



ABRAÃO JOSÉ SILVA VIANA

**MALHAS FOTOCONVERSoras AFETAM O
CRESCIMENTO VEGETATIVO, OS PROCESSOS
OXIDATIVOS E AS COMPOSIÇÕES QUÍMICAS VOLÁTIL E
FENÓLICA DE *Lippia gracilis* SCHAUER.**

**LAVRAS - MG
2021**

ABRAÃO JOSÉ SILVA VIANA

**MALHAS FOTOCONVERSoras AFETAM O CRESCIMENTO VEGETATIVO, OS
PROCESSOS OXIDATIVOS E AS COMPOSIÇÕES QUÍMICAS VOLÁTIL E
FENÓLICA DE *Lippia gracilis* SCHAUER.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Orientadora

**LAVRAS – MG
2021**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Viana, Abraão José Silva.

Malhas fotoconversoras afetam o crescimento vegetativo, os processos oxidativos e as composições químicas volátil e fenólica de *Lippia gracilis* Schauer. / Abraão José Silva Viana. - 2021.

130 p. : il.

Orientador(a): Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2021.

Bibliografia.

1. alecrim-de-tabuleiro. 2. malhas coloridas. 3. qualidade de luz. I. Bertolucci, Suzan Kelly Vilela. II. Título.

ABRAÃO JOSÉ SILVA VIANA

**MALHAS FOTOCONVERSIONS AFETAM O CRESCIMENTO VEGETATIVO, OS
PROCESSOS OXIDATIVOS E AS COMPOSIÇÕES QUÍMICAS VOLÁTIL E
FENÓLICA DE *Lippia gracilis* SCHAUER.**

**PHOTOCONVERSION MESHES AFFECT VEGETATIVE GROWTH, OXIDATIVE
PROCESSES AND VOLATILE AND PHENOLIC COMPOSITIONS OF *Lippia
gracilis* SCHAUER.**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 02 de Dezembro de 2021.

Prof. Dr. Alexandre Alves de Carvalho

UFLA

Prof. Dr. José Eduardo Brasil Pereira Pinto

UFLA

Profa. Dra. Ana Hortência Fonseca Castro

UFSJ

Prof. Dr. Geraldo Célio Brandão

UFOP

Profa. Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Orientadora

**LAVRAS - MG
2021**

À minha mãe Zélia, meu pai José Geraldo (*in memoriam*),
minhas filhas Jamile e Alice, minhas irmãs Danuza e
Daniele, meus irmãos Davi e Daniel.

Dedico.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me concedido o dom da vida e pelos dons que me deu, a ele agradeço pelo caminho percorrido até aqui, pela saúde que me proporcionou.

À minha mãe agradeço pelo apoio e orações, que sem dúvida foram fundamentais para minhas realizações. Obrigado pelo amor e fé depositada em mim.

Ao meu pai José Geraldo - Nô (*in memoriam*) agradeço pela incessante busca em querer meu bem, sempre ajudando e estando presente em todas as ocasiões. Mesmo nos deixando durante este período do doutorado, sei que está olhando por mim. Sua fé e as orações sempre foram de extrema grandeza.

Às minhas filhas Jamile e Alice agradeço imensamente, elas me inspiram alegria, felicidade, amor e grandes expectativas. Espero ser a elas um exemplo.

Agradeço aos meus irmãos e companheiros Danuza, Daniele, Daniel, Davi, pela força depositada em mim; vocês são muito importantes em minhas conquistas.

À Andreara, mãe de Alice, por estar ao meu lado durante o doutorado.

Aos meus amigos agradeço por estarem sempre ao meu lado, apoiando e dando aquela força nos momentos difíceis.

Agradeço à Universidade Federal de Lavras (UFLA) pela oportunidade oferecida, principalmente ao programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares.

Agradeço à minha orientadora Suzan Kelly Vilela Bertolucci pelo apoio, ensinamentos, conquistas, dedicação e toda disponibilidade oferecida. Os ensinamentos servirão de aprendizado em toda a minha vida, não só no mundo acadêmico, mas também no dia-a-dia. Obrigado por tudo.

Agradeço ao professor José Eduardo, uma grande pessoa, com um grande coração, sem dúvida jamais esquecerei de todo o seu ensinamento, principalmente na sua resiliência em me ajudar num momento delicado durante este período, obrigado por tudo.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares (PPGPMAC): Luciane Vilela, Manuel Gavilanes, Wilson Magela, Smail, pelo ensinamento através das disciplinas ministradas durante o doutorado.

À técnica Annete, do laboratório de fitoquímica do horto de plantas medicinais, pelo apoio e ajuda nos procedimentos laboratoriais e análises cromatográficas.

Ao colaborador pós-doutorando Alexandre, por toda ajuda no trabalho, em especial na estatística do trabalho.

À coordenação do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, trabalho este secretariado pela Ana Luíza, um muito obrigado por tudo.

A todos os colegas de curso com quem tive a oportunidade de aprender e ensinar mutuamente, não somente assuntos relacionados ao programa, mas todas as experiências vividas e as amizades, sem dúvida foi uma fase incrível da minha vida. Obrigado a todos pela oportunidade de convivência com vocês.

A todos os amigos que tive a oportunidade de conhecer através da UFLA.

Agradeço à Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM) por ser meu local de trabalho como técnico e pela realização de algumas análises deste trabalho, e todos os que contribuíram para meu trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), CNPQ (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) e FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo apoio financeiro ao projeto para desenvolvimento da pesquisa.

Muito obrigado!

RESUMO

Lippia gracilis Schauer, pertence à família Verbenaceae, popularmente conhecida como alecrim-de-tabuleiro, é uma planta nativa e endêmica da região semiárida do Nordeste do Brasil, reconhecida há muito tempo na medicina popular como planta medicinal, usada especialmente como antimicrobiana e antisséptica. Neste trabalho, objetivou-se avaliar o efeito de malhas fotoconversoras no crescimento vegetativo, estresse oxidativo, composição química volátil e fenólica em plantas de *Lippia gracilis* Schauer cultivadas em vasos. O cultivo de *L. gracilis* a pleno sol e utilizando as malhas fotoconversoras (azul, preta e vermelha) apresentaram diferenças significativas nos parâmetros avaliados. O comprimento de planta, matéria seca foliar e do caule foram maiores nos tratamentos com malhas (azul, preta e vermelha), enquanto os pigmentos fotossintetizantes houve um aumento significativo do tratamento com cultivo de malha azul. Na composição química volátil, os compostos principais, variaram em todos os tratamentos. O cultivo sob malha preta, favoreceu o aumento do carvacrol, timol e (*E*)-cariofileno, já o cultivo sob malhas azul e vermelha reduziram o conteúdo de *p*-cimeno, óxido de cariofileno e mirceno. Foram isoladas duas flavonas glicosiladas do extrato etanólico, a orientina e isoorietina, posteriormente quantificadas nos extratos dos diferentes tratamentos, apresentando diferenças quanto ao teor, de acordo com a mudança no sistema de cultivo, com o cultivo a pleno sol apresentando as maiores médias. O mesmo foi observado nos resultados de estresse oxidativo não enzimático, com o cultivo sob malha azul a menos eficiente quanto à produção dos compostos fenólicos.

Palavras-chaves: alecrim-de-tabuleiro, malhas coloridas, fótons, qualidade de luz, flavonas.

ABSTRACT

Lippia gracilis Schauer, belongs to the Verbenaceae family, popularly known as rosemary-de-table, is a native and endemic plant of the semiarid region of Northeast Brazil, recognized for a long time in popular medicine as a medicinal plant, used especially as an antimicrobial and antiseptic. The objective of this work was to evaluate the effect of photoconversion meshes on vegetative growth, oxidative stress, volatile and phenolic chemical composition in *Lippia gracilis* Schauer plants grown in pots. Cultivation of *L. gracilis* in full sun and using photoconverter meshes (blue, black and red) showed significant differences in the parameters evaluated. The plant length, leaf and stem dry matter were higher in the treatments with meshes (blue, black and red), while the photosynthetic pigments showed a significant increase in the treatment with blue mesh cultivation. In volatile chemical composition, the main compounds varied in all treatments. Cultivation under black mesh favored the increase of carvacrol, thymol and (*E*)-caryophyllene, whereas cultivation under blue and red mesh reduced the content of *p*-cymene, caryophyllene oxide and myrcene. Two glycosylated flavones from the ethanol extract, orientin and isoorietin, were isolated and subsequently quantified in the extracts of the different treatments, showing differences in content, according to the change in the cultivation system, with the cultivation in full sun showing the highest averages. The same was observed in the results of non-enzymatic oxidative stress, with the cultivation under blue mesh being less efficient in terms of the production of phenolic compounds.

Keywords: alecrim-do-tabuleiro, colored mesh, photons, light quality, flavones.

LISTA DE FIGURAS

- Figura A - Foto de *Lippia gracilis* Schauer no Horto de Plantas Medicinas da UFLA.21
- Figura 1 - Cultivo da espécie *Lippia gracilis* no Horto de Plantas Mediciniais da UFLA. A) Cultivo a pleno sol; B) Cultivo sob malha azul; C) Cultivo sob malha preta e D) Cultivo sob malha vermelha.....58
- Figura 2 - (A) Teor (%) e (B) rendimento (g.planta⁻¹) de óleo essencial de *L. gracilis* cultivados sob diferentes malhas (azul, preto e vermelho) e a pleno sol. Médias (\pm desvio padrão) seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si em relação aos diferentes tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).....66
- Figura 3 - Distribuição de matéria seca nas folhas, caules e raízes de plantas de *Lippia gracilis* submetidas a quatro malhas coloridas. UFLA, Lavras – MG, 2021.....67
- Figura 4 - Plantas de *Lippia gracilis* com 90 dias cultivadas sob pleno sol e malhas vermelha, preta e azul: A- parte aérea; B- raiz.....68
- Figura 5 - (A) Teor (%) e (B) rendimento (g.planta⁻¹) de óleo essencial de *L. gracilis* cultivados sob diferentes malhas (azul, preta e vermelha) e a pleno sol. Médias (\pm desvio padrão) seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si em relação aos diferentes tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).....9
- Figura 6 - Curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD, em dois dias consecutivos para o carvacrol.....72
- Figura 7 – Flavonas orientina e isoorientina isoladas das folhas de *Lippia gracilis*.....74
- Figura 8 - Valores de poder redutor dos tratamentos com o cultivo de *L. gracilis* a pleno sol, cultivo com malha azul, preta e vermelha. Médias seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si em relação aos diferentes tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).78
- Figura 6.1 - Cromatograma obtido por CLAE de A2-148-01. Condições de análise: Detector UV-Vis, 280 nm, Coluna C18 e fluxo de 1 mL/min, 40 °C, volume de injeção: 10 mL. Fase móvel: A: H2O com 0,1% de ácido acético e B: Metanol. Gradiente 0 – 5 min: 10 % B, 5 – 40 min: 10% B à 80% de B.....98
- Figura 6.2 - Esquema do estudo fitoquímico do “fracionamento 1” do extrato bruto em etanol das folhas de *Lippia gracilis* (A2-136-01).....100
- Figura 6.3 - Cromatograma obtido por CLAE de A2-160-01. Condições de análise: Detector UV-Vis, 210 nm, coluna C18, 25 cm x 4,6 mm x 5 μ m,, mantida a 40 °C, fluxo de 1 mL/min, volume de injeção: 10 mL. Fase móvel: A: H2O com 0,1% de ácido acético e B: Metanol. Gradiente 0 – 65 min: 5 % B à 95% B, 65 – 70 min: 95% B, 70 – 75 min: 95% B à 5% de B, 75 – 85 min: 5% B.102
- Figura 6.4 - Espectros de varredura UV-Vis de A2-165-01 e A2-168-01, mostrando os deslocamentos de bandas quando complexado com AlCl₃.....102
- Figura 6.5 - Esquema do estudo fitoquímico do “fracionamento 2” do extrato bruto em etanol das folhas de *Lippia gracilis* (A2-136-01).....104

Figura 6.6 - Esquema geral dos fracionamentos 1 e 2 de A2-136-01 de *L. gracilis*...105

Figura 6.7 - Cromatograma obtido por CLAE de A2-165-01. Condições de análise: Detector UV-Vis, 210 nm, coluna C18, 25 cm x 4,6 mm x 5 µm,, mantida a 40 °C, fluxo de 1 mL/min, volume de injeção: 10 mL. Fase móvel: A: H2O com 0,1% de ácido acético e B: Metanol. Gradiente 0 – 65 min: 5 % B à 95% B, 65 – 70 min: 95% B, 70 – 75 min: 95% B à 5% de B, 75 – 85 min: 5% B.....106

Figura 6.8 - Cromatograma obtido por CLAE de A3-13-01 – 91 % de pureza de área. Condições de análise: Detector UV-Vis, 210 nm, coluna C18, 25 cm x 4,6 mm x 5 µm,, mantida a 40 °C, fluxo de 1 mL/min, volume de injeção: 10 mL. Fase móvel: A: H2O com 0,1% de ácido acético e B: Metanol. Gradiente 0 – 65 min: 5 % B à 95% B, 65 – 70 min: 95% B, 70 – 75 min: 95% B à 5% de B, 75 – 85 min: 5% B.....107

Figura 6.9 - Espectro de varredura UV-Vis de A2-165-01, mostrando os deslocamentos de bandas quando complexado com AlCl3.....107

Figura 6.10 - Espectro de massas com ionização por eletrospray (modo negativo) da substância A2-165-01.....108

Figura 6.11 - Espectro de IV da substância A2-165-01 (orientina).....109

Figura 6.12 - Espectro de RMN de 1H de A2-165-01 (orientina) (DMSO; 300 MHz).....110

Figura 6.13 - Expansão do espectro de RMN de 1H de A2-165-01 (orientina) (DMSO; 300 MHz).....110

Figura 6.14 - Espectro de RMN de 13C de A2-165-01 (orientina) (DMSO; 75 MHz).....112

Figura 6.15 - Expansão do espectro de RMN de 13C de A2-165-01 (orientina) (DMSO; 75 MHz).....112

Figura 6.16 - Expansão do espectro de RMN de 13C de A2-165-01 (orientina) (DMSO; 75 MHz).113

Figura 6.17 - Espectro DEPT-135 de A2-165-01 (orientina) (DMSO; 75 MHz).....113

Figura 6.18 - Espectro HSQC-editado de A2-165-01 (orientina) (DMSO; 300 MHz).....114

Figura 6.19 - Cromatograma obtido por CLAE de A2-168-01. Condições de análise: Detector UV-Vis, 210 nm, coluna C18, 25 cm x 4,6 mm x 5 µm, mantida a 40 °C, fluxo de 1 mL/min, volume de injeção: 10 mL. Fase móvel: A: H2O com 0,1% de ácido acético e B: Metanol. Gradiente 0 – 65 min: 5 % B à 95% B, 65 – 70 min: 95% B, 70 – 75 min: 95% B à 5% de B, 75 – 85 min: 5% B.....115

Figura 6.20 - Cromatograma obtido por CLAE de A3-11-03. Amostra obtida no Fracionamento 2 – 86 % de pureza. Condições de análise: Detector UV-Vis, 210 nm, coluna C18, 25 cm x 4,6 mm x 5 µm, mantida a 40 °C, fluxo de 1 mL/min, volume de injeção: 10 mL. Fase móvel: A: H2O com 0,1% de ácido acético e B: Metanol.

Gradiente 0 – 65 min: 5 % B à 95% B, 65 – 70 min: 95% B, 70 – 75 min: 95% B à 5% de B, 75 – 85 min: 5% B.....	115
Figura 6.21 - Espectro de varredura UV-Vis de A2-168-01, mostrando os deslocamentos de bandas quando complexado com AlCl ₃	116
Figura 6.22 - Espectro de massas com ionização por eletrospray (modo negativo) da substância A2-168-01.....	116
Figura 6.23 - Espectro de IV da substância A2-168-01.....	117
Figura 6.24 - Espectro de RMN de ¹ H de A2-168-01 (isoorientina) (DMSO; 300 MHz).....	118
Figura 6.25 - Expansão do espectro de RMN de ¹ H de A2-168-01 (isoorientina) (DMSO; 300 MHz).....	118
Figura 6.26 - Espectro de RMN de ¹³ C de A2-168-01 (isoorientina) (DMSO; 75 MHz).....	120
Figura 6.27 - Expansão do espectro de RMN de ¹³ C de A2-168-01 (isoorientina) (DMSO; 75 MHz).....	120
Figura 6.28 - Expansão do espectro de RMN de ¹³ C de A2-168-01 (isoorientina) (DMSO; 75 MHz).....	121
Figura 6.29 - Expansão do espectro de RMN de ¹³ C de A2-168-01 (isoorientina) (DMSO; 75 MHz).....	122
Figura 6.30 - Espectro DEPT-135 de A2-168-01 (isoorientina) (DMSO; 75 MHz). .	122
Figura 6.31 - Espectro HSQC-editado de A2-168-01 (isoorientina) (DMSO; 300 MHz).....	122
Figura 6.32 - Expansão do espectro HSQC-editado de A2-168-01 (isoorientina) (DMSO; 300 MHz).....	123
Figura 6.33 - Expansão do espectro HSQC-editado de A2-168-01 (isoorientina) (DMSO; 300 MHz).....	124

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Pigmentos fotossintéticos (clorofila <i>a</i> e <i>b</i> , clorofila total e carotenóides) de <i>L. gracilis</i> cultivados sobre diferentes malhas (azul, preto e vermelho) e a pleno sol.....	68
Tabela 2 - Composição química (\pm desvio padrão) dos compostos orgânicos voláteis das folhas de <i>Lippia gracilis</i> cultivados sob diferentes malhas (azul, preto e vermelho) e a pleno sol.....	71
Tabela 3 – Conteúdo, teor e rendimento de carvacrol no óleo essencial das folhas de <i>Lippia gracilis</i> cultivados sob diferentes malhas (azul, preto e vermelho) e a pleno sol.....	73
Tabela 4 - Massa injetada, áreas médias ($n = 3$) e desvio padrão relativo das curvas analíticas da orientina, nos dois dias de análise.....	75
Tabela 5 - Valores percentuais de orientina e isoorientina nos extratos dos diferentes tratamentos de cultivo de <i>L. gracilis</i>	76
Tabela 6 - Percentuais de ACR usando o método DPPH, nas concentrações 200, 300, e 400 ppm em quatro tratamentos (cultivo sob malha azul, preto e vermelho) e cultivo a pleno sol.....	77
Tabela 6.1 - Fracionamento do extrato bruto etanólico das folhas de <i>L. gracilis</i> (A2-136-01).....	95
Tabela 6.2 - Grupos das frações obtidas por CCDs de A2-136-01.....	95
Tabela 6.3 - Fracionamento de A2-149-01.....	96
Tabela 6.4 - Reunião das frações obtidas por CCDs de A2-149-01.....	97
Tabela 6.5 - Fracionamento de A2-148-01.....	98
Tabela 6.6 - Reunião das frações obtidas por CCDs de A2-148-01.....	99
Tabela 6.7 - Fracionamento do extrato etanólico das folhas de <i>L. gracilis</i> (A2-136-01).....	101
Tabela 6.8 - Reunião das frações obtidas por CCDs de A2-136-01.....	101
Tabela 6.9 - Fracionamento de A2-160-01 em CLAE preparativo.....	103
Tabela 6.10 - Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (DMSO, 75 MHz) e de ^1H (DMSO, 300 MHz) de A2-165-01 com dados da literatura (XIN ZHOU <i>et al.</i> , 2005).....	111

Tabela 6.11 - Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (DMSO, 75 MHz) e de ^1H (DMSO, 300 MHz) de A2-168-01 com dados da literatura (Helana N. Michael, <i>et al.</i> , 2010).....	119
--	-----

LISTA DE SIGLAS

δ – Deslocamento químico

$\bar{\nu}$ – Número de onda

λ – Comprimento de onda

CCDS – Cromatografia em camada delgada de sílica

CCF - Cromatografia em coluna de sílica gel tipo *Flash*

CIM – Concentração inibitória mínima

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CP - Comprimento da planta

MSF - Matéria seca foliar

MSC - Matéria seca do caule

MSR - Matéria seca da raiz

MST - Matéria seca total

R:PA - razão raiz : parte aérea

d – Duplete

dd – duplete duplo

ddd – Duplo duplete duplo

DEPT 135 – *Distortionless enhancement by polarization transfer* – ângulo 135°

DPPH - 2,2-difenil-1-picrilhidrazil

ESI – Ionização por *Spray* de elétrons

EM – Espectro de massas

J – Constante de acoplamento escalar

m – Multiplete

OE – Óleo essencial

q – Quarteto

Rf – Fator de retenção

s – Simpleto

t – Tripleto

US - Ultrassônico

LISTA DE ANEXOS

Anexo 1 - Curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD, em dois dias consecutivos para a substância orientina.....	125
Anexo 2 - Perfis cromatográficos dos extratos provenientes dos quatro tratamentos.	126
Anexo 3 - Pureza de pico.....	127

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO GERAL.....	19
2	OBJETIVOS.....	20
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	21
3.1	ASPECTOS BOTÂNICOS DE <i>Lippia gracilis</i> Schauer.....	21
3.2	ASPECTOS GERAIS DE <i>Lippia gracilis</i> Schauer.....	22
3.3	ESTUDOS AGRONÔMICOS DE <i>Lippia gracilis</i> Schauer.....	23
3.4	QUÍMICA DE <i>Lippia gracilis</i> Schauer.....	27
3.5	ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE <i>Lippia gracilis</i> Schauer.....	33
3.5.1	Atividade antiinflamatória.....	33
3.5.2	Atividade antimicrobiana.....	34
3.5.3	Atividade amebicida.....	37
3.5.4	Atividade larvicida, inseticida e acaricida.....	37
3.5.5	Atividade antioxidante.....	39
3.5.6	Atividade de toxicidade.....	39
3.6	A INFLUÊNCIA DA LUZ NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	39
4	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	41
5	ARTIGO - MALHAS FOTOCONVERSoras AFETAM O CRESCIMENTO VEGETATIVO, OS PROCESSOS OXIDATIVOS E AS COMPOSIÇÕES QUÍMICAS VOLÁTIL E FENÓLICA DE <i>Lippia gracilis</i> SCHAUER.....	55
1	INTRODUÇÃO.....	55
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	57
2.1	Material vegetal e cultivo da espécie.....	57
2.2	Análise de pigmentos fotossintetizantes.....	58
2.3	Análises químicas de constituintes voláteis.....	59
2.3.1	Extração de óleo essencial.....	59
2.3.2	Teor, rendimento e composição do óleo essencial.....	60
2.2.3	Doseamento e produtividade agrícola de carvacrol.....	60
2.4	Análises químicas de constituintes fenólicos.....	61
2.4.1	Extração e isolamento de flavonoides.....	61
2.4.1.1	Quantificação de orientina e isoorientina nos extratos.....	62

2.4.2	Avaliação do estresse oxidativo não enzimático.....	63
2.5	Análise estatística.....	64
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	64
3.1	Determinação dos parâmetros de crescimento e pigmentos fotossintetizantes.....	64
3.2	Teor, rendimento e composição do óleo essencial.....	69
3.3	Doseamento e produtividade agrícola de carvacrol.....	71
3.4	Isolamento de flavonoides.....	73
3.5	Quantificação de orientina e isorientina nos extratos.....	74
3.6	Avaliação do estresse oxidativo não enzimático.....	76
3.7	Análise dos Componentes Principais (PCA).....	78
4	CONCLUSÃO.....	80
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
6	MATERIAL SUPLEMENTAR.....	92
7	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	129

1 INTRODUÇÃO GERAL

O gênero *Lippia*, cujo nome deriva de August Lippi, um botânico italiano, pertence à família Verbenaceae, compreendendo cerca de 250 espécies herbáceas, arbustos e pequenas árvores (SOARES *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2017; SIQUEIRA-LIMA, *et al.*, 2019). É amplamente distribuído nas florestas tropicais decíduas da América Central, nas regiões áridas do sudoeste da América Sul e África tropical (GUIMARÃES *et al.*, 2012; BLANK, 2013; SIQUEIRA-LIMA, *et al.*, 2019).

Dentre as espécies medicinais deste gênero, tem-se *Lippia gracilis* Schauer, conhecida popularmente como alecrim-de-tabuleiro, uma planta aromática endêmica do Nordeste brasileiro, reconhecida há muito tempo na medicina popular como planta medicinal, usada para muitos propósitos, especialmente como antimicrobiano e anti-séptico (RIELLA *et al.*, 2012; DE MELO *et al.*, 2019). São encontrados também relatos da utilização de suas folhas e flores no tratamento de doenças de pele, lesões externas, queimaduras, feridas e úlceras, devido às suas propriedades curativas, além de seu uso analgésico e anti-inflamatório no tratamento de resfriados, tosse, sinusite, bronquite, congestão nasal, dor de cabeça e icterícia (PASCUAL *et al.* 2001; MENDES *et al.* 2010; ALBUQUERQUE *et al.* 2012).

A espécie *L. gracilis* apresenta potencial significativo para uso econômico pelas indústrias química e farmacêutica, devido à presença de carvacrol e timol no óleo essencial de suas folhas. Compostos fenólicos de importância terapêutica também já foram relatados para a espécie (TREVISAN *et al.*, 2016; DE SOUZA *et al.*, 2018).

Medicamentos fitoterápicos contendo flavonoides são eficazes em diversas doenças (PANNU *et al.* 2021). A orientina, é um flavonoide da classe das flavonas, cujas propriedades relatadas no trabalho de revisão de LAM *et al.* (2016) foram: antioxidante, antienvhecimento, antiviral, antibacteriano, antiinflamatório, vasodilatador e cardioprotetor, radioprotetor, neuroprotetor, antidepressivo, antiadipogênese e efeitos antinociceptivos.

Estudos de LIU *et al.* (2015) observaram que a orientina apresentou efeito antidepressivo em camundongos quando tratados por 21 dias (20 mg/kg e 40 mg/kg, via oral). Já outros estudos verificando o efeito da orientina nos processos inflamatórios, observaram a inibição de diversos fatores como espécies rativas de oxigênio, NF- κ B, TNF- α , HMGB1, migração de leucócitos por esta flavona (LEE *et al.*, 2014; KU *et al.*, 2014).

Estudos agrônômicos apontaram diferentes respostas quanto à composição química do óleo essencial da espécie, como o estresse salino, estresse hídrico e adubação (OLIVEIRA *et al.*, 2019; PALHARES NETO *et al.*, 2020; SANTOS *et a.*, 2014). Um estudo realizado por

LAZZARINI *et al.* (2018) com a manipulação espectral de luz em cultivo *in vitro* com *Lippia gracilis* demonstrou alterações na composição química volátil da espécie.

Em se tratando de plantas medicinais, diversos fatores podem estar relacionados com a biossíntese de metabólitos secundários, além da questão genética de uma determinada espécie. Diversos fatores edafoclimáticos, como tipo de solo, índice pluviométrico, estação do ano, variação circadiana, temperatura, disponibilidade de nutrientes, qualidade e intensidade de luz, dentre outros fatores podem afetar a produção de metabólitos secundários (KSOURI *et al.*, 2008; MORAES *et al.*, 2017).

A luz está diretamente relacionada aos processos vitais das plantas, sendo a condição ambiental que mais influencia no processo fotossintético, devido à absorção de fótons. Estes são utilizados na reação química na fotossíntese, para obtenção de energia aos processos fisiológicos relacionados ao desenvolvimento e crescimento da planta (TAIZ *et al.*, 2017). Uma forma de manipular o espectro de luz recebido pelas plantas é a utilização de malhas coloridas. Estas malhas promovem a transmissão seletiva da radiação ultravioleta, com o propósito de aumentar a produção de princípios ativos em plantas medicinais (SOUZA *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2018).

O uso de sombreamento com malhas interferem na quantidade e qualidade da radiação solar transmitida, determinando modificações ópticas de espalhamento e refletância da luz, com isso, a planta irá apresentar diferentes respostas morfofisiológicas desejáveis e maximizar a produção de princípios ativos (PINTO *et al.*, 2014; ALVARENGA *et al.*, 2015).

2 OBJETIVO

Neste contexto, este trabalho tem como objetivo avaliar o efeito de malhas fotoconversoras no crescimento vegetativo, estresse oxidativo, composição química volátil e fenólica em plantas de *Lippia gracilis* Schauer cultivadas em vasos.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 ASPECTOS BOTÂNICOS DE *Lippia gracilis* Schauer

Lippia gracilis Schauer, pertence à família Verbenaceae (Figura A), popularmente conhecida como “alecrim-da-chapada”, “candeia-de-queimar”, “alecrim-de-serrote”, “bálsamo da montanha” e alecrim-de-tabuleiro, é uma planta nativa e endêmica da região semiárida do Nordeste do Brasil, apresenta-se como um arbusto de aproximadamente 2,5 m de altura, bem ramificada, com grupos de flores brancas e pequenas folhas com nervos odoríferos visíveis, seus frutos são do tipo aquênio, apresentam sementes pequenas com mecanismos que dificultam a germinação (PIMENTA *et al.*, 2007; MATOS *et al.*, 1999). Seu acúmulo de óleo essencial ocorre principalmente nos tricomas glandulares (MARINHO *et al.*, 2011).



Figura A – Aspectos da planta de *Lippia gracilis* Schauer no Horto de Plantas Medicinas da UFLA. Fonte: próprio autor

3.2 ASPECTOS GERAIS DE *Lippia gracilis* Schauer

O Brasil é considerado o país com o maior número de espécies do gênero *Lippia*, as quais são encontradas principalmente as plantas do semiárido que habitam a caatinga, seu principal bioma, bem como no cerrado. Os estados nordestinos, Bahia, Sergipe, Piauí, Ceará, Paraíba, Pernambuco e Sergipe são os locais com maior frequência, onde popularmente são conhecidas como alecrins (MORAES *et al.*, 2017). O gênero *Lippia* se destaca no Brasil como um centro de diversidade, com 84 espécies e alto grau de endemismo nos cerrados e campos rupestres (FLORA DO BRASIL, 2020; MORAES *et al.*, 2018).

As plantas do gênero *Lippia*, frequentemente aromáticas, é representado por espécies distintas por sua aparência durante a curta fase de floração e também por sua fragrância geralmente forte e agradável, muito utilizadas na medicina popular pelas comunidades tradicionais da Caatinga, região semi-árida do Nordeste brasileiro, que utilizam suas folhas para tratar infecções de garganta e boca, doenças cutâneas, úlceras, distúrbios vaginais, acne, pitiríase alba, caspa, queimaduras, feridas, sinusite, bronquite, nasal congestão, dor de cabeça, icterícia, paralisia, seborreia, dermatoses, acne (MORAES *et al.*, 2017; DE MELO *et al.*, 2019).

Entre os efeitos biológicos relatados para o gênero *Lippia*, destacam-se suas propriedades do sistema nervoso central demonstrado por vários estudos (PASCUAL *et al.*, 2001; MAMUN-OR-RASHID *et al.*, 2013). Como o gênero inclui muitas plantas aromáticas ricas em óleos voláteis, suas propriedades farmacológicas são comumente atribuídas a esses óleos. Eles são compostos terpênicos que já demonstraram ter aplicabilidade clínica (GUIMARÃES *et al.*, 2012; GOUVEIA *et al.*, 2018).

As folhas secas e moídas de algumas espécies *Lippia* sp., ou as flores e frutos desse gênero, são usadas como substitutos do *Thymus vulgaris* (orégano) em misturas de especiarias para pizzas e carnes, também amplamente utilizado como condimento na cozinha e no preparo de vários pratos (PASCUAL *et al.*, 2001; LORENZI, 2002; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Dentre as espécies encontradas no Brasil, está a *Lippia sidoides* (syn. *L. origanoides*), conhecida como alecrim-pimenta, com interessantes propriedades medicinais. É reconhecida na Farmacopeia Mexicana como um substituto do orégano comum (*Origanum vulgare*), apresentando forte atividade antimicrobiana e está no programa de fitoterapia do Ministério da Saúde do Brasil, incluída no RENISUS – Relação Nacional de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS, devido às suas propriedades farmacológicas e seu possível uso no

desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos, incluindo medicamentos (fitoterápicos) e adjuvantes (ALMEIDA *et al.*, 2018; SIQUEIRA-LIMA, *et al.*, 2019).

A espécie *Lippia gracilis* Schauer é uma planta endêmica do Nordeste brasileiro, é popularmente conhecida como alecrim-da-chapada, alecrim-de-serrote, alecrim-de-tabuleiro, candeia-de-queimar e bálsamo da montanha (MATOS *et al.*, 1999; GOMES *et al.*, 2011). É reconhecida há muito tempo na medicina popular como planta medicinal, usada especialmente como antimicrobiana e antisséptica (RIELLA *et al.*, 2012; DE MELO *et al.*, 2019).

Na medicina popular do Nordeste do Brasil, as folhas de *L. gracilis* são utilizadas como antisséptico para tratar seborreia e dermatoses, dermatites, além de acne, infecções de garganta e boca, caspa, problemas vaginais, queimaduras e feridas, dores de cabeça, tratar tosse, bronquite, congestão nasal e cefaleia (GUILHON *et al.*, 2011; SOARES *et al.*, 2011; DE MELO *et al.*, 2013). As infusões ou decocções de folhas e o macerado alcoólico são usados para algumas doenças inflamatórias (GUIMARÃES *et al.*, 2012).

A espécie *L. gracilis* é uma planta considerada rica em óleo essencial devido aos monoterpenos fenólicos carvacrol e timol, seu óleo essencial possui atividade antimicrobiana e é utilizado externamente para tratar doenças cutâneas, queimaduras, feridas e úlceras, atividade antinociceptivo e ações anti-inflamatórias (GOMES *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2015; MORAES *et al.*, 2017). Apesar de sua importância medicinal e cultural no Nordeste do Brasil, existem poucos estudos científicos sobre esta importante planta (DE SOUZA MORAES *et al.*, 2018).

3.3 ESTUDOS AGRONÔMICOS DE *Lippia gracilis* Schauer

Diversos estudos agronômicos já foram realizados com a espécie *Lippia gracilis*, como propagação vegetativa, adubação orgânica, omissão de nutrientes, déficit hídrico, salinidade, genética, efeito da qualidade de luz na composição química do óleo essencial em cultivo *in vitro*, época de colheita e secagem, dentre outros.

A propagação vegetativa é um estudo de extrema importância, principalmente quando se trata da adaptação desta espécie em locais que não sejam seu *habitat* natural, ou então a versatilidade das diversas maneiras de sua forma propagativa. Neste sentido, no estudo realizado por SANTOS *et al.* (2016), verificaram que dentre os diferentes tipos de estacas e substratos utilizados para propagação de *L. gracilis*, estacas medianas e basais apresentaram

melhores resultados do que as apicais, enquanto o composto de argila+húmus foi relativamente superior ao areia+argila+húmus e igual, em significância, ao areia+húmus.

Em outro estudo testando diferentes doses de fertilizante mineral, calcário, substratos e recipientes na produção de mudas de *L. gracilis*, OLIVEIRA *et al.* (2011) observaram que aos 35 dias após o plantio, o uso de 1,0 g/L de fertilizante (6-24-12) sem calcário foi eficaz na sobrevivência das plantas e no enraizamento das estacas, enquanto a bandeja de poliestireno expandido é recomendada para a produção de mudas de *L. gracilis* por meio de estacas.

Em estudos envolvendo adubação orgânica, DE SOUZA *et al.* (2017) observaram que a fertilização orgânica, mineral e irrigação influenciam a produção de biomassa e teor de óleo essencial, porém os métodos de cultivo não afetaram significativamente os compostos químicos do óleo essencial. Já SANTOS *et al.* (2014) verificaram que a composição química dos compostos majoritários sofreram variação em tratamentos com a presença e ausência de adubação orgânica, juntamente com a presença e ausência de adubação mineral, com variações do carvacrol (73,9 a 77%) e timol (4,9 a 10,3%).

A omissão de nutrientes fornecidos à planta também gera mudanças em diversos aspectos relacionados à fenologia, bem como na biossíntese de metabólitos secundários. Este efeito foi testado por ALMEIDA *et al.* (2018), demonstrando que nitrogênio, potássio e cálcio foram os nutrientes mais limitantes para o crescimento de *L. gracilis*. Já a omissão de enxofre promoveu mais crescimento do que a solução completa. Entretanto, a omissão de enxofre, cálcio e magnésio diminuíram o conteúdo de carvacrol no óleo essencial.

O déficit hídrico é outro fator preponderante na resposta da planta. Em estudo onde foi testada irrigação (controle) e suspensão (irrigação) por 15 dias foi observado que o déficit hídrico negativo afetou o crescimento da parte aérea (redução de 72%), com estímulo do crescimento do sistema radicular (aumento de 205%) (PALHARES NETO *et al.*, 2020). Já em estudo verificando a resposta da composição química do óleo essencial das folhas de genótipos de *L. gracilis*, nas estações de seca e chuva, com e sem irrigação, CRUZ *et al.* (2014) observaram que o OE das folhas apresentou teor entre 1,25% e 1,92% na estação chuvosa e 1,42% e 2,70% na seca. Quando a irrigação foi utilizada, o teor foi entre 1,42% e 2,87%; sem irrigação, os teores foram entre 1,60% e 3,00%, enquanto o principal constituinte dos genótipos foi timol e carvacrol, mostrando também que as concentrações apresentaram pouca variação entre as estações.

A salinidade altera a capacidade de acumulação de íons e morfofisiológica na planta. OLIVEIRA *et al.* (2019) verificaram que utilizando irrigação contendo diferentes concentrações de sais e condutividades elétricas, a espécie *L. gracilis* mostrou aos 25 e 50

dias uma resposta variável ao estresse salino em função do tempo, tendo uma capacidade considerável de suportar uma carga crescente de íons tóxicos, mantendo uma taxa de crescimento positiva, destacando o potencial uso da espécie em ambientes moderadamente salinos.

Outro estudo de salinidade indicou que quando *L. gracilis* é exposta ao NaCl, nas concentrações 25, 50, 75 e 100 mM por 40 dias, a planta reduz a taxa de crescimento relativo em comparação com a observada para os controles. Já o estresse salino não afetou o rendimento nem as concentrações dos constituintes do OE, com carvacrol e timol os constituintes majoritários (RAGAGNIN *et al.*, 2014).

A cultura de tecidos vegetais é uma técnica com grande aplicação na agricultura. Nessa técnica, pequenos fragmentos de tecido vivo, chamados explantes, são isolados de um organismo vegetal, desinfestados e cultivados assepticamente, por períodos indefinidos em um meio de cultura apropriado. Dentro desta técnica, diversos fatores podem ser testados, como os meios de cultura, reguladores de crescimento, tipos de explantes, qualidade e intensidade de luz, dentre outros, podendo inibir ou favorecer o desenvolvimento de plantas e claro, influenciar na composição dos princípios ativos das plantas medicinais (KSOURI *et al.*, 2008; LAZZARINI *et al.*, 2018; PINTO *et al.*, 2007).

Neste sentido, vale ressaltar alguns trabalhos da área com a espécie *L. gracilis*. LAZZARINI *et al.* (2019) observaram que a combinação dos reguladores de crescimento 6-benzilaminopurina (BAP), ácido naftalenacético (ANA) e Thidiazuron (TDZ) influenciaram significativamente o crescimento *in vitro*. Os autores verificaram que o experimento de BAP e ANA induziu o maior número de brotações, enquanto BAP e TDZ reduziram os rebentos e o comprimento das raízes, porém estimularam o número de brotações por explante, variando ainda a composição de compostos voláteis, sendo os principais constituintes ρ -cimeno, γ -terpineno, timol, carvacrol e *E*-cariofileno, porém o uso de reguladores de crescimento reduziu significativamente os níveis de carvacrol e timol.

Em outro estudo de LAZZARINI *et al.* (2019), foi verificado que diferentes sistemas de ventilação natural (com membranas) e tipos de explantes influenciam no crescimento e no conteúdo volátil de compostos de *L. gracilis in vitro*. Neste estudo, os explantes com um par de folhas obtiveram as melhores respostas, sendo o sistema de ventilação natural com quatro membranas proporcionando os melhores parâmetros de crescimento e resposta à área foliar dos explantes com folhas, enquanto os pigmentos fotossintéticos diminuíram com o aumento do número de membranas. Já os maiores teores de carvacrol e timol foram observados em plântulas cultivadas em frascos de cultura com quatro membranas porosas.

Já no estudo de PALHARES NETO *et al.* (2018), verificaram a resposta quanto ao sistema de vedação de três tipos de explantes, E1 (gema apical), E2 (segmento nodal abaixo da gema apical) e E3 (segmento nodal abaixo de E2), em meio MS com antioxidante (polivinilpirrolidona) ou agente adsorvente (carvão ativado). Os autores observaram que o cultivo dos explantes fechados com folha de alumínio (vedação total) ou com folha de alumínio contendo um orifício (vedação parcial), as folhas normais apresentam maior organização e desenvolvimento celular do que as folhas hiperídricas, enquanto o uso de antioxidantes não controlou a oxidação de E1. Já as menores taxas de hiperidricidade foram aos tratamentos de fechamento parcial, no entanto, a vedação total juntamente com a adição de polietilenoglicol levou ao aumento da peroxidação lipídica.

