UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Variabilidade temporal e intraespecífica dos
constituintes voláteis das folhas de *Lychnophora ericoides* Mart.**

Daniel Petinatti Pavarini

Ribeirão Preto

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Variabilidade temporal e intraespecífica dos
constituintes voláteis das folhas de *Lychnophora ericoides* Mart.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas para
obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientado: Daniel Petinatti Pavarini

Orientador: Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Ribeirão Preto

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Pavarini, Daniel Petinatti

Variabilidade temporal e intraespecífica dos constituintes voláteis das folhas de *Lychnophora ericoides* Mart. Ribeirão Preto, 2011.

126 p. : il. ; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Produtos Naturais e Sintéticos.

Orientador: Lopes, Norberto Peporine.

1. *Lychnophora ericoides*. 2. CG-EM. 3. HS-SPME. 4. Terpenos. 5. Variabilidade Química.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Daniel Petinatti Pavarini

Variabilidade temporal e intraespecífica dos constituintes voláteis das folhas de *Lychnophora ericoides* Mart.

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Farmacêuticas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Produtos Naturais e
Sintéticos.

Orientador(a): Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

**Dedico este trabalho a arte, aquela que me dá
“a fome e a sede”, e ainda aos meus pais Elenir
e Airton pelo dom da vida.**

Agradecimentos

Ao Prof. Norberto quero registrar que sou grato desde o primeiro dia de trabalho pela motivação e oportunidade oferecidas com enorme frequência. Já ao amigo Betão, a minha gratidão, pela confiança e amizade, ficará nestas palavras expressa: Valeu, cara!

Aos Professores João e Zé Callegari e a todos os Professores do NPPNS pelo apoio sempre providencial que me ofereceram durante estes últimos 2 anos, cercando-me de conhecimento e interesse pela Ciência.

A Cris, ao Tomaz, ao Diógenes e a todos os funcionários do NPPNS pelo apoio não apenas técnico, mas também humano e amigo de todos os dias durante os experimentos e as horas de confraternização.

Aos doutores Daniel Callejon e Denis Soares e aos professores Fernando Cunha e Glória Emília pela realização dos biosensaís.

Ao doutor Adrian e aos professores Mônica, Fernando e Massuo pelas pertinentes sugestões em relação a metodologia e espectroscopia.

Ao meu amigo Cesar e a seus irmãos do Paraíso Perdido, em Minas, pela gentileza com a qual me receberam em vosso pedaço do Céu para trabalhar.

Aos integrantes das equipes de coleta que se disponibilizaram a enfrentar acampamentos com chuva, noites frias e dias quentes de trabalho além dos riscos de “topar com uma onça preta”.

Aos alunos iniciação Elidia, Arthur e Leandro, pelo acompanhamento durante os experimentos nas bancadas do laboratório.

Ao Junio Leonel Mendes da “Furnas Hidrelétricas” pelos dados pluviométricos que foram de grande valia para o estudo.

Ao CNPq pela bolsa concedida.

Agradeço a Thaís e ao Caue pelas horas de convivência com o paizão que vocês tão carinhosamente abriram mão para que esta dissertação fosse escrita.

Aos meus companheiros de pós-graduação, Dayana e Leandro por todos os momentos de angústia, revolta e principalmente de alegria que os estudos e os trabalhos nos proporcionaram e que nós pudemos e soubemos compartilhar.

Ao Vessecchi, ao Lucas, ao Eduardo e a todos os meus queridos colegas dos laboratórios do NPPNS pelas horas divididas de forma tão bem humorada e regadas a cafés, ou a “frangos na telha”.

Agradeço a Universidade de São Paulo por ter me propiciado uma nova visão do Mundo.

Agradeço a Elenir por acreditar em mim há quase 28 anos ininterruptamente. Por sempre ter me incentivado, me motivado, e me amado.

Agradeço a Natalia por me amar, mas principalmente por me permitir amá-la. Só ela deve saber o quão difícil é desarmar este homem. Agradeço pela nossa vida, ainda recente, mas certamente longa e feliz.

Agradeço a Airton e Saulo, os melhores homens do mundo, mesmo com tantos defeitos. Obrigado pelas discussões prolongadas e encharcadas.

A todos os meus queridos da nossa “grande família” a qual chega a incluir tios e tias com pais diferentes. O meu muito obrigado pelo apoio permanente e pelas lições sem as quais provavelmente ainda estaria eu na praçinha Tóquio aos domingos.

A todos os meus bons amigos, onde quer que estejam. Sei que vocês são como estrelas, pois “nem sempre os vejo, mas sei que estão lá”.

**“O homem que deixou de ser escravo da
natureza, tampouco é o senhor que nela
espera, deveria ser guardião.” Benedito Nunes**

Resumo

PAVARINI, D.P. **Variabilidade temporal e intraespecífica dos constituintes voláteis das folhas de *Lychnophora ericoides* Mart.** 2011. 126 f. Dissertação de Mestrado-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

A literatura relata variações espaciais e rítmicas para diferentes classes de metabólitos secundários, entretanto os dados são consistentes apenas para espécies que ocorrem em áreas temperadas. *Lychnophora ericoides* Mart. tem sido muito empregada popularmente como antiinflamatório e analgésico. É relatado o uso de suas partes aéreas pela população que vive nas proximidades de seu habitat em tratamentos de lesões cutâneas. *L. ericoides* representa uma das várias espécies da família Asteraceae endêmicas ao cerrado que biossintetizam uma ampla gama de terpenoides. Embora pouco estudada, sabe-se que a fração volátil de suas partes aéreas apresenta constituição terpênica. O presente estudo tem como objetivo determinar a constituição química desta fração volátil por meio de técnicas brandas de pré-concentração dos analitos e avaliar a variabilidade química desta fração a nível intraespecífico e temporal. Dessa forma, as coletas foram realizadas durante um período de 15 meses e utilizou-se HS-SPME e CG-EM para avaliar as amostras coletadas. Um método para pré-concentração dos compostos voláteis (COVs) foi desenvolvido a partir da otimização dos parâmetros para obtenção do equilíbrio termodinâmico em HS-SPME. A obtenção de cromatogramas, determinação de índices de retenção relativos e aquisição de espectros de massas com ionização por elétrons possibilitaram a identificação de 7 monoterpenos majoritários e 1 sesquiterpeno também majoritário. Foi detectada a presença de um sesquiterpeno em amostras analisadas por HS-SPME que não se faz presente, de forma majoritária, nos óleos essenciais. Foram também realizados processos de hidrodestilação para obtenção dos óleos essenciais. A partir dos óleos essenciais foi possível isolar 3 sesquiterpenos por meio de CCDP e, para duas dentre estas substâncias, foram adquiridos dados de IES-EM, IES-EM/EM e RMN uni e bidimensionais. Um sesquiterpeno inédito na literatura, o acetato de bisabolila, teve sua estrutura elucidada por meio dos espectros adquiridos a partir de material isolado. Este sesquiterpeno, que está presente em preparados hidroalcoólicos utilizados na medicina popular, foi submetido a ensaios para avaliação do potencial anti-nociceptivo *in vitro* utilizando-se macrófagos peritoneais de ratos Wistar. Os resultados sugerem um efeito analgésico, devido à redução dos mediadores IL-1 β e TNF- α , os quais estão envolvidos no processo da dor inflamatória. É possível observar uma uniformidade intraespecífica nos níveis de COVs e uma tendência de comportamento a nível intraplanta e a nível circadiano de apresentar percentuais mais elevados de sesquiterpenos em épocas chuvosas e quentes (verão) e, analogamente, menos elevados em períodos de menor temperatura ambiente (durante a noite). Nas folhas mais jovens há uma tendência destes valores relativos serem mais elevados.

Palavras chave: 1. *Lychnophora ericoides*. 2. CG-EM. 3. HS-SPME. 4. Terpenos. 5. Variabilidade Química.

Abstract

PAVARINI, D.P. **Time-scale and intraspecific variability of *Lychnophora ericoides* Mart. leave's volatile constituents.** 2011. 126 p. Master's Dissertation-Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Literature does report spatial and time-scale shifting on several secondary metabolites, despite such data are relevant just for those species which occurs within a temperate climate region. *Lychnophora ericoides* Mart. has been widely used as a folk medicine against pain and inflammation process. Off the region where is located *L. ericoides*'s habitat there is an evident and extensive use of its aerial parts by the people which live there in order to treat several types of skin wound. In Brazilian Cerrado, tropical savanna, there are large numbers of endemic Asteraceae species, including *L. ericoides*, which are capable of biosynthesizing a wide variety of terpenoids. Considering the poor number of studies carried out concerning the *L. ericoides* volatile fraction it can be said that this fraction is quite formed by different classes of terpenes. This work aims to find the chemical composition of *L. ericoides* volatile fraction by using soft pre concentration techniques of compounds and investigate the chemical variability at time-scale and intraspecific levels. Thus, harvests were done throughout a 15 months period and HS-SPME & GC-MS were used to analyze the samples. A pre concentration method was developed by reaching optimum values for parameters involving the ideal thermodynamic equilibrium in HS-SPME. The chromatograms acquisition, relative retention index calculations and electron ionization mass spectra acquisition, combined, made possible the identification of 7 monoterpenoids and 1 sesquiterpenoid. A particular sesquiterpene could have been identified only by using HS-SPME pre concentration and not by essential oils analysis. Using prep-TLC of the essential oils, 3 sesquiterpenes were isolated. The ESI-MS, ESI-MS/MS as well as 1D and 2D NMR spectra of two of these three isolated terpenes were acquired. One new sesquiterpene, bisabolyl acetate, had its structure elucidated at the end of this process. This sesquiterpene is displayed in hydro alcoholic extracts used in folk medicine. Bioassays for *in vitro* antinociceptive investigations using peritoneal macrophages isolated of Wistar rats were done using the bisabolyl acetate. Results on this investigation may suggest that a pain relief effect could be described for this compound, every since it was possible to notice a reducing on IL-1 β and TNF- α levels. These two cytokines are involved in inflammatory pain. A regular pattern on volatile levels within the samples could've been noticed, and it is what could be called an intraspecific uniformity. A trend on both intraplant and circadian investigations could've been observed and what tends to happen is a rising on sesquiterpenes level by the period of year which the rainy and warm summer is governing the weather. In an opposite way these levels tend to diminish by the period in which the lower temperatures are registered (throughout the night time). Among the younger leaves there is also a trend on higher sesquiterpenes levels to occur.

Key words: 1. *Lychnophora ericoides*. 2. GC-MS. 3. HS-SPME. 4. Terpenes. 5. Chemical Variability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura dos terpenos de interesse na indústria farmacêutica.....	24
Figura 1 (continuação): Estrutura dos terpenos de interesse na indústria farmacêutica.....	25
Figura 2: Estruturas do esqueleto carbônico bisabolano e dos estereoisômeros do bisabolol.....	26
Figura 3: As 4 etapas fundamentais da biogênese dos terpenoides.....	27
Figura 4: Capítulo floral de <i>Lychnophora ericoides</i>	28
Figura 5: Indivíduo adulto de <i>Lychnophora ericoides</i>	28
Figura 6: Sesquiterpenoides majoritários em frações voláteis de <i>Lychnophora ericoides</i>	31
Figura 7: Representação gráfica do princípio de equilíbrio termodinâmico trifásico.....	33
Figura 8: Total de trabalhos que utilizam SPME apontado pela base de dados Scopus.....	35
Figura 9: Representação gráfica da fibra de SPME com filme de PDMS.....	35
Figura 10: Dados pluviométricos da região em que foram realizadas as coletas.....	43
Figura 11: Dados climáticos obtidos pelo IRRCS que demonstram a ocorrência das estações verão-chuvoso e inverno-seco na região onde foram realizadas as coletas.....	43
Figura 12: Classificação de ramos de acordo com a idade das folhas.....	45
Figura 13: equação de Kovats utilizada no calculo do IRR.....	47
Figura 14: Estratégias de identificação dos compostos voláteis presentes na folhas de <i>Lychnophora ericoides</i>	48
Figura 15: Correção manual da integração dos sinais dos cromatogramas.....	49

Figura 16: Cromatograma do preparado hidroalcoólico concentrado evidenciando a ocorrência do acetato de bisabolila.....	51
Figura 17: Cromatograma destacando os sinais das substâncias majoritárias.....	55
Figura 18: Estruturas químicas dos metabólitos identificados em <i>Lychnophora ericoides</i>	57
Figura 19: Espectro IE-EM do sinal 1.....	58
Figura 20: Espectro IE-EM do sinal 2.....	58
Figura 21: Espectro IE-EM do sinal 3.....	59
Figura 22: Espectro IE-EM do sinal 4.....	59
Figura 23: Espectro IE-EM do sinal 5.....	59
Figura 24: Espectro IE-EM do sinal 6.....	60
Figura 25: Espectro IE-EM do sinal 7.....	60
Figura 26: Espectro IE-EM do sinal 8.....	61
Figura 27: Espectro IE-EM do sinal 9.....	61
Figura 28: Espectro IE-EM do sinal 10.....	62
Figura 29: Espectro de massas do sinal 10 obtido em IES no modo <i>scan</i>	63
Figura 30: Comparação dos deslocamentos químicos dos núcleos de ^{13}C do α -cadinol à esquerda e dos valores atribuídos a hipótese do 11,13-dehidrocadinol evidenciando diferenças que negam a hipótese.....	66
Figura 31: Representação com setas das correlações a longa distância observadas no mapa de correlações HMBC da substância 10.....	67
Figura 32: Espectro IE-EM para a substância 11.....	68
Figura 33: Espectro de massas da substância 11 no modo <i>scan</i>	69

Figura 34: Esquema de setas das correlações observadas no mapa de contornos HMBC da substância 11	72
Figura 35: Valores observados para a relação Ses/Mon que foram utilizados para definição da temperatura ideal (75°C) de banho para a extração HS-SPME.....	74
Figura 36: Intensidade do sinal no cromatograma (esquerda) e relação Ses/Mon (direita) ao longo do período de armazenamento em freezer no laboratório.....	75
Figura 37: Comportamento dos metabólitos majoritários em diferentes folhas dos capítulos florais.....	76
Figura 38: Comportamento dos metabólitos majoritários em diferentes folhas dos botões florais.....	77
Figura 39: Relação Ses/Mon em diferentes folhas do capítulo floral (esquerda) em comparação com as diferentes folhas do botão floral (direita).....	77
Figura 40: Valores da relação Ses/Mon observados em experimentos de variação intraplanta durante cinco coletas realizadas entre 2009 e 2010.....	79
Figura 41: Intensidade de sinal nos cromatogramas das amostras de coleta em período circadiano (março, 2009).....	80
Figura 42: Valores observados para a relação Ses/Mon durante as coletas do período circadiano em diferentes datas de coleta.....	81
Figura 43: Gráfico em perspectiva comparando os perfis circadianos durante o fim do verão (março de 2009) e o fim do inverno (agosto de 2009).....	81
Figura 44: Gráfico comparando o comportamento da temperatura ambiente durante os períodos circadianos do fim do verão (março de 2009) e do fim do inverno (agosto de 2009).....	82
Figura 45: Gráfico em linhas que demonstram o comportamento da relação Ses/Mon em seis períodos distintos de um intervalo de 18 meses.....	83

Figura 46: Intensidade de sinal das 11 substâncias majoritárias do estudo observadas em análises de óleo essencial de Maio, Agosto e Novembro de 2009.....	85
Figura 47: Valores observados para a relação Ses/Mon dos óleos essenciais em diferentes meses do ano de 2009.....	85
Figura 48: Efeitos do acetato de bisabolila sobre os níveis de TNF - α produzidos por macrófagos peritoneais de ratos estimulados com LPS.....	86
Figura 49: Efeitos do acetato de bisabolila sobre os níveis de IL-6 produzidos por macrófagos peritoneais de ratos estimulados com LPS.....	87
Figura 50: Efeitos do acetato de bisabolila sobre os níveis de IL-1 β produzidos por macrófagos peritoneais de ratos estimulados com LPS.....	88
Figura 51: Efeitos do acetato de bisabolila sobre os níveis de NO produzidos por macrófagos peritoneais de ratos estimulados com LPS.....	89
(apêndice) Figura 1: Espectros de massas da molécula protonada de m/z 221 referente ao sinal 10 (MS/MS) ESI-qTOF, modo positivo).....	105
(apêndice) Figura 2: Espectro RMN de ^1H para substância 10 (300MHz, CDCl_3).....	106
(apêndice) Figura 3: Espectro RMN de ^{13}C para substância 10 (75MHz, CDCl_3).....	108
(apêndice) Figura 4: Espectro DEPT 135° para substância 10 (75MHz, CDCl_3).....	110
(apêndice) Figura 5: Mapa de contornos HMQC para substância 10 (300MHz, CDCl_3).....	110
(apêndice) Figura 6: Mapa de contornos HMBC para substância 10 (300MHz, CDCl_3).....	112
(apêndice) Figura 7: Espectro RMN de ^1H para substância 11 (500MHz, CDCl_3).....	113
(apêndice) Figura 8: Espectro RMN de ^{13}C para substância 11 (125MHz, CDCl_3).....	115
(apêndice) Figura 9: Espectro DEPT 135° para substância 11 (125MHz, CDCl_3).....	116

(apêndice) Figura 10: Mapa de contornos HMQC para substância 11 (500MHz, CDCl ₃).....	117
(apêndice) Figura 11: Espectros MS/MS do íon <i>m/z</i> 281 (ESI-qTOF; modo positivo).....	119
(apêndice) Figura 12: Mapa de Contornos HMBC para substância 11 (500MHz, CDCl ₃).....	120
(apêndice) Figura 13: Comparação de cromatogramas das fibras SPME de diferentes polímeros de revestimento.....	123
(apêndice) Figura 14: Comparação de cromatogramas das fibras SPME PDMS expostas ao <i>Headspace</i> durante diferentes intervalos de tempo à mesma temperatura (75° C).....	124
(apêndice) Figura 15: Cromatogramas dos compostos recuperados das bandas da CCDP....	125
(apêndice) Figura 16: Comparação entre os cromatogramas de BF1 dos campos de coleta “paraíso” (P1) e “pedreira” (P2) coletados em maio de 2009.....	126

