



**Universidade Federal do Amazonas
Centro de Ciências do Ambiente
Programa de Pós-Graduação em Ciências
do Ambiente e
Sustentabilidade na Amazônia -
PPG/CASA**



JÚLIO CÉSAR GONÇALVES DE SOUZA

**HIDRODESTILAÇÃO ASSISTIDA POR ENZIMAS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
(DPPH) E ANTITUMORAL DO ÓLEO ESSENCIAL DE *MATOUREA AZUREA***

**Manaus / AM
2024**



**Universidade Federal do Amazonas
Centro de Ciências do Ambiente
Programa de Pós-Graduação em Ciências
do Ambiente e
Sustentabilidade na Amazônia -
PPG/CASA**



JÚLIO CÉSAR GONÇALVES DE SOUZA

**HIDRODESTILAÇÃO ASSISTIDA POR ENZIMAS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE
(DPPH) E ANTITUMORAL DO ÓLEO ESSENCIAL DE *MATOUREA AZUREA***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências do Ambiente e Sustentabilidade na Amazônia como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Mathias Pereira

Coorientadora: Prof^ª. Dra. Leiliane do Socorro Sodré de Souza

**Manaus / AM
2024**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729h Souza, Júlio César Gonçalves de
Hidrodestilação assistida por enzimas, atividade antioxidante (DPPH) e antitumoral do óleo essencial de *Matourea azurea* / Júlio César Gonçalves de Souza . 2024
132 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Anderson Mathias Pereira
Coorientadora: Leiliane do Socorro Sodré de Souza
Dissertação (Mestrado em Ciências do Ambiente e Sustentabilidade na Amazônia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Óleo essencial. 2. Hidrodestilação. 3. Celulase. 4. Antioxidante. 5. Antitumoral. I. Pereira, Anderson Mathias. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

JÚLIO CÉSAR GONÇALVES DE SOUZA

HIDRODESTILAÇÃO ASSISTIDA POR ENZIMAS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH) E ANTITUMORAL DO ÓLEO ESSENCIAL DE *MATOUREA AZUREA*.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências do Ambiente e Sustentabilidade na Amazônia como exigência para obtenção do título de Mestre em Ciências Ambientais.

Orientador: Prof. Dr. Anderson Mathias Pereira

Coorientadora: Prof^a. Dra. Leiliane do Socorro Sodré de Souza

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Ariane Mendonça Kluczkovski

Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dra. Josiane Weise

Universidade Federal do Amazonas

Prof^a. Dra. Karina Cesca

Universidade Federal de Santa Catarina

AGRADECIMENTOS

Agradeço e dedico este trabalho à minha mãe Josanne Keyla Gonçalves de Souza e meu pai José Ivan Alves de Souza pela educação, proteção e investimento para a minha formação acadêmica.

À minha mãe e irmãs e familiares pela rede de apoio ao longo da vida.

Aos meus amigos pelo suporte emocional e incentivo na carreira.

Aos meus professores, em especial a prof.^a Dr.^a Norma Cecília Rodriguez Bustamante pela oportunidade de me inserir no universo da pesquisa acadêmica através do projeto de inclusão “Amigos do PET” do curso de Engenharia Florestal da UFAM.

Aos meus orientadores pela confiança em executar este projeto e por toda paciência, dedicação e acolhimento no grupo de pesquisa.

Aos meus colegas de laboratório, em especial Giovana Lima de Souza e Guilherme Teixeira de Azevedo pela ajuda nos experimentos.

À banca examinadora, pela contribuição e cordialidade nos apontamentos.

Por fim gostaria de agradecer à empresa LFN - Latino Americana pelo fornecimento das enzimas comerciais, ao Centro de Análises Químicas da Universidade do Estado do Amazonas, ao Laboratório de Estudos de Farmacocinética (NePK) e ao Laboratório de Atividades Biológicas (Biophar). Agradeço também o financiamento da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) e do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

RESUMO

A sociedade tem passado por mudanças demográficas e epidemiológicas nas últimas décadas e a necessidade de novos produtos frente às doenças relacionadas à senescência e às mudanças climáticas é imperativa. Nesse contexto, fitoquímicos oriundos do metabolismo secundário vegetal desempenham um papel central na busca por novos princípios ativos. A espécie *Matorea azurea* possui óleo essencial rico em mono e sesquiterpenos e é amplamente utilizada na medicina tradicional. Possui propriedades antifúngicas e contra *Leishmania amazonensis*, além de apresentar moléculas com potencial para o mercado de aromatizantes. Diante desse contexto, este trabalho teve como objetivo caracterizar o perfil químico do óleo essencial obtido por hidrodestilação tradicional e hidrodestilação assistida por enzimas através de técnicas de espectrometria, assim como investigar o seu efeito antioxidante e antitumoral. Para esse fim foi feito um delineamento experimental para comparar o efeito da hidrodestilação assistida por enzimas (celulase) nas concentrações de 1%, 1,5% e 2 % em função do rendimento do óleo essencial e da composição química. Além disso, também foi investigado o efeito antioxidante (DPPH) e antitumoral em linhagens celulares de adenocarcinoma A545 e gliomas GL e C6 com o óleo essencial das folhas de *M. azurea* oriundo de hidrodestilação convencional. Após a identificação dos compostos majoritários foi feito um estudo de DFT (*Density Functional Theory*) para registro e auxílio na interpretação do espectro infravermelho e das implicações na reatividade química desses compostos a partir de dados gerados com os valores energéticos dos orbitais de fronteira. Os resultados foram submetidos à ANOVA a 95% de confiança. A cromatografia gasosa e o FTIR comprovaram que seu óleo essencial é rico em mono e sesquiterpenos, dentre álcoois, aldeídos, cetonas e éteres. Os compostos majoritários estão o mirtenal, o β -copaen-4- α -ol, o viridiflorol, a pinocarvona e o *trans*-pinocarveol. Através do GAP HOMO-LUMO se constatou que os terpenos em questão são estáveis e pouco reativos. A hidrodestilação com digestão enzimática resultou no incremento de 32% na concentração ótima de celulase (1%) e houve mudanças qualitativas e quantitativas após esse processo. A inibição do radical DPPH é fraca com IC₅₀ calculado de 225,41 μ L/mL. O óleo essencial de *M. azurea* não apresentou atividade antitumoral, porém tem proteção citológica forte contra o peróxido de hidrogênio e não apresenta citotoxicidade em linhagens de células saudáveis, motivando futuras pesquisas levando em consideração o seu comportamento relativamente inerte e pela espécie vegetal possuir atributos interessantes como a alta adaptabilidade e fácil propagação.

Palavras-chave: óleo essencial, hidrodestilação, celulase, antioxidante e antitumoral.

ABSTRACT

Society has undergone demographic and epidemiological changes in recent decades, and the need for new products to address diseases related to senescence and climate change is imperative. In this context, phytochemicals derived from plant secondary metabolism play a central role in the search for new bioactive compounds. The species *Matorea azurea* has essential oil rich in mono- and sesquiterpenes and is widely used in traditional medicine. It has antifungal properties and activity against *Leishmania amazonensis*, in addition to containing molecules with potential for the flavoring market. In this context, this study aimed to characterize the chemical profile of the essential oil obtained by traditional hydrodistillation and enzyme-assisted hydrodistillation through spectrometry techniques, as well as to investigate its antioxidant and antitumor effects. For this purpose, an experimental design was carried out to compare the effect of enzyme-assisted hydrodistillation (cellulase) at concentrations of 1%, 1.5%, and 2% on essential oil yield and chemical composition. Furthermore, the antioxidant effect (DPPH) and antitumor activity were investigated in adenocarcinoma A545 and glioma GL and C6 cell lines with the essential oil of *M. azurea* leaves obtained by conventional hydrodistillation. After identifying the major compounds, a DFT (*Density Functional Theory*) study was conducted to assist in the interpretation of the infrared spectrum and to understand the implications for the chemical reactivity of these compounds based on data generated with the frontier orbital energy values. The results were subjected to ANOVA with 95% confidence. Gas chromatography and FTIR showed that its essential oil is rich in mono- and sesquiterpenes, including alcohols, aldehydes, ketones, and ethers. The major compounds include mirtenal, β -copaen-4- α -ol, viridiflorol, pinocarvona, and *trans*-pinocarveol. The GAP HOMO-LUMO analysis revealed that the terpenes in question are stable and not highly reactive. Enzyme-assisted hydrodistillation resulted in a 32% increase at the optimal cellulase concentration (1%), with both qualitative and quantitative changes observed after this process. The inhibition of the DPPH radical was weak, with an IC₅₀ value of 225.41 μ L/mL. The essential oil of *M. azurea* did not show antitumor activity; however, it provided strong cytological protection against hydrogen peroxide and exhibited no cytotoxicity in healthy cell lines, motivating future research considering its inert behavior and the interesting attributes of the plant species, such as high adaptability and easy propagation.

Keywords: essential oil, hydrodistillation, cellulase, antioxidant, antitumor.

LISTA DE ABREVIATURAS, CÓDIGOS, SIGLAS E FÓRMULAS

$\mu\text{g/mL}$: Micrograma por mililitro

$\mu\text{L/mL}$: Microlitro por mililitro

μL : Microlitros

A549: Linhagem celular de adenocarcinoma (pulmão)

ABTS: Método de análise antioxidante baseado no radical ABTS

ANOVA: Análise de Variância

Atm: Atmosfera (unidade de pressão)

C6: Linhagem celular de glioma de rato

cm^{-1} : Número de onda (frequência na espectroscopia)

DFT: Teoria do Funcional da Densidade

DMSO: Dimetilsulfóxido

DOXO: Doxorrubicina

DPPH: Radical livre estável usado em ensaios antioxidantes

eV: Eletronvolt

FRAP: Poder de redução do ferro (*Ferric Reducing Antioxidant Power*)

FTIR: Espectroscopia no Infravermelho com Transformada de Fourier

GC-MS: Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

GL: Linhagem celular de glioma

H_2O_2 : Peróxido de hidrogênio

IC_{50} : Concentração inibitória 50%

IFEAT: *International Federation of Essential Oils and Aroma Trades*

K: Kelvin (temperatura)

kHz: Quilohertz

L929: Linhagem celular de fibroblastos de rato

LC_{50} : Concentração letal 50%

m/s: Metro por segundo

$\text{meq O}_2/\text{kg}$: Miliequivalentes de oxigênio por quilograma

ml: Mililitros

mol/g: Mol por grama

MOMP: Permeabilização da membrana externa mitocondrial

MTS: Variante do ensaio MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio)

MTT: Ensaio colorimétrico de viabilidade celular (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio)

ODS: Objetivos de Desenvolvimento Sustentável

OEC: Observatório de Complexidade Econômica

ONU: Organização das Nações Unidas

PARPi's: Inibidores da poli-ADP-ribose polimerase

PDSW: Água de fumaça derivada de plantas

pH: Potencial hidrogeniônico

PUFAs: Ácidos graxos poli-insaturados

RSM: Modelagem de superfície de resposta

SES: Sistemas socioecológicos

W: Watt

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: MEV das flores de <i>Lavandula angustifolia</i> com ultrassom	29
Figura 2: Representação esquemática da parede celular vegetal e seus componentes	32
Figura 3: MEV da semente de <i>Elettaria cardamomum</i> com digestão enzimática	34
Figura 4: Peroxidação lipídica	38
Figura 5: Panorama do efeito de óleos essenciais nas vias de inibição intrínseca, extrínseca e PARPi	47
Figura 6: <i>Matourea azurea</i> (Linden) Colletta & V.C. Souza	52
Figura 7: Mapa de localização do plantio e prédio dos laboratórios	54
Figura 8: Propagação assexuada de <i>M. azurea</i>	55
Figura 9: Preparação do solo	56
Figura 10: Aparelho Clevenger	56
Figura 11: Método de hidrodestilação assistida por enzimas (Celluclast 1.5 L)	58
Figura 12: Plantio de <i>M. azurea</i>	65
Figura 13: Ensaio de cinética da flor, folha e talo	66
Figura 14: Hidrodestilação pós-enzimólise	71
Figura 15: <i>Post-hoc</i> – Teste Tukey (Celulase)	71
Figura 16: Cromatograma do óleo essencial de <i>M. azurea</i> após digestão enzimática (Controle – 1%)	75
Figura 17: Cromatograma do óleo essencial de <i>M. azurea</i> após digestão enzimática (1,5% - 2%)	76
Figura 18: FTIR – espectro do óleo essencial de <i>M. azurea</i>	77
Figura 19: Espectro IR do β -copaen-4a-ol	79
Figura 20: Espectro IR do viridiflorol	79
Figura 21: Espectro IR <i>trans</i> -pinocarveol	79
Figura 22: Espectro IR mirtenal	79
Figura 23: Espectro IR Pinocarvona	79
Figura 24: Moléculas otimizadas, terpenos presentes no óleo essencial de <i>M. azurea</i>	82
Figura 25: Atividade antioxidante de <i>M. azurea</i> em DPPH	88
Figura 26: Ensaio de citotoxicidade em células L929	92
Figura 27: <i>Post-hoc</i> – Teste Tukey (L929)	94
Figura 28: Proteção citológica - <i>M. azurea</i>	96
Figura 29: <i>Post-hoc</i> – Teste Tukey (Proteção Celular)	96

Figura 30: Atividade Metabólica de A549	99
Figura 31: <i>Post-hoc</i> – Teste Tukey (A549)	99
Figura 32: Citotoxicidade em células GL	101
Figura 33: <i>Post-hoc</i> – Teste Tukey (GL)	101
Figura 34: Atividade metabólica em células C6	102
Figura 35: <i>Post-hoc</i> – Teste Tukey (C6)	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Principais espécies vegetais produtoras de óleos essenciais na Amazônia Legal	20
Tabela 2: Espécies comerciais de óleo essencial e respectivos setores econômicos	22
Tabela 3: Substâncias identificadas no óleo essencial de <i>M. azurea</i>	68
Tabela 4: ANOVA <i>One-Way</i> – Óleo essencial <i>M. azurea</i>	72
Tabela 5: Perfil químico do óleo essencial de <i>M. azurea</i> após enzimólise de celulase	75
Tabela 6: Tipos de vibrações no espectro IR de terpenos do óleo essencial de <i>M. azurea</i>	80
Tabela 7: Descritores quânticos para as moléculas mais abundantes no óleo essencial de <i>M. azurea</i>	84
Tabela 8: Percentual de inibição do óleo essencial de <i>M. azurea</i>	85
Tabela 9: ANOVA dos tratamentos para o ensaio de citotoxicidade	93
Tabela 10: ANOVA dos tratamentos para o ensaio de proteção celular	97
Tabela 11: ANOVA da atividade metabólica de células A549	99
Tabela 12: ANOVA da atividade metabólica de células GL	101
Tabela 13: ANOVA da atividade antitumoral de células C6	101

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	14
2.	OBJETIVOS.....	16
2.1.	Objetivo Geral.....	16
2.2.	Objetivos Específicos.....	16
3.	REVISÃO DE LITERATURA.....	17
3.1.	Sustentabilidade e produção de óleos essenciais	17
3.2.	Mercado de Óleos Essenciais: setores e pesquisa.....	22
3.3.	Influência do pré-tratamento no processo de extração de óleos essenciais.	27
3.3.1.	Pré-Tratamento: Secagem.....	27
3.3.2.	Pré-Tratamento: Micro-ondas e ultrassom	29
3.3.3.	Pré-Tratamento: Digestão Enzimática	32
3.4.	Óleos Essenciais e potencial antioxidante	37
3.5.	A Teoria de Densidade Funcional (DFT) e sua aplicação em óleos essenciais	42
3.6.	Apoptose, câncer e o papel dos óleos essenciais	46
3.7.	Descrição da espécie: histórico, taxonomia e distribuição	50
3.7.1.	<i>Matourea Azurea</i> (Linden) Colletta; V.C. Souza.....	52
4.	MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1.	Local do Experimento	55
4.2.	Material Vegetal	55
4.2.1.	Obtenção Das Mudas.....	55
4.2.2.	Plantio Das Mudas.....	56
4.3.	Extração dos Óleos Essenciais.....	57
4.4.	Determinação do Teor de Óleo Essencial	58
4.5.	Pré-tratamento enzimático	58
4.6.	Caracterização do perfil químico do óleo essencial.....	60
4.6.1.	Cromatografia Gasosa/Espectrometria De Massas (CG/EM).....	60
4.6.2.	FTIR (<i>Fourier Transform Infrared Spectroscopy</i>)	60
4.7.	DFT (<i>Density Functional Theory</i>)	60
4.7.1.	Otimização Molecular	60
4.7.2.	Cálculo Computacional	61
4.8.	Atividade Antioxidante (DPPH)	62
4.9.	Ensaio de citotoxicidade ISSO 10993/5	63
4.9.1.	Preparação Das Amostras	63
4.9.2.	Citotoxicidade pela avaliação da atividade metabólica.....	64

4.9.3. Estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio em células de fibroblastos L929	64
4.10. Atividade Antitumoral	65
4.11. <i>Softwares</i> utilizados	65
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	66
5.1. Plantio de <i>M. azurea</i>	66
5.2. Hidrodestilação, cinética e umidade	67
5.3. CG/EM e substâncias identificadas	68
5.4. Pré-tratamento enzimático	72
5.5. Perfil químico do óleo essencial de <i>M. azurea</i> após digestão enzimática (CG/EM)	75
5.6. <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i> (FTIR)	78
5.7. DFT - <i>Density Functional Theory</i>	82
5.8. Atividade Antioxidante	89
5.9. Ensaio de Citotoxicidade	93
5.10. Proteção Celular	97
5.11. Atividade antitumoral	99
5.11.1. Linhagem A549 (adenocarcinoma – pulmão)	99
5.11.2. Linhagem GL (Glioma – cérebro)	101
5.11.3. Linhagem C6 – Câncer no cérebro'	102
6. Conclusão	105
REFERÊNCIAS	106
ANEXOS	126

1. INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são líquidos de misturas complexas de óleos aromáticos hidrofóbicos e podem ser extraídos de diversas partes dos vegetais como as folhas, flores, cascas e frutos. São sintetizados pelo metabolismo secundário que se distingue por não estarem envolvidos em processos geradores de energia e/ ou constituição do protoplasto (De Rezende et al., 2016; Falleh et al., 2020). São frequentemente encontrados em tricomas glandulares que se projetam da epiderme e não devem ser confundidos com óleos fixos ou óleos graxos, que são compostos por misturas naturais de lipídeos que não são necessariamente voláteis (Hüsni et al., 2007; Taiz; Zeiger, 2013; Kalemba; Synowiec, 2019). Os principais grupos que os constituem pertencem aos monos e sesquiterpenos. Estes podem ser classificados em hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ésteres e éteres.

O mercado internacional de óleos essenciais em 2021 foi estimado em US\$10,3 bilhões, correspondentes a 253 mil toneladas, com tendência de crescimento constante, devendo atingir de 15 a 16 bilhões de dólares anuais e 345 mil toneladas em 2026. A demanda ocorre principalmente pelos setores de bebidas e alimentos, fragrâncias, cosméticos e aromaterapia, uso doméstico e farmacêutico (Barbieri; Borsotto, 2018; Bizzo; Rezzende, 2022; Yeshi; Wangchuck, 2022).

Há alto investimento pelas indústrias de aromaterapia em função da mudança no comportamento dos consumidores que se tornam cada vez mais conscientes dos benefícios à saúde e dos problemas e efeitos colaterais de medicamentos convencionais a longo prazo (Yan et al., 2019). Os óleos essenciais também têm sido alvo na produção de pesticidas, um setor em crescimento impulsionado pela expansão do agronegócio, e nesse campo as pesquisas acadêmicas levam em consideração a qualidade, a conservação da biodiversidade e segurança ambiental evitando o aumento do efeito de seleção natural e da poluição (Devrnja et al., 2022).

Os óleos essenciais são protagonistas na indústria farmacêutica. O fato ocorre por conta de transições epidemiológicas e demográficas na sociedade, além da seleção natural e resistência aos medicamentos. No ponto de vista demográfico se observa queda nas taxas de fertilidade e mortalidade infantil em paralelo com a tendência de crescimento na proporção de idosos na população. No que diz respeito à transição epidemiológica se observa a substituição gradual de mortalidade por doenças causadas por agentes infecciosos e oportunistas por doenças crônicas, como a diabetes, Parkinson, Alzheimer e o câncer (Wild et al., 2020).

De acordo com Gautam et al. (2014) os óleos essenciais podem atuar no combate ao câncer promovendo a apoptose, assim como também na estabilização da mitose e meiose. A apoptose, conhecida também como morte celular programada, ocorre quando a estrutura química desses metabólitos é capaz de interagir nos processos de destruição celular. A literatura tem focado principalmente no mecanismo de apoptose, já que a necrose, uma outra forma de morte celular, envolve respostas inflamatórias (Brown; Attardi, 2005; Ng et al., 2018). Ademais, outra via alternativa de ação dos óleos essenciais em células tumorais é na desativação das PARPi's (*poly ADP ribose polymerase*) que estão envolvidas na reparação de DNA, programação de morte celular e integridade genômica.

Em conjunto com estudos de linhagens celulares e testes biológicos é necessário que sejam feitas análises físico-químicas para identificar os princípios ativos e seus respectivos grupos funcionais para compreender os possíveis processos de atuação em sistemas biológicos e melhor direcionamento do seu uso para os setores do mercado. A escolha por novas espécies tem sido norteada principalmente pelo etnoconhecimento além de critérios mais ortodoxos como a fácil propagação, alta adaptabilidade e rápido crescimento. Sendo assim, a espécie utilizada neste trabalho foi *Matourea azurea* (Plantaginaceae) por atender esses requisitos.

A ocorrência natural do gênero *Otacanthus*, antiga classificação taxonômica que estava inserida a *M. azurea* (recentemente incluída em *Matorurea*), abrange os estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e Minas Gerais, sendo restrita a região fitogeográfica da costa brasileira a leste. Seu óleo essencial possui grande potencial para o mercado por conta da sua composição química além de apresentar propriedades antifúngicas e atividade inibitória de moderada a forte no crescimento de protozoários de *Leishmania amazonensis*. Essa espécie também possui o maior rendimento de óleo essencial entre os representantes do antigo gênero *Otacanthus*, constituído principalmente por monoterpenos como o *trans*-pinocarveol, mirtenal e α -pineno; e sesquiterpenos como β -copaen-4 α -ol, viridiflorol, β -oplopenona e α -copaeno (Ronse, 2001; Andrade et al., 2006; Houël et al., 2014).

Diante do exposto, este projeto teve como objetivo realizar análises para traçar o perfil qualitativo do óleo essencial de *M. azurea* e entender a relação dos seus constituintes com a citotoxicidade, atividade antitumoral e capacidade antioxidante. Também foi realizada a extração assistida por enzimas que se justifica pela necessidade da produção industrial por maior rendimento desse tipo de bioproduto.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Comparar o rendimento de óleo essencial de *Matourea azurea* (Linden) Colletta & V.C. Souza entre a hidrodestilação tradicional e a hidrodestilação assistida por enzimas, assim como qualificar o seu perfil químico antes e após a digestão enzimática e investigar a sua atividade antioxidante e antitumoral.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar a propagação e o plantio da *Matourea azurea* (Linden) Colletta & V.C. Souza;
- Avaliar a influência do pré-tratamento enzimático no rendimento e na composição química do óleo essencial em contraste com a hidrodestilação tradicional;
- Identificar as moléculas mais abundantes na composição do óleo essencial e calcular seus descritores quânticos e o espectro vibracional no infravermelho através de técnicas de química computacional para auxiliar na interpretação dos dados experimentais;
- Avaliar a atividade antioxidante e antitumoral dos óleos essenciais obtida por hidrodestilação tradicional.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. SUSTENTABILIDADE E PRODUÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Para que políticas públicas sejam implementadas com eficiência dentro do âmbito da sustentabilidade é necessário um entendimento conceitual do termo *a priori*. Existem centenas de definições acumuladas ao longo de décadas de discussão. Ruggerio (2021) através de análise material com levantamento bibliográfico afirma que os trabalhos acadêmicos e relatórios institucionais acerca do tema incluem os seguintes critérios em síntese: a) Considerar a complexidade dos sistemas socioecológicos (SEs), incluindo os aspectos econômicos, ecológicos, sociais e políticos. Esse ponto ressalta que a sustentabilidade é uma questão multifacetada, exigindo uma abordagem abrangente que una essas dimensões interligadas. b) Atender à equidade entre gerações e dentro da mesma geração. Isso implica que a sustentabilidade deve assegurar justiça tanto para a geração atual quanto para as futuras, garantindo a disponibilidade de recursos e oportunidades para ambos os grupos. c) Reconhecer a estrutura hierárquica da natureza. Isso envolve reconhecer as interações e os ciclos de retroalimentação entre os SEs e seu ambiente, destacando o caráter dinâmico dos sistemas ecológicos e sociais e suas interconexões.

A construção desse tipo de análise na academia tem uma lógica diferente das ciências biológicas e exatas por conta do tipo de ferramentas empregadas para a formação de epistemes nesses dois campos do conhecimento. Enquanto que na biologia e afins essas ferramentas se aprimoram com o desenvolvimento tecnológico, nas ciências humanas esse processo se dá partir de análises sociológicas através de diversas teorias culturais que tem um tempo de “obsolescência” mais lento comparado às técnicas das exatas. Nesse sentido a própria história continua sendo um método de análise material e é importante para o campo da sustentabilidade porque muitos problemas que se acentuaram décadas atrás ainda não foram superados. Por exemplo, Rossi e Demuru (2024) afirmam que países desenvolvidos têm muita resistência em aceitar a responsabilidade de danos ambientais e evitam contratos de adequação que podem diminuir o ganho de receita e endossam o discurso de medidas compensatórias que nem sempre englobam todas as dimensões do problema.

O termo “sustentabilidade” tem um histórico longo de discussão que passa a ter um formato mais parecido com o que se tem hoje em dia a partir de 1950, em decorrência do debate acerca do aumento da atividade nuclear que propiciou o surgimento das chuvas ácidas.

Posteriormente, devido à repercussão do livro “*Silent spring*” da bióloga Rachel Carson, também se adicionou às pautas as denúncias relacionadas a inseticidas e pesticidas, um ponto que até hoje tem implicações seríssimas em regiões rurais pois atravessa conflitos e está relacionado com mortes por toxicidade e anomalias genéticas (Bombardi, 2017; Evaristo et al, 2022). Nessas problemáticas se configurava um impasse ético: os efeitos colaterais negativos não se limitavam ao território daqueles que geravam poluição, e se estendiam a populações que nada tinham a ver com essas práticas e muitas vezes se encontravam em situação de vulnerabilidade (McCormick, 1991; Nascimento 2012).

No início dos anos 90, Ignacy Sachs (1993) formulou os princípios básicos do ecodesenvolvimento, termo utilizado pela primeira vez em 1973 por Maurice Strong, pressupondo a existência de cinco dimensões: sustentabilidade social, sustentabilidade econômica, sustentabilidade ecológica, sustentabilidade espacial e sustentabilidade cultural, introduzindo um importante dimensionamento da sua complexidade e superando a ideia de Desenvolvimento Sustentável vigente na década de 90 que se segmentava no tripé: econômico, ambiental e social (Nascimento, 2012). Para Jacobi (1999) esses princípios articulam-se com as teorias de autodeterminação que estavam sendo defendidas pelos países não-alinhados desde a década de 60. O autor também defende que o desenvolvimento sustentável não se refere especificamente a um problema limitado de adequações ecológicas de um processo social, mas a uma estratégia ou modelo múltiplo para a sociedade, que deve levar em conta tanto a viabilidade econômica como a ecológica.

Cunhando o termo “Desenvolvimento Sustentável”, Nascimento (2012) propôs que ele se tornasse um campo de disputa, um conceito teórico de Bourdieu, com múltiplos discursos que ora se opõem, ora se complementam. O campo é uma categoria que pode ser definida como uma rede, ou configuração, de relações objetivas entre posições. Essas posições são determinadas pela distribuição de diferentes tipos de capital (econômico, cultural, social e simbólico) que são específicos a cada campo. Dentro de cada campo, há uma constante luta ou disputa entre os agentes para manter ou melhorar suas posições. Essa disputa é pelo controle dos recursos e capitais específicos do campo que podem ser tanto materiais quanto simbólicos (Harvey et al., 2020).

Nascimento (2012) enfatiza que o domínio da polissemia é a expressão maior desse campo de forças, que passa a condicionar posições e medidas de governos, empresários, políticos, movimentos sociais e organismos multilaterais. De certa forma, essa tese complementa a conclusão de Ruggerio (2021) onde afirma ser essencial entender que, embora

seja desejável desenvolver uma definição abstrata do conceito, a sustentabilidade só terá real significado quando aplicada a uma escala geográfica específica. Nascimento (2012) não propôs um novo conceito de sustentabilidade para solucionar a questão da polissemia mas adaptou essa problemática sob a ótica da teoria cultural de Bourdieu enquanto ferramenta sociológica. Parte substancial dessa disputa atravessa o âmbito do discurso, cujo poder de capilaridade social se potencializa de acordo com o capital cultural, político e econômico de cada agente inserido no campo, como apontado em Machado (2005). No entanto, o desenvolvimento sustentável também foi proposto como um conceito político normativo por Nobre e Amazonas (2002), uma noção que já estava presente no clássico relatório “Nosso Futuro Comum” de Gro Brundtland (1987).

Em setembro de 2015, durante a 70ª Sessão da Assembleia Geral da ONU em Nova York, os Estados-membros adotaram formalmente a Agenda 2030 para o Desenvolvimento Sustentável, que inclui os 17 Objetivos de Desenvolvimento Sustentável e suas 169 metas (Oliveira, 2024). Ela se baseia em uma história de negociação política de princípios básicos, como os direitos humanos ou a justiça intra e intergeracional, com marcos como a Declaração dos Direitos Humanos (1948), a Conferência das Nações Unidas sobre o Meio Ambiente Humano (1972), o Relatório Brundtland (1987), a Cúpula da Terra no Rio de Janeiro (1992) e o Rio + 20 (2012).

De acordo com o IPEA (2015) os Objetivos do Desenvolvimento Sustentável (ODS) podem ser concentrados em quatro dimensões a social, a econômica, a ambiental e a 16 institucional, havendo integração e interdependência entre eles. Esses objetivos foram a síntese de discussões em eventos anteriores como na conferência Rio +20. Nesse contexto, o estímulo da extração sustentável dos óleos essenciais contempla pelo menos os seguintes objetivos:

ODS 2 – Acabar com a fome, alcançar a segurança alimentar e melhoria da nutrição e promover a agricultura sustentável;

ODS 3 – Assegurar uma vida saudável e promover o bem-estar para todos, em todas as idades;

ODS 8 – Promover o crescimento econômico sustentado, inclusivo e sustentável, emprego pleno e produtivo, e trabalho decente para todos;

ODS 9 – Construir infraestrutura resiliente, promover a industrialização inclusiva e sustentável, e fomentar a inovação.

A coleta de matéria-prima, beneficiamento, extração e produção de derivados em comunidades rurais são considerados como uma atividade econômica que utiliza energia limpa e que gera em maior proporção resíduos orgânicos que podem ser tratados e destinados dentro da lógica da economia circular.

Apesar de desafiador é plausível trazer essa lógica para o Amazonas, estado de interesse do financiamento desta pesquisa. A Amazônia como um todo, é um território complexo e com uma grande variedade étnica, com povos originários, tradicionais, com estilo pré-capitalista e capitalistas coexistindo nesse espaço (Witkoski, 2023). Para Lara et al. (2021), as espécies vegetais podem fornecer além de recursos para a produção artesanal, produtos florestais não madeireiros como os óleos essenciais nas comunidades amazônicas que vivem na área sem prejudicar o bioma local. A produção de óleo essencial é uma atividade econômica na região e as ODS podem ser atendidas a partir do poder legislativo e do intercâmbio entre entidades de pesquisa, extensão e comunidades.

Segundo Almeida (2016), existem aproximadamente 339 espécies de plantas produtoras de óleo essencial na Amazônia Legal, porém apenas uma pequena parte é comercialmente conhecida. Seu trabalho identificou algumas listadas na tabela 1. Vale mencionar que nem todas têm origem na região Amazônica. O autor, com base em uma Matriz de Importância e Desempenho identificou relativa importância na produção de óleos essenciais no Pará e no Amazonas no cenário de sustentabilidade econômica, embora a concorrência com produtos sintéticos, o acesso às árvores, precariedades na infraestrutura (estradas, pontes e vicinais), a logística e o nível de instrução dos trabalhadores sejam problemas a serem superados. Dos Santos et al., (2021) também apontam que as bioindústrias de cosméticos no Amazonas têm dificuldade na regulação do provisionamento das matérias-primas, tendo em vista que o cultivo desses insumos apresenta sazonalidade.

A descoberta de novos fármacos está diretamente relacionada ao Objetivo de Desenvolvimento Sustentável (ODS) 3: "Saúde e Bem-estar" e se associa com a bioprospecção do óleo essencial de *M. azurea*. Para Souza et al. (2022), a bioprospecção envolve a busca por compostos orgânicos em micro-organismos, plantas e animais que possam ser benéficos para a humanidade. Esta atividade pode ser aplicada em diversas áreas, como química (farmacêutica, pesticidas, cosméticos, alimentos), genética (engenharia genética, fermentação, cultura celular) e biônica (sensores, bioengenharia). Para isso, utilizam-se métodos convencionais (como extrações líquido-líquido, HPLC, espectrometria de massas, entre outros) e métodos de química verde (sem solventes orgânicos, utilizando ultrassom, enzimas, micro-ondas etc.).

Tabela 1: Principais espécies vegetais produtoras de óleos essenciais na Amazônia Legal

Nome vulgar	Nome científico	Família
Pau rosa	<i>Aniba roseodora</i>	Lauraceas
Copaíba	<i>Copaifera langsdorffii</i>	Leguminosae-Caesalpinioideae
Casca preciosa	<i>Aniba canelilla</i> (Kunth) Mez.	Lauraceas
Pataqueira	<i>Conobea scoparioides</i>	Scrophulariaceae
Capim vetiver	<i>Vetiveria zizanioides</i>	Gramineae
Cipó-alho	<i>Mansoa alliacea</i> (Lam.) A.H. Gentry	Bignoniaceae
Sacaca	<i>Croton cajuçara</i> Benth. 1854	Euphorbiaceae
Pimenta longa	<i>Piper hispidinervium</i>	Piperaceae
Pimenta de macaco	<i>Piper aduncum</i> L.	Piperaceae
Priprioca	<i>Cyperus articulatus</i> L.	Cyperaceae
Puxuri	<i>Licaria puchury-major</i> (Mart.) Korstem, 1937	Lauráceas
Breu Branco	<i>Protium</i> spp.	Burseraceae
Alfavaca	<i>Ocimum gratissimum</i> L. 1753	Labiatae (Lamiaceae)
Sassafrás-do-Pará	<i>Ocotea cymbarum</i> Kunth.	Lauraceas
Jaborandi	<i>Pilocarpus microphyllus</i> Stapf. ex Wardleworth, 1893	Rutaceae
Cumarú	<i>Dipteryx odorata</i>	Papilionoideae

Fonte: Almeida (2016).

A bioprospecção pode ser realizada por diferentes abordagens, incluindo a etnofarmacológica, quimiosistemática, via ecologia molecular e tentativa e erro. Dentro da ODS 3 várias metas específicas se alinham com a pesquisa de fitoquímicos e a produção de novos medicamentos. Dentre elas pode-se citar a meta 3.b:

Apoiar a pesquisa e o desenvolvimento de vacinas e medicamentos para as doenças transmissíveis e não transmissíveis que afetam principalmente os países em desenvolvimento, fornecer acesso a medicamentos e vacinas essenciais a preços acessíveis, de acordo com a Declaração de Doha sobre o Acordo TRIPS e a Saúde Pública, que afirma o direito dos países em desenvolvimento de utilizarem ao máximo as disposições do Acordo sobre Aspectos dos Direitos de Propriedade Intelectual Relacionados ao Comércio em relação à flexibilização para proteger a saúde pública, e, em particular, fornecer acesso a medicamentos para todos (IPEA, 2015, p. 100).

A sustentabilidade desempenha um papel crucial na produção e uso de óleos essenciais, pois garante que os recursos naturais utilizados sejam manejados de forma responsável, preservando a biodiversidade e os ecossistemas. À medida que a demanda por óleos essenciais cresce no mercado global, práticas sustentáveis são essenciais para evitar a superexploração de plantas e garantir a longevidade das cadeias produtivas. Além disso, a produção sustentável valoriza a responsabilidade social e econômica, promovendo o bem-estar

das comunidades locais envolvidas no cultivo e na extração desses recursos naturais, assegurando um equilíbrio entre o crescimento econômico e a preservação ambiental.

3.2. MERCADO DE ÓLEOS ESSENCIAIS: SETORES E PESQUISA

A demanda dos óleos essenciais de forma global ocorre principalmente pelos seguintes mercados: bebidas e alimentos (35%), fragrâncias, cosméticos e aromaterapia (29%), uso doméstico (16%) e farmacêutico (15%) (Barbieri; Borsotto, 2018). A indústria de perfumaria tem grande interesse na fragrância dos óleos essenciais, e mesmo com o surgimento de moléculas sintéticas a demanda por matéria-prima natural não foi superada (Sharmeen, 2021).

Em relação às análises de mercado a principal dificuldade se encontra na gestão dos dados, pois muitos países não divulgam as receitas de exportação ou emitem relatórios com base diferente. Os óleos essenciais também podem ser incluídos em outras categorias na estrutura dos bancos, o que torna os modelos matemáticos subestimados (Barbieri et al., 2018; Bizzo; Rezzende, 2022).

Em 2022, os principais exportadores de óleos essenciais (desterpenados ou não), incluindo os resinoides; oleorresinas de extração; soluções concentradas de óleos essenciais em gorduras, óleos fixos, ceras ou substâncias análogas foram a Índia com US\$ 879 milhões, os Estados Unidos com US\$ 693 milhões, o Brasil com US\$ 425 milhões, a França US\$ 424 milhões, e a China com US\$ 407 milhões (OEC, 2024). Esses dados também estão de acordo com a pesquisa de Bizzo e Rezzende (2022) que apontam esses países como líderes em receita e produção em toneladas, este último com a liderança do Brasil.

Bizzo e Rezzende (2022) listaram as principais espécies vegetais produtoras de óleo essencial em nível mundial a partir de dados da *International Federation of Essential Oils and Aroma Trades* (IFEAT) e estão compiladas na tabela 2.

Apesar de haver uma corrida nos laboratórios do mundo em busca de novos componentes e espécies promissoras, alguns produtos à base de óleo essencial presente nas prateleiras já tiveram eficácia testada. É o caso do PrevAM, um inseticida que tem como base o óleo de laranja, e o Requiem que tem como base a mistura de três monoterpênicos e ambos se mostraram competitivos contra os inseticidas convencionais no combate à *M. persicae* e *Aphis gossypii* em condições controladas (Isman et al., 2020).

Tabela 2: Espécies comerciais de óleo essencial e respectivos setores econômicos

Óleo Essencial	Quantidade (ton)	Usos
Laranja (<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck e outras)	50.000-55.000	Bebidas, aromatizante
Menta japonesa (<i>Mentha arvensis</i> L.)	25.000-40.000	Aromatizante, mentol
Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i> Labill.)	5.000-11.000	Aromatizante, medicamentos
Limão siciliano (<i>Citrus limon</i> (L.) Osbeck)	7.000-7.500	Bebidas, aromatizante
Hortelã-pimenta (<i>Mentha x piperita</i> L.)	4.000-4.500	Aromatizante, higiene oral
Cravo, folhas (<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. & L.M.Perry)	2.500-4.000	Fragrâncias, aromatizante
Menta (<i>Mentha spicata</i> L.)	2.000-3.700	Aromatizante, higiene oral
Cedro da Virgínia (<i>Juniperus virginiana</i> L.)	2.000-3.500	Fragrâncias
Citronela (<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt ex Bor)	1.500-3.000	Fragrâncias

Fonte: Bizzo e Rezzende (2022)

Nos parágrafos seguintes serão abordadas pesquisas com espécies comerciais ou com potencial dentro de setores como controle biológico, alimentício e farmacêutico.

Em relação ao controle biológico, Emamjomeh et al. (2023) investigaram o efeito do óleo essencial de *E. globulus* em larvas do terceiro estágio de *Ephestia kuehniella* (lepidóptera). Tendo como principais constituintes o 1,8 cineol e para-cimeno, houve uma melhora no efeito tóxico em quatro vezes a mais. Os autores afirmam que a nano encapsulação contribui para a redução da volatilidade do óleo essencial, assim, os princípios ativos são liberados de forma gradual e a toxicidade às larvas se mantém ao longo do tempo reduzindo significativamente o LC₅₀ em comparação com o óleo essencial sem tratamento.

Uma preocupação atual para humanidade é a resistência de microrganismos aos medicamentos, era imaginado que esse ponto chegaria, mas há uma aceleração desse processo por conta do comportamento incorreto do ser humano com automedicação e despejo inadequado impulsionando a seleção natural de microrganismos (Lim et al., 2024).

Nesse contexto, o uso dos óleos essenciais tem sido uma linha de estudo na tentativa de que sua associação com antibióticos melhore a permeabilidade da membrana plasmática. É o caso do trabalho de Iseppi et al. (2023) ao estudar *E. globulus* e *Melaleuca alternifolia* Chell em *Staphylococcus aureus* resistentes à meticilina, um antibiótico beta lactâmico de pequeno espectro pertencente ao grupo das penicilinas. Os óleos foram testados em 3 linhagens da

bactéria de forma individual, em associação com oxacilina, e associação óleos essenciais-óleos essenciais. Em todos os tratamentos foi observado diminuição da carga de bactérias. A melhor atividade sinérgica foi observada na associação do óleo essencial de *E. globulus* com oxacilina e a interação entre os óleos essenciais das duas espécies vegetais, ambos tratamentos apresentando concentração inibitória fracionada de 0,19. De forma geral foi concluído que após os tratamentos houve a danificação da parede celular da bactéria de forma irreversível, com liberação de ácidos nucleicos e proteínas.

Recentemente, Imane et al. (2020) conduziram um estudo relevante com bactérias resistentes a antibióticos diversos e puderam constatar que o óleo essencial de *M. alternifolia* foi mais eficiente que o antibiótico cloranfenicol provavelmente pela grande concentração de α -careno, α -pineno e terpinen-4-ol.

No combate aos fungos pode-se citar o trabalho de Kenfaoui et al. (2023). Os autores avaliaram o efeito de seis óleos essenciais em *Diplodia mutila*, *Neoscytalidium novaehollandiae*, *Trichothecium roseum*, e *Neopestalotiopsis vitis*. Esses fungos atacam os troncos de pés de uva e atingem diretamente a produção de vinhos e sucos. A máxima inibição de crescimento ocorreu na concentração de 100 μ L/mL e todos os óleos tiveram efeito significativo positivo. Para *D. mutila*, os melhores desempenhos foram de *E. globulus*, *Mentha spicata*, e *Rosmarinus officinalis* com 81,37%, 80,08% e 53,75% de inibição, seguindo a ordem. Contra *N. vitis*, *C. zeylanicum* e *L. latifolia* apresentaram respectivos 91,75% e 74,95% de inibição. *N. novaehollandiae* foi mais suscetível ao óleos essenciais de *R. officinalis* com 78,70% de inibição. *T. roseum* foi o fungo que sofreu expressiva ação inibitória com todos os óleos testados, mesmo em baixas concentrações. *E. globulus* mostrou redução no crescimento de micélio nos quatro fungos em diferentes concentrações.