Neste estudo de LAZZARINI *et al.* (2018), testaram diferentes intensidades, qualidade de luz e tipo de explante sobre os compostos voláteis e o crescimento de *L. gracilis in vitro*, observando que em todas as combinações experimentais houve influência significativa do crescimento, enquanto o explante de segmentos apicais comparado aos segmentos nodais foi superior em todos os parâmetros avaliados. As variáveis de crescimento foram maiores com o aumento da intensidade da luz, principalmente de $94 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$, enquanto os principais constituintes do OE foram ρ -cimeno, γ -terpineno, timol, carvacrol e *E*-cariofileno, sendo a composição dos compostos voláteis variando de acordo com a intensidade e qualidade da luz, sendo a baixa intensidade ($26 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$) aumentou o conteúdo de γ -terpineno (12,42%) e diminuiu concomitantemente o carvacrol (38,52%) e a luz LED azul apresentou maior produção de carvacrol (48,11%).

DE OLIVEIRA *et al.* (2008) verificaram que houve o controle do crescimento vegetativo de fungos contaminantes na presença dos OE de *L. sidoides* e *L. gracilis* em comparação com o fungicida Carbendazin, com o OE de *L. gracilis* controlando os fungos *Aspergillus niger* e *Penicillium* sp na concentração de $126 \mu\text{L}/\text{mL}$.

A época de colheita e secagem é outro fator determinante quando se objetiva a obtenção de OE em plantas aromáticas. Em estudo realizado por SANTOS *et al.* (2016), observaram que plantas colhidas em 2009 e 2012, apresentaram variações de OE significativas apenas na colheita de 2012, variando de 2,35% a 4,66%, enquanto entre as épocas de colheita os teores aumentaram de 1,52% nas plantas com um ano para 4,66% nas plantas com quatro anos, com o carvacrol e timol os principais compostos.

Em outro estudo foi verificado o tempo de secagem (0, 2, 4 e 8 dias) sobre o conteúdo e a composição química do OE das folhas de acessos de *L. gracilis* secas a 40°C , observando que o maior teor de OE foi com quatro dias de secagem na maioria dos acessos em estudo,

enquanto um acesso foi aos quatro e oito dias de secagem, valores médios de 0,038 e 0,029 mL/g respectivamente (DE MELO *et al.*, 2019).

A genética é sem dúvida o fator determinante na produção de metabólitos secundários em espécies vegetais, mas claro, sendo influenciada por todos os fatores citados acima, dentre outros fatores edafoclimáticos (BROWN JÚNIOR, 1988; KSOURI *et al.*, 2008). Em estudo realizado por SANTOS *et al.* (2016), observaram que *L. sidoides* e *L. gracilis* geraram 789 marcadores e os locos avaliados exibiram índice de diversidade de Shannon moderado ($I = 0,42$) em ambas as espécies, sugerindo que os acessos conservados possuem um nível intermediário de diversidade genética, com um total de 23, 22 e 36 alelos para os acessos de *L. sidoides* e *L. gracilis* nas plantas amostradas.

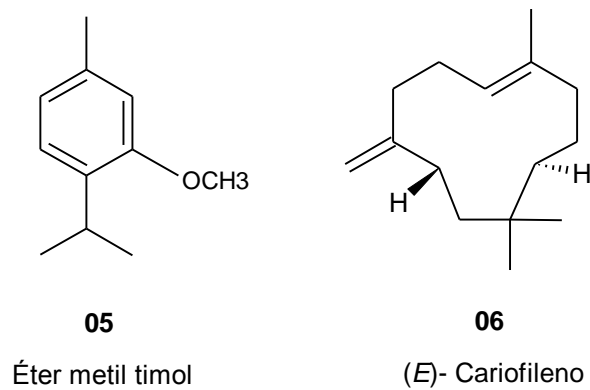
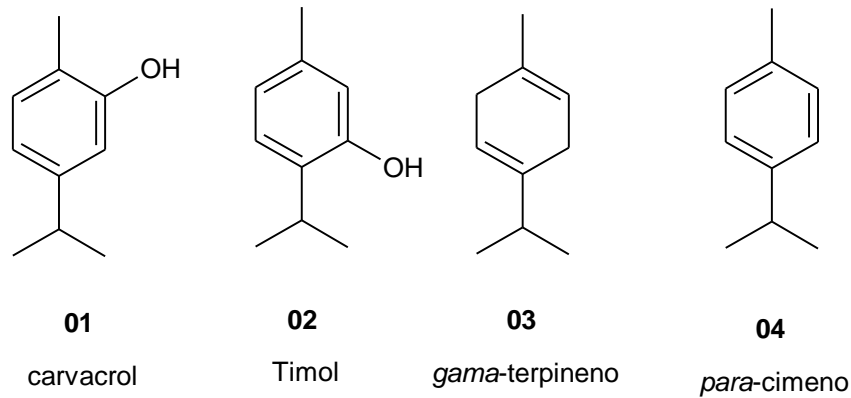
Já em outro estudo de genética, foi verificado que as melhores metáfases foram fotografadas e apontadas para o cromossomo número $2n = 24$, utilizando pontas de raízes coletadas de espécimes recém-plantados de *L. gracilis*, contudo, sabe-se que o gênero tem vários números de cromossomos, variando de $n = 10$ a 30.

A técnica de impressão digital também foi utilizada para diferenciar sete genótipos de *L. gracilis* originária dos Estados de Sergipe e Bahia, Brasil. Neste estudo, os cromatogramas obtidos por CLAE-DAD foi possível diferenciar os genótipos e suas relações com o local de origem, podendo esta técnica ser utilizada para avaliação da qualidade de *L. gracilis* (GOMES *et al.*, 2010).

Esta técnica também foi utilizada por DE JESUS PRADO *et al.* (2012) para discriminar chás de sete genótipos de *L. gracilis* obtidos de diferentes locais (Sergipe e Bahia), utilizando o perfil cromatográfico obtido por CLAE-DAD combinado com análises quimiométricas, observou que os cromatogramas de impressão digital analisados estatisticamente, revelaram diferenças entre os genótipos coletados e cultivados nas mesmas condições.

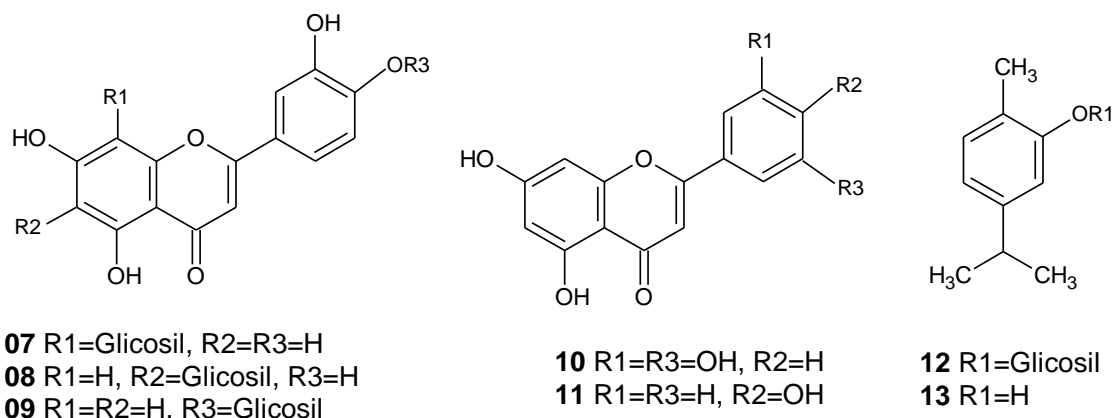
3.4 QUÍMICA DE *Lippia gracilis* Schauer

Quanto aos estudos fitoquímicos da espécie *Lippia gracilis* Schauer, existem vários trabalhos identificando os constituintes voláteis, encontrados no óleo essencial de *L. gracilis*, sendo os principais os monoterpênicos carvacrol (**01**), timol (**02**), γ -terpineno (**03**), *p*-cimeno (**04**), éter metil de timol (**05**) e sesquiterpênicos como (*E*)-cariofileno (**06**) (DE SOUZA MORAES *et al.*, 2018).

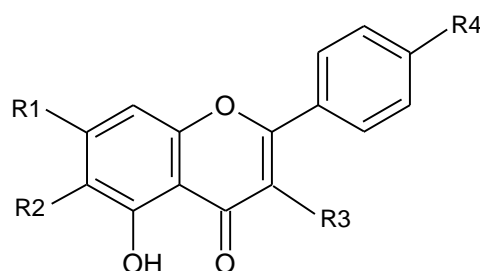


Pesquisas sobre os demais constituintes presentes em suas folhas, caules e raízes são poucas, mostrando que as principais classes encontradas até o momento são flavonóides, terpenos e quinonas.

Em trabalho realizado por MORAES *et al.* (2017) foi relatado o isolamento e caracterização de glicosídeos de flavona e derivados de flavanona a partir de infusão das folhas, orientina (**07**), isoorientina (**08**), Luteolina 4'-O-glicosídeo (**09**), 2-(3,5-Diidroxifenil)-5,7-diidroxi-4H-cromen-4-one (**10**), Tricetina (**11**), carvacrol e seu derivado glicosilado (**12 e 13**).



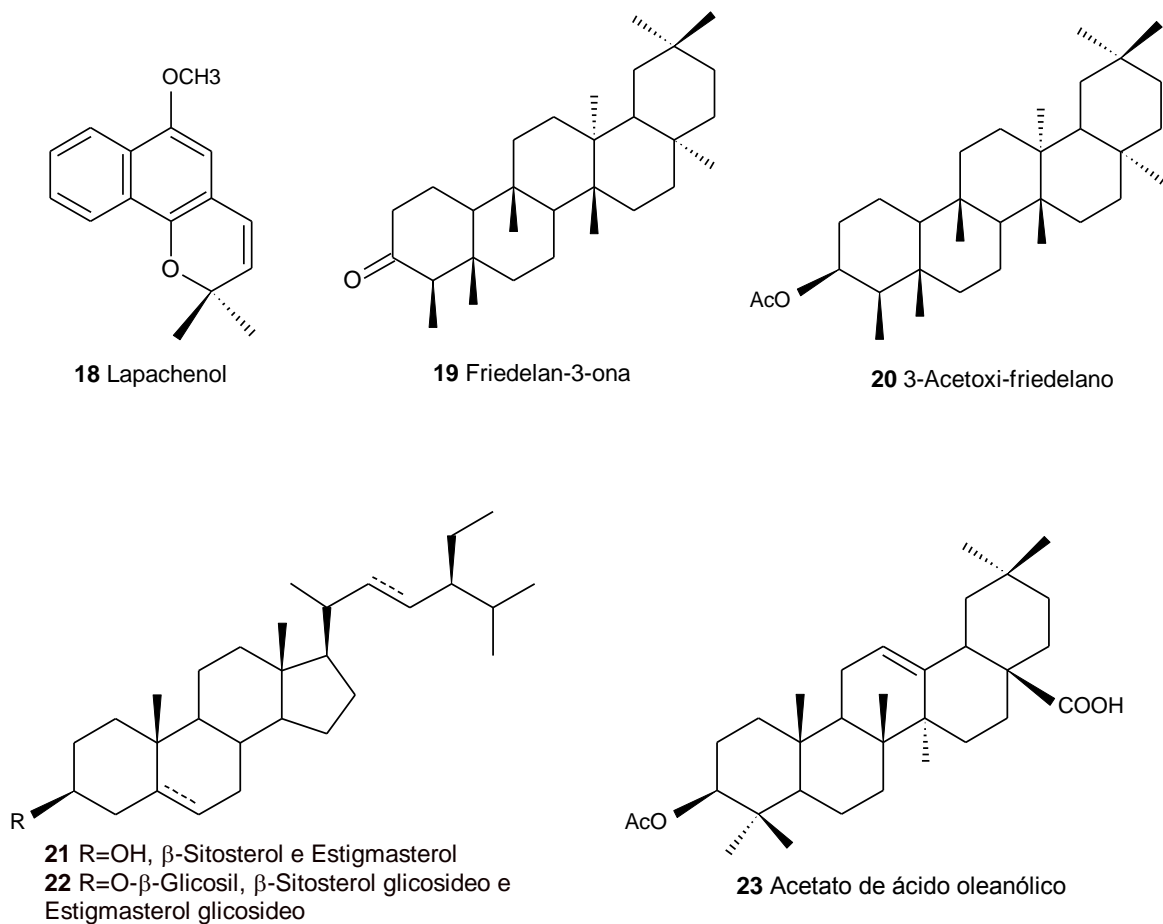
Em levantamento bibliográfico feito por DE SOUZA MORAES *et al.* (2018), foi relatado a identificação no extrato etanólico das folhas de *L. gracilis* alguns flavonoides usando a técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) acoplado à espectrometria de massa (ESI-MS/MS), sendo estes flavonóides identificados por comparação com a literatura como 6-metoxi-apigenina (hispidulina) (**14**), 5,7,4'-trihidroxi-3,6-dimetoxi-flavona (**15**), 5,7-dihidroxi-6,4'-dimetoxi flavona (pectolinarigenina) (**16**) e 5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona (**17**). Concluindo que os flavonóides **16** (pectolinarigenina) e **17** (5-hidroxi-3,7,4'-trimetoxiflavona) foram os mais abundantes no extrato foliar com concentrações de 51,4 e 46,6 mg/kg de peso seco, respectivamente, enquanto os flavonóides **14** (hispidulina) e **15** (5,7,4'-trihidroxi-3,6-dimetoxi-flavona) foram encontrados na mesma concentração de 34,4 mg/kg de peso seco (TREVISAN *et al.*, 2016).

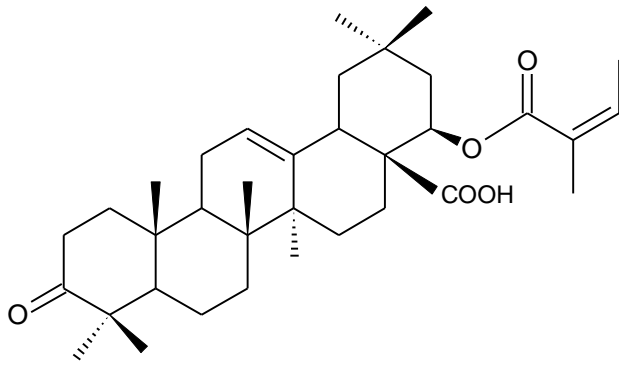


- 14** R1= OH, R2=OCH3, R3=H, R4=OH
15 R1=OH, R2=R3=OCH3, R4=OH
16 R1=OH, R2=OCH3, R3=H, R4=OCH3
17 R1=OCH3, R2=H, R3=R4=OCH3

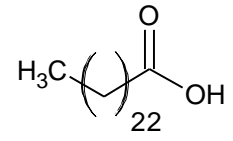
Em estudo fitoquímico com raízes e folhas de *L. gracilis* foram isolados e identificados 16 metabólitos secundários de diferentes classes de produtos naturais. A partir do extrato hexânico das raízes, foi possível isolar lapachenol (**18**), friedelan-3-ona (**19**), 3-acetoxi-friedelano (**20**), uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol (**21**), acetato de ácido

oleanólico (**23**) e lantadeno-A (**24**). Já no fracionamento do extrato etanólico das raízes foi isolado o ácido tetracosanoico (**25**), tecomaquinona (**26**), microfilaquinona (**27**), uma mistura de estigmasterol 3-O-beta-D-glicosídeo e sitosterol 3-O-beta-D-glicosídeo (**22**) e 5-hidroxi-naftol [2,3b] furan-4,9-quinona (**28**). No mesmo estudo, flavonóides como a quercetina (**29**), a hispidulina (**14**) e a 3-metilquercetina (**30**) também puderam ser isolados do etanólico extrato das folhas (LIMA *et al.*, 2008).

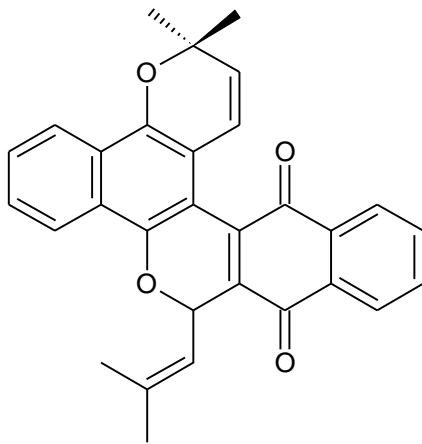




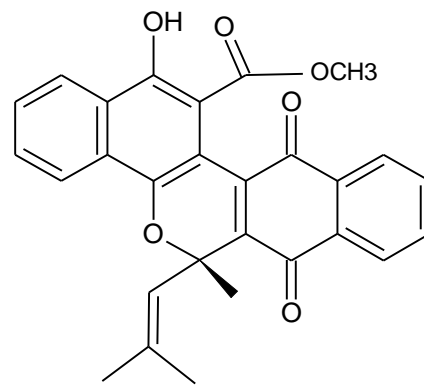
24 Lantadene A



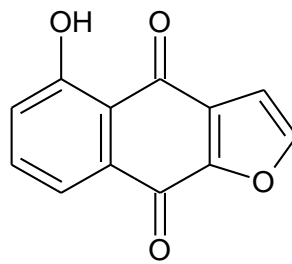
25 Ácido tetracosanóico



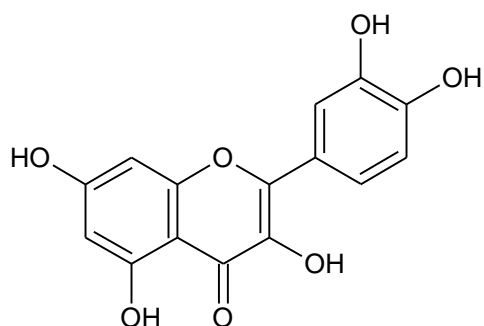
26 Tecomaquinona



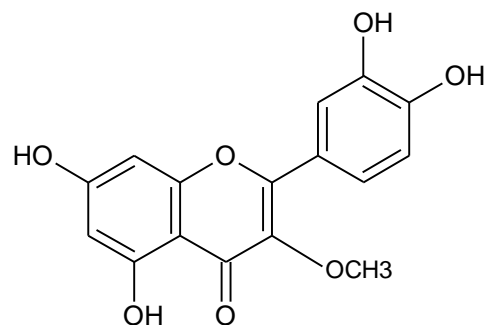
27 Microfilaquinona



28
5-Hidroxiñafitol [2,3b] furan-4,9-quinona



29 Quercetina



30 3-Metilquercetina

Avaliando o efeito da coleta de material vegetal em diferentes momentos do dia de *L. gracilis*, o estudo em questão verificou que o rendimento de OE de folhas secas, (2,6%) em relação a folhas frescas (0,6%) foi bem superior. Já analisando a composição dos OEs, verificou-se que os constituintes majoritários do OE de folhas frescas foram timol (44,4%), carvacrol (22,2%), *p*-cimeno (6,2%) e α -pineno (5,7%), enquanto o OE de folhas secas foi timol (21,3%), carvacrol, (20,9%), α -pineno (19,4%) e *p*-cimeno (8,6%) (BITU *et al.*, 2015).

Com o intuito de verificar a variação na composição química dos óleos essenciais das folhas coletadas de *L. gracilis* em duas localidades do bioma caatinga de Pernambuco, verificou-se que um total de 36 compostos foram identificados nos óleos de todas as amostras, sendo que os perfis químicos das amostras dos mesmos locais eram os mesmos, tendo apenas mudanças relativas na composição. Já os principais componentes identificados nas amostras de Buique foram carvacrol (36,4–45,0%) e *p*-cimeno (18,1–26,2%), enquanto timol (37,4%), γ -terpineno (14,9–20,5%) e 4-metoxi-acetofenona (10,1-12,4%) foram os principais componentes encontrados na amostra coletada em Ouricuri (NEVES *et al.*, 2008).

Em estudo fitoquímico de *L. gracilis*, DE ABREU MATOS *et al.* (2000) encontraram como principais compostos do óleo essencial o *p*-cimeno (14,5%), γ -terpineno (10,6%) e carvacrol (38,4%). Já em estudo feito por MATOS *et al.* (1999), foram encontrados o carvacrol (47,7%) e *p*-cimeno (19,2%) como componentes principais.

No mesmo levantamento bibliográfico feito por DE SOUZA MORAES *et al.* (2018), os autores relatam que a variabilidade quantitativa dos principais compostos está associado à origem geográfica, genética, época de colheita e/ou condições de cultivo e estresse abiótico. Segundo o autor, existem pelo menos três quimiotipos diferentes, o tipo timol (T), o tipo carvacrol (C) e o tipo intermediário (CT), que contém carvacrol e timol em altas porcentagens (com mais carvacrol do que timol ou mais timol do que carvacrol).

3.5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Lippia gracilis* Schauer

Estudos de atividades biológicas são de extrema importância, principalmente pela necessidade de comprovarem os usos populares de plantas usadas para fins medicinais. Neste sentido, diversas atividades biológicas de *Lippia gracilis* já foram confirmadas, como a sua atividade anti-inflamatória, antimicrobiana, amebicida, inseticida, larvicida, acaricida, estresse oxidativo, toxicidade, dentre outras.

3.5.1 Atividade anti-inflamatória

A atividade anti-inflamatória é o principal uso de *L. gracilis* na medicina popular. Com isto, vale ressaltar o trabalho de SIQUEIRA-LIMA *et al.* (2019), no qual foi observado que os camundongos tratados com OE de *L. gracilis* e OE complexado em beta-ciclodextrina (24 mg/kg) reduziu o número de leucócitos e os níveis de TNF-alfa e IL-1 beta, também inibiu o comportamento nociceptivo induzido por cinamaldeído e mentol.

Neste mesmo estudo de SIQUEIRA-LIMA *et al.* (2019), os autores verificaram que em modelos de dor crônica, aumentou o conteúdo de proteínas inflamatórias e o OE e OE complexado em beta-ciclodextrina restauraram o conteúdo de proteínas de TNF-alfa, NF-kappa B e PKA, mas não IL-1 beta e IL-10, enquanto que o OE inibiu os canais de Ca²⁺, portanto estes testes mostraram o efeito anti-hiperalgésico por meio de reduções nos níveis de TNF-alfa e PKA.

Já no estudo de RIELLA *et al.* (2012), verificaram que o timol reduziu significativamente o edema em roedores (100 mg/kg) e, além disso, diminuiu o influxo de leucócitos para a área lesada (10, 30 e 100 mg/kg), enquanto as feridas tratadas com filmes de colágeno contendo timol mostraram taxas de retração de feridas significativamente maiores (7 e 14 dias).

Em outro estudo com o extrato metanólico de *L. gracilis*, observou que após a administração oral do extrato (100, 200 e 400 mg/kg), reduziu significativamente o número de contorções e o tempo de lambidas da pata em ambas as fases do teste de formalina, quando comparados aos camundongos do grupo controle, enquanto a administração oral de 400 mg/kg de extrato produziu um efeito anti-inflamatório na peritonite induzida por carragenina (GUIMARÃES *et al.*, 2012).

Resultado semelhante foi obtido por GUILHON *et al.* (2011), verificando que o OE de *L. gracilis* (10, 30 e 100 mg/kg) inibiu significativamente o número de contorções induzidas

por ácido acético e o tempo que o animal passou lambendo a pata injetada com formalina (segunda fase), demonstrando ainda que animais pré-tratados com naloxona, não reverteram o efeito antinociceptivo do OE, enquanto o éster metílico de l-nitro arginina e atropina reverteram significativamente o efeito do OE. Estes mesmos autores, verificaram ainda que o OE inibiu o processo inflamatório induzido por injeção subcutânea de carnavenosina, reduzindo a migração celular, volume de exsudato, proteína extravasada e mediadores inflamatórios (óxido nítrico, prostaglandina E2, TNFN- α e IFN- γ), indicando que o OE de *L. gracilis* produz um efeito antinociceptivo que pode ser potencialmente mediado por receptores colinérgicos e pela via do óxido nítrico.

Já no trabalho realizado por MENDES *et al.* (2010) foi verificado que o tratamento oral com o OE em camundongos, inibiu a atividade no efeito do ácido acético nas concentrações 50, 100 e 200 mg/kg ($30,33 \pm 2,36$, $25,20 \pm 1,48$ e $21,00 \pm 1,54$ contorções abdominais, resp.), em comparação com o grupo controle ($36,73 \pm 1,92$ contorções). Já os testes com o ácido acetilsalicílico (300 mg/kg) inibiram as contorções induzidas pelo ácido acético ($12,67 \pm 0,50$ contorções abdominais) e a formação de edema induzido por carragenina foi reduzida com o OE a 200 mg/kg ($0,72 \pm 0,06$ mL h) e pelo ácido acetilsalicílico (300 mg/kg, $0,85 \pm 0,04$ mL h), em comparação com o grupo controle ($1,76 \pm 0,06$ mL h).

3.5.2 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana também é relatada com bastante frequência na espécie, principalmente relacionado ao OE. A exemplo, o estudo de DA SILVA *et al.* (2019), observando que o OE de sete genótipos de *L. gracilis* testados apresentaram inibição do crescimento bacteriano de *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, agente causador da podridão negra, uma doença que causa sérios danos às plantas da família Brassicaceae, com CIM de 700 a 1000 $\mu\text{g/ml}$, sendo que a CIM para timol e carvacrol foi de 250 $\mu\text{g/ml}$.

Em estudo de SILVA *et al.* (2018) com o OE de *L. sidoides* e *L. gracilis*, foi observado que o OE de *L. sidoides* inibiu em todas as concentrações (0,02, 0,04, 0,06, 0,08 e 0,1 $\mu\text{L/mL}$) o crescimento de isolados do fungo *Rhizoctonia solani*, um fitopatógeno do solo. Já o OE de *L. gracilis* inibiu o isolado R2 em todas as concentrações, enquanto o isolado R1 do patógeno foi completamente inibido na concentração de 0,04 $\mu\text{L/mL}$.

Em ensaios para verificar a eficácia dos OEs de *L. gracilis* no crescimento *in vitro* de *Xanthomonas campestris* (causador do cancro bacteriano em videira) obtidos em diferentes

tipos de manejo de cultivo, em três diferentes doses (200, 250 e 300 $\mu\text{L/L}$), observou-se que os óleos proporcionaram percentuais de inibição do crescimento bacteriano variando de 62,67% a 96,50%, maiores que o controle positivo oxiclreto de cobre (49,6%). Já na composição química os compostos majoritários sofreram variação, carvacrol (73,9 a 77%) e timol (4,9 a 10,3%) (SANTOS *et al.*, 2014).

Na avaliação da atividade antimicrobiana de OE das folhas de *L. gracilis* associados a antibióticos comerciais contra a resistência bacteriana, foi verificado que o OE tem sinergismo significativo com todos os antibióticos testados, diminuindo a CIM dos aminoglicosídeos e melhorando sua zona de inibição em mais de 300% contra *Staphylococcus aureus* e 270% contra *Pseudomonas aeruginosa*; já os compostos majoritários foram timol (44,4%), carvacrol (22,2%), *p*-cimeno (6,2%) e α -pineno (5,6%) (BITU *et al.*, 2014).

Em outro estudo de BITU *et al.* (2012), verificaram que o rendimento do OE extraído das folhas secas (2,64%) foi significativamente maior quando comparado ao das folhas frescas (0,56 %), sendo timol dominante (44,42%; 21,3%), seguido de carvacrol (22,21%; 21,30%), *p*-cimeno (6,23%; 8,58%), α -pineno (5,65%; 19,42%), β -cariofileno (5,61%; 3,57%), respectivamente. Já os resultados microbiológicos mostraram que o óleo essencial possui atividade antimicrobiana relevante contra *E. coli* (ATCC 10536), *E. coli* (Ec 27), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 15442), *S. aureus* (ATCC 12692) e *S. aureus* (Sa 358), com suas zonas de inibição variando de 9 a 13 mm e a MIC variando de 64 a 512 $\mu\text{g/mL}$.

Em estudo *in vitro*, a solução do OE de *L. gracilis* a 5% apresentou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*, isolado de pacientes diabéticos com úlceras infectadas; já no estudo em modelo experimental de ratos, observou-se que esta solução apresentou redução do nível de UFC/mL (*S. aureus* sem *L. gracilis* 108 ± 313 versus *S. aureus* com *L. gracilis* $13,28 \pm 4,03$), sendo carvacrol, *p*-cimeno e γ -terpineno foram considerados os componentes principais (NETO *et al.*, 2010).

Em ensaio de toxicidade *in vitro* dos OEs de *L. sidoides* e *L. gracilis* sobre o fungo *Sclerotium rolfsii*, um dos patógenos que causam graves danos à agricultura, afetando uma ampla gama de hospedeiros, foi observado que todas as concentrações (0,3 a 1,5 $\mu\text{L/mL}$) controlaram efetivamente o patógeno *in vitro*, com o timol e o carvacrol os compostos majoritários (GUERRA *et al.*, 2018).

Em outro estudo testando diferentes concentrações dos OEs de *L. sidoides* e *L. gracilis* sobre o fungo *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*, causador da murcha do tomateiro, foi observado que a atividade antifúngica dos óleos essenciais a 100% foi demonstrada em todas as concentrações testadas (0,3 a 1,5 $\mu\text{L/mL}$), exceto na concentração de 0,3 $\mu\text{L/mL}$, na qual

apenas 70,2% do crescimento micelial foi inibido (FONTES *et al.*, 2018). Já no trabalho de FRANCO *et al.* (2014), observou-se a concentração letal (LC50 5,0 µg/mL) contra os fungos *Cladosporium sphaerospermum* e *C. cladosporioides*.

Em CRUZ *et al.* (2018), foi observado que o OE de *L. gracillis* possui potencial antifúngico para o controle do sangramento do colmo do coqueiro, uma vez que o *Thielaviopsis paradoxa* foi inibido em todas as concentrações utilizadas, sendo que um dos genótipos avaliados de *L. gracillis* apresentou CIM de 0,23 mg/mL, enquanto outro apresentou CIM de 0,82 mg/mL; já as nanoemulsões de óleo essencial apresentaram alta eficiência no controle da doença (CIM 0,6 mg/mL) e baixa fitotoxicidade.

Em outro estudo com *Thielaviopsis paradoxa*, COSTA-CARVALHO *et al.* (2018) observaram que o OE de diferentes acessos de *L. gracilis* controlou com eficiência a concentração do patógeno em 0,3 µL/mL, e a concentração de 0,1 µL/mL foi responsável por um controle do crescimento micelial nos acessos (20,0, 80,9 e 60,9), demonstrando ainda a presença de quimiotipos na espécie *L. gracilis*, uma vez que a porcentagem de inibição do crescimento micelial diferiu significativamente entre os diversos acessos na menor concentração.

Em se tratando de uma das mais importantes hortaliças cultivadas no Brasil, a pimenta (*Capsicum annuum* L), ARAÚJO *et al.* (2018) observaram que em concentrações de 0,3 µL/mL, os OEs de *L. gracilis* e *L. sidoides* inibiram 100% do crescimento micelial *in vitro* de *Colletotrichum* sp., causador da principal doença desta cultura, a antracnose, com timol e carvacrol os constituintes majoritários no óleo de *L. sidoides* (42,33% e 4,56%) e *L. gracilis* (10% e 41,7%).

Em ensaios avaliando o efeito *in vitro* dos OEs (255, 340 e 425 ppm) e extratos em etanol (2500, 5000 e 7500 ppm) de raízes e folhas de *L. gracilis* no controle do fungo *Monosporascus cannonballus*, agente causador do colapso do melão, observou-se uma eficácia nas três concentrações dos OEs no controle do fungo. Os percentuais de inibição foram de 100%, semelhante ao controle positivo Captan (4075 ppm), enquanto o extrato de raiz, nas concentrações de 5000 ppm e 7500 ppm, e o extrato de folha, na concentração de 7500 ppm, também proporcionaram porcentagem de inibição de 100% (FERNANDES *et al.*, 2015).

Em estudo com fungos contaminantes de laboratórios de cultura de tecidos vegetais, verificou-se que nos óleos testados nas concentrações de 0; 420; 440; 460; 480 e 500 µL/L, houve uma inibição de 100% em 420 µL/L para todos os fungos, exceto para *C. luneta* (95,58 %) e *A. niger* (89,40 %); já nos testes com as bactérias (420 µL/L), verificou-se que a espécie

bacteriana *K. pneumoniae* foi a menos sensível e *E. hormaechei* foi a mais sensível (DE ALBUQUERQUE *et al.*, 2006).

3.5.3 Atividade amebicida

A atividade amebicida contra trofozoítos de *Acanthamoeba polyphaga* também foi testada em estudo de SANTOS *et al.* (2016). Neste estudo, observou-se que em quase todas as concentrações de óleos e o composto carvacrol, mostraram atividade amebicida, com valor de IC50 para de *L. gracilis* de 10,08 µg/mL; já o carvacrol IC50 de 24,74 µg/mL, mostrando ainda baixa citotoxicidade.

3.5.4 Atividade larvicida, inseticida e acaricida

Estudos com larvas, insetos e ácaros também são relatados na literatura para *L. gracilis*, principalmente o efeito de seu OE. O trabalho de OLIVEIRA *et al.* (2020), verificou que houve mortalidade larval (27,27%) e pupal (28,12%) de *Liriomyza sativae*, uma praga polifágica mundial para culturas hortícolas e ornamentais, após a imersão das folhas com larvas de *L. sativae* recém-eclodidas em solução de OE de *L. gracilis*.

Em ensaios para verificar a eficiência de complexos de OE de *L. gracilis* e β -ciclodextrina (β -CD) para controle de *A. aegypti*, foi observado que o complexo tinha uma concentração letal de 50% (CL50 33 ppm), sendo o OE puro (39 ppm). Em outras palavras, complexar o óleo com β -CD melhorou a atividade larvicida, além disso, o OE complexado com β -CD não foi prejudicial para organismos não-alvo nas concentrações necessárias para controlar larvas de *A. aegypti* (GALVAO *et al.*, 2019).

A toxicidade e os efeitos subletais do OE de *L. gracilis* nos ácaros *Aceria guerreronis* Keifer (Eriophyidae) e *Raoiella indica* Hirst (Tenuipalpidae), causadores de patologias na família Arecaceae também foram relatados. DOS SANTOS *et al.*, (2019), registrou que a toxicidade do OE difere do timol para *A. guerreronis* (CL50 = 4,28 mg/mL, LC50-timol = 5,34 mg/mL) e para *R. indica* (LC50 = 4,99 mg/mL, LC50-timol = 9,03 mg/mL).

Já em trabalho de MELO *et al.* (2018), mostrou-se que os OEs de dois quimiotipos de *L. gracilis*, bem como seus principais compostos, apresentaram toxicidade para *Diaphania hyalinata* (causador da broca das cucurbitáceas), apresentando DL50 = 5,90 e 4,56 µg/mg, respectivamente, enquanto timol e carvacrol isolados, foram cerca de duas a cinco vezes mais tóxicos do que os OE correspondentes.

Em avaliação da eficácia *in vitro* de onze óleos essenciais do Brasil, dentre elas a *L. gracilis*, sobre a eficiência reprodutiva e letalidade do carrapato *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (carrapato do gado), verificou-se que a *L. gracilis* causou 100% de letalidade a 25 mg/mL, com LC50 e LC90 de 3,21 e 7,03 mg/mL respectivamente, sendo uma das mais eficazes entre as espécies testadas (CHAGAS *et al.*, 2016).

A atividade do OE de *L. gracilis* e seus componentes carvacrol e timol também foi confirmada contra larvas de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* e fêmea ingurgitada. O carvacrol (CL50 de 0,22 e 4,46 mg/mL, para larvas e fêmeas ingurgitadas, resp.) foi mais eficiente do que o timol (CL50 de 3,86 e 5,50 mg/mL); já as concentrações letais do OE foram de 1,31 mg/mL e 4,66 mg/mL para larvas e fêmeas ingurgitadas, respectivamente (CRUZ *et al.*, 2013).

Em ensaio para verificar os efeitos acaricidas de OEs extraídos de dois diferentes genótipos de *L. gracilis* e os principais monoterpenos em larvas suscetíveis e resistentes de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* a organofosforados, observou-se que o óleo foi mais eficaz contra a cepa de carrapato resistente a organofosforados do que a cepa de carrapato suscetível, enquanto o carvacrol foi 3,2 vezes mais tóxico para a cepa resistente a organofosforados do que para cepa suscetível (COSTA-JUNIOR *et al.*, 2016).

O potencial larvicida de OEs de espécies vegetais comuns obtidas no Parque Nacional Chapada das Mesas, Brasil, também foi confirmado. Observou-se que larvas de terceiro instar de *A. aegypti*, principal vetor da dengue e da febre chikungunya, foram suscetíveis ao OE de *L. gracilis* com uma concentração letal (CL50) de 282 mg/L após 24h de exposição (DIAS *et al.*, 2015). Um potente efeito inseticida do OE de *L. gracilis* contra larvas de *Aedes aegypti* também foi confirmado por SILVA *et al.* (2008). SANTIAGO *et al.* (2006), também confirmaram esta atividade do OE de *L. gracilis*, com CL50 de 26,3 µg/mL.

Considerada a praga mais importante do feijão-caupi (*Vigna unguiculata*), o gorgulho *Callosobruchus maculatus*, estudo de PEREIRA *et al.* (2008), observou que o OE *L. gracilis* provocou 100% de mortalidade em todas as concentrações (10, 20, 30, 40 e 50 µL/20 g).

Atividades biológicas do OE de *L. gracilis*, também são relatadas contra cupins subterrâneos *Heterotermes sulcatus* (Isoptera: Rhinotermitidae), com 100% de mortalidade dos cupins nas doses testadas (LIMA *et al.*, 2013). Enquanto o hidrolato (subproduto da destilação de óleo essencial) de *L. gracilis* apresentou efeitos farmacológicos em testes com retos abdominais de sapo, duodeno de coelho, coração de anfíbio e útero de rato (FONTELES *et al.*, 1988).

3.5.5 Atividade antioxidante

Atividades relacionadas ao poder antioxidante também são relatadas para a espécie. O estudo de TREVISAN *et al.* (2016), utilizando o ensaio de hipoxantina/xantina oxidase, baseado em HPLC foi inativo ($IC_{50} > 2000 \mu\text{g/mL}$), com o carvacrol (5,36 g/kg) sendo altamente ativo (1,74 μM), inclusive nos ensaios ORAC. Já no trabalho de Franco *et al.* (2014), a atividade de eliminação do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH) para o óleo da folha foi de $35,7 \pm 3,3 \mu\text{g/mL}$ (EC_{50}).

3.5.6 Atividades de toxicidade

Em estudos de MELO *et al.* (2014), foi observado o efeito citotóxico do OE de *L. gracilis* contra células normais e tumorais em concentrações abaixo de 100 $\mu\text{g/mL}$. O mesmo foi observado por FERRAZ *et al.*, 2013, onde os constituintes (timol, p-cimeno, γ -terpineno e mirceno) exibiram citotoxicidade para diferentes linhagens de células tumorais, com inibição do crescimento tumoral de 38,5-41,9%. RIBEIRO *et al.* (2012), também observaram a citotoxicidade do extrato hexânico e metanólico das folhas e o OE das folhas de *L. gracilis*, contra linhas de células tumorais humanas, com excelentes resultados de inibição de crescimento celular.

3.6 A INFLUÊNCIA DA LUZ NA PRODUÇÃO DE METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Tanto o metabolismo primário quanto o secundário, dependem da concentração de glicose no tecido vegetal. Com isso, a luz desempenha um papel fundamental, não fornecendo apenas a energia para a produção de glicose no processo de fotossíntese, mas também carrega informações precisas indispensáveis para o reconhecimento de mudanças no meio ambiente (KOLTON *et al.*, 2022).

Os fotorreceptores (pigmentos específicos ou complexos proteína-pigmento) irão permitir às plantas receber e reagir a vários comprimentos de onda e partes de fótons, já que apresenta sensibilidade à radiação UV para vermelho distante e regular as mudanças na morfologia, fisiologia e metabolismo (KOLTON *et al.*, 2022; ZHANG *et al.*, 2021). Desta maneira, as plantas têm uma grande capacidade de se ajustar a diversas condições espectrais de luz (HE *et al.*, 2021).

A qualidade (faixa espectral) e intensidade (irradiância) de luz são fatores ambientais que afetam a fotossíntese, fotomorfogênese e o metabolismo secundário de plantas (ALVARENGA *et al.*, 2015; ANDRADE *et al.*, 2017; HSIE *et al.*, 2019).

O uso de malhas fotoconversoras no manejo agrícola de plantas medicinais, torna-se uma ferramenta que tem o objetivo de combinar a proteção física e a filtragem da faixa espectral de luz absorvida pela planta (KSOURI *et al.*, 2008; SOUZA *et al.*, 2011).

O espectro da malha azul mostra um pico de transmissão principal na região verde-azulada (400-540 nm), enquanto a rede de malha vermelha tem maior transmitância em comprimentos de onda superiores a 590 nm; já a malha preta é considerada inerte, promovendo o sombreamento (OREN-SHAMIR *et al.*, 2001; ALVES *et al.*, 2018).

Vários estudos têm sido realizados a fim de obter plantas com altos teores de princípios ativos, sendo a qualidade de luz um destes fatores, capaz de alterar a produção de metabólitos secundários (LAZZARINI *et al.*, 2018; ALMEIDA *et al.*, 2018).

COSTA *et al.* (2012) observaram que plantas de hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.) cultivadas sob malhas de cor vermelha, preta e sob o pleno sol, obtiveram maiores teores e rendimento de óleo essencial. Plantas de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) cultivadas em pleno sol e sob malha azul produziram maior biomassa seca de folhas e maiores teores e rendimentos do óleo essencial (DE SOUZA *et al.*, 2014). O estudo de PINTO *et al.*, 2014 com o cultivo de *Achillea millefolium* em diferentes cores de malhas, observou que o rendimento de óleo foi superior a pleno sol (4,45 g.planta⁻¹) e o principal constituinte do óleo, o camazuleno, apresentou faixa de variação entre 19,9 e 46,9% dentre os tratamentos.

