

Análise da Fração Volátil por *Headspace* em Folhas de *Hyptis marruboides* Cultivadas *in vivo* e *in vitro*

Priscila Pereira Botrel¹, José Eduardo Brasil P. Pinto², Suzan Kelly Vilela Bertolucci², Felipe Campos Figueiredo¹ e Flávio Figueiredo da Cruz¹

¹Instituto Federal do Sul de Minas, IFSULDEMINAS, Campus Muzambinho, Muzambinho, MG, priscila.botrel@eafmuz.gov.br, felipe@eafmuz.gov.br, flaviocruzcrc@hotmail.com

²Universidade Federal de Lavras, UFLA, Lavras, MG, Departamento de Agricultura, jeduardo@dag.ufla.br, suzan@dag.ufla.br

Introdução

Hyptis marruboides Epl. é também conhecida como hortelã-do-campo e pertence à família Lamiaceae. Estudos têm mostrado atividades biológicas importantes relacionadas ao gênero *Hyptis*, tais como atividades antifúngica (OLIVEIRA et al., 2004), antibacteriana (SOUZA et al., 2003) e inseticida (ARAÚJO et al., 2003) dentre outras. Aos óleos essenciais secretados nesse gênero têm sido atribuídas ações farmacológicas, como anestésico, antiespasmódico e anti-inflamatório (DI STASI e LIMA, 2002).

A técnica de *Headspace* permite analisar pequenas amostras do vegetal em um sistema fechado, sem a necessidade de extração prévia. Ao contrário do óleo volátil, que é extraído em contato com meio aquoso e submetido à temperatura elevada e pH ácido por um grande período de tempo, os compostos voláteis analisados em *Headspace* podem ser considerados mais fiéis à composição química original do vegetal, pois normalmente não sofrem degradação (SOUZA, 2007).

A composição dos metabólitos secundários nas plantas é resultado do balanço entre a sua formação e transformação que ocorrem durante o crescimento em decorrência principalmente de três fatores: genéticos, ambientais, e das técnicas de cultivo (CASTRO et al., 2002).

Devido à ameaça de extinção da espécie em estudo e com intuito de obtenção de mudas com padrão químico semelhante, objetivou-se avaliar a composição química da fração volátil em folhas de plantas de *H. marruboides* cultivadas em campo, casa de vegetação e *in vitro*.

Material e Métodos

Amostras de folhas de *H. marruboides* foram coletadas do campo (idade de 24 meses), casa de vegetação (idade de 24 meses) e *in vitro* através da cultura nodal em meio MS sem regulador de crescimento (45 dias). As amostras foram secas em estufa com circulação de ar a 39°C.

As análises químicas foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica do DAG/UFLA. Para extração da fração volátil de *H. marruboides* empregou-se a técnica de *headspace* estático. Para isso, utilizou-se do extrator/amostrador *headspace* automático *CombiPAL Autosampler System* (CTC Analytics AG, Switzerland) acoplado ao sistema de CG/EM. Após procedimentos de otimização das condições operacionais foram estabelecidos os seguintes parâmetros: temperatura de incubação da amostra de 100°C durante 30 min, temperatura da seringa a 110°C. Foram empregados 100 mg de folhas secas fragmentadas em tamanho aproximado de 5 mm, que foram acondicionadas em vial para *headspace* de 20 mL, vedados com septo de silicone/PTFE; 500 µL da fase de vapor foram injetados na coluna cromatográfica. A fração volátil foi analisada empregando cromatografia em fase gasosa acoplado a um espectrômetro de massas (CG-EM) e cromatografia em fase gasosa acoplado a um detector de ionização em chama de hidrogênio (CG-DIC).

Nas análises de CG-EM foi utilizado um sistema de cromatografia em fase gasosa 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 um intervalo de aquisição de massas de 40-400 *m/z*. Utilizou-se uma coluna capilar de sílica fundida HP-5 (30 m de comprimento × 0,25 mm de diâmetro interno × 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). O gás hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e a linha de transferência para o MS foram mantidas em 220 °C e 240 °C, respectivamente. A temperatura inicial do forno foi de 60 °C, isotérmico por 1,5 min, seguido por uma rampa de temperatura de 3° C/min até 240 °C, seguida de uma rampa de 10 °C/min até 270 °C. A injeção foi realizada no modo *split* a uma razão de injeção de 1:50. As análises quantitativas da fração volátil foram realizadas por CG-DIC empregando o sistema Agilent® 7890A acoplado a um detector de ionização de chama de hidrogênio nas mesmas condições operacionais das análises por CG/EM. As concentrações dos constituintes presentes no óleo foram expressas pela porcentagem de área relativa dos picos cromatográficos.