Segundo Santos et al. (2023) o óleo essencial de *Citrus sinensis*, a espécie mais produzida em toneladas como mostrado na tabela 1, é composto principalmente por limoneno independentemente da variedade, apresentando maior concentração desse ativo no epicarpo (80% a 95 %). Maiores concentrações foram observadas em extrações que misturaram as cascas e folhas (Sharma; Tripathi, 2006; Singh et al., 2010; Zhang et al., 2019; Magalhães et al., 2020; Matuka et al., 2020). O limoneno, mirceno, α -pineno e sabineno são compostos que permanecem nas cascas mesmo após métodos de secagem e hidrodestilação. Magalhães et al. (2020) também constataram atividade antifúngica desse óleo essencial contra *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus flavus* inibindo seu crescimento a 125 μ g/ml. Porém os pesquisadores não encontraram atividade antioxidante para os métodos ABTS e DPPH. Em contrapartida,

Manzur et al. (2023) analisaram a atividade antioxidante do óleo essencial de *Citrus sinensis* neutralizou radicais livres e concluíram seu potencial na preservação de produtos alimentícios.

O gênero *Mentha* oferta uma extensa variedade de possibilidades de uso para as indústrias alimentícias e nutraceuticas por conta de métodos de cultivos bem estabelecidos e pelo valor medicinal de seus compostos químicos. A geração de espécies de oxigênio reagentes (ROS), citotoxicidade, atividade antioxidante, antidiabética e antimicrobiana de extratos fermentados de *Mentha arvensis* corroboram a segurança de medicamentos e alimentos sem efeitos colaterais. (Asghar et al., 2022). O principal constituinte do seu óleo essencial é o mentol, e pode ser identificado α -pineno, β -pineno e mirceno em menores percentagens. Pode ser encontrado também limoneno, pulegona, isomentona, mentil acetato, sabineno e isomentol (Asghar et al., 2022; Truong et al., 2022; Singh et al., 2023).

De forma geral, os óleos essenciais têm problemas para manter sua integridade devido à sua fácil volatilização. Dentre as estratégias para se mitigar esse efeito negativo se encontra a encapsulação que pode ser definida como o processo de encapsular uma substância dentro de outra e se subdivide em duas classificações de acordo com o tamanho da partícula: microencapsulação e nano encapsulação. A técnica consiste em utilizar um fluido que pode ser uma solução, emulsão ou suspensão contendo o núcleo e o material que constituirá a parede e após o processo se obtém microcápsulas com óleo no interior e pode ser usada para encapsular aromatizantes, lipídios e pigmentos (Martins et al., 2014). Truong et al. (2022) optaram pelo método de secagem por spray (*spray drying*) por conta da simplicidade e eficiência. Para essa espécie as melhores condições foram: concentração de material para a parede de 25% (w/w), a concentração de óleo essencial de 1,5% (w/v) através do método de homogeneização, a temperatura de entrada a 140 °C e taxa de alimentação de fluxo de 8 mL/min. A maior eficiência de microencapsulação foi de 98% e se observou aumento na quantidade de Mentol que passou de 52,1% para 62,7%. Os autores afirmam que esse aumento pode ser em decorrência do desaparecimento de neoisomentol, pulegona, β -Bourbonene e nerolidol por conta da alta temperatura.

Outra técnica alternativa e que visa o aumento do rendimento de óleos essenciais é o uso de água defumada derivada de plantas (PDSW – *Plant-derived smoke water*) e *karrikinolide* que interfere na atividades fisiológicas e composição dos bioativos do óleo essencial. Singh et al. (2023) utilizou essa técnica com *Mentha arvensis* onde a fumaça foi criada a partir da combustão da palha de trigo e incorporada em água destilada em 4 concentrações diferentes.

Dentre os resultados, foi observado o aumento nos tricomas glandulares e nos estômatos e consequentemente resultou na produção de mais óleo essencial. PDSW (1:500 v/v) aumentou os tricomas glandulares em 24,75% em relação ao controle e o *karrikinolide* (10^{-8} M) em 17,32%. Além disso, a cromatografia mostrou ganho de 29,94% e 25,42% respectivamente na percentagem de mentol.

Eucalyptus spp compõe um gênero vegetal de notório interesse econômico devido ao seu rápido crescimento, qualidade do fuste para fins madeireiros e indústria de celulose, além de se poder extrair óleo essencial. O seu principal composto de interesse é o 1,8 cineol, também chamado de eucaliptol, além de limoneno, terpinen-4-ol, α -pineno, β -pineno, mirtenol, canfeno entre outros em menores quantidades (Silvestre et al., 1997; Boukhatem et al., 2020; Kenfaoui et al., 2023). Os extratos de suas folhas apresentam propriedades antissépticas e auxiliam no combate de doenças respiratórias do trato superior e doenças cutâneas por ser antifúngico, bactericida e larvicida. Devido ao seu aroma agradável é utilizado como aromatizante e absorvido pela indústria de cosméticos (Elzayyat et al., 2018; Shala; Gururani, 2021; Mehta; Sharma, 2022).

Em relação aos cosméticos pode-se citar também o trabalho de Almeida et al. (2022), onde se utilizou o hidrolato em membrana nano celulósica de bactérias para a obtenção de ativos *anti-aging* para a formulação de produtos voltados para o *skincare*, a escolha da matéria prima é interessante porque hidrolato costuma ser visto como resíduo e descartável o que leva o não aproveitamento de toda a potencialidade química da hidrodestilação. Os resultados foram promissores pois as membranas impregnadas com hidrolato apresentaram boas propriedades mecânicas em rigidez e elasticidade, além de boas métricas para atividade antioxidante.

Como visto, os óleos essenciais desempenham um papel crescente no mercado por conta da sua versatilidade que tem sido explorada em diversas aplicações, o que ressalta sua importância econômica e funcional. No entanto, apesar de sua popularidade, ainda há uma necessidade urgente de novas pesquisas que investiguem de forma mais aprofundada os mecanismos de ação, segurança de uso, e potenciais terapêuticos de componentes específicos dos óleos essenciais. Isso é crucial para validar cientificamente suas aplicações e desenvolver novos produtos mais eficazes e seguros, assegurando sua viabilidade sustentável no mercado a longo prazo.

3.3. INFLUÊNCIA DO PRÉ-TRATAMENTO NO PROCESSO DE EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS.

O pré-tratamento é uma etapa fundamental na extração de óleos essenciais e tem como objetivo otimizar a eficiência do processo de extração e a qualidade do produto. Esta fase envolve diversas técnicas que podem incluir desde métodos físicos, como a trituração e secagem das plantas, até tratamentos químicos, como a aplicação de solventes e enzimas. Recentemente, estudos têm demonstrado que a aplicação de ultrassom durante o pré-tratamento pode aumentar significativamente a extração de compostos bioativos, melhorando o rendimento e a pureza do óleo essencial (Wang et al., 2023). Além disso, a utilização de micro-ondas tem se mostrado uma alternativa promissora, reduzindo o tempo de extração e preservando as características sensoriais e químicas dos óleos (Gavahian et al., 2022). Esses avanços tecnológicos não apenas aumentam a eficiência do processo, mas também contribuem para a sustentabilidade, ao reduzir o consumo de energia e solventes (Zhang et al., 2021). Assim, o desenvolvimento e a implementação de técnicas de pré-tratamento são cruciais para a evolução das práticas de extração de óleos essenciais, garantindo produtos de alta qualidade e processos mais sustentáveis. A seguir serão abordados os pré-tratamentos de forma mais detalhada

3.3.1. *Pré-Tratamento: Secagem*

Dentre as diversas possibilidades de pré-tratamento está a variação de temperatura de secagem, um método eficaz para aumentar a vida útil do produto retardando o crescimento de microrganismos e impedindo certas reações bioquímicas que podem alterar as características organolépticas (Díaz-Maroto et al., 2004; Osaie et al., 2021).

No entanto, esse processo pode afetar negativamente o rendimento do óleo essencial por conta da degradação de componentes que são bastante sensíveis à temperatura. Argyropoulos e Müller (2014) propõem que em relação a degradação dos componentes, a ocorrência depende do ponto de ebulição, portanto no caso do seu estudo com o óleo essencial de *M. officinalis* os seus principais constituintes geraniol, citronelol e neral, não apresentaram perda de qualidade pois o ponto de ebulição de seus componentes está entre 208 °C e 260 °C. Entretanto mudanças estatisticamente significativas podem acontecer no nível de composição química trazendo vantagens sobre substâncias de interesse econômico. Isso se observou por exemplo no experimento conduzido por Blanco e Bovi (2000) com alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) onde

as médias da porcentagem de α -pineno, mirceno e cânfora diferiram em função do aumento de temperatura (40, 60 e 80 °C), sendo que o α -pineno reduziu em quantidade enquanto os outros dois aumentaram. Em adição, Carvalho Filho et al. (2006) utilizando as mesmas temperaturas para *Ocimum basilicum* L. encontraram comportamento similar para a concentração de cânfora em temperaturas mais elevadas e em ambos os trabalhos o rendimento do óleo essencial diminuiu com a elevação do calor.

Ebadi et al. (2015) ao trabalhar com secagem através de estufa, de congelamento, a vácuo e a sombra observaram que algumas substâncias poderiam estar ausentes ou presentes a depender do método para o óleo essencial de *Lippia citriodora* Kunth. O α -pineno só foi detectado no tratamento com secagem a vácuo na temperatura de 60 °C; já o nerol só esteve presente quando a secagem foi a sombra ou na estufa a 40 °C. Pirbalout et al. (2013) afirmam que as mudanças e o surgimento de novos constituintes podem ocorrer principalmente por conta de reações de oxidação, hidrólise por glicosídeos e esterificação.

Mashkani et al. (2018) ao pesquisar pré-tratamentos térmicos do óleo essencial de *Thymus daenensis* Celak, reportaram a diminuição da quantidade de monoterpenos hidrocarbonatos, como α -tujeno, α -pineno, mirceno, α e γ -terpineno, para-cimeno e 1, 8- cineol em relação à testemunha, com exceção de quando submetidos a secagem em estufa a 35 °C. Os autores também observaram que houve mais processos de conversão de terpenos hidrocarbonados para oxigenados, o que pode ser explicado pelas vias de biossíntese do timol e carvacrol.

Os valores absolutos dos componentes por si só são insuficientes para se fazer um juízo de valor, isso depende do contexto e da finalidade do óleo essencial. Por exemplo, o α -pineno é um composto que tem grande aplicação em medicamentos para tratamentos respiratórios e intestinais, já o mirceno é utilizado como anti-inflamatório e analgésico, então pode-se manipular a temperatura com o fim de otimizar um ou outro componente para determinado uso (Argyropoulos; Müller, 2014; Lopes et al., 2022). Vale ressaltar que outras variáveis como a intensidade e tempo de exposição à luz podem afetar a quantidade de um mesmo composto dentro da mesma espécie ou diferentes devido a processos de reação oxidativa, temperatura de ebulição, isômeros entre outros.

A taxa de aquecimento ou de secagem é um parâmetro que também pode afetar no rendimento dos óleos essenciais. Khater et al. (2024) ao trabalhar com a espécie *Origanum majorana* L. observaram que a taxa de secagem também teve interação com as dimensões do

material, mais especificamente com a espessura das folhas. Os resultados indicaram que a taxa de secagem diminui com o aumento da espessura da camada e a temperatura durante o período experimental. Os autores também observaram maior rendimento no óleo extraído após a secagem com equipamento solar (2,91%) do que o extraído por estufa (1,07%).

Karami et al. (2024), pesquisaram a influência da secagem para *Artemisia dracunculus* L. e concluíram que a secagem feita em baixas temperaturas apresentaram maior rendimento de óleo essencial. O menor tempo para reduzir a umidade para 12% foi de 180 minutos a 70° e ventilação a 2 m/s. A velocidade de ventilação também foi avaliada em 1 e 1,5 m/s, porém não houve diferença estatisticamente significativa entre esses dois valores.

Como foi visto, a secagem também pode ser feita por aparatos menos convencionais que estufas, na literatura pode-se encontrar experimentos conduzidos com micro-ondas, raio infravermelho, secador solar etc. A secagem de plantas medicinais ao sol pode ser prejudicial pois o processo de foto decomposição ocorre intensamente, degradando os componentes químicos e ocasionando alterações de cor, sabor e odor das partes vegetais. Isso porque há a possibilidade de compostos insaturados passarem por reações fotoquímicas de ciclo adição, como observado em muitos dienos conjugados resultando na formação de diversos produtos (Hendrickson; Hammond, 1970; Martins et al., 2000; Khater et al., 2024).

3.3.2. Pré-Tratamento: Micro-ondas e ultrassom

A extração de óleos essenciais por micro-ondas é uma técnica moderna que vem ganhando destaque por sua eficiência e sustentabilidade em comparação aos métodos tradicionais como a destilação a vapor e extração com solventes. Esta técnica utiliza radiação eletromagnética no espectro de micro-ondas para aquecer seletivamente o material vegetal, resultando em uma liberação mais rápida e eficiente dos óleos essenciais (Kant et al., 2022).

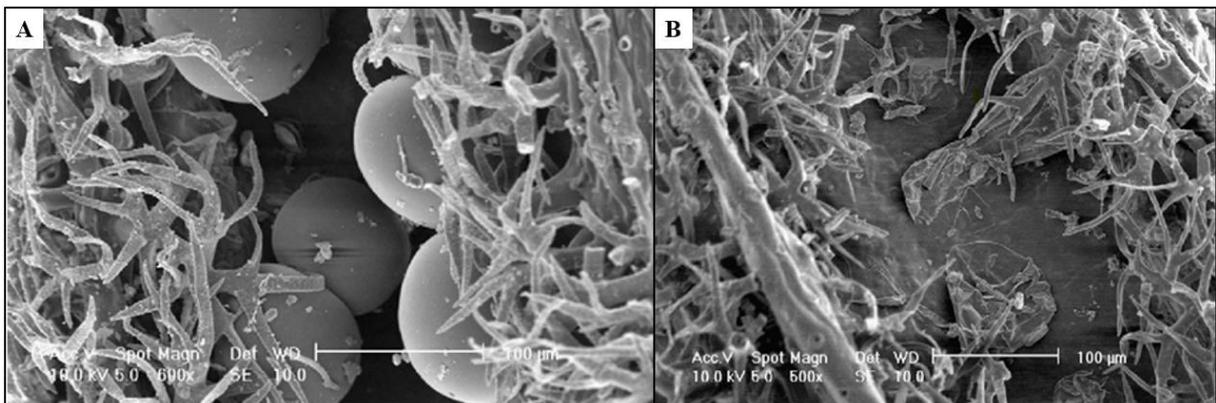
A eficiência da técnica de extração com micro-ondas está fundamentada em dois principais fenômenos físicos: o aquecimento dielétrico e a eficiência térmica localizada. No primeiro fenômeno as micro-ondas interagem diretamente com as moléculas polares de água presentes no interior das células vegetais. Este aquecimento é extremamente rápido e localizado, fazendo com que a água dentro das células se vaporize rapidamente. Como resultado, a pressão interna aumenta, rompendo as paredes celulares e liberando os óleos essenciais. Essa capacidade de aquecimento seletivo e localizado é um dos fatores que explica

o aumento no rendimento da extração em comparação a métodos tradicionais. Em relação a eficiência térmica localizada ao contrário de técnicas como a destilação a vapor, onde o calor é fornecido de fora para dentro, o micro-ondas aquece as moléculas de água dentro do material vegetal, o que minimiza a perda de energia para o ambiente. Isso também resulta em uma extração mais rápida e eficiente dos compostos voláteis que compõem o óleo essencial (Boutemtam et al., 2020; Drinić et al., 2020; Dewi et al., 2022).

A extração de óleos essenciais com ultrassom, também conhecida como extração assistida por ultrassom (UAE - *Ultrasound-Assisted Extraction*), é uma técnica que tem ganhado popularidade devido à sua eficiência, rapidez e menor impacto ambiental em comparação aos métodos tradicionais. O uso de ondas ultrassônicas provoca fenômenos físicos que aumentam a liberação dos compostos voláteis, como os óleos essenciais, das células vegetais. O ultrassom utiliza ondas sonoras de alta frequência (geralmente entre 20 kHz e 100 kHz) para promover a extração (Jafari et al., 2022; Gavrilina et al., 2023; Chen et al., 2024).

A degradação das glândulas celulares pode ser evidenciada por microscopia de varredura como feito em Farhat et al. (2009) de acordo com a figura a seguir:

Figura 1: MEV das flores de *Lavandula angustifolia* com ultrassom



A: Glândulas secretoras sem pré-tratamento. B: Glândulas degradadas após uso do ultrassom.
Fonte: Fahrhat et al. (2009).

Dois princípios físicos são fundamentais para a eficácia desse método: a cavitação acústica e agitação mecânica. No primeiro as ondas ultrassônicas atravessam um meio líquido (como uma solução contendo o material vegetal), formam-se bolhas de vácuo ou microbolhas devido à alternância de ciclos de compressão e rarefação. As bolhas podem ser estáveis ou transitórias. As bolhas transitórias têm um papel crucial neste contexto, pois são responsáveis por desencadear reações soniquímicas. Elas sofrem repetidos ciclos de expansão e contração

até que se tornem instáveis e se fragmentem em bolhas menores. Eventualmente, essas bolhas colapsam e implodem, gerando o fenômeno conhecido como sonoluminescência. Esse colapso provoca uma elevação significativa de pressão (chegando a 1000 atm) e temperatura (até 5000 K) no ambiente. Esses processos culminam na cavitação acústica, o principal mecanismo que impulsiona a extração de óleos essenciais de materiais vegetais por ultrassom. No segundo princípio, além da cavitação, o ultrassom também promove uma agitação intensa no líquido. Essa ação mecânica melhora a difusão dos compostos voláteis para o solvente que está sendo usado para coletar o óleo essencial, aumentando a taxa de transferência de massa e acelerando o processo de extração (Hallez et al., 2016; Khalid et al., 2024).

Os dois pré-tratamentos podem ser utilizados em conjunto, como no trabalho de Karimi et al. (2020) com extração sequencial associada ultrassom-micro-ondas (SUMAE). Essa técnica combina ondas ultrassônicas e energia de micro-ondas, onde o ultrassom é utilizado como pré-tratamento. Esse método foi utilizado para extrair óleo essencial de *Zataria multiflora*, com as condições otimizadas por metodologia de superfície de resposta (RSM) e o desenho composto central (CCD). A atividade antioxidante e antibacteriana do óleo essencial extraído foi investigada e os resultados comparados com o método de extração assistida por micro-ondas (MAE). O SUMAE resultou em um maior rendimento de óleo essencial (0,812%) em relação ao MAE (0,6%) e apresentou menor impacto ambiental, como emissões de CO₂ e consumo de energia. Além disso, o óleo extraído pelo SUMAE mostrou maior atividade antioxidante, tornando-o uma técnica verde e segura para a extração de óleos essenciais.

Em outro estudo conduzido por Chen et al. (2020), o ultrassom foi aplicado como pré-tratamento em folhas de *Perilla frutescens* antes da hidrodestilação assistida por micro-ondas (UP-MAHD) para extração de óleos essenciais. Foi observado que o pré-tratamento com ultrassom aumentou significativamente o rendimento do óleo essencial e a porcentagem de compostos oxigenados, devido à sinergia entre o ultrassom e a irradiação por micro-ondas. A análise revelou que o óleo essencial era rico em cetona de perila (80,76%) e mostrou alta atividade antioxidante e citotoxicidade contra células cancerígenas. No geral, essa técnica melhora o rendimento e a atividade biológica dos óleos essenciais, sendo uma alternativa promissora para a utilização eficiente de *P. frutescens* e outras plantas.

Yu et al. (2020) fizeram um experimento para investigar as influências do pré-tratamento por ultrassom e do pré-tratamento por micro-ondas sobre a cinética de extração, composição química e atividade antioxidante do óleo essencial da casca de quincã obtido por hidrodestilação. Os dois pré-tratamentos diminuíram o tempo de extração, aumentaram o

rendimento e a atividade de eliminação de radicais DPPH, mas não afetaram significativamente a composição química do óleo essencial em relação à hidrodestilação tradicional. Diversos trabalhos reportam aumento na atividade antioxidante em função do aumento de compostos oxigenados ao utilizar esses pré-tratamentos (Radivojac et al., 2020; Mukherjee et al., 2023).

A extração por ultrassom e micro-ondas traz vantagens significativas, como maior rapidez e eficiência em comparação aos métodos tradicionais, muitas vezes ocorrendo em minutos, além de menor consumo de solventes, tornando os processos mais ecológicos e sustentáveis. Ambas as técnicas operam a baixas temperaturas, o que preserva compostos voláteis e bioativos sensíveis ao calor. No entanto, há limitações, como a necessidade de equipamentos especializados para ultrassom e micro-ondas, que podem ter um custo inicial elevado, além da possibilidade de que a cavitação intensa ou o aquecimento localizado alterem a estrutura de alguns compostos voláteis, o que pode ser indesejável em determinadas aplicações (Richa et al., 2020; Ye et al., 2023).

3.3.3. Pré-Tratamento: Digestão Enzimática

Os vegetais apresentam até quatro vezes mais a capacidade de gerar metabólitos secundários do que outros organismos. Dentre essas substâncias se encontram os terpenos que são compostos voláteis, uma classe característica por fácil difusão no ar em concentrações suficientes para ser percebida por outros seres vivos, fato que acontece não somente pelo peso molecular, mas também por sua facilidade de criar pontes de hidrogênio. No entanto, no ponto de vista antropogênico os óleos essenciais são produzidos em tecidos escassos quando comparado à parte total da base de matéria seca, sendo principalmente as sementes, flores, galhos e raízes. É comum que o constituinte principal do óleo seja acima de 40% e isso não necessariamente significa que seja algum que tenha valor ou aplicação para o ser humano (Gounaris, 2010).

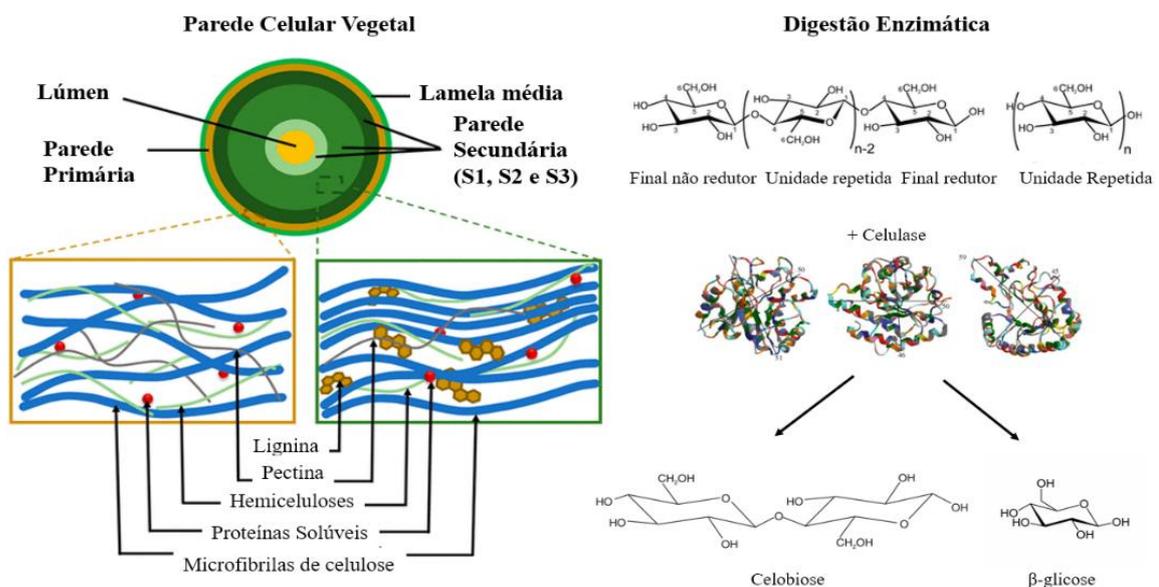
Dentro desse contexto, o uso de biotecnologia tem se tornado um alvo em pesquisas com o intuito de superar a limitação do teor de óleos essenciais e para este trabalho em especial, o uso de enzimas. Elas são amplamente utilizadas em pesquisas para o tratamento de resíduos da agricultura e para a conversão de biocombustíveis (Kashyap et al., 2000; Zhang et al., 2006). Basicamente elas atuam na parede celular na digestão e liberando para o meio óleo essencial que sem esse processo poderia ficar retido nessas estruturas mesmo após a hidrodestilação ou

qualquer outro método de extração (Cassini 2010; Dos Santos Reis, 2015). Essa parede é composta por polissacarídeos, proteínas, compostos fenólicos e sais minerais.

A celulose é o polissacarídeo mais abundante do planeta. É composta por polímeros não ramificados de homo polissacarídeos formados por cadeias longas de β -D-glucopiranosose unidas por ligações glicídicas do tipo $\beta(1\rightarrow4)$. A Celluclast 1.5 L possui atividade declarada de 700 EGU/g que hidrolisa ligações (1,4)-beta-D-glicosídica em celulose e outros beta-D-glucanas. A celulose é recalcitrante para vários solventes, incluindo a água. Porém os produtos formados da digestão enzimática como a celobiose e os monômeros de açúcar são solúveis em água (Alves et al., 2016; Etale et al., 2023). A figura 2 a seguir esquematiza os componentes da parede celular vegetal e traz a representação da estrutura do polímero.

Segundo Mwaurah et al. (2019), a hidrólise enzimática em processos de extração em meio aquoso normalmente possui mais vantagem porque a água leva mais tempo para degradar a parede celular das estruturas que secretam e armazenam material vegetal oleoso, resultando em um processo menos eficiente no rendimento. Por outro lado, o meio aquoso facilita a remoção de fosfolípídeos concorrentes e elimina o processo de degomação de óleos. Os autores também denominam o pré-tratamento enzimático como *ecofriendly* pois pode ser alternativa para o uso de solventes nocivos como hexano e n-hexano que possuem alta toxicidade e potencial de poluição atmosférica (Potrich et al., 2020).

Figura 2: Representação esquemática da parede celular vegetal e seus componentes



O produto da enzimólise são moléculas de celobiose e monômeros de açúcar.

Fonte: Adaptado de Kannan e Jasra (2011) e Etale et al. (2023).

Atualmente a celulase é uma enzima de alto custo aquisitivo e suas formas comerciais normalmente são feitas a partir de fungos do gênero *Trichoderma* e *Aspergillus* (Cherry; Fidantsef, 2003). Zhang et al. (2006) afirmam que os mecanismos que envolvem a hidrólise enzimática da celulose têm ação sinérgica de endoglucanase, exoglucanase ou celobiohidrolase (CBHI) e beta glucosidase. As endoglucanases hidrolisam β -1,4-intramolecular acessível em ligações glicosídicas de cadeias de celulose de maneira aleatória para produzir novas pontas na cadeia; exoglucanases gradualmente clivam as cadeias de celulose nas extremidades para liberar celobiose ou glicose solúveis; β -glicosidases hidrolisam celobiose em glicose, a fim de eliminar a inibição da celobiose. A ação combinada de endoglucanases e exoglucanases modificam a topografia da molécula causando aumento na velocidade da taxa de hidrólise. Salleh e Murad (2016) utilizando Celluclast®, uma enzima comercial, demonstraram que sua ação resultou na produção de três açúcares principais: xilose, glucose e uma pequena quantidade de celobiose, além de galactose e arabinose.

A hidrodestilação assistida depende de propriedades intrínsecas da enzima escolhida que encadeiam reações com acurácia em sítios ativos específicos, ainda que a hidrólise ocorra de forma aleatória. O aumento de rendimento ocorre por conta da quebra da parede celular vegetal liberando o material intracelular para o meio externo (Nadar et al., 2018).

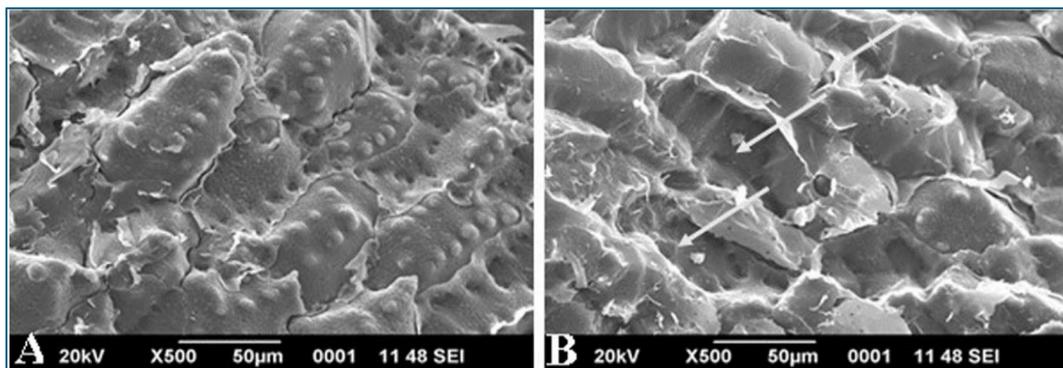
Li et al. (2024) utilizaram o óleo essencial de alecrim em ensaios de extração assistida por enzimas. Esse vegetal é amplamente reconhecido como aromatizante alimentar e erva tradicional, além de possuir potencial atividade antioxidante. No entanto, sua baixa taxa de rendimento. Neste estudo, foi utilizado um método de extração assistida por pré-tratamento enzimático com celulase ácida (>10.000 U/g), utilizando o design Box-Behnken (BBD) e modelos de metodologia de superfície de resposta (RSM). O rendimento otimizado (4,10%) do óleo essencial foi registrado nas seguintes condições ótimas: quantidade de enzima 1,60%, pH da digestão enzimática 5,0, temperatura da digestão enzimática 46,50 °C e tempo de digestão enzimática 1,7 h.

Outra enzima muito utilizada para a degradação da parede celular é a pectinase. Elas são definidas como um mix enzimático que hidrolisam substâncias peptídicas em plantas e micróbios. A pectina tem papel no crescimento da célula e sua senescência, além de participar do amadurecimento de frutos e processos de abscisão (Haile; Ayele, 2022).

Baby e Ranganathan (2016) realizaram um experimento com quatro enzimas no óleo essencial de *Foeniculum vulgare*: celluclast, pectinex, protease e viscozyme. Todos os pré-

tratamentos apresentaram melhorias no rendimento do óleo em relação ao controle após otimização, sendo os maiores valores para *viscozyme* com aumento de 22,5% e *celluclast* 15,8%. Dentre os principais compostos aromáticos, o D-limoneno foi o que apresentou diferença estatística em todos os pré-tratamentos, onde a maior ganho foi decorrente da *celluclast*, passando de 4,68% no controle para 10,69%. Foi constatado também ganho significativo nos outros compostos como α -pineno e *trans*-anetol, sendo este último o seu constituinte majoritário e cujo melhor tratamento foi com *viscozyme*. Os autores também observaram as rupturas em nível celular através de análise de microscopia de varredura (MEV), figura 3, e ressaltam a ligação dos dados obtidos com as características físico-químicas da parede celular, ou seja, esses resultados podem variar de acordo com a espécie pois um mesmo composto pode apresentar inúmeros isômeros e, portanto, várias possibilidades de interação entre enzima e substrato.

Figura 3: MEV da semente de *Elettaria cardamomum* com digestão enzimática



A - controle. B – pectinase

Fonte: Baby; Ranganathan, 2016.

Allay et al. (2024) fizeram uma pesquisa com o objetivo de avaliar a eficiência da extração enzimática aquosa na obtenção de óleo das sementes de cânhamo (*Cannabis sativa* L.). Para maximizar o rendimento do óleo, foram otimizados os parâmetros da extração assistida por enzimas, incluindo pH, concentração de enzimas (hemicelulase, protease e pectinase), temperatura e tempo de incubação. Os autores utilizaram a metodologia de superfície de resposta com um *design* de composto central. Para comparação, também foi aplicado o método de extração por solvente (Soxhlet). As condições ideais de hidrólise envolveram uma incubação de 4 horas a 60°C com um pH de 6,5, utilizando uma preparação multienzimática com protease, hemicelulase e pectinase nas concentrações de 55, 202,5 e 234 U/mg, respectivamente. Comparando-se com a extração convencional Soxhlet, a extração enzimática aquosa alcançou incremento de óleo de 30,65% sob os parâmetros otimizados mencionados. A aplicação de

enzimas resultou em um óleo mais estável contra a oxidação do que o óleo extraído com solvente, apresentando um valor de peróxido de 19,54 e 47,87 meq O₂/kg, respectivamente. Além disso, a análise de HPLC-DAD do conteúdo de tocoferol revelou um teor total de tocoferol mais elevado (547,2 mg/kg) na extração enzimática aquosa em comparação com a extração por Soxhlet (513,51 mg/kg), com γ -tocoferol como a forma predominante. Não houve diferenças significativas na composição de ácidos graxos entre os dois métodos de extração, com o ácido linoleico e o ácido alfa-linolênico sendo os principais constituintes. Embora a extração enzimática de óleo das sementes de cânhamo tenha sido bem-sucedida, a recuperação de óleo observada foi menor do que a obtida pelo método de extração Soxhlet.

Taiwo et al. (2024) produziram xilanase e pectinase por fermentação em estado sólido e posteriormente utilizou essas enzimas no pré-tratamento da extração de óleo essencial de cebolas trituradas (*Allium cepa*). Os resultados mostraram que o uso de enzimas aumentou o rendimento de óleo essencial em 171%. A xilanase e a pectinase funcionam de forma ótima em pH 5,5 e 4,0, respectivamente, e a uma temperatura de 60 °C. Os principais componentes identificados no óleo essencial de cebolas não tratadas foram principalmente ácidos orgânicos seguido por compostos contendo enxofre. Já o perfil do óleo essencial das cebolas pré-tratadas com xilanase indicou a presença de 15 compostos, sendo o lupeol (38,41%) o constituinte majoritário, seguido por hidrocarbonetos (15,6%) e compostos organossulfurados (15,5%). No óleo essencial obtido dos substratos tratados com enzimas mistas foram identificados a presença de 24 compostos, sendo os organossulfurados os principais componentes, representando 78% do conteúdo do óleo essencial. Já o óleo essencial obtido com pectinase indicou a presença de 12 compostos, sendo os compostos organossulfurados os constituintes dominantes. Os pesquisadores também observaram que os substratos tratados com pectinase apresentaram a maior quantidade de ésteres.

Zhang et al. (2022) estudaram o rendimento do óleo essencial da casca de pomelo (*Citrus maxima* 'Shatian Yu') através de micro-ondas e digestão por pectinase. Foram identificados 23 compostos no óleo essencial da casca por GC-MS. O limoneno, frenbuteno e laureno no representaram 79,31%, 4,72% e 3,46%, respectivamente. O rendimento do óleo essencial das cascas pré-tratadas com pectinase em concentrações variando de 20–100 mol por unidade de tempo foi de 4,71–6,45 mL/kg de matéria seca, enquanto o rendimento das amostras não tratadas foi de 4,38 mL/kg. O rendimento foi proporcional à duração da irradiação por micro-ondas e aumentou significativamente na faixa de potência de micro-ondas de 235–385

W. As condições ótimas foram: adição de 69,17 mol/g de pectinases, uso de 651,42 W de potência de micro-ondas e tempo de extração de 43,84 minutos.

A combinação de enzimas com tecnologias modernas (ultrassom, micro-ondas, supercrítica, líquidos iônicos) pode ser desenvolvida para explorar as vantagens de ambas as técnicas na extração de biomoléculas. A aplicação de técnicas de extração híbridas pode reduzir o tempo de extração e proporcionar rendimentos ainda melhores, tornando o processo mais sustentável (Nadar et al., 2018).

3.4. ÓLEOS ESSENCIAIS E POTENCIAL ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes são compostos capazes de retardar ou diminuir a oxidação de um material oxidável, mesmo quando usados em pequenas quantidades (<1%, comumente 1–1000 mg/L) em comparação com a quantidade do material que precisam proteger (Amorati et al., 2013). Em paralelo é importante conceituar a autooxidação ou peroxidação, onde segundo Baschieri e Amorati (2021) é a reação espontânea de moléculas orgânicas com O₂ que leva à formação de peróxidos, epóxidos, aldeídos e cetonas, bem como a fragmentos de quebra mais simples ou a polímeros insolúveis.

A oxidação na membrana celular ocorre por meio de uma reação em cadeia de radical mediada por radicais peroxila (ROO•) que ocorre simultaneamente à autooxidação de hidrocarbonetos (Valgimigli; Pratt, 2012).

Desde o início do século 20 a peroxidação lipídica (PL) tem sido investigada. É um processo que consiste na absorção de oxigênio molecular por lipídios expostos ao oxigênio e apresenta uma notável semelhança com a autooxidação de hidrocarbonetos (Porter, 1986). Na natureza, os produtos formados a partir da oxidação primária de compostos voláteis são chamados de hidroperóxidos. Como exemplo há o α -pineno, que comumente é emitido de coníferas e é o monoterpeneo mais abundante na atmosfera desempenhando um papel fundamental no crescimento de partículas nesse meio (Pavlica et al., 2021).

De acordo com Valgimigli (2023), a PL é uma reação em cadeia radical composta por três etapas canônicas: iniciação, propagação e término. A figura 4 apresenta um resumo utilizando Ácidos Graxos Poli-insaturados (PUFAs) como o substrato oxidável prototípico. Os PUFAs são os principais alvos do ataque de espécies reativas de oxigênio ou de radicais livres.

A oxidação desses lipídios em humanos pode acometer várias doenças, como aterosclerose, câncer, diabetes e distúrbios neurodegenerativos por conta da agregação de biomoléculas danificadas às proteínas resultando em deformidades no dobramento de oligômeros (Yin; Porter, 2005; Butterfield, 2020; Iuchi et al., 2021).

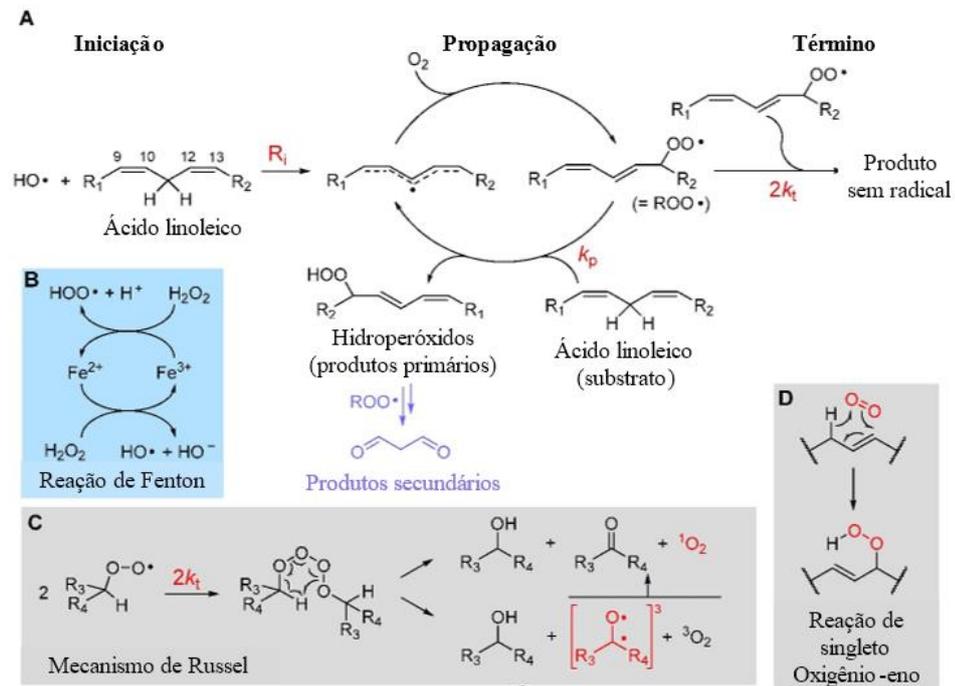
O processo é iniciado por uma espécie de radical que, independentemente de sua origem ou estrutura, é capaz de reagir com o substrato lipídico RH (mais comumente por abstração de átomo de hidrogênio) para produzir um radical alquila R•, que irá reagir com oxigênio a uma taxa controlada por difusão para formar um radical peroxila (ROO•). O radical HOO•, a forma protonada do ânion superóxido, desempenha um papel importante na propagação e término da peroxidação lipídica em sistemas não aquosos. No entanto, diferentemente dos radicais alquilperoxila (ROO•), que têm apenas capacidade oxidante, o HOO• possui uma atividade oxidante e redutora de duas faces (Baschieri et al., 2023).

O radical HOO• pode ser formado pela fragmentação de radicais ROO• provenientes de aminas, álcoois, alquenos substituídos e pode estar presente em baixas concentrações em muitos sistemas oxidantes. Ciclicamente, ROO• ataca outra molécula do substrato para produzir um hidroperóxido ROOH (o substrato oxidado) e outro radical. A reação em cadeia prossegue por muitos ciclos antes que duas espécies radicais terminem incidentalmente uma à outra em um chamado passo de terminação. O número de ciclos que ocorrem entre a iniciação e a terminação é chamado de "comprimento da cadeia" (Amorati et al., 2013; Baschieri et al., 2023).

Como produto da reação em cadeia são formados os peróxidos lipídicos. Eles são moléculas estáveis o suficiente para persistir e difundir nas bicamadas lipídicas, porém são propensos à degradação. Esses produtos de degradação frequentemente são reativos e podem ser amplamente divididos em duas classes: ácidos hidroxílicos e aldeídos reativos (Gaschler; Stockwell, 2017).

De acordo com Borgohain et al. (2015), existem dois caminhos para o sequestro de radicais livres. O primeiro é a transferência de átomo de hidrogênio (HAT) que se baseia na visão clássica de um antioxidante doar um átomo de hidrogênio para formar compostos mais estáveis. Esse tipo de interação é mais relevante na capacidade de quebra da cadeia mencionada anteriormente.

Figura 4: Peroxidação lipídica



As principais etapas da peroxidação lipídica (A), com indicação de um mecanismo principal de iniciação (B), detalhes do mecanismo de término de Russel (C) e reação do oxigênio singlete com lipídios insaturados (D). **Fonte:** Valgimigli (2023).

O segundo é a transferência de um único elétron (SET), esse mecanismo consiste na habilidade de transferir um elétron para reduzir qualquer composto, como metais, carbonilas e radicais. A ionização e desprotonação dos grupos funcionais envolvidos são fundamentais para a reatividade desse processo. Ambos os caminhos são dependentes do pH, do solvente ou do meio utilizado. Também pode haver outros mecanismos de desativação dos radicais, como a perda sequencial de prótons por transferência de elétrons (SPLET) e a transferência de um único elétron seguida por transferência de próton (SET-PT) (Urbaniak et al., 2013).