O cultivo de orégano (*Oreganum vulgare*) em diferentes ambientes de luz, utilizando malhas coloridas, promoveu a variação na composição química do óleo essencial, destaque para os compostos majoritários *p*-cimeno (9,80-14,52%), γ -terpineno (8,13-17,19%) e terpineno-4-ol (8,88-27,92%) (OLIVEIRA *et al.*, 2016), enquanto ALVES *et al.*, 2018, observaram uma variação dos compostos majoritários neral (24,68-29,18%), geranial (35,96-42,07%) e da carvona (0,10-11,67%) no óleo essencial de *Lippia alba* cultivada sob malhas azul e vermelho e a pleno sol.

4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, C. C.; CAMARA, T. R.; SANT'ANA, A. E. G.; ULISSES, C.; WILLADINO, L.; MARCELINO JÚNIOR, C. Effects of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer on caulinary shoots of heliconia cultivated in vitro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 26-33, 2012.

ALMEIDA, B. R.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE CARVALHO, A. A.; ROZA, H. L. H.; FIGUEIREDO, F. C.; PINTO, J. E. B. P. Macronutrient Omission Changes *Lippia gracilis* Schauer, a Threatened Medicinal Plant, Growth and Volatile Chemical Composition. **HortScience**, v. 53, n. 12, p. 1877-1882, 2018.

ALMEIDA, M. C.; PINA, E. S.; HERNANDES, C.; ZINGARETTI, S. M.; TALEB-CONTINI, S. H.; SALIMENA, F. R.; BERTONI, B. W. Genetic diversity and chemical variability of *Lippia* spp. (Verbenaceae). **BMC research notes**, v. 11, n. 1, p. 1-14, 2018.

ALVARENGA, I. C. A.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P. In vitro culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 122, n. 2, p. 299–308, 2015.

ALVES, A. C.; JESUS, F. N.; ALVES, P. B.; SANTOS, H. V.; SOUZA, G. S.; SANTOS, A. R. Biomass production and essential oil of lemon balm cultivated under colored screens and nitrogen. **Horticultura Brasileira**, v. 36, p. 94-99, 2018.

ANDRADE, H. B.; BRAGA, A. F.; BERTOLUCCI, S. K. V.; HSIE, B. S.; SILVA, S. T.; PINTO, J. E. B. P. Effect of plant growth regulators, light intensity and LED on growth and volatile compound of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit in vitro plantlets. **Acta Hort**, v. 1155, p. 277–284, 2017.

ARAÚJO, E. R.; COSTA-CARVALHO, R. R.; FONTES, M. G.; LARANJEIRA, D., BLANK, A. F.; ALVES, P. B. Antifungal activity of essential oils of *Lippia* species of *Colletotrichum* sp. in vitro. **In III International Symposium on Medicinal and Nutraceutical Plants and III Conference of National Institute of Science and 1198**, p. 9-16, 2012.

BITU, V. B.; BOTELHO, M. A.; COSTA, J. G. M.; RODRIGUES, F. F. G.; VERAS, H. N. H.; MARTINS, K. T.; QUINTANS-JUNIOR, L. J. Screening and antimicrobial activity phytochemical of essential oil from *Lippia gracillis*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 1, p. 69-75, 2012.

BITU, V. D. C. N.; MARTINS DA COSTA, J. G.; ROGRIGUES, F. F. G.; COLARES, A. V.; COUTINHO, H. D. M.; BOTELHO, M. A.; MENEZES, I. R. A. Effect of collection time on composition of essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae) growing in Northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 18, n. 3, p. 647-653, 2015.

BITU, C. N. *et al.* Chemical composition of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer leaves and its potential as modulator of bacterial resistance. **Natural Product Research**, v. 8, n. 6, p. 399-402, 2014.

BLANK, A. F. Transformation of genetic resources of native aromatic plants into wealth: The potential of *Lippia gracilis*. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 3, 2013.

BRANT, R. D. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSA, L. F.; ALBUQUERQUE, C. J. B.; FERRI, P. H.; CORRÊA, R. M. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de melissa cultivada sob malhas fotoconversoras. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1401-1407, 2009.

BROWN JÚNIOR, K.S. Engenharia ecológica: novas perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais. **Acta Amazônica**, v.18, n.1, p. 291-303, 1988.

CHAGAS, A. C. D.; DE SENA OLIVEIRA, M. C.; GIGLIOTI, R.; SANTANA, R. C. M.; BIZZO, H. R.; GAMA, P. E.; CHAVES, F. C. M. Efficacy of 11 Brazilian essential oils on lethality of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 7, n. 3, p. 427-432, 2016.

CHAGAS, J. H.; PINTO, J. E. B.; BERTOLUCCI, S. K. V.; COSTA, A. G.; DE JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B. Produção, teor e composição química do óleo essencial de hortelã-japonesa cultivada sob malhas fotoconversoras. **Horticultura brasileira**, v. 31, p. 297-303, 2013.

COELHO, A. D.; DE SOUZA, C. K.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE CARVALHO, A. A.; SANTOS, G. C.; DE OLIVEIRA, T.; PINTO, J. E. B. P. Wavelength and light intensity enhance growth, phytochemical contents and antioxidant activity in micropropagated plantlets of *Urtica dioica* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 145, n. 1, 59-74, 2021.

COSTA, L. C. D. B.; PINTO, J. E. B. P.; CASTRO, E. M. D.; ALVES, E.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ROSAL, L. F. Effects of coloured shade netting on the vegetative development and leaf structure of *Ocimum selloi*. **Bragantia**, v. 69, p. 349-359, 2010.

COSTA, A. G.; CHAGAS, J. H.; PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. Crescimento vegetativo e produção de óleo essencial de hortelã-pimenta cultivada sob malhas. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 534-540, 2012.

COSTA-CARVALHO, R. R. *et al.* Effect of essential oils from different accessions of *Lippia gracilis* on control of *Thielaviopsis paradoxa*. **Acta Horticulturae**, v. 1198, p. 27-30, 2018.

COSTA-JÚNIOR, L. M.; MILLER, R. J.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; LI, A. Y.; DE LEON, A. A. P. Acaricidal efficacies of *Lippia gracilis* essential oil and its phytochemicals against organophosphate-resistant and susceptible strains of *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary parasitology**, v. 228, 60-64, 2016.

CRUZ, E. M. D. O.; PINTO, J. A. O.; FONTES, S. S.; ARRIGONI-BLANK, M. D. F.; BACCI, L.; JESUS, H. C. R. D.; BLANK, A. F. Water deficit and seasonality study on essential oil constituents of *Lippia gracilis* Schauer germplasm. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014.

CRUZ, E. M. D. O., E. M.; COSTA-JUNIOR, L. M.; PINTO, J. A. O.; DE ALEXANDRIA SANTOS, D.; DE ARAUJO, S. A.; DE FÁTIMA ARRIGONI-BLANK, M.; BLANK, A. F. Acaricidal activity of *Lippia gracilis* essential oil and its major constituents on the tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Veterinary Parasitology**, v. 195, n. 1-2, p. 198-202, 2013.

CRUZ, E. M.; MENDONÇA, M. C.; BLANK, A. F.; SAMPAIO, T. S.; PINTO, J. A.; GAGLIARDI, P. R.; WARWICK, D. R. *Lippia gracilis* Schauer essential oil nanoformulation

prototype for the control of *Thielaviopsis paradoxa*. **Industrial Crops and Products**, v. 117, p. 245-251, 2018.

DA SILVA, R. S.; DE OLIVEIRA, M. M. G.; DE MELO, J. O.; BLANK, A. F.; CORRÊA, C. B.; SCHER, R.; FERNANDES, R. P. M. Antimicrobial activity of *Lippia gracilis* essential oils on the plant pathogen *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* and their effect on membrane integrity. **Pesticide biochemistry and physiology**, v. 160, p. 40-48, 2019.

DE ABREU MATES, F. J.; MACHADO, M. I. L.; DE VASCONCELOS SILVA, M. G.; CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W. Essential oils of *Lippia alnifolia* Schauer (Verbenaceae) and *Lippia* aff. *gracillis* HBK, two aromatic medicinal shrubs from northeast Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 12, n. 3, 295-297, 2000.

ALBUQUERQUE, C. C. D.; CAMARA, T. R.; MARIANO, R. D. L. R.; WILLADINO, L.; MARCELINO JÚNIOR, C.; ULISSES, C. Antimicrobial action of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 49, p. 527-535, 2006.

PRADO, V. D. J.; MORAES, V. D. S.; NOGUEIRA, P. D. L.; CRUZ, E. M. O.; BLANK, A. F.; PEREIRA FILHO, E. R.; MARTINS, L. R. R. Characterization of teas from *Lippia gracilis* Schauer genotypes by HPLC-DAD chromatographic profile combined with chemometric analyses. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1814-1818, 2012.

DE MELO, J. O.; BITENCOURT, T. A.; FACHIN, A. L.; CRUZ, E. M. O.; DE JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B.; SCHER, R. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. **Acta Tropica**, v. 128, n. 1, p. 110-115, 2013.

DE MELO, J. O.; BLANK, A. F.; DE OLIVEIRA, A. M. S.; ANDRADE, T. M.; DE FÁTIMA ARRIGONI-BLANK, M.; ALVES, P. B. Content and chemical composition of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer accessions in different drying times. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 6, 2019.

DE OLIVEIRA, O. R.; TERAPO, D.; DE CARVALHO, C. P.; INNECCO, R.; DE ALBUQUERQUE, C. C. Effect of essential oil from genus *Lippia* plants over the control of

fungi contaminants on the micro propagation of plants. **Revista Ciência Agronômica**, v. 39, n. 1, p. 94, 2008.

DE SOUZA MORAES, V. R.; DE LIMA NOGUEIRA, P. C.; COSTA, E. V.; DE SOUZA SANTOS, L.; SILVA, V. R.; BOMFIM, L. M.; BEZERRA, D. P. Phytochemical and Biological Properties of *Lippia gracilis*. In **Anticancer plants: Properties and Application**, Springer, Singapore, p. 37-55, 2018.

DE SOUZA, A. V. V.; DOS SANTOS, U. S.; CORRÊA, R. M.; DE SOUZA, D. D.; DE OLIVEIRA, F. J. V. Essential oil content and chemical composition of *Lippia gracilis* Schauer cultivated in the Sub-meddle São Francisco Valley. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 20, n. 4, p. 983-994, 2017.

DE SOUZA, G. S.; DOS SANTOS SILVA, J.; DE OLIVEIRA, U. C.; DOS SANTOS NETO, R. B.; DOS SANTOS, A. R. Crescimento vegetativo e produção de óleo essencial de plantas de alecrim cultivadas sob telas coloridas. **Bioscience Journal**, v. 30, 2014.

DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; RODRIGUES, K. A. D. F.; BRITO, M. C. A.; ROSA, C. D. S.; AMARAL, F. M. M. D.; MORAES, D. F. C. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils extracted from Brazilian legal Amazon plants against *Aedes aegypti* L.(Diptera: Culicidae). **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2015.

DOS SANTOS, M. C.; TEODORO, A. V.; MENEZES, M. S.; PINTO-ZEVALLOS, D. M.; DE FÁTIMA ARRIGONI-BLANK, M.; OLIVEIRA, E. M. C.; BLANK, A. F. Bioactivity of essential oil from *Lippia gracilis* Schauer against two major coconut pest mites and toxicity to a non-target predator. **Crop Protection**, v. 125, p. 104913, 2019.

FERRAZ, R. P.; BOMFIM, D. S.; CARVALHO, N. C.; SOARES, M. B.; DA SILVA, T. B.; MACHADO, W. J.; BEZERRA, D. P. Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, v. 20, n. 7, p. 615-621, 2013.

FERNANDES, L. C. B.; ALBUQUERQUE, C. C. D.; SALES JÚNIOR, R.; OLIVEIRA, F. F. M.; GURGEL, E. P.; MESQUITA, M. V. D.; SILVA, M. D. S. D. Fungitoxicity of plant

extracts and essential oil of *Lippia gracilis* Schauer on the fungus *Monosporascus cannonballus* Pollack and Uecker. **Summa Phytopathologica**, v. 41, n. 2, p. 153-155, 2015.

Flora do Brasil 2020. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: < <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/> >. Acesso em: 10 out. 2021.

FONTELES, M. C.; GADELHA, M. G. T.; SOUZA, N. R.; ALENCAR, V. H. M.; MATOS, F. J. A. Algumas propriedades farmacológicas de hidrolatos de plantas do nordeste brasileiro. **Acta Amazonica**, v. 18, p. 123-127, 1988.

FONTES, M. G.; COSTA-CARVALHO, R. R.; COELHO, I. L.; ARAÚJO, E. R.; FILHO, J. C.; LARANJEIRA, D.; ALVES, P. B. Effect of essential oils from plants of the genus *Lippia* on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. **In III International Symposium on Medicinal and Nutraceutical Plants and III Conference of National Institute of Science and 1198**, p. 35-40, 2012.

FRANCO, C. D. S.; RIBEIRO, A. F.; CARVALHO, N. C.; MONTEIRO, O. S.; DA SILVA, J. K. R.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. Composition and antioxidant and antifungal activities of the essential oil from *Lippia gracilis* Schauer. **African Journal of Biotechnology**, v. 13, n. 30, 2014.

GALVÃO, J. G.; CERPE, P.; SANTOS, D. A.; GONSALVES, J. K.; SANTOS, A. J.; NUNES, R. K.; NUNES, R. S. *Lippia gracilis* essential oil in β -cyclodextrin inclusion complexes: an environmentally safe formulation to control *Aedes aegypti* larvae. **Pest Management Science**, v. 75, n.2, p. 452-459, 2019.

GOMES, S. V.; SANTOS, A. D.; MORAES, V. R.; MARTINS, L. R.; VIANA, M. D.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B. Differentiation of *Lippia gracilis* Schauer genotypes by LC fingerprint and chemometrics analyses. **Chromatographia**, v. 72, n. 3, p. 275-280, 2010.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**, v. 36, n. 1, p. 64-77, 2011.

GOUVEIA, D. N.; PINA, L. T.; RABELO, T. K.; DA ROCHA SANTOS, W. B.; QUINTANS, J. S. S.; GUIMARAES, A. G. Monoterpenes as perspective to chronic pain management: A systematic review. **Current Drug Targets**, v. 19, n. 8, p. 960-972, 2018.

GUERRA, Y. L.; ARAÚJO, E. R.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; COSTA-CARVALHO, R. R.; LARANJEIRA, D. Fungi toxicity of essential oils in controlling *Sclerotium rolfsii*. **In III International Symposium on Medicinal and Nutraceutical Plants and III Conference of National Institute of Science and 1198**, p. 47-52, 2018.

GUILHON, C. C.; RAYMUNDO, L. J.; ALVIANO, D. S.; BLANK, A. F.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; MATHEUS, M. E.; FERNANDES, P. D. Characterisation of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *Lippia gracilis* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 406-413, 2011.

GUIMARAES, A. G.; GOMES, S. V.; MORAES, V. R.; NOGUEIRA, P. C.; FERREIRA, A. G.; BLANK, A. F.; JÚNIOR, L. J. Q. Phytochemical characterization and antinociceptive effect of *Lippia gracilis* Schauer. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n. 3, p. 428-434, 2012.

HE, R.; LI, Y.; OU, S.; GAO, M.; ZHANG, Y.; SONG, S.; LIU, H. Regulation of Growth and Main Health-Promoting Compounds of Chinese Kale Baby-Leaf by UV-A and FR Light. **Frontiers in Plant Science**, v. 12, p. 799376-799376, 2021.

HSIE, B. S. D.; BUENO, A. I. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE CARVALHO, A. A.; DA CUNHA, S. H. B.; MARTINS, E. R.; PINTO, J. E. B. P. Study of the influence of wavelengths and intensities of LEDs on the growth, photosynthetic pigment, and volatile compounds production of *Lippia rotundifolia* Cham *in vitro*. **J. Photochem. Photobiol.** v. 198, p. 111577, 2019.

KOLTON, A.; DLUGOSZ-GROCHOWSKA, O.; WOJCIECHOWSKA, R.; CZAJA, M. Biosynthesis regulation of folates and phenols in plants. **Scientia Horticulturae**, v. 291, p. 110561, 2022.

KSOURI, R.; MEGDICHE, W.; FALLEH, H.; TRABELSI, N.; BOULAABA, M.; SMAOUI, A.; ABDELLY, C. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, n. 11, p. 865-873, 2008.

KU, S. K.; KWAK, S.; BAE, J. S. Orientin inhibits high glucose-induced vascular inflammation in vitro and in vivo. **Inflammation**, v. 37, n. 6, p. 2164-2173, 2014.

LAM, K. Y.; LING, A. P. K.; KOH, R. Y.; WONG, Y. P.; SAY, Y. H. A review on medicinal properties of orientin. **Advances in Pharmacological Sciences**, 2016.

LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE CARVALHO, A. A.; SANTIAGO, A. C.; PACHECO, F. V.; YUCESAN, B.; PINTO, J. E. B. P. Explant type and natural ventilation systems influence growth and content of carvacrol and thymol of *Lippia gracilis* Schauer. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 137, n. 1, p. 33-43, 2019.

LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE CARVALHO, A. A.; SANTIAGO, A. C.; PACHECO, F. V.; CÉLIO, M. M. F.; PINTO, J. E. B. P. Growth regulators affect the dry weight production, carvacrol and thymol content of *Lippia gracilis* Schauer. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 35-44, 2019.

LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PACHECO, F. V.; DOS SANTOS, J.; SILVA, S. T.; DE CARVALHO, A. A.; PINTO, J. E. B. P. Quality and intensity of light affect *Lippia gracilis* Schauer plant growth and volatile compounds in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 135, n. 3, p. 367-379, 2018.

LEE, W.; KU, S. K.; BAE, J. S. Vascular barrier protective effects of orientin and isoorientin in LPS-induced inflammation in vitro and in vivo. **Vascular Pharmacology**, v. 62, n.1, p. 3-14, 2014.

LIMA, J. K.; ALBUQUERQUE, E. L.; SANTOS, A. C. C.; OLIVEIRA, A. P.; ARAÚJO, A. P. A.; BLANK, A. F.; BACCI, L. Biototoxicity of some plant essential oils against the termite *Nasutitermes corniger* (Isoptera: Termitidae). **Industrial Crops and Products**, v. 47, p. 246-251, 2013.

LIMA, M. D. L.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; SANTIAGO, G. M. P.; MATOS, F. J. A.; SANT'ANA, A. E. G. Composition and biological activities of *Lippia* aff. *gracilis* essential oil. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 44, n. 2, p. 254-256, 2008.

LIU, Y.; LAN, N.; REN, J.; WU, Y.; WANG, S.T.; HUANG, X.F.; YU, Y. Orientin improves depression like behaviour and BDNF in chronic stressed mice. **Mol. Nutr. Food Res.**, v. 59, p. 1130–1142, 2015.

LORENZI HAND MATOS, F. J. A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. São Paulo, **Instituto Plantarum**, 2002.

MAMUN-OR-RASHID, A. N. M.; AZAM, M. M.; DASH, B. K.; HAFIZ, F. B.; SEN, M. K. Ethnomedicobotanical study on *Ocimum sanctum* L.(Tulsi)—a review. Mintage. **J. Pharm. Med. Sci**, v. 2, n. 2, p. 37-42, 2013.

MARINHO, M. J. M.; ALBUQUERQUE, C. C.; MORAIS, M. B.; SOUZA, M. C. G.; SILVA, K. M. B. Establishment of protocol for *Lippia gracilis* Schauer micropropagation. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 246-252, 2011.

MATOS, F. J. D. A. *et al.* Medicinal plants of Northeast Brazil containing thymol and carvacrol - *Lippia sidoides* Cham. and *L. gracilis* H.B.K. (Verbenaceae). **J. Essent. Oil Res.**, v. 11, n. 6, p. 666-668, 1999.

MELO, C. R.; PICANCO, M. C.; SANTOS, A. A.; SANTOS, I. B.; PIMENTEL, M. F.; SANTOS, A. C.; BACCI, L. Toxicity of essential oils of *Lippia gracilis* chemotypes and their major compounds on *Diaphania hyalinata* and non-target species. **Crop Protection**, v. 104, p. 47-51, 2018.

MELO, J. O. D.; SALTORATTO, A. L. F.; RIZO, W. F.; JESUS, H. C. R. D.; ARRIGONI-BLANK, M. D. F.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F. Cytotoxic effects of essential oils from three *Lippia gracilis* Schauer genotypes on HeLa, B16, and MCF-7 cells and normal human fibroblasts, 2014.

MENDES, S. S.; BOMFIM, R. R.; JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B.; BLANK, A. F.; ESTEVAM, C. S.; THOMAZZI, S. M. Evaluation of the analgesic and anti-inflammatory effects of the essential oil of *Lippia gracilis* leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 3, p. 391-397, 2010.

MORAES, V. R.; THOMASI, S. S.; SPRENGER, R. F.; PRADO, V. M.; CRUZ, E. M.; CASS, Q. B.; BLANK, A. F. Secondary metabolites from an infusion of *Lippia gracilis* Schauer using the LC-DAD-SPE/NMR hyphenation technique. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 1335-1340, 2017.

NETO, R. M.; MATOS, F. J.; ANDRADE, V. S.; MELO, M. C. M.; CARVALHO, C. B.; GUIMARÃES, S. B.; VASCONCELOS, P. R. The essential oil from *Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae, in diabetic rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, n. 2, p. 261-266, 2010.

NEVES, I. A.; DE OLIVEIRA, J. C. S.; DA CAMARA, C. A. G. Chemical composition of the leaf oils of *Lippia gracilis* schauer from two localities of pernambuco. **Journal of Essential Oil Research**, v. 20, n. 2, p. 157-160, 2008.

OLIVEIRA, A. C. *et al.* Essential oils activity from plants of the Brazilian Caatinga on the vegetable leafminer. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 50, 2020.

OLIVEIRA, A. C. L. *et al.* Seedling production of two "alecrim-de-tabuleiro" (*Lippia gracilis* Schauer) genotypes under mineral fertilizer, limestone, substrates and containers. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 1, p. 35-42, 2011.

OLIVEIRA, F. F. M. *et al.* Ecophysiological response of *Lippia gracilis* (Verbanaceae) to duration of salt stress. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 178, p. 202-210, 2019.

OREN-SHAMIR, M.; GUSSAKOVSKY, E.; ELIEZER, S.; NISSIM-LEVI, A. D. A.; KIRA, R.; RINAT, O. Colored shade nets can improve the yield and quality of green decorative branches of *Pittosporum variegatum*. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, v. 76, p. 353-361, 2001.

PALHARES NETO, L. P.; DE SOUZA, L. M.; DE MORAIS, M. B.; DE ALBUQUERQUE, C. C.; CAMARA, T. R.; ULISSES, C. Controlling hyperhydricity in micropropagated plants of *Lippia grata* Schauer (Verbenaceae), a native species of a dry seasonal tropical forest with pharmacological potential. **Brazilian Journal of Botany**, v. 41, n. 3, p. 529-538, 2018.

PALHARES NETO, L.; DE SOUZA, L. M.; DE MORAIS, M. B.; ARRUDA, E.; DE FIGUEIREDO, R. C. B. Q.; DE ALBUQUERQUE, C. C.; ULISSES, C. Morphophysiological and Biochemical Responses of *Lippia grata* Schauer (Verbenaceae) to Water Deficit. **Journal of Plant Growth Regulation**, v. 39, n. 1, 2020.

PANNU, A.; SHARMA, P. C.; THAKUR, V. K.; GOYAL, R. K. Emerging Role of Flavonoids as the Treatment of Depression. **Biomolecules**, v. 11, n. 12, p. 1825, 2021.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ M. D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **J. Ethnopharmacol**, v. 76, n. 3, p. 201-14, 2001.

PEREIRA, A. C. R. L. *et al.* Insecticide activity of essential and fixed oils in *Callosobruchus maculatus* (FABR., 1775) (Coleoptera: Bruchidae) in cowpea grains [*Vigna unguiculata* (L.) WALP.]. **Cienc. Agrotecnol.**, v. 32, n. 3, p. 717-724, 2008.

PINTO, J. E. B. P.; FERRAZ, E. O.; BERTOLUCCI, S. K. V.; SILVEIRA, H. R. O.; SANTOS, A. R.; SILVA, M. S. Produção de biomassa e óleo essencial em mil folhas cultivada sob telas coloridas. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 321-326, 2014.

PIMENTA, M. R.; FERNANDES, L. S.; PEREIRA, U. J.; GARCIA, L. S.; LEAL, S. R.; LEITÃO, S. G.; SALIMENA, F. R. G.; VICCINI, L. F.; PEIXOTO P. H. P. Floração, germinação e estaquia em espécies de *Lippia* L. (Verbenaceae). **Braz J Bot**, v. 30, p. 211-220, 2007.

RAGAGNIN, R. C. G.; ALBUQUERQUE, C. C.; OLIVEIRA, F. F. M.; SANTOS, R. G.; GURGEL, E. P.; DINIZ, J. C.; VIANA, F. A. Effect of salt stress on the growth of *Lippia gracilis* Schauer and on the quality of its essential oil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 28, p. 346-351, 2014.

RIBEIRO, S. S. *et al.* Evaluation of the cytotoxic activity of some Brazilian medicinal plants. **Planta Med**, v. 78, n. 14, p. 1601-6, 2012.

RIELLA, K. R. *et al.* Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 656-663, 2012.

SANTIAGO, G. M. P. *et al.* Larvicidal activity against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae) of essential oils of *Lippia* species from Brazil. **Nat. Prod. Commun.**, v. 1, n. 7, p. 573-576, 2006.

SANTOS, C. P. *et al.* Genetic diversity of *Lippia sidoides* Cham. and *L. gracilis* schauer germplasm. **Genetics and Molecular Research**. v. 15, n. 3, 2016.

SANTOS, C. P. D. *et al.* Harvest time and geographical origin affect the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer. **Ind. Crops Prod.**, v. 79, p. 205-210, 2016.

SANTOS, I. G. A. *et al.* Amebicidal activity of the essential oils of *Lippia* spp. (Verbenaceae) against *Acanthamoeba polyphaga* trophozoites. **Parasitology Research**, v. 115, n. 2, p. 535-540, 2016.

SANTOS, M. M.; PEIXOTO, A. R.; PESSOA, E. D. S.; NEPA, H. B. D. S.; PAZ, C. D. D.; SOUZA, A. V. V. D. Estudos dos constituintes químicos e atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis* a *Xanthomonas campestris* pv. *viticola* "in vitro". **Summa Phytopathologica**, v. 40, p. 277-280, 2014.

SANTOS, R. G. *et al.* Tipo de estaca e substrato na propagação vegetativa de *Lippia gracilis* Schauer. **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 83, 2016.

SILVA, V. M. *et al.* Effect of essential oils from *Lippia sidoides* and *Lippia gracilis* on growth inhibition of *Rhizoctonia solani*. **Acta Horticulturae. NARAIN, N.: International Society for Horticultural Science**, 1198, p. 31-34, 2018.

SILVA, W. J. *et al.* Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmentally safe insecticides. **Bioresour. Technol.**, v. 99, n. 8, p. 3251-3255, 2008.

SIQUEIRA-LIMA, P. S. *et al.* Central nervous system and analgesic profiles of *Lippia* genus. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 29, n. 1, p. 125-135, 2019.

SIQUEIRA-LIMA, P. S. *et al.* Involvement of the PKA pathway and inhibition of voltage gated Ca²⁺channels in antihyperalgesic activity of *Lippia grata*/beta-cyclodextrin. **Life Sciences**, v. 239, 2019.

SIQUEIRA-LIMA, P. S. *et al.* β -Cyclodextrin Complex Containing *Lippia grata* Leaf Essential Oil Reduces Orofacial Nociception in Mice - Evidence of Possible Involvement of Descending Inhibitory Pain Modulation Pathway. **Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.**, v. 114, n. 2, p. 188-196, 2014.

SOARES, L. E. S. *et al.* Chromosome number of *Lippia gracilis* Schauer (verbenaceae) from Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista Caatinga**, v. 24, n. 3, p. 221-224, 2011.

SOUZA, G. S.; PINTO, J. E. B. P.; RESENDE, M. G.; BERTOLUCCI, S. K. V.; SOARES, Â. M.; CASTRO, E. M. Crescimento, teor de óleo essencial e conteúdo de cumarina de plantas jovens de gauco (*Mikania glomerata* Sprengel) cultivadas sob malhas coloridas. **Biotemas**, v. 24, n. 3, p. 1-11, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. **Artmed Editora**, Porto Alegre, 2017.

TREVISAN, M. T. S. *et al.* Composition of essential oils and ethanol extracts of the leaves of *Lippia* species: identification, quantitation and antioxidant capacity. **Rec. Nat. Prod.**, v. 10, n. 4, p. 485-496, 2016.

OLIVEIRA, V. C.; SANTOS, A. R.; SOUZA, G. S.; LIMA, G. R.; ALVES, P. B.; SANTOS, H. V. Metabólitos secundários e características anatômicas de folhas de orégano (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) cultivado sob malhas coloridas. **Revista de Ciências Agrárias**, v. 39, n. 1, p. 170-177, 2016.

ZHANG, S.; ZHANG, L.; ZOU, H.; QIU, L.; ZHENG, Y.; YANG, D.; WANG, Y. Effects of Light on Secondary Metabolite Biosynthesis in Medicinal Plants. **Frontiers in plant science**, v. 12, p. 781236-781236, 2021.

ARTIGO

MALHAS FOTOCONVERSoras AFETAM O CRESCIMENTO VEGETATIVO, OS PROCESSOS OXIDATIVOS E AS COMPOSIÇÕES QUÍMICAS VOLÁTIL E FENÓLICA DE *Lippia gracilis* Schauer.

1 INTRODUÇÃO

O gênero *Lippia* é composto de espécies economicamente importantes, principalmente pela ampla utilização de seus óleos essenciais e suas propriedades medicinais (PASCUAL *et al.*, 2001). O gênero pertence à família Verbenaceae, compreendendo cerca de 250 espécies herbáceas, arbustos e pequenas árvores (SOARES *et al.*, 2011; MORAES *et al.*, 2017).

Dentre as espécies medicinais do gênero *Lippia*, tem-se *Lippia gracilis* Schauer, conhecida popularmente como alecrim-de-tabuleiro, uma planta arbustiva aromática que atinge até 2 m de altura, endêmica do Nordeste brasileiro, reconhecida como planta medicinal. Utilizada como antimicrobiano, anti-séptico, doenças de pele, lesões externas, queimaduras, feridas e úlceras, além de seu uso analgésico e anti-inflamatório no tratamento de resfriados, tosse, sinusite, rinite, congestão nasal, dor de cabeça e icterícia (PASCUAL *et al.* 2001; RIELLA *et al.*, 2012; DE MELO *et al.*, 2019).

As atividades biológicas de *L. gracilis* são atribuídas principalmente à presença de óleo essencial, rico nos monoterpenos carvacrol e timol, e aos compostos fenólicos de outras classes como quinonas e flavonoides, encontrados principalmente os derivados de flavanona e as flavonas glicosiladas como orientina, isoorientina, luteolina 4'-O-glicosídeo, naringenina e tricetina, provenientes das folhas (GUIMARÃES *et al.* 2012; TREVISAN *et al.*, 2016; MORAES *et al.* 2017).

A luminosidade é um fator preponderante no controle do crescimento, desenvolvimento e metabolismo das plantas, os quais são afetados por sua intensidade, direção, duração e qualidade (KSOURI *et al.*, 2008). Com a absorção de fótons no processo fotossintético, a planta desempenha várias funções vitais, já que os fótons são utilizados em reações químicas da fotossíntese, portanto gerando energia para as etapas fisiológicas ligadas ao crescimento e desenvolvimento do vegetal (TAIZ *et al.*, 2017).

Novas tecnologias têm sido incorporadas aos sistemas de manejo de plantas, como é o caso das malhas fotoconversoras, estas inicialmente utilizadas apenas como proteção, tornaram-se uma técnica para filtrar e modular a luminosidade, alterando a quantidade e qualidade da radiação solar transmitida, ou seja, modificando a faixa espectral que chega até a

planta. Com a alteração da faixa espectral absorvida, a planta irá apresentar diferentes respostas morfofisiológicas essencialmente na produção de princípios ativos (PINTO *et al.*, 2014; ALVARENGA *et al.*, 2015).

Estudos têm relatado diferentes respostas de crescimento e biossíntese de metabólitos secundários em plantas medicinais quando cultivados sob malhas coloridas, ou seja, modificação espectral de absorção de luz. A exemplo, o cultivo de *Myrsine africana*, que melhorou efetivamente o metabolismo primário, com aumento do crescimento da planta e a bioatividade no cultivo sob malha vermelha (COLES *et al.*, 2021). O efeito das malhas coloridas estimulou a melhor produção de pigmentos fotossintéticos em *Piper hispidinervum* (LIMA *et al.*, 2017), enquanto BRANT *et al.*, (2009) verificaram o aumento no crescimento vegetativo e o maior teor de citral no óleo essencial de *Melissa officinalis*.

No cultivo *in vitro*, o efeito da qualidade de luz no crescimento e nos pigmentos fotossintéticos também foram verificados em *Achillea millefolium* L., com o espectro azul proporcionando o maior acúmulo de matéria seca, número de raízes, porcentagem de enraizamento e sobrevivência (ALVARENGA *et al.*, 2015). Em *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. o vermelho monocromático proporcionou maior comprimento do caule e maior peso seco nas plântulas derivadas dos segmentos apicais (SILVA *et al.*, 2017). Em *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. os diferentes espectros de luz afetaram o crescimento das plântulas e as características morfológicas (ANDRADE *et al.*, 2017). A espécie *Lippia rotundifolia* Cham. foi estimulada quanto ao crescimento das plântulas com a combinação dos espectros vermelho e azul, obtendo os melhores dados biométricos e teor de clorofila total (HSIE *et al.*, 2019).

Estudos de cultivo *in vitro* realizados por LAZZARINI *et al.*, (2018) demonstraram que o crescimento e a composição volátil de *L. gracilis* é sensível a variações na intensidade e no comprimento de luz fornecido para plântulas. Contudo, o objetivo deste trabalho é avaliar o efeito de malhas fotoconversoras no crescimento vegetativo, estresse oxidativo e na composição química volátil e fenólica de *Lippia gracilis* Schauer cultivados em vasos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e cultivo da espécie

O material vegetal foi herborizado e incorporado ao acervo do Herbário PAMG (Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais - EPAMIG, Belo Horizonte, Minas Gerais) sob o registro 57859.

Para obtenção das mudas de *Lippia gracilis*, utilizaram-se plantas micropropagadas, que aos 40 dias foram removidas dos frascos de cultura, lavadas em água corrente, transferidas para tubetes contendo o substrato comercial Tropstrato HA™ e mantidas em uma estufa com irrigação automatizada. As mudas foram transplantadas quando atingiram um tamanho mínimo de 10 cm (45 dias de idade) para vasos de 10 dm³. O substrato utilizado foi uma mistura de solo e areia grossa na proporção de 2:1, respectivamente. O solo utilizado no substrato foi coletado da camada de 0 a 20 cm de profundidade de um Latossolo vermelho-amarelo distrófico (EMBRAPA, 1997) no município de Lavras, Minas Gerais, Brasil. As características químicas do substrato foram as seguintes: índice de saturação de bases (V%) = 21,35; matéria orgânica (dag.kg⁻¹) = 1,03; pH em água = 5,4; P-Rem (mg/L) = 15,22; K (mg/dm³) = 25,89; Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺, H+Al (cmolc/ dm³) = 0,68; 0,05; 0,07; 2,93; Zn, Fe, Mn, Cu, B e S (mg/dm³) = 0,46; 43,3; 15,34; 1,38; 0,02; 1,6, respectivamente.

O experimento foi conduzido em uma área de pleno sol no campo experimental do Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), situada nas coordenadas geográficas 21° 14' S e 45° 00 W, a 918 m de altitude (Figura 1). O experimento foi conduzido em delineamento inteiramente casualizado (DIC), totalizando quatro tratamentos de cultivo de *L. gracilis*: pleno sol (testemunha), sob malha preta (50%), malha chromatinet® vermelha (50%) e malha chromatinet® azul (50%), com cinco repetições e cinco plantas por repetição, totalizando 25 plantas. As telas coloridas foram esticadas em uma estrutura de madeira de 3 x 3 x 2 m de comprimento, largura e altura, respectivamente. As malhas fotoconversoras utilizadas foram fornecidas pela empresa Polysack Plastic Industrial®. A intensidade da radiação foi mensurada por meio de um quantômetro-fotômetro-radiômetro LI-COR, modelo LI-185, equipado com um sensor quântico, sendo a radiação solar expressa em $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. No tratamento a pleno sol, foi observada a intensidade de $1.500 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, correspondendo a 100% da radiação incidente; sob malha preta, foi detectada a intensidade de $660 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (44%), enquanto que sob malha vermelha e sob

malha azul, foram detectados $690 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (46%) e $550 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ (36%), respectivamente.

As avaliações foram feitas após 90 dias do transplântio das mudas. As plantas de *L. gracilis* foram colhidas, separadas em raiz, caule e folha. As partes vegetativas foram individualmente desidratadas em estufa com ventilação forçada a 40°C até peso constante. O peso do material vegetal seco foi mensurado e determinada a matéria seca de raiz (MSR), caule (MSC), folha (MSF) e total (MST) da planta, em g.planta^{-1} . Medidas nos parâmetros de crescimento em relação ao comprimento da planta (CP) e R:PA (razão raiz:parte aérea) também foram mensuradas. Todas as medidas foram realizadas em cinco repetições.

Além dos parâmetros de crescimento, foram realizados doseamentos de clorofila *a*, clorofila *b*, total, carotenoides, teor, rendimento e composição química do óleo essencial, avaliação do estresse oxidativo e da composição química fenólica de *Lippia gracilis* Schauer cultivados em vasos.



Figura 1 - Cultivo da espécie *Lippia gracilis* sob A) pleno sol; B) malha azul; C) malha preta e D) malha vermelha.

2.2 Análise de pigmentos fotossintetizantes

A extração e doseamento de pigmentos fotossintéticos seguiram o método desenvolvido por Hiscox e Israelstam (1979) com adaptações propostas por BARNES *et al.* (1992). Em resumo, folhas frescas (50 mg) foram pesadas diretamente em tubos de Falcon cobertos com papel alumínio, adicionados 10 mL de dimetilsulfóxido (DMSO) saturado com carbonato de cálcio (CaCO_3) e incubados em estufa a 65°C por 48 h. As amostras foram

preparadas em quadruplicata. A saturação do DMSO seguiu o protocolo de SANTOS *et al.* (2008) com modificações. Para isto, o DMSO foi saturado com carbonato de cálcio (CaCO_3) na proporção de 5 g.L^{-1} de DMSO, sob agitação constante por quatro horas, e então filtrado duas vezes à vácuo em papel de filtro duplo. Posteriormente, a solução foi centrifugada a 6000 rpm por 10 min.

Em seguida, três alíquotas de 3 mL de cada réplica foram transferidas para uma cubeta de quartzo, e os valores de densidade óptica em 480, 649 e 665 nm foram lidos em espectrofotômetro TECAN INFINITY M200 PRO, operado com o sistema de processamento de dados I-Control[®] (versão 3.37), contra DMSO saturado em branco. O valor de densidade óptica específica de cada amostra foi calculado pela média das leituras das três alíquotas.

Os comprimentos de onda e as equações utilizadas para os cálculos foram baseados na metodologia de Wellburn (1994), sendo:

$$\text{Clorofila } a_{649} = (12,47 \times A_{665}) - (3,62 \times A_{649});$$

$$\text{Clorofila } b_{665} = (25,06 \times A_{649}) - (6,5 \times A_{665});$$

$$\text{Carotenoides}_{480} = (1000 \times A_{480} - 1,29 \times C_a - 53,78 \times C_b)/220.$$

A clorofila total ($a + b$) foi calculada pelo somatório dos resultados encontrados das equações para clorofila a e b , sendo todos os resultados expressos em mg.g^{-1} matéria fresca.

2.3 Análises químicas de constituintes voláteis

2.3.1 Extração do óleo essencial

Folhas de *Lippia gracilis* foram secas em estufa de circulação de ar à temperatura de $40 \text{ }^\circ\text{C}$ até manter peso constante. Após período de secagem, foram armazenadas até o momento da extração dos óleos essenciais. Foi utilizada a técnica de hidrodestilação em aparelho clevenger, utilizando balão de 2 L. Para cada tratamento (pleno sol, malha azul, preta e vermelha), foram realizadas quatro (4) repetições, totalizando dezesseis (16) extrações. Em todas as extrações foi utilizada uma massa de 30 g de folhas secas. O tempo de duração para destilar os óleos essenciais foi de 90 min, sendo após este tempo, utilizado diclorometano para lavagem do aparelho de Clevenger. Posteriormente foi feita a separação em funil de decantação da fase orgânica e fase aquosa e depois o solvente foi evaporado em capela de exaustão de gases.

