



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CENTRO DE CIÊNCIA DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

JULIANA DE SOUSA FIGUERÊDO

Estudo fitoquímico e potencial biológico de *Origanum vulgare* (orégano)

TERESINA

2019

JULIANA DE SOUSA FIGUERÊDO

Estudo fitoquímico e potencial biológico de *Origanum vulgare* (orégano)

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química da Universidade Federal do Piauí, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pelo Programa de Pós-graduação em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica.

Orientadora: Profa. Dra. Chistiane Mendes Feitosa

TERESINA

2019

Dissertação de autoria de Juliana de Sousa Figuerêdo, sob o título "**Estudo fitoquímico e potencial biológico de *Origanum vulgare* (orégano)**", apresentada à Universidade Federal do Piauí, para obtenção do título de Mestre em Química pelo Programa de Pós-graduação Química, na área de Química Orgânica, aprovado em 28 de fevereiro de 2019 pela comissão julgadora constituída pelos doutores:

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dr^a. Chistiane Mendes Feitosa (Orientadora)

Departamento de Química – UFPI

Profa. Dr^a. Sâmya Danielle Lima Freitas (membro interno/UFPI)

Departamento de Química – UFPI

Profa. Dr^a. Veruska Cavalcanti Barros (membro extreno/UFPI)

Departamento da Farmácia – UFPI

Prof. Dr^o José Milton Elias de Matos (Suplente/UFPI)

Departamento de Química – UFPI

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ

REITOR

Prof. Dr. José de Arimatéia Dantas Lopes

VICE-REITORA

Profa. Dr^a. Nadir do Nascimento Nogueira

DIRETOR DO CENTRO DE CIÊNCIAS DA NATUREZA

Prof. Dr. Edmilson Miranda de Moura

COORDENADOR GERAL DOS PROGRAMAS DE PÓS-GRADUAÇÃO DA UFPI

Prof. Dr. Welter Cantanhêde da Silva

COORDENADOR DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA - UFPI

Prof. Dr. José Milton Elias de Matos

AGRADECIMENTOS

Deus, por tudo, meu centro. Por Sua destra que me sustenta em todo o tempo. Por sempre me surpreender com seu favor. Por ter me sustentado até aqui e saber que serei conduzida até o fim, pois Sua presença é constante em cada passo meu. Por ser um Deus que prover-me o que preciso; Por guiar-me quando não sei por aonde ir.

Aos meus amados e queridos pais pelo colo, conselhos pelo eixo e pelos valores que modela o meu caráter. Por sempre estarem me apoiando e confiando em meus sonhos. E, a cada dia me ensinarem o caminho das pedras. Meus presentes! Em especial, a minha mãe, por ser a minha maior incentivadora e apoiadora em tudo que proponho fazer, amo a senhora demais vezes um bilhão!!! A minha irmã, Mandinha, por sempre ser prestativa e amável comigo, te admiro, lindona! Aos meus familiares pelo apoio presente em cada etapa da minha vida.

Aos meus avós que tanto amo, Dona Zizi e Seu Ciro, pela admiração e incentivo aos estudos e por sempre ficarem felizes com a minha felicidade, amor de Deus!

A professora Chistiane, pela confiança em mim depositada. Por me orientar e auxiliar, para conclusão desse trabalho, tão gratificante e enriquecedor, muito obrigada, professora!

Aos meus queridos amigos que estão presentes em minha vida, que ficam felizes com minha felicidade e que sempre têm uma palavra amiga para me confortar, amo cada um Luh, Lili (Lildes), Maelson e Natália.

Aos amigos do LAPNNEX, Felipe, um amigo singular e único, que Deus me apresentou, amo vc, amigo, me ajudou desde o primeiro dia, super prestaivo, atencioso e dedicado, Layanna, uma amiga que com ela não tem trabalho ruim que não possa sair um artigo, uma grande pesquisadora! E aos demais, que fizeram parte dessa caminhada que para mim foi mais que gratificante, foi uma bênção!

Aos meus queridos amigos, Seu Ari e Seu Francisco, que sempre estão lá ajudando, sorrindo, dando um bom dia, com uma alegria única, foi um prazer conhecê-los. Muito obrigada a todos pelos ensinamentos, conversas, conselhos e disponibilidade;

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
1.1 Plantas medicinais	16
1.2 Óleo essencial da espécie <i>Origanum vulgare</i>	17
1.3 Família Lamiaceae	18
1.4 <i>Origanum vulgare</i> (Orégano)	18
1.4.1 Estudos biológicos	20
1.4.1.1 Atividade antibacteriana	20
1.4.1.2 Atividade antioxidante	22
1.4.1.3 Atividade Larvicida	23
1.5 <i>Aedes aegypti</i>	23
2 OBJETIVOS	26
2.1 Objetivo geral	26
2.2 Objetivos específicos	26
3 MATERIAIS E MÉTODOS	27
3.1 Material vegetal	27
3.2 Procedimentos gerais	27
3.2.1 Reagentes, solventes e equipamentos	27
3.2.2 Cromatografia em coluna e em camada delgada	27
3.2.3 Solução reveladora de sulfato cérico (Ce(SO₄)₂)	27
3.2.4 Análise do óleo essencial das folhas secas de <i>O. vulgare</i> por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	28
3.2.4.1 Análise da fração DCM de <i>O. vulgare</i> por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)	28
3.2.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)	29
3.2.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)	29
3.3 Obtenção do extrato, das frações e do óleo essencial das folhas secas de <i>O. vulgare</i>	29
3.3.1 Obtenção do extrato etanólico e frações das folhas secas de <i>O. vulgare</i>	29
3.3.2 <i>Screening</i> fitoquímico do extrato etanólico (EtOH) das folhas secas de <i>O. vulgare</i> para identificação de metabólitos secundários	30
3.3.3 Análise cromatográfica em camada delgada do extrato e das frações da partição do extrato EtOH das folhas secas de <i>O. vulgare</i>	30
3.3.3.1 Fracionamento cromatográfico da fração diclorometano (DCM)	31

3.3.3.1.2 Subfrações (SF1; SF2e SF3) da fração diclorometano (DCM).....	31
3.4 Extração do óleo essencial das folhas secas de <i>O. vulgare</i>	33
3.5 Ensaios biológicos do óleo essencial e do extrato EtOH das folhas secas de <i>O.vulgare</i>	33
3.5.1 Atividade anticolinesterásica	33
3.5.1.1 Atividade inibitória qualitativa da enzima acetilcolinesterase (AChE)	33
3.5.1.2 Atividade inibitória quantitativa da enzima acetilcolinesterase (AChE) por microplacas	34
3.5.2 Atividade antioxidante com 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)	35
3.5.3 Atividade Larvicida frente as larvas do <i>Aedes aegypti</i>	36
3.6 Análise estatística.....	36
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
4.1 <i>Screening</i> fitoquímico	37
4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)	37
4.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência do extrato EtOH e das frações HEX; DCM; AcOEt e MeOH de <i>O. vulgare</i>	37
4.3 Identificação dos constituintes da fração diclorometano	39
4.3.1 Composição química da fração DCM sililada das folhas secas de <i>O. vulgare</i> por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM).....	39
4.5 Análise da Atividade antioxidante do óleo essencial de <i>O. vulgare</i>	51
4.6 Atividade anticolinesterásica (AChE).....	53
4.7 Atividade larvicida do OE de <i>O. Vulgare</i> frente às larvas <i>Aedes aegypti</i>	58
5 Conclusão	60
REFERÊNCIAS	62

LISTAS DE FIGURAS

Figura 1 - Destaque de uma espécie de <i>O. vulgare</i>	19
Figura 2 - Estruturas químicas dos principais constituintes do óleo essencial de <i>O. vulgare</i>	20
Figura 3 - Fluxograma do procedimento para obtenção do extrato EtOH e as frações das folhas secas de <i>O.vulgare</i>	30
Figura 4 - Cromatograma da amostra do extrato EtOH de <i>O. vulgare</i> obtido via cromatografia líquido de alta eficiência, utilizando como solvente de arraste acetonitrila (MeCN); $\lambda = 254$ nm	38
Figura 5: Cromatograma da amostra do extrato EtOH de <i>O. vulgare</i> obtido via cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando como solvente de arraste metanol (MeOH); $\lambda = 254$ nm	38
Figura 6: Cromatograma das frações HEX; DCM; AcOEt e MEOH a partir do extrato EtOH de <i>O. vulgare</i> obtido via cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando como solvente de arraste MEOH ; $\lambda = 254$ nm	39
Figura 7 – Cromatograma de íons totais da fração DCM	41
Figura 8 – Estruturas dos constituintes identificados na fração diclorometano sililada por CG-EM	42
Figura 9 – Rearranjo de McLaffert derivados de ésteres etílicos	43
Figura 10 – Clivagem (quebra) γ carbonila	43
Figura 11 – Espectro de massa do composto palmitato etila	43
Figura 12 – Principais fragmentos propostos para o palmitato de etila	43

Figura 13 – Espectro de massa do composto linoleato de etila	44
Figura 14 – Principais fragmentos propostos para o linoleato de etila	44
Figura 15 – Espectro de massa do composto timol-trimetilsilil	45
Figura 16– Proposta de fragmentação do timol-trimetilsilil (Timol TMS)	45
Figura 17 – Espectro de massa do composto Isopulego-trimetilsilil (Isopulegol TMS)	46
Figura 18 – Proposta de fragmentação do isopulegol trimetilsilil (Isopulegol TMS)..	46
Figura 19 – Espectro de RMN de ^{13}C da mistura da SF1 (CDCl_3 , 400MHz)	47
Figura 20 – Espectro de RMN de ^{13}C da mistura da SF1 (CDCl_3 , 400MHz).....	48
Figura 21 – Espectro de RMN de ^1H da mistura da SF1 (CDCl_3 , 100MHz)	49
Figura 22 – Espectro de DEPT da mistura da SF1 (CDCl_3 , 400MHz)	49
Figura 23 – Estruturas dos compostos identificados no OEEV por CG-EM	50
Figura 24 – Reação de redução do radical DPPH frente a um composto antioxidante (HA))	52
Figura 25 – Reação de atividade enzimática da AChE	54
Figura 26 – Cromatoplasmas do ensaio qualitativo de inibição da enzima AChE do extrato e frações e óleo essencial de <i>O. vulgare</i>	55

LSTAS DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Atividade antioxidante do OEOV usando o DPPH	52
Gráfico 2 – Atividade Anticolinesterásica do OEOV utilizando a Rivastigmina (Exelon [®]) como controle positivo	57
Gráfico 3: Atividade anticolinesterásica do extrato EtOH utilizando a Rivastigmina (Exelon [®]) como controle positivo	58
Gráfico 4: Análise estatística da atividade larvicida do O.E de 24 h	58
Gráfico 5: Análise estatística da atividade larvicida do O.E de 48 h	58

LISTAS DE TABELAS

Tabela 1 - Tratamento cromatográfico da fração DCM das folhas secas de <i>O. vulgare</i>	32
Tabela 2 – Screening fitoquímico do extrato etanólico de <i>O. vulgare</i>	37
Tabela 3 – Constituintes químicos identificados na fração diclorometano sililada por CG-EM	41
Tabela 4: Composição química do óleo essencial de <i>O. vulgare</i>	50
Tabela 5: Atividade antioxidante para o óleo essencial de <i>O. vulgare</i> , utilizando DPPH, comparado a análises da Vitamina C, com as respectivas concentrações	52
Tabela 6: Valores da média e do erro padrão da média (EPM) de cada concentração para o OE para o <i>O. vulgare</i>	57
Tabela 7: Valores da média e do erro padrão da média (EPM) de cada concentração para o extrato EtOH de <i>O. vulgare</i>	57

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

ABTS – 2,2-azinobis-(3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico)

AChE – Acetilcolinesterase

AcOEt – acetato de etila

ANOVA – Análise de Variância

ATCI – Iodeto de acetilcolina

CC – cromatografia em coluna

CCD – Cromatografia em cada delgada

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa

CL50 – Concentração inibitória em cinquenta por cento

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

COSY – *Correlation spectroscopy*

Ce(SO₄)₂ – Sulfato cérico

DA – Doença de Alzheimer

DCM – diclorometano

DMSO - Dimetilsulfóxido

DP – Desvio padrão

DPPH – 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

DTNB – Ácido 5,5'-ditiobis-2-nitrobenzoico

EEOV – Extrato etanólico de *Origanum vulgare*

EtOH – Etanol

Fr AcOEt – Fração acetato de etila

Fr DCM – Fração diclorometano

Fr Hex – Fração hexânica

Fr MeOH – Fração metanólica

H₂O – água

Hex – Hexano

MeOH – metanol

OEOV – Óleo essencial de *Origanum vulgare*

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RESUMO

O *Origanum vulgare* (orégano) pertence à família Lamiaceae, uma planta aromática, conhecida pelo seu uso na culinária e propriedades medicinais. O presente trabalho descreve a identificação dos constituintes do óleo essencial das folhas de *O. vulgare* (OEOV) e avaliação frente às atividades antioxidante (DPPH), anticolinesterásica e ensaios biolarvicida contra o mosquito do *Aedes aegypti*. O OEOV foi extraído por hidrodestilação e analisado por CG-EM. A avaliação do potencial antioxidante por DPPH realizado para o óleo essencial indicou que *O. vulgare* é promissora no sequestro de radicais livres. Foi realizado a partir do extrato etanólico de *O. Vulgare* (EEOV) análises, a saber: CLAE, CG-EM e RMN. O EEOV e o OEOV foram submetidos as análises acetilcolinesterásica e larvicida. Um *screening* fitoquímico do EEOV fora realizado para a identificação dos principais metabólitos presentes na espécie. Todos os ensaios acima mencionados seguiram testes preconizados na literatura. O teste de Elman adaptado por Rhee foi utilizado para avaliar a inibição da acetilcolinesterase, enzima associada a doença de Alzheimer. Foi possível caracterizar um percentual de 98,3 % dos constituintes presentes no óleo essencial, sendo estes: γ -terpineno (8,27 %); Terpinen-4-ol (52,54 %); Timol (6,82 %); Carvacrol (12,96 %) e o β -cariofileno (5,89 %). O teste larvicida foi realizado seguindo o WHO (World Health Organization) com adaptações e com larvas do *A. aegypti* no 3º e 4º estágio larval, com o objetivo de avaliar o potencial de mortalidade, realizado em dois ciclos, de 24 e 48 h, para ambas amostras, mostrando-se, o OEOV, melhor resultado larvicida com CL50 de 53,57 e 45,66 ppm, respectivamente aos dois tempos. A fração diclorometano após a sililação e análise por CG-EM apresentou em sua composição ácido graxo e terpenos, identificando o constituinte timol sililado, como composto majoritário. Resultados apontam que o óleo essencial e o extrato poderão após testes mais específicos serem usados como agentes promissores naturais com propriedades funcionais e fonte alternativa de compostos biotivos para formulações farmacêuticas na área da química, saúde e neurociência, ou seja, no desenvolvimento de fitoterápicos, tendo isto nos motivado a continuar seu estudo.

Palavras chave: *Origanum vulgare*. Estudo fitoquímico. Óleo essencial. Atividades biológicas.

ABSTRACT

Origanum vulgare (oregano) belongs to the family Lamiaceae, an aromatic plant, known for its use in cooking and medicinal properties. The present work describes the identification of the constituents of *O. vulgare* leaves essential oil (OEOV) and evaluation against antioxidant activities (DPPH), anticholinesterase and biolarvicidal assays against the *Aedes aegypti* mosquito. The OEOV was extracted by hydrodistillation and analyzed by GC-MS. The evaluation of the antioxidant potential by DPPH performed for the essential oil indicated that *O. vulgare* is promising in the sequestration of free radicals. The ethanolic extract of *O. Vulgare* (EEOV) was analyzed, namely: HPLC, GC-MS and NMR. EEOV and OEOV underwent acetylcholinesterase and larvicidal analysis. A phytochemical screening of EEOV was carried out to identify the main metabolites present in the species. All of the above mentioned tests followed tests recommended in the literature. The Rhee-adapted Elman's test was used to evaluate the inhibition of acetylcholinesterase, an enzyme associated with Alzheimer's disease. It was possible to characterize a percentage of 98.3% of the constituents present in the essential oil, being: γ -terpinene (8.27%); Terpinen-4-ol (52.54%); Thymol (6.82%); Carvacrol (12.96%) and γ -caryophyllene (5.89%). The larvicidal test was performed according to WHO (World Health Organization) with additives and larvae of *A. aegypti* in the 3rd and 4th larval stage, with the objective of evaluating the mortality potential, performed in two cycles of 24 and 48 h, for both samples, showing the best OEOV result with LC50 of 53.57 and 45.66 ppm, respectively, at both times. The dichloromethane fraction after silylation and GC-MS analysis presented fatty acids and terpenes in their composition, identifying the silylated thymol constituent as the major compound. Results indicate that the essential oil and the extract may be used after more specific tests as natural promising agents with functional properties and alternative source of bioactive compounds for pharmaceutical formulations in the field of chemistry, health and neuroscience, that is, in the development of herbal medicines. this motivated us to continue their study.

Key words: *Origanum vulgare*. Phytochemical study. Essential oil. Biological activities.

1 INTRODUÇÃO

1.1 Plantas medicinais

As plantas medicinais e aromáticas possuem um grande valor dentro da medicina tradicional e terapêutica, as quais, em muitos casos, são os únicos recursos disponíveis a serem utilizados em tratamentos e prevenções de doenças, para uma população (OLIVEIRA *et al.*, 2012; ALBURQUERQUE; HANAZAKI, 2006). O conhecimento e o uso popular dessas plantas tem gerado importância em sua utilização, devido aos seus efeitos farmacológicos, mesmo desconhecendo os constituintes químicos biotivos presentes (MACIEL *et al.*, 2002; OLIVEIRA; OLIVEIRA; ANDRADE, 2010)

Através desses conhecimentos prévios que a medicina popular proporciona das espécies vegetais, pesquisas vem sendo conduzidas aos estudos químicos e biológicos por formulações de medicamentos obtidos de compostos químicos derivados das plantas (MUSTHABA *et al.*, 2010; SEWELL; RAFIEIAN- KOPAEI, 2014; CECHINEL FILHO; YUNES, 1998; MACIEL *et al.*, 2002).

A diversidade das plantas na produção de fitoconstituintes é vasta, onde muitas contêm flavonoides, saponinas, terpenos, quinonas, fenóis, alcaloides e cumarinas, em quantidades consideráveis, em várias partes da planta (BRANDÃO *et al.*, 2010) . Esses compostos químicos são produzidos pelo metabolismo secundário das plantas, os quais são conhecidos por apresentarem propriedades fitoquímicas e farmacológicas, de grande interesse para o desenvolvimento da medicina, o que sustenta ainda mais novos estudos (SABZEHZARI; NAGHAVI, 2018; CHACÓN; RILEY-SALDANA; GONZÁLEZ-ESQUINA, 2013; SAVITHRAMMA *et al.*, 2011).

A produção desses metabólitos secundários, no organismo vegetal, se dá por adaptação aos fatores de crescimento, por fornecerem proteção contra estressores ambientais agressivos, herbívoros contra sua sobrevivência, e mudanças nas condições ambientais que reverbera em seus acúmulos, os quais passam a serem usados como fonte em potencial na produção de novos medicamentos promissores no tratamento de várias doenças (SEGUN; OGBOLE; AJAIYEOBA, 2018; SUN *et al.*, 2016; AKULA; RAVISHANKAR, 2011).

A área da química dos produtos naturais possui um papel importante na química orgânica através de investigação e identificação de compostos fitoquímicos através de isolamento e determinação estrutural (PINTO *et al.*, 2002) . Esse estudo é construído

por etapas fundamentais que compreende a preparação do extrato, óleos fixos e/ou voláteis, o tipo de extração a ser realizada, obtenção das frações e/ou mistura volátil e isolamento das substâncias (MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S, 2001).

1.2 Óleo essencial da espécie *Origanum vulgare*

Óleos essenciais (OEs) são misturas de compostos aromáticos e voláteis extraídos de partes específicas da planta, flores e folhas (BAJPAI; BAEK; KANG, 2012; DUTRA et al., 2019). A partir de sua origem biossintética, os compostos presentes nos OEs podem ser classificados terpenos: mono (C10) e sesqui (C15); aromáticos e alifáticos, hidrocarbonetos ou oxigenados, a partir da rotabiossintética do MEP (fosfato de metileritritol) e MEV (ácido mevalônico), monoterpenoides e sesquiterpenoides, respectivamente (CALO et al., 2015; BAKKALI et al., 2008). Esses constituintes são responsáveis pelas propriedades biológicas exercidas pelos óleos essenciais, antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antioxidantes e inseticida (BAKKALI et al., 2008; KALEMBA; KUNICKA, 2003).

Um dos entraves ao se realizar pesquisas com OEs, deve-se ao fato dos constituintes químicos variarem significativamente, a variabilidade em sua composição e rendimento, sendo dependente da origem geográfica (efeitos climáticos e ecológicos), fatores genéticos, tempo, local da colheita, procedimento de extração e estágio de desenvolvimento em que se encontra crescendo, a planta (SARIKURKCU et al., 2015; MORSHEDLOO et al., 2018; POLAT et al., 2011; DE MARTINO et al., 2009).

Dentre os estudos com os OEs, o óleo essencial de orégano (OEOV) apresenta grande importância, por apresentar atividades antioxidante e antimicrobiana, dentre estes estudos mostram-se que esse potencial é devido a presença de carvacrol e timol (LI et al., 2018; ZHOU et al., 2018). E pesquisas recentes relatam que o OEOV é antiproliferativo, antiinflamatório, antidiabético, atividade promissora ao câncer e larvicida (LEYVA-LÓPEZ et al., 2017;), incentivando ainda mais para o aprimoramento na área.

Romero et al. (2012) relatam, em um estudo mais detalhado, que as atividades estão associadas, especialmente, aos compostos majoritários terpenoides fenólicos (timol (2-isopropil-5-metil-fenol) e seu isômero carvacrol (5-isopropil-2-metil-fenol) presentes no OEOV, que possuem atividade antimicrobiana frente a bactérias e fungos, antiinflamatória e antioxidante. Nos constituintes minoritários são observados a presença de alcoóis **monoterpênicos** (linalol, 4-terpineol,), **hidrocarbonetos**

monoterpênicos (*p*-cimeno, terpinoleno, γ -terpineno, α - pineno, β - pineno, limoneno, β -felandreno, acetato de linalila) e **sesquiterpenos** (β -cariofileno, germacreno e espatulenol), que podem atuar na eficiência das atividades (SOUZA *et al.*, 2005), estruturas representadas na Figura 2.