Existem muitos métodos e adaptações para se analisar a capacidade antioxidante, dentre esses pode-se citar: o DPPH e o FRAP. O DPPH, radical de 1,1-difenil-2-picrilhidrazil foi desenvolvido por Blois (1958). Esse método se baseia na medição espectrofotométrica e a estabilização do radical ocorre devido à aglomeração estereoquímica no átomo de nitrogênio e o efeito de “guerra de corda” exercido no grupo de difenilamino de segunda ordem entre um elétron doador, um picril e um elétron aceitador. Esse efeito estabiliza a estrutura canônica (Gulcin; Alwasel, 2023).

O FRAP, o poder de antioxidação de redução férrica, é um teste colorimétrico que consiste na transformação do complexo $[\text{Fe}^{3+}-(2,4,6\text{-Tris}(2\text{-piridil})\text{-s-triazina})_2]^{3+}$ em $[\text{Fe}^{2+}-(2,4,6\text{-Tris}(2\text{-piridil})\text{-s-triazina})_2]^{2+}$.

(TPTZ) $2]2^+$ em meio ácido e o resultado é obtido em unidades de FRAP que pode ser definido na redução de 1M de íon férrico a um íon ferroso. Também é importante mencionar que essa reação pode formar produtos pró-oxidantes como no caso do Fe^{2+} , uma molécula que tem participação na reação de Fenton e leva à formação de radicais hidroxilas (Wojtunik-Kulesza, 2020).

Khodaei et al. (2021), destacam que antioxidantes sintéticos têm sido associados com riscos à saúde como: prejuízo ao fígado, câncer e mudanças na estrutura helicoidal do DNA. Legumes, frutas e especiarias são alimentos ricos em fenóis e terpenoides, substâncias que possuem propriedades antioxidante ubíquas. Por isso os óleos essenciais têm sido uma alternativa para a substituição desses produtos que apresentam efeitos colaterais indesejáveis (Hari Babu et al., 2012). Além disso, eles podem ser usados na incorporação de filmes e embalagens comestíveis, perfumes e outros produtos visando a sua preservação.

Alguns autores presumem que a capacidade antioxidante dos óleos essenciais e de bioextratos está intimamente relacionada com a alta quantidade de compostos fenólicos e terpenos insaturados. No entanto, Ngo et al. (2016) afirmam que nem sempre essa é uma explicação plausível, pois esse processo é um resultado complexo da interferência entre os materiais oxidantes e o componentes com potencial ação antioxidante. Terpenoides com a ausência de anéis fenólicos, podem oxidar de forma similar aos lipídios insaturados que se deseja proteger.

O mecanismo de auto oxidação pode começar ou pela abstração de um átomo de hidrogênio ao reagir com radicais peroxil, ou pela adição desses radicais às ligações de carbono insaturadas. Essas reações são caracterizadas por terem rápida duração e dependendo da natureza do composto e da presença do solvente, ou do meio (aeróbico ou inerte), pode haver a formação de múltiplos produtos. Para ilustrar uma dessas situações, pode-se citar o caso do α -pineno visto em Neuenschwander et al. (2010), onde a molécula foi submetida ao processo de oxidação através de conversão térmica e oxigênio puro. Dentre os produtos se encontrou óxido de α -Pineno (29,0 %), hidroperóxido de verbenilo (29,0 %), verbenol (13,5 %), verbenona (7,0 %), hidroperóxido de pinenilo (4,0 %), pinenol (0,5 %), hidroperóxido de pinocarvilo (6,0 %), pinocarveol (1,5 %), pinocarvona (1,0 %), Hidroperóxido de mirtenilo (5,0 %), mirtenol (2,0 %) e mirtenal (1,5 %).

Ngo et al. (2016), também afirmam que a entalpia de dissociação das ligações (BDE) é um parâmetro de extrema importância no entendimento do mecanismo de transferência de

átomo de hidrogênio (HAT). O potencial antioxidante é diretamente relacionado com os valores de BDE, no caso o quanto menor esse valor é para a ligação de C-H de relevância. Com base nesse conceito, os autores definiram a sequência do potencial oxidante das classes de terpenos encontradas no óleo essencial de *Cleistocalyx operculatus*, onde em monoterpenos: α -terpineno > γ -terpineno > mirceno > β -pineno > limoneno > α -pineno > canfeno; em sesquiterpenos: α -cadineno > aromadendr-9-eno > γ amorfeno > sesquitujeno > γ -muuroleno > β -cedreno > α -copaneno > 6-epi-beta-cubebeno; e em diterpenos: cembreno > abieta-7,13-dieno > rimueno > axinisseno > kaur-16-eno. De forma geral, os pesquisadores avaliaram 21 compostos não fenólicos e com base em propriedades termodinâmicas concluíram que α -terpineno, γ -terpineno, cembreno e abieta-7,13-dieno são os que mais tem potencial antioxidante e observaram uma pequena mudança nos valores de BDE em função entre o meio oxigenado ou com água e etanol como solventes.

Os óleos essenciais também podem ser incorporados na dieta de animais com o fim de antioxidação. É o caso do óleo essencial do orégano, onde Migliorini et al. (2019) o introduziram na dieta de galinhas e constaram melhor produtividade em condições de estresse e redução na peroxidação lipídica nas gemas, tanto em ovos frescos quanto aqueles que foram armazenados em um período de 21 dias. Como consequência se obteve um produto com maior tempo de prateleira. Os autores ainda ressaltam que o efeito antioxidante ocorreu principalmente por conta do carvacrol e do timol. O óleo essencial de tomilho, que frequentemente é rico nessas duas substâncias também é reportado há um bom tempo como pró-antioxidante por inibir a peroxidação lipídica e neutralizar radicais livres, sendo indicado a sua inclusão em dietas tendo a vantagem de preservar as propriedades organolépticas dos alimentos (Youdim; Finlayson, 2000). O óleo essencial de *Artemisia nilagirica* (Clarke) Pamp., rico em cetona e álcool de *Artemisia* também aumentou o tempo de vida do milho em prateleira, bem como a resistência a microrganismos enquanto usado como preservativo (Kumar et al., 2019). O jambu (*Acmella oleracea*), que é um alimento de interesse etno-farmacológico na região amazônica também apresenta propriedades anti-lipoperoxidativas, além de ser citotóxico em algumas células humanas, o seu óleo essencial no caso é rico em mirceno e óxido cariofileno (Jerônimo et al., 2024).

Muitos trabalhos têm sido desenvolvidos na perspectiva de usar os metabólitos vegetais na preservação de alimentos. Após o ataque de microrganismos, a oxidação é a principal causa de prejuízo nos produtos dessa categoria. Nesse contexto, o desenvolvimento

de compósitos tem recebido muita atenção tanto para aumentar a eficiência contra a oxidação quanto para enfraquecer a dependência de produtos pouco sustentáveis.

Kumari et al. (2023), desenvolveram a produção de um compósito formado por Poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) e óleos essenciais como filme. O PHB é um biopolímero degradável e forte candidato a substituto das embalagens de alimentos de origem petroquímica. Os óleos foram obtidos das espécies *Citrus bergamia*, *Vitis vinifera*, *Zingiber officinale* e testados em diferentes concentrações. Os compósitos na proporção de 5% de óleo apresentaram maior atividade antioxidante, no sequestro de radicais DPPH, do que quando comparados ao controle. Em destaque o filme com a incorporação de *Z. officinale* (gengibre) com mais de 75% do sequestro de radicais. Além disso os filmes com essa proporção também apresentaram boas propriedades físicas. São hidrofóbicos, com ângulo de contato da água maior que 65°, apresentaram incremento de até 30 vezes mais flexibilidade do que o controle e aumento na cristalinidade. Os autores indicam o compósito para a embalagem de pães, sanduíches e bolos, pois também apresentam propriedades antimicrobianas contra *E. coli* e *S. aureus*.

Assagaf et al. (2024), analisaram o potencial antioxidante sinérgico de três óleos essenciais: *Cymbopogon flexuosus*, *Carum carvi*, e *Acorus calamus*. Os pesquisadores deduziram que a formulação ótima foi na concentração de 20% *C. flexuosus*, 53% *C. carvi*, e 27% *A. calamus* para o IC₅₀ de 191,13 (± 0.83) µg/mL em DPPH. Enquanto que a formulação de 17% *C. flexuosus*, 43% *C. carvi*, e 40% *A. calamus* foi a que obteve melhor resultado para o sequestro do radical ABTS na concentração de 114,07 (± 1.42) µg/mL. O uso de misturas pode aumentar o efeito antioxidante, porém no caso ainda é necessário desenvolver outros testes para seja determinado a segurança do produto.

Os mecanismos de atuação dos antioxidantes são compreendidos principalmente a partir de estudos de DFT (*Density functional theory*), onde a entalpia de dissociação de ligação (DBE) e o potencial de ionização são medidas fundamentais para o entendimento da dinâmica e eficiência química dessas moléculas (Wright et al., 2001).

3.5. A TEORIA DE DENSIDADE FUNCIONAL (DFT) E SUA APLICAÇÃO EM ÓLEOS ESSENCIAIS

A Teoria do Funcional da Densidade (DFT, do inglês *Density Functional Theory*) é um método computacional utilizado para descrever e prever as propriedades eletrônicas de

sistemas, como moléculas, sólidos e superfícies, com base na densidade eletrônica do sistema. Em vez de trabalhar diretamente com as funções de onda, como em métodos tradicionais da mecânica quântica (como o Método Hartree-Fock), o DFT simplifica o problema ao se concentrar na densidade de elétrons, que é uma função espacial dependente das coordenadas e que contém todas as informações relevantes sobre o comportamento do sistema quântico (Sholl; Steckel, 2022).

A DFT é amplamente aplicada em áreas da física, química e ciência dos materiais, permitindo a simulação e análise de sistemas complexos a partir de uma abordagem mais eficiente e menos custosa computacionalmente, sem perder a precisão necessária para muitos problemas. Através dessa teoria, é possível calcular propriedades como energias de ligação, estruturas eletrônicas e moleculares, propriedades ópticas, magnéticas, entre outras (Bursch et al., 2022; Teale et al., 2022).

De acordo com Sholl e Steckel (2022) todo o campo da DFT se baseia em dois teoremas matemáticos fundamentais provados por Kohn e Hohenberg, e na derivação de um conjunto de equações por Kohn e Sham em meados da década de 1960. O primeiro resultado, provado por Hohenberg e Kohn, é:

“A energia do estado fundamental a partir da equação de Schrödinger é um funcional único da densidade eletrônica.”

Os autores afirmam que este teorema estabelece que há uma correspondência única entre a função de onda no estado fundamental e a densidade eletrônica nesse estado. Para compreender a relevância desse resultado, é importante primeiro entender o significado de um "funcional". Como o próprio nome sugere, um funcional está diretamente relacionado ao conceito mais conhecido de uma função. Uma função atribui um número específico a partir do valor de uma ou mais variáveis, por exemplo, a função $f(x) = x^2 + 1$, que depende de uma única variável. Já um funcional é um conceito semelhante, mas em vez de atuar diretamente sobre variáveis, ele opera sobre funções e gera um único número a partir delas. Um exemplo de funcional seria $\frac{1}{2} \int_{-1}^1 f(x) dx$ que usa uma função $f(x)$ para calcular seu valor. Avaliando esse funcional com $f(x) = x^2 + 1$, o resultado é $F[f]=8/3$. Portanto, o resultado de Hohenberg e Kohn pode ser reinterpretado como afirmando que a energia do estado fundamental, E , é uma função da densidade eletrônica, representada por $n(r)$. Isso explica por que a teoria é chamada de DFT.

Os orbitais moleculares HOMO (*Highest Occupied Molecular Orbital*) e LUMO (*Lowest Unoccupied Molecular Orbital*) são fundamentais para compreender a reatividade química em nível atômico, pois indicam as áreas de transferência de carga dentro da molécula. O HOMO corresponde à região com maior densidade eletrônica, enquanto o LUMO é a região mais deficiente em elétrons. Esses orbitais delimitam, respectivamente, o comportamento doador e aceitador de elétrons da molécula, formando um complexo de transferência de carga. Quanto maior a energia do HOMO, maior é sua capacidade de doar elétrons, e quanto mais baixa a energia do LUMO, maior a facilidade de aceitar elétrons (Vieira et al., 2021; Chen et al., 2023). A seguir serão abordados outros descritores:

- **Potencial de ionização** é a quantidade de energia necessária para remover um elétron de um átomo ou molécula neutra. Esse valor indica quão facilmente os elétrons podem ser retirados, o que é importante para entender a formação de radicais ou os processos de transferência de elétrons. Pela aproximação de Koopmans, o potencial de ionização é aproximado pelo valor negativo da energia do HOMO (Zhang; Musgrave, 2007; Ugodi et al., 2023; Bhatia, 2024).

- **Afinidade eletrônica** descreve a variação de energia que ocorre quando um elétron é adicionado a um átomo ou molécula, formando um íon negativo. Ela indica a tendência de um átomo ou molécula em aceitar um elétron extra, sendo relevante para prever sua capacidade de participar de reações nucleofílicas. De acordo com a aproximação de Koopmans, a afinidade eletrônica pode ser estimada pela energia do LUMO (Ugodi et al., 2023; Bhatia, 2024; Manssouri et al., 2024).

- **Eletronegatividade** refere-se à capacidade de um átomo de atrair elétrons em uma ligação química. Segundo a conjectura de Mulliken, ela pode ser calculada a partir da energia de ionização e da afinidade eletrônica, ajudando a entender se um átomo tende a doar ou retirar elétrons. A eletronegatividade é útil para prever a polaridade e a distribuição de carga em moléculas (Ugodi et al., 2023; Bhatia, 2024; Manssouri et al., 2024).

- **Potencial químico** refere-se à tendência dos elétrons de se distribuírem uniformemente entre os átomos de uma molécula ou sistema, sendo conhecido como o princípio de equalização de eletronegatividade. Ele reflete a capacidade de transferência de elétrons e o potencial de redistribuição de carga durante reações químicas (Ugodi et al., 2023; Bhatia, 2024; Manssouri et al., 2024).

- **Dureza e maciez:** De acordo com a aproximação de Koopmans, o potencial de ionização e a afinidade eletrônica são usados para calcular descritores globais de reatividade. O potencial de ionização está ligado à **dureza**, que representa a resistência de um sistema à transferência de elétrons, enquanto a afinidade eletrônica está associada à **maciez**, indicando a capacidade de aceitação de elétrons ou polarizabilidade. A dureza e a maciez também estão relacionadas à maneira como um sistema responde a perturbações externas (Ugodi et al., 2023; Bhatia, 2024; Manssouri et al., 2024).

- **Índice eletrofílico:** O índice eletrofílico é uma medida na química computacional que avalia o grau de reatividade eletrofílica de uma molécula ou de uma área específica dentro dela. Ele serve como um descritor que ajuda a prever a capacidade de uma molécula em aceitar elétrons de nucleófilos, ou seja, espécies ricas em elétrons. Esse índice é particularmente útil em reações que envolvem substituições ou adições eletrofílicas e nucleofílicas. Um índice eletrofílico alto indica uma maior capacidade da molécula de atuar como eletrofílica (aceitar elétrons), enquanto um índice mais baixo sugere menor reatividade eletrofílica (Ugodi et al., 2023; Bhatia, 2024; Manssouri et al., 2024).

- **Índice de Transferência de Carga Máxima (ΔN_{max}):** Esse descritor representa a quantidade máxima de carga (em termos de elétrons) que uma molécula pode transferir a outro sistema ou átomo antes de ocorrer a neutralização ou reatividade. Ele é calculado a partir da relação entre o potencial químico (μ) e a dureza global (η) da molécula (Padmanabhan et al., 2007; Rathi et al., 2020).

Nos últimos anos, os óleos essenciais têm ganhado destaque devido às suas potenciais propriedades terapêuticas, incluindo atividades antitumorais e antioxidantes. No entanto, a compreensão completa dos mecanismos de ação dessas substâncias no nível molecular ainda é um desafio (Berk et al., 2022). Neste contexto, a DFT se torna uma ferramenta de grande valor. Ao utilizar essa teoria, pesquisadores podem modelar as interações entre as moléculas presentes nos óleos essenciais e possíveis alvos biológicos, como enzimas, proteínas e o DNA (Abu-Dief et al., 2024).

Ela pode ser aplicada no estudo das propriedades eletrônicas, pois permite calcular a distribuição da densidade eletrônica dos compostos presentes nos óleos essenciais, proporcionando uma compreensão mais detalhada sobre sua reatividade química. Com isso, é possível prever quais compostos têm maior probabilidade de atuar como antioxidantes, capturando radicais livres e prevenindo danos oxidativos às células (Liu et al., 2020).

A DFT ajuda a simular como as moléculas dos óleos essenciais interagem com biomoléculas no corpo humano. Essa análise é crucial para entender como certos compostos podem inibir o crescimento de células tumorais ou interferir em processos bioquímicos que levam ao desenvolvimento de câncer. Ao modelar a interação dos compostos de óleos essenciais com proteínas-chave envolvidas no desenvolvimento e progressão do câncer, a DFT em conjunto com *docking* molecular pode fornecer *insights* sobre quais substâncias têm maior potencial de bloquear ou inibir essas proteínas, oferecendo um ponto de partida para o desenvolvimento de novos tratamentos (Zochedh et al, 2022).

Alguns compostos de óleos essenciais demonstram a capacidade de induzir a apoptose (morte programada) em células tumorais ou inibir o crescimento celular. Utilizando a DFT, é possível explorar os detalhes moleculares dessas interações, como as interações de ligação em sítios ativos de proteínas envolvidas na regulação celular. Essa informação é fundamental para entender como os óleos essenciais podem ser usados para interromper o ciclo de multiplicação de tumores malignos. Por exemplo, Sindhu et al. (2022) utilizaram a DFT como forma de complementar o resultado de *docking* de terpenos com a proteína MK8, uma das reguladoras do mecanismo de apoptose e com base no gap dos orbitais de fronteira e de suavidade global constataram a possível atividade biológica do carvacrol e da valinina.

A DFT é fundamental no estudo da oxidação de terpenos porque permite modelar com precisão as interações eletrônicas que ocorrem durante o processo de oxidação. Com DFT, é possível calcular suas possíveis vias de oxidação. Além disso, auxilia na previsão de intermediários reativos e produtos de oxidação, levando em consideração a estabilidade energética. Um exemplo aplicado é a pesquisa de Atalay et al. (2022) onde os autores com base na maior energia do HOMO ranquearam terpenos em função da sua capacidade antioxidante, além de demonstrar que esse processo para moléculas como o carveol, geraniol e o eugenol ocorre por SPLET.

3.6. APOPTOSE, CÂNCER E O PAPEL DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

As células cancerígenas possuem a habilidade de escapar dos mecanismos de apoptose. Alterações na cadeia de DNA nos genes responsáveis pela sinalização da via apoptótica compreendem a maior parte dos fatores adaptativos que levam a esse escape. Concomitantemente, mudanças epigenéticas causadas por modificações graves no exoma e

histonas que regulam as expressões de sinais mediadores pró e antiapoptóticas representam o maior conjunto de fatores que interferem na resposta terapêutica. A maioria das mudanças epigenéticas são norteadas pela atividade de enzimas modificadas na cromatina que adicionam, removem ou reconhecem diferentes marcadores nas histonas e no DNA (Ozyerli-Goknar; Bagci-Onder, 2021). A integridade de todas as células somáticas depende do balanceamento contínuo de sinalizadores tróficos e de sobrevivência para suprimir a apoptose. A engrenagem principal do processo são as caspases (*cysteine aspartyl proteases*) pois provocam a morte celular por clivagem a partir de uma gama de substratos intracelulares que ativam a dissolução da célula (Walczak; Krammer, 2000).

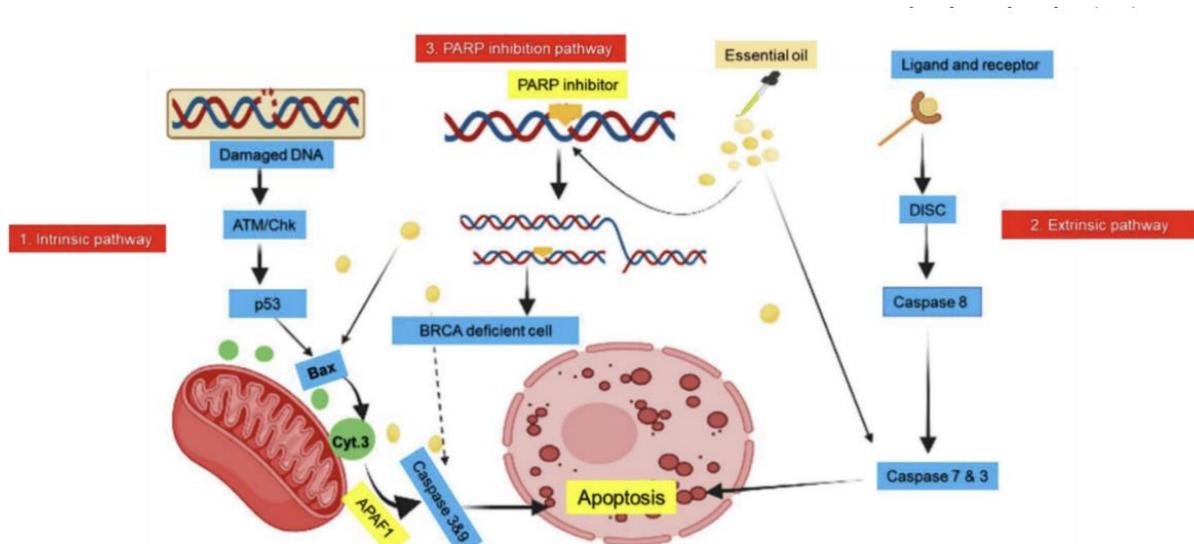
Existem duas vias principais de ativação da apoptose: a extrínseca e intrínseca. A primeira é mediada pelos receptores de morte transmembrana de CD95 (Fas/APO-1/TNFRSF6) que recruta e monta complexos proteicos que ativam a superfície da caspase 8 para formar os complexos de sinalização de morte induzida quando estimulada pelo CD95 ligante (CD95L) (Walczak; Krammer, 2000; Peter et al., 2015). A segunda envolve a via de sinalização de morte na mitocôndria que atua como um sensor integrado de múltiplos estímulos de morte liberados pelo citocromo C dentro do citosol onde é engatilhada a ativação das caspases. Essa sinalização é uma resposta ao estresse de genotóxicos celulares causados por danos no DNA, ciclo celular defeituoso, perda de substrato da matriz extracelular, hipoxia e privação dos fatores de sobrevivência celular. Esses estímulos levam à permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP) que além do citocromo C libera AIF (*apoptosis-inducing fator*) e Smac/DIABLO do espaço intermembrana mitocondrial (Henry-Mowatt et al., 2004). Uma vez que o citocromo-C é liberado pela mitocôndria ele desencadeia o aparelhamento de um complexo intracelular apoptosômico que recruta a caspase 9 através da proteína Apaf-1 e consequentemente caspases efetoras, caspase -3, -6 e/ou -7 (Vander Heiden et al., 2000; Hengartner, 2000).

Outro grupo de moléculas que atua na apoptose são as proteínas BCL-2 (*B-cell CLL/Lymphoma 2*). Em resposta a vários tipos de perturbação, ativadores específicos de BH3 como BIM e BID estimulam a oligomerização de efetores BAX e BAK para induzir a MOMP, liberar o citocromo C e a destruição da célula. Membros de multidomínio antiapoptóticos podem inibir a ativação através do sequestro de ativadores de BAX e BAK e/ou essas proteínas já ativadas. Sensores específicos de BH3 podem se ligar aos sítios de ligação e inibir um membro antiapoptótico, mas não consegue agir a BAX e a BAK por conta própria. No caso de as proteínas já estarem ligadas a ativadores ou efetores estas podem ser substituídas por

sensores, assim elas podem proceder para a MOMP e trabalhar na morte celular. BIM preferencialmente ativa BAX em detrimento da BAK e BID preferencialmente ativa a BAK (Certo et al, 2006; Letai, 2017).

De acordo com Gautam et al. (2014) os óleos essenciais podem atuar no combate ao câncer desencadeando a apoptose como também na estabilização da divisão celular. O esquema abaixo na figura 5 mostra de forma mais didática e resumida o fluxo de eventos que acontecem até a ativação da cadeia de caspases. O produto é o corpo apoptótico que posteriormente é degradado por fagócitos.

Figura 5: Panorama do efeito de óleos essenciais nas vias de inibição intrínseca, extrínseca e PARPi



Fonte: Sharma et al., 2023.

Russo et al (2016) confirmaram a ação via intrínseca de óleo essencial de espécies de *Salvia spp* através de teste calorimétrico da Caspase utilizando linhagens de células do melanoma humano M14, A2058 e A375. Em relação a via extrínseca pode-se citar a ação citotóxica do óleo essencial de *Vitex agnus castus*, pesquisada por Ilhan (2020), onde foi descrito efeito de Bcl-2, Bcl-XL, Bax, Bad, FADD, Caspase-8, Caspase-9, TRAIL R1/DR4, e TRAIL R2/DR5 na ativação de caspase 3/7 e apoptose sem causar dano a células humanas saudáveis.

Além da apoptose, na figura 5 é representado também outro mecanismo possível: a desativação das PARPi's (*poly ADP ribose polymerase*). Elas são proteínas envolvidas em vários processos biológicos como a reparação de DNA, programação de morte celular e

integridade genômica, com capacidade incomparável de reparar quebras na dupla fita de DNA, principalmente nas que contém deficiência no reparo de recombinação homóloga. A existência dessa deficiência no DNA é condicional para a eficácia de inibidores de PARP, por tanto são alvo de estudos onde essa condição é existente como no caso do de mama (Farmer et al., 2005; Menezes et al., 2022). Os resíduos de histidina e tirosina são encontrados no domínio catalítico e esses são os sítios onde NAD⁺ interage para iniciar o reparo de DNA. Os PARPi's competem pela histidina e tirosina e cessam a forquilha de replicação e previne a síntese de DNA fita dupla que leva à morte das células cancerígenas (Sharma et al., 2023).

Quando as células são estimuladas a submeter-se à apoptose, a organização de bicamada fosfolipídica na membrana plasmática está alterada levando à inversão da fosfatidilserina (PS) da superfície interna da bicamada fosfolipídica para a superfície externa. Como resultado, o PS exposto à superfície pode ser detectado através de sua afinidade para ligação com Anexina V, uma proteína ligadora de fosfolipídios, que pode ser avaliada utilizando citometria de fluxo (Coxon et al., 2011). Nos parágrafos seguintes serão abordados alguns estudos aplicados da ação dos óleos essenciais de diferentes espécies em linhagens de células tumorais.

Rahaman et al. (2022) direcionaram uma pesquisa utilizando as linhagens de células A375 (melanoma) e A431 (carcinoma) com a hipótese de que o eucaliptol sendo um inibidor da via PI3k/Akt seria efetivo em cercear a metástase na pele e concluíram que houve inibição da transição epitelial para mesenquimal e metástase através da inibição da PI3K/ Akt/mTOR tanto nas linhagens celulares quanto no modelo *in vivo*. Além disso, constataram que a conjugação do eucaliptol com o inibidor de PI3K, LY294002 diminuiu a expressão de moléculas de sinalização de forma sinérgica resultando em um efeito antimetastático mais forte ainda.

Akiel et al., (2022) examinaram o efeito citotóxico *in vitro* do viridiflorol, um composto presente no óleo essencial de *M. azurea*, usando linhagens de blastoma medular Daoy, câncer de mama MCF-7 e câncer de pulmão A549 para a determinação do IC₅₀ e constataram que as células tumorais Daoy foram mais sensíveis ao efeito do viridiflorol, apresentando 40% a mais de inibição que o temozolamida. O viridiflorol é uma molécula lipofílica com TPSA (*topological polar surface area*) = 20,23, um parâmetro que confere boa penetração na barreira cerebral (Pajouhesh; Lenz, 2005).

Santos et al. (2011) investigaram os efeitos da rutina em células de glioma GL-15, demonstrando que concentrações de 50-100 µM reduziram a proliferação celular e a

viabilidade. A rutina diminuiu a fosforilação de ERK1/2 e causou acúmulo de células na fase G2 do ciclo celular. Além disso, 87,4% das células tratadas com 100 μ M de rutina entraram em apoptose, comprovada por citometria de fluxo com coloração de AnnexinV/PI, além de condensação nuclear e fragmentação de DNA. Concluiu-se que a rutina pode ser uma potencial candidata para o tratamento de gliomas malignos, devido à sua capacidade de induzir apoptose e diferenciação celular.

Diante dessas informações, pode-se afirmar que óleos essenciais têm demonstrado um potencial promissor no tratamento do câncer devido às suas propriedades bioativas, incluindo efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios e antiproliferativos. Estudos mostram que compostos presentes nesses óleos, como terpenos e fenóis, podem induzir apoptose, inibir a proliferação celular e interferir em vias de sinalização molecular envolvidas no crescimento tumoral.

3.7. DESCRIÇÃO DA ESPÉCIE: HISTÓRICO, TAXONOMIA E DISTRIBUIÇÃO

Nome: *Matourea azurea* (Linden) Colletta; V.C. Souza.

Sinonímia homotípica: *Achetaria azurea* (Linden) V.C. SOUZA, *Otacanthus azureus* (Linden) Ronse, *Stemodia azurea* Linden

Sinonímia heterotípica: *Otacanthus caeruleus* Lindl., *Tetraplacus taubertii* Mez.

Em 1890 o gênero *Otacanthus* foi descrito como pertencente à família Scrophulariaceae. A família de hábito cosmopolita compreendia cerca de 306 gêneros e 5850 espécies com ocorrência predominantemente em áreas montanhosas das regiões temperadas do hemisfério norte (Fischer, 2004). No Brasil a distribuição do gênero inclui os estados do Rio de Janeiro, Espírito Santo, Bahia e Minas Gerais, sendo restrita a região fitogeográfica da costa brasileira a leste. Encontrada também na Mata Atlântica entre o nível do mar e 1000 metros (Ronse, 2001). São ervas eretas ou prostadas, com folhas opostas, às vezes alternas, deltóides, ovaladas a lanceoladas, com margens serradas a crenadas. As flores são geralmente bilabiadas, solitárias ou reunidas em inflorescências cimosas ou racemosas, os frutos são em sua maioria cápsulas loculicidas (Santos, 1998; Ronse, 2001). Souza e Giulietti (2009) posteriormente atribuíram ao gênero *Achetaria*.

De acordo com Souza (2009), em nível morfológico foram reconhecidos dois conjuntos de espécies em *Achetaria*. O primeiro, composto pelas tradicionalmente reconhecidas

como *Beyrichia* ou como *Achetaria*, apresenta flores pequenas e foram representados por *A. scutellarioides*, *A. ocymoides* (Cham.; Schldl.) Wettst. e *A. latifolia* V.C. Souza. O segundo, contendo as espécies tratadas como *Otacanthus* apresenta flores grandes e vistosas e foi representado por *A. azurea* (Linden) V.C. Souza, *A. caparaoense* (Brade) V.C. Souza, *A. platychila* (Radlk.) V.C. SOUZA e *A. crenata* (Ronse; Philcox) V.C. SOUZA. Este caráter, que foi utilizado na separação de *Achetaria* e *Otacanthus*, é bastante útil no reconhecimento das espécies, mas mostra-se frágil em nível genérico, já que *Achetaria erecta* possui flores de tamanho intermediário entre estes dois grupos.

Segundo Colletta et al. (2020), o estudioso Baillon incluiu em 1888 pela primeira vez os gêneros *Dickia*, *Achetaria* e *Beyricha* como sinonímia de *Matourea*, embora não tivesse proposto nenhuma alteração de nome. Em 1984, o pesquisador Zarucchi incluiu o *Matourea* em *Stemodia*, porém Souza e Giulietti (2009) questionaram a inclusão afirmando que morfologicamente estaria mais próximo de *Achetaria*. Estruturas que em *Achetaria* poderiam ser interpretadas como brácteas ocorriam também em *Otacanthus*. Ademais, o tamanho das flores que havia sido empregado na diferenciação destes dois gêneros não se apresentava de forma descontínua nas espécies de modo que pudesse ser delimitado uma cisão clara, propondo assim a sinonimização dos dois gêneros.

Recentemente, Colletta et al. (2020) incluíram *Achetaria* (Souza; Giulietti, 2009) na sinonímia de *Matourea*. A relação filogenética putativa presumida por Souza e Giulietti (2009) foi corroborada por Scatigna et al. (2022) através de estudos moleculares com abordagem de inferência Bayesiana e máxima parcimônia, cujo cladograma mostra mais aproximação evolutiva de *Matourea* com *Dizygostemon* do que com *Stemodia*.

Matourea se encontra inserido em Plantaginaceae que são angiospermas que apresentam flores coloridas ao longo do ano, de diferentes matizes e local de ocorrência. Na família, é comum a prevalência de herbáceas e arbustos que se desenvolvem em substratos aquáticos, rupícolas e terrícolas. Geograficamente, sua ocorrência se confirma em todas as regiões do território brasileiro, estando presente nos seus principais biomas, Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Scatigna; Mota, 2017; Scatigna, 2019).

Plantaginaceae possui óbvio *status* monofilético que se sustenta pela presença de caracteres avançados como: folhas filodiais e veias paralelas; pelos na região axial em todos os seus representantes. No que diz respeito à adaptação anemocórica pode-se citar características

como corola escariosa (murcho, seco), ausência de disco nectarífero e tem estigma alongado, filiforme, seco e papilionato (Rahn, 1996).

Todas suas espécies necessitam de alta intensidade luminosa, porém a relação de disponibilidade de água pode ser bastante variável pois é possível encontrar aquelas que ocorrem desde áreas pantanosas até desérticas. (Rahn, 1996).

3.7.1. *Matourea Azurea* (Linden) Colletta; V.C. Souza

De acordo com o *Plants of the World Online* (2023), a espécie (figura 6) foi publicada pela primeira vez no táxon em 2020, sendo nativa do Espírito Santo e Rio de Janeiro adaptada a bioma tropical úmido. Segundo Ronse (2001), o gênero *Otacanthus* foi descrito por Lindley (1862) o qual não tendo disposição de frutos e sementes foi inicialmente classificado como Acanthaceae. Batizou essa espécie como *O. coeruleus* Lindl., porém ele já havia nomeado a mesma espécie de *Stemodia azurea*, e posteriormente resultou em *Otacanthus azureus* (Linden) Ronse.

Destaca-se das demais espécies do gênero por apresentar as maiores dimensões de cálice e corola (Souza, 2009). Sua taxonomia é descrita por Rosen (2001):

Arbusto mediano com até 1-2 m de altura, ramificado na base. Folhas com lâmina largamente elíptica, ligeiramente triangular a aguda apicalmente, com pecíolos alados, até 120 x 44 mm. Inflorescência 6-17 cm de comprimento na maturidade; pedicelos até 2 mm de comprimento. Cálice glabro, mas coberto com glândulas minúsculas, exceto no margens, os segmentos inferiores estreitamente triangulares a subulados, 15 x 1 mm, o superior segmento amplamente oval, quase circular em o ápice, 11-20 mm de comprimento e 10 mm ampla. Corola azul-violeta a azul celeste com uma mancha branca no lábio inferior na garganta, o tubo de 25-40 mm de comprimento cilíndrico, curvado para baixo no ápice, glabro até 3/4 do comprimento, mais para cima minuciosamente viloso, o lábio superior reniforme, 15-20 x 16-25 mm, o lábio inferior 3-lobado. Anteras com pólen globoso. Estilete 30 mm, mais curto ou mais longo que os estames. Ovário cônico, 3 x 2 mm, frouxamente piloso, bilocular. Cápsula 8 x 4 mm, pubescente, abertura por 2 válvulas dobradas para dentro. Sementes quase ovóides, anguladas por carúnculas dispostas em linhas longitudinais, 0,6 X 0,4 mm (Rosen, 2001).

Figura 6: *Matourea azurea* (Linden) Colletta & V.C. Souza



Fonte: Acervo do autor, 2023

De acordo com Ronse et al. (1998), as partes aéreas de *M. azurea* contêm quantidades consideráveis de óleo essencial secretado por estruturas denominadas de tricomas glandulares que estão presentes na maioria nas folhas. Houël et al. (2014) identificaram seis maiores constituintes do seu óleo essencial e são eles: β -copaeno-4- α -ol (23,3%), α -humuleno (10,6%), α -copaeno (8,8%), mirtenal (5,6%), viridiflorol (5,1%) e *trans*-pinocarveol (4,3%). Os outros componentes estão sintetizados no quadro 1 a seguir.

De acordo com Serudo et al. (2013), ela é conhecida como copaibinha ou erva-copaíba por ser utilizada na região do Alto Solimões como substituta dos óleos de copaíba obtidos das copaibeiras (*Copaifera* spp), sendo cultivada em canteiros ou jardins. Os autores também afirmam que essa espécie apresenta maior rendimento de óleo essencial a 100% de irradiância.

Quadro 1: Composição do O.E de *M. azurea*

RI*	(%)	Componentes	RI*	(%)	Componentes
1028	0,66	para-Cimeno	1524	0,68	Calameneno
1147	4,35	<i>trans</i> -pinocarveol	1586	0,56	Óxido de cariofileno
1169	2,63	Pinocarvona	1592	23,27	β -Copaen-4- α -ol
1185	0,61	Terpinen-4-ol	1599	5,11	Viridiflorol
1199	5,59	Mirtenal	1607	0,93	β -Oplopenona
1249	0,56	Cuminaldeído	1613/1614	5,05	NI + Óxido de humuleno II
1374	0,86	Ciclosativeno + α -ylangeno	1630/1631	1,28	β -Muurolo-4(10), 14-dienol + <i>cis</i> -cadin-4-en-7-ol
1380	8,77	α -Copaeno	1638	4,06	Bulnesol
1424	0,52	β -Caryophylleno	1645/1647	0,75	Cubenol + NI
1461	10,56	α -Humuleno	1676	1,33	Cadalenol
1465	1,03	Alloaromadendreno	936	1,28	α -Pineno
1499	1,33	<i>cis</i> -Cubebol	976	0,91	Sabineno
1518	1,43	<i>trans</i> Cubebol	981	0,84	β -Pineno
1520	2,91	d-Cadineno	–	–	–

*Índice de retenção.

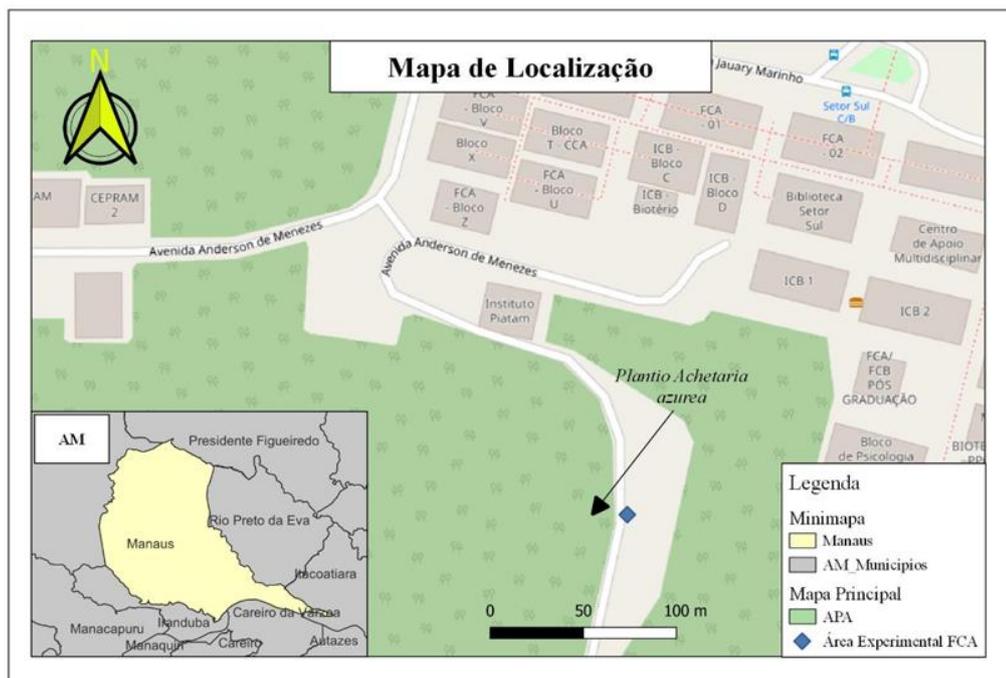
Fonte: Huël et al., 2014.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. LOCAL DO EXPERIMENTO

A propagação vegetal, plantio e extração de óleo essencial de *Matourea azurea* foram feitas na Universidade Federal do Amazonas (UFAM), que se localiza na Av. General Rodrigo Octavio Jordão Ramos, 1200 – Coroado I, Manaus – Amazonas. As mudas foram cultivadas em viveiro com 50 por cento de sombreamento na Área Experimental da Faculdade de Ciências Agrárias (FCA) e o plantio foi realizado nas coordenadas -3.1023100706955726 , -59.97535309325865 como apresentado na figura 7.

7: Mapa de localização do plantio e prédio dos laboratórios



Mapa elaborado pelos autores. Sistema de projeção Geográfica: SIRGAS 2000. Fonte das camadas: IBGE, 2022; OpenLayerStreetView. Escala: 1:1500.

4.2. MATERIAL VEGETAL

4.2.1. Obtenção Das Mudanças

A partir de plantas matrizes adultas e em floração da espécie *Matourea azurea* (Linden) V.C. Souza foram feitas estacas com aproximadamente 10 cm de comprimento para propagação

assexuada. Posteriormente foram fincadas em substrato contendo a proporção de 4:1 de terra com esterco bovino em copos descartáveis de 50 ml no dia 02 de junho de 2022, como mostra na figura 8. A rega foi diária e foi feito monitoramento para averiguar a presença de pragas e remoção de matocompetição.

Figura 8: Propagação assexuada de *M. azurea*



À esquerda está a foto da planta matriz. Na direita estão as estacas no substrato dentro da casa de vegetação. Fonte: Acervo do autor.

4.2.2. Plantio Das Mudas

O campo próximo a casa de vegetação da Área Experimental foi arado para receber as mudas. Foram feitos piquetes de bambu como marcadores para a área de 7,5 m x 7,5m com espaçamento de 0,50 m como na figura 9. O substrato foi composto pela terra da abertura das covas com esterco bovino na proporção 4:1. O plantio aconteceu no dia 24 de agosto de 2022 e posteriormente foi feita a manutenção e após o amadurecimento das mudas também foi aplicado banho de ureia para estimular o aumento de biomassa aérea. Os dados climáticos referentes à época da colheita estão sintetizados no Anexo 1.

Figura 9: Preparação do solo



Fonte: Acervo do autor.

4.3. EXTRAÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

O teor de óleos voláteis em vegetais foi determinado pelo processo de hidrodestilação, utilizando aparelho Clevenger (figura 10). O modelo de extrator é dimensionado para operar em circuito fechado e projetado com base em cálculos hidrodinâmicos de modo que seja mantido o equilíbrio do sistema durante toda a extração. O método se baseia conforme Comunicado Técnico da Embrapa escrito por Santos et al. (2004) e a Farmacopeia Brasileira (Brasil, 2010).

