



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Monaliza Maia Rebelo

**CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE DOS ÓLEOS
ESSENCIAIS E EXTRATOS METANÓLICOS DE *CONOBEA*
SCOPARIOIDES E *HYPTIS CRENATA***

**BELÉM-PA
2008**

Monaliza Maia Rebelo

**CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E
EXTRATOS METANÓLICOS DE *CONOBEA SCOPARIOIDES* E *HYPTIS*
*CRENATA***

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Ciência e Tecnologia de
Alimentos da Universidade Federal do Pará,
como requisito necessário para a obtenção
do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia
de Alimentos.

Área de Concentração:
Ciência e Tecnologia de Alimentos

Linha de Pesquisa:
Ciência e Tecnologia de Matérias-Primas
Alimentícias da Amazônia e de Resíduos
Agroindustriais

Orientador:
José Guilherme Soares Maia

**BELÉM-PA
2008**



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
CENTRO TECNOLÓGICO
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

Monaliza Maia Rebelo

**CAPACIDADE ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E
EXTRATOS METANÓLICOS DE *CONOBEA SCOPARIOIDES* E *HYPTIS*
*CRENATA***

DATA DA AVALIAÇÃO: 30 / 05 / 2006

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Guilherme Soares Maia (Orientador)
(Departamento de Engenharia Química e de Alimentos - UFPA)

Prof. Dr. Hervé Louis Ghislain Rogez (Membro)
(Departamento de Engenharia Química e de Alimentos - UFPA)

Prof. Dra. Giselle Skelding Pinheiro Guilhaon (Membro)
(Departamento de Química - UFPA)

Prof. Dr. Lênio José Guerreiro de Faria (Suplente)
(Departamento de Engenharia Química e de Alimentos - UFPA)

Ao meu eterno e glorioso Deus e seu digníssimo filho Jesus Cristo, por serem minha fortaleza, refúgio e o alimento da minha alma que me faz viver e crescer no amor.

Ao meu amado bebê, esposo e minha indispensável família pais, irmãos, sobrinhos, cunhados e sogros, que são o suporte da minha vida, sem vocês eu nada seria!

AGRADECIMENTOS

Aos coordenadores Rosinelson Pena e Hervé Rogez do curso de mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela existência do curso e a oportunidade de eu poder contar com essa pós-graduação.

Ao meu orientador José Guilherme Soares Maia, pelo convite a fazer esse mestrado e junto ao seu projeto de pesquisa, poder ter sido bolsista e produzir minha dissertação.

A todos os professores e membros desse curso que, de uma forma ou de outra, contribuíram para meu aprendizado e formação científica. Especialmente, aos professores Lênio de Faria e Pergentino Sousa, pelas vezes que se dispuseram a me atender e ensinar, quando solicitados.

A todos os integrantes do Laboratório de Alimentos, pela disponibilidade de ajudas quando solicitados ou não e pelo local e infra-estrutura necessária para realização das análises antioxidantes. Em especial, ao Jesus Souza e Evaldo Silva que contribuíram com seus conhecimentos, esclarecendo minhas dúvidas.

Aos professores componentes da banca examinadora dessa dissertação Hervé Rogez, Giselle Guilhon e Lênio de Faria, pelas valiosas correções, sugestões e contribuições, que fizeram enriquecer esse trabalho.

Aos meus amigos de sala de aula, pela companhia e solidariedade.

As meninas do LEPRON: Hellen Flores, Thaís Pereira, Patrícia de Lira e Nathalie Azevedo, pela amizade e colaboração nas atividades do projeto. A Eloísa Andrade que, além de amiga, analisou os óleos essenciais de *C. scoparioides* e *H. crenata* por cromatografia gasosa e identificou seus constituintes através de CG/EM. Ao Rosivaldo Mendes que, posteriormente, reproduziu esses cromatogramas com melhorias. Ao amigo Ferdinando Nascimento, pelas coletas e preparo das plantas. A Joyce Kelly, em especial, que participou e contribuiu diretamente no desenvolvimento e confecção dessa dissertação.

Ao meu esposo Paulo, pelo amor, companheirismo e ao fruto do nosso amor, uma benção divina, nosso amado bebê, que se forma no meu ventre.

Aos meus maravilhosos e amados pais Augusto e Maristela, pelo amor, criação e educação, especialmente a minha mãe, pelo incentivo e confiança.

Aos meus queridos irmãos Maristely e Miely e amados sobrinhos Luís, Luan e Aliny, pelo amor, carinho e afeto que temos um com o outro.

“Aquele que habita no esconderijo do Senhor, à
sombra do onipotente descansará. Direi do Senhor: Ele é
o meu Deus, o meu refúgio e fortaleza e Nele confiarei”.

Salmo 91:1-2

RESUMO

Conobea scoparioides (Cham. & Schltdl.) Benth. e *Hyptis crenata* Pohl são espécies herbáceas aromáticas da região amazônica. A primeira é conhecida popularmente como “pataqueira” e pertence à família Scrophulariaceae. Está distribuída no Norte do Brasil com ocorrência em áreas úmidas, terras baixas de rios e riachos, espalhada em manchas e solo arenoso. A segunda é conhecida vulgarmente como “salva-do-marajó” e pertence à família Lamiaceae. Sua distribuição se estende pelo estuário do rio Amazonas e arquipélago do Marajó, nos estados do Pará e Amapá. Estas espécies, em mistura com outras plantas aromáticas, são utilizadas em banhos aromáticos durante as festividades de São João. Foram coletadas três amostras de “pataqueira”: uma na localidade de Santa Quitéria, Município de Santa Isabel (PA) e duas na área da Embrapa, no Município de Belém (PA). Foram coletadas três amostras de “salva-do-marajó”: nas localidades de Deus-me-ajude, Rio Câmara e São Pedro, no Município de Salvaterra (PA). As plantas foram selecionadas pelo uso etnobotânico e presença de compostos fenólicos em seus óleos essenciais. Os constituintes dos óleos essenciais foram analisados por CG e CG-EM, sendo majoritários na “pataqueira” o éter metílico do timol, timol e α -felandreno e na “salva-do-marajó” o α -pineno, 1,8-cineol, β -pineno e limoneno. Óleos essenciais e extratos metanólicos das plantas foram analisados quanto a sua capacidade antioxidante usando-se o método de seqüestro do radical DPPH. A toxicidade de óleos e extratos também foi obtida usando-se bioensaios com larvas de camarão (*Artemia salina*). Os resultados deste trabalho indicam que “pataqueira” e “salva-do-marajó” são espécies com grande potencial terapêutico, devido às atividades antioxidante e citotóxica de seus óleos e extratos, com aplicabilidade nos mercados de alimentos, fitoterápicos e cosméticos.

ABSTRACT

Conobea scoparioides (Cham. & Schltdl.) Bent. and *Hyptis crenata* Pohl are herbaceous and aromatic species from Amazon region. The first one is known as “pataqueira” and belongs to Scrophulariaceae family. It is distributed in North Brazil and occurs in humid areas, low lands of rivers and streams, widespread in spots and sandy soil. The second one is known as “salva-do-marajó” and belongs to Lamiaceae family. It is distributed by the Amazon estuary and Marajó Archipelago in the Pará and Amapá states. These species, mixed with other aromatic plants, are used for aromatic baths along the Saint John’s festivities. Three “pataqueira” samples were collected: one in the locality of Santa Quitéria, in the Municipality of Santa Isabel (PA) and two in the área of Embrapa, in the Municipality of Belém (PA). Three “salva-do-marajó” samples were collected in the localities of Deus-me-ajude, Rio Câmara e São Pedro, in the Municipality of Salvaterra (PA). The plants were selected by their ethnobotanical uses and the presence of phenolic compounds in its essential oils. The constituents of all essential oils were analysed by GC and GC-MS, being thymol methyl ether, thymol and α -phellandrene the main compounds found in the “pataqueira” oil and α -pinene, 1,8-cineole, β -pinene e limonene the major components identified in the “salva-do-marajó” oil. The essential oils and methanolic extracts of the sample plants were analyzed for their antioxidant capacities using the DPPH radical scavenging. The essential oils e methanolic extracts toxicities were also determined using brine shrimp (*Artemia salina*) bioassays. This work results indicated that “pataqueira” and “salva-do-marajó” are species with a high therapeutic potencial due the antioxidant and citotoxic activities of their essential oils and methanolic extracts, with aplicabilities in the market of food, phytomedicines, and cosmetics.

ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

Cs-1	Amostra de <i>Conobea scoparioides</i> , coletada na localidade de Santa Quitéria
Cs-2, Cs-3	Amostras de <i>Conobea scoparioides</i> , coletadas na área da Embrapa
Hc-1, Hc-2, Hc-3	Amostras de <i>Hyptis crenata</i> coletadas nas localidades: Deus-me-ajude, Rio Câmara e São Pedro
OCs-1f	Amostra de óleo essencial de <i>C. scoparioides</i> fresca
OCs-1s	Amostra de óleo essencial de <i>C. scoparioides</i> seca
OCs-2s	Amostra de óleo essencial de <i>C. scoparioides</i> seca
OCs-3f	Amostra de óleo essencial de <i>C. scoparioides</i> fresca
OCs-3s	Amostra de óleo essencial de <i>C. scoparioides</i> seca
OHc-1f	Amostra de óleo essencial de <i>H. crenata</i> fresca
OHc-1s	Amostra de óleo essencial de <i>H. crenata</i> seca
OHc-2s	Amostra de óleo essencial de <i>H. crenata</i> seca
OHc-3s	Amostra de óleo essencial de <i>H. crenata</i> seca
ECs-1	Amostra de extrato metanólico de <i>C. scoparioides</i>
ECs-3	Amostra de extrato metanólico de <i>C. scoparioides</i>
EHc-1	Amostra de extrato metanólico de <i>H. crenata</i>
EHc-2	Amostra de extrato metanólico de <i>H. crenata</i>
EHc-3	Amostra de extrato metanólico de <i>H. crenata</i>
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
PG	Galato de propila
TBHQ	Ter-butilidroquinona
NDGA	Ácido nordidroguaiarético
DPPH•	Radical 1,1-difenil-2-picrilidrazila
H•	Radical hidrogênio
¹ O ₂	Oxigênio singlete
O ₂ ^{-•}	Radical superóxido
OH•	Radical hidroxila
NO	Óxido nítrico
ONOO ⁻	Peroxinitrito

Q•	Radical semiquinona
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
LEPRON	Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais
MPEG	Museu Paraense Emílio Goeldi
Trolox	Ácido 6-hidróxi-2,5,7,8,-tetrametilcroman-2-carboxílico
CE ₅₀	Concentração efetiva em 50% de capacidade
CL ₅₀	Concentração Letal em 50%
Abs ₅₁₇	Absorbância medida em 517 nm
CGL	Cromatografia gás-líquido
CG-EM	Cromatografia de gás acoplada à espectrometria de massas
CCD	Cromatografia em camada delgada
IR	Índice de retenção
P.A.	Para análise
p.	Página
m	Metro
cm	Centímetro
nm	Nanômetro
L	Litro
mL	Mililitro
μL	Microlitro
mM	Milimolar
μM	Micromolar
ppm	Partes por milhão
mg	Miligrama
μg	Micrograma
pH	potencial hidrogeniônico
min	Minuto
h	Horas
blu	Base livre de umidade
UV	Ultravioleta
MeOH	Metanol
DMSO	Dimetilsulfóxido

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	<i>Conobea scoparioides</i>	20
Figura 2.	<i>Hyptis crenata</i>	22
Figura 3.	Esquema do seqüestro do radical DPPH por um antioxidante (YAMAGUCHI et al., 1998).....	33
Figura 4.	Estruturas dos constituintes majoritários identificados nos óleos essenciais de <i>C. scoparioides</i>	52
Figura 5.	Estruturas dos constituintes majoritários identificados nos óleos essenciais de <i>H. crenata</i>	52
Figura 6.	Cromatograma do óleo essencial da amostra OCS-1f.....	53
Figura 7.	Cromatograma do óleo essencial da amostra OCS-1s.....	54
Figura 8.	Cromatograma do óleo essencial da amostra OCS-3f.....	55
Figura 9.	Cromatograma do óleo essencial da amostra OCS-3s.....	56
Figura 10.	Cromatograma do óleo essencial da amostra OHc-1f.....	57
Figura 11.	Cromatograma do óleo essencial da amostra OHc-1s.....	58
Figura 12.	Gráfico comparativo entre os valores da CE ₅₀ dos óleos essenciais de <i>C. scoparioides</i> e <i>H. crenata</i> frente ao radical DPPH.....	65
Figura 13.	Gráfico comparativo entre os valores da CE ₅₀ dos extratos metanólicos de <i>C. scoparioides</i> e <i>H. crenata</i> frente ao radical DPPH.....	65
Figura 14.	Gráfico comparativo entre os valores da CL50 dos óleos essenciais e extratos metanólicos de <i>C. scoparioides</i> e <i>H. crenata</i> frente a <i>Artemia salina</i>	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Composição química dos óleos essenciais de <i>C. scoparioides</i> (MAIA et al., 2000b).....	21
Tabela 2.	Composição química dos óleos essenciais de <i>H. crenata</i> (ZOGHBI et al., 2002).....	23
Tabela 3.	Rendimento em óleo essencial (%) das amostras de <i>C. scoparioides</i>	48
Tabela 4.	Rendimento em óleo essencial (%) das amostras de <i>H. crenata</i>	48
Tabela 5.	Composição química e quantidade relativa de cada constituinte dos óleos essenciais de <i>C. scoparioides</i>	50
Tabela 6.	Composição química e quantidade relativa de cada constituinte dos óleos essenciais de <i>H. crenata</i>	51
Tabela 7.	Valores do percentual de inibição do radical DPPH para os óleos essenciais de <i>C. scoparioides</i>	60
Tabela 8.	Valores do percentual de inibição do radical DPPH para os óleos essenciais de <i>H. crenata</i>	61
Tabela 9.	Valores do percentual de inibição do radical DPPH para os extratos metanólicos de <i>C. scoparioides</i>	62
Tabela 10.	Valores do percentual de inibição do radical DPPH para os extratos metanólicos de <i>H. crenata</i>	62
Tabela 11.	Valores do percentual da concentração de DPPH remanescente para os óleos essenciais de <i>C. scoparioides</i>	62
Tabela 12.	Valores do percentual da concentração de DPPH remanescente para os óleos essenciais de <i>H. crenata</i>	63
Tabela 13.	Valores do percentual da concentração de DPPH remanescente para os extratos metanólicos de <i>C. scoparioides</i>	63
Tabela 14.	Valores do percentual da concentração de DPPH remanescente para os extratos metanólicos de <i>H. crenata</i>	63

Tabela 15.	Valores da concentração efetiva em 50% de capacidade (CE ₅₀) para os óleos essenciais de <i>C. scoparioides</i> e <i>H. crenata</i>	64
Tabela 16.	Valores da concentração efetiva em 50% de capacidade (CE ₅₀) para os extratos metanólicos de <i>C. scoparioides</i> e <i>H. crenata</i>	64
Tabela 17.	Toxicidade dos óleos essenciais de <i>C. scoparioides</i> e <i>H. crenata</i> sobre larvas do microcrustáceo <i>Artemia salina</i>	66
Tabela 18.	Toxicidade dos extratos metanólicos de <i>C. scoparioides</i> e <i>H. crenata</i> sobre larvas do microcrustáceo <i>Artemia salina</i>	67

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	17
2.	OBJETIVOS	19
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	20
3.1.	<i>CONOBEA SCOPARIOIDES</i>	20
3.2.	<i>HYPTIS CRENATA</i>	22
3.3.	EXTRATOS.....	25
3.4.	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	25
3.5.	DESTILAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS.....	26
3.6.	CROMATOGRAFIA GASOSA.....	26
3.7.	RADICAIS LIVRES.....	27
3.8.	AGENTES ANTIOXIDANTES.....	27
3.8.1.	Mecanismos de defesa antioxidantes	28
3.8.2.	Antioxidantes sintéticos	29
3.8.3.	Antioxidantes naturais	30
3.9.	OXIDAÇÃO LIPÍDICA.....	32
3.10.	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SEQÜESTRO DE RADICAIS LIVRES DPPH “GERADOS” <i>IN VITRO</i>	33
3.11.	ESPECIARIAS E PLANTAS AROMÁTICAS COM CAPACIDADE ANTIOXIDANTE.....	34
3.12.	ATIVIDADE BIOLÓGICA FRENTE A <i>ARTEMIA SALINA</i> LEACH....	36
4.	MATERIAL E MÉTODOS	38
4.1.	INSTRUMENTOS E ACESSÓRIOS.....	38
4.2.	SOLVENTES, REAGENTES, SAIS E OUTROS.....	38
4.3.	MATÉRIA-PRIMA.....	39
4.4.	MÉTODOS.....	39
4.4.1.	Coleta e identificação	39
4.4.2.	Obtenção dos óleos essenciais, armazenamento e teor de umidade	40
4.4.3.	Obtenção dos extratos metanólicos	41
4.4.4.	Análise química dos óleos essenciais	41

4.5.	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS METANÓLICOS DAS PLANTAS.....	42
4.5.1.	Método de descoloração do β-caroteno em placas de cromatografia em camada delgada (CCD).....	42
4.5.2.	Método de seqüestro do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazila..	42
4.5.2.1.	Preparo da amostras.....	43
4.5.2.2.	Preparo da solução estoque de DPPH.....	43
4.5.2.3.	Medidas da capacidade antioxidante.....	43
4.5.2.4.	Preparo da solução do Trolox, o antioxidante de referência.....	44
4.5.2.5.	Avaliação da capacidade e eficácia antioxidante.....	44
4.6.	AVALIAÇÃO DA TOXIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS METANÓLICOS DAS PLANTAS FRENTE ÀS LARVAS DO MICROCRUSTÁCEO <i>ARTEMIA SALINA</i>	46
4.6.1.	Preparo do aquário, da solução salina artificial e eclosão dos cistos de <i>Artemia salina</i>.....	46
4.6.2.	Preparo das amostras para o teste de toxicidade.....	46
4.6.3.	Bioensaio de toxicidade com <i>Artemia salina</i>.....	47
4.6.4.	Determinação da Concentração Letal de 50% (CL₅₀) para os microcrustáceos como parâmetro de atividade biológica.....	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
5.1.	TEOR DE UMIDADE E RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS..	48
5.2.	ANÁLISE QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS.....	50
5.3.	AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS METANÓLICOS DAS PLANTAS.....	59
5.3.1.	Método de descoloração do β-caroteno em placas de cromatografia em camada delgada (CCD).....	59
5.3.2.	Método de seqüestro do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazila..	59
5.3.2.1.	Percentuais de inibição do radical DPPH e de sua concentração remanescente.....	60
5.3.2.2.	Concentração efetiva em 50% de capacidade (CE ₅₀)	64

5.4.	AVALIAÇÃO DA TOXIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS METANÓLICOS DAS PLANTAS FRENTE ÀS LARVAS DO MICROCRUSTÁCEO <i>ARTEMIA SALINA</i>	66
6.	CONCLUSÕES	70
	REFERÊNCIAS	71

1. INTRODUÇÃO

Inúmeras são as espécies vegetais conhecidas na Amazônia, que apresentam acentuado aroma, com usos em “sachets”, defumações, banhos aromáticos, vinculadas ou não a rituais religiosos, cujos estudos encontram-se incompletos ou desconhecidos. A distribuição, o registro e o uso destas plantas estão incluídos em bibliografia literária, com citações em ordem cronológica que vão da época colonial até as mais recentes, sendo raras vezes de aspecto técnico ou científico (MAIA e ZOGHBI, 1998).