Os componentes foram identificados por comparação de seus índices de retenção relativos calculados com índices de retenção de literaturas (ADAMS, 2007; BOTREL et al.,

2009; DAVIES, 1990), por comparação dos espectros de massas com o banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY - NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007) e por coinjeção com mistura de α e β -tujona de referência [Sigma-Aldrich[®], pureza declarada de 82,5% (porcentagem de área relativa CG), ~ 70% de α -tujona e ~ 10% de β -tujona]. Os índices de retenção (IR) foram determinados utilizando uma curva de calibração de uma série de *n*-alcanos (C₈-C₂₀), injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras.

Resultados e Discussão

As análises químicas da fração volátil das folhas de *H. marrubioides* oriundas de cultivo em campo, casa de vegetação e *in vitro* não indicaram alterações significativas na composição e teores dos constituintes. Foram identificados nas amostras 12 constituintes químicos que representaram mais de 91% do total da composição química da fração volátil (Tabela 1).

Os voláteis emitidos caracterizaram por uma porcentagem de monoterpenos (68,91-73,18%) maior que a de sesquiterpenos (20,12 – 22,78%). No entanto, Botrel et al. (2010) observaram maior porcentagem de sesquiterpenos no campo de 76,34% e casa de vegetação de 92,57% e baixa porcentagem de monoterpenos nos dois materiais (22,86% e 2,35%, respectivamente). Isso pode ser devido à diferença entre as amostras, pois no presente estudo analisou-se as frações voláteis extraídas por ‘*Headspace*’ e no estudo de Botrel et al. (2010) foi analisado o óleo essencial obtido por hidrodestilação em aparelho de Clevenger.

Independente da origem das amostras (campo, casa de vegetação e cultivo *in vitro*) os constituintes majoritários da fração volátil foram α -tujona (39,51 a 40,00%) e terpinoleno (14,45 a 17,00%).

Neste trabalho foi detectado α -terpineno (0,65-1,71%) e terpinoleno (14,45-17,00%) e Botrel et al. (2010) não encontraram esses constituintes. No entanto, encontraram terpinen-4-ol (0,00-1,12%) e α -terpineol (0,71-1,40%). O α -copaeno não foi detectado nas amostras da fração volátil oriundas do cultivo *in vitro*. Os demais constituintes apresentaram pequenas variações nos seus teores. Al-Qudah et al. (2011) analisaram o óleo essencial de *Teucrium polium* L. e observaram que *in vitro* o constituinte β -cariofileno foi superior em relação as plantas do campo.

Essa investigação mostra que a micropropagação de *H. marrubioides*, através da proliferação da cultura nodal, é um método confiável para multiplicação rápida dessa espécie

permitindo a mesma produção da fração volátil de plantas cultivadas no campo ou em ambiente protegido.

Tabela 1. Constituição química da fração volátil de plantas do campo (24 meses), casa de vegetação (24 meses) e de plântulas (45 dias) de *Hyptis marruboides*.

Compostos	IR ^a	Campo	Casa Vegetação	In vitro
		Área%+DP	Área%+DP	Área%+DP
tuja-2,4-(10)-dieno (M)	964	8,19±0,80	10,08±1,85	11,42±2,69
2,6-dimetil-2-octeno (H)	967	1,01±0,06	1,21±0,13	1,22±0,20
α-terpineno (M)	1015	1,71±0,02	1,35±0,35	0,65±0,13
terpinoleno (M)	1089	15,03±0,56	14,45±0,01	17,00±1,81
α-tujona (M)	1102	39,51±1,23	40,00±0,03	39,65±2,37
β-tujona (M)	1120	0,18±0,02	0,17±0,05	0,09±0,02
trans-pinocanfona (M)	1162	3,28±0,01	3,43±0,13	3,15±0,08
β-bourboneno (S)	1385	7,72±0,02	6,34±0,38	6,15±0,21
α-copaeno (S)	1394	1,47±0,09	0,94±0,63	nd
β-cariofileno (S)	1431	7,37±0,57	7,61±0,79	5,99±1,15
trans-muurolo-4-(14),5-dieno (S)	1495	3,67±0,56	4,72±0,11	4,84±0,87
γ-himachaleno (S)	1498	2,55±0,09	2,20±0,42	3,14±0,28
Monoterpenos totais (%)		68,91	70,69	73,18
Sesquiterpenos totais (%)		22,78	21,81	20,12
Total identificado (%)		91,69	92,50	93,30