1.3 Família Lamiaceae

O gênero *Origanum* pertence à família Lamiaceae abrange cerca de 200 gêneros e, aproximadamente, 3.200 espécies, distribuídas em todo o mundo em especial nas regiões do Mediterrâneo e Ásia central (GULLUCE, *et al.*, 2012; LORENZI; MATOS, 2002). Muitas espécies dessa família produzem óleos essenciais que são utilizados na culinária, na medicina tradicional em muitos países como propriedades terapêuticas, por exemplo: expectorantes, antioxidante, antisséptica, calmante e tônico digestiva, e na indústria farmacêutica e cosmética (VIANA, 2013; COQUEIRO, *et al.*, 2012).

Dentre os gêneros cultivados nessa família destacam-se espécies que possuem importância econômica como: alecrim (*Romarinus officinalis* L.), boldo do Chile (*Peumus boldus* Benth), erva-cideira (*Melissa officinalis* L.), hotelã-da-folha-miúda (*Mentha crispai* L.), hortelã-pimenta (*Mentha piperita* L.), lavanda (*Lavandula* spp.) manjeriço (*Ocimum basilicum* L.), manjerona (*Origanum majorana* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.), sálvia (*Salvia officinalis* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) (VIANA, 2013). E, as espécies mais conhecidas são manjerona (*Origanum majorana* L.) e orégano (*Origanum vulgare* L.) (KRUPPA, 2008).

1.4 *Origanum vulgare* (Orégano)

A espécie *Origanum vulgare* (Figura 1), conhecida popularmente como orégano, é uma planta aromática herbácea, de 30 – 50 cm de altura, médio porte, suas folhas medem de 1-2 cm, flores esbranquiçadas à violáceas, caule ereto com uma coloração vermelho pardo, perene, aromática e condimentar, adapta bem em solo seco e calcário (LORENZI; MATOS, 2008; VIANA, 2013).

A maioria das espécies de *Origanum* é nativa das regiões do Mediterrâneo (Grécia, Irã e Turquia), cultivadas também no leste europeu, no centro asiático, regiões do norte da África, e em zonas temperadas da Eurásia e em alguns locais da América do Sul e Norte (SUZUKI, 2013; CRISHTI; KALOO; SULTAN, 2013). No Brasil, é cultivado nas regiões sul e suldeste (LISTON, 2013) sobre condições adaptáveis.

O orégano é um dos condimentos mais populares e utilizados do mundo, suas folhas e as flores, na maioria das vezes desidratadas, são utilizadas na culinária, pois possui um aroma agradável, forte e quente (LISTON, 2013). Rodrigues (2002) utilizou as folhas picadas do orégano para fins aromatizantes. Esse aroma, característico no gênero *Origanum*, é devido à ampla variedade de espécies de plantas que produzem óleos essenciais com características químicas de compostos fenólicos, lipídios e ácidos graxos, flavonóides e antocianinas, é bom ressaltar que a composição química depende da espécie, do clima, da altitude e do tempo em que a planta é colhida (COQUEIRO, *et al.*, 2012).

Figura 1 - Destaque de uma espécie de *O. vulgare*



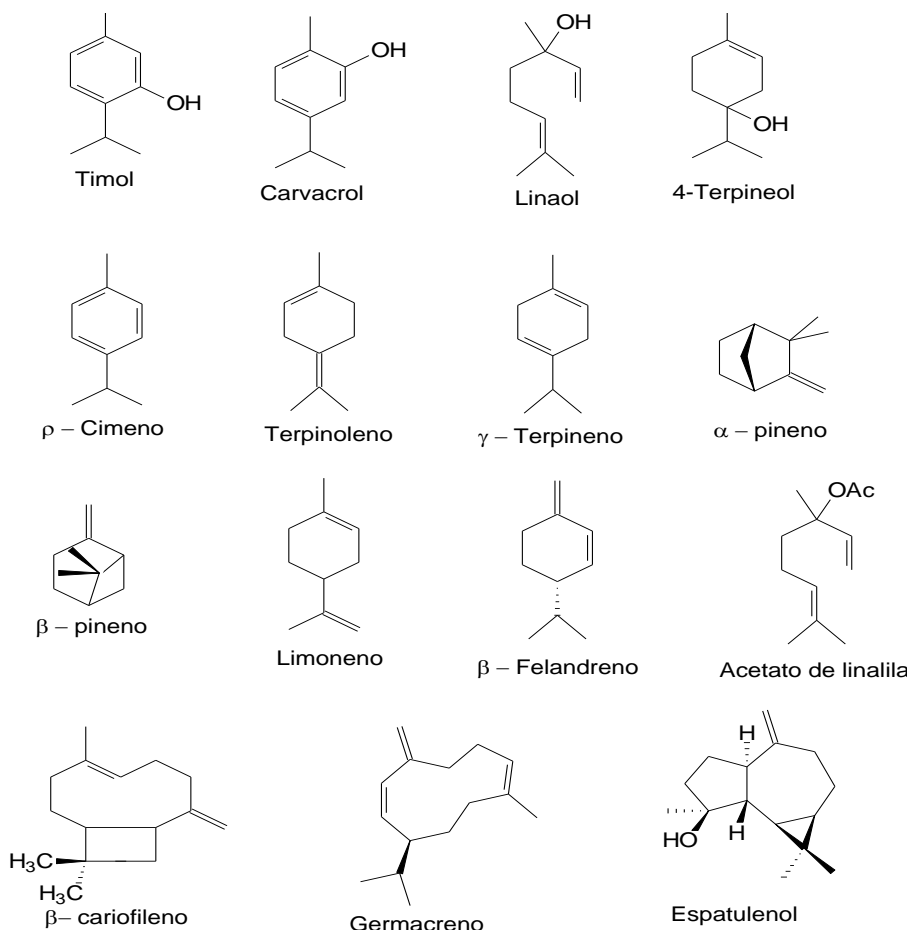
Fonte: <https://www.logees.com/browse-by-common-name/o/oregano-origanum->

Segundo Coqueiro *et al.* (2012), Rodrigues (2002) e Romero *et al.* (2012), o orégano tem sido amplamente utilizado nas indústrias agrícolas, farmacêuticas, de cosméticos e na medicina, por possuírem atividades biológicas (antiinflamatória, anticancerígena, emoliente, digestiva, antibacteriana, antifúngica e antioxidante), através de suas flores e folhas as quais são usadas em tratamentos homeopáticos. Coqueiro (2012) também enfatiza que é muito conhecido como erva culinária e utilizado como substância aromatizante em produtos alimentares, bebidas alcoólicas e na perfumaria, por possuir fragrância picante e forte.

Outras pesquisas na literatura apontam que *O. vulgare* possui as atividades a saber: analgésica, antiviral e larvicida (BRONDANI *et al.*, 2018; BELTRÁN *et al.*, 2018; BELTRÁN *et al.*, 2018; LUKAS *et al.*, 2017; GOVINDARAJAN *et al.*, 2016;

SCHMIDERER; NOVAK, 2013; TEIXEIRA *et al.*, 2013; LEITE *et al.*, 2009), o tornando promissor para uso em futuras formulações farmacêuticas na área da química, saúde, neurociência, dentre outras.

Figura 2 - Estruturas químicas dos principais constituintes do óleo essencial de *O. vulgare*



Fonte: Arquivo pessoal

1.4.1 Estudos biológicos

1.4.1.1 Atividade antibacteriana

A atividade do orégano é atribuída basicamente aos principais componentes timol e carvacrol, esses compostos modificam a permeabilidade das membranas e reagem com radicais livres (lipídicos e hidroxílicos) tornando-os estáveis (LUNA *et al.*, 2010).

Os compostos fenólicos (carvacrol e timol) presentes no OEOV, bem como em outras espécies de Lamiaceae, apresentam atividade microbiana (MIGLIORINI, 2017) que agem na membrana celular das bactérias impossibilitando sua divisão mitótica, provocando desidratação celular e impedindo a sua propagação de bactérias

patogênicas, ou seja, exercendo um efeito como agente microbiano (FUKAYAMA *et al.*, 2005).

Calo *et al.* (2015) sugere que o componente com maior atividade antimicrobiana do OEOV foi o carvacrol, e também com maior atividade contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas. Estudos mostram que o óleo essencial de *Origanum vulgare* conhecido por possuir um grande potencial antimicrobiano frente à várias espécies de microorganismos, em especial as patogênicas e aquelas relacionadas a deterioração de alimentos (CASTILHO *et al.*, 2012; LUZ *et al.*, 2012).

Como Liston (2013) relata uma avaliação e aplicação do óleo do *O. vulgare* como agente antimicrobiano natural frente à *Escherichia coli* em sururu *in natura* durante a estocagem para a conservação. Foi realizado para comparar, o tratamento utilizando o OEOV e o método de conservação tradicional, o congelamento. Nessa comparação, o OEOV foi capaz de inibir a deterioração do sururu de forma similar ao congelamento, apresentou também uma vantagem satisfatória conseguindo eliminar as contagens da bactéria *E. Coli.*, comprovando assim o grande potencial antimicrobiano.

Em estudo realizado por GANDRA *et al.* (2013), a atividade dos extratos de orégano e alecrim apresentaram atividade antimicrobiana frente às culturas de *S. aureus* e *E. coli*, e o mesmo trabalho verificou valores de compostos fenólicos totais e uma grande capacidade antioxidante comparado aos encontrados no extrato de erva doce e de estragão, permitindo afirmar que possuem potencial antimicrobiano e antioxidante.

Segundo Pesavento *et al.* (2015) a característica que mais apresenta influência na ação antimicrobiana destes extratos voláteis naturais são o seu alto poder de hidrofobicidade, pois possuem habilidade de atravessar as membranas bacterianas e atuar rigorosamente, causando perda de íons e redução do potencial da membrana microbiana, destruindo proteínas, lipídeos e organelas presentes na célula bacteriana (BAKKALI *et al.*, 2008), causando assim a apoptose, morte celular.

Em posse disso, cada constituinte tem sua própria colaboração no desencadeamento das suas propriedades biológicas (tanto no efeito antagônico ou sinérgico) dessa forma, a complexidade da mistura dos compostos presentes torna mais difícil à estabilidade dos microorganismos e conseqüentemente um menor risco de resistência microbiana (SOUZA *et al.*, 2005).

Estudos demonstram que os componentes do óleo essencial do orégano exibem atividade biológica contra microorganismos patogênicos, mas apresenta também atividade antioxidante (JANG *et al.*, 2007).

1.4.1.2 Atividade antioxidante

Os antioxidantes podem ser explicados como substâncias eficientes para retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis, podendo estas moléculas serem enzimática ou não enzimática, como: α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos (flavonóides) (MORAIS et al., 2009; SOUSA et al., 2007).

A atividade antioxidante de compostos fenólicos é especialmente devido às suas propriedades de óxido-redução e estrutura química, que podem desempenhar um importante papel de neutralizar e inibir a formação de radicais livres (DEGÁSPARI & WASZCZYNSKYJ, 2004), a presença do grupo hidroxila (POLAT et al., 2011), que pode doar elétrons para neutralização ou seqüestro de radicais livres, quelação de metais de transição, produzido tanto na fase de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUSA et al., 2007). Com isso, os intermediários produzidos pela ação de antioxidantes fenólicos são relativamente estáveis, por efeito da ressonância do anel aromático existente na estrutura destas substâncias (SOUSA et al., 2007).

Os condimentos são utilizados para aumentar e/ou acrescentar sabor, aroma ao alimento, e, em segundo plano, a conservação, devido às suas propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Por exemplo, os condimentos pertencentes a família Lamiaceae, os quais têm sido estudados devido ao seu potencial caráter antioxidante e por seus compostos polifenólicos (MORAIS et al., 2009).

Segundo Lima e Cardoso (2007), os compostos timol e carvacrol, encontrados no óleo essencial do gênero *Origanum*, da família Lamiaceae, são exemplos de terpenóides antioxidantes, que apresentam um fraco caráter ácido, que possui uma hidroxila (OH) ligada a um anel aromático, e capazes de doarem um átomo de hidrogênio, radical esse estabilizado pela ressonância do anel (LIMA; CARDOSO, 2007). Todavia, Vandar-ünlü et al. (2003), sugere que quando esses compostos são testados separadamente do óleo essencial, apresentam baixa atividade, mostrando que outros constituintes presente no óleo podem contribuir para essa atividade, direcionando a acreditar que esses compostos trabalham de maneira sinérgica.

Stanojević et al. (2007) avaliaram que o óleo essencial do orégano pode ser usado como fonte potencial de antioxidantes naturais para a indústria de alimentos, produtos farmacêuticos e químicos. Através desse estudo, pode-se perceber que o óleo essencial de orégano representa uma alternativa aos aditivos sintéticos que possuem efeitos

tóxicos e cancerígenos. Além de que, os resultados da atividade antioxidante desse trabalho propõe que o uso de orégano não é apenas coerente, como também deve ser favorecido na culinária tradicional.

1.4.1.3 Atividade Larvicida

Atualmente as informações são limitadas sobre o seu potencial larvicida do orégano (*Origanum vulgare*) contra os mosquitos de importância médica e veterinária (Pavela, 2015).

Govindarajan *et al.* (2016) relata a atividade larvicida de dois constituintes químicos do óleo essencial da folha *O. vulgare*, o carvacrol e 4-terpinol. Os testes larvicidas realizados foram contra quatro importantes vetores de mosquitos malária *Anopheles stephensi* e *A. subpictus*, o vetor de filariose *Culex quinquefasciatus* e o vector de encefalite japonesa *Culex tritaeniorhynchus*.

Essa pesquisa trouxe conhecimento para novos estudos sobre um larvicida natural contra a malária, filariose e encefalite japonesa mosquito vetores. A espécie em estudo está disponível em grande quantidade na Índia, e o custo da extração e preparação do óleo essencial foi mínimo. É importante ressaltar, que os óleos essenciais são normalmente mais biodegradáveis e do que os inseticidas sintéticos, contribuindo na preservação do meio ambiente.

1.5 *Aedes aegypti*

O *A. Aegypti* é uma espécie de mosquito originário da África, originalmente descrito no Egito por Linnaeus 1762, razão de seu epíteto específico, essa espécie acompanhou o homem no processo de migração, se adaptando ao ambiente urbano, raramente é encontrada em ambientes semissilvestres ou onde não há a presença do homem. Essa espécie é antropofílica, possuindo hábitos diurnos, alimentando-se próximo ao amanhecer e no período vespertino próximo ao crepúsculo (BRAGA, 2007; LIMA-CAMARA, et al.; 2010; SOUZA-NETO et al., 2019).

A dengue é uma enfermidade emergente, que nos últimos anos ganhou destaque como uma das principais doenças transmitidas por um mosquito (artrópode), *Aedes aegypti*, e com isso considerada uma arbovirose. Esse artrópode não transmite somente a dengue, mas outras doenças, como febre amarela, zika e chikungunya. (SOUZA-NETO *et al.*, 2019; AUGUSTO *et al.*; 2016; LIMA-CAMARA, 2010).

Em uma perspectiva histórica, pressupõem-se que a introdução do mosquito nas Américas tenha advindo da época das grandes navegações através da exploração e colonização das terras do novo mundo, através da destruição dos habitat naturais, devido as pressões antrópicas, uma parte da espécie silvestre sofreu um processo seletivo favorecendo a disseminação e a sua sobrevivência em aglomerados humanos (SOUZA-NETO *et al.*, 2019; AUGUSTO *et al.*; 2016).

Com isso, seus criadouros são, geralmente, no intra e no peridomicílio humano, esgotos, recipientes que acumulam água parada, de chuva ou como aqueles que servem para armazenamento de água para uso doméstico. A proximidade com homem favoreceu a proliferação da espécie em dois aspectos: condições ideais para reprodução e fontes de alimentação (MACIEL-DE-FREITAS, *et al.*; 2010; GONÇALVES, *et al.*; 2014). O aumento contínuo da população também contribuiu para sua dispersão para outras áreas através dos meios de transporte, contribuindo a possibilidade de contrair o vírus.

O ciclo de reprodução começa quando uma fêmea adulta deposita seus ovos nos reservatórios que contenham água limpa, parada e após sete dias, a larva se desenvolve e torna-se pupa, dois dias depois, o mosquito está completamente formado. O período de repouso dos ovos colabora com o ciclo de variações climáticas, ou seja, a viabilidade dos ovos durante a seca é cerca de 450 dias, eclodindo ao contato com água (SOUZA-NETO, *et al.*; 2019; LIMA-CAMARA, *et al.*; 2010).

O combate do *A. aegypti* tem sido um desafio mundial para qualquer governo, e a conscientização da população sobre o vetor e as doenças que transmite, de forma educativa, é uma das saídas mais eficientes para o controle desse mosquito. (MONTEIRO, *et al.*; SOUZA-NETO, *et al.*, 2019; ZARA, *et al.*, 2016). No Brasil, os Agentes Comunitários de Saúde (ACS) e os Agentes de Combate a Endemias (ACE), atuam em conjunto com a população, com objetivo de detectar ou destruir focos de ovos dos mosquitos, realizando assim um controle mecânico e químico, além das realizações de ações educativas como palestras e propagandas que alertam a população sobre os riscos trazidos por esse arbovírus buscando romper a cadeia de transmissão da doença (MONTEIRO, *et al.*; SOUZA-NETO, *et al.*, 2019; ZARA, *et al.*, 2016).

Nessa tarefa, existem 3 tipos de mecanismos de controle a saber: o mecânico, biológico e químico. Sendo que o mecânico consiste na adoção de práticas capazes de eliminar o vetor e os criadouros reduzindo o contato com o homem, drenando os reservatórios de água e empregando telas em portas e janelas; O controle biológico

baseia-se na utilização de predadores naturais ou patógenos que visem à redução da população vetorial; Por fim o controle químico consiste no uso de produtos neurotóxicos, para matar as larvas e insetos adultos, sendo um controle mediante ao uso racional e seguro, visto a possibilidade de riscos ambiental e a seleção de vetores mais resistentes (GONÇALVES, *et al.*; 2014; MONTEIRO, *et al.*; 2014; ZARA, *et al.*, 2016).

Dessa maneira, o surgimento e o fortalecimento de novos estudos de pesquisas na área da fitoquímica estão se destacando, e aprimorando caminhos a serem percorridos, na busca da prevenção e controle dessas doenças que possuem um grande alcance mundial. As plantas apresentam-se como fontes de propriedades medicinais e nutricionais por possuírem compostos biotivos (BENELLI, 2015; NILE; NILE; KEUM, 2017).

Segundo, Govindarajan *et al.* (2016) os larvicidas são ferramentas inteligentes e servem para diminuir a densidade dos mosquitos em seus locais de reprodução antes de chegarem a fase adulta. Diante disto, publicações tem sido realizadas nos últimos anos utilizando extratos e óleos essenciais (OEs) de plantas, com efeito larvicida (DIAS, *et al.*, 2015; PAVELA, 2015; THONGWAT, *et al.*, 2017). Em especial, os óleos essenciais vêm mostrando como um grande potencial frente a pragas de insetos, apresentando baixa toxicidade em mamíferos e degradação célere no ambiente (PAVELA, 2015; GOVINDARAJAN, *et al.*, 2016a).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigar a composição química do óleo essencial e extrato etanólico de *Origanum vulgare* (orégano) e testá-los frente a atividade anticolinesterásica e realizar ensaios biolarvicida contra o mosquito do *Aedes aegypti*.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Extração por hidrodestilação do óleo essencial das folhas secas de *O. vulgare*
- ✓ Preparar o extrato etanólico (EtOH) das folhas secas de *O. vulgare* e submeter fracionamento por partição em frações hexânica (Hex); diclorometano (DCM); acetato de etila (AcOEt) e metanólica (MeOH)
- ✓ Identificar os principais constituintes químicos tanto do óleo essencial quanto da fração DCM por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-EM)
- ✓ Realizar um *screening* fitoquímico do extrato EtOH
- ✓ Isolamento a partir da fração DCM
- ✓ Avaliar o potencial antioxidante por meio do sequestro dos radicais livres DPPH do óleo essencial
- ✓ Avaliar o potencial de inibição qualitativo e quantitativo da enzima acetilcolinesterase (AChE) do extrato etanólico e óleo essencial das folhas
- ✓ Avaliar o potencial biolarvicida frente as larvas de *Aedes aegypti* do 3 e 4º estágio larval do extrato etanólico e óleo essencial das folhas secas de *O. vulgare*

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Material vegetal

As folhas secas e trituradas de *O. vulgare* foram adquiridas no mercado central do município de Teresina, Piauí, Brasil, no mês de outubro de 2017.

3.2 Procedimentos gerais

3.2.1 Reagentes, solventes e equipamentos

A enzima acetilcolinesterase, ácido ascórbico, rivastigmina (Exelon[®]), radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) foram adquiridos de Sigma-Aldrich.

Os solventes utilizados na extração, partição e fracionamento cromatográfico foram de grau analítico da Dinâmica, Synth, Impex, Vetec e Sigma. Para as análises de cromatografia gasosa e líquida e espectrometria de massas utilizou-se solventes de grau HPLC da Tedia e Vetec e água ultrapura (sistema Milli Q-Plus). Clorofórmio deuterado da Merck. Sulfato de sódio anidro da Synth.

3.2.2 Cromatografia em coluna e em camada delgada

A separação em coluna cromatográfica (CC) foi realizada utilizando gel de sílica 60 (0,060 – 0,200 mm) da fração diclorometano. As placas para cromatografia em camada delgada (CCD) .

3.2.3 Solução reveladora de sulfato cérico (Ce(SO₄)₂)

Na visualização dos constituintes, as cromatoplasmas foram borrifadas com solução de sulfato de cérico, dissolveu-se 2,1 g de Ce(SO₄)₂ em 15 mL de H₂SO₄ com adição de 800 mL de água destilada. As plaquinhas são aquecidas em chapa aquecedora à 100 °C .

3.2.4 Análise do óleo essencial das folhas secas de *O. vulgare* por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

As análises de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) foram realizadas em um equipamento Shimadzu, com coluna capilar Restek GC columns Rtx[®] - 5MS (crossbond[®] 5% diphenil/ 95% dimethyl polysiloxane) (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m). Uma alíquota de 1 μ L de solução da amostra (1 mg mL⁻¹), foi injetada em um cromatógrafo a gás no modo split (10:1) e temperatura do injetor a 250 °C. A programação do forno foi de 50 °C com taxa de 5 °C/min até 260 °C permanecendo por 10 minutos. O gás hélio com fluxo constante a 3 mL/min. O tempo total da análise foi 48:50 min e a temperatura da interface foi 250 °C. O espectrômetro de massas operando com ionização por elétrons (EI 70 eV) com faixa de massa m/z 45 a 650 Da e temperatura da fonte de 330 °C. A identificação dos constituintes químicos foram identificadas por comparação dos espectros de massas obtidos da bibliotecas computacionais Wiley229 e NIST 0.8, bem como pela comparação de seus índices de retenção (RI), segundo os valores da literatura (Adams, 2007).

