

Varição intraespecífica na composição e teor do óleo essencial de *Lippia thymoides*

Intraspecific variation in essential oil composition and content of *Lippia thymoides*

DOI 10.32712/2446-4775.2021.1062

Neves, Dilaine Suellen Caires¹; Santana, Gabriela Nunes¹; Krepsky, Patrícia Baier^{1*}.

¹Universidade Federal da Bahia (UFBA), Instituto Multidisciplinar em Saúde. Rua Hormindo Barros, 58, Candeias, CEP 45029-094, Vitória da Conquista, BA, Brasil.

*Correspondência: pkrepsky@gmail.com.

Resumo

Lippia thymoides é uma planta aromática e medicinal nativa na Caatinga e Cerrado brasileiros. Pesquisas foram realizadas nas áreas de farmacologia e fitoquímica, no entanto, o conhecimento científico sobre a variação química é inceptivo. Portanto, esta pesquisa teve como objetivo avaliar possíveis fatores que interferem no teor e composição química do óleo essencial de folhas e flores. Para determinação do teor de óleo essencial foi empregado aparelho de Clevenger. O óleo essencial obtido foi avaliado por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas. As variáveis foram: diferentes indivíduos (seis) e horários de coleta (7, 12 e 17 horas), recuperação após poda e estresse hídrico em campo. O horário de coleta, a poda e a seca não influenciaram o teor de óleo essencial. Foi detectada apenas variação interindividual. A análise da composição química do óleo essencial revelou timol, metiltimol e *p*-cimeno como componentes majoritários. Algumas variações foram observadas na composição dos óleos essenciais, porém o perfil cromatográfico permaneceu constante. Portanto, a coleta pode ser realizada a qualquer hora do dia, e uma nova coleta pode ocorrer após a recuperação da planta sem comprometer o teor de óleo essencial e sua composição química.

Palavras-chave: Cromatografia gasosa. Quantificação. Óleo essencial. Composição química. Metabólitos secundários. Terpenos.

Abstract

Lippia thymoides is an aromatic and medicinal plant native to the Brazilian *Caatinga* and *Cerrado*. Some research on pharmacological activities and chemical composition has been carried out. However scientific knowledge about chemical variation is inceptive. Therefore, this research is aimed to evaluate factors that interfere in essential oil content of leaves and flowers, and its chemical composition. Essential oil was quantified by means of hydrodistillation in a Clevenger apparatus. Essential oil obtained was evaluated by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The variables were: different individuals (six), hour of

collection (7, 12 and 17 hours), recovery after pruning and water stress on field. The hour of collection, pruning and drying, did not influence the essential oil content. It was detected only interindividual variation. Analysis of the chemical composition of essential oil revealed thymol, methyl-thymol and *p*-cymene as major components. Some variations were observed on essential oil composition, but the chromatographic fingerprint remained constant. Therefore, the collection can be performed any hour of the day, and a new one can take place after the recovery of plants without compromising oil content and chemical composition.

Keywords: Gas chromatography. Quantification. Essential oil. Chemical composition. Secondary metabolites. Terpenes.

Introdução

Lippia thymoides Mart. & Schauer, da família Verbenaceae^[1,2] é um arbusto que floresce em diferentes épocas do ano^[3]. Conhecida popularmente como alecrim-do-mato, alecrim-do-campo, alecrim-de-cheiro-miúdo^[4-6], faz parte da vegetação da Caatinga e Cerrado da Bahia, Pernambuco, Sergipe e Minas Gerais^[1]. O chá das folhas e flores é empregado na medicina popular no tratamento de feridas, infecções vaginais e cutâneas, febre, indigestão, bronquite e doenças reumáticas^[7,8].

As plantas desta espécie biossintetizam terpenos, os quais compõem o óleo essencial. Foram descritos na literatura científica três quimiotipos de *Lippia thymoides*, em relação às variações no componente majoritário do óleo essencial, determinadas pelo genótipo^[9]. O componente majoritário de um deles é o monoterpeno oxigenado timol^[6,8] e de outro, o sesquiterpeno β -cariofileno^[5]. Além desses já foi descrito o quimiotipo metiltimol^[9]. Em relação aos componentes fixos dos ramos com folhas, foram detectados compostos fenólicos com concentração equivalente ou superior àquela encontrada em hortaliças com teor considerado elevado deste grupo de metabólitos secundários, os quais, com o óleo essencial contribuem para os efeitos farmacológicos^[9].

Quanto aos demais fatores que resultam em variações no teor e composição química de óleos essenciais, podemos citar: temperatura, intensidade luminosa, radiação ultravioleta, sazonalidade, estresse hídrico e salino, nutrientes e fertilizantes no solo, concentração de gás carbônico, presença de herbívoros ou patógenos e estágio de desenvolvimento da planta^[10,11]. Apesar de existirem todos estes fatores que causam variação na biossíntese foram encontrados poucos estudos para a espécie. Em plantas do quimiotipo timol foi relatado maior teor de óleo essencial em flores secas, 7,3%; enquanto as folhas apresentaram 1,87%^[9]. Em plantas do quimiotipo cariofileno o teor de óleo essencial em folhas variou entre 2,14 e 2,93%^[5] e em ramos com folhas, de 0,5 a 1,1%^[6]. Silva et al.^[6] demonstraram que não houve diferença significativa entre os teores obtidos em época de seca e chuva, e em diferentes horários de coleta, de modo contrário ao que acontece com muitas espécies aromáticas, porém, na análise de correlação encontrou-se relação positiva entre teor e umidade relativa, e teor e temperatura ambiente. Por outro lado, outros pesquisadores encontraram menor teor em período seco, porém, não foi realizada análise estatística^[5].

