

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

INVESTIGAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DA REGIÃO TOCANTINA POR CÁLCULO DE SIMILARIDADE DE ESPECTROSCOPIA (RMN) E CROMATOGRAFIA (CG-EM) DIFERENCIAL

MARCOS VINICIUS MORAIS SILVA¹, GABRIEL SOUSA BRITO¹, JAN SCHRIPSEMA², FRANCISCO EDUARDO ARAGÃO CATUNDA JÚNIOR¹

AFILIAÇÃO

¹Universidade Estadual da Região Tocantina do Maranhão – Centro de Ciências Exatas, Naturais e Tecnológicas – Rua Godofredo Viana, Nº 1300, Centro, Imperatriz-MA, CEP: 65901-480.

²Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro – Centro de Ciências Tecnológicas – Avenida Alberto Lamego, Nº 2000, Parque Califórnia, Campos dos Goytacazes-RJ, CEP: 28013-602.

RESUMO

A biodiversidade do Cerrado Maranhense é riquíssima e considerada mais abundante que a observada em outros estados. Diante da diversidade presente nesse bioma, a Química de Produtos Naturais de espécies vegetais encontra vasto objeto de estudo para gerar conhecimento sobre a composição química e a descoberta de novas substâncias. As espécies pertencentes ao gênero *Ocimum* são geralmente caracterizadas como ricas em óleos essenciais com aplicações em produtos farmacêuticos, fragrâncias e cosméticos, cujo principal constituinte químico em *Ocimum gratissimum* é o eugenol. A produção de óleo essencial, sofre uma influência grande em sua composição e em seu rendimento, devido à variações diversões. O presente trabalho tem como objetivo construir uma impressão digital baseado em análises cromatográficas (CG-EM) e espectroscópicas (RMN) do óleo essencial das folhas de *Ocimum gratissimum*. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação, métodos Clevenger modificado. Os espectros de CG-EM e RMN de ¹H e ¹³C foram obtidos, e foram construídas tabelas de similaridades, tanto quanto de correlações entre estes espectros. As técnicas analíticas empregadas no presente estudo são excelentes ferramentas para a produção de impressões digitais de óleos essenciais e amostras hidrodestiladas. Cada uma das técnicas

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

utilizadas aqui teve vantagens e desvantagens específicas. O CG-EM oferece alto poder de separação e boas possibilidades de identificação usando bancos de dados prontamente disponíveis. RMN de ^1H foi a técnica de análise mais rápida usada aqui, Contudo, a identificação de componentes individuais pode ser complicada pela considerável sobreposição de sinais. A técnica de RMN de ^{13}C foi a opção preferida, uma vez que a alta resolução dos sinais permite que quase todos os componentes principais sejam observados, e portanto, uma identificação altamente confiável e possível.

PALAVRAS-CHAVE: *Ocimum gratissimum*, Eugenol, 1,8-cineol.

INTRODUÇÃO

O Cerrado é o segundo maior bioma do Brasil com área de 203 milhões de hectares (Ibge, 2004). No estado do Maranhão, esse bioma é a vegetação predominante, com uma ocupação de 64% do território, que se estende dos planaltos do sul do estado até próximo ao litoral da região nordeste (Sema, 2011). A biodiversidade do Cerrado Maranhense é riquíssima e considerada mais abundante que a observada em outros estados. Em zonas ecogeográficas de tensão caracterizadas pela quebra dos gradientes morfo-químicos surge maior complexidade estrutural e molecular. Fato este observado em mapas fitoquímicos para áreas sul-americanas, onde as variações de perfis metabólicos totais foram mais ricas para espécies de cerrado quando comparado com espécies de florestas (Gottlieb et al., 1998).

Diante da diversidade presente nesse bioma, a Química de Produtos Naturais de espécies vegetais encontra vasto objeto de estudo para gerar conhecimento sobre a composição química e a descoberta de novas substâncias. Além de contribuir para um desenvolvimento econômico sustentável, com agregação de valor a essas espécies e seus derivados, e redução aos impactos ambientais gerados pelo desmatamento (Braz-Filho, 2010).

O gênero *Ocimum* (Lamiaceae), geralmente conhecido como manjerição, há bastante tempo é conhecido pela diversidade genética de suas espécies, compreendendo cerca de 150 espécies de ervas e arbustos das regiões tropicais e subtropicais da Ásia, África, América Central e do Sul (Sobti and Pushpangadan, 1982; Raina and Gupta, 2018).