Figura 10: Aparelho Clevenger



Fonte: IndiaMART.com

Os experimentos foram realizados em triplicata com 75g de material na razão entre massa e volume de 10%. O solvente utilizado foi água destilada. O tempo de hidrodestilação

foi determinado com base em ensaios de cinética assumindo o tempo máximo de 3 horas. Foram extraídos óleo essencial das folhas e da parte aérea completa (folhas + flor + caule).

4.4. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE ÓLEO ESSENCIAL

O teor do óleo essencial extraído de biomassa vegetal foi calculado com base na matéria úmida através da seguinte equação (1):

$$T = \frac{V_o}{B_m} \times 100 \quad (1)$$

Onde, T = teor de óleo (ml de óleo essencial em 100 g de biomassa) ou rendimento de extração (%); V_o = volume de óleo extraído (ml), lido diretamente na escala volumétrica do tubo separador; B_m = biomassa aérea vegetal (folhas e ramos finos) em gramas. O óleo extraído foi separado e posteriormente adicionado sulfato de sódio anidro para a absorção de água residual na proporção de 1:2 (m/v).

4.5. PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO

Foi utilizado a enzima comercial Celluclast 1.5 L, cordialmente fornecida pela LFN Latino Americana com atividade declarada de 700 EGU/g.

Inicialmente foi determinada a atividade enzimática da celulase como atividade de papel de filtro e expressa em FPU por volume de enzima original, seguido o procedimento padrão do NREL *Measurement of Cellulase Activities* (Adney; Baker, 2008), que aplica as diretrizes da IUPAC, descrita por Ghose (1987).

Também foi realizado o teste de umidade nas folhas com o fim de compensar o volume de água na concentração enzimática no sistema como um todo. Abaixo a equação (2) utilizada:

$$\text{Umidade(\%)} = ((\text{Massa inicial} - \text{Massa seca})/\text{Massa inicial}) \times 100 \quad (2)$$

As concentrações utilizadas para a comparação do efeito enzimático foram: 1%, 1,5% e 2% em banho a 50 °C por 30 min com o controle (hidrodestilação sem pré-tratamento). Os ensaios foram feitos em duplicata na razão mássica solvente/matéria de 10%. Foi utilizado água destilada como solvente e o tampão com ácido cítrico foi dispensado, pois o solvente apresentou o pH ótimo de 5 para a catálise enzimática (figura 11). Após esse processo o material foi conduzido para a hidrodestilação com o Clevenger e os passos subsequentes descritos na seção anterior. Os resultados subsequentes do rendimento do óleo essencial foram submetidos à ANOVA e o óleo analisado por GC/MS.

Figura 11: Método de hidrodestilação assistida por enzimas (Celluclast 1.5 L)



Fonte: Acervo do autor.

4.6. CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO ÓLEO ESSENCIAL

4.6.1. Cromatografia Gasosa/Espectrometria De Massas (CG/EM)

As amostras de óleo essencial de *M. azurea* foram analisadas por Cromatografia Gasosa/Espectrometria de Massas (CG/EM), conforme descrito por Andrade et al., (2011) e Houel et al., (2014), com adaptações para um sistema Shimadzu QP Plus-2010, nas seguintes condições: coluna de sílica capilar Rtx-5MS (30 m x 0,25 mm; espessura de filme de 0,25 µm). O volume de injeção (óleo essencial solubilizado em diclorometano) foi de 10 µl. A programação da temperatura terá variação de 50°C a 150°C a 4°C min⁻¹, depois de 150°C a 175°C a 15°C min⁻¹ e de 175°C a 300°C a 20°C min⁻¹. A ionização será obtida pela técnica de impacto eletrônico a 70 eV e temperaturas da fonte de íons e linha de transferência em 220°C e 280°C, respectivamente. A identificação das substâncias das amostras será baseada no índice de retenção linear (IR) calculado em relação aos tempos de retenção de uma série homóloga de n-alcenos e no padrão de fragmentação observado em espectros de massas, comparando esses valores existentes nas bases de dados Adams (2017) e Nist (NIST - National Institute of Standards and Technology).

4.6.2. FTIR (*FOURIER TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY*)

O equipamento FTIR utilizado para análise foi o IRAffinity-1S, marca SHIMADZU, utilizando uma célula de ATR (Reflectância Total Atenuada) de cristal de seleneto de zinco. A resolução espectral utilizada será de 16 cm⁻¹ e faixa de varredura de 4000 a 500 cm⁻¹. Esta análise foi realizada para determinar quais grupos funcionais estão presentes no óleo essencial de *M. azurea* da colheita realizada em ago/2023. As amostras foram analisadas na Central de Análises Químicas (CAQ/QAT) da Escola Superior de Tecnologia da Universidade do Estado do Amazonas-UEA.

4.7. DFT (*DENSITY FUNCTIONAL THEORY*)

4.7.1. Otimização Molecular

A otimização das moléculas mais abundantes do óleo essencial extraído das folhas de *M. azurea* foi feita no software gratuito Avogadro. A estrutura molecular foi obtida pelos SMILES (*Simplified Molecular Input Line Entry System*) disponíveis no PubChem. O campo de força utilizado para gerar o arquivo *INP foi o MMFF94s (Merck *Molecular Force Field* 94s). Para melhor eficiência esse processo se iniciou com campos de força de menor a maior precisão até o MMFF94s que teve otimização com menor energia, indicando o estado fundamental da molécula. A ordem baseada na sofisticação e na precisão típica desses campos de força em modelagem molecular foi a seguinte: GHEMICAL, UFF (*Universal Force Field*), GAFF (*General Amber Force Field*), MMFF94 (Merck *Molecular Force Field* 94) e por fim o MMFF94s. O algoritmo utilizado foi o *Conjugate Gradient*, com 100 passos por atualização, Hanwell et al. (2012).

4.7.2. Cálculo Computacional

O funcional escolhido a partir do equilíbrio entre custo computacional e precisão foi o B3LYP (Becke, 3-parameter, Lee-Yang-Parr) com base 6-311++G(d,p). O software utilizado foi o Orca com arquivo de entrada contendo a seguinte sintaxe:

```
! B3LYP OPT FREQ 6-311++G(d,p) TightSCF PAL6 RIJCOSX
```

Onde, B3LYP: Funcional utilizado; OPT: indica que foi realizada uma otimização de geometria; FREQ: Solicita um cálculo de frequência após a otimização de geometria para verificar se a estrutura otimizada é um mínimo verdadeiro e para obter as propriedades vibracionais; 6-311++G(d,p): base especificada; TightSCF: configura critérios de convergência mais rigorosos para o ciclo SCF (*Self-Consistent Field*); PAL6: Utilizou 6 núcleos de CPU para o cálculo paralelo; RIJCOSX: técnica de aproximação para acelerar os cálculos de integrais de troca em DFT.

A DFT é uma combinação de métodos que fornece uma aproximação para o cálculo da energia eletrônica de uma molécula, levando em consideração os efeitos da mecânica quântica, onde o B refere-se ao funcional de troca de Becke, que é uma correção do funcional de troca de Hartree-Fock. O 3LYP refere-se à combinação de três funcionais: 1) o funcional de troca de Hartree-Fock, 2) o funcional de troca de Becke (B), e 3) o funcional de correlação de Lee-Yang-Parr (LYP) (Becke, 1993).

Foram calculados os seguintes descritores quânticos: Potencial de Ionização (IP), Afinidade Eletrônica (EA), Gap HOMO-LUMO (ΔE), Eletronegatividade (χ), Dureza Global (η), Suavidade Global (S), Potencial Químico (μ), Índice de Eletrofilicidade (ω), Índice de Transferência de Carga Máxima (ΔN_{\max}), Índice de Nucleofilicidade (N) e o Potencial de Redução.

Para os cálculos dos descritores quânticos foram utilizadas as equações de (2) a (12) a seguir:

$$IP = -E_{\text{HOMO}} \quad (2)$$

$$EA = -E_{\text{LUMO}} \quad (3)$$

$$\text{GAP } \Delta E = IP - EA \quad (4)$$

$$\chi = \frac{1}{2} (EA + IP) \quad (5)$$

$$\eta = \frac{1}{2} (IP - EA) \quad (6)$$

$$S = \frac{1}{\eta} \quad (7)$$

$$\mu = -\frac{1}{2} (EA + IP) \quad (8)$$

$$\omega = \frac{\mu^2}{2\eta} \quad (9)$$

$$\Delta N_{\max} = -\frac{\mu}{\eta} \quad (10)$$

$$N = \frac{1}{\omega} \quad (11)$$

$$\text{Potencial de redução} = \text{LUMO} \quad (12)$$

4.8. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (DPPH)

O método consiste em avaliar a capacidade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH \cdot), de coloração púrpura que possui absorção máxima em 517 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R), o DPPH \cdot é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem da atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH \cdot remanescente no meio reacional.

A solução de DPPH foi preparada na concentração 0,06 mol/L, onde a amostra foi pesada e avolumada com metanol P. A. em 1000 ml. A solução foi feita no mesmo dia da análise e protegida da exposição à luz.

Foram transferidos 50 µL de cada concentração da amostra teste, em triplicata, para tubos de ensaio, protegidos da exposição direta da luz, sendo adicionados 1950 µL da solução de DPPH 0,06 mol/L seguido de homogeneização da mistura. O controle foi preparado de modo semelhante, substituindo a amostra por metanol P. A. O branco foi preparado adicionando 1950 µL de metanol P. A. mais 50 µL da solução-teste contendo a mesma concentração de cada ensaio para a calibração do espectrofotômetro. Após 30 minutos de reação, foi verificada a absorvância em espectrofotômetro com comprimento de onda de 517 nm.

Os dados foram expressos em média e desvio padrão e aplicados o teste t de Student para comparação entre duas médias e teste ANOVA *OneWay* para análise de variância em mais duas médias. Foram consideradas as diferenças com $p \leq 0,05$ como significativas.

4.9. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE ISSO 10993/5

As linhagens de células murinas de fibroblastos (L929, Thermo Scientific, Brasil), PBS (PBS, para cultura de células *in vitro* foram cultivadas em um meio de cultura contendo carbonato de sódio (Sigma Aldrich), penicilina-estreptomicina (pen/strep), meio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), soro fetal bovino (FBS). Enzima TrypLE Express, solução salina tamponada com fosfato (PBS), solução CellTiter 96® Aqueous One (MTS [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2H-tetrazólio]) (Promega Biotecnologia do Brasil, Brasil), glutaraldeído e formaldeído também foram utilizados em vários ensaios.

4.9.1. Preparação Das Amostras

As amostras foram liofilizadas e pesadas em 276 mg. Posteriormente foram solubilizadas em 1 ml de DMSO, com diluição em meio de cultura até concentrações de 0-1000 µg/mL. Avaliado pelo tempo de 24, 48, 72 horas.

4.9.2. CITOTOXICIDADE PELA AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE METABÓLICA

A viabilidade celular após o contato direto com o óleo essencial foi avaliada utilizando uma linha de células murinas de fibroblastos (L929, Thermo Scientific, Brasil) semeadas em placas de cultura de células de 96 poços (Corning Life Sciences). As células foram mantidas em uma atmosfera úmida a 37 °C com 5% de CO₂ e cultivadas em DMEM, suplementado com 10% de FBS e 1% de penicilina/estreptomicina. O meio de cultura celular foi renovado a cada 2 dias até que as células atingissem 90–95% de confluência. As células foram destacadas usando Tryplex e colocadas em placas de 96 poços com uma densidade de $1 \cdot 10^4$ células/poço. Após 24 h de adesão celular, diferentes concentrações foram adicionadas aos poços. As células foram então incubadas a 37 °C, 5% de CO₂ e 90% de umidade por 24, 48 e 72 horas. Após esse período, as células foram lavadas com PBS (PBS, Gibco® USA), e a viabilidade celular foi medida com o ensaio de proliferação Aqueous One solution (CellTiter 96, MTS, Promega). Em cada poço, uma mistura de 20 µL de reagente celular MTS (Promega Corporation® USA) e 100 µL de meio foi adicionada e cultivada em um incubador (Ultrasafe HF 212UV, Brasil) a 37 °C por 2 h com 5% de CO₂. Em seguida, o meio restante foi transferido para placas de 96 poços para medições de densidade óptica a 490 nm de comprimento de onda. As análises foram realizadas em um espectrofotômetro (Molecular Devices, Spectra Max Plus 348) com quatro réplicas paralelas para cada amostra. O meio de cultura foi usado como grupo de controle e os resultados mostraram atividade metabólica (Aguilar et al., 2021).

4.9.3. ESTRESSE OXIDATIVO INDUZIDO POR PERÓXIDO DE HIDROGÊNIO EM CÉLULAS DE FIBROBLASTOS L929

A avaliação da viabilidade celular após estresse oxidativo (H₂O₂) foi realizada de acordo com Leonarski et al. 2023. Células de fibroblastos L929 foram semeadas a uma densidade de $1 \cdot 10^4$ células/poço em uma placa de 96 poços contendo meio de cultura DMEM suplementado com 10% de FBS e incubadas durante a noite a 37 °C em uma atmosfera umidificada com 5% de CO₂. Após a incubação, DMEM com 10% de FBS contendo 500 µg/mL (peso seco) a solução com óleo essencial foi usada para tratar as células expostas concomitantemente a 1,0 mM de H₂O₂ por 24 horas (dose que diminui 80% da viabilidade

celular das células L929 em 24 horas). A viabilidade celular foi avaliada usando o ensaio MTS conforme descrito na seção anterior.

4.10. ATIVIDADE ANTITUMORAL

As células adenocarcinoma de pulmão (A549) e de glioma (GL e C6) foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de $1 \cdot 10^4$ células/poço e mantidas por 24 horas a 37 °C em um incubador de CO₂ para adesão. Após 24 horas, as células foram tratadas com 500 µg/mL da solução com óleo essencial. Doxorrubicina (10 µg/mL) foi usada como controle positivo, DMSO foi o controle negativo e o controle em branco usou apenas o meio de cultura. As células tratadas foram incubadas por 24 horas e 48 horas a 37 °C em um incubador de CO₂. Após o período de incubação, o meio de cultura foi removido e as células foram lavadas duas vezes com PBS. A viabilidade celular dos extratos foi medida usando o ensaio colorimétrico MTS conforme descrito na seção anterior. (Sousa et al., 2020).

A avaliação estatística foi realizada usando análise de variância de uma via (ANOVA), seguida pelo teste de Tukey, com $p < 0,05$ considerado como estatisticamente significativo.

4.11. *SOFTWARES* UTILIZADOS

As análises estatísticas e criação dos gráficos foram feitas com Origin 2018. A otimização molecular foi feita com o software Avogadro e o DFT com o Orca. A visualização das frequências e ilustração dos orbitais moleculares com o IboView , Chemcraft e Jmol.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. PLANTIO DE *M. AZUREA*

O plantio, ilustrado na figura 12, teve 25% de mortalidade concentrada principalmente na área central do terreno com maior exposição à incidência solar. Apesar de *M. azurea* ser bem adaptada em plena luminosidade (Serudo et al., 2013), o solo da área de capoeira exposto e sujeito a altas temperaturas se endurece e dificulta o desenvolvimento das raízes, e durante os longos períodos sem chuva esse fato se agrava, pois o gradiente de concentração favorece a perda de água da planta para o solo, ou seja, o solo passa a drenar a planta. Vale mencionar que no dia 24 do mês de setembro de 2022, segundo os dados disponibilizados pelo INMET (Anexo 1), houve a maior temperatura do ano registrando impressionantes 37,8 °C, temperaturas acima dos 35 °C também foi frequente durante o mês de outubro. Anderson (2004) cultivou experimentalmente *M. azurea* em Kentucky nos Estados Unidos da América e afirmou que a espécie é de fácil propagação e exige bastante água. Também é tolerante a baixas temperaturas, podendo se desenvolver entre 12,78 °C e 15,56 °C.

Figura 12: Plantio de *M. azurea*



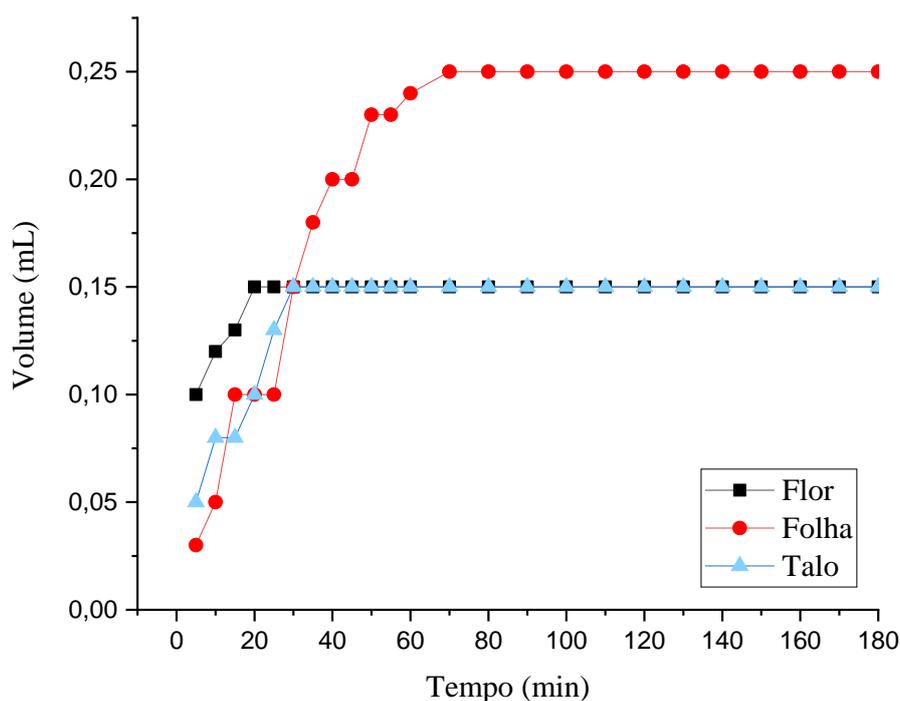
Fonte: Acervo do autor

Em relação à coloração das flores se observou empiricamente um clareamento na época mais seca e quente, já durante a estação das chuvas suas flores apresentaram um azul vibrante. Klehm (2011) trabalhou na mesma área experimental e relatou a presença de lepidópteras da espécie *Anartia jatrophae* (Linnaeus, 1763), porém no atual experimento foi notado a presença de apenas dois indivíduos em meados de dezembro de 2022. Em agosto de 2023 houve possível contaminação por *Colletotrichum* sp. e outros fungos, foi borrifado sulfato de cobre a 3% para fazer o controle.

5.2. HIDRODESTILAÇÃO, CINÉTICA E UMIDADE

O gráfico na figura 13 mostra a curva cinética do volume de óleo essencial extraído em função do tempo (3 horas). Com base nesses resultados se estabeleceu que o tempo de 1:30 h de hidrodestilação seria o mais viável para os futuros ensaios laboratoriais. O teor de óleo essencial para as flores foi de 0,3%, para o talo 0,3% e as folhas 0,5%. Os valores médios de umidade das flores foram de 14,60%, para o talo 26,39% e folhas 23,90%.

Figura 13: Ensaio de cinética da flor, folha e talo



Andrade et al. (2006) encontraram melhor teor ao utilizar base seca comparado com a úmida. Para as folhas o teor foi de 0,40% (0,80% na base seca), caule 0,05% (0,1% na base seca) e flores menos de 0,05 % em base úmida. A mistura de folhas e caule obteve 0,3%. Uma hipótese de os valores absolutos deste trabalho terem sido maiores do que o de Andrade et al. (2006) pode ser pelo histórico de adubação e das condições edafoclimáticas.

Provavelmente o teor do óleo essencial dos indivíduos do plantio tenha aumentado em função da adubação bovina, seguindo a recomendação do trabalho de Klhem (2011) com aproximadamente 25% de esterco bovino, além da adubação nitrogenada foliar que estimula o desenvolvimento da biomassa aérea.

5.3. CG/EM E SUBSTÂNCIAS IDENTIFICADAS

A tabela 3 compila os dados da identificação dos componentes. Os cromatogramas estão dispostos nos Anexos 2-8. Em abril de 2022, os compostos majoritários presentes nas folhas foram o mirtenal, com uma concentração de 18,66%, e o *trans*-pinocarveol com uma concentração de 13,25%. Além disso, o β -copaen-4 α -ol apareceu em uma concentração de 11,96%, seguido pela pinocarvona, que apresentou uma concentração de 9,88%. Outro composto importante foi o ciclossativeno, com 7,81%. Esses compostos formaram os principais constituintes voláteis das folhas em abril de 2022.

Já em agosto de 2023, observa-se mudanças significativas na composição e no rendimento do óleo essencial das folhas. Houve uma leve redução no rendimento de 0,5% para 0,47% em valores absolutos. O β -copaen-4 α -ol, que anteriormente tinha uma concentração de 11,96%, tornou-se o composto mais abundante, aumentando para 20,73%. O mirtenal, que era o principal composto em abril de 2022, apresentou uma redução significativa em sua concentração, caindo para 8,74%. Além disso, o pinocarveol, que não estava presente no óleo essencial em abril de 2022, apareceu com uma concentração relevante de 9,49%. A pinocarvona também teve uma diminuição, passando de 9,88% em abril de 2022 para 6,31% em agosto de 2023. Outro composto que ganhou importância foi o viridiflorol, que em agosto de 2023 teve aumento na concentração (4,6%). Essas comparações mostram que houve uma mudança significativa no perfil químico das folhas entre abril de 2022 e agosto de 2023, sugerindo uma alteração no metabolismo da planta ao longo desse período, possivelmente em resposta a variações sazonais, ambientais ou fatores relacionados ao desenvolvimento (Santos et al., 2022).

Tabela 3: Substâncias identificadas no óleo essencial de *M. azurea*.

Nº	RT*	Parte Vegetal	Flor - Folha – Talo	Folha	Folha
		Mês/Ano	abr/22		ago/23
		Composição	%		
1	8,574	Ciclofencheno	-	-	6,3
2	7,609	α -Pineno	4,17	2,56	1,52
3	8,857	Sabineno	2,43	2,46	3,24
4	10,36	β -Pineno	0,81	1,15	0,75
5	11,484	p-Cimeno	0,74	0,73	0,68
6	12,918	Limoneno	1,12	0,9	0,54
7	13,744	γ -Terpineno	1,36	1,34	-
8	14,403	<i>trans</i> -Pinocarveol	9,14	13,25	-
9	15,216	Pinocarveol	-	-	9,49
10	15,237	Pinocarvona	8,27	9,88	6,31
11	15,686	Terpinen-4-ol	4,71	4,75	2,41
12	16,432	Mirtenal	14,92	18,66	8,74
13	17,057	Mirtenol	0,74	1,28	-
14	17,37	Cuminaldeído	1,76	2,53	-
15	22,289	Ciclossativeno	6,97	7,81	0,29
16	24,591	Aluaromadendreno	-	-	0,32
17	24,767	α -Copaeno	7,92	6,16	4,95
18	24,965	β -Cariofileno	-	0,89	-
19	25,998	α -Humuleno	-	1	-
20	26,667	epi-Cubebol	-	0,77	-
21	26,894	δ -Cadineno	2,46	2,18	-
22	29,557	β-copaen-4α-ol	9,42	11,96	20,73
23	30,179	Viridiflorol	2,45	3,07	4,6
24	31,187	Humuleno	0,96	1,07	3,80
25	31,599	β -Oplopenona	2,29	2,43	-
26	32,911	Bulnesol	-	0,48	-
27	33,342	Cubenol	2,01	1,52	-
28	39,519	Acetato de (Z)- α -Santalol	2,24	1,17	-
29	56,069	Fenilacetato de Isoeugenol (E)	13,02	-	-

*Tempo de retenção

Os cinco compostos majoritários presentes nas flores foram o fenilacetato de isoeugenol (E), com uma concentração de 13,02%, seguido pelo mirtenal, com 14,92%, e o β -Copaen-4 α -ol, que apresentou uma concentração de 9,42%. Além desses, o *trans*-pinocarveol apareceu com uma concentração de 9,14%, enquanto a pinocarvona esteve presente em uma concentração de 8,27%. Esses compostos representaram os principais constituintes químicos das flores nesse período, refletindo suas características voláteis predominantes.

A espécie vegetal *M. azurea* se destaca pelos óleos essenciais ricos em bioativos com potencial biológico e para os mercados alimentícios, cosméticos e farmacêuticos. As substâncias identificadas nas análises e interpretação dos dados (tabela 3), também foram identificadas nos trabalhos de Ronse et al. (1998), Andrade et al. (2006) e Houel et al. (2014) com as principais substâncias majoritárias *trans*-pinocarveol, mirtenal, α -copaeno, β -copaen-4 α -ol. O óleo essencial de *M. azurea* consiste em uma complexa mistura de mono e sesquiterpenos. A composição do óleo é interessante do ponto de vista fitoquímico, uma vez que β -copaeno-4 α -ol, um sesquiterpeno identificado pela primeira vez nesta espécie, é uma das principais substâncias majoritárias.

O fenilacetato de isoeugenol (E) é um composto aromático que está presente em grande quantidade no óleo essencial das flores de *M. azurea*, sendo o segundo mais abundante. Ele pertence à classe dos ésteres e pode ser sintetizado por métodos bioenzimáticos e catálise heterogênea, sendo considerado um produto natural. Este composto é aprovado para uso em alimentos pelo Comitê de Aditivos Alimentares (JECFA) e pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA, 2023), e está incluído na base de dados de substâncias aromáticas da União Europeia. De acordo com Oliveira et al. (2019), o acetato de eugenil produzido por catálise heterogênea mostrou bons resultados como agente antimicrobiano contra *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, demonstrando potencial para ser usado na indústria alimentícia.

A pinocarvona é uma molécula natural encontrada em diversas plantas, incluindo aquelas do gênero *Pinus* e *Artemisia* (Hassani Moghaddam et al., 2020; Korablova et al., 2023). Ela pode ser sintetizada através de reações de foto oxigenação de (+) e (-)- α -pinenos, assim como o *trans*-pinocarveol (Rosa et al., 2023). Pesquisas demonstraram que este composto é eficaz contra uma variedade de patógenos, incluindo bactérias gram-positivas e gram-negativas, além de fungos. A capacidade da pinocarvona de perturbar a membrana celular dos microrganismos contribui para sua eficácia como agente antimicrobiano. Este efeito,

combinado com suas propriedades antioxidantes e anti-inflamatórias, torna a pinocarvona uma molécula de interesse para o desenvolvimento de novos fármacos.

O mirtenal é considerado praticamente insolúvel em água e é relativamente neutro. Sua estabilidade será discutida do ponto de vista molecular mais à frente na abordagem do estudo de DFT das principais moléculas do óleo essencial de *M. azurea*. É um monoterpene que tem ganhado mais notoriedade, sendo amplamente utilizado no combate a diversas doenças, como tumores, doenças neurodegenerativas e diabetes. Com base nos dados de pesquisa, algumas revisões focam na propriedade anticancerígena do mirtenal, destacando suas propriedades terapêuticas que regulam negativamente as vias do inflamaçã e outras vias de sinalização. (Shen et al., 2023; Dragomanova et al., 2023).

O viridiflorol é um composto natural que possui um ciclopropaazuleno em sua estrutura, o que contribui para suas propriedades anticancerígenas, particularmente contra o câncer de mama. Ele pode ser extraído de *Salvia algeriensis* e outras plantas da família Lamiaceae, como *Melaleuca quinquenervia* e *Allophylus edulis* que têm importância etnofarmacológica. Estudos mostraram que o viridiflorol tem efeitos citotóxicos em células cancerígenas, incluindo MCF-7, A549 e Daoy, reduzindo a viabilidade celular de forma dependente da concentração e exibindo maior atividade em células cerebrais (Daoy). Além disso, o viridiflorol demonstrou propriedades antinociceptivas e antiartríticas, inibindo edema, dor e inflamação em modelos experimentais, o que confirma seu potencial analgésico e anti-inflamatório, reforçando o uso tradicional de *A. edulis* para tratar dores. (Akiel et al., 2022; Naeem et al., 2022; De Matos Balsalobre et al., 2023).

O ciclossativeno possui propriedades antioxidantes e anticarcinogênicas. Em estudos com ratos, demonstrou-se que o CSV protege células neurológicas corticais do dano causado por H₂O₂ (Turkez et al., 2015). Gomes et al. (2023) observaram que compostos com alta porcentagem de Ciclossativeno encontrados em fungos endofíticos de café (*Induratia coffeana*), têm atividade antimicrobiana contra várias espécies de *Aspergillus*.

A presença de compostos de valor farmacêutico no óleo essencial de *M. azurea* como o mirtenal e o viridiflorol, fazem dessa espécie potencial candidata de futuros estudos em linhagens celulares e seu aprimoramento, como por exemplo sua incorporação em nano emulsões. Além de poder ser de interesse de outros setores como a engenharia de materiais e biocombustíveis e na investigação contra outras ameaças biológicas.

5.4. PRÉ-TRATAMENTO ENZIMÁTICO

O rendimento médio de óleo essencial do controle foi de $0,43\% \pm 0,005$. Para os ensaios tratados previamente com celulase os rendimentos de acordo com as concentrações foram: 1% ($0,57\% \pm 0,014$), 1,5% ($0,55\% \pm 0,014$) e 2% ($0,49\% \pm 0,027$). O gráfico na figura 14 a seguir ilustra o quantitativo do volume das extrações e se observa aumento nos valores absolutos do óleo essencial de *M. azurea*.

O resultado da análise de variância (ANOVA) da tabela 4 mostra que o valor-P é menor que 0,05 o que indica que pelo menos um dos tratamentos é estatisticamente diferente. No gráfico da figura 15 é possível localizar que a diferença estatística está entre os tratamentos com 1% e 1,5% de celulase em relação à testemunha, com incremento de 32% e 26% respectivamente. De acordo com os dados, a concentração ótima de Celluclast 1.5 é de 1%.

Quando o intervalo de confiança não intercepta a linha do zero (figura 15) se assume que há diferença estatisticamente significativa (destaque em vermelho). A posição da média no eixo horizontal indica se a média do primeiro tratamento na comparação é maior ou menor. Por exemplo, quando se compara os tratamentos 2% com 1,5%, pode-se dizer que não há diferença estatística entre eles pois o intervalo intercepta a linha do zero e a posição na região negativa indica que a média do volume de óleo essencial extraído com 2% de celulase foi menor do que quando extraído com 1,5%. Agora, quando se compara os tratamentos com diferença significativa o tratamento com 1,5% teve maior rendimento em relação ao controle, mas menores valores do que a média do tratamento com 1%.

Figura 14: Hidrodestilação pós-enzimólise

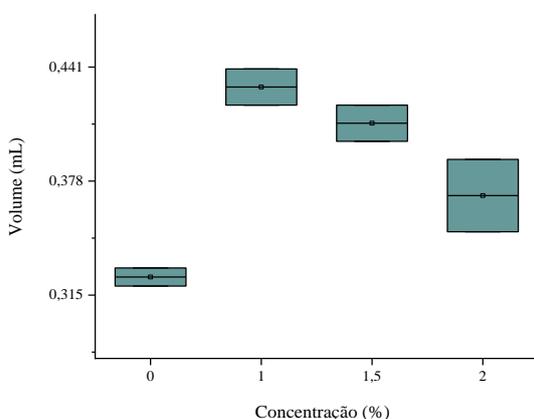


Figura 15: *Post-hoc* – Teste Tukey (Celulase)

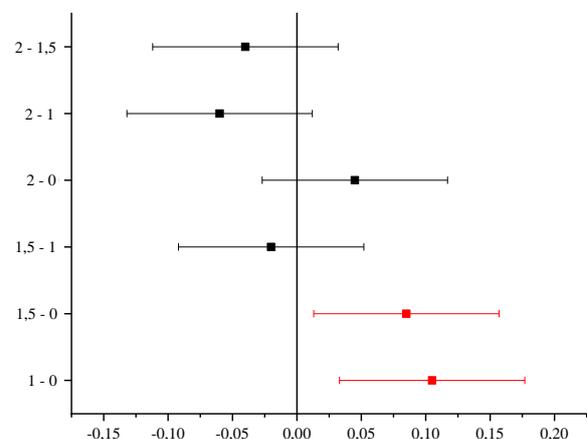


Tabela 4: ANOVA *One-Way* – Óleo essencial *M. azurea*

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F value	Prob>F	R ²	Coef. Var.
Modelo	3	0,01294	0,00431	13,8	0,01412	0,91189	0,04607
Erro	4	0,00125	3,13E-04				
Total	7	0,01419					

GL= graus de liberdade; SQ = soma dos quadrados; QM= quadrado médio.

Na tabela 4 é apresentado o R² com valor de 0,91 constatando que o modelo foi capaz de capturar a variabilidade dos dados pelos fatores analisados de forma muito satisfatória. Esse parâmetro apresenta valores entre 0 e 1 e quanto mais próximo de 1 maior é a capacidade explicativa em relação às fontes de variação. Os graus de liberdade (GL), soma de quadrados (SQ) e quadrado médio (QM) são fundamentais na ANOVA para medir a variação total dos dados e decompor essa variação entre e dentro dos grupos. Os GL indicam quantos valores são livres para variar, enquanto a SQ quantifica a variação. O QM, obtido ao dividir a SQ pelos GL, é usado para calcular o teste F, que permite avaliar se as diferenças entre grupos são estatisticamente significativas. (Fávero; Belfiore, 2017; Liu; Wang, 2021).

Na figura 14 observa-se que para todas as concentrações utilizadas houve aumento no rendimento de óleo essencial, porém com o aumento da concentração há perda na eficiência da digestão enzimática. Como os dados não se comportam de acordo com a cinética de Michaelis-Menten se descarta a possibilidade da ocorrência de saturação enzimática, pois como o volume de substrato é constante, nessa situação a curva apresentaria um platô após a concentração ótima não um comportamento decrescente, e de forma global uma hipérbole retangular (Srinivasan, 2022).

Dessa forma, esse comportamento pode ser explicado pela inibição enzimática a partir dos produtos da degradação da celulose, como a celobiose e a glicose, ou da interação de substâncias aromáticas como terpenos e fenóis da biomassa. Também pode ocorrer a ligação não produtiva da enzima com lignina, por conta do tipo de proteína ou de modificações alostéricas (Agrawal et al., 2021). A inibição enzimática pode ocorrer de duas formas, a alostérica e a competitiva, ambas interferindo no funcionamento das enzimas de maneiras distintas. Na inibição competitiva, o inibidor compete diretamente com o substrato pela ligação ao sítio ativo da enzima, reduzindo a taxa de formação do complexo enzima-substrato. Já a inibição alostérica ocorre quando o inibidor se liga a um sítio diferente do sítio ativo, chamado sítio alostérico, induzindo uma mudança conformacional que diminui a afinidade da enzima

pelo substrato ou a atividade catalítica. O aumento da concentração dos reagentes aumenta a velocidade de reação e os produtos inibitórios se formam mais rápido e comprometem a eficiência da digestão, ao ponto de não se observar diferença estatisticamente significativa entre a concentração de 2% com o controle (Gusakov; Sinitsyn, 1992; Hsieh et al., 2014; Nong et al., 2024). Outro fator que pode explicar esse comportamento é o erro inerente à técnica de extração e do delineamento experimental, o aumento de repetições pode diminuir os valores de erro e capturar melhor a natureza da reação, bem como instrumentos mais precisos como um tubo de condensação a vácuo para diminuir o erro associado à separação utilizando apenas o Clevenger. Wainer et al. (2022) encontraram maior desvio padrão ao comparar o rendimento entre a hidrodestilação assistida por celulase e tradicional com a hidrodestilação a vapor por exemplo.

Na literatura é reportado o efeito positivo da digestão por celulase no rendimento do óleo essencial. Liu et al. (2021) ao pesquisar o efeito da digestão enzimática antes da extração assistida por micro-ondas de folhas de *Cinnamomum burmannii* também observaram melhoria significativa no rendimento com celulase comparado ao controle e à ação de pectinase e protease neutra. No entanto, as melhores condições se encontraram no efeito com complexos enzimáticos. O mix de celulase/hemicelulase em pH 5 e temperatura de incubação a 40 °C seguido por extração por micro-ondas teve melhor performance do que a extração com enzimas isoladas e hidrodestilação tradicional. Os autores também afirmam que essa metodologia também aumentou a porcentagem de frações oxigenadas.

Hosni et al. (2013) estudaram métodos de extração de óleo essencial para *Thymus capitatus* com diferentes enzimas também a 40 °C. A celulase isolada teve incremento de 63,55%, enquanto que a hemicelulase de 23,72% e a combinação de ambas obteve aumento de 109,32%. Os pesquisadores também executaram o mesmo delineamento experimental para *Rosmarinus officinalis* com resultados menos animadores do que com *T. capitatus*. A celulase, hemicelulase e o mix das duas tiveram os respectivos rendimentos: 5%, 50% e 20%. Esses dados são interessantes pois evidenciam o aumento no rendimento de óleo essencial a partir do efeito sinérgico de enzimas que atuam em diferentes substratos. Contudo, para aplicar essa metodologia no futuro com o óleo essencial de *M. azurea* é importante levar em consideração o efeito inibitório dos produtos da enzimólise e utilizar estabilizantes durante a adição das enzimas.

5.5. PERFIL QUÍMICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *M. AZUREA* APÓS DIGESTÃO ENZIMÁTICA (CG/EM)

A partir da análise de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas foi possível identificar o perfil químico do óleo essencial de *M. azurea*. Há diferença na composição qualitativa do óleo após o tratamento enzimático com Celluclast 1.5.

A diferença na composição frente às concentrações da extração assistida por enzima pode ser em decorrência da interação dos terpenos com os produtos da enzimólise, a solubilidade da celobiose e dos monômeros de açúcar que podem liberar íons na solução facilitando reações de oxidação, ou os açúcares redutores podem atuar como antioxidantes. Em suas devidas proporções também pode haver a formação de novos produtos a partir da solubilização de conservantes e estabilizantes do complexo enzimático como o sorbato de potássio e o cloreto de sódio (Gan et al., 2002; Alves et al., 2016; Şimşek et al., 2023). Dentre as mudanças se destaca o aparecimento do 1,4,7-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-Z,Z,Z-, uma molécula pouco estudada. Os compostos majoritários e característicos da espécie permaneceram com concentração relativamente constante.

A seguir, a tabela 5 correspondente com as substâncias identificadas e os valores de concentração, e as figuras 12 e 13 que mostram os picos identificados nos cromatogramas. Posteriormente será abordado a importância de algumas dessas moléculas identificadas.

No óleo essencial de *M. azurea*, apenas o composto 1,4,7-cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-Z,Z,Z aumentou com o uso das enzimas, com incrementos de 9,05% e 24,29% para concentrações de 1,5% e 2%, respectivamente, e 4,20% na concentração de 1%. Este composto já foi reportado em algumas espécies como *Eugenia caryophyllus*, *Sonchus bornmuelleri* e *Zanthoxylum dissitum*, mas há poucos estudos sobre sua funcionalidade (Uddin et al., 2017; Gharari et al., 2023).

O Ciclofenchono é um composto que também pode ser encontrado no óleo essencial de *Curcuma aeruginosa*, *Curcuma mangga*, *Commiphora caudata*, *Stachys lavandulifolia* e *Ziziphora clinopodioides* (Waman et al., 2018; Peng et al., 2022). Recentemente Ghavam (2022) descobriu um quimiotipo de *Z. clinopodioides*, uma espécie nativa do Iran, rico em ciclofenchono (25,29%). Nos ensaios microbianos não houve a formação de halo de inibição para diversos microrganismos como bactérias gram-positivas como a *S. aureus*, gram-negativa como a *E.coli*, e linhagens de fungo como *A. niger* e *C. albicans*, e altas concentrações de

inibição mínima provaram o fraco efeito antimicrobiano do óleo essencial. Contudo, a espécie teve ótimos resultados contra a atividade de células de câncer de ovário (OVCAR-3) com IC₅₀ de 144,25 µg/mL.

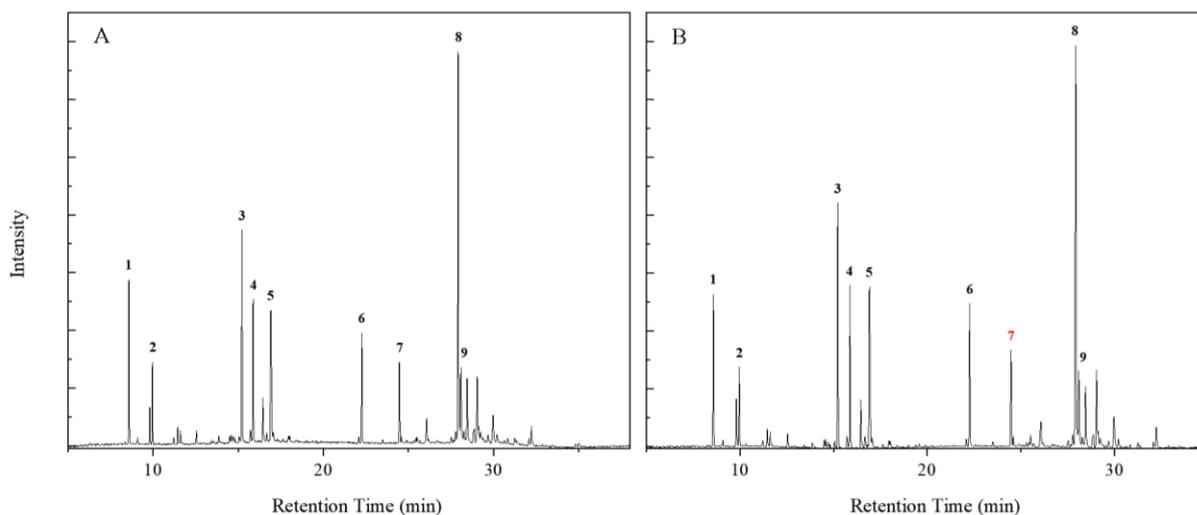
Tabela 5: Perfil químico do óleo essencial de *M. azurea* após enzimólise de celulase

Nome	RT	Controle	1%	1,5%	2%
Ciclofencheno	8,574	6,3	5,36	-	5,88
Sabineno	9,800	1,52	1,79	0,73	1,74
(-)-β-Pineno	9,955	3,24	2,98	1,74	3,25
β-Cymene	11,448	0,75	0,73	0,53	0,69
D-Limoneno	11,607	0,68	0,57	-	0,78
γ-Terpinene	12,542	0,54	0,56	0,47	0,67
Pinocarveol	15,216	9,49	-	8,17	-
trans-Pinocarveol	15,212	-	-	-	10,22
p-Mentha-2,8-dien-1-ol	15,224	-	10,02	-	-
Pinocarvona	15,870	6,31	6,77	5,11	6,06
(-)-Terpinen-4-ol	16,447	2,41	2,35	2,31	2,86
(1R)-(-)- Mirtenal	16,909	8,74	9,91	8,24	9,42
Ciclossativeno	22,075	0,29	0,31	0,25	-
Copaene	22,258	4,95	5,84	5,47	4,93
Humulene	24,466	3,8	-	-	-
1,4,7-Cycloundecatriene, 1,5,9,9-tetramethyl-Z,Z,Z-	24,475	-	4,2	4,58	5,22
Aluaromadendreno	24,591	0,32	0,39	-	-
Naphthalene	26,067	1,45	1,54	1,79	1,57
β-Copaen-4α-ol	27,920	20,73	20,17	23,93	19,09
Viridiflorol	28,084	4,6	4,22	5,11	4,28

RT= Tempo de retenção. O c corresponde a concentração de enzima utilizada, onde 0 é o controle e, 1,2 e 3 é o percentual de enzima utilizado.