Com o objetivo de contribuir para melhor compreensão sobre a variabilidade no teor e composição do óleo essencial de *Lippia thymoides* foi desenvolvida a presente pesquisa.

Material e Métodos

Parte experimental

Material vegetal

A espécie foi identificada pela Prof^a. Dr^a. Andréa Karla Almeida dos Santos. A exsicata encontra-se depositada no Herbário do Instituto Multidisciplinar em Saúde, da Universidade Federal da Bahia, em Vitória da Conquista, Bahia, sob número de tombo HVC 2313. O acesso foi cadastrado no Sistema Nacional de Gestão do Patrimônio Genético e do Conhecimento Tradicional Associado (SisGen) sob número AD59A19. As coletas aconteceram em sítio localizado no município de Barra do Choça, Bahia (14°51'44.1"S 40°37'02.8"W), local onde a espécie desenvolveu-se espontaneamente. Após cada coleta, as amostras foram transportadas imediatamente para o laboratório e secas à temperatura ambiente pelo período de três dias ao abrigo da luz. Foram separados os ramos, sendo empregadas nas análises folhas e flores.

Quantificação de óleo essencial

Para a quantificação do óleo essencial foi empregado aparelho Clevenger, com manta de aquecimento (QUIMIS) e banho termostático (TE-2005 da TECNAL). O procedimento foi realizado de acordo com o preconizado pela Farmacopeia Brasileira^[12], considerando os resultados da determinação de umidade. A única alteração realizada foi a exclusão do uso do xilol como solvente para o óleo essencial obtido. Antes de cada análise o aparelho foi limpo com água e sabão, água destilada e acetona. Pesou-se exatamente cerca de 12 gramas das folhas e flores secas e adicionados 150 ml de água destilada. Este conjunto foi submetido a destilação por arraste de vapor durante 4 horas em aparelho Clevenger. O volume de óleo essencial obtido foi medido no equipamento, sendo calculado seu teor em ml/100 gramas. A fim de garantir a exatidão dos resultados foram comparados os resultados da determinação de teor de óleo essencial obtidos pelo método farmacopeico com e sem o uso de xilol, sendo as análises realizadas em sextuplicata e os resultados comparados através de teste *t-Student*. Além disso, foi realizado em triplicata, teste de recuperação adicionando-se limoneno. Foram determinadas a repetibilidade, em sextuplicata, e a precisão intermediária, em triplicata, expressas em erro padrão relativo. Na avaliação da precisão intermediária foram comparados os resultados obtidos com analistas diferentes e em dias diferentes. Com o intuito de determinar a robustez do método, alterações no nível de aquecimento da manta e quantidade de droga vegetal foram avaliadas (ANOVA)^[13].

O óleo obtido foi armazenado em congelador para análise posterior por cromatografia gasosa.

No processo de determinação de água em drogas vegetais, através do método gravimétrico^[10], foram empregadas balança analítica e estufa com circulação de ar (BIOSAN).

Análise por cromatografia em fase gasosa

As análises de composição do óleo essencial foram realizadas em cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (SHIMADZU-QP2010), equipado com uma coluna capilar com fase estacionária composta por 5% de difenilpolisiloxano e 95% de dimetilpolisiloxano (30 m × 0,25 mm, 0,25 µm de espessura do filme). O espectrômetro foi operado em modo de impacto eletrônico, com faixa de varredura de 35–500 amu, energia de ionização de 70 eV e uma taxa de 0,30 s por varredura. As temperaturas da

fonte de ionização e do injetor foram mantidas a 200°C e 240°C, respectivamente. O gás de arraste utilizado foi o hélio. Diclorometano P.A. (Êxodo científica) foi usado para diluir o óleo essencial até a concentração final de 2,5%. O volume de injeção foi 1,0 µl. Durante a corrida cromatográfica a temperatura passou de 60 a 240°C, com incremento de 3°C/min., em 60 minutos. As temperaturas do injetor e do detector permaneceram em 250°C.

Utilizou-se o programa *GC-MS Postrun Analysis* para o tratamento dos dados cromatográficos. A quantificação foi realizada através da normalização das áreas sob a curva dos picos majoritários. Foram selecionados para análise da composição química as substâncias que apresentaram porcentagem de, no mínimo, 1% e, no máximo, 95% de similaridade entre os espectros obtidos na detecção em espectrômetro de massas e aqueles das bibliotecas de espectros de massa (*Mass Spectral Library - NIST 05; Flavor and Fragrances of Natural and Synthetic Compounds - FFNSC 1.3*). A identificação de cada substância foi realizada também através do cálculo do índice de retenção, empregando os tempos de retenção obtidos através da análise cromatográfica de série de alcanos e das amostras.

Varição no teor de óleo essencial e composição química

Varição entre indivíduos e um ano após primeira coleta: a coleta para determinação da variação entre os indivíduos (primeira coleta) foi realizada no mês agosto de 2017, entre 8 e 10 horas, em um dia ensolarado, com temperatura de 18°C e umidade de 59%. Naquele período, no terceiro trimestre (julho a setembro), o tempo foi chuvoso de acordo com o Instituto Nacional de Meteorologia^[14]. Foram coletadas as folhas e flores de seis indivíduos. Todos encontravam-se floridos. Após a coleta sinalizou-se o local de cada amostra. Todos os indivíduos foram podados na base, a cerca de 10 cm do solo. Foi realizada comparação entre a média do teor de óleo essencial obtida para cada indivíduo por ANOVA, seguido por teste de Tukey, assim como estatística descritiva (média, desvio padrão, erro padrão relativo) para o conjunto de dados. Em análise por cromatografia em fase gasosa foram identificados os componentes majoritários e normalizadas as áreas sob a curva para obtenção das porcentagens. Além disso, para cada componente foi aplicada estatística descritiva (média, desvio padrão, erro padrão relativo).