O conhecimento da composição química dos óleos essenciais e aromas de espécies da flora odorífera amazônica se faz necessário a fim de avaliar o valor comercial de seus constituintes voláteis, ou do “bouquet” oferecido por estas misturas, às indústrias de perfumes, cosméticos, medicamentos e de alimentos. As plantas aromáticas frescas, secas e os seus extratos têm uma longa tradição de aplicação no campo alimentar, sendo responsáveis pelo “toque” de muitos pratos tradicionais. À parte o sabor e o aroma únicos que conferem, muitas plantas possuem propriedades antioxidantes, antissépticas ou antimicrobianas (LIEWEN, 1992). Estudos anteriores de plantas aromáticas relataram a presença de compostos fenólicos e outros nos óleos essenciais das folhas e ramos finos, em exemplares coletados no Estado do Pará (MORAIS et al., 1972; MAIA et al., 2000a, 2000b; MAIA, ZOGHBI e ANDRADE, 2001; ZOGHBI et al., 2002). Nada mais se conhece com participação efetiva na pauta de comércio e de exportação da região amazônica, em relação ao aproveitamento da flora odorífera, com exceção do óleo essencial de pau-rosa (*Aniba rosaeodora*, Lauraceae), dos óleos-resinas de copaíba (*Copaifera* ssp, Caesalpiniaceae) e de sementes de cumaru (*Dipteryx odorata*, Fabaceae). O inventário da flora odorífera da Amazônia, que vem sendo realizado desde 1980 pelo grupo de Plantas Aromáticas, propicia uma alternativa para o desenvolvimento sustentado da região, antes que muitas destas espécies existentes atinjam pressão ambiental indesejável e risco de extinção (MAIA e ZOGHBI, 1998).

Nos últimos anos, a preocupação constante de proporcionar aos consumidores produtos de alta qualidade levou à adoção de medidas que permitem limitar o fenômeno de oxidação durante as fases de processamento e armazenagem dos produtos (escolha de processos que limitem as operações de arejamento e o tratamento térmico; utilização de matérias-primas refinadas, com baixos teores de

água e isentas de pró-oxidantes; armazenamento a baixas temperaturas e em atmosfera inerte; adição de compostos antioxidantes; utilização de embalagens estanques e opacas à radiação ultravioleta, etc.). Deste conjunto de ações, a adição de compostos antioxidantes é, sem dúvida, uma prática corrente, razão que justifica o atual interesse pela pesquisa de novos compostos com capacidade antioxidante. O baixo custo de obtenção, facilidade de emprego, eficácia, termo-resistência, "neutralidade" organoléptica e ausência reconhecida de toxicidade são premissas para a sua seleção e utilização a nível industrial (CASTERA-ROSSIGNOL e BOSQUE, 1994).

Muitos antioxidantes sintéticos como o BHA, BHT, PG e TBHQ, apresentam efetividade na redução da oxidação lipídica em nível de 200 ppm. Antioxidantes naturais extraídos de plantas podem ser usados como alternativas aos antioxidantes sintéticos, devido a seu efeito equivalente ou maior na inibição da oxidação lipídica (NAMIKI, 1990). Madsen e Bertelsen (1995), indicam algumas especiarias, como alecrim, salvia e orégano, apresentando atividade antioxidante efetiva.

Segundo Shahidi, Janitha e Wanasundara (1992), o efeito antioxidante de plantas aromáticas é devido à presença de compostos fenólicos. A presença destes em plantas tem sido muito estudada por apresentarem atividade farmacológica, por inibirem a oxidação lipídica e a proliferação de fungos patogênicos (NAGEM, ALBUQUERQUE e MIRANDA, 1992; GAMACHE, RYAN e ACWORTH, 1993; IVANOVA et al., 1997; FERNANDEZ, SAENZ e GARCIA, 1998; HOLLMAN e KATAN, 1998). São também responsáveis pela cor, adstringência e aroma em vários alimentos (PELEG, BODINE e NOBLE, 1998).

2. OBJETIVOS

- Identificar os constituintes voláteis dos óleos essenciais de *C. scoparioides* e *H. crenata* por cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas;
- Avaliar a capacidade e eficácia antioxidante dos óleos essenciais e extratos metanólicos das plantas, utilizando os métodos de descoloração do β -caroteno em placas de cromatografia em camada delgada e de seqüestro do radical DPPH;
- Avaliar as propriedades toxicológicas dos óleos essenciais e extratos metanólicos das plantas frente às larvas do microcrustáceo *Artemia salina*.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. *CONOBEA SCOPARIOIDES*

Conobea scoparioides (Cham. & Schltdl.) Benth. (Figura 1), conhecida popularmente como pataqueira ou vassourinha-do-brejo é uma erva perene, de até 1,0 m de altura, muito aromática, com folhas sésseis, opostas, lanceoladas, serradas, com talo verde, quadrangular, com flores brancas, azuis ou róseas, pertence a família Scrophulariaceae, tendo sinonímia com *Sphaerotherca scoparioides* Cham. & Schltdl. Encontra-se distribuída no Norte do Brasil e ocorre em áreas semi-inundadas, terras baixas de rios e riachos, solo arenoso, espalhada em manchas. É utilizada para banhos aromáticos em mistura com outras plantas aromáticas da Amazônia e no tratamento de “beri-beri” (CAMINHOÁ, 1877; CRUZ, 1979; RODRIGUES, 1989). O extrato alcoólico de *C. scoparioides* e a substância curcubitacina E, de origem esteroideal, isolada desta planta, são descritos na literatura como inibidores da adesão de células (MUSZA et al., 1994). A composição química dos óleos essenciais de espécimens de *C. scoparioides* está mostrada na Tabela 1 (MAIA et al., 2000b).



Figura 1. *Conobea scoparioides*

Tabela 1. Composição química dos óleos essenciais de *C. scoparioides* (MAIA et al., 2000b).

Constituintes	A	B	C
α -tujeno	-	-	0,1
α -pineno	-	1,1	0,8
1-octen-3-ol	-	-	0,1
3-octanona	1,7	1,1	0,4
3-octanol	0,1	-	-
<i>n</i> -decano	-	0,7	-
α -felandreno	5,1	9,6	0,2
<i>p</i> -cimeno	0,9	7,3	26,7
limoneno	0,4	1,4	5,7
β -felandreno	-	-	1,8
(<i>Z</i>)- β -ocimeno	-	-	0,1
(<i>E</i>)- β -ocimeno	0,4	-	0,2
γ -terpineno	-	0,9	-
<i>p</i> -cimeneno	0,1	-	0,1
linalol	0,4	-	0,2
<i>n</i> -undecano	-	0,9	-
<i>p</i> -cimen-8-ol	0,2	-	0,6
<i>n</i> -dodecano	-	1,1	-
<i>p</i> -cimen-9-ol	0,7	-	1,2
timol, éter metílico	36,0	42,4	-
safrol	-	4,3	-
timol	52,0	17,9	57,5
<i>n</i> -tridecano	-	0,5	-
eugenol	0,7	-	0,2
timol, acetato	-	-	0,7
β -cariofileno	-	-	0,4
geranil acetona	-	-	0,1
viridifloreno	-	2,4	-
α -selineno	-	0,8	-
<i>n</i> -pentadecano	-	1,6	-
(<i>E,E</i>)- α -farneseno	-	2,4	-
(<i>E</i>)-nerolidol	0,1	-	0,2
cariofileno oxido	-	-	0,1

A, B e C: espécimens de *C. scoparioides* coletados nos estados do Amapá, Pará e Maranhão, respectivamente.

3.2. *HYPTIS CRENATA*

Hyptis crenata (Pohl) ex Benth. (Figura 2), é uma planta pertencente à família Lamiaceae e é conhecida vulgarmente como salva-do-marajó, salva, salsa-do-marajó, hortelã-do-campo, etc. É uma erva ereta com haste succulenta e pilosa, folhas oposto-decussadas, coriáceas, sésseis, elípticas, ovadas ou elíptico-oblongas com 2,0-4,0 cm de comprimento e 1,2-2,0 cm de largura, ápice agudo ou arredondado, base arredondada ou cordiforme, margem serrada, possui inflorescências axilares, capituliformes, multifloras com brácteas lanceoladas e acuminadas, tem flores com cálice tubuloso e apresenta núculas oblongo-ovóides com cerca de 1,0 cm de comprimento. Encontra-se distribuída em estuário do rio Amazonas, arquipélago do Marajó, estados do Pará e Amapá. O uso do chá das folhas serve como sudorífico, tônico, estimulante, para tratar inflamações dos olhos e garganta, constipação e artrite (BERG, 1993). Não há relatos sobre a investigação química dos metabólitos secundários de *H. crenata*. Zoghbi et al., (2002) estudaram a composição química dos óleos essenciais de espécimens desta planta, que está incluída na Tabela 2.



Figura 2. *Hyptis crenata*

Tabela 2. Composição química dos óleos essenciais de *H. crenata* (ZOGHBI et al., 2002).

Constituintes	A	B	C	D
α -pineno	6,1	3,5	51,1	14,5
canfeno	0,1	1,0	2,8	3,5
propanoato de pentila	0,1	-	-	-
sabineno	0,8	-	-	-
β -pineno	0,7	1,2	10,3	7,9
mirreno	1,5	0,9	0,4	2,0
decano	-	0,4	-	-
isobutil 3-metilbutanoato	0,2	-	-	-
α -felandreno	-	0,2	0,1	0,7
3-metilbutil butanoato	0,5	-	-	-
3-metilbutil 2-metilpropanoato	6,4	-	-	-
<i>p</i> -cimenolimoneno	-	-	15,0	-
α -terpineno	-	0,4	0,2	0,8
limoneno	-	1,0	-	-
1,8-cineol	-	23,9	16,5	36,7
(<i>Z</i>)- β -ocimeno	0,2	-	-	-
(<i>E</i>)- β -ocimeno	4,7	-	-	-
γ -terpineno	0,1	1,3	0,3	1,5
<i>cis</i> -sabineno hidratado	-	0,2	-	-
octanol	-	0,2	-	-
terpinoleno	37,8	0,7	0,2	1,5
linalol	-	1,0	-	1,0
isopentil 2-metilbutanoato	1,1	-	-	-
isopentil isovalerato	2,2	-	-	-
1,3,8- <i>p</i> -mentatrieno	0,3	-	-	-
<i>endo</i> -fenchol	-	-	-	0,9
<i>trans</i> -2-pinanol	-	-	-	0,4
<i>trans</i> -pinocarveol	-	-	-	0,2
cânfora	-	3,0	-	0,3
<i>cis</i> -verbenol	0,2	-	-	-
canfeno hidratado	-	0,6	0,1	0,7
pinocarvona	-	-	-	0,1
borneol	-	21,8	0,4	3,0
pinocanfeol	0,4	-	-	-
4-terpineol	-	1,2	0,1	1,1
naftaleno	-	-	-	0,1
<i>p</i> -cimen-8-ol	1,0	-	-	-
α -terpineol	-	2,9	1,0	5,2
butil hexanoato	0,3	-	-	-
mirtenol	-	0,2	-	0,2
dodecano	-	0,4	-	-
decanal	0,1	-	-	-
<i>cis</i> -3-hexenil 2-metilbutanoato	0,1	-	-	-
bornil acetato	-	0,4	-	0,1
safrol	0,1	-	-	-
tridecano	-	0,4	-	-
α -cubebeno	-	-	0,2	-
α -longipineno	-	0,7	-	2,0
α -ilangeno	-	0,5	-	0,4
α -copaeno	0,1	-	-	0,1
hexil hexanoato	0,2	-	-	-
β -elemeno	0,2	-	-	-
cipereno	-	-	-	0,3
tetradecano	-	0,1	-	-
α -gurjuneno	-	0,4	-	-

Tabela 2. Composição química dos óleos essenciais de *H. crenata* (ZOGHBI et al., 2002). Continuação.

Constituintes	A	B	C	D
β -cariofileno	9,9	18,8	0,5	3,0
β -gurjuneno	-	0,1	-	-
aromadendreno	0,2	4,5	0,1	0,6
α -himachaleno	-	0,3	0,2	1,6
α -humuleno	0,7	1,0	-	0,1
<i>allo</i> -aromadendreno	0,4	0,6	-	0,1
β -chamigreno	-	-	0,2	2,3
γ -muroleno	0,1	-	-	-
germacreno D	0,8	0,5	-	-
β -selineno	0,2	0,2	-	0,1
valenceno	-	1,4	-	-
α -selineno	-	-	-	0,3
biciclogermacreno	3,8	-	-	-
β -himachaleno	-	-	0,2	1,3
germacreno A	0,2	-	-	-
(<i>E,E</i>)- α -farneseno	0,7	-	-	-
β -dehidro- <i>ar</i> -himachaleno	-	-	-	0,4
γ -cadineno	0,6	0,2	-	-
δ -cadineno	1,2	0,2	-	0,1
γ -dehidro- <i>ar</i> -himachaleno	-	-	-	0,1
α -calacoreno	-	-	-	0,4
espatulenol	2,3	0,2	-	0,2
cariofileno oxido	4,1	1,3	-	0,6
humuleno epóxido II	0,5	-	-	-
β -himachaleno óxido	-	-	-	0,4
1- <i>epi</i> -cubenol	0,6	-	-	0,5
<i>epi</i> - α -murolol	1,2	-	-	-
α -murolol	0,2	-	-	-
himachalol	-	-	-	1,3
α -cadinol	0,7	-	-	-
14-hidroxi-9- <i>epi</i> - β -cariofileno	0,1	-	-	-

A e B: espécimens de *H. crenata* coletados nas municipalidades de Porto Nacional e de São Sebastião da Boa Vista, estado do Tocantins em janeiro de 1998 e outubro de 1991 e **C e D:** coletados em Melgaço, estado do Pará em março de 1999 e fevereiro de 1997, respectivamente.

3.3. EXTRATOS

Os extratos são produtos obtidos por percolação a frio ou a quente de produtos de origem animal ou vegetal, pelo uso de solventes orgânicos que, posteriormente são eliminados por destilação. Os extratos contêm os princípios ativos, voláteis e fixos, correspondentes ao produto natural (BRASIL, 1999).

3.4. ÓLEOS ESSENCIAIS

O termo óleo essencial é designado de líquidos oleosos voláteis de origem vegetal, dotado de forte aroma, em sua maioria agradável, obtido através de processo físico de destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outros métodos adequados, sendo a hidrodestilação o método mais utilizado. Os óleos essenciais podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si. São substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas capazes de conferir ou intensificar o aroma ou sabor dos alimentos (MAIA, 1982; BRASIL, 1999).

Do ponto de vista químico um óleo essencial é uma mistura heterogênea e complexa, com cerca de 50 a 300 componentes voláteis distribuídos principalmente entre terpenóides (mono e sesquiterpenos), lignóides (alil e propenil derivados), hidrocarbonetos, fenóis, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, álcoois e ácidos. Podem estar presentes em diferentes órgãos da planta, difundidos pelas partes aéreas, nas folhas, nos talos, nas flores, nas raízes, nas cascas, no caule, no lenho, nas sementes e nos tubérculos. Devido o seu aroma e suas características condimentares, os óleos essenciais têm sido aplicados em indústria de alimentos, em compostos farmacêuticos, em perfumes e em cosméticos. Os óleos essenciais têm se tornado mais populares, em composições de diversos sabores, cujo uso é de mais fácil manejo, se comparado ao próprio material da planta (MAIA, 1982).

3.5. DESTILAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

A destilação é um processo de separação de misturas líquidas, baseado na diferença de composições dos constituintes nas fases, líquida e de vapor, em equilíbrio, devido à diferença de volatilidade entre os componentes do líquido. A volatilidade com vapor d'água e a sua existência em estruturas anatômicas bem definidas são as principais características dos óleos essenciais, quando comparado com o odor (MAIA, 1982).

Existem diferentes tipos de destilação que ocorrem de acordo com o grau de contato da matriz e a fonte de calor: destilações a vapor seco e úmido, hidrodifusão e hidrodestilação, sendo esta última a mais utilizada (MILCHARD, 1992).

A obtenção de óleos essenciais por hidrodestilação pode ser efetuada por dois métodos. Na destilação, usando aparelhos de vidro do tipo Clevenger, o material vegetal é imerso em água dentro de um balão, sob aquecimento até ebulição provocando a formação de vapor que arrasta os compostos mais voláteis. Esta técnica é chamada de hidrodestilação. Após condensação, estes compostos separam-se da água por decantação. Na destilação por arraste a vapor d'água, este atravessa a matriz arrastando os componentes voláteis, sendo a separação semelhante à da hidrodestilação. Na destilação o material está sujeito a temperaturas acima de 100°C, o que poderá levar à transformação química dos constituintes termolábeis do óleo, provocando indesejáveis alterações na composição da mistura. Quando o aquecimento é prolongado, o contato com a água poderá conduzir à hidrólise de ésteres, polimerização de aldeídos ou modificação estrutural de outros compostos (MILCHARD, 1992).

3.6. CROMATOGRAFIA GASOSA

O cromatógrafo de gás é um instrumento analítico que fornece um método simples, rápido, sensível e acurado para separação, identificação e determinação de compostos voláteis. Um gás de arraste, inerte, de alta pureza, é enviado via um controlador de fluxo ao injetor. A amostra seja sólida, líquida ou em solução, é vaporizada no injetor aquecido e empurrada para a coluna sem qualquer modificação no fluxo do gás de arraste. O processo de separação ocorre sob condições controladas da temperatura, freqüentemente isotérmica ou em programa

linear de temperatura onde o efluente da coluna alcança um detector termostatzado. O sinal enviado pelo detector é convertido a uma voltagem analógica através de um amplificador e é registrado como uma função do tempo por um registrador potenciométrico (MAIA, 1982).

3.7. RADICAIS LIVRES

O termo radical livre refere-se a átomo e molécula, que contêm número ímpar de elétrons em sua última camada eletrônica (elétrons não-emparelhados) (HALLIWELL, 1994). Essa configuração faz desses radicais moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (POMPELLA, 1997). Entre as principais formas reativas de oxigênio: $^1\text{O}_2$ (oxigênio singlete), $\text{O}_2^{\bullet-}$ (radical superóxido), $\text{OH}^{\bullet}$ (radical hidroxila), NO (óxido nítrico), ONOO^- (peroxinitrito) e $\text{Q}^{\bullet}$ (radical semiquinona), o $\text{O}_2^{\bullet-}$ apresenta uma baixa capacidade de oxidação, o $\text{OH}^{\bullet}$ mostra uma pequena capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. O H_2O_2 (peróxido de oxigênio) não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas. Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular: proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU e ANDERSON, 1997).

3.8. AGENTES ANTIOXIDANTES

Antioxidantes são compostos que, presentes em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, podem retardar ou inibir significativamente a oxidação de lipídeos ou outras moléculas de maneira eficaz, evitando o início ou propagação das reações em cadeia (SIES e STAHL, 1995). Eles são indispensáveis para a proteção de certos óleos essenciais, especialmente os que contêm terpenos, assim como de outras substâncias aromáticas (BRASIL, 1999).

A utilização de constituintes antioxidantes disponíveis na dieta ou mesmo os sintéticos, é um dos mecanismos de defesa contra os radicais livres que podem ser empregados nas indústrias de alimentos, cosméticos, bebidas e na medicina, sendo que muitas vezes os próprios medicamentos aumentam a geração intracelular desses radicais (DOROSHOW, 1983; HALLIWELL et al., 1995; WEIJL, CLETON e OSANTO, 1997).

Segundo Nawar (1996), existe uma grande quantidade de compostos, tanto naturais quanto sintéticos, com propriedades antioxidantes, que para seu uso em alimentos devem cumprir certos requerimentos, sendo um deles a segurança para a saúde. Estes antioxidantes são comumente utilizados em vários alimentos, especialmente nos que contêm óleos e gorduras. Os tocoferóis naturais, o α -tocoferol sintético e outros antioxidantes fenólicos (BHA, BHT, PG, TBHQ), são antioxidantes efetivos na iniciação da oxidação (PAPAS, 1993).

Os estudos sobre os antioxidantes têm ressaltado, principalmente, o uso de nutrientes isolados no tratamento e prevenção de doenças. Entretanto, nos alimentos são encontrados uma grande variedade de substâncias que podem atuar em sinergismo na proteção das células e tecidos (JACOB, 1995; NIKI et al., 1995).

O efeito cooperativo entre as vitaminas C e E é freqüentemente mencionado na literatura, mostrando que a interação dessas vitaminas é efetiva na inibição da peroxidação dos lipídeos da membrana e na proteção do DNA (GEY, 1998).