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Parâmetros físicos utilizados na integração dos sinais cromatográficos.....	47
Tabela 2: Identificação dos sinais que correspondem aos metabólitos majoritários dos cromatogramas.....	56
Tabela 3: Relação dos sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C (75MHz, CDCl_3) e DEPT 135° da amostra isolada em CCDP referente ao sinal 10	46
Tabela 4: Deslocamentos químicos da substância 10 observados nos espectros de RMN de ^{13}C (75MHz, CDCl_3) e ^1H (300MHz, CDCl_3).....	65
Tabela 5: Correlações entre hidrogênios e carbonos observadas no mapa de contornos HMBC da substância 10 (300MHz, CDCl_3).....	66
Tabela 6: Deslocamentos químicos (δ) da substância 11 observados nos espectros de RMN de ^{13}C e ^1H (500MHz, CDCl_3).....	68
Tabela 7: Comparação dos deslocamentos (δ) ^{13}C entre a substância 11 (obtido em 125MHz) e o poliglutal monoacetato (obtido em 50MHz).....	70
Tabela 8: Correlações entre hidrogênios e carbonos observadas no mapa de contornos HMBC da substância 11 (500MHz, CDCl_3).....	71
Tabela 9: Obtenção de óleo essencial em três coletas de 2009.....	84
(apêndice) Tabela 1: Tempo de retenção de cada um dos 17 <i>n</i> -alcanos utilizados na determinação dos IRRs de cada analito analisado.....	104

LISTA DE ABREVIATURAS

COVs	Compostos Orgânicos Voláteis
HS-SPME	<i>Headspace - Solid Phase Micro Extraction</i>
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer.</i>
HMBC	<i>Heteronuclear Multiple Bond Correlation</i>
HMQC	<i>Heteronuclear Multiple Quantum Correlation</i>
CG-EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas
IE-EM	Espectrometria de massas com ionização por elétrons
IES-EM	Espectrometria de Massas com ionização por <i>electrospray</i>
IPP	Difosfato de isopentila
FPP	Difosfato de farnesila
GPP	Difosfato de geranila
TNF-α	<i>Tumor necrosis factor-α</i>
IL-β	Inter leucina β
IL-6	Inter leucina 6
PDMS	Polidimetilsiloxano
PDMS/DVB	Polidimetilsiloxano/divinilbenzeno
CAR/PDMS	Carboxeno/polidimetilsiloxano
LPS	Lipopolissacarídeo
DMSO	Dimetilsulfoxido

IDH	Índice de deficiência de hidrogênio
<i>m</i>MenS	<i>meta</i> -mentano sintase
<i>p</i>MenS	<i>para</i> -mentano sintase
CamS	canfano sintase
BisS	bisabolano sintase
CyS	cariofilano sintase
MMA	Ministério do meio ambiente
EM	espectrometria de massas
GMT	<i>Greenwich Mean Time</i>
eV	elétron volt
IRR	índice de retenção relativa
Ses/Mon	Razão entre a soma das áreas dos sesquiterpenos majoritarios nos cromatogramas e a soma das áreas dos monterpenos no cromatograma
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
δ	Deslocamento químico em ppm
m/z	Relação massas/carga
^{13}C	Isótopo 13 do Carbono
^1H	Próton
CDCl_3	Clorofórmio deuterado
(m)	Multiplete
(s)	Singleto
(s)l	Singleto largo
(dd)	Duplo dubleto
J_{AB}	Constante de acoplamento entre os Núcleos A e B
J_{AC}	Constante de acoplamento entre os Núcleos A e C
MHz	Megahertz [10^6 unidades de frequência (ciclos por segundo)]
λ	Comprimento de onda
®	Marca registrada comercial

Sumário

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	viii
Lista de abreviaturas	ix
Lista de símbolos	xi
1. INTRODUÇÃO	22
1.1 Biodiversidade e quimiodiversidade	23
1.2 <i>Lychnophora ericoides</i>	28
1.3 Variabilidade rítmica e espacial	31
1.4 <i>Headspace – Solid Phase Micro Extraction</i> (HS-SPME) e Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)	32
1.5 Citocinas mediadoras da algesia e nocicepção	35
2. OBJETIVOS	38
3. MATERIAL E MÉTODOS	40
3.1 Amostragens em campo de coleta	42
3.1.1 Indivíduos paraíso	44
3.1.2 Indivíduos pedreira	44
3.1.3 Coleta no período circadiano	44
3.1.4 Coleta do material para estudo intraplanta	45
3.1.5 Coleta do material para isolamento de óleo essencial	45
3.2 Análise do material vegetal amostrado	46
3.2.1 Método de HS-SPME	46
3.2.2 Óleos Essenciais	47
3.2.3 Identificação dos compostos voláteis de <i>Lychnophora ericoides</i>	47
3.2.4 Determinação dos percentuais relativos dos analitos	48
3.2.5 Avaliação da estabilidade das amostras armazenadas em freezer	50
3.3 Isolamento de Sesquiterpenos	50
3.4 Análises por Ressonância Magnética Nuclear	51

3.5 Avaliações de biotividade	51
3.5.1 Animais	52
3.5.2 Isolamento de macrófagos peritoneais dos animais	52
3.5.3 Determinação de produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α ; IL-6 e IL-1 β)	52
3.5.4 Determinação da produção de NO	53
3.5.5 Análise estatística	53
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1 Identificação dos picos cromatográficos majoritários	55
4.1.1 Substância 1	58
4.1.2 Substância 2	58
4.1.3 Substância 3	58
4.1.4 Substância 4	59
4.1.5 Substância 5	59
4.1.6 Substância 6	59
4.1.7 Substância 7	60
4.1.8 Substância 8	60
4.1.9 Substância 9	61
4.1.10 Substância 10	62
4.1.11 Substância 11	67
4.2 Otimização das condições de pré-concitração por HS-SPME	73
4.3 Isolamento dos sesquiterpenos	75
4.4 Avaliação da variação intraplanta	76
4.5 Variação intraespecífica	78
4.6 Variação circadiana	79
4.7 Óleos essenciais	83
4.8 Efeito do acetato de bisabolila na liberação de mediadores inflamatórios <i>in vitro</i>	86
5. CONCLUSÃO	91
6. REFERÊNCIAS	94
7. Apêndice	103

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Biodiversidade e quimiodiversidade

A magnitude da biodiversidade brasileira é tema clássico e recorrente tanto em artigos científicos como na mídia falada e escrita. Os extensos trabalhos de levantamento florístico feitos por naturalistas como Carl Friedrich Philipp von Martius, August Wilhelm Eichler e Ignatz Urban, que resultaram na imensa obra *Flora Brasiliensis*, foram os primeiros levantamentos deste patrimônio e datam do século XIX. Entretanto, esta megabiodiversidade brasileira não é conhecida com precisão, tal a sua complexidade. Estima-se entre dois a dez milhões o número de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos no planeta sendo que, segundo tal estimativa, o Brasil seria detentor de 15 a 20% desta biodiversidade (CDB, 2006). Recentemente, esforços mútuos de entidades de diversos setores como institutos de Ensino e Pesquisa (Universidade de Campinas-SP e O Instituto Jardim Botânico do Rio de Janeiro-RJ) e organismos do Poder Público [Centro Nacional de Conservação da Flora (CNCFlora)] resultaram na atualização do catálogo da flora brasileira. A base de dados criada sob a designação “Lista de Espécies da Flora do Brasil”, conta com um sistema que abriga a cifra de 94.141 táxons, entre nomes aceitos e sinônimos (JBRJ, 2010). São 40.982 espécies da flora brasileira, sendo 3.608 de fungos, 3.495 de algas, 1.521 de briófitas, 1.176 de pteridófitas, 26 de gimnospermas e 31.156 de angiospermas.

Do ponto de vista da bioprospecção, constata-se que esta vastidão de organismos convivendo em habitats preservados fornece-nos uma gigantesca fonte de moléculas, a qual muitas vezes é denominada de “quimiodiversidade” (GERSHENZON; DUDAREVA, 2007). As propriedades físico-químicas, biológicas e ecológicas de moléculas oriundas do metabolismo secundário dessas plantas devem ser objeto de estudos de forma rápida considerando o recente e crescente aumento dos danos a este patrimônio causados pela ação antrópica (MCCHESENEY *et al.*, 2007).

Os metabólitos secundários, segundo Schultz (2002), tem sua ocorrência na natureza atribuída a uma relação de conflito bioquímico (*biochemical warfare*) entre a planta e os fatores bióticos e abióticos de influência sobre seu metabolismo que se fazem presentes no habitat. Afirma-se ainda que este seja um fenômeno dinâmico compreendido em uma escala de tempo nunca menor que a do processo evolutivo.

Os metabólitos secundários ou produtos naturais são produzidos por vias biossintéticas derivadas do metabolismo primário dos organismos. A classe mais quimiodiversa de produtos naturais é a dos terpenos. O nome desta classe de produtos naturais é oriundo do termo alemão “*Turpentin*”, o qual designa a fração volátil da resina produzida nas cutículas dos caules de espécies do gênero *Pinus* (COPPEN; HONE, 1995). Estes compostos se tratam de hidrocarbonetos saturados que após serem funcionalizados pela maquinaria enzimática dos organismos biossintetizadores fornecem os terpenoides ou isoprenoides. Estas moléculas podem apresentar diversas funções orgânicas como alcoóis, aldeídos, cetonas, ácidos, fenóis, óxidos, peróxidos, furanos, lactonas, acetais, éteres e ésteres. Estas estruturas são derivadas de diversas combinações de unidades prenílicas de 5 carbonos, o isopreno. A “regra do isopreno” foi postulada por Otto Wallach, e o levou a ser laureado com o prêmio Nobel em Química no ano de 1910. A teoria de Wallach versava sobre a possibilidade biogenética de oligomerização de unidades difosforiladas de isoprenos para formar diferentes classes de terpenos (CHRISTMAN, 2010). Dentre os compostos mais voláteis desta classe estão os mono e sesquiterpenos (10 e 15 átomos de carbono, respectivamente). A maior parte dos mais de 30.000 terpenoides (BREITMAIER, 2006) já relatados na literatura são produtos do metabolismo secundário. Entre as moléculas de maior interesse (**Figura 1**) para a indústria farmacêutica pode-se citar o monoterprenoide (C_{10}) limoneno que incluído na dieta diária age como anticancerígeno (CROWELL; GOLD, 1994), o sesquiterpenoide (C_{15}) antimalárico artemisinina (VAN GELDRE *et. al*, 1997) e o diterpeno (C_{20}) anticancerígeno taxol (HOLMES *et al.* 1995 *apud* TRAPP; CROTEAU, 2001).

Figura 1: Estrutura dos terpenos de interesse na indústria farmacêutica.

Figura 1 (continuação): Estrutura dos terpenos de interesse na indústria farmacêutica.

Os terpenoides são derivados do difosfato de isopentila (IPP) sendo que nas plantas seu principal precursor é sintetizado no citosol pela via mista do acetato/mevalonato (QURESHI; PORTER 1981 *apud* TRAPP; CROTEAU, 2001; NEWMAN; CHAPPELL 1999), pela qual os sesquiterpenos são formados.

De acordo com Croteau e colaboradores(2002) a biossíntese dos terpenoides a partir do mais simples metabólito primário pode ser basicamente dividida em 4 etapas (**Figura 3**): (a) síntese do precursor fundamental IPP; (b) fusões repetitivas de IPP para formação de séries homólogas de prenilas difosfatadas que serão precursores de diferentes classes de terpenoides; (c) elaboração destes prenildifosfatos alílicos que formam os esqueletos dos terpenoides; e (d) modificações enzimáticas secundárias (majoritariamente reações redox) que fazem surgir as funções orgânicas das moléculas e a quimiodiversidade desta família de produtos naturais.

Dentre os diversos tipos de esqueletos carbônicos de terpenos pode-se destacar os esqueletos do tipo bisabolano. O mais comumente conhecido destes derivados bisabolanos é o α -bisabolol. Foi primeiramente isolado da camomila (*Matricaria chamomilla*) (JAKOVLEV *et al.*, 1979) que é uma espécie também da família Asteraceae. O α -bisabolol tem 2 centros quirais, portanto 4 isômeros possíveis (**Figura 2**). Esse metabólito consta na literatura como um dos sesquiterpenos com maior número de bioatividades descritas como, por exemplo, anticancerígeno, anti-inflamatório e analgésico (KAMATOU; VILJOEN 2010).

Figura 2: Estruturas do esqueleto carbônico bisabolano e dos estereoisômeros do bisabolol.

Figura 3: As 4 etapas fundamentais da biogênese dos terpenoides. Etapa (c) ilustra a ciclização das unidades prenilicas difosfatadas, por enzimas específicas, em esqueletos ciclohexânicos (enzimas *mMenS*; *pMenS*), monoterpeneo bicíclico (enzima *CamS*), bisabolano (enzima *BisS*) e cariofilano (enzima *CyS*). Etapa (d) ilustra a funcionalização do campesterol por complexos enzimáticos da família CYP85 gerando brassinolídeos (HAMBERGEN; BOHLMANN, 2006).

1.2 *Lychnophora ericoides*

Uma das maiores famílias de Angiospermae é Asteraceae, contando com suas 17 tribos. A estimativa de sua grandeza é da ordem de 24000 espécies, as quais devem ocorrer entre 1600 a 1700 gêneros, o que contabiliza de 8 a 10% das angiospermas (FUNK *et al.*, 2009). No

Figura 4: Capítulo floral de *Lychnophora ericoides*. Fumas-MG, Março de 2009.

Brasil a família está representada por 2000 espécies e 250 gêneros sendo um grande número de espécies endêmicas, especialmente no cerrado (SOUZA & LORENZI, 2008 *apud* NAKAJIMA *et al.* 2009)

A grande diversidade morfológica e a característica cosmopolita de Asteraceae é refletida em sua peculiar habilidade de biossintetizar uma ampla gama de metabólitos secundários incluindo

monoterpenos, diterpenos, triterpenos, sesquiterpenos e lactonas sesquiterpênicas além de flavonoides, ácidos fenólicos, benzofuranos e alcaloides pirolizidínicos (alcaloides restritos as tribos Senecioneae e Eupatorie) (FUNK *et al.*, 2009). Dada esta grande diversidade de perfis químicos, os estudos fitoquímicos de Asteraceae figuram entre alguns dos mais relevantes dados utilizados na sistemática da família. Esta interpretação dos perfis químicos com vista em estudos evolutivos de plantas é denominada quimiosistemática (GOTTLIEB, 1982).

Vernonieae é diferenciada das outras tribos de Asteraceae com base na morfologia dos capítulos homógamos (**Figura 4**) de flores hermafroditas (MANSANARES, 2004). É representada por cerca de 40 gêneros e 450 espécies, sendo o Brasil reconhecido como um de seus principais centros de ocorrência. Apesar de sua vasta distribuição tropical (Américas, África e Austrália), apresenta muitas vezes espécies com um endemismo pronunciado para

Figura 5: Indivíduo adulto de *Lychnophora ericoides*. São João Batista do Glória- MG, Maio de 2009.

uma dada localidade (SEMIR, 1991).

Lychnophorinae, subtribo pertencente à tribo Vernonieae, destaca-se por sua distribuição restrita ao território brasileiro. Dentre os estudos fitoquímicos realizados com espécies da subtribo 16,9% do relato de moléculas se refere à flavonoides sendo flavonóis (37,4%) e flavonas (38,7%) os predominantes (KELES *et al.*, 2010). Esta tribo compreende 9 gêneros e 81 espécies, tendo como metabólitos majoritários lactonas sesquiterpênicas (LSTs) do tipo furanoheliangolido, goyazensolideo, eudesmanolideo e eremantholideo (FUNK *et al.* 2009; BORELLA *et al.* 1998). Entre os terpenoides, há uma predominância de sesquiterpenos (65,8%), presentes em todas as espécies da subtribo (KELES *et al.*, 2010). É comum o relato de derivados de cariofileno nos estudos com extratos de baixa polaridade e nos poucos estudos sobre óleos essenciais em espécies da tribo Lychnophoriae (KELES *et al.*, 2010) como, por exemplo, em *Eremanthus erythropappus* (SOUSA *et al.*, 2008) e em *Lychnophora ericoides* (VICHENWSKI *et al.* 1980 & BOHLMANN *et al.* 1980).

Espécies do gênero *Lychnophora*, são classificadas nessa subtribo e destacam-se por estarem entre as plantas da família Asteraceae utilizadas na medicina popular brasileira, assim como a carqueja (*Baccharis trimera*), o guaco (*Mikania glomerata*) e o boldo brasileiro (*Vernonia condensata*), por exemplo.

A literatura registra uma série de atividades biológicas de espécies de *Lychnophora*, tais como tripanocida [*L. granmogolense*, *L. passerina*, *L. vilosissima* (GRAEL *et al.*, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 1996; CHIARI *et al.*, 1996; CHIARI *et al.*, 1991)], analgésica [*L. ericoides* (CERQUEIRA *et al.*, 1987)], antibacteriana e antifúngica [*L. salicifolia* (JORDÃO *et al.*, 1997; MIGUEL *et al.*, 1996)], moluscocida [*L. brunioides* (BAZON *et al.*, 1997)], antiinflamatório [*L. ericoides* (SANTOS *et al.*, 2010)] e anticonvulsivante [*L. rupestris* e *L. staavioides* (CONTINI *et al.*, 2008)].

A espécie *Lychnophora ericoides* (**Figura 5**) é, dentre as espécies do gênero, a mais utilizada na medicina popular, na forma de extrato hidroalcoólico de suas partes aéreas. *L. ericoides* possui grande polimorfismo, podendo ser facilmente confundida com outras do mesmo gênero, principalmente *L. pseudovilosissima*, *L. vilosissima* e *L. salicifolia*, e cresce em locais xéricos, como campos pedregosos a arenosos-gramíneos, ou entre serrotes (SEMIR, 1991).

-*Lychnophora ericoides* consta na lista oficial do Ministério do Meio Ambiente (MMA, 2008) como “ameaçada de extinção”. A lista foi elaborada a partir do relatório apresentado ao ministério pelos pesquisadores da fundação Biodiversitas, Belo Horizonte MG. As conclusões da

fundação foram apresentadas durante workshop realizado na capital mineira em 2005 e enquadravam *L. ericoides* na categoria “Ameaçada”. Entretanto esta categoria possui três níveis e *L. ericoides* foi considerada “vulnerável”, sendo este o nível mais baixo de ameaça. Portanto, é possível afirmar que a espécie está ameaçada principalmente por sua massiva extração por parte dos “erveiros” e “raizeiros” nativos da região de seu habitat (LOPES, 2000). Contudo, a afirmação de que existe alto risco de extinção destoa da estratificação de riscos traçada pelos taxonomistas.