3.2.4.1 Análise da fração DCM de *O. vulgare* por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM)

Para a realização da identificação dos constituintes químicos da fração DCM, esta fração fora previamente sililada e, posteriormente, injetada no cromatógrafo. Para a realização da sililação foram usados 5 mg da fração e cerca de 1 mL de diclorometano, com algumas gotas de piridina destilada para a dissolução da amostra. A amostra foi transferida para um balão de fundo redondo de 5 mL e purgada com N₂ até garantir que o ambiente esteja livre de umidade, adicionando-se o reagente sililante N,O-Bis(trimetilsilil) trifluoracetamida (BSTFA), após o sistema foi tamponado com septo de vidro e, em seguida, mantido em banho de areia aquecido, em uma faixa de temperatura de 65 – 75 °C.

Na análise da fração DCM de *O. vulgare* realizada por CG-EM, utilizou-se um cromatógrafo a gás (Thermo GC Ultra) acoplado à espectrômetro de massa sequencial de alta resolução com ionização por impacto de elétrons e analisador triplo quadrupolo (TSQ Quantum XLS), onde uma alíquota de 2 μ L da solução da amostra (5 mg mL⁻¹), sililada foi injetada no cromatógrafo no modo *Split* (10:1). A temperatura do injetor

290° C. As condições de análise foram: coluna capilar de 30 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro e 0,1 µm de fase estacionária dimetilpolisiloxano (100%) para altas temperaturas (modelo COL-ELITE-1HT, perkinElmer®); o hélio foi o gás de arraste em fluxo de 1 mL min⁻¹.; programação de análise: temperatura do injetor 290° C, interface de 300° C. O espectrômetro de massa operou por ionização por impacto eletrônico de 70 eV e faixa de varredura de 50 a 650 Daltons (Da).

3.2.5 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)

As análises foram realizadas em cromatógrafo analítico marca Shimadzu modelo LC-20 A., controlador CBM-20A, detector UV-Vis com arranjo de diodos (DAD), modelo SPD- M20A, coluna Nuleodur® 100-5 Macherey-Nagel, C18, 5µm (250 x 4,6 mm). O extrato foi analisado em coluna de fase reversa C18, no modo gradiente com acetonitrila e água [MeCN/H₂O 5:95 → MeCN 100% em 40 min] com vazão de 1,0 mL/min e varredura de 190 a 800 nm. Método de análise em Cromatografia líquida de alta eficiência CLAE-DAD, como também no modo gradiente MeOH:H₂O, 5-100% MeOH em 50 min. Solução de aproximadamente 1 mg mL⁻¹, fluxo 1 mL min⁻¹, C18, λ = 254 nm. Nas frações Hexânica (HEX); Diclorometano (DCM); Acetato de Etila (AcOEt) e metanólica (MeOH) no modo gradiente MeOH:H₂O, 5-100% MeOH em 50 min. Solução de aproximadamente 1 mg mL⁻¹, fluxo 1 mL min⁻¹, C18, λ = 254 nm.

3.2.6 Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de RMN de ¹H e ¹³C foram obtidos em espectrômetro Varian INOVA – modelo 400 operando a 400 (¹H) e 100 (¹³C) MHz. As amostras foram dissolvidas em CDCl₃.

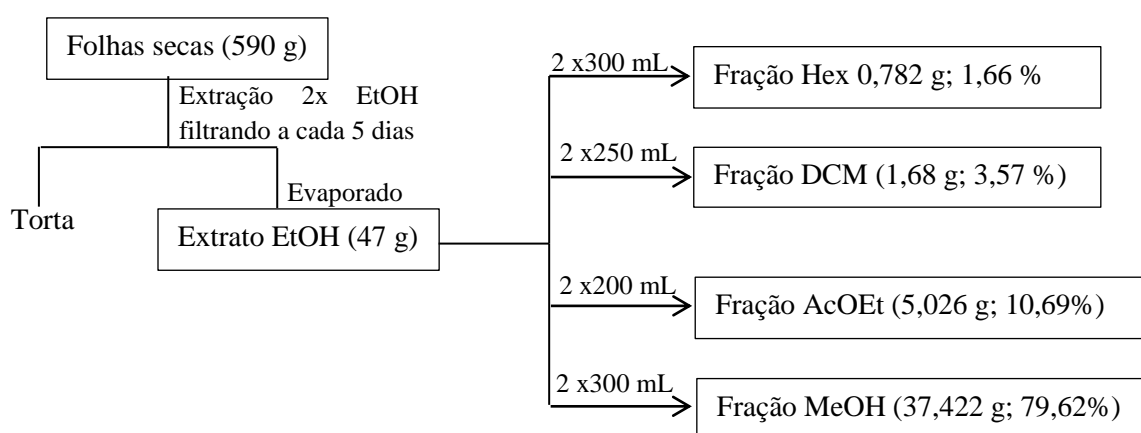
3.3 Obtenção do extrato, das frações e do óleo essencial das folhas secas de *O. vulgare*

3.3.1 Obtenção do extrato etanólico e frações das folhas secas de *O. vulgare*

As folhas secas de *O. vulgare* (590,0 g), foram submetidas à extração por maceração com etanol. Foram utilizados 3 L do solvente e a extração ocorreu durante 5 dias, extraíndo-se o material com uma agitação mecânica diária e posterior filtração do

extrato (Figura 3), o processo foi realizado por 2 vezes . O extrato foi concentrado em evaporador rotativo à pressão reduzida, resultando em um rendimento de 57,30 g (9,71%) de extrato etanólico seco. Parte do extrato EtOH (10,30 g) foi reservado para testes biológicos e análises. O EtOH foi submetido a uma coluna filtrante para a realização da partição das frações Hexânicas (Hex), diclorometano (DCM), acetato de etila (AcOEt) e metanólica (MeOH).

Figura 3 – Fluxograma do procedimento para obtenção do extrato EtOH e as frações das folhas secas de *O.vulgare*



3.3.2 *Screening* fitoquímico do extrato etanólico (EtOH) das folhas secas de *O. vulgare* para identificação de metabólitos secundários

O extrato EtOH das folhas secas de *O. vulgare* foi submetido à análise fitoquímica através de uma série de reações de caracterização dos compostos a saber: alcaloides, taninos, flavonoides; saponinas; triterpenos e/ou esteróis; cumarinas e quinonas. Os testes se baseiam em reações cromáticas e de precipitação conforme descrito por Simões *et al.* (2004).

3.3.3 Análise cromatográfica em camada delgada do extrato e das frações da partição do extrato EtOH das folhas secas de *O. vulgare*

As frações da partição do extrato EtOH das folhas secas foram analisadas por CCD com eluente $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}$ (9:1) e sulfato cérico como revelador. Com base nos perfis cromatográficos, a fração DCM apresentou manchas roxas e amarelas

características de substâncias de natureza terpênica e fenólica, respectivamente, e com isso foi selecionada para o fracionamento cromatográfico com posterior identificação estrutural dos seus isolados.

3.3.3.1 Fracionamento cromatográfico da fração diclorometano (DCM)

A fração DCM (1,0 g) foi submetida a uma coluna cromatográfica (CC) gel de sílica 60 como adsorvente, utilizando-se solventes orgânicos puros e misturas binárias em grau crescente de polaridade. Utilizando-se como eluente: Hex (100%); Hex/DCM (95:05, 9:1, 8:2, 1:1) ; DCM (10%); DCM/AcOEt (98:02, 95:05, 9:1, 8:2; 7:3, 6:4, 1:1); AcOEt (100%) e MeOH (100%) , Tabela 1. Foram coletadas um total de 58 frações que foram concentradas, pesadas e analisadas em CCD. As frações obtidas foram monitoradas por CCD, eluídas em um sistema de solvente de: Hex/DCM (95:5, 9:1, 8:2, 7:3) e DCM/MeOH (9:1, 8:2 e 1:1) e as que apresentaram o mesmo fator de retenção foram reunidas e submetidas a outras técnicas cromatográficas para em seguida ser avaliado o grau de pureza das substâncias isoladas.

3.3.3.1.2 Subfrações (SF1; SF2e SF3) da fração diclorometano (DCM)

A subfração SF1 (24 - 26) (112,5 mg) apresentou um sólido cristalino amarelo amorfo e a análise em CCD foi realizada em um eluente Hex/DCM (8,5:1,5) e sulfato de cérico revelador, apresentando uma mancha alaranjada. As análises de RMN ^1H e ^{13}C permitiram identificar uma mistura de compostos.

A subfração SF2 (49 - 53) (107,6 mg) apresentou um sólido pastoso amarelo amorfo e análise em CCD foi utilizado um eluente Hex/DCM (8:2) e sulfato de cérico revelador, apresentando manchas roxas e outras alaranjadas.

A subfração SF3 (70;71;72) (89,6 mg) apresentou um sólido cristalino amarelo amorfo e análise em CCD com eluente Hex/DCM (8,5:1,5) e sulfato de cérico revelador, apresentando apenas manchas roxas.

Tabela 1 – Tratamento cromatográfico da fração DCM das folhas secas de *O. vulgare*

SOLVENTE	FRASCOS	Massa (mg)
Hex (100%)	1 - 3	7,3
Hex/DCM (95:05)	4 - 8	42,5
Hex/DCM (9:1)	9 – 15	77,9
Hex/DCM (8:2)	16 – 23	50,6
Hex/DCM (7:3)	24 – 28 *(SF1(24;25;26))	210,6 *(112,5)
Hex/DCM (6:4)	29 – 33	167,5
DCM	34 – 38	31,0
DCM/AcOEt (9:1)	39 - 43	43,8
DCM/AcOEt (8:2)	44 – 48	33,2
DCM/AcOEt (7:3)	49 – 53 *(SF2)	*107,6
DCM/AcOEt (6:4)	54 – 58	25,3
DCM/AcOEt (1:1)	69- 73 *(SF3(70;71;72))	118,4 *(89,6)
AcOEt (100%)	74 – 78	19,4
MeOH (100%)	79 – 82	43,7

*Subfrações (SF) que foram submetidas a outros processos de separações cromatográficas

3.4 Extração do óleo essencial das folhas secas de *O. vulgare*

As folhas secas de *O. vulgare* (400 g) foram submetidas à extração por hidrodestilação, por um período de 4 h, utilizando-se um aparelho de tipo Clevenger (SIMÕES et al., 2004), acoplado a um balão de 5 litros. O óleo essencial de *O. vulgare* (OEOV) obtido, foi seco em sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4), filtrado e armazenado em frascos âmbar sob refrigeração até posteriores testes, e o teor percentual foi calculado com base no peso seco de material vegetal, sendo a extração realizada em triplicata. A extração foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Plantas Medicinais e Neuroquímica Experimental (LPNNEX) do Núcleo de Tecnológica Farmacêutica, na Universidade Federal do Piauí - UFPI.

3.5 Ensaios biológicos do óleo essencial e do extrato EtOH das folhas secas de *O. vulgare*

3.5.1 Atividade anticolinesterásica

O método se baseia em avaliar a hidrólise da acetilcolina a partir da enzima AChE formando a tiocolina que na presença do reagente de Ellman (DTNB-ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoico]) produz 5-tio-2-nitrobenzoato (cor amarelo) e 2-nitrobenzoato de metila-5-mercaptopicolina. O reagente indica a cromatoplaça uma coloração amarelada e o teste de inibição é considerado positivo quando se observa manchas brancas, pois consta que a acetiltiocolina não foi hidrolisada. O ensaio realizado tanto para o extrato EtOH quanto o óleo essencial das folhas secas de *O. vulgare* atividade testada (Figura 25) (RHEE et al., 2001) comparado com um padrão positivo (caféina), ambas amostras exibiram atividades.

3.5.1.1 Atividade inibitória qualitativa da enzima acetilcolinesterase (AChE)

O OEOV, o extrato etanólico e as frações foram dissolvidos em metanol para preparar soluções de 10 mg mL^{-1} . Em seguida, $1,5 \mu\text{L}$ do OEOV, extrato EtOH e as frações foram aplicadas sobre placa de CCD e eluídas com os solventes $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9:1). Após a eluição, a atividade da enzima foi detectada com a utilização do método de Ellman "in situ" sobre a placa (ELLMAN, 1961, RHEE et al., 2001, AHMAD et al., 2015). As placas foram pulverizadas com DTNB (ácido 5,5'-ditiobis-[2-

nitobenzóico]) à 1 mmol L^{-1} (1mM) e 1 mmol L^{-1} (1 mM) em ATCI (Iodeto de acetilcolina) em tampão tris A até a saturação do reagente. A placa foi seca por 3-5 minutos e, em seguida, uma solução de enzima de AChE (tipo VI-s liofilizada, 261 U.mg^{-1} sólido, Proteína 386 U.mg^{-1}) foi borrifada na placa de CCD dissolvida em tampão A (500 U.mL^{-1} solução estoque foi diluída com tampão A para se obter 5 U.mL^{-1} enzima). Um fundo amarelo com os halos brancos são visualizados e vistos como resultados positivos para inibir a AChE em um tempo de no máximo 5 minutos após a borrifação da AChE. A cafeína, um alcaloide inibidor da enzima AChE obtido de *Paulinia cupana*, foi utilizado como controle positivo.

3.5.1.2 Atividade inibitória quantitativa da enzima acetilcolinesterase (AChE) por microplacas

O ensaio enzimático quantitativo da atividade de inibição da enzima acetilcolinesterase (AChE) foi realizado utilizando um espectrofotômetro com leitor de microplacas de 96 poços. Utilizou-se a análise preconizada e descrito pelo método de Ellman et al., 1961 com modificações de Rhee et al., 2001, com o objetivo de avaliar o potencial de inibição (CI_{50}) para o OEOV (NANTAKORNSUTTANAN Et al., 2016).

Inicialmente, 10,0 mg da amostra (óleo essencial e/ou extrato ETOH), foi dissolvida a 10% de metanol e Buffer A (50 mM Tris/HCl, pH 8,0) em um epperdoff 25 μL de 0,22 U/mL da AChE. No primeiro momento, foi realizada a leitura para os poços da microplaca adicionando-se 25 μL da amostra em metanol 10%; 125 μL de 5,5' ditiobis (2-nitrobenzeno) - DTNB (3 mM com, NaCl (0,1 M) e MgCl_2 (0,02) ; 25 μL ATCI (iodeto de acetilcolina) (15 mM em 10 mL de H_2O) e 150 μL Buffer B (50 mM Tris/HCl, pH 8,0, contendo 0,1% de albumina sérica bovina (BSA) 1mL de Buffer A, sem enzima. Nessa primeira análise, realizou-se como leitura de tempo inicial. A absorvância foi medida a 405 nm. A absorvância foi lida, novamente, a cada 5 minutos de incubação da enzima nas amostras por duas vezes. As concentrações utilizadas foram de 10; 5; 2,5; 1,25; 0,625 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Foi utilizada um leitor de microplacas ELISA (modelo Polaris; marca Celer biotecnologia S.A) e os dados foram analisados no software GraphPad Prism versão 6.00. A Rivastigmina (Exelon[®]), medicamento utilizado na terapia da doença de Alzheimer, foi utilizado como controle positivo. As análises foram realizadas em triplicata ($n = 3$) para calcular a média e os valores representam a média \pm erro padrão da média, para cada concentração $p \leq 0,0001$

comparado ao controle (*Two way* ANOVA, seguida pelo pós-teste de *Holm-Šídák*). A taxa de inibição foi calculada usando a equação segundo Nantakornsuttanan et al., 2016. Atividade foi expressa pelos valores de concentração inibidora 50% (CI_{50}) ($\mu\text{g} / \text{mL}$).

$$\% \text{ inibição} = (1 - ((\mathbf{B} - \mathbf{b}) / (\mathbf{A} - \mathbf{a})) \times 100$$

Onde, **B** é a amostra com enzima; **b** amostra sem enzima; **A** branco com enzima; **a** branco sem enzima. O branco foi realizado substituindo a amostra por Buffer A.

3.5.2 Atividade antioxidante com 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

Para avaliação da atividade antioxidante com 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) foi utilizado o método de Bouyahya et al., (2017). Inicialmente, uma mistura reacional contendo o OEOV e/ou extrato EtOH nas concentrações de 0,002 a 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$, adicionado à 2,7 mL da solução metanólica estoque de DPPH ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 0,3 mL da amostra, sendo a mistura então agitada vigorosamente e incubada à temperatura ambiente na ausência de luz durante 30 minutos, com leitura realizada em espectrofotômetro à 517 nm, para definir os valores equivalentes à capacidade de redução do radical DPPH à DPPH-H (difenilpicrilhidrazina) de cor amarela.

A atividade antioxidante frente ao radical DPPH foi calculada como valores CI_{50} (mg mL^{-1}), mensurada a partir do controle positivo, ácido ascórbico (Vitamina C), com dose necessária de CI_{50} de $0,02268 \mu\text{g.mL}^{-1}$ de inibição. Portanto, um valor menor da Concentração de Inibição (CI_{50}) do controle positivo equivale a uma maior atividade antioxidante do OE. Ou seja, os valores de CI_{50} indicam a concentração da amostra que é necessária para reduzir 50% de radicais livres DPPH. Os valores das absorbâncias, realizado em triplicata, o potencial para eliminar o radical DPPH• foi calculado utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ de inibição do radical DPPH}\bullet = (\mathbf{A} \text{ branco} - \mathbf{a} \text{ amostra}) / \mathbf{A} \text{ branco} \times 100$$

Onde, **A** = branco; **a** = amostra. O mesmo procedimento experimental foi realizado utilizando o ácido ascórbico como controle positivo.

3.5.3 Atividade Larvicida frente as larvas do *Aedes aegypti*

A atividade larvicida do OEOV e/ou extrato EtOH de *O. vulgare* frente as larvas do *A. aegypti*, foi avaliado segundo WHO (2005). Foram analisados utilizando-se as concentrações a saber: 30, 60, 90, 120 e 150 ppm ($\mu\text{g mL}^{-1}$), que foram dissolvidas em um meio de concentração de 1% (v/v) de DMSO, diluído em água da torneira, desclorada, para obter cada uma das concentrações. O controle foi preparado usando apenas a solução de 1% (v/v) de DMSO. Sessenta larvas do terceiro e/ou quarto estágio larval foram introduzidas em cada solução. O teste foi realizado em triplicata, para um total de 180 larvas testadas. O bioensaio da mortalidade larval foi registrado às 24 h e 48 h após o contato do OE com as larvas, durante esse período as mesmas não foram alimentadas. As concentrações letais CL₅₀ (Concentração Letal), indicam a concentração da amostra que é necessária para matar 50% das larvas e foram calculadas usando o software Statistical graph prisma 2 utilizado para cada tempo dos bioensaio com $p < 0.05$, considerados significativos.

As larvas do *A. aegypti* foram obtidas a partir de mosquitos adultos, provenientes de Teresina-PI, mantidos em colônia semifechada no Laboratório de Parasitologia e Entomologia Sanitária (LAPES-UFPI), a $28 \pm 2^\circ\text{C}$ e $70 \pm 10\%$ UR (Umidade Relativa). Os adultos foram alimentados com solução açucarada concentrada e as fêmeas realizam o repasto sanguíneo em camundongos. As larvas são alimentadas com ração de peixe trituradas durante toda fase evolutiva.

3.6 Análise estatística

Os dados foram calculados plotando as porcentagens de inibição contra o concentrações do OEOV e/ou extrato EtOH. O teste foi realizado em triplicado e os valores de CI₅₀ foram relatados como médias \pm Desvio Padrão. Os dados foram analisados no software GraphPad Prism versão 6.00. Os valores de inibição e foram comparados por meio da Análise de Variância (ANOVA), seguido do pós-teste de *Holm-Šidák* ($p < 0,05$).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 *Screening* fitoquímico

O extrato etanólico das folhas secas de *O. vulgare* foram submetidos a uma triagem fitoquímica preliminar, com o objetivo de se identificar os constituintes do metabolismo secundário presentes na espécie e caracterizar fitoquimicamente a amostra. Na Tabela 2 está o resultado desse perfil químico.

A triagem fitoquímica dos principais metabólitos secundários da planta *Origanum vulgare*, objetiva identificar metabólitos como: **flavonoides**, que apresentam atividades antiinflamatória, antialérgico, anticancerígeno, **alcaloides**, antitumorais, antitussígenos, antiviral, **esteroides/triterpenoides**, antiinflamatórios, **cumarinas**, antimicrobiana, antiinflamatória, **terpenos**, antiinflamatório, larvicida, **taninos** contribuem no tratamento da hipertensão arterial, queimaduras, bactericida, fungicida, larvicida, inseticida, e **saponinas**, antiviral e atuam sobre membranas celulares (SILVA; MIRANDA; CONCEIÇÃO, 2010; BESSA et al., 2013).

Tabela 2 – *Screening* fitoquímico do extrato etanólico de *O. vulgare*

Metabólitos	Alcalóides	Taninos	Flavonoides	Triterpenos/esteróis	Saponinas	Cumarinas	Quinonas
	Positivo	Positivo	Inconclusivo	Positivo/negativo	Positivo	Positivo	Positivo

Os resultados levaram a continuidade dos estudos para isolamento dos constituintes químicos de interesse farmacológico presente no extrato. Direcionando-nos, previamente, a composição química existente no extrato EtOH das folhas de *O. vulgare*.

4.2 Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE-DAD)

4.2.1 Cromatografia líquida de alta eficiência do extrato EtOH e das frações HEX; DCM; AcOEt e MeOH de *O. vulgare*

Há poucos estudos na literatura de divulgação sobre constituintes do extrato etanólico da espécie *O. vulgare*, sendo importante essa identificação para futuras pesquisas (BLANK et al., 2017; KOUKOULITSA et al., 2006). Com isso, no presente trabalho, foi realizada uma prévia análise cromatográfica líquida de alta eficiência

(CLAE-DAD), do extrato etanólico (EtOH) de *O. vulgare*, com o objetivo que se saber como estaria a separação dos constituintes presente na amostra, para que assim, a fração escolhida tivesse um melhor estudo fitoquímico nos isolamentos e em suas atividades futuras. A fração que apresentou melhor perfil cromatográfico no comprimento de onda $\lambda = 254$ nm foi a fração diclorometano, para o extrato EtOH as análises foram realizadas utilizando dois tipos de solventes, Acetonitrila e metanol, reproduzindo dois perfis cromatográficos, como são mostrados nas Figuras 4 e 5, respectivamente, já para as frações, a análise foi realizada utilizando o solvente de arraste MeOH, Figura 6. É importante saber que o tipo de solvente utilizado interfere na quantidade de constituintes químicos extraídos e identificados (DANILA et al., 2011) O extrato EtOH apresentou uma boa separação de quantidade de constituintes utilizando o MeOH como solvente de arraste, como se pode observar nos perfis (Figura 5) .

Figura 4: Cromatograma da amostra do extrato EtOH de *O. vulgare* obtido via cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando como solvente de arraste acetonitrila (MeCN); $\lambda = 254$ nm (Modo analítico; Coluna de fase reversa C18, no modo gradiente com acetonitrila e água [MeCN/H₂O 5:95 \rightarrow MeCN 100% em 40 min] $\lambda = 254$ nm), todas os cromatogramas por CLAE foram feitas nessas condições.