3.8.1. Mecanismos de defesa antioxidantes

A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos. Esses agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase, catalase, NADPH-quinona oxidoreductase, glutathione peroxidase e enzimas de reparo) ou não-enzimáticos (α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ácido ascórbico (vitamina C), flavonóides, proteínas do plasma, selênio, glutathione, clorofilina, L-cisteína e curcumina) (SIES, 1993).

O sistema de defesa antioxidante do organismo compreende uma variedade de substâncias que atuam em diferentes níveis: o sistema primário constitui-se em

uma primeira linha de defesa formada por substâncias que impedem a geração de espécies reativas ou através da retirada destas de maneira a impedir sua interação com alvos celulares, bloqueando a etapa de iniciação da cadeia radicalar. Nesse grupo encontram-se: enzimas antioxidantes; quelantes e proteínas como a transferrina e a ceruloplasmina que transportam, respectivamente, ferro e cobre, impedindo que esses metais sejam liberados e catalizem a formação de espécies oxidantes; substâncias não-enzimáticas como o ascorbato, albumina e carotenóides que seqüestram radicais superóxido e hidroxila, ou suprimem oxigênio singlete. O sistema de defesa secundário é formado por compostos que bloqueiam a etapa de propagação da cadeia radicalar, seqüestrando radicais intermediários como: peroxil ou alcoxil. Esses antioxidantes geralmente são compostos fenólicos ou aminas aromáticas, entre eles estão o α -tocoferol, flavonóides e vários antioxidantes sintéticos (ABDALA, 1993). Os produtos mais freqüentemente medidos são, hidroperóxidos e dienos conjugados, para a oxidação primária, e substâncias voláteis para a secundária (MOURE et al., 2001).

A importância concernente ao desempenho dos antioxidantes *in vivo* depende dos fatores: tipos de radicais livres formados; onde e como são gerados esses radicais; análise e métodos para a identificação dos danos, e doses ideais para obter proteção. Assim, é perfeitamente possível que um antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas que falhe na proteção, ou mesmo que aumente as lesões induzidas em outros sistemas, ou tecidos (HALLIWELL et al., 1995).

3.8.2. Antioxidantes sintéticos

A aplicação de antioxidantes sintéticos como inibidores da oxidação lipídica é bem conhecida nas indústrias de óleos e de derivados lipídicos. Os principais antioxidantes sintéticos utilizados habitualmente nos alimentos são os fenóis com várias substituições no anel: Butil-hidroxianisol (BHA), Butil-hidroxitolueno (BHT), Ter-butilidroquinona (TBHQ), Ácido nordidroguaierético (NDGA) e Galato de propila (PG), são bastante efetivos. A eficiência de um composto antioxidante se relaciona com vários fatores, como suas energia de ativação, constantes de velocidade e solubilidade e o seu potencial de óxido-redução. Esses compostos têm a capacidade de doar elétrons ou átomos de hidrogênio e, além disso, seus radicais intermediários são relativamente estáveis devido à deslocação por ressonância e à falta de

posições moleculares apropriadas para serem atacados pelo oxigênio molecular. Dois tipos de sinergismo são conhecidos: um que implica a ação de aceptores de radicais livres misturados e um outro que combina a ação de um aceptor de radical livre e um quelante de metais. Esse fenômeno de sinergismo se produz, quando uma mistura de compostos antioxidantes tem uma atividade mais elevada do que a atividade dos antioxidantes separadamente (NAWAR, 1996).

Estudos revelam que os antioxidantes BHA e BHT poderiam apresentar certa toxicidade e eficiência mais baixa que alguns antioxidantes naturais, junto com uma maior consciência dos consumidores com atenção na segurança dos aditivos nos alimentos, surge um grande interesse no estudo dos aditivos naturais com capacidade antioxidante (WANASUNDARA e SHAHIDI, 1998).

3.8.3. Antioxidantes naturais

Estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo. Os antioxidantes presentes nos vegetais neutralizam a ação dos radicais livres e o consumo destes pode fortalecer o sistema imunológico, reduzindo o risco de uma série de doenças como câncer, aterosclerose, diabetes, artrite, malária, AIDS, doenças do coração, as quais podem estar ligadas aos danos causados por formas de oxigênio extremamente reativas denominadas de “substâncias reativas oxigenadas”, que também estão ligadas com processos responsáveis pelo envelhecimento do corpo (SIES, 1993; MORRISSEY, SHEEHY e GAYNOR 1994; BRENNA e PAGLIARINI, 2001). Os antioxidantes naturais têm sido isolados de diferentes partes de plantas tais como sementes, frutas, folhas e raízes. Bem como, muitos trabalhos têm sido realizados na determinação da sua capacidade antioxidante (CHEVOLLEAU et al., 1992; NAKATANI, 1992; MANCINI-FILHO, et al., 1998; MIRANDA, SATO e MANCINI-FILHO, 2001).

Nos alimentos, os antioxidantes naturais podem se originar de um ou mais compostos do próprio alimento por via endógena, de substâncias formadas de reações durante o processamento ou como aditivos isolados de fontes naturais (PRATT, 1992).

A vitamina E, que é um componente dos óleos vegetais encontrada na natureza em quatro formas diferentes α , β , δ e δ -tocoferol, sendo o α -tocoferol a forma antioxidante amplamente distribuída nos tecidos e no plasma, tem a capacidade de impedir a propagação das reações em cadeia induzidas pelos radicais livres nas membranas biológicas. Os danos oxidativos podem ser inibidos pela ação antioxidante dessa vitamina, juntamente com a glutatona, a vitamina C e os carotenóides, constituindo um dos principais mecanismos da defesa endógena do organismo (RILEY, 1994). Por outro lado, extratos crus de frutas, ervas, vegetais, cereais e outros materiais ricos em fenólicos são de interesse na indústria de alimentos, pois estes retardam a degradação oxidativa de lipídeos, melhorando deste modo a qualidade e o valor nutricional dos alimentos. Por conseguinte, existe um interesse crescente no isolamento, identificação e na utilização dos antioxidantes naturais, os quais podem agir como seqüestradores de radicais livres, interrompendo a reação em cadeia provocada por estes, além de funcionar como agentes redutores, quelantes ou sequestrantes do oxigênio singlete e como desativadores de metais pró-oxidantes (PRATT, 1992; RICE-EVANS et al., 1995; KÄHKÖNEN et al., 1999).

Os compostos fenólicos mais estudados são: o ácido caféico, o ácido gálico e o ácido elágico. Esses compostos de considerável importância na dieta podem inibir o processo de peroxidação lipídica em certos sistemas, mas isso não significa que eles possam proteger as células e os tecidos de todos os tipos de danos oxidativos. Esses compostos podem apresentar atividade pró-oxidante em determinadas condições (HARTMAN e SHANKEL, 1990; HALLIWELL et al., 1995; DECKER, 1997).

Muitos autores relataram que os extratos de várias sementes oleaginosas possuem propriedade antioxidante, a qual, em alguns casos exercem melhor efeito antioxidante que o observado pelos antioxidantes sintéticos nas mesmas concentrações (AMAROWICZ et al., 1993; OOMAH, KENASCHU e MAZZA, 1995). Para Wanasundara, Shahidi e Shukla (1997), muitos são os componentes naturalmente presentes nos alimentos que apresentam atividade antioxidante, incluem flavonóides, precursores de lignanos, ácidos fenólicos, terpenos, tocoferóis, fosfolípidos, etc.

3.9. OXIDAÇÃO LIPÍDICA

As propriedades antioxidantes de muitas ervas e condimentos naturais foram descritas como sendo efetivas na redução do processo de peroxidação de lipídeos, em óleos e alimentos gordurosos, e têm sido o alvo de muitas pesquisas. A oxidação lipídica é uma das principais reações deteriorativas que ocorrem durante o processamento, distribuição, armazenamento e preparo final dos alimentos. É responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis nos alimentos, tornando-os impróprios para o consumo. Além disso, provoca outras alterações que irão afetar a qualidade nutricional, a integridade e a segurança dos alimentos, através da formação de compostos potencialmente tóxicos (FRANKEL, 1980; NAWAR, 1985; ARUOMA, 1993; KUBOW, 1993). A oxidação lipídica é um fenômeno espontâneo e inevitável, com uma implicação direta no valor comercial quer dos corpos graxos, quer de todos os produtos que a partir deles são formulados: alimentos, cosméticos, medicamentos (SILVA, BORGES e FERREIRA, 1999).

Os lipídeos desempenham um importante papel no que diz respeito à qualidade de certos produtos alimentares, particularmente em relação às propriedades organolépticas que os tornam desejáveis (sabor, cheiro, cor, textura). Ao mesmo tempo, conferem valor nutritivo aos alimentos, constituindo uma fonte de energia metabólica, de ácidos graxos essenciais (ácidos linoléico, linolênico e araquidônico) e de vitaminas lipossolúveis (A, D, E e K) (FRANKEL, 1996a; ST. ANGELO, 1996).

3.10. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE DE SEQÜESTRO DE RADICAIS LIVRES DPPH “GERADOS” *IN VITRO*

Há trabalhos que propõem um tipo de teste que não recorre à oxidação de substratos lipídicos, mas à redução de radicais livres estáveis gerados *in vitro*, como resultado da atividade de seqüestro de compostos antioxidantes. Seqüestradores são compostos que impedem a ação catalítica de certos íons metálicos, protegendo assim o aromatizante do processo de oxidação (BRASIL, 1999). A atividade antioxidante pode ser avaliada *in vitro* com êxito pelo teste do DPPH, um radical livre estável à temperatura ambiente, com coloração violeta característica em solução alcoólica. O método de Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) tem por base a redução do radical 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH•) (Figura 3), que apresenta um máximo de absorção em 517 nm. Ao fixar um H•, abstraído do antioxidante em estudo, haverá diminuição do valor da absorbância, permitindo calcular a quantidade de antioxidante gasto para reduzir 50% do DPPH•, após o estabelecimento do equilíbrio da reação. Trata-se de um teste rápido, que não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação. A atividade antioxidante varia de acordo com o tipo de composto e sua concentração (MAILLARD, BERSET, 1995).

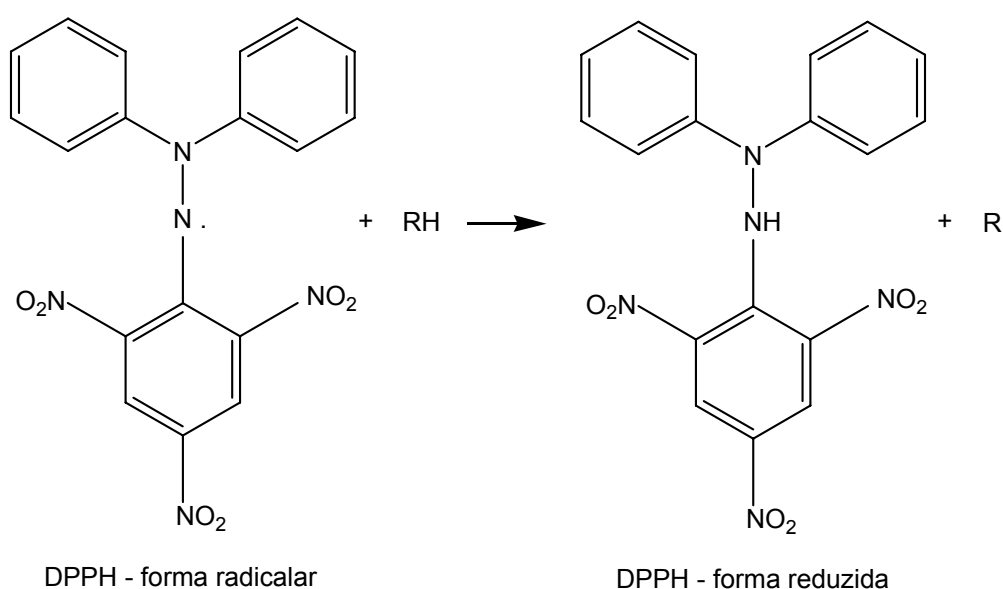


Figura 3. Esquema do seqüestro do radical DPPH por um antioxidante (YAMAGUCHI et al., 1998).

3.11. ESPECIARIAS E PLANTAS AROMÁTICAS COM CAPACIDADE ANTIOXIDANTE

Por definição, condimentos e especiarias são produtos aromáticos de origem vegetal empregados principalmente para conferir sabor aos alimentos. Segundo Shelef (1983), além dessa utilidade, os condimentos possuem também propriedades antimicrobianas, antioxidantes e medicinais. Em vários estudos, tem sido evidenciado que os princípios ativos dos condimentos localizam-se na fração de óleo essencial (PARRY, 1962; FARAG, DAW e ABO-RAYA, 1989; KOKETSU e GONÇALVES, 1991; MAHMOUD, 1994; FURLAN, 1998).

Desde antigamente, especiarias e ervas têm sido usadas não somente para melhorar o sabor e odor em alimentos e estender o tempo de prateleira, mas também pelas suas propriedades antisépticas e medicinais. O efeito de preservação das especiarias e ervas sugere a presença de constituintes antioxidantes e antimicrobianos (NAKATANI, 1997), sendo que, segundo Shahidi, Janitha e Wanasundara (1992) e Madsen e Bertelsen (1995), a atividade antioxidante das especiarias e plantas aromáticas é devido, principalmente, aos compostos fenólicos.

As propriedades antioxidantes de plantas aromáticas, ervas e especiarias são indicadas como efetivas para retardar o processo de peroxidação lipídica em óleos e alimentos gordurosos e têm conquistado o interesse de muitos grupos de pesquisa (BRRACO, LOLIGER e VIRET, 1981; KRAMER, 1985; LAGOURI et al., 1993; MILOS et al., 2000). Tsimidou e Boskou (1994) concluíram que entre as ervas e condimentos extensivamente estudados, as plantas pertencentes à família Lamiaceae possuem significativa atividade antioxidante. Os autores Lagouri e Boskou (1996) e Milos et al., (2000) trabalharam com a especiaria orégano (*Origanum vulgare* L.) para detectar a presença de antioxidantes e a sua atividade. Já, com o alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), Frankel et al., (1996b) estudaram a sua propriedade antioxidante e Offord et al. (1997) determinaram a atividade antioxidante em sistemas lipídicos e não lipídicos. Lagouri et al. (1993) estudaram a atividade antioxidante de muitos óleos essenciais e descobriram que o óleo essencial do orégano, rico em timol e carvacrol, tem importante efeito antioxidante no processo de oxidação do toucinho. Em estudos mais recentes, Yanishlieva e Marinova (1995) e Yanishlieva et al. (1999) examinaram a atividade antioxidante de extratos hexânicos do orégano que cresce na Bulgária, bem como os mecanismos de ação do timol e

carvacrol puros. Milos et al. (2000) fracionaram o óleo essencial de orégano, de acordo com a sua acidez e polaridade, no sentido de correlacionar a atividade antioxidante deste óleo com a presença de timol e carvacrol. Somente a fração contendo estes dois compostos fenólicos apresentou atividade antioxidante. Por outro lado, com respeito aos compostos não voláteis, foi observado que os ácidos carnósico e rosmarínico, sendo este último derivado do ácido caféico e muito mais potente que o BHA e o BHT são os responsáveis pela ação antioxidante dos extratos etanólicos de alecrim e orégano (BANIAS, OREOPOULOU e THOMOPOULOS, 1992; CHEVOLLEAU et al., 1992; PRATT 1992). Os ácidos fenólicos carboxílicos são muito comuns na família Lamiaceae, apresentando o orégano os ácidos protocatequínico e caféico (NAKATANI, 1997). As folhas secas do orégano foram sucessivamente extraídas com diclorometano e metanol e seus compostos antioxidantes foram isolados, sendo o principal composto identificado como um glicosídeo fenólico (KIKUZAKI e NAKATANI, 1989). Estudos dos extratos de orégano e alecrim, *in vivo* e *in vitro*, revelaram efetividade na proteção contra a oxidação (CINTRA e MANCINI FILHO, 2001). Na determinação do período de indução em banha de porco, após adição de extratos de orégano, alecrim e outras especiarias, Economou, Oreopoulou e Thomopoulos (1991) indicaram que o alecrim apresentou o melhor resultado, seguido pelo orégano. Frankel et al. (1996b) determinaram a atividade antioxidante do extrato do alecrim e dos seus compostos ativos, na inibição da formação e decomposição de hidroperóxidos em sistemas oleosos (óleo de milho) e emulsões óleo-água, encontrando resultados significativos para o alecrim e os ácidos carnósico e rosmarínico. Já no óleo emulsificado, os resultados foram satisfatórios para o carnosol e o ácido carnósico.

Apesar da intensa investigação da atividade antioxidante de ervas e condimentos de origem européia ou oriental, pouco se conhece sobre esta atividade nos óleos essenciais e plantas aromáticas da Amazônia. Stashenko, Jaramillo e Martinez (2004) estudaram a atividade antioxidante *in vitro* do óleo essencial de *Lippia alba*, que cresce na Colômbia, a nossa “erva-cidreira” usada no Norte do Brasil como calmante e para males digestivos. Sacchetti et al. (2004) identificaram no óleo essencial de *Ocimum micranthum*, a “alfavaca-do-campo”, que ocorre na Amazônia, uma eficácia antioxidante comparável àquela dos óleos de *Ocimum basilicum* e *Thimus vulgaris*, dois tradicionais condimentos de origem européia.

3.12. ATIVIDADE BIOLÓGICA FRENTE A *ARTEMIA SALINA* LEACH

Nos últimos anos tem-se verificado um grande avanço científico envolvendo os estudos químicos e farmacológicos de plantas medicinais que visam obter novos compostos com propriedades terapêuticas e embora as drogas sintéticas constituam maioria nas farmácias caseiras, os medicamentos à base de plantas, os fitoterápicos, vêm ganhando um espaço cada vez maior no combate e tratamento de diversas enfermidades, entre elas destacam-se as doenças tropicais como: a esquistossomose e dengue. Uma forma de agilizar o isolamento e obtenção de tais compostos é pela introdução de ensaios biológicos nas pesquisas fitoquímicas (FILHO e YUNES, 1998).

A avaliação da bioatividade de compostos orgânicos, sejam eles provenientes de plantas ou de síntese, tem sido pouco viável em muitos laboratórios devido não estarem equipados para a realização de bioensaios de rotina utilizando animais de sangue quente ou tecidos e órgãos isolados. As normas éticas internacionais recomendam o uso criterioso destes animais. O desenvolvimento de métodos alternativos e a necessidade de realizar ensaios com procedimentos simples e rápidos levaram à busca de novos testes (CAVALCANTE et al., 2000).

