



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS NATURAIS**

DANYELY RODRIGUES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO
DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia organoides*: UMA ANÁLISE FRENTE AO
FITOPATÓGENO *Colletotrichum gossypii***

**MARABÁ-PA
2016**



**SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DO SUL E SUDESTE DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS EXATAS
LICENCIATURA PLENA EM CIÊNCIAS NATURAIS**

DANYELY RODRIGUES DA SILVA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO
DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia organoides*: UMA ANÁLISE FRENTE AO
FITOPATÓGENO *Colletotrichum gossypii***

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Licenciatura Plena em Ciências Naturais como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciada Plena em Ciências Naturais sob a orientação do Prof. Dr. Alcy Favacho Ribeiro.

**MARABÁ-PA
2016**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca II da UNIFESSPA. CAMAR, Marabá, PA

Silva, Danyely Rodrigues

Caracterização química e avaliação do potencial antifúngico dos óleos essenciais de *Lippia origanoide*: uma análise frente ao fitopatógeno *colletotrichum gossypii* / Danyely Rodrigues da Silva; orientadora, Alcy Favacho Ribeiro. — 2016.

Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação) - Universidade Federal do Sul e Sudeste do Pará, Campus Universitário de Marabá, Instituto de Ciências Exatas, Faculdade de Ciências Exatas e Naturais,

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIFÚNGICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia origanoides*: UMA ANÁLISE FRENTE AO FITOPATÓGENO *Colletotrichum gossypii*

DANYELY RODRIGUES DA SILVA

Banca Examinadora

Prof. Dr. Alcy Favacho Ribeiro.

Faculdade de Química –UFPA- Campus Ananindeua

Orientador

Membro 1

Prof^ª. Dr^ª Simone Yasue Simote Silva

Faculdade de Química –ICE-Unifesspa

Membro 2

Prof^ª. Dr^ª Marilene Nunes Oliveira

Faculdade de Química –ICE-Unifesspa

**“Eu sou aquela mulher que fez a escalada da montanha da vida,
removendo pedras e plantando flores. “**

Cora Coralina

AGRADECIMENTOS

Ao Prof^o Dr. **Alcy Favacho Ribeiro** que me orientou, com toda dedicação, paciência e confiança depositada durante muito tempo da minha graduação, com preciosos conselhos para que este sonho fosse concretizado;

A prof^a **Alessandra de Rezende Ramos** por disponibilizar a infraestrutura do (IESB),

Aos técnicos **Ferdinando** e **Rafaela** por total orientação, contribuição e disponibilização às orientações no Laboratório de Produtos Naturais (UFPA);

As minhas amigas bolsistas **Seli Mourão** e **Teresinha Guida** por todo apoio e confiança nos experimentos realizados no (IESB);

Agradeço a **Fundação Amazônica Paraense** pela bolsa de iniciação científica (PIBIC/Unifesspa);

A todos os docentes, por direcionar os caminhos para a minha formação acadêmica;

Aos meus amigos de classe pela grande convivência, momentos marcantes em minha vida que serão levados para sempre em meu coração, em especial à **Leilane Andressa, Teresinha Guida, Jordana Vicente, Carmelina Chaves, Fabrícia Pimenta, Renata Vanessa, Jéssica Lima, Maria Geovane, Aline Mesquita, Erika Soares, Alexandra Furtado, Douglas Pereira, Rafael Medeiros, Wagner Abreu e Matheus Fontana** que me apoiaram sempre com seus conselhos e dividiram alegrias e tristezas são histórias que jamais serão esquecidas;

Aos meus pais **Clemi Rodrigues da Silva** e **Irândir José da Silva** e meus irmãos **Aline Evellyn** e **Daniel Rodrigues** por me apoiar e me dar forças em todos os momentos que pensei em desistir, e aos demais familiares que depositaram confiança, esperança e apoio para que eu pudesse concluir a graduação com sucesso;

Ao meu namorado **Christian Ramon** que sempre me encorajou e sempre me ajudou em todos os momentos;

As minhas professoras **Simone Yasue Simote Silva** e **Marilene Nunes Oliveira** por sua participação como membros da banca e por suas contribuições em todos os anos da minha graduação;

A todos que contribuíram de maneira direta ou indireta para realização deste trabalho.

Dedico este trabalho a Deus, pela sua bondade ao me permitir chegar aqui, alcançar mais um dos grandes objetivos da minha vida concluindo este trabalho.

Ofereço aos meus pais, Clemi Rodrigues e Irandir José, bem como ainda ao meu amado irmão Daniel Rodrigues que sempre acreditaram em mim e toda a minha família que sempre me incentivou .

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS.....	13
2.1 OBJETIVO GERAL	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. REVISÃO DA LITERATURA.....	14
3.1 FAMÍLIA VERBENACEAE.....	14
3.2 ASPECTO DO GÊNERO LIPPIA.....	14
3.3 <i>LIPPIA ORIGANOIDES</i> E CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	15
3.4 <i>COLLETOTRICHUM GOSSYPII</i> : CARACTERÍSTICAS GERAIS.....	16
3.5 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	17
3.6 TÉCNICA DE OBTENÇÃO DE ÓLEO: HIDRODESTILAÇÃO.....	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	19
4.1 LOCAL DA COLETA E MATERIAL BOTÂNICO.....	19
4.2 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE.....	19
4.3 PROCESSAMENTO DO MATERIAL COLETADO.....	19
4.4 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	20
4.5 ANÁLISE QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	21
4.6 ENSAIO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>LIPPIA ORIGANOIDES</i>	21
4.7 TRATAMENTO DE DADOS	22
5. RESULTADOS E DISCUSSÕES	23
5.1 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE.....	23
5.2 RENDIMENTO EM ÓLEO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA.....	23
5.3 ATIVIDADE FUNGICIDA DO ÓLEO ESSENCIAL.....	25
6. CONCLUSÕES.....	28
REFERÊNCIAS.....	29

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Levantamento de dados botânico no Herbário do Museu Emilio Goeldi Belém-Pará. 19
- Figura 2:** Destilação das folhas de *Lippia origanoides*. 20
- Figura 3:** Placas com fungo *Colletotrichum gossypii* incorporados em diversas concentrações de óleo de *Lippia origanoides* na BOD por observações. 22
- Figura 4** Estrutura química do (E)-Nerolidol 25
- Figura 5:** Íon-cromatograma do óleo das folhas de *Lippia origanoides*. 25
- Figura 6:** Análise da inibição do crescimento micelial do fungo *Colletotrichum gossypii*... 26
- Figura 7:** Placas que relacionam o efeito antifúngico do óleo de *Lippia origanoides* nas diferentes concentrações testadas 26
- Figura 8:** Índice antifúngico do óleo de *Lippia origanoides* 27