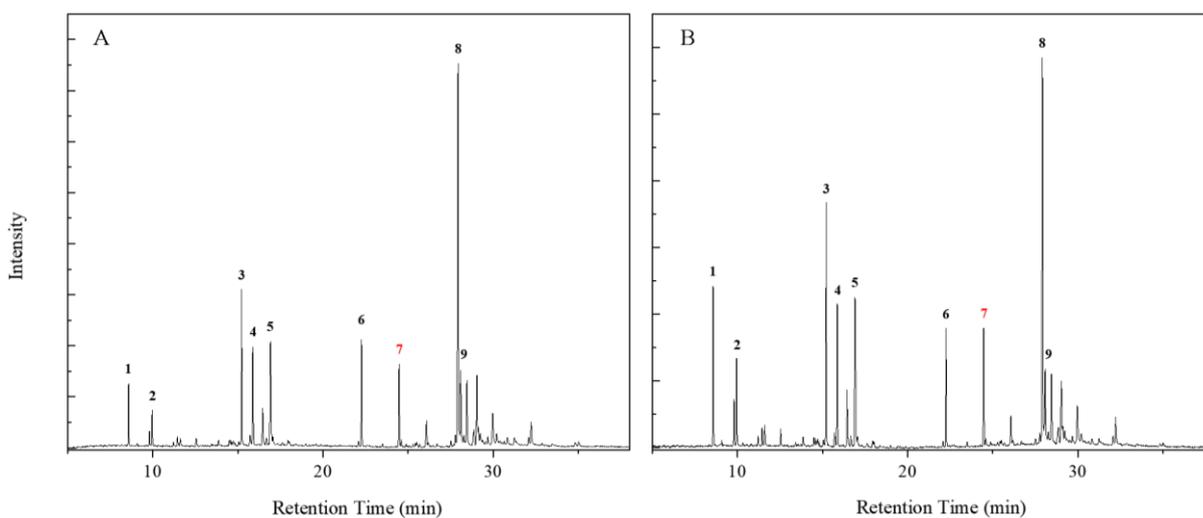
Wang et al. (2024) conduziram um experimento de extração assistida por enzima de *Cinnamomum longepaniculatum*, uma espécie endêmica da China e que tem como compostos majoritários o DL-isopulegol, o thujylalcohol e o β-phellandrene. As enzimas utilizadas foram a hemicelulase, β-glucana circunscrita, e a endo-β-glucanase. Os autores observaram que o pré-tratamento enzimático aumentou a quantidade de compostos oxigenados no óleo essencial, mas de forma geral, assim como no óleo de *M. azurea*, os compostos majoritários tendem a ter pouca variação em quantidade bem como o perfil qualitativo. Em relação ao rendimento o maior incremento relativo foi observado no efeito em conjunto da β-glucana circunscrita e da hemicelulase de 53,55%, e proporcionou aumento também no número de constituintes do óleo.

Figura 16: Cromatograma do óleo essencial de *M. azurea* após digestão enzimática (Controle – 1%)



Cromatograma de Íons Totais (TIC) do óleo essencial de *M. azurea*. A: Controle, com os picos e compostos correspondentes: **1** - *Cyclofenchene*, **2** - β -*Pinene*, **3** - *Pinocarveol*, **4** - *Pinocarvone*, **5** - *Myrtenal*, **6** - *Copaene*, **7** - *Humulene*, **8** - β -*Copaen-4 α -ol*, **9** - *Viridiflorol*. B: Amostra submetida a pré-tratamento enzimático com 1% de celulase, com os picos e compostos correspondentes: **1** - *Cyclofenchene*, **2** - β -*Pinene*, **3** - *trans-Pinocarveol*, **4** - *Pinocarvone*, **5** - *Myrtenal*, **6** - *Copaene*, **7** - *1,4,7-Cycloundecatriene*, *1,5,9,9-tetramethyl-Z,Z,Z*, **8** - β -*Copaen-4 α -ol*, **9** - *Viridiflorol*.

Figura 17: Cromatograma do óleo essencial de *M. azurea* após digestão enzimática (1,5% - 2%)



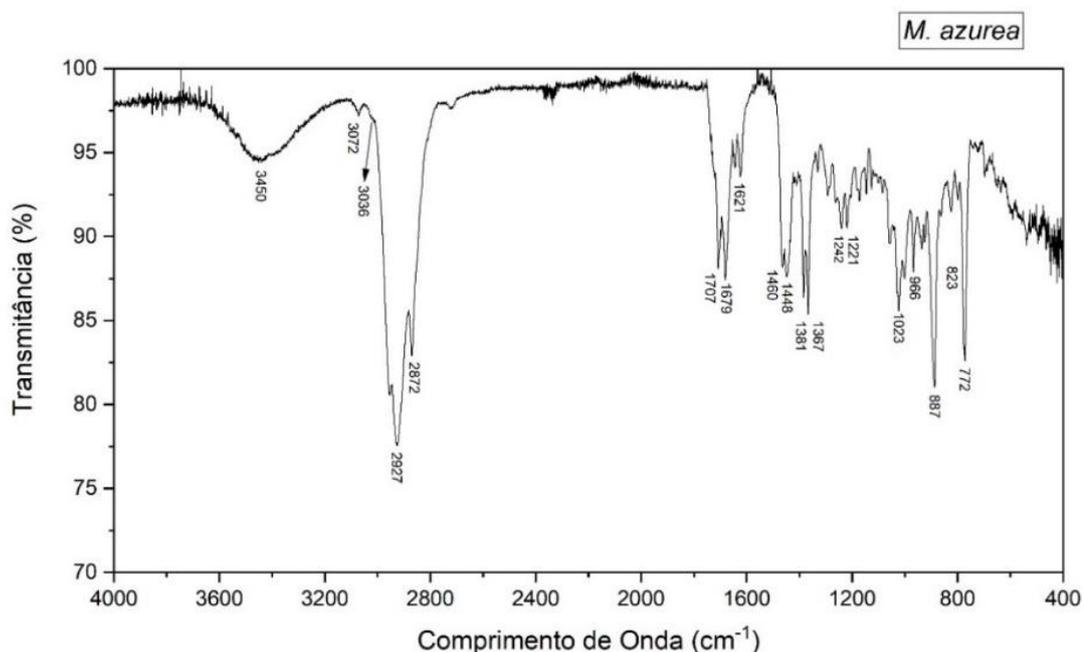
Cromatograma de Íons Totais (TIC) do óleo essencial de *M. azurea*. A: Amostra submetida a pré-tratamento com 1,5% de celulase. Os picos e seus compostos correspondentes são: **1** - *trans- β -Ocimene*, **2** - β -*Pinene*, **3** - *Pinocarveol*, **4** - *Pinocarvone*, **5** - *Myrtenal*, **6** - *Copaene*, **7** - *1,4,7-Cycloundecatriene*, *1,5,9,9-tetramethyl- Z,Z,Z*, **8** - β -*Copaen-4 α -ol*, **9** - *Viridiflorol*. B: Amostra submetida a pré-tratamento enzimático com 2% de celulase, com os picos e compostos correspondentes: **1** - *Cyclofenchene*, **2** - β -*Pinene*, **3** - *trans-Pinocarveol*, **4** - *Pinocarvone*, **5** - *Myrtenal*, **6** - *Copaene*, **7** - *1,4,7-Cycloundecatriene*, *1,5,9,9-tetramethyl-Z,Z,Z*, **8** - β -*Copaen-4 α -ol*, **9** - *Viridiflorol*.

A endo- β -glucanase (celulase) teve incremento de 30,85%, um número compatível com o incremento da Celluclast 1.5 (32%) com os resultados desse trabalho com *M. azurea*. Rashed et al. (2016) observaram maior eficiência na extração de óleo essencial em *Lavandula angustifolia* ao combinar celulase e hemicelulase, aumentando os teores de linalol (31%), acetato de lavandulil (15%) e α -terpineol (4%).

5.6. FOURIER-TRANSFORM INFRARED SPECTROSCOPY (FTIR)

O gráfico da figura 18 apresenta as bandas de absorção para o óleo essencial de *M. azurea*. Na região de comprimento de onda de 2927 cm^{-1} e 2872 cm^{-1} está presente o estiramento de C-O característico do grupo químico dos aldeídos, a presença do dubleto permite a distinção de outros grupos (Silverstein et al., 2014, Pavia et al., 2015).

Figura 18: FTIR – espectro do óleo essencial de *M. azurea*



Em 1460 cm^{-1} há a absorção da vibração do tipo *scissoring* (dobramento) do CH próximo ao grupo carbonila. Os picos na faixa de $850\text{-}920\text{ cm}^{-1}$ correspondem à absorção do metileno. Próximo a 875 cm^{-1} há a absorção de β -pineno devido ao tensionamento da estrutura do anel com o grupo CH₂ exocíclico, essa banda também pode ser um indicativo do mirceno porém ele não foi identificado na cromatografia, embora esteja presente em outros quimiotipos

de *M. azurea* (Agatonovic-Kustrin et al., 2020). O pico presente em 1448 cm^{-1} pode ser resultado da sobreposição da deformação de CH_2 com o CH_3 assimétrico, sendo que a intensidade é proporcional à quantidade desses dois grupos. Em 1679 e 1621 cm^{-1} correspondem a vibração de estiramento do grupo carbonila de aldeídos. O pico próximo a 1450 cm^{-1} é indicativo da presença de álcoois com absorção da vibração de dobramento de C-OH (Li et al., 2013).

Cada tipo de ligação tem sua própria frequência natural de vibração, e como dois tipos idênticos de ligações em dois diferentes compostos estão em dois ambientes levemente diferentes, os padrões de absorção no espectro infravermelho em duas moléculas de estruturas diferentes nunca são exatamente idênticos (Pavia et al., 2015). Em soluções homogêneas como óleos essenciais, o espectro de componentes individuais pode mostrar sobreposições e mistura de diversos modos vibracionais (Agatonovic-Kustrin et al., 2020). Dessa forma o FTIR pode ser utilizado como técnica para a diferenciação de espécies vegetais a partir dos padrões na região de *fingerprint*. O estiramento de C-O e o dobramento O-H não são modos vibracionais independentes pois eles podem se acoplar com vibrações de grupos adjacentes (Silverstein et al., 2015). O dubleto observado na faixa de 2860 cm^{-1} a 2700 cm^{-1} de um aldeído é resultado da ressonância de Fermi, no caso a banda detectada no gráfico 2 provavelmente corresponde ao mirtenal, a molécula de maior concentração no óleo de *M. azurea*. A segunda banda aparece quando a vibração do estiramento C—H se acopla com a primeira harmônica da vibração de dobramento do C-H do aldeído de média intensidade, que surge na faixa de 1400 cm^{-1} a 1350 cm^{-1} , a intensidade em 1680 cm^{-1} sugere sistema de conjugação mais longa para C=O.

Apesar de óleo essencial de *M. azurea* possuir compostos com presença de hidroxilas e na literatura essa banda característica ser larga e intensa, fatores como a simetria da molécula podem interferir na vibração. O comportamento do pico nessa região pode ser explicado por conta de bandas harmônicas, quando há a sobreposição de duas bandas com dipolo elétrico forte, além de ter interferência da concentração pois ainda que parte majoritária da composição do óleo essencial seja de álcoois como β -copaen-4a-ol e o *trans*-pinocarveol essas substâncias não se sobrepõem a soma da fração restante. Entretanto, De Pooter et al. (1989) mencionaram em seu trabalho uma absorção característica de banda larga O-H ao trabalhar com β -copaen-4a-ol purificado de *M. azurea*, confirmando que a até então recém-descoberta molécula era um sesquiterpeno oxigenado, o que possibilitou sua identificação. A partir do DFT em B3LYP, com base 6-311++G(d,p) foi possível fazer o espectro por computação quântica dos elementos

isolados que representam a maior área identificada no cromatograma nas figuras 19, 20, 21, 22 e 23 a seguir e descobrir os tipos de vibração sintetizados na tabela 6.

Figura 19: Espectro IR do β -copaen-4 α -ol

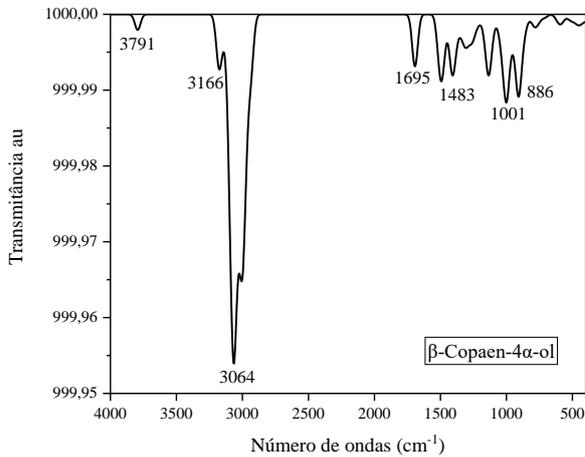


Figura 20: Espectro IR do viridiflorol

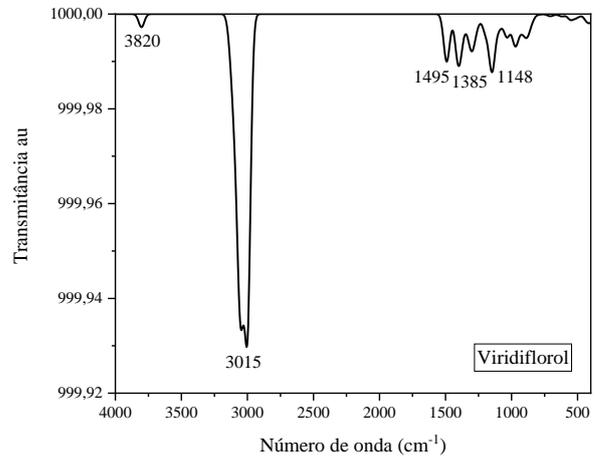


Figura 21: Espectro IR *trans*-pinocarveol

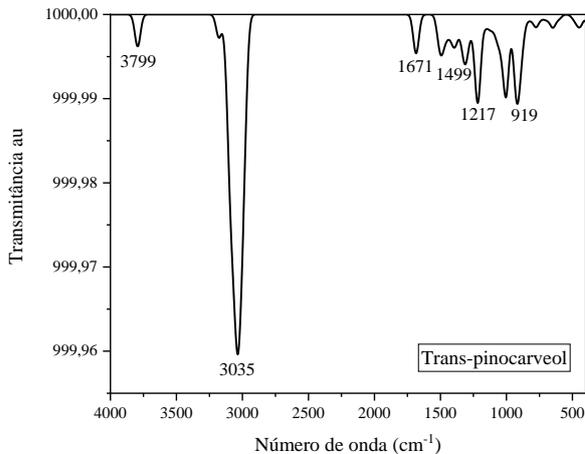


Figura 22: Espectro IR mirtenal

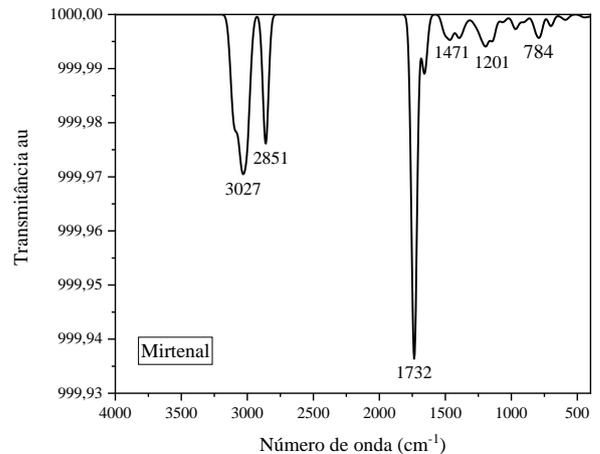


Figura 23: Espectro IR Pinocarvona

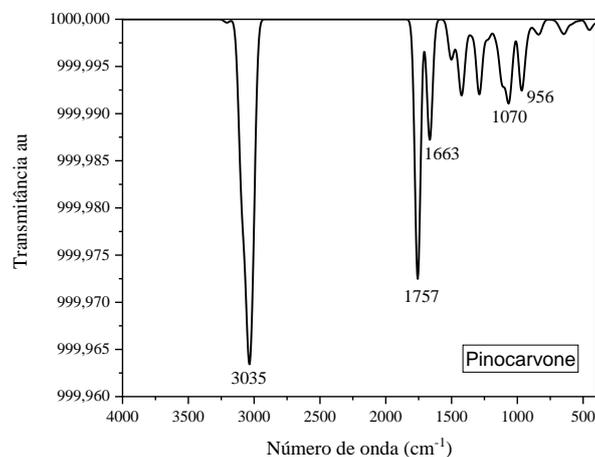
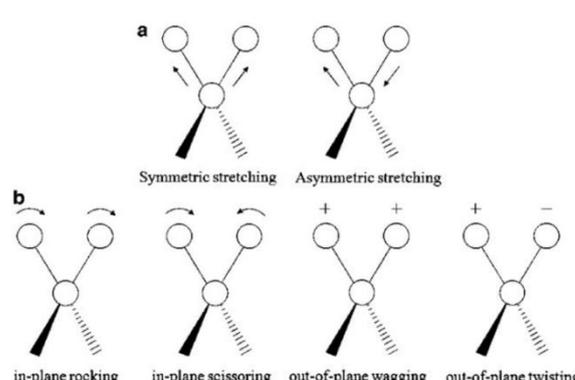


Tabela 6: Tipos de vibrações no espectro IR de terpenos do óleo essencial de *M. azurea*

Molécula	Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Tipo de vibração	Molécula	Comprimento de onda (cm ⁻¹)	Tipo de vibração
β-Copaen-4α-ol	289,44	δ(O-H)*	Pinocarvone	73,06	ω(H-C-H)/ ρ(H-C-H)
	915,73	δ(H-C-H)		353,85	ρ(H-C-H)/ δ(C=O)*
	1400,11	δ(H-C-H)		1673,48	δ(H-C-H) (<i>scissoring</i>)
	1700,96	δ(H-C-H) (<i>scissoring</i>)		1766,09	ν(C=O)*/ δ(H-C-H) (<i>scissoring</i>)
	3077,77	ν(H-C-H)		3049,51	ν(C-H)
	3812,27	ν(O-H)*		3222,57	ν(C-H)
Viridiflorol	300,62	δ(O-H)*	Myrtenal	784,49	δ(C=O)*
	1155,49	δ(H-C-H)/ δ(C-H)		1207,31	δ(H-C-H)
	1300,73	δ(O-H)/ δ(C-H)		1744,61	ν(C=O)*
	3029,85	ν(C-H)		2875,06	ν(C-H)*
	3821,01	ν(O-H)*		1666,07	ν(C=C)/ ω(C-H)*
trans-pinocarveol	345,03	δ(O-H)*/ δ(H-C-H)	2875,06	ν(C-H)*	
	919,9	δ(H-C-H)	3099,3	ν(C-H)	
	1321,02	δ(H-C-H)			
	1401,53	δ(H-C-H)			
	3049,84	ν(C-H)			
	3812,39	ν(O-H)*			

δ: Dobramento (*bending*). ν: Estiramento (*stretching*). ω: *Wagging*. ρ: *Rocking*. *: Grupo Funcional. a: Estiramento. b: Dobramento. Fonte da figura: Ojeda; Dittrich, 2012.

Os dados com a variável número de ondas foram corrigidos com fator de escala 0,9951 (Zochedh et al., 2022). A ausência de números imaginários demonstra que o cálculo de otimização da geometria molecular foi bem-sucedido, representando o estado fundamental da molécula. Os dados experimentais costumam ser diferentes porque há a absorção do infravermelho em moléculas com diferentes estados energéticos além do fundamental e por diferenças no estado da matéria (Costa et al., 2020). Também pode haver interações do material com solventes e moléculas que resultam em diferentes absorções de luz infravermelha. É interessante observar que o estiramento do grupo O-H nos álcoois terciários aparece em regiões de maior número de ondas e com formato similar. O estiramento do *trans*-pinocarveol, um álcool secundário, apresenta banda ligeiramente distinta dos terciários, com maior intensidade. Em condições experimentais essa vibração do O-H pode aparecer em menores números de onda.

Os dados da tabela 6 são uma descrição do tipo de vibração referente ao pico da intensidade do espectro infravermelho visualizado no *software* Chemcraft. O objetivo da investigação de vibrações é descobrir quais modos vibracionais causam cada uma das bandas experimentais (Udayappan et al., 2024). O valor do número de ondas é diferente dos gráficos porque eles correspondem aos valores antes da padronização. Os álcoois apresentam vibração do tipo estiramento no grupo funcional em regiões de maior número de onda, em torno de 3800 cm^{-1} , e outra de dobramento em regiões de menor número de ondas, por exemplo, o β -Copaen-4 α -ol tem esse pico em 289,44 cm^{-1} . De acordo com o que mencionado no início da seção, o mirtenal apresenta estiramento C=O em 1744 cm^{-1} e em torno de 784 cm^{-1} há o dobramento nesses átomos. O grupo funcional aldeído no mirtenal também teve vibração de dobramento em C-H em 2875 cm^{-1} .

Com base nos dados calculados pode-se afirmar que os picos fortes em regiões de maior número de ondas encontrados no espectro experimental do óleo essencial de *M. azurea* é uma sobreposição das vibrações de diferentes grupos funcionais.

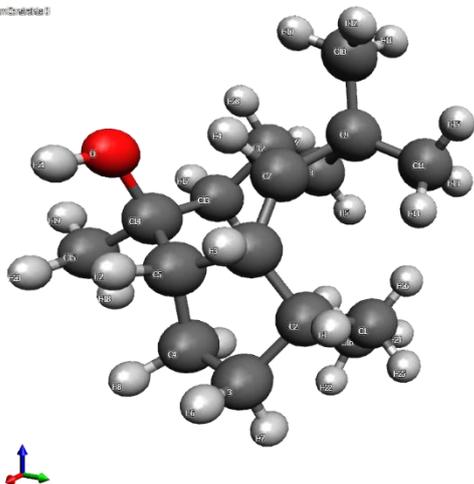
5.7. DFT - DENSITY FUNCTIONAL THEORY

A figura 24 compila a geometria das moléculas otimizadas com o *software* Avogadro. Estão dispostas duas vistas para melhor visualização da estrutura molecular. As coordenadas se encontram no Anexo 9 em diante.

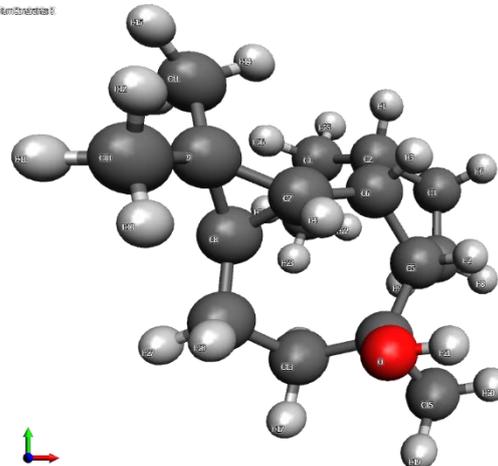
Figura 24: Moléculas otimizadas, terpenos presentes no óleo essencial de *M. azurea*

Viridiflorol

Atômico 3 = 20220, Vírtel 08 = 0
Nomenclatura 0

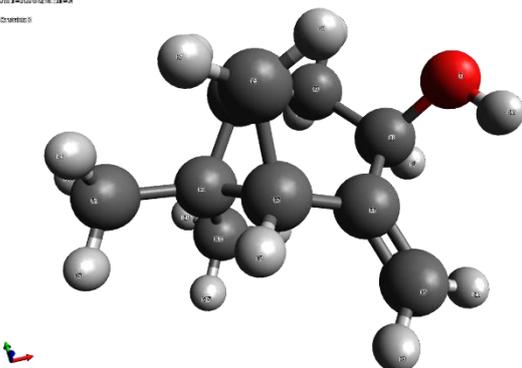


Atômico 3 = 20220, Vírtel 08 = 0
Nomenclatura 0

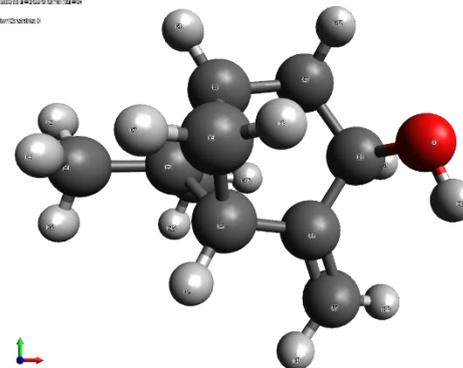


Trans-pinocarveol

Atômico 3 = 40240, Vírtel 08 = 0
Nomenclatura 0

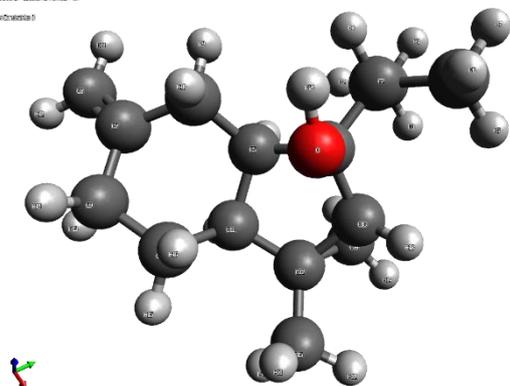


Atômico 3 = 40240, Vírtel 08 = 0
Nomenclatura 0

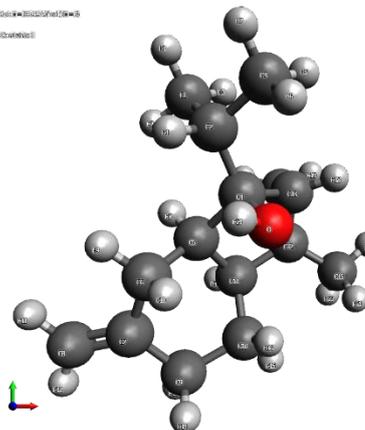


β -Copaen-4- α -ol

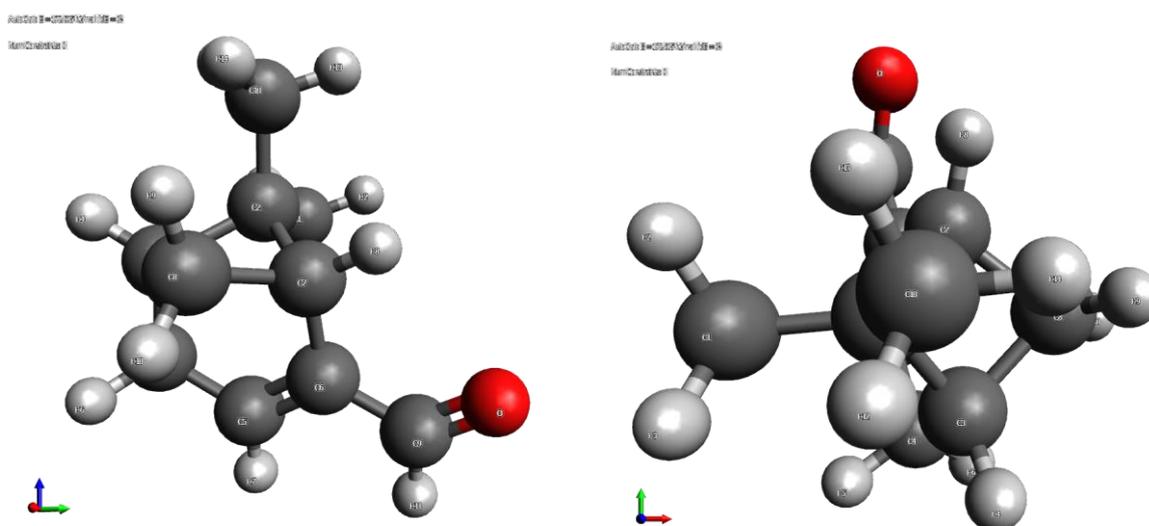
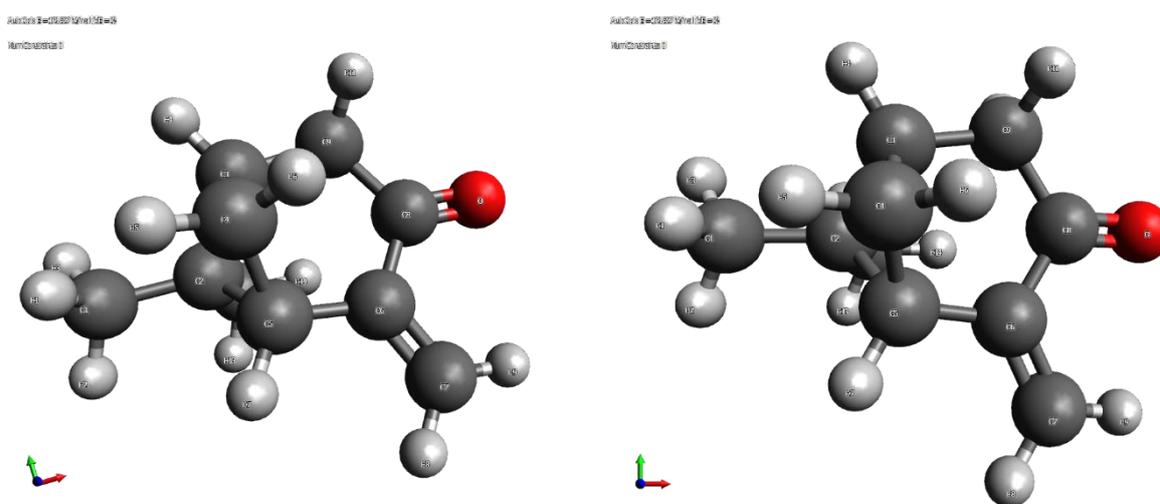
Atômico 3 = 20240, Vírtel 08 = 0
Nomenclatura 0



Atômico 3 = 20240, Vírtel 08 = 0
Nomenclatura 0



À esquerda a vista centralizada, onde se observa a simetria. À direita a molécula alinhada aos eixos.

Figura 24 - Continuação**Mirtenal****Pinocarvone**

Moléculas otimizadas no software Avogadro para o campo de força MMF94s.

Estudos dos componentes dos óleos essenciais utilizando métodos experimentais e teóricos desempenham um papel importante na compreensão de seus impactos e potenciais utilizações. O orbital molecular mais ocupado e o orbital molecular desocupado mais baixo são os principais orbitais envolvidos na estabilidade química (Akman et al., 2023).

Foram calculados o Gap HOMO-LUMO, o potencial químico, a eletronegatividade, dureza e suavidade global, índice de eletrofilicidade, potencial de ionização, índice de

nucleofilicidade, afinidade eletrônica, índice de transferência de carga máxima e o potencial de redução compilados na tabela 7. Em seguida a tabela 8 com a representação visual da densidade energética dos orbitais de fronteira.

Tabela 7: Descritores quânticos para as moléculas mais abundantes no óleo essencial de *M. azurea*

Descritor	Viridiflorol	<i>trans</i> - Pinocarveol	β -Copaen-4- α -ol	Mirtenal	Pinocarvona
Gap _{HOMO-LUMO} (ΔE)	6,566	6,507	6,245	5,228	5,05
Potencial Químico (μ)	-3,53	-3,5985	-3,4205	-4,377	-4,272
Eletronegatividade (χ)	3,53	3,5985	3,4205	4,377	4,272
Dureza Global (η)	3,283	3,2535	3,1225	2,614	2,525
Suavidade Global (S)	0,152	0,154	0,1602	0,191	0,198
Índice de Eletrofilicidade (ω)	1,897	1,990	1,873	3,667	3,614
Potencial de Ionização (IP)	6,813	6,852	6,543	6,991	6,797
Ind. de Nuc ^a .	-6,566	-6,507	-6,245	-5,228	-5,050
Afinidade Eletrônica (EA)	0,247	0,345	0,298	1,763	1,747
Índice de Transferência de Carga Máxima (ΔN_{max})	-1,075	-1,106	-1,096	-1,674	-1,692
Potencial de Redução	-0,247	-0,345	-0,298	-1,763	-1,747

Valores descritos em eletro volts (eV).

Os lóbulos dos orbitais de fronteira (HOMO e LUMO) podem ser interpretados em termos de cor, tamanho e posição. As cores indicam a fase do orbital, que representa o sinal da função de onda em diferentes regiões, não confundir com carga elétrica. Geralmente, duas cores contrastantes, como no caso o azul e o roxo, são usadas para mostrar as fases opostas. Interações entre regiões da mesma cor entre moléculas resultam em interferência construtiva, enquanto cores opostas indicam interferência destrutiva. A fase é crucial para determinar o tipo de interação que ocorre durante a formação de ligações, como ligantes ou antiligantes (Li et al., 2010; Baghernejad et al., 2020).

O tamanho dos lóbulos dos orbitais de fronteira indica a densidade eletrônica em uma determinada região da molécula; lóbulos maiores correspondem a uma maior probabilidade de encontrar elétrons ali. No HOMO, isso significa uma maior tendência de doar elétrons, enquanto no LUMO, lóbulos maiores indicam áreas mais propensas a aceitar elétrons (Mahalakshmia; Balachandran, 2015).

Tabela 8: Representação dos orbitais de fronteira de moléculas mais abundantes no óleo essencial de *M. azurea*

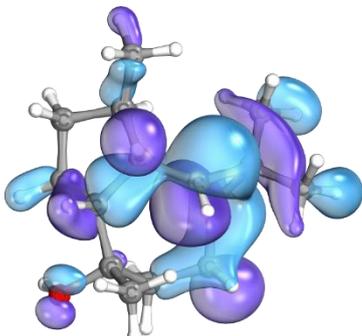
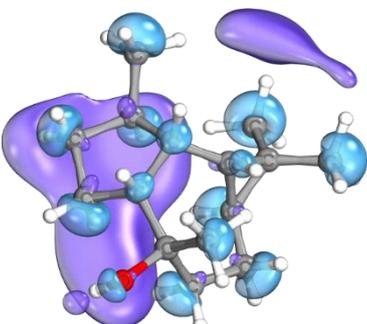
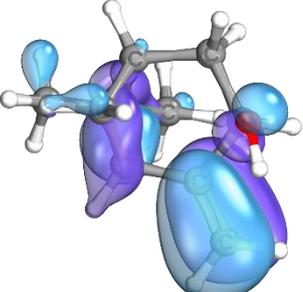
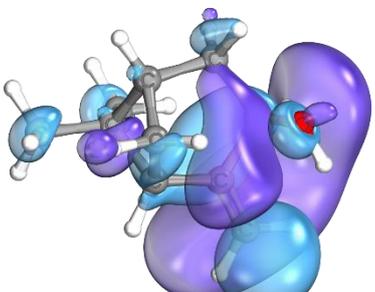
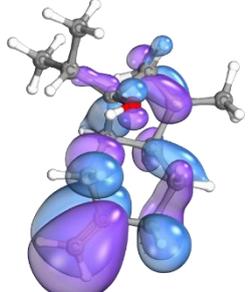
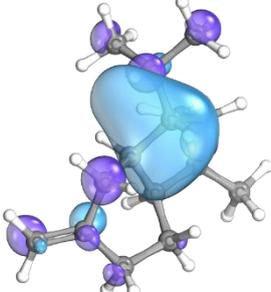
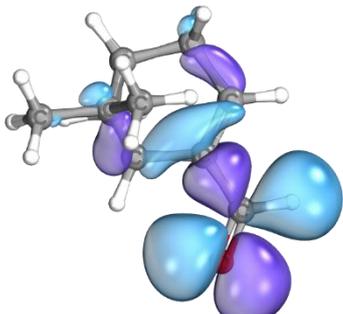
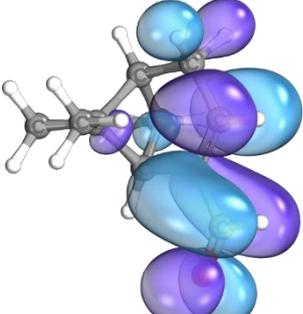
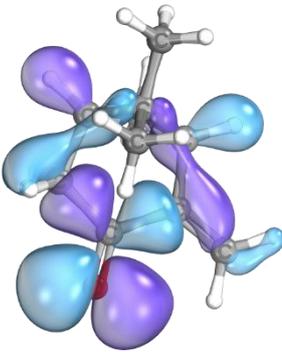
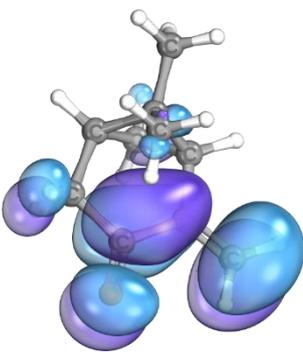
Molécula	HOMO	LUMO	ΔE
Viridiflorol (C ₁₅ H ₂₆ O)	 -6,813 eV	 -0,247 eV	6,566 eV
<i>Trans</i> - pinocarveol (C ₁₀ H ₁₆ O)	 -6,852 eV	 -0,345 eV	6,507 eV
β -Copaen-4- α -ol (C ₁₅ H ₂₄ O)	 -6,543 eV	 -0,298 eV	6,245 eV
Myrtenal (C ₁₀ H ₁₄ O)	 -6,991 eV	 -1,763 eV	5,228 eV

Tabela 8 – Continuação

Molécula	HOMO	LUMO	GAP ΔE
Pinocarvone (C ₁₀ H ₁₄ O)	 -6,797 eV	 -1,747 eV	5,050 eV

Os lóbulos na cor azul indicam a função de onda positiva e na cor roxa a negativa.
Orbitais moleculares gerados com o software IboView.

A densidade eletrônica, portanto, está diretamente relacionada à reatividade da molécula, com regiões densas no HOMO ou acessíveis no LUMO sendo mais reativas. Já a posição dos lóbulos revela os átomos ou grupos funcionais envolvidos nas interações. Para o HOMO, isso destaca as partes nucleofílicas da molécula, e, para o LUMO, as partes eletrofílicas. O maior HOMO foi identificado no β -Copaen-4- α -ol (-6,543 eV) e o menor LUMO corresponde ao *trans*-pinocarveol (-0,345 eV).

Compreender a posição dos lóbulos é essencial para prever a reatividade química, identificando áreas mais suscetíveis a doações ou recebimentos de elétrons, e, portanto, a ligações covalentes e interações moleculares em geral. Ao se comparar a densidade energética do HOMO entre o mirtenal e o β -Copaen-4- α -ol em seus respectivos grupos funcionais se observa uma maior distribuição na região do aldeído do que do álcool, o que implica em maior reatividade por parte do mirtenal em reações onde se doa o elétron, além da presença da ligação dupla no aldeído que o torna mais suscetível a novas ligações.

A energia de fronteira molecular, ou "Gap HOMO-LUMO", é a diferença de energia entre o orbital molecular mais ocupado (HOMO) e o orbital molecular mais baixo desocupado (LUMO). Um menor valor para esse *gap* geralmente indica maior reatividade química, pois uma menor diferença de energia entre esses orbitais facilita a transição eletrônica, tornando a molécula mais reativa. O viridiflorol, o *trans*-pinocarveol e o β -copaen-4- α -ol são as moléculas que apresentam mais estabilidade dentre os terpenos selecionados com base nos valores do gap HOMO-LUMO descritos na tabela 7, enquanto que a pinocarvona é o mais reativo com gap de 5,05 eV. Um valor mais elevado de HOMO (energia mais alta) sugere que a molécula é uma

boa doadora de elétrons, porque seus elétrons de valência estão em um nível de energia relativamente alto, o que facilita a doação. (Kumar et al., 2010; Akman et al., 2023).

Hu et al. (2010) afirmam que o HOMO de sesquiterpenos interage com o LUMO de ozônio em reações de ozonólise, também descobriram que os índices descritores de DFT no nível B3LYP tem correlação fraca com o grau de insaturação das moléculas. Em reações de oxidação, Sneha et al. (2021) afirmam que quanto menor for a energia do gap molecular melhor é para a reação de antioxidantes.

É importante notar que a "capacidade de ligação" não é apenas uma função das energias de HOMO e LUMO, outros fatores como a geometria molecular e a natureza dos orbitais envolvidos na interação também desempenham um papel importante na reatividade e na formação de ligações químicas (Haaland et al., 2004; Basha et al., 2021). Quando o gap molecular diminui ocorre o aumento da reatividade e da instabilidade da molécula (Patil; Canoo, 2020).

A afinidade eletrônica e a energia de ionização podem ser relacionadas aos orbitais LUMO e HOMO, essa relação não é sempre linear ou direta em todos os contextos moleculares. A afinidade eletrônica é a energia liberada quando uma molécula captura um elétron. A energia de ionização é a quantidade necessária para remover um elétron de uma molécula no estado gasoso, e menores valores sugerem que a molécula pode doar um elétron mais facilmente. Quanto menor a energia de ionização mais fácil é a abstração de elétron (Sneha et al., 2021). Para esses dois descritores a maior energia foi encontrada no mirtenal. O β -Copaen-4- α -ol apresentou a menor energia de ionização com 6,543 eV e o maior resultado foi para o mirtenal com 6,991 eV.

A eletronegatividade tem uma relação direta com a eletrofilicidade, enquanto a nucleofilicidade demonstra uma relação inversa com ela (Tandon et al., 2020). A eletronegatividade também é um conceito que depende de múltiplos fatores, incluindo a estrutura eletrônica, configuração de orbitais do átomo ou molécula e a pressão (Dong et al., 2022). Para este descritor os maiores valores foram do mirtenal (4,377 eV) da pinocarvona (4,272 eV).

Valores pequenos do índice eletrofilicidade global mostram bons nucleófilos e valores mais altos mostram bons eletrófilos. Quando o potencial químico (μ) for maior e o índice de eletrofilicidade (ω) for menor pode-se dizer que a molécula possui ação nucleofílica. Quando ocorre o contrário, ou seja, quando o potencial químico é menor e o índice de eletrofilicidade é

maior, a molécula tende a ter uma ação eletrofílica. O menor potencial químico indica que a molécula tem uma menor tendência a doar elétrons, o que significa que ela está menos disposta a perder elétrons e, portanto, é menos nucleofílica e mais eletrofílica. Um maior índice de eletrofilicidade sugere que a molécula tem uma maior tendência a aceitar elétrons, o que é uma característica dos eletrófilos, espécies que aceitam pares de elétrons para formar novas ligações. Nesse sentido todos os terpenos modelados podem ser considerados eletrofílicos (tabela 7). Os valores do índice de transferência de carga máxima têm baixos resultados, isso implica que a molécula tem uma capacidade limitada de doar ou aceitar elétrons. Esse descritor sugere que a molécula será um nucleófilo ou eletrófilo mais fraco, resultando em menor reatividade em reações que envolvem transferência de carga (Serdaroğlu; Elik, 2017; Costa et al., 2020; Chérif et al., 2023).