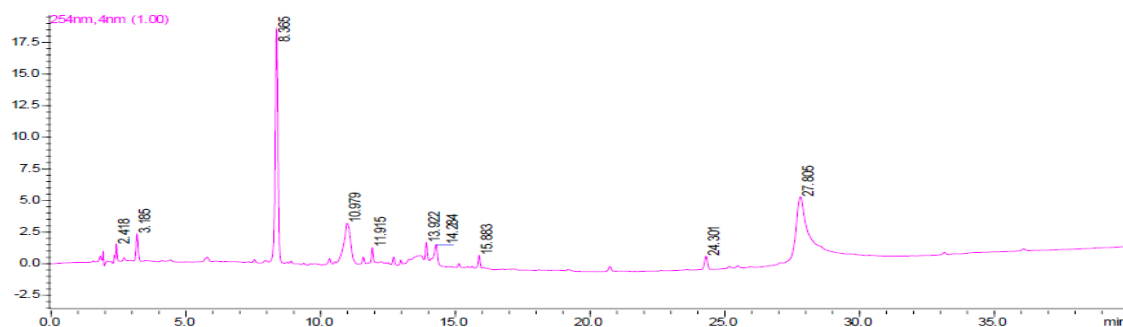


Figura 5: Cromatograma da amostra do extrato EtOH de *O. vulgare* obtido via cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando como solvente de arraste metanol (MeOH); $\lambda = 254$ nm

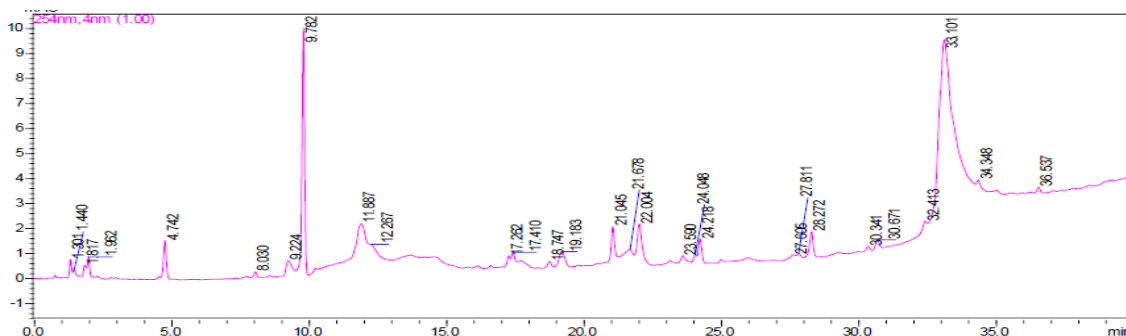
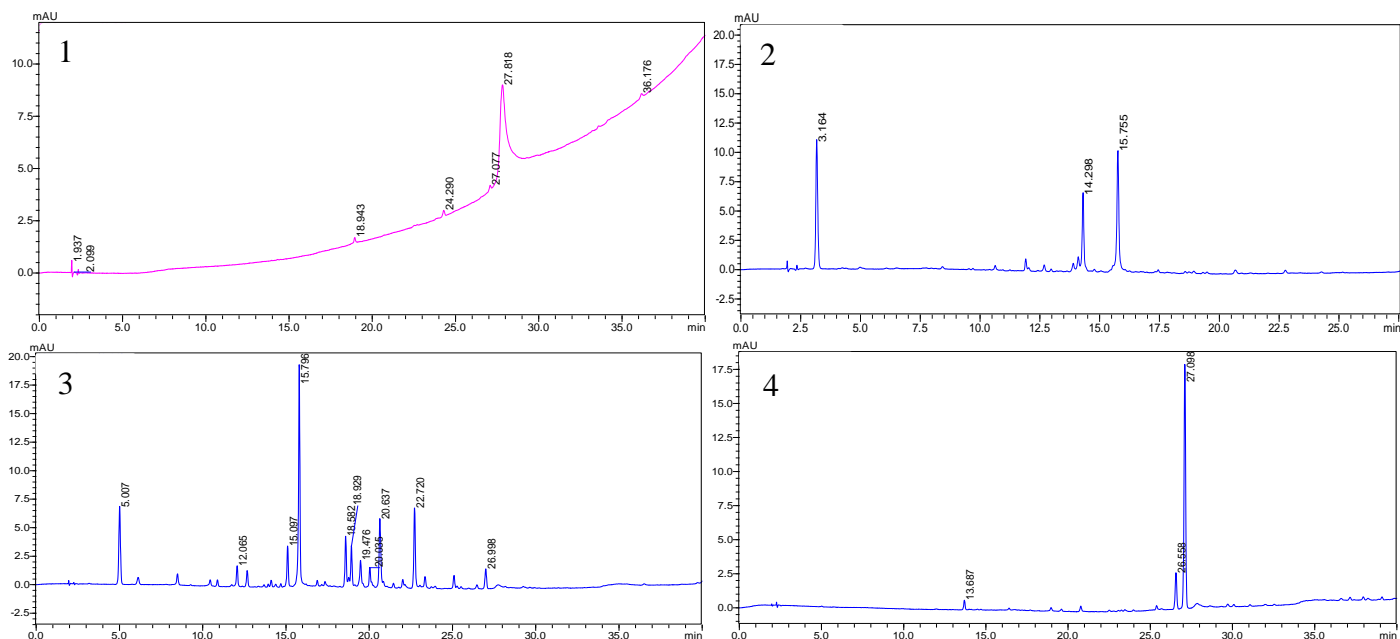


Figura 6: Cromatograma das frações (1) HEX; (2) DCM; (3) AcOEt e (4) MEOH a partir do extrato EtOH de *O. vulgare* obtido via cromatografia líquida de alta eficiência, utilizando como solvente de arraste MEOH ; $\lambda = 254 \text{ nm}$



A partir desses resultados obtidos partimos para análise da fração diclorometano, onde realizamos o CG-EM, o fracionamento e isolamento, e a mesma no teste qualitativo de inibição da enzima AChE apresento resultado positivo.

4.3 Identificação dos constituintes da fração diclorometano

4.3.1 Composição química da fração DCM sililada das folhas secas de *O. vulgare* por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM)

A alternativa de analisar extratos brutos e/ou frações pode ser extremamente útil para a realização de um estudo sistemático da planta e de outras amostras biologicamente ativas, sendo um método de análise rápida, chamada de triagem fitoquímica (*screening*), que pode orientar o trabalho para utilização de métodos de isolamento futuros (SANTOS; AQUINO NETO, 2000). Esse tipo de análise nos proporciona a composição química de extratos, frações e compostos isolados por CG-EM (técnica de investigação, separação, identificação e quantificação dos

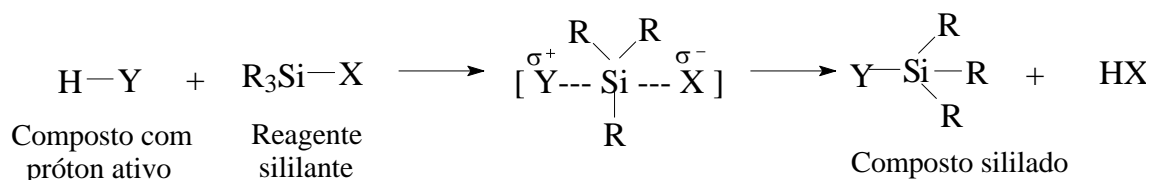
fitoconstituintes individuais presentes em uma determinada amostra complexa) (ORHAM et al., 2012).

A análise por cromatografia à gás, é aplicada a compostos voláteis e termicamente estáveis em temperaturas relativamente elevadas programadas durante o processo de separação e identificação cromatográfica (CHIARADIA et al., 2008).

Quando a amostra apresenta compostos com alta massa molar ou grupos funcionais de alta polaridade, ocorre à necessidade de derivatização, uma reação química que modifica a substância com o objetivo de formar novos produtos com melhores propriedades cromatográficas, onde diminui a polaridade dos compostos e aumenta a sensibilidade e seletividade do detector para os analitos de interesse (WELLS, 1999; COLLINS; BRAGA; BONATO, 2006; SHAREEF, ANGOVE e WELLS, 2006; SCHUMMER et al., 2009; KOUREMENOS et al., 2010), um dos tipos de reações de derivatizações utilizada em cromatografia gasosa é a sililação.

A reação de sililação é uma técnica simples, rápida e eficiente, que ocorre em uma só etapa bloqueando os sítios próticos, os quais são substituídos por grupamentos trimetilsilil ($\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), diminuindo o ponto de ebulição dos compostos e aumentando sua estabilidade térmica, resultando em picos estreitos e simétricos (HALKET et al., 2005; ORATA, 2012; WU et al., 2009).

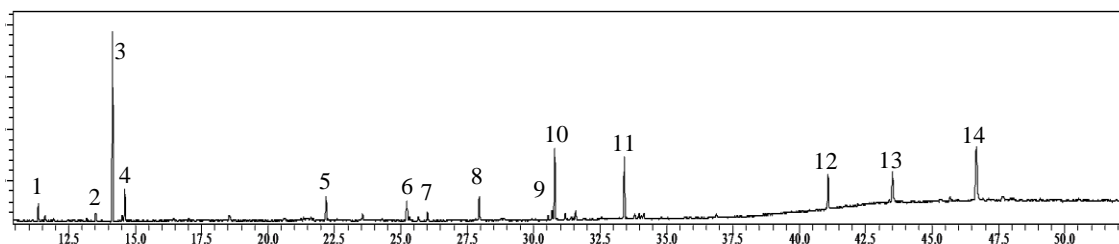
Esquema 1: Representação do mecanismo geral da reação de sililação



Fonte: Blau & Halket, 1993, com modificações

O perfil cromatográfico da fração DCM a partir do extrato EtOH de *O. vulgare* é mostrado na Figura 7.

Figura 7 – Cromatograma de íons totais da fração DCM



Os compostos foram identificados utilizando os tempos de retenções e interpretações das análises dos espectros de massas (íon molecular $[M^+]$ e pico base) em comparação com os espectros de massas dos compostos obtidos a partir da biblioteca computacional e da literatura Wiley229 e NIST 0.8, bem como pela comparação de seus índices de retenções (RI), segundo os valores da literatura (Adams, 2007; ZARETSKII et al., 1967; ASSIMOPOULOU; PAPAGEORGIU, 2005; SANTOS et al., 2013). A abundância relativa (%), íon molecular, fórmula molecular e tempo de retenção dos compostos identificados na fração DCM são mostrados na Tabela 3.

A composição química da fração DCM após derivatização por sililação e análise por CG-EM mostrou a identificação de 6 constituintes: Ácido metilmalônico-bis-metilsilil; terpenos (mono: Timol trimetilsilil; Isopulegol trimetilsilil); sesquiterpeno: ciclo isolongifoleno; ácidos graxos identificados como ésteres etílicos (palmitato de etila (Hexadecanoato de etila) e linaloato de etila). O constituinte majoritário foi o Timol sililado, (32,42%). O composto isopulegol também já foi relatado em outra espécie da família Lamiaceae, como a *Melissa officinalis* L. (SREELEKSHMI et al., 2007; BLUMENTHAL et al., 2000).

Tabelas 3 – Constituintes químicos identificados na fração diclorometano sililada CG-EM

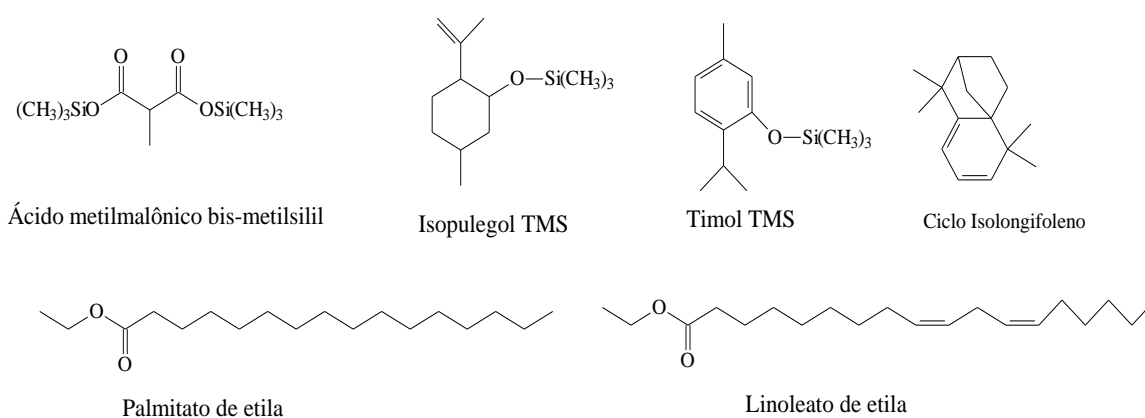
Pico	Constituinte Químico	Fórmula molecular	$[M^+]$	TR	%
1	Ácido metilmalônico-bis-metilsilil	$C_{11}H_{22}O_4Si_2$	247	11,347	3,01
2	Isopulegol trimetilsilil	$C_{13}H_{26}OSi$	226	13,510	1,37
3	Timol trimetilsilil	$C_{13}H_{22}OSi$	222	14,144	32,42
4	N.I				5,42
5	Ciclo isolongifoleno	$C_{15}H_{22}$	202	22,185	3,88
6	N.I				3,36
7	N.I				1,29
8	Palmitato de etila	$C_{28}H_{36}O_2$	284	27,952	3,84
9	Linaloato de etila	$C_{20}H_{36}O_2$	308	30,692	1,55

10	N.I	30,798	12,12
11	N.I	33,412	10,38
12	N.I	41,086	5,72
13	N.I	43,516	4,93
14	N.I	46,668	9,29

N.I.: não identificado; T.R.: tempo de retenção

As estruturas dos constituintes identificados na fração diclorometano sililada estão representadas na Figura 8.

Figura 8 – Estruturas dos constituintes identificados na fração diclorometano sililada CG-EM



Foram identificados ésteres etílicos saturados e insaturados de ácidos graxos, palmitato e linaloato de etila, respectivamente, na fração DCM. A composição total dos ácidos graxos encontrados foi confirmada pelo monitoramento do fragmento do pico base m/z 88, devido a quebra da ligação γ em relação ao grupo $C=O$ que é proveniente do rearranjo de McLafferty, Figura 9, e o outro sinal de pico base que é corresponde à quebra homolítica (clivagem) da ligação γ carbonila m/z 101, como se mostra na frente, Figura 10, fragmentos característicos de ésteres etílicos saturados (DE QUEIROZ et al., 2008). Pode-se observar essas fragmentações, dos picos base, no espectro de massa do composto palmitato de etila, como também, o pico do íon molecular $[M^+]$ 284, Figura 11, e seus principais fragmentos propostos na Figura 12.

Figura 9 – Rearranjo de McLaffert derivados de ésteres etílicos

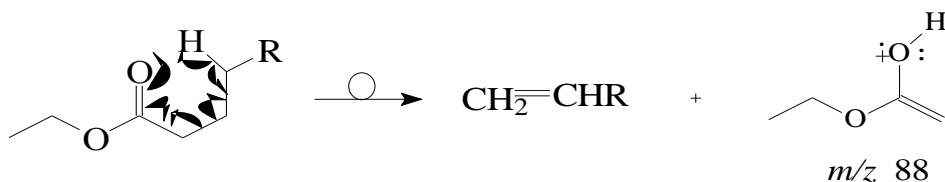


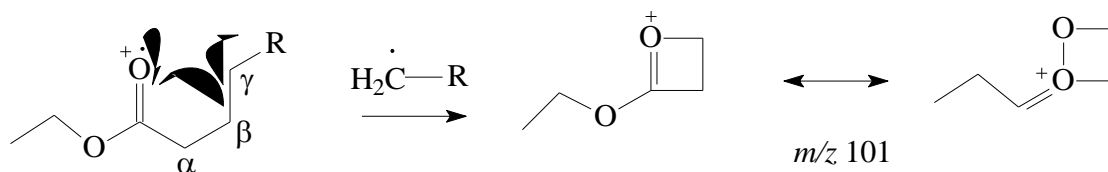
Figura 10 – Clivagem (quebra) γ carbonila

Figura 11 – Espectro de massas do composto palmitato de etila

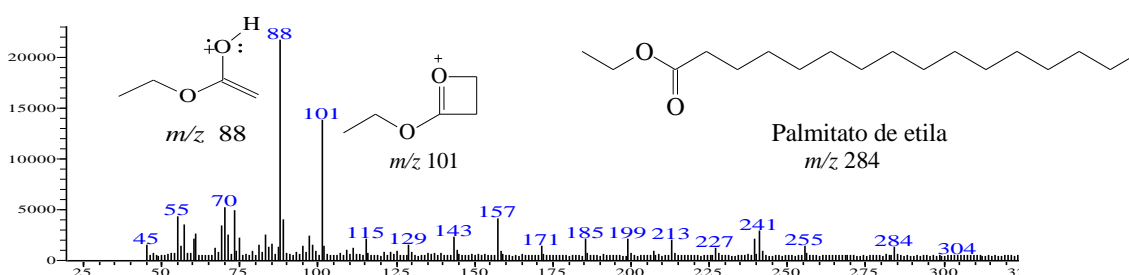
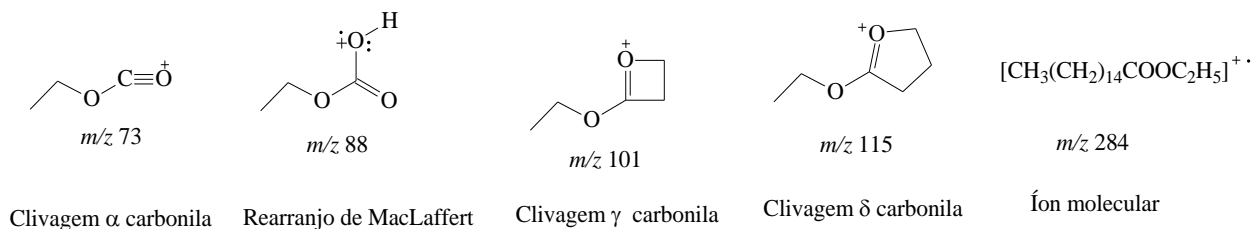


Figura 12 – Principais fragmentos propostos para o palmitato de etila



No espectro de massa do linoleato de etila, éster insaturado, verifica-se a presença de dois picos bases m/z 67 e 81, da quebra homolítica, fornecendo as duas espécies radicalares $[\text{C}_5\text{H}_7]^+$ e $[\text{C}_6\text{H}_9]^+$, respectivamente, e o sinal do íon molecular, $[\text{M}^+]$ 308, apresentados na Figura 13. Os seus principais fragmentos são propostos na Figura 14, através de fragmentações subsequentes (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

Figura 13 – Espectro de massa do composto linoleato de etila

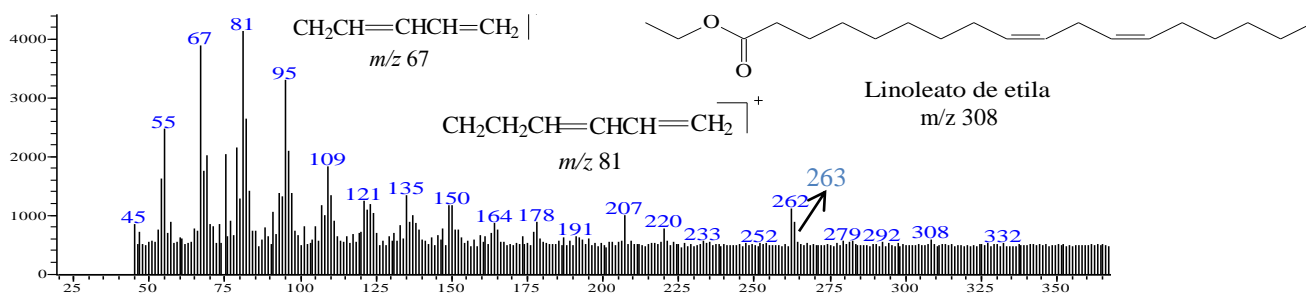
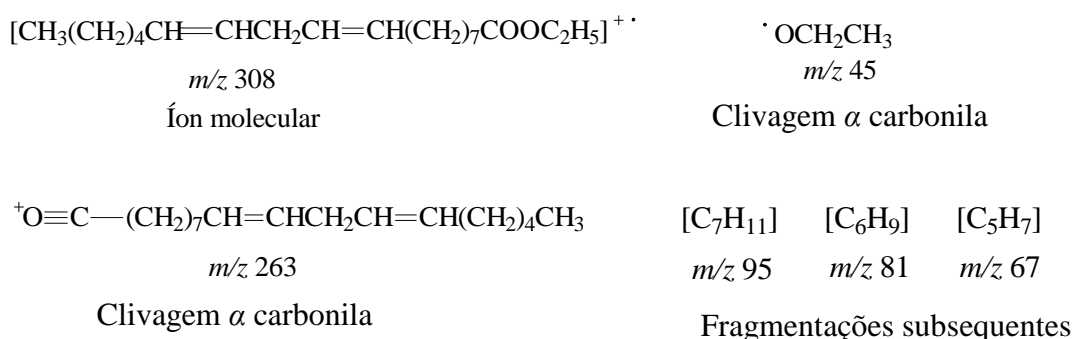


Figura 14 – Principais fragmentos propostos para o linoleato de etila



O timol trimetilsilil (Timol TMS) foi o único composto fenólico detectado na fração analisada com a maior intensidade relativa, 32,42%, como o pico do íon molecular de $[\text{M}^+]$ 222. Os picos bases m/z 73 e 207, para o m/z 73 representa o cátion trimetilsilil ($+\text{Si}(\text{CH}_3)_3$), formado por uma quebra homolítica, e o pico m/z 207 é sugerido a perda de uma metila, logo o processo de fragmentação, neste caso, é favorecido pelas ligações de carbonos ramificados. Isso ocorre na molécula em estudo, porque há uma maior estabilidade em carbonos terciários sobre os secundários e desses sobre os primários.

O grupo trimetilsilil (TMS) por natureza é um bom grupo protetor e, conseqüentemente, fácil de ser eliminado. O pico m/z 135 representa a perda da molécula neutra $\text{CH}_2\text{Si}(\text{CH}_3)_2$, que ocorre o rearranjo de McLaffert, confirmando que o composto timol foi realmente siliado por uma derivatização de silição, composto esse, presente na espécie *Origanum vulgare* (TRIVEDI et al., 2016; KHAN et al., 2018). Na Figura 15, é mostrado o espectro de massa do Timol trimetilsilil e a Figura 16 mostra a sua proposta de fragmentação.