RESUMO

As Verbenáceas apresentam aproximadamente 36 gêneros e 1035 espécies. O gênero *Lippia* é o segundo maior gênero da família verbenaceae, utilizado largamente na medicina popular. Os principais centros de distribuição estão localizados na América do Sul e América Central e a Cordilheira dos Andes. *Colletotrichum gossypii* é um fungo fitopatológico identificado como o causador da ramulose, que tem sido considerada, nos últimos anos, uma doença de grande problemática para a cultura do algodão, sem muita eficiência de aplicação de fungicida. Como alternativa para o controle da ramulose, que cresce, exponencialmente, o interesse pelo potencial antifúngico de produtos naturais, visando o seu incremento na agricultura e uma diminuição na utilização de agrotóxicos. Diante desta perspectiva, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial do óleo essencial da espécie *Lippia origanoides* como alternativa de controle do *Colletotrichum Gossypii* no algodoeiro. Folhas e ramos finos de *Lippia Origanoides* foram coletados na Floresta Nacional de Carajás. Os óleos foram obtidos por processo de hidro destilação, utilizando o aparelho Clevenger. De acordo com os resultados, *Lippia origanoides* apresentou um bom rendimento em óleo essencial ($> 1,9\%$). A composição química do óleo foi obtida por CG-MS através de comparações. Os principais componentes químicos identificados foram carvacrol, 1,8-cineol, γ -terpineno, E-cariofileno e p-cimeno. Para avaliar a atividade fungicida, o óleo foi incorporado em meio BDA fundente a concentrações 1 μ l, 0,75 μ l e 0,50 μ l a cada 1 ml. O efeito do óleo de *Lippia origanoides* sobre o crescimento micelial de *Colletotrichum gossypii* foi observado por um período de onze dias. Na concentração de 1 μ l, houve atividade moderada com a inibição de 24%. Os resultados obtidos reforçam a utilização racional de óleos essenciais de espécies nativas como fungicidas naturais.

Palavra-chave: Verbenaceas; *Colletotrichum gossypii*; espécies oleaginosas .

1. INTRODUÇÃO

A Amazônia é uma das principais fontes da flora aromática. Por possuir uma diversidade de espécies, apresenta uma grande fonte renovável de produção de plantas aromáticas – o que significa ser um grande potencial alternativo para o desenvolvimento sustentável.

O óleo essencial produzido por diversas espécies da flora aromática pode ser usado como matéria prima para diversos fins, tendo em vista a aplicação direta em produtos como perfumes, fragrâncias e cosméticos, com uso em indústrias de medicamentos humanos e veterinários, bem como ainda para a horticultura, devido ao uso para a fabricação de inseticidas, fungicidas, bactericidas e larvicida.

Os óleos essenciais podem ser encontrados em diversas partes das plantas, folhas, ramos finos, flores, madeiras, em estruturas especializadas, como os pêlos glandulares e bolsas secretoras.

Plantas aromáticas destacam-se pela diversidade botânica e ampla distribuição. Ademais, o gênero *Lippia* pertencente à família Verbenaceae é de suma importância uma vez que apresenta espécies que podem ser utilizadas para fins medicinais comprovados.

A este respeito, Oliveira (2004) nos diz:

Lippia é conhecida como “salva do Marajó” e alecrim de angola muito utilizada como tempero e suas folhas e flores tem o poder de infusão no tratamento de dores no estômago, cólicas de bebê, diarreia, azia, náusea, problemas menstruais, febre, anti-séptico da boca, garganta e feridas.

Em contrapartida, mesmo sendo a sua importância reconhecida no meio científico, Stashenko e coautores (2010) destacam que, nos últimos anos, apenas cinco trabalhos foram publicados sobre *Lippia origanoides*, o que contrasta com a importância dos mais diversos usos da espécie.

Nesse contexto, o presente trabalho visou, de maneira geral, avaliar o potencial antifúngico de *Lippia origanoides* aum fitopatógeno.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho usa contribuir com os estudos quimiosistemas da espécie *Lippia origanoides* através da caracterização química e biológica do seu óleo essencial

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Identificar a espécie da família Verbenaceae com potencial aromático coletado na Floresta Nacional de Carajás - PA;
- Obter o óleo essencial e avaliar o seu rendimento em óleo;
- Identificar a composição química dos óleos obtidos;

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 FAMÍLIA VERBENACEAE

A família Verbenaceae é distribuída nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo. No Brasil, existem cerca de 150 espécies dessa família, caracterizadas como ervas eretas, procumbentes ou reptantes, até subarbustos e arbustos perenes e anuais. As flores apresentam corolas, que variam do branco ao rubescente – as quais são pequenas e diminutas, reunidas em inflorescências de diversos tipos, predominando as racemosas (MENDONÇA, 1997).

As Verbenáceas apresentam aproximadamente 36 gêneros e 1035 espécies. Os gêneros mais representativos são: *Verbena* (ca. 200), *Lippia* (ca. 150), *Citharexylum* (ca. 70), *Glandularia* (ca. 60) e *Duranta* (ca. 30) (JUDD et al., 1999).

Além do elevado número as espécies também possuem uma ampla distribuição nas regiões tropicais e temperadas das Américas, África e Índia. Os principais centros de distribuição estão nas Américas do Sul e Central, incluindo a Cordilheira dos Andes (SANDERS 2001; JUDD et al., 1999).

Outras características botânicas das Verbenáceas podem ser arbustos, ervas e árvores, com ou sem espinhos, com folhas opostas ou verti ciladas, raramente alternadas e compostas, frutos indeiscentes (drupas) ou deiscentes (cápsula de 2-4 alvas) (BERG, 1993).

Algumas espécies têm sido usadas na indústria alimentícia e na produção de aromatizantes, temperos, cosméticos e perfumes (STASHENKO, JARAMILLO & MARTÍNEZ, 2003).