Um dos animais que tem sido utilizado nestes bioensaios é uma espécie de crustáceo, *Artemia salina* Leach da classe Anostracea, que vive em águas salinas e salobras de todo o mundo. A letalidade de organismos simples tem sido utilizada para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica, onde existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida (MEYER et al., 1982). O custo da implantação e manutenção da cultura de *Artemia salina* é muito baixo, o que faz desta, um excelente modelo experimental utilizado nas mais diversas áreas da biologia. O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica (COLEGATE e MOLYNEUX, 1993). Os resultados são determinados através da Concentração Letal de 50% (CL₅₀) para os microcrustáceo como parâmetro de avaliação da atividade biológica, além de serem facilmente tratados estatisticamente. É crescente a utilização de produtos naturais pela população como alternativa no tratamento de diversas enfermidades. O estudo das possíveis propriedades farmacológicas e seus efeitos tóxicos correspondentes é imprescindível. Inúmeros artigos têm sido reportados na literatura em estudos

ambientais (PRICE, WAGGY e CONWAY 1974; SORGELOOS, REMICHE-VAN DER WIELEN e PERSOONE, 1978), utilizando produtos e toxinas naturais além de extratos de plantas (HARWIG, HARWIG e SCOTT, 1971; MEYER, 1982). Os metabólitos secundários de plantas têm sido usados como fatores de interação com outros organismos, onde muito deles são de interesse biológico ou possuem atividades terapêuticas úteis ao homem (WINK, 1990).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. INSTRUMENTOS E ACESSÓRIOS

- Aquário com capacidade para 2 L
- Balança analítica Chyo, modelo JL-200
- Balões de fundo redondo de 250, 500, 1000 e 5000 mL
- Banho criostático de circulação Haake
- Bomba de oxigênio
- Centrífuga Fanem, modelo 206
- Condensadores
- Cromatógrafo gasoso HP 5890 série II, com ionização de chama
- Cubetas plásticas de 1cm de caminho óptico
- Espectrofotômetro Ultrospec 2000, UV/Visível – Pharmacia Biothec (EUA)
- Evaporador rotativo Heidorph 400
- Medidor de pH, marca DIGIMED
- Micropipetas Gilson, eppendorf e Digipet
- Tubos de ensaio

4.2. SOLVENTES, REAGENTES, SAIS E OUTROS

- Água destilada
- $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ P. A. (74% - 78% de pureza); VETEC
- DPPH 85% de pureza, para HPLC, FLUKA
- KCl P. A. (99% de pureza); VETEC
- $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ P. A. (99% - 102% de pureza); VETEC
- NaCl P. A. (99% de pureza); VETEC
- Na_2CO_3 P. A. (99,5% de pureza); VETEC
- Na_2SO_4 P. A. (99% de pureza); VETEC
- Ovos de *Artemia salina*, adquiridos da empresa pesqueira MARAMAR
- Solventes P. A. e grau HPLC-CARLO ERBA
- Solução 0,02% de β -caroteno, em diclorometano
- Sílica-gel 60 GF para cromatografia em camada delgada
- Trolox 98% de pureza, FLUKA

4.3. MATÉRIA-PRIMA

As plantas selecionadas para estudo são de porte herbáceo, identificadas como *Conobea scoparioides* (Cham. & Schltdl.) Benth. (Scrophulariaceae) e *Hyptis crenata* Pohl (Lamiaceae). Três amostras de *C. scoparioides* foram coletadas: Cs-1 na localidade de Santa Quitéria, no Município de Santa Isabel/PA (março de 2005), e Cs-2 e Cs-3 na área da Embrapa, Município de Belém/PA (julho e agosto de 2005, respectivamente). Três amostras de *H. crenata* foram coletadas (todas em março de 2005): Hc-1 na localidade Deus-me-ajude, Hc-2 na localidade Rio Câmara e Hc-3 na localidade São Pedro, Município de Salvaterra/PA. As amostras foram codificadas com as letras iniciais de seus nomes científicos e pela ordem de coleta. As plantas foram selecionadas em função de seus usos etnobotânicos e pela presença de compostos fenólicos em seus óleos essenciais.

4.4. MÉTODOS

4.4.1. Coleta e identificação

O material coletado foi acondicionado em sacos plásticos perfurados (aeração permanente), tendo-se o cuidado de não amontoá-los e, em seguida, transportados imediatamente para o Laboratório de Engenharia de Produtos Naturais (LEPRON), onde foi processado para a obtenção de seus óleos essenciais e a preparação de extratos metanólicos. Os exemplares foram encaminhados para a Coordenação de Botânica do Museu Paraense Emílio Goeldi (MPEG) para a preparação das exsicatas, registro e incorporação no herbário. A identificação botânica das espécies foi feita pela Dra. Lea Carreira, recebendo *C. scoparioides* o número MG174901 e *H. crenata* o número MG174699.

4.4.2. Obtenção dos óleos essenciais, armazenamento e teor de umidade

Os óleos essenciais das plantas frescas e secas foram obtidos por hidrodestilação (MAIA, ZOGHBI e ANDRADE, 2001). Para a planta fresca o material foi reduzido a pequenos pedaços com o auxílio de uma tesoura em aço inoxidável. Para o preparo das plantas secas, o material foi colocado e espalhado em bandejas inoxidáveis para secagem em temperatura ambiente a 30°C, na sombra, em local seco e arejado, durante 5-7 dias. Em seguida foi pulverizado com o auxílio de um triturador mecânico. Após o processo de redução, o material foi pesado (100 g) e submetido à hidrodestilação, usando-se aparelho de vidro tipo Clevenger, durante 3h. Neste processo, o material foi colocado em um balão de fundo redondo, imerso em água destilada (dependendo da sua densidade, parte da planta pode sobrenadar no líquido). A água foi posta em ebulição por aquecimento direto do balão em mantas aquecedoras, permitindo o arraste dos componentes voláteis pelo vapor d'água. A mistura de vapor foi conduzida para um condensador refrigerado (por meio de um banho termostático) para condensação dos líquidos e recolhimento das fases no Clevenger. O óleo essencial com sua característica lipofílica (mistura de substâncias orgânicas de baixa polaridade) separa-se da água com a formação de um sistema bifásico. A operação seguinte foi à retirada do óleo essencial pelo processo de decantação, com uso de centrífugas. O óleo foi removido para frascos de vidro (cor âmbar) com pipetas Pasteur e armazenados em refrigerador à temperatura média de 5°C. As amostras de óleos essenciais das plantas frescas e secas receberam os seguintes códigos: OCs-1f, OCs-1s, OCs-2s, OCs-3f, OCs-3s, OHc-1f, OHc-1s, OHc-2s e OHc-3s.

O teor de umidade das plantas foi determinado em separador de vidro tipo Dean & Stark (SANTOS et al., 1998). Pesou-se 5 g do material em um balão de fundo redondo e adicionou-se cerca de 20 mL de tolueno. Aquecido o balão em manta aquecedora o tolueno em ebulição arrastou consigo a água existente nas plantas. O processo de condensação foi o mesmo já descrito acima, com separação das fases e medição do teor de água. O tolueno em contato com a água existente na planta forma uma mistura de vapores azeotrópicos, que depois se separam após condensação. A água presente na planta, por ser mais densa que o tolueno, permanece na camada inferior do separador graduado, quando foi medido o seu

volume. Desta forma, o cálculo do rendimento em óleo essencial foi obtido em base livre de umidade (blu).

4.4.3. Obtenção dos extratos metanólicos

Uma porção de 60 g de material seco e moído de cada planta foi submetida à extração com metanol em extrator do tipo Soxhlet, durante 3h. Em seguida a solução obtida foi concentrada em evaporador rotativo a vácuo e depois mantida em capela até a evaporação total do solvente. Os rendimentos dos extratos de *C. scoparioides* (ECs-1, ECs-3) e *H. crenata* (EHc-1, EHc-2, EHc-3), foram em média 30% e 10%, respectivamente. Posteriormente, os extratos foram armazenados em frascos de vidros âmbar e mantidos em dessecador.

4.4.4. Análise química dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram analisados por cromatografia gás-líquido (CGL) e cromatografia de gás acoplado à espectrometria de massas (CG-EM). Foram usados um cromatógrafo de gás HP 5980, com ionização de chamas, e um cromatógrafo de gás acoplado à espectrometria de massas Finigan Incos XL, equipados com coluna capilar de sílica do tipo DB-5 (30m x 0,25mm d.i., espessura do filme 0,25µm), gás de arraste hidrogênio e hélio, respectivamente; temperatura do injetor a 220°C; tipo de injeção, splitless, 2 µL de uma solução de 1 mg da amostra para 1 mL de *n*-hexano (1:1000); temperatura programada para 60-240°C, com gradiente de 3°C/min. A identificação dos compostos voláteis foi baseada nos índices de retenção linear (Índice de Kovats), calculados em relação aos tempos de retenção de uma série homóloga de *n*-alcanos e na comparação computadorizada com espectros de massas das bibliotecas de referência do sistema de dados, contendo espectros de substâncias autênticas comumente identificadas em óleos essenciais e aromas (MORAIS et al., 1972; MAIA et al., 2000a, 2000b; ADAMS, 2001; MAIA, ZOGHBI e ANDRADE 2001; ZOGHBI et al., 2002).

4.5. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS METANÓLICOS DAS PLANTAS

4.5.1. Método de descoloração do β -caroteno em placas de cromatografia em camada delgada (CCD)

O teste preliminar para avaliação qualitativa da atividade antioxidante foi realizado de acordo com experimentos de descoloração do β -caroteno em CCD, segundo Pratt e Miller (1984). Sílica para CCD foi homogeneizada em água destilada e a solução espalhada sob um suporte fixo (lâminas de vidro) para o preparo das placas cromatográficas, as quais foram posteriormente ativadas em estufa. Após esta etapa foram feitas aplicações das amostras (óleos essenciais e extratos metanólicos diluídos em MeOH) sobre as placas, com o uso de capilar. Em seguida foram feitas as corridas cromatográficas das placas em cubas de vidro apropriadas contendo variados sistemas de solventes, para a separação dos constituintes químicos. Para as amostras de óleos essenciais e extratos metanólicos, os sistemas de eluição foram hexano+acetona, 97:3 e 92:8, respectivamente. Após evaporar o solvente, as placas foram espargidas com solução 0,02% de β -caroteno, em diclorometano. As placas foram postas a luz natural até descoloração das manchas presentes nas amostras. Manchas amarelas remanescentes são forte indicativo da presença de compostos com capacidade antioxidante (BARATA et al., 1995; BERSET e CUVELIER, 1996).

4.5.2. Método de seqüestro do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazila

A avaliação da capacidade e eficácia antioxidante das amostras de óleos essenciais e extratos metanólicos das plantas foi realizada pelo método de seqüestro do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazila (DPPH), segundo Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995) e Hu et al. (2004).

4.5.2.1. Preparo da amostras

Volumes de 10 μL dos óleos essenciais das plantas frescas e secas foram pipetados e pesados, correspondentes à quantidade média de 9,25 mg de massa para cada óleo. Posteriormente, estes volumes foram solubilizados em metanol, perfazendo concentrações de 7,5, 3,7 e 1,9 mg/mL para o óleo de *C. scoparioides* e 616,7, 231,3 e 123,3 mg/mL para o óleo de *H. crenata*. Os extratos, nas quantidades de 20 mg, foram solubilizados em 5 mL de metanol e, em seguida, com sucessivas diluições, obteve-se as concentrações de 4,0, 2,3 e 1,6 mg/mL para *C. scoparioides* e 1,6, 0,8, 0,4 e 0,3 mg/mL para *H. crenata*.

4.5.2.2. Preparo da solução estoque de DPPH

A solução estoque de DPPH (60 μM em metanol) foi preparada diariamente, antes da obtenção das medidas. A solução foi mantida ao abrigo da luz e a temperatura entre 25 e 30°C de maneira a se obter uma absorbância inicial de cerca de 0,60 a 517 nm. O DPPH é um radical livre estável, de coloração violeta escuro, com máximo de absorção em 517 nm, que se reduz na presença de um doador de hidrogênio, no caso o antioxidante seqüestrador de radicais livres.

4.5.2.3. Medidas da capacidade antioxidante

A mistura reacional foi posta em cubetas plásticas de 1,0 cm de caminho óptico. O volume fixo de 1950 μL da solução metanólica de DPPH a 60 μM foi adicionado a alíquotas de 50 μL de cada uma das diluições iniciais de óleos e extratos de ambas as plantas. A inibição de absorbância inicial de cada amostra foi equivalente àquela do branco. Metanol foi usado para zerar o caminho ótico do espectrofotômetro e a absorbância do branco foi medida e usada como controle. Este valor foi 0,60. O branco foi preparado diariamente nas mesmas condições, usando-se metanol em lugar das amostras. Em seguida, com as amostras, o decréscimo dos valores de absorbância foi anotado nos tempos $t=0$, $t=1$, $t=5$ e $t=10$ min e, daí em diante, monitoradas em intervalos contínuos de 10 min, durante cerca de 2 h, até valor constante. O término da reação foi indicado quando se iniciou o

aumento do valor de absorbância. A redução da concentração do radical DPPH foi registrada pela mudança da coloração violeta para amarelo claro, indicando a presença de substâncias com capacidade antioxidante e doadoras de $H^{\bullet}$. Na mistura reacional, as amostras de óleos essenciais e extratos metanólicos encontravam-se nas concentrações de 186,5, 93,25 e 46,63 $\mu\text{g/mL}$ e 100,0, 57,0 e 40,0 $\mu\text{g/mL}$ para *C. scoparioides* e de 15.417,0, 5.781,0 e 3.558,0 $\mu\text{g/mL}$ e 40,0, 20,0, 10,0 e 7,0 $\mu\text{g/mL}$ para *H. crenata*. Para cada concentração testada foram feitas avaliações em triplicatas, com obtenção da média.

4.5.2.4. Preparo da solução do Trolox, o antioxidante de referência

Trolox (ácido 6-hidróxi-2,5,7,8,-tetrametilcroman-2-carboxílico), um derivado do α -tocoferol, foi usado como padrão antioxidante para comparar as atividades de seqüestro de radicais das amostras. Trolox, na concentração de 4 mM em metanol foi diluído neste mesmo solvente para uma concentração de 1,6 mM, de onde foi pipetado 50 μL e misturados com 1950 μL da solução metanólica de DPPH 60 μM , para o teste da sua capacidade antioxidante. A concentração de 40 μM de Trolox, na mistura reacional, foi usada como padrão para comparar a capacidade de seqüestro de radicais das amostras. A reação foi monitorada nas mesmas condições daquelas realizadas para as amostras e o branco. A reação levou cerca de 30 min.

4.5.2.5. Avaliação da capacidade e eficácia antioxidante

A capacidade de seqüestro de radicais das amostras foi calculada de acordo com:

a) o percentual de inibição do radical DPPH (SACCHETTI et al., 2004):

$$\% \text{ inibição de DPPH} = [(A_B - A_A) / A_B] \times 100,$$

onde A_B e A_A são os valores de absorbância do branco e da amostra, respectivamente, no tempo final da reação. O desvio padrão (s), o erro padrão da média (s_y) e as médias dos percentuais da capacidade antioxidante (%CAO) das amostras, em cada uma das concentrações testadas foram calculados e o gráfico da

%CAO versus concentração foi construído para se obter a concentração efetiva em 50% de capacidade (CE_{50}), utilizando análise de regressão linear no programa de software Excel.

b) o percentual da concentração de DPPH remanescente (OSIMORE et al., 2005):

$$\%DPPH_{Rem} = [DPPH]_{(t)} / [DPPH]_{(0)} \times 100,$$

onde $[DPPH]_{(0)}$ é a concentração remanescente do radical sem o antioxidante, e $[DPPH]_{(t)}$ é a concentração remanescente do radical no tempo final da reação, que foi calculada da curva de calibração de acordo com a equação abaixo, determinada por regressão linear (LOHACHOOMPOL, SRZEDNICKI e CRESKE, 2004):

$$[DPPH]_{(t)} = (Abs_{517} + 2,58 \times 10^{-3}) \times 12509^{-1}$$

4.6. AVALIAÇÃO DA TOXIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS METANÓLICOS DAS PLANTAS FRENTE ÀS LARVAS DO MICROCRUSTÁCEO *ARTEMIA SALINA*

Os óleos essenciais das plantas frescas e os extratos metanólicos foram testados quanto à toxicidade geral, utilizando-se o bioensaio de letalidade frente a *Artemia salina* Leach (MEYER et al., 1982; PARRA et al., 2001). Os testes foram realizados no Laboratório de Farmacodinâmico, do Departamento de Farmácia, da UFPA, segundo orientação do Prof Dr. Pergentino Sousa.

4.6.1. Preparo do aquário, da solução salina artificial e eclosão dos cistos de *Artemia salina*

O meio para o cultivo das larvas de *Artemia salina* consistiu de solução salina artificial (salmora). Foram dissolvidos 46 g de NaCl, 22 g $MgCl_2 \cdot 6H_2O$, 8 g Na_2SO_4 , 2,6 g $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ e 1,4 g KCl em 2 L de água destilada. Em seguida o pH foi monitorado e ajustado para 9,0 usando Na_2CO_3 para evitar o risco de mortalidade dos microcrustáceos devido o decréscimo de pH durante a incubação (LEWAN, ANDERSSON e MORALES-GOMES, 1992). Para eclosão dos cistos utilizou-se um aquário de vidro recoberto com papel alumínio com capacidade para 2 L, onde foi adicionada a salmora e 50 mg de ovos de *Artemia salina*, adquiridos da empresa pesqueira MARAMAR. Ao sistema foi feita uma divisória, de maneira que um lado continha os ovos ao abrigo da luz e o outro lado foi iluminado para permitir a migração das larvas. O experimento recebeu oxigênio com o auxílio de uma bomba de ar e foi realizado a temperatura ambiente entre 25 e 30°C até o período de eclosão das larvas, o qual se completou após cerca de 48 horas.

4.6.2. Preparo das amostras para o teste de toxicidade

As amostras de óleos e extratos, em quantidades de 7,5 mg solúveis em 1% e 5% de dimetilsulfóxido, respectivamente, foram diluídas em 6 mL da salmora (solução estoque). O DMSO foi utilizado como veículo para a solubilização das amostras no meio aquoso. Posteriormente foram retiradas alíquotas para realização

de sucessivas diluições em tubos de ensaio contendo a salmora, nas concentrações de 500, 100, 50, 25, 10, 5 e 1 µg/mL.

4.6.3. Bioensaio de toxicidade com *Artemia salina*

Em cada amostragem foram utilizadas 10 larvas de *Artemia salina* com 48 horas de eclosão, distribuídas em tubos de ensaio com o auxílio de micropipetas, em volume final de 5 mL de solução, nas concentrações já mencionadas. Os tubos com as larvas foram mantidos a temperatura ambiente entre 25 e 30°C sob iluminação artificial por um período de 24 horas. Decorrido este, foi realizada a contagem do número de larvas sobreviventes nos testes das amostras e no grupo controle. Utilizou-se um grupo controle (sem amostras) preparado nas mesmas condições que aquelas da solução estoque. Realizaram-se três réplicas para cada concentração das amostras testadas e o controle.

4.6.4. Determinação da Concentração Letal de 50% (CL₅₀) para os microcrustáceos como parâmetro de atividade biológica

Os valores estimados da CL₅₀ foram determinados a partir do gráfico do número probito correspondente ao percentual de microcrustáceos mortos contra as concentrações testadas em escala logarítmica, através do ajuste dos pontos experimentais e das equações obtidas pela curva de calibração, usando-se o programa de software Excel (FINNEY, 1991).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. TEOR DE UMIDADE E RENDIMENTO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Os valores dos rendimentos em óleos essenciais calculados em base livre de umidade e as respectivas umidades das plantas encontram-se expressos nas Tabelas 3 e 4.

Tabelas 3. Rendimento em óleo essencial (%) das amostras de *C. scoparioides*.

Amostras	Rendimento em óleo (%)	Teor de umidade (%)
OCs-1f	1,8	86,0
OCs-1s	1,7	16,0
OCs-2s	1,9	12,0
OCs-3f	11,0	94,0
OCs-3s	3,3	16,0

Tabela 4. Rendimento em óleo essencial (%) das amostras de *H. crenata*.

Amostras	Rendimento em óleo (%)	Teor de umidade (%)
OHc-1f	1,4	78,0
OHc-1s	0,9	14,0
OHc-2	0,8	22,0
OHc-2s	0,5	16,0
OHc-3	1,3	20,0
OHc-3s	0,8	16,0

Os rendimentos dos óleos essenciais obtidos de *C. scoparioides* variaram entre 1,7 e 11,0 % e para *H. crenata* a variação foi de 0,5 a 1,4%. Observa-se que para a amostra OCs-3f, o rendimento em óleo é bem superior àqueles de OCs-1f, OCs-1s, OCs-2s e OCs-3s. Fato este que pode estar relacionado com o local e o período de coleta e também com as umidades das plantas. As amostras OCs-1f e OCs-1s foram coletadas no início do período chuvoso (março de 2005), ou seja, início da sua sazonalidade, já as amostras OCs-2s, OCs3f e OCs3s foram coletadas no verão em julho e agosto de 2005, no término da sazonalidade. Observa-se que para as amostras OCs-2s e OCs3s, apesar de coletadas na área da EMPRAPA, mas em meses diferentes, os rendimentos em óleos essenciais obtidos são diferentes: 1,9 e 3,3%. Esses resultados incentivam novas investigações de *C. scoparioides*,

sugerindo estudos da sazonalidade da planta em vários locais de coleta e até mesmo na área da EMBRAPA, local que se mostrou bastante interessante em questão de rendimento em óleo essencial.