Figura 15 – Espectro de massa do composto timol-trimetilsilil

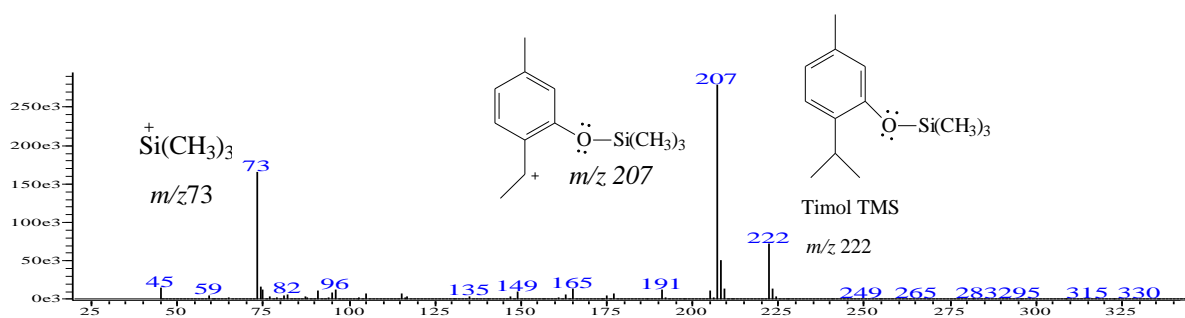
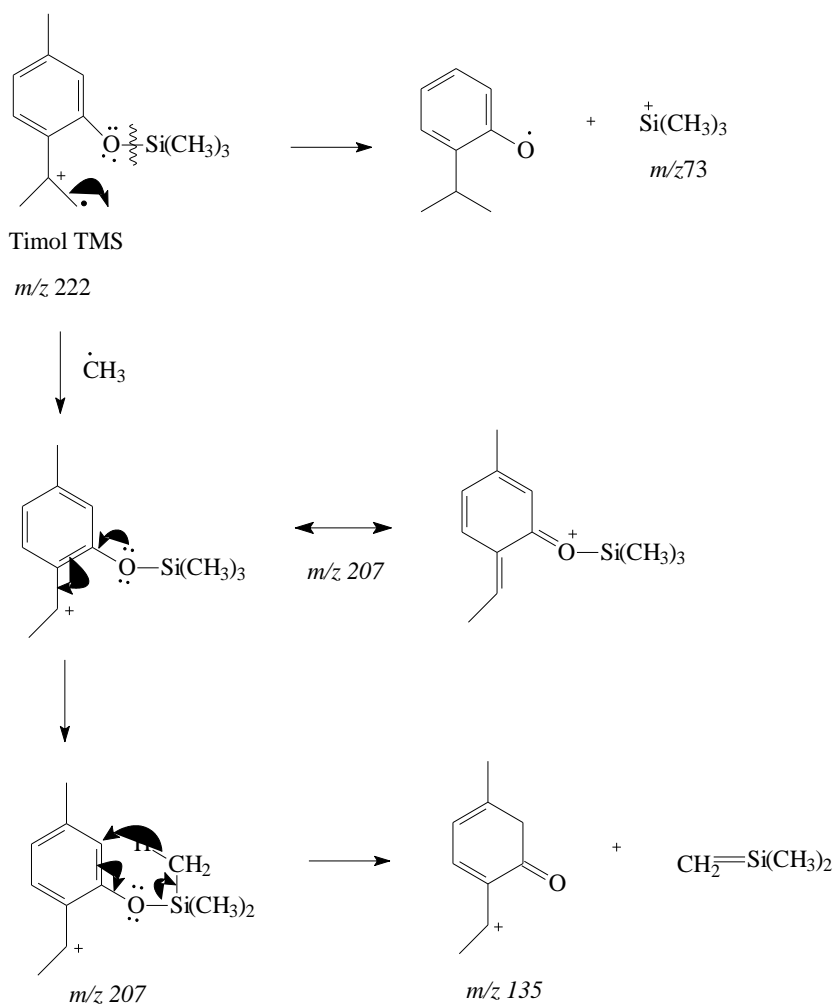


Figura 16– Proposta de fragmentação do timol-trimetilsilil (Timol TMS)



O constituinte isopulegol TMS apresenta o pico m/z 221 que representa a perda de uma metila. O pico base m/z 143 é explicado pelo rearranjo de H, seguindo de rearranjo de hidrocarboneto (Vagner Meerwein), depois perde metil ciclobuteno e H radical, gerando o íon radical m/z 143.

O pico m/z 226 sofre uma quebra homolítica formando o pico base m/z 73, que é a perda do grupo trimetilsilil. O pico do cátion radical, m/z 226, sofre um rearranjo que

logo em seguida ocorre uma liberação de um radical CH_3CHCH_3 , formando o pico base m/z 183, que logo após libera uma molécula neutra $(\text{CH}_3)_3\text{SiOH}$ gerando o pico base m/z 93. O pico base m/z 158 é a perda de uma molécula neutra $(\text{CH}_3)_2\text{CHCHCH}$, a partir do cátion radical m/z 226, por uma quebra homolítica.

Na Figura 17 mostra o espectro de massa do Isopulegol-trimetilsilil e a Figura 18 mostra a sua proposta de fragmentação.

Figura 17 – Espectro de massa do composto Isopulego-trimetilsilil (Isopulegol TMS)

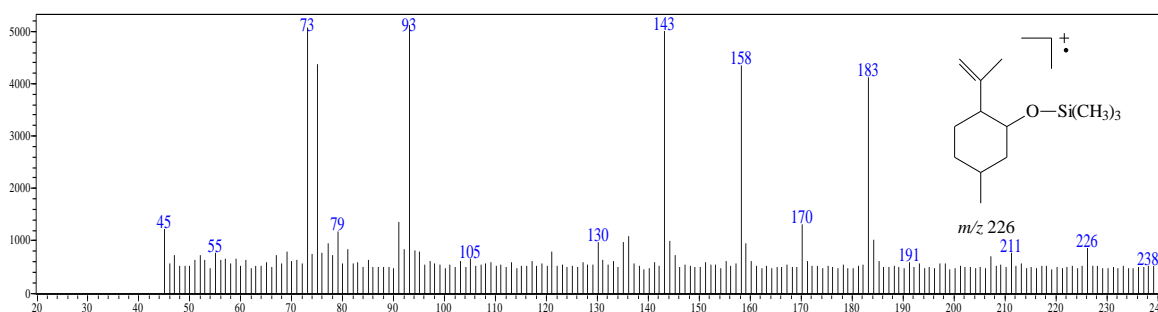
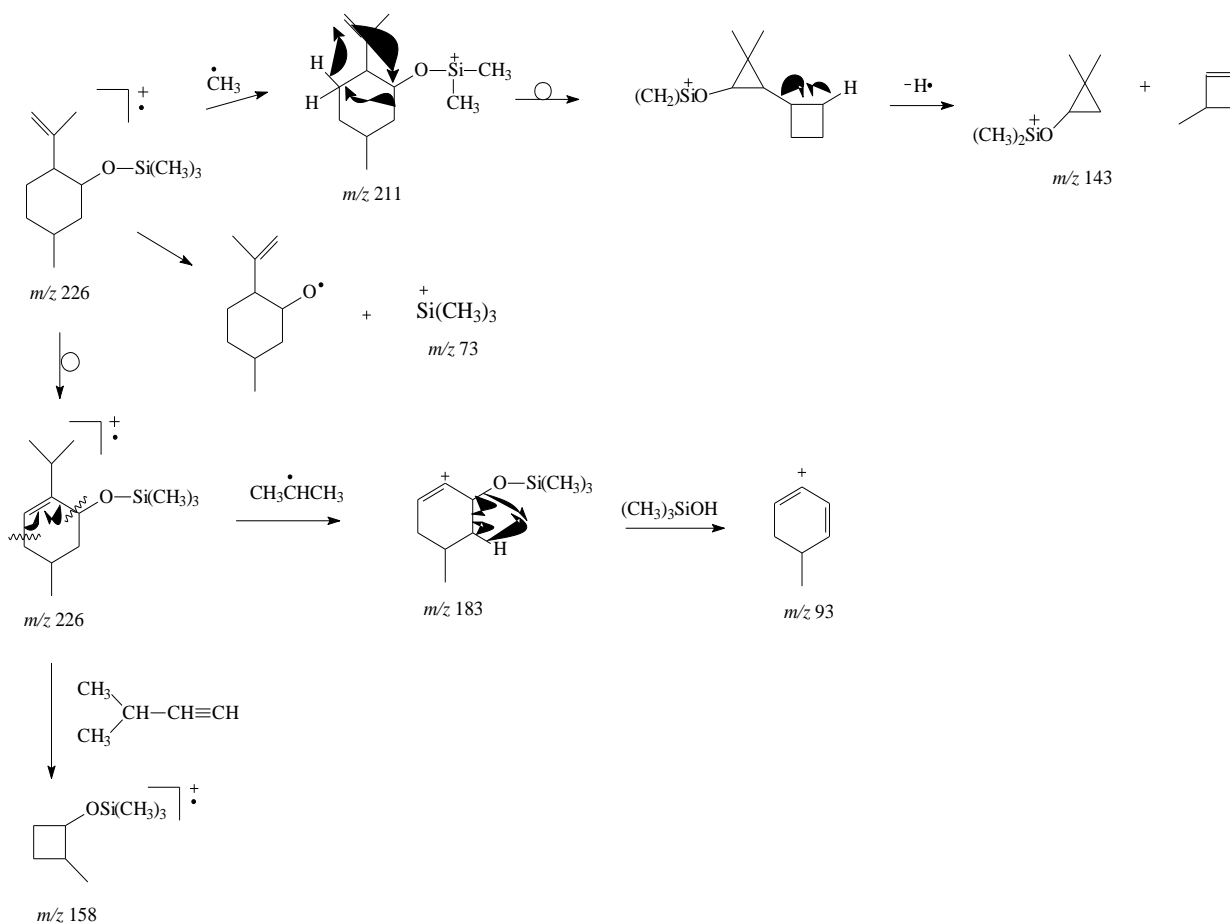


Figura 18 – Proposta de fragmentação do isopulegol trimetilsilil (Isopulegol TMS)



4.3.2 Identificação do constituinte a partir da fração diclorometano (DCM)

Na tentativa de identificar mais compostos químicos, as subfrações foram submetidas a uma análise de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), a partir da fração diclorometano.

Resultou na identificação de uma mistura, SF1, de ácidos graxos predominantemente insaturados. Isso é justificado a partir da análise preliminar da fração DCM por CG-EM, a qual foi identificada a presença de apenas um éster insaturado de ácido graxo, o linoleato de etila, com o pico molecular m/z 308, $C_{20}H_{36}O_2$.

Essa descoberta foi confirmada po RMN de 1H , ^{13}C e DEPT que apresentaram perfis característicos para uma mistura de ácidos graxos de natureza insaturada, confirmado pelos sinais em δ 5,33 e 5,34 atribuídos ao CH olefínico, referente as instaurações. No RMN de ^{13}C , dois carbonos primários [δ_c 14,07 e 14,22], na região de carbonos secundários [δ_c 22,65 – 33,80] e de carbonos insaturados [121,07 – 131,92]. E, dois sinais de carbonilas de ésteres [δ_c 178,81 e 178,75].

O RMN de 1H apresentou sinais atribuídos a hidrogênios alifáticos [δ_c 0,84 – 2,80], com sinais de dois tripletos metílicos [δ_c 0,84 – 0,97].

Figura 19 – Espectro de RMN de ^{13}C da mistura da SF1 ($CDCl_3$, 400MHz)

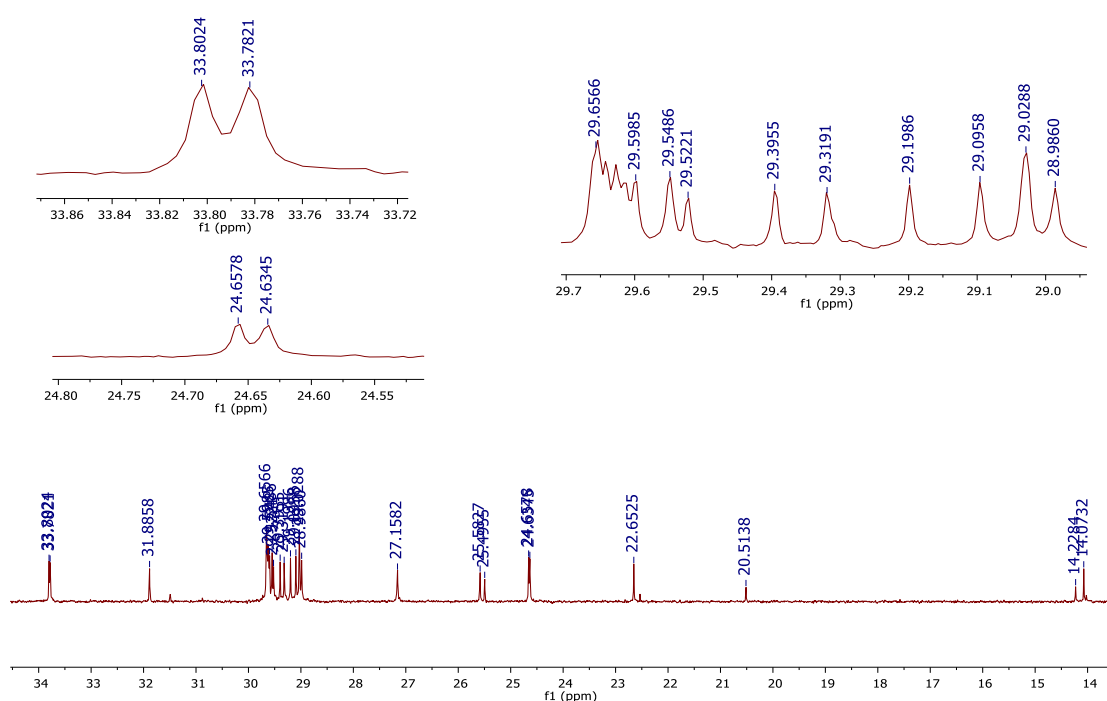


Figura 20 – Espectro de RMN de ^{13}C da mistura da **SF1** (CDCl_3 , 400MHz)

COMPOSTO 5 C13

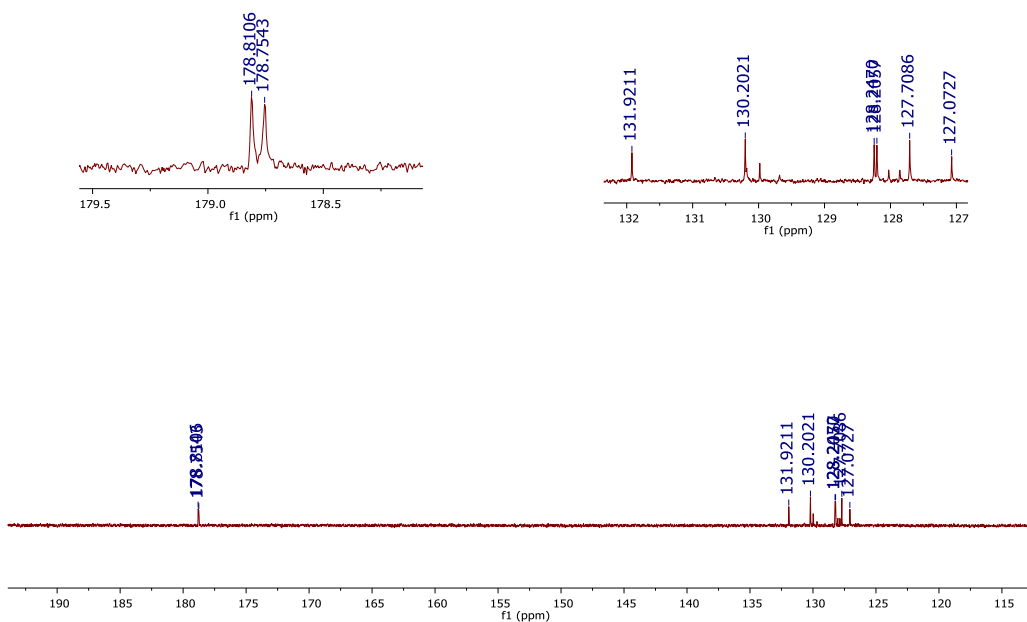


Figura 21 – Espectro de RMN de ^1H da mistura **SF1** (CDCl_3 , 400MHz)

COMPOSTO 5 H1

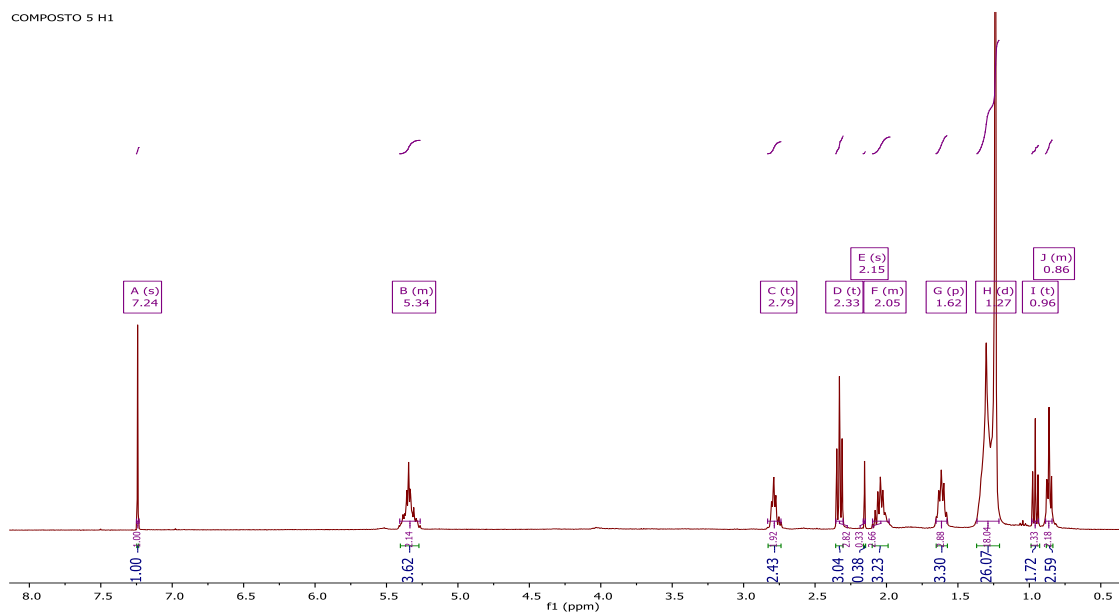
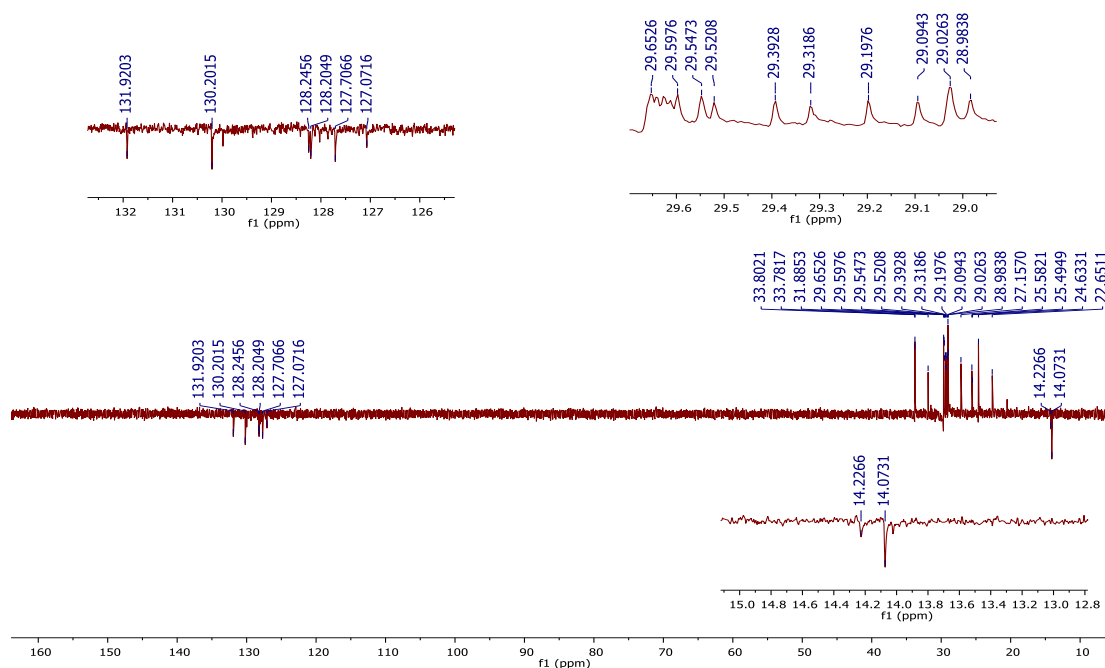


Figura 22 – Espectro de DEPT da mistura da SF1 (CDCl₃, 100MHz)

4.4 Composição do óleo essencial de *O. Vulgare*

Obteve-se 4,67 (p / p) como rendimento do Óleo Essencial das folhas de *O. Vulgare* (OEOV). A composição química encontra-se descrita na Tabela 4, onde foi possível caracterizar um percentual de 98,3 % dos constituintes presentes no óleo essencial. Os principais constituintes voláteis encontrados no óleo essencial das folhas secas de *O. vulgare*, foram: γ -terpineno (8,27 %); Terpinen-4-ol (52,54 %); Timol (6,82 %); Carvacrol (12,96 %) e o β -cariofileno (5,89 %).