Os estudos fitoquímicos envolvendo *L. ericoides* se restringem praticamente a investigação dos componentes não voláteis, ou componentes fixos, e revelam uma composição química majoritária de lactonas sesquiterpênicas e flavonoides em frações de média polaridade de extratos das folhas (SAKAMOTO *et al.*, 2003 ;BORELLA *et al.*, 1998) enquanto encontram-se em frações polares os ácidos cafeoilquínicos e as di-C-glicosilflavonas (GOBBO-NETO *et al.*, 2005; SANTOS *et al.*, 2005). Segundo Borsato e colaboradores (2000) as raízes desta espécie apresentam lignanas.

Dentre os poucos trabalhos publicados sobre os COVs das partes aéreas de *Lychnophora ericoides*, destaca-se que são observados sesquiterpenos e monoterpenos em seu óleo essencial (CURADO *et.al.*, 2006; COSTA *et.al.*, 2008) e em relação ao potencial bioativo, o óleo essencial de *L. ericoides* que ocorrem no município de São João batista do Glória – MG apresentam atividade acaricida (BALDIN, *et al.* 2010). Dentre os sesquiterpenos majoritários encontram-se α -cadinol, (*E*)-nerolidol, óxido de cariofileno e uma série de compostos que derivam do esqueleto carbônico do tipo bisabolano (**Figura 6**). Majoritariamente os bisabolanos são α -bisabolol, *ar*-diidro-turmerona, *ar*-curcumeno e *ar*-turmerol.

Figura 6: Sesquiterpenoides majoritários em frações voláteis de *Lychnophora ericoides*.

É evidenciado um polimorfismo químico envolvendo os componentes majoritários do óleo essencial entre duas populações **A** e **B** de *Lychnophora ericoides* (CURADO *et al.*, 2006). Os autores observaram a presença significativa de α -cadinol e α -bisabolol no óleo essencial de plantas **A** (população com espécies exalando odor), enquanto a população **B** (indivíduos que não exalam odor) apresentou como componentes majoritários o *ar*-diidro-turmerona e (*E*)-nerolidol. Empregando métodos estatísticos o autor evidencia sazonalidade, nas estações de inverno seco (maio a setembro) e verão úmido (novembro a março) do Cerrado.

1.3 Variabilidade rítmica e espacial

O metabolismo secundário de plantas pode variar consideravelmente dependendo de vários fatores como radiação UV, composição atmosférica, herbivoria e ataque de patógenos, altitude do habitat, ritmo circadiano e sazonalidade, entre outros, sendo que a constância de metabólitos secundários é praticamente uma exceção (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Em espécies medicinais brasileiras, foi observado que o óleo essencial de *Virola surinamensis* apresenta nas folhas uma concentração constante de 0,5% (v/m) durante o dia e seus constituintes majoritários apresentam variações sazonais (LOPES *et al.*, 1997). Em fevereiro, com a chegada das chuvas (inverno na Floresta Amazônica), os níveis de monoterpenos se apresentam em torno de 28% ao amanhecer e caem para cerca de 15% ao

anoitecer, voltando aos níveis originais durante a noite. Em *Ocimum gratissimum*, a concentração do metabólito majoritário eugenol no óleo essencial das folhas é influenciada pela luz solar. O eugenol representa 98% dos constituintes ao meio dia e apenas 11% às 17 horas (SILVA *et al.*, 1999). As maiores concentrações dos óleos voláteis de *Cistus monspeliensis* ocorrem por volta do entardecer (ANGELOPOULOU *et al.*, 2002).

Há de se ressaltar que a maior parte destes estudos têm como objeto as espécies que ocorrem em áreas temperadas. Atualmente este avanço nos estudos de variabilidade química de espécies endêmicas em regiões de clima temperado ocorre em detrimento do avanço do conhecimento sobre as espécies do Neotrópico.

Em se tratando do bioma cerrado, considera-se a definição de estação seca e estação chuvosa como as delineadoras da estacionalidade do clima. Os complexos rupestres de quartzito (SEMIR, 1991), onde encontram-se os indivíduos que são objetos do presente estudo, estão sob influência deste ritmo sazonal sendo que esta é uma região interdigitada pela “floresta tropical sazonalmente seca” (PENNINGTON *et al.*, 2009).

1.4 Headspace – Solid Phase Micro Extraction (HS-SPME) e Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)

No que toca as análises dos compostos orgânicos voláteis (COVs) pode-se, de forma geral, dizer que o procedimento analítico para análise e/ou obtenção de óleos essenciais, aromas e frações voláteis, envolve duas etapas: a extração e a análise. A composição da fração volátil pode ser diferente dependendo do método de extração selecionado, sendo que as técnicas que sejam capazes de extrair os compostos o mais próximo do real perfil químico encontrado no vegetal são as ideais para estudos de ecologia química (STASHENKO *et al.*, 2004).

A análise (segunda etapa) dos COVs tem sido realizada principalmente através da técnica de cromatografia em fase gasosa (CG) acoplada a detectores que utilizam detecção por ionização em chama (DIC), espectrometria de massas (EM) e detecção espectrométrica por absorção no infra-vermelho (EIV) e outros (BONATO, 2006).

A microextração em fase sólida (SPME) é uma técnica em microescala de preparo de amostra convenientemente e recorrentemente utilizada em análise por cromatografia em fase

gasosa. O processo de extração e pré-concentração de analitos ocorre quando o dispositivo de SPME é exposto na amostra ou no seu “*headspace*” (HS-SPME).

A técnica é baseada no fenômeno de partição (ou ainda a adsorção, em caso de uso de sólidos adsorventes como, por exemplo, o Carboxen) do analito entre a sua matriz e esta matriz sintética sendo esta última denominada “fibra” (VALENTE; AUGUSTO, 2000). A teoria se baseia na cinética de transferência de massa entre fases e na termodinâmica que descreve a partição entre elas (**Figura 7**). Em um sistema HS-SPME, temos a extração viabilizada por um equilíbrio trifásico, estabelecido numa microescala: *matriz-headspace-fibra*.

Figura 7: Representação gráfica do princípio de equilíbrio termodinâmico trifásico.

As fibras de SPME imobilizam uma fase extratora. Caso se pretenda alcançar a pré-concentração de terpenos voláteis a fase extratora imobilizada deve ser constituída de polímeros de baixa polaridade como é o caso do polidimetilsiloxano. Estes polímeros que recobrem as fibras de sílica fundida resolvem um problema corriqueiro que ocorre na extração em micro escala que é a recuperação da fase extratora de dentro do seio da matriz. Com os polímeros imobilizados na fibra de sílica fundida, a recuperação da fase extratora ocorre sem grandes problemas e com a possibilidade de utilizar-se a fase repetidas vezes.

Os primeiros experimentos com SPME foram realizados usando fibra ótica, com e sem revestimentos poliméricos. Um rápido desenvolvimento desta técnica resultou na incorporação de fibras revestidas dentro de uma microseringa gerando o primeiro dispositivo de SPME (LOUGH *et al.*, 1992).

Se caso uma gotícula de solvente extrator fosse encarregada de extrair, através da afinidade química e do coeficiente de partição, uma pequena quantidade do analito presente em uma amostra, teríamos um processo dificultado por questões técnicas como recuperação de pequenos volumes, por exemplo. Entretanto, esta microescala apresentaria grandes vantagens, como obtenção de cromatogramas com grande resolução e a possibilidade de repetidos procedimentos, o que viabiliza análises em duplicata e triplicata. Pois bem, a técnica de SPME, ao imobilizar a fase extratora, recobrindo fibras de sílica fundida com polímeros e adsorventes, resolve o primeiro problema da hipótese aqui apresentada, abrindo espaço para uma técnica de extração em microescala.

Técnicas de análise por *Headspace*, incluindo as formas dinâmicas, estática e *Headspace* – Microextração em Fase Sólida (HS-SPME) têm se mostrado como os mais convenientes métodos de caracterização de COVs emitidos por amostras vegetais (AUGUSTO *et al.*, 2003).

HS-SPME fornece uma técnica simples, rápida, sensível e livre de solventes que tem sido largamente empregada para análises qualitativas e semi-quantitativas de COVs *in situ* ou *ex situ* desde que foi introduzida na década de 1990 (PAWLISZYN, 1999; ZINI *et al.*, 2001; ZINI *et al.*, 2002; ZINI *et al.*, 2003)

A otimização dos parâmetros que influenciam na eficiência das extrações com a SPME são fundamentais para a análise dos COVs, pois desta forma é possível realizar análises com reprodutibilidade e sensibilidade superiores, além de um menor tempo de extração. Assim, é de grande relevância a seleção do tipo de recobrimento da fibra, os estudos de cinética para se atingir o equilíbrio, bem como a otimização da dessorção desses compostos na câmara de injeção do cromatógrafo.

As fibras de SPME são comercializadas atualmente com uma ampla variedade de filmes poliméricos ou partículas adsorventes, recobrimo o bastão de sílica, relativamente

Figura 8: Total de trabalhos que utilizam SPME apontado pela base de dados Scopus. A busca de trabalhos na base de dados foi efetuada com as seguintes palavras chave: *Terpene*; "tipo do polímero/partícula".

PDMS (**Figura 9**). Entretanto é possível notar que há estudos nesta área desenvolvidos com os demais tipos de filmes.

Dentre as diversas opções existem três tipos de filmes recomendados para estudos de COVs das plantas: (a) 100µm de polidimetilsiloxano (PDMS); (b) 65µm polidimetilsiloxano/divinilbenzeno (PDMS/DVB); e (c) 75µm carboxeno/polydimetilsiloxano (CAR/PDMS).

Uma rápida busca por trabalhos na literatura que utilizam SPME no estudo de terpenos (**Figura 8**) voláteis demonstra que há certa predileção pelas fibras recobertas com

Figura 9: Representação gráfica da fibra de SPME com filme de PDMS.

1.5 Citocinas mediadoras da algesia e nocicepção

A Associação Internacional para Estudo da Dor (IASP) define dor como uma "experiência sensorial e emocional desagradável associada a uma lesão tecidual real ou potencial". Logo, além do envolvimento da percepção dos estímulos nocivos pelo sistema nervoso central quando receptores sensoriais especializados (nociceptores) são ativados, a dor apresenta um componente afetivo-motivacional, incluindo atenção e aprendizagem (NOBACK *et al.*, 1996; LOESER; MELZACK, 1999).

A definição de nocicepção é a detecção pelos nociceptores de estímulos que codificam sinais para fornecer informação ao sistema nervoso central da existência de injúria tissular associada a um estímulo nocivo. O termo dor seria o termo mais adequado para o homem, enquanto, paralelamente, nocicepção seria mais indicado para modelos experimentais (NOBACK *et al.*, 1996).

Durante o processo inflamatório induzido por uma lesão tecidual, ocorre o aparecimento dos sinais clássicos dos processos inflamatórios, tais como o rubor, calor, tumor (edema) e dor. A dor induzida pelo processo inflamatório pode ser gerada pelo aumento da sensação dolorosa e/ou a diminuição do limiar de dor a estímulos que normalmente não produzem ou produzem pouca dor. O estabelecimento da lesão tecidual ou inflamação induz a liberação de diversos mediadores químicos gerados por diferentes células, os quais podem atuar ativando diretamente, ou ainda sensibilizando, os nociceptores (KANDEL *et al.*, 2000; VERRI *et al.* 2006).

Desta maneira estes mediadores inflamatórios são importantes para a produção da dor inflamatória, dentre estes podemos destacar o Fator de Necrose Tumoral (TNF)- α , a Interleucina(IL)-1 e a IL-8. (VERRI *et al.* 2006; CUNHA *et al.*, 2007).

A literatura apresenta uma extensa discussão que visa elucidar qual é a cascata de eventos bioquímicos deflagrada pela ativação dos nociceptores das membranas de neurônios sensoriais por meio de citocinas. Esta discussão não será abordada nesta dissertação, pois neste estudo o interesse é restrito a avaliação *in vitro* da liberação de citocinas por macrófagos peritoneais cultivados em meio de cultura.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O grupo de pesquisas coordenado pelo Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes tem estudado a química de produtos naturais de indivíduos adultos de *Lychnophora ericoides* que ocorrem na região sul do estado de Minas Gerais ao longo dos últimos 12 anos. Estes estudos têm contribuído para a compreensão das propriedades terapêuticas bem como do papel Ecoquímico de tais metabolitos secundários. Durante esta jornada puderam ser notadas peculiaridades dos indivíduos como o característico odor exalado e a abundância de artrópodes e aves que visitam os indivíduos adultos na época da flora, durante o verão chuvoso. Mais recentemente, trabalhos sobre a constituição química dos óleos essenciais de *L. ericoides* foram publicados por grupos de pesquisas brasileiros que estudam organismos que ocorrem em regiões distintas das que foram estudadas por Lopes e colaboradores. Estes trabalhos evidenciam a ocorrência de sesquiterpenos majoritários a despeito dos resultados sob coordenação do Prof. Dr. Norberto Peporine Lopes, em estudos HS-SPME, os quais foram obtidos em um período anterior e demonstravam um predomínio de monoterpenos.

Este trabalho tem como objetivo principal identificar os metabólitos secundários que constituem a fração volátil das folhas de indivíduos de *Lychnophora ericoides* e determinar a variabilidade espacial e intraespecífica destes constituintes. As amostras foram analisadas por técnicas brandas de pré-concentração com o objetivo de obter os resultados mais próximos do que seria o real perfil químico de COVs que são emitidos pelas folhas integras no campo. O objetivo desta análise utilizando técnicas modernas é o de analisar quais são os COVs emitidos pelas folhas. Com o objetivo de analisar a variabilidade dos níveis de sesquiterpenos em relação aos níveis de monoterpenos foi utilizado um método comparativo.

Dentro do contexto deste trabalho apresenta-se ao Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas (FCFRP-USP) esta dissertação de Mestrado. Tal dissertação tem por objetivo discutir os aspectos teóricos do estudo bem como apresentar os resultados obtidos, que incluem dados de ensaios de bioatividade *in vitro*.

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

Foram utilizados os seguintes materiais:

- Gelo seco e frascos de vidro com vedação confiável para amostragens durante as coletas no campo.
- Sistema de navegação por GPS Garmin "GPS 45 Personal Navigator".
- Aparato de Clevenger modificado para hidrodestilação com sistema de refrigeração por "dedo frio" operando a uma temperatura próxima a 0°C.
- Na₂SO_{4(s)} anidro.
- Sistema de Cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de Massas (CG/EM) Shimadzu QP2010 (Ionização por elétrons).
- Banho de água com temperatura controlada e sem agitação durante os experimentos de HS-SPME.
- Fibras SPME Supelco de SPME para amostragem manual (24GA) com *coat* de 100µm de polidimetilsiloxano (PDMS), 65µm polidimetilsiloxano/divinilbenzeno *coating* (PDMS/DVB), 75µm Carboxeno/polidimetilsiloxano *coating* (CAR/PDMS).
- Frascos de vidro de 1mL para *Headspace*.
- Banco de dados espectrais Willey 7, NIST 62 e FFNSC Ver.1.3.
- Serie homologa de *n*-alcanos (C₉ a C₂₅) Alltech.
- Software "lab solutions GC-MS" – Shimadzu.
- Placas de vidro para cromatografia em camada delgada em escala preparativa (CCDP) recobertas com sílica gel PF254+366.
- Reagentes reveladores vanilina e ácido sulfúrico (SIGMA®) em soluções etanólicas de 1% e 10% respectivamente.
- Luz ultravioleta mineralight UVGL-25 operando em λ 365/254 nm.

➤ Sistema de recuperação de matriz orgânica adsorvida em sílica. Composto por um funil de placa sinterizada, com saída para uma bomba de pressão negativa, acoplado a um balão volumétrico de boca esmerilhada para acoplamento com rotoevaporador (Büchi R124).

➤ Solventes grau P.A. Sigma®: acetato de etila e metanol.

➤ Solvente deuterado (CDCl₃) Aldrich® para aquisição de espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

➤ Espectrômetros de Ressonância Magnética Nuclear RMN Brüker DRX-500 e DPX300.

➤ Softwares para interpretação dos espectros de RMN: “ACD/NMR Processor” *Academic edition* e “MestreC” *Lite version*.

➤ Espectrômetro de massas UltrOTOFq (Bruker Daltonics) ESI-qTOF.

Na obtenção das células e no cultivo celular:

➤ Tioglicolato: Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA.

➤ Meio RPMI 1640: Invitrogen, Gibco, Carlsbad, CA, EUA.

➤ Soro Bovino Fetal: Invitrogen, Gibco, Carlsbad, CA, EUA.

➤ Glutamina: Invitrogen, Gibco, Carlsbad, CA, EUA.

➤ Antibióticos e antimicótico: 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 0,25µg/mL de anfotericina B (Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA).

➤ Azul de Tripán: Sigma-aldrich, St Louis, Missouri, EUA.

Produção de NO:

➤ Reagente de Griess (0.1% dicloridrato de N-(1-naphthyl)-ethylenediamina, 1% sulfanilamida, 2.5% ácido fosfórico): Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA.

Produção de citocinas:

➤ LPS (lipopolissacarídeo de *E. coli* 0111:B4): Sigma-Aldrich, St Louis, Missouri, EUA

➤ Dexametasona (Decadronal®, Prodome, Brasil)

➤ TNF α ; IL-1 β e IL-6: The National Institute for Biological Standards and Control (NIBSC, South Mimms, Hertfordshire, UK).

Após levantamento bibliográfico e planejamento experimental, foram adotadas as seguintes metodologias:

3.1 Amostragens em campo de coleta

Considerando a possibilidade de acesso dos campos de coleta, as condições estruturais para a atividade dentro do período circadiano, a distância entre os diferentes pontos e a distância destes em relação ao laboratório, optou-se acessar dois campos de coleta.

Atribuiu-se o nome de indivíduos “paraíso” aos indivíduos amostrados dentro do espaço físico do campo de coleta georeferenciado em S 20° 37' 54.0", W 046° 19' 39.1"; 900 m altitude. Pelo mesmo critério atribuiu-se o nome de indivíduos “pedreira” aos indivíduos do campo de coleta georeferenciado em S 20° 38' 31.6", W 046° 15' 31.8"; 1010 m altitude. O campo de coleta “paraíso” localiza-se no município de São João Batista do Glória enquanto o campo de coleta “pedreira” está localizado no município de São José da Barra. Ambos os municípios estão localizados no estado Minas Gerais, na área da bacia hidrográfica do Rio Grande.