Ocimum gratissimum L. é popularmente conhecida como alfavaca, alfavacão ou alfavaca-cravo, é um arbusto aromático, que alcança até 1 metro de altura, originário da África e sul da Ásia e subespontâneo no Brasil. As espécies pertencentes ao gênero *Ocimum* são geralmente caracterizadas como ricas em óleos essenciais com aplicações em produtos

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

farmacêuticos, fragrâncias e cosméticos, cujo principal constituinte químico em *O. gratissimum* é o eugenol (Fernandes et al., 2013). Vários artigos tratam da composição química do óleo essencial do *O. gratissimum*, revelando uma variabilidade de quimiotipos timol, eugenol, cinamato de etila, eugenol / metil-eugenol, geraniol, dentre outros (Zoghbi et al., 2007).

Os óleos essenciais, produto natural obtido de partes de plantas como flores, frutos, sementes, caule, raízes, dentre outros (Bakkali et al., 2008), são misturas complexas de substâncias voláteis, com composição variável de 20 a 200 constituintes químicos, em altas ou baixas concentrações (Navarrete et al., 2011).

Mediante a comercialização exarcebada de óleos essenciais, sendo alvo de adulterações de diversas formas, como mistura de óleos de outras espécies, solventes que podem agir como contaminantes, são necessários métodos adequados e rápidos para estabelecer a autenticidade e pureza de óleos essenciais, dentre as técnicas empregadas, a combinação com cálculos de similaridade com espectroscopia (RMN ^1H e ^{13}C) de cromatografia (CG-EM) tendo sido utilizadas nos últimos anos para ter uma impressão digital da espécie vegetal (Queiroz et al., 2014; Baldim et al., 2018; Freitas et al., 2018; Schripsema, 2019; Schripsema, Da Silva and Dagnino, 2022).

METODOLOGIA

Material vegetal

A parte aérea (folhas e caules) frescas da planta *Ocimum gratissimum* L. foram coletadas por Gabriel Sousa Brito, em vários horários, no Alto da Pipira (5° 26' 4,07'' S, 47° 17' 45,83'' O), cidade de Senador La Rocque, no Estado do Maranhão, região Nordeste do Brasil. A identificação botânica foi realizada pelo curador Prof. Dr. Eduardo Bezerra de Almeida Júnior e a exsicata (N° 11.175) foi depositada e catalogada no acervo do Herbário do Maranhão (MAR), Departamento de Biologia (CCBS) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA), na cidade de São Luís, MA, Brasil.

As amostras (folhas e caules) coletadas e posteriormente, colocadas para secar. O material escolhido para efetuar a secagem foi colocado ao sol, ou seja, ao ar livre sob temperatura ambiente por um período até que efetuasse a evaporação do líquido presente nas folhas. Após a secagem a amostra foi direcionada ao laboratório para que se efetuasse a extração do óleo essencial.

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA*Extração dos óleos essenciais*

O material vegetal (parte aérea) das espécies coletadas foi, individualmente, submetido a hidrodestilação, utilizando aparato tipo Clevenger (Shukla et al., 2009) no laboratório de biotecnologia da UEMASUL (LABITEC). O tempo de extração foi de aproximadamente 3 h para cada material. Os óleos essenciais foram separados dos hidrolatos, em seguida seco com sulfato de sódio anidro, concentrado e mantidos em refrigerador até a análise.

Preparo das amostras para análise RMN

Todas as diluições dos óleos foram realizadas pipetando 100 μL dos óleos diretamente em tubos RMN de 5 mm (diâmetro externo) e adicionando 500 μL de CDCl_3 (clorofórmio deuterado). Os pesos precisos do óleo e do solvente foram determinados em uma balança analítica com precisão de 0,1 mg.

Aquisição e processamento dos espectros de RMN

Os espectros de RMN foram medidos em um espectrômetro Bruker Avance III HD, equipado com uma sonda de observação Bruker 1H/X Broadband de 5 mm (PABBO BB/19F-1H/D Z-GRD) operando a 500,13 MHz por ^1H e 125,76 MHz para ^{13}C . Todos os espectros foram adquiridos a 298 K. Para análises de RMN ^1H , serão acumuladas 8 varreduras usando o programa de pulso zg30, com pulso de 30° de largura, tempo de aquisição de 3,2 s e atraso de relaxamento de 1 s adquirindo 64K pontos de dados.