Tabela 4: Composição química do óleo essencial de *O. vulgare*

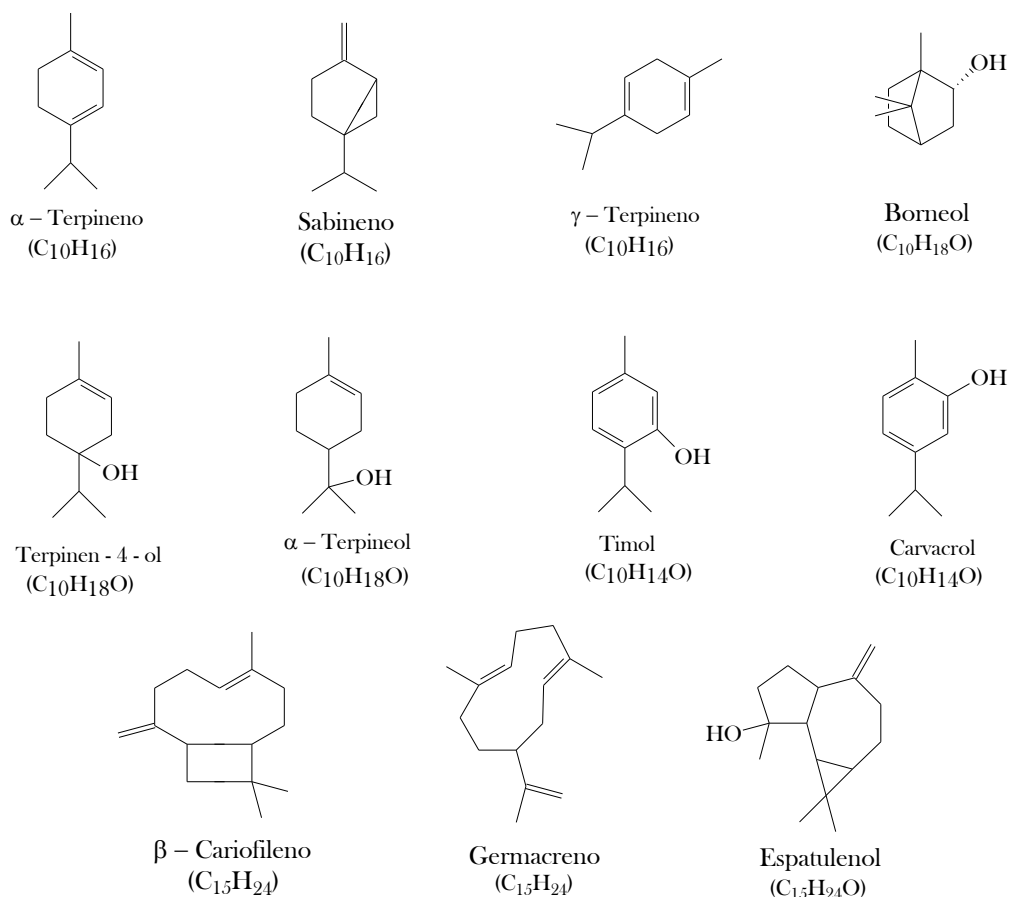
Picos	*T.R.	Concentração (%)	Constituintes
1	5,715	2,95	α -terpineno
2	5,944	1,11	Sabineno
3	6,631	8,27	γ -terpineno
4	9,144	1,02	Borneol
5	9,426	52,54	Terpinen-4-ol
6	9,817	3,63	α -terpineol
7	12,759	6,82	Timol
8	12,954	12,96	Carvacrol
9	15,852	5,89	β -cariofileno
10	17,744	1,76	Germacreno
11	19,539	1,35	Espatulenol

*T.R = Tempo de Retenção

Por meio dessa análise cromatográfica foram identificados monoterpenos hidrocarbonetos 12,33 % (α -terpineno; Sabineno; γ -terpineno); monoterpenos oxigenados 76,96 % (Borneol; Terpinen-4-ol; α -terpineol; Carvacrol; Timol); sesquiterpenos hidrocarbonetos 7,65 % (β -cariofileno e germacreno) e sesquiterpeno oxigenado 1,35 % (Espatuneol), demonstrados na Figura 23, estando de acordo com os achados da literatura, reinterando a composição do O.E da espécie *O. vulgare*, (MASTRO et al., 2017; SARIKURKCU et al., 2015; BÉJAOU, BOULILA,A.; BOUSSAID, M., 2013).

A variação da composição do óleo essencial dessa espécie é discutido por vários pesquisadores como LUKAS, B.; SCHMIDERER, C.; NOVAK, J., (2015); COQUEIRO, et al., (2012); Simões, et al., (2003), já que os constituintes estão associados a localização geográfica, condições climáticas, forma do plantio, método de extração, manejo das folhas, fatores e características genéticas, ecológicas e ambientais, armazenamento, dentre outros (MORSHEDLOO et al., 2018; OLIVEIRA, et al., 2016; MORSHEDLOO et al., 2015; COQUEIRO, et al., 2012;).

Figura 23 – Estruturas dos compostos identificados no OEEV por CG-EM

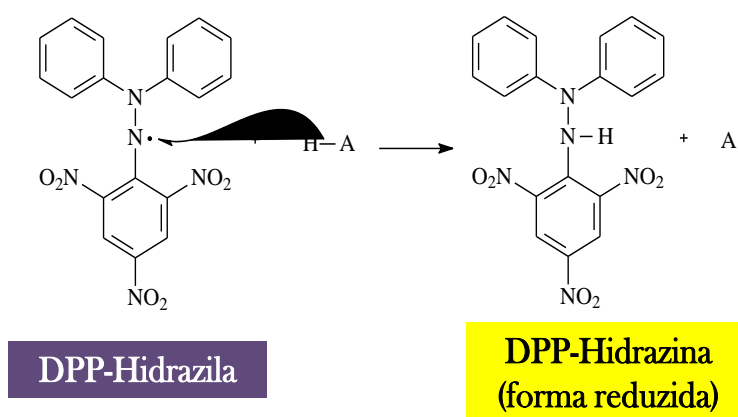


4.5 Análise da Atividade antioxidante do óleo essencial de *O. vulgare*

O teste de DPPH• é um método comumente realizado *in vitro* para determinação de atividade antioxidante, em óleos fixos e essenciais, por ser um método rápido, prático e sensível, o qual tem como princípio básico, o sequestro de hidrogênio ou elétrons proveniente da amostra que atua como doadora desses radicais, essa capacidade de remoção de radicais livres é medida utilizando o cátion radical DPPH• que será facilmente reduzido a DPPH-H (2,2-difenil-1-picril-hidrazina) e sua atividade é medida espectrofotometricamente, (STANOJEVIĆ, L.P. et al., 2016; BOUYAHYA et al., 2017; CANSIAN, R.L. et al., 2010) .

Baseado na redução de solução alcoólica de DPPH•, que apresenta um máximo de absorção em 517 nm, característico de coloração violeta, que na presença de um antioxidante em potencial, doador de hidrogênio ou elétrons, o DPPH• pode abstrair o seu radical hidrogênio ou elétron, para dessa maneira se tornar uma molécula estável, DPPH-H (2,2-difenil-1-picril-hidrazina), que proverá em uma diminuição da absorbância, que em solução apresenta coloração amarelada (Figura 24) já que a coloração passa do violeta para o amarelo (BERGAMASCHI, 2010).

Figura 24 – Reação de redução do radical DPPH frente a um composto antioxidante (HA)



O OEOV foi testado em cinco concentrações diferentes (0,002; 0,02; 0,2; 2,0 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sendo os resultados apresentados nas Tabelas 2, respectivamente. As análises demonstraram que o teor antioxidante aumenta equivalente a concentração da amostra adicionada, com valor máximo e mínimo de 93,65 e 16,51 %, para o OEOV, e

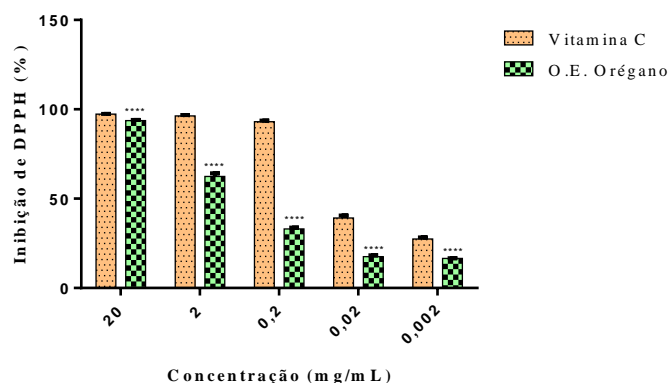
a maior e menor concentrações, 20 e 0,002 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, como está demonstrado na Tabela 5 e no Gráfico 1, em comparação aos níveis de inibição de concentração, e ao controle positivo (Vitamina C), sendo que obtemos os valores de 97,37 e 27,44 %, para maior e menor concentrações, respectivamente.

Tabela 5: Atividade antioxidante para o óleo essencial de *O. vulgare*, utilizando DPPH, comparado a análises da Vitamina C, com as respectivas concentrações

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Vitamina C (%)	OE de Orégano (%)
20	97,37334	93,65666
2	96,34666	62,40333
0,2	93,09666	33,08333
0,02	39,13333	17,55667
0,002	27,440	16,50667

Os resultados demonstraram que o OEOV exibiu uma atividade moderada para eliminação de radicais DPPH, com um valor CI_{50} de $0,5672 \mu\text{g mL}^{-1}$, maior que a do ácido ascórbico, $0,02268 \mu\text{g mL}^{-1}$. Segundo HAJLAOUI et al. (2016), a atividade moderada para eliminação de radicais DPPH pode estar relacionada à atividade mais fraca do componente terpinen-4-ol, que se encontra em maior concentração percentual no OE, pois em seu trabalho o resultado apresentou um valor CI_{50} de $62,66 \pm 2,08 \mu\text{g mL}^{-1}$, para *Origanum majorona* justificando uma eficiência moderada.

Gráfico 1 – Atividade antioxidante do OEOV usando o DPPH



Os valores representam a média \pm desvio padrão da média dos experimentos em triplicata. (ANOVA e pós-teste de *Holm-Šidák*).

Sugere-se que essa atividade pode ter ocorrido devido à uma moderada porcentagem na quantidade de compostos fenólicos, monoterpenos aromáticos presentes no OEOV, já que o timol e o carvacrol, são monoterpenos oxigenados aromáticos que apresentam um grupo fenil capaz de doar elétrons ou prótons ou átomos de hidrogênio(YAN et al., 2016), onde suas abundâncias no presente estudo foi apenas 6,82 e 12,96%, respectivamente; trabalhos de Hyun et al. (2014); Quideau et al.(2011) e Bisht et al. (2009); discutem que o timol e o carvacrol, são compostos redox-ativos, um fenol natural, e fortes eliminadores de radicais livres, onde atuam como antioxidantes naturais.

HAJLAOUI et al. (2016) e Silva et al. (2007) mencionam que os monoterpenos oxigenados possuem maior atividade antioxidante que os monoterpenos hidrocarbonetos, hidrocarbonetos sesquiterpênicos e seus derivados oxigenados, onde apresentam menor atividade antioxidante. Justificando que a atividade do OE com *O. vulgare*, extraído das folhas comercializadas, foi significativa e promissora para o desenvolvimento de novas pesquisas na saúde e a neurociência.

4.6 Atividade anticolinesterásica (AChE)

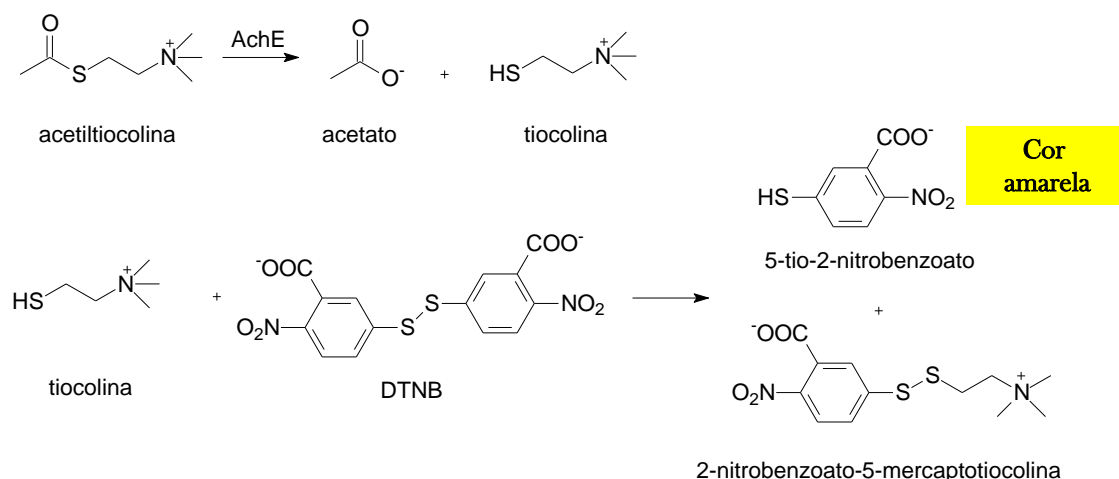
A enzima acetilcolinesterase (AChE) é responsável pela finalização da transmissão dos impulsos nervosos e encontra-se relacionada a problemas neurodegenerativos como a doença de Alzheimer (ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V.L.A; GONSALVES, A.A, 2016). A acetilcolina (ACh), é um importante neurotransmissor colinérgico responsável pelas sinapses nervosas e na presença da enzima AChE é hidrolizada (degradada) em acetato e colina, o que proporciona redução de suas taxas (HUA; ZHOU; YU, 2015; ZARRAD et al., 2015; DVIR et al., 2010).

Neste contexto, pesquisas vêm sendo divulgadas com amplos estudos com diversos inibidores, a saber: galatamina, neostigmina e a rivastigmina, chamados de anticolinesterásicos ou colinérgicos indiretos, os quais possuem potencial de inibir a ação da enzima AChE, bloqueando a hidrólise da AChE, e viabilizando o seu acúmulo por um período maior na fenda sináptica, o qual proporciona um aumento nos estímulos das transmissões colinérgicas (ARAÚJO, C. R. M.; SANTOS, V. L. DOS A.; GONSALVES, A. A., 2016; BITZINGER ET AL., 2016; TEL-ÇAYAN ET AL., 2015; MUSTAFA, S.; ISMAEL, HN, 2014). Como também, as plantas medicinais vêm se

destacando como alternativa na inibição da enzima AChE o que incentiva a procura por compostos bioativos com propriedades anticolinesterásica.

Em um ensaio qualitativo na inibição da enzima AChE em cromatografia em camada delgada (CCD), pelo método de Ellman, onde o resultado é através da coloração na cromatoplaça. O método se baseia em avaliar a hidrólise da acetilcolina a partir da enzima AChE formando a tiocolina que na presença do reagente de Ellman (DTNB-ácido 5,5'-ditiobis-[2-nitrobenzoico]) produz 5-tio-2-nitrobenzoato (cor amarelo) e 2-nitrobenzoato de metila-5-mercaptotiocolina. O reagente indica a cromatoplaça uma coloração amarelada e o teste de inibição é considerado positivo quando se observa manchas brancas, pois consta que a acetiltiocolina não foi hidrolisada. O ensaio realizado tanto para o extrato EtOH quanto o óleo essencial da folhas secas de *O. vulgare* atividade testada (Figura 25) (RHEE et al., 2001) comparado com um padrão positivo (cafeína), ambas amostras exibiram atividades.

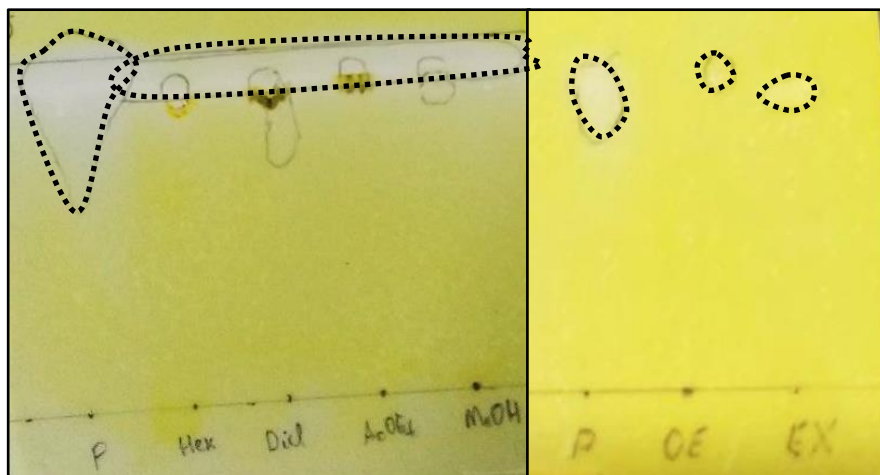
Figura 25 – Reação de atividade enzimática da AChE



No teste qualitativo inibidor da enzima acetilcolinesterase do óleo essencial, do extrato etanólico e das frações das folhas secas de *O. vulgare* foram avaliados na concentração de 10 mg mL^{-1} . O teste é considerado positivo quando se observa na cromatoplaça manchas brancas em destaque da colocação amarelada. Pois então, o óleo essencial, o extrato e frações apresentaram-se ativos na inibição da enzima, conforme observado na Figura 26, possuindo desse modo compostos capazes de inibir a enzima AChE. (P: padrão cafeína; amostra: óleo essencial; EX: extrato etanólico; OE: óleo

essencial; Hex.: fr. Hexânica; DiCl.: fr. Diclorometano; AcOEt.: fr. Actato de etila; MeOH: fr. Metanólica).

Figura 26 – Cromatoplasmas do ensaio qualitativo de inibição da enzima AChE do extrato e frações (1) e óleo essencial de *O. vulgare* (2)



Para o teste quantitativo, o padrão utilizado foi a Rivastigmina (Exelon[®]), um inibidor mais utilizado no tratamento à demência associada às doenças de Alzheimer e Parkinson (GOSCHORSKA et al., 2018; CHEN et al., 2017; HENDERSON et al., 2016). A concentração inibitória 50 % (**CI₅₀**) da rivastigmina, no presente estudo, foi de 0,3633 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto os testes em 5 e 10 min, a **CI₅₀** foi de 0,9926 e 1,625 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, já para o óleo essencial, enquanto para o extrato EtOH a **CI₅₀** da rivastigmina foi de 0,3302 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e os teste em 5 e 10 min foram de 9,431 e 12,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

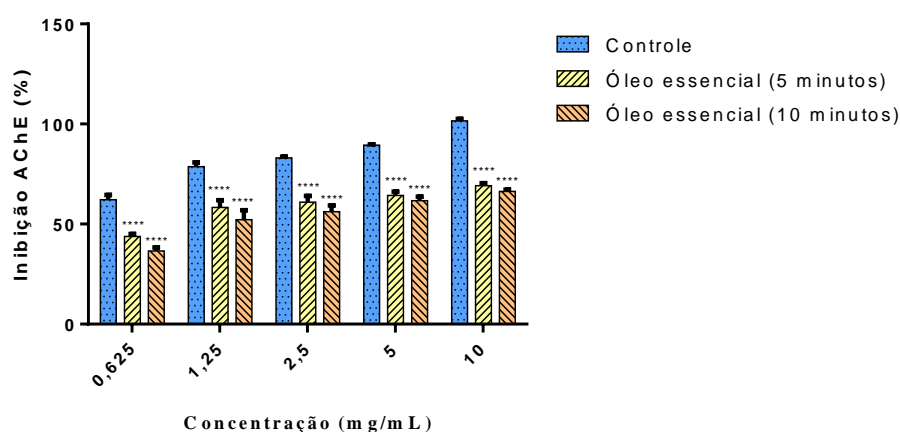
O resultado foi esperado, pois quanto maior for o tempo da ação inibitória maior concentração necessária para que a atividade seja realizada. Pode-se concluir que com o passar do tempo à atividade da amostra diminui, pois se trata de compostos voláteis, monoterpenos, presentes no OEOV, com relação ao extrato EtOH bruto, onde esse material apresenta quantidades maiores de compostos orgânicos, podendo haver interações entre si, que podem diminuir ou potencializar a atividade, impurezas, dentre outros fatores que podem interferir nos resultados biológicos, como a da inibição enzima AChE.

Os resultados mostraram que a inibição cresce com o aumento da concentração do OE e extrato EtOH, em comparação com a rivastigmina (controle positivo, Gráfico 2 e

3), nos dois períodos de tempos (em 5 e 10 min). Nas concentrações mínimas e máximas, 0,625 e 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$, de 43,78 e 69,23 %, para 5 min, e 36,23 e 66,28 %, para 10 min, respectivamente. Para o extrato foram de 23,07 e 55,17 %, 5min, e 22,33 e 53,22 %, 10 min. O padrão os resultados foram de 62,22 e 101,54 %, respectivamente, na mínima e máxima concentração. Os dados se encontram nas Tabelas 6 e 7, com seus respectivos Gráficos 2 e 3. Portanto, sugere-se que estes resultados são satisfatórios e relevantes para a pesquisa, pois ambas as amostras apresentaram potencial inibidor frente à enzima AChE, nos motivando no aprimoramento de novas técnicas, como isolamentos, testes com o composto majoritário, dentre outras, para a continuidade da pesquisa para a espécie *O. vulgare* nessa área de estudo.

Em pesquisas realizadas por Sarikurkcu et al. (2015), espécies do gênero *Origanum*, subsp. *vulgare* e subsp. *hirtum*, apresentaram atividades relevantes para o tratamento de doenças neurodegenerativas como a doença de Alzheimer (DA). Estas sub espécies apresentaram seus óleos essenciais com inibição de $1.64 \pm 0.002 \text{ mg.g}^{-1}$ de no teste *in vitro* da enzima acetilcolinesterase. Dessa maneira, podemos reinterar que o presente trabalho, avaliado, possui potencial de inibição *in vitro* diante da enzima AChE do OEOV, pois apresentou valores promissores comparados com a literatura.

Gráfico 2 – Atividade Anticolinesterásica do OEOV utilizando a Rivastigmina (Exelon®) como controle positivo

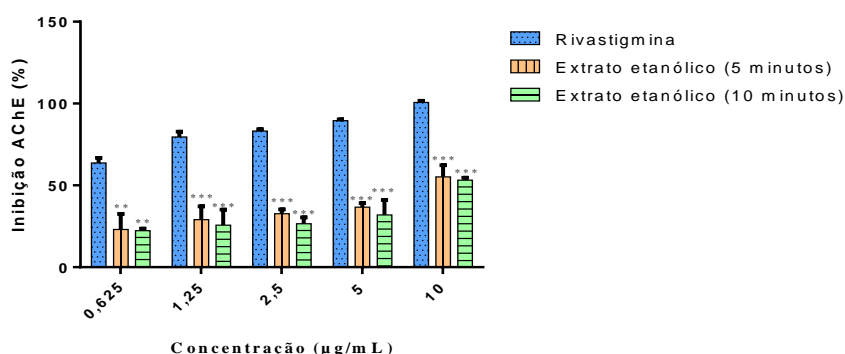


Os valores representam a média (%) \pm erro padrão da média, $n=3$ para cada concentração, $p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$ comparado ao controle (*Two way ANOVA*, seguida pelo pós-teste de *Holm-Sidak*).

Tabela 6: Valores da média e do erro padrão da média (EPM) de cada concentração para o OE para o *O. vulgare*

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Rivastigmina		Óleo essencial (5 minutos)		Óleo essencial (10 minutos)	
	Média (%)	EPM	Média (%)	EPM	Média (%)	EPM
0,625	62,22	2,3234	43,78	1,2241	36,60	1,6574
1,25	78,64	2,1219	58,28	3,6096	52,13	4,7869
2,5	83,09	0,65237	60,97	3,0925	56,18	3,1020
5	89,38	0,46857	64,37	1,8735	61,63	2,0529
10	101,54	0,97895	69,23	1,1701	66,28	0,9441

Gráfico 3: Atividade anticolinesterásica do extrato EtOH utilizando a Rivastigmina (Exelon[®]) como controle positivo



Os valores representam a média (%) \pm erro padrão da média, $n=3$ para cada concentração, $p \leq 0,01$; $p \leq 0,001$ comparado ao controle (*Two way ANOVA*, seguida pelo pós-teste de *Holm-Šidák*).

