



VANUZIA RODRIGUES FERNANDES FERREIRA

**AVALIAÇÃO COLORIMÉTRICA, ELETROANALÍTICA E
TEÓRICA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ÓLEOS
ESSENCIAIS E SEUS CONSTITUINTES MAJORITÁRIOS**

**LAVRAS, MG
2018**

VANUZIA RODRIGUES FERNANDES FERREIRA

**AVALIAÇÃO COLORIMÉTRICA, ELETROANALÍTICA E TEÓRICA DA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS CONSTITUINTES
MAJORITÁRIOS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/ Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora
Profa. Dra. Adelir Aparecida Saczk
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2018**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Ferreira, Vanuzia Rodrigues Fernandes.

Avaliação colorimétrica, eletroanalítica e teórica da atividade antioxidante de óleos essenciais e seus constituintes majoritários / Vanuzia Rodrigues Fernandes Ferreira. - 2018.

117 p. : il.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Coorientador(a): Adelar Aparecida Saczk.

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Lavras, 2018.

Bibliografia.

1. Estresse oxidativo. 2. Peroxidação lipídica. 3. Syzygium Aromaticum. I. Cardoso, Maria das Graças. II. Saczk, Adelar Aparecida. III. Título.

VANUZIA RODRIGUES FERNANDES FERREIRA

**AVALIAÇÃO COLORIMÉTRICA, ELETROANALÍTICA E TEÓRICA DA
ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE ÓLEOS ESSENCIAIS E SEUS CONSTITUINTES
MAJORITÁRIOS**

**COLORIMETRIC, ELETROANALITIC AND THEORETICAL EVALUATION OF
THE ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ESSENTIAL OILS AND ITS MAJORITY
CONSTITUENTS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Química/ Agroquímica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 19 de Fevereiro de 2018
Dr. Matheus Puggina de Freitas, UFLA
Dra. Fabiana da Silva Felix, UFLA
Dra. Maria Graça Costa Miguel, UAlg FCT

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora
Profa. Dra. [Adelir Aparecida Saczk](#)
Coorientadora

**LAVRAS - MG
2018**

A Jesus, Autor e Consumador de minha fé, que até aqui tem me ajudado!!!

Ao meu querido marido, Marcelo, pela paciência, apoio e compreensão, por acreditar e sonhar junto comigo!!!

Aos meus pais, Waldemir e Maria, por me darem a vida e o incentivo!!!

Às minhas irmãs, Drielle e Raquel, por me apoiarem nesta jornada, pela amizade e cumplicidade!!!

À minha orientadora Profa. Maria das Graças Cardoso, pelos ensinamentos, confiança, carinho, amizade e pelo exemplo de professora!!!

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar a vida e me sustentar em todos os meus caminhos, por me permitir realizar meus sonhos e objetivos, abrindo portas que ninguém foi capaz de fechar.

À Universidade Federal de Lavras, que me proporcionou formação de excelência, ao departamento de química e a todos os professores que marcaram minha trajetória com ensinamentos que foram além das salas de aula.

Aos órgãos de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) e Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo apoio e suporte financeiro.

Ao meu marido, Marcelo, por estar sempre ao meu lado, pelo cuidado e carinho, pelo amor mesmo nos dias difíceis, pelo apoio e incentivo e por comemorar comigo cada vitória. Esta conquista também te pertence!

A toda minha família que, de longe ou de perto, me acompanha e apoia os meus sonhos, por orarem por mim e me darem forças quando penso que não irei conseguir.

Em especial, agradeço à professora Dra. Maria das Graças, pelos muitos ensinamentos, pela oportunidade, pelo carinho com que me recebeu e pela confiança depositada em mim, pela amizade e por me orientar não apenas profissionalmente, mas para a vida. Guardarei seus ensinamentos comigo.

À Professora Dra. Adelir Aparecida Saczk, por aceitar me coorientar, por me dar a oportunidade de expandir meus conhecimentos em uma nova área, pelo carinho e confiança.

À professora Dr. Fabiana da Silva Félix pelos ensinamentos, paciência e por toda a ajuda durante os experimentos eletroanalíticos.

Ao professor Dr. Matheus Puggina de Freitas, por abrir as portas do seu laboratório, juntamente com o Dr. Josué Mariani Silla, pelo suporte durante os cálculos teóricos; vocês, certamente abrilhantaram meu trabalho.

Aos membros da banca examinadora, por contribuírem com o trabalho, engrandecendo-o e tornando-o melhor.

À Dra. Lidiany Zacaroni, pelas análises cromatográficas dos óleos essenciais que foram realizadas no Centro de Análise e Prospecção e Química - CAPQ.

À Dra. Maria Luisa Teixeira, por todo o apoio experimental e estatístico e pela amizade e companheirismo.

Ao Lemaf (Laboratório de Estudos e Projetos em Manejo Florestal), em especial ao Professor Dr. José Roberto Scolforo e a Dra. Thiza Falqueto, por ceder o cerne da madeira de candeia. E ao Horto de plantas medicinais, pelo auxílio na coleta do material vegetal.

Aos amigos do Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais e de Análise de Qualidade de Aguardente, Cleusa, Maísa, Letícia, Eduarda, Wilder, Gabriel, Manuel, Gustavo, Richard, Allan, Alex. Em especial, à Rafaela Brandão, Rafaela Vieira, Karen, Luana, Jéssica e Danúbia, pelo companheirismo, paciência, pelo auxílio antes, durante e após a execução do experimento, pela boa convivência e pela amizade e por serem uma família para mim.

Aos colegas do Laboratório de Eletroanalítica Matheus, Samuel, Luiz, Thalyta e Milena, pela boa convivência e por me auxiliarem durante os ensaios eletroanalíticos. Em especial, à Camila, por todo o suporte e auxílio.

Às minhas irmãs de mestrado, Karen e Rafaela Vieira, pelas muitas horas de estudo, pelas discussões, risadas, anseios e pelas conquistas.

Aos professores do programa de pós-graduação em Agroquímica e aos funcionários do Departamento de Química, por toda a atenção e pela ajuda prestada.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização de mais um sonho!