3.1.1 ASPECTOS DO GÊNERO *LIPPIA*

Lippia é o segundo maior gênero da família Verbenaceae, possuindo cerca de 150 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores, cujos maiores centros de dispersão se encontram em países das Américas do Sul e Central, como também em território da África tropical (TRONCOSO, 1974; MOLDENKE, 1980; VERDCOURD, 1992; TERBLANCHÉ e KOENELIUS, 1996; SALIMENA, 2000; SALIMENA, 2002).

O gênero *Lippia* foi descrito por Linnaeus em 1753. Em 1847, Schauer propôs a primeira subdivisão no gênero, reconhecendo padrões diferentes na arquitetura das

inflorescências, estabelecendo cinco seções: *Lippia*, *Dipterocalyx*, *Goniostachyum*, *Zapania* e *Rhodolippia*.

Além disso, Troncoso (1974) apresentou um amplo estudo sobre a taxonomia de *Lippia*, no qual foram revistas delimitações intragenéricas resultando em uma única taxa que tem sido seguida pelos especialistas na família. O gênero foi, então, subdividido em sete seções: *Lippia*, *Dipterocalyx*, *Goniostachyum*, *Zapania*, *Rhodolippia*, *Pseudoalaysia* e *Diocolippia*. Posteriormente, a única espécie contida na seção *Pseudoalaysia* foi sinonimizada por Salimena-Pires (1997), diminuindo então para seis seções.

Viccini (2005) menciona que o Brasil é um dos grandes centros de dispersão do gênero *Lippia*, entre 70 a 75% das espécies conhecidas, estando sua maior representatividade na Cadeia do Espinhaço em Minas Gerais e nos campos rupestres do estado de Goiás.

Além de se destacar pela grande diversidade botânica e ampla distribuição, o gênero *Lippia* vem recebendo importante atenção por apresentar espécies que podem ser utilizadas para os mais diversos fins. Dentre estes, um grande número de espécies se destaca por apresentar propriedades medicinais comprovadas, possuindo efeitos contra a malária (GASQUET et al., 1993), efeito antiviral (ABADet AL., 1995), assim como ação sedativa, diurética, anti-reumática, antiinflamatória e outras (MORTON 1981; COSTA et al., 1998; VALE et al., 1999; RAO et al., 2000; VIANA et al., 2000; PASCUAL et al., 2001).

3.1.2 *LIPPIA ORIGANOIDES*

Lippia origanoides é descrita como sendo um arbusto que cresce cerca de 3 m e possui características muito aromáticas. A espécie é distribuída em alguns países da América Central, América do Norte e América do Sul, especialmente na Região Amazônica. Possui flores com corolas brancas e com frutificação em junho (MOLDENKE, 1981; PASCUAL et al, 2001).

A espécie *L. origanoides*, popularmente conhecida no Norte do Brasil como “salvado-marajó” e "alecrim de angola", é utilizada largamente como tempero, além de infusão de suas folhas e flores no tratamento de dor de estômago, cólicas de bebê, diarreia, azia, náusea, problemas menstruais, febre e como antisséptico da boca, garganta e feridas (OLIVEIRA et al., 2004).

No Pará, é usado para fins culinários e medicinais. No México, *Lippia origanoides* é chamada de orégano e a farmacopéia mexicana a reconhece como substituta de *Lippia*

graveolens Kunth e *Origanum vulgare* L. (MAISCH, 1885). Estudos relataram a composição química do óleo essencial das folhas de *Lippia. organoides*, coletadas em Oriximiná (PA). Este óleo apresentou alto teor de monoterpenos, carvacrol (38,6%), timol (18,5%) e *p*-cimeno (10,3%) (OLIVEIRA et al., 2007).

Pesquisa realizada em Minas Gerais apresentou timol como componente 28 principal do óleo de um exemplar de *L. organoides*, enquanto carvacrol esteve presente no óleo apenas como traço (0,04%) (GALLINO, 1987). Considerando a variação entre timol e carvacrol no óleo, Oliveira e coautores (2007) propuseram a existência de diferentes tipos químicos para esta espécie.

Além disso, Ribeiro (2014), sobre estudos sazonais realizado na cidade de Parauapebas com óleo de *lippia*, coletados em maio de 2011 e abril de 2012, afirma:

Na estação chuvosa, os monoterpenos e oxigenados sesquiterpenos foram os mais bem representados nos óleos, seguidos pelos hidrocarbonetos sesquiterpenos e o monoterpene hidrocarbonetos. Na estação seca, houve uma predominância dos hidrocarbonetos monoterpenos e oxigenados monoterpenos, seguidos dos sesquiterpenos oxigenados e os hidrocarbonetos sesquiterpenos. No total, 104 constituintes foram identificados no estudo sazonal, cobrindo mais de 95% da composição de óleos. Os principais constituintes foram (E)-metil cinamato, (E)-nerolidol, *p*-cimeno, 1,8-cineol, carvacrol, α -pineno, (E)-cariofileno e *g*-terpinene, com grande variação ao longo do ano. Neste trabalho, estamos relatando a ocorrência de um quimiotipo novo para *L. organoides*, caracterizado por um derivado de óleo rico em (E)-metil cinamato e (E)-nerolidol.

3.2 COLLETOTRICHUM GOSSYPHII: CARACTERÍSTICAS GERAIS

O fungo *Colletotrichum gossypii* é um fungo fitopatogênico identificado como o causador da ramulose que tem sido considerada nos últimos anos a doença de grande importância para a cultura do algodão e sem muita eficiência de aplicação de fungicida. (CIA e SALGADO, 1997).

Por vários tempos a ramulose tem sido considerada a doença de maior importância para a cultura do algodão e sem muita eficiência de esquema de aplicação fungicida. Os sintomas aparecem em folhas, ramos e pecíolos na forma de manchas. (CIA; FUZATTO, 1999).

Segundo Corba: “Os fungos pertencentes a esse gênero são conhecidos como causadores da antracnose (BAILEY; JEGER, 1992), entretanto a variedade cephalosporioides,

causadora do sintoma de super brotamento, descrita por Costa & Fraga Jr. (1937) no Estado de São Paulo, não apresentava os sintomas da antracnose (BARROCAS, 2008). Além do algodoeiro cultivado, a ramulose também afeta outras espécies do gênero *Gossypium* (COSTA; FRAGA JR., 1939).”

3.3 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são compostos complexos, voláteis e naturais caracterizados por forte odor e produzidos por plantas aromáticas como metabólitos secundários (BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008; SILVA e CASALI, 2000).

A composição química de óleos essenciais depende do clima, da estação do ano, condições geográficas, período de colheita e a técnica de destilação (MACIEL et al., 2002).