Em agosto de 2018 foi realizada uma segunda coleta dos mesmos indivíduos. Todos foram coletados no mesmo dia e horário. Esta segunda coleta foi realizada um ano após poda drástica, num período chuvoso^[14]. Os resultados obtidos foram comparados por teste *t-Student* pareado, bicaudal.

Varição em função do horário de coleta: realizou-se nova coleta de folhas e flores de outros indivíduos da mesma área, para análise da variação do teor de óleo essencial e composição química em diferentes horários. As coletas foram realizadas em um dia por semana, durante três semanas não consecutivas. Em cada dia escolheu-se uma amostra composta por cerca de 10 indivíduos próximos, coletados em três horários (7, 12 e 17 horas). Foi determinado o teor de óleo essencial de todas as amostras, sendo os óleos resultantes analisados individualmente por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Varição em período de seca e calor: a coleta foi realizada em período seco. Foram coletadas folhas de três amostras, cada qual composta por cerca de 5 a 10 indivíduos próximos, que faziam parte da mesma touceira. Neste caso, não foram coletadas flores, visto que, em função da seca, as mesmas encontravam-se ausentes. Foi determinado o teor de óleo essencial de todas as amostras, sendo os óleos resultantes analisados individualmente por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas.

Foram comparadas (teste *t-Student*, não pareado, $p = 0,05$) as porcentagens dos componentes identificados com aquelas que haviam sido obtidos na análise da variação entre os indivíduos.

Resultados e Discussão

Quantificação de óleo essencial: validação do método modificado

Na determinação da exatidão, a comparação entre o teor de óleo essencial obtido pelo método farmacopeico, com xilol, e pelo método modificado, sem uso do xilol, demonstrou não haver diferença ($p > 0,05$) entre os resultados obtidos. A análise dos dados foi feita através do teste *t-Student*, sendo o valor de p igual a 0,083. Desta forma, foi possível diminuir a geração de solvente orgânico a ser descartado, assim como a exposição dos analistas a este solvente tóxico^[15]. Como ensaio adicional para confirmar a exatidão do método foi realizado teste de recuperação em triplicata, através da adição de 0,1 ml de limoneno. Calculou-se a média da porcentagem de recuperação, a qual foi igual a $95 \pm 7\%$, sendo considerada satisfatória, devido ao grau de precisão do método. A repetibilidade foi avaliada através da análise de seis replicatas, sendo obtido desvio padrão relativo de 5,7%. Para realizar a precisão intermediária foi repetida a mesma análise em dias diferentes e com operadores diferentes, sendo obtidos valores de desvio padrão relativo (DPR), 5,1 e 7,2%, não foram detectadas diferenças entre as médias ($p > 0,05$). Os critérios de aceitação, de acordo com a resolução 166, de 2017^[13], devem considerar o objetivo do método, sua variabilidade intrínseca e a concentração de trabalho, assim como a concentração do analito na amostra. Para métodos de quantificação seria desejável maior precisão, no entanto, a escala presente no aparelho, onde acontece a medida do volume de óleo essencial, não permite leitura com maior precisão, o que é uma característica do método. Porém, este fato não compromete os resultados, visto que, é possível quantificar porcentagem de óleo de até 0,5%, considerando a massa inicial de droga vegetal de 12 g, sendo que a concentração de trabalho foi de 1,64% a 2,85%. Para avaliação da robustez foi avaliada variação na escala de aquecimento da manta aquecedora (potência 190 W) em 80%, 90% e 100% de sua capacidade total. Após tratamento dos dados (ANOVA) verificou-se que não há diferença significativa entre os teores médios obtidos. No mesmo ensaio o fluxo de destilação foi medido. Obteve-se fluxos de 1,05 ml/min, 1,77 ml/min e 2,04 ml/min, para as potências de 80%, 90% e 100%, respectivamente. A Farmacopeia Brasileira^[12] preconiza um fluxo de 2 ml/min. De acordo os resultados a capacidade 100% da manta é a que mais atende ao parâmetro estabelecido, porém, foi escolhida para a realização de todas as análises a capacidade de 90%, visto que, na capacidade 100% da manta ocorreram ebulições tumultuosas durante o processo de destilação. Avaliou-se também a pesagem de 12 e 10 gramas, não sendo detectadas diferenças. Como não foram encontradas diferenças nos resultados obtidos com diferentes temperaturas e massa de droga vegetal, o método foi considerado robusto. Quanto ao tempo de análise, avaliou-se a variação no teor de óleo essencial em 2, 3 e 4 horas de extração. Houve leve aumento em 4 horas em relação a 3 horas, sendo selecionado o tempo de extração de 4 horas, tempo preconizado pela Farmacopeia Brasileira^[12]. Ehlert et al.^[16] avaliaram o tempo de extração com a técnica de hidrodestilação para sete espécies de plantas aromáticas, considerando que o mesmo é característico para cada espécie. O tempo máximo necessário foi 4 horas, e o mínimo 3 horas. Em testes realizados com o alecrim, *Rosmarinus officinalis*, foi possível detectar que o tempo de extração prolongado pode alterar a composição do óleo^[17]. Os dados reforçam a importância de avaliação prévia do tempo de extração para a espécie que se deseja estudar, visando obtenção do óleo essencial com bom padrão de qualidade e a modificação do processo, a fim de evitar

desperdício de energia^[16]. De acordo com os ensaios realizados foi possível demonstrar a confiabilidade dos seus resultados.