RESUMO

Os processos oxidativos e as espécies reativas de oxigênio são responsáveis por inúmeras patologias, além de perdas econômicas nas indústrias alimentícias e cosméticas. É crescente o número de aditivos químicos, medicamentos e suplementos à base de substâncias antioxidantes, que retardam ou inibem tais processos, por serem capazes de estabilizar ou inibir a formação de radicais livres. Os antioxidantes mais utilizados são os sintéticos butil hidroxianisol (BHA), 2,6-ditertbutil-4-hidroxitolueno (BHT) e galato de propila (PQ); além desses, a indústria faz uso do ácido ascórbico e α -tocoferol. Entretanto, a busca por maior qualidade de vida, tem impulsionado as pesquisas no sentido de substituir ou associar os sintéticos aos produtos de origem natural. Existem vários compostos de origem natural que apresentam as características requeridas de um bom antioxidante, destacando-se entre eles os compostos fenólicos, taninos, alcaloides, antocianinas e os óleos essenciais. Os óleos essenciais, metabolitos secundários, produzidos pelas plantas, têm atraído a atenção devido à sua complexa constituição química, podendo atuar na estabilização de radicais livres ou na sua inibição. No presente trabalho, teve-se como objetivos extrair e caracterizar quimicamente os óleos essenciais de cravo-da-índia, orégano, hortelã e candeia, bem como avaliar a atividade antioxidante dos mesmos e de seus constituintes majoritários, eugenol, carvacrol, carvona e α -bisabolol, respectivamente, utilizando métodos de análise colorimétrico, eletroanalítico e teórico. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação utilizando-se um aparelho de Clevenger modificado, por um período de duas horas. Os óleos essenciais foram identificados por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas e quantificados por cromatografia gasosa acoplada a detector de ionização de chamas. A avaliação colorimétrica da atividade antioxidante foi realizada mediante os ensaios de estabilização de radicais DPPH, proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico, sequestro de radicais hidroxila e poder redutor em relação a íons Fe^{+3} . A técnica de voltametria cíclica foi utilizada para avaliar o comportamento eletroquímico das amostras e o seu efeito quelante sobre íons Fe^{+2} , tendo carbono vítreo como eletrodo de trabalho, fio de platina como auxiliar e Ag/ AgCl como eletrodo de referência. As avaliações foram realizadas em meio de tampão fosfato (pH 7,4) e sulfato de sódio (pH 5,0) como eletrólitos, respectivamente. A entalpia de dissociação da ligação OH foi calculada, após a otimização das estruturas pelo método DFT/ ω B97X-D. Foram realizados cálculos de frequência para obtenção dos valores de entalpia padrão e correções de energia no ponto zero. A entalpia de solvatação foi obtida a partir do ciclo termodinâmico. Foi possível observar que os óleos essenciais de cravo-da-índia e orégano, juntamente com seus majoritários eugenol e carvacrol, apresentaram respostas antioxidantes semelhantes aos sintéticos, ácido ascórbico e BHT, sendo que eugenol e o óleo essencial de cravo exibiram melhores resultados que carvacrol e óleo de orégano. Os demais óleos e seus majoritários não apresentaram características de moléculas antioxidantes. De toda a avaliação, pode-se concluir que o eugenol é uma molécula promissora para a substituição ou associação com os antioxidantes utilizados no mercado.

Palavras-chave: Estresse oxidativo. Peroxidação lipídica. *Syzygium Aromaticum*. *Origanum Vulgare* L. *Mentha spicata* L. *Eremanthus erythropappus*.

ABSTRACT

Oxidative processes and reactive oxygen species are responsible for numerous pathologies and economic losses in the food and cosmetic industries. The number of chemical additives, drugs and supplements based on antioxidants, which slow or inhibit such processes, are increasing because they are capable of stabilizing or inhibiting the formation of free radicals. The most widely used antioxidants are the synthetic butyl hydroxyanisole (BHA), 2,6-di-*tert*-butyl-4-hydroxytoluene (BHT) and propyl gallate (PQ). In addition, the industry also uses ascorbic acid and α -tocopherol. However, the quest for a better quality of life has driven research to replace or associate synthetic products with products of natural origin. There are several compounds of natural origin that have the characteristics required of a good antioxidant, among them phenolic compounds, tannins, alkaloids, anthocyanins and essential oils. Essential oils, secondary metabolites produced by plants, have attracted attention because of their complex chemical compositions, and they can act in the stabilization or inhibition of free radicals. The objective of the present work was to extract and characterize the essential oils from clove, oregano, spearmint and candeia, as well as to evaluate the antioxidant activities of these oils and their major constituents: eugenol, carvacrol, carvone and α -bisabolol, respectively, using colorimetric, electroanalytical and theoretical methods. The essential oils were extracted by hydrodistillation using a modified Clevenger apparatus for a period of two hours. They were identified and quantified by gas chromatography coupled to a mass spectrometer and a flame ionization detector. The colorimetric evaluation of the antioxidant activity was accomplished by means of the stabilization of DPPH radicals, protection of the β -carotene/linoleic acid system, sequestration of hydroxyl radicals and reducing power in relation to Fe^{+3} ions. The cyclic voltammetry technique was used to evaluate the electrochemical behavior of the samples and their chelating effect on Fe^{+2} ions. Vitreous carbon was used as the working electrode, platinum wire as the auxiliary electrode and Ag/AgCl as the reference electrode. The evaluations were performed in phosphate buffer (pH 7.4) and sodium sulfate (pH 5.0) as supportive electrolytes, respectively. The enthalpy of dissociation of the OH bond was calculated after the optimization of the structures by the DFT/ ω B97X-D method. Frequency calculations were performed to obtain standard enthalpy values and zero point energy corrections. The enthalpy of solvation was obtained from the thermodynamic cycle. The essential oils of clove and orégano, along with their principal eugenol and carvacrol components, presented antioxidant responses similar to those of the synthetic products, ascorbic acid and BHT. Eugenol and the essential oil from clove yielded better results than those carvacrol and oil of oregano. The other oils and their principal components did not present antioxidant characteristics. Eugenol was shown to be a promising molecule for substitution or association with the antioxidants used in the market.

Keywords: Oxidative stress., Lipid peroxidation, *Syzygium Aromaticum*, *Origanun vulgare* L., *Mentha spicata* L., *Eremanthus erythropappus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Redução tetravalente do oxigênio molecular.....	19
Figura 2 - Interação do íon Fe^{+2} com oxigênio molecular.....	20
Figura 3 - Etapas da peroxidação lipídica	21
Figura 4 -Estrutura química dos antioxidantes não enzimáticos (a), naturais (b) e sintéticos (c)	24
Figura 5 -Metabolismo da glicose, vias do chiquimato e acetato.....	26
Figura 6- Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP), pela via do mevalonato. (Continua)	27
Figura 7- Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP), pela via da 1-deoxi-D-xilulose-5 fosfato (DXPS). (Continua).....	29
Figura 8 - Formação dos precursores terpênicos pela condensação cabeça-cauda dos precursores básicos dos terpenos IPP e DMAPP	31
Figura 9- Formação de compostos fenilpropanoides.....	32
Figura 10 - Estrutura química do Carvacrol, Timol e Eugenol	36
Figura 11 - Estrutura química dos terpenoides Carvona e α -bisabolol	38
Figura 12- Aspecto geral da espécie <i>Syzygium Aromaticum</i>	39
Figura 13- Aspecto geral de <i>Origanun vulgare</i> L.	40
Figura 14- Aspecto geral de <i>Mentha spicata</i> L.	42
Figura 15- Aspecto geral de <i>Eremanthus erythropappus</i> M.	43
Figura 16 - Sinal de aplicação de potencial no tempo e voltamogramas para voltametria cíclica	48
Figura 17 - Visão lateral de um sistema eletródico	49
Figura 18 - Interação da hemoglobina com íons Fe^{+2}	51
Figura 19 - Cromatograma do óleo essencial de cravo-da-índia.....	64
Figura 20 - Estrutura dos constituintes químicos majoritários do óleo essencial de cravo-da-índia	65
Figura 21 - Cromatograma do óleo essencial de orégano	65
Figura 22 - Estruturas dos constituintes majoritários do óleo essencial de orégano	67
Figura 23- Cromatograma do óleo essencial de hortelã	68
Figura 24- Estruturas químicas dos constituintes majoritários do óleo essencial de hortelã ...	69
Figura 25- Cromatograma para o óleo essencial de candeia	70
Figura 26- Estrutura dos constituintes majoritários do óleo de candeia.....	71
Figura 27- Reação de estabilização de radicais DPPH por doação de átomos de hidrogênio..	73
Figura 28- Mecanismo de reação de estabilização de DPPH por eugenol	74
Figura 29- Mecanismo de proteção de peroxidação e proteção lipídica	77
Figura 30- Estabilização de radicais hidroxila: Doação de átomos de hidrogênio e/ou efeito quelante.....	79
Figura 31- Efeito da concentração das amostras na formação do azul da prússia.....	80
Figura 32- Mecanismo de redução de íons ferro	82
Figura 33- Voltamogramas cíclicos em eletrodo de carbono vítreo à velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}	84