Os exemplares que foram objeto deste estudo tiveram sua identificação feita pelo Prof. Dr. João Semir do Departamento de Botânica do Instituto de Biologia-UNICAMP. As excisatas avaliadas estão depositadas no herbário da UNICAMP (Herbário UEC). Os códigos dos materiais depositados são NPL221 para o exemplar do campo de coleta “paraíso” e NPL227 para o exemplar do campo de coleta “pedreira”.

Foram realizadas seis coletas. Durante o ano de 2009 em março, maio, agosto e novembro e durante o ano de 2010, no mês de março e junho. Na **Figura 10** está representada a estacionalidade que ocorre na região, com o verão chuvoso, e o inverno seco, através dos dados pluviométricos gentilmente cedidos pelo Sr. Luís Junio Leonel Mendes da estação meteorológica da Usina de Furnas (USFU.O).

Figura 10: Dados pluviométricos da região em que foram realizadas as coletas.

Os dados pluviométricos coletados na região são similares a média dos dados obtidos pela *International Research Institute for Climate and Society* da Universidade de Columbia-EUA (IRICS, 2010). Estes dados demonstram a frequência de dias chuvosos, a temperatura média, e a precipitação total durante o período entre 1960 e 1991. Dos valores aferidos durante o período do estudo utilizou-se a média aritmética para confecção dos gráficos. Os gráficos da **Figura 11** demonstram que na região a chegada do verão úmido ocorre em outubro-novembro e do inverno seco em abril-maio.

Figura 11: Dados climáticos obtidos pelo *IRICS* que demonstram a ocorrência das estações verão-chuvoso e inverno-seco na região onde foram realizadas as coletas. Da esquerda para a direita: Temperatura, precipitação média diária e frequência de dias chuvosos durante os 12 meses do ano.

Os ramos de folhas utilizados em experimentos HS-SPME foram coletados e imediatamente armazenados em vidros vedados e codificados individualmente. As amostras foram mantidas em recipiente contendo gelo seco. A amostragem para experimentos HS-SPME consiste em um pequeno ramo de folhas, cerca de 500 mg. O material permaneceu sob congelamento a -20° C até a data da análise, a qual foi realizada no menor tempo possível após a coleta.

Foram coletados ramos inteiros em quantidade mínima o suficiente para a hidrodestilação e obtenção dos óleos essenciais (por volta de 500 gramas).

3.1.1 Indivíduos “paraíso”

Foram escolhidos e nomeados 5 indivíduos adultos (I, II, III, IV, V) que apresentaram um número de capítulos florais superior a 10, durante o período da florada (fevereiro a abril), suficiente para os estudos de variação temporal através de experimentos HS-SPME. Foram coletados, aleatoriamente, ramos inteiros de botão floral e de capítulos florais de cinco indivíduos não nomeados para estudos de variação intraplanta. Foi coletado, ainda, material vegetal para obtenção de óleo essencial por hidrodestilação.

3.1.2 Indivíduos “pedreira”

Com intuito de avaliar a variação espacial foi realizada a coleta aleatória de ramos inteiros de botão floral e de flores de cinco indivíduos não nomeados. As amostras foram coletadas assim como na amostragem dos indivíduos “paraíso” para estudos de variação intraplanta. Foi coletado ainda material vegetal para obtenção de óleo essencial por hidrodestilação.

3.1.3 Coleta no período circadiano

Para avaliação dos níveis dos metabólitos ao longo de um período circadiano foram realizadas 6 coletas entre indivíduos “paraíso” dentro de um período de 24 horas. No horário oficial de Brasília (GMT – 3 h) o material foi coletado às 11h30min, 15h30min, 19h30min, 23h30min, 03h30min e 07h30min. Foram realizadas 5 coletas para esta avaliação entre março de 2009 e março de 2010 (datas disponibilizadas na **Figura 10**).

3.1.4 Coleta do material para estudo intraplanta

Considerando as diferenças organolépticas como cor e odor ao longo dos ramos e entre ramos de botão floral e de capítulos florais, foram coletados materiais destes dois estágios de maturação. Aleatoriamente, 5 ramos de botão floral e 5 ramos de capítulo floral foram coletados em cada população. Estes ramos foram divididos em três compartimentos (**Figura 12**) que representam a idade das folhas: **BF1** e **FL1**, os mais jovens em botões e capítulos, respectivamente; **BF2** e **FL2** de idade intermediária; **BF3** e **FL3** os mais senis, comparativamente.

Figura 12: Classificação de ramos de acordo com a idade das folhas.

3.1.5 Coleta do material para isolamento de óleo essencial

Para o isolamento de óleo essencial das folhas dos indivíduos de ambas as populações do estudo, foram coletadas alíquotas de cerca de 500 gramas de folhas de diferentes estágios de maturação em cada população. A coleta deste *pool* de material foi estabelecida propositalmente, visando obter o mais amplo espectro de metabólitos possivelmente encontrados em diferentes folhas. A coleta deste material se fez necessária principalmente devido à necessidade de isolamento de compostos não identificáveis apenas pelo uso de bibliotecas de espectros de massas combinadas ao cálculo do índice de retenção relativa em cromatografia em fase gasosa, conforme será discutido posteriormente neste documento.

3.2 Análise do material vegetal amostrado

Para a análise das amostras das folhas de *Lychnophora ericoides* foi utilizado o sistema CG-EM supracitado na listagem dos materiais. O sistema operou em ionização por elétrons (IE) (250° C; 70 eV), equipado com injetor *split* (240° C) e com proporção *split* variando no intervalo entre 1/20 e 1/80 conforme a saturação que o detector sofreu pelas diferentes concentrações de analitos nas amostras. A coluna utilizada foi do tipo sílica fundida com fase estacionária DB-5MS (30m x 0.25mm x 0.25µm), utilizando hélio como gás de arraste, fluxo na coluna de 1,33 mL/min, pressão de 81,5 kPa e aquecimento com programação de temperatura de 60-189°C a 3° C/min. Os espectros de massas foram obtidos através da aquisição no intervalo de tempo de 0,50 scan/s de *m/z* 40 a 500 e a partir de 3 minutos de análise até o final desta (43 minutos).

3.2.1 Método de HS-SPME

Para o desenvolvimento do método de extração por HS-SPME, foi realizada a otimização univariada dos seguintes parâmetros tempo de exposição da fibra (5 a 10 minutos), temperatura do banho (45°C a 85 °C). Foi verificado o comportamento das fibras do tipo PDMS, CAR/PDMS e a PDMS/DVB. Como se relata posteriormente, na seção **RESULTADOS**, a fibra PDMS apresentou o comportamento mais adequado às necessidades do estudo. Posteriormente foi avaliado o comportamento desta fibra segundo as variáveis tempo de banho (5, 10 20, 30, 40 e 50 minutos) e temperatura do banho (45, 55, 65, 75 e 85 °C).

Para a extração por HS-SPME foi retirada uma alíquota de 50 mg de cada amostra analisada. Optou-se, sempre que possível, pelo uso de folhas íntegras para essa amostragem. Assim, foi selecionada a máxima quantidade possível de material a ser analisado sem comprometer o limite de detecção do espectrômetro de massas e que oferecesse a melhor resolução dos sinais. As diferentes concentrações dos analitos encontrados entre as amostras precisaram ser contornadas usando-se diferentes razões de *split* uma vez que a alíquota usada no HS-SPME havia sido definida.

Esta alíquota foi submetida ao *headspace* utilizando-se frascos de vidro com vedação eficiente. O processo de extração HS-SPME foi realizado em banho de água quente sob a temperatura de 75°C durante 30 minutos. Com a ajuda de um termômetro esta temperatura foi controlada ao longo de todo o processo.

3.2.2 Óleos essenciais

Os materiais coletados para a obtenção de óleo essencial foram mantidos sob congelamento até a data da hidrodestilação. Este material fresco foi congelado e então submetido à hidrodestilação por 4 h, utilizando um aparelho tipo Clevenger modificado para obtenção dos óleos. Os óleos foram separados da água pela diferença entre densidades, submetidos ao contato com $\text{Na}_2\text{SO}_{4(s)}$ anidro, secados sobre fluxo de N_2 , e armazenados em frascos selados e protegidos de luminosidade, sob baixa temperatura. Posteriormente, foram submetidos à análise química por CG-EM e cromatografia preparativa para isolamento de sesquiterpenos.

3.2.3 Identificação dos COVs presentes nas folhas de *Lychnophora ericoides*

A identificação dos sinais apresentados nos cromatogramas foi feita inicialmente por comparação dos espectros de massas obtidos por IE com os espectros das bibliotecas citadas na listagem de materiais. Os dados obtidos forneceram informações indicativas, porém não conclusivas. A identidade apontada neste primeiro passo foi comparada com o índice de retenção relativa (IRR) determinado pela equação de Kovats (**Figura 13**) a partir dos tempos de retenção de cada *n*-alcano (**Tabela 1** do **Apêndice**) da série homóloga que foi injetada no cromatógrafo por via úmida utilizando o mesmo método de operação do cromatógrafo. Baseando-se em dados que se confirmaram entre estes dois procedimentos foi estabelecida a identificação de compostos com espectros de massas que constam nas bibliotecas.

$$\text{IRR} = 100n + 100n \left(\frac{\log t_{R_x} - \log t_{R_z}}{\log t_{R_{(z+1)}} - \log t_{R_z}} \right)$$

Figura 13: equação de Kovats utilizada no cálculo do IRR. “n” é o número de carbonos do *n*-alcano com o tempo de retenção (t_{R_z}) invariavelmente anterior ao do analito (t_{R_x}), enquanto $t_{R_{z+1}}$ é o tempo de retenção do *n*-alcano eluído da coluna invariavelmente logo após o analito.

Entretanto, foram obtidos nos cromatogramas sinais referentes a moléculas que não constam nas bibliotecas de espectros de massas e que, portanto, mesmo com seu IRR determinado, se mostraram não identificáveis por esta estratégia. Este percalço trouxe à tona a necessidade de uma segunda estratégia de identificação, a qual se baseou no isolamento e

posterior procedimento de determinação estrutural baseados principalmente na aquisição espectros de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

A **Figura 14** apresenta um esquema simplificado das estratégias aqui discutidas.

Figura 14: Estratégias de identificação dos compostos voláteis presentes na folhas de *Lychnophora ericoides*.

3.2.4 Determinação dos percentuais relativos dos analitos

A área de cada sinal em cada cromatograma gerado durante as análises por CG-EM foi determinada através do software LabSolution GC-MS. A integração dos sinais foi estabelecida seguindo os parâmetros físicos descritos na **Tabela 1**. Estes parâmetros foram manipulados através do software do cromatografo visando a edição dos sinais relativos aos compostos de interesse. Estas condições foram estabelecidas de forma empírica a partir da avaliação dos efeitos de sua manipulação sobre os dados qualitativos. Elas representam o ponto de corte (*cut off*) ideal para análise qualitativa dos níveis de metabólitos de interesse do estudo, em detrimento dos componentes denominados “traços”.

Tabela 1: Parâmetros físicos utilizados na integração dos sinais cromatográficos.

Slope	4000/ min
Width	7 sec
Drift	0/min
T.dbl	1000 min
Min area- height	1.500.000

Houve a necessidade de verificação e eventual correção da integração dos sinais como no exemplo demonstrado na **Figura 15**.

Figura 15: Correção manual da integração dos sinais dos cromatogramas.

As áreas obtidas foram então utilizadas para a determinação dos percentuais relativos entre as classes de metabólitos identificadas nas amostras analisadas, através da média aritmética das áreas obtidas em cada uma das repetições. Foi estabelecida uma razão com o nome “Razão Ses/Mon”. Para compor esta razão, os valores de intensidade de sinal observado para cada sinal cromatográfico são somados entre os da mesma classe. Os sinais **1, 2, 3, 4, 5, 6** e **7** (**Figura 17**) somados originam o valor do denominador, enquanto a soma dos valores observados para os sinais **8, 9, 10** e **11** originam o numerador.

3.2.5 Avaliação da estabilidade das amostras armazenadas em freezer

Devido ao elevado número de amostras obtidas em cada coleta, houve a necessidade de se proceder as análises durante vários dias, geralmente de 6 dias por coleta. As análises tiveram início sempre no primeiro dia após a chegada do material no laboratório. No intuito de avaliar o comportamento dos COVs na matriz vegetal ao longo do tempo em que estiveram armazenadas, foram realizadas análises diárias de uma amostra com grande quantidade de folhas.

3.3 Isolamento de Sesquiterpenos

Para o isolamento dos sesquiterpenos não identificados pela primeira estratégia foi utilizado um volume de 200 μ L de óleo essencial obtido conforme metodologia descrita no item 3.2.2. O material foi solubilizado em uma quantidade mínima de clorofórmio (cerca de 2mL) e então aplicado, em quantidades igualitariamente divididas, em quatro placas de CCDP. Em pares, as placas foram eluídas em 2 cubas de vidro distintas e previamente saturadas com a fase móvel. Utilizou-se como fase móvel diclorometano. Após a completa eluição e secagem das placas, foi procedida a revelação para análise da resolução da cromatoplaça.

As bandas cromatográficas foram expostas a luz ultravioleta para determinar a presença ou ausência de compostos com grupos cromóforos. Posteriormente foi realizada a revelação com ácido sulfúrico e vanilina seguida de aquecimento. Durante a etapa de revelação foram tomadas todas as precauções necessárias para proteger os compostos isolados na sílica da exposição a qualquer possível reação de degradação o que poderia levar ao isolamento de artefatos. Para tanto, apenas uma pequena parte das placas foi revelada e, a bancada de trabalho foi coberta de gelo, visando também a não volatilização dos analitos.

As bandas identificadas foram removidas das placas, com a ajuda de espátula e pincel, e logo após foi realizada a recuperação dos compostos. Utilizando o sistema de recuperação descrito na listagem de materiais e uma proporção de solventes acetato de etila/metanol (8:2), em um volume aproximado de 150 mL para cada banda removida da placa.

O material foi rotaevaporado sob condições tênues de aquecimento. A temperatura do banho quente do aparelho oscilou em torno de 35°C. Logo após a purificação, uma alíquota foi injetada no sistema CG-EM para verificação da pureza. O restante do material foi seco sob fluxo de gás N₂ e armazenado em freezer em vidros devidamente protegidos de luz, codificados e vedados.

3.4 Análises por Ressonância Magnética Nuclear

As amostras foram submetidas à aquisição de espectros de RMN ^1H , ^{13}C , mapas de contornos HMQC, HMBC e COSY. Estas amostras foram preparadas após secagem sobre fluxo de N_2 , utilizando CDCl_3 como solvente. Foram utilizados aparelhos com campos de 500 e 300MHz. As amostras estiveram sob refrigeração durante o transporte. Os espectros obtidos foram editados e interpretados.

3.5 Avaliações de biotividade

Dentre os Sesquiterpenos isolados por cromatografia em escala preparativa o acetato de bisabolila foi selecionado para realização de experimentos *in vitro* que visaram a avaliação do efeito deste composto na liberação de citocinas por macrófagos peritoneais. A seleção deste metabólito foi baseada na constatação de sua presença em preparados hidroalcoólicos das folhas (**Figura 16**). Conforme é descrito na seção **RESULTADOS e DISCUSSÃO**, este sesquiterpeno foi obtido em quantidade relativamente grande. A disponibilidade de material isolado em quantidade para realização de bioensaios motivou a seleção deste composto.

Figura 16: Cromatograma do preparado hidroalcoólico concentrado evidenciando a ocorrência do acetato de bisabolila (29% da área total do cromatograma). Os sinais com legenda “NI” não foram identificados Obtido em CG-EM através de injeção por via úmida.

Os estudos foram conduzidos pelos Dr. Daniel Roberto Callejon e Dr. Denis de Melo Soares em laboratórios da FCFRP contando com a colaboração da Prof.^a Dra. Gloria Emilia Petto de Souza e em laboratórios da FMRP contando com a colaboração do Prof. Dr. Fernando de Queiroz Cunha.

3.5.1 Animais

Ratos Wistar (*Ratus norvegicus*) macho (180-200g) foram mantidos em salas com controle de temperatura ($27\pm 2^{\circ}\text{C}$) e ciclos de luz/escuro de 12 horas com acesso a água e comida *ad libitum*. Todos os sacrifícios dos animais foram conduzidos rapidamente visando minimizar o sofrimento. O estudo foi conduzido de acordo com as normas do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (nº 135/2005)

3.5.2 Isolamento de macrófagos peritoneais dos animais

Com o intuito de obter as células íntegras e viáveis, os ratos foram tratados com 10 mL de 3% tioglicolato intra peritoneal (i.p.) por quatro dias. Os animais foram sacrificados por deslocação cervical e a cavidade peritoneal foi lavada com 10 mL de tampão fosfato (PBS) por duas vezes. O fluido peritoneal foi coletado e as células foram lavadas com meio RPMI por duas vezes usando centrifugação a $100\times g$ por 5 min. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* de células foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI. O número de células foi determinado por exclusão pelo azul de tripan. As células foram plaqueadas (4×10^5 células/poço) em placas de 24 poços em meio RPMI por 24 horas a 37°C com atmosfera úmida contendo 5% de CO_2 . Após a adesão celular os macrófagos não aderidos foram removidos por lavagem sucessiva (três lavagens) com PBS.

3.5.3 Determinação de produção de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α ; IL-6 e IL-1 β)

As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) (volume final do poço < 1%) e diluídas em RPMI. As monocamadas de macrófagos peritoneais cultivadas nas placas de 24 poços foram tratadas com as seguintes concentrações de acetato de bisabolila: 3 e 10 $\mu\text{g/mL}$ por 30 minutos. Após este tratamento, as células foram estimuladas com lipopolissacarídeo (LPS) por 4 horas a 37°C em atmosferas com 5% CO_2 . As células tratadas com dexametasona (DEXA - $9\mu\text{g/mL}$) foram usadas como controle positivo de atividade antiinflamatória. Após incubação, o sobrenadante foi coletado para aferição dos níveis das citocinas TNF- α ; IL-6 e IL-1 β .

As concentrações de TNF- α , IL-6, e IL1- β no sobrenadante da cultura celular foram detectadas pelo uso do *enzyme-linked immunosorbent assay* (ELISA).