Variação no teor de óleo essencial e composição química

Variação entre indivíduos e um ano após primeira coleta: foram detectadas variações significativas ($p > 0,05$) no teor de óleo essencial obtido da mistura de flores e folhas de seis indivíduos coletados na mesma área, dia e horário, em 2017. Foram obtidos os seguintes teores médios: 1,64% (indivíduo 3); 1,80% (indivíduo 2); 1,99% (indivíduo 1); 2,30% (indivíduo 4); 2,47% (indivíduo 2) e 2,85% (indivíduo 6), com erro padrão relativo igual a 19%, valor que demonstra certa homogeneidade nos resultados. Outros pesquisadores verificaram que o teor de óleo essencial foi significativamente maior para as flores^[8]. Portanto, pode-se atribuir parte da variação encontrada às diferenças na proporção entre flores e folhas em cada amostra, além das variações genéticas^[10]. Valores semelhantes de porcentagem de óleo foram encontrados em folhas coletadas na cidade de Feira de Santana, Bahia, com variação de 2,14 a 2,93%, em diferentes épocas do ano^[5]. O erro padrão relativo foi de 14%^[5], menor que os 19% encontrados neste estudo, possivelmente pelo fato de terem sido coletadas apenas folhas, e a variação sazonal não ter sido expressiva.

Considerando o tamanho diminuto das folhas e flores seria inviável rotineiramente coletar apenas folhas ou flores. Por este motivo as análises foram realizadas sem tal separação, de modo a avaliar situação real de coleta.

Os componentes do óleo essencial foram identificados através dos espectros de massas e índice de retenção (**TABELA 1**). Os indivíduos foram caracterizados como pertencentes ao quimiotipo timol (**TABELA 2**). Os espécimes coletados na região norte do país, por outros pesquisadores, pertenciam também ao quimiotipo timol, sendo os demais componentes semelhantes aos resultados aqui relatados (**TABELA 3**)^[6,8]. Para este quimiotipo o cariofileno está presente, porém, como componente minoritário^[6], resultado também encontrado durante a realização de nossa pesquisa. Por outro lado, indivíduos também coletados no estado da Bahia eram do quimiotipo β -cariofileno, apresentando o timol como um dos componentes minoritários^[5].

TABELA 1: Composição do óleo essencial de folhas e flores de *Lippia thymoides* com os valores de índices de retenção e tempos de retenção, em minutos.

Componente	RI ^a	RI	TR min.
α -tujona	922 ^[6]	913	5,8
β -mirceno	993 ^[18]	991	7,6
α -terpineno	1014 ^[18]	1018	8,5
p -cimeno	1023 ^[18]	1026	8,8
limoneno	1028 ^[18]	1029	8,9
γ -terpineno	1059 ^[18]	1057	10,0
metiltimol	1237 ^[18]	1242	17,3
timol	1296 ^[6]	1308	20,1
acetiltimol	1357 ^[18]	1360	22,3
α -copaeno	1377 ^[18]	1381	23,2
α -cedreno	1411 ^[5]	1420	24,8
β -cariofileno	1419 ^[5]	1428	25,1
α -humuleno	1454 ^[6]	1463	25,6

Legenda: RI^a = Índice de retenção da literatura; RI = Índice de retenção calculado; TR = Tempo de retenção.

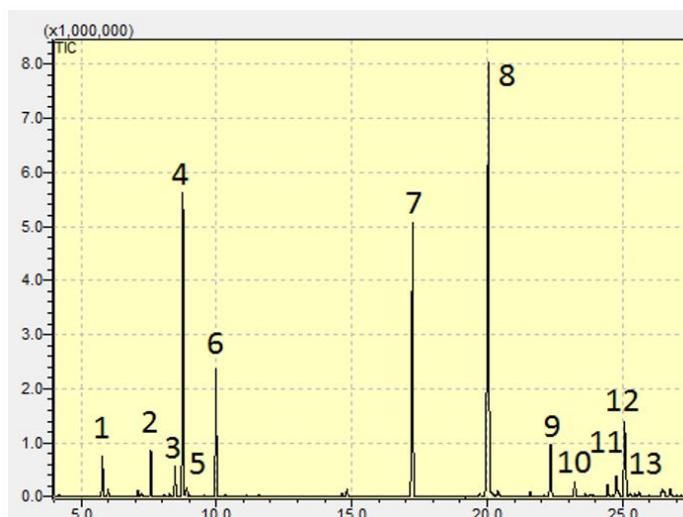
TABELA 2: Composição do óleo essencial de folhas e flores de *Lippia thymoides* de seis indivíduos coletados em 2017, denominados primeira coleta (1ª C), e 2018, segunda coleta (2ª C), com os valores de normalização das áreas (%) e de *p*.