2.3.2 Teor, rendimento e composição química do óleo essencial

O teor de óleo essencial (%) foi dado pela média da massa do óleo (mg) em 100 mg de massa seca das folhas das quatro repetições. O rendimento de óleo (g.planta^{-1}) foi determinado multiplicando-se o teor de óleo essencial e a massa de óleo produzido por planta. Análise do óleo essencial foi realizada por cromatografia gasosa (CG) em sistema Agilent 5890A, acoplado a detector de ionização em chamas (FID), empregando coluna HP-5MS (30 cm de comprimento x 250 μm de diâmetro interno x 0,25 μm de espessura). O óleo essencial foi diluído em acetato de etila (1%, v/v) e 1,0 μL foi injetado no modo *split* a uma razão de 50:1. Utilizou-se o hélio como gás de arraste com fluxo de 1,2 mL min^{-1} . As temperaturas do injetor e do detector foram 250 e 240 $^{\circ}\text{C}$, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de 60 $^{\circ}\text{C}$, seguida por uma rampa de temperatura de 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 240 $^{\circ}\text{C}$. Posteriormente, por uma rampa de temperatura de 10 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$ até 280 $^{\circ}\text{C}$. Os índices de retenção relativos a uma serie de *n*-alcanos C8 a C20 foram calculados de acordo com Van der Dool e Kratz (1963) para os picos correspondentes e comparados a índices de retenção da literatura (DAVIES, 1990; ADAMS, 2017).

2.3.3 Doseamento e produtividade agrícola de carvacrol

Para identificação da presença de carvacrol, uma amostra autêntica (Sigma-Aldrich[®], pureza declarada $\geq 98\%$) foi analisada nas mesmas condições obtidas para o óleo essencial. Para a identificação inequívoca da identidade do pico supostamente correspondente ao carvacrol, o óleo essencial foi analisado em cromatógrafo gasoso Agilent[®] 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent[®] MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. As condições operacionais foram as mesmas empregadas nas análises por CG. A identidade do pico do carvacrol nas amostras foi confirmada por comparação com os espectros de massas do banco de dados da biblioteca da National Institute of Standards and Technology (NIST, 2008).

Para as análises quantitativas de carvacrol, empregou-se o método do padrão externo (AOAC, 2013). A faixa de linearidade (2,0 a 12,0 μg) foi estimada na área conhecida de uma solução de referência de carvacrol e a área correspondente ao pico do carvacrol nas amostras. A linearidade foi determinada através da injeção de diferentes volumes de uma solução de referência. As curvas de calibração foram determinadas em relação à massa injetada de

carvacrol, em dois dias consecutivos. Os dados obtidos para cada curva analítica de carvacrol foram submetidos à análise de regressão linear pelo método dos mínimos quadrados e os coeficientes de determinação (R^2) foram calculados. As curvas obtidas nos dois dias consecutivos foram comparadas estatisticamente por análise de covariância ($p < 0,05$). A partir da curva analítica média, determinaram-se o conteúdo (mg.g^{-1} de óleo essencial), o teor (mg.100 g^{-1} de folha seca) e o rendimento (mg.planta^{-1}) de carvacrol. O rendimento foi determinado multiplicando-se a produção de carvacrol e a massa de óleo produzido por planta.

2.4 Análises químicas de constituintes fenólicos

2.4.1 Extração e isolamento de flavonoides

Folhas secas de *L. gracilis* (83,3 g) foram submetidas à pulverização com nitrogênio líquido em almofariz para preparação do extrato bruto etanólico. O material pulverizado foi submetido à extração por sonicação com etanol absoluto (3 x 500 mL) (relação planta : solvente = 1 : 6), à temperatura ambiente, por 24 min em cada ciclo. Após a evaporação dos solventes em evaporador rotatório, foi obtido então o extrato bruto A2-136-01 (5,1 g), rendimento de 6,12 %. Parte do extrato A2-136-01 (2,90 g) foi submetido à filtração em coluna cromatográfica tipo *flash* (CCF), utilizando sílica-gel 60 (40-60 μm , Agela) em uma coluna com 2,5 cm de diâmetro, volume de sílica preenchendo 15 cm de altura, utilizando os solventes hexano, AcOEt, MeOH e H_2O , puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. Foi coletado desta coluna um total de 20 frações, todas monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD) em cromatofolhas de alumínio recobertas de sílica-gel com indicador de fluorescência UV 254 nm (Merck®). As frações obtidas em AcOEt:MeOH (7:3) obtiveram uma massa de 488,3 mg (A2-160-01). Parte desta fração (306,7 mg) foi submetida à CLAE preparativo, eluída com gradiente de fase móvel binária composta por: (A): ácido acético a 0,1% em H_2O e (B): MeOH. O sistema de eluição iniciou com 30% B a 60% B, 0-30 minutos, fluxo de 12 mL/min, volume de injeção de 500 μL , amostras injetadas a 55,8 mg/mL, fornecendo 3 frações. A terceira fração (A3-11-03) forneceu a isoorientina (27,9 mg), com 86 % de pureza determinada por CLAE analítico. As duas primeiras frações A3-11-01 (55,8 mg) e A3-11-02 (19,6 mg) foram reunidas e submetidas novamente à CLAE preparativo nas mesmas condições acima, fornecendo a orientina (5,0 mg, 91 % de pureza determinada por CLAE analítico - Anexo 3). As duas

substâncias foram submetidas à análise de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C em equipamento Bruker 300Mhz; UV/Vis em equipamento Thermo Scientific modelo Genesys 105; espectrometria de massas em um espectrômetro micrOTOF-II (Bruker Daltonics, Massachusetts, EUA); infravermelho em espectrômetro Agilent® Cary 630 FTIR ATR ZnSe; CLAE analítico em cromatógrafo Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany, Serie Agilent 1260 Infinity DAD e CLAE preparativo em cromatógrafo Shimadzu, DAD SPD-M20A.

2.4.1.1 Quantificação de orientina e isoorientina nos extratos

Utilizou-se apenas a substância orientina (91% de pureza - perfil cromatográfico e a pureza de pico da substância pode ser visto no Anexo 3) para o teste de linearidade. A orientina foi quantificada de forma direta e a isoorientina de maneira indireta, com base em equivalente de orientina, já que se trata de substâncias isômeras conformacionais. As curvas analíticas foram feitas utilizando diferentes concentrações, baseadas nos dados obtidos dos extratos de *Lippia gracilis* e dados da literatura (MORAES *et al.*, 2017) e as análises feitas em dois dias consecutivos, posteriormente avaliadas pelo teste de regressão linear e os dados qualitativos comparados de teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). As concentrações para a construção das curvas com a substância orientina foram a partir de soluções estoques de 0,5 mg/mL e 0,125 mg/mL. Quanto aos teores de orientina e isoorientina nos extratos, foram calculados usando um fator de resposta, conforme SNYDER *et al.* (1997). Com base nas áreas dos picos da orientina e isoorientina nos extratos e utilizando a equação média das curvas analíticas de regressão da orientina, foram então calculados os teores percentuais destas duas substâncias nos extratos.

Para o preparo dos extratos, pesou-se 1,0 g de folhas secas pulverizadas de cada tratamento e submeteu-se à sonicação com etanol absoluto (2 x 30 mL), à temperatura ambiente, por 20 min. em cada ciclo. Filtraram-se os extratos sob vácuo em papel de filtro e foram reunidos em balão volumétrico de 100 mL, completando-se o volume com etanol. Homogeneizou-se a solução e transferiu-se uma alíquota de 10 mL para um balão de evaporador rotatório (previamente pesado), sendo concentrada até resíduo, sob pressão reduzida, à temperatura máxima de 50 °C. O percentual de rendimento extrativo foi calculado. Estes extratos foram utilizados para a quantificação das flavonas, fenólicos totais, flavonoides totais, DPPH e poder redutor.

As amostras dos extratos para as análises de quantificação em CLAE das flavonas foram preparadas na concentração de 4,0 mg/mL, solubilizadas em metanol e utilizando balão volumétrico de 1 mL. Todas as amostras dos extratos para CLAE foram pesadas em triplicata e submetidas à solubilização em banho de ultrassom por 15 min, seguido de centrifugação a 8.400 g por 10 min. e transferidas para *vials*. Em cada extrato de cada tratamento foram feitas análises em CLAE analítico em três repetições. Todas as massas foram pesadas em uma balança analítica de seis casas decimais. Posteriormente, os dados foram analisados estatisticamente e comparados pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

2.4.2 Avaliação do estresse oxidativo não enzimático

Seguindo a metodologia descrita por SINGH e colaboradores (2002) e BLOIS (1958), foi avaliado o teste de captura de radical DPPH (α -difenil- β -picrilhidrazila). Alíquotas de 100 μ L de amostra dos extratos das folhas secas a 200, 300 e 400 ppm, solubilizadas em metanol foram colocadas em tubos de ensaio. Como padrão utilizou-se 100 μ L de solução alcoólica de ácido gálico a 100 ppm. Solução metanólica de DPPH 0,1 mM (5 mL) foi adicionada aos tubos que, em seguida, foram agitados vigorosamente. Os tubos foram deixados em repouso a 27 °C por 20 minutos. Um tubo controle contendo a mistura acima, sem o extrato, foi usado como branco e o metanol usado como corretor da linha de base. As absorvâncias foram medidas a 517 nm. Todos os testes foram realizados em triplicata e a atividade de captura de radical (ACR) expressa como a porcentagem de inibição e calculada usando a fórmula:

$$\% \text{ ACR} = [(\text{Abs. controle} - \text{Abs. Amostra})/\text{Abs. Controle}] \times 100$$

Onde **Abs.** = absorvância.

Para determinação do poder redutor, utilizou-se a metodologia descrita por YILDIRIN *et al.* (2001). Alíquotas de 1 mL das amostras dos extratos das folhas secas a 50, 100 e 200 ppm e 1 mL de solução de ácido gálico a 100 ppm, ambos em metanol. Acrescentaram-se às alíquotas, 1,0 mL de tampão fosfato (0,2 mol/L, pH 6,6) e 1,5 mL de [K₃Fe(CN)₆] (1%). Em seguida, as amostras foram incubadas a 50 °C por 30 min. Após este período, adicionou-se 1,5 mL de ácido tricloroacético (10%) e a mistura foi centrifugada a 2.500 rpm por 8 min. Retiraram-se 2,0 mL da camada superior, que foram acrescidos de 2,0 mL de água destilada e 0,5 mL de FeCl₃ aquoso (0,1 %). A absorvância foi medida a 700 nm. O aumento do poder redutor foi avaliado com o aumento da absorvância.

2.5 Análise estatística

Os dados obtidos nas análises foram submetidos à análise de variância, onde as médias foram comparadas pelo teste Scott-Knott, com nível de significância de 5%, utilizando o programa Sisvar, versão 5.7 (FERREIRA, 2019). Para a análise dos componentes principais (PCA) foi utilizado o software Statistica®, versão 13.3 (StatSoft, Tulsa, OK, EUA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Determinação dos parâmetros de crescimento e pigmentos fotossintetizantes

Diferenças significativas foram observadas nos parâmetros de crescimento, comprimento da planta (CP), matéria seca foliar (MSF), matéria seca do caule (MSC), matéria seca da raiz (MSR), matéria seca total (MST) e R:PA (razão raiz : parte aérea) (Figura 2). Os tratamentos sombreados (malha azul, preta e vermelha) obtiveram médias superiores ao cultivo a pleno sol, quanto ao CP, MSF e MSC. O aumento destes parâmetros nos tratamentos sombreados primeiramente pode estar relacionado ao sombreamento, já que plantas sobre estas condições apresentam menor espessura do mesofilo, devido à redução dos tecidos e, geralmente, apresentam maior crescimento de parte aérea (TAIZ *et al.* 2017). Outro fator é a influência do fitocromo no crescimento. A luz é percebida pelas plantas por meio de fotorreceptores, como fitocromos e criptocromos que geram uma série de respostas fisiológicas específicas por meio destes receptores, sendo na região do vermelho e azul que possuem seus máximos de absorvância (MUNEER *et al.* 2014). Resultados semelhantes foram observados por LAZZARINI *et al.* (2018) em cultivo *in vitro* de *L. gracilis*, observando aumento significativo de crescimento das plântulas sob luz vermelha e azul com explante de segmento apical. O tratamento a pleno sol proporcionou a maior média de MSR (42,19 g), seguido pelo tratamento de malha vermelha (30,18 g), e os menores valores encontrados nos tratamentos de malha azul (18,69 g) e preta (22,60 g), que não diferiram entre si. A MST apresentou as maiores médias nos tratamentos a pleno sol (74,25 g) e malha vermelha (72,33 g), seguidos pelos tratamentos de malha azul (56,06 g) e preta (61,33 g).

Nesta espécie (*Lippia gracilis*), o acúmulo de biomassa seca pelas raízes e a relação raiz/parte aérea, a análise estatística revelou diferenças significativas entre os tratamentos, sendo as plantas cultivadas em pleno sol, o que proporcionou maior relação (R:PA = 1,32) em relação às malhas coloridas. Isto indica uma alocação preferencial de biomassa seca para o

sistema radicular (Figura 2). Alocação de fotoassimilados maior para raízes, em relação à parte aérea da planta, pode ser uma estratégia para aumentar a absorção de água e nutrientes. Assim, a espécie possa sobreviver em ambientes com maior incidência de ventos e alta irradiância e, conseqüentemente, maior exigência hídrica. Plantas da mesma espécie com sistemas mais desenvolvidos em determinada condição, credenciam-nos a terem maior capacidade de aclimatação que aqueles com sistemas radiculares reduzidos. Trabalhos têm demonstrado maior acúmulo de biomassa seca no sistema radicular de plantas cultivadas na condição pleno sol do que em malhas coloridas (CHAGAS *et al.*, 2013; SOUZA *et al.*, 2011; COSTA *et al.*, 2010; BRANT *et al.*, 2009; MELO & ALVARENGA, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2009). A maior alocação de biomassa para as raízes em *L. gracilis* indica que a luz tem um efeito estimulante para translocar os fotoassimilados para a raiz. Entretanto, o cultivo de *Ocimum gratissimum* sob cultivo protegido em malhas coloridas e pleno sol, o acúmulo de biomassa seca da parte aérea foi semelhante (MARTINS *et al.*, 2008). O acúmulo de biomassa das raízes pode variar entre as malhas, indicando que as respostas quanto ao emprego das malhas coloridas são particulares para cada espécie.

Observa-se na Figura 3 que a distribuição de biomassa seca em percentagem do total, para os diferentes órgãos da planta de *L. gracilis* variou com as diferentes malhas coloridas. Nas plantas cultivadas a pleno sol, o direcionamento para a raiz foi maior (56,82%) em seguida pela malha vermelha (41,72%). Nas malhas preta e azul houve uma distribuição mais equilibrada para os órgãos. A Figura 4 (A- parte aérea; B- raiz) mostra as plantas de *Lippia gracilis* com 90 dias de cultivo, sob pleno sol e malhas vermelha, preta e azul.

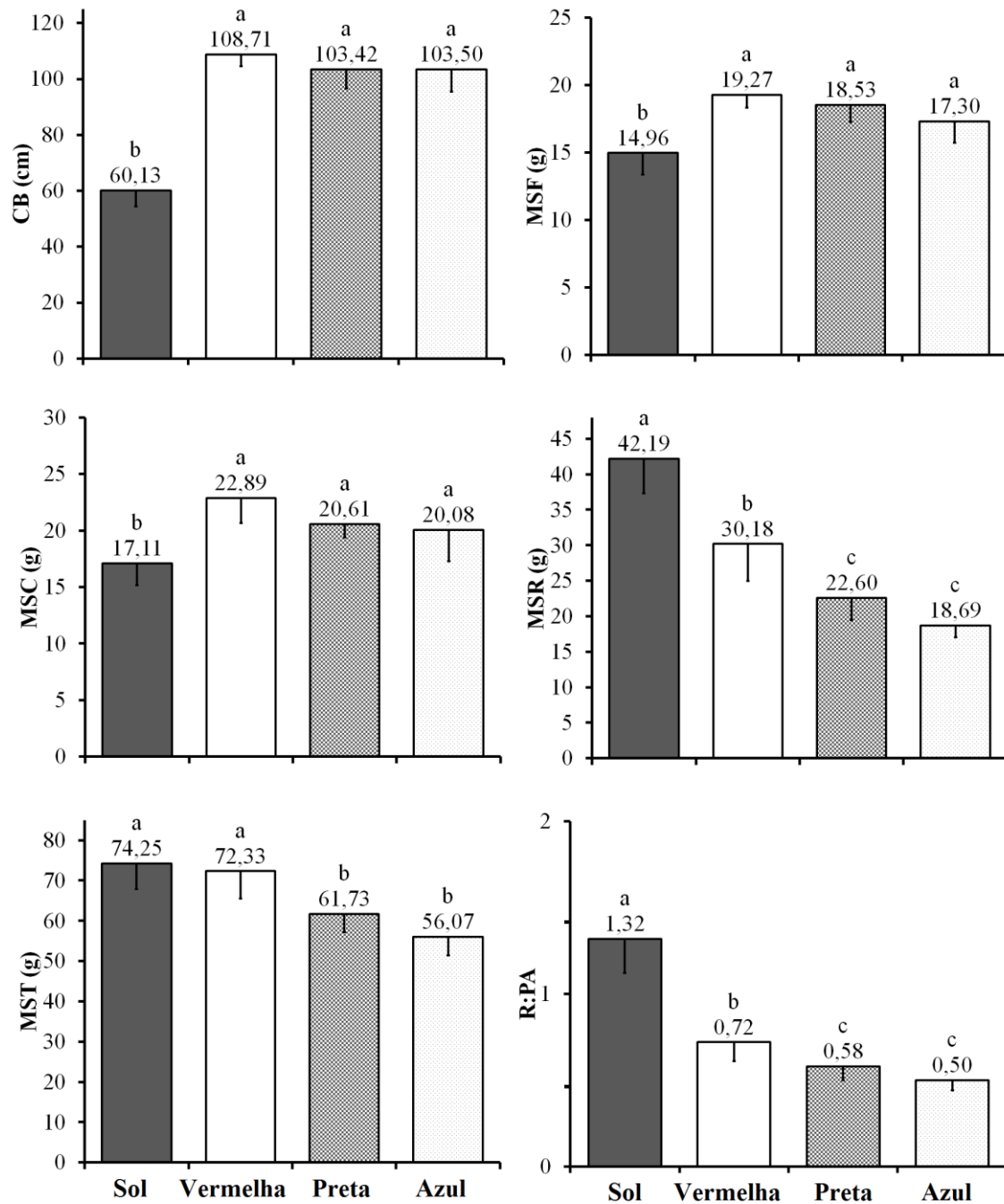


Figura 2 - Comprimento do broto principal (CB), matéria seca de folhas (MSF), caules (MSC), raízes (MSR) e total (MST), e relação entre raiz e parte aérea (R:PA) de *Lippia gracilis* cultivadas sob pleno sol e malhas vermelha, preta e azul. Médias seguidas por mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$). Barras verticais representam o desvio padrão.

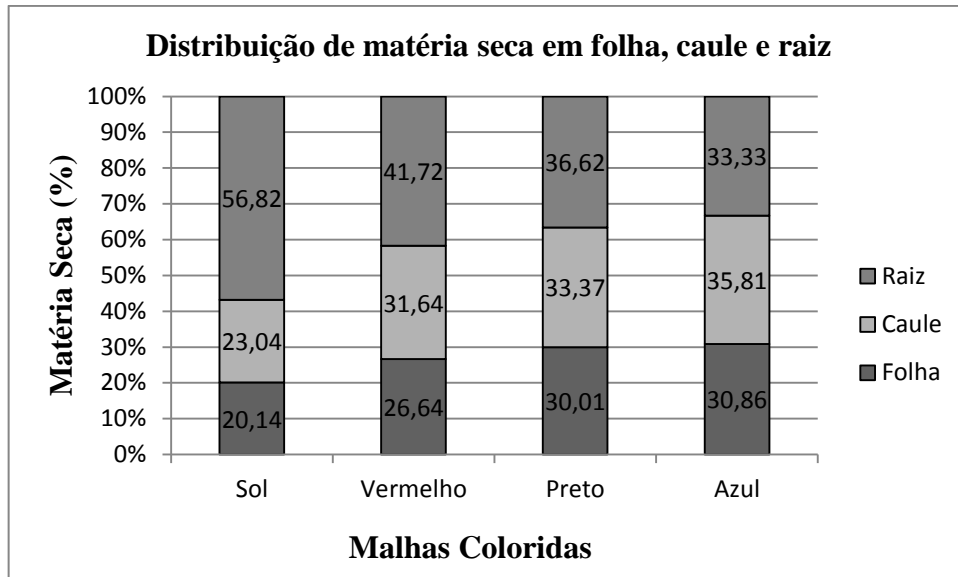


Figura 3 – Distribuição de matéria seca nas folhas, caules e raízes de plantas de *Lippia gracilis* submetidas a quatro malhas coloridas. UFLA, Lavras – MG, 2021.

As malhas coloridas influenciaram os teores dos pigmentos fotossintetizantes. A malha azul acumulou maiores teores de clorofila *a* e *b*, clorofila total, diferindo estatisticamente dos demais tratamentos (Tabela 1). Quanto ao teor de carotenoides, houve uma queda no teor desta classe de pigmentos apenas no cultivo sob malha vermelha (0,20 mg.g⁻¹), que foi estatisticamente distinto dos demais tratamentos. A clorofila é um pigmento de cor verde, encontrada em plantas, que possui a função de absorver luz para realizar a fotossíntese e sua intensa cor esverdeada se deve a suas fortes absorções das regiões azuis e vermelhas do espectro eletromagnético. Já os carotenoides, são compostos pigmentados, lipossolúveis, variando do amarelo ao vermelho, sintetizados apenas por plantas e microrganismos (TAIZ *et al.*, 2017). Portanto, o cultivo nestas malhas (azul e vermelho) tem um efeito direto na produção de clorofila e carotenoides, justificando a intensificação da produção de clorofila no experimento de malha azul e a diminuição de carotenoides no tratamento de malha vermelha. Resultados semelhantes foram encontrados por HSIE *et al.*, (2019) em cultivo *in vitro* de *Lippia rotundifolia*. COELHO *et al.* (2021) observaram que *Urtica dioica* em cultivo *in vitro* obteve os maiores valores de clorofila *a*, *b* e carotenoides nos comprimentos de onda do azul, LED branco e fluorescente.

Tabela 1- Pigmentos fotossintéticos (clorofila *a* e *b*, clorofila total e carotenóides) de *L. gracilis* cultivados sobre diferentes malhas (azul, preto e vermelho) e a pleno sol.

Trat.	Clorofila a	Clorofila b	Clorofila total	Carotenoides
Sol	1,28 b	0,20 b	0,84 b	0,23 a
Vermelha	1,18 b	0,21 b	0,80 b	0,20 b
Preta	1,18 b	0,23 b	0,82 b	0,22 a
Azul	1,52 a	0,27 a	1,03 a	0,24 a
CV	4,95	5,74	4,75	4,97

*Médias seguidas por mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

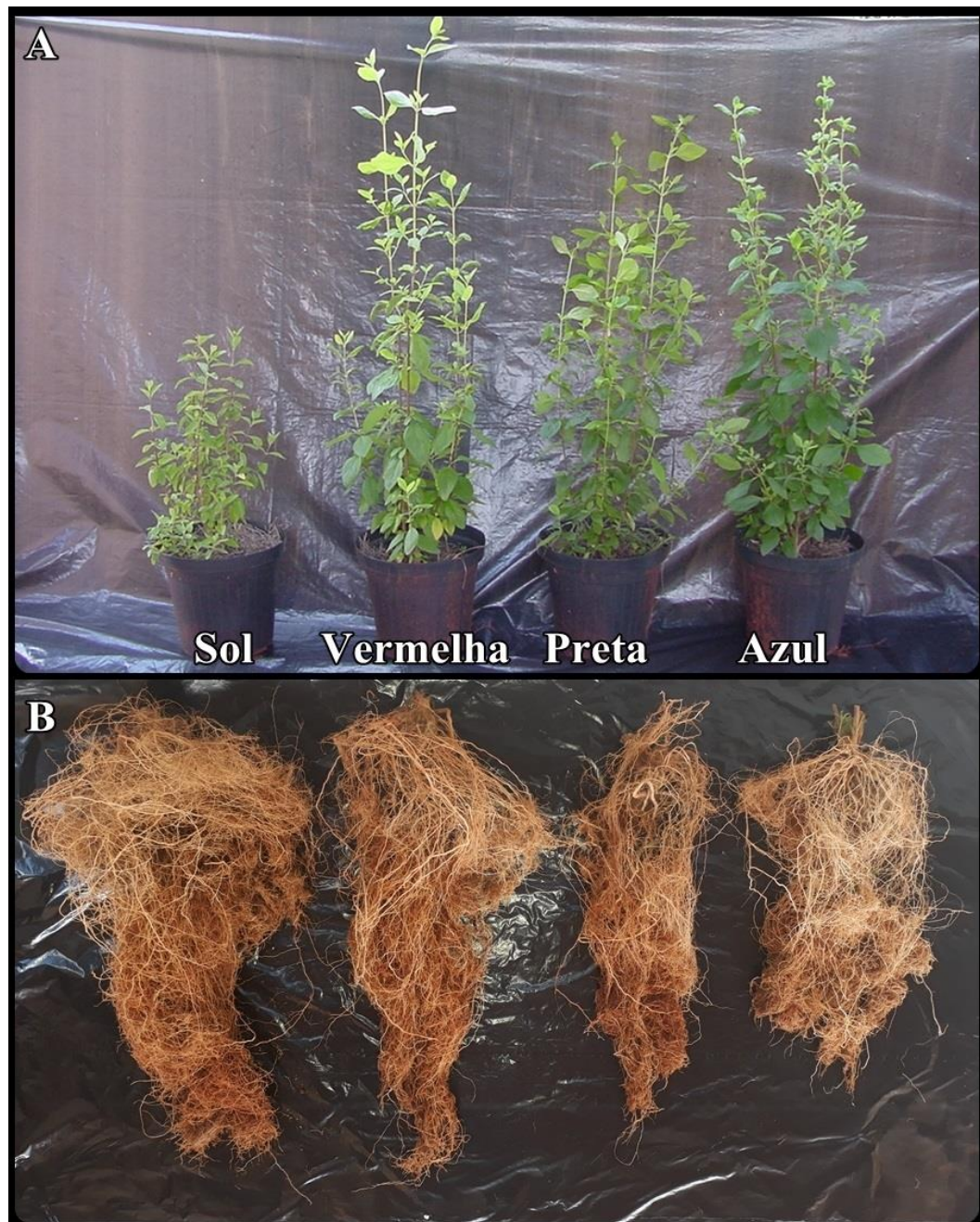


Figura 4 - Plantas de *Lippia gracilis* com 90 dias cultivadas sob pleno sol e malhas vermelha, preta e azul: A- parte aérea; B- raiz.

3.2 Teor, rendimento e composição química do óleo essencial

Na avaliação do teor de óleo essencial não houve diferença entre as médias dos tratamentos, com valores variando de 1,35% (pleno sol) a 1,59% (malha vermelha), com base no peso seco (Figura 5). Quanto ao rendimento, também não foi verificada nenhuma diferença, com valores variando de 0,21 a 0,25 g.planta⁻¹. Em estudo com a espécie *Oreganum vulgare*, comparando o cultivo sob malhas coloridas e a pleno sol, OLIVEIRA *et al.* (2016) observaram variações no teor do óleo de 1,20% (vermelha) a 2,20% (pleno sol). BRANT *et al.* (2009) observaram que o cultivo de *Melissa officinalis* sob diferentes malhas fotoconversoras e pleno sol apresentou variação no teor (0,34-0,44%) e rendimento (0,08-0,09 g.planta⁻¹) do óleo essencial, enquanto CHAGAS *et al.* (2013) utilizando os mesmos sistemas de cultivo com *Mentha arvensis*, observaram variação de 2,20-3,22% no teor e 0,45-0,95 g.planta⁻¹ no rendimento.

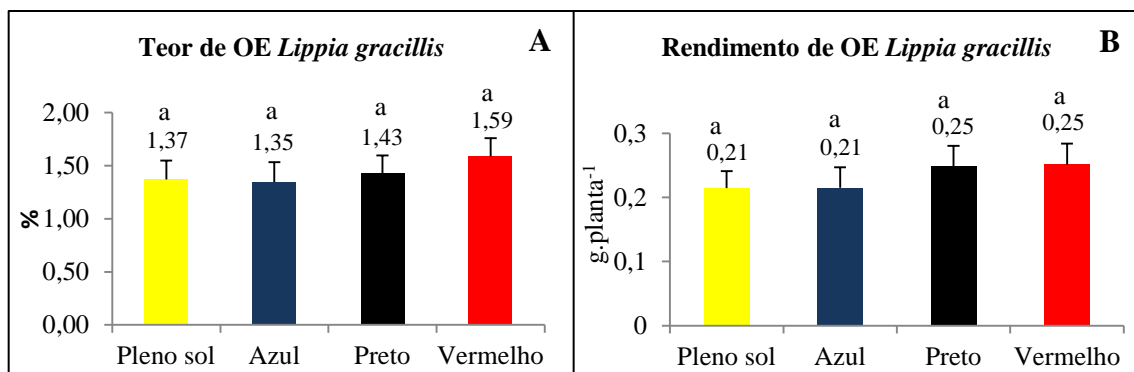


Figura 5 - (A) Teor (%) e (B) rendimento (g.planta⁻¹) de óleo essencial de *L. gracilis* cultivados sob diferentes malhas (azul, preta e vermelha) e a pleno sol. Médias (\pm desvio padrão) seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si em relação aos diferentes tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

As malhas fotoconversoras utilizadas no cultivo de *L. gracilis* modificaram qualitativa e quantitativamente a composição química volátil (Tabela 2). Houve diferença significativa entre os tratamentos sombreados e a pleno sol, com alterações principalmente nos compostos majoritários do óleo essencial. No tratamento a pleno sol foram identificados 13 compostos (97,96%), enquanto nos tratamentos sombreados um total de 16 compostos cada (97,76; 98,19 e 97,82%, azul, preto e vermelho, respectivamente). Os cinco compostos majoritários são carvacrol, *p*-cimeno, timol, (*E*)-cariofileno e oxido de cariofileno, totalizando respectivamente 93,82% da composição do óleo essencial do tratamento a pleno sol, 92,90% de malha azul, 93,02% de malha preta e 88,71% de malha vermelha.

O carvacrol, composto principal do óleo essencial de *L. gracilis*, apresentou média superior no cultivo sob malha preta (61,21%); já a menor média foi no cultivo a pleno sol (59,38%), com os tratamentos sob malha azul (60,50%) e vermelha (60,48%) semelhantes. Estes resultados encontrados para o carvacrol em *L. gracilis* foram superiores aos encontrados por LAZZARINI *et al.* (2018) em cultivo *in vitro* da mesma espécie. Outro composto majoritário, o *p*-cimeno, se destacou no cultivo a pleno sol (25,00%), sendo superior em 3% do que os tratamentos com cultivo sombreados, que não houve diferença entre eles. O timol, outro composto com percentual relevante, apresentou diferença em todos os tratamentos, sendo no cultivo sob malha preta, o que obteve a maior média (4,38%). A menor média foi no cultivo a pleno sol (3,93%). Entre outros compostos presentes nas amostras, podemos destacar o (*E*)-cariofileno (2,63-3,82%), óxido de cariofileno (2,36-2,88%) e mirceno (1,19-1,25%). Todos estes compostos já foram relatados em *L. gracilis* (CRUZ *et al.*, 2018; LAZZARINI, *et al.*, 2018; GALVÃO *et al.*, 2019).

Comparando os três compostos majoritários carvacrol, *p*-cimeno e timol nos quatro tratamentos, observa-se que à medida que o *p*-cimeno diminui nos tratamentos sombreados (azul, preto e vermelho, respectivamente) em relação ao pleno sol, há um acréscimo do carvacrol e também do timol. Dados da literatura indicam que plantas da família Lamiaceae biossintetizam carvacrol e timol a partir da oxidação de *p*-cimeno, α -terpineno e γ -terpineno (CROCOLL *et al.* 2010; POULOSE e CROTEAU 1978; STEFANAKI *et al.* 2016). Contudo, diante dos resultados da composição química volátil de *L. gracilis* nos diferentes tratamentos, observa-se que o cultivo sob malha preta, considerada neutra, favoreceu o aumento do carvacrol, timol e (*E*)-cariofileno. Ao contrário, as malhas azul e vermelha reduziram o conteúdo de *p*-cimeno, óxido de cariofileno e mirceno, reforçando que há alteração no comportamento da via de biossíntese dos compostos presentes no óleo essencial.

Tabela 2 - Composição química (\pm desvio padrão) dos compostos orgânicos voláteis das folhas de *Lippia gracilis* cultivados sob diferentes malhas (azul, preta e vermelha) e a pleno sol.

Composto	IR*	Tratamentos			
		Conteúdo (%) \pm DP			
		Pleno sol	Azul	Preta	Vermelha
1-Octeno-3-ol	978	Nd	0,15 \pm 0,03 a	0,16 \pm 0,01 a	0,16 \pm 0,01 a
Mirceno	990	1,19 \pm 0,05 a	1,21 \pm 0,02 a	1,23 \pm 0,02 a	1,25 \pm 0,01 a
α -Terpineno	1016	0,46 \pm 0,01 c	0,68 \pm 0,01 b	0,69 \pm 0,01 b	0,72 \pm 0,00 a
<i>p</i> -Cimeno	1024	25,00 \pm 0,78 a	21,99 \pm 0,26 b	21,40 \pm 0,27 b	21,53 \pm 0,09 b
Silvestreno	1027	0,64 \pm 0,02 a	0,52 \pm 0,01 b	0,50 \pm 0,01 c	0,52 \pm 0,00 b
γ -Terpineno	1056	0,34 \pm 0,01 d	0,69 \pm 0,01 c	0,74 \pm 0,01 b	0,84 \pm 0,00 a
Linalool	1101	0,10 \pm 0,00 a	0,10 \pm 0,01 a	0,10 \pm 0,00 a	0,09 \pm 0,01 a
Terpineno-4-ol	1176	0,70 \pm 0,01 a	0,66 \pm 0,02 b	0,66 \pm 0,01 b	0,66 \pm 0,01 b
<i>p</i> -cimeno-7-ol	1287	0,54 \pm 0,01 a	0,53 \pm 0,01 a	0,52 \pm 0,00 b	0,53 \pm 0,00 b
Timol	1294	3,93 \pm 0,04 d	4,22 \pm 0,03 c	4,38 \pm 0,02 a	4,34 \pm 0,01 b
Carvacrol	1306	59,38 \pm 0,71 c	60,50 \pm 0,48 b	61,21 \pm 0,30 a	60,48 \pm 0,09 b
(<i>E</i>)-Cariofileno	1416	2,63 \pm 0,01 d	3,75 \pm 0,02 b	3,66 \pm 0,02 c	3,82 \pm 0,01 a
α -Humuleno	1450	Nd	0,24 \pm 0,00 a	0,24 \pm 0,00 a	0,24 \pm 0,00 a
β -Bisaboleno	1508	Nd	0,21 \pm 0,00 b	0,21 \pm 0,00 b	0,22 \pm 0,00 a
Oxido de cariofileno	1581	2,88 \pm 0,08 a	2,44 \pm 0,02 b	2,37 \pm 0,02 c	2,36 \pm 0,01 c
Pogostol	1652	0,21 \pm 0,01 a	0,18 \pm 0,00 c	0,18 \pm 0,00 c	0,20 \pm 0,00 b
Total (%)		97,96	97,76	98,19	97,82
Nº de compostos		13	16	16	16

*IR Índice de retenção linear da série alceno (C8-C20), coluna HP-5MS.

*nd não detectado, desvio padrão PD (n = 4).

*Médias (\pm desvio padrão) seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si em relação aos diferentes tratamentos pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

3.3 Doseamento e produtividade agrícola de carvacrol

Com base na equação média de duas curvas de calibração (Figura 6), foi então calculado o conteúdo (mg/g OE), teor (mg/100g folhas) e rendimento de carvacrol (mg/planta) dos óleos essenciais obtidos nos tratamentos de cultivo sombreado (malha azul, preta e vermelha) e o cultivo a pleno sol (Tabela 3).

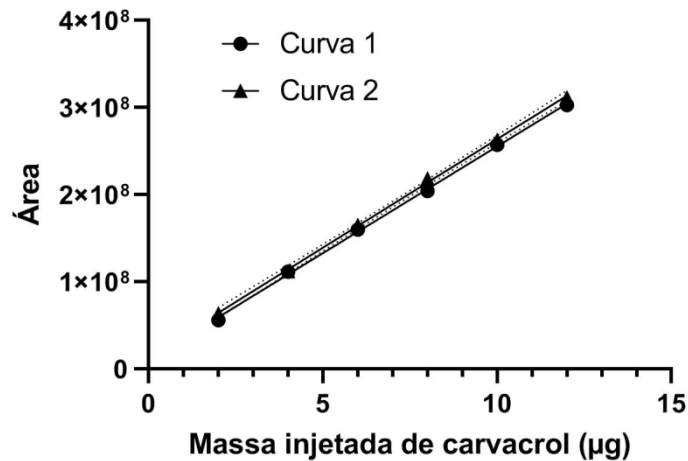


Figura 6 - Curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD, em dois dias consecutivos para o carvacrol.

Equação curva dia 1:

$$y = 24.517.320,112x + 10.253.201,633; R^2 = 0,99907$$

Equação curva dia 2:

$$y = 24.926.817,914x + 14.466.202,489; R^2 = 0,99921$$

Equação média:

$$y = 24.722.069,013x + 12.359.702,061; R^2 = 0,9997$$

Os resultados mostram diferenças significativas entre as médias dos tratamentos tanto em conteúdo quanto em teor e rendimento de carvacrol, demonstrando que o uso de malhas fotoconversoras no cultivo de *L. gracilis* promovem diferentes respostas. O conteúdo de carvacrol, apresentou a maior média no cultivo sob malha preta (6,87 mg/g de OE), diferindo dos demais tratamentos, que foram semelhantes (6,13-6,49 mg/g de OE). O cultivo de *L. gracilis* sob malha vermelha obteve o maior teor de carvacrol (10,30 mg/100g folhas), sendo 5% superior à malha preta e 22% em relação à malha azul e pleno sol.

O rendimento houve diferença em todos os tratamentos, com o cultivo sob malha vermelha sendo superior, já que obteve um maior teor de carvacrol e maior biomassa seca por planta, correspondendo a uma média de 1,98 mg/planta de carvacrol. Os outros tratamentos variaram de 1,26 a 1,81 mg/planta. O rendimento de óleo essencial nas plantas depende de

alguns fatores, ou seja, o acúmulo de matéria seca, a quantidade de óleo essencial e o conteúdo (BAGHBANI-ARANI *et al.*, 2017; AHMADI *et al.*, 2020).

A espécie *L. gracilis*, por apresentar alta concentração de carvacrol em seu óleo essencial e um bom rendimento, torna-se uma excelente opção em substituição a espécies aromáticas quando o interesse é o carvacrol, a exemplo da espécie *Origanum vulgare*. Contudo, estudos não só na área química e biológica, mas agrônômica, devem ser intensificados com o intuito de estabelecer sistemas de plantio adequado, a fim de obter melhores condições para aproveitamento de princípios ativos desta espécie nativa do semi-árido do nordeste do Brasil.

Tabela 3 – Conteúdo, teor e rendimento de carvacrol no óleo essencial das folhas de *Lippia gracilis* cultivados sob diferentes malhas (azul, preta e vermelha) e a pleno sol.

	Tratamento				CV %
	Pleno sol	Azul	Preta	Vermelha	
Conteúdo mg/g OE	6,13 ± 0,15 b	6,27 ± 0,30 b	6,87 ± 0,17 a	6,49 ± 0,10 b	2,59
Teor mg/100g folhas	8,40 ± 0,20 c	8,45 ± 0,41 c	9,79 ± 0,25 b	10,30 ± 0,15 a	2,52
Rendimento mg/planta	1,26 ± 0,03 d	1,46 ± 0,07 c	1,81 ± 0,05 b	1,98 ± 0,03 a	2,56

*Médias (± desvio padrão) seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si em relação aos diferentes tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

3.4 Isolamento de flavonoides

O fracionamento cromatográfico do extrato etanólico das folhas de *Lippia gracilis* conduziu ao isolamento da orientina (1) e isoorientina (2) (Figura 7). A elucidação estrutural destes compostos constituiu-se na análise dos dados espectrais e comparação com dados da literatura. O detalhamento de todas as etapas de fracionamento, inclusive todos os espectros e cromatogramas obtidos, estão em material suplementar.

Orientina: sólido amarelo. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ_{H} (ppm): 6,65 (s; H-3), 13,17 (s; OH-5), 6,27 (s; H-6), 7,48 (s; H-2'), 6,86 (d; $J=8,1$ Hz; H-5'), 7,53 (d; $J=8,4$ Hz; H-6'), 4,68 (d; $J=9,9$ Hz; H-1''). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ_{C} (ppm): 164,11 (C-2), 102,43 (C-3), 182,04 (C-4), 160,38 (C-5), 98,07 (C-6), 162,58 (C-7), 104,55 (C-8), 156,01 (C-9), 104,05 (C-10), 122,03 (C-1'), 114,15 (C-2'), 145,82 (C-3'), 149,61 (C-4'), 115,65 (C-5'), 119,36 (C-6'), 73,9 (C-1''), 70,69 (C-2''), 78,76 (C-3''), 69,76 (C-4''), 82,02 (C-5''), 61,57 (C-

6''). Massas: $m/z = 448$ g/mol. IV: 3350 cm^{-1} (ν O-H), 2921 e 2846 cm^{-1} (ν C-H), 1432 e 1376 cm^{-1} (δ C-H), 1602 e 1432 cm^{-1} (ν C-O-C).