Duas amostras do material de *H. crenata* chegaram ao LEPRON parcialmente secas (OHc-2 e OHc-3), razão pela qual possuímos os resultados para as plantas com teor de umidade em torno de 20% e após secagem. Os rendimentos em óleos para ambas as plantas frescas e com maior teor de água foram maiores que para as secas. Os rendimentos em óleos essenciais de todas as amostras analisadas são considerados expressivos, se comparados com plantas aromáticas tradicionais (VARDAR-ÜNLÜ et al., 2003; SACHETTI et al., 2004; JUKI, MILO, 2005).

5.2. ANÁLISE QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Foram identificados 14 e 20 constituintes, que representaram de 93,6 a 94,4% e de 84,2 a 97,8% do conteúdo total dos óleos essenciais resultantes de *C. scoparioides* e *H. crenata*, respectivamente. A quantidade relativa de cada constituinte com seus correspondentes índices de retenção (IR) está mostrada nas Tabelas 5 e 6.

Tabela 5. Composição química e quantidade relativa de cada constituinte dos óleos essenciais de *C. scoparioides*.

Constituintes	IR	OCs-1f	OCs-1s	OCs-2s	OCs-3f	OCs-3s
α -tujeno	930	0,3	0,3	0,3	0,2	0,3
sabineno	975	-	-	-	0,2	-
β -pineno	979	1,9	1,1	1,0	1,8	1,0
α-felandreno	1003	12,1	12,6	14,3	12,1	14,3
<i>p</i> -cimeno	1025	3,5	1,5	1,7	1,5	1,7
limoneno	1028	0,2	0,1	0,2	0,1	0,1
β -felandreno	1030	0,2	0,2	0,2	0,2	0,2
(<i>E</i>)- β -ocimeno	1050	0,8	0,6	0,7	0,5	0,7
γ -terpineno	1060	0,5	0,4	0,3	0,4	0,3
linalol	1097	0,3	0,3	0,2	0,2	0,2
<i>p</i> -cimen-8-ol	1188	0,3	0,5	0,7	0,4	0,7
éter metílico do timol	1235	43,5	44,7	47,5	39,6	47,7
timol	1290	35,0	37,0	26,3	40,0	26,4
eugenol	1360	-	0,1	0,2	0,2	0,2

Os principais constituintes identificados no óleo essencial de *C. scoparioides* foram o éter metílico do timol (OCs-1f: 43,5%, OCs-1s: 44,7%, OCs-2s: 47,5%, OCs-3f: 39,6%, OCs-3s 47,7%), timol (OCs-1f: 35,0%, OCs-1s: 37,0%, OCs-2s: 26,3%, OCs-3f: 40,0%, OCs-3s: 26,4%) e α -felandreno (OCs-1f: 12,1%, OCs-1s: 12,6%, OCs-2s: 14,3%, OCs-3f: 12,1%, OCs-3s: 14,3%). Esses constituintes corresponderam em média a 91% do total da composição química identificada. O timol e seu éter metílico representaram 78% dessa composição.

Tabela 6. Composição química e quantidade relativa de cada constituinte dos óleos essenciais de *H. crenata*.

Constituintes	IR	OHc-1f	OHc-1s	OHc-2s	OHc-3s
α -tujeno	930	0,6	0,5	-	-
α-pineno	939	22,0	19,5	36,1	31,5
canfeno	952	2,7	2,7	4,8	3,3
sabineno	975	0,6	0,1	-	-
β-pineno	979	17,0	13,8	12,5	16,3
mirreno	990	1,6	1,3	2,2	2,0
α -felandreno	1003	0,2	0,2	0,4	0,4
α -terpineno	1017	1,1	0,8	0,8	0,8
<i>p</i> -cimeno	1025	2,0	1,8	2,1	1,3
limoneno	1028	5,4	4,4	9,8	6,9
1,8-cineol	1033	17,6	23,2	21,1	25,2
γ -terpineno	1060	3,5	2,4	1,2	1,1
terpinoleno	1089	1,1	0,8	0,9	0,7
cânfora	1142	4,7	11,6	1,9	2,2
borneol	1164	2,1	5,3	-	-
4-terpineol	1178	1,0	2,7	-	-
α -terpineol	1190	-	0,1	0,8	1,0
β -cariofileno	1419	1,0	0,6	1,6	1,3
aromadendreno	1441	-	0,1	0,9	0,9
biciclogermagreno	1494	-	-	0,7	0,9

Os constituintes majoritários identificados no óleo essencial de *H. crenata* foram o α -pineno (OHc-1f: 22,0%, OHc-1s: 24,2%, OHc-2s: 36,1%, OHc-3s: 31,5%), 1,8-cineol (OHc-1f: 17,6%, OHc-1s: 21,1%, OHc-2s: 21,1%, OHc-3s: 25,2%), β -pineno (OHc-1f: 17,0%, OHc-1s: 15,6%, OHc-2s: 12,5%, OHc-3s: 16,3%) e limoneno (OHc-1f: 5,4%, OHc-1s: 5,2%, OHc-2s: 9,8%, OHc-3s: 6,9%). A média desses constituintes representou 72% do total da composição química identificada.

O perfil cromatográfico obtido para os óleos essenciais de *C. scoparioides* é semelhante àqueles dos espécimens coletados nos estados do Amapá e Pará (MAIA et al., 2000b). Já o perfil cromatográfico de *H. crenata* se assemelha àquele tipo

químico do espécimen coletado em Melgaço/PA em março de 1999 (ZOGHBI et al., 2002). As estruturas químicas dos constituintes majoritários identificados nos óleos essenciais das plantas em estudo estão representadas nas Figuras 4 e 5. Os cromatogramas das plantas estão representados nas Figuras 6, 7, 8, 9, 10 e 11 (p. 53, 54, 55, 56, 57 e 58).

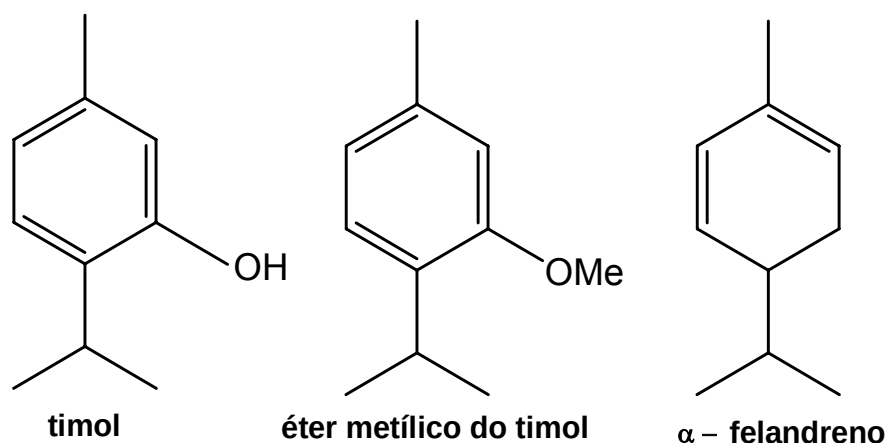


Figura 4. Estruturas dos constituintes majoritários identificados nos óleos essenciais de *C. scoparioides*.

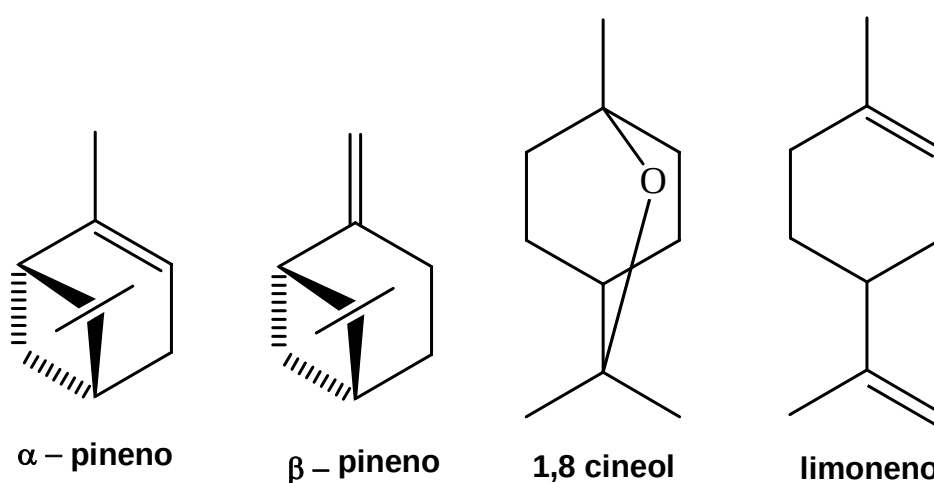


Figura 5. Estruturas dos constituintes majoritários identificados nos óleos essenciais de *H. crenata*.

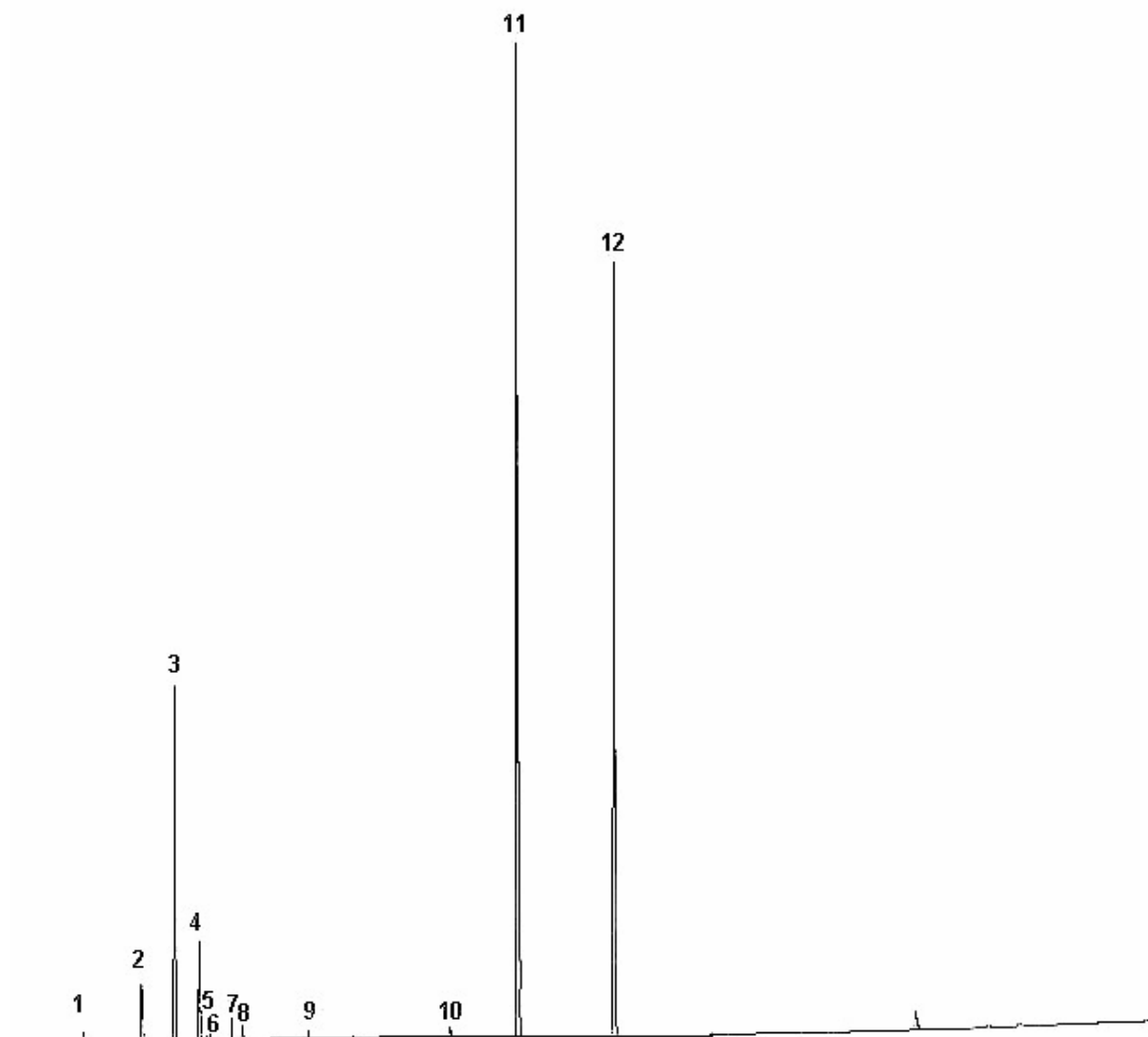


Figura 6. Cromatograma do óleo essencial da amostra OCS-1f.

1. α -tujeno (0,3%), 2. β -pineno (1,9%), 3. α -felandreno (12,1%), 4. *p*-cimeno (3,5%), 5. limoneno (0,2%), 6. β -felandreno (0,2%), 7. (*E*)- β -ocimeno (0,8%), 8. γ -terpineno (0,5%), 9. linalol (0,3%), 10. *p*-cimen-8-ol (0,3%), 11. timol, éter metílico (43,5%), 12. timol (35,0%).

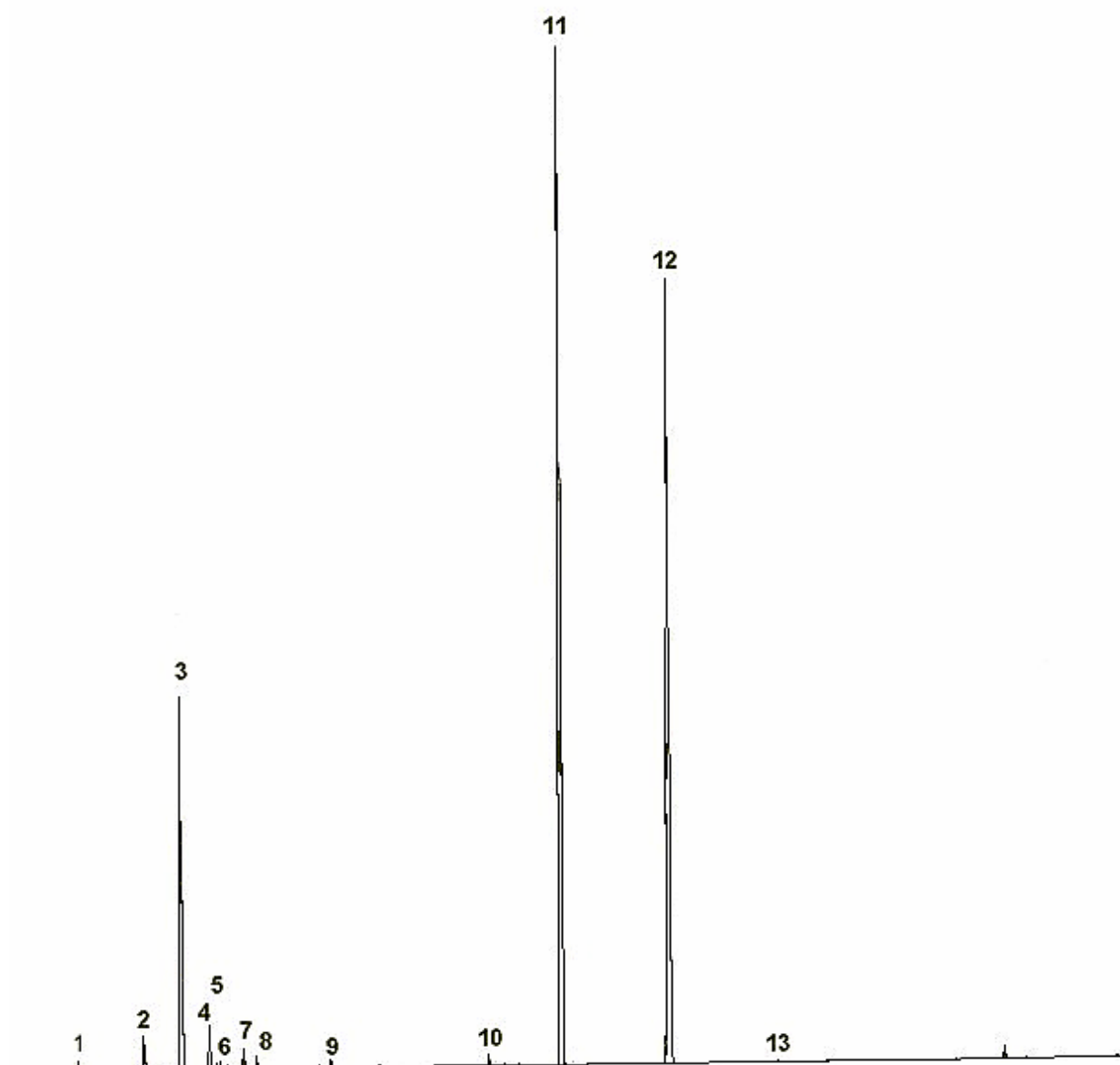


Figura 7. Cromatograma do óleo essencial da amostra OCS-1s.

1. α -tujeno (0,3%), 2. β -pineno (1,1%), 3. α -felandreno (12,6%), 4. *p*-cimeno (1,5%), 5. limoneno (0,1%), 6. β -felandreno (0,2%), 7. (*E*)- β -ocimeno (0,6%), 8. γ -terpineno (0,4%), 9. linalol (0,3%), 10. *p*-cimen-8-ol (0,5%), 11. timol, éter metílico (44,7%), 12. timol (37,0%), 13. eugenol (0,1%).

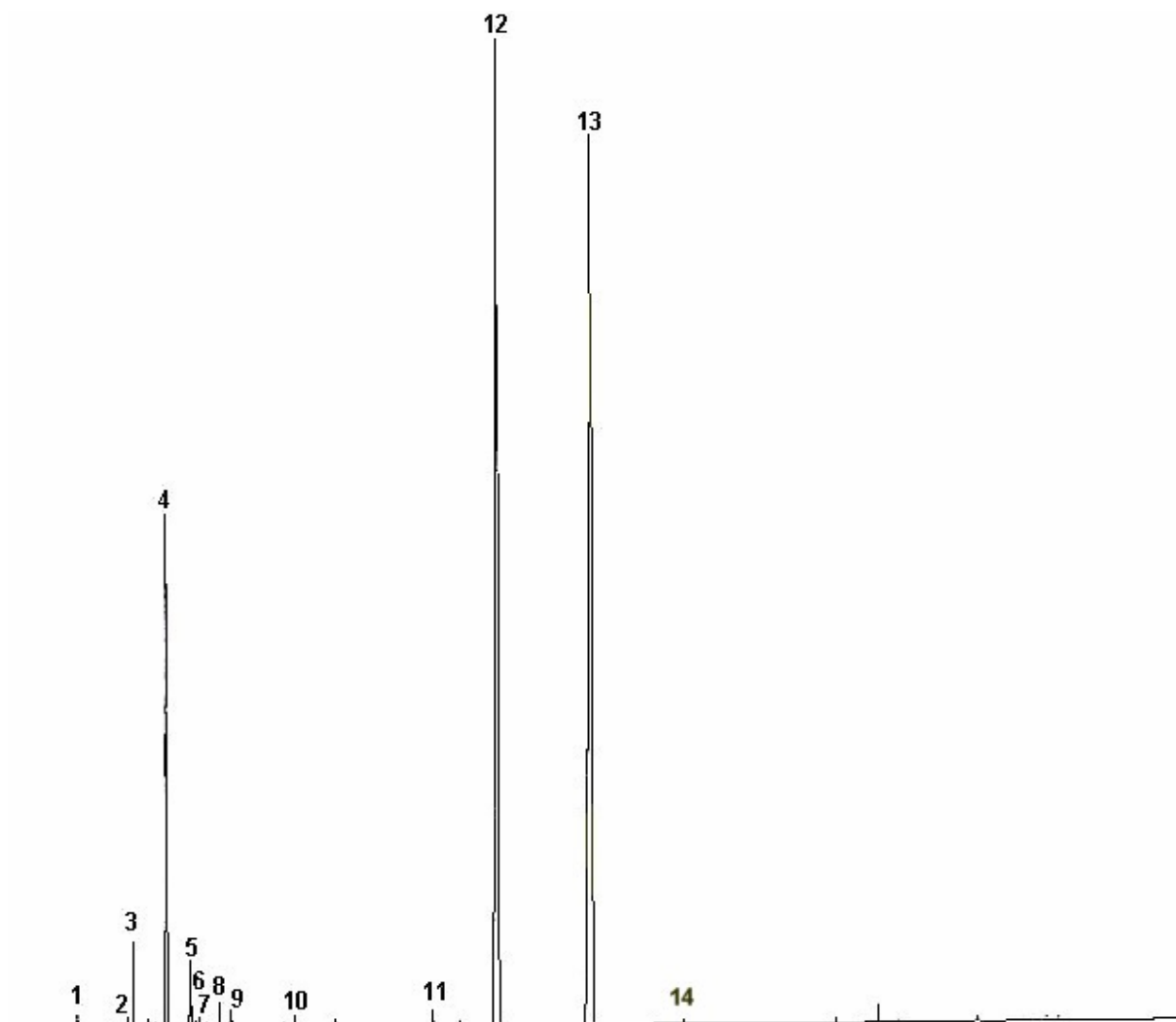


Figura 8. Cromatograma do óleo essencial da amostra OCs-3f.