Os óleos essenciais são misturas compostas de substâncias líquidas e sólidas, que variam extensamente em relação à sua composição e pontos de ebulição. Cada substância com determinado ponto de ebulição é volátil e possui uma pressão de vapor definida, a qual depende da temperatura. Portanto, a intensidade de um aroma pode ser considerada como uma manifestação da volatilidade (ponto de ebulição e da pressão de vapor) da substância que emite o odor (MAIA, 1982).

Os óleos essenciais raramente apresentam cor, são líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente, de fácil volatilidade e aroma agradável; são lipossolúveis, solúveis em solvente orgânico e podem ser metabolizados em todos os órgãos das plantas, como folhas, flores, raízes, sementes, frutos, armazenados em células secretoras, cavidades e células da epiderme, e sua composição pode variar segundo a localização na planta (ARAÚJO, 1995; SIANI et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2007; BAKKALI et al., 2008).

3.4 TÉCNICA DE OBTENÇÃO DE ÓLEO: HIDRODESTILAÇÃO

Na técnica de hidrodestilação, ou “método do alambique”, o material vegetal se encontra em contato direto com a água em ebulição, e uma vez evaporados, o mesmo princípio da técnica de arraste a vapor se aplica para a separação. É o mesmo método mais usado nos países subdesenvolvidos, justamente por ser mais fácil e econômico de se implementar, porém traduz-se em óleos de baixo rendimento (GROSSMAN, 2005).

A hidrodestilação é a metodologia mais usada em laboratório, porque permite reproduzir as técnicas utilizadas nos processos industriais e obter óleos essenciais com características similares. Este procedimento, embora seja clássico pode levar a formação de artefatos em função da alta temperatura utilizada durante o processo. Preferencialmente é utilizada na extração de óleos em plantas frescas podendo ser aplicado a plantas secas, quando a inexistência de matéria-prima fresca (FIGUEIREDO, 2010).

4. METODOLOGIA

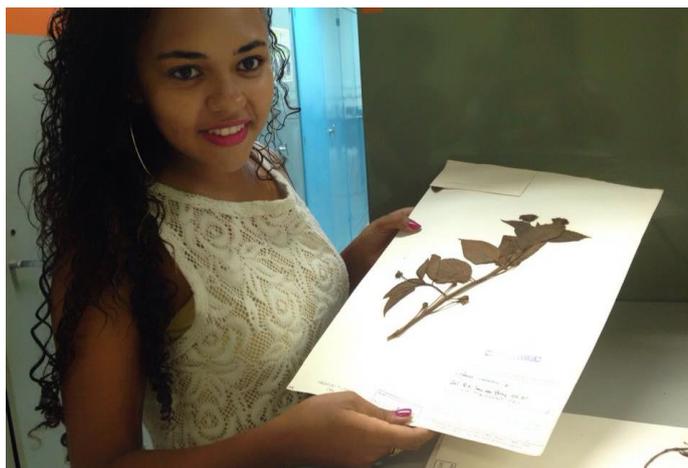
4.1 LOCAL DA COLETA E MATERIAL BOTÂNICO

A coleta do material botânico foi realizada na Floresta Nacional de Carajás, no município de Parauapebas - Pará. Além disso, concentrou-se no turno da manhã na estação do ano verão no dia 22/10/2014, com a equipe liderada pelo pesquisador Alcy Favacho Ribeiro. Foram empregadas técnicas consagradas em botânica no que se refere à coleta, preparação de exsicatas, secagem e transporte do material coletado. As exsicatas coletadas foram envelopadas com jornais, encharcados com álcool 70%.

4.1.2 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE

Exsicatas da exemplar coletada foi levada e depositada ao Herbário João Murça Pires do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG), na capital Belém. A identificação da espécie foi realizada por especialista em Botânica do Museu Goeldi. A Figura 1. ilustra o trabalho de levantamento dos dados botânicos iniciais realizados .

Figura 1: Identificação da espécie coletada na Floresta Nacional de Carajás- PA



4.2.3 PROCESSAMENTO DO MATERIAL COLETADO

O material botânico coletado foi transportado para a Unidade 2 da Unifesspa, localizada no bairro Nova Marabá Folha 17, em sacos de papel encharcados de álcool para que houvesse uma boa conservação e armazenados em sala com refrigeração por um período de sete dias. Após a secagem preliminar, todo material foi conduzido para preparação e processamentos.

O material foi seco em estufa sob ventilação a 35°C constante por 7 dias e após triturado em moinhos de facas submetidos posterior hidrodestilação dos óleos essenciais. Esta etapa foi realizada no Laboratório de Engenharia Química da UFPA (LEPRON) da capital Belém.

4.2.4 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

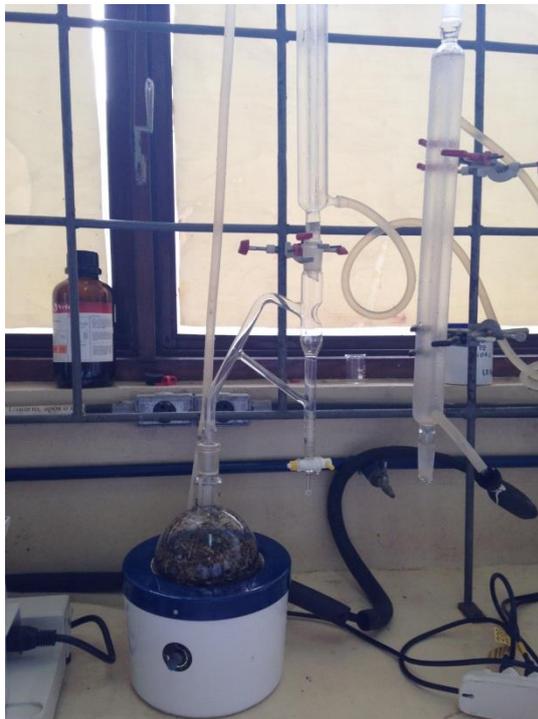
Nesta etapa, pretendeu-se avaliar o processo de obtenção do óleo. O óleo essencial de *Lippia origanoides* foi obtido por hidro destilação utilizando um sistema clevenger modificado , por um período de 3 horas contínuas.