Isoorientina: sólido amarelo. RMN ^1H (DMSO- d_6 , 300 MHz) δ_{H} (ppm): 6,68 (s; H-3), 13,57 (s; OH-5), 6,48 (s; H-8), 6,88 (d; $J=8,1$ Hz; H-5'). RMN ^{13}C (DMSO- d_6 , 75 MHz) δ_{C} (ppm): 163,66 (C-2), 102,84 (C-3), 181,95 (C-4), 160,72 (C-5), 108,89 (C-6), 163,29 (C-7), 93,57 (C-8), 156,21 (C-9), 104,15 (C-10), 121,43 (C-1'), 113,63 (C-2'), 145,78 (C-3'), 149,73 (C-4'), 116,09 (C-5'), 118,09 (C-6'), 78,94 (C-1''), 73,07 (C-2''), 69,91 (C-3''), 70,65 (C-4''), 81,91 (C-5''), 61,52 (C-6''). Massas: $m/z = 448$ g/mol. IV: 3350 cm^{-1} (ν O-H), 2980 e 2920 cm^{-1} (ν C-H), 1432 e 1376 cm^{-1} (δ C-H), 1580 e 1420 cm^{-1} (ν C-O-C).

A orientina e isoorientina, flavonoides pertencentes à subclasse das flavonas, foram identificadas com base nos dados de CLAE-DAD, RMN ^1H e ^{13}C , espectros bidimensionais HSQC, espectros de massas, infravermelho e UV/Vis (ver parte experimental), além da comparação com dados publicados anteriormente (XIN ZHOU *et al.*, 2005; HELANA N. MICHAEL, *et al.*, 2010; FERREIRA *et al.*, 2016).

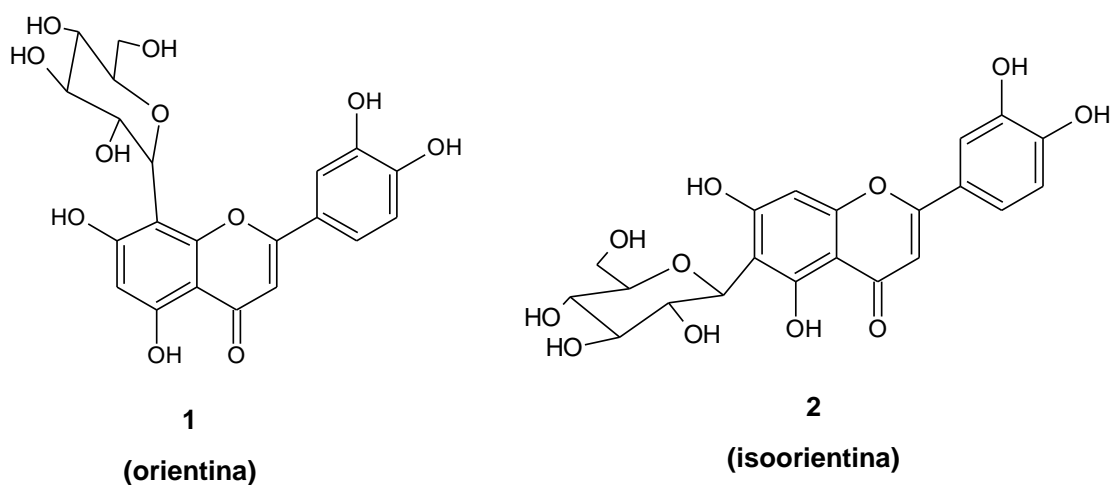


Figura 7 – Flavonas orientina e isoorientina isoladas das folhas de *Lippia gracilis*.

3.5 Quantificação de orientina e isoorientina nos extratos

No teste de linearidade, as curvas analíticas obtidas em dois dias consecutivos (Tabela 4), tiveram uma excelente relação linear com base na massa injetada e as áreas dos picos relacionados, com coeficiente de determinação (R^2) de 0,9995 e 0,9985, respectivamente (Anexo 1). Estes valores indicam a existência de relação linear entre a concentração de

orientina e a absorvância na faixa de trabalho avaliada, ou seja, a linearidade do método é adequada. A análise de covariância indicou que as inclinações e os interceptos das duas retas foram equivalentes e, portanto, a equação da reta foi estabelecida com os valores médios, resultando na equação média $y = 4.518.367,73 - 1.603.752,65$ com R^2 médio de 0,9992.

Tabela 4 - Massa injetada, áreas médias ($n = 3$) e desvio padrão relativo das curvas analíticas da orientina, nos dois dias de análise.

Volume injetado (μL)	Massa injetada	Dia 1		Dia 2	
		Área média	DPR (%)	Área média	DPR (%)
Orientina					
Solução de referência (0,5 mg/mL)					
20	10,0	43413901	0,39	44208468	0,63
15	7,5	31525838	0,18	32603735	0,11
10	5,0	21057799	0,35	21456468	0,17
5	2,5	9460562	1,40	8456942	2,91
Solução de referência (0,125 mg/mL)					
20	2,5	9604305	0,15	9121068	2,28
15	1,875	7240444	0,73	6543866	0,55
10	1,25	4413809	0,47	4074459	0,33
5	0,625	1847221	0,59	1709056	1,60

Os teores de orientina e isoorientina, quantificadas nos extratos (Anexo 2), foram afetados significativamente quanto ao cultivo a pleno sol e a utilização das malhas fotoconversoras, mostrando que o manejo agrícola de *L. gracilis*, no que diz respeito à luminosidade, pode favorecer a produção de um determinado metabólito secundário (Tabela 5). Os maiores percentuais de orientina e isoorientina foram encontrados no cultivo a pleno sol (10,85 e 9,85%, respectivamente). Os tratamentos sombreados sob malha vermelha e preta foram estatisticamente semelhantes para a orientina (8,29 e 8,34%, respectivamente), com o menor percentual no cultivo sob malha azul (6,21%), enquanto a isoorientina seguiu-se em ordem decrescente o tratamento sob malha preta (7,52%), vermelha (7,22%) e azul (6,11%). A variação dos metabólitos secundários pode variar além da questão genética, pelos fatores edafoclimáticos, influenciando o desenvolvimento vegetal e a biossíntese de metabólitos secundários (COSTA *et al.*, 2010; BROWN JÚNIOR, 1988; KSOURI *et al.*, 2008). A influência da luz sobre a síntese de metabólitos secundários foi observada em *Mentha*

arvensis (CHAGAS *et al.*, 2013), *Mikania glomerata* (SOUZA *et al.*, 2011), *Achillea millefolium* (ALVARENGA *et al.*, 2015), *Hyptis suaveolens* (ANDRADE *et al.*, 2017) e *Plectranthus amboinicus* (SILVA *et al.*, 2017).

Tabela 5 - Valores percentuais de orientina e isoorientina nos extratos dos diferentes tratamentos de cultivo de *L. gracilis*.

Flavona	Tratamento				CV (%)
	Pleno sol	Azul	Preta	Vermelha	
	%				
orientina	10,85 ± 0,17 a	6,21 ± 0,20 c	8,34 ± 0,20 b	8,29 ± 0,07 b	1,87
isoorientina	9,85 ± 0,21 a	6,11 ± 0,08 d	7,52 ± 0,12 b	7,22 ± 0,05 c	1,78

* Médias (± desvio padrão) seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si em relação aos diferentes tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

3.6 Avaliação do estresse oxidativo não enzimático

A produção excessiva de radicais, tais como os radicais ânions superóxido, hidroxila, oxigênio e H_2O_2 têm sido associados com a carcinogênese, doenças cardíacas, câncer e muitos outros problemas de saúde relacionados com o avanço da idade (KYUNG-A *et al.*, 2011). Assim, compostos antioxidantes exógenos agem com uma função auxiliar neste processo de defesa. Neste contexto, novos antioxidantes naturais, principalmente os isolados de plantas medicinais, adquirem uma grande importância, sendo nos últimos anos as pesquisas farmacológicas destes compostos de grande interesse (SILVA *et al.*, 2009). O teste de DPPH é utilizado para avaliar a atividade antioxidante de extratos e substâncias puras. O DPPH é um radical capaz de reduzir na presença de compostos doadores de elétrons. A evidência da reação se dá quando a cor violeta da solução metanólica de DPPH desaparece, passando, portanto, a incolor, quando este reage com substâncias que doam radicais (WU, 2006). O teste do poder redutor auxilia nos resultados da atividade antioxidante, pois o acréscimo nos valores de absorvância de acordo com o aumento da concentração evidencia sua capacidade de retirada de radical livre, ou seja, poder de reduzir espécies com elétrons isolados ou desemparelhados (YLDIRIN *et al.*, 2001).

Os resultados mostraram diferenças entre todos os tratamentos de cultivo de *L. gracilis*, nas diferentes concentrações testadas. O maior conteúdo de fenólicos e flavonoides levou a um aumento da atividade antioxidante, demonstrando que estes compostos são responsáveis pela atividade antioxidante (JING *et al.* 2018). Observa-se pelos resultados

(Tabela 6 e Figura 8), que o cultivo a pleno sol foi superior em todas as concentrações testadas, obtendo percentuais que chegaram a 93,14% de retirada de radical na concentração 400 ppm, pelo método DPPH, sendo confirmado no teste de poder redutor, diferindo dos demais tratamentos. Este resultado corrobora com os maiores valores de fenólicos totais e flavonoides totais encontrados nos extratos. Este fato se dá pela capacidade destes compostos fenólicos doarem elétrons, já que possuem em sua estrutura elétrons livres, principalmente nos grupos de hidroxilas presentes em suas moléculas, em especial aos flavonoides, que apresentaram altos percentuais nos extratos, evidenciando o grande poder antioxidante de *L. gracilis*.

Os menores valores foram encontrados no cultivo de *L. gracilis* sob malha azul, reforçando a correlação destes resultados com os resultados encontrados para os compostos fenólicos e também flavonoides. As plantas apresentam defesa antioxidante contra os danos do estresse oxidativo, sejam enzimáticos (superóxido dismutase, catalase e outras enzimas) e não enzimáticas (compostos fenólicos, etc.), sistemas de defesa antioxidante que protegem as plantas de dano oxidativo por eliminação de espécies reativas de oxigênio (GILL E TUTEJA, 2010). Em estudo com extrato metanólico de *Centaurea sivasica*, rico em flavonoides, mostrou-se uma atividade notável em todos os testes de atividade antioxidante (YIRTICI *et al.*, 2022). Segundo PICOS-SALAS e colaboradores (2021), as flavonas apresentam excelentes atividades antioxidantes, com potencial atividade antiinflamatória, anticâncer e antidiabético.

Tabela 6 - Percentuais de atividade de captura de radicais usando o método DPPH, nas concentrações 200, 300, e 400 ppm em quatro tratamentos (cultivo sob malha azul, preta e vermelha) e cultivo a pleno sol.

Tratamento	Concentração (ppm)		
	200	300	400
	% ACR DPPH		
Pleno Sol	82,74 ± 0,92 a	93,27 ± 0,06 a	93,14 ± 0,00 a
Azul	31,98 ± 1,20 d	46,78 ± 0,70 d	61,23 ± 0,85 c
Preta	47,85 ± 1,20 c	76,05 ± 1,12 c	89,50 ± 1,26 b
Vermelha	60,60 ± 1,65 b	84,96 ± 1,06 b	92,38 ± 0,29 a
CV %	1,35		

* Médias (± desvio padrão) seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si em relação aos diferentes tratamentos na mesma época e mesma concentração pelo teste de Scott-Knott (p<0,05).

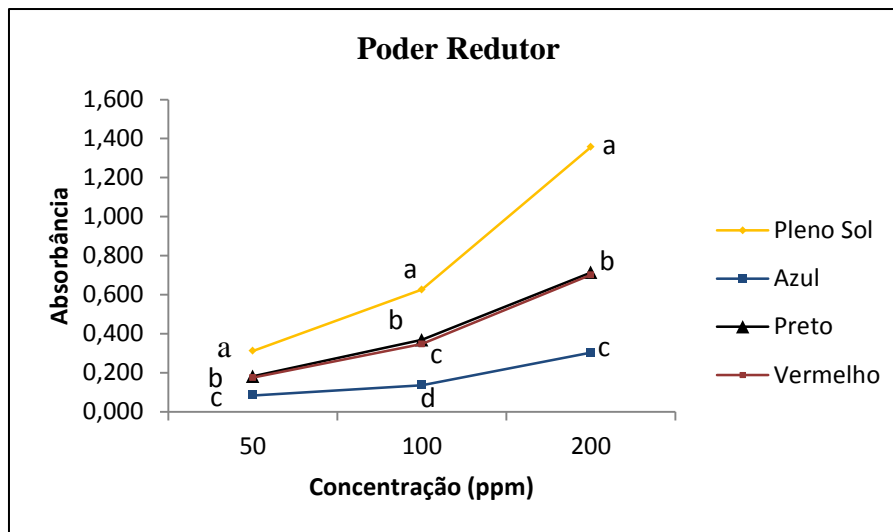


Figura 8 - Valores de poder redutor dos tratamentos com o cultivo de *L. gracilis* a pleno sol, cultivo com malha azul, preta e vermelha. Médias seguidas de mesmas letras minúsculas não diferem entre si em relação aos diferentes tratamentos pelo teste de Scott-Knott ($p < 0,05$).

3.7 Análise dos Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais (PCA) é uma técnica da estatística multivariada que consiste em transformar um conjunto de variáveis originais em outro conjunto de variáveis de mesma dimensão, denominadas de componentes principais. Tem o objetivo de mostrar como os dados foram estruturados, correlação entre os dados, observar os *outliers* e, assim, dando uma visão geral do comportamento dos dados.

A PCA apresenta a correlação entre o crescimento vegetativo, teor de óleo essencial e compostos voláteis com as diferentes malhas, explicando 96,08% da variação total (Figura 9). Assim, com o uso das PC1 (82,61%) e PC2 (13,47%) foi possível identificar a separação dos tratamentos em três grupos: no cultivo a pleno sol (Grupo I) ocorreu maior acúmulo de matéria seca de raiz, total, teor de óleo essencial e dos compostos óxido de cariofileno, *p*-cimeno, orientina e isoorientina; Grupo II malha vermelha e preta, maior acúmulo de matéria seca de caule, folha e dos compostos voláteis timol, carvacrol e cariofileno, e na malha azul (Grupo III) ocorreu maior acúmulo de clorofila total.

A PCA permitiu identificar a correlação positiva entre o acúmulo de matérias secas (MSR, MST), teor de óleo e dos compostos voláteis (cariofileno e *p*-cimeno) com o cultivo a pleno sol e, de forma negativa com as malhas vermelha, azul e preta. E as malhas vermelha e preta uma correlação positiva com matéria seca (MSF, MSC) e dos compostos timol,

carvacrol e cariofileno. Os resultados da PCA complementam as análises e interpretações anteriores.

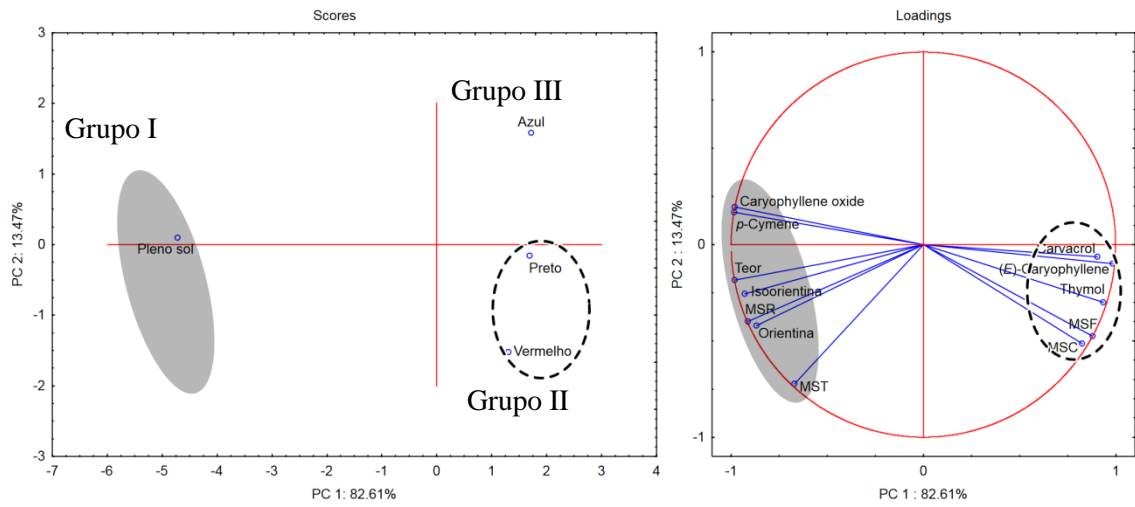


Figura 9 – Análise de componentes principais de variáveis avaliadas de quatro diferentes tratamentos de cultivo de *L. gracilis*, pleno sol, cultivo com malha azul, preta e vermelha.

4 CONCLUSÃO

Conclui-se deste trabalho, que *L. gracilis* apresentou diferentes respostas quanto aos tratamentos a que foi submetida. O cultivo nas malhas fotoconversoras nas cores azul, preta e vermelha em comparação com o experimento a pleno sol, promoveram alterações no crescimento vegetativo, na composição química volátil, fenólica e no estresse oxidativo das plantas. Os resultados encontrados neste trabalho mostram que as plantas de *L. gracilis* quando cultivadas com malhas, influenciam de maneira positiva o maior comprimento de planta, matéria seca do caule e foliar, com o cultivo na malha azul apresentando-se a mais eficiente na produção de pigmentos fotossintetizantes. O cultivo na malha vermelha apresentou o maior teor e rendimento de carvacrol, composto economicamente importante em *L. gracilis*, sendo então recomendada esta cor de malha quando o objetivo é a produção de carvacrol. Quanto à produção das flavonas orientina e isorientina, o cultivo a pleno sol foi o mais eficiente, inclusive apresentando maior eficiência no potencial de redução no estresse oxidativo, já que as flavonas são compostos fenólicos com alta capacidade de neutralizar os radicais livres. Este estudo mostrou ainda que independente da radiação transmitida pelas malhas coloridas evidenciou-se uma plasticidade fenotípica desta espécie aos espectros e intensidades luminosas estudadas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry, ed. 5, **Texensis Publishing**, 2017.

AHMADI, H.; BABALAR, M.; SARCHESHMEH, M. A. A.; MORSHEDLOO, M. R.; SHOKRPOUR, M. Effects of exogenous application of citrulline on prolonged water stress damages in hyssop (*Hyssopus officinalis* L.): Antioxidant activity, biochemical indices, and essential oils profile. **Food Chemistry**, v. 333, p. 127433, 2020.

ALVARENGA, I. C. A.; PACHECO, F. V.; SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PINTO, J. E. B. P. In vitro culture of *Achillea millefolium* L.: quality and intensity of light on growth and production of volatiles. **Plant Cell Tissue Organ Cult**, v. 122, n. 2, p. 299-308, 2015.

ANDRADE, H. B.; BRAGA, A. F.; BERTOLUCCI, S. K. V.; HSIE, B. S.; SILVA, S. T.; PINTO, J. E. B. P. Effect of plant growth regulators, light intensity and LED on growth and volatile compound of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit in vitro plantlets. **Acta Hort**, v. 1155, p. 277-84, 2017.

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. AOAC. **AOAC Guidelines for Single-Laboratory Validation of Chemical Methods for Dietary Supplements and Botanicals**. 2013. Disponível em: <http://www.eoma.aoc.org/app_k.pdf> Acesso em: 11 jul 2020.

ASSIS, J. S.; MALDONADO, R.; MUNOZ, T.; ESCRIBANO, M. I.; MERODIO, C. Effect of high carbon dioxide concentration on PAL activity and phenolic contents in ripening cherimoya fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 23, n. 3, p. 33-39, 2001.

BAGHBANI-ARANI, A.; MODARRES-SANAVY, S. A. M.; MASHHADI-AKBAR-BOOJAR, M.; MOKHTASSI-BIDGOLI, A. Towards improving the agronomic performance, chlorophyll fluorescence parameters and pigments in fenugreek using zeolite and vermicompost under deficit water stress. **Industrial Crops and Products**, v. 109, p. 346-357, 2017.

BARNES, J. D.; BALAGUER, L.; MANRIQUE, E.; ELVIRA, S.; DAVISON, A. W. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls a and b in lichens and higher plants. **Environmental and Experimental botany**, v. 32, n. 2, p. 85-100, 1992.

BLOIS, M. S. K. Antioxidant determination by the use of a stable free radical. *Nature*, v. 4617, p. 1199-1120, 1958.

BONOLI, M.; MARCONI, E.; CABONI, M. F. Free and bound phenolic compounds in barley (*Hordeum vulgare* L.) flours Evaluation of the extraction capability of different solvent mixtures and pressurized liquid methods by micellar electrokinetic chromatography and spectrophotometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1057, n. 1-2, p. 1-2, 2004.

BRANT, R. D. S.; PINTO, J. E. B. P.; ROSA, L. F.; ALBUQUERQUE, C. J. B.; FERRI, P. H.; CORRÊA, R. M. Crescimento, teor e composição do óleo essencial de melissa cultivada sob malhas fotoconversoras. **Ciência Rural**, v. 39, p. 1401-1407, 2009.

BROWN JÚNIOR, K.S. Engenharia ecológica: novas perspectivas de seleção e manejo de plantas medicinais. **Acta Amazônica**, v.18, n.1, p. 291-303, 1988.

CASTRO, A. H. F.; LIMA, M. M.; PAIVA, R.; ALVARENGA, A. A.; SÓTER, M. O. Curva de crescimento, atividade da fenilalanina amônia-liase e teores de fenóis e taninos totais em calos de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Fabaceae-Mimosoideae). **Plant Cell Culture & Micropropagation**, v. 4, n. 2, p. 99-104, 2008.

CHAGAS, J. H.; PINTO, J. E. B.; BERTOLUCCI, S. K. V.; COSTA, A. G.; DE JESUS, H. C. R.; ALVES, P. B. Produção, teor e composição química do óleo essencial de hortelã-japonesa cultivada sob malhas fotoconversoras. **Horticultura brasileira**, v. 31, p. 297-303, 2013.

COELHO, A. D.; DE SOUZA, C. K.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE CARVALHO, A. A.; SANTOS, G. C.; DE OLIVEIRA, T.; PINTO, J. E. B. P. Wavelength and light intensity enhance growth, phytochemical contents and antioxidant activity in micropropagated plantlets of *Urtica dioica* L. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 145, n. 1, 59-74, 2021.

COLES, Z. S.; DU TOIT, E. S.; LALL, N.; PAYNE, B.; STEYN, J. M. The influence of photosensitive shade netting on vegetative growth and bioactivity of *Myrsine africana* L. for cosmeceutical production. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, p. 100324, 2021.

COSTA, L. C. D. B.; PINTO, J. E. B. P.; CASTRO, E. M. D.; ALVES, E.; BERTOLUCCI, S. K. V.; ROSAL, L. F. Effects of coloured shade netting on the vegetative development and leaf structure of *Ocimum selloi*. **Bragantia**, v. 69, p. 349-359, 2010.

CRAVER, J. K.; GEROVAC, J. R.; LOPEZ, R. G.; KOPSELL, D. A. Light intensity and light quality from sole-source light-emitting diodes impact phytochemical concentrations within *Brassica* microgreens. **Journal of the American**, 2017.

CROCOLL, C.; ASBACH, J.; NOVAK, J.; GERSHENZON, J.; DEGENHARDT, J. Terpene synthases of oregano (*Origanum vulgare* L.) and their roles in the pathway and regulation of terpene biosynthesis. **Plant molecular biology**, v. 73, n. 6, p. 587-603, 2010.

CRUZ, E. M.; MENDONÇA, M. C.; BLANK, A. F.; SAMPAIO, T. S.; PINTO, J. A.; GAGLIARDI, P. R.; WARWICK, D. R. *Lippia gracilis* Schauer essential oil nanoformulation prototype for the control of *Thielaviopsis paradoxa*. **Industrial Crops and Products**, v. 117, p. 245-251, 2018.

DAVIES, N.W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicon and Carbowax 20M phases. **J. Chromatogr. A**, v. 503, p. 1-24, 1990.

DE MELO, J. O.; BLANK, A. F.; DE OLIVEIRA, A. M. S.; ANDRADE, T. M.; DE FÁTIMA ARRIGONI-BLANK, M.; ALVES, P. B. Content and chemical composition of the essential oil of *Lippia gracilis* Schauer accessions in different drying times. **Bioscience Journal**, v. 35, n. 6, 2019.

DURAZZO, A.; LUCARINI, M.; SOUTO, E. B.; CICALA, C.; CAIAZZO, E.; IZZO, A. A.; NOVELLINO, E.; SANTINI, A. Polyphenols: a concise overview on the chemistry, occurrence, and human health. **Phytotherapy Research**, v. 33, n. 9, p. 2221-2243, 2019.

FERREIRA, D. F.. SISVAR: A COMPUTER ANALYSIS SYSTEM TO FIXED EFFECTS SPLIT PLOT TYPE DESIGNS. **REVISTA BRASILEIRA DE BIOMETRIA**, v. 37, n. 4, p. 529-535, 2019.

FERREIRA, R. O.; CARVALHO, A. R. D.; RIGER, C. J.; CASTRO, R. N.; SILVA, T.; CARVALHO, M. G. D. Constituintes químicos e atividade antioxidante in vivo de flavonoides isolados de *Clusia lanceolata* (Clusiaceae). **Química Nova**, v. 39, p. 1093-1097, 2016.

GALVÃO, J. G.; CERPE, P.; SANTOS, D. A.; GONSALVES, J. K.; SANTOS, A. J.; NUNES, R. K.; NUNES, R. S. *Lippia gracilis* essential oil in β -cyclodextrin inclusion complexes: an environmentally safe formulation to control *Aedes aegypti* larvae. **Pest Management Science**, v. 75, n.2, p. 452-459, 2019.

GILL, S. S.; TUTEJA, N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. **Plant Physiol Biochem**, v. 48, n. 12, p. 909-930, 2010.

GUERRA, C. C. Vinho Tinto. In: VENTURINI FILHO, W. G (Coord.). **Bebidas alcoólicas: ciência e tecnologia**. São Paulo: Blucher, cap. 11, p. 209-233 2010.

GUIMARAES, A. G.; GOMES, S. V.; MORAES, V. R.; NOGUEIRA, P. C.; FERREIRA, A. G.; BLANK, A. F.; JÚNIOR, L. J. Q. Phytochemical characterization and antinociceptive effect of *Lippia gracilis* Schauer. **Journal of Natural Medicines**, v. 66, n. 3, p. 428-434, 2012.

HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Otimização de método para determinação de flavonóis e flavonas em frutas por cromatografia líquida de alta eficiência utilizando delineamento estatístico e análise de superfície de resposta. **Quím. Nova**, 2008.

HSIE, B. S. D.; BUENO, A. I. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE CARVALHO, A. A.; DA CUNHA, S. H. B.; MARTINS, E. R.; PINTO, J. E. B. P. Study of the influence of wavelengths and intensities of LEDs on the growth, photosynthetic pigment, and volatile

compounds production of *Lippia rotundifolia* Cham *in vitro*. **J. Photochem. Photobiol.** v. 198, p. 111577, 2019.

HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B.; RODRIGUES, M. I. Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em hortaliças. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 66, n.2, p. 143-152, 2007.

JING, X.; WANG, H.; GONG, B.; LIU, S.; WEI, M.; AI, X.; LI, Y.; SHI, Q. Secondary and sucrose metabolism regulated by different light quality combinations involved in melon tolerance to powdery mildew. **Plant Physiol Biochem**, v. 124, p. 77-7, 2018.

KOLTON, A.; DLUGOSZ-GROCHOWSKA, O.; WOJCIECHOWSKA, R.; CZAJA, M. Biosynthesis regulation of folates and phenols in plants. **Scientia Horticulturae**, v. 291, p. 110561, 2022.

KSOURI, R.; MEGDICHE, W.; FALLEH, H.; TRABELSI, N.; BOULAABA, M.; SMAOUI, A.; ABDELLY, C. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. **Comptes Rendus Biologies**, v. 331, n. 11, p. 865-873, 2008.

KYUNG-A, H.; YU-JIN, H.; DONG-SIK, P.; JAEHYUN, K.; AE-SON O. In vitro investigation of antioxidant and anti-apoptotic activities of Korean wild edible vegetable extracts and their correlation with apoptotic gene expression in HepG2 cells. **Food Chemistry**, v. 125, n. 2, p. 483-487, 2011.

LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE CARVALHO, A. A.; SANTIAGO, A. C.; PACHECO, F. V.; YUCESAN, B.; PINTO, J. E. B. P. Explant type and natural ventilation systems influence growth and content of carvacrol and thymol of *Lippia gracilis* Schauer. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 137, n. 1, p. 33-43, 2019.

LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DE CARVALHO, A. A.; SANTIAGO, A. C.; PACHECO, F. V.; CÉLIO, M. M. F.; PINTO, J. E. B. P. Growth regulators affect the dry weight production, carvacrol and thymol content of *Lippia gracilis* Schauer. **Industrial Crops and Products**, v. 129, p. 35-44, 2019.

LAZZARINI, L. E. S.; BERTOLUCCI, S. K. V.; PACHECO, F. V.; DOS SANTOS, J.; SILVA, S. T.; DE CARVALHO, A. A.; PINTO, J. E. B. P. Quality and intensity of light affect *Lippia gracilis* Schauer plant growth and volatile compounds in vitro. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, v. 135, n. 3, p. 367-379, 2018.

LI, X.; JIN, L.; PAN, X.; YANG, L.; GUO, W. Proteins expression and metabolite profile insight into phenolic biosynthesis during highbush blueberry fruit maturation. **Food Chem**, v. 290, p. 216-228, 2019.

LIMA, V. A.; PACHECO, F. V.; AVELAR, R. P.; ALVARENGA, I. C.; PINTO, J. E. B.; ALVARENGA, A. A. Growth, photosynthetic pigments and production of essential oil of long-pepper under different light conditions. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 89, p. 1167-1174, 2017.

MARINHO, T. A.; OLIVEIRA, M. G.; MENEZES-FILHO, A. C. P.; CASTRO, C. F. S.; OLIVEIRA, I. M. M.; BORGES, L. L.; SILVA-JR, N. J. Phytochemical characterization, and antioxidant and antibacterial activities of the hydroethanolic extract of *Anadenanthera peregrina* stem bark. **Brazilian Journal of Biology**, v. 82, 2021.

MARTINS, J. R.; ALVARENGA, A. A.; CASTRO, E. M.; PINTO, J. E. B. P.; SILVA, A. P. O. Avaliação do crescimento e do teor de óleo essencial em plantas de *Ocimum gratissimum* L. cultivadas sob malhas coloridas. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 10, p. 102-107, 2008.

MELO, A. A. M.; ALVARENGA, A. A. Sombreamento de plantas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don'Pacífica White' por malhas coloridas: desenvolvimento vegetativo. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 33, p. 514-520, 2009.

MICHAEL, H. N.; AWAD, H. M.; EL-SAYED, N. H.; PARÉ, P. W. Chemical and antioxidant investigations: Norfolk pine needles (*Araucaria excelsa*). **Pharmaceutical biology**, v. 48, n. 5, p. 534-538, 2010.

MORAES, V. R.; THOMASI, S. S.; SPRENGER, R. F.; PRADO, V. M.; CRUZ, E. M.; CASS, Q. B.; BLANK, A. F. Secondary metabolites from an infusion of *Lippia gracilis* Schauer using the LC-DAD-SPE/NMR hyphenation technique. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 28, p. 1335-1340, 2017.

MUNEER, S.; KIM, E.; PARK, J.; LEE, J. Influence of green, red and blue light emitting diodes on multiprotein complex proteins and photosynthetic activity under different light Intensities in lettuce leaves (*Lactuca sativa* L.). **Int J Mol Sci**, v. 15, n. 3, p. 4657, 2014.

NIST. NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library/Analysis Program and Data for Microsoft Windows, ed. 5, Shimadzu, USA, 2008.

OLIVEIRA, M. I.; CASTRO, E. M.; COSTA, L. C. B.; OLIVEIRA, C. Características biométricas, anatômicas e fisiológicas de *Artemisia vulgaris* L. cultivada sob telas coloridas. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v. 11, p. 56-62, 2009.

PASCUAL, M. E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; SÁNCHEZ M. D.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **J. Ethnopharmacol**, v. 76, n. 3, p. 201-14, 2001.

PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S.; GOMES, T.L.B.; CARDOSO, K.C.M.; AMORIM, E.L.C. Otimização de Metodologia Analítica para o Doseamento de Flavonoides de *Bauhinia cheilantha* (Bongard) Steudel. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 288-291, 2010.

PICOS-SALAS, M. A.; HEREDIA, J. B.; LEYVA-LÓPEZ, N.; AMBRIZ-PÉREZ, D. L.; GUTIÉRREZ-GRIJALVA, E. P. Extraction Processes Affect the Composition and Bioavailability of Flavones from Lamiaceae Plants: A Comprehensive Review. **Processes**, v. 9, n. 9, p. 1675, 2021.

PINHEIRO, P. F.; MENINI, L. A. P.; BERNARDES, P. C.; SARAIVA, S. H.; CARNEIRO, J. W. M.; COSTA, A. V.; ARRUDA, T. R.; LAGE, M. R.; GONÇALVES, P. M.; BERNARDES, C. O.; ALVARENGA, E. S.; MENINI, L. Semisynthetic Phenol Derivatives Obtained from Natural Phenols: Antimicrobial Activity and Molecular Properties. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 1, p. 323-330, 2018.

PINTO, J. E. B. P.; FERRAZ, E. O.; BERTOLUCCI, S. K. V.; SILVEIRA, H. R. O.; SANTOS, A. R.; SILVA, M. S. Produção de biomassa e óleo essencial em mil folhas cultivada sob telas coloridas. **Horticultura Brasileira**, v. 32, p. 321-326, 2014.

POULOSE, A. J.; CROTEAU, R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: Conversion of γ -terpinene to p-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 187, n. 2, p. 307-314, 1978.

RIELLA, K. R. *et al.* Anti-inflammatory and cicatrizing activities of thymol, a monoterpene of the essential oil from *Lippia gracilis*, in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 656-663, 2012.

SANTOS, R. P.; CRUZ, A. C. F. D.; IAREMA, L.; KUKI, K. N.; OTONI, W. C. Protocolo para extração de pigmentos foliares em porta-enxertos de videira micropropagados, 2008.

SILVA, G. D. F.; SILVA, S. R. S.; BARBOSA, L. C. A.; DUARTE, L. P.; RIBEIRO, S. M. R.; QUEIROZ, J. H.; VIEIRA FILHO, S. A.; OLIVEIRA, M. L. R. Antioxidant activity of *Maytenus imbricata* Mart., Celastraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2B, p. 530-536, 2009.

SILVA, S. T.; BERTOLUCCI, S. K. V.; DA CUNHA, S. H. B.; LAZZARINI, L. E. S.; TAVARES, M. C.; PINTO, J. E. B. P. Effect of light and natural ventilation systems on the growth parameters and carvacrol content in the *in vitro* cultures of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Plant Cell Tissue Organ Cult.** v. 129, p. 501-10, 2017.

SINGH, R. P.; MURTHY, K. N. C.; JAYAPRAKASHA, G. K. Studies on the antioxidante activity of pomegranate (*Punica granatum*) peel and seed extracts using in vitro models. **J. Agric. Food Chem.**, v. 50, n. 1, p. 81-86, 2002.

SNYDER, L. R.; KIRKLAND, J. J. Introduction to modern liquid chromatography, **John Wiley & Sons**, new York, ed. 2, p. 765, 1997.

SOARES, L. E. S. *et al.* Chromosome number of *Lippia gracilis* Schauer (verbenaceae) from Rio Grande do Norte, Brazil. **Revista Caatinga**, v. 24, n. 3, p. 221-224, 2011.

SOUZA, G. S.; PINTO, J. E. B. P.; RESENDE, M. G.; BERTOLUCCI, S. K. V.; SOARES, Â. M.; CASTRO, E. M. Crescimento, teor de óleo essencial e conteúdo de cumarina de plantas jovens de gauco (*Mikania glomerata* Sprengel) cultivadas sob malhas coloridas. **Biotemas**, v. 24, n. 3, p. 1-11, 2011.

STEFANAKI, A.; COOK, C. M.; LANARAS, T.; KOKKINI, S. The Oregano plants of Chios Island (Greece): Essential oils of *Origanum onites* L. growing wild in different habitats. **Industrial Crops and Products**, v. 82, p. 107-113, 2016.

SWAIN, T. Flavonoids. In: GOODWIN, T. W. Chemistry and biochemistry of plants pigments. **New York: Academic**, ed. 2, v. 2, p. 176-177, 1976.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. Fisiologia e desenvolvimento vegetal. **Artmed Editora**, Porto Alegre, 2017.

TREVISAN, M. T. S. *et al.* Composition of essential oils and ethanol extracts of the leaves of *Lippia* species: identification, quantitation and antioxidant capacity. **Rec. Nat. Prod.**, v. 10, n. 4, p. 485-496, 2016.

VAN H. DEN DOOL; P. DEC KRATZ. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas liquid partition chromatography. **J. Chromatogr. A**, v. 11, p. 463-471, 1963.

WOISKY R. G.; SALATINO A. Analysis os propolis: some parameters ond prodecure for chemical fuality control. **J. Apic. Res.** v. 37, n. 2, p. 99-105, 1998.

WU, C.; CHEN, F.; WANG, X.; KIM, H. J.; HE, G.; ZITLIN, V. H.; HUANG, G. Antioxidant constituents in feverfew (*Tanacetum parthenium*) extract and their chromatographic quantification. **Food Chem.**, v. 96, n. 2, p. 220-227, 2006.

YILDIRIN, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, 2001.

YIRTICI, Ü.; ERGENE, A.; ATALAR, M. N.; ADEM, Ş. Phytochemical composition, antioxidant, enzyme inhibition, antimicrobial effects, and molecular docking studies of *Centaurea sivasica*. **South African Journal of Botany**, v. 144, p. 58-71, 2022.

ZENKOV, N. K.; CHECHUSHKOV, A. V.; KOZHIN, P. M.; KANDALINTSEVA, N. V.; MARTINOVICH, G. G.; MENSCHIKOVA, E. B. Plant phenols and autophagy. **Biochemistry**, v. 81, n. 4, p. 297-314, 2016.

ZHOU, X.; PENG, J.; FAN, G.; WU, Y. Isolation and purification of flavonoid glycosides from *Trollius ledebouri* using high-speed counter-current chromatography by stepwise increasing the flow-rate of the mobile phase. **Journal of Chromatography A**, v. 1092, n. 2, p. 216-221, 2005.

6 MATERIAL SUPLEMENTAR

FITOQUÍMICA – ISOLAMENTO DAS FLAVONAS

PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS GERAIS

Sílica-gel 60 (40-60 μm , Agela) foi utilizada nas colunas cromatográficas do tipo *flash*, em diversos diâmetros, com a finalidade de fracionamento e isolamento dos compostos. Foram eluídas sob pressão, com fluxo de 5 mL/min, utilizando como solventes hexano, acetato de etila e metanol, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade. O monitoramento do fracionamento foi realizado por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando cromatofolhas de alumínio recobertas de sílica-gel com indicador de fluorescência UV 254 nm (Merck[®]). Os cromatogramas foram observados sob luz visível e ultravioleta 365 nm, antes e após a revelação com vapor de iodo e solução etanólica de vanilina 1%. As análises por CLAE analítico foram realizadas em um Cromatógrafo Agilent Technologies Deutschland GmbH, Waldbronn, Germany, Serie Agilent 1260 Infinity, Equipado com Quaternary Pump VL, Diode Array Detector VL, do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri (UFVJM). Foi utilizada coluna HPLC Discovery C18, tamanho das partículas 5 μm , 25 cm x 4,6 mm, mantida a 40 °C. Os comprimentos de ondas de detecção foram de 190 a 400 nm. As amostras foram dissolvidas em metanol, filtradas em microfiltro Millipore 0,45 mm e depois centrifugadas. Volumes de 10 μL foram injetados no equipamento. Para as análises empregou-se uma coluna C18 e fluxo de 1,0 mL/min, 40 °C, com obtenção de espectros no UV, na faixa de 200 a 400 nm, que foram registrados *on-line* para cada pico. As análises por CLAE preparativo foram realizadas em um Cromatógrafo Shimadzu, equipado com detector de UV-visível do tipo DAD SPD-M20A, com bombas LC-6AD, injetor manual do tipo Rheodyne 7725i, do Departamento de Farmácia (MULTIFAR) da UFVJM. Foi utilizada coluna Shimpack C18, 250 mm x 20 mm, partículas de 5 μm . Os espectros de infravermelho (IV) foram obtidos em um Espectrômetro Agilent[®] Cary 630 FTIR ATR ZnSe, do Departamento de Engenharia Química da UFVJM. Foram realizadas varreduras na faixa de 4000-650 cm^{-1} . Para obtenção dos espectros de RMN (Ressonância Magnética Nuclear) de ¹H e de ¹³C, 1D e 2D, foi realizado em equipamento da marca Bruker 300Mhz, pertencente ao Laboratório Integrado de Pesquisa Multiusuário dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri – LIPEMVALE, UFVJM. Os espectros de massas (eletrospray) foram obtidos dados de alta

resolução e adquiridos em um espectrômetro de massa micrOTOF-II (Bruker Daltonics, Massachusetts, EUA) equipado com uma fonte de ionização por electrospray e um analisador de massas tipo time-of-flight, empregando uma bomba de infusão (Kd Scientific) a uma taxa de fluxo de 300 $\mu\text{L}/\text{min}$. A tensão capilar e da placa final na fonte de eletrospray foi de 3,0 kV e 0,45 kV, respectivamente, no modo de ionização negativa, com uma vazão de secagem de 8 L/min e pressão de 4 bar a 200 °C. Uma solução de ácido trifluoroacético de sódio (Na-TFA), na concentração de 500 mg/L, foi utilizada para calibração do equipamento. Para aquisição e análise de dados, foi usado o programa Bruker Compass Data Analysis 4.1 (Bremen, Alemanha). As análises foram realizadas na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP, Departamento de Física e Química, no Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais e Sintéticos (NPPNS). Os espectros de UV/Vis foram obtidos em um Espectrofotômetro UV-Vis-Thermo Scientific modelo Genesys 105 do Departamento de Química da UFVJM.