Os espectros de RMN foram processados no programa Spinworks 4 vs. 4.2.4 (Kirk Marat, Universidade de Manitoba). Os FIDs multiplicados usando Lorentz Função de janela (exponencial) com LB 0,2 Hz para os espectros ^1H . A fase foi ajustada manualmente e a correção de linha de base totalmente automática aplicada. Os espectros foram calibrados para o sinal de solvente residual.

Aquisição e processamento dos espectros de CG-EM

10 mg de óleo essencial foram diluídos em 1 mL de diclorometano e 1 μL desta diluição foi injetada. A análise CG-EM (Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa) foi realizada em um aparelho Shimadzu GC- Cromatógrafo 2010 Plus (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão) equipado com uma coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS, 30 m de comprimento, com diâmetro interno de 0,25 mm e 0,25 μm de espessura de filme (Restek Co. Bellefonte, EUA). A temperatura foi programada para subir de 60 °C para 240 °C a uma taxa de 3 °C/min, seguido de uma fase isotérmica de 5 min a 240 °C. O gás hélio foi

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

usado como gás de arraste a uma taxa de fluxo de 0,8 mL/min. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 240 °C e 300 °C, respectivamente.

Os espectros de massa foram registrados de 40 a 600 Daltons. Cada pico do cromatograma foi identificado pelo seu espectro de massas, por comparação com a biblioteca do equipamento (NIST – 147.198 compostos), através de fontes da literatura (Van Den Dool and Kratz, 1963; Adams, 2007; Nist, 2014) e injeções de padrões autênticos. A determinação dos índices de Kovats foi realizada por co-injeção com padrões de alcanos (C₈ a C₃₀).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Tabela 1: Composição química, Índice de Kovats obtido da literatura (KI_{Lit.}), Índice de Kovats calculado (KI_C), percentual de compostos identificados e da mesma classe (%) nos óleos essenciais das folhas de *Ocimum gratissimum*.

Compostos	KI _{Lit.}	KI _C	%					
			OEM4	OEM5	OEM7	OEM9	OEM12	OEM13
<i>Monoterpenos</i>			0.00	0.00	1.33	0.00	0.00	4.60
Sabineno	975	978	-	-	-	-	-	1.03
β-Pineno	978	983	-	-	1.33	-	-	2,66
Mirceno	990	992	-	-	-	-	-	0.91
<i>Monoterpenos oxigenados</i>			95.28	49.28	73.12	80.64	95.62	72.87
1,8-Cineol	1031	1039	12.28	19.78	31.70	24.04	9.48	34.98
Linalool	1096	1105	-	-	0.61	-	-	0.88
4-Terpineol	1177	1186	-	-	-	-	-	-
α-Terpineol	1188	1199	-	2.04	0.80	-	-	1.49
Metil chavicol	1196	1203	-	-	-	-	-	-
α-Funchila Acetato	1220	1222	-	-	-	-	-	-
Carvona	1243	1252	-	-	-	-	-	-
Eugenol	1359	1359	83.00	27.46	40.01	56.60	86.14	35.52
<i>Sesquiterpenos</i>			4.72	38.04	20.62	15.74	4.38	20.23
E-Cariofileno	1419	1423	2.22	12.73	6.39	6.31	1.76	6.17
α-E-Bergamoteno	1434	1436	-	-	-	-	-	-
α-Humuleno	1454	1460	-	-	0.89	-	-	-
Germacreno D	1481	1484	-	-	0.53	-	-	-
β-Selineno	1490	1492	2.50	19.78	9.38	9.43	2.62	10.94
α-Selineno	1498	1498	-	5.53	2.64	-	-	3.12
7-epi-α-Selineno	1522	1523	-	-	0.79	-	-	-
<i>Sesquiterpenos oxigen.</i>			0.00	12.68	5.00	0.00	0.00	2.30
Óxido de cariofileno	1583	1587	-	12.68	5.00	-	-	2.30
Epi-α-Cadinol	1640	1648	-	-	-	-	-	-
Total			100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

Baseado nas análises de CG-EM uma tabela de similaridade foi feita (Figura 1). Esta tabela mostra claramente quais óleos essenciais são mais parecidos.

Figura 1: Similaridades calculadas para os dados de CG-EM.