1. α -tujeno (0,2%), 2. sabineno (0,2%), 3. β -pineno (1,8%), 4. α -felandreno (12,1%), 5. *p*-cimeno (1,5%), 6. limoneno (0,1%), 7. β -felandreno (0,2%), 8. (*E*)- β -ocimeno (0,5%), 9. γ -terpineno (0,4%), 10. linalol (0,2%), 11. *p*-cimen-8-ol (0,4%), 12. timol, éter metílico (39,6%), 13. timol (40,0%), 14. eugenol (0,2%).

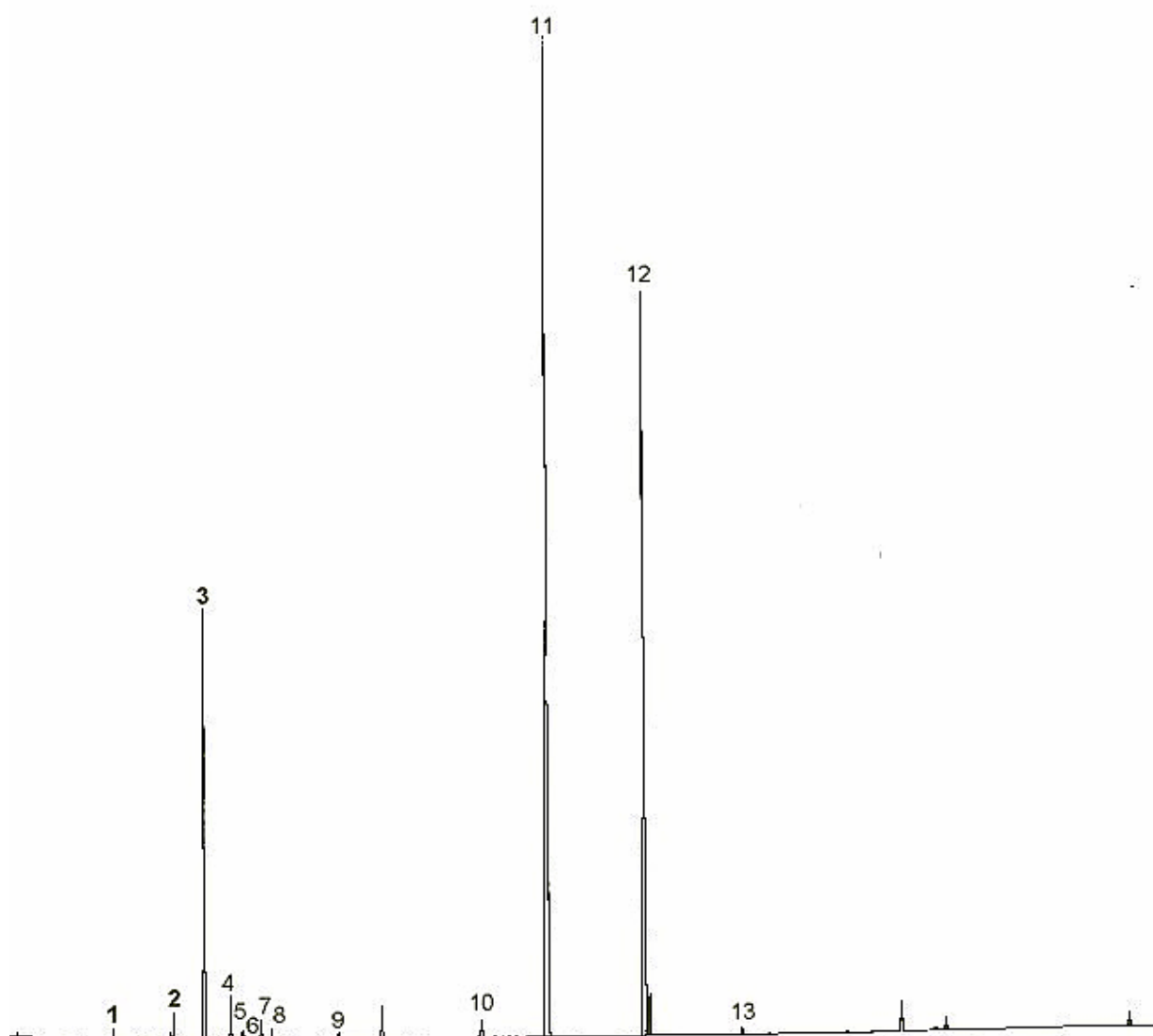


Figura 9. Cromatograma do óleo essencial da amostra OCs-3s.

1. α -tujeno (0,3%), 2. β -pineno (1,0%), 3. α -felandreno (14,3%), 4. *p*-cimeno (1,7%), 5. limoneno (0,1%), 6. β -felandreno (0,2%), 7. (*E*)- β -ocimeno (0,7%), 8. γ -terpineno (0,3%), 9. linalol (0,2%), 10. *p*-cimen-8-ol (0,7%), 11. timol, éter metílico (47,7%), 12. timol (26,4%), 13. eugenol (0,2%).

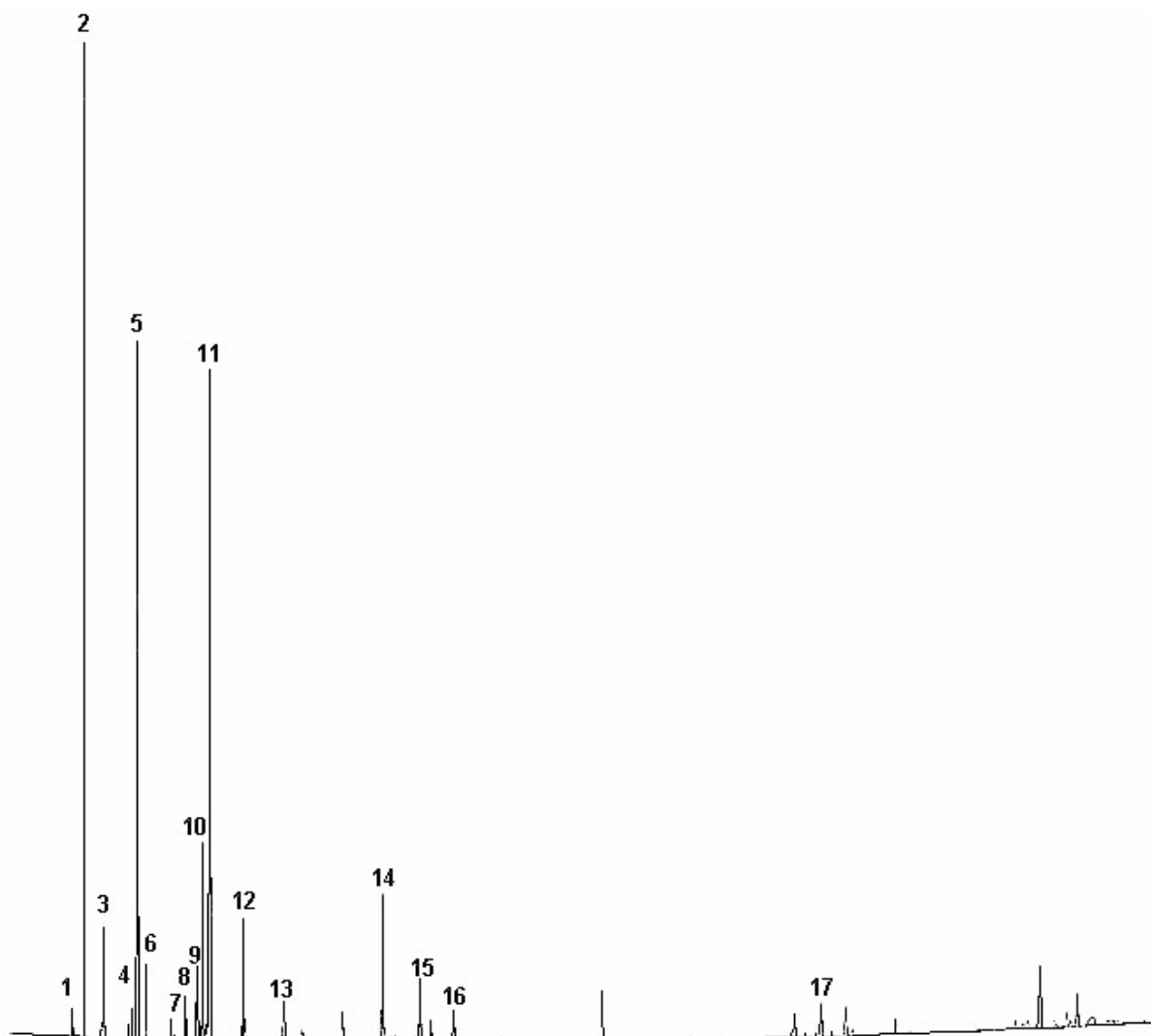


Figura 10. Cromatograma do óleo essencial da amostra OHc-1f.

1. α -tujeno (0,6%), 2. α -pineno (22,0%), 3. canfeno (2,7%), 4. sabineno (0,6%), 5. β -pineno (17,0%), 6. mirceno (1,6%), 7. α -felandreno (0,2%), 8. γ -terpineno (1,1%), 9. p -cimeno (2,0%), 10. limoneno (5,4%), 11. 1,8-cineol (17,6%), 12. γ -terpineno (3,5%), 13. terpinoleno (1,1%), 14. cânfora (4,7%), 15. borneol (2,1%), 16. 4-terpineol (1,0%), 17. β -cariofileno (1,0%).

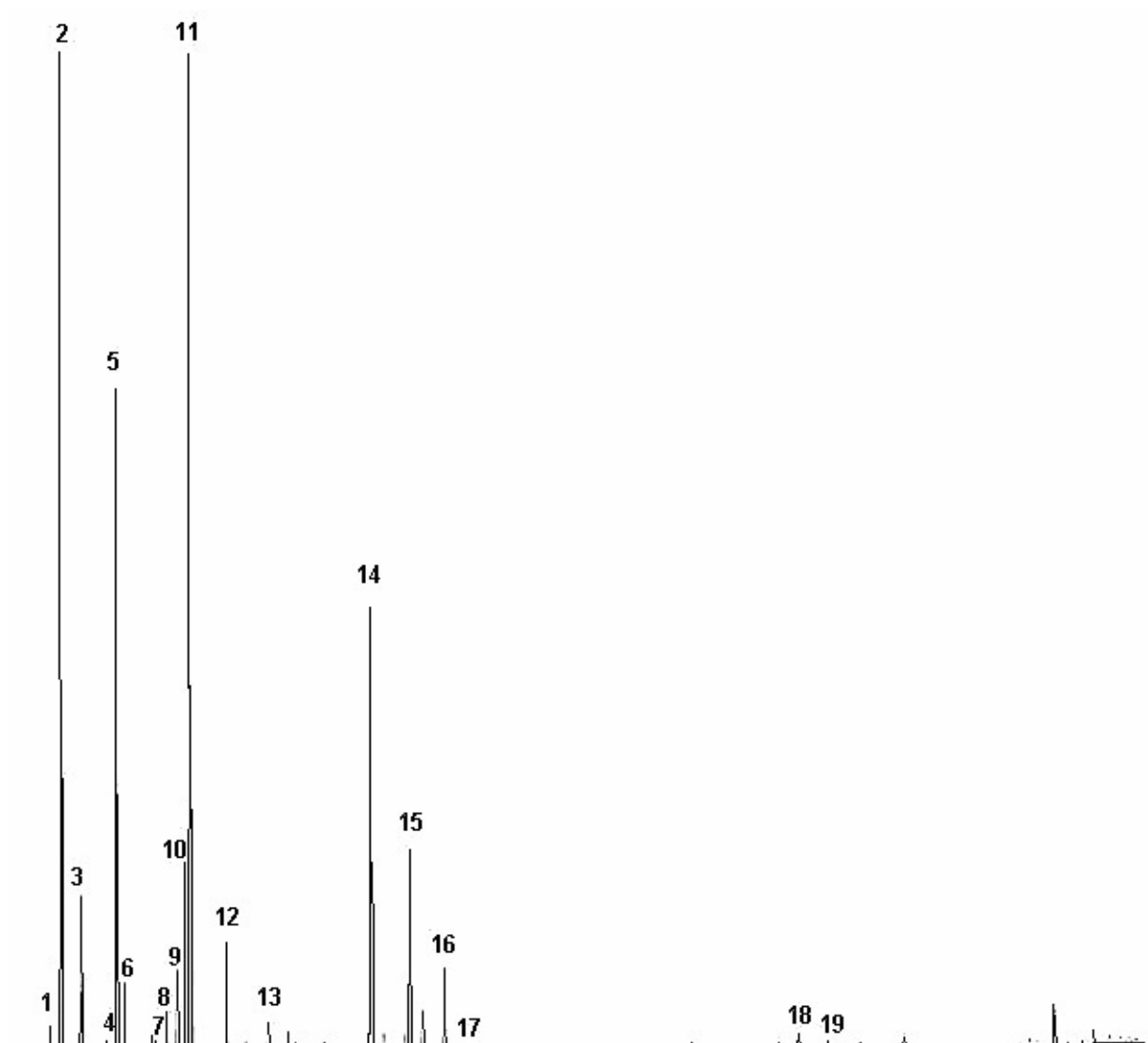


Figura 11. Cromatograma do óleo essencial da amostra OHc-1s.

1. α -tujeno (0,5%), 2. α -pineno (19,5%), 3. canfeno (2,7%), 4. sabineno (0,1%), 5. β -pineno (13,8%), 6. mirceno (1,3%), 7. α -felandreno (0,2%), 8. γ -terpineno (0,8%), 9. *p*-cimeno (1,8%), 10. limoneno (4,4%), 11. 1,8-cineol (23,2%), 12. γ -terpineno (2,4%), 13. terpinoleno (0,8%), 14. cânfora (11,6%), 15. borneol (5,3%), 16. 4-terpineol (2,7%), 17. α -terpineol (0,1%) 18. β -cariofileno (0,6%), 19. aromadendreno (0,1%).

5.3. AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS METANÓLICOS DAS PLANTAS

5.3.1. Método de descoloração do β -caroteno em placas de cromatografia em camada delgada (CCD)

As amostras de óleos essenciais e extratos metanólicos de *C. scoparioides* e *H. crenata*, foram testadas qualitativamente quanto à detecção da capacidade antioxidante, usando o teste de descoloração do β -caroteno em placas de cromatografia em camada delgada (CCD) (p. 42).

Para as amostras de *C. scoparioides*, somente seus óleos essenciais se apresentaram com manchas amarelas remanescentes nas placas de CCD, após espargimento da solução de β -caroteno e exposição à luz solar. Para as amostras de *H. crenata*, aconteceu o contrário, ou seja, somente seus extratos metanólicos que se revelaram frente à solução utilizada, mostrando-se no final do experimento, com manchas remanescentes de coloração amarela. As indicações dessas manchas sugerem presença de substâncias antioxidantes em sua composição química, o que posteriormente foi quantificado através do método de seqüestro de radicais DPPH.

5.3.2. Método de seqüestro do radical livre 1,1-difenil-2-picrilhidrazila

O DPPH na presença das amostras de óleos essenciais e dos extratos metanólicos de *C. scoparioides* e *H. crenata* descoloriu-se, devido a sua habilidade de seqüestro de hidrogênios. Os resultados obtidos através deste método para avaliar a capacidade de seqüestro de radicais das amostras, foram calculadas de diferentes maneiras.

5.3.2.1. Percentuais de inibição do radical DPPH e de sua concentração remanescente

Os resultados dos percentuais de inibição do radical DPPH e de sua concentração remanescente induzidos pelas plantas, juntamente com os valores dos erros padrões das médias, estão mostrados nas Tabelas 7, 8, 9, 10 e 11, 12, 13, 14, respectivamente. Os óleos essenciais de *C. scoparioides*, nas concentrações de 46,6 a 186,5 µg/mL, tiveram um efeito de seqüestro sobre os radicais, variando de 46,02 a 82,05% de inibição, enquanto os óleos de *H. crenata*, nas concentrações de 3.558,0 a 15.417,0 µg/mL, apresentaram variação de inibição sobre o radical de 41,44 a 79,93%. Observa-se que os óleos essenciais de *C. scoparioides* são muito mais efetivos no seqüestro de radicais DPPH que os óleos de *H. crenata*. Pois, para um valor de 80% de inibição, é preciso usar uma concentração de aproximadamente 83 vezes maior de *H. crenata*. Para os extratos de *C. scoparioides* e *H. crenata*, em concentrações de 40 a 100 µg/mL e de 7 a 40 µg/mL, teve-se um efeito de seqüestro dos radicais que variou de 47,65 a 93,96% e de 18,83 a 94,01%. Já os extratos de *H. crenata* são 2,5 vezes mais eficientes no seqüestro de radicais que os de *C. scoparioides*. Observa-se que para se obter uma percentagem de inibição de 94%, é preciso usar uma concentração de 40 µg/mL para *H. crenata* e de 100 µg/mL para *C. scoparioides*.

Tabela 7. Valores do percentual de inibição do radical DPPH para os óleos essenciais de *C. scoparioides*.

Concentração (µg/mL)	Inibição (%)			
	OCs-1f	OCs-1s	OCs-3f	OCs-3s
186,5	76,97 ± 1,41	80,88 ± 1,05	82,05 ± 1,62	80,30 ± 1,74
93,3	61,93 ± 1,83	67,99 ± 1,00	69,28 ± 0,90	64,73 ± 0,79
46,6	46,02 ± 0,88	51,28 ± 0,32	53,59 ± 0,87	51,27 ± 1,58

A ordem decrescente de seqüestro de radicais DPPH entre os óleos essenciais de *C. scoparioides* é OCs-1s > OCs-1f e OCs-3f > OCs-3s. Observa-se que para o espécimen coletado no município de Santa Isabel/PA (Cs-1), a amostra seca tem uma percentagem de inibição sobre o radical, ligeiramente maior que para a amostra fresca, o que é inverso para os óleos essenciais do material coletado na

área da EMBRAPA/PA. Estes valores são correspondentes com as quantidades relativas do constituinte timol, assim como ele em sinergismo com seu éter metílico, presentes na composição desses óleos e que juntos, correspondem em média 78% do total dessa composição. Repare nas amostras, as quantidades relativas de timol (OCs-1s: 37,0%, OCs-1f: 35,0% e OCs-3f: 40,0%, OCs-3s: 26,4%) e timol + seu éter metílico (OCs-1s: 81,7%, OCs-1f: 78,5% e OCs-3f: 79,6%, OCs-3s: 74,1%).

Tabela 8. Valores do percentual de inibição do radical DPPH para os óleos essenciais de *H. crenata*.