Figura 34- Proposta de mecanismo de oxidação do ácido ascórbico (I), eugenol (II) e carvacrol (III)	86
Figura 35- Voltamogramas cíclicos ilustrativos do efeito quelante de carvacrol e óleo essencial de orégano.....	89
Figura 36- Relação entre a corrente de oxidação de Fe ⁺² e a concentração das amostras.....	90
Figura 37- Estrutura química da rapanona	91
Figura 38- Variação da corrente de ferro (II) com relação à concentração	92
Figura 39 - Estruturas tridimensionais otimizadas em nível ωB97X-D/6-31+G(d,p), em fase gasosa. Geometrias similares foram obtidas em água implícita.....	94
Figura 40- Estruturas de ressonância para o ácido ascórbico desprotonado	96

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Rendimento em Base Livre de Umidade dos óleos essenciais	61
Tabela 2 - Caracterização química do óleo essencial de cravo-da-índia.....	64
Tabela 3 - Caracterização química do óleo essencial de orégano	66
Tabela 4 - Caracterização química do óleo essencial de hortelã	68
Tabela 5- Caracterização química do óleo essencial de candeia	70
Tabela 6- Porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais e seus constituintes majoritários: estabilização de radicais DPPH.....	72
Tabela 7- Porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais e seus constituintes majoritários: sistema β -caroteno/ ácido linoleico.....	75
Tabela 8- Porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais e seus constituintes majoritários: estabilização de radicais hidroxila	78
Tabela 9- Relação entre as inclinações de reta e a atividade antioxidante das amostras	81
Tabela 10- Potenciais e corrente de oxidação para os óleos essenciais e seus respectivos constituintes majoritários.....	87
Tabela 11- Entalpia padrão em fase gasosa e água implícita (ΔH° , kcal mol ⁻¹) e entalpia de solvatação ($\delta\Delta H^*S$, kcal mol ⁻¹), calculadas para os equilíbrios 1-5, em nível $\omega B97X-D/6-31+G(d,p)$	94

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
2 REFERENCIAL TEÓRICO	17
2.1 Processos Oxidativos: Ação de Radicais Livres.....	17
2.2 Mecanismo de Formação de Radicais Livres	18
2.3 Peroxidação Lipídica	20
2.4 Sistema de Defesa Antioxidante.....	22
2.5 Óleos Essenciais	25
2.5.1 Óleos Essenciais e Suas Aplicações de Mercado	32
2.5.2 Atividade Antioxidante dos Óleos Essenciais	33
2.5.3 Constituintes Químicos de Óleos Essenciais de Importância Farmacológica e Industrial	36
2.6 Cravo-da-índia (<i>Syzygium aromaticum</i>).....	39
2.7 Oregão (<i>Origanum vulgare</i> L.)	40
2.8 Hortelã (<i>Mentha spicata</i> L.)	41
2.9 Candeia (<i>Eremanthus erythropappus</i> M.)	42
2.10 Avaliação da atividade antioxidante.....	43
2.10.1 Métodos Colorimétricos	44
2.10.2 Métodos Eletroquímicos.....	46
2.10.3 Efeito Quelante Sobre Íons Ferro (II).....	50
2.10.4 Cálculos Teóricos	52
3 MATERIAL E MÉTODOS	53
3.1 Material Vegetal	53
3.2 Extração dos Óleos Essenciais	53
3.3 Determinação da umidade	54
3.4 Identificação e Quantificação dos Constituintes Químicos dos Óleos Essenciais	54
3.5 Atividade Antioxidante: Diluição das Amostras	55
3.6 Atividade Antioxidante: Sequestro de Radicais Livre DPPH	56
3.7 Atividade Antioxidante: Sistema β -caroteno/ ácido linoleico.....	56
3.8 Determinação da Atividade Antioxidante: Radical Hidroxila.....	57
3.9 Atividade Antioxidante: Poder Redutor	58
3.10 Atividade Antioxidante: Voltametria Cíclica	58
3.11 Atividade Antioxidante: Determinação do efeito quelante sobre íons Fe^{+2}	59

3.12 Cálculos Teóricos: Entalpia de dissociação	60
3.13 Análise Estatística	60
4 RESULTADOS E DISCUSSÕES	61
4.1 Rendimento dos Óleos Essenciais	61
4.2 Identificação e Quantificação Química dos Constituintes Presentes nos Óleos Essenciais de cravo-da-índia, orégano, hortelã e candeia	63
4.3 Atividade Antioxidantes dos Óleos Essenciais e seus Constituintes Majoritários: Avaliação Colorimétrica.....	71
4.3.1 Atividade Antioxidante: Estabilização de Radicais Livres: DPPH.....	71
4.3.2 Atividade Antioxidante. Peroxidação lipídica: Sistema β -caroteno/ ácido linoleico ..	75
4.3.3 Atividade Antioxidante: Estabilização de radicais Hidroxila	77
4.3.4 Atividade Antioxidante: Redução de íons Fe^{+2} : Poder Redutor.....	80
4.4 Atividade antioxidantes dos óleos essenciais e seus constituintes majoritários: Avaliação Eletroanalítica.....	82
4.4.1 Atividade Antioxidante: Voltametria Cíclica.....	82
4.4.2 Atividade Antioxidante: Efeito Quelante sobre íons Fe^{+2}	88
4.5 Avaliação da Atividade Antioxidante: Cálculos Teóricos de Entalpia de Dissociação das Moléculas	93
5 CONCLUSÃO	97
REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS	98
APÊNDICE	111

1 INTRODUÇÃO

Reações de oxidação são comuns na natureza, nos organismos vivos e nos produtos sintéticos e industrializados. São de extrema importância no processo de síntese de muitos produtos biologicamente ativos na produção de energia, de macromoléculas e na regulação do metabolismo animal e vegetal. Durante as reações de oxidação, há formação de intermediários conhecidos como radicais livres.

Radicais livres apresentam alta reatividade devido a uma deficiência eletrônica. O fato de reagirem prontamente faz com que essas moléculas sejam essenciais para o bom funcionamento do organismo vivo. São muitas as ações exercidas ou favorecidas por radicais livres, destacando-se o fato de serem sinalizadores de muitas reações biológicas, participarem ativamente da produção de energia na forma de ATP, atuarem no sistema imunológico durante processos infecciosos. Apesar de serem normais ao metabolismo e de possuírem efeitos benéficos, os radicais livres são indesejáveis e combatidos, pois em excesso reagem com macromoléculas, danificando-as e contribuindo para o desenvolvimento de muitas enfermidades, além de causar a deterioração de muitos produtos industriais.