Foram utilizados 20 gramas de folhas trituradas da espécie coletadas e submetidas utilizando sistemas de vidro do tipo Clevenger modificado, acoplado a sistema de refrigeração com temperatura da água de condensação a 15 °C no LEPRON do Instituto Tecnológico (ITEC) da Universidade Federal do Pará (UFPA), em Belém.

Os óleos essenciais obtidos foram centrifugados, secos com sulfato de sódio anidro, armazenados em ampola de vidro com tampa de teflon âmbar na ausência de oxigênio e conservados em ambiente refrigerado entre 5 a 10 °C.

O cálculo do rendimento em óleo foi realizado através da relação do volume do óleo obtido com a massa do material seco utilizado na destilação, considerando-se esta base livre de umidade (MAIA & ANDRADE, 2009).

Figura 2: Destilação das folhas de *Lippia origanoides*.



4.2.5 ANÁLISE QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

A composição química do óleo essencial foi determinada por técnica CG/EM, usando-se um equipamento Thermo, modelo Focus DSQII, com coluna capilar de sílica fundida.

Os componentes químicos foram identificados através das comparações dos seus espectros de massa (EM) e índice de retenção (IR) com os de substâncias padrão existentes nas bibliotecas do sistema e com dados da literatura (NIST, 2005; Adams, 2007). Os IR foram obtidos utilizando uma curva de calibração de uma série homóloga de *n*-alcanos injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras de óleos. Esta etapa foi desenvolvida no Laboratório de Produtos Naturais (LEPRON/UFPA - Belém)

4.2.6 ENSAIO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA ORIGANOIDES*

Visando avaliar o efeito fungicida em diferentes concentrações do óleo essencial das folhas de *Lippia origanoides* foram testadas para analisar o potencial fungicida frente ao

fungo fitopatogêno *Colletotrichum gossypii*. Utilizando o método de autobiografia direta (SILVA, 2010; MARSTON, 2011).

A atividade antifúngica foi avaliada pelo método da diluição em ágar. O óleo de *Lippia origanoides* foi incorporado em meio BDA (dextrose, batata e Agar) fundente para o meio nutritivo do fungo e submetido nas concentrações finais de 0,50 µg/mL, 0,75µg/mL e 1µg/mL. Discos de micélio do fungo *Colletotrichum gossypii* (0,9 cm) foram transferidos para o centro das placas de *Petri* (60x15 mm). As placas foram incubadas a temperatura de 25°C em incubadora BOD. Os experimentos foram realizados em quadruplicada e placas sem as amostras foram usadas como controle. O crescimento micelial foi monitorado por onze dias e o índice antifúngico, 0% de inibição do desenvolvimento micelial calculado de acordo com a equação:

$$\text{Inibição (\%)} = \left[1 - \frac{\text{\textcircled{Ø}} \text{ crescimento do tratamento (mm)}}{\text{\textcircled{Ø}} \text{ crescimento do controle (mm)}} \right] 100$$

Figura3: Placas com fungo *Colletotrichum gossypii* incorporados em diversas concentrações de óleo de *Lippia origanoides* na BOD por observações.



4.7 TRATAMENTO DOS DADOS

Os dados foram analisados para estudar os níveis da atividade antifúngica entre as amostras e controle, utilizando o Software Microsoft Excel XP, foram calculados por tratamento de medida em cálculo desvio padrão.

5. RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 IDENTIFICAÇÃO DA ESPÉCIE

No herbário do Museu Paraense Emilio Goeldi (MPEG), onde estão depositados os exemplares da planta trabalhada pelo grupo de pesquisa ‘‘ PLANTAS AROMATICAS DA AMAZÔNIA ‘‘ como dito acima a espécie foi identificada como sendo *Lippia origanoides* (Verbenaceae) um subarbusto com flores brancas. A descrição é similar (RIBEIRO, 2011) com três exemplares coletados em São Geraldo do Araguaia (PA) e um em Anapurus (MA). Com estas informações, em consulta ao herbário do MPEG e aos técnicos taxômicos foi verificado que os registros de exemplares é de fato a devida espécie *Lippia origanoides*.

5.2 RENDIMENTO DO ÓLEO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA

O rendimento em óleo das folhas de *Lippia origanoides* foi superior a 1,9 ml, valor este que significa um bom rendimento .

A composição química analisada por CG-EM levou a identificação de 49 constituintes, representando 93,7% do conteúdo total do óleo essencial (Tabela 1).

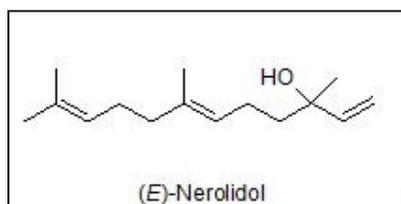
Tabela 1- Constituintes voláteis encontrados na *Lippia origanoides*

Constituinte	IR	%
α -tujeno	924	0,2
α -pineno	934	5,7
Sabineno	970	1,1
β -pineno	978	0,9
Mirceno	990	0,8
α -terpineno	1014	0,3
<i>p</i> -cimeno	1025	3,1
1,8-cineol	1032	10,7
(E)- β -cimeno	1045	0,6
γ -terpineno	1056	1,5
hidrato de <i>cis</i> -sabineno	1067	0,4
Linalool	1095	3,5
α -canfolenal	1124	0,1
<i>cis</i> -verbenol	1141	0,3

Pinocarvona	1164	0,1
δ -terpineol	1162	0,4
<i>p</i> -cimen-8-ol	1181	0,1
α -terpineol	1174	2,1
Verbenona	1205	0,9
<i>trans</i> -carveol	1217	0,2
éter metílico do timol	1233	1,3
éter metílico do carvacrol	1245	0,6
Timol	1290	0,2
Carvacrol	1297	7,8
acetato de mirtenila	1321	0,9
α -cubebeno	1348	0,1
α -copaeno	1376	3,6
(<i>E</i>)-cinamato de metila	1378	0,7
α -garjuneno	1410	0,1
(<i>E</i>)-cariofileno	1416	5,2
2,5-dimetoxi- <i>p</i> -cimeno	1425	0,5
β -gurjuneno	1432	0,2
<i>trans</i> - α -bergamoteno	1433	0,3
α -guaieno	1439	0,1
α -humuleno	1455	0,5
<i>alo</i> -aromadendreno	1462	0,2
δ -muuroleno	1479	0,2
α -zingiberene	1494	0,8
α -muuroleno	1500	0,5
β -bisaboleno	1506	0,2
δ -cadineno	1525	0,1
β -curcumeno	1515	0,2
β -sesquifelandreno	1523	0,2
<i>trans</i> -calameneno	1529	0,1
α -calacoreno	1546	0,1
(<i>E</i>)-nerolidol	1563	33,2
óxido de cariofileno	1582	2,1
epóxido de humuleno II	1609	0,1
muurola-4,10(14)-dien-1 β -ol	1630	0,3
α -cariofila-4(12),8(13)-dien-5-ol	1640	0,2
α -muurolol	1645	0,1
Hidrocarbonetos monoterpênicos		14,2
Monoterpenos oxigenados		27,7
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		12,8
Sesquiterpenos oxigenados		36,2
Outros		2,8