Tabela 7: Valores da média e do erro padrão da média (EPM) de cada concentração para o extrato EtOH de *O. vulgare*

Concentrações	Rivastigmina		Extrato (5 minutos)		Extrato (10 minutos)	
	Média	EPM	Média	EPM	Média	EPM
0,625	62,2258	2,323477	23,07693	9,485255	22,33879	1,265045
1,25	78,64516	2,121934	29,03412	8,155005	25,67109	9,472385
2,5	83,09677	0,6523788	32,73568	2,60266	26,53502	3,856829
5	89,3871	0,4685738	36,66859	2,486984	31,96544	9,10213
10	101,5484	0,9789538	55,17641	7,113935	53,22432	1,481026

Orhan et al. (2008) em seu trabalho, apresentaram como resultado de inibição do óleo essencial da espécie de *O.vulgare* frente a acetilcolinesterase foi de 97,9 % , em comparação com o do presente estudo que o percentual apresentado foi entre 66,28 – 69,23 % . Esse resultado pode estar relacionado com fatores climáticos, modo de plantio, extração do óleo, armazenamento, localidade, dentre outros, pois no trabalho citado anteriormente a planta encontrava-se no estágio maduro e florido, um estágio excelente para extração de óleo essencial, onde os valores percentuais dos constituintes, se encontraram maiores, porém nesse trabalho analisado as folhas foram adquiridas secas e comercializadas, e dessa maneira alguns constituintes voláteis encontrados foram menores percentualmente, em comparação a um óleo extraído de uma planta fresca.

VLADIMIR-KNEŽEVIĆ, S. et al. (2014) realizou um teste de atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (AChE) para o extrato etanólico de *Origanum vulgare* e o teste não atingiu 50% inibição da atividade enzimática, na concentração de 1 mg.mL^{-1} .

4.7 Atividade larvicida do OE de *O. Vulgare* frente às larvas *Aedes aegypti*

Os resultados dos ensaios do teste larvicida foram calculados a partir da mortalidade larval de cada concentração, em triplicatas, durante o período de 24 e 48 h, e a partir da quantificação do número de larvas mortas foram construídos os gráficos 4 e 5, e calculado o CL50, que foram de 53,54 ppm (limite inferior limite 36,66 – 78,28 ppm) e 45,66 ppm (limite inferior de limite 31,21 – 66,79 ppm) , respectivamente. A amostra exibiu uma regressão linear dos valores adquiridos para as análises 24 e 48 h $Y = 0,4843X + 9,072$; $R^2 = 0,9251$ e $Y = 0,4231X + 8,150$; $R^2 = 0,9238$, corroborando para uma atividade larvicida significativa.

Gráfico 4: Análise estatística da atividade larvicida do O.E de 24 h

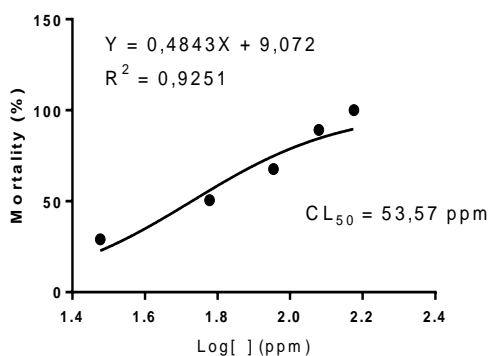
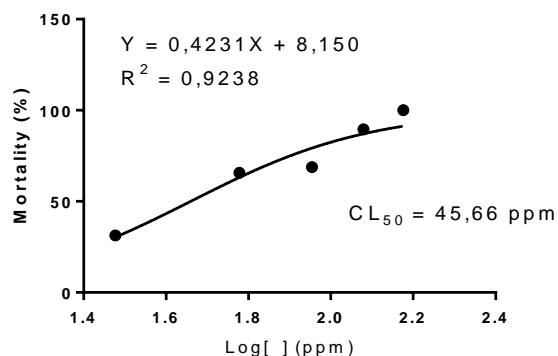


Gráfico 5: Análise estatística da atividade larvicida do O.E de 48 h



Esses resultados dependem da concentração de cada ensaio, e estão de acordo com o trabalho de Govindarajan et al. (2016) que avaliaram o potencial do OE de *O. vulgare* como larvicida, frente aos vetores de mosquitos *Anopheles stephensi*, *Anopheles subpictus*, *Culex quinquefasciatus* e *Culex Tritaeniorhynchus* com valores LC50 de 67,00; 74,14; 80,35; 84,93 ppm. Da mesma forma, Govindarajan et al. (2012) testaram o O.E. de *Mentha spicata* contra *Aedes aegypti*, *Anopheles stephensi* e *Culex. Quinquefasciatus*, os aquais apresentaram CL50 de 56,08; 49,71; 62,62 ppm, respectivamente.

E no mesmo trabalho de Govindarajan et al. (2016) foram avaliados constituintes puros do OE de outra espécime de *O. vulgare* a saber: carvacrol e terpinen-4-ol frente aos vetores de mosquito, *Anopheles stephensi*, *Anopheles subpictus*, *Culex. quinquefasciatus* e *Culex. Tritaeniorhynchus* com valores obtidos de CL50 de 21,15; 24,06; 26,08 ; 27,95 ppm, para o cavarcol, e 43,27 ; 47,73 ; 52,19 ; 54,87 ppm, para o terpinen-4-ol. Esses valores são relevantes, pois confirmam que a atividade larvicida para o O.E do orégano das folhas secas, foi positivo, pois além do óleo ser uma mistura formada por monoterpenos, este resultado pode ser sugerido como sinergismo de todos os constituintes, como também ao composto majoritário terpinen-4-ol (52,53 %), como foi mencionado anteriormente.

Estudos realizados por Seo et al. (2015) sugerem que os constituintes γ -terpineno apresentara um forte potencial larvicida. Em nossos achados os constituintes, a saber: γ -terpineno, apresentaram uma porcentagem de 8,67 % na composição do óleo, contribuindo e confirmando em um resultado promitente e positivo ao prosseguimento de estudos e testes futuros.

Para o extrato EtOH das folhas secas de *O. vulgare*, não exibiu atividade frente as larvas *Aedes aegypti*. Prosseguiremos com aprimoramento dessa amostra, seja na sua solubilidade, pois não apresentou boa interação como o DMSO ou com outro tipo de solvente para a extração do extrato ou um complexo para aumentar assim a forma que o veículo irá interagir com as larvas e na solubilidade ao DMSO.

5 Conclusão

De acordo com os resultados obtidos e mostrados neste trabalho, pode-se considerar que: o teste fitoquímico e a análise por CLAE do extrato etanólico das folhas secas de *O. vulgare* foram de importância durante o processo de prospecção, pois forneceu um perfil prévio da amostra. O fracionamento cromatográfico da fração diclorometano a partir do extrato etanólico permitiu identificar uma mistura de ácidos graxos predominantemente insaturados, por RMN. A fração diclorometano após a sililação e análise por CG-EM apresentou em sua composição ácidos graxos e terpenos, identificando o constituinte timol sililado, como composto majoritário. O óleo essencial de *O. vulgare* foi analisado por CG-EM e apresentou em sua composição compostos tais como: monoterpenos hidrocarbonetos e oxigenados; sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados, sendo o terpinen-4-ol o majoritário. O óleo essencial e o extrato etanólico de *O. vulgare* mostraram-se que contêm componentes terpênicos que podem afetar em diferentes alvos, como atividade de AChE e estresse oxidativo, e que pode ter grande relevância na prevenção e terapêutica da doença de Alzheimer. O óleo essencial apresentou-se como promissor no sequestro de radicais livres, evidenciado por meio do ensaio de DPPH. Além disso, estudos indicam que o óleo essencial do orégano pode ser usado como fonte potencial de antioxidantes naturais para a indústria de alimentos, produtos farmacêuticos e químicos. Assim, através desse estudo pode-se perceber que o óleo essencial de orégano representa uma alternativa aos aditivos sintéticos que possuem efeitos tóxicos e cancerígenos. O potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase por meio do ensaio qualitativo de Ellman, ao óleo essencial, extrato etanólico e as frações apresentaram inibição da enzima. Para o teste quantitativo os resultados adquiridos foram positivos e promissores, tendo uma resposta mais ativa e efetiva para o óleo essencial do que o extrato. Na investigação do teste biolarvicida, os resultados mostraram que o óleo essencial apresentou uma atividade mais satisfatória do que o extrato, pois segundo a análise por CG-EM o seu composto majoritário já possui potencial para essa atividade, contribuindo para a eficiência da amostra. E os resultados adquiridos para o extrato não foram eficientes. Os resultados apontam que o óleo essencial de *O. vulgare* poderá, após testes mais específicos, ser usado como agente promissor natural com propriedades funcionais em formulações farmacêuticas na área da química, saúde e neurociência, tendo isto nos motivado a continuar seu estudo.

Concluimos que os resultados obtidos nesse estudo foram significativos, pois contribuem no conhecimento da família e do gênero, enriquecendo os estudos fitoquímicos e biológico da espécie *O. vulgare*.

Perspectivas futuras

Este trabalho nos levou a elaboração de um complexo de inclusão do óleo de *O. vulgare* para melhorar as propriedades do OEOV.

O complexo de inclusão (CI) entre o óleo essencial de *Origanum vulgare* (OEOV) com β -ciclodextrina (β -CD) foi preparado, de acordo com o método proposto por Bhandari e colaboradores, com algumas modificações. Pesou-se 25 mg do OEOV e foi solubilizado em 500 μ L de etanol PA e adicionado a solução de 184,3 mg de β -CD solubilizada em 10 mL de uma mistura etanol:água (1:2) aquecida a 55 °C. Após a adição do OE, a mistura foi agitada a 150 rpm durante 4 horas, a uma temperatura ambiente de 25 °C. Após este período, a suspensão foi retirada da agitação e o solvente rotaevaporado. O precipitado foi recolhido e seco por liofilização.

A mistura física (MF) entre o OEOV e a β -CD na razão de 1:1 foi homogeneizada com o auxílio de um pistilo e, em seguida, foi armazenada em frasco hermeticamente fechado. As amostras encontram-se reservadas para posteriores análises por IV, DSC, Tg e RMN.

REFERÊNCIAS

- AKULA, Ramakrishna; RAVISHANKAR, Gokare Aswathanarayana. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720-1731, 2011.
- ALI, S.I.; GOPALAKRISHNAN, B.; VENKATESALU, V.. Evaluation of larvicidal activity of *Senecio laetus* Edgew. against the malarial vector, *Anopheles stephensi*, dengue vector, *Aedes aegypti* and Bancroftian filariasis vector, *Culex quinquefasciatus*. **South African Journal Of Botany**, v. 114, p.117-125, 2018.
- ALKENANI, Naser A.. Semi-field assessment of Spinosad in combination with Altosid briquet and Dudim DT tablets against *Aedes aegypti* mosquito larvae reared in pond water. **Saudi Journal Of Biological Sciences**, v. 27, p.1-6, 2018.
- ARAÚJO, C. R. M., SANTOS, V. D. A., & GONSALVES, A. A. Acetilcolinesterase-AChE: Uma Enzima de Interesse Farmacológico. **Revista Virtual de Química**, 8(6), 1818-1834.
- ARPASOVA, H. et al. The Effect of Oregano Essential Oil and *Rhus coriaria* L. on Selected Performance Parameters of Laying Hens. **Scientific Papers: Animal Science and Biotechnologies**, vol. 47, p. 12-16, 2014.
- ASSIMOPOULOU, A. N.; PAPAGEORGIU, V. P. GC- MS analysis of penta- and tetra- cyclic triterpenes from resins of *Pistacia* species. Part I. *Pistacia lentiscus* var. Chia. **Biomedical Chromatography**, v. 19, n. 4, p. 285-311, 2005.
- AUGUSTO, L. G. S. et al. *Aedes aegypti* control in Brazil. **The Lancet**, v. 387, n. 10023, p.1052-1053, 2016.
- BAJPAI, V. K.; BAEK, W.-H; KANG, S. C. Control of *Salmonella* in foods by using BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.
- BELTRÁN, J. M. G. et al. In vitro effects of *Origanum vulgare* leaf extracts on gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) leucocytes, cytotoxic, bactericidal and antioxidant activities. **Fish & Shellfish Immunology**, v. 79, p.1-10, 2018.
- BENABDALLAH, A. et al. Chemical composition, antioxidant activity and acetylcholinesterase inhibitory of wild *Mentha* species from northeastern Algeria. **South African Journal Of Botany**, v. 116, p.131-139, 2018.
- BENELLI, G. Research in mosquito control: current challenges for a brighter future. **Parasitology Research**, v. 114, n. 8, p.2801-2805, 2015.
- BERGAMASCHI, K. B. Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento. 2010. 97 f. Dissertação (Mestrado em ciências) – Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2010.

BESSA, N. G. F. et al. Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde–Tocantins. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 692-707, 2013.

BHANDARI, B. R.; D'ARC, B. R.; THI BICH, L. L. Lemon oil to β -cyclodextrin ratio effect on the inclusion efficiency of β -cyclodextrin and the retention of oil volatiles in the complex. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 4, p. 1494-1499, 1998.

BHARATI, Minu; SAHA, Dhiraj. Assessment of Insecticide Resistance in Primary Dengue Vector, *Aedes aegypti* (Linn.) From Northern Districts of West Bengal. **Acta Tropica**, p.1-33, 2018.

BITZINGER, D. I. et al. Species- and concentration-dependent differences of acetyl- and butyrylcholinesterase sensitivity to physostigmine and neostigmine. **Neuropharmacology**, v. 109, p.1-6, 2016.

BLANK, Daiane Einhardt et al. COMPOSIÇÃO QUÍMICA E CITOTOXICIDADE DE *Origanum vulgare* L. E *Rosmarinus officinalis* L. **Science And Animal Health**, v. 4, n. 2, p. 117-130, 2017.

BLAU, K.; HALKET, J. M. **Handbook of derivatives for chromatography**. Wiley, 1993.

BLUMENTHAL, M.; GOLDBERG, A.; BRINCKMANN, J. *Herbal Medicine-Expanded Commission E Monographs*, **Integrative Medicine Communications**, Newton, Mass, USA, 2000.

BOUYAHYA, A. et al. Chemical composition of *Mentha pulegium* and *Rosmarinus officinalis* essential oils and their antileishmanial, antibacterial and antioxidant activities. **Microbial Pathogenesis**, v. 111, p.41-49, 2017.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiol. Serv. Saúde**, v.16, n.4, p.279-293, 2007.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v. 33, n. 6, 2010.

BRONDANI, L. Pradebon et al. Evaluation of anti-enzyme properties of *Origanum vulgare* essential oil against oral *Candida albicans*. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 28, n. 1, p.94-100, 2018.

CALO, J. R. et al. Essential oils as antimicrobials in food systems - A review **Food Control**, v. 54, p. 111-119, 2015.

CANSIAN, R.L. et al. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. Linaloolifera fujita) **Cienc. Tecnol. Aliment.** 2, 378-378 384, 2010.

CASTILHO, P. C.; FEIO, S. S.; WEINHOLD, T. S.; GOUVEIA, S. C. Evaluation of the antimicrobial and antioxidant activities of essential oils, extracts and their main components from oregano from Madeira Island, Portugal. **Food Control**, v. 23, p.552 – 558, 2012.

CHACÓN, I. D.C.; RILEY-SALDANA, C. A.; GONZÁLEZ-ESQUINA, A. R. Secondary metabolites during early development in plants. *Phytochemistry Reviews*. Dordrecht, v. 12, p. 47-64, 2013.

CHEN, Tzu-hua *et al.* Factors affecting therapeutic response to Rivastigmine in Alzheimer's disease patients in Taiwan. **The Kaohsiung Journal Of Medical Sciences**, v. 33, n. 6, p.277-283, 2017.

CHIARADIA, M. C. et al. O estado da arte da cromatografia associada à espectrometria de massas acoplada à espectrometria de massas na análise de compostos tóxicos em alimentos. **Química nova**, 2008.

CHOU, Su-tze et al. Chemical composition, antioxidant, anti-melanogenic and anti-inflammatory activities of *Glechoma hederacea* (Lamiaceae) essential oil. **Industrial Crops And Products**, v. 122, p.675-685, 2018.

CLEFF, M.B.; MEINERZ, A.R.; XAVIER, M.; SCHUCH, L.F.; MEIRELES, M.C.A.; RODRIGUES, M.R.A.; MELLO, J.R.B. *In vitro* activity of *Origanum vulgare* essential oil against *Candida* species. **Braz J Microbiol**, v. 41, n. 1, p. 116-23, 2010.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. (Org). **Fundamento de cromatografia, Campinas, SP; UNICAMP**, 2006.

COQUEIRO, D. P. et al. Efeitos do chá de orégano (*Origanum vulgare*) no perfil bioquímico de ratos Wistar. **Scientia Medica**, Porto Alegre, v. 22, n. 4, p.191-196, 2012.

CRISHTI, S.; KALOO, Z. A.; SULTAN, P. Medicinal importance of genus *Origanum*: A review. **Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy**, v. 5, n. 10, p. 170-177, 2013.

DA SILVA LUZ, I. et al. Exposure of *Listeria monocytogenes* to sublethal amounts of *Origanum vulgare* L. essential oil or carvacrol in a food-based medium does not induce direct or cross protection. **Food research international**, v. 48, n. 2, p. 667-672, 2012

DA SILVA, N. L. A.; MIRANDA, F. A. A.; DA CONCEIÇÃO, G. M. Triagem Fitoquímica de Plantas de Cerrado, da Área de Proteção Ambiental Municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão. **Scientia Plena**, v. 6, n. 2, 2010.

DANILA, O. A.; GATEA, F.; RADU, G. L. Polyphenol composition and antioxidant activity of selected medicinal herbs. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 47, n. 1, p. 22-26, 2011.

DAVIDENCO, V. et al. Day length modulates precocity and productivity through its effect on developmental rate in *Origanum vulgare* ssp. **Scientia Horticulturae**, v. 218, p.164-170, 2017.

DE QUEIROZ, D. R. et al. Determinação da matéria-prima utilizada na produção do biodiesel adicionado ao diesel mineral através de monitoramento seletivo de íons. **Quim. Nova**, v. 31, n. 5, p. 1062-1066, 2008.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos [antioxidant properties of phenolic compounds]. **Visão Acadêmica**, v. 5, p. 33-40, 2004.

DIAS, C. N. *et al.* Chemical composition and larvicidal activity of essential oils extracted from brazilian legal Amazon plants against *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **J. Evid. Based Complementary Altern. Med.** 2015, 1–8.

DOS SANTOS, A. P.; DE AQUINO NETO, F. R. Estado da arte da cromatografia gasosa de alta resolução e alta temperatura. **Química nova**, v. 23, n. 3, p. 371, 2000.

DUTRA, Tatiane Viana et al. Bioactivity of oregano (*Origanum vulgare*) essential oil against *Alicyclobacillus* spp. **Industrial Crops And Products**, v. 129, p.345-349, 2019.

DVIR, H., SILMAN, I., HAREL, M., ROSENBERRY, T.L., SUSSMAN, J.L., 2010. Acetylcholinesterase: from 3D structure to function. **Chem. Biol. Interact.** 187, 10–22.

FAUCON, Frederic et al. Identifying genomic changes associated with insecticide resistance in the dengue mosquito *Aedes aegypti* by deep targeted sequencing. **Genome Research**, v. 25, n. 9, p.1347-1359, 2015. Cold Spring Harbor Laboratory.

FRANCINE, Tankeu Nzufu *et al.* Larvicidal activities of hydro-ethanolic extracts of three Cameroonian medicinal plants against *Aedes albopictus*. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, v. 6, n. 11, p.931-936, nov. 2016.

FUKAYAMA, E. H. *et al.* Oregan extract as an additive in the broiler diet. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n.6, 2316-2326, 2005.

GANDRA, E. A. *et al.* Potencial antimicrobiano y antioxidante de extractos vegetales. **Rev. Cienc. Tecnol.** v. 15, n .20, p. 24–29, 3013.

GIATROPOULOS, A. *et al.* Chemical composition and assessment of larvicidal and repellent capacity of 14 Lamiaceae essential oils against *Aedes albopictus*. **Parasitology Research**, v. 117, n. 6, p.1953-196, 2018.

GONÇALVES, C. M. *et al.* Distinct variation in vector competence among nine field populations of *Aedes aegypti* from a Brazilian dengue-endemic risk city. **Parasites & Vectors**, v. 7, p. 320, 2014.

GOSCHORSKA, M. *et al.* Effect of acetylcholinesterase inhibitors donepezil and rivastigmine on the activity and expression of cyclooxygenases in a model of the

inflammatory action of fluoride on macrophages obtained from THP-1 monocytes. **Toxicology**, v. 406-407, p.9-20, 2018.

GOVINDARAJAN, M. *et al.* Acute toxicity and repellent activity of the *Origanum scabrum* Boiss. & Heldr. (Lamiaceae) essential oil against four mosquito vectors of public health importance and its biosafety on non-target aquatic organisms. **Environmental Science And Pollution Research**, v. 23, n. 22, p.23228-23238, 2016. (a).

GOVINDARAJAN, M. *et al.* Larvicidal potential of carvacrol and terpinen-4-ol from the essential oil of *Origanum vulgare* (Lamiaceae) against *Anopheles stephensi*, *Anopheles subpictus*, *Culex quinquefasciatus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). **Research In Veterinary Science**, v. 104, p.77-82, 2016.

GULLUCE, M. *et al.* Chemical Derivatization and Mass Spectral Libraries in Metabolic Profiling by GC/MS and LC/MS/MS. **Journal of Experimental Botany**, v. 56, n. 410, p. 219-243, 2005.

GULLUCE, M. *et al.* Isolation of some active compounds from *Origanum vulgare* L. ssp. *vulgare* and determination of their genotoxic potentials. **Food chemistry**, v. 130, n. 2, p. 248-253, 2012.

HADDI, K. *et al.* Detection of a new pyrethroid resistance mutation (V410L) in the sodium channel of *Aedes aegypti*: a potential challenge for mosquito control. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p.1-9, 19, 2017.

HADER, S. Z. A. *et al.* Larvicidal potential of selected indigenous lichens against three mosquito species— *Culex quinquefasciatus*, *Aedes aegypti* and *Anopheles stephensi*. **Chinese Herbal Medicines**, v. 10, n. 2, p.152-156, 2018.

HAJLAOUI, H. *et al.* Chemical composition and in vitro evaluation of antioxidant, antimicrobial, cytotoxicity and anti-acetylcholinesterase properties of Tunisian *Origanum majorana* L. essential oil. **Microbial Pathogenesis**, v. 95, p.86-94, 2016.

HALES S.; WET, N.D.; MAINDONALD, J.; WOODWARD, A. Potential effect of population and climate changes on global distribution of dengue fever: an empirical model. **Lancet** 360: 830–834, 2002.

HENDERSON, E. J *et al.* Rivastigmine for gait stability in patients with Parkinson's disease (ReSPonD): a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 2 trial. **The Lancet Neurology**, v. 15, n. 3, p.249-258, mar. 2016.

HUA, B.; ZHOU, J.; YU, G. Hydrophobic interactions in the pillar[5]arene-based host-guest complexation and their application in the inhibition of acetylcholine hydrolysis. **Tetrahedron Letters**, v. 56, n. 8, p.986-989, 2015.