3.5.4 Determinação da produção de NO

A produção de óxido nítrico (NO) foi avaliada pela concentração de nitrito (NO_2^-) nos sobrenadantes por método de Griess. Os macrófagos aderidos foram tratados com o acetato de bisabolila conforme descrito acima. Após o tratamento o sobrenadante (50 μL) foi incubado com um volume idêntico de reagente de Griess (0.1% *N*-(1-naftil)-etilenodiamino dihidroclorido, 1% sulfanilamida, 2.5% ácido fosfórico). Esta mistura foi incubada por 10 minutos a temperatura controlada da sala e protegida da luz. A absorbância da mistura foi mensurada em espectrofotômetro automatizado operando a 540 nm (SpectraMAX 340). A concentração de NO_2^- foi calculada com base em curva de calibração usando nitrito de sódio (NaNO_2) como padrão. Os resultados foram expressos em micromoles de nitrito. O nitrito é um produto de oxidação do óxido nítrico capaz de ter suas concentrações em meio líquido mensuradas através de espectrofotometria.

3.5.5 Análise estatística

Os resultados foram expressos na forma de média $\pm$ desvio padrão. A análise estatística dos dados foi conduzida através do uso de análise de variância (ANOVA) seguindo-se o teste de Bonferroni. Valores de *p* menores que 0.05 foram considerados como estatisticamente significantes.

RESULTADOS e DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

As análises em CG-EM revelaram que no tocante ao nível de metabólitos secundários voláteis a constituição química das amostras apresenta basicamente micromoléculas do tipo monoterpenos e sesquiterpenos. Foi possível observar até 64 sinais cromatográficos, entretanto 11 foram considerados majoritários, os quais são representados abaixo na **Figura 17**. No caso dos monoterpenos os sinais foram selecionados como majoritários por apresentarem uma área integrada que corresponde a mais de 5 % da área total do cromatograma. No caso dos sesquiterpenos o valor estabelecido foi de 2%.

Figura 17: Cromatograma destacando os sinais das substâncias majoritárias.

4.1 Identificação dos sinais cromatográficos majoritários

Os sinais cromatográficos 1, 2, 3, 4, 5, 6 e 7 foram identificados como sendo monoterpenos pela estratégia que combina a comparação dos dados de espectrometria de massas com ionização por elétrons (IE-EM) aos valores do índice de retenção relativa. Analogamente o sinal cromatográfico 8 foi identificado como o sesquiterpeno 1,2-

dehidrosesquicineol. Já o sinal **9** foi identificado como um sesquiterpeno, que ocorre, de forma detectável, apenas em cromatogramas obtidos a partir de amostras submetidas à HS-SPME. Portanto, a sua ocorrência minoritária nos óleos essenciais não pode viabilizar o isolamento da substância. A substância referente ao sinal **10** foi isolada, muito embora tal isolamento não tenha propiciado um alto grau de pureza, o que prejudicou a sua elucidação estrutural. Entretanto os dados obtidos foram suficientes para se afirmar que a substância trata-se de um sesquiterpeno de estrutura bicíclica hidroxilada, com um grupo isopropenil e mais uma olefina endocíclica. O sesquiterpeno representado nos resultados de CG-EM na forma do sinal cromatográfico **11** foi isolado por CCDD e sua elucidação estrutural foi possível a partir da interpretação de espectros de RMN ^1H , ^{13}C , mapas de correlação HMQC, HMBC e espectros de massas em alta resolução e massa-massa adquiridos pelo ESI-qTOF. As identificações são apresentadas na **Tabela 2** e serão, logo a seguir, discutidas. As estruturas químicas são representadas na **Figura 18**.

Tabela 2: Identificação dos sinais que correspondem aos metabólitos majoritários dos cromatogramas.

Substância	Composto	I.R.R.	T _r
1	α -Pineno	932	5,17
2	β -Pineno	977	6,35
3	α -Terpineno	1016	7,35
4	Ocimeno	1024	7,60
5	Limoneno	1027	7,78
6	γ -Terpineno	1056	8,94
7	Terpinen-4-ol	1180	13,80
8	Sesquicineol	1463	25,80
9	N. I.*	1498	27,22
10	N. I.*	1609	31,57
11	Acetato de Bisabolila**	1894	41,76

*Não identificado** isolado e identificado

Figura 18: Estruturas químicas dos metabólitos identificados em *Lychnophora ericoides*.

4.1.1 Substância 1

O espectro de massas obtido em ionização por elétrons (IE-EM) (**figura 19**) apresentou um índice de similaridade de 99% com o espectro do α -pineno e seu IRR é muito similar ao descrito por Adams (ADAMS, 1995).

Figura 19: Espectro IE-EM do sinal 1.

4.1.2 Substância 2

O espectro de IE-EM (**figura 20**) apresentou um índice de similaridade de 97% com o espectro do β -pineno e seu IRR é muito similar ao descrito por Adams.

Figura 20: Espectro IE-EM do sinal 2.

4.1.3 Substância 3

O espectro de IE-EM (**Figura 21**) apresentou um índice de similaridade de 96% com o espectro do α -terpineno e seu IRR é muito similar ao descrito por Adams.

Figura 21: Espectro IE-EM do sinal 3.

4.1.4 Substância 4

O espectro de IE-EM (**Figura 22**) apresentou um índice de similaridade de 96% com o espectro do ocimeno e seu IRR é muito similar ao descrito por Adams.

Figura 22: Espectro IE-EM sinal 4.

4.1.5 Substância 5.

O espectro de IE-EM (**Figura 23**) apresentou um índice de similaridade de 95% com o espectro do limoneno e seu IRR é muito similar ao descrito por Adams.

Figura 23: Espectro IE-EM sinal 5.

4.1.6 Substância 6

O espectro de IE-EM (**Figura 24**) apresentou um índice de similaridade de 97% com o espectro do γ -terpineno e seu IRR é muito similar ao descrito por Adams.

Figura 24: Espectro IE-EM sinal 6.

4.1.7 Substância 7

O espectro de IE-EM (**Figura 25**) apresentou um índice de similaridade de 97% com o espectro do terpinen-4-ol e seu IRR é muito similar com o descrito por Adams.

Figura 25: Espectro IE-EM sinal 7.

4.1.8 Substância 8

O espectro de IE-EM para a substância **8** (**Figura 26**) apresentou apenas baixos índices de similaridade com monoterpenos enquanto as buscas por espectros se baseavam apenas nas bibliotecas Willey 7 e NIST 62. A análise crítica deste espectro sugere que esta substância seja um sesquiterpeno oxigenado. O íon de m/z 220, mesmo que pouco intenso, pode ser o íon molecular. A presença do íon de m/z 41, em intensidade de aproximadamente 50%, pode ser devido a formação do íon alila que é característico das vias de fragmentação de olefinas. Portanto, com base nas informações supracitadas, o sesquiterpeno oxigenado com massa molecular 220 u possui uma fórmula empírica $C_{15}H_{24}O$. A confirmação da estrutura, nesse caso foi possível através do uso da biblioteca de espectros FFNSC Ver.1.3. O espectro de massas obtido (**Figura 26**) apresentou índice de similaridade de 95% com o 1,2 dehidrosesquicineol e seu IRR foi muito similar com o obtido por Masotti *et al.* (2003).

Figura 26: Espectro IE-EM sinal 8.

4.1.9 Substância 9

O espectro IE-EM para a substância **9** (figura 27) apresenta baixos índices de similaridades com os espectros de alguns monoterpenos, principalmente para aqueles que apresentam em sua fragmentação íons de m/z 134 ou de m/z inferiores. Estes íons são similares à fragmentação do composto do sinal **9**, contudo o íon de m/z 202 com 20% de intensidade pode indicar um íon molecular, sugerindo assim que a substância 9 seja um sesquiterpeno de fórmula empírica $C_{15}H_{22}$. A presença do íon alila de m/z 41 e do íon tropílio de m/z 91 reforçam a hipótese desta fórmula empírica de índice de deficiência de hidrogênio (IDH) 5.

Figura 27: Espectro IE-EM sinal 9.

É pertinente ressaltar que este sesquiterpeno não se faz presente, de forma apreciável, no óleo essencial de *L. ericoides* apesar de ser um constituinte majoritário da fração volátil analisada por técnicas com alto poder de pré-concentração de analitos como a técnica HS-SPME. Neste sentido conclui-se que a técnica HS-SPME teve a capacidade de analisar componentes químicos da fração volátil que não são detectáveis por meio de técnicas convencionais de obtenção dos COVs como, por exemplo, a hidrodestilação. Entretanto a dificuldade em elucidar a estrutura deste metabólito é elevada devido à impossibilidade de isolamento do mesmo.

4.1.10 Substância 10

O espectro IE-EM para a substância **10** (**Figura 28**) apresentou um baixo índice de similaridade com os espectros para monoterpênos oxigenados como, por exemplo, o óxido de limoneno (73%). A presença do íon acílio de m/z 43 pode ser indício da presença de função oxigenada como a de uma carbonila, bem como de uma cadeia alquílica insaturada uma vez que apresente o carbocátion propila.

Figura 28: Espectro IE-EM sinal **10**.

Considerando a lógica da biogênese, é possível cogitar a presença de derivados de uma mesma rota biossintética, os quais apresentam esqueletos carbônicos fundamentais similares. Isto caracteriza uma série de metabólitos congêneres, ou seja, compostos que apresentam modificações estruturais como uma esterificação ou acetilação entre eles. Portanto, é possível sugerir, que o sinal **10** se trata de um congênere do acetato de bisabolila, substância **11** (discutido na próxima seção). A hipótese sugere porque não é possível se observar o íon molecular de m/z 220, pois assim como ocorre com o sinal **11**, essa substância seria um álcool terciário. Na literatura atual em IE (PAVIA, 2009) é descrito que alcoóis terciários normalmente não apresentam sinal do íon molecular e a busca deve ser realizada através do íon-fragmento, que representa o produto desidratado. Essa reação nas condições utilizadas nas análises de IE (energia de ionização de 70eV) é facilitada pela formação de um carbocátion terciário. Tal hipótese foi testada com a aquisição de espectros de massas empregando uma técnica “branda” de ionização, a ionização por *electrospray* (IES). Com o uso deste modo de ionização, seria possível observar o íon de m/z 221 da molécula protonada, que corresponderia segundo a hipótese, a nossa substância em sua forma íntegra. O espectro IES-EM em modo *scan* para a substância **10** apresentou o íon de m/z 221.1992, o qual foi sugerido como sendo a molécula protonada $[M+H]^+$ (**figura 26**). Este íon foi selecionado e fragmentado (dissociado por colisão) para a obtenção de espectros EM/EM, onde foi observada a geração de íons-fragmentos sob diferentes energias de colisão (0, 5, 10, 15 e 20eV) (**Figura 1 do Apêndice**). É possível afirmar

que estes resultados apontam para a hipótese que a substância **10** pode se tratar de um sesquiterpeno de fórmula molecular $C_{15}H_{24}O_1$.

Figura 29: Espectro de massas do sinal **10** obtido em IES no modo *scan* (ESI-qTOF; modo positivo).

O isolamento deste composto, representado pelo sinal **10**, foi possível através de CCDP. Entretanto a substância não pode ser purificada completamente, havendo a contaminação por terpinen-4-ol em níveis relevantes. A amostra isolada foi submetida à aquisição de espectros de RMN.

Com os resultados dos espectros de ^{13}C (**Figura 3** do **Apêndice**) e DEPT 135° (**Figura 4** do **Apêndice**) foram determinados o número de átomos de carbono. Foi possível observar sinais referentes a átomos de 23 carbonos, sendo evidente uma diferença de intensidade entre um

grupo de 15 sinais e outro grupo de 8 sinais. Com base na literatura (BOHLMANN *et al.* 1975) foi possível determinar que o grupo de 8 sinais que apresentaram-se em menor intensidade são relativos aos sinais dos núcleos ativos em RMN de ^{13}C do terpinen-4-ol (**Tabela 3**)

Tabela 3: Relação dos sinais observados no espectro de RMN de ^{13}C (75MHz, CDCl_3) e DEPT 135° da amostra isolada em CCDP referente ao sinal **10**. Na última coluna à direita estão os valores de deslocamento químico dos núcleos de ^{13}C do terpinen-4-ol disponíveis na literatura. A direita da tabela encontra-se a estrutura do Terpinen-4-ol com as referências numéricas dos carbonos tabelados.

C	δ	DEPT	Terpinen-4-ol (Bohlmann <i>et al.</i> , 1975)
1	16.8	+	16.9
2	16.9	+	17.0
3	19.6	+	X
4	20.9	-	X
5	23.3	+	23.3
6	23.5	+	X
7	27.0	-	27.2
8	27.4	-	X
9	29.4	+	X
10	30.7	-	31.1
11	31.2	-	X
12	34.3	-	X
13	34.5	-	34.5
14	34.7	+	X
15	36.8	+	36.8
16	45.7	+	X
17	47.5	+	X
18	72.4	0	X
19	110.7	-	X
20	118.4	+	118.7
21	124.9	+	X
22	133.0	0	X
23	148.4	0	X

Carbonos do Terpinen-4-ol

A partir desta avaliação preliminar foi possível determinar que a substância **10** possui um IDH=4 sendo que sua estrutura conta com 2 olefinas e dois ciclos. Paralelamente a esta observação, a análise do espectro de RMN de ^1H (**Figura 2 do Apêndice**) e mapa de contornos HMQC (**Figura 5 do Apêndice**) possibilitou determinar quais os tipos de prótons estão representados nos espectros e sua conectividade (**Tabela 4**). É importante ressaltar que os espectros de terpenoides apresentam, frequentemente, um efeito relevante de segunda ordem e que neste caso dificultou ainda mais a atribuição dos sinais devido a sobreposição destes com

os sinais dos prótons do contaminante. A despeito do exposto, foi proposta a ocorrência de 3 metilas (carbonos **3**, **6** e **9**), 5 carbonos metilênicos CH₂ [**4**, **8**, **11**, **12** e **19** (olefínico)], 4 carbonos metínicos CH₁ [**14**, **16**, **17** e **21** (olefínico)] e três carbonos quaternários [**18** (carbinólico), **22** (olefínico) e **23** (olefínico)] presentes na estrutura.

Tabela 4: Deslocamentos químicos da substância **10** observados nos espectros de RMN de ¹³C (75MHz, CDCl₃) e ¹H (300MHz, CDCl₃).

C	δ	δH
3	19.6	1.71 (s)
4	20.9	1.53 ? (m)
6	23.5	1,62 ? (s)
8	27.4	Ha 1.37 (m); Hb 1.76 (m)
9	29.4	1.23(s)
11	31.2	1.98 (m)
12	34.3	1.50 (m)
14	34.7	2.40 (m)
16	45.7	1.65 ?
17	47.5	1,97 ?
18	72.4*	-
19	110.7	4.71 (m)
21	124.9	5.35 (m)
22	133.0*	-
23	148.4*	-

* carbono quaternário

Conforme discutido na **INTRODUÇÃO** na literatura há relatos da ocorrência de sesquiterpenos majoritários nos óleos essenciais de *Lychnophora ericoides*. De forma geral afirma-se que os tipos de esqueletos carbônicos comuns a estes sesquiterpenos são bisabolanos e cadinanos, sendo este último um biciclo hexeno. Contando com os dados espectroscópicos, a hipótese de uma estrutura bicíclica e ainda as informações quimiossistemáticas supracitadas foi aventada a hipótese de que a estrutura da substância **10** poderia se tratar de um derivado do cadinano. Considerando as observações que permitem concluir a presença de uma hidroxila na estrutura (dados de espectrometria de massas e deslocamentos químicos) a busca por similaridade se iniciou com o α-cadinol. A hipótese foi a de que teríamos o 11,13-dehidrocadinol, **Figura 30**.

Figura 30: Comparação dos deslocamentos químicos dos núcleos de ^{13}C do α -cadinol à esquerda (HERZ; WATANABE, 1983) e dos valores atribuídos a hipótese do 11,13-dehidrocadinol evidenciando diferenças que negam a hipótese.

A hipótese de que a substância 10 seria o 11,13-dehidrocadinol foi negada a partir da comparação dos dados espectroscópicos, com ênfase nos deslocamentos químicos observados para os núcleos de ^{13}C e com base nos dados de correlação a longa de distância obtidos pelo mapa de contornos HMBC **Tabela 5**. Não havia consonância entre os “fragmentos” (**Figura 31**) da molécula que são possíveis de se determinar a partir do mapa de correlações HMBC (**Figura 6 do Apêndice**) e a estrutura do α -cadinol.

Tabela 5: Correlações entre hidrogênios e carbonos observadas no mapa de contornos HMBC da substância **10** (300MHz, CDCl_3).

Carbono	^1H (δ)	^{13}C (δ)
3	1.72	C-17(47.5); C-19(110.7); C-23(148.4)
4	1.53	C-3(19.6); C-8(27.4); C-18(72.5)
6	1.62	C-21(124.7); C-22(133.0); C-17(47.5); C-11(31.25)
8	1.37(a)	-
8	1.76(b)	C-17(47.5)
9	1.23	C-12(34.3); C-16(45.7); C-18(72.5)
11	1.98	C-3(19.6) ?; C-8(27.4) ?
12	1.50	-
14	2.40	C-23(148.4)
16	1.65	-
17	1.97	-
19	4.71	C-17(47.5); C-3(19.6); C-23(148.4)
21	5.35	C-12(34.3)

Figura 31: Representação com setas das correlações a longa distância observadas no mapa de correlações HMBC da substância **10**. São três “fragmentos” da molécula que podem ser determinados apesar de não poderem ser agrupados para a determinação estrutural inequívoca.

Enfim, é possível afirmar que os dados espectroscópicos obtidos através do material isolado apresentaram-se com um certo grau de dificuldade de interpretação devido ao contaminante terpinen-4-ol presente na amostra analisada. Com o intuito de determinar de forma inequívoca a estrutura deste metabólito, procedimentos de isolamento estão sendo conduzidos com base em cromatografia em fase normal de eluição utilizando aparatos de cromatografia *flash*.

4.1.11 Substância 11

O espectro IE-EM para a substância **11** está apresentado na **Figura 32**. A busca por similares para este espectro nos bancos de dados disponíveis apresentou resultados semelhantes aos da busca realizada para o sinal **10**.

Figura 32: Espectro IE-EM para a substância **11**.

O isolamento deste composto, representado pelo sinal **11**, foi possível através de CCDP. A substância purificada foi submetida à aquisição de espectros de RMN.

Com os resultados dos espectros de RMN de ^1H (**Figura 7** do **Apêndice**), ^{13}C (**Figura 8** do **Apêndice**), DEPT 135° (**Figura 9** do **Apêndice**) e mapa de contornos HMQC (**Figura 10** do **Apêndice**) foram determinados o número de núcleos carbonos e a conectividade destes aos prótons. Os dados obtidos desta análise de espectros foram expressos na **Tabela 6**.