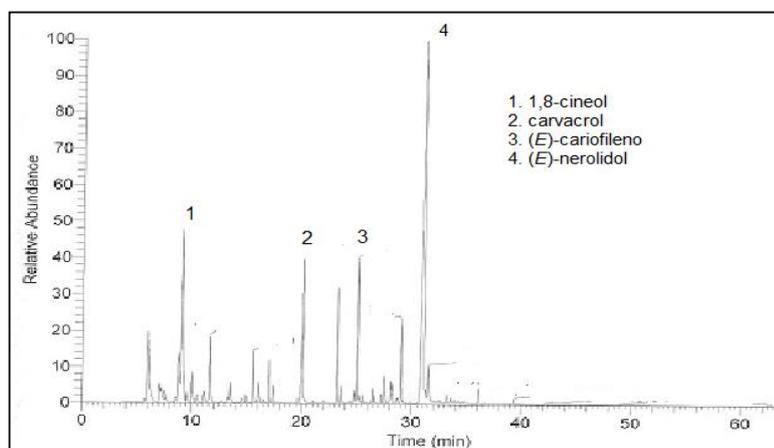
Os constituintes predominantes (*E*)-nerolidol (33%) seguido de outros componentes em menor quantidade, como o monoterpeno oxigenado 1,8 cineol (10%); carvacrol (7,8%); (*E*)-cariofileno (5%) e o sesquiterpeno oxigenado, respectivamente mostram os constituintes voláteis na mistura e o cromatograma da amostra.

Figura 4: Estrutura química do (*E*)-Nerolidol



A identificação foi feita por comparação dos espectros de massa e seus respectivos índices de retenção com os dados das bibliotecas de massas ADAMS (2007) e NIST. A figura representam os íons cromatogramas dos óleos de folhas.

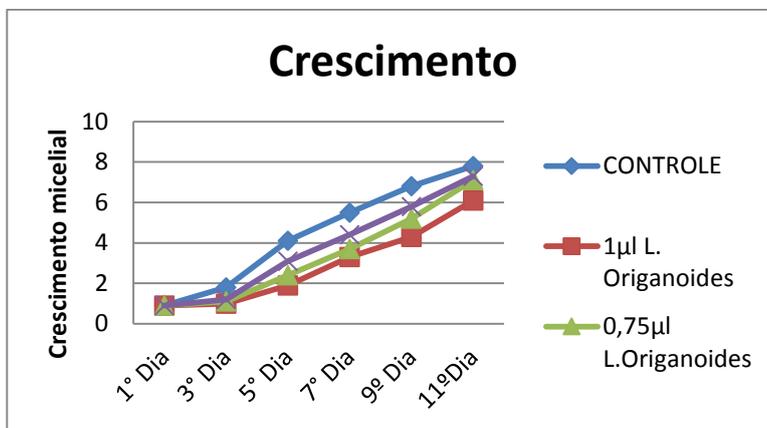
Figura 5: Íon-cromatograma do óleo das folhas de *L. origanoides*.



5.3 ATIVIDADE FUNGICIDA

O crescimento micelial foi avaliado por um período de 11 dias, no intervalo de 48 em 48 horas, usando medições para controlar o crescimento da placa de controle e a inibição das placas com concentrações de óleo. Em todas as concentrações a inibição do crescimento micelial foi pouco significativa (Figura 5), demonstrando um baixo efeito antifúngico do óleo. A concentração de 1,0µl/ml o micélio inibiu tendo uma ação de forma moderada, durante o período de observação.

Figura 6: Análise da inibição do crescimento micelial do fungo *Colletotrichum gossypii*.



Nas concentração 0,75µl/ml, 0,50µl/ml o fungo demonstrou uma concentração pouco inibitória sendo comparada as placas de controle.

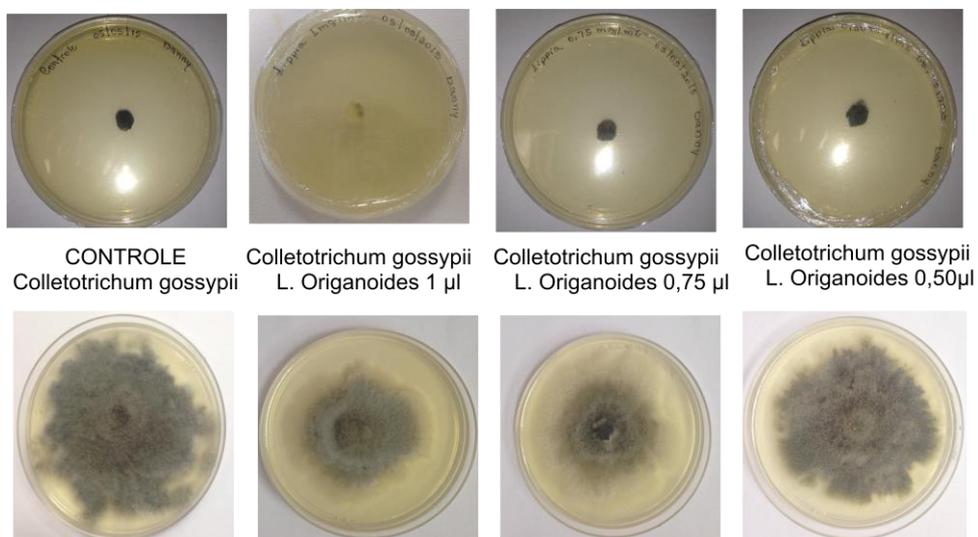
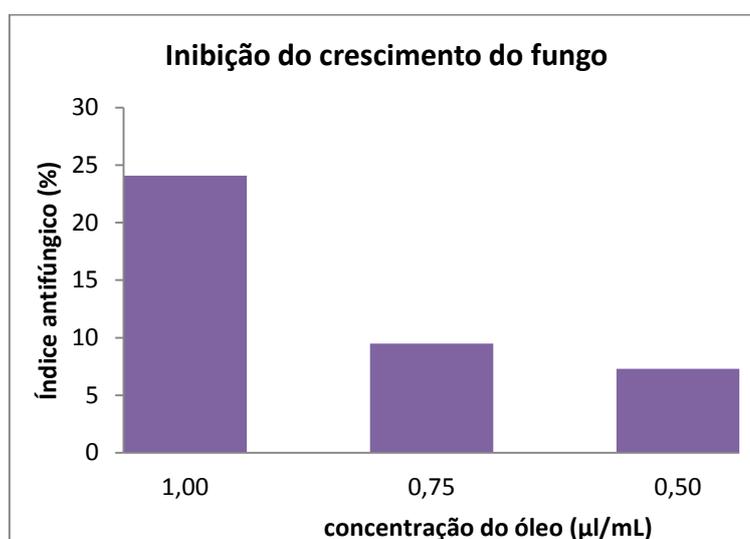