Componente	Normalização das áreas (%)										Valor de <i>p</i>		
	Ind. 1		Ind. 2		Ind. 3		Ind. 4		Ind. 5			Ind. 6	
	1ª C	2ª C	1ª C	2ª C	1ª C	2ª C	1ª C	1ª C	2ª C	1ª C		2ª C	
α -tujona	1,17	1,04	1,19	1,40	0,8	1,2	1,38	1,38	0,50	0,96	1,58	0,92	
β -mirceneno	1,34	1,47	1,45	1,89	0,91	1,6	1,52	1,21	0,75	1,55	1,75	0,42	
α -terpineno	1,31	1,04	1,66	1,96	0,77	1,4	1,68	1,37	0,73	1,90	2,06	0,97	
<i>p</i> -cimeno	12,2	11,1	9,37	9,26	7,62	9,08	13,0	9,85	3,77	15,1	16,9	0,59	
limoneno	0,30	0,32	0,31	0,39	39,0	0,34	0,38	0,29	0,0	0,38	0,45	0,37	
γ -terpineno	4,72	3,85	8,5	9,31	2,83	3,87	7,85	7,23	3,77	9,28	9,02	0,53	
metiltimol	14,2	14,7	9,77	9,5	5,84	9,62	10,1	9,98	10,7	10,8	11,3	0,20	
timol	18,6	16,5	31,4	30,3	20,0	33,8	21,3	17,7	16,5	20,2	19,5	0,55	
acetiltimol	14,0	13,5	3,44	2,9	0,19	2,54	1,25	0,77	0,9	0,95	0,82	0,87	
α -copaeno	1,96	1,84	0,84	0,79	0,73	1,16	0,88	1,41	1,4	1,67	1,58	0,77	
α -cedreno	0,73	0,99	1,10	1,17	0,77	1,05	1,73	1,62	1,96	1,21	1,21	0,044	
β -cariofileno	6,04	6,29	3,66	3,24	3,82	6,19	5,48	7,04	7,27	4,66	3,74	0,62	
α -humuleno	1,62	1,91	0,27	0,57	0,72	1,38	0,33	0,49	0,54	0,41	0,58	0,05	

Legenda: C: coleta; Ind.: indivíduo.

* Não foi realizada segunda coleta da amostra 4 pois este indivíduo desenvolveu-se menos que os demais indivíduos.

FIGURA 1: Perfil cromatográfico por CG-MS para óleo essencial de folhas e flores de *Lippia thymoides* contendo (1) α -tujona, (2) β -mirceneno, (3) α -terpineno, (4) *p*-cimeno, (5) limoneno, (6) γ -terpineno, (7) metiltimol, (8) timol, (9) acetiltimol, (10) α -copaeno, (11) α -cedreno, (12) β -cariofileno, (13) α -humuleno.



Os valores de *p* apresentados (**TABELA 2**) mostram que só houve diferença significativa na composição química entre as coletas para α -humuleno e α -cedreno, componentes minoritários. Portanto, um ano após a poda as plantas apresentavam mesmo perfil em relação à composição do óleo essencial (**FIGURA 1**). Considera-se que a composição se manteve relativamente constante, com exceção do indivíduo 3 que apresentou aumento muito expressivo na porcentagem relativa de limoneno apenas na primeira coleta, passando a ser o componente majoritário. Para este indivíduo, outros monoterpêneos tiveram sua concentração diminuída, especialmente γ -terpineno, *p*-cimeno, timol, metiltimol e acetiltimol. Como todos fazem parte da mesma rota biossintética, tendo como precursor do γ -terpineno^[19], possivelmente houve um desvio da biossíntese de γ -terpineno para limoneno. Importante considerar que não se trata de outro

quimiotipo, visto que, após um ano, o mesmo indivíduo teve seu nível de limoneno alterado de 39,0 para 0,34%, concentração equivalente às demais amostras.

Esses resultados indicam que é possível realizar nova coleta após poda drástica. No momento da coleta foram mantidos apenas cerca de 10 centímetros dos caules, ou seja, todas as folhas e flores foram coletadas, e após um ano as plantas recuperaram-se completamente. Durante este período, de um ano, foi observado o crescimento da planta em campo, o qual foi considerado lento, provavelmente em função da baixa pluviosidade em 2017 e 2018. Ao contrário do que foi observado na região norte do país, por Silva et al.^[8], local onde as plantas cresceram cerca de um metro em seis meses^[6], altura em que encontram-se adultas^[1]. Possivelmente, o desenvolvimento foi mais rápido em função da maior pluviosidade naquela região. Considera-se a hipótese de que seria possível realizar mais de uma coleta ao ano em regime de chuvas mais abundantes ou com o apoio de irrigação.

É importante considerar o desenvolvimento da planta no momento da coleta, visto que a concentração de metabólitos secundários geralmente cresce em função do estágio de desenvolvimento da planta, atingindo um máximo e decrescendo^[11]. Tal processo natural pode ser reiniciado aplicando-se a prática de poda. Ou seja, a poda tem como objetivo tanto a coleta quanto a renovação das plantas coletadas.

TABELA 3: Composição do óleo essencial de folhas e flores de *Lippia thymoides* de seis indivíduos coletados em 2017, com as respectivas porcentagens, em comparação com valores da literatura científica.

Componentes	Presente pesquisa	Silva et al. ^[6]	Silva et al. ^[8]
α -tujona	0,8 a 1,58	0,1 a 0,6	0,81
β -mirceno	0,75 a 1,89	0,1 a 1,0	1,34
α -terpineno	0,73 a 2,06	0,1 a 1,0	1,48
<i>p</i> -cimeno	3,77 a 16,87	0,5 a 6,4	8,36
limoneno	0 a 0,45*	0,1 a 0,2	0,23
γ -terpineno	2,83 a 9,31	0,5 a 6,4	9,36
metiltimol	5,84 a 14,7	0,1 a 1,8	1,27
timol	16,5 a 33,8	70,1 a 80,0	58,9
acetiltimol	0,77 a 13,5	5,1 a 13,7	8,10
α -copaeno	0,73 a 1,96	0,1 a 0,4	0,03
α -cedreno	3,24 a 7,27	-	-
β -cariofileno	3,24 a 7,27	-	4,53
α -humuleno	0,27 a 1,91	0,4 a 0,8	0,61

Legenda: * Foi excluído o valor discrepante.