Tabela 6: Deslocamentos químicos (δ) da substância **11** observados nos espectros de RMN de ^{13}C (125MHz, CDCl_3) e ^1H (500MHz, CDCl_3).

C	δ	δH
1	22,6	2,24 (m)
2	121	5,49 (sl)
3	130*	-
4	37,4	2,12 (m)
5	69,1	5,54 (sl)
6	44,9	1,72 (dd J_{AB} 12Hz; J_{AC} 6Hz)
7	74*	-
8	41,5	1,52 (m)
9	22,7	2,03 (m)
10	124,6	5,11 (t J 6,6Hz)
11	132,2*	-
12	26	1,68 (s)
13	18	1,61 (s)
14	24,6	1,13 (s)
15	23,4	1,64 (s)
16	171,7 [#]	-
17	22	2,04 (s)

* carbono quaternário # carbono carbonílico

O íon molecular de m/z 262 e o íon acílio de m/z 43 foram observados no espectro de massas de IE. Estas observações sugerem que a substância 11 seja um sesquiterpeno oxigenado, cuja fórmula molecular foi atribuída como sendo $C_{17}H_{26}O_2$. Entretanto, a aquisição de espectros de massas de alta resolução através da ionização por *electrospray* (**Figura 33**) exibiu íons não observados em IE-EM. A ionização por *electrospray* possibilitou a detecção da molécula protonada com m/z 281.2103. A observação de um íon de m/z 281 sugere que a substância 11 possua uma hidroxila em sua constituição, a qual pode ser identificada pela observação do íon de m/z 263 ($[M+H-H_2O]^+$). Esta possibilidade foi testada induzindo a fragmentação do íon de m/z 281 (EM/EM) sob a variação da energia de colisão entre 0 e 15 eV (**Figura 11 do Apêndice**). É possível observar que os íons produtos são mais abundantes que o íon precursor mesmo quando a energia de dissociação utilizada é igual a 0eV o que evidencia a instabilidade do íon de m/z 281. A abundância do íon de m/z 263 em detrimento do íon de m/z 281 se acentua a medida em que se aumenta a energia de colisão. Estas observações confirmam a hipótese da substância 11 ser hidroxilada e nos aponta a fórmula molecular de $C_{17}H_{28}O_3$, uma vez que os erros com relação à massa acurada foram da ordem de 3 ppm.

Figura 33: Espectro de massas da substância 11 no modo *scan* (ESI-qTOF; modo positivo).

Com base na fórmula molecular enfim obtida com precisão, calculou-se um IDH igual a 4. Os dados de RMN apresentaram deslocamento que nos apontam a presença de 3 insaturações conferidas a duas olefinas (124,6/132,2 e 121/130) e uma carbonila (171,7). Este $\delta^{13}\text{C}$ de 171,1 é característico de carbonilas de função éster (PAVIA, 2009). Concluindo, a substância **11** se trata de um sequiterpeno esterificado, que possui duas olefinas e um ciclo.

Pelo mapa de contornos HMBC (**Figura 12 do Apêndice**) foi possível identificar que a olefina formada pelos carbonos rotulados como 10 e 11 possuía um carbono quaternário ligado a duas metilas. Isto somado a informação de que temos um álcool que desidrata rapidamente quando ionizado, levanta a possibilidade da substância **11** ser um derivado do bisabolol. Esta hipótese também se fundamenta no relato de ocorrência deste metabólito em *Lychnophora ericoides* (CURADO *et al.*, 2006). Por fim deve ser ressaltado que este metabólito já foi encontrado presente em amostras analisadas durante este estudo.

A busca de derivados do bisabolol na literatura apontou um derivado do ácido púlico isolado de partes aéreas de *Pulicaria glutinosa* (MUHAMMAD *et al.*, 1992) que se assemelha com nossa proposta (**Tabela 7**).

Tabela 7: Comparação dos deslocamentos ($\delta^{13}\text{C}$) entre a substância **11** (obtido em 125MHz) e o poliglutal monoacetato (obtido em 50MHz).

C	Substância 11 (δ)	Poliglutal monoacetato (δ)
1	22,7	71,9
2	121	121,2
3	130	139,4
4	37,4	29,9
5	69,1	20,9
6	44,9	42,2
7	74	31,3
8	41,5	33,5
9	22,6	27
10	124,6	154,7
11	132,2	139,6
12	26	14,7
13	18	195,3
14	24,6	9
15	23,4	23,1
16	171,7	171,3
17	22	21,4

A interpretação (**Tabela 8**) do mapa de contornos HMBC possibilitou identificar que os prótons com δ 1,68 e 1,61, das metilas 12 (26,0 ppm) e 13 (18,0 ppm) respectivamente, apresentavam correlação com os carbonos olefínicos 10 (124,6 ppm) e 11 (132,2 ppm). A correlação do próton δ 5,11, do carbono olefínico 10, com estes carbonos metílicos, 12 e 13, confirmam a possibilidade da cadeia 2-hidróxi-6-metil-hepteno lateral ao ciclo. Em seguida, observou-se que este próton olefínico ainda apresentava correlação com o carbono metilênico C-9 (22,7 ppm). Foi possível determinar a conectividade deste carbono olefínico ao carbono metilênico devido a esta observação. De maneira similar foi atribuída a conectividade do carbono 9 ao carbono metilênico C-8 (41,5 ppm) sendo que este último apresenta desblindagem compatível com um carbono em posição β a uma hidroxila. Observa-se que seus prótons (^1H δ 1,52) apresentam correlação com o carbono quaternário C-7 (^{13}C δ 74,0), o que confirma sua posição β ao heteroátomo. Este heteroátomo é o oxigênio de uma hidroxila, pois conforme observado nos estudos de espectrometria de massas, a hidroxila que é perdida na forma de água é a de um álcool terciário. Este carbono quaternário C-7, α a carbonila, ainda é correlacionado aos prótons do C-14 (1,52 ppm) o que confirma a presença da metila. Podemos enfim afirmar que a cadeia lateral ao ciclo corresponde a que foi levantada na hipótese.

Tabela 8: Correlações entre hidrogênios e carbonos observadas no mapa de contornos HMBC da substância **11** (500MHz, CDCl_3).

Posição	^1H (δ)	^{13}C (δ)
1	2,24	C-6(44,9); C-2(121,0); C-3(130,0)
2	5,49	C-15(23,4); C-4(37,4); C6(44,9)
3	*	-
4	2,12	C-17(22,0); C-6(44,9); C-5(69,1); C-2(121,0); C-3(130,0)
5	5,54	C-1(22,6); C-7(74,0); C-3(130,0); C-16(171,7)
6	1,72	-
7	*	-
8	1,52	C-7(74,0); C-6(44,9); C-14(24,5); C-9(22,7)
9	2,03	C-8(41,5); C-7(74,0); C-10(124,6); C-11(132,2); C-16(171,7)
10	5,11	C-9(22,7); C-12(26,0); C-13(18,0); C-8(41,5)
11	*	-
12	1,68	C-7(74,0); C-13(18,0); C-10(124,6); C-11(132,2)
13	1,61	C-12(26,0); C-10(124,6); C-11(132,2)
14	1,13	C-8(41,5); C-6(44,9); C-7(74,0)
15	1,64	C-4(37,4); C-2(121,0)
16	#	-
17	2,04	C-16(171,7)

Posições relativas à * carbono quaternário # carbono carbonílico

Os sinais correspondentes aos carbonos carbonílico C-16 (171,7 ppm) e a metila C-17 (22,0 ppm) foram atribuídos a função éster devido a correlação apresentada pelos prótons desta metila (2,04 ppm) com a carbonila. Esta é a única correlação destes prótons que pode ser visualizada no mapa de contornos HMBC.

As comparações dos deslocamentos químicos dos carbonos do ciclo de nossa hipótese com os dos carbonos do ciclo poliglutal monoacetato demonstra que há muita semelhança entre as estruturas. Com a análise detalhada dos dados tabelados (**Tabela 8**) foi possível traçar as correlações observadas no mapa de contornos HMBC em forma de um esquema de setas (**Figura 34**). É possível afirmar que o ciclo é o 3-metil ciclohexeno a partir destas comparações supracitadas.

Figura 34: Esquema de setas das correlações observadas no mapa de contornos HMBC da substância **11**.

Portanto, foi possível atribuir todos os deslocamentos químicos aos carbonos, determinar qual a conectividade dos átomos bem como determinar o número de átomos de carbono que compõe a cadeia alquílica em posição α a carbonila. Para afirmar definitivamente que a proposta traçada representa realmente a substância **11** resta determinar que o grupo acetil esta posicionado no carbono 5. Este carbono apresenta deslocamento químico próprio de carbono ligado a heteroátomo (δ 69,1 ppm). Não restam dúvidas quanto a conectividade do carbono 5 ao

grupo acetil quando observamos que este é o único carbono do ciclo que apresenta correlação com a carbonila.

4.2 Otimização das condições de pré-concitração por HS-SPME

Após os testes das diferentes fibras, foram obtidos, confirmando a hipótese, os melhores resultados para a fibra de PDMS. Observou-se uma maior intensidade dos sinais cromatográficos, quando foi utilizada a fibra PDMS, em relação a ambas as fibras CAR/PDMS e PDMS/DVB. Ademais, a afinidade pelas duas diferentes classes de metabólitos (monoterpenos e sesquiterpenos), em proporção similar aquela observada no óleo essencial, foi maior para a fibra de PDMS em relação às outras, como se pode notar na comparação entre cromatogramas disposta na forma de figura (**Figura 13 do Apêndice**).

Em relação à determinação do valor adequado da variável temperatura do banho, dentre os valores avaliados foi observado que 45°C e 55°C não apresentaram todos os 11 sinais majoritários nos cromatogramas, sendo que em ambos os casos os sinais ausentes eram relativos aos tempos de retenção de **9** e **11**. Os demais valores apresentaram todos os sinais de interesse com intensidade de sinal diretamente proporcional ao valor em graus Celsius. Portanto, para definir qual seria a melhor temperatura entre as que contemplam os 11 sinais cromatográficos considerou-se a relação Ses/Mon como a melhor maneira de discriminar o valor mais condizente com as necessidades analíticas.

Na **Figura 35** pode ser notada a mesma proporção entre intensidade de sinal e graus Celsius, descrita anteriormente. De posse dos dados da razão Ses/Mon em amostras de óleo essencial foi possível encontrar a melhor temperatura de banho. Partindo do raciocínio que devido à exposição do óleo a fatores que favorecem a volatilização, como por exemplo, a secagem do material sob fluxo de N₂, pode-se assumir que em relação aos valores hipotéticos naturais, há um aumento na razão Ses/Mon nas amostras de óleo essencial. Tal aumento se deve à maior volatilização dos monoterpenos durante a obtenção deste óleo. Tal raciocínio restringe a escolha do melhor valor a uma faixa, sombreado da **Figura 35**, que compreende a temperatura de 75°C.

Figura 35: Valores observados para a relação Ses/Mon que foram utilizados para definição da temperatura ideal (75°C) de banho para a extração HS-SPME. Em tom cinza está representada a faixa de valores da relação Ses/Mon considerados ideais para o estudo. A relação Ses/Mon é expressa pela soma dos valores para os 4 sinais de sesquiterpenos majoritários em função da soma dos valores para os 7 sinais dos monoterpenos majoritários.

De forma análoga foram analisados os cromatogramas obtidos com diferentes tempos de exposição da fibra PDMS durante o *headspace*. Foi observado que a análise com tempo de exposição que apresentou os cromatogramas com a melhor resolução cromatográfica, intensidade de sinais observados e relação Ses/Mon foi a de 30 minutos. Como é possível observar na **Figura 14** do **Apêndice** o uso de tempos menores resultavam em cromatogramas com intensidade de sinal e relação Ses/Mon abaixo do ideal. Foi observado que a relação era a inversa para os tempos de 40 e 50 minutos. Nestas temperaturas o sinal foi observado em intensidade ideal, entretanto a relação Ses/Mon apresentou-se consecutivamente maior a medida que se aumenta a temperatura. Estas observações permitiram que o tempo de exposição da fibra fosse estabelecido em “30 minutos”.

Em relação à estabilidade das amostras armazenadas em freezer, também foram avaliados os dois parâmetros, intensidade do sinal e relação Ses/Mon.

Os resultados estão dispostos na **Figura 36**. Nota-se que há entre 96h e 144h uma diminuição na intensidade do sinal. Entretanto, a relação Ses/Mon apresenta valores muito semelhantes entre 24h e 144h. Por uma questão física, não há a possibilidade de realizar esta avaliação com repetições, pois evidentemente, a aplicação número 2 de qualquer ponto

analisado não corresponde ao múltiplo de 24. Por exemplo, uma hipotética duplicata do ponto 24h seria formada, na verdade, por um ponto 24h e outro 24+1.

Figura 36: Intensidade do sinal no cromatograma (esquerda) e relação Ses/Mon (direita) ao longo do período de armazenamento em freezer no laboratório. À esquerda, a intensidade do sinal foi expressa em unidades de área que resultam da soma de cada um dos 11 sinais majoritários. À direita a relação Ses/Mon é expressa pela soma dos valores para os 4 sinais de sesquiterpenos majoritários em função da soma dos valores para os 7 sinais dos monoterpenos majoritários.

Portanto, considerando a variabilidade intrínseca da matriz orgânica, por mais uniforme que seja a amostra, haverá alguma variação entre alíquotas da mesma. Levando em conta esta limitação analítica, pode-se afirmar que há, relativamente, estabilidade na relação Ses/Mon dentro do período estudado.

4.3 Isolamento dos sesquiterpenos

Os resultados da revelação das placas CCDP demonstraram que foram resolvidas oito bandas. Por mais criterioso tenha sido o manuseio das amostras durante o processo de isolamento, não foi possível recuperar todas as bandas cromatográficas, provavelmente pela volatilização destas durante a rotaevaporação. Entretanto, mostrou-se possível a recuperação de três sesquiterpenos com nível de pureza e quantidade [(Substância 10= 23,3mg); (Substância 11= 27,2mg)] adequadas para a aquisição de espectros de RMN (**Figura 15 do Apêndice**). Entretanto, o nível de pureza para a substância 10 não foi o suficiente para possibilitar a aquisição de espectros de RMN que fossem possíveis de ter todos os seus sinais atribuídos de forma inequívoca.

4.4 Avaliação da variação intraplanta

A avaliação intraplanta foi avaliada segundo a metodologia traçada previamente, a qual é apresentada neste documento na seção **MATERIAIS e MÉTODOS**. O material botânico foi coletado durante a coleta de março de 2009 no campo de coleta “paraíso”. Os resultados estão expressos na forma de gráficos do tipo barras (**Figuras 37, 38 e 39**). Para obtenção destes gráficos foram utilizadas as médias aritméticas dos valores de intensidade de sinal. Cada média compreende os valores médios de cinco indivíduos.

Figura 37: Comportamento dos metabólitos majoritários em diferentes folhas dos capítulos florais. Valores obtidos pela média dos 5 indivíduos coletados.

Figura 38: Comportamento dos metabólitos majoritários em diferentes folhas dos botões florais. Valores obtidos pela média dos 5 indivíduos coletados.

Figura 39: Relação Ses/Mon em diferentes folhas do capítulo floral (esquerda) em comparação com as diferentes folhas do botão floral (direita). Os dados foram obtidos pela média aritmética de cinco amostragens por ponto analisado, sendo a média dos valores de intensidade de todos sesquiterpenos majoritários em razão da média dos valores de intensidade de todos os monoterpenos majoritários. A barra de erros se refere a cinco por cento a mais ou a menos dos valores totais de cada ponto analisado.

É possível notar que se observa um sinal menos intenso a medida que utiliza-se folhas mais velhas em ambos os dois tipos de ramos analisados. Além desta diferença na intensidade do sinal, que ocorre para todos os 11 sinais selecionados como majoritários, os gráficos apontam para uma diminuição da relação Ses/Mon a medida que se utiliza folhas mais velhas.

4.5 Variação intraespecífica

A **Figura 16** do **Apêndice** disponibiliza uma comparação dos cromatogramas obtidos durante as análises das amostras **BF1** dos dois grupos de indivíduos. Nele é possível observar a similaridade da constituição química entre os grupos, o que aponta para a possível caracterização da estabilidade intraespecífica. É pertinente ressaltar que são notáveis as diferenças anatômicas macroscópicas entre o grupo de indivíduos do campo de coleta “paraíso” e os indivíduos do campo de coleta “pedreira”. Esta aparente dissonância entre anatomia e fitoquímica motivou ainda mais o aprofundamento dos estudos de variação intraespecífica.

A obtenção de amostras para estudos de variação intraplanta foi realizada em várias coletas e, quando foi possível o acesso, em ambos os campos de coleta. Os dados obtidos foram expressos na forma de valores da relação Ses/Mon (**Figura 40**). É possível notar que sempre que foi possível comparar as duas regiões nota-se haver uma tendência dos valores serem maiores para folhas mais jovens de indivíduos do campo de coleta “pedreira”. Entretanto, de forma geral, observa-se que há uma tendência de comportamento dos valores da razão Ses/Mon em função da idade das folhas, sendo que nesta função os valores da relação Ses/Mon seriam inversamente proporcionais a idade das folhas. Portanto as folhas mais jovens apresentariam os maiores valores para relação Ses/Mon e as mais senis, por conseguinte, os menores valores.

Esta tendência de comportamento é razoavelmente similar em ambos os grupos de indivíduos. Salvo a exceção a essa tendência estão os valores observados para os indivíduos do campo de coleta “paraíso” em março de 2010 que apresentaram de fato uma tendência de aumento dos valores para as folhas determinadas “de idade intermediária”. Não foi possível acessar o campo de coleta “pedreira”.

Figura 40: Valores da relação Ses/Mon observados em experimentos de variação intraplanta durante cinco coletas realizadas entre 2009 e 2010. Os dados foram obtidos pela média aritmética de cinco amostragens por ponto analisado, sendo a média dos valores de intensidade de sinal de todos sesquiterpenos majoritários em razão da média dos valores de intensidade de sinal de todos os monoterpenos majoritários. A barra de erros se refere a cinco por cento a mais ou a menos dos valores totais de cada ponto analisado.