Figura7: Placas que relacionam o efeito antifúngico do óleo de *Lippia origanoides* nas diferentes concentrações testadas

A concentração de 1 μ l/ml conseguiu inibir o fungo 24%, já na concentração de 0,75 μ l/ml o óleo inibiu 9% e na concentração 0,50 μ l/ml o óleo inibiu 7%, que pode ser visualizado (Figura 8) confirmando que o óleo na concentração maior possui atividade antifúngica moderada.

Figura 8: Índice antifúngico do óleo de *Lippia origanoides*



O presente trabalho mostrou que os óleos essenciais da planta de *Lippia origanoides* apresentam atividades antimicrobiana contra um grande número de bactéria, incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos (CARSON & RILEY, 1995).

O *Colletotrichum gossypii* teve ação moderada em relação a inibição quando colocado sob concentração 1 μ l/ml do óleo de *Lippia origanoides*

CONCLUSÃO

As atividades desta pesquisa contribuíram para aumentar o registro de plantas com alto teor aromático com ocorrência na região sul/sudeste do Pará.

O óleo de *Lippia origanoides* é constituído principalmente de mono terpenos oxigenados cineol, (E)- cariofileno, (E)-nerolidol e o carvacrol apresentou razoável atividade frente ao fungo *Colletotrichum gossypii* podendo ser considerado um valor relativo comparado com a placa de controle.

A espécie coletada na Floresta Nacional de Carajás possui características aromáticas, foi identificada como *Lippia origanoides*.

O rendimento em óleo foi de 1,9 ml, valor este que significa bom rendimento.

O fungo após ser colocado sob diferentes concentrações de óleo de *Lippia* apresentou ação moderada.

REFERÊNCIAS

- ABAD, M.J.; SÁNCHEZ, S.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.; CARRASCO, L. **Antiviral activity of some medicinal plants**. *Methods and Findings*, v.17, p.108, 1995.
- ADAMS, R.P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. Allured Publishing Corp., Carol Stream, IL, 804 p. 2007.
- ARAÚJO, J.M. **Química de Alimentos: Teoria e Prática - Óleos Essenciais**. Ed. Impr. Univ. Viçosa/UFV: Viçosa, MG, 1995.
- BAILEY, J. A.; JEGER, M. J. **Colletotrichum: biology, pathology and control**. CAB International, Wallingford, 388 p., 1992.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. **Biological effects of essential oils – A review**. *Food and Chemical Toxicology*. V.46, p.446-475, 2008.
- BARROCAS, E. N. **Efeitos de *Colletotrichum gossypii* var. *cephalosporioides* em sementes e plantas de algodoeiro e detecção, por meio de PCR, de *Stenocarpella* sp. em sementes de milho inoculadas**. 2008. 110p. Tese (Doutorado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2008.
- BERG, M.E. **Plantas medicinais na Amazônia: Contribuição ao seu conhecimento sistemático**. 2ª Ed. Ver. e Aum. Belém, Museu Paraense Emílio Goeldi, 1993.
- BURT, S. **Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review**. *International Journal of food Microbiology*. V.94, p.223-253, 2004.
- CARSON, C.F.; RILEY, T.V. **Antimicrobial activity of the major components of essential oil of *Melaleuca alternifolia***. *J. Bacteriol.* v. 78, p. 264–269, 1995.
- CIA, E.; SALGADO, C. L. Doenças do algodoeiro (*Gossypium* spp.). In: Kimati (Ed.) **Manual de Fitopatologia**, 1997, p. 33-48.
- CIA, E.; FUZATTO, M. G. Manejo de doenças na cultura do algodão. In: CIA, E.; FREIRE, E. C.; SANTOS, W. J. (Ed.) **Cultura do algodoeiro**. Piracicaba: Potafós, 1999, p. 121-131.
- COSTA, A. S.; FRAGA Jr., C. G. Superbrotamento ou ramulose do algodoeiro. **Revista de Agricultura**, Piracicaba, v. 12, n. 5/7, p. 249-259, 1937.
- COSTA, A. F. **Farmacognosia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, v. 1, p 1031, 1998.
- COSTA, A. S.; FRAGA Jr., C. G. Sobre a natureza da “ramulose” ou “superbrotamento” do algodoeiro. **Jornal de Agronomia**, v. 2, p. 151-160, 1939.
- FIGUEIREDO, C. **Aplicação de plantas aromáticas e óleos essenciais encapsulados em produtos lácteos**. Portugal. Universidade de Coimbra, 2010.

GALLINO, M.A. **Una Verbenacea essenziera ricca in timolo: *Lippia origanoides* H.B.K.** *Essenze Derivati Agrumari*, 57(4): p.628–629,1987.

GROSSMAN, L., **Óleos essenciais na culinária, cosmética e saúde.** Editora Optionline, São Paulo, 301 p. 2005.

GASQUET, M.; DELMAS, F.; TIMÓN-DAVID, P.; KEITA, A.; GUINDO, M.; KOITA, N.; DIALLO, D.; DOUMBO, O. **Evaluation *on vitro* and *in vivo* of a tradicional antimalarial, Malarial-5.** *Fitoterapia*, v.80, p.1925-1941, 1993.

JUDD, W. S.; CAMPBELL, C. S.; KELLOGG, E. A.; STEVENS, P. F.; **Plant systematics – a phylogenetic approach.** Sunderland: Sinauer Associates Inc., 1999.