Varição em função do horário de coleta: a partir do valor de *p* (0,58) calculado na análise de variância (ANOVA), foi constatado que não houve diferença significativa no teor de óleo essencial em função do horário de coleta (7, 12 e 17 horas). O valor de *f* de 0,56 indica que mais repetições não influenciariam no resultado. Semelhante resultado foi obtido por Silva et al.^[6], investigando para a mesma espécie as variações nos teores de óleo essencial em diferentes horários (6, 9, 12, 15, 18 e 21 horas), visto que os autores não observaram diferença significativa nos teores de óleo. Na pesquisa de Ehlert et al.^[20] com a *Lippia alba*, fenótipo limoneno-carvona, foi constatado que o teor de óleo essencial também não apresentou diferença significativa entre os horários avaliados (8, 10, 12, 14 e 16 horas). Diferenças significativas eram esperadas, considerando que geralmente a biossíntese de óleo essencial é estimulada pelo aumento na temperatura, inclusive tais compostos participam na termorregulação de espécies vegetais^[11]. Silva et al.^[6] encontraram correlação positiva entre temperatura e teor de óleo, porém, as diferenças não foram suficientes para serem detectadas estatisticamente. Talvez nos indivíduos analisados na presente pesquisa

houve equilíbrio entre o aumento da biossíntese e a volatilização dos compostos formados resultando em constância quanto ao teor.

Quanto à composição dos óleos essenciais obtidos (**TABELA 4**), a porcentagem de 12 compostos analisados foi comparada. Não foram observadas alterações significativas ($p > 0,05$) nas porcentagens dos compostos identificados em função dos horários de coletas avaliados. No trabalho de Ehlert et al.^[20] foram observadas diferenças na composição do óleo essencial de *L. alba*. Portanto, ao contrário do que seria esperado, a coleta para fins comerciais ou emprego caseiro pode ser realizado em diferentes horários durante o dia, o que representa uma grande vantagem em relação à logística para coleta.

TABELA 4: Composição do óleo essencial de *Lippia thymoides* nos respectivos horários de coleta.

Compostos	7 horas	12 horas	17 horas
	% Área ± DP (EPR)	% Área ± DP (EPR)	% Área ± DP (EPR)
α -tujona	1,58 ± 0,15 (9,24)	1,54 ± 0,14 (8,80)	1,39 ± 0,13 (8,97)
α -pineno	0,65 ± 0,48 (73,94)	0,63 ± 0,51 (80,22)	0,53 ± 0,38 (72,86)
β -mirceno	1,82 ± 0,17 (9,33)	1,61 ± 0,40 (24,67)	1,69 ± 0,19 (11,13)
α -terpineno	1,20 ± 0,17 (14,6)	1,23 ± 0,18 (14,62)	1,12 ± 0,09 (8,04)
p -cimeno	13,71 ± 1,97 (14,35)	12,56 ± 2,03 (16,18)	10,70 ± 1,47 (13,71)
γ -terpineno	4,63 ± 1,43 (30,83)	5,38 ± 0,83 (15,45)	4,81 ± 0,13 (2,72)
metiltimol	13,07 ± 1,03 (7,88)	11,69 ± 0,80 (6,82)	11,94 ± 0,40 (3,34)
timol	25,42 ± 1,20 (4,73)	24,69 ± 3,44 (13,94)	25,99 ± 1,81 (6,96)
acetiltimol	1,25 ± 1,10 (87,89)	1,77 ± 1,40 (78,84)	1,61 ± 0,39 (24,26)
α -copaeno	0,98 ± 3,31 (32,12)	1,02 ± 0,41 (40,13)	1,30 ± 0,58 (44,64)
α -cedreno	1,06 ± 0,15 (13,90)	1,17 ± 0,31 (26,66)	1,06 ± 0,11 (10,06)
cariofileno	5,19 ± 1,68 (32,44)	5,65 ± 2,02 (35,74)	5,82 ± 1,83 (31,38)

Legenda: DP = desvio padrão, EPR = erro padrão relativo.

Varição em período de seca e calor: não houve diferença significativa no teor de óleo essencial (teste *t-Student*, $p = 0,40$) entre aqueles obtidos no ensaio para avaliar a variação entre indivíduos, que aconteceu em período de temperaturas e chuvas amenas, e os teores resultantes de coleta em época de seca e calor. Considerando o conhecimento científico atual sobre estresse hídrico, o teor de óleo essencial poderia aumentar ou diminuir. Em revisão elaborada por Selmar e Kleinwachter^[21], foi apontado que plantas expostas ao estresse hídrico podem apresentar aumento na biossíntese de metabólitos secundários reduzidos, como terpenos, cujos carbonos apresentam número de oxidação menor que aqueles de carboidratos. Provavelmente tal fato seria resultado do aumento do potencial redutor do metabolismo vegetal em função do aumento da razão NADPH/NADP causado pelo aumento do gás carbônico em função do fechamento dos estômatos. Por outro lado, outros pesquisadores observaram que a seca foi correlacionada negativamente com o teor de óleo essencial de *Lippia thymoides*^[6], assim como aconteceu com *Lippia organoides*, cujo óleo essencial também é composto por sesquiterpenos e monoterpenos^[22].