HYUN, T.K., KIM, H.C.; KIM, J.S. 2014. Antioxidant and antidiabetic activity of *Thymus quinquecostatus* Celak. Ind. **Crop Prod.** 52, 611–616.

JAN, S. *et al.* Divergence in tissue-specific expression patterns of genes associated with the terpenoid biosynthesis in two oregano species *Origanum vulgare* L., and *Origanum majorana*. **Industrial Crops And Products**, v. 123, p.546-555, 2018.

JANG, I. S. *et al.* Effect of a commercial essential oil on growth performance, digestive enzyme activity and intestinal microflora population in broiler chickens. **Animal Feed Science and Technology**, v. 134, n. 3, p. 304-315, 2007.

LIMA-CAMARA, T. N. Activity patters of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* (Diptera: Culicidae) under natural and artificial conditions. **Oecologia Australis**, v.14, n.3, p.737-744, 2010.

LIMA-CAMARA, T. N. *et al.* Dengue Infection Increases the Locomotor Activity of *Aedes aegypti* Females. **Plos One**, v.6, n.3, e17690, 5p, 2011.

KALEESWARAN, G. *et al.* Bamboo-Leaf Prickly Ash extract: A potential bio-pesticide against oriental leaf worm, *Spodoptera litura* (Fabricius) (Lepidoptera). **Journal Of Environmental Management**, v. 208, p.46-55, 2018.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and Antifungal Properties of Essential Oils. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, n.10, p. 813-829, 2003.

KHAN, M. *et al.* The composition of the essential oil and aqueous distillate of *Origanum vulgare* L. growing in Saudi Arabia and evaluation of their antibacterial activity. **Arabian Journal Of Chemistry**, v. 11, n. 8, p.1189-1200, 2018.

KOUKOULITSA, C. *et al.* Polar constituents from the aerial parts of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* growing wild in Greece. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 54, n. 15, p. 5388-5392, 2006.

KOUREMENOS, K. A. *et al.* “One-pot microwave derivatization of target compounds relevant to metabolomics with comprehensive two-dimensional gas chromatography,” **Journal of Chromatography B**, vol. 878, no. 21, pp. 1761–1770, 2010.

KRUPPA, P.C.; RUSSOMANO, O.M.R. Ocorrência de fungos em sementes medicinais de plantas medicinais, aromáticas e condimentares de família Lamiaceae. **Tropical Plant Pathology**, v.33, n.1, p.72-75, 2008.

LEITE, A. M. *et al.* Preliminary study of the molluscicidal and larvicidal properties of some essential oils and phytochemicals from medicinal plants. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p.842-846, 2009.

LEYVA-LÓPEZ, N. *et al.* Essential oils of oregano: Biological activity beyond their antimicrobial properties. **Molecules**, v. 22, n. 6, p. 989, 2017.

LI, J. *et al.* Combined effects of octenylsuccination and oregano essential oil on sweet potato starch films with an emphasis on water resistance. **International journal of biological macromolecules**, v. 115, p. 547-553, 2018.

- LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G. "Família Lamiaceae: importantes óleos essenciais com ação biológica e antioxidante." **Revista Fitos**, v. 3, n. 3, p. 14-24, 2007.
- LISTON, M.S. **Estudo da composição e aplicação do óleo essencial de *Origanum vulgare* L. como agente microbiano em sururu (*Mytella falcata*)**. 2013. 72 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal do Maranhão, 2013.
- LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 2.ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 200. 544p.
- LOSADA-BARREIRO, Sonia; BRAVO-DÍAZ, Carlos. Free radicals and polyphenols: The redox chemistry of neurodegenerative diseases. **European Journal Of Medicinal Chemistry**, v. 133, p.379-402, 2017.
- LUKAS, Brigitte; SAMUEL, Rose; NOVAK, Johannes. Oregano or marjoram? The enzyme γ -terpinene synthase affects chemotype formation in the genus *Origanum*. **Israel Journal Of Plant Sciences**, v. 58, n. 3, p.211-220, 2010.
- LUKAS, Brigitte; SCHMIDERER, Corinna; NOVAK, Johannes. Essential oil diversity of European *Origanum vulgare* L. (Lamiaceae). **Phytochemistry**, v. 119, p.32-40, nov. 2015.
- LUKAS, Brigitte; SCHMIDERER, Corinna; NOVAK, Johannes. Phytochemical diversity of *Origanum vulgare* L. subsp. *vulgare* (Lamiaceae) from Austria. **Biochemical Systematics And Ecology**, v. 50, p.106-113, out. 2013.
- LUNA, A. *et al.* Effects of thymol and carvacrol feed supplementation on lipid oxidation in broiler meat. **Poultry Science**, v. 89, n. 2, p. 366-370, 2010.
- MACIEL, M. A. M. *et al.* Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p.429-438, 2002.
- MACIEL-DE-FREITAS, R. *et al.* A review on the ecological determinants of *Aedes aegypti* (diptera: culicidae) vectorial capacity. **Oecologia Australis**, [s.l.], v. 14, n. 03, p.726-736, set. 2010. *Oecologia Australis*.
- MACORIS, M.L.G. *et al.* Impact of insecticide resistance on the field control of *Aedes aegypti* in the State of São Paulo. **Soc. Bras. Med. Trop.** 47, 573–578, 2014.
- MASTRO, G. *et al.* Essential oil diversity of *Origanum vulgare* L. populations from Southern Italy. **Food Chemistry**, v. 235, p.1-6, nov. 2017.
- MENDES, L. A. *et al.* Larvicidal effect of essential oils from Brazilian cultivars of guava on *Aedes aegypti* L. **Industrial Crops And Products**, v. 108, p.684-689, dez. 2017.
- MIGLIORINE, Marcos José. **Desempenho, qualidade de ovos e saúde de poedeiras comerciais alimentadas com dieta suplementada com óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*)**. 2017. 64 f. Dissertação (Mestrado) - Zootecnia, Universidade do Estado de Santa Catarina – UDESC, Chapecó. 2017.

MIYAZAWA, M.; YAMAFUJI, C. Inhibition of Acetylcholinesterase Activity by Bicyclic Monoterpenoids. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 53, n. 5, p.1765-1768, 2005.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, p. 105-111, 2001.

MORAIS, S. M. *et al.* Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. **Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 19, n. 1b, p. 315-320, 2009.

MOREIRA, F. T.C.; SALE, M. G. F.; LORENZO, M. D.I. Towards timely Alzheimer diagnosis: A self-powered amperometric biosensor for the neurotransmitter acetylcholine. **Biosensors And Bioelectronics**, v. 87, p.607-614, 2017.

MORSHELOO, M. R. *et al.* Essential oil profile of oregano (*Origanum vulgare* L.) populations grown under similar soil and climate conditions. **Industrial Crops And Products**, v. 119, p.183-190, set. 2018.

MOSTAFALOU, S.; ABDOLLAHI, M. The link of organophosphorus pesticides with neurodegenerative and neurodevelopmental diseases based on evidence and mechanisms. **Toxicology**, v. 409, p.44-52, nov. 2018.

MS, 2015. A febre do zika virus. Ministério da Saúde, <http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal> (accessed 15.09.15).

MONTEIRO, F. A. *et al.* Diversity of Brazilian *Aedes aegypti*: Patterns following an Eradication Program. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.9, 10p, 2014.

MUNUSAMY, R. G. *et al.* Ovicidal and larvicidal activities of some plant extracts against *Aedes aegypti* L. and *Culex quinquefasciatus* Say (Diptera: Culicidae). **Asian Pacific Journal Of Tropical Disease**, v. 6, n. 6, p.468-471, 2016.

MUSTAFA, S.; ISMAEL, HN Reatividade da bexiga urinária diabética ao inibidor da colinesterase Neostigmina. **Urology**, 84 (6), 2014.

MUSTHABA, M. *et al.* Patented herbal formulations and their therapeutic applications. **Recent patents on drug delivery & formulation**, v. 4, n. 3, p. 231-244, 2010.

NANTAKORNSUTTANAN, N., THUPHAIRO, K., KUKREJA, R. K., CHAROENKIATKUL, S., SUTTISANSANEE, U.: Anti-cholinesterase inhibitory activities of different varieties of chili peppers extracts. **International Food Research Journal**, 23, 1953-1959, 2016.

NAQQASH, M. N. *et al.* Insecticide resistance and its molecular basis in urban insect pests. **Parasitology Research**, v. 115, n. 4, p.1363-1373, 2016.

NILE, S. H.; NILE, A. S. ; KEUM, Y. Total phenolics, antioxidant, antitumor, and enzyme inhibitory activity of Indian medicinal and aromatic plants extracted with different extraction methods. **Biotech**, v. 7, n. 1, p.1-10, 27, 2017.

OLIVEIRA, G. L.; OLIVEIRA, A. F. M. ; ANDRADE, L. H. C. Plantas medicinais utilizadas na comunidade urbana de Muribeca, Nordeste do Brasil. **Acta Botanica Brasilica**,v. 24, n. 2, p.571-577, 2010.

OLIVEIRA, J.L.T.M. *et al.* Effectiveness of *Origanum vulgare* L. and *Origanum majorana* L. essential oils in inhibiting the growth of bacterial strains isolated from the patients with conjunctivitis. **Brazilian Archives of Biology and technology**, v.52, n.1, p. 45-50, 2009.

OLIVEIRA, V. C. *et al.* Secondary metabolites and anatomical features of oregano leaves (*Origanum vulgare* ssp. *hirtum*) grown under colored meshes. **Revista de Ciências Agrárias**, 2016, 39(1): 170-177.

ORATA, F., Derivatization reactions and reagents for gas chromatography analysis, in *Advanced Gas Chromatography-Progress in Agricultural*. **Biomedical and Industrial Applications**. 2012.

ORHAN, I. *et al.* Activity of essential oils and individual components against acetylcholinesterase. **Zeitschrift fuer Naturforschung C**, v. 63, n. 7-8, p. 547-553, 2008.

ORHAN, N.; ASLAN, M.; DEMIRCI, B.; ERGUN, F. A bioactivity guided study on the antidiabetic activity of *Juniperus oxycedrus* subsp. *oxycedrus* L. leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 140. n. 2, p. 409-415, 2012.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; SAUCIER, L.; LACROIX, M. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **FoodControl**, v. 18, p. 414- 420, 2006.

PAVELA, Roman. Acute toxicity and synergistic and antagonistic effects of the aromatic compounds of some essential oils against *Culex quinquefasciatus* Say larvae. **Parasitology Research**, v. 114, n. 10, p.3835-3853, 2015.

PETROVICK, P.R. 2003. *Farmacognosia da Planta ao medicamento*. 5^a ed., Porto Alegre, Universidade, p.1102.

PINTO, A. C. *et al.* Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química nova**, p. 45-61, 2002.

PLIEGO, E. P.; VELÁZQUEZ-CASTRO, J.; COLLAR, A. F. Seasonality on the life cycle of *Aedes aegypti* mosquito and its statistical relation with dengue outbreaks. **Applied Mathematical Modelling**, v. 50, p.484-496, 2017.

POLAT, U.; YESILBAG, D.; EREN, M. Serum biochemical profile of broiler chickens fed diets containing rosemary and rosemary volatile oil. **Journal of Biological and Environmental Sciences**, v. 5, n. 13, 2011.

QUIDEAU, S., DEFFIEUX, D., DOUAT-CASASSUS, C., POUYSÈGU, L., Plant polyphenols: Chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angew. Chem. Int.** 50,586–62, 2011.

RODRIGUES, Maria Regina Alves. **Estudo dos óleos essenciais presentes em manjerona e orégano**. 2002. 163 f. Tese (Doutorado) - Curso de Química, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2002.

ROMERO, A. L. *et al.* Composição Química e Atividade do Óleo Essencial de *Origanum vulgare* Sobre Fungos Fitopatogênicos. **Brazilian Journal Of Microbiology**, v. 14, n. 4, p. 231-235, 2012.

RUEDA, A. G. *et al.* Synthesis of new α -amino nitriles with insecticidal action on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Revista Brasileira de Entomologia*, v. 62, n. 2, p.112-118, abr. 2018.

SAAVEDRA, L. M. *et al.* The quantitative structure–insecticidal activity relationships from plant derived compounds against chikungunya and zika *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) vector. **Science Of The Total Environment**, v. 610-611, p.937-943, jan. 2018.

SABZEHZARI, M.; NAGHAVI, M. R. Phyto-miRNAs-based regulation of metabolites biosynthesis in medicinal plants. **Gene**. v. 682, n. 15, p. 13-24, 2018.

SANTOS, D. S. *et al.* Extraction and evaluation of fatty acid composition of *Orbignyaphalerata martius* oils (arecaceae) from Maranhão State, Brazil. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 2, p. 355-362, 2013.

SANTOS, N.D.L. *et al.* Effect of gamma irradiation of *Moringa oleifera* seed lectin on its larvicidal, ovicidal, and oviposition-stimulant activities against *Aedes aegypti*. **South African Journal Of Botany**, v. 18, p.1-6, 2018.

SARIKURKCU, C. *et al.* Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. **Industrial Crops And Products**, v. 70, p.178-184, ago. 2015.

SAVITHRAMMA, N. *et al.* Screening of medicinal plants for secondary metabolites. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 8, n. 3, p. 579-584, 2011.

SCHUMMER, C. *et al.* Comparison of MTBSTFA and BSTFA in derivatization reactions of polar compounds prior to GC/MS analysis. **Talanta**, v. 77, n. 4, p. 1473–1482, 2009.

SEGUN, P. A.; OGBOLE, O. O.; AJAIYEoba, E. O. Medicinal plants used in the management of cancer among the ijebus of southwestern Nigeria. **Journal Of Herbal Medicine**, v. 14, p.68-75, 2018.

SEWELL, R.D.E.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. The history and ups and downs of herbal medicine usage. **J. HerbMed. Pharmacol.** n. 3, v. 1, p. 1-3, 2014.

SEO, S. *et al.* Larvicidal and Acetylcholinesterase Inhibitory Activities of Apiaceae Plant Essential Oils and Their Constituents against *Aedes albopictus* and Formulation Development. **Journal Of Agricultural And Food Chemistry**, v. 63, n. 45, p.9977-9986, 2015. American Chemical Society (ACS).

SHAHRIARI, M. *et al.* Effects of α -pinene, trans-anethole, and thymol as the essential oil constituents on antioxidant system and acetylcholine esterase of *Ephestia kuehniella* Zeller (Lepidoptera: Pyralidae). **Pesticide Biochemistry And Physiology**, v. 150, p.40-47, 2018.

SHAREEF, A.; ANGOVE, M. J.; WELLS, J. D. Optimization of silylation using N-methyl-N-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide, N,O-bis-(trimethylsilyl)-trifluoroacetamide and N-(tert-butyltrimethylsilyl)-N-methyltrifluoroacetamide for the determination of the estrogens estrone and 17 α -ethinylestradiol by gas chromatography-mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1108, n. 1, p. 121–128, 2006.

SHEKHAR, S. *et al.* Neuroprotection by ethanolic extract of *Syzygium aromaticum* in Alzheimer's disease like pathology via maintaining oxidative balance through SIRT1 pathway. **Experimental Gerontology**, v. 110, p.277-283, 2018.

SILVA J.P.L. *et al.* Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciênc Tecnol Aliment** v. 1, n. 3, p. 136-41, 2010.

SILVA, E.M. *et al.* Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, n. 3, p.1012-1018, 2007.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMÕES, C. M. O. S. *et al.* Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2002 p., 2004.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* Analysis of phenolic compounds in Greek plants of Lamiaceae family by HPLC. **Journal Of Applied Research On Medicinal And Aromatic Plants**, v. 6, p.62-69, 2017.

SMERIGLIO, A. *et al.* Essential oil of *Citrus lumia* Risso: Phytochemical profile, antioxidant properties and activity on the central nervous system. **Food And Chemical Toxicology**, v. 119, p.407-416, 2018.

SOUSA, C.M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quim Nova**. n. 30 p. 351-355. 2007.

SOUZA, Evandro Leite. **Potencial antimicrobiano de óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare*): Uma abordagem para uso em sistemas de conservação de alimentos**. 2006. 139 f. Tese (Doutorado) – Nutrição, Universidade Federal de Pernambuco – UFPE, Recife, 2006.

SOUZA, N.A.B. et al. Efficacy of *Origanum* essential oils for inhibition of potentially pathogenic fungi. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.46, n.3, p. 499-508, 2010.

SOUZA-NETO, J. A. et al. *Aedes aegypti* vector competence studies: A review. *Infection*, **Genetics And Evolution**, v. 67, p.191-209, 2019.

SOUZA, K. R. et al. Vector control measures failed to affect genetic structure of *Aedes aegypti* in a sentinel metropolitan area of Brazil. **Acta Tropica**, v. 128, n. 3, p.598-605, 2013.

SPINDOLA, K. C. W. et al. *Dendranthema grandiflorum*, a hybrid ornamental plant, is a source of larvicidal compounds against *Aedes aegypti* larvae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 26, n. 3, p.342-346, 2016.

SREELEKSHMI, R.; LATHA, P. G.; ARAFAT, M. M. et al. “Antiinflammatory, analgesic and anti-lipid peroxidation studies on stem bark of *Ficus religiosa* Linn,” **Natural Product Radiance**, v.6, n. 5, p. 377–381, 2007.

STANOJEVIĆ, L.P. et al. Antioxidant activity of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L.). **Biologica Nyssana**, v. 7, n. 2, p. 131-139, 2016.

SUN, M. et al. Effects of growth altitude on chemical constituents and delayed luminescence properties in medicinal rhubarb. **Journal Of Photochemistry And Photobiology B: Biology**. v. 162, p.24-33, 2016.

SURESH, Udaiyan et al. Tackling the growing threat of dengue: *Phyllanthus niruri*-mediated synthesis of silver nanoparticles and their mosquitocidal properties against the dengue vector *Aedes aegypti* (Diptera). **Parasitology Research**, v. 114, n. 4, p.1551-1562, 2015.

SUZUKI, E.Y. **Óleo essencial de *Origanum vulgare* Linnaeus: uma alternativa contra as principais bactérias causadoras de mau odor**. 2013. 99 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Juiz de Fora, 2013.

TEIXEIRA, B. et al. Chemical composition and bioactivity of different oregano (*Origanum vulgare*) extracts and essential oil. **Journal Of The Science Of Food And Agriculture**, v. 93, n. 11, p.2707-2714, 2013.

TEL-ÇAYAN, G. et al. Phytochemical investigation, antioxidant and anticholinesterase activities of *Ganoderma adspersum*. **Industrial Crops And Products**, v. 76, p.749-754, 2015.

THONGWAT, D. *et al.* Larvicidal activity of endocarp and seed crude extracts of *Dracaena loureiri* Gagnep against *Aedes aegypti* (L.) mosquito. **Asian Pacific Journal Of Tropical Biomedicine**, v. 7, n. 3, p.222-226, 2017.

TRIVEDI, M. K. *et al.* Mass spectrometric analysis of isotopic abundance ratio in biofield energy treated thymol. Science Publishing Group. v, 1, n. 1, p. 1-8, 2016.

VARDAR-ÜNLÜ, G. *et al.* Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and metanol extract of *Tymus pectinatus* Fish. et Mey. var. *pectinatus* (Lamiaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.51, p.63-67, 2003.

VIANA, W. P. **Atividade antifúngica do óleo essencial de *Origanum vulgare* (Orégano) sobre fungos oportunistas do gênero *Fusarium***. 2013. 91 f. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Biotivos - Farmacologia), Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

VLADIMIR-KNEŽEVIĆ, S. *et al.* Acetylcholinesterase inhibitory, antioxidant and phytochemical properties of selected medicinal plants of the Lamiaceae family. **Molecules**, v. 19, n. 1, p. 767-782, 2014.

VONTAS, J. *et al.* Insecticide resistance in the major dengue vectors *Aedes albopictus* and *Aedes aegypti*. **Pesticide Biochemistry And Physiology**, v. 104, n. 2, p.126-131, 2012.

WELLS, R. J. Recent advances in non-silylation derivatization techniques for gas chromatography. **Journal of Chromatography A**, vol. 843, no. 1-2, pp. 1–18, 1999.

WHO, 2012. Global strategy for dengue prevention and control 2012–2020. World Health Organization, Available at http://www.who.int/about/licensing/copyright_form/en/index.html (accessed September 2015).

WHO, 2015. Chikungunya. World Health Organization, Media Centre, Fact sheetn. 327, update February 2015, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/es> (accessed 13.09.15).

WHO. Global insecticides use for vector-borne disease control, a 10 year assessment (2000-2009). 5th 404 ed. World Health Organization: Geneva, Switzerland, 2011.

WILKE, A. B. B.; MEDEIROS-SOUSA, A. R., CERETTI-JUNIOR, W.; MARRELLI, M. T. Mosquito populations dynamics associated with climate variations. **Acta Tropica** 166, 343–350, 2017.

WOJTUNIK-KULESZA, K. A. *et al.* The influence of common free radicals and antioxidants on development of Alzheimer's Disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 78, p.39-49, 2016.

WU, J., *et al.*, Determination of fecal sterols by gas chromatography-mass spectrometry with solid-phase extraction and injection-port derivatization. **J. Chromatogr A**, v.7, n. 1216, p. 1053-8, 2009.

Y, S. É. *et al.* Essential Oil from *Origanum vulgare* Linnaeus: An Alternative Against Microorganisms Responsible for Bad Perspiration Odor. **Journal Of Young Pharmacists**, v. 7, n. 1, p.12-20, 2014.

YAN, F. *et al.* Antioxidant capacity variation in the oregano (*Origanum vulgare* L.) collection of the German National Genebank. **Industrial Crops And Products**, [s.l.], v. 92, p.19-25, dez. 2016.

ZARA, A. L. S. A. *et al.* Estratégias de controle do *Aedes aegypti*: uma revisão. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, [s.l.], v. 25, n. 2, p.1-2, jun. 2016. Instituto Evandro Chagas.

ZARETSKII , V. I. *et al.* Mass spectrometry of steroid systems.XII.Determination of the position of the double bond in some steroid systems by the method of fragmentation mass spectrometry. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 3, n. 6, p. 320-327, 1967.

ZARRAD, K. *et al.* Chemical composition, fumigant and anti-acetylcholinesterase activity of the Tunisian *Citrus aurantium* L. essential oils. **Industrial Crops And Products**, v. 76, p.121-127, 2015.

ZHAO, X. *et al.* Effects of ginger root (*Zingiber officinale*) on laying performance and antioxidant status of laying hens and on dietary oxidation stability. **Poultry science**, v. 90, n. 8, p. 1720-1727, 2011.

ZHOU, Y. *et al.* Preparation and antimicrobial activity of oregano essential oil Pickering emulsion stabilized by cellulose nanocrystals. **International journal of biological macromolecules**, v. 112, p. 7-13, 2018.