5.8. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

O percentual de inibição por DPPH do óleo essencial aumentou proporcionalmente com a concentração e a partir do R^2 pode-se afirmar que a redução ocorre de forma dependente e de natureza linear. O maior percentual foi observado na concentração de 300 $\mu\text{L/mL}$ com 62,60% e o IC_{50} calculado a partir da equação da reta foi de 225,41 $\mu\text{L/mL}$. A seguir a tabela 8 com as diferentes concentrações e o gráfico 8 plotado com esses dados.

Figura 25: Atividade antioxidante de *M.azurea* em DPPH

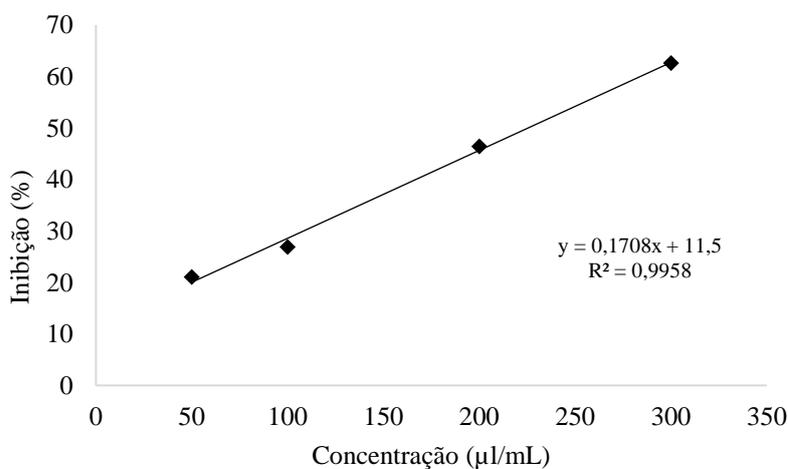


Tabela 8: Percentual de inibição do óleo essencial de *M. azurea*

Concentração ($\mu\text{L}/\text{mL}$)	Percentual de Inibição
50	21,0757 \pm 0,62
100	26,8918 \pm 2,39
200	46,4353 \pm 2,08
300	62,6016 \pm 2,03

Os radicais livres contêm um ou mais elétrons não pareados na camada de valência conferindo a eles instabilidade, menor tempo de vida e espécies altamente reativas. São formados a partir do contato com matéria exógena que emite radiação, poluentes, drogas, cosméticos e outros. No sistema do corpo humano atuam como reguladores da homeostase (Nakai; Tsuruta, 2021). Eles possuem papel duplo nos sistemas vivos pois podem ser tóxicos para produtos do metabolismo aeróbico. Causam danos oxidativo e disfunção dos tecidos que pode levar a formação de tumores e doenças relacionadas à senescência. Em contrapartida, participam da sinalização celular ativando respostas benéficas ao estresse (Di Meo; Venditti, 2020; Sadiq, 2023).

O solvente utilizado neste trabalho foi o metanol, uma substância polar, Borgohain et al. (2015) concluíram que com base na teoria de densidade funcional que a polaridade desse tipo de meio diminui a energia de dissociação de ligação de O-H, sugerindo que a redução ocorre por conta da transferência de átomo de hidrogênio. No entanto, alguns pesquisadores como Khodaei et al. (2021), assumem que esse processo ocorre por transferência de um único elétron de hidrogênio. De acordo com Borgohain et al. (2015), os dois processos são possíveis porque o aumento da polaridade no meio reduz os valores do potencial de ionização vertical (IP_v), favorecendo a transferência de elétron de hidrogênio.

O óleo essencial da espécie *M. azurea* usado na nossa pesquisa tem pouca atividade antioxidante mesmo em altas concentrações, o que ficou evidente pelo fato de a solução não ter mudado para amarelo, permanecendo em uma tonalidade de violeta mais clara do que no início do experimento. Reddy et al. (2012) também executaram o ensaio de DPPH solubilizado em metanol com a mesma espécie e obtiveram excelentes resultados. A maior concentração, 1 mg/mL, obteve capacidade sequestradora de 90 % e IC₅₀ de 88,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. No entanto, esse óleo essencial foi obtido através de métodos diferentes como moer o material vegetal até um estado pastoso, extrair o óleo através de destilação a vapor separação utilizando éter dietil, em vez de hidrodestilação convencional.

As atividades antioxidantes claramente dependem da composição, especialmente da concentração de componentes fenólicos, que podem quebrar a cadeia de atividade antioxidante (Amorati; Valgimigli, 2018; Khodaei et al., 2021). A presença de álcoois terciários como o β -copaen-4a-ol, *trans*-pinocarveol e viridiflorol diminuem a capacidade redutora da solução. Fatores bióticos como o substrato onde os terpenos são sintetizados, o tipo de reação enzimática envolvida na biossíntese e a topografia subcelular também influenciam na expressão fenotípica da planta, além da influência de fatores abióticos peculiares de cada sítio geográfico (Zhou; Pichersky, 2020).

Khodaei et al. (2021) analisaram o óleo essencial de 32 espécies vegetais e utilizaram a técnica de PCA (*Principal Analysis Components*) para agrupamento com base na capacidade antioxidante por DPPH e correlacionar com os constituintes químicos. Os resultados mostraram que os compostos fenólicos têm grande peso explicativo para menores valores de IC₅₀ e destacaram o leve efeito sinérgico positivo entre fenóis e álcoois. Os autores também realizaram a metodologia de superfície de resposta para gerar um modelo preditivo tendo como variável resposta o IC₅₀ de DPPH, e para esses dados, os aldeídos obtiveram um peso pequeno de subtração do intercepto seguido de álcoois, fenóis e sesquiterpeno. Esses dados sugerem que aldeídos, como o mirtenal, podem ter pouca reatividade com o DPPH. Ainda que esses tipos de análises estatísticas sejam boas ferramentas dentro das ciências exatas, agrupar grupos funcionais sem levar em consideração as suas estruturas químicas e os processos de reações podem subestimar o modelo e sua interpretação.

Além dos pontos discutidos, a metodologia de extração também pode interferir nos resultados de oxidação. Manzur et al. (2023) analisaram a atividade antioxidante e antibactericida do óleo essencial de *Citrus sinensis* obtido através do método de prensagem a frio e prensagem a frio seguido de hidrodestilação e ambos apresentaram capacidade de reduzir metais e, em particular, a prensagem a frio neutralizou radicais livres e concluíram que óleo pode ter aplicabilidade na prevenção e contaminação de patógenos com potencial para a produção de biofilmes na preservação de produtos alimentícios.

O mirtenal (aldeído), o composto majoritário do óleo essencial tanto da parte aérea total quanto das folhas isoladas das plantas mais jovens, e segundo maior composto a partir do segundo ciclo de corte de *M. azurea*, é reportado na literatura como forte antioxidante. Hari Babu et al. (2012) encontraram forte capacidade sequestradora de hidroxilas, ânions superóxido e óxido nítrico de forma dependente.

O viridiflorol é uma molécula que isoladamente possui capacidade de sequestro de DPPH. Trevizan et al. (2016) encontram IC₅₀ de 74,7 µg/mL para o viridiflorol e para o ácido ascórbico de 21, 66 µg/mL. Quando se compara os valores dos orbitais de fronteira dessas duas moléculas se observa que o valor do HOMO do viridiflorol é maior do que do ácido ascórbico com respectivos -6,813 eV e -9.22 eV. Os respectivos gap dos orbitais são 6,566 eV e 8,82 eV (Chugaeva et al., 2023). O HOMO com mais energia permite maior facilidade em doar elétrons e estabilizar o DPPH. Os valores de gap energético sugerem que o ácido ascórbico seja menos reativo que o viridiflorol. A resposta para esse comportamento pode estar na complementariedade entre os funcionais dos orbitais das moléculas envolvidas, provavelmente ocorre mais interações destrutivas do que destrutivas entre o viridiflorol e o DPPH do que entre o ácido ascórbico, além disso, as reações também são governadas por efeitos estéricos. O fato de o viridiflorol ser um álcool terciário implica que pelo menos o mecanismo de HAT é menos provável de acontecer e dificilmente a reação poderia ter aumento na redução decorrente de produtos de auto oxidação.

Xinhui et al. (2023) estudaram o efeito antioxidante de produtos da reação de Maillard (MRPs) com a adição de aldeídos alifáticos saturados, monoinsaturados e poli-insaturados e avaliaram algumas propriedades organolépticas. Os autores observaram que para todos os grupos de MRPs, a capacidade sequestradora do DPPH teve correlação negativa com o grau de insaturação do aldeído. Esse pode ser outro fator que contribuiu para o baixo poder antioxidante do óleo essencial de *M. azurea*.

É válido mencionar que o mecanismo de reação entre antioxidantes fenólicos e radicais peroxila foi historicamente considerado como um mecanismo de transferência de átomo de hidrogênio, mas nas últimas décadas foi descoberta também a possibilidade de ocorrer a transferência de elétrons acoplada a prótons, e compostos com grupo funcional aldeído podem neutralizar radicais peroxila de forma semelhante (Olszowy; Dawidowicz, 2016).

Apesar de se esperar uma correlação entre a estrutura e a capacidade antioxidante, na prática pode não acontecer assim, pois além da presença dos radicais antioxidantes a posição desse grupo na molécula pode conferir diferentes configurações eletrônicas que podem favorecer ou não a doação de elétrons. Contudo, Zhu et al. (2023) ao submeter uma lignina à demetilação, com o intuito de produzir mais grupos hidroxilas ligadas aos anéis fenólicos, observaram que o aumento da concentração de conteúdo fenólico diminuiu o valor de IC₅₀, embora essa resposta não seja de natureza linear. O óleo essencial de *M. azurea* apresenta baixa

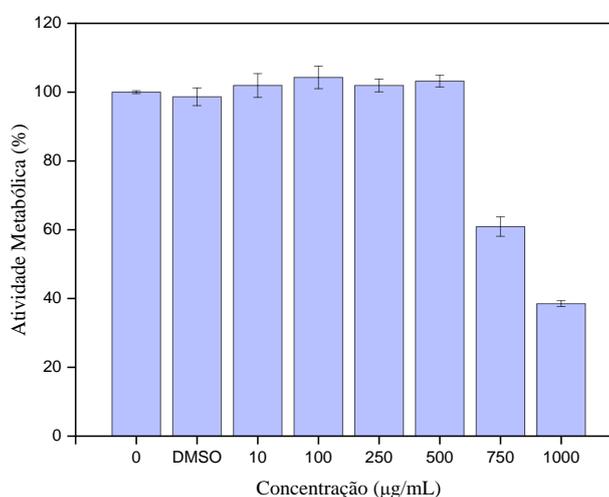
intensidade na banda característica do grupo OH fenólico no FTIR e esse pode ser outro indicativo da baixa atividade antioxidante.

Embora o método DPPH seja amplamente utilizado na pesquisa, ele por si só não é suficiente para afirmar se um extrato vegetal é de fato antioxidante ou não, pois uma de suas limitações é a ausência de substrato oxidante e quando se pensa na aplicação dentro de sistemas biológicos esse método pode ser subestimado por não abranger os mecanismos de redução e oxidação mediados por enzimas (Baschieri; Amorati., 2021).

5.9. ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

O ensaio de citotoxicidade foi feito com linhagem celular de fibroblastos L929 de camundongos com o controle positivo DMSO e os resultados mostraram que a viabilidade celular ocorreu até a concentração de 500 $\mu\text{g/mL}$ do óleo essencial de *M. azurea* como apresentado no gráfico da figura 26. Até essa concentração há um leve aumento na atividade metabólica o que pode ser uma resposta compensatória a citotoxicidade causada por terpenos mais reativos, porém presentes em pequenas quantidades. Com o aumento da concentração há uma queda abrupta na atividade metabólica. Yap et al. (2021) afirmam que a toxicidade pode acontecer por conta de monoterpenos através de dano na membrana plasmática, estresse oxidativo por conta do aumento de ROS e da peroxidação lipídica e seus produtos.

Figura 26: Ensaio de citotoxicidade em células L929



A análise de variância ANOVA-*OneWay* (tabela 9) mostra que o R^2 foi de 0,98 constatando que o modelo foi capaz de capturar a variabilidade dos dados pelos fatores analisados de forma muito satisfatória. O valor de $F = 111,4576$ comparado um p-valor extremamente pequeno ($2,26 \times 10^{-12}$) sugere que o efeito do fator ou das variáveis independentes no modelo é altamente significativo. Isso indica que a variabilidade explicada pelo modelo é muito maior do que a variabilidade não explicada (erro), sugerindo que o modelo tem um bom ajuste e que as diferenças entre os grupos são altamente significativas a 95% de confiabilidade (Fávero; Belfiore, 2017).

Tabela 9: ANOVA dos tratamentos para o ensaio de citotoxicidade

Fonte de Variação	GL	SQ	QM	F Value	Prob>F	R ²	Coef. Var
Modelo	7	12964,85923	1852,12275	111,4576	2,26E-12	0,98	0,046
Erro	16	265,87656	16,61729				
Total	23	13230,73579					

GL = graus de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; QM = quadrado médio.

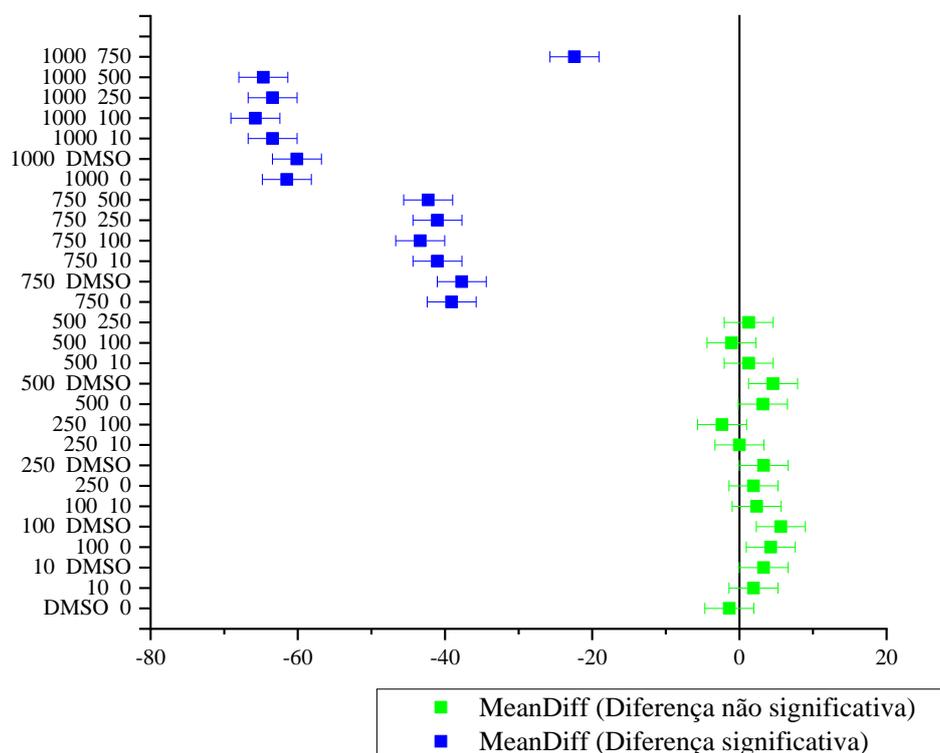
No gráfico da figura 27 estão representadas essas diferenças estatísticas a partir do resultado do teste Tukey. Cada linha no eixo vertical representa uma comparação entre dois grupos. Os nomes dos grupos aparecem listados, e os pares que foram comparados são indicados horizontalmente. O eixo horizontal mostra a diferença das médias dos grupos comparados. O valor central de cada barra indica a diferença entre as médias dos dois grupos, e as barras horizontais ao redor indicam o intervalo de confiança para essa diferença.

Pode-se observar que não houve diferença significativa entre o controle e os tratamentos até 500 $\mu\text{g/mL}$. As concentrações mais altas de 750 $\mu\text{g/mL}$ e 100 $\mu\text{g/mL}$ e apresentaram diferenças estatísticas significativa entre si e houve a diminuição da atividade metabólica em média para 60,89% ($2,83 \pm$) e 38,50% ($0,85 \pm$) respectivamente.

De acordo com a ISO 10993-5:2009 (2009), o valor mínimo da viabilidade celular para as células de L929 é de 70%, portanto a partir disso se estabeleceu que a concentração utilizada para o ensaio de proteção celular frente ao peróxido de hidrogênio seria de 500 $\mu\text{g/mL}$.

O óleo essencial de *M. azurea* apresentou resultados satisfatórios quando comparado com outras espécies. Por exemplo, Marinas et al. (2021) constaram citotoxicidade acima de 300 $\mu\text{g/mL}$ para o óleo essencial de frutas de *Amorpha fruticosa*, que também é rico em sesquiterpeno e tem como compostos majoritários isômeros de cadineno e muuroleno.

Figura 27: *Post-hoc* – Teste Tukey (L929)



Teste Tukey das médias da citotoxicidade do óleo essencial de *M. azurea*. No eixo y se encontra a comparação dos tratamentos expressos em µg/mL.

Silva (2022) reportou efeito citotóxico elevado na mesma linhagem de célula com α -pineno, β -pineno, γ -terpineno e terpinen-4 ol com os respectivos valores de inibição celular: 97%, 72%, 40% e 15%. Esses quatro terpenos representam quase 10% da composição do óleo essencial, o que indica que as moléculas mais estáveis como o β -copaen-4 α -ol podem interferir na cinética da reação de forma positiva para a proteção celular, já que a perda de viabilidade só é detectada a partir de concentrações muito elevadas, aumentando a probabilidade de contato entre os sítios ativos dessas moléculas citotóxicas.

Ding et al. (2024) estudaram a citotoxicidade de *Hedychium flavum* em várias linhagens celulares incluindo a L929 e compararam o efeito em relação a origem do material de extração: as folhas e o talo. O óleo essencial das folhas apresentou IC₅₀ de 182,22 µg/mL sendo mais tóxico que o do talo com IC₅₀ de 294,49 µg/mL. Os resultados da cromatografia apontam redução em torno da metade de α -pineno e β -pineno e um aumento na porcentagem de eucaliptol. O eucaliptol é um composto que isoladamente não é citotóxico em L929, isso foi constatado no trabalho de Pereira (2023) que também analisou seis espécies de óleo essencial, obtendo os melhores resultados de viabilidade celular para *Citrus paradisi* e *Citrus limon*,

ambos ricos em D-limoneno e γ -terpineno, que são encontrados em menores concentrações no óleo essencial de *M. azurea*.

Greay et al. (2010) analisaram a atividade metabólica de *Melaleuca alternifolia* e terpinen-4-ol, seu princípio ativo majoritário e encontrado também no óleo essencial de *M. azurea* (4,75%). O resultado com MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) mostrou que o óleo essencial puro teve IC₅₀ de 0,1% em células L929, essa porcentagem é em referência ao controle. Os valores de IC₅₀ menores em células de fibroblastos após 48 horas indicam que tanto o óleo essencial quanto o terpinen-4-ol se tornam um pouco mais eficazes com o tempo. Em relação ao terpeno isolado os resultados foram obtidos após 48 horas e teve IC₅₀ de 0,15%, sendo menos nocivo que o óleo essencial bruto (0,09%) dentro das mesmas condições experimentais. No entanto, Kamiya et al. (2024) afirmam que mais estudos precisam ser feitos para esclarecer a citotoxicidade do terpinen-4-ol, embora seja considerado de baixa ou nenhuma citotoxicidade em linhagens de células saudáveis.

O p-cimeno, uma molécula presente em menores porcentagens no óleo essencial de *M. azurea*, é reportado na literatura como não tóxico em L929, 100 $\mu\text{g/mL}$ diminui a atividade metabólica em média de 87,1%, assim como o mentol que reduz 81%. 3-carene e carvacrol apresentam alta toxicidade com respectivos 48,7% e 46,1% da atividade celular. O linalol, isoborneol, 1,8-cineol, eugenol e carvona apresentam toxicidade moderada com viabilidade entre 30% e 50% (Silva et al., 2017).

Silva (2022) reportou efeito citotóxico elevado na mesma linhagem de célula com α -pineno, β -pineno, γ -terpineno e terpinen-4 ol com os respectivos valores de inibição celular: 97%, 72% , 40% e 15%. Esses quatro terpenos representam quase 10% da composição do óleo essencial, o que indica que as moléculas mais estáveis como o β -copaen-4 α -ol podem interferir na cinética da reação de forma positiva para a integridade celular, já que a perda de viabilidade só é detectada a partir de concentrações muito elevadas quando há aumento na probabilidade de contato entre os sítios reativos dessas moléculas citotóxicas bem como o possível acúmulo de produtos da oxidação. Janani et al. (2024) utilizaram uma metodologia diferente para avaliar os efeitos negativos do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*) em L929, os colegas avaliaram a integridade da membrana celular a partir da quantificação de lactato desidrogenase, onde a maior quantidade dessa enzima reflete em maior dano na membrana, e para as concentrações de 100 $\mu\text{g/mL}$ e 200 $\mu\text{g/mL}$ esse parâmetro foi significativo quando comparado ao controle negativo. Os autores também reportaram viabilidade celular abaixo de 80% em concentrações acima de 100 $\mu\text{g/mL}$.

5.10. PROTEÇÃO CELULAR

A concentração de 500 µg/mL de óleo essencial de *M. azurea* apresentou proteção de 85 % em células L929, sendo um contraste da diminuição da atividade metabólica com o peróxido de hidrogênio. O gráfico na figura 28 mostra a atividade metabólica das células frente aos tratamentos.

Figura 28: Proteção citológica - *M. azurea*

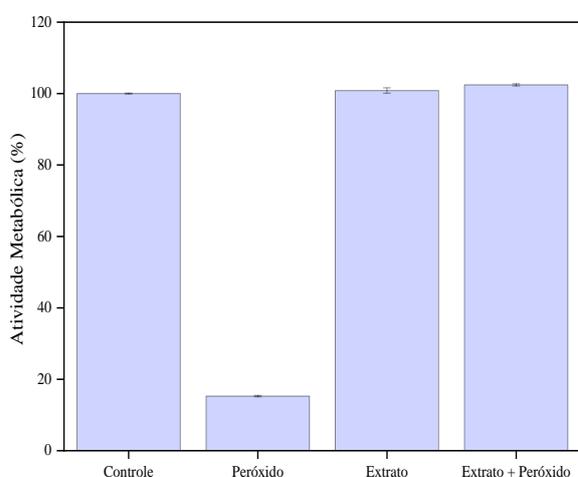
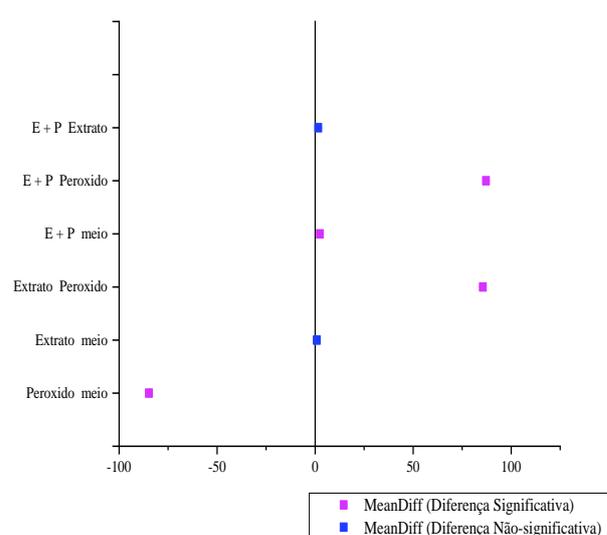


Figura 29: Post-hoc – Teste Tukey (Proteção Celular)



Abaixo se encontra a tabela 10 com o resultado da ANOVA-*OneWay*, onde o R^2 de 0,991 indica ótimo ajuste do modelo e a comparação entre os valores de F mostram que há diferença significativa em pelo menos um dos tratamentos. O resultado do teste Tukey apresentado na figura 28 mostra que não houve diferença estatisticamente significativa entre o controle e o extrato (óleo essencial) isolado, ou seja, na concentração utilizada não houve citotoxicidade nem pela degradação da membrana e nem por ativação de mecanismos de morte celular. O efeito de proteção é evidenciado quando se inclui o peróxido de hidrogênio ao extrato (P +E), uma ROS que causa a peroxidação lipídica, e se constata que não há diferença estatisticamente significativa entre desse tratamento com o uso isolado do extrato. O peróxido de hidrogênio isolado reduziu para menos de 20% a atividade metabólica.

O óleo essencial da *M. azurea* é rico em mono e sesquiterpenos, e para essa análise foi utilizado o oriundo da extração do primeiro ciclo de corte em meados de abril/ 2023 e apresenta maior porcentagem de mirtenal. Além disso, é rico em álcoois, alcenos, aldeídos, cetonas e hidrocarbonetos.

Tabela 10: ANOVA dos tratamentos para o ensaio de proteção celular

Fonte de Variação	GL	Soma dos Quadrados	Quadrado Médio	F Calculado	Prob>F	R ²	Coef. Var.
Tratamento	3	22121,28	7373,7590	10576,5234	1.11×10 ⁻¹⁶	0,9997	0,0105
Erro	12	8,36618	0,6972				
Total	15	22129,64					

GL = graus de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; QM = quadrado médio.

Como visto com os resultados do DFT, as moléculas em maior quantidade no óleo essencial como o mirtenal, β -copaen-4 α -ol, viridiflorol e *trans*-pinocarveol apresentam baixa reatividade por terem o gap energético dos orbitais de fronteira considerado alto dentro dessa classe de compostos.

No entanto, parte significativa dos componentes do óleo essencial de *M. azurea* é formada por álcoois terciários e nesse caso a natureza nucleofílica da molécula não seria o suficiente para justificar a oxidação com o peróxido de hidrogênio, pois eles não apresentam hidrogênio disponível para a reação. A baixa reatividade ajuda a proteger a célula pois diminui a probabilidade de reações paralelas entre os produtos da reação de oxidação como ácidos carboxílicos e cetonas com os compostos fracionários. Popov et al. (2010) avaliaram a cinética da oxidação de peróxido de hidrogênio na presença de álcoois dos três tipos por fotólise. As concentrações de peróxido de hidrogênio, oxigênio, metanol, etanol e butanol terciário foram monitoradas em função do tempo. A cinética consistiu em um consumo inicial rápido de oxigênio seguido por uma aceleração significativa da foto decomposição do peróxido de hidrogênio. A fase de aceleração foi identificada como sendo a origem da rápida resposta da reação entre o peróxido de hidrogênio e os radicais com carbono central resultado da abstração atômica do hidrogênio de álcoois primários. Os radicais formados na solução com álcool terciário são mais estáveis e não reagem diretamente com o peróxido de hidrogênio e conseqüentemente a fase de aceleração de fotólise não é significativa, o que corrobora com a hipótese de que parte significativa da proteção celular do óleo essencial de *M. azurea* seja por efeitos estéricos.

É provável que a proteção citológica seja explicada também a partir da oxidação de aldeídos como o mirtenal, alcenos como β -pineno e álcoois secundários como terpinen-4-ol e pinocarveol com seus respectivos isômeros. Segundo Hari Babu et al. (2012), o mirtenal tem a capacidade de sequestrar moléculas reativas de OH e ânions de superóxido nos respectivos IC₅₀: 25,52 μ g/mL e 28,51 μ g/mL. Muilu-Mäkelä et al. (2022), estudaram o efeito de proteção contra oxidação utilizando os seguintes monoterpenos: α -pineno, β -pineno (presentes no óleo de *M.*

azurea), R-limoneno, S- limoneno e 3-carene. Os monoterpenos tiveram uma baixa atividade de neutralização do peróxido de hidrogênio, sem a capacidade de proteger do estresse oxidativo em cultura de células HCE, que apresenta 90% de perda de viabilidade nesse processo.

5.11. ATIVIDADE ANTITUMORAL

Como mencionado anteriormente, o câncer é uma doença de grande preocupação na saúde pública, pois pode levar os pacientes a quadros agressivos e cujos cuidados exigem grande demanda social e financeira. Nesse sentido, os óleos essenciais têm sido investigados por serem compostos por moléculas com propriedades farmacêuticas como os terpenos e terpenoides e podem ter ação antitumoral em várias linhagens celulares, como detalhado no trabalho de revisão em Machado et al. (2022). O óleo essencial de *M. azurea* foi testado em células tumorais das linhagens A549, GL e C6. O melhor cenário é quando o óleo essencial não é citotóxico em linhagens de células saudáveis, mas age com especificidade em células tumorais. No caso, apesar de óleo essencial de *M. azurea* não ser tóxico em células L929, infelizmente ele também não diminuiu a viabilidade celular das linhagens tumorais. A seguir serão apresentados os resultados das análises individualmente e será abordado na discussão os principais mecanismos por detrás do efeito antitumoral das células testadas mediante os óleos essenciais e seus princípios ativos na literatura.

5.11.1. LINHAGEM A549 (ADENOCARCINOMA – PULMÃO)

A maior diminuição da viabilidade celular de A549 ocorreu após 72 horas onde a atividade metabólica teve valor médio de 88,93% (figura 30). Apesar de haver diferença estatística significativa como mostra o teste Tukey no gráfico da figura 31 esses valores indicam que o óleo essencial de *M. azurea* não causa citotoxicidade em A549. Inicialmente (24 horas) é observado um aumento na atividade metabólica que pode ser uma resposta ao estresse oxidativo causado por terpenos como discutido em seções anteriores. Isso pode ocorrer por conta de mecanismos inerentes à célula ou pelo estímulo positivo de moléculas como o α -pineno e β -cariofileno na expressão de fatores como Nrf2. Essa proteína atua como um regulador principal na defesa contra o estresse oxidativo, ativando a expressão de genes que codificam enzimas antioxidantes e de detoxificação. Quando ativado, Nrf2 transloca-se para o núcleo e induz a

produção de enzimas que neutralizam espécies reativas de oxigênio, ajudando a proteger as células de danos oxidativos. Muitos terpenos têm propriedades eletrofílicas que levam à dissociação do Nrf2 de sua proteína reguladora (Keap1) permitindo sua entrada no núcleo (Fakhri et al., 2020; Kim et al., 2020). Com o passar do tempo observa-se um saldo negativo provavelmente por conta do consumo dos terpenos antioxidantes e acúmulo de produtos da peroxidação lipídica, como explicado anteriormente. A seguir o gráfico 13 mostrando a atividade metabólica frente ao controle negativo e a tabela 11 com os resultados da análise de variância. O R^2 de 0,94 mostra que o modelo tem excelente capacidade explicativa das fontes de variação estudadas.

Figura 30: Atividade Metabólica de A549

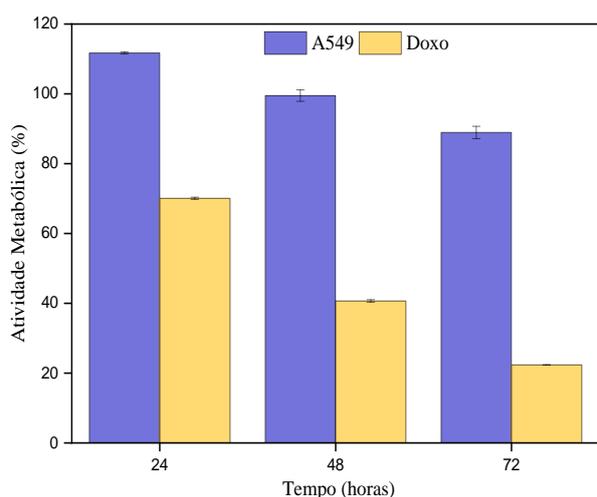


Figura 31: *Post-hoc* – Teste Tukey (A549)

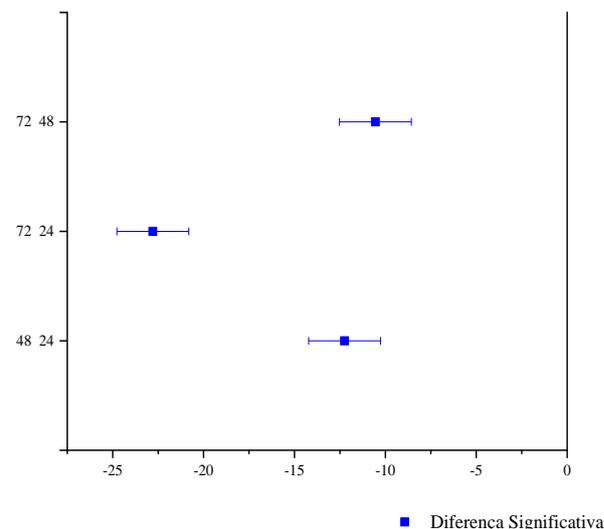


Tabela 11: ANOVA da atividade metabólica de células A549

A549	GL	SQ	QM	F Value	Prob>F	R ²	Coef. Var.
Modelo	2	1040,80529	520,40264	66,4552	4,07E-06	0,93658	0,02797
Erro	9	70,47791	7,83088				
Total	11	1111,2832					

GL = graus de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; QM = quadrado médio.

Também é reportado na literatura o efeito citotóxico de óleos essenciais ricos em α -pineno, por exemplo, Bilgic e Duran (2020) estudaram o efeito antitumoral de células A549 do óleo essencial de *Myrtus communis* L, uma espécie rica em 1,8-cineole (32%) e α -pineno (29,6%). Concentrações acima de 625 $\mu\text{g/ml}$ reduziram significativamente a viabilidade celular após incubação de 24 horas. Houve aumento considerável da expressão de caspase-3 e caspase-

9 na concentração 312,5 µg/mL. Também foi observado aumento na expressão de genes p21 enquanto que a expressão de Bcl-2 se manteve estável.

A citotoxicidade em A549 por monoterpenos pode ocorrer devido a indução da apoptose, como no caso do Hinokitiol, um monoterpenoide que aumenta a expressão de proteínas Bax, caspase-9/-3 ativada, citocromo c e p53 de forma dependente da concentração. O hinokitiol também pode reduzir a migração celular através da regulação negativa de Metaloproteinases de Matriz (MMP-9 e MMP-2) e pela regulação positiva via ação antioxidante de Catalase (CAT) e de Superóxido Dismutase (SOD) (Jayakumar et al., 2018; Silva et al., 2021). O carvacrol também é reportado como tóxico em células A549. Khan et al. (2018) utilizaram nano emulsões de carvacrol em células de adenocarcinoma que apresentaram viabilidade celular de 52,7% para a dose de 100 µg/ml. A acumulação da população sub-G1 é um marcador apoptótico conhecido em A549 e para essa variável o valor máximo foi de 40,5%. Os autores acreditam que o carvacrol aumenta a formação de ROS no meio intracelular, sendo este o principal evento que leva à apoptose. Eles observaram mudanças no potencial de membrana da mitocôndria e aumento de proteínas apoptóticas (BAX) e redução de anti-apoptóticas (Bcl2).

5.11.2. LINHAGEM GL (GLIOMA – CÉREBRO)

As linhagem de GL teve efeito ainda menos citotóxico frente ao óleo essencial de *M. azurea*, apresentando perda na viabilidade muito pequena apenas após 72 horas com média de 96,61% ± (4,11). A seguir o gráfico na figura 32 mostra a porcentagem de viabilidade celular em função do tempo. O gráfico na figura 33 ilustra o resultado do teste Tukey, onde não houve diferença estatística significativa entre as médias dos tratamentos. Na tabela 12, se encontra o resultado da ANOVA. O R² de 0,98 indica que o modelo é altamente explicativo na variação dos dados. Diferente da linhagem A549, não foi observado aumento e nem variação significativa na atividade metabólica, ou seja, o óleo teve comportamento inerte na interação com essa linhagem celular.

O glioma é um grupo extremamente heterogêneo de cânceres que surgem das células de suporte do cérebro. Essas diferenças estruturais e, em última instância, gênicas, estão por detrás da diferença de comportamento entre essa linhagem e a A549, os dados sugerem que as células de glioma tem aparatos bioquímicos mais eficientes para se proteger da citotoxicidade do óleo essencial de *M. azurea*. As células gliais estão em íntima interação com os neurônios e

são necessárias para o desenvolvimento e a manutenção das funções e estruturas cerebrais, além de fornecer neuro proteção. As pesquisas atuais estão concentradas em descobrir moléculas com baixa toxicidade que possam modular vias de sinalização biológica alteradas e principalmente atravessar a barreira hematoencefálica e melhorar a eficácia do tratamento (Abbas et al., 2020).

Dentre as três linhagens celulares estudadas neste trabalho, as células de glioma (GL) foram as que mais apresentaram resistência à doxorrubicina, em torno de 10% a mais de viabilidade celular após 72 horas, sendo uma evidência de um possível mecanismo antioxidante e anti-apoptótico mais eficiente nessa linhagem.

Figura 32: Citotoxicidade em células GL

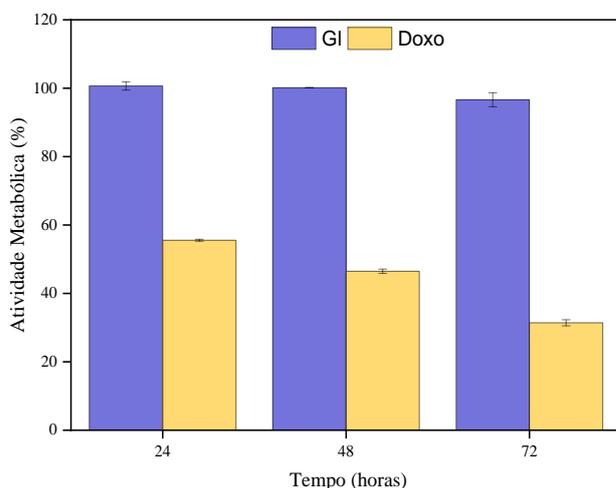


Figura 33: Post-hoc – Teste Tukey (GL)

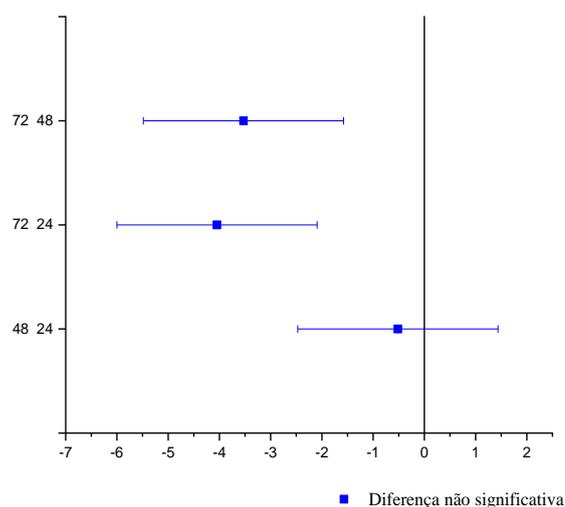


Tabela 12: ANOVA da atividade metabólica de células GL

GL*	GL	SQ	QM	F Value	Prob>F	R ²	Coef. Var.
Modelo	2	1188,43013	594,21507	354,51215	2,7635E-9	0,98747	0,02912
Erro	9	15,08534	1,67615				
Total	11	1203,51547					

*Glioma; GL = graus de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; QM = quadrado médio.

5.11.3. LINHAGEM C6 – CÂNCER NO CÉREBRO'

A linhagem celular C6 não apresentou decréscimo na viabilidade celular suficiente com o tratamento do óleo essencial de *M. azurea* para considerá-lo um agente antitumoral. Após 48 horas houve a inibição de aproximadamente 14% e não houve diferença estatisticamente

significativa quando se compara a atividade metabólica após 72 horas. A seguir serão apresentadas a figura 34 com a atividade metabólica e a figura 35 com o teste Tukey e a tabela 13 com a análise de variância. O R^2 de 0,99 indica um excelente poder explicativo nas variações encontradas no experimento. A ausência de aumento na atividade metabólica nas primeiras horas e o menor valor médio para esse parâmetro com o uso da Doxo, sugere que essa linhagem tenha mecanismos de proteção celular menos eficientes do que as outras linhagens testadas, embora satisfatórios comparados à inibição do efeito citotóxico do óleo essencial de *M. azurea*.

Figura 34: Atividade metabólica em células C6

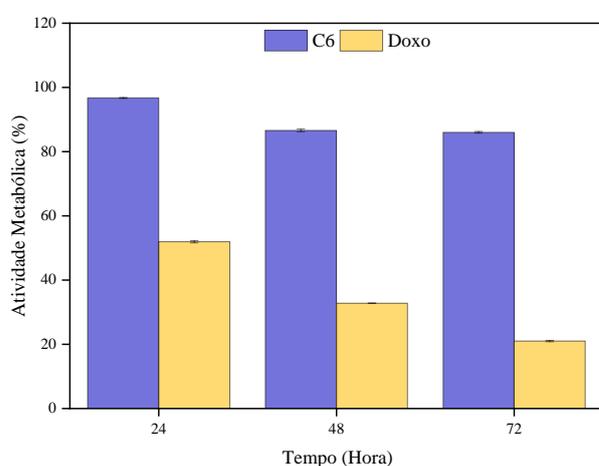


Figura 35: Post-hoc – Teste Tukey (C6)

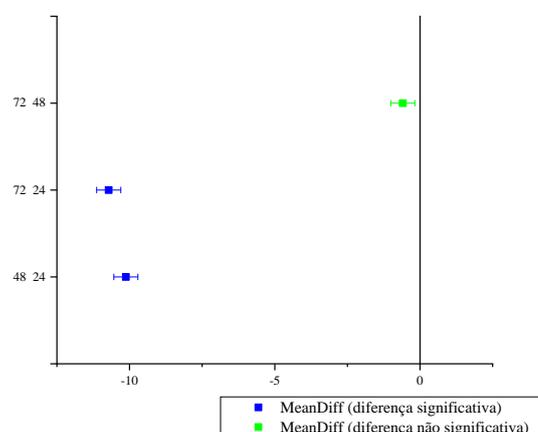


Tabela 13: ANOVA da atividade metabólica de células C6

C6	DF	SQ	QM	F Value	Prob>F	R2	Coef Var
Modelo	2	290,2937	145,1468	421,4348	1,28E-09	0,98944	0,00654
Erro	9	3,0997	0,34441				
Total	11	293,3934					

GL = graus de liberdade; SQ = Soma dos quadrados; QM = quadrado médio.

A sensibilidade ao óleo essencial pode variar de acordo com a linhagem. Por exemplo, em um estudo com óleo essencial obtido das partes aéreas de *Abies pindrow* foi testado quanto à sua atividade antiproliferativa *in vitro* contra quatro linhagens celulares de câncer: carcinoma mamário humano (MCF), tumor epitelial ductal mamário humano (T47D), adenocarcinoma pulmonar epitelial humano (A549) e células gliais de rato (C6), em três concentrações diferentes: 10 $\mu\text{g/mL}$, 20 $\mu\text{g/mL}$ e 50 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados mostraram uma sensibilização significativa das linhas celulares, inibindo seu crescimento, com inibições máximas observadas

nas linhagens celulares MCF (42%), T47D (42%), A549 (41%) e C6 (33%) quando tratadas com 50 µg/mL do óleo. O MTT indicou que o óleo teve diferentes efeitos inibitórios em linhas celulares de diferentes origens teciduais. Esse óleo é composto principalmente por α -pineno (36,58%) e limoneno (38,90%) e de modo geral é composto por mais de 90% de monoterpenos hidrocarbonado (Yatoo et al.,2021).