4.6 Variação circadiana

Os indivíduos que foram marcados no campo de coleta “paraíso” como I, II, III, IV e V tiveram suas amostragens analisadas pela técnica HS-SPME. Os resultados dos cromatogramas foram tabelados e as médias aritméticas dos valores foram utilizados para a confecção dos gráficos do tipo barras apresentados na **Figura 41**. Nota-se que no horário 19h30min os sesquiterpenos apresentam, de maneira geral os maiores sinais, excetuando-se o acetato de bisabolila que tem sinais mais intensos no horário de 07h30min. Já em relação aos monoterpenos, com exceção das substâncias **1** e **7**, é possível observar que de forma geral há um declínio na intensidade do sinal entre todo o intervalo da coleta circadiana. As exceções α -pineno (**1**) e terpineol (**7**) não apresentam um comportamento em comum. A substância **1** não parece apresentar qualquer padrão de comportamento enquanto a substância **7** tem um comportamento semelhante aos sesquiterpenos.

Figura 41: Intensidade de sinal nos cromatogramas das amostras de coleta em período circadiano (março, 2009).

Os dados sugerem ocorrer um aumento relativo da relação Ses/Mon durante os períodos da alvorada e do crepúsculo (**Figura 42**), o que se trata de um comportamento registrado na literatura para a emissão de terpenos voláteis de espécies de *Pinus* (HELMING *et al.*, 2006 *apud* DUHL *et al.* 2008).

Figura 42: Valores observados para a relação Ses/Mon durante as coletas do período circadiano em diferentes datas de coleta. Os dados foram obtidos pela média aritmética de cinco amostragens por ponto analisado, sendo a média dos valores de intensidade de sinal de todos Sesquiterpenos majoritários em razão da média dos valores de intensidade de sinal de todos os Monoterpenos majoritários. A barra de erros se refere a cinco por cento a mais ou a menos dos valores totais de cada ponto analisado.

Figura 43: Gráfico em perspectiva comparando os perfis circadianos durante o fim do verão (março de 2009) e o fim do inverno (agosto de 2009).

No período de inverno, o registro de que as temperaturas ambiente no campo de coleta declinam-se a partir das 17hs (**Figura 44**) podem explicar o declínio da relação Ses/Mon que ocorre na medida em que o período do crepúsculo e da noite se aproximam dentro do período circadiano. Entretanto o mesmo raciocínio não se aplica para a interpretação da variação dos valores da relação Ses/Mon durante o período circadiano na época do verão chuvoso, quando é observado uma tendência de aumento nos valores da relação Ses/Mon nos períodos do crepúsculo e da alvorada.

Figura 44: Gráfico comparando o comportamento da temperatura ambiente durante os períodos circadianos do fim do verão (março de 2009) e do fim do inverno (agosto de 2009). As aferições foram efetuadas com um termômetro posicionado sobre um dos cinco indivíduos do campo de coleta “paraíso”.

Existem vários fatores que governam a emissão de sesquiterpenos por partes aéreas de plantas, os quais incluem fatores bióticos e abióticos (DUHL *et al.* 2008). Dentre os fatores abióticos talvez o mais determinante seja a temperatura. Baseado em aferições a partir de galhos de laranjeiras não adultas, os autores Hansen; Seufert (1999, *apud* DUHL *et al.* 2008) construíram uma curva que expressa os níveis de β -cariofileno emitidos pela planta em função da temperatura e puderam encontrar um aumento de 5,6 vezes a partir do aumento de 10°C na temperatura a qual foi submetida à amostra. Outro exemplo deste controle abiótico é a emissão de sesquiterpenos por folhas de *Pinus taeda*. Os valores apresentam uma forte dependência com a temperatura, sendo que os máximos são observados pela manhã e ao horário do

crepúsculo enquanto durante a noite ocorre um declínio (HELMING *et al.*, 2006 *apud* DUHL *et al.* 2008).

Durante os estudos de variação intraplanta foram coletadas amostras do campo de coletas “paraíso” em seis coletas. A análise comparativa destas amostragens pode fornecer dados de variação sazonal (**Figura 45**). É possível notar que durante os períodos chuvosos 2009, março e novembro ocorre uma tendência de aumento nos valores da relação Ses/Mon, bem como no mês de maio deste ano. Entretanto essa tendência é nítida apenas para ramos mais jovens.

Figura 45: Gráfico em linhas que demonstram o comportamento da relação Ses/Mon em seis períodos distintos de um intervalo de 18 meses. Nota-se que durante o período do inverno seco os valores tendem a serem reduzidos. Os dados foram obtidos pela média aritmética de cinco amostragens por ponto analisado, sendo a média dos valores de intensidade de sinal de todos Sesquiterpenos majoritários em razão da média dos valores de intensidade de sinal de todos os Monoterpenos majoritários. A barra de erros se refere a cinco por cento a mais ou a menos dos valores totais de cada ponto analisado.

4.7 Óleos essenciais

Os óleos essenciais foram obtidos utilizando o material vegetal acessado durante as coletas de maio, agosto e novembro de 2009 realizadas no campo de coleta “pedreira”. Utilizando o aparelho de Clevenger obtivemos um material de característica oleosa, coloração verde-amarelado e odor *sui generis* entre o doce e o cítrico. Utilizando aproximadamente as

mesmas quantidades de folhas em cada obtenção do óleo, foi possível observar uma diferença na quantidade de óleo obtida (**Tabela 9**) entre cada obtenção. Não é possível afirmar o rendimento do processo, pois o material fresco foi utilizado e não foi possível a aferição da porcentagem de água das folhas frescas.

Tabela 9: Obtenção de óleo essencial em três coletas de 2009.

Data	Massa de folhas	Quantidade de óleo
maio, 2009	298g	170 μ L
agosto, 2009	288g	110 μ L
novembro, 2009	300g	150 μ L

Foi observado que o óleo essencial obtido das folhas coletadas em maio, final de verão chuvoso, apresentou todas as 11 substâncias majoritárias **Figura 46** e a relação Ses/Mon de 1,63. Quando se observa da mesma maneira os dados de agosto nota-se que o α -terpineno e a substância **9** não foram detectadas. Já em novembro não só a substância **9** não foi detectada mas também se fizeram ausentes o α -pineno β -pineno e o α -terpineno. Consequentemente a relação Ses/Mon de novembro foi a maior da série de dados disposta na **Figura 47**.

Figura 46: Intensidade de sinal das 11 substâncias majoritárias do estudo observadas em análises de óleo essencial de maio, agosto e novembro de 2009.

Figura 47: Valores observados para a relação Ses/Mon dos óleos essenciais em diferentes meses do ano de 2009.

4.8 Efeito do acetato de bisabolila na liberação de mediadores inflamatórios *in vitro*

Os resultados demonstram que o tratamento prévio das células com o acetato de bisabolila inibe significativamente a produção de TNF- α por macrófagos peritoneais estimulados com LPS em ensaios *in vitro*.

Figura 48: Efeitos do acetato de bisabolila sobre os níveis de TNF - α produzidos por macrófagos peritoneais de ratos estimulados com LPS. As células (4×10^5 células/poço) foram tratadas com diferentes concentrações de bisabolila (3 e 10 $\mu\text{g/mL}$) por 30 minutos e estimuladas com LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) por 4 horas. Após o tratamento o sobrenadante foi coletado e a concentração de TNF - α foi determinada por ELISA. O controle negativo foram células tratadas com DMSO (<1%). O Controle foi representado por células tratadas com LPS (10 $\mu\text{g/mL}$). DEXA foram células tratadas com dexametasona (9 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ comparado com o controle (LPS).

O tratamento com acetato de bisabolila não inibe a produção de IL-6 em macrófagos peritoneais de ratos sensibilizadas com LPS.

Figura 49: Efeitos do acetato de bisabolila sobre os níveis de IL-6 produzidos por macrófagos peritoneais de ratos estimulados com LPS. As células (4×10^5 células/poço) foram tratadas com diferentes concentrações de bisabolila (3 e 10 $\mu\text{g/mL}$) por 30 minutos e estimuladas com LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) por 4 horas. Após o tratamento o sobrenadante foi coletado e a concentração de IL-6 foi determinada por ELISA. O controle negativo foram células tratadas com DMSO (<1%). O Controle foi representado por células tratadas com LPS (10 $\mu\text{g/mL}$). DEXA foram células tratadas com dexametasona (9 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ comparado com o controle (LPS).

O tratamento com acetato de bisabolila inibe significativamente a produção de IL-1 β em macrófagos peritoneais de ratos sensibilizadas com LPS.

Figura 50: Efeitos do acetato de bisabolila sobre os níveis de IL-1 β produzidos por macrófagos peritoneais de ratos estimulados com LPS. As células (4×10^5 células/poço) foram tratadas com diferentes concentrações de bisabolila (3 e 10 μ g/mL) por 30 minutos e estimuladas com LPS (10 μ g/mL) por 4 horas. Após o tratamento o sobrenadante foi coletado e a concentração de IL-1 β foi determinada por ELISA. O controle negativo foram células tratadas com DMSO (<1%). O Controle foi representado por células tratadas com LPS (10 μ g/mL). DEXA foram células tratadas com dexametasona (9 μ g/mL). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ comparado com o controle (LPS).

O tratamento com acetato de bisabolila não inibe a produção de NO em macrófagos peritoneais de ratos sensibilizadas com LPS.

Figura 51: Efeitos do acetato de bisabolila sobre os níveis de NO produzidos por macrófagos peritoneais de ratos estimulados com LPS. As células (4×10^5 células/poço) foram tratadas com diferentes concentrações de bisabolila (3 e 10 $\mu\text{g/mL}$) por 30 minutos e estimuladas com LPS (10 $\mu\text{g/mL}$) por 4 horas. Após o tratamento o sobrenadante foi coletado e a concentração de NO foi determinada por ELISA. O controle negativo foram células tratadas com DMSO (<1%). O Controle foi representado por células tratadas com LPS (10 $\mu\text{g/mL}$). DEXA foram células tratadas com dexametasona (9 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados são expressos como média $\pm$ desvio padrão. * $p < 0,05$ comparado com o controle (LPS).

Segundo Verri *et al.* (2006) tem sido demonstrado que neurônios sensoriais expressam receptores transmembrânicos para TNF- α e IL-1 β , o que vem a sugerir o papel direto destas citocinas na sensibilização nociceptiva durante a inflamação (COPRAY *et al.*, 2001 *apud* VERRI *et al.*, 2006; PARADA *et al.*, 2003b *apud* VERRI *et al.*, 2006). Ainda segundo esta revisão bibliográfica, já foi demonstrado que TNF- α é capaz de deflagrar o potencial de ação de neurônios quando aplicado *in vivo* diretamente em axônios periféricos, bem como possui a capacidade de aumentar a sensibilidade a estímulos químicos e mecânicos (SORKIN *et al.*, 1997 *apud* VERRI *et al.*, 2006; NICOL *et al.*, 1997a *apud* VERRI *et al.*, 2006; JUNGER & SORKIN, 2000 *apud* VERRI *et al.*, 2006). Não obstante, IL-1 β desempenha sobre neurônios sensoriais um aumento da susceptibilidade a nocicepção por calor (OBREJA *et al.*, 2002 *apud* VERRI *et al.*, 2006).

Ainda acerca da determinação dos papéis das citocinas no processo nociceptivo, ressalta-se que Cunha e colaboradores, 2005, estudaram a importância destes peptídeos no processo sensorial. Os resultados encontrados têm destaque nesta discussão, pois evidenciam o papel de TNF- α e IL-1 β na hipernocicepção inflamatória. Foi estabelecido a circunscrição destes mediadores dentro da cascata de citocinas que descreve a gênese deste fenômeno.

A redução nos níveis de TNF- α e IL-1 β que foi observada nos ensaios com macrófagos peritoneais pode estar relacionada com a capacidade analgésica que é popularmente atribuída aos preparados hidroalcoólicos de partes aéreas de *Lychnophora ericoides*. O sesquiterpeno submetido aos bioensaios é majoritário no cromatograma (**Figura 16** da seção **MATERIAL E MÉTODOS**) obtido pela injeção da fração hexânica que foi obtida pela partição do preparado hidroalcoólico com o solvente lipofílico. Este cromatograma embasa a afirmação de que o acetato de bisabolila, substância **11**, esta presente no preparado hidroalcoólico bem como os resultados dos ensaios *in vitro* corroboram a atividade antiinflamatória e analgésica deste preparado que é relatada pela população local de Minas Gerais.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Pode-se concluir a partir dos resultados do estudo que foi possível:

- Otimizar as condições necessárias para a análise dos COVs das folhas de *Lychnophora ericoides* de dois campos de coleta distintos: campo de coleta “paraíso” e campo de coleta “pedreira”.

- Obter o óleo essencial das folhas dos indivíduos “pedreira”, analisar sua constituição química em CG-EM e obter os dados para análise do ritmo sazonal dos COVs de *Lychnophora ericoides* através destas amostragens.

- Identificar 7 monoterpenos que são majoritários da fração volátil das folhas de *Lychnophora ericoides*: (1) α -pineno, (2) β -pineno, (3) α -terpineno, (4) ocimeno, (5) limoneno, (6) γ -terpineno e (7) terpinen-4-ol bem como do sesquiterpeno (8) sesquicineol.

- Isolar 3 sesquiterpenos sendo que 2 deles, as substâncias **10** e **11**, as quais não foram identificadas através da comparação de espectros de massas em ionização por elétrons.

- Detectar um sesquiterpeno, a substância **9**, que não é um componente majoritário dos óleos essenciais, através de técnicas modernas e brandes de pré-concentração como o HS-SPME.

- Concluir que um dos sesquiterpenos da fração volátil, a substância **10**, se trata de uma estrutura bicíclica hidroxilada com uma insaturação endocíclica e um grupo isopropenil a qual não se trata de um derivado cadinano.

- Elucidar a estrutura química da substância **11**, o sesquiterpeno acetato de bisabolila.

- Obter dados consistentes para o estudo comparativo das razões sesquiterpeno/monoterpeno emitidas a partir das folhas de *L. ericoides* em HS-SPME. Os dados embasaram as avaliações da ritmicidade e do comportamento intraespecífico dos metabólitos secundários as quais foram delineadas como objeto do estudo.

- Observar tendências de comportamento rítmicas, principalmente a nível circadiano. Ocorre durante o verão uma tendência de aumento relativo de porcentagens de sesquiterpenos na fração volátil, enquanto ao longo da noite a tendência é de queda nestes níveis.

-Observar tendências de variação intraplanta dos níveis de sesquiterpenos. Principalmente durante os períodos chuvosos as folhas mais jovens de botões florais e de capítulos florais tendem a apresentar porcentagens maiores de sesquiterpenos.

-Constatar uma uniformidade do perfil químico a nível intraespecífico a partir da comparação dos resultados do estudo intraplanta dos dois campos de coleta visitados. Qualitativamente não há diferença entre os indivíduos.

-Conduzir avaliações *in vitro* da capacidade inibitória do acetato de bisabolila sobre a produção de três citocinas e de óxido nítrico por macrófagos peritoneais isolados de ratos Wistar.

-Observar variações estatisticamente significativas na liberação de TNF- α e IL-1 β por macrófagos peritoneais de ratos Wistar *in vitro*. As células que foram previamente expostas ao acetato de bisabolila apresentaram níveis de liberação destas citocinas significativamente menores que as células estimuladas com LPS (controle).

-Obter dados de bioatividade que corroboram a ação analgésica de preparados hidroalcoólicos das partes aéreas de *L. ericoides* que é atribuída pelos “erveiros” e “raizeiros” que vivem na região dos campos de coleta.

REFERÊNCIAS

6. REFERÊNCIAS:

- ADAMS, R. P. **Identification Oil Components by Gas Chromatography-Mass Spectroscopy**, Allured Publishing Corporation, USA, 1995.
- ANGELOPOULOU, D.; DEMETZOS, C.; PERDETZOGLU, D. Diurnal and seasonal variation of the essential oil labdanes and clerodanes from *Cistus monspeliensis* L. leaves. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.30, p.189-203, 2002.
- AUGUSTO, F.; LEITE e LOPES, A.; ZINI, C.A. Sampling and sample preparation for analysis of aromas and fragrances. **TrAC-Trends on Analytical Chemistry**, v.22, p.160 -168, 2003.
- BALDIN, E.L.L.; POGETTO, M.H.F.A.D.; PAVARINI, D.P.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C. Composição química e atividade acaricida do óleo essencial de *Lychnophora ericoides* Mart. sobre *Tetranychus urticae* Koch (Acari: Tetranychidae). **Boletín de Sanidad Vegetal. Plagas**, v.36, p.125-132, 2010.
- BAZON, J.N.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W.; LOPES, J.N.C. Constituents of *Lychnophora brunioides*. **Fitoterapia**, Milão, v. 68, n.1, p.92-93, 1997.
- BOHLMANN, F.; ZDERO C.; KING R. M.; ROBINSON H.; Seven guaianolides from the tribe vernonieae. **Phytochemistry**, v.19, p.2669-2673, 1980.
- BOHLMANN, F.; ZEISBERG, R.; KLEIN, E. ¹³C-NMR-Spektren von Monoterpenen. **Organic Magnetic Resonance**, v.7, p.426-432, 1975.
- BONATO, P.S. **Cromatografia Gasosa**. In: COLLINS, C.H.; BRAGA, G.L.; BONATO, P.S. (Org.). **Fundamentos de Cromatografia**, 7 ed. Campinas-SP: UNICAMP, 2006, p. 203-270.
- BORELLA, J.C.; LOPES, J.L.C.; VICHNEWSKI, W.; CUNHA, W. R.; HERZ, W. Sesquiterpene lactones, triterpenes and flavones from *Lychnophora ericoides* and *Lychnophora pseudovillosissima*. **Biochemical Systematics and Ecology**, v.26 p.671-676, 1998.
- BORSATO, M. L. C.; GRAEL, C. F. F.; SOUZA, G. E. P.; LOPES, N. P. Analgesic activity of the lignans from *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, v.55, p.809-813, 2000.
- BREITMAIER, E. **Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca, pheromones**. Weinheim: Wiley-VCH, 2006, 223 p.