Nos organismos vivos, os radicais livres produzidos são eliminados pelo sistema de defesa antioxidante que impede lesões celulares por meio da neutralização desses radicais e da reparação dos possíveis danos causados à célula. O excesso de radicais livres ou a deficiência no sistema de defesa antioxidante leva o organismo a um estado de estresse oxidativo em que espécies reativas de oxigênio e nitrogênio interagem com biomoléculas, provocando vários danos, que vão desde lesões celulares, necrose até a morte celular. Esses danos contribuem para o desenvolvimento de várias patologias, como câncer, aterosclerose e doenças neurodegenerativas, além de contribuir no processo de envelhecimento.

Na indústria, o excesso de radicais livres leva à deterioração de muitos produtos e a grandes perdas econômicas. Por esse motivo, a indústria também utiliza um sistema de defesa antioxidante quando adicionam a seus produtos agentes antioxidantes que neutralizam os radicais livres formados pela exposição dos produtos à luz, ao oxigênio do ar e ao calor. Os antioxidantes mais utilizados pela indústria são os sintéticos butil-hidroxi-anisol (BHA), 2,6-di-tertbutil-4-hidroxitolueno (BHT), tertbutil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG).

A toxicidade dos antioxidantes sintéticos tem impulsionado a pesquisa para a descoberta de novos agentes antioxidantes de origem natural. Uma das fontes para essa descoberta são os óleos essenciais, metabólitos secundários produzidos pelas plantas e obtidos por destilação por

arraste a vapor ou expressão dos pericarpos de frutos cítricos, que apresentam inúmeras atividades biológicas, entre elas, a atividade antioxidante.

A atividade antioxidante dos óleos essenciais é atribuída aos seus constituintes químicos derivados de fenilpropanoides e terpenoides com características fenólicas, que apresentam em suas estruturas elétrons ou átomos de hidrogênio disponíveis para doação aos radicais livres. Muitas espécies vegetais possuem óleos essenciais ricos nesse tipo de composto, como o cravo-da-índia (*Syzygium Aromaticum*) e o orégano (*Origanum Vulgare* L.), que possuem comprovada capacidade antioxidante. Além dessas espécies, pode-se citar o óleo essencial de hortelã (*Mentha spicata* L.) e de candeia (*Eremanthus erythropappus*), espécies que, de acordo com a literatura, podem exibir alguma atividade por serem constituídas de sesquiterpenos oxigenados.

A determinação da atividade antioxidante não pode ser representada por um único teste, uma vez que vários mecanismos estão envolvidos em tal processo. Dessa forma, diversas metodologias de análise são utilizadas durante os estudos, e cada vez mais novas metodologias têm sido desenvolvidas a fim de elucidar e compreender a capacidade antioxidante total de várias espécies químicas. Entre os métodos utilizados, citam-se os colorimétricos, que são clássicos e se utilizam da variação na resposta de absorvância do sistema na presença de um agente antioxidante. Por envolver transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio, a capacidade antioxidante também tem sido avaliada por técnicas eletroquímicas, como a voltametria cíclica, que avalia a capacidade da substância em sofrer processos redoxes. Outra forma de se avaliar tal característica é por meio da química computacional, em que empregando-se cálculos teóricos e parâmetros físico-químicos, é possível inferir sobre a facilidade na doação de átomos de hidrogênio e/ou elétrons com base na estabilidade dos radicais formados após o processo.

No presente trabalho, teve-se como objetivos: extrair e caracterizar os óleos essenciais de cravo-da-índia, orégano, hortelã e candeia, bem como avaliar a atividade antioxidante por meio de métodos colorimétricos, eletroanalíticos e teóricos dos óleos essenciais, juntamente com seus constituintes majoritários eugenol, carvacrol, carvona e α -bisabolol.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Processos Oxidativos: Ação de Radicais Livres

Reações de oxidação e redução estão presentes em toda parte, nos organismos animais ou vegetais, nos alimentos e nos diversos materiais utilizados no cotidiano. Essas reações fazem parte da vida e são extremamente importantes em processos fisiológicos. Durante o desenvolvimento de tais reações, ocorre a formação de espécies indispensáveis; porém, muitas vezes indesejáveis, que são denominadas radicais livres.

Radicalis livres são átomos ou espécies altamente reativas, devido à sua deficiência eletrônica e ao desemparelhamento de elétrons na camada de valência. Em geral, a formação de radicalis livres ocorre da interação de certas moléculas com o oxigênio. No corpo humano, reações fisiológicas que ocorrem em aerobiose, como a respiração celular, na mitocôndria são as grandes responsáveis pela geração dessas espécies. Além da mitocôndria, radicalis livres podem ser formados em membranas celulares e no citosol. Existem outras fontes internas de geração dessas espécies, como a enzima xantina oxidase, as organelas peroxissomas, os processos inflamatórios e de fagocitose e os caminhos de araquidonato (síntese de ácido araquidônico). Fontes externas também contribuem para sua formação, entre elas destacam-se o exercício físico, fumaça de cigarro, poluentes ambientais, radiação, drogas/medicamentos, íons metálicos, pesticidas, solventes industriais e ozônio (BARBOSA et al., 2010; FERREIRA; ABREU, 2007; LOBO et al., 2010; RAHMAN, 2007).

Quando em quantidade controlada, os radicalis livres efetuam um importante papel nas reações biológicas em animais. São sinalizadores de reações, que atuam na transferência de elétrons. Auxiliam na produção de energia, na forma de ATP, pela cadeia transportadora de elétrons, na fertilização de óvulos, na ativação de genes e no mecanismo de defesa em processos de infecção (BARBOSA et al., 2010).

Em tecidos vegetais, a enzima lipoxigenase catalisa a adição de oxigênio a ácidos graxos polinsaturados, levando à formação de hidroperóxidos. A ação dessa enzima está associada a importantes processos fisiológicos, como biossíntese de compostos regulatórios, crescimento e desenvolvimento da planta, germinação de sementes e resposta a ferimentos. Essa enzima também é extremamente importante durante o desenvolvimento de aromas em vegetais. Entretanto, a lipoxigenase catalisa oxidações lipídicas em alimentos, principalmente em sementes oleaginosas, levando-os à deterioração. Em animais, a lipoxigenase atua na oxidação de ácidos graxos, tendo o ácido araquidônico como principal substrato, contribui para a

formação de vários componentes regulatórios, como leucotrienos e lipoxinas. As lipoxigenases do sistema animal atuam em processos inflamatórios e como agentes imunológicos por meio da formação de espécies radicalares (BATISTA et al., 2002; ROSAHL, 1996).

Apesar de serem essenciais ao metabolismo vegetal e animal, os radicais livres, quando em excesso, reagem com moléculas importantes como lipídeos de membranas, proteínas e ácido desoxirribonucleicos (DNA). Em animais, a interação dos radicais livres com essas moléculas, contribui para o desenvolvimento de diversas patologias como câncer, doenças cardiovasculares, aterosclerose, hipertensão, lesão por isquemia/reperfusão, diabetes mellitus, doenças neurodegenerativas (Alzheimer e Parkinson) e artrite reumatoide, atuam também no processo de envelhecimento (FERREIRA; ABREU, 2007; LOBO et al., 2010; MCCORD, 2000; RAHMAN, 2007).

Além de efeitos maléficos à saúde, os radicais livres contribuem para grandes perdas econômicas na indústria de alimentos, uma vez que essas espécies são responsáveis por reações de rancificação e conseqüente deterioração de alimentos ricos em lipídeos. A oxidação lipídica causa alterações na cor, sabor, aroma e consistência dos alimentos, além de diminuir o valor nutricional dos mesmos e contribuir para formação de compostos prejudiciais à saúde (WOMENI et al., 2016).