FRACIONAMENTO CROMATOGRÁFICO DO EXTRATO

O fracionamento do extrato etanólico de *Lippia gracilis* foi realizado visando ao isolamento de dois picos com maior absorvidade molar observado no cromatograma em CLAE analítico.

Preparo do extrato

Folhas secas de *L. gracilis* (83,3 g) foram submetidas à pulverização com nitrogênio líquido em almofariz para preparação do extrato bruto etanólico. O material pulverizado foi submetido à extração por sonicação com etanol absoluto (3 x 500 mL) (relação planta : solvente = 1 : 6), à temperatura ambiente, por 24 min. em cada ciclo. Após a evaporação dos solventes em evaporador rotatório, foi obtido então o extrato bruto A2-136-01 (5,1 g), rendimento de 6,12 %.

Concentração das frações

As frações recolhidas foram concentradas em evaporador rotatório a 45 °C, sob pressão reduzida e transferidas para frascos previamente tarados. Para a eliminação do

solvente, antes da pesagem, os frascos foram mantidos sob jato de ar frio e, posteriormente, em dessecador sob vácuo por, no mínimo, 48 horas.

Monitoramento do fracionamento cromatográfico

O monitoramento do fracionamento foi feito por CCD. Os cromatogramas foram observados sob luz visível e ultravioleta 365 nm, antes e após a revelação com vapor de iodo e solução etanólica de vanilina 1%.

Fracionamento cromatográfico do extrato bruto etanólico de *Lippia gracilis*

O fracionamento do extrato bruto etanólico de *Lippia gracilis* foi realizado visando ao isolamento de dois picos com maior absorvidade molar observado no cromatograma em CLAE analítico. Os compostos foram isolados por dois diferentes métodos de fracionamento, como mostra o fluxograma ao final da descrição de todos os procedimentos realizados. O primeiro foi denominado de “fracionamento 1” e o segundo “fracionamento 2”, como é descrito nos procedimentos que se seguem abaixo. O segundo foi realizado na tentativa de melhorar a eficiência do processo de purificação e pureza das substâncias isoladas no fracionamento 1.

Fracionamento 1 - Extrato bruto etanólico (A2-136-01)

Parte do extrato bruto etanólico das folhas de *L. gracilis* (1,87 g) foi submetida a procedimentos cromatográficos de filtração em coluna cromatográfica tipo *flash*, utilizando sílica-gel 60 (40-60 µm, Agela) em uma coluna com 2,0 cm de diâmetro, volume de sílica preenchendo 15 cm de altura, utilizando os solventes hexano, AcOEt, MeOH e H₂O, puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade, sendo coletados desta coluna um total de 63 frações (Tabela 6.1).

Tabela 6. 1 - Fracionamento do extrato bruto etanólico das folhas de *L. gracilis* (A2-136-01)

Eluente	Frações
Hexano	1-5 (1: 120 mL; 2-5: 40 mL cada)
Hexano: AcOEt (8:2)	6-10 (50 mL cada)
Hexano: AcOEt (6:4)	11-19 (20 mL cada)
Hexano: AcOEt (4:6)	20-40 (15 mL cada)
Hexano: AcOEt (2:8)	41-56 (12 mL cada)
AcOEt	57-58 (125 mL cada)
AcOEt:MeOH (7:3)	59-60 (100 mL cada)
AcOEt:MeOH (1:1)	61 (100 mL)
MeOH	62 (100 mL)
H ₂ O	63 (100 mL)

Após análise dos perfis cromatográficos das frações em CCD, foram então reunidas em 16 grupos (Tabela 6.2).

Tabela 6.2 - Grupos das frações obtidas por CCDs de A2-136-01.

Grupos (Código)	Frações	Massa
R1	1-5	2,0 mg
R2	6-8	275,3 mg
R3	9-11	90,0 mg
R4	12-18	28,4 mg
R5	19-21	4,5 mg
R6	22-25	12,6 mg
R7	26-30	12,5 mg
R8 (A2-149-01)	31-36	19,0 mg
R9 (A2-149-01)	37-40	50 mg
R10 (A2-149-01)	41-46	13,7 mg
R11 (A2-149-01)	47-52	86,6 mg

R12 (A2-149-01)	53-54	0,3 mg
R13	55-58	20,0 mg
R14 (A2-148-01)	59	298,7 mg
R15	60-62	50,0 mg
R16	63	30,0 mg

Após reunião das frações (Tabela 6.2), como ainda algumas apresentaram um perfil cromatográfico semelhante em CCD, as frações R8, R9, R10, R11 e R12 foram reagrupadas, sob o código A2-149-01 (169,6 mg). Outro grupo interessante foi o R14, codificada como A2-148-01 (298,7 mg). Diante das massas obtidas desses grupos e perfil cromatográfico em CCD e CLAE, elas foram submetidas a outros procedimentos cromatográficos, como segue abaixo.

Fracionamento de A2-149-01

A fração A2-149-01 (169,6 mg), oriunda do agrupamento dos grupos R8 a R12 (Tabela 6.2) foi submetida ao fracionamento em coluna cromatográfica tipo *flash*, utilizando os solventes hexano, AcOEt, e MeOH puro ou em misturas, em gradiente crescente de polaridade, obtendo então 59 frações, coletadas em diferentes volumes (Tabela 6.3).

Tabela 6.3 - Fracionamento de A2-149-01

Eluente	Frações
Hexano: AcOEt (8:2)	1-6 (15 mL cada)
Hexano: AcOEt (6:4)	7-19 (15 mL cada)
Hexano: AcOEt (1:1)	20-22 (30 mL cada)
Hexano: AcOEt (4:6)	23-56 (15 mL cada)
AcOEt	57 (100 mL)
AcOEt:MeOH (1:1)	58 (100 mL)
MeOH	59 (100 mL)

As frações coletadas foram então agrupadas em várias grupos de acordo com seu perfil cromatográfico em CCD (Tabela 6.4).

Tabela 6.4 - Reunião das frações obtidas por CCDs de A2-149-01.

Grupos (Código)	Frações	Massa
R1	1-6	5,0 mg
R2	7-19	5,3 mg
R3	20-22	3,5 mg
R4	23-28	3,8 mg
R5 (A2-153-02)	30-38	9,0 mg
R6	39-44	6,5 mg
R7	45-52	8,0 mg
R8	53-56	2,0 mg
R9	57-59	8,4 mg

O grupo R5 (A2-153-02) (Tabela 6.4) apresentou em CCD uma única banda, com forte absorção no UV 254 nm, sendo confirmada em CLAE analítico (> 70%), portanto foi submetida às análises espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C , bidimensional HSQC, espectros de massas, infravermelho e UV/Vis para elucidação estrutural.

Fracionamento de A2-148-01

Após verificar seu perfil em CLAE, este grupo foi submetido à coluna cromatográfica tipo *flash*, utilizando sílica-gel 60 (40-60 μm , Agela) em uma coluna com 2,0 cm de diâmetro, volume de sílica preenchendo 15 cm de altura, na tentativa de purificação das duas substâncias correspondentes aos picos de maior intensidade (Figura 6.1).

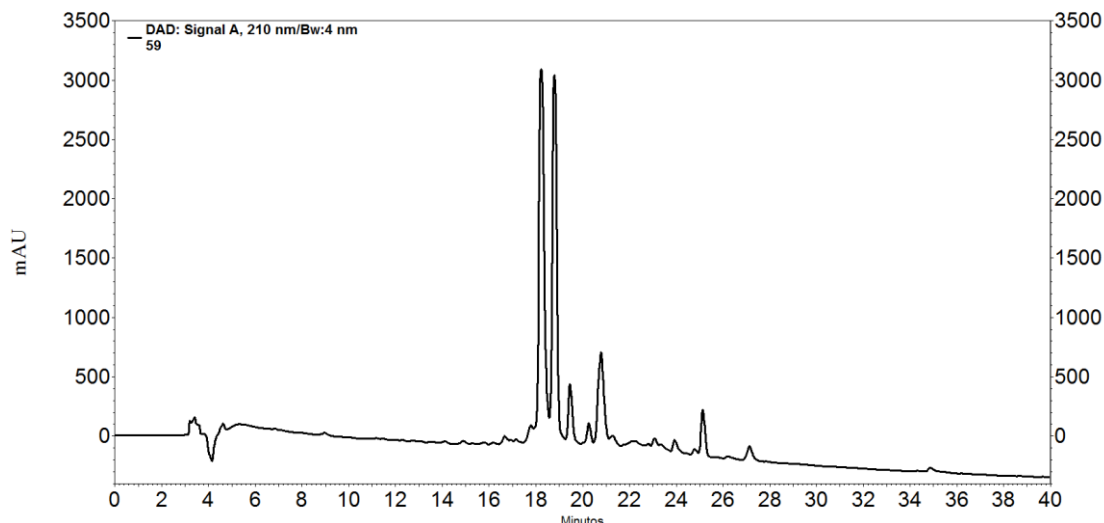


Figura 6.1 - Cromatograma obtido por CLAE de A2-148-01. Condições de análise: Detector UV-Vis, 280 nm, Coluna C18 e fluxo de 1 mL/min, 40 °C, volume de injeção: 10 mL. Fase móvel: A: H₂O com 0,1% de ácido acético e B: Metanol. Gradiente 0 – 5 min: 10 % B, 5 – 40 min: 10% B à 80% de B.

Foram obtidas 44 frações, eluídas utilizando os solventes AcOEt, MeOH e H₂O puros ou em misturas, em gradientes crescentes de polaridade (Tabela 6.5).

Tabela 6.5 - Fracionamento de A2-148-01

Eluente	Frações
AcOEt:MeOH (9:1)	1-15 (10 mL cada)
AcOEt:MeOH (7:3)	16-40 (10 mL cada)
AcOEt:MeOH (1:1)	41 (100 mL)
MeOH	42 (100 mL)
MeOH:H ₂ O (1:1)	43 (100 mL)
H ₂ O	44 (100 mL)

As frações coletadas nesta coluna foram reunidas em grupos de acordo com seu perfil cromatográfico em CCD (Tabela 6.6).

Tabela 6.6 - Reunião das frações obtidas por CCDs de A2-148-01.

Grupos (Código)	Frações	Massa
R1	1	2,0 mg
R2 (A2-165-01)	2-3	9,3 mg
R3	4	10,0 mg
R4	5-9	9,0 mg
R5 (A2-168-01)	10-12	12,0 mg
R6	13-23	20,0 mg
R7	24-40	30,5 mg
R8	41	22,5 mg
R9	42	10,4 mg
R10	43	42,3 mg
R11	44	32,0 mg

Do fracionamento de A2-148-01 foram obtidas duas amostras (Tabela 6.6). Uma das amostras foi proveniente do grupo R2, codificada como A2-165-01 (9,3 mg), submetida então a análises espectroscópicas de RMN ^1H e ^{13}C , bidimensional HSQC, espectros de massas, infravermelho e UV/Vis. O grupo R5, código A2-168-01 (12,0 mg), também foi submetida a análises espectroscópicas. Abaixo, na Figura 6.2 podemos observar o esquema dos procedimentos fitoquímicos do “fracionamento 1” do extrato bruto em etanol das folhas de *Lippia gracilis* (A2-136-01).

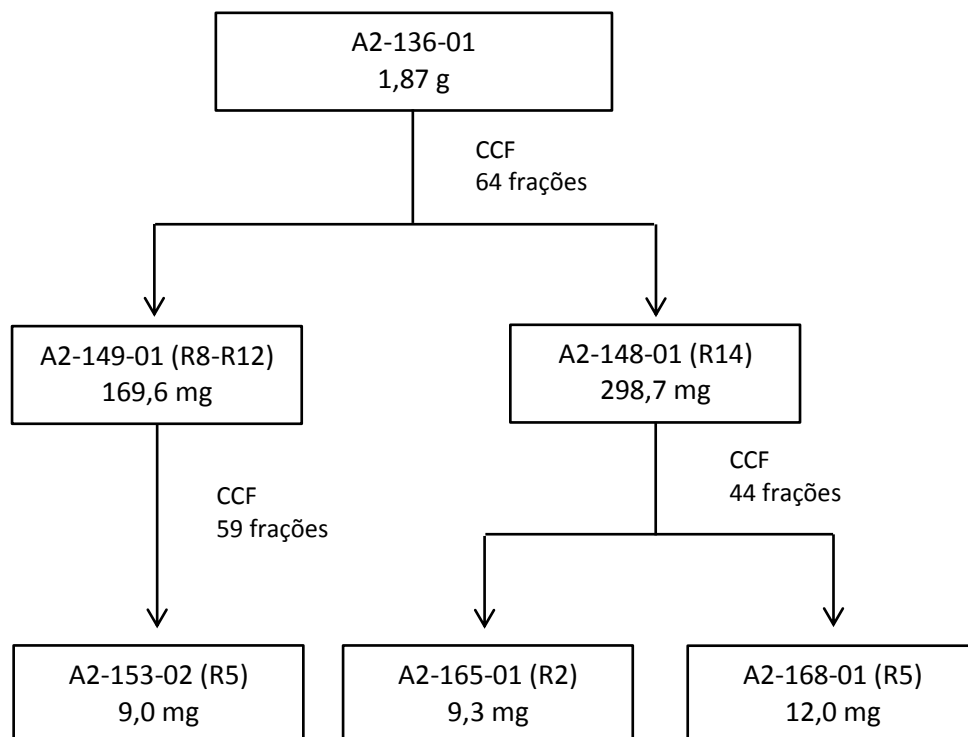


Figura 6.2 - Esquema do estudo fitoquímico do “fracionamento 1” do extrato bruto em etanol das folhas de *Lippia gracilis* (A2-136-01).

Fracionamento 2 - Extrato bruto etanólico (A2-136-01)

A fim de encontrar uma maneira mais eficiente, rápida, maior quantidade, e melhorar a pureza das flavonas isoladas, outra estratégia de fracionamento com outra parte do extrato bruto etanólico das folhas de *L. gracilis* (2,90 g) foi executada. O extrato foi submetido à filtração em coluna cromatográfica tipo *flash*, utilizando sílica-gel 60 (40-60 μm , Agela) em uma coluna com 2,5 cm de diâmetro, volume de sílica preenchendo 15 cm de altura, utilizando o solventes hexano, AcOEt, MeOH e H_2O , puros ou em misturas, em ordem crescente de polaridade, sendo então coletados desta coluna um total de 20 frações (Tabela 6.7).

Tabela 6.7 - Fracionamento do extrato etanólico das folhas de *L. gracilis* (A2-136-01).

Eluente	Frações
Hexano: AcOEt (8:2)	1-2 (100 mL cada)
Hexano: AcOEt (1:1)	3-5 (70 mL cada)
Hexano: AcOEt (3:7)	6-7 (100 mL cada)
AcOEt	8-12 (120 mL cada)
AcOEt:MeOH (7:3)	13-15 (50 mL cada)
AcOEt:MeOH (1:1)	16-18 (50 mL cada)
MeOH	19 (100 mL)
H ₂ O	20 (100 mL)

Após verificar os perfis cromatográficos das frações em CCD, foram então reunidas em 10 grupos (Tabela 6.8).

Tabela 6.8 - Reunião das frações obtidas por CCDs de A2-136-01.

Grupos (código)	Frações	Massa
R1	1-3	620,5 mg mg
R2	4-5	300,8 mg
R3	6-7	200,0 mg
R4	8-11	40,0 mg
R5	12-13	12,4 mg
R6 (A2-160-01)	14	488,3 mg
R7	15	20,1 mg
R8	16-18	58,3 mg
R9	19	55,4 mg
R10	20	53,2 mg

O grupo R6, de massa 488,3 mg (A2-160-01) apresentou perfil cromatográfico em CLAE (Figura 6.3) indicando a presença de dois picos majoritários com tempos de retenção em 23 min min e 25 min, cujos espectros no UV são compatíveis com padrões espectrais de

flavonas, como mostra a Figura 6.4. Esta fração foi submetida a procedimentos cromatográficos descritos a seguir, com o objetivo de isolar as duas substâncias com maior área de pico.

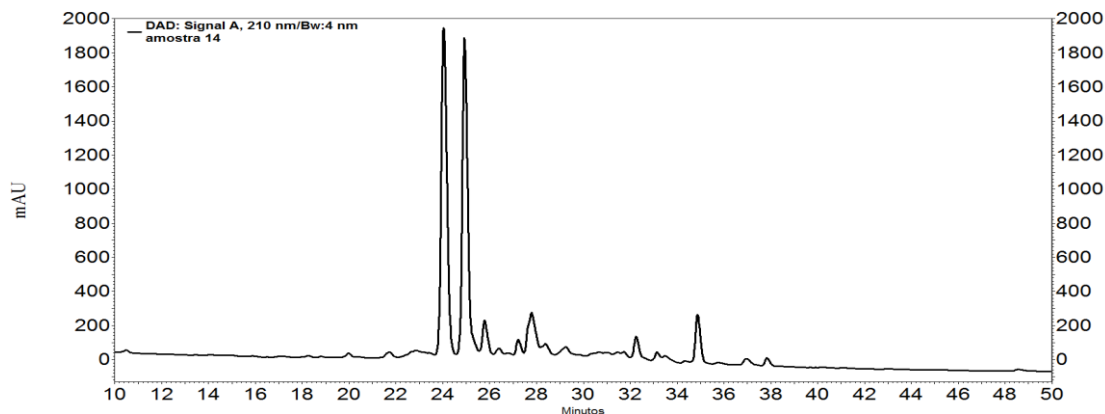


Figura 6.3 - Cromatograma obtido por CLAE de A2-160-01. Condições de análise: Detector UV-Vis, 210 nm, coluna C18, 25 cm x 4,6 mm x 5 μ m, mantida a 40 °C, fluxo de 1 mL/min, volume de injeção: 10 mL. Fase móvel: A: H₂O com 0,1% de ácido acético e B: Metanol. Gradiente 0 – 65 min: 5 % B à 95% B, 65 – 70 min: 95% B, 70 – 75 min: 95% B à 5% de B, 75 – 85 min: 5% B.

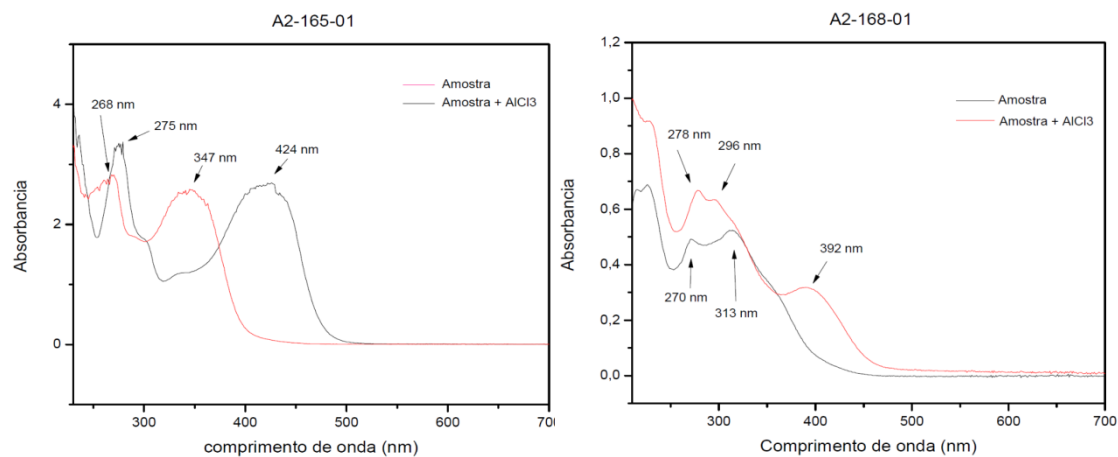


Figura 6.4 - Espectros de varredura UV-Vis de A2-165-01 e A2-168-01, mostrando os deslocamentos de bandas quando complexado com AlCl₃.

Fracionamento de A2-160-01 em CLAE preparativa

A fração A2-160-01 foi submetida a fracionamento por CLAE preparativa, já que da primeira tentativa de fracionamento do extrato bruto (“fracionamento 1”), utilizando apenas etapas com coluna cromatográfica tipo *flash*, não houve uma boa separação dessas substâncias.

Para as análises de purificação em CLAE preparativo, foi utilizado 306,7 mg de A2-160-01, diluído em 5,5 mL (55,8 mg/mL) distribuídos em onze corridas cromatográficas, com injeção de 500 µL por aplicação. Fase móvel A: H₂O e B: MeOH, corridas com tempo de 30 minutos, fluxo de 12 mL/min, eluição no modo gradiente 0 – 30 min: 30% B à 60% B.

As corridas cromatográficas foram acompanhadas em tempo real e coletadas frações nos tempos de retenção de interesse, relacionadas aos dois picos majoritários. As frações coletadas nas onze corridas foram então reunidas de acordo com o tempo de retenção (TR). Na Tabela 6.9 é apresentado o TR e as massas das substâncias de interesse obtidas no fracionamento.

Tabela 6.9 - Fracionamento de A2-160-01 em CLAE preparativo.

TR	Massa	Código
17,40-18,40 (A3-11-01)	55,8 mg	A3-11-01
17,40-18,40 (A3-11-02)	19,6 mg	A3-11-02
18,40-19,30 (A3-11-03)	27,9 mg	A3-11-03

Análises por CLAE analítico a 1,0 mg/mL de A3-11-03 (27,9 mg) indicaram pureza de 86% de percentagem de área relativa. Esta fração possui perfil cromatográfico por CLAE analítico equivalente a A2-168-01, obtida no “fracionamento 1”. As amostras A3-11-01 e A3-11-02, após avaliação do perfil cromatográfico em CLAE analítico, foram agrupadas (75,4 mg) e resubmetidas a fracionamento por CLAE preparativo, diluído em 500 µL e injeção do volume total em uma aplicação. Utilizou-se fase móvel A: H₂O e B: MeOH, tempo de 30 minutos, fluxo de 12 mL/min, eluição no modo gradiente 0 – 30 min: 30% B à 60% B. Obteve-se então A3-13-01 (5,0 mg), com pureza de 91 % em percentagem de área na concentração 1,0 mg/mL, equivalente a A2-165-01. A Figura 6.5 apresenta o esquema dos procedimentos fitoquímicos do “fracionamento 2” do extrato bruto em etanol das folhas de *Lippia gracilis* (A2-136-01).

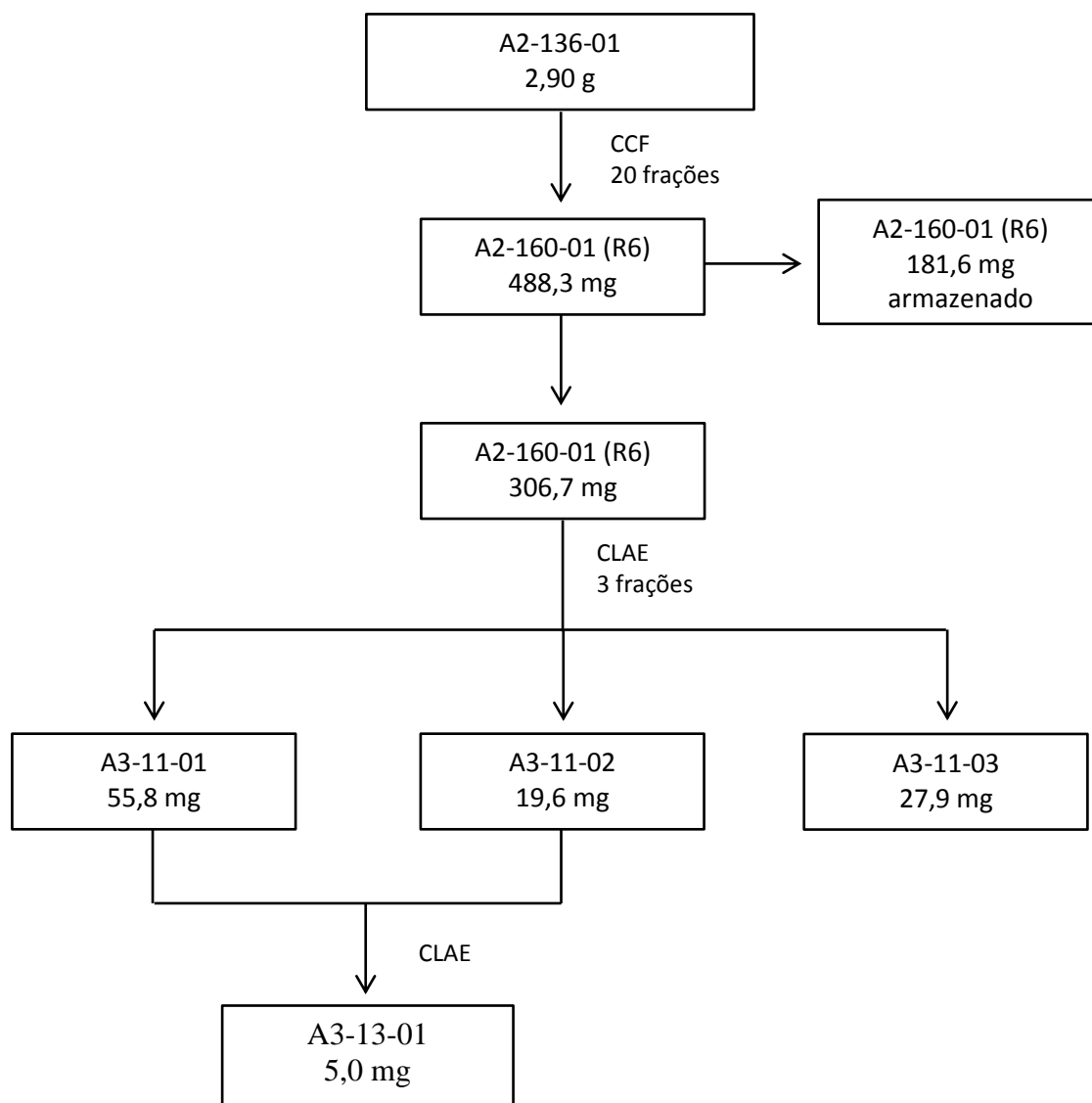


Figura 6.5 - Esquema do estudo fitoquímico do “fracionamento 2” do extrato bruto em etanol das folhas de *Lippia gracilis* (A2-136-01).

A figura 6.6 mostra o esquema geral do “fracionamento 1” e “fracionamento 2” do extrato bruto etanólico de *L. gracilis* (A2-136-01).

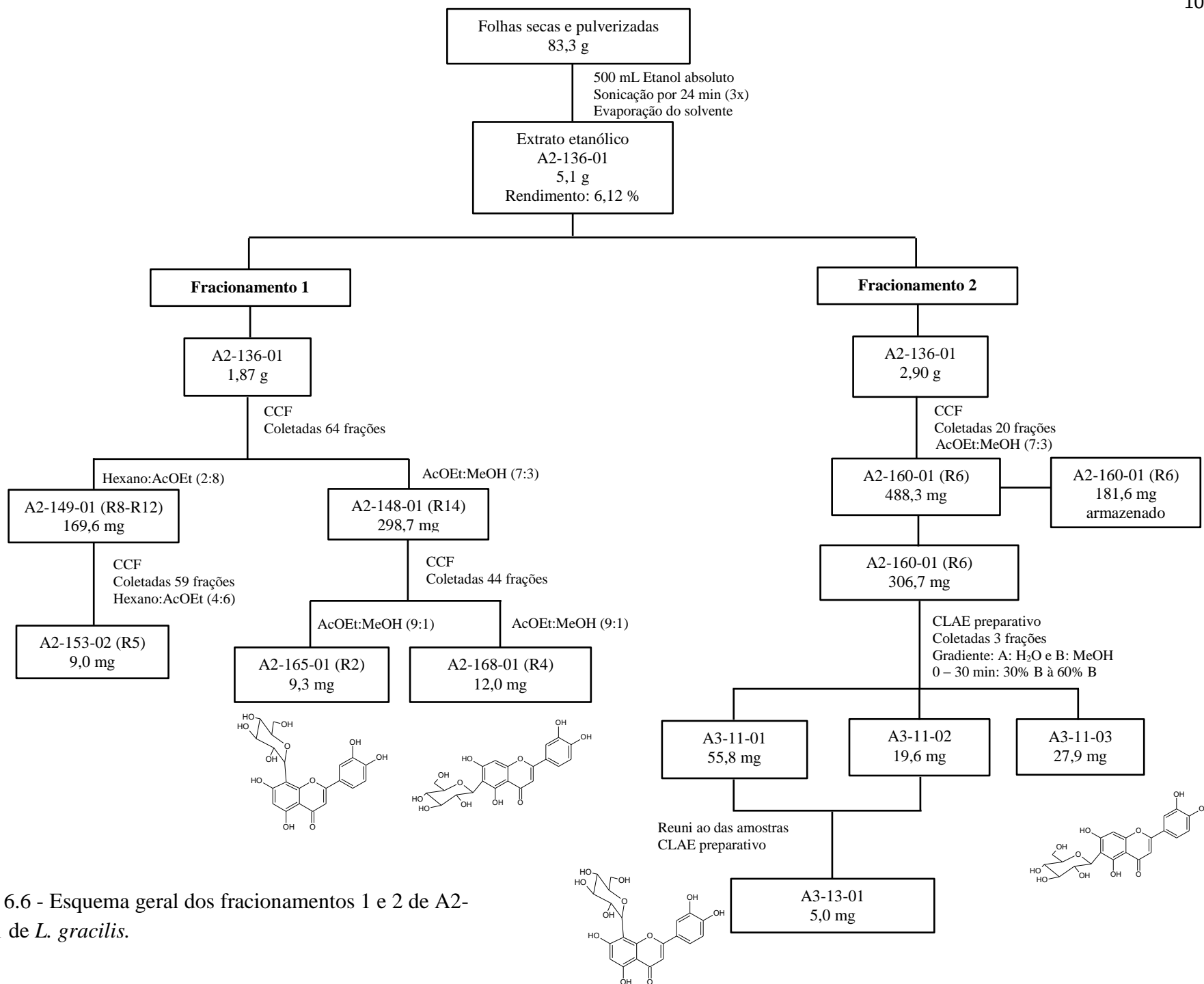


Figura 6.6 - Esquema geral dos fracionamentos 1 e 2 de A2-136-01 de *L. gracilis*.

PUREZA, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

Elucidação estrutural de A2-165-01 e A3-13-01

A substância A2-165-01 foi isolada do extrato etanólico das folhas de *L. gracilis*, de coloração amarela e apresentando absorção característica de flavonoides em CLAE (Figuras 6.7), bem como deslocamentos de bandas quando submetidas à varredura em análise de UV-Vis, utilizando AlCl_3 como agente complexante (Figura 6.9). A mesma substância A3-13-01 (Figura 6.8), foi isolada no “fracionamento 2”, com pureza de 91% por CLAE (utilizada nos trabalhos de quantificação dos extratos).

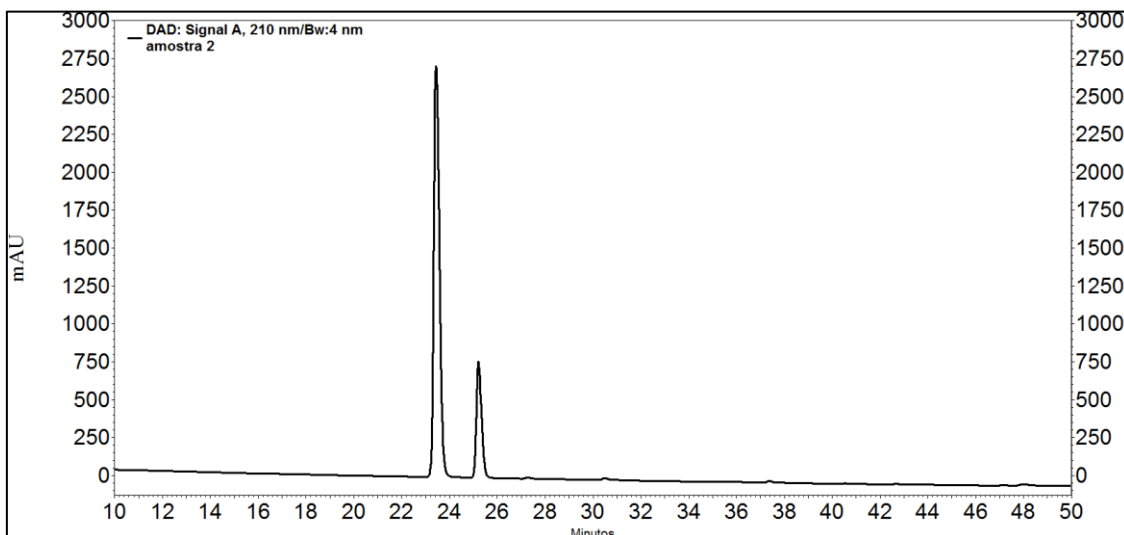


Figura 6.7 - Cromatograma obtido por CLAE de A2-165-01. Condições de análise: Detector UV-Vis, 210 nm, coluna C18, 25 cm x 4,6 mm x 5 μm ., mantida a 40 °C, fluxo de 1 mL/min, volume de injeção: 10 mL. Fase móvel: A: H_2O com 0,1% de ácido acético e B: Metanol. Gradiente 0 – 65 min: 5 % B à 95% B, 65 – 70 min: 95% B, 70 – 75 min: 95% B à 5% de B, 75 – 85 min: 5% B.

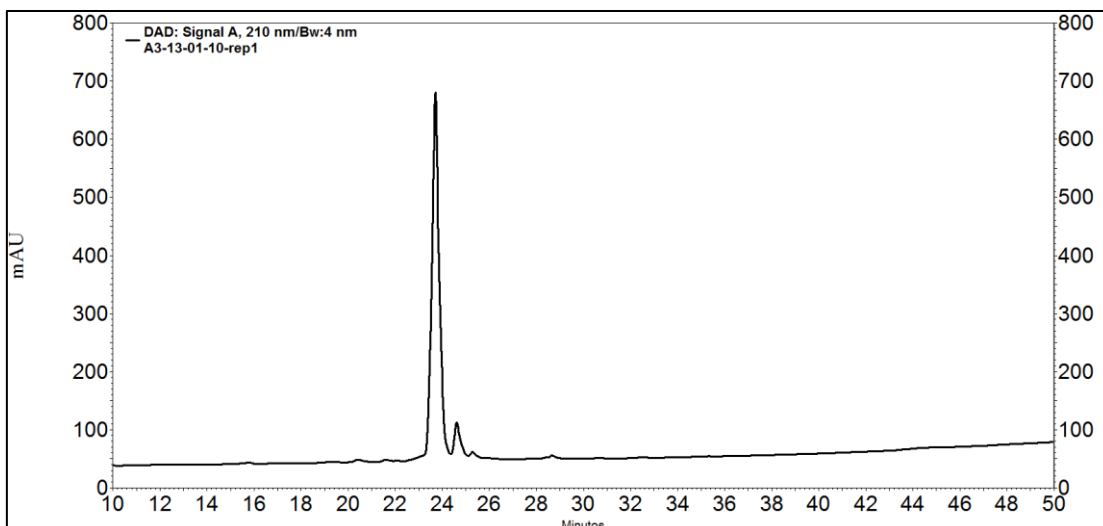


Figura 6.8 - Cromatograma obtido por CLAE de A3-13-01 – 91 % de pureza de área. Condições de análise: Detector UV-Vis, 210 nm, coluna C18, 25 cm x 4,6 mm x 5 μ m,, mantida a 40 $^{\circ}$ C, fluxo de 1 mL/min, volume de injeção: 10 mL. Fase móvel: A: H₂O com 0,1% de ácido acético e B: Metanol. Gradiente 0 – 65 min: 5 % B à 95% B, 65 – 70 min: 95% B, 70 – 75 min: 95% B à 5% de B, 75 – 85 min: 5% B.

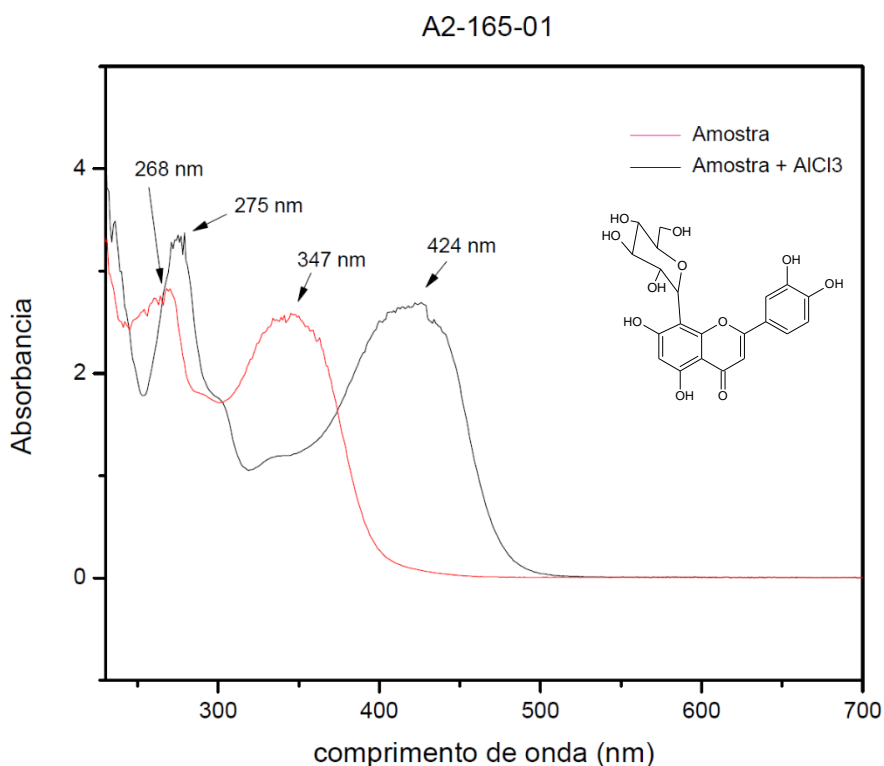


Figura 6.9 - Espectro de varredura UV-Vis de A2-165-01 (solubilizada em metanol), mostrando os deslocamentos de bandas quando complexado com AlCl₃.

Na análise por espectrometria de massas com ionização por eletrospray (modo negativo) foi possível identificar a massa da substância A2-165-01 (Figura 6.10), correspondendo a 448 g/mol. Devido à análise ser realizada no modo negativo, houve uma desprotonação, sendo no espectro observando uma massa de 447,11 g/mol. Esta massa corresponde à massa de duas possíveis flavonas orientina e isoorientina.

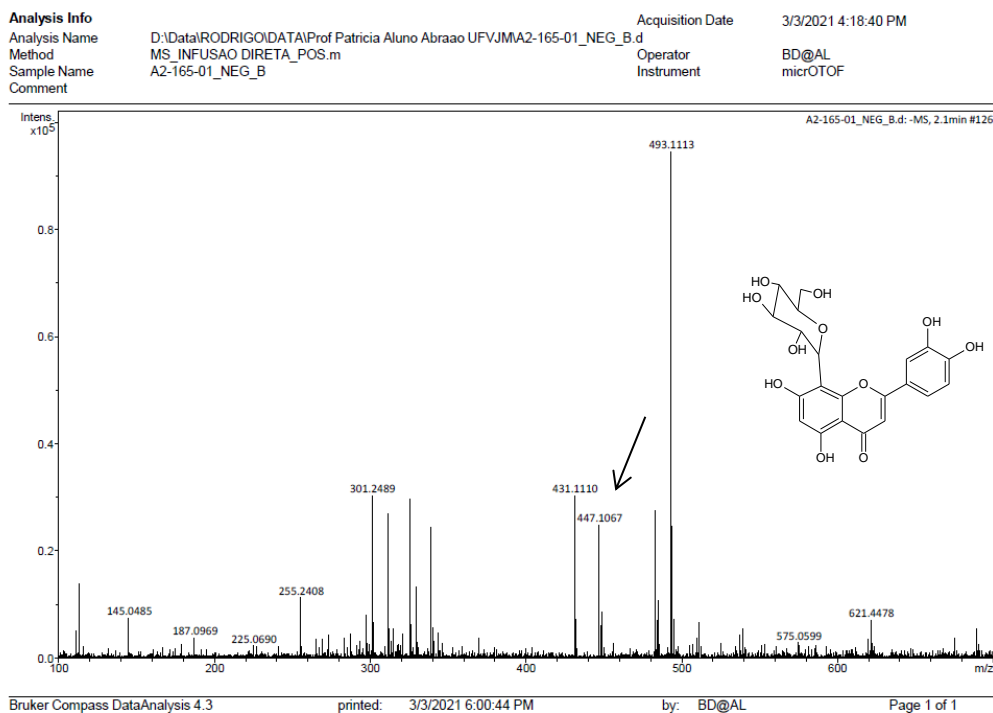


Figura 6.10 - Espectro de massas com ionização por eletrospray (modo negativo) da substância A2-165-01.

O espectro no infravermelho (IV) (Figura 6.11) mostra as bandas de absorção característica da classe da substância. Em 3350 cm^{-1} (estiramento de ligação O-H), 2921 e 2846 cm^{-1} (estiramento de ligação C-H alifática e/ou alicíclica), 1432 e 1376 cm^{-1} (deformações de ligação C-H alifática e/ou alicíclica), 1602 e 1432 cm^{-1} (estiramento de ligação C-O-C) (SILVERSTEIN *et al*, 1994).