MAISCH, M. **On some useful pants of the natural order of Verbenaceae.** *Amer. Journ. of Pharm.* 57(7): 189-199, 1885.

MAIA, J.G.S.; ANDARDE, E.H.A. **Database of the Amazon aromatic plants and their essential oils.** *Quimica Nova* 32 (3): 595-622, 2009.

MARSTON, A. **Thin-layer chromatography with biological detection in phytochemistry.** *Journal of Chromatography A*, 1218: 2676–2683, 2011.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA, V.F.; GRYNBERG, N.F.; ECHEVARRIA, A. **Plantas Medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares.** *Quim. Nova.* v.25, p.429-438, 2002.

MAIA, J.G.S. **Óleos essenciais: evolução dos métodos de análise.** Tese de doutorado em Ciências. Programa de Pós-Graduação em Química. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, 1982.

MENDONÇA, M.C.S. **Efeito do ácido indolbutírico no enraizamento de estacas de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.).** Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal do Ceará, 1997.

MOLDENKE, H.N. **Notes on *Lippia*.** *Phytologia* 48:151-185, 1981.

MORTON, A. **Atlas of Medicinal Plants of Middle America.** Springfield, Illinois, USA, v. 1; 745 p. 1981.

MOLDENKE, H.N. **Materials towards a monograph of the genus *Lippia*.** *Phytologia*, 12: 6-71. 1980.

OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; VIEIRA, W.L.; FREIRE, K.R.L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I.O.; SOUZA E.L.; TOLEDO, M.S.; SILVA-FILHO, R.N. **Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica.** *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, (16): 77- 82, 2004.

NIST/EPA/HHH Mass Spectral Library. Nist Mass Spectral Search Program (NIST 05, Version 2.0d). The NIST Mass Spectrometry Data Center, Gaithersburg, 2005.

OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; BIZZO, H.R.; LOPES, D.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; LEITÃO, S.G. **Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K.** Food Chemistry 101: 236-240, 2007.

OLIVEIRA, R.A.G.; LIMA, E.O.; VIEIRA, W.L.; FREIRE, K.R.L.; TRAJANO, V. N.; LIMA, I.O.; SOUZA E.L.; TOLEDO, M.S.; SILVA-FILHO, R.N. **Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica.** Brazilian Journal of Pharmacognosy, (16): 77- 82, 2004.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, M E.; VILLAR, A. ***Lippia*: tradicional uses, chemistry and pharmacology: a review.** Journal of Ethnopharmacology, v.76, p. 201-214, 2001.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D.S.; VILLAR, A. **Antiulcerogenic activity of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae).** Farmaco, v. 56, p. 501-504, 2001b.

RAO, G. P.; SINGH, M.; SINGH, P.; SINGH, S. P.; CATALAN, C.; KAPOOR, I. P. S. **Studies on chemical constituents and antifungal activity of leafessential oil of *Lippia alba* (Mill).** Indian Journal of Chemical Technology, New Delhi, v. 7, n. 6, p. 332-335, 2000.

RIBEIRO, A. F. Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia Origanoides* Kunth. In: Biochemical Systematics and Ecology 55, Elsevier, 2014, pag. 249 - 259.

RIBEIRO, A.F. **Observações pessoais.** Belém, 2011.

SALIMENA-PIRES, F.R. ***Lippia* L. sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae) do Brasil.** In: Congresso latino-americano de Botânica, 7., México, Sociedade latino-americano de Botânica, 299pp. 1997.

SALIMENA, F.R.G. **Novos sinônimos e tipificação em *Lippia* sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae).** Hickenia 3:145-149. 2002.

SALIMENA, F.R.G. **Revisão taxonômica de *Lippia alba* L. sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae).** Tese (Doutorado em Botânica) - Universidade de São Paulo, São Paulo. 2000.

SANDERS, R.W. **The genera of Verbenaceae in Southeastern United States.** Harvard Papers in Botany, Harvard, v. 5, n. 2, p. 303-358, 2001.

SILVA, F.; CASALI, V.W.D. **Plantas medicinais e aromáticas: Pós-colheita e óleos essenciais.** Viçosa, MG: UFV, 135p. 2000.

SILVA, J.K. do R. **Estudo químico e das propriedades biológicas dos óleos essenciais e extratos de espécies de *Piper* da Amazônia Oriental.** Tese de Doutorado, PPG em Química, Universidade Federal do Pará, Belém, 2010.

SIANI, A.C; SAMPAIO, A.L.F.; SOUZA, M.C.; HENRIQUES, M.G.M. O.; RAMOS, M.F. **S. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório.** Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento, v.16, p.38-43, 2000

STASHENKO, E.E.; MARTÍNEZ, J. ARIAS, G.; DURÁN, C.; SALGAR, W.; CALA, M. ***Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis.** *J. Sep. Sci.*, 33, 93–103, 2010.

STASHENKO, E.E.; JARAMILLO, B.E.; MARTÍNEZ, J.R. **Comparación de La composición química y la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae.** Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales, Bogota, v.27, n. 105, p. 579-597, 2003.

TERBLANCHÉ, F.C.; KOENELIUS, G. **Essential constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) – A literatura review.** Journal Essential Oil Research, v.8, p. 471-185, 1996.

TRONCOSO, N.S. **Los generos de Verbenaceae de sudamerica extra-tropical (Argentina, Chile, Bolívia, Paraguai, uruguai y sur de Brasil).** Darwiniana, Buenos Aires, v. 18, n. 3/4, p. 295-412, 1974.

VALE, T.G.; MATOS, F.J.A.; LIMA, T.C. .; VIANA, G. S. B. **Behavioral affects of essential Oils from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. chemotypes.** Journal of Ethnopharmacology, Clare, v. 167, n. 2, p. 127-133, Nov. 1999.

VERDCOURD, B. **Verbenaceae.** *In:* Flora of Tropical East Africa, p. 27, Balkema AA/Brookfiel, Rotterdam. 1992.

VICCINI, L.F. **Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae).** Plant Systematics and Evolution, v. 256, n.1, p.1-4, 2005.

VIANA, G.S.D.; VALE, T.G.; SILVA, C.M.; MATOS, F. J. D. **Anticonvulsant activity of essential oils and active from chemotypes of *Lippia alba* (Mill) NE Br.** Biological Pharmaceutical Bulletin, Tokyo, v. 23, n. 11, p. 1314-1317, Nov. 2000.