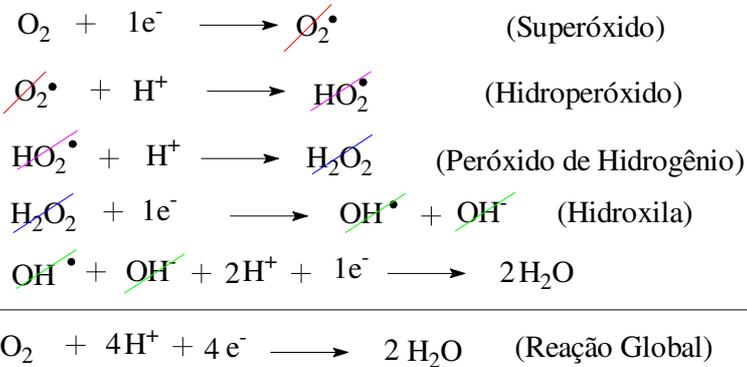
2.2 Mecanismo de Formação de Radicais Livres

Radicalares livres são formados durante reações de oxidação e redução, e na maioria dos casos, sua formação se inicia com os radicalares provenientes do metabolismo do oxigênio molecular, dando origem às espécies reativas de oxigênio (ERO), ou por meio do metabolismo do nitrogênio formando as espécies reativas de nitrogênio (ERN) (APRIOKU, 2013; FERREIRA; ABREU, 2007).

Durante o metabolismo, o oxigênio molecular sofre redução tetravalente para formação de moléculas de água. Entretanto, no decorrer dessa reação, há a formação de intermediários radicalares, como o ânion superóxido (O_2^-), hidroperóxidos (O_2H^\cdot) e hidroxila (OH^\cdot). Ocorre também a formação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), que apesar de não ser um radical livre, participa de reações que levam à formação de radicalares hidroxila por meio de interações com metais de transição, como ferro e cobre (APRIOKU, 2013). O peróxido de hidrogênio consegue atravessar membranas, e interage com proteínas exibindo alta toxicidade à célula (FERREIRA;

MATSUBARA, 1997). A redução tetravalente do oxigênio molecular, bem como a formação dos intermediários, está ilustrada na Figura 1.

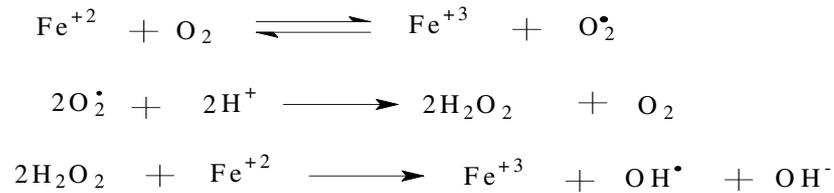
Figura 1 - Redução tetravalente do oxigênio molecular



Fonte: Adaptado de Ferreira e Matsubara (1997)

Entre os intermediários radicalares, o radical hidroxila é o mais reativo, pois se combina rapidamente com metais ou outros radicais, inativa proteínas e enzimas, além de iniciar a peroxidação lipídica em ácidos graxos de membrana. Quando produzido próximo ao DNA, esse radical pode levar a alterações nas bases purínicas e pirimidínicas, causando inativação ou mutação na molécula do DNA. O radical hidroperóxido é o segundo mais reativo e contribui para a destruição de membranas biológicas. O superóxido não é um radical muito reativo, mas apresenta elevada toxicidade para a célula, estando associado a lesões biológicas secundárias (MCCORD, 2000). Apesar das ERO serem mediadoras de várias patologias, sua formação nem sempre é prejudicial, pois durante infecções bacterianas essas espécies são produzidas para destruir microrganismos (APRIOKU, 2013; FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Ao longo dos anos, estudos têm demonstrado que a ação nociva das ERO é catalisada por metais como cobre e ferro, sendo o ferro mais importante nesse contexto, por ser o metal mais abundante e o que mais contribui na catálise das oxidações de biomoléculas (APRIOKU, 2013; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; KELL; PRETORIUS, 2014). A interação do ferro com o oxigênio molecular e com as ERO está apresentada na Figura 2.

Figura 2 - Interação do íon Fe^{+2} com oxigênio molecular

Fonte: Ferreira; Matsubara (1997).

A catálise de danos oxidativos por metais pode ser evidenciada no traumatismo craneiocefálico, quando há liberação de ferro intracelular devido à incapacidade de ligação Fe-proteína e/ou deficiência de enzimas antioxidantes. Isso pode levar à formação de espécies reativas de oxigênio e ampliar os riscos de lesão pós-trauma. Lesões com sangramento e consequente liberação de hemoglobina e ferro também favorecem a formação dessas espécies, como em casos de tumores e na artrite reumatoide (FERREIRA; MATSUBARA, 1997; KELL; PRETORIUS, 2014).

As espécies reativas de nitrogênio (ERN) constituem outro grupo importante de radicais livres. Dentro desse grupo, o óxido nítrico (NO^\bullet) é a principal espécie envolvida em processos como neurotransmissão, regulação da pressão sanguínea, mecanismos de defesa e regulação da resposta imunológica. O óxido nítrico é formado em tecidos biológicos durante o metabolismo da arginina a citrulina. Durante processos inflamatórios, reage com ânions superóxidos para a formação do ânion peroxinitrilo (ONOO^-), que atua como potente agente oxidante, provocando quebras de DNA e peroxidações lipídicas. O excesso dessas espécies contribui para a nitrosilação de proteínas e sua consequente perda de função (FERREIRA; ABREU, 2007).

2.3 Peroxidação Lipídica

Peroxidação lipídica é um processo, pelo qual radicais livres ou espécies não radicalares atacam lipídios, óleos ou ácidos graxos polinsaturados, gerando novos tipos de radicais como produto da degradação desses compostos. Esse processo ocorre tanto nos organismos vivos como nos alimentos e é desencadeado quando há um excesso de radicais livres.

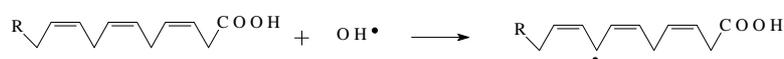
A peroxidação lipídica constitui um problema para a indústria alimentícia, uma vez que desencadeia a deterioração de alimentos nos diversos processos industriais, como armazenamento, processamento e tratamento térmico de matérias-primas e no armazenamento de produtos finais. Favorece a diminuição da qualidade e da vida de prateleira dos alimentos,

além de formar compostos que causam efeitos negativos no sabor, odor e no valor nutricional (HAJJI et al., 2010). No organismo humano, a peroxidação lipídica favorece o aparecimento de disfunções e patologias; dependendo do nível, desencadeiam morte celular e necroses (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014; YIN; XU; PORTER, 2011).