	OEM4	OEM5	OEM7	OEM9	OEM11	OEM12	OEM13
OEM4	100.00	44.46	59.06	75.73	97.10	95.15	54.12
OEM5	44.46	100.00	71.85	63.57	47.29	39.78	70.78
OEM7	59.06	71.85	100.00	83.34	61.90	54.38	91.93
OEM9	75.73	63.57	83.34	100.00	78.56	71.04	78.29
OEM11	97.10	47.29	61.90	78.56	100.00	92.48	56.95
OEM12	95.15	39.78	54.38	71.04	92.48	100.00	49.44
OEM13	54.12	70.78	91.93	78.29	56.95	49.44	100.00

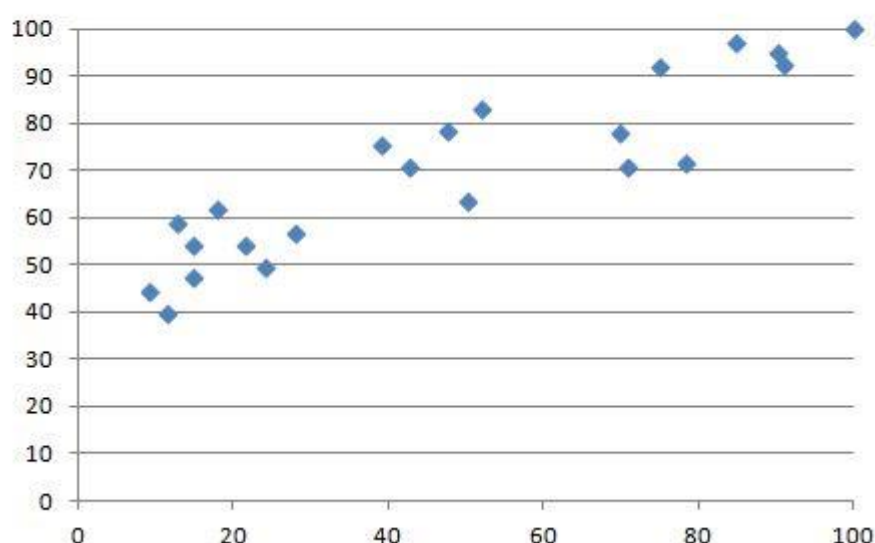
Figura 2: Similaridades calculadas para os dados de RMN de ^{13}C .

	OEM4	OEM5	OEM7	OEM9	OEM11	OEM12	OEM13
OEM4	100.00	9.20	12.63	39.13	84.79	90.19	21.38
OEM5	9.20	100.00	78.33	50.06	14.88	11.49	70.83
OEM7	12.63	78.33	100.00	52.01	17.80	14.70	74.90
OEM9	39.13	50.06	52.01	100.00	47.57	42.55	69.67
OEM11	84.79	14.88	17.80	47.57	100.00	90.93	27.81
OEM12	90.19	11.49	14.70	42.55	90.93	100.00	23.97
OEM13	21.38	70.83	74.90	69.67	27.81	23.97	100.00

As duas tabelas de similaridade têm uma aparência parecida, e as similaridades das duas técnicas mostram uma boa correlação (Figura 3).

Figura 3: Correlações entre os dados de similaridades CG-EM com RMN ^{13}C .

GC similarity (Y) vs ^{13}C similarity (X)