Além o estresse hídrico outra variável envolvida neste caso é a temperatura, cujo aumento foi correlacionado com aumento na biossíntese de terpenos em *Lippia thymoides*^[6]. A temperatura é um dos fatores que mais estimula enzimas ligadas a biossíntese de terpenos, os quais refletem a luz solar atuando na termorregulação das plantas, aumentando a sua tolerância a altas temperaturas^[10]. No caso dos

resultados aqui apresentados, possivelmente houve aumento no teor de óleo essencial proporcionado pelo estímulo da biossíntese de terpenos em função da temperatura e concentração dos óleos pela diminuição no teor de água das plantas, sendo que estes fatos compensaram a diminuição na biossíntese causada pela seca e pela ausência das flores.

Quanto à composição dos óleos essenciais, não foram detectadas diferenças significativas nas porcentagens das substâncias identificadas (**TABELA 5**). Apesar da ausência de diferenças, tanto no teor de óleo essencial quanto no perfil cromatográfico, entre os dois períodos, considera-se mais adequada coleta fora do período de seca excessiva, visto que durante a seca a biomassa foi muito diminuída, e houve maior dificuldade para separar folhas e flores dos caules.

TABELA 5: Comparação entre as porcentagens, obtidas por normalização das áreas, de componentes identificados dos óleos essenciais obtidos na análise da variação entre os indivíduos (basal) e aqueles obtidos em período de seca.

Componente	Normalização das áreas (%) \pm DP* (EPR** %)		Valor de p
	Porcentagem basal	Porcentagem durante seca	
α -tujona	1,14 \pm 0,21 (18,9)	1,20 \pm 0,089 (7,49)	0,75
β -mirceno	1,33 \pm 0,22 (16,5)	1,15 \pm 0,115 (10,07)	0,29
α -terpineno	1,44 \pm 0,36 (25,0)	0,45 \pm 0,32 (72,6)	***
<i>p</i> -cimeno	11,17 \pm 2,48 (22,2)	14,89 \pm 5,55 (37,29)	0,26
γ -terpineno	6,73 \pm 2,25 (33,4)	2,31 \pm 0,452 (19,6)	0,15
metiltimol	10,8 \pm 2,43 (24,1)	16,47 \pm 1,39 (8,47)	0,077
timol	21,52 \pm 4,57 (21,2)	25,37 \pm 6,76 (26,65)	0,14
acetiltimol	3,44 \pm 4,85 (140,9)	0,83 \pm 0,38 (46,0)	***
α -copaeno	1,24 \pm 0,46 (37,0)	0,69 \pm 0,066 (9,63)	0,11
α -cedreno	1,25 \pm 0,46 (26,7)	1,24 \pm 0,065 (9,39)	0,082
cariofileno	5,11 \pm 1,20 (23,5)	6,12 \pm 0,27 (4,41)	***

Legenda: * DP = desvio padrão; ** EPR = erro padrão relativo *** Não foi possível realizar a análise estatística em função das diferenças nas variâncias.

Conclusão

As variações no teor de óleo essencial (1,64% a 2,85%) entre indivíduos foram aceitáveis no sentido de possibilitar a obtenção de lotes de matéria-prima vegetal com adequado teor de óleo essencial. Não foram observadas diferenças em função do horário de coleta, seca e após recuperação de poda drástica, facilitando o planejamento da logística de coleta. Os componentes majoritários do óleo essencial foram timol, metiltimol, *p*-cimeno, com porcentagem relativa de, respectivamente, 16,5 a 33,8%; 5,84 a 14,7%; 0,77 a 14,0%, os quais, com os componentes minoritários, resultaram em perfil cromatográfico constante frente às variáveis analisadas. Conclui-se que, coletas para fins comerciais ou utilização caseira das folhas e flores de *Lippia thymoides* podem ser realizadas em qualquer horário do dia, sendo possível nova coleta após desenvolvimento completo das plantas. Apesar de não terem sido detectadas diferenças no teor e composição em período de intensa seca não seria indicada coleta neste período, visto que a massa total de folhas por indivíduo diminuiu extensivamente neste período. Estudos sobre variabilidade química de espécies de Caatinga e Cerrado geram conhecimento científico que pode ser aplicado em planos de manejo para esses biomas, desvalorizados tanto do ponto de vista de conservação quanto de pesquisa científica, especialmente a Caatinga, quando se compara a regiões de Floresta Atlântica e Amazônica. Planos de manejo podem resultar em renda às populações locais, assim como valorização e conservação dos biomas.