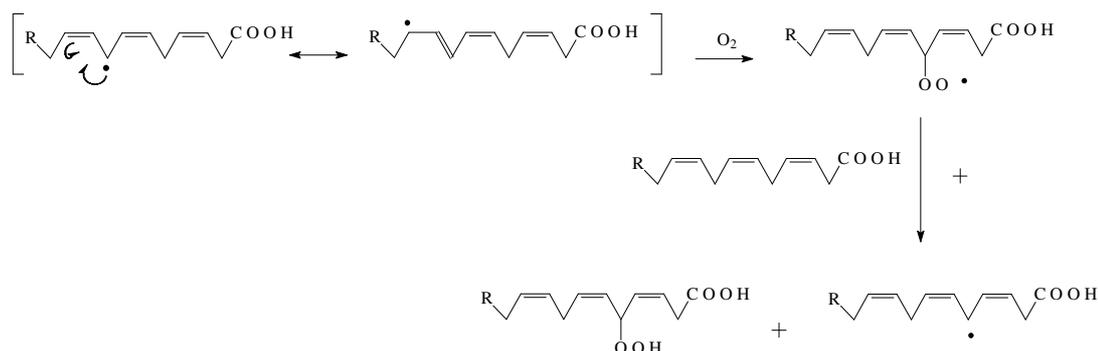
O processo de peroxidação lipídica nos alimentos e no corpo humano ocorre por meio de reações radiculares que se desenvolvem em cadeias por três etapas, sendo elas: inicialização, propagação e terminação. As etapas que regem esse processo estão ilustradas na Figura 3.

Figura 3 - Etapas da peroxidação lipídica

Inicialização

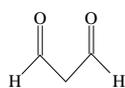


Propagação

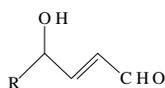


Finalização - Junção de radicais para formação de novos compostos como:

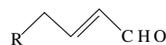
Malondialdeído



4 - Hidroxialquenal



2 - Alquenal



Fonte: Adaptado de Dukić et al. (2012)

Existem vários fatores que contribuem para a iniciação da peroxidação lipídica, entre eles, citam-se a radiação UV e ionizante, o oxigênio e a poluição do ar. Em organismos vivos, a etapa de inicialização também envolve enzimas e coenzimas, além do extravasamento de elétrons na cadeia transportadora de elétrons. De forma geral, essa etapa da peroxidação lipídica envolve a formação de radicais livres ou espécies não radicalares, como o H_2O_2 , fenômeno que é geralmente iniciado pela ação das espécies reativas de oxigênio, mais especificamente os

radicais hidroxila ($\text{OH}\cdot$) e hidroperóxido ($\text{O}_2\text{H}\cdot$) (AYALA; MUÑOZ; ARGÜELLES, 2014; DUKIĆ et al., 2012; YIN; XU; PORTER, 2011).

Uma vez formados, os radicais livres capturam hidrogênio alílico, formando radicais lipídicos ($\text{L}\cdot$) que reagem com outras moléculas, dando origem a novos radicais. Assim, o radical lipídico formado na iniciação dá origem à etapa de propagação, uma vez que tende a reagir com o oxigênio molecular, formando radical peroxila ($\text{LOO}\cdot$), que ataca outras moléculas de ácidos graxos, originando hidroperóxidos lipídicos (LOOH), além de outros radicais. Uma vez iniciadas, as reações de peroxidação lipídica desencadeiam-se dando origem a muitas outras espécies radicalares, que se combinam na etapa de finalização formando vários compostos hidrocarbonetos, aldeídos, álcoois, cetonas voláteis e polímeros lipídicos, alguns dos quais são prejudiciais à saúde (DUKIĆ et al., 2012; LOBO et al., 2010; RAHMAN, 2007; YIN; XU; PORTER, 2011).

Apesar de o radical hidroxila ser considerado como o grande responsável pelo processo de peroxidação, esse também pode ser catalisado por íons Fe^{+2} , que convertem hidroperóxidos (LOOH) em espécies altamente reativas, como alcóxilas ($\text{LO}\cdot$) e peróxilas ($\text{LOO}\cdot$), iniciadores de reações de ramificação (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

2.4 Sistema de Defesa Antioxidante

A defesa antioxidante controla os níveis de radicais livres, eliminando-os ou impedindo sua formação, minimizando os danos provocados pela ação deletéria dessas espécies. Os agentes de defesa são chamados de antioxidantes, ou seja, são espécies químicas ou enzimáticas que reagem com os radicais livres, neutralizando-os e impedindo a oxidação de outras moléculas.

Os antioxidantes possuem origem endógena e exógena e são classificados como enzimáticos e não enzimáticos. O mecanismo de defesa endógeno é aquele controlado por enzimas, como a superóxido dismutase, que elimina radicais superóxidos, catalase e a glutaciona peroxidase, que controlam níveis de peróxido de hidrogênio e conseqüentemente contribuem para a diminuição dos níveis de radicais hidroxila. Além das enzimas, o sistema endógeno também conta com outras biomoléculas, que participam da defesa não enzimática, como as vitaminas E (α -Tocoferol) e C (ácido ascórbico) e a pró-vitamina A (β -Caroteno). Alguns carotenoides, como o licopeno, luteína e zeaxantina, também atuam como antioxidantes não enzimáticos. Por serem cofatores de enzimas, minerais como zinco, cobre, selênio e

magnésio também são de extrema importância no controle de radicais livres (BARBOSA et al., 2010; FERREIRA; ABREU, 2007; FERREIRA; MATSUBARA, 1997; MCCORD, 2000).

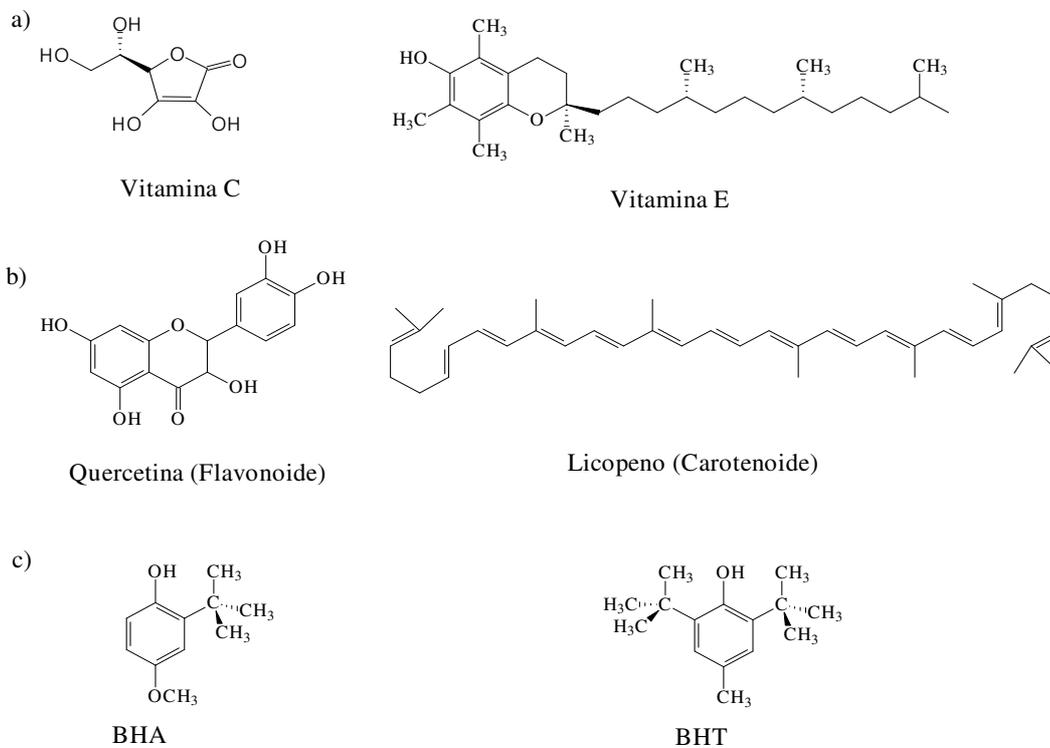
Os antioxidantes não enzimáticos fazem parte da dieta e são classificados como exógenos. Frutas, legumes, vegetais, plantas aromáticas e medicinais são fontes naturais dessas substâncias. Compostos fenólicos (flavonóis, flavonas, flavanóis, flavanonas, antocianidinas, isoflavonoides), taninos, resveratrol e estibenos; compostos nitrogenados (derivados da clorofila, indoles, aminoácidos e aminas) e compostos organossulfurados (isotiocianatos e compostos de enxofre alílicos) estão entre os metabolitos vegetais mais potentes no combate a radicais livres e atuam como antioxidantes naturais (FERREIRA; ABREU, 2007).