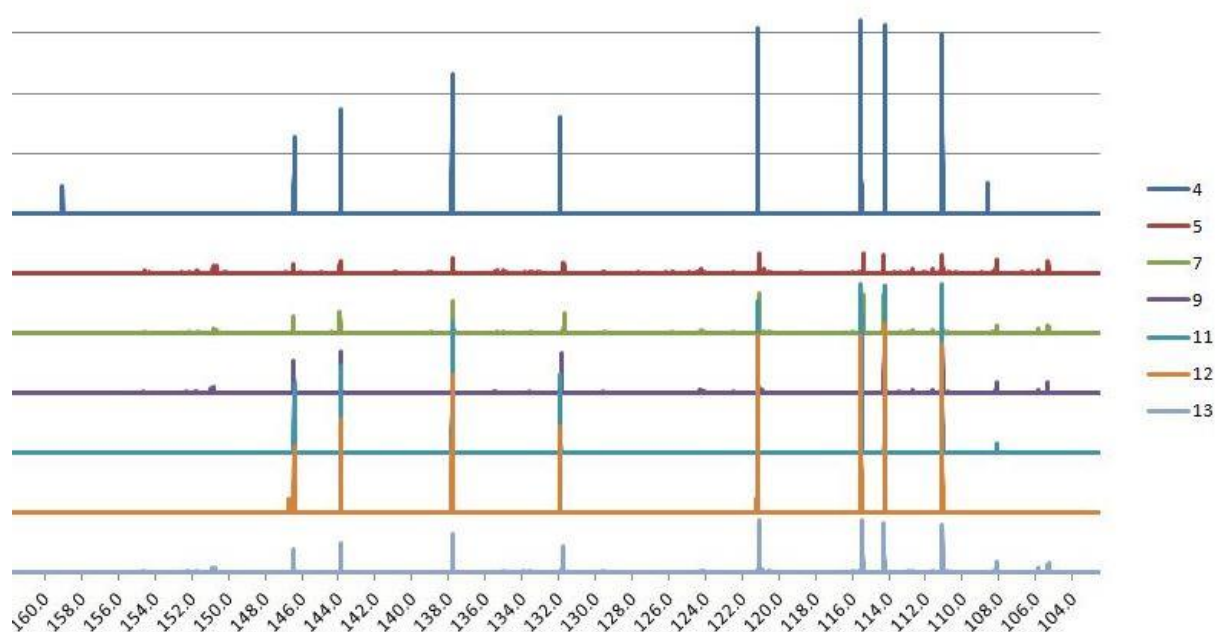


VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

Os valores de similaridade com RMN de ^{13}C são muito mais baixos porque a concentração dos componentes influencia não somente a intensidade dos sinais dos compostos mais também o deslocamento químico.

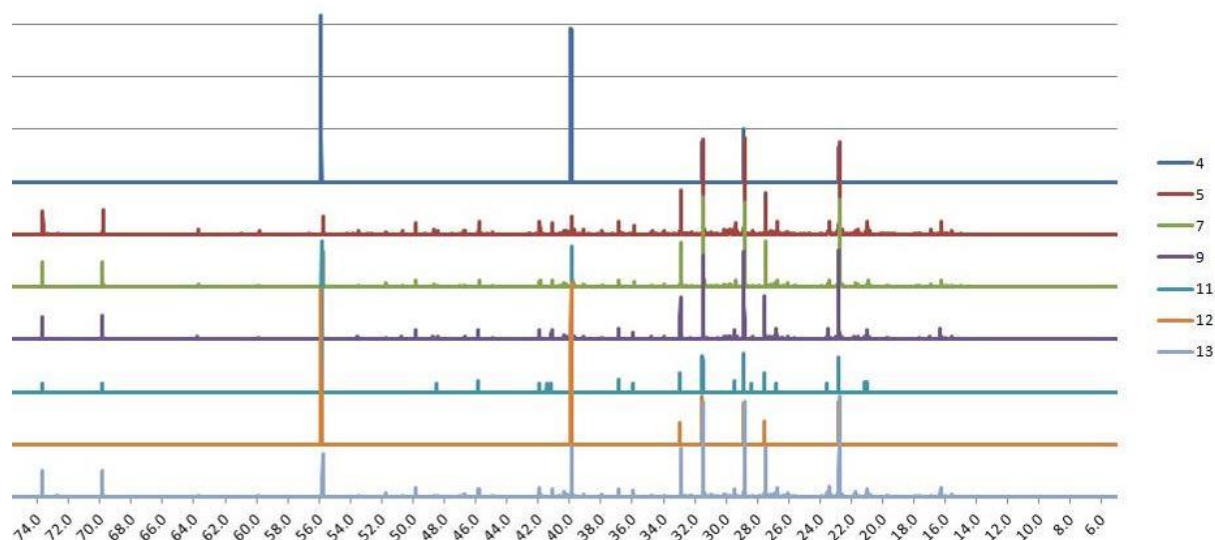
A comparação dos espectros mostra claramente a presença de eugenol em todas as amostras, mas em quantidades bem diferentes (Figura 4).

Figura 4: Região no espectro de RMN ^{13}C , mostrando os sinais aromáticos de eugenol.



Com RMN de ^{13}C quais todos os sinais dos compostos presentes em quantidades acima de 2% nos óleos essenciais são visíveis.

Figura 5: Região no espectro de RMN ^{13}C mostrando sinais alifáticos.



VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

A grande vantagem de RMN de ^{13}C sobre CG-EM está na identificação dos componentes. CG-EM fornece os espectros de massas, mas para certos grupos de compostos os espectros podem ser muito parecidos para estruturas diferentes. Também o equipamento pode influenciar a aparência do espectro. RMN de ^{13}C permite distinguir compostos muito melhor. Isômeros são facilmente identificados sem deixar dúvidas.

CONCLUSÕES

As técnicas analíticas empregadas no presente estudo são excelentes ferramentas para a produção de impressões digitais de óleos essenciais e amostrar hidrodestiladas. Cada uma das técnicas utilizadas aqui teve vantagens e desvantagens específicas. O CG-EM oferece alto poder de separação e boas possibilidades de identificação usando bancos de dados prontamente disponíveis. RMN de ^1H foi a técnica de análise mais rápida usada aqui. Contudo, a identificação de componentes individuais pode ser complicada pela considerável sobreposição de sinais. A técnica de RMN de ^{13}C foi a opção preferida, uma vez que a alta resolução dos sinais permite que quase todos os componentes principais sejam observados, e portanto, uma identificação altamente confiável e possível.

APOIO FINANCEIRO

FAPEMA, CNPq.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adams, R.P. et al. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Carol Stream, IL: Allured publishing corporation, 2007.
- Bakkali. F. et al. Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology* 2008. 46, 446–475.
- Baldim, J.L. et al. The synergistic effects of volatile constituents of *Ocimum basilicum* against foodborne pathogens. *Industrial Crops and Products* 2018, 112, 821-829.
- Braz-Filho, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. *Quim. Nova* 2010, 33, 1, 229-239.
- Fernandes, V.F., et al. Light intensity on growth, leaf micromorphology and essential oil production of *Ocimum gratissimum*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 2013, 23,3, 419-424.
- Freitas, J.V.B. et al. Chemometric analysis of NMR and GC datasets for chemotype characterization of essential oils from different species of *Ocimum*. *Talanta* 2018, 180, 329-336,.
- Gottlieb, O.R. et al. Biodiversidade: o enfoque interdisciplinar brasileiro. *Ciênc. Saúde Coletiva* 1998, 3, 2, 97-102.
- Ibge - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, 2004. Disponível em: <https://ww2.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/21052004biomashtml.shtm>. Acesso em:

VI Semana Acadêmica de Pesquisa, Inovação e Extensão da UEMASUL
07 a 09 de novembro de 2023- Imperatriz - MA

20/02/2023.

Navarrete, A. et al. Improvement of essential oil steam distillation by microwave pretreatment. *Industrial & Engineering Chemistry Research* 2011, 50, 8, 4667-4671.

Nist Chemistry Webbook. Disponível em: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>. Acesso em: 14 out. 2014.

Queiroz, E.F. et al. *Princípios ativos de plantas superiores*. 2ª ed. EdUFSCar, 2014.

Raina, A.P.; Gupta, V. Chemotypic characterization of diversity in essential oil composition of *Ocimum* species and varieties from India. *Journal of Essential Oil Research* 2018, 30, 6, 444-456.

Schripsema, J. Similarity and differential NMR spectroscopy in metabolomics: application to the analysis of vegetable oils with ¹H and ¹³C NMR. *Metabolomics* 2019, 15, 3, 1-12.

Schripsema, J.; Da Silva, S. M.; Dagnino, D. Differential NMR and chromatography for the detection and analysis of adulteration of vetiver essential oils. *Talanta* 2022, 237, 122928.

Shukla, R.; Kumar, A.; Singh, P.; Dubey, N.K. Efficacy of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown essential oil and its monoterpene aldehyde constituents against fungi isolated from some edible legume seeds and aflatoxin B1 production. *Int. J. Food Microbiol.* 2009, 135, 165-170.

Sobti, S.N.; P. Pushpangadan. "Studies in the genus *Ocimum*: Cytogenetics, breeding and production of new strains of economic importance." *Cultivation and utilization of aromatic plants*/edited by CK Atal and BM Kapur 1982.

Van Den Dool, H.; Kratz, P.D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. 1963.

Zoghbi, M.G.B., et al. Variation in volatiles of *Ocimum campechianum* Mill. and *Ocimum gratissimum* L. cultivated in the North of Brazil. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 2007, 10, 3, 229-240.