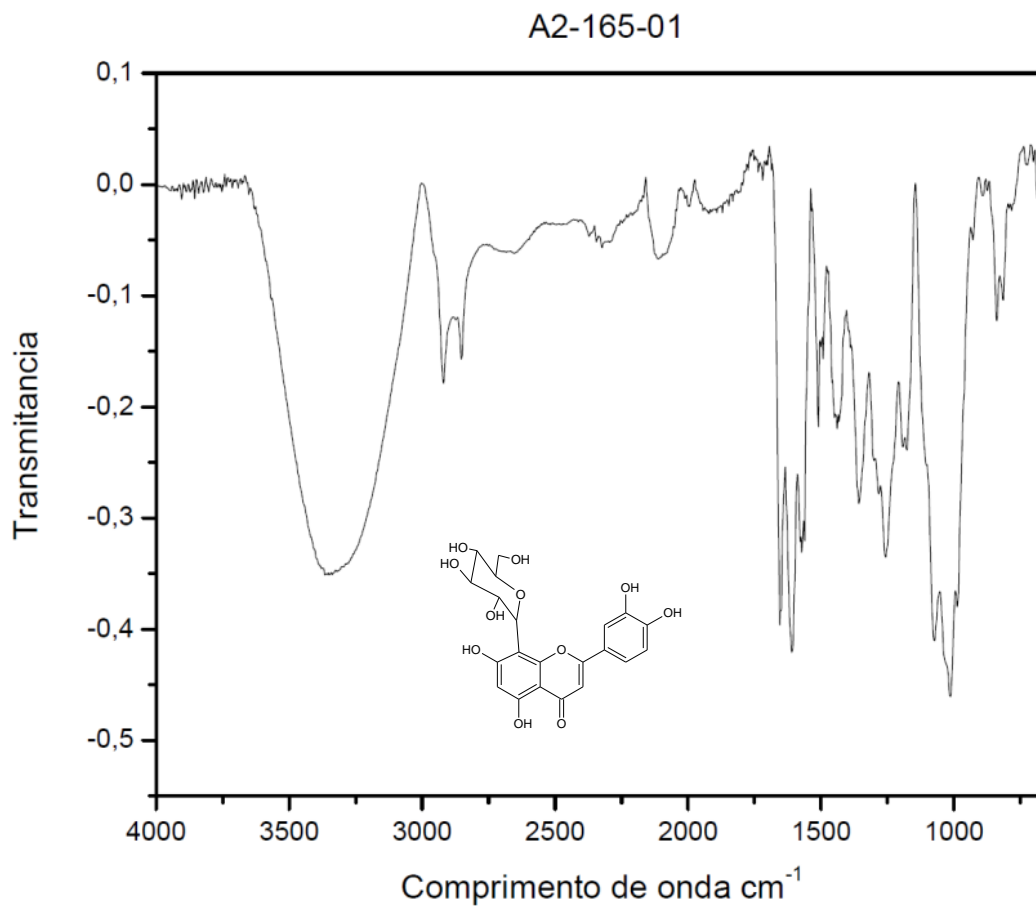


Figura 6.11 - Espectro de IV da substância A2-165-01 (orientina).

O espectro de RMN de ^1H e suas expansões (Figuras 6.12 e 6.13) mostram os singletos em δ_{H} 6,27, 6,65, 7,48 e 13,17, referentes aos átomos de hidrogênio H-6, H-3, H-2' e OH da posição C-5. Três dupletos foram registrados em δ_{H} 4,68 ($J= 9,9$ Hz) atribuído à H-1'', δ_{H} 6,86 ($J= 8,1$ Hz) atribuído à H-5' e δ_{H} 7,53 ($J=8,4$ Hz) atribuído à H-6'. Os sinais dos hidrogênios em H-2' e H-6' devido à resolução do equipamento, não desdobraram em dupletos e duplo dupletos, respectivamente. Estes deslocamentos são compatíveis com os deslocamentos da orientina, nome IUPAC: 8-(β -D-Glicopiranosil)-3',4',5,7-tetrahidroxiflavona, conforme XIN ZHOU *et al.*, (2005) (Tabela 6.10).

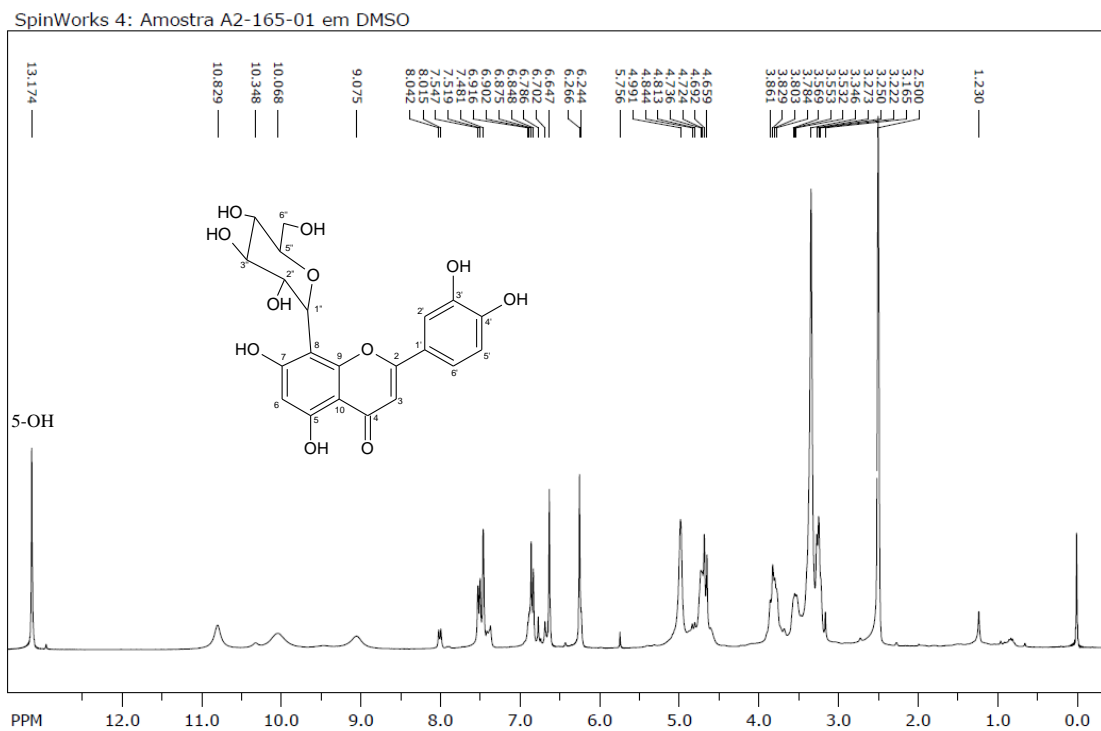


Figura 6.12 - Espectro de RMN de ^1H de A2-165-01 (orientina) (DMSO; 300 MHz).

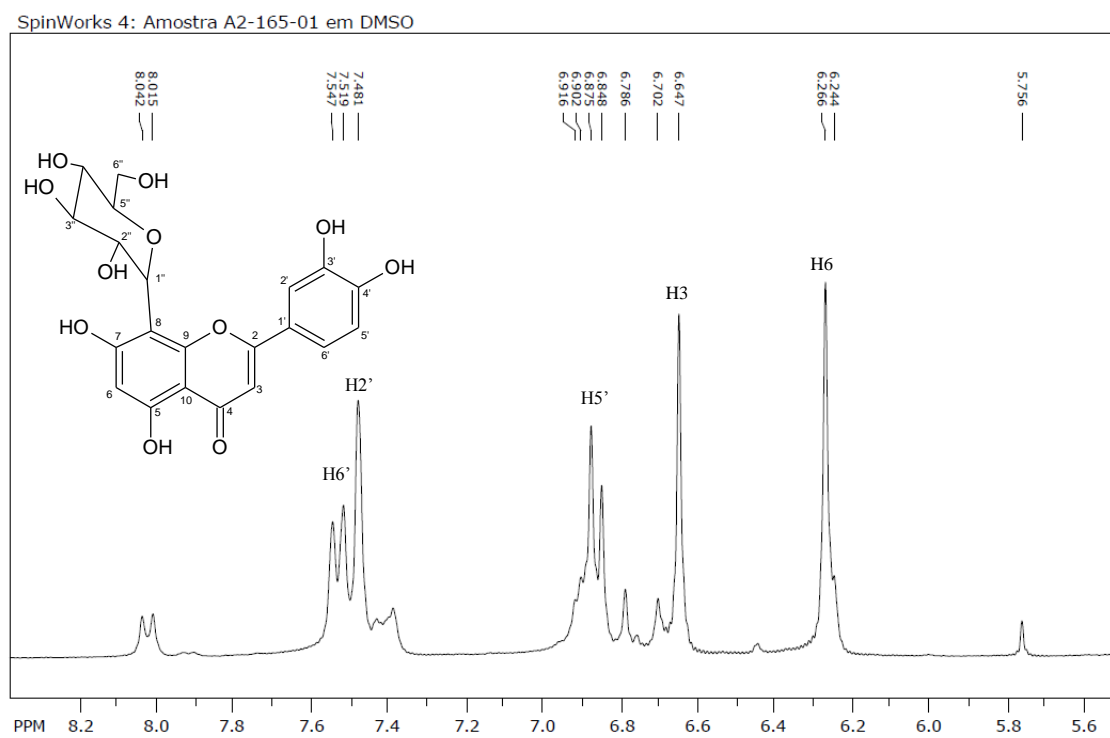


Figura 6.13 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de A2-165-01 (orientina) (DMSO; 300 MHz).

Quanto ao espectro de RMN de ^{13}C e suas expansões (Figuras 6.14, 6.15 e 6.16) observaram-se todos os 21 sinais da orientina (Tabela 6.10). Podemos observar o sinal em δ_{C} 182,04 atribuído ao átomo de carbono C-4 da carbonila (C=O) do anel aromático C. Os sinais em δ_{C} 160,38 e 162,58 foram atribuídos aos átomos de carbono hidroxilados C-5 e C-7, respectivamente. Outros sinais de carbonos hidroxilados são em δ_{C} 145,82 e 149,61, correspondendo a C-3' e C-4', respectivamente. O sinal em δ_{C} 104,55 corresponde ao átomo de carbono C-8, onde está o grupo substituinte glicosídeo, sendo confirmados todos seus sinais (XIN ZHOU *et al.*, 2005).

Tabela 6.10 - Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (DMSO, 75 MHz) e de ^1H (DMSO, 300 MHz) de A2-165-01 com dados da literatura (XIN ZHOU *et al.*, 2005).

Posição	Orientina δ_{C} Xin Zhou <i>et al.</i> , 2005	Orientina δ_{H} Xin Zhou <i>et al.</i> , 2005	A2-165-01 δ_{C}	A2-165-01 δ_{H}
C-2	164,16		164,11	
C-3	102,41	(6,65; s)	102,43	6,65 (s)
C-4	182,03		182,04	
C-5	160,47	(13,15; s; OH)	160,38	13,17 (s; OH)
C-6	98,31	(6,25; s)	98,07	6,27 (s)
C-7	162,80		162,58	
C-8	104,65		104,55	
C-9	156,01		156,01	
C-10	103,99		104,05	
C-1'	121,97		122,03	
C-2'	114,07	(7,44; d; $J= 2,1$ Hz)	114,15	7,48 (s)
C-3'	145,95		145,82	
C-4'	149,90		149,61	
C-5'	115,78	(6,90; d; $J= 8,2$ Hz)	115,65	6,86 (d; $J= 8,1$ Hz)
C-6'	119,45	(7,50; dd; $J= 2,1; 8,1$ Hz)	119,36	7,53 (d; $J= 8,4$ Hz)
C-1''	73,50	(4,72; d; $J= 9,0$ Hz)	73,39	4,68 (d; $J= 9,9$ Hz)
C-2''	70,90		70,69	
C-3''	78,88		78,76	
C-4''	70,83		69,76	
C-5''	82,04		82,02	
C-6''	61,76		61,57	

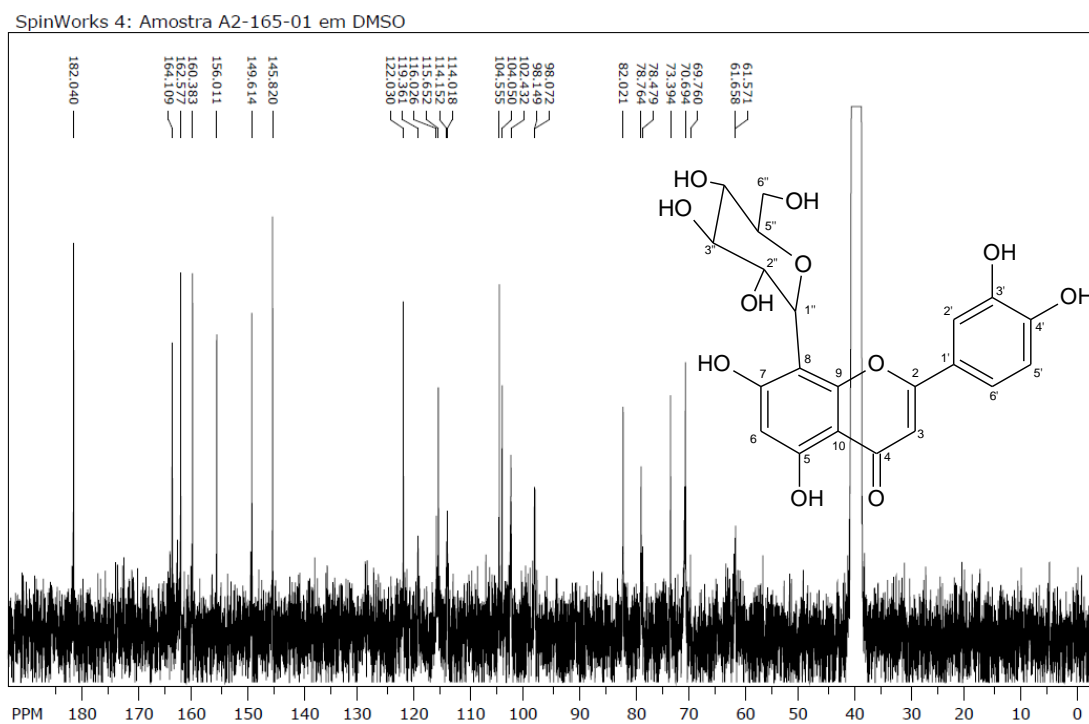


Figura 6.14 - Espectro de RMN de ^{13}C de A2-165-01 (orientina) (DMSO; 75 MHz).

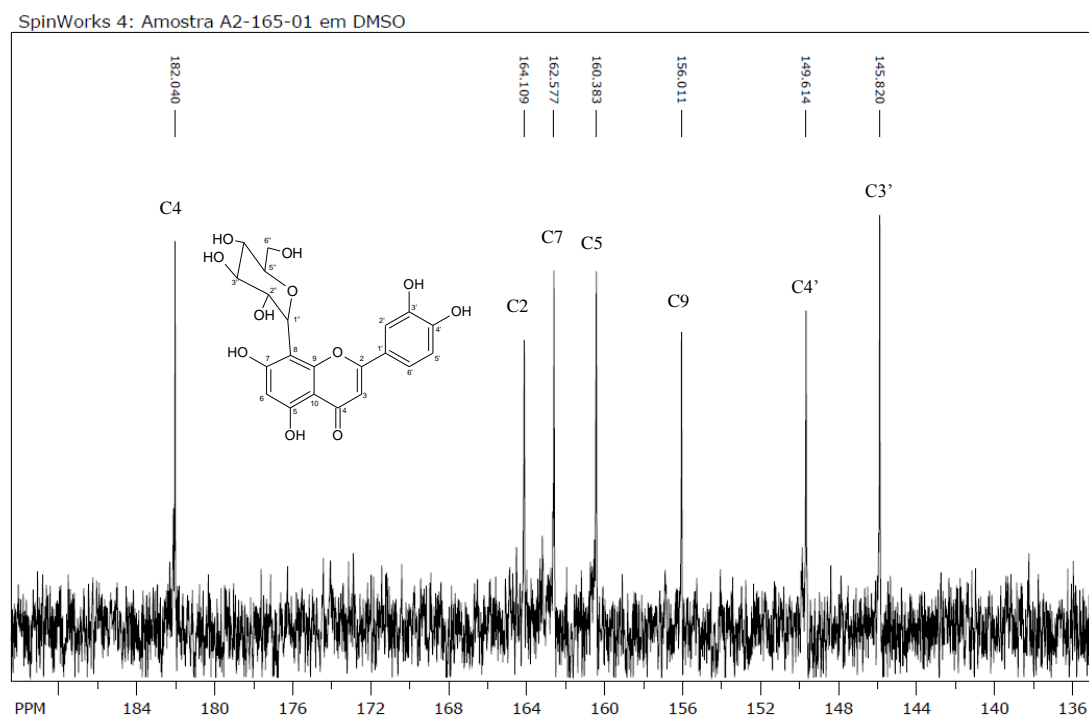


Figura 6.15 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de A2-165-01 (orientina) (DMSO; 75 MHz).

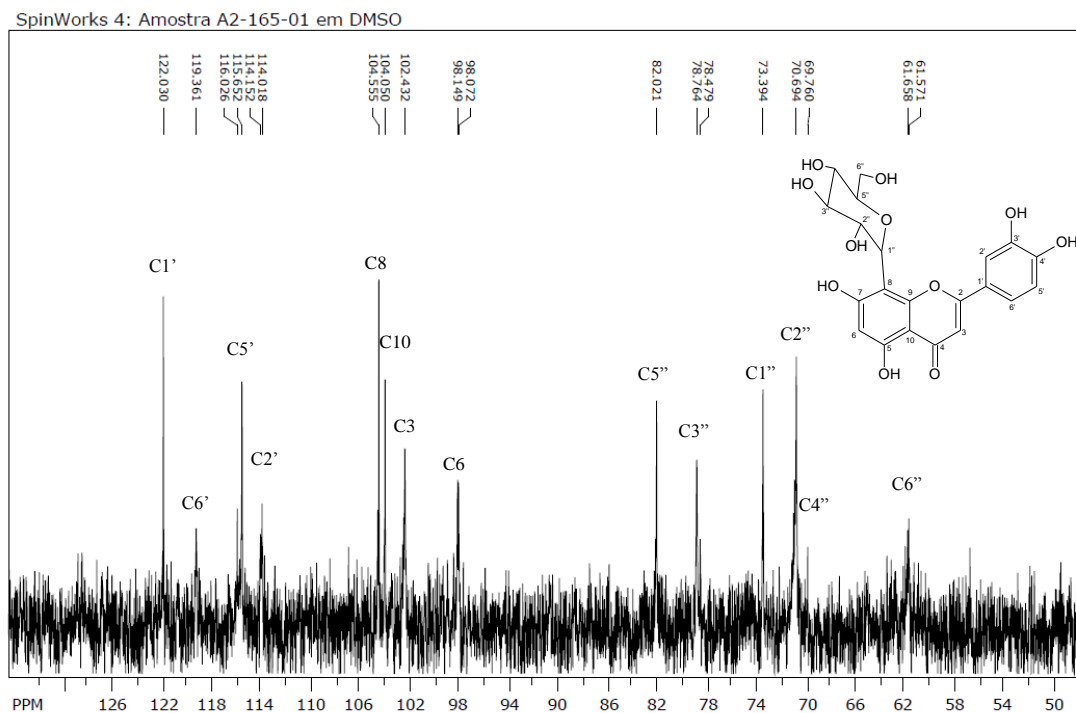


Figura 6.16 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de A2-165-01 (orientina) (DMSO; 75 MHz).

Através do subespectro DEPT-135 (Figura 6.17) foi possível confirmar a presença dos átomos de carbono metínicos, metílicos e não hidrogenados. No Espectro HSQC-editado foram confirmados os hidrogênios ligados a carbonos, principalmente os singletos de C-3 e C-6, bem como os dupletos de C-5', C-6' e C-1'' (Figura 6.18).

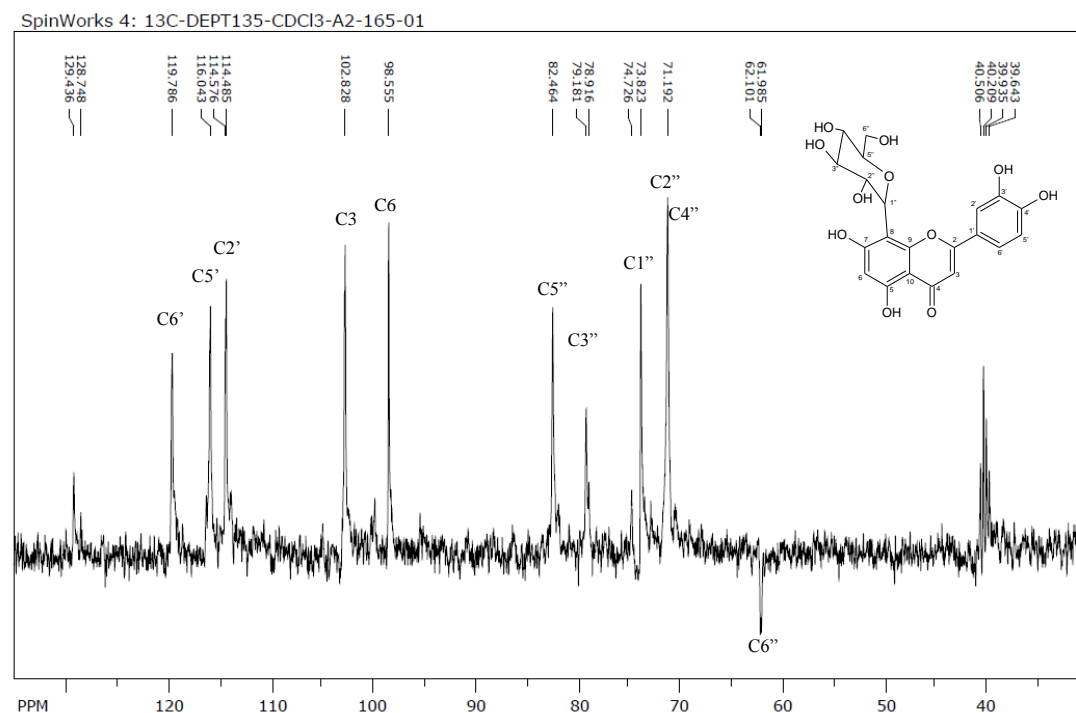


Figura 6.17 - Espectro DEPT-135 de A2-165-01 (orientina) (DMSO; 75 MHz).

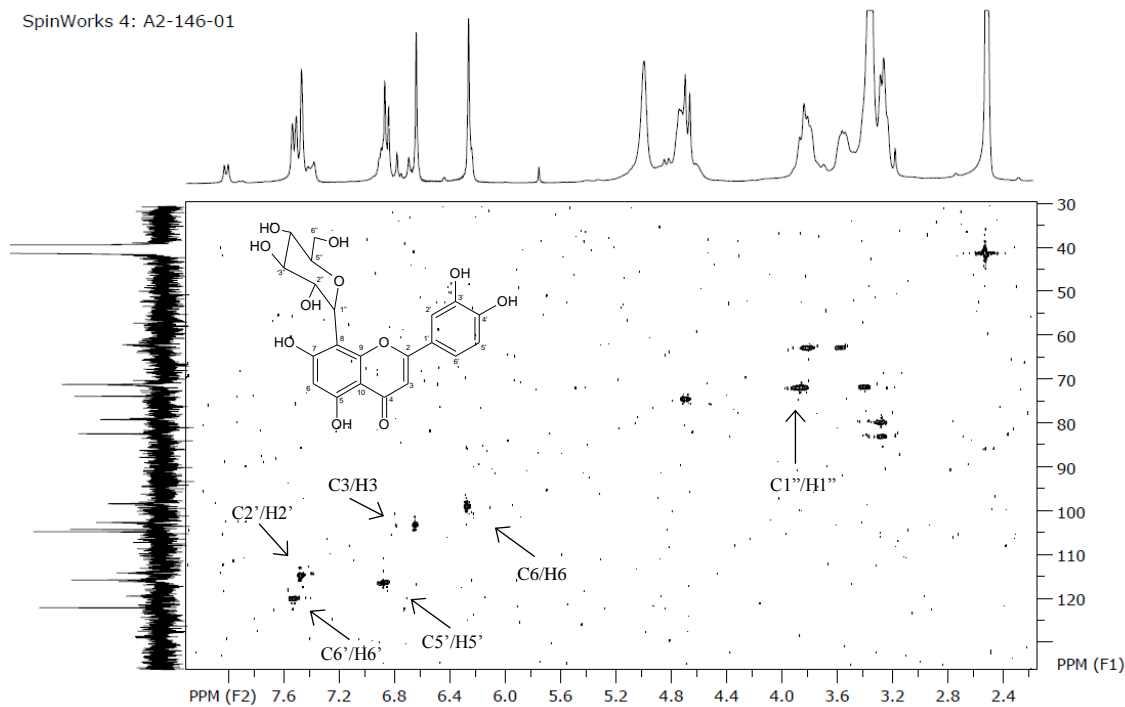


Figura 6.18 - Espectro HSQC-editado de A2-165-01 (orientina) (DMSO; 300 MHz).

Elucidação estrutural de A2-168-01 e A3-11-03

A substância A2-168-01 foi isolada do extrato etanólico das folhas de *L. gracilis*, de coloração amarela, apresentando absorção característica de flavonoides em CLAE (Figura 6.19), bem como deslocamentos de bandas quando submetidas à varredura em análise de UV-Vis, utilizando AlCl_3 como agente complexante (Figura 6.21). A mesma substância A3-11-03 (Figura 6.20) foi isolada no “fracionamento 2”, com pureza de 86% por CLAE.

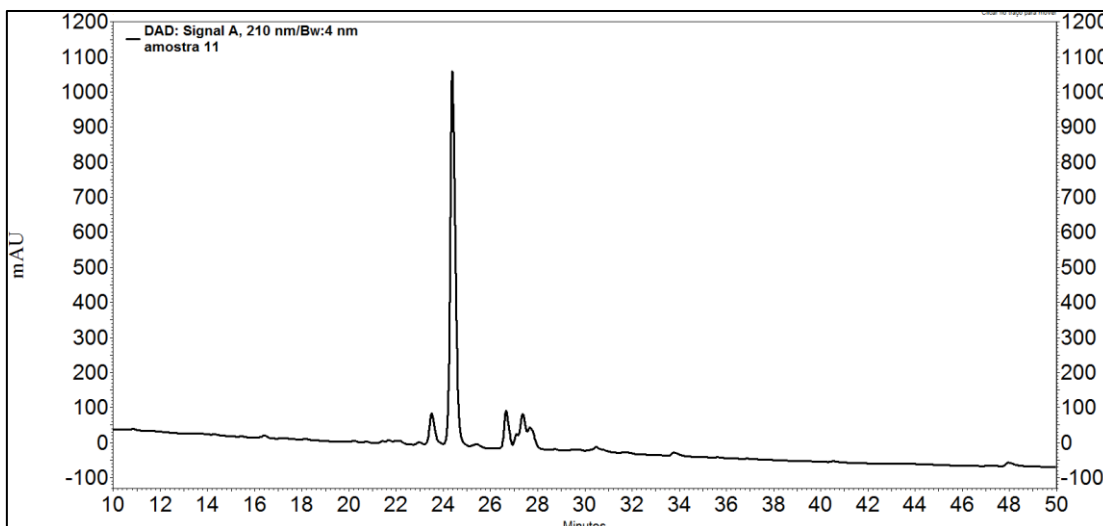


Figura 6.19 - Cromatograma obtido por CLAE de A2-168-01. Condições de análise: Detector UV-Vis, 210 nm, coluna C18, 25 cm x 4,6 mm x 5 μ m, mantida a 40 °C, fluxo de 1 mL/min, volume de injeção: 10 mL. Fase móvel: A: H₂O com 0,1% de ácido acético e B: Metanol. Gradiente 0 – 65 min: 5 % B à 95% B, 65 – 70 min: 95% B, 70 – 75 min: 95% B à 5% de B, 75 – 85 min: 5% B.

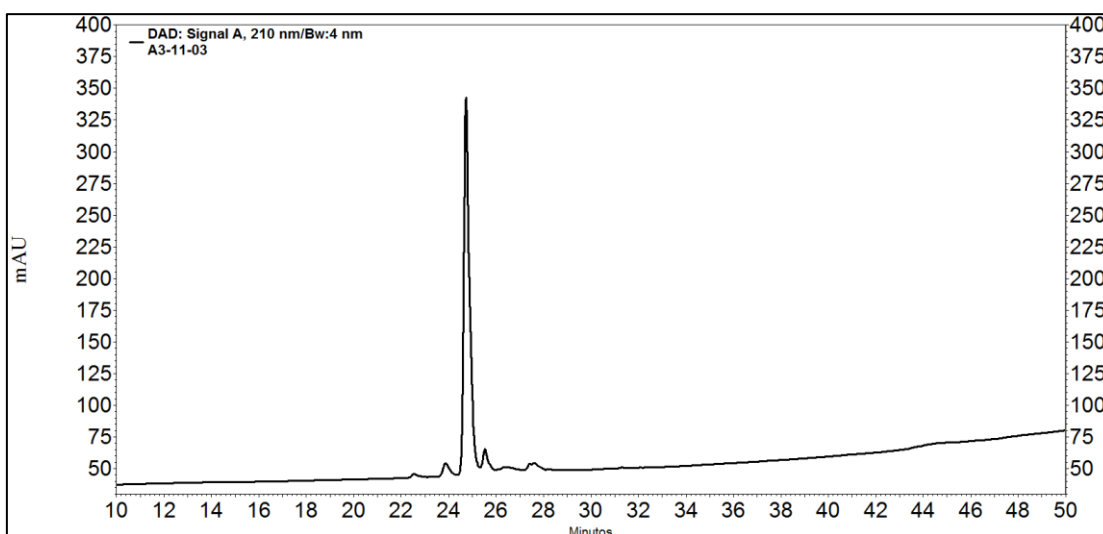


Figura 6.20 - Cromatograma obtido por CLAE de A3-11-03. Amostra obtida no Fracionamento 2 – 86% de pureza. Condições de análise: Detector UV-Vis, 210 nm, coluna C18, 25 cm x 4,6 mm x 5 μ m, mantida a 40 °C, fluxo de 1 mL/min, volume de injeção: 10 mL. Fase móvel: A: H₂O com 0,1% de ácido acético e B: Metanol. Gradiente 0 – 65 min: 5 % B à 95% B, 65 – 70 min: 95% B, 70 – 75 min: 95% B à 5% de B, 75 – 85 min: 5% B.

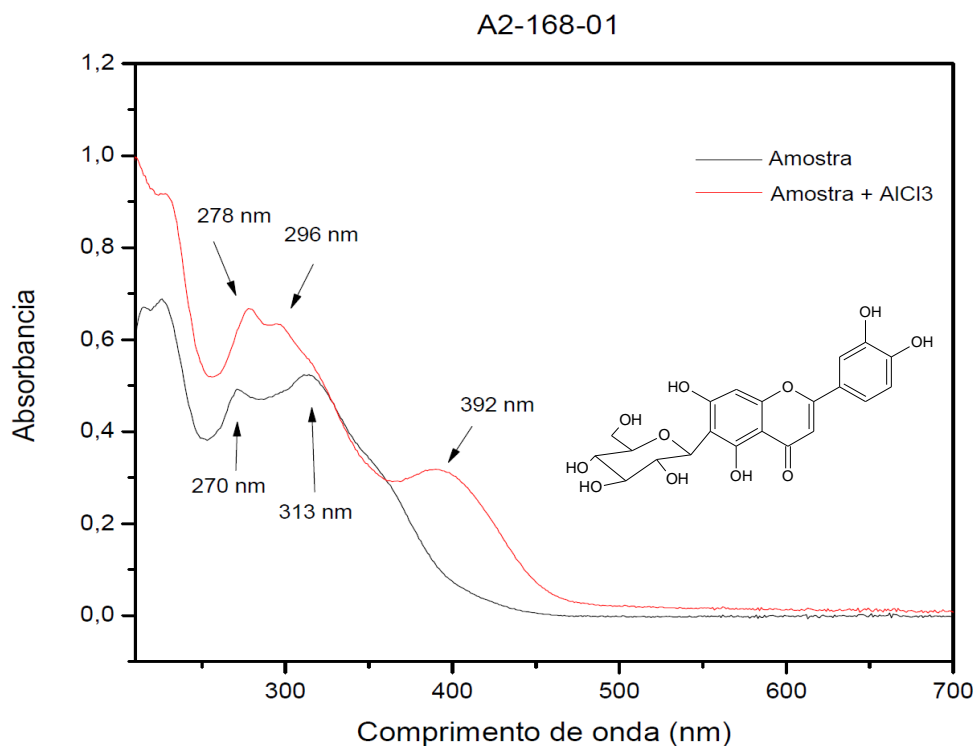


Figura 6.21 - Espectro de varredura UV-Vis de A2-168-01 (solubilizada em metanol), mostrando os deslocamentos de bandas quando complexado com AlCl_3 .

Pela técnica de espectrometria de massas com ionização por eletrospray, no modo negativo, foi possível identificar a massa de 448 g/mol (Figura 6.22).

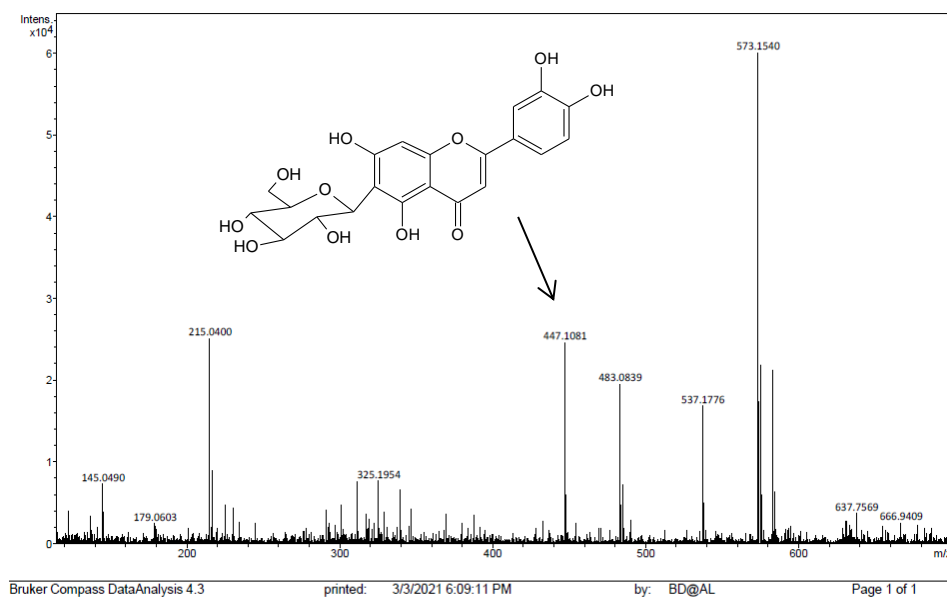


Figura 6.22 - Espectro de massas com ionização por eletrospray (modo negativo) da substância A2-168-01.

O espectro de infravermelho (Figura 6.23) mostra as bandas de absorção características da classe da substância. Em 3350 cm^{-1} (estiramento de ligação O-H), 2930 e 2850 cm^{-1} (estiramento de ligação C-H alifática e/ou alicíclica), 1440 e 1382 cm^{-1} (deformações de ligação C-H alifática e/ou alicíclica), 1602 e 1432 cm^{-1} (estiramento de ligação C-O-C) (SILVERSTEIN *et al.*, 1994).

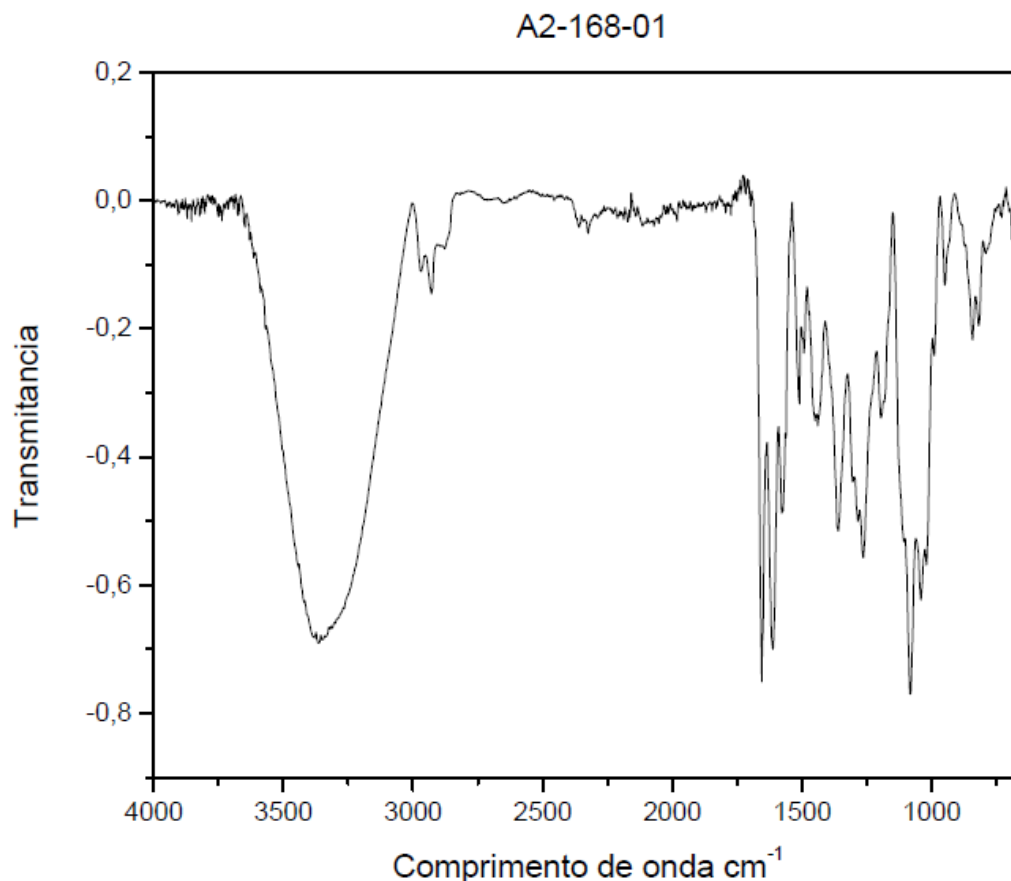


Figura 6.23 - Espectro de IV da substância A2-168-01.

Pelo espectro de RMN de ^1H e suas expansões (Figuras 6.24 e 6.25) observamos os singletos em δ_{H} 6,48, 6,68 e 13,57, referentes aos átomos de hidrogênio H-8, H-3 e OH da posição C-5. Apenas um duplete foi possível identificar, em δ_{H} 6,88 ($J = 8,1\text{ Hz}$), atribuído à H-5'. Estes deslocamentos são compatíveis com os deslocamentos da isoorientina, nome IUPAC: 6-(β -D-Glicopiranosil)-3',4',5,7-tetrahydroxiflavona, conforme HELANA N. MICHAEL, *et al.*, (2010) (Tabela 6.11).

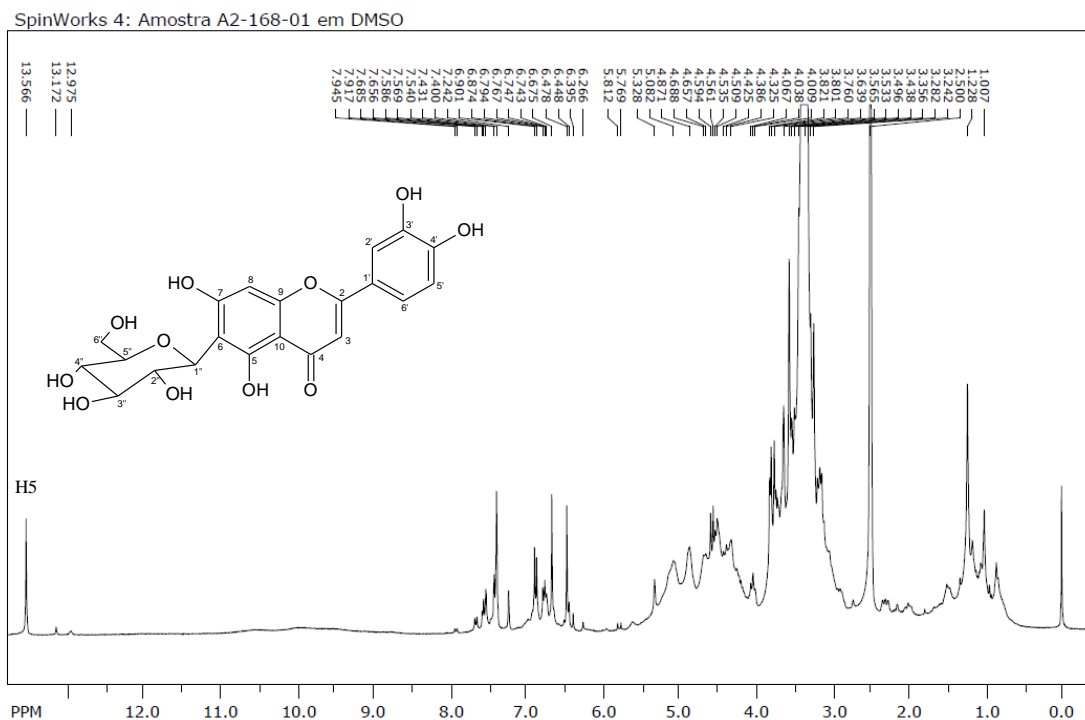


Figura 6.24 - Espectro de RMN de ^1H de A2-168-01 (isorientina) (DMSO; 300 MHz).