O microambiente tumoral de glioblastoma é caracterizado por um alto nível de heterogeneidade molecular, o que é fundamental para sustentar a gênese, progressão da doença e resistência terapêutica. As principais características desse microambiente incluem acidose, hipóxia, excesso de glutatona e uma atividade enzimática exacerbada, principalmente associada às metaloproteinases da matriz (Martins et al., 2023).

O β -Cariofileno, um composto minoritário do óleo essencial de *M. azurea* (1%), pode prevenir os astrócitos da citotoxicidade induzida por glutamato em linhagem de glioma C6, ele aumenta a produção intracelular de ROS, induz disfunção mitocondrial e diminui as defesas antioxidantes, como glutatona e a atividade da glutatona peroxidase. Em contrapartida, em linhagens C6, o monoterpeno previne a citotoxicidade modulando a resposta antioxidante celular, principalmente inibindo a produção de ROS e restabelecendo o potencial da membrana mitocondrial (Assis et al., 2014). A ação dessa molécula em conjunto com outros terpenos citados anteriormente pode justificar a leve diminuição na atividade metabólica em função do tempo.

No entanto, quando se compara os gráficos e se observa que a maior perda de viabilidade aconteceu em linhagem C6 em função da doxorrubicina, e pode-se inferir que C6 é menos eficiente na produção de superóxido dismutase e da glutatona peroxidase como resposta ao aumento de espécies reativas do que a linhagem GL. Logo ela também é mais suscetível à outras fontes de peroxidação lipídica. Contudo, a interação com moléculas mais reativas limita a atividade celular até em média de 86% mesmo após 72 horas, o que novamente demonstra um comportamento inerte do óleo essencial ao não causar citotoxicidade significativa e não estimular a produção de energia, quer seja para a multiplicação celular ou defesa da oxidação (Benckrouna et al., 1993; Vitale et al., 2024).

6. CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Matorea azurea* apresenta uma composição rica em mono e sesquiterpenos, incluindo álcoois, aldeídos, cetonas e éteres. Possui rendimento satisfatório em volume de óleo essencial ($0,43\% \pm 0,005$), com um incremento significativo de 32% após a digestão enzimática com celulase a 1% e concentrações mais altas podem ter sido menos eficientes por conta de produtos inibidores. O quimiotipo estudado apresentou baixa atividade antioxidante frente ao DPPH e não demonstrou efeito significativo sobre a viabilidade de células tumorais de gliomas e adenocarcinoma. Por outro lado, é encorajador que o óleo essencial não tenha mostrado citotoxicidade em células saudáveis e tenha oferecido proteção contra o estresse oxidativo pelo peróxido de hidrogênio. Os cálculos dos orbitais de fronteira indicaram que os compostos majoritários possuem estabilidade elevada, sugerindo um comportamento mais inerte frente a algumas reações e possuem caráter eletrofílico, sendo mais suscetíveis a aceitar elétrons para a formação de ligações químicas. Estes resultados ressaltam o potencial de estudos futuros que possam melhorar a biodisponibilidade dos compostos, como a utilização de nanoemulsões lipídicas para facilitar o transporte celular. Além disso, o rendimento do óleo essencial pode ser ainda mais otimizado por extrações assistidas por complexos enzimáticos com múltiplos alvos catalíticos e com a adição de estabilizantes no protocolo de digestão enzimática.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M. N.; KAUSAR, S.; CUI, H. Therapeutic potential of natural products in glioblastoma treatment: targeting key glioblastoma signaling pathways and epigenetic alterations. **Clinical and Translational Oncology**, v. 22, n. 7, p. 963-977, 2020.
- ABU-DIEF, Ahmed M. et al. Synthesize, structural inspection, stoichiometry in solution and DFT calculation of some novel mixed ligand complexes: DNA binding, biomedical applications and molecular docking approach. **Journal of Molecular Liquids**, v. 399, p. 124422, 2024.
- ADAMS, Robert P. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. 5 online ed. **Gruver, TX USA: Texensis Publishing**, 2017.
- ADNEY, Bill; BAKER, John. Measurement of Cellulase Activities. 2008.
- AGATONOVIC-KUSTRIN, Snezana et al. Essential oil quality and purity evaluation via ft-ir spectroscopy and pattern recognition techniques. **Applied sciences**, v. 10, n. 20, p. 7294, 2020.
- AGRAWAL, Ruchi et al. Current understanding of the inhibition factors and their mechanism of action for the lignocellulosic biomass hydrolysis. **Bioresource Technology**, v. 332, p. 125042, 2021.
- AGUILAR, Andrea Elizabeth Melgar et al. Green synthesis of nano hydroxyapatite: morphology variation and its effect on cytotoxicity against fibroblast. **Materials Letters**, v. 284, p. 129013, 2021.
- AKIEL, Maaged A. et al. Viridiflorol induces anti-neoplastic effects on breast, lung, and brain cancer cells through apoptosis. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 29, n. 2, p. 816-821, 2022.
- AKMAN, Feride et al. Molecular structure, electronic properties, reactivity (ELF, LOL, and Fukui), and NCI-RDG studies of the binary mixture of water and essential oil of *Phlomis bruguieri*. **Molecules**, v. 28, n. 6, p. 2684, 2023.
- ALLAY, Aymane et al. Combined Effect of Protease, Hemicellulase and Pectinase on the Quality of Hemp Seed Oil (*Cannabis sativa* L.) Obtained by Aqueous Enzymatic Extraction as an Eco-friendly Method. **Journal of Oleo Science**, v. 73, n. 7, p. 963-976, 2024.
- ALMEIDA, Neuler André. Óleos essenciais e desenvolvimento sustentável na Amazônia: uma aplicação da matriz de importância e desempenho. **Reflexões Econômicas**, v. 2, n. 2, p. 136-158, 2016.
- ALMEIDA, Tânia et al. Bioactive bacterial nanocellulose membranes enriched with Eucalyptus globulus Labill. leaves aqueous extract for anti-aging skin care applications. **Materials**, v. 15, n. 5, p. 1982, 2022.
- ALVES, Luis et al. Dissolution state of cellulose in aqueous systems. 1. Alkaline solvents. **Cellulose**, v. 23, p. 247-258, 2016.
- AMORATI, Riccardo; FOTI, Mario C.; VALGIMIGLI, Luca. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 61, n. 46, p. 10835-10847, 2013.

- AMORATI, Riccardo; VALGIMIGLI, Luca. Methods to measure the antioxidant activity of phytochemicals and plant extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 66, n. 13, p. 3324-3329, 2018.
- ANDERSON, R. G. Brazilian Snapdragon (*Otacanthus azureus*) for the Cut Flower Market. 2004.
- ANDRADE, Eloisa Helena A. et al. Volatiles of the leaves, stems and flowers of *Otacanthus azureus* (Linden) Ronse. **Journal of Essential Oil Research**, v. 18, n. 5, p. 481-482, 2006.
- ARGYROPOULOS, Dimitrios; MÜLLER, Joachim. Changes of essential oil content and composition during convective drying of lemon balm (*Melissa officinalis* L.). **Industrial Crops and Products**, v. 52, p. 118-124, 2014.
- ASGHAR, M. et al. Bioactive potential of cultivated *Mentha arvensis* L. for preservation and production of health-oriented food. **JAPS: Journal of Animal & Plant Sciences**, v. 32, n. 3, 2022.
- ASSAGGAF, Hamza et al. Design of three-component essential oil extract mixture from *Cymbopogon flexuosus*, *Carum carvi*, and *Acorus calamus* with enhanced antioxidant activity. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 9195, 2024.
- ATALAY, Vildan Enisoğlu et al. Investigation of Antioxidant Effects of Various Organic Oil Components by Theoretical Methods. **Rev. Roum. Chim**, v. 67, n. 8-9, p. 439-446, 2022.
- BABY, Kumaranthara Chacko; RANGANATHAN, Thottiam Vasudevan. Effect of enzyme pre-treatment on extraction yield and quality of cardamom (*Elettaria cardamomum* maton.) volatile oil. **Industrial Crops and Products**, v. 89, p. 200-206, 2016.
- BAGHERNEJAD, Masoud et al. Constructive Quantum Interference in Single-Molecule Benzodichalcogenophene Junctions. **Chemistry—A European Journal**, v. 26, n. 23, p. 5264-5269, 2020.
- BAILLON, H. *Histoire des plantes*. Paris: Librairie Hachette, 1867. Disponível em: <https://doi.org/10.5962/bhl.title.40796>. Acesso em: 01 out. 2024.
- BARBIERI, Cinzia et al. Essential oils: market and legislation. **Potential of essential oils**, p. 107-127, 2018.
- BASCHIERI, Andrea; AMORATI, Riccardo. Methods to determine chain-breaking antioxidant activity of nanomaterials beyond DPPH•. A review. **Antioxidants**, v. 10, n. 10, p. 1551, 2021.
- BASCHIERI, Andrea; JIN, Zongxin; AMORATI, Riccardo. Hydroperoxyl radical (HOO•) as a reducing agent: unexpected synergy with antioxidants. A review. **Free Radical Research**, v. 57, n. 2, p. 115-129, 2023.
- BASHA, Fazilath et al. Computational evaluation on molecular structure (Monomer, Dimer), RDG, ELF, electronic (HOMO-LUMO, MEP) properties, and spectroscopic profiling of 8-Quinolinesulfonamide with molecular docking studies. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 1198, p. 113169, 2021.
- BECKE, Becke A. term correlation functional (part of b3lyp). **J Chem Phys**, v. 98, p. 5648, 1993.

BENCHEKROUN, M. Nabil; SINHA, Birandra K.; ROBERT, Jacques. Doxorubicin-induced oxygen free radical formation in sensitive and doxorubicin-resistant variants of rat glioblastoma cell lines. **FEBS letters**, v. 322, n. 3, p. 295-298, 1993.

BERK, Şeyda et al. A comprehensive and current review on the role of flavonoids in lung cancer—Experimental and theoretical approaches. **Phytomedicine**, v. 98, p. 153938, 2022.

BHATIA, Manjeet. An overview of conceptual-DFT based insights into global chemical reactivity of volatile sulfur compounds (VSCs). **Computational Toxicology**, p. 100295, 2024.

BILGIC, Nilufer; DURAN, Gulay Gulbol. Chemical composition of *Myrtus communis* L. and Proapoptotic effects on the A549 cell line. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 23, n. 6, p. 1283-1295, 2020.

BIZZO, Humberto R.; REZENDE, Claudia M. O mercado de óleos essenciais no Brasil e no mundo na última década. **Química Nova**, v. 45, p. 949-958, 2022.

BLANCO, M. C. S. G. et al. Drying temperature effects in rosemary essential oil content and composition. In: **I Latin-American Symposium on the Production of Medicinal, Aromatic and Condiments Plants 569**. 2000. p. 99-103.

BLOIS, Marsden S. Antioxidant determinations by the use of a stable free radical. **Nature**, v. 181, n. 4617, p. 1199-1200, 1958.

BOMBARDI, Larissa Mies. A mundialização da agricultura brasileira e a ameaça aos direitos humanos. **Relatório da Rede Social de Justiça e Direitos Humanos. Direitos Humanos no Brasil**, p. 101-107, 2019.

BORGOHAIN, Romesh et al. Antioxidant activity of some phenolic aldehydes and their diimine derivatives: A DFT study. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 1060, p. 17-23, 2015.

BOUKHATEM, Mohamed Nadjib et al. *Eucalyptus globulus* essential oil as a natural food preservative: Antioxidant, antibacterial and antifungal properties in vitro and in a real food matrix (orangina fruit juice). **Applied Sciences**, v. 10, n. 16, p. 5581, 2020.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia Brasileira*. 5. ed. Brasília: Anvisa, 2010. 2 v.

BROWN, J. Martin; ATTARDI, Laura D. The role of apoptosis in cancer development and treatment response. **Nature reviews cancer**, v. 5, n. 3, p. 231-237, 2005.

BRUNDTLAND, Gro Harlem. Our common future—Call for action. **Environmental conservation**, v. 14, n. 4, p. 291-294, 1987.

BURSCH, Markus et al. Best-practice DFT protocols for basic molecular computational chemistry. **Angewandte Chemie International Edition**, v. 61, n. 42, p. e202205735, 2022.

BUTTERFIELD, D. Allan. Brain lipid peroxidation and alzheimer disease: Synergy between the Butterfield and Mattson laboratories. **Ageing research reviews**, v. 64, p. 101049, 2020.

CARVALHO FILHO, José Luiz S. et al. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 24-30, 2006.

CASSINI, Juliane. **Utilização de enzimas para a obtenção de óleos essenciais e cumarinas da casca de *Citrus latifolia* Tanaka**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul. Caxias do Sul, p. 62. 2015.

CERTO, Michael et al. Mitochondria primed by death signals determine cellular addiction to antiapoptotic BCL-2 family members. **Cancer cell**, v. 9, n. 5, p. 351-365, 2006.

CHEN, Baixi; WANG, Yuhua; CHEN, Guangjie. New Potentiality of Bioactive Substances: Regulating the NLRP3 Inflammasome in Autoimmune Diseases. **Nutrients**, v. 15, n. 21, p. 4584, 2023.

CHEN, Fengli et al. Homogenate-ultrasonic pretreatment followed by microwave hydrodistillation of essential oil from rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) leaves: Kinetic, chemical composition, and biological activity. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 42, p. 101744, 2024.

CHEN, Fengli et al. Ultrasound pre-treatment combined with microwave-assisted hydrodistillation of essential oils from *Perilla frutescens* (L.) Britt. leaves and its chemical composition and biological activity. **Industrial Crops and Products**, v. 143, p. 111908, 2020.

CHEN, Huimin et al. Depression mechanism of novel organic phosphoryl depressants on calcite: DFT and coordination studies. **Journal of Molecular Liquids**, v. 389, p. 122885, 2023.

CHÉRIF, Imen et al. Exploration of intramolecular charge transfer in para-substituted nitrobenzofurazan: Experimental and theoretical analyses. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 301, p. 122939, 2023.

CHERRY, Joel R.; FIDANTSEF, Ana L. Directed evolution of industrial enzymes: an update. **Current opinion in biotechnology**, v. 14, n. 4, p. 438-443, 2003.

CHUGAEVA, Uliana Y. et al. Effects of L-ascorbic acid (C₆H₈O₆: Vit-C) on collagen amino acids: DFT study. **Amino Acids**, v. 55, n. 11, p. 1655-1664, 2023.

COLLETTA, Gabriel Dalla; SCATIGNA, André Vito; SOUZA, Vinicius Castro. Assessment of *Matourea pratensis* (Plantaginaceae: Gratioloideae) reveals an older name for *Achetaria*. **Taxon**, v. 69, n. 6, p. 1354-1360, 2020.

COSTA, Renyer A. et al. Quantum chemical studies, vibrational analysis, molecular dynamics and docking calculations of some ent-kaurane diterpenes from *Annona vepretorum*: a theoretical approach to promising anti-tumor molecules. **Structural Chemistry**, v. 31, p. 1223-1243, 2020.

COXON, Katy M. et al. Purification of annexin V and its use in the detection of apoptotic cells. **Cancer Cell Culture: Methods and Protocols**, p. 293-308, 2011.

DE MATOS BALSALOBRE, Natália et al. Potential anti-arthritis and analgesic properties of essential oil and viridiflorol obtained from *Allophylus edulis* leaves in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 301, p. 115785, 2023.

DE POOTER, H. L.; DE BUYCK, L. F.; SCHAMP, N. M.; BILLIET, F.; DE BRUYN, A. The volatile fraction of *Otacanthus coeruleus* Lindl. containing the new copaene derivative β -copaen-4 α -ol. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 4, n. 2, p. 47-51, jun. 1989.

DE REZENDE, Fernanda Mendes et al. Vias de síntese de metabólitos secundários em plantas. **Laboratório de Ensino de Botânica**, v. 93, 2016.

DEVRNJA, Nina; MILUTINOVIĆ, Milica; SAVIĆ, Jelena. When scent becomes a weapon—plant essential oils as potent bioinsecticides. **Sustainability**, v. 14, n. 11, p. 6847, 2022.

DEWI, Shinta R. et al. Investigating the role of solvent type and microwave selective heating on the extraction of phenolic compounds from cacao (*Theobroma cacao* L.) pod husk. **Food and Bioproducts Processing**, v. 134, p. 210-222, 2022.

DI MEO, Sergio; VENDITTI, Paola. Evolution of the knowledge of free radicals and other oxidants. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2020, n. 1, p. 9829176, 2020.

DÍAZ-MAROTO, M. Consuelo et al. Changes produced in the aroma compounds and structural integrity of basil (*Ocimum basilicum* L) during drying. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, n. 15, p. 2070-2076, 2004.

DING, Furong et al. Exploring the Composition and Bioactivity of *Hedychium flavum* Leaf and Stem Essential Oil: In Vitro Assessment of Antibacterial, Antioxidant, Cytotoxicity, and Enzyme Inhibitory Activities. **Journal of Chemistry**, v. 2024, n. 1, p. 6643335, 2024.

DONG, Xiao et al. Electronegativity and chemical hardness of elements under pressure. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 119, n. 10, p. e2117416119, 2022.

DOS SANTOS REIS, Nadabe et al. Aplicação de extrato multienzimático de *Aspergillus niger* na extração de óleos essenciais de *Mentha arvensis* por hidrodestilação. In: Xx Simpósio Nacional de Bioprocessos, Xi Simpósio De Hidrólise Enzimática De Biomassa, 01-04 set. 2015, Fortaleza. Anais... Fortaleza: [s.n.], 2015.

DOS SANTOS, Alessandro Carvalho et al. A importância da indústria de biocosméticos para o desempenho econômico do estado do Amazonas. **Terceira Margem Amazônia**, v. 6, n. 16, p. 105-125, 2021.

DRAGOMANOVA, Stela et al. Therapeutic Potential of Myrtenal and Its Derivatives—A Review. **Life**, v. 13, n. 10, p. 2086, 2023.

DRINIĆ, Zorica et al. Microwave-assisted extraction of *O. vulgare* L. spp. hirtum essential oil: Comparison with conventional hydro-distillation. **Food and Bioproducts Processing**, v. 120, p. 158-165, 2020.

EBADI, Mohammad Taghi et al. Influence of different drying methods on drying period, essential oil content and composition of *Lippia citriodora* Kunth. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 2, n. 4, p. 182-187, 2015.

EFSA PANEL ON ADDITIVES AND PRODUCTS OR SUBSTANCES USED IN ANIMAL FEED (FEEDAP) et al. Safety and efficacy of feed additives consisting of essential oils derived from the flower buds or the leaves of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & LM Perry (clove bud oil and clove leaf oils) for all animal species (FEFANA asbl). **EFSA Journal**, v. 21, n. 7, p. e08183, 2023.

ELZAYYAT, Elham et al. Insecticidal, oxidative, and genotoxic activities of *Syzygium aromaticum* and *Eucalyptus globulus* on *Culex pipiens* adults and larvae. **Turkish J. Parasitol**, v. 42, p. 213-222, 2018.

- EMAMJOMEH, Lena et al. Nanoencapsulation enhances the contact toxicity of *Eucalyptus globulus* Labill and *Zataria multiflora* Boiss essential oils against the third instar larvae of *Ephestia kuehniella* (Lepidoptera: Pyralidae). **International Journal of Pest Management**, v. 69, n. 3, p. 207-214, 2023.
- ETALE, Anita et al. Cellulose: a review of water interactions, applications in composites, and water treatment. **Chemical reviews**, v. 123, n. 5, p. 2016-2048, 2023.
- EVARISTO, Aryane et al. Pesticides and farmers' health: an analysis of variables related to management and property. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 94, n. 2, p. e20211335, 2022.
- FAKHRI, Sajad et al. Attenuation of Nrf2/Keap1/ARE in Alzheimer's disease by plant secondary metabolites: A mechanistic review. **Molecules**, v. 25, n. 21, p. 4926, 2020.
- FALLEH, Hanen et al. Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. **Food chemistry**, v. 330, p. 127268, 2020.
- FARHAT, Asma et al. Eco-friendly and cleaner process for isolation of essential oil using microwave energy: Experimental and theoretical study. **Journal of Chromatography A**, v. 1216, n. 26, p. 5077-5085, 2009.
- FARMER, Hannah et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. **Nature**, v. 434, n. 7035, p. 917-921, 2005.
- FÁVERO, Luiz Paulo; BELFIORE, Patrícia. **Manual de análise de dados: estatística e modelagem multivariada com Excel®, SPSS® e Stata®**. Elsevier Brasil, 2017.
- FISCHER, Eberhard. Scrophulariaceae. In: **Flowering Plants· Dicotyledons: Lamiales (except Acanthaceae including Avicenniaceae)**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2004. p. 333-432.
- GAN, Quan; ALLEN, S. J.; TAYLOR, G1. Design and operation of an integrated membrane reactor for enzymatic cellulose hydrolysis. **Biochemical Engineering Journal**, v. 12, n. 3, p. 223-229, 2002.
- GASCHLER, Michael M.; STOCKWELL, Brent R. Lipid peroxidation in cell death. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 482, n. 3, p. 419-425, 2017.
- GAUTAM, Nandini; MANTHA, Anil K.; MITTAL, Sunil. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. **BioMed research international**, v. 2014, n. 1, p. 154106, 2014.
- GAVAHIAN, Mohsen et al. Cold plasma as an emerging energy-saving pretreatment to enhance food drying: Recent advances, mechanisms involved, and considerations for industrial applications. **Trends in Food Science & Technology**, p. 104210, 2023.
- GAVRILA, Adina I. et al. Enhancing the extraction process efficiency of thyme essential oil by combined ultrasound and microwave techniques. **Agronomy**, v. 13, n. 9, p. 2331, 2023.
- GHAVAM, Mansureh. In vitro biological potential of the essential oil of some aromatic species used in Iranian traditional medicine. **Inflammopharmacology**, v. 30, n. 3, p. 855-874, 2022.

GHOSE, T. K. Measurement of cellulase activities. **Pure and applied Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 257-268, 1987.

GOMES, André Angelo Medeiros et al. Endophytic species of *Induratia* from coffee and carqueja plants from Brazil and its potential for the biological control of toxicogenic fungi on coffee beans by means of antimicrobial volatiles. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 54, n. 1, p. 349-360, 2023.

GOUNARIS, Y. Biotechnology for the production of essential oils, flavours and volatile isolates. A review. **Flavour and fragrance journal**, v. 25, n. 5, p. 367-386, 2010.

GREAY, S. J. et al. Induction of necrosis and cell cycle arrest in murine cancer cell lines by *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil and terpinen-4-ol. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 65, p. 877-888, 2010.

GULCIN, İlhami; ALWASEL, Saleh H. DPPH radical scavenging assay. **Processes**, v. 11, n. 8, p. 2248, 2023.

GUSAKOV, Alexander V.; SINITSYN, Arkady P. A theoretical analysis of cellulase product inhibition: Effect of cellulase binding constant, enzyme/substrate ratio, and β -glucosidase activity on the inhibition pattern. **Biotechnology and bioengineering**, v. 40, n. 6, p. 663-671, 1992.

HAALAND, Arne; SHOROKHOV, Dimitry J.; TVERDOVA, Natalya V. Topological analysis of electron densities: is the presence of an atomic interaction line in an equilibrium geometry a sufficient condition for the existence of a chemical bond? **Chemistry—A European Journal**, v. 10, n. 18, p. 4416-4421, 2004.

HAILE, Setegn; AYELE, Abate. Pectinase from microorganisms and its industrial applications. **The Scientific World Journal**, v. 2022, n. 1, p. 1881305, 2022.

HALLEZ, Loïc et al. Enhancement and quenching of high-intensity focused ultrasound cavitation activity via short frequency sweep gaps. **Ultrasonics sonochemistry**, v. 29, p. 194-197, 2016.

HANWELL, Marcus D. et al. Avogadro: an advanced semantic chemical editor, visualization, and analysis platform. **Journal of Cheminformatics**, v. 4, p. 1-17, 2012.

HARVEY, Charles et al. Bourdieu, strategy and the field of power. **Critical Perspectives on Accounting**, v. 73, p. 102199, 2020.

HASSANI MOGHADDAM, Esfandiar et al. Identification and Comparison of Some Essential Oils Components in Seven *Eucalyptus* Species Cultivated in Khoramabad. **Journal of Medicinal plants and By-Products**, v. 9, n. Special, p. 59-66, 2020.

HENDRICKSON, James B.; CRAM, Donald J.; HAMMOND, George S. **Organic chemistry**. 3. ed. New York: McGraw-Hill Book Company, 1970.

HENGARTNER, Michael O. The biochemistry of apoptosis. **Nature**, v. 407, n. 6805, p. 770-776, 2000.

HENRY-MOWATT, Judith et al. Role of mitochondrial membrane permeabilization in apoptosis and cancer. **Oncogene**, v. 23, n. 16, p. 2850-2860, 2004.

HOSNI, Karim et al. Enzyme-assisted extraction of essential oils from thyme (*Thymus capitatus* L.) and rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.): Impact on yield, chemical composition and antimicrobial activity. **Industrial Crops and Products**, v. 47, p. 291-299, 2013.

HOUËL, E. et al. In vitro antidermatophytic activity of *Otacanthus azureus* (Linden) Ronse essential oil alone and in combination with azoles. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 2, p. 288-294, 2014.

HSIEH, Chia-wen C. et al. Cellulase inhibition by high concentrations of monosaccharides. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 62, n. 17, p. 3800-3805, 2014.

HU, S.-X.; YU, J.-G.; ZENG, E. Y. A theoretical study on UV-spectroscopy, electronic structure and reactivity properties of sesquiterpenes. **Atmospheric Chemistry and Physics Discussions**, v. 10, n. 10, p. 24325-24343, 2010.

HÜSNÜ, K.; BAŞER, Can; DEMIRCI, Fatih. Chemistry of essential oils. In: **Flavours and fragrances: chemistry, bioprocessing and sustainability**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2007.

ILHAN, Suleyman. Essential oils from *Vitex agnus castus* L. leaves induce caspase-dependent apoptosis of human multidrug-resistant lung carcinoma cells through intrinsic and extrinsic pathways. **Nutrition and cancer**, v. 73, n. 4, p. 694-702, 2020.

IMANE, Nait Irahah et al. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of some essential oils against multidrug resistant bacteria. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 35, p. 101074, 2020.

IPEA. **Desafios do Desenvolvimento: Objetivos de Desenvolvimento Sustentável: metas possíveis**. Ano 12, edição 86, 2015.

ISEPPI, Ramona; CONDÒ, Carla; MESSI, Patrizia. Synergistic inhibition of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) by *Melaleuca alternifolia* Chell (Tea Tree) and *Eucalyptus globulus* Labill. essential oils in association with oxacillin. **Antibiotics**, v. 12, n. 5, p. 846, 2023.

ISMAN, Murray B. Commercial development of plant essential oils and their constituents as active ingredients in bioinsecticides. **Phytochemistry reviews**, v. 19, p. 235-241, 2020.

IUCHI, Katsuya; TAKAI, Tomoka; HISATOMI, Hisashi. Cell death via lipid peroxidation and protein aggregation diseases. **Biology**, v. 10, n. 5, p. 399, 2021.

JACOBI, Pedro. Meio ambiente e sustentabilidade. **O Município no século XXI: cenários e perspectivas**. Cepam—Centro de Estudos e Pesquisas de Administração Municipal, p. 175-183, 1999.

JAFARI, Roya; ZANDI, Mohsen; GANJLOO, Ali. Effect of ultrasound and microwave pretreatments on extraction of anise (*Pimpinella anisum* L.) seed essential oil by ohmic-assisted hydrodistillation. **Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants**, v. 31, p. 100418, 2022.

JANANI, Krishnamachari; TEJA, Kavalipurapu Venkata; AJITHA, P. Cytotoxicity of oregano essential oil and calcium hydroxide on L929 fibroblast cell: A molecular level study. **Journal of Conservative Dentistry and Endodontics**, v. 24, n. 5, p. 457-463, 2021.

JAYAKUMAR, Thanasekaran et al. Hinokitiol inhibits migration of A549 lung cancer cells via suppression of MMPs and induction of antioxidant enzymes and apoptosis. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 4, p. 939, 2018.

JERÔNIMO, Lucas Botelho et al. *Acmella oleracea* (L.) RK Jansen essential oils: chemical composition, antioxidant, and cytotoxic activities. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 112, p. 104775, 2024.

KALEMBA, Danuta; SYNOWIEC, Agnieszka. Agrobiological interactions of essential oils of two menthol mints: *Mentha piperita* and *Mentha arvensis*. **Molecules**, v. 25, n. 1, p. 59, 2019.

KAMIYA, Harunobu et al. In vitro evaluation of the antimicrobial properties of terpinen-4-ol on apical periodontitis-associated bacteria. **Journal of Infection and Chemotherapy**, v. 30, n. 4, p. 306-314, 2024.

KANNAN, Kayambu; JASRA, Raksh Vir. Improved catalytic hydrolysis of carboxy methyl cellulose using cellulase immobilized on functionalized meso cellular foam. **Journal of Porous Materials**, v. 18, n. 4, p. 409-416, 2011.

KANT, Ravi; KUMAR, Anil. Review on essential oil extraction from aromatic and medicinal plants: Techniques, performance and economic analysis. **Sustainable Chemistry and Pharmacy**, v. 30, p. 100829, 2022.

KARAMI, Hamed et al. Gas sensor-based machine learning approaches for characterizing tarragon aroma and essential oil under various drying conditions. **Sensors and Actuators A: Physical**, v. 365, p. 114827, 2024.

KARIMI, Safoora; SHARIFZADEH, Shady; ABBASI, Habib. Sequential ultrasound-microwave assisted extraction as a green method to extract essential oil from *Zataria multiflora*. **Journal of Food and Bioprocess Engineering**, v. 3, n. 2, p. 101-109, 2020.

KASHYAP, D. R. et al. Production, purification and characterization of pectinase from a *Bacillus* sp. DT7. **World journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 16, p. 277-282, 2000.

KENFAOUI, Jihane et al. The potency and effectiveness of six essential oils in controlling grapevine trunk diseases in Morocco. **Journal of Natural Pesticide Research**, v. 6, p. 100053, 2023.

KHALID, Samran et al. Recent advances in the implementation of ultrasound technology for the extraction of essential oils from terrestrial plant materials: A comprehensive review. **Ultrasonics Sonochemistry**, p. 106914, 2024.

KHAN, Imran et al. In vitro and in vivo antitumor potential of carvacrol nanoemulsion against human lung adenocarcinoma A549 cells via mitochondrial mediated apoptosis. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 144, 2018.

KHATER, El-Sayed G. et al. Effect of drying system, layer thickness and drying temperature on the drying parameters, product quality, energy consumption and cost of the marjoram leaves. **Scientific Reports**, v. 14, n. 1, p. 4637, 2024.

KHODAEI, Nastaran et al. Compositional diversity and antioxidant properties of essential oils: Predictive models. **LWT**, v. 138, p. 110684, 2021.

- KIM, Taejoon et al. Therapeutic potential of volatile terpenes and terpenoids from forests for inflammatory diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n. 6, p. 2187, 2020.
- KLEHM, Cristiane da Silva. Produção de biomassa, teor e rendimento de óleo essencial de *Otacanthus Azureus* (Linden) Ronse em função da adubação orgânica e épocas de corte, em Manaus, AM. 2011.
- KORABLOVA, Olha et al. Chromatographic Profiles of Essential Oils from Some Species the *Artemisia* L. Genus. **Scientific committee**, p. 46, 2023.
- KUMAR, Manoj et al. Chemically characterised *Artemisia nilagirica* (Clarke) Pamp. essential oil as a safe plant-based preservative and shelf-life enhancer of millets against fungal and aflatoxin contamination and lipid peroxidation. **Plant Biosystems-An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 154, n. 3, p. 269-276, 2019.
- KUMARI, Satti Venu Gopala; PAKSHIRAJAN, Kannan; PUGAZHENTHI, G. Facile fabrication and characterization of novel antimicrobial and antioxidant poly (3-hydroxybutyrate)/essential oil composites for potential use in active food packaging applications. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 252, p. 126566, 2023.
- LARA, Caroline Schmaedeck; COSTA, Caroline Rabelo; SAMPAIO, Paulo de Tarso Barbosa. O mercado de sementes e mudas de pau-rosa (*Aniba* spp.) no Estado do Amazonas. **Revista de Economia e Sociologia Rural**, v. 59, p. e221035, 2021.
- LEONARSKI, Eduardo et al. Pressurized liquid extraction as an eco-friendly approach to recover anthocyanin from black rice bran. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 86, p. 103372, 2023.
- LETAI, Anthony. Apoptosis and cancer. **Annual Review of Cancer Biology**, v. 1, n. 1, p. 275-294, 2017.
- LI, Xinqian; STAYKOV, Aleksandar; YOSHIZAWA, Kazunari. Orbital views of the electron transport through polycyclic aromatic hydrocarbons with different molecular sizes and edge type structures. **The Journal of Physical Chemistry C**, v. 114, n. 21, p. 9997-10003, 2010.
- LI, Y. Q.; KONG, D. X.; WU, H. Analysis and evaluation of essential oil components of cinnamon barks using GC-MS and FTIR spectroscopy. **Industrial Crops and Products**, v. 41, p. 269-278, 2013.
- LI, Yuanyuan et al. Optimization of Enzyme-Assisted Extraction of Rosemary Essential Oil Using Response Surface Methodology and Its Antioxidant Activity by Activating Nrf2 Signaling Pathway. **Molecules**, v. 29, n. 14, p. 3382, 2024.
- LIU, Qimin; WANG, Lijuan. t-Test and ANOVA for data with ceiling and/or floor effects. **Behavior Research Methods**, v. 53, n. 1, p. 264-277, 2021.
- LIU, Yuyang; LIU, Chuanqun; LI, Jianjun. Comparison of vitamin c and its derivative antioxidant activity: Evaluated by using density functional theory. **ACS omega**, v. 5, n. 39, p. 25467-25475, 2020.
- LIU, Zaizhi et al. Efficient extraction of essential oil from *Cinnamomum burmannii* leaves using enzymolysis pretreatment and followed by microwave-assisted method. **Lwt**, v. 147, p. 111497, 2021.

LOPES, Katianne Soares et al. Identification of bioactive compounds and cytogenotoxicity of the essential oil from the leaves of *Croton heliotropiifolius* Kunth. **Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A**, v. 85, n. 24, p. 1002-1018, 2022.

MACHADO, Thaíssa Q. et al. A narrative review of the antitumor activity of monoterpenes from essential oils: An update. **BioMed research international**, v. 2022, n. 1, p. 6317201, 2022.

MACHADO, Vilma de Fátima. A produção do discurso do desenvolvimento sustentável: de estocolmo à Rio-92. 2005. 327 f. Tese (Doutorado em Desenvolvimento Sustentável)—Universidade de Brasília, Brasília, 2005.

MAGALHÃES, Maísa Lamounier et al. Biological activities of the essential oil from the Moro orange peel (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). **Flavour and fragrance journal**, v. 35, n. 3, p. 294-301, 2020.

MAHALAKSHMI, G.; BALACHANDRAN, V. NBO, HOMO, LUMO analysis and vibrational spectra (FTIR and FT Raman) of 1-Amino 4-methylpiperazine using ab initio HF and DFT methods. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 135, p. 321-334, 2015.

MANSSOURI, Mounir et al. Anti-Corrosion Performance of Ruta Graveolens Essential Oil as A Green Inhibitor for Mild Steel in 1 M HCl: Evaluations of Electrochemical, DFT And Monte Carlo. **Analytical and Bioanalytical Electrochemistry**, v. 16, n. 6, p. 507-536, 2024.

MANZUR, Marilina et al. *Citrus sinensis* essential oils an innovative antioxidant and antipathogenic dual strategy in food preservation against spoilage bacteria. **Antioxidants**, v. 12, n. 2, p. 246, 2023.

MARINAS, Ioana Cristina et al. Chemical composition, antipathogenic and cytotoxic activity of the essential oil extracted from *Amorpha fruticosa* fruits. **Molecules**, v. 26, n. 11, p. 3146, 2021.

MARTINS, Cláudia; PACHECO, Catarina; SARMENTO, Bruno. The effect of glioblastoma microenvironment on therapeutic, diagnostic, or theranostic systems. In: **New Insights Into Glioblastoma**. Academic Press, 2023. p. 729-747.

MARTINS, Eucarlos de Lima. *Síntese e caracterização de micropartículas de etilcelulose e seu uso na encapsulação do fungicida tebuconazole*. 2014. 117 f. Tese (Doutorado) – Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

MARTINS, Paula M. et al. Influência da temperatura e velocidade do ar de secagem no teor e composição química do óleo essencial de capim-limão. In: **I Latin-American Symposium on the Production of Medicinal, Aromatic and Condiments Plants 569**. p. 155-160, 2000.

MASHKANI, Mohammad Reza Dehghani et al. Changes in the essential oil content and composition of *Thymus daenensis* Celak. under different drying methods. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 389-395, 2018.

MATUKA, Thandiswa et al. Chemical composition and in vivo anti-inflammatory activity of essential oils from *Citrus sinensis* (L.) osbeck growing in South Africa. **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 23, n. 4, p. 638-647, 2020.

MCCORMICK, Amy C. Designing a Carbon Tax: The Introduction of the Carbon-Burned Tax. **UCLA Journal of Environmental Law and Policy**, n. 10, p. 221, 1991.

MEHTA, Surbhi; SHARMA, Kanika. Bioassay-guided characterization of antifungal principles from blue gum tree (*Eucalyptus globulus*). **Indian Phytopathology**, v. 75, n. 4, p. 989-997, 2022.

MENEZES, Maria Clara Saad et al. PARP inhibitors for breast cancer: germline BRCA1/2 and beyond. **Cancers**, v. 14, n. 17, p. 4332, 2022.

MIGLIORINI, Marcos J. et al. Oregano essential oil in the diet of laying hens in winter reduces lipid peroxidation in yolks and increases shelf life in eggs. **Journal of Thermal Biology**, v. 85, p. 102409, 2019.

MUILU-MÄKELÄ, Riina et al. Antibacterial and oxidative stress-protective effects of five monoterpenes from softwood. **Molecules**, v. 27, n. 12, p. 3891, 2022.

MUKHERJEE, Souvik et al. A cross talk based critical analysis of solvent free microwave extraction to accentuate it as the new normal for extraction of essential oil: An attempt to overhaul the science of distillation through a comprehensive tutelage. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 63, n. 24, p. 6960-6982, 2023.

MWAURAH, Peter Waboi et al. Novel oil extraction technologies: Process conditions, quality parameters, and optimization. **Comprehensive reviews in food science and food safety**, v. 19, n. 1, p. 3-20, 2020.

NADAR, Shamraja S.; RAO, Priyanka; RATHOD, Virendra K. Enzyme assisted extraction of biomolecules as an approach to novel extraction technology: A review. **Food Research International**, v. 108, p. 309-330, 2018.

NAEEM, Muhammad et al. A review of twenty years of research on the regulation of signaling pathways by natural products in breast cancer. **Molecules**, v. 27, n. 11, p. 3412, 2022.

NAKAI, Kozo; TSURUTA, Daisuke. What are reactive oxygen species, free radicals, and oxidative stress in skin diseases? **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 19, p. 10799, 2021.

NASCIMENTO, Elimar Pinheiro do. Trajetória da sustentabilidade: do ambiental ao social, do social ao econômico. **Estudos avançados**, v. 26, p. 51-64, 2012.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY (NIST). *NIST Research Library*. Disponível em: <https://www.nist.gov/nist-research-library>. Acesso em: 29 set. 2024.

NEUENSCHWANDER, Ulrich; GUIGNARD, Florian; HERMANS, Ive. Mechanism of the Aerobic Oxidation of α -Pinene. **ChemSusChem: Chemistry & Sustainability Energy & Materials**, v. 3, n. 1, p. 75-84, 2010.

NG, Chau Yee et al. Phytochemicals in skin cancer prevention and treatment: an updated review. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 4, p. 941, 2018.

NGO, Thi Chinh et al. Insight into the antioxidant properties of non-phenolic terpenoids contained in essential oils extracted from the buds of *Cleistocalyx operculatus*: a DFT study. **RSC advances**, v. 6, n. 37, p. 30824-30834, 2016.

NONG, Daguang et al. Single-molecule tracking reveals dual front door/back door inhibition of Cel7A cellulase by its product cellobiose. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 121, n. 18, p. e2322567121, 2024.

OEC - Observatory of Economic Complexity. Disponível em: <https://oec.world/es/profile/hs/essential-oils>. Acesso em: 08 out. 2024.

OJEDA, Jesús J.; DITTRICH, Maria. Fourier transform infrared spectroscopy for molecular analysis of microbial cells. **Microbial Systems Biology: Methods and Protocols**, p. 187-211, 2012.

OLIVEIRA, Leandro Dias de. A Agenda 2030 sob o olhar das periferias: limites e imposturas dos 17 Objetivos do Desenvolvimento Sustentável. **Geografares**, n. 38, 2024.

OLSZOWY, Małgorzata; DAWIDOWICZ, Andrzej L. Essential oils as antioxidants: Their evaluation by DPPH, ABTS, FRAP, CUPRAC, and β -carotene bleaching methods. **Monatshefte für Chemie-Chemical Monthly**, v. 147, p. 2083-2091, 2016.

OSAE, Richard et al. Drying techniques affect the quality and essential oil composition of Ghanaian ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). **Industrial Crops and Products**, v. 172, p. 114048, 2021.

OZYERLI-GOKNAR, Ezgi; BAGCI-ONDER, Tugba. Epigenetic deregulation of apoptosis in cancers. **Cancers**, v. 13, n. 13, p. 3210, 2021.

PADMANABHAN, J. et al. Electrophilicity-based charge transfer descriptor. **The Journal of Physical Chemistry A**, v. 111, n. 7, p. 1358-1361, 2007.

PATIAL, Poonam Kumari; CANNOO, Damanjit Singh. Evaluation of volatile compounds, phenolic acids, antioxidant potential and DFT study of essential oils from different parts of *Araucaria columnaris* (G. Forst.) Hook. from India. **Food and Chemical Toxicology**, v. 141, p. 111376, 2020.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. A. *Introduction to Spectroscopy*. 5. ed. Stamford: Cengage Learning, 2015.

PAVLICA, Damjan Jan; PODLIPNIK, Črtomir; POMPE, Matevž. Quantification of Hydroperoxides by Gas Chromatography with Flame Ionisation Detection. **Acta Chimica Slovenica**, v. 68, n. 3, 2021.

PENG, Weiyao et al. Diversity of volatile compounds in ten varieties of Zingiberaceae. **Molecules**, v. 27, n. 2, p. 565, 2022.

PEREIRA, Carolina de Lélis Rodrigues. Efetividade de dissolução da guta-percha e segurança do uso de óleos essenciais dos gêneros *Citrus* e **Cymbopogon**. 2023. 89 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2023.

PETER, M. E. et al. The role of CD95 and CD95 ligand in cancer. **Cell death & differentiation**, v. 22, n. 4, p. 549-559, 2015.

PIRBALOUTI, Abdollah Ghasemi; MAHDAD, Elahe; CRAKER, Lyle. Effects of drying methods on qualitative and quantitative properties of essential oil of two basil landraces. **Food chemistry**, v. 141, n. 3, p. 2440-2449, 2013.