Existem também os antioxidantes de origem sintética encontrados em medicamentos, que possuem grupamentos -SH em suas estruturas. Nesse grupo, destacam-se as mercaptopropionilglicinas e *N*-acetilcisteína (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

A indústria alimentícia e cosmética, para evitar desperdícios, adiciona em seus produtos uma grande variedade de agentes antioxidantes de origem sintética, a fim de aumentar a vida de prateleira e manter por maior tempo possível a integridade dos produtos. Dentre os antioxidantes sintéticos mais utilizados, estão o butil hidroxianisol (BHA), o 2,6-ditertbutil-4-hidroxitolueno (BHT), o tertbutilhidroquinona (TBHQ) e o galato de propila (PG) (ANDRADE et al., 2012).

Antioxidantes não enzimáticos, naturais ou sintéticos, atuam neutralizando radicais livres pela doação de prótons ou elétrons, inibindo, assim, as reações em cadeia, impedindo o ataque dos radicais sobre lipídios, aminoácidos de proteínas, ácidos graxos e as bases do DNA. Também atuam na reparação de lesões, removendo danos no DNA e reconstruindo membranas (BIANCHI; ANTUNES, 1999; MIRANDA et al., 2016). A estrutura química dessas espécies permite a doação de um próton ou de elétrons ao radical, de forma que os novos radicais formados não promovam ou propagem as reações de oxidação, pois são estabilizados por estruturas de ressonância, decorrente da deslocalização eletrônica (SANTIAGO et al., 2016; MIRANDA et al., 2016). Na Figura 4, estão ilustradas as estruturas químicas de três tipos de antioxidantes.

Figura 4 -Estrutura química dos antioxidantes não enzimáticos (a), naturais (b) e sintéticos (c)



Fonte: Do autor (2018)

Apesar da diversidade, a estrutura química dos antioxidantes possui certas similaridades, como a deslocalização eletrônica proveniente de duplas ligações conjugadas, grupamentos hidroxila ligados a anéis aromáticos e/ou hidrogênios alílicos. A importância dessas espécies no controle de radicais livres tem impulsionado a pesquisa, no sentido da descoberta e síntese de novos agentes antioxidantes para as indústrias farmacêuticas, cosméticas e alimentícias, que apresentem menor toxicidade ao ser humano, uma vez que os antioxidantes sintéticos mais utilizados (BHA e BHT) têm apresentado certa toxicidade, podendo contribuir para o desenvolvimento de carcinomas. O uso desses antioxidantes já é restrito em muitos países e busca-se a substituição ou associação desses com produtos de origem natural (ANDRADE et al., 2012; DORMAN et al., 2000; RAMALHO; JORGE, 2006; RUBERTO; BARATTA, 2000; TENORE et al., 2011).

2.5 Óleos Essenciais

Dentre os produtos de origem natural que possuem promissora atividade antioxidante, destacam-se os óleos essenciais, substâncias conhecidas e utilizadas desde a idade média e que, até os dias de hoje, despertam grande interesse por parte da comunidade científica e industrial (BAKKALI et al., 2008).

Óleos essenciais são metabólitos secundários obtidos de partes de plantas por meio de arraste com vapor d' água, assim como expressão dos pericarpos de frutos cítricos. Possuem difícil classificação química, pois são formados de uma mistura complexa de substâncias voláteis, lipofílicas, usualmente odoríferas e líquidas. São chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Sua principal característica é a volatilidade, diferindo dos óleos fixos e de misturas de substâncias lipídicas, obtidas de sementes. A maioria dos óleos essenciais possuem aroma agradável e intenso, apresentam baixa solubilidade em água, mas são solúveis em solventes orgânicos, como éter, designando-os óleos etéreos (SIMÕES et al., 2007).

Geralmente, possuem sabor acre (ácido) e picante, são incolores ou amarelados quando recentemente extraídos, com exceção do óleo de camomila, que possui coloração azul devido ao alto teor de azulenos. A maioria deles possui densidade menor que a da água, com exceção de óleos ricos em eugenol, cuja densidade é maior. Os óleos essenciais não são muito estáveis na presença de luz, calor, umidade e metais, por esse motivo são facilmente degradados, de forma que o processo de armazenamento é de extrema importância para a manutenção de todas as suas propriedades químicas e biológicas (GUIMARÃES et al., 2008; SIMÕES et al., 2007).

De acordo com Teixeira (2016), os constituintes dos óleos essenciais variam de hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, entre outros. Esses constituintes são encontrados como uma mistura que varia em quantidade e qualidade, sendo que um ou mais compostos apresentam-se em maior concentração e são denominados majoritários; existem também os minoritários e os presentes em baixíssimas concentrações, que são conhecidos como traços.

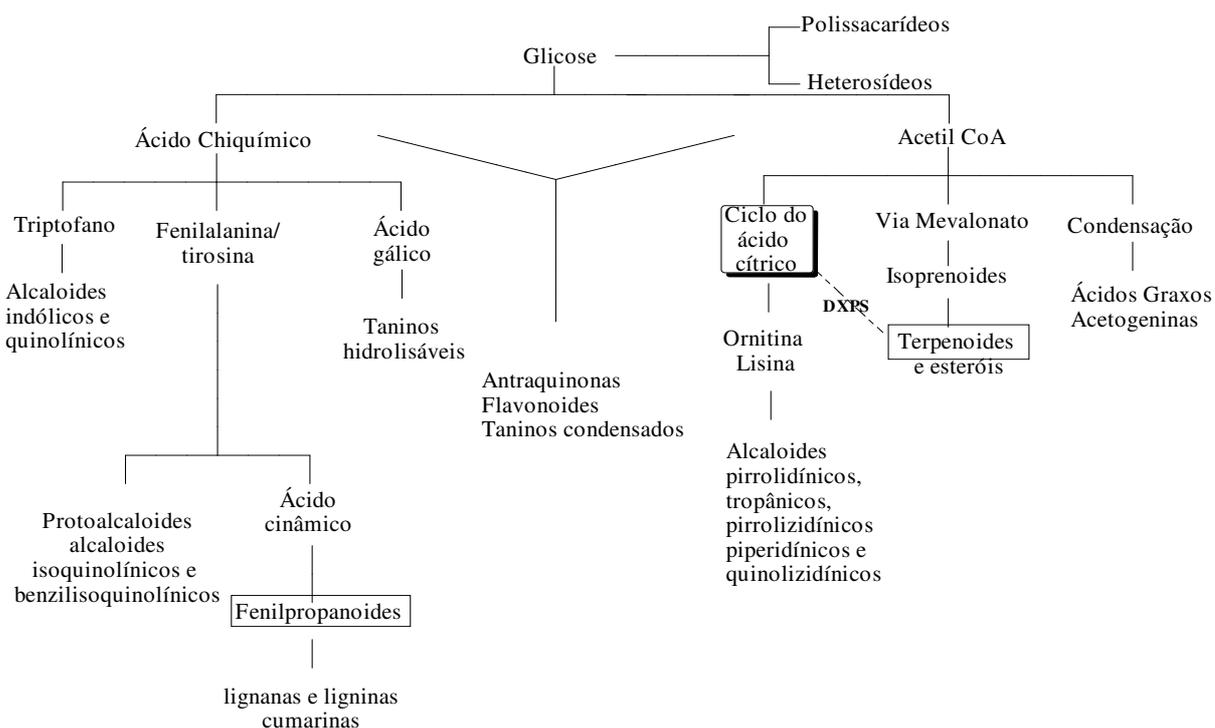
Os óleos essenciais podem ser produzidos em todos os órgãos da planta, são geralmente encontrados e extraídos de flores, folhas, caules, sementes, frutos, raízes ou rizomas. São armazenados em células secretoras, cavidades, canais, células epidérmicas ou tricomas glandulares. Uma vez produzidos, auxiliam a planta na sua adaptação ao meio, protegendo-a contra perda de água, aumento de temperatura, ataques de microrganismos e patógenos. Atuam