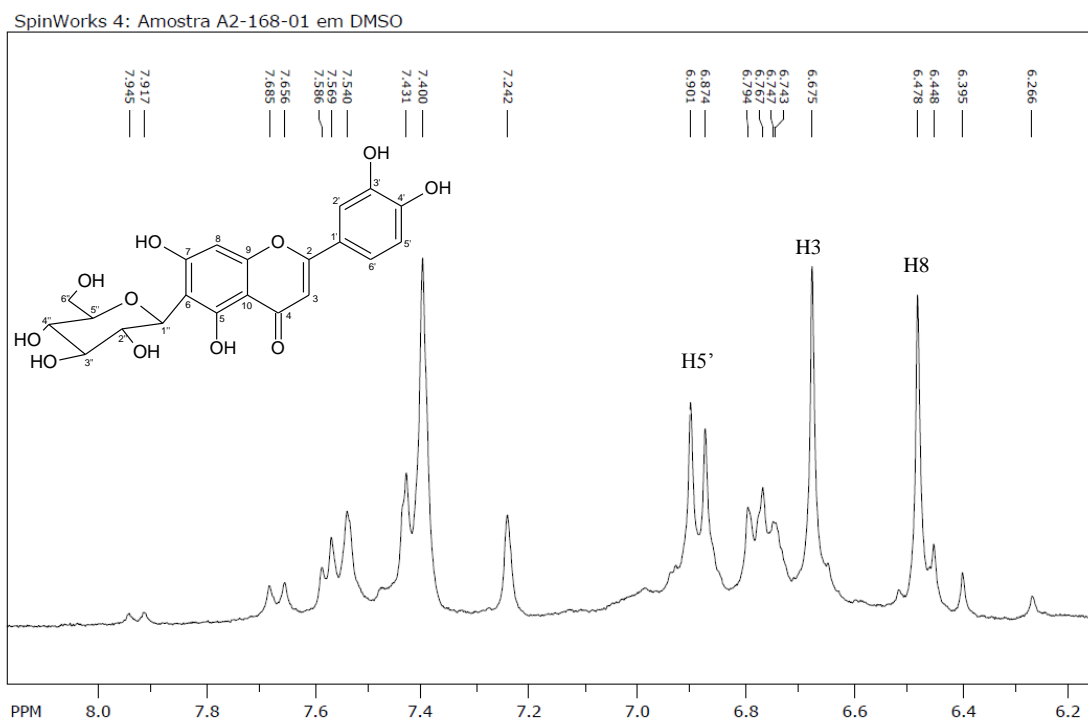


Figura 6.25 - Expansão do espectro de RMN de ^1H de A2-168-01 (isorientina) (DMSO; 300 MHz).

Analisando o espectro de RMN de ^{13}C e suas expansões (Figuras 6.26, 6.27, 6.28 e 6.29), dos 21 sinais presentes na estrutura da molécula, apenas quatro destes apresentaram-se com baixa intensidade, em nível de ruído, sendo confirmados no espectro bidimensional HSQC (Tabela 6.11). Podemos observar o sinal em δ_{C} 181,95 atribuído ao átomo de carbono C-4 da carbonila (C=O) do anel aromático C. Os sinais em δ_{C} 160,72 e 163,29 foram atribuídos aos átomos de carbono hidroxilados C-5 e C-7, respectivamente. Outros sinais de carbonos hidroxilados são em δ_{C} 145,78 e 149,73, correspondendo a C-3' e C-4', respectivamente. O sinal em δ_{C} 108,89, corresponde ao átomo de carbono C-6, onde está o grupo substituinte glicosídeo, na qual foram confirmados todos seus sinais (HELANA N. MICHAEL, *et al.*, 2010).

Tabela 6.11 - Comparação dos deslocamentos químicos de RMN de ^{13}C (DMSO, 75 MHz) e de ^1H (DMSO, 300 MHz) de A2-168-01 com dados da literatura (Helana N. Michael, *et al.*, 2010).

Posição	Isoorientina δ_{C} Helana N. Michael, <i>et al.</i> , 2010	Isoorientina δ_{H} Helana N. Michael, <i>et al.</i> , 2010	A2-168-01 δ_{C}	A2-168-01 δ_{H}
C-2	163,30		163,66	
C-3	102,71	(6,59; s)	102,84	6,68 (s)
C-4	181,70		181,95	
C-5	160,57		160,72	13,57 (s; OH)
C-6	108,7		108,89	
C-7	163,0		163,29	
C-8	93,4	(6,53; s)	93,57	6,48 (s)
C-9	156,2		156,21	
C-10	103,3		104,15	
C-1'	121,30		121,43 *	
C-2'	113,2	(7,4; d; $J= 2,5$ Hz)	113,63 *	
C-3'	145,64		145,78	
C-4'	149,53		149,73	
C-5'	115,9	(6,93; d; $J= 8,0$ Hz)	116,09 *	6,88 (d; $J= 8,1$ Hz)
C-6'	118,83	(7,39; dd; $J= 2,5; 8,0$ Hz)	118,09 *	
C-1''	78,9	(4,82; d; $J= 10,0$ Hz)	78,94	
C-2''	72,42		73,07	
C-3''	70,82		69,91	
C-4''	71,13		70,65	
C-5''	81,2		81,91	
C-6''	61,5		61,52	

* Sinais pouco intensos de ^{13}C , confirmados no HSQC.

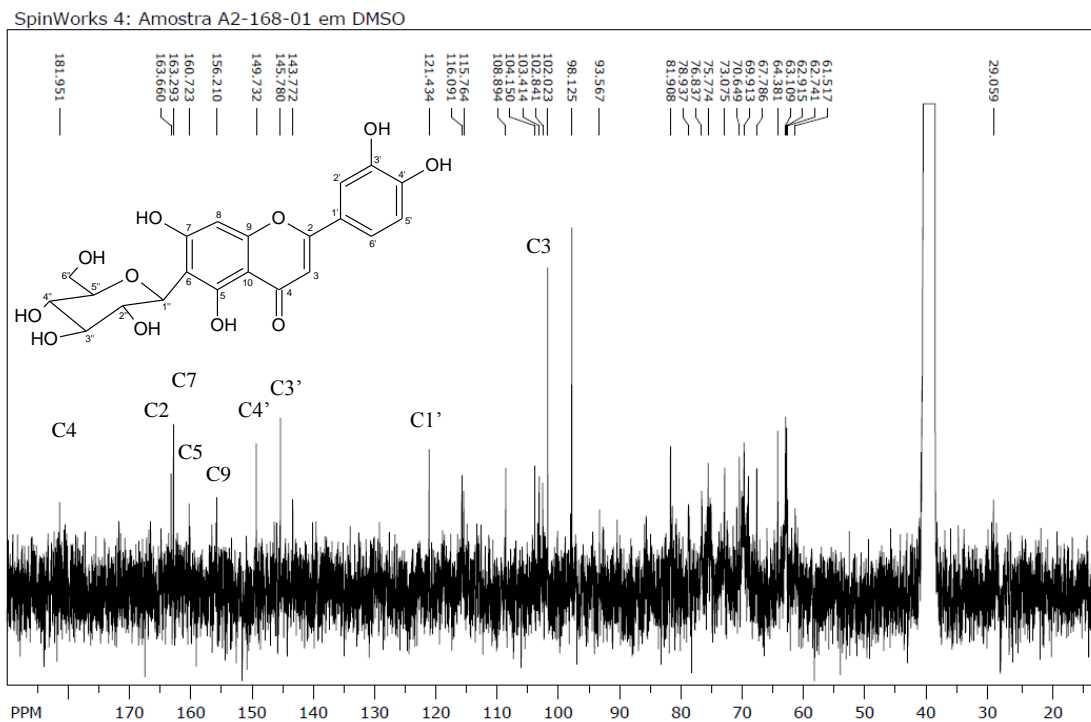


Figura 6.26 - Espectro de RMN de ^{13}C de A2-168-01 (isorientina) (DMSO; 75 MHz).

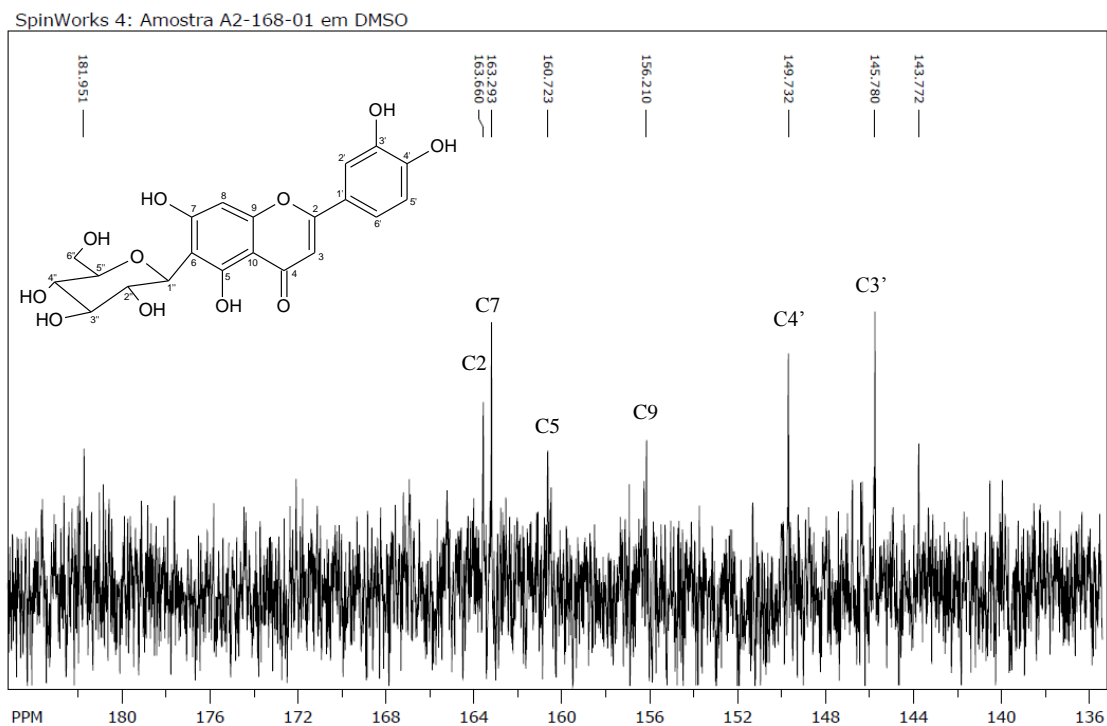


Figura 6.27 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de A2-168-01 (isorientina) (DMSO; 75 MHz).

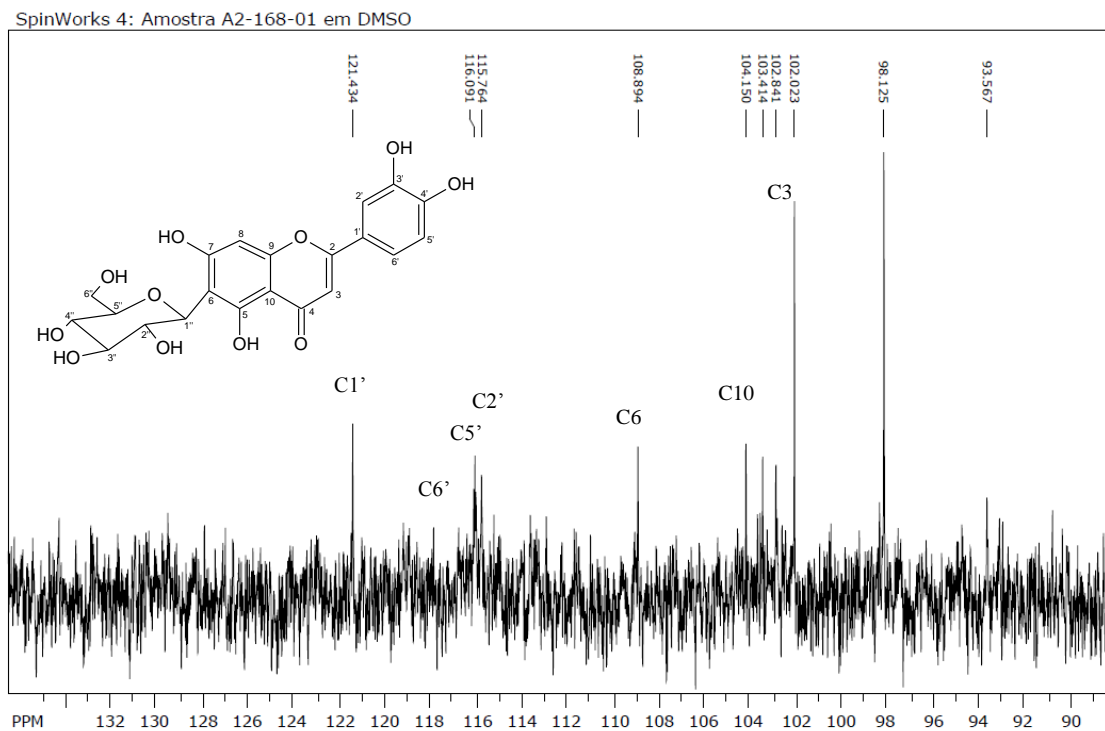


Figura 6.28 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de A2-168-01 (isoorientina) (DMSO; 75 MHz).

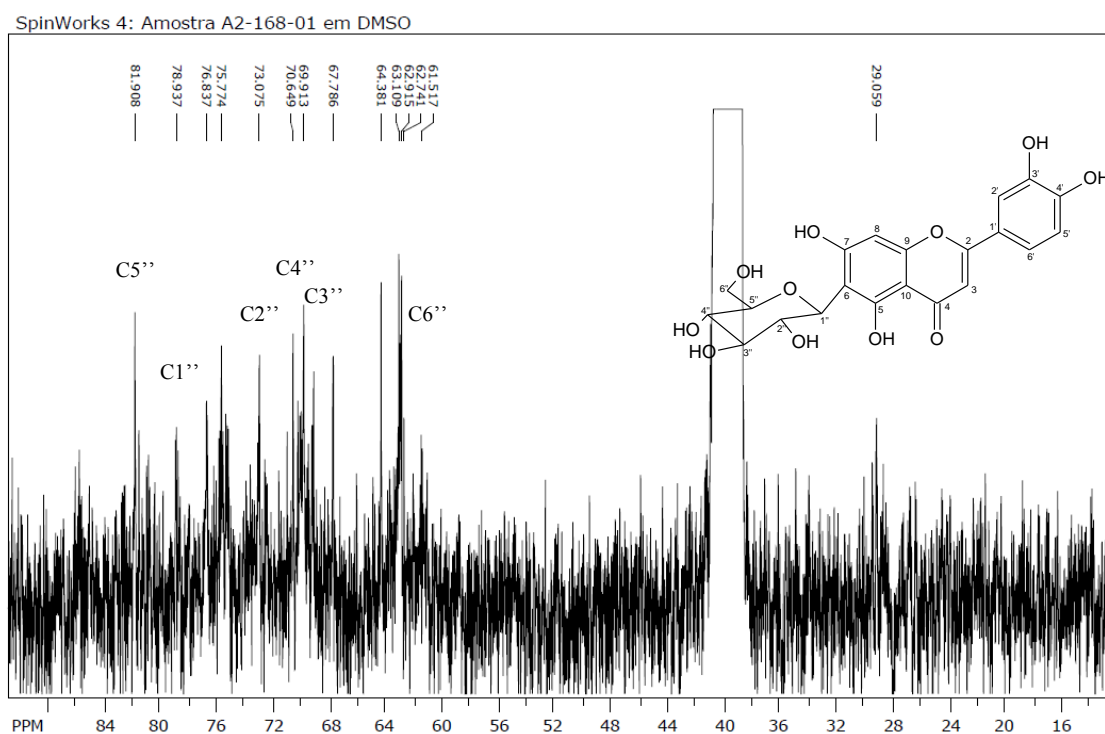


Figura 6.29 - Expansão do espectro de RMN de ^{13}C de A2-168-01 (isoorientina) (DMSO; 75 MHz).

Através do subspectro DEPT-135 (Figura 6.30) foi possível confirmar a presença dos átomos de carbono metínicos, metílicos e não hidrogenados. O espectro HSQC-editado e suas expansões foram confirmados os hidrogênios ligados a carbonos, principalmente os singletos de C-3 e C-8, bem como o duplete de C-5' (Figuras 6.31, 6.32 e 6.33).

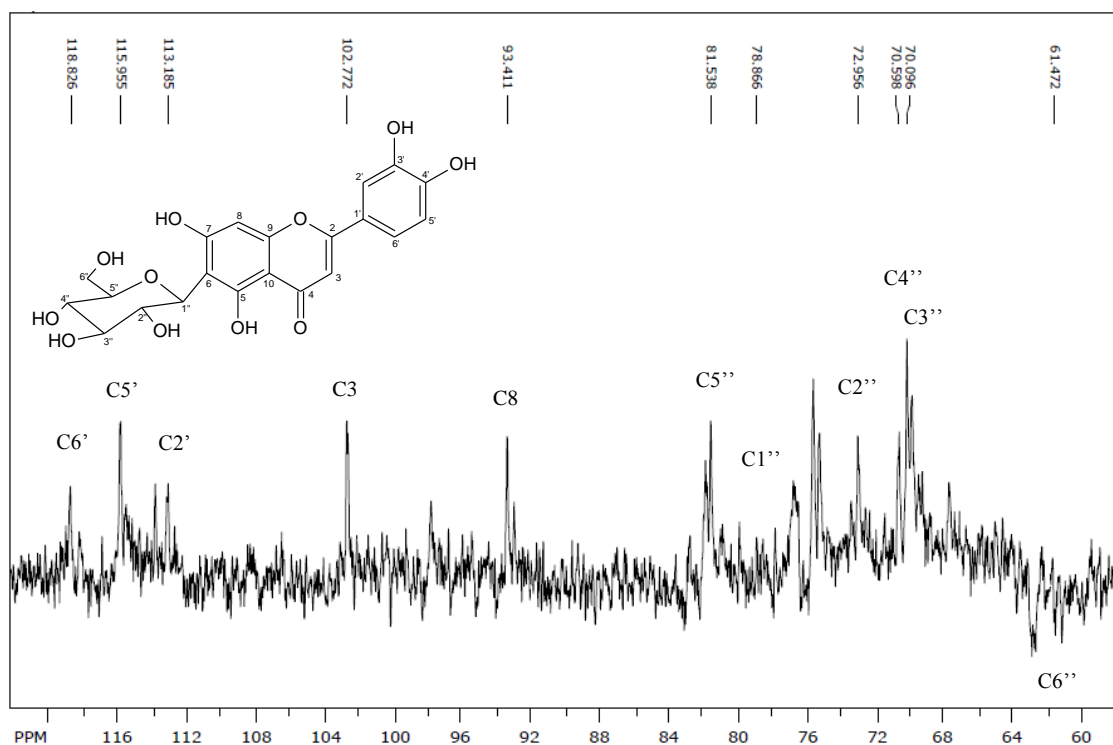


Figura 6.30 - Espectro DEPT-135 de A2-168-01 (isoorientina) (DMSO; 75 MHz).

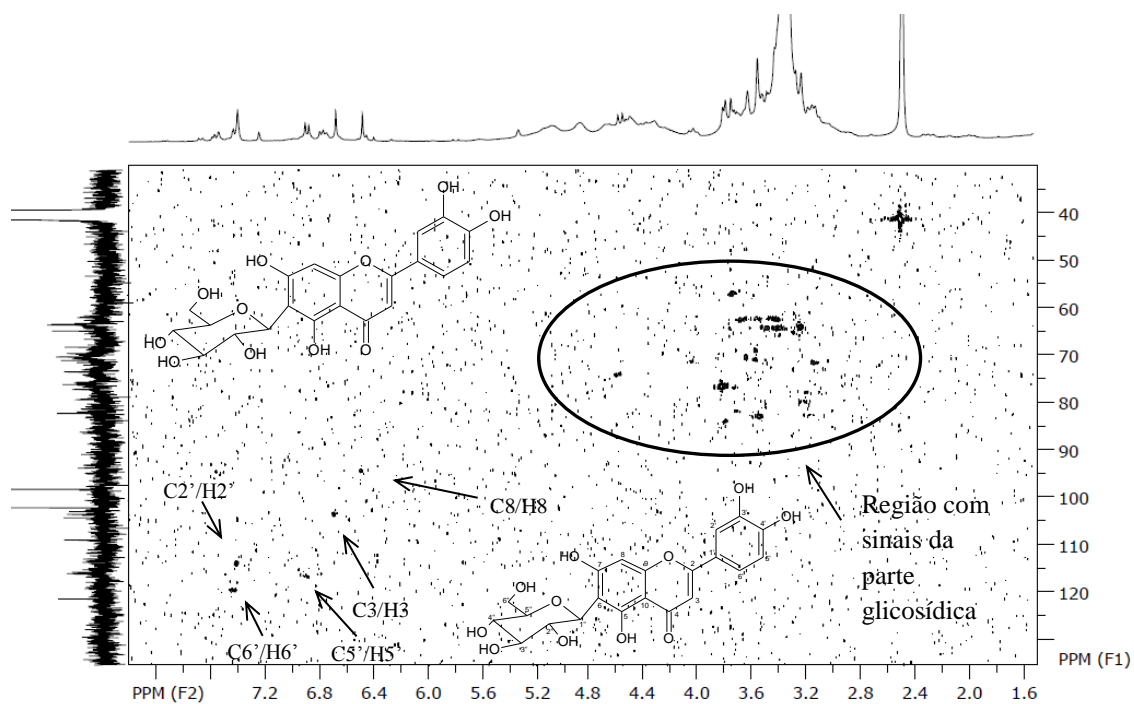


Figura 6.31 - Espectro HSQC-editado de A2-168-01 (isorientina) (DMSO; 300 MHz).

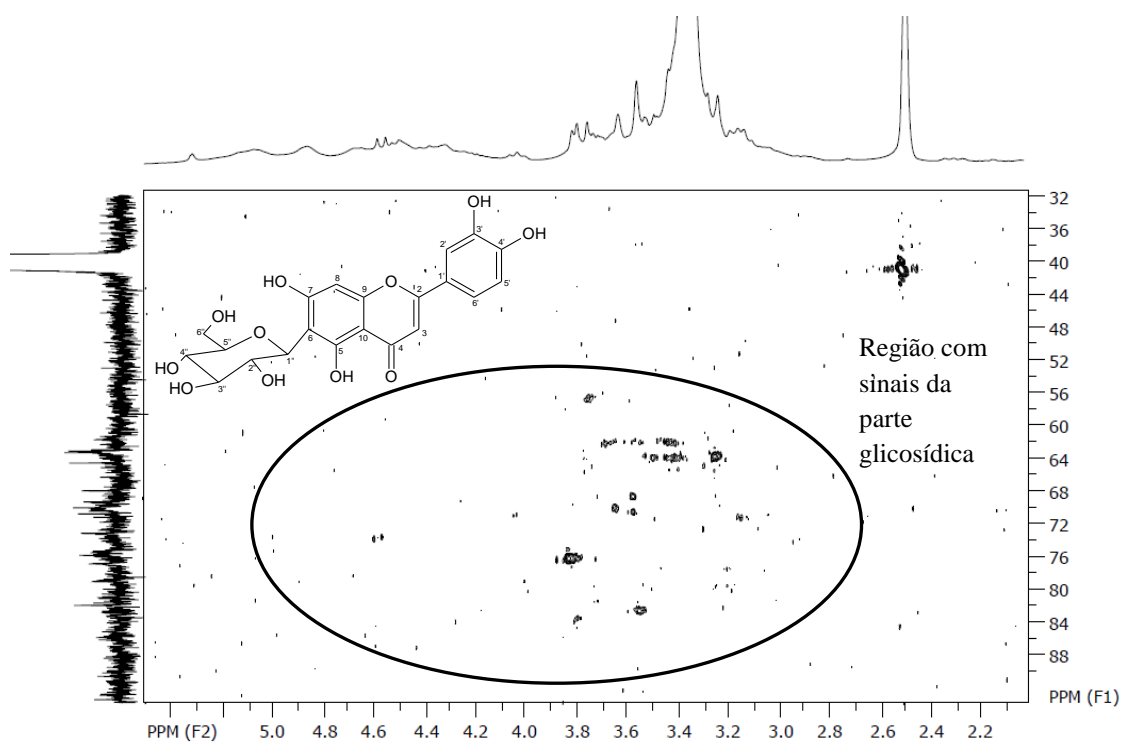


Figura 6.32 - Expansão do espectro HSQC-editado de A2-168-01 (isorientina) (DMSO; 300 MHz).

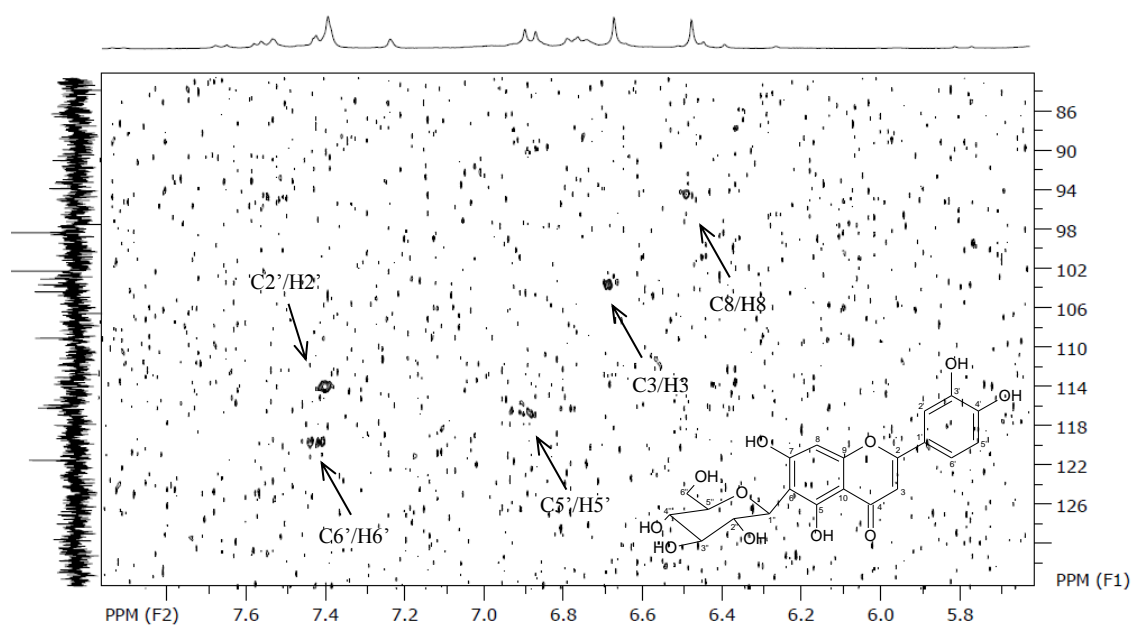
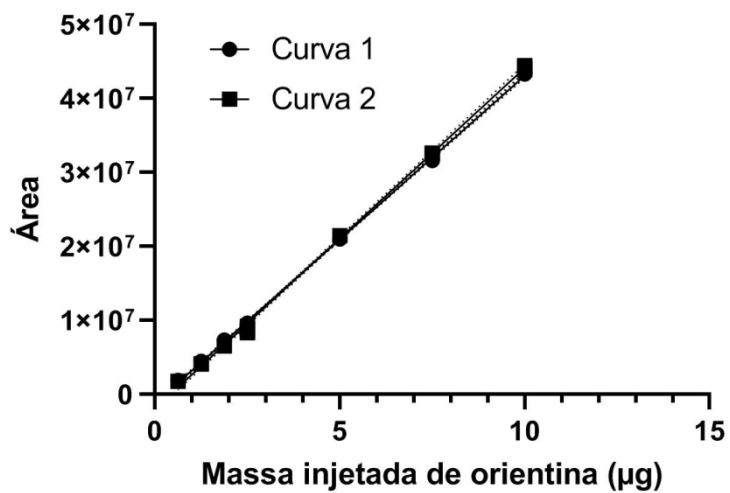


Figura 6.33 - Expansão do espectro HSQC-editado de A2-168-01 (isorientina) (DMSO; 300 MHz).

ANEXO 1

Curvas analíticas obtidas por CLAE-DAD, em dois dias consecutivos para a substância orientina

**Equação curva dia 1:**

$$y = 4.427.554,49x - 1.224.649,82 \quad (R^2 = 0,9995)$$

Equação curva dia 2:

$$y = 4.609.180,96x - 1.982.855,47 \quad (R^2 = 0,9985)$$

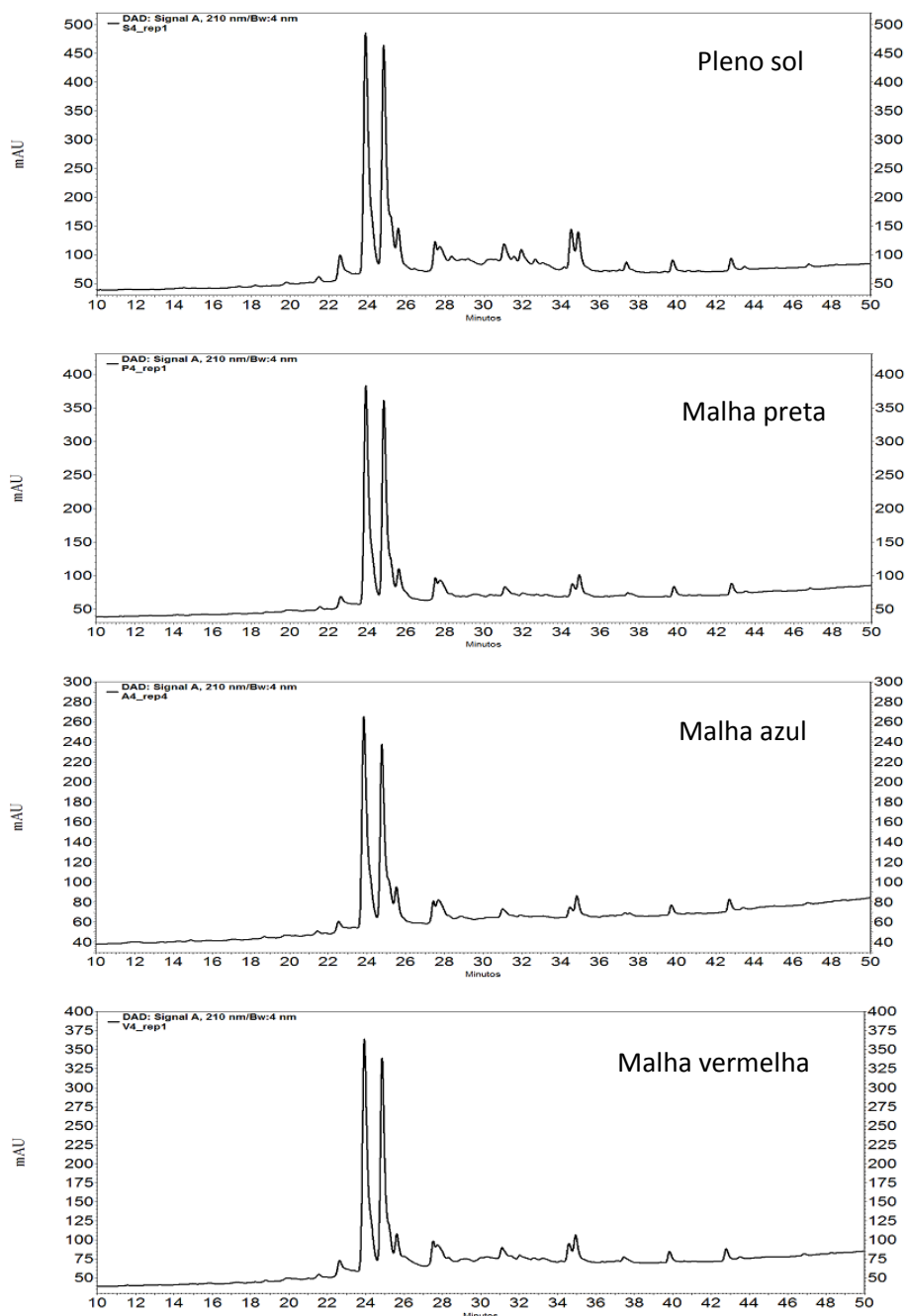
Equação média:

$$y = 4.518.367,73x - 1.603.752,65 \quad (R^2 = 0,9992)$$

ANEXO 2

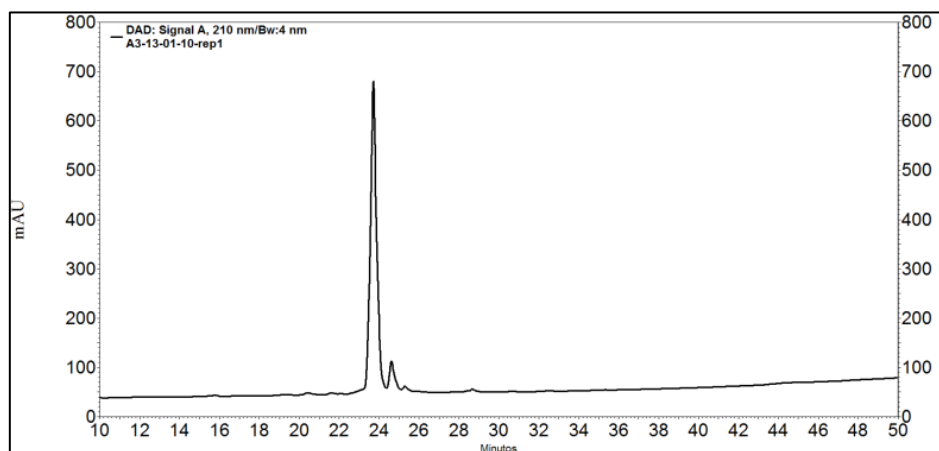
Quantificação das flavonas orientina e isoorientina nos extratos de *Lippia gracilis*

Perfis cromatográficos dos extratos provenientes dos quatro tratamentos

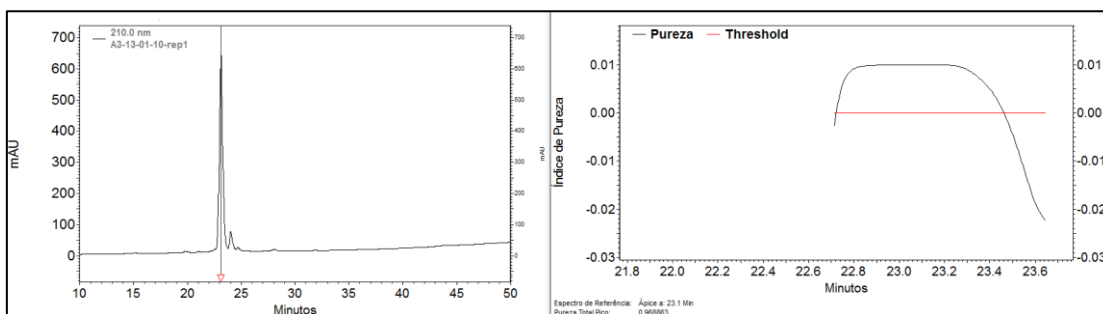


Cromatogramas dos extratos do primeiro corte, cultivo pleno sol, cultivo sob malha azul, preta e vermelha. Condições de análise: Detector UV-Vis, 210 nm, coluna C18, 25 cm x 4,6 mm x 5 µm, mantida a 40 °C, fluxo de 1 mL/min, volume de injeção: 10 mL. Fase móvel: A: H₂O com 0,1% de ácido acético e B: Metanol. Gradiente 0 – 65 min: 5 % B à 95% B, 65 – 70 min: 95% B, 70 – 75 min: 95% B à 5% de B, 75 – 85 min: 5% B.

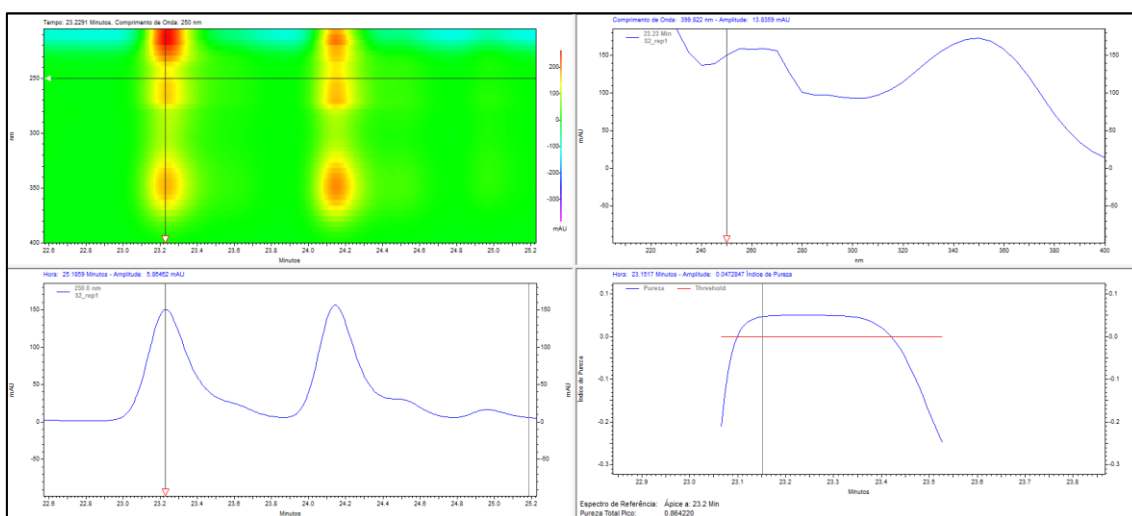
ANEXO 3



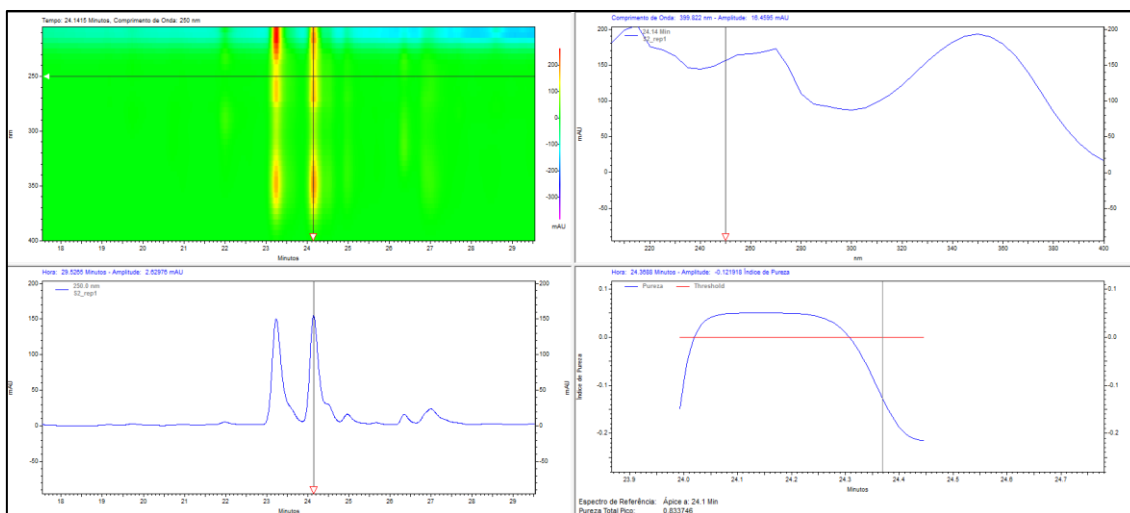
Cromatograma da substância orientina, a 210 nm, com 91% de pureza.



Pureza de pico da substância orientina isolada, com 99% de probabilidade e 3 % de limite (threshold) – pico 23,2 min.



Pureza de pico no extrato, com 95% de probabilidade e 20% de limite (threshold) – pico 23,2 min (orientina).



Pureza de pico no extrato, com 95% de probabilidade e 20% de limite (threshold) – pico 24,1 min (isorientina).

7 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O conhecimento científico é extremamente importante para a sociedade, pois é a partir dele que é possível a transformação social e tecnológica. O conhecimento científico gerado consolida o saber, levando para as futuras gerações conhecimentos mais solidificados sobre determinado assunto. A área de química de produtos naturais vem, neste sentido, para contribuir com o conhecimento popular, já que o uso de plantas medicinais muitas das vezes é o único recurso terapêutico usado por muitas comunidades, apresentando ainda uma fonte inesgotável de princípios ativos com potencial para tratamento de diversas enfermidades, que precisa cada vez mais ser explorada. A espécie *Lippia gracilis* é uma destas plantas, já utilizada na medicina tradicional do nordeste brasileiro, inclusive uma planta endêmica da região. O trabalho realizado nesta tese de doutorado vem para contribuir com novos conhecimentos químico-agronômicos para esta espécie, uma vez que a produção vegetal é um gargalo para a exploração comercial de produtos oriundos de plantas medicinais e aromáticas. Portanto, este trabalho é apenas uma fatia do potencial inestimável da espécie *L. gracilis*. A continuação dos trabalhos com esta planta é de extrema importância, já que diversas moléculas presentes na planta são desconhecidas, bem como suas atividades biológicas. Assim como, outros estudos agronômicos no sentido de encontrar melhores condições de plantio, manejo, colheita e beneficiamento para um melhor aproveitamento dos compostos bioativos de *Lippia gracilis*.