Plants of the World Online | Kew Science. Disponível em: <<http://www.plantsoftheworldonline.org>>. Acesso em: 10/08/2023.

POPOV, Evgeny et al. Kinetics of UV– H₂O₂ advanced oxidation in the presence of alcohols: the role of carbon centered radicals. **Environmental science & technology**, v. 44, n. 20, p. 7827-7832, 2010.

PORTER, Ned A. Mechanisms for the autoxidation of polyunsaturated lipids. **Accounts of Chemical Research**, v. 19, n. 9, p. 262-268, 1986.

POTRICH, Erich et al. Replacing hexane by ethanol for soybean oil extraction: Modeling, simulation, and techno-economic-environmental analysis. **Journal of Cleaner Production**, v. 244, p. 118660, 2020.

RADIVOJAC, Aleksandar et al. Conventional versus microwave-assisted hydrodistillation of sage herbal dust: Kinetics modeling and physico-chemical properties of essential oil. **Food and Bioproducts Processing**, v. 123, p. 90-101, 2020.

RAHAMAN, Ashikur et al. Eucalyptol targets PI3K/Akt/mTOR pathway to inhibit skin cancer metastasis. **Carcinogenesis**, v. 43, n. 6, p. 571-583, 2022.

RAHN, Knud. A phylogenetic study of the Plantaginaceae. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 120, n. 2, p. 145-198, 1996.

RASHED, Marwan MA et al. Enhancement of mass transfer intensification for essential oil release from lavender pubescence using integrated ultrasonic-microwave technique and enzymatic pretreatment. **ACS Sustainable Chemistry & Engineering**, v. 6, n. 2, p. 1639-1649, 2018.

RATHI, Parveen; KHANNA, Radhika; JASWAL, Vivek Sheel. Quantum parameters based study of some heterocycles using density functional theory method: A comparative theoretical study. **Journal of the Chinese Chemical Society**, v. 67, n. 2, p. 213-217, 2020.

REDDY, L. J. et al. Evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the leaf essential oil and leaf extracts of *Otacanthus caerulus* (Linden) Ronse. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science Research**, v. 2, p. 20-25, 2012.

RICHA, Rishi et al. Ultrasound assisted essential oil extraction technology: New boon in food industry. **SKUAST Journal of Research**, v. 22, n. 2, p. 78-85, 2020.

RONSE, A. C. et al. *Otacanthus* species: in vitro culture, plant propagation, and the production of essential oil. In: **Medicinal and Aromatic Plants X**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, p. 305-319, 1998.

RONSE, Anne. A revision of *Otacanthus* Lindl.(Scrophulariaceae). **Brittonia**, v. 53, p. 137-153, 2001.

RONSE, Anne; DE POOTER, Herman; DE PROFT, Maurice. Essential oils of *Otacanthus*. **Phytochemistry**, v. 46, n. 8, p. 1365-1368, 1997.

ROSA, Gabriel HS et al. Diverse continuous photooxygenation reactions of (+) and (-)- α -pinenes to the corresponding pinocarvones or *trans*-pinocarveols. **Reaction Chemistry & Engineering**, v. 8, n. 4, p. 790-797, 2023.

ROSSI, Antonio Roberto; DEMURU, Paolo. Para onde fomos, para onde vamos: sentidos dos discursos ambientais do Brasil na Assembleia Geral da ONU–1985-2022. **Revista Comunicação Midiática**, v. 19, n. 1, p. 264-285, 2024.

RUGGERIO, Carlos Alberto. Sustainability and sustainable development: A review of principles and definitions. **Science of the Total Environment**, v. 786, p. 147481, 2021.

RUSSO, Alessandra et al. Comparative phytochemical profile and antiproliferative activity on human melanoma cells of essential oils of three lebanese *Salvia* species. **Industrial Crops and Products**, v. 83, p. 492-499, 2016.

SACHS, Ignacy et al. Estratégias de transição para o século XXI. **Para pensar o desenvolvimento sustentável. São Paulo: Brasiliense**, p. 29-56, 1993.

SALLEH, Noor Shafryna; MURAD, Abdul Munir Abdul. Enzymatic hydrolysis of oil palm empty fruits bunch fiber using Celluclast® and Accellerase® BG for sugar production. In: **AIP Conference Proceedings**. AIP Publishing, 2016.

SANTOS, A. S. et al. Descrição de sistema e de métodos de extração de óleos essenciais e determinação de umidade de biomassa em laboratório. 2004.

SANTOS, B. L. et al. Antiproliferative, proapoptotic and morphogenic effects of the flavonoid rutin on human glioblastoma cells. **Food chemistry**, v. 127, n. 2, p. 404-411, 2011.

SANTOS, Fernanda Rodrigues dos et al. Yield of essential oil from varieties of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 45, p. e-496, 2023.

SANTOS, Francisco de Assis Ribeiro dos. **Scrophulariaceae do Brasil: morfologia polínica e suas implicações taxonômicas**. 1998. Tese (Doutorado) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1998.

SANTOS, Paulo Vinicius L. et al. Seasonal influence on volatile composition of *Psidium friedrichsthalianum* leaves, sampled in the brazilian Amazon. **Horticulturae**, v. 9, n. 7, p. 768, 2023.

SCATIGNA, André Vito et al. Phylogenetics of Gratioleae (Plantaginaceae): paraphyly of *Stemodia* and its implications for generic circumscriptions, with insights from floral evolution. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 200, n. 2, p. 194-217, 2022.

SCATIGNA, André Vito; MOTA, Nara Furtado de Oliveira. Flora of the cangas of Serra dos Carajás, Pará, Brazil: Plantaginaceae. **Rodriguésia**, v. 68, n. 3spe, p. 1077-1083, 2017.

SENTHIL KUMAR, K.; PATNAIK, Archita. Intramolecular electronic communication in a dimethylaminoazobenzene–fullerene C60 dyad: An experimental and TD-DFT study. **Journal of computational chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1182-1194, 2010.

SERDAROĞLU, GONCAGÜL; ELIK, MUSTAFA. DFT based quantum chemical descriptors of 1-substituted TH β C, DH β C, β C derivatives. **Cumhuriyet Science Journal**, v. 38, n. 4, 2017.

SERUDO, Rafaela Noel et al. Acúmulo de matéria seca e rendimento de óleo da planta *Otacanthus azureus* em função da luminosidade e adubação nitrogenada. **Scientia Plena**, v. 9, n. 11, 2013.

SHALA, Awad Y.; GURURANI, Mayank Anand. Phytochemical properties and diverse beneficial roles of *Eucalyptus globulus* Labill.: a review. **Horticulturae**, v. 7, n. 11, p. 450, 2021.

SHARMA, Mansi et al. Essential oils as anticancer agents: Potential role in malignancies, drug delivery mechanisms, and immune system enhancement. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 146, p. 112514, 2022.

SHARMA, Neeta; TRIPATHI, Abhishek. Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogens. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 22, p. 587-593, 2006.

SHARMEEN, Jugreet B. et al. Essential oils as natural sources of fragrance compounds for cosmetics and cosmeceuticals. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 666, 2021.

SHOLL, David S.; STECKEL, Janice A. **Density functional theory: a practical introduction**. John Wiley & Sons, 2022.

SILVA, Audrey RST et al. Leishmanicidal activity and structure-activity relationships of essential oil constituents. **Molecules**, v. 22, n. 5, p. 815, 2017.

SILVA, Bruno IM et al. Anticancer activity of monoterpenes: A systematic review. **Molecular Biology Reports**, v. 48, p. 5775-5785, 2021.

SILVA, Bruno Iraquitán Miranda da. *Atividade antitumoral de mono e sesquiterpenos*. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas, Recife, 2022.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J.; BASSLER, G. C. *Spectrometric Identification of Organic Compounds*. 8. ed. Hoboken: Wiley, 2015.

SILVESTRE, Armando JD et al. Analysis of the variation of the essential oil composition of *Eucalyptus globulus* Labill. from Portugal using multivariate statistical analysis. **Industrial Crops and Products**, v. 6, n. 1, p. 27-33, 1997.

ŞİMŞEK, Derya et al. Partial Replacement of NaCl by KCl, MgCl₂ and CaCl₂ Chloride Salts in the Production of Sucuk: Effects on Volatile Compounds, Lipid Oxidation, Microbiological and Sensory Properties. **Foods**, v. 12, n. 19, p. 3525, 2023.

SINDHU, M. S.; POONKOTHAI, M.; THIRUMALAISAMY, R. Phenolic and terpene compounds from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Act as promising hepatic anticancer agents screened through in silico and in vitro approaches. **South African Journal of Botany**, v. 149, p. 145-159, 2022.

SINGH, Priyanka et al. Chemical profile, antifungal, antiaflatoxigenic and antioxidant activity of *Citrus maxima* Burm. and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their cyclic monoterpene, DL-limonene. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 6, p. 1734-1740, 2010.

SINGH, Ruby et al. An assessment of the physicochemical characteristics and essential oil composition of *Mentha longifolia* (L.) Huds. exposed to different salt stress conditions. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1165687, 2023.

SINGH, Sarika et al. Plant-derived smoke water and karrikinolide (KAR1) enhance physiological activities, essential oil yield and bioactive constituents of *Mentha arvensis* L. **Frontiers in Plant Science**, v. 14, p. 1129130, 2023.

SNEHA, E. et al. Experimental and quantum chemical investigation of bio-fuels/lubricants for its oxidative stability. **Journal of Molecular Liquids**, v. 340, p. 117292, 2021.

SOUSA, Rita O. et al. Collagen from Atlantic cod (*Gadus morhua*) skins extracted using CO₂ acidified water with potential application in healthcare. **Journal of Polymer Research**, v. 27, n. 3, p. 73, 2020.

SOUZA, Ana Valéria Vieira de et al. **Bioprospecção de plantas da Caatinga com potencial para produção de fitomedicamentos**. 2022.

SOUZA, Vinicius Castro; GIULIETTI, Ana Maria. Levantamento das espécies de Scrophulariaceae *sensu lato* nativas do Brasil. **Pesquisas, Botânica**, v. 60, p. 7-288, 2009.

SRINIVASAN, Bharath. A guide to the Michaelis–Menten equation: steady state and beyond. **The FEBS journal**, v. 289, n. 20, p. 6086-6098, 2022.

TAIWO, E. A. et al. Influence of Enzymatic Pretreatment and Optimization on Hydro Distillation Recovery of Essential Oils from *Allium cepa*. **Chemistry Africa**, v. 7, n. 3, p. 1223-1233, 2024.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. *Fisiologia Vegetal* 5^o ed. -Porto Alegre, Artmed, 2013.

TANDON, Hiteshi; CHAKRABORTY, Tanmoy; SUHAG, Vandana. A scale of atomic electronegativity in terms of atomic nucleophilicity index. **Foundations of Chemistry**, v. 22, p. 335-346, 2020.

TEALE, Andrew M. et al. DFT exchange: sharing perspectives on the workhorse of quantum chemistry and materials science. **Physical chemistry chemical physics**, v. 24, n. 47, p. 28700-28781, 2022.

TREVIZAN, Lucas Noboru Fatori et al. Anti-inflammatory, antioxidant and anti-*Mycobacterium tuberculosis* activity of viridiflorol: The major constituent of *Allophylus edulis* (A. St.-Hil., A. Juss. & Cambess.) Radlk. **Journal of ethnopharmacology**, v. 192, p. 510-515, 2016.

TRUONG, C. B. H. et al. Microencapsulation of corn mint (*Mentha arvensis* L.) essential oil using spray-drying technology. **Food Res**, v. 6, n. 4, p. 154-160, 2022.

TURKEZ, H.; TOĞAR, B.; AYDIN, S.; YANARDAĞ, R.; ASLAN, A. Protective effects of cyclosativene on H₂O₂-induced injury in cultured rat primary cerebral cortex cells. **Cytotechnology**, v. 67, p. 299-309, 2015.

UDAYAPPAN, V. et al. Experimental and theoretical vibrational analysis, structural conformations, DFT estimations, antibacterial, antifungal, DPPH, H₂O₂, Nitric oxide

scavenging activity drug, in silico molecular docking, and ADMET studies of N-(2-carboxyphenyl) phthalimide (CPPD). **Journal of Molecular Liquids**, p. 126119, 2024.

UGODI, Gerald W. et al. Reactivity indexes of antioxidant molecules from *Psorospermum febrifugum*. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 12, n. 3, p. 14-18, 2023.

URBANIĄK, Alicja; SZELĄG, Małgorzata; MOLSKI, Marcin. Theoretical investigation of stereochemistry and solvent influence on antioxidant activity of ferulic acid. **Computational and Theoretical Chemistry**, v. 1012, p. 33-40, 2013.

VALGIMIGLI, Luca. Lipid Peroxidation and Antioxidant Protection. **Biomolecules**, v. 13, n. 9, p. 1291, 2023.

VALGIMIGLI, Luca; PRATT, Derek A. Antioxidants in chemistry and biology. **Encyclopedia of radicals in chemistry, biology and materials**, 2012.

VANDER HEIDEN, Matthew G. et al. Outer mitochondrial membrane permeability can regulate coupled respiration and cell survival. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 97, n. 9, p. 4666-4671, 2000.

VIEIRA, Wedja Timoteo et al. Activated carbon from macauba endocarp (*Acrocomia aculeate*) for removal of atrazine: Experimental and theoretical investigation using descriptors based on DFT. **Journal of Environmental Chemical Engineering**, v. 9, n. 2, p. 105155, 2021.

VITALE, Roberta; MARZOCCO, Stefania; POPOLO, Ada. Role of oxidative stress and inflammation in doxorubicin-induced cardiotoxicity: a brief account. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 25, n. 13, p. 7477, 2024.

WAINER, Jessie et al. Extraction of essential oils from *Lavandula* × *intermedia* ‘Margaret Roberts’ using steam distillation, hydrodistillation, and cellulase-assisted hydrodistillation: Experimentation and cost analysis. **Plants**, v. 11, n. 24, p. 3479, 2022.

WALCZAK, Henning; KRAMMER, Peter H. The CD95 (APO-1/Fas) and the TRAIL (APO-2L) apoptosis systems. **Experimental cell research**, v. 256, n. 1, p. 58-66, 2000.

WAMAN, Ajit Arun; BOHRA, Pooja; SOUNDERARAJAN, Aarthi. Propagule size affects yield and quality of *Curcuma mangga* Val. et Zijp.: An important medicinal spice. **Industrial Crops and Products**, v. 124, p. 36-43, 2018.

WANG, Chen-Wei et al. Enzyme-assisted extraction of essential oil from *Cinnamomum longepaniculatum* (Gamble) N. Chao ex HW Li and anxiolytic activity. **Chemical Papers**, v. 78, n. 7, p. 4567-4582, 2024.

WANG, Danli et al. Ultrasound-assisted aqueous enzymatic extraction of gardenia fruits (*Gardenia jasminoides* Ellis) oil: Optimization and quality evaluation. **Industrial Crops and Products**, v. 191, p. 116021, 2023.

WILD, Christopher P.; WEIDERPASS, E.; STEWART, Bernard W. World cancer report: cancer research for cancer prevention. International Agency for Research on Cancer. **World Health Organization: Geneva, Switzerland**, 2020.

WITKOSKI, Antônio Calos. **Terras, Florestas e Águas de Trabalho: As formas de uso dos recursos naturais nas várzeas amazônicas**. Valer Editora, 2023.

WOJTUNIK-KULESZA, Karolina A. Approach to optimization of FRAP methodology for studies based on selected monoterpenes. **Molecules**, v. 25, n. 22, p. 5267, 2020.

WRIGHT, James S.; JOHNSON, Erin R.; DILABIO, Gino A. Predicting the activity of phenolic antioxidants: theoretical method, analysis of substituent effects, and application to major families of antioxidants. **Journal of the American Chemical Society**, v. 123, n. 6, p. 1173-1183, 2001.

XINHUI, L. I. U. et al. Effect of tea polyphenols on antioxidant and processing characteristics of Maillard reaction products of peanut protein. **Journal of Henan University of Technology (Natural Science Edition)**, v. 44, n. 1, p. 36-43, 2023.

YAN, Min-Ren et al. Targeting open market with strategic business innovations: A case study of growth dynamics in essential oil and aromatherapy industry. **Journal of Open Innovation: Technology, Market, and Complexity**, v. 5, n. 1, p. 7, 2019.

YAP, Polly Soo Xi et al. Membrane disruption properties of essential oils—A double-edged sword? **Processes**, v. 9, n. 4, p. 595, 2021.

YATOO, Gulam N. et al. Gas chromatographic-mass spectrometric analysis, antibacterial, antioxidant and antiproliferative activities of the needle essential oil of *Abies pindrow* growing wild in Kashmir, India. **Microbial Pathogenesis**, v. 158, p. 105013, 2021.

YE, Rumeng et al. Extraction process optimization of essential oil from *Mellissa officinalis* L. using a new ultrasound-microwave hybrid-assisted Clevenger hydrodistillation. **Industrial Crops and Products**, v. 203, p. 117165, 2023.

YESHI, Karma; WANGCHUK, Phurpa. Essential oils and their bioactive molecules in healthcare. In: **Herbal biomolecules in healthcare applications**. Academic Press, 2022.

YIN, Huiyong; PORTER, Ned A. New insights regarding the autoxidation of polyunsaturated fatty acids. **Antioxidants & redox signaling**, v. 7, n. 1-2, p. 170-184, 2005.

YOUDIM, K. A.; DEANS, S. G.; FINLAYSON, H. J. The antioxidant properties of thyme (*Thymus zygis* L.) essential oil: an inhibitor of lipid peroxidation and a free radical scavenger. **Journal of Essential Oil Research**, v. 14, n. 3, p. 210-215, 2002.

YU, Fen et al. Effects of ultrasound and microwave pretreatments on hydrodistillation extraction of essential oils from Kumquat peel. **Food Science & Nutrition**, v. 9, n. 5, p. 2372-2380, 2021.

ZHANG, Gang; MUSGRAVE, Charles B. Comparison of DFT methods for molecular orbital eigenvalue calculations. **The journal of physical chemistry A**, v. 111, n. 8, p. 1554-1561, 2007.

ZHANG, Lu-Lu et al. Antidepressant-like effect of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oil and its main component limonene on mice. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 67, n. 50, p. 13817-13828, 2019.

ZHANG, Xiaonan et al. The preparation of the essential oil from pomelo (*Citrus maxima* 'Shatian Yu') peel using microwave-assisted distillation by pectinase soaking and its anti-fungal activity. **Separations**, v. 9, n. 7, p. 161, 2022.

ZHANG, Xinhui et al. Emerging chitosan-essential oil films and coatings for food preservation- A review of advances and applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 273, p. 118616, 2021.

ZHANG, Y.-H. P.; HIMMEL, M. E.; MIELENZ, J. R. Outlook for cellulase improvement: screening and selection strategies. **Biotechnology advances**, v. 24, n. 5, p. 452-481, 2006.

ZHU, Guozhi et al. Lignin-derived polyphenols with enhanced antioxidant activities by chemical demethylation and their structure-activity relationship. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 237, p. 124030, 2023.

ZOCHEDH, Azar et al. Investigation on structural, spectroscopic, DFT, biological activity and molecular docking simulation of essential oil Gamma-Terpinene. **Journal of Molecular Structure**, v. 1268, p. 133651, 2022.

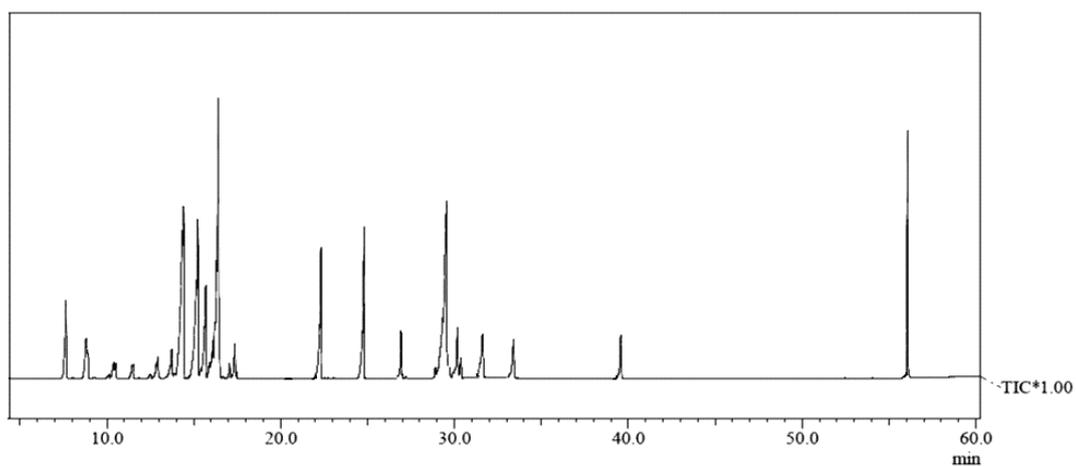
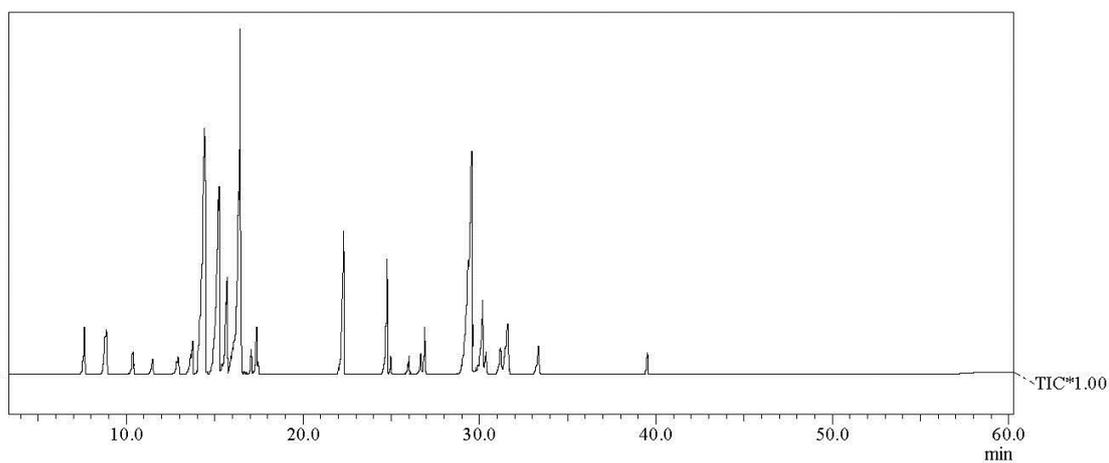
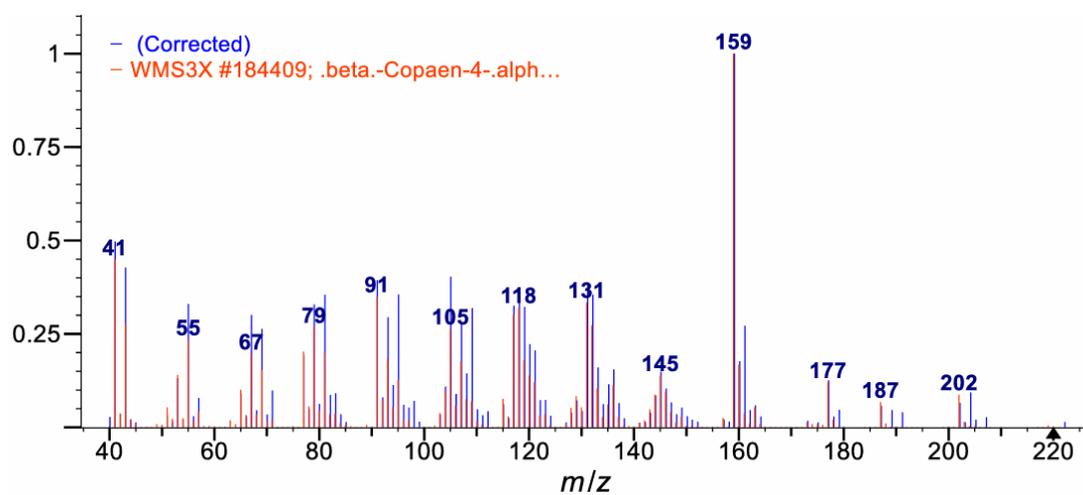
ANEXOS

Anexo 1: Dados climáticos da cidade de Manaus em 2023

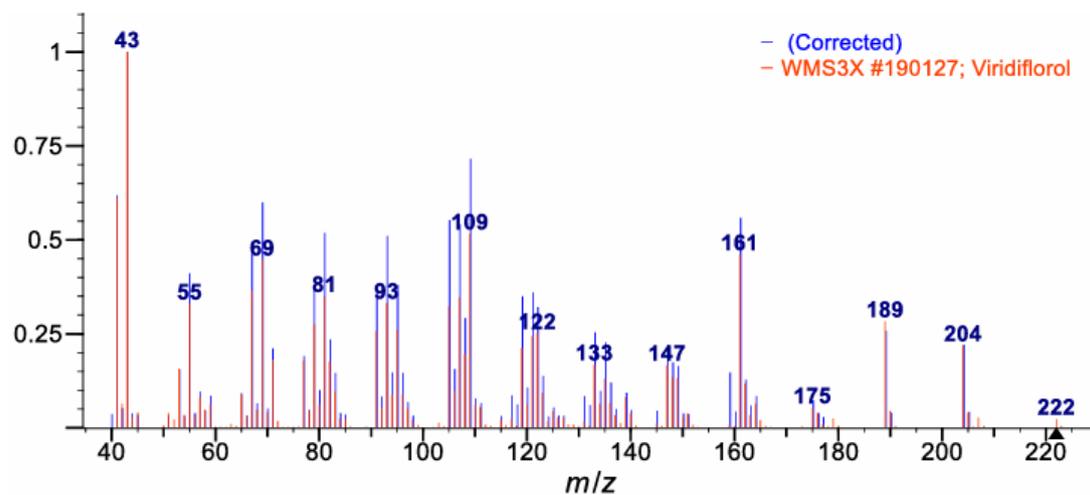
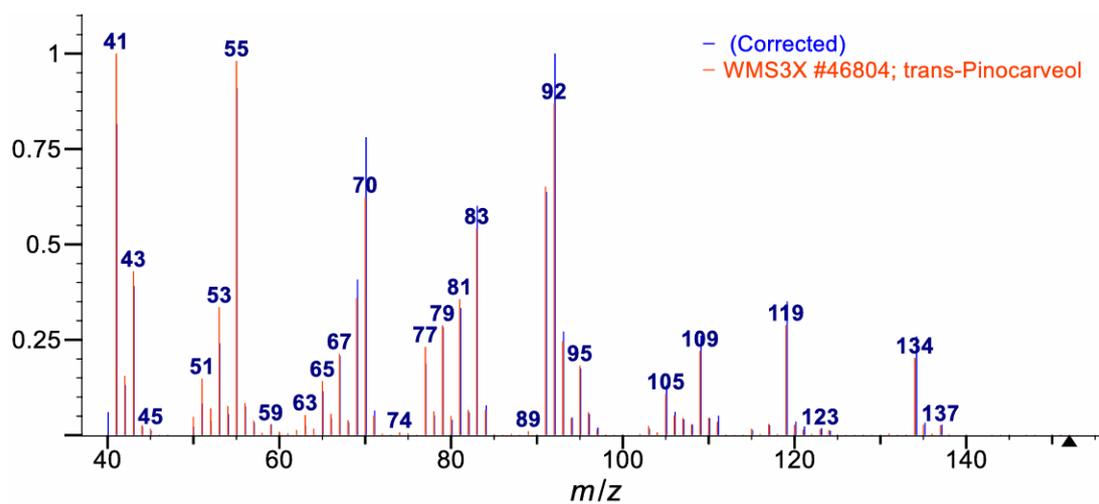
Ano	Mês	Precipitação Total (mm)	Temperatura Máxima (°C)	Umidade (%)	Radiação Global (Kj/m ²)
2022	Janeiro	0,425981055	27,30270636	80,73612991	558,0434371
2022	Fevereiro	0,461921708	27,01921708	82,39288256	531,2886833
2022	Março	0,48117702	26,83110696	83,37505838	522,5647828
2022	Abril	0,514195804	26,84751748	83,5513986	519,1403846
2022	Mai	0,443087174	27,01488062	82,44031094	529,2707385
2022	Junho	0,403750868	27,05262792	81,79022922	536,5004168
2022	Julho	0,350465254	27,3571372	80,02989507	555,4585627
2022	Agosto	0,311770797	27,6365378	78,32550915	576,3720228
2022	Setembro	0,278869779	27,94609951	76,80113636	592,1259367
2022	Outubro	0,272060648	28,08843556	76,12074431	602,2450861
2022	Novembro	0,259902047	28,15614167	75,75709621	606,6010800
2022	Dezembro	0,281495112	28,13659995	76,21900161	607,0407936
2023	Janeiro	0,374068966	26,43972414	86,67724138	515,1800000
2023	Fevereiro	0,453740015	26,46928105	87,26724764	526,6848947
2023	Março	0,490995261	26,67279621	87,02748815	528,9925592
2023	Abril	0,464962726	26,90134943	86,44389205	537,0014554
2023	Mai	0,402339181	27,22435219	85,63137364	532,1568042
2023	Junho	0,349613674	27,43445772	84,40056219	521,7931317
2023	Julho	0,311665005	27,43445772	84,40056219	521,7931317
2023	Agosto	0,274526828	28,23800591	80,37675873	543,9511992
2023	Setembro	0,250818659	28,58671199	78,70720025	563,6922399
2023	Outubro	0,237890354	28,87240039	77,41149521	577,5032222
2023	Novembro	0,233552299	29,01432904	76,92330048	583,7832512
2023	Dezembro	0,251250579	28,93919388	77,58744498	576,5646623

Valores médios das variáveis climáticas durante o período de colheita de *M. azurea*.

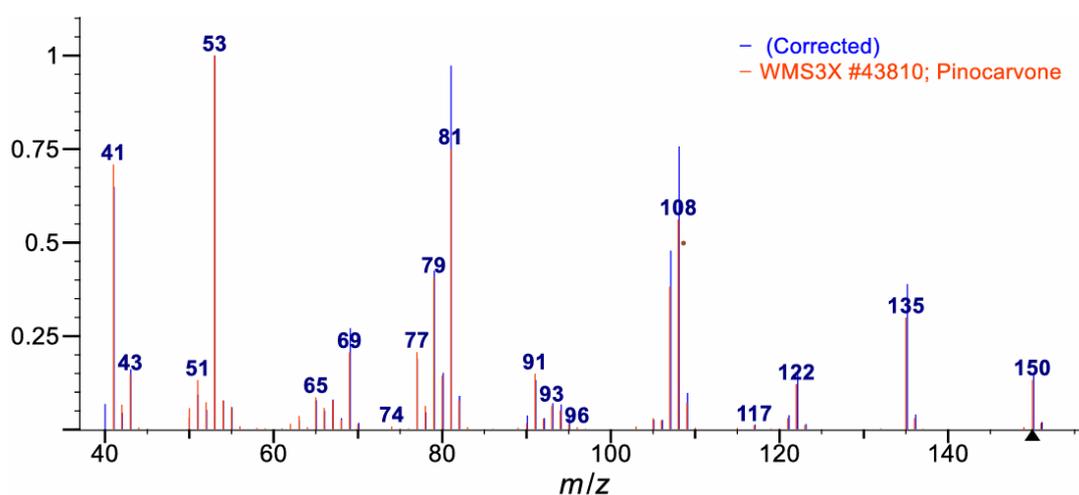
Fonte: Elaboração do autor a partir dos dados do INMET.

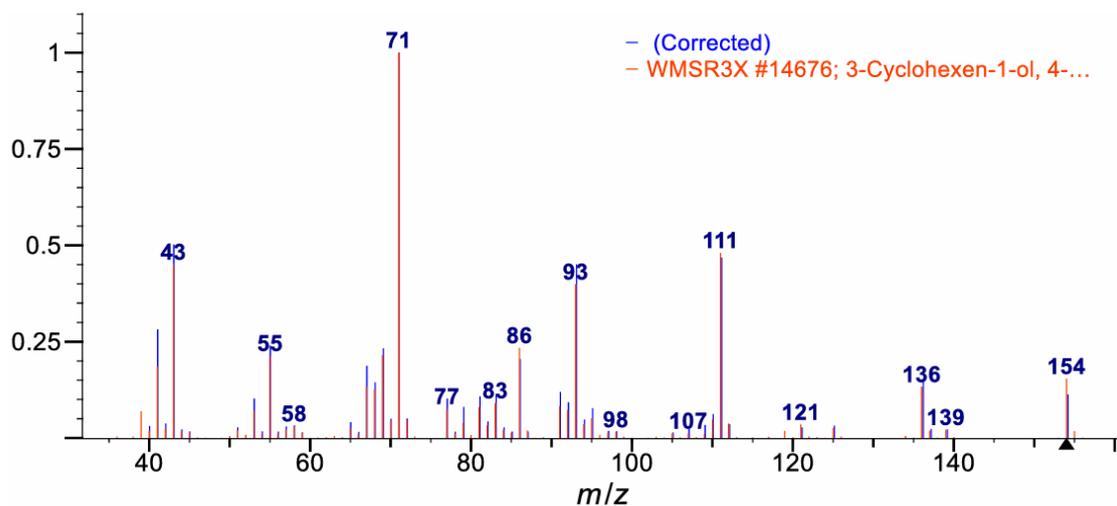
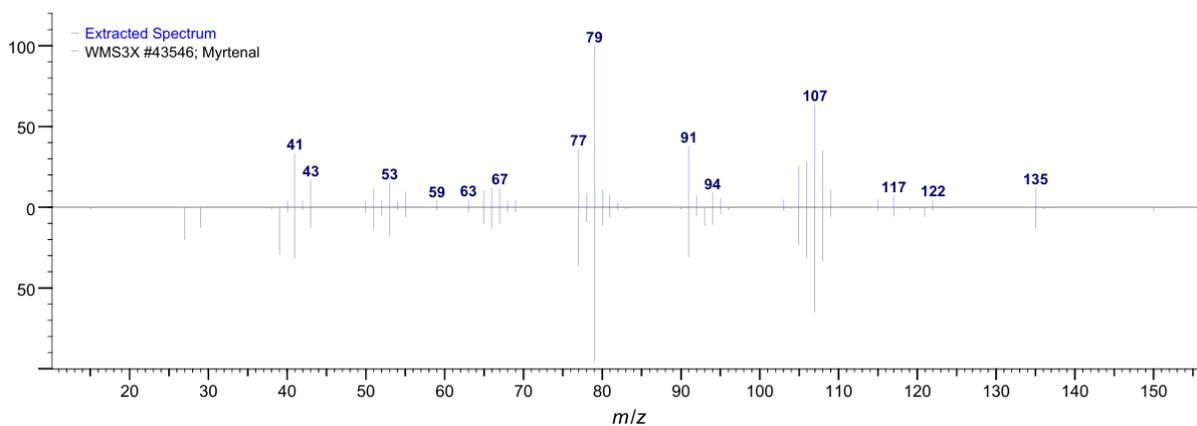
Anexo 2: Cromatograma do óleo essencial da parte aérea de *M. azurea***Anexo 3:** Cromatograma do óleo essencial das folhas de *M. azurea***Anexo 3:** Espectro do β -copaen-4 α -ol

Anexo 4: Espectro do viridiflorol

Anexo 5: Espectro do *trans*-pinocarveol

Anexo 6: Espectro do Pinocarvona



Anexo 7: Espectro do (-)-Terpinen-4-ol**Anexo 8:** Espectro do Mirtenal**Anexo 9:** Coordenadas da molécula β -copaen-4 α -ol usadas no arquivo INP

* xyz 0 1

C	1.63881	0.90046	-0.01604
C	2.36250	0.05512	1.03621
C	3.46676	0.91071	1.67939
C	2.90025	-1.31173	0.52935
C	1.81312	-2.27113	-0.05885
C	0.98691	-3.02971	0.99199
C	0.46331	-4.31943	0.41987
C	-0.84705	-4.58322	0.30427
C	1.52487	-5.28178	-0.06134
C	2.84309	-4.58013	-0.42442
C	2.58504	-3.20771	-1.04832
C	3.82140	-2.41388	-1.45213
C	3.93470	-1.20452	-0.56802
C	3.60861	-1.03218	-2.03250
C	5.05477	-3.15991	-1.86301
O	3.57214	-1.96937	1.61275
H	1.25598	1.82312	0.43530
H	0.77754	0.37932	-0.44084
H	2.30753	1.19264	-0.83102
H	1.63790	-0.15563	1.83500
H	4.22815	1.19925	0.94742

H	3.96293	0.38054	2.49815
H	3.04480	1.83057	2.09946
H	1.11659	-1.69868	-0.68386
H	0.17426	-2.38340	1.34549
H	1.57486	-3.28487	1.88003
H	-1.60163	-3.87764	0.63794
H	-1.19940	-5.51608	-0.12594
H	1.15806	-5.81927	-0.94500
H	1.72358	-6.03034	0.71460
H	3.40651	-5.22353	-1.11016
H	3.46379	-4.47568	0.47455
H	1.97273	-3.35633	-1.94886
H	4.91172	-0.89638	-0.21815
H	4.37904	-0.60795	-2.66819
H	2.60824	-0.74407	-2.33276
H	5.44902	-3.75181	-1.03094
H	5.85197	-2.48160	-2.18639
H	4.83253	-3.83297	-2.69718
H	3.05619	-1.82833	2.42321

*

Anexo 10: Coordenadas da molécula Viridiflorol usadas no arquivo INP

* xyz 0 1

C	0.52838	0.60723	-0.41375
C	2.01373	0.37151	-0.17334
H	2.17201	-0.69601	-0.01607
C	2.50870	1.07726	1.08797
C	4.00814	1.16795	0.86176
C	4.10918	1.62585	-0.60357
H	3.82885	2.69244	-0.57100
C	2.90591	0.90627	-1.31409
H	2.34920	1.68843	-1.85023
C	3.34443	-0.07269	-2.35620
H	3.57762	0.50120	-3.25153
C	4.30576	-1.11321	-1.84457
H	4.25720	-1.44769	-0.81148
C	3.14125	-1.55460	-2.70450
C	3.41924	-1.96831	-4.13328
C	2.03468	-2.36067	-2.07469
C	5.71634	-0.82753	-2.21616
C	6.28753	0.22874	-1.26081
C	5.55995	1.60063	-1.19125
C	5.64443	2.34199	-2.53332
O	6.36484	2.41775	-0.30402
H	0.30226	1.67555	-0.49993
H	-0.06404	0.20547	0.41487
H	0.19684	0.12006	-1.33524
H	2.26444	0.51808	1.99651
H	2.07621	2.08103	1.17979
H	4.47287	0.18862	1.01403
H	4.46780	1.87873	1.55526
H	4.14264	-1.31402	-4.62965
H	2.49522	-1.94032	-4.72065
H	3.81557	-2.98875	-4.16144
H	2.18024	-2.51686	-1.00317
H	1.98398	-3.36079	-2.52044
H	1.06752	-1.87865	-2.24152
H	5.81625	-0.48810	-3.25248
H	6.30452	-1.74818	-2.12918
H	7.33710	0.40226	-1.53684

H	6.34153	-0.19791	-0.25047
H	5.14794	1.82711	-3.35486
H	6.69175	2.49153	-2.82337
H	5.21039	3.34536	-2.44961
H	6.49277	1.92861	0.52613

*

Anexo 11: Coordenadas da molécula *trans*-pinocarveol usadas no arquivo INP

* xyz 0 1

C	0.81078	-0.16656	0.32212
C	2.29300	-0.13402	-0.09854
C	3.14040	1.05632	0.52493
H	2.58490	1.98925	0.66781
C	3.27355	0.16233	1.79609
C	3.25460	-1.03844	0.78642
H	2.81100	-1.95716	1.18443
C	4.60701	-1.23296	0.15593
C	4.98974	-2.45945	-0.22878
C	5.40000	0.03374	-0.08962
H	5.97674	-0.03411	-1.01882
C	4.51650	1.30391	-0.12816
O	6.34367	0.17702	0.97195
C	2.34728	-0.30939	-1.62171
H	0.65941	-0.04959	1.39801
H	0.35215	-1.11932	0.03463
H	0.25487	0.63879	-0.17089
H	2.42713	0.20192	2.49017
H	4.17372	0.29442	2.40452
H	4.36395	-3.33164	-0.06372
H	5.94128	-2.62236	-0.72612
H	4.36479	1.62262	-1.16591
H	5.01832	2.13214	0.38677
H	6.70169	-0.70792	1.15512
H	1.79882	0.49718	-2.12103
H	1.88967	-1.26058	-1.91601
H	3.36168	-0.30418	-2.02761

*

Anexo 12: Coordenadas da molécula Mirtenal usadas no arquivo INP

* xyz 0 1

C	-3.65976	0.94568	0.08303
C	-2.13533	1.08823	-0.01900
C	-1.35236	-0.02047	-0.85180
C	-2.03060	-0.47278	-2.16399
C	-2.48013	0.74810	-2.94394
C	-2.26710	1.98438	-2.44977
C	-1.54464	2.06482	-1.13437
C	-0.30185	1.09969	-1.15416
C	-2.71321	3.19043	-3.17830
O	-2.53205	4.32361	-2.75119
C	-1.60064	1.33616	1.40573
H	-4.15211	0.75507	-0.87277
H	-4.10387	1.85901	0.49461
H	-3.92354	0.11443	0.74662
H	-0.97418	-0.86583	-0.26799
H	-2.89239	-1.11176	-1.94473
H	-1.32615	-1.05316	-2.76982
H	-2.98697	0.58428	-3.89011
H	-1.33100	3.08576	-0.80515
H	0.44687	1.27513	-0.37519
H	0.24603	1.01518	-2.09962

H	-3.22500	3.00856	-4.13800
H	-1.85947	0.49835	2.06288
H	-2.04323	2.24574	1.82716
H	-0.51591	1.45724	1.45312

*

Anexo 13: Coordenadas da molécula Pinocarvona usadas no arquivo INP

* xyz 0 1

C	0.87242	-0.18564	0.43803
C	2.37164	-0.16926	0.08050
C	3.20215	1.00318	0.75649
C	3.27772	0.08705	2.01894
C	3.27733	-1.10434	0.99669
C	4.66107	-1.30832	0.46027
C	5.20242	-2.52704	0.35115
C	5.40719	-0.06711	0.05285
O	6.55925	-0.09957	-0.36614
C	4.61781	1.23090	0.18973
C	2.48855	-0.32213	-1.44098
H	0.67892	-0.08255	1.50870
H	0.41248	-1.12694	0.11690
H	0.34932	0.63543	-0.06486
H	2.65789	1.94258	0.89737
H	2.41058	0.13105	2.68629
H	4.16644	0.19720	2.65050
H	2.79634	-2.01899	1.35845
H	4.66586	-3.42264	0.64491
H	6.20891	-2.65698	-0.03935
H	4.55233	1.70192	-0.79656
H	5.17637	1.89619	0.85737
H	1.96689	0.49601	-1.95023
H	2.03658	-1.26510	-1.76846
H	3.51798	-0.31782	-1.80585

*