Concentração (µg/mL)	Inibição (%)	
	OHc-1f	OHc-1s
15.417,0	79,93 ± 1,46	71,41 ± 0,52
5.781,0	64,51 ± 1,27	57,63 ± 1,17
3.558,0	41,44 ± 1,71	42,58 ± 1,48

O efeito de seqüestro de radicais DPPH para os óleos essenciais de *H. crenata* foi ligeiramente maior para a planta fresca. Esta suposta capacidade antioxidante sugere que os valores de percentagem de inibição sobre o radical, estejam relacionados com as quantidades relativas de α -pineno (OHc-1f: 22,0%, OHc-1s: 19,5%), β -pineno (OHc-1f: 17,0%, OHc-1s: 13,8%), limoneno (OHc-1f: 5,4%, OHc-1s: 5,2%), γ -terpineno (OHc-1f: 3,5%, OHc-1s: 2,4%) e terpinoleno (OHc-1f: 1,1%, OHc-1s: 0,8%), que apesar desses dois últimos não fazerem parte dos constituintes majoritários, apresentam um forte efeito de seqüestro de radicais DPPH superior aqueles encontrados para o α -pineno, β -pineno e limoneno (CHOI, 2000). Pois, esses constituintes estão em maior proporção na amostra fresca. Pode-se dizer que o 1,8-cineol (OHc-1f: 17,6%, OHc-1s: 23,2%) foi o único dos constituintes majoritários que não contribuiu diretamente na eficácia da capacidade antioxidante das amostras, por que estava em maior quantidade na amostra seca.

Tabela 9. Valores do percentual de inibição do radical DPPH para os extratos metanólicos de *C. scoparioides*.

Concentração (µg/mL)	Inibição (%)	
	ECs-1	ECs-3
100,0	82,09 ± 0,14	93,96 ± 0,24
57,0	69,95 ± 1,47	80,91 ± 1,63
40,0	47,65 ± 1,49	59,73 ± 1,44

Tabela 10. Valores do percentual de inibição do radical DPPH para os extratos metanólicos de *H. crenata*.

Concentração (µg/mL)	Inibição (%)		
	EHc-1	EHc-2	EHc-3
40,0	94,01 ± 0,14	63,89 ± 1,57	93,61 ± 1,10
20,0	73,56 ± 0,46	30,87 ± 0,63	59,59 ± 1,76
10,0	38,71 ± 0,46	15,03 ± 0,86	34,36 ± 1,61
7,0	25,92 ± 1,06	—	18,83 ± 0,85

O maior efeito de seqüestro de radicais DPPH entre os extratos metanólicos de *C. scoparioides*, em todas as concentrações testadas, é para a amostra ECs-3 que deve apresentar uma maior quantidade relativa dos fitoantioxidantes ativos, pois, provavelmente, esses extratos possuem composições químicas semelhantes, já que seus óleos essenciais são qualitativamente iguais e quantitativamente diferentes. O mesmo pode-se dizer para os extratos de *H. crenata*, que apesar da amostra EHc-1 ter os maiores valores de percentagem de inibição sobre o radical DPPH, também devem ter composição química semelhantes.

Tabela 11. Valores do percentual da concentração de DPPH remanescente para os óleos essenciais de *C. scoparioides*.

Concentração (µg/mL)	%DPPH _{Rem} (µM)			
	OCs-1f	OCs-1s	OCs-3f	OCs-3s
186,5	22,37	19,44	17,53	18,86
93,3	36,81	31,65	31,25	34,63
46,6	53,28	50,53	45,16	48,31

Tabela 12. Valores do percentual da concentração de DPPH remanescente para os óleos essenciais de *H. crenata*.

Concentração (µg/mL)	%DPPH _{Rem} (µM)	
	OHc-1f	OHc-1s
15.417,0	19,26	28,32
5.781,0	36,32	45,20
3.558,0	58,56	57,42

Tabela 13. Valores do percentual da concentração de DPPH remanescente para os extratos metanólicos de *C. scoparioides*.

Concentração (µg/mL)	%DPPH _{Rem} (µM)	
	ECs-1	ECs-3
100,0	18,06	6,16
57,0	32,14	19,22
40,0	50,93	38,09

Tabela 14. Valores do percentual da concentração de DPPH remanescente para os extratos metanólicos de *H. crenata*.

Concentração (µg/mL)	%DPPH _{Rem} (µM)		
	EHc-1	EHc-2	EHc-3
40,0	5,41	32,37	5,98
20,0	25,21	62,03	36,98
10,0	55,46	74,73	65,63
7,0	63,10	—	70,92

5.3.2. 2. Concentração efetiva em 50% de capacidade (CE₅₀)

Os resultados da capacidade antioxidante das amostras, calculada pela redução de 50 % da concentração inicial de DPPH, estão apresentados nas Tabelas 15 e 16 e nas Figuras 12 e 13. Ressalta-se que quanto menor o valor da CE₅₀, maior a capacidade antioxidante da amostra. Os óleos essenciais de *C. scoparioides* e *H. crenata* apresentaram uma CE₅₀ que variou de 14,40 a 54,06 µg/mL e de 3.729,83 a 5.191,00 µg/mL, enquanto seus correspondentes extratos metanólicos de 11,27 a 33,64 µg/mL e de 15,22 a 31,55 µg/mL. O padrão positivo Trolox apresentou uma CE₅₀ de 4,67 ± 0,35 µg/mL. Portanto, todas as amostras mostraram-se cerca de 2 a 12 vezes menos ativas frente ao DPPH, exceto os óleos essenciais de *H. crenata* que se apresentaram cerca de 1000 vezes menos eficazes no seqüestro de radicais, todas em comparação ao padrão utilizado. Com esses resultados, pode-se sugerir uma provável atividade antioxidante das amostras analisadas.

Tabela 15. Valores da concentração efetiva em 50% de capacidade (CE₅₀) para os óleos essenciais de *C. scoparioides* e *H. crenata*.

Amostras	CE ₅₀ (µg/mL)
OCs-1f	54,06 ± 1,37
OCs-1s	25,67 ± 6,74
OCs-3f	14,40 ± 1,13
OCs-3s	32,29 ± 1,37
OHc-1f	3.729,83 ± 322,49
OHc-1s	5.191,00 ± 1252,75

Tabela 16. Valores da concentração efetiva em 50% de capacidade (CE₅₀) para os extratos metanólicos de *C. scoparioides* e *H. crenata*.

Amostras	CE ₅₀ (µg/mL)
ECs-1	33,64 ± 1,02
ECs-3	11,27 ± 1,10
EHc-1	15,22 ± 0,38
EHc-2	31,56 ± 0,74
EHc-3	18,66 ± 0,75

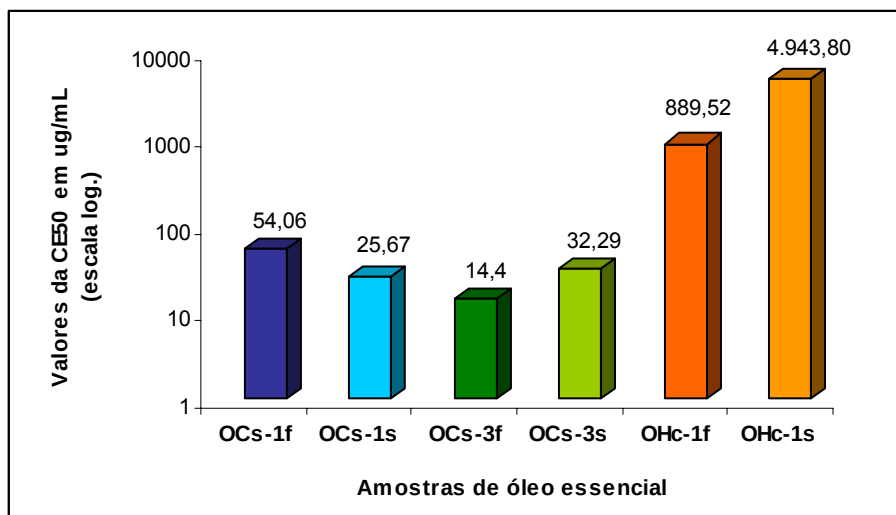


Figura 12. Gráfico comparativo entre os valores da CE₅₀ dos óleos essenciais de *C. scoparioides* e *H. crenata* frente ao radical DPPH.

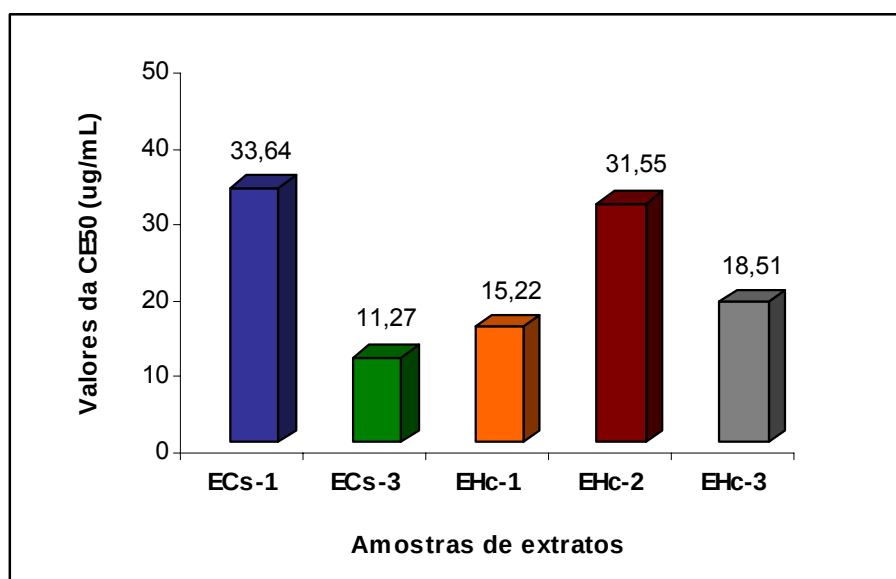


Figura 13. Gráfico comparativo entre os valores da CE₅₀ dos extratos metanólicos de *C. scoparioides* e *H. crenata* frente ao radical DPPH.

5.4. AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS E EXTRATOS METANÓLICOS DAS PLANTAS FRENTE ÀS LARVAS DO MICROCRUSTÁCEO *ARTEMIA SALINA*

Os resultados do teste de toxicidade mostraram que os óleos essenciais e extratos metanólicos de *C. scoparioides* e *H. crenata* apresentaram atividade toxicológica frente ao microcrustáceo *Artemia salina* e são biologicamente ativas. As amostras são geralmente consideradas ativas quando o teste de toxicidade frente a *Artemia salina* for menor que 1000 µg/mL (MEYER, 1982). As avaliações da toxicidade das amostras sobre *Artemia* conduziram aos resultados apresentados nas Tabelas 17 e 18, juntamente com as concentrações testadas, índices de mortalidade, desvio padrão e coeficiente de correlação.

Tabela 17. Toxicidade dos óleos essenciais de *C. scoparioides* e *H. crenata* sobre larvas do microcrustáceo *Artemia salina*.

Amostras	Concentrações (µg/mL)	Mortalidade (%)	CL ₅₀ (µg/mL)	Desvio padrão (±)	Coeficiente de correlação
OCs1f	1	0	7,8	0,3	0,9708
	5	5			
	10	52,9			
	25	100			
OCs3f	1	0	7,5	0,3	0,9774
	5	13,0			
	10	53,6			
	25	100,0			
OHc1f	1	0	6,7	0,2	0,9750
	5	40,0			
	10	60,0			
	25	100,0			

Tabela 18. Toxicidade dos extratos metanólicos de *C. scoparioides* e *H. crenata* sobre larvas do microcrustáceo *Artemia salina*.

Amostras	Concentrações µg/mL	Mortalidade (%)	CL ₅₀ µg/mL	Desvio padrão (±)	Coefficiente de correlação
ECs1	1	0	77,6	7,1	0,9967
	25	10,0			
	50	40,0			
	500	100,0			
ECs3	10	0	100,8	4,4	0,9904
	50	10,0			
	100	30,0			
	500	100,0			
EHc1	1	10,0	13,0	3,7	0,9825
	10	46,7			
	25	56,7			
	50	80,0			
	100	86,7			
	500	95,0			

As amostras de óleos essenciais OCs1f, OCs3f e OHc1f apresentaram uma CL₅₀ de 7,8; 7,5 e 6,7 µg/mL, enquanto que os extratos metanólicos ECs1, ECs3 e EHc1 tiveram uma CL₅₀ de 77,6; 100,8 e 13,0 µg/mL, respectivamente. O gráfico mostrado na Figura 14 é da comparação entre os valores das CL₅₀ obtidos das amostras de *C. scoparioides* e *H. crenata* frente a *Artemia salina*.

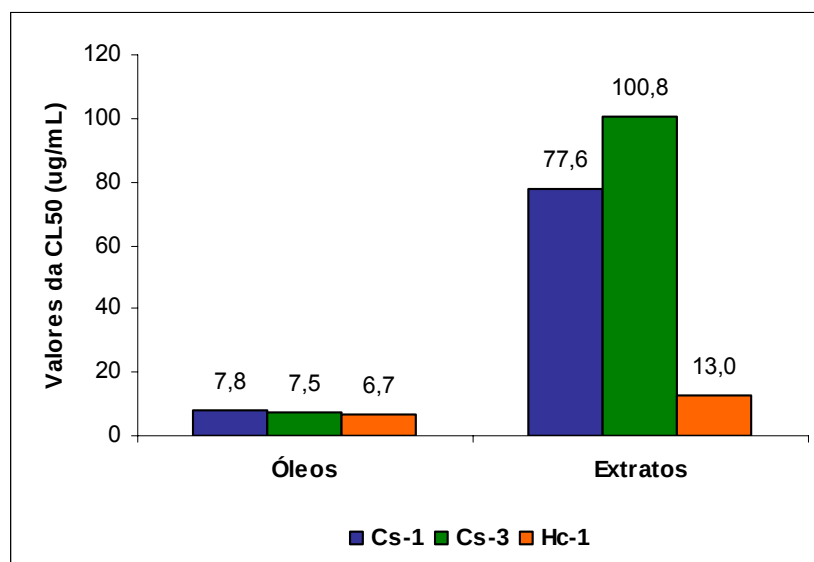


Figura 14. Gráfico comparativo entre os valores da CL₅₀ dos óleos essenciais e extratos metanólicos de *C. scoparioides* e *H. crenata* frente a *A. salina*.

Observa-se para as amostras Cs-1 e Cs-3, que seus óleos essenciais são em média cerca de doze vezes mais biologicamente ativos e tóxicos que seus extratos metanólicos, enquanto que para a amostra Hc-1, seu óleo apresenta somente duas vezes mais atividade toxicológica que seu extrato.

As três amostras de óleos essenciais em contato com as larvas, na concentração de 25 µg/mL, apresentaram um índice de 100% de mortalidade após 24h, já para as amostras dos extratos metanólicos, na concentração de 500 µg/mL, tiveram índice de 95-100% de mortalidade, o que demonstra que quanto maior a dose dessas amostras maior é o efeito tóxico. Os óleos essenciais por apresentarem os menores valores de CL₅₀ que os extratos metanólicos são mais tóxicos.

O extrato de *H. crenata* demonstrou ter maior atividade biológica e toxicológica que os extratos alcoólicos de *Ocimum gratissimum* e *O. tenuiflorum* (CL₅₀=18,76 e 18,75 µg/mL), porém menor que para *O. basilicum* (CL₅₀=9,9 µg/mL), todas espécies da família Lamiaceae (PARRA, 2001).

Nos estudos de Oliveira et al. (1992), os resultados da pesquisa de toxicidade em 55 extratos de plantas da família Verbenaceae, demonstraram toxicidade em concentrações menores do que 1000 µg/mL, empregando *Artemia salina*.

Comparando-se os valores da CL₅₀, podemos observar a maior toxicidade para OHc1f seguido de OCs3f > OCs1f > EHc1 > ECs1 > ECs3. A utilização de DMSO a 1 e 5% (v/v), para as amostras de óleos e extratos, respectivamente, facilitou a solubilização dos compostos para posterior adição de solução salina artificial e, o bioensaio controle, indicou que as larvas não foram afetadas pela composição da mistura empregada como solvente.

As amostras de óleos essenciais e extratos metanólicos testadas exibiram diferente grau de toxicidade, provavelmente relacionado à composição química das amostras biologicamente ativas.

A literatura relata que existe uma correlação entre a toxicidade geral frente a *Artemia salina* e a citotoxicidade diante de linhagens celulares humanas de tumores sólidos. Estudos experimentais mostram que para uma determinada droga, sua CL₅₀ referente à toxicidade frente a *Artemia salina* é dez vezes maior do que sua dose efetiva (DE₅₀) obtida para a toxicidade frente às linhagens celulares de tumores sólidos (MACLAUGHLIN, 1991).

Os resultados obtidos mostraram-se interessantes e sugerem que *C. scoparioides* e *H. crenata*, que em função de seus valores de CL₅₀, têm potencial

atividade biológica e toxicológica frente ao microcrustáceo *Artemia salina*. A avaliação da letalidade para esse tipo de larvas permite detectar compostos bioativos em extratos e óleos essenciais, facilitando o isolamento de compostos biologicamente ativos, contribuindo para investigações químicas e farmacológicas de produtos naturais (TROTTER et al., 1983; FONTENELE et al., 1988; SOLIS et al., 1993).

6. CONCLUSÕES

Os maiores valores em rendimentos dos óleos essenciais de *C. scoparioides* e *H. crenata* corresponderam às plantas frescas e com elevado teor de umidade. Esses rendimentos são considerados expressivos, quando comparados com plantas aromáticas tradicionais.

Os principais constituintes identificados no óleo de *C. scoparioides* foram o éter metílico do timol, timol e α -felandreno, enquanto que os majoritários de *H. crenata* foram o α -pineno, 1,8-cineol, β -pineno e limoneno. O perfil cromatográfico desses óleos é semelhante àqueles encontrados na literatura.

Dentre as amostras testadas segundo o método de descoloração do β -caroteno, somente àquelas dos óleos essenciais de *C. scoparioides* e dos extratos metanólicos de *H. crenata*, se mostraram positivas, indicando qualitativamente a presença de substâncias antioxidantes nessas amostras.

A alta capacidade antioxidante/redutor do radical livre DPPH frente às amostras analisadas foram demonstradas e quantificadas. Este radical na presença das amostras em estudo descoloriu-se de violeta ao amarelo. Pode-se dizer que os óleos essenciais de *C. scoparioides* tiveram um forte efeito de seqüestro sobre o DPPH, devido às quantidades relativas do constituinte timol, assim como ele em sinergismo com seu éter metílico. Já para os óleos de *H. crenata*, esta suposta capacidade antioxidante sugere que os valores de percentagem de inibição sobre o radical, estejam relacionados com as quantidades relativas de α -pineno, β -pineno, limoneno, γ -terpineno e terpinoleno. Para os extratos metanólicos de *C. scoparioides* e *H. crenata* foram obtidos efeitos de seqüestro dos radicais, que variaram de 47,65 a 93,96% e de 18,83 a 94,01%, respectivamente. As amostras foram comparadas com o padrão positivo Trolox que apresentou uma CE₅₀ de 4,67 μ g/mL, o que indica que todas as amostras mostraram-se cerca de 2 a 12 vezes menos ativas frente ao DPPH, exceto os óleos essenciais de *H. crenata* que se apresentaram cerca de 1000 vezes menos eficazes no seqüestro de radicais.

As amostras de óleos essenciais e extratos metanólicos testadas frente às larvas de *Artemia salina*, exibiram diferente grau de toxicidade, provavelmente relacionado à composição química e a concentração dessas amostras. Os óleos essenciais obtiveram menores valores de CL₅₀ que os extratos metanólicos, o que indica serem mais ativos biologicamente e mais tóxicos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/Quadrupole mass spectroscopy**. Ed. Altured; Carol Stream, Illinois, p. 456, 2001.
- ABDALLA, D. S. P. Antioxidantes: conceitos básicos e perspectivas terapêuticas. **ARS CVRANDI**, São Paulo, v. 26, p. 141, 1993.
- AMAROWICZ, R.; WANASUNDARA, U.; WANASUNDARA, J.; SHAHIDI, F. Antioxidant activity of ethanolic extracts of flaxseed in a β -carotene-linoleate model system. **Journal of Food Lipids**, v. 1, p. 111, 1993.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v. 350, n. 1, p. 103, 1996.
- ARUOMA, O. I. Free radicals and food. **Chemistry in Britain**, v. 29, n. 3, p. 210, 1993.
- BANIAS, C.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C. D. The effect of primary antioxidant and synergists on the activity of plant extracts in lard. **Journal of American Oil Chemical Society**, n. 69, p. 520, 1992.
- BARATA, E.; GUILLEMIN, P.; RODRIGUES, L.; MORAIS, J. G. Applications of oxygraphics to the study of antioxidant activity. **Revista Portuguesa de Farmacia**, v. 45, n.3, p. 95, 1995.
- BERG, M. E. van den. **Plantas medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático**. Belém, Museu Paraense Emílio Goeldi, p. 207, 1993.
- BERSET, C.; CUVELIER, M.-E. Methods of estimating the degree of lipid oxidation and of measuring antioxidizing power. **Sciences des Aliments**, v. 16, p. 219, 1996.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25, 1995.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária–ANVISA. Portaria n. 645 de 16 de dezembro de 1997. Aprova o regulamento técnico sobre aditivos aromatizantes /aromas. **Diário Oficial da União**. Brasília, DF. Resolução n. 104, de 14 de maio de 1999.
- BRENNA, O. V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4841, 2001.
- BRRACO, U.; LOLIGER, J.; VIRET, J. Production and use of natural antioxidants. **Journal of American Oil Chemists Society**, v. 58, p. 686, 1981.