também na atração de polinizadores e como repelentes contra insetos e herbívoros (BAKKALI et al., 2008; SANTIAGO et al., 2016).

Quanto à ocorrência vegetal, os óleos essenciais são encontrados em maior proporção em angiospermas dicotiledôneas, nas famílias Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae, Rutaceae, entre outras. São moderadamente encontrados em angiospermas monocotiledôneas, com exceção de gramíneos e zingiberáceos, e raramente encontrados em gimnospermas (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais são constituídos basicamente de terpenos e fenilpropanoides, os quais são formados a partir do metabolismo da glicose (FIGURA 5) pela via do chiquimato (fenilpropanoides) e pela via do acetato (rota do mevalonato ou do 5-fosfato de 1-deoxi-D-xilulose (DXPS)), originando terpenos, terpenoides e seus derivados.

Figura 5 -Metabolismo da glicose, vias do chiquimato e acetato



Fonte: Simões et al. (2007)

Os compostos terpênicos ocorrem em uma grande variedade nos óleos essenciais de espécies vegetais e compreendem uma classe de metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural. Embora sejam extraordinariamente diversos, todos são biossintetizados a partir do isopentenil difosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil difosfato (DMAPP). Existem duas vias independentes de síntese envolvidas na formação dos intermediários básicos (IPP e DMAPP), localizadas em compartimentos intracelulares separados. No citossol, o IPP é

derivado da via do mevalonato pela condensação de acetil-CoA, ao passo que nos plastídios, o IPP é formado a partir de piruvato e gliceraldeído 3-fosfato através do fosfato de metileritritol, seguindo a via do DXPS (DUDAREVA et al., 2005; SIMÕES et al., 2007). Na Figura 6, encontra-se o mecanismo completo da formação de isoprenil difosfato (IPP) e seu isômero (DMAPP) pela via do mevalonato, partindo de três moléculas de acetil-CoA, dando origem ao ácido mevalônico, que é fosforilado em várias etapas consecutivas para a formação dos precursores básicos dos terpenos (DEWICK, 2009; TEIXEIRA, 2016).

Figura 6- Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP), pela via do mevalonato. (Continua)

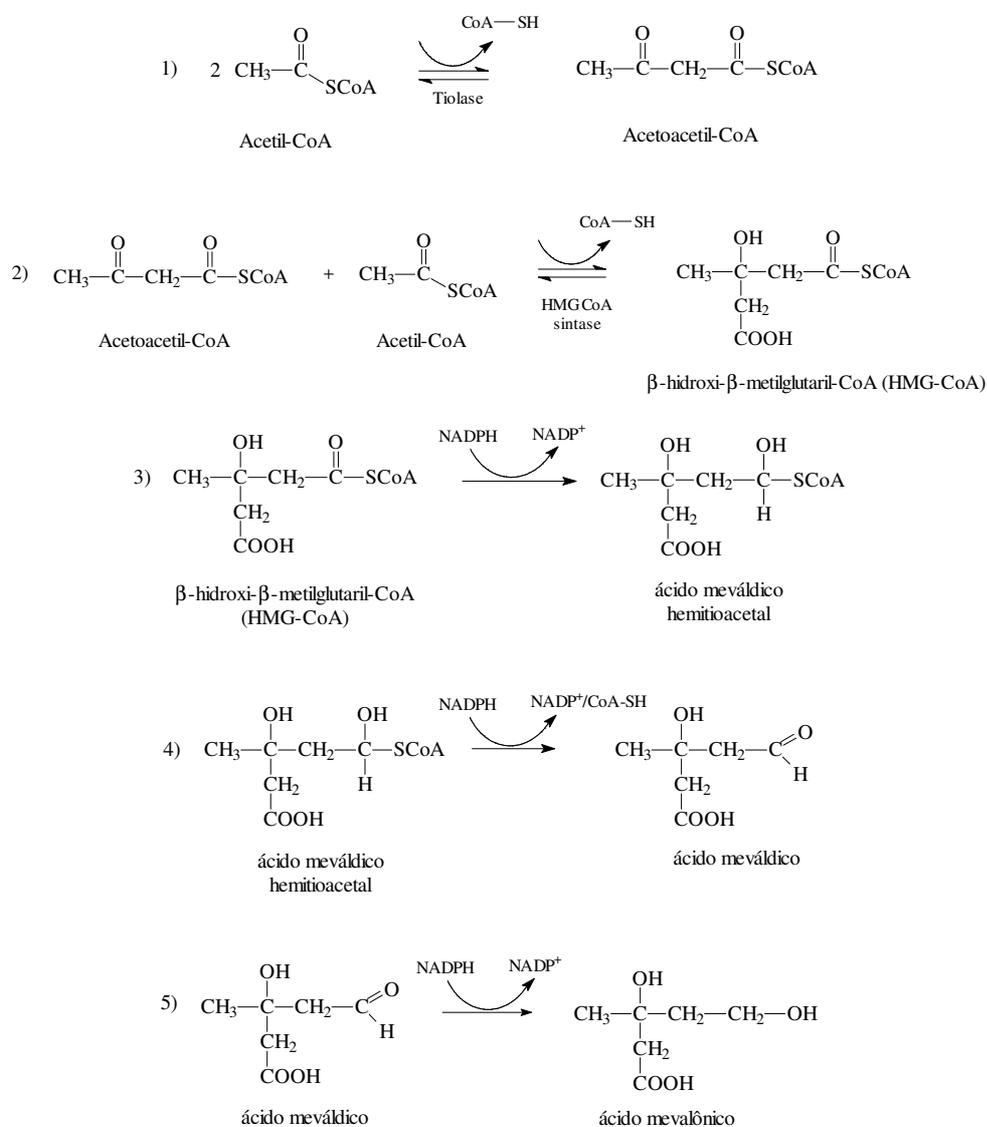