Referências

1. Brazil Flora. Projeto Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. *Lippia thymoides*. 2020. [Acesso em: 5 de maio de 2020]. Disponível em: [\[Link\]](#).
2. Missouri Botanical Garden. *Lippia thymoides*. 2020. [Acesso em 18 de março 2020]. Disponível em: [\[Link\]](#).
3. Melo JIM, Alves IDM, Sousa RTM, Barbosa LMMA, Andrade WM. Verbenaceae *sensu lato* em um trecho da ESEC Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Rev Caatinga**. 2010; 23(3): 41. ISSN 0100-316X. [\[Link\]](#).
4. Pinto CDP, Rodrigues VD, Pinto FDP, Pinto RDP, Uetanabaro APT, Pinheiro CSR et al. Antimicrobial activity of *Lippia* species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2013; 2013: 614501. ISSN 1741-427X. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
5. Silva FS, Menezes PMN, Sá PGS, Oliveira ALDS, Souza EAA, Almeida JRGDS et al. Chemical composition and pharmacological properties of the essential oils obtained seasonally from *Lippia thymoides*. **Pharm Biol**. 2016; 54(1): 25. ISSN 1388-0209. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
6. Silva SG, Figueiredo PLB.; Nascimento LD, da Costa WA, Maia JGS, Andrade EHA. Planting and seasonal and circadian evaluation of a thymol-type oil from *Lippia thymoides* Mart. & Schauer. **Chem Cent J**. 2018; 12(1): 113. ISSN 1752-153X. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
7. Pascual ME, Slowing K, Carretero E, Mata DS, Villar A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **J ethnopharmacol**. 2001; 76(3): 201. ISSN 0378-8741. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
8. Silva SG, Costa RA, Oliveira MS, Cruz JN, Figueiredo PLB, Brasil D et al. Chemical profile of *Lippia thymoides*, evaluation of the acetylcholinesterase inhibitory activity of its essential oil, and molecular docking and molecular dynamics simulations. **PLoS One**. 2019; 14(3): e0213393. ISSN 1932-6203. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
9. Silva FS, Menezes PMN, Sá PGS, Oliveira ALDS, Souza EAA, Bamberg VM et al. Pharmacological basis for traditional use of the *Lippia thymoides*. **Evid Based Complement Alternat Med**. 2015; 2015: 463248. ISSN 1741-427X. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
10. Rehman R, Hanif MA, Mushtaq Z, Al-Sadi MA. Biosynthesis of essential oils in aromatic plants: a review. **Food Rev Int**. 2016; 32(2): 117. ISSN 87559129, 15256103. [\[CrossRef\]](#).
11. Rehman R, Hanif MA, Mushtaq Z, Mochona B, Qi X. Biosynthetic factories of essential oils: the aromatic plants. **Nat Prod Chem Res**. 2016; 4(4): 1000227. ISSN 2329-6836. [\[CrossRef\]](#).
12. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Farmacopeia Brasileira**. 6ª ed. Brasília: 2019. [Acesso em: 5 de maio de 2020]. Disponível em: [\[Link\]](#).
13. Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Resolução da Diretoria Colegiada - **RDC nº. 166**, 24 de julho de 2017. Guia para validação de métodos analíticos. [Acesso em: 27 de março de 2019]. Disponível em: [\[Link\]](#).
14. Brasil. INMET - Instituto Nacional de Meteorologia. **Agrometeorologia**. 2020. [Acesso em: 28 de abril de 2020]. Disponível em: [\[Link\]](#).
15. Cazari VRDR, Pereira TR, Romera AM, Brandão MDC, Zelandi Filho C, Faverato APA. Redução do uso de xilol na técnica de coloração hematoxilina e eosina. **Colloquium Vitae**. 2013; 5(2): 135. ISSN 1984-6436. [\[CrossRef\]](#).

16. Ehlert PAD, Blank AF, Arrigoni-Blank MF, Paula JWA, Campos DA, Alviano CS. Tempo de hidrodestilação na extração de óleo essencial de sete espécies de plantas medicinais. **Rev Bras PI Med.** 2006; 8(2): 79. ISSN 1516-0572, 1983-084X. [\[Link\]](#).
17. Prins CL, Lemos CSL, Freitas SP. Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Rev Bras PI Med.** 2006; 8(4): 92. ISSN 1516-0572, 1983-084X [\[Link\]](#).
18. Hudaib M, Speroni E, Di Pietra AM, Cavrini V. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. **J Pharm Biomed Anal.** 2002; 29(4): 691. ISSN 07317085. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
19. Poulouse AJ, Croteau R. Biosynthesis of aromatic monoterpenes: conversion of γ -terpinene to *p*-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. **Arch Biochem Biophys.** 1978; 187(2): 307. ISSN 0003-9861. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
20. Ehlert PAD, Ming LC, Marques MOM, Fernandes DM, Rocha WA, Luz JMQ et al. Influência do horário de colheita sobre o rendimento e composição do óleo essencial de erva-cidreira brasileira [*Lippia alba* (Mill.) N. E. Br.]. **Rev Bras PI Med.** 2013; 15(1): 72. ISSN 1516-0572, 1983-084X. [\[CrossRef\]](#).
21. Selmar D, Kleinwächter M. Stress enhances the synthesis of secondary plant products: the impact of stress-related over-reduction on the accumulation of natural products. **Plant Cell Physiol.** 2013; 54(6): 817. ISSN 1471-9053. [\[CrossRef\]](#) [\[PubMed\]](#).
22. Souza LM, Fonseca FSA, Silva JCRL, Silva AM, Silva JR, Martins ER. Essential oil composition in natural population of *Lippia organoides* (Verbenaceae) during dry and rainy seasons. **Rev Bio Tropical.** 2019; 67(1): 278. ISSN 0034-7744. [\[CrossRef\]](#).

Histórico do artigo | **Submissão:** 29/07/2020 | **Aceite:** 09/10/2020 | **Publicação:** 30/06/2021

Conflito de interesses: O presente artigo não apresenta conflitos de interesse.

Como citar este artigo: Neves DSC, Santana GN, Krepsky PB. Variação intraespecífica na composição e teor do óleo essencial de *Lippia thymoides*. **Rev Fitos.** Rio de Janeiro. 2021; 15(2): 192-203. e-ISSN 2446.4775. Disponível em: <<http://revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista-fitos/article/view/1062>>. Acesso em: dd/mm/aaaa.

Licença CC BY 4.0: Você está livre para copiar e redistribuir o material em qualquer meio; adaptar, transformar e construir sobre este material para qualquer finalidade, mesmo comercialmente, desde que respeitado o seguinte termo: dar crédito apropriado e indicar se alterações foram feitas. Você não pode atribuir termos legais ou medidas tecnológicas que restrinjam outros autores de realizar aquilo que esta licença permite.