CAMINHOÁ, J. M. **Elementos de botânica geral e médica**. Rio de Janeiro, Typographia Nacional, v. 3, p. 2772, 1877.

Castera-Rossignol, A.; Bosque, F. New approach to antioxidants. **Oleagineux Corps Gras Lipides**, v. 1, n. 2, p. 131, 1994.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C. de; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 23, n. 1, p. 20, 2000.

CHEVOLLEAU, S.; MALLET, J. F.; UCCIANI, E.; GAMISANS, J.; GRUBER, M. Effect of rosemary extracts and major constituents on lipid oxidation and soybean lipoxygenase activity. **Journal of American Oil Chemical Society**, v. 79, p. 1269, 1992.

CHOI, H-S; SONG, H. S.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. Radical-scavenging activities of *Citrus* essential oils and their components: detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 48, p. 4156, 2000.

CINTRA, R. M. G.; MANCINI-FILHO, J. Efeito antioxidante de especiarias: avaliação e comparação de métodos *in vitro* e *in vivo*. **Nutrire: revista da sociedade brasileira de alimentação e nutrição**, v. 22, p. 49, 2001.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J.; **Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination**; Colegate, S. M., Ed.; CRC Press; London, p. 441, 1993.

CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. Rio de Janeiro, Civilização Brasileira, p. 599, 1979.

DECKER, E. A. Phenolics: prooxidants or antioxidants? **Nutrition Reviews**, v. 55, n. 11, p. 396, 1997.

DOROSHOW, J.H. Effect of anthracycline antibiotics on oxygen radical formation in rat heart. **Cancer Research**, v. 43, n. 2, p. 460, 1983.

ECONOMOU, K. D.; OREOPOULOU, V.; THOMOPOULOS, C. D. Antioxidant activity of some plant extracts of the family labiatae. **Journal of American Oil Chemical Society**, v. 68, n. 2, p. 109, 1991.

FARAG, R. S.; DAW, Z. Y.; ABO-RAYA, S. H. Influence of some spice essential oils on *Aspergillus parasiticus* growth and production of aflatoxins in a synthetic medium. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 1, p. 54, 1989.

FERNANDEZ, M. A.; SAENZ, M. T.; GARCIA, M D. Antiinflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 50, n. 10, p. 1183, 1998.

FILHO, C. V.; YUNES, R. A. Estratégias para obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais. Conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 99, 1998.

FINNEY, D. J. **Probits analysis**. 3rd ed. Cambridge University Press, 1991.

FONTENELLE, A. J.; CARVALHO, U.; MELO, V.M.; BRAGA, L.M.; AGUIAR, A.; MATOS, F.J .A. Avaliação da toxicidade de extratos de plantas medicinais através de bioensaio com *Artemia salina* Leach. **Ciência e Cultura**, v. 40, n. 11, p. 1109, 1988.

FRANKEL, E. N. Lipid oxidation. **Progress in Lipid Research**, v. 19, n. 1-2, p. 1, 1980.

FRANKEL, E.N. Antioxidants in lipid foods and their impact on food quality. **Food Chemistry**, v.57, n.1, p.51, 1996a.

FRANKEL, E. N.; HUANG, S. W.; AESCHBACH, R.; PRIOR, E. Antioxidant activity of a rosemary extract and its constituents, carnosic acid, carnosol and rosmarinic acid in bulk oil and oil-in-water emulsion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.44, p.131, 1996b.

FURLAN, M. R. **Ervas e temperos: cultivo e comercialização**. Cuiabá: SEBRAE/MT, v. 15, P. 128, 1998.

GEY, K. F. Vitamins E plus C and interacting conutrients required for optimal health. **Biofactors**, v. 7, n. 1/ 2, p. 113, 1998.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p. 253, 1994.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LÖLINGER, J.; ARUOMA, O. I. The characterization on antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 33, n. 7, p. 601, 1995.

HARTMAN, P. E.; SHANKEL, D. M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 15, n. 3, p. 145, 1990.

HARWIG, J.; SCOTT, P. M. Brine shrimp (*Artemia salina* L.) larvae as a screening system for fungal toxins. **Applied Microbiology**, v. 21, n. 6, p. 1011, 1971.

HOLLMAN, P. C.; KATAN, M. B. Bioavailability and health effects of dietary flavonoids in man. **Archives of Toxicology Supplement**, v. 20, p. 237, 1998.

HU, Q.; XU, J.; CHEN, S.; YANG, F. Antioxidant activity of extracts of black sesame seed (*Sesamum indicum* L.) by supercritical carbon dioxide extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 943, 2004.

IVANOVA, A.; MILKOVA, T.; GALABOV, A. S.; NIKOLAEVA, L.; VOYNOVA, E. Transformation of cholanic acid derivatives into pharmacologically active esters of phenolic acids by heterogeneous Wittig reaction. **Zeitschrift fuer Naturforschung**, v. 52, n. 7-8, p. 516, 1997.

JACOB, R. A. The integrated antioxidant system. **Nutrition Research**, v. 15, n. 5, p. 755, 1995.

JUKI, M.; MILO, M. Catalytic oxidation and antioxidant properties of thyme essential oils (*Thymus vulgaris* L.). **Croatica Chemica Acta CCACAA**, v. 78, n. 1, p. 105, 2005.

KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J.-P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S.; HEINONEN, M. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 3954, 1999.

KIKUZAKI, H.; NAKATANI, N. Structure of a new antioxidative phenolic acid from oregano (*Origanum vulgare* L.). **Agricultural and Biological Chemistry**, v. 53, n. 2, p. 519, 1989.

KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L. **Óleos Essenciais e Sua Extração Por Arraste a Vapor**. Rio de Janeiro: EMBRAPA-CTAA, p. 24, 1991.

KRAMER, R. E. Antioxidants in clove. **Journal of American Oil Chemical Society**, v. 62, n. 1, p. 111, 1985.

KUBOW, S. Lipid oxidation products in food and atherogenesis. **Nutrition Reviews**, v. 51, n. 2, p. 33, 1993.

LAGOURI, V.; BLEKAS, G.; TSIMIDOU, M.; KOKKINI, S.; BOSKOU, D. Composition and antioxidant activity of essential oil from oregano plants grown in Greece. **Zeitschrift fuer Lebensmittel-Untersuchung und-Forschung**, v. 197, p. 20, 1993.

LAGOURI, V., BOSKOU, D. Nutrient antioxidants in oregano. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 47, p. 493, 1996.

LEWAN, L.; ANDERSSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Alternatives to Laboratory Animals**, v. 20, p. 297, 1992.

LIEWEN, M. B. **Antimicrobials in Encyclopedia of Food Science e Technology**, vol.1, Ed. in . Chief Y..H.Hui, John Willey e Sons, 1992.

LOHACHOOMPOL, V.; SRZEDNICKI, G.; CRESKE, J. The change of total anthocyanins in blueberries and their antioxidant effect after drying and freezing. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, v. 5, p. 248, 2004.

MACLAUGHLIN, J. L.; **Methods in Plant Biochemistry**; Hostet-tmann, K., Ed; Academic Press, v. 6, p. 1, 1991.

MADSEN, H. L.; BERTELSEN, G. Spices as antioxidants. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, p. 271, 1995.

MAHMOUD, L. E. Antifungal action and antiaflatoxic properties of some essential oil constituents. **Letters in Applied Microbiology**, v. 2, p. 110, 1994.

MAIA, J. G. S. **Óleos Essenciais: Evolução dos Métodos de Análise**, Belo Horizonte: Instituto de Ciências Exatas, Departamento de Química, UFMG, 1982.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B. Óleos Essenciais: o inventário da flora amazônica, In: **Tópicos Especiais em Tecnologia de Produtos Naturais**, Organizadores FARIA, L. J. G.; COSTA, C. M. L., NUMA/POEMA/UFPA, Série POEMA nº 7, p. 302, Belém, 1998.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, M. H. L. da. Óleos essenciais de vassourinha-do-brejo. **Horticultura Brasileira**, v. 18, p. 942, 2000a.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, M. H. L. da. Essential oils from *Conobea scoparioides* (Cham. & Schltdl.) Benth. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 15, p. 413, 2000b.

MAIA, J. G. S.; ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A. Plantas aromáticas na Amazônia e seus óleos essenciais. **Coleção Adolpho Ducke**, Museu Paraense Emílio Goeldi, Belém, 2001.

MAILLARD, M.-N.; BERSET, C. Evolution of antioxidant activity during kilning: Role of insoluble bound phenolic acids of barley and malt. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 1789, 1995.

MANCINI-FILHO, J.; VAN-KOIJ, A.; MANCINI, D. A. P.; COZZOLINO, F. F.; TORRES, R. P. Antioxidant activity of cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*, Breyne) extracts. **Boll. Chim. Farmaceutico**, v. 137, n. 11, p. 443, 1998.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, B.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v. 45, p. 31, 1982.

MILCHARD, M. J. **Essential Oils: Lecture Notes of a Seminar on the Distillation of Essential Oil**. Belém-PA, FCAP, p. 30, 1992.

MILOS, M.; MASTELIC, J.; JERKOVIC, I.; KATALINIC, V. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of oregano (*Origanum vulgare* L.) grown wild in Croatia. **Rivista Italiana Eppos**, v. 12, p. 617, 2000.

MIRANDA, M. S.; SATO, S.; MANCINI-FILHO, J. Antioxidant activity of the microalga *Chlorella vulgaris* cultured on special conditions. **Boll. Chim. Farmaceutico**, v. 140, n. 3, p. 165, 2001.

MORAIS, A. A. de; MOURÃO, J. C.; GOTTLIEB, O. R.; SILVA, M. L. da; MARX, M. C.; MAIA, J. G. S.; MAGALHÃES, M. T. Óleos essenciais da Amazônia contendo timol. **Acta Amazônica**, v. 2, n. 1, p. 45, 1972.

MORRISSEY, P. A.; SHEEHY, P. J. A.; GAYNOR, P. Vitamin E. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, p. 260, 1994.

MOURE, A.; CRUZ, J. M.; FRANCO, D.; DOMÍNGUEZ, J. M.; SINEIRO, J.; DOMÍNGUEZ, H.; NÚÑEZ, M. J.; PARAJO, J. C. Natural antioxidants from residual sources. **Food Chemistry**, v. 72, p. 145, 2001.

MUSZA, L. L.; SPEIGHT, P.; McELHINEY, S.; BARROW, C. J.; GILLUM, A. M.; COOPER, R.; KILLAR, L. M. Cucurbitacins, cell adhesion inhibitors from *Conocarpus scoparioides*. **Journal of Natural Products**, v. 57, p. 1498, 1994.

NAMIKI, M. Antioxidants/antimutagens in food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 29, n. 4, p. 273, 1990.

NAKATANI, N. Natural antioxidants from spices. In: HO, C. T., Lee, C. Y., Huang, M. T. Phenolic compounds in food and their effects on health. Washington : **American Chemical Society**, ACS Symposium Series, n. 507, p. 72, 1992.

NAKATANI, N. Antioxidants from spices and herbs. In: SHAHIDI, F., ed. **Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects and Applications**. Champaign: AOCS Press, p. 64, 1997.

NAGEN, T. J.; ALBUQUERQUE, T. T. O.; MIRANDA, L. C. G. Ácidos fenólicos em cultivares de soja: ação antioxidante. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, v. 35, n. 1, p. 129, 1992.

NAWAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O. R. (Ed.). **Food Chemistry**. 2.ed. New York: Marcel Dekker, p. 139, 1985.

NAWAR, W. W. Lipids. In: FENNEMA, O. R. **Food chemistry**. 3.ed. New York: Marcel Dekker. Food science and technology, p. 225, 1996.

NIKI, E.; NOGUSHI, N.; TSUCHIHASHI, H.; GOTOH, N. Interaction among vitamin C, vitamin E, and β -carotene. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1322, 1995.

OFFORD, E. A.; GUILLOT, F.; AESCHBACH, R.; LÖLIGER, J.; PFEIFER, A. M. A. Antioxidant and biological properties of rosemary components: implications for food and health. In: SHAHIDI, F., ed. **Natural Antioxidants: Chemistry, Health Effects and Applications**. Champaign: AOCS, Press, p. 88, 1997.

OLIVEIRA, A. L. F.; ZACHIS, M.; BRITO, N. R. S.; GUIMARÃES, L. A. S.; LAINETTI, R.; PIRES, F. R. S. Contribuição à farmacognosia de Verbenaceae II – Indicação de bioatividade em extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 73, n. 4, p. 83, 1992.

OMISORE, N. O. A.; ADEWUNMI, C. O.; IWALEWA, E. O.; NGADJUI, B. T.; ADENOWO, T. K.; ABEGAZ, B. M.; OJEWOLE, J. A.; WATCHUENG, J. Antitrichomonal and antioxidant activities of *Dorstenia barteri* and *Dorstenia convexa*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 38, p.1087, 2005.

OOMAH, B. D.; KENASCHUK, E. O.; MAZZA, G. Phenolic acids in flaxseed. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 43, p. 2016, 1995.

PAPAS, A. M. Oil-soluble antioxidants in foods. **Toxicological and Industrial**, v. 9, n. 1/2, p. 123, 1993.

PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD₅₀ value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. **Phytomedicine**, v. 8, n. 5, p. 395, 2001.

PARRY, J. W. Spices: morphology, histology, chemistry. **Chemical**, v. 2, p. 183, 1962.

PELEG, H.; BODINE, K. K.; NOBLE, A. C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses**, v. 23, n. 3, p. 371, 1998.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, v. 67, n. 5, p. 289, 1997.

PRATT, D. E.; MILLER, E. E. A flavonoid antioxidant in spanish peanuts (*Arachia hypogea*). **Journal of American Oil Chemical Society**, v. 61, p. 1064, 1984.

PRATT, D. E. Natural antioxidants from plant material. *In*: HO, C. T., LEE, C. Y., HUANG, M. T. Phenolic compounds in food and their effects on health. Washington: **American Chemical Society**, ACS Symposium Series, n. 507, p. 54, 1992.

PRICE, K. S.; WAGGY, G. T.; CONWAY, R. A. Brine shrimp bioassay and seawater BOD of petrochemicals. **Journal - Water Pollution Control Federation**, v. 46. p.63, 1974.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; BOLWELL, P. G.; BRAMLEY, P. M.; PRIDHAM, J. B. The relative antioxidant activities of plant-derived polyphenolic flavonoids. **Free Radical Research**, v. 22, n. 4, p. 375, 1995.

RILEY, P. A. Free radicals in biology: oxidative stress and the effects of ionizing radiation. **International Journal of Radiation Biology**, v. 65, n. 1, p. 27, 1994.

RODRIGUES, R. M. **A flora da Amazônia**. Belém, CEJUP, p. 462, 1989.

SACCHETTI, G.; MEDICI, A.; MAIETTI, S.; RADICE, M.; MUZZOLI, M.; MANFREDINI, S.; BRACCIOLI, E.; BRUNI, R. Composition and functional properties of the essential oil of amazonian basil, *Ocimum micranthum* Willd., Labiatae in comparison with commercial essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 3486, 2004.

SANTOS, A. S.; ANDRADE, E. H. A.; ZOGHBI, M. G. B.; LUZ, A. I. R.; MAIA, J. G. S. Sesquiterpenes on Amazonian Piper Species. **Acta Amazonica**, v. 28, n. 2, p. 127, 1998.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic antioxidants. **Critical Reviews of Food Science & Nutrition**, v. 32, n. 1, p. 67, 1992.

SHELEF, L. A. Antimicrobial effects os spices. **Journal of Food Safety**, v. 6, n. 1, p. 29, 1983.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, v. 215, n. 2, p. 213, 1993.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315, 1995.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, v. 22, n. 1, 1999.

SOLIS, P.N.; WRIGHT, C.W.; ANDERSON, M.M.; GRUPTA, M.P.; PHILLIPSON, J.D. A microwell cytotoxicity assay using *Artemia salina* (Brine Shrimp). **Planta Medica**, v.59, p.250, 1993.

SORGELOOS, P.; REMICHE-VAN DER WIELEN, C.; PERSOONE, G. The use of *Artemia nauplii* for toxicity tests a critical analysis. **Ecotoxicology and environmental safety**, v. 2, p. 249, 1978.

ST. ANGELO, A. J. Lipid oxidation on foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**. v. 36, p. 175, 1996.

STASHENKO, E. E.; JARAMILLO, B. E.; MARTINEZ, J. R. Comparison of different extraction methods for the analysis of volatile secondary metabolites of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown, grown in Colombia, and evaluation of its in vitro antioxidant activity. **Journal of Chromatography**, n. 1025, p. 93, 2004.

TROTTER, R.T.; LOGAN, M.H.; ROCHA, J.M.; BONETA, J.L. Ethnography and bioassay: combined methods for a preliminary screen of home remedies for potential harmacological activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.8, p.113, 1983.

TSIMIDOU, M.; BOSKOU, D. Antioxidant activity of essential oils from the plants of the Lamiaceae family. In G. Charalambous, Editor, **Spices, herbs and edible fungi (Developments in Food Science, 34)**, p. 273, 1994.

VARDAR-ÜNLÜ, G.; CANDAN, F.; SÖKMEN, A.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SÖKMEN, M.; DÖNMEZ, E.; TEPE, B. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pestinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, n. 51, p. 63, 2003.

WANASUNDARA, P. K. J. P. D.; SHAHIDI, F.; SHUKLA, V. K. S. Endogenous antioxidants from oilseeds and edible oils. **Food Research International**, v. 13, n. 2, p. 225, 1997.

WANASUNDARA, U. N.; SHAHIDI, F. Antioxidant and pro-oxidant activity of green tea extracts in marine oils. **Food Chemistry**, v. 63, n. 3, p. 335, 1998.

WEIJL, N. I.; CLETON, F. J.; OSANTO, S. Free radicals and antioxidants in chemotherapy-induced toxicity. **Cancer Treatment Reviews**, v. 23, n. 4, p. 209, 1997.

WINK, M. Physiology of Secondary Product Formation in Plants. In: **Secondary Products from Plant Tissue Culture**, Ed. Charlwood, B. V. & Rhodes, M. J. C., p. 23, 1990.

YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; TERUYOSHI, M.; TERAOKA, J. HPLC Method for evaluation of the free radical-scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazil. **Bioscience Biotechnol Biochemistry**, v. 62, p. 1201, 1998.

YANISHLIEVA, N. V.; MARINOVA, E. M. Effects of antioxidants on the stability of triacylglycerols and methyl esters of fatty acids of sunflower oil, **Food Chemistry**, v. 54, p. 377, 1995.

YANISHLIEVA, N. V.; MARINOVA, E. M.; GORDON, M. H.; RANEVA, V. G. Antioxidant activity and mechanism of action of thymol and carvacrol in two lipid systems, **Food Chemistry**, v. 64, p. 59, 1999.

YU, T-W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, v. 379, n. 2, p. 201, 1997.

ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; SILVA, M. H. L.; MAIA, J. G. S.; LUZ, A. I. R.; SILVA, J. D. Chemical variation in the essential oils of *Hyptis crenata* Pohl ex Benth. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 5, 2002.