^a Índice de retenção relativo a série n-alcanos (C₈-C₂₀) em coluna HP-SMS.

nd = não detectado; M = monoterpeno; S = sesquiterpeno; H = hidrocarboneto

Conclusões

Os constituintes majoritários da fração volátil de *H. marruboides* em todas as condições de cultivo (campo, casa de vegetação e cultivo *in vitro*) foram α-tujona (39,51 a 40,00%) e terpinoleno (14,45 a 17,00%).

A cultura nodal (*in vitro*) é um método eficiente para propagação clonal de *H. marruboides*, pois não interfere na composição química da fração volátil quando comparada com plantas obtidas de cultivos convencionais.

Referências Bibliográficas

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**, 4th ed. Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007.

AL-QUDAH, T. S.; SHIBLI, R. A.; ALALI, F. Q. *In vitro* propagation and secondary metabolites production in wild germander (*Teucrium polium* L.). **In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant**, Columbia, v. 47, p. 496-505, 2011.

ARAÚJO, E. C. C.; SILVEIRA, E. R.; LIMA, M. A. S.; NETO, M. A.; ANDRADE, I. L.; LIMA, M. A. A.; SANTIAGO, G. P. S.; MESQUITA, A. L. M. 2003. Insecticidal activity and chemical composition of volatile oils from *Hyptis martiusii* Benth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 51, p. 3760-3762, 2003.

BOTREL, P. P.; PINTO, J. E. B. P.; FIGUEIREDO, F. C.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FERRI, P. H. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* Epling (Lamiaceae) em diferentes genótipos. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 1, n. 2, p. 164-469, 2009.

BOTREL, P. P.; PINTO, J. E. B. P.; Araújo, A. C. C.; BERTOLUCCI, S. K. V.; FIGUEIREDO, F. C.; FERRI, P. H.; COSTA, D. P. Variações no teor e na composição volátil de *Hyptis marruboides* EPL. cultivada no campo e em casa de vegetação. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, p. 33-37, 2010.

CASTRO, D. M.; MING, L. C.; MARQUES, M. O. M. Composição fitoquímica dos óleos essenciais de folhas da *Lippia alba* (Mill). N.E.Br em diferentes épocas de colheita e partes do ramo. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 4, n. 2, p. 75-79, 2002.

DAVIES, N. W. Gas chromatographic retention indices of monoterpenes and sesquiterpenes on methyl silicone and Carbowax 20M phases. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 503, p. 1-24, 1990.

DI STASI L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. São Paulo: UNESP, 2002. 604 p.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version 2.0 of the NIST/EPA/NIH mass spectral library: software**. Gaithersburg: Department of Commerce, 2008.

OLIVEIRA, C. M. A. da; SILVA, M. D. R.; KATO, L.; SILVA, C. C. da; FERREIRA, H. D.; SOUZA, L. K. H. Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Hyptis ovalifolia* Benth. (Lamiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 15, n. 5, p. 756-759, Sept./Oct. 2004.

SOUZA, L. K. H.; OLIVEIRA, C. M. A.; FERRI, P. H.; OLIVEIRA, J. G.; SOUZA, A. H.; FERNANDES, O. D. L.; SILVA, M. D. R. Antimicrobial activity of *Hyptis ovalifolia* towards dermatophytes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 98, n. 7, p. 963-965, Oct. 2003.

SOUZA, T. J. T. **Determinação da composição química e avaliação preliminar das atividades antioxidante e anticolinesterásica dos óleos voláteis de espécies de *Eupatorium* L. (Asteraceae).** 2007. 232 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.