- CDB (Secretariado da Convenção sobre Diversidade Biológica). Canadá. **Panorama da Biodiversidade Global 2**, Montreal, 81 + vii páginas, 2006.
- CERQUEIRA, M.B.S.; SOUZA, J.T.; AMADO JÚNIOR, R. R.; PEIXOTO, A.B.F. Ação analgésica do extrato bruto aquoso liofilizado do caule e das folhas da *Lychnophora ericoides* Mart. (arnica). **Ciência e Cultura**, v.39, n.5/6, p.551-553, 1987.
- CHIARI, E.; DUARTE, D.S.; RASLAN, D.S.; SAÚDE, D.A.; PERRY, K.S.P.; BOAVENTURA, M.A.D.; GRANDI, T.S.M.; STEHMANN, J.R.; ANJOS, A.M.G.; OLIVEIRA, A.B. *In vitro* screening of Asteraceae plant species against *Trypanosoma cruzi*. **Phytoterapy Research**, v.10, p.636-638, 1996.
- CHIARI, E.; OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S.; MESQUITA, A.L.; TAVARES, K.G. Screening *in vitro* of natural products against blood forms of *Trypanosoma cruzi*. **Transactions of Royal Society Tropical Medicine Hygiene**, v.85, p.372-374, 1991.
- CHRISTMANN, M. Otto Wallach: Founder of Terpene Chemistry and Nobel Laureate 1910. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 49, p. 9580-9586, 2010.
- CONTINI, S.H.T.; SANTOS, W.F.; MORTARI, M.R.; LOPES, N.P.; LOPES, J.L.C. Neuropharmacological effects of *Lychnophora species* (Vernonieae, Asteraceae) and anticonvulsant activity of 4,5-di-O-[E]-caffeoylquinic acid isolated from stem of *L. rupestris* and *L. staavioides* on mice. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.102, p.281-286, 2008.
- COSTA, M. A. C.; JESUS, J.G.; FARIAS, J.G.; NOGUEIRA, J.C. M.; OLIVEIRA, A.L.R.; FERRI, P.H. Variação estacional do óleo essencial em arnica (*Lychnophora ericoides* Mart.). **Revista de Biologia Neotropical**, v.5, p.53-65, 2008.
- COPPEN, J.J.W.; HONE, G.A. Gum naval stores: turpentine and rosin from pine resin. **Non-Wood Forest Products - 2**, FAO, Rome, 1995. 71 p.
- CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. **Natural Products (Secondary Metabolites)**. Chapter 24 In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.) **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**, American Society of Plant Physiologists. 2002. 1408 p.
- CROWELL, P.L.; GOULD, M.N. Chemoprevention and therapy of cancer by *d*-limonene. **Critical Reviews in Oncogenesis**, v.5, n.1, p.1-22, 1994.

- CUNHA, T.M.; VERRI, JR.W.A.; POOLE, S.; PARADA, C.A.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. **Pain facilitation by proinflammatory cytokine actions at peripheral nerve terminals.** In: DELEO, J.A.; SORKIN, L.S.; WATKINS, L.R. (Eds) **Immune and Glial Regulation of Pain**, IASP Press, Seattle, p.67-83, 2007.
- CUNHA, T.M.; VERRI, W.A.; JR.; SILVA, J.S.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. A cascade of cytokines mediates mechanical inflammatory hypernociception in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v.102, p.1755-1760, 2005.
- CURADO, M.A.; OLIVEIRA, C.B.A.; JESUS, J.B.; SANTOS, S.C.; SERAPHIN, J.C. FERRI, P.H. Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides* **Phytochemistry**, v.67, p. 2363-2369, 2006.
- DUHL, T.R.; HELMIG, D.; GUENTHER, A. Sesquiterpene emissions from vegetation: a review, **Biogeosciences**, v.5, p.761-777, 2008.
- FUNK, V.A.; SUSANA, A.; STUESSY, T. F.; BAYER, R.J. **Systematics, Evolution, and Biogeography of Compositae**. Vienna, Austria: International Association for Plant Taxonomy (IAPT), 2009. 965p.
- GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, v.3, p.408-414, 2007.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, p.374-381, 2007.
- GOBBO-NETO L.; SANTOS, M.D.; KANASHIRO, A.; ALMEIDA, M.C.; LUCISANO-VALIM, Y.M.; LOPES, J.L.C.; SOUZA, G.E.P.; LOPES, N.P. Evaluation of the anti-inflammatory and antioxidant activities C-glucosylflavones from *Lychnophora ericoides* (Asteraceae). **Planta Medica**, v.71, p.3-6, 2005.
- GOTTLIEB, O.R. **Micromolecular evolution, systematics and ecology. An essay into a novel botanical discipline**. Springer, Heidelberg, 1982, 170p.
- GRAEL, C.F.F.; VICHNEWSKI, W.; SOUZA, G.E.P.; LOPES, J.L.C.; ALBUQUERQUE, S.; CUNHA, W.R. A study of the trypanocidal and analgesic properties from *Lychnophora*

- granmongolense* (Duarte) Semir & Leitão Filho. **Phytotherapy Research**, v.14, p.203-206, 2000.
- HAMBERGER, B.; BOHLMANN, J. Cytochrome P450 mono-oxygenases in conifer genomes: discovery of members of the terpenoid oxygenase superfamily in spruce and pine. **Biochemical Society Transactions**, v.36, p.1209-1214, 2006.
- HERZ, W.; WATANABE, K. Sesquiterpene alcohols and triterpenoids from *Liatris microcephala*. **Phytochemistry**, v.22, p.1457-1459, 1983.
- IRICS. *International Research Institute for Climate and Society* New York, Columbia University
Disponível em <<http://portal.iri.columbia.edu/portal/server.pt>>. Visualizado em 10 de março de 2010.
- JAKOVLEV, V.; ISAAC, O.; THIEMER, K.; KUNDE, R. Pharmacological investigations with compounds of chamomile ii. New investigations on the antiphlogistic effects of (-)-alpha-bisabolol and bisabolol oxides. **Planta Medica**, v.35, p.125-140, 1979.
- JBRJ. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio De Janeiro. **Lista de espécies Flora brasileira 2010**. Disponível em <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/>>. Visualizado em 10 de Janeiro de 2011.
- JORDÃO, C.O.; LOPES, J.L.C.; ALBUQUERQUE, S.; VICHNEWSKI, W. Biological activity of the crude extracts and isolated substances from *Lychnophora salicifolia* Mart. **Bolletino Chimico Farmaceutico**, v.136, p.56, 1997.
- KAMATOU, G.P.P.; VILJOEN, A.M. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol -rich oils. **Journal of American Oil Chemists' Society** v.87, p.1-7, 2010.
- KANDEL, E.R.; SCHWARTZ, J.H.; JESSEL, T.M. In: **Principles of Neural Science**. 4^a ed. EUA: McGraw-Hill, cap.24, p. 472-491, 2000.
- KELES, L.C.; MELO, N.I. ; AGUIAR, G.P. ; WAKABAYASHI, K.A.L. ; CARVALHO, C.E.; CUNHA, W.R. ; CROTTI, A.E.M. ; LOPES, J.L.C. ; LOPES, N.P. Lychnophorinae (Asteraceae): A survey of its chemical constituents and biological activities **Química Nova**, v. 33, p. 2245-2260, 2010.
- LOESER, J.D.; MELZACK, R. Pain: an overview. **The Lancet**, v.353, p.1607-1609, 1999.

- LOPES, N. P. A essência da arnica. **FAPESP - Pesquisa**, São Paulo-SP, v. 64, p. 42 - 44, 2000.
- LOPES; N.P.; KATO, M.J.; ANDRADE, E.H.A.; MAIA, J.G.S.; YOSHIDA, M. Circadian and seasonal variation in the essential oil from *Virola surinamensis* leaves. **Phytochemistry**, v.46, p.689-693, 1997.
- LOUGH, D. S.; MOLTAGH, S.; PAWLISZYN, J. Dynamics of organic compound extraction from water using liquid-coated fused silica fibers. **Analytical Chemistry**, v. 64, p. 1187-1189, 1992.
- MANSANARES, M.E. Estudo citotaxonômico de espécies do gênero *Lychnophora* Mart. (Asteraceae: Vernonieae: Lychnophorinae). 2004. 148 f. **Tese de Doutorado**, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, 2004.
- MASOTTI, V.; JUTEAU, F.; BESSIÈRE, J.M.; VIANO, J. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities, **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.51, p.7115-7121, 2003.
- MCCHESENEY, J. D.; VENKATARAMAN, S. K.; HENRI, J. T. Plant natural products: Back to the future or into extinction? **Phytochemistry**, vol. 68, p.2015-2022, 2007.
- MIGUEL, O.G.; LIMA, E.O.; MORAIS, V.M.F.; GOMES, S.T.A.; MONACHE, F.D.; CRUZ, A.B.; CRUZ, R.C.B.; CECHINEL FILHO, V. Antimicrobial activity of constituents isolated from *Lychnophora salicifolia*. **Phytotherapy Research**, v.10, p.694-696, 1996.
- MMA. BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Lista oficial das espécies da flora Brasileira ameaçadas de extinção**. Instrução normativa Nº 6, de 23 de setembro de 2008.
- MUHAMMAD, I.; EL FERALLY, F.S.; MOSSA, J.S.; RAMADAN, A.F. Terpenoids from *Pulicaria glutinosa*. **Phytochemistry**, v.31, p. 4245-4248, 1992.
- NAKAJIMA, J.N.; TELES, A.M.; RITTER, M.; MONDIN, C.A.; DEMATTEIS, M.; HEIDEN, G.; BORGES, R.A.X.; RIVERA, V.L. **Asteraceae**, p. 76-89. In **Plantas Raras do Brasil**. GIULIETTI, A.M.; da SILVA, J.M.C.; RAPINI, A.; de QUEIROZ, L.P.; de ANDRADE, M.J.G. (Org.). **Catálogo de Espécies Raras do Brasil**. Feira de Santana: Editora da UEFS, 2009. 498p.

- NEWMAN, J.D.; CHAPPELL, J. Isoprenoid biosynthesis in plants: carbon partitioning within the cytoplasmic pathway. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.34, p.95-106, 1999.
- NOBACK, C.R.; STROMINGER, N.L.; DMAREST, R.J. (1996) **The human nervous system: structure and function. Pain and temperature**, 5^a ed., Williamns & Wilkins, New York, pp. 123-137, 1996.
- OLIVEIRA, A.B.; SAÚDE, D.A.; PERRY, K.S.P.; DUARTE, D.S.; RASLAN, D.S.; BOAVENTURA, M.A.D.; CHIARI, E. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. **Phytotherapy Research**, v.10, p.292-295, 1996.
- PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ Jr.; G. S. & Vyvyan, J. R. **Introduction to Spectroscopy**, Brooks/Cole-Cengage Learning, 4^a. ed., Belmont, USA, 2009.
- PAWLISZYN, J. (eds) **Application of solid phase microextraction**. RSC, Cambridge, UK, 1999.
- PENNINGTON, R.T.; LAVIN, M; OLIVEIRA-FILHO, A. Woody plant diversity, evolution, and ecology in the tropics: Perspectives from seasonally dry tropical forests. **Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics**, v.40, p.437-457, 2009.
- SAKAMOTO, H.T.; FLAUSINO, D.; CASTELLANO, E.E.; STARK, C.B.W.; GATES, P.J.; LOPES, N.P. Sesquiterpene lactones from *Lychnophora ericoides*. **Journal of Natural Products**, v.66, p.693–695, 2003.
- SANTOS, M.D.; CHEN, G.; ALMEIDA, M.C. ; SOARES, D.M. ; SOUZA, G.E.P.; LOPES, N.P.; LANTZ, R.C. Effects of caffeoylquinic acid derivatives and C-Flavonoid from *Lychnophora ericoides* on in vitro Inflammatory Mediator Production. **Natural Product Communications**, v.5, p.733-740, 2010.
- SANTOS, M.D.; GOBBO-NETO, L.; ALBARELLA, L.; SOUZA, G.E.P.; LOPES, N.P. Analgesic activity of di-caffeoylquinic acids from roots of *Lychnophora ericoides* (Arnica da serra). **Journal of Ethnopharmacology**, vol.96, p.545–549, 2005.
- SCHULTZ, J.C. How plants fight dirty. **Nature**, v. 416, p. 267, 2002.

- SEMIR, J. Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniae: Compositae). (1991). 515 f. **Tese de Doutorado**, Instituto de Biologia, UNICAMP, Campinas, 1991.
- SILVA, M.G.V.; CRAVEIRO, A.A.; MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; ALENCAR, J.W. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, v.70, p.32-34, 1999.
- SOUSA, O.V.; DUTRA, R.C.; YAMAMOTO, C.H.; PIMENTA, D.S. Estudo comparativo da composição química e da atividade biológica dos óleos essenciais das folhas de *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch **Revista Brasileira de Farmácia**, v.89, p.113-116, 2008.
- STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E.; MARTÍNEZ, J.R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its *in vitro* antioxidant activity. **Journal of Chromatography A**, v. 1025, p. 93-103, 2004.
- TRAPP, S.C.; CROTEAU, R.B. Genomic organization of plant terpene synthases and molecular evolutionary implications. **Genetics**, v.158, p.811-832, 2001.
- VALENTE, A.L.P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Química Nova**, v.23, p. 523-530, 2000.
- VAN GELDRE, E.; VERGAUWE, A.; VAN DEN EECKHOUT, E. State of the art of the production of the antimalarial compound artemisinin in plants. **Plant Molecular Biology** v.33, n.2, p.199-209, 1997.
- VICHENWSKI, W.; LINS A. P.; HERZ W.; MURARIS R.; Lychnopholic acid and its acetate from *Lychnophora martiana*. **Phytochemistry**, v.19,p.685-686, 1980.
- VERRI, W.A.; JR.; CUNHA, T.M.; PARADA, C.A.; POOLE, S.; CUNHA, F.Q.; FERREIRA, S.H. (2006) Hypernociceptive role of cytokines and chemokines: targets for analgesic drug development? **Pharmacology & Therapeutics**, v.112, p.116-138, 2006.
- ZINI, C.A.; AUGUSTO, F.; CHRISTENSEN, E.; CARAMAO, E.B.; PAWLISZYN, J. SPME Applied to the study of volatile organic compounds emitted by three species of Eucalyptus *in situ*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 7199–7205, 2002.

ZINI, C.A.; AUGUSTO, F.; CHRISTENSEN, E.; SMITH, B.P.; CARAMAO, E.B.; PAWLISZYN, J. Monitoring biogenic volatile compounds emitted by *Eucalyptus citriodora* using SPME. **Analytical Chemistry**, v.73 p.4729–4735, 2001.

ZINI, C.A.; ZANIN, K.D.; CHRISTENSEN, E.; CARAMÃO, E.B.; PAWLISZYN, J. Solid-phase microextraction of volatile compounds from the chopped leaves of three species of *Eucalyptus*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p. 2679–2686, 2003.

APÊNDICE

7. APÊNDICE

Tabela 1: Tempo de retenção de cada um dos 17 *n*-alcanos utilizados na determinação dos IRRs de cada analito avaliado.

t_r (Min)	<i>n</i>-alcano
4.38	C ₉ H ₂₀
7.00	C ₁₀ H ₂₂
10.55	C ₁₁ H ₂₄
14.67	C ₁₂ H ₂₆
18.98	C ₁₃ H ₂₈
23.28	C ₁₄ H ₃₀
27.38	C ₁₅ H ₃₂
31.31	C ₁₆ H ₃₄
35.06	C ₁₇ H ₃₆
38.63	C ₁₈ H ₃₈
42.04	C ₁₉ H ₄₀
45.30	C ₂₀ H ₄₂
48.41	C ₂₁ H ₄₄
51.41	C ₂₂ H ₄₆
54.27	C ₂₃ H ₄₈
57.02	C ₂₄ H ₅₀
59.68	C ₂₅ H ₅₂

Figura 1: Espectros de massas da molécula protonada de m/z 221 referente ao sinal **10** (MS² ESI-qTOF, modo positivo).

Figura 2: Espectro RMN de ^1H para substância **10** (300MHz, CDCl_3).

Ampliações do espectro RMN de ^1H para substância **10** (300MHz, CDCl_3)

Ampliações do espectro RMN de ^1H para substância **10** (300MHz, CDCl_3).

Ampliações do espectro RMN de ^1H para substância **10** (300MHz, CDCl_3).

Figura 3: Espectro RMN de ^{13}C para substância **10** (75MHz, CDCl_3).

Ampliações espectro RMN de ^{13}C para substância **10** (75MHz, CDCl_3).

Ampliações espectro RMN de ¹³C para substância **10** (75MHz, CDCl₃).

Ampliações espectro RMN de ¹³C para substância **10** (75MHz, CDCl₃).

Figura 4: Espectro DEPT 135° para substância **10** (75MHz, CDCl₃).

Figura 5: Mapa de contornos HMBC para substância **10** (300MHz, CDCl₃).

Ampliação mapa de contornos HMQC para substância **10** (300MHz, CDCl₃).

Ampliação mapa de contornos HMQC para substância **10** (300MHz, CDCl₃).

Figura 6: Mapa de contornos HMBC para substância **10** (300MHz, CDCl_3).

Ampliação mapa de contornos HMBC para substância **10** (300MHz, CDCl_3).

Figura 7: Espectro RMN de ^1H para substância **11** (500MHz, CDCl_3).

Ampliação espectro RMN de ^1H para substância **11** (500MHz, CDCl_3).

Ampliação espectro RMN de ^1H para substância **11** (500MHz, CDCl_3).

Ampliação espectro RMN de ^1H para substância **11** (500MHz, CDCl_3).

Figura 8: Espectro RMN de ^{13}C para substância 11 (125MHz, CDCl_3).

Figura 9: Espectro DEPT 135° para substância **11** (125MHz, CDCl₃).

Figura 10: Mapa de contornos HMQC para substância **11** (500MHz, CDCl_3).

Ampliação mapa de contornos HMQC para substância **11** (500MHz, CDCl_3).

Ampliação mapa de contornos HMQC para substância **11** (500MHz, CDCl₃).

Figura 11: Espectros MS/MS do ion m/z 281 (ESI-qTOF; modo positivo).

Figura 12: Mapa de Contornos HMBC para substância **11** (500MHz, CDCl₃).

Ampliação mapa de contornos HMBC para substância **11** (500MHz, CDCl₃).

Ampliação mapa de contornos HMBC para substância **11** (500MHz, CDCl_3).

Ampliação mapa de contornos HMBC para substância **11** (500MHz, CDCl_3).

Ampliação mapa de contornos HMBC para substância **11** (500MHz, CDCl₃).

Figura 13: Comparação de cromatogramas das fibras SPME de diferentes polímeros de revestimento.

Figura 14: Comparação de cromatogramas das fibras SPME PDMS expostas ao *Headspace* durante diferentes intervalos de tempo à mesma temperatura (75° C).

Figura 15: Cromatogramas dos compostos recuperados das bandas da CCDP.

Figura 16: Comparação entre os cromatogramas de **BF1** dos campos de coleta “paraíso” (P1) e “pedreira” (P2) coletados em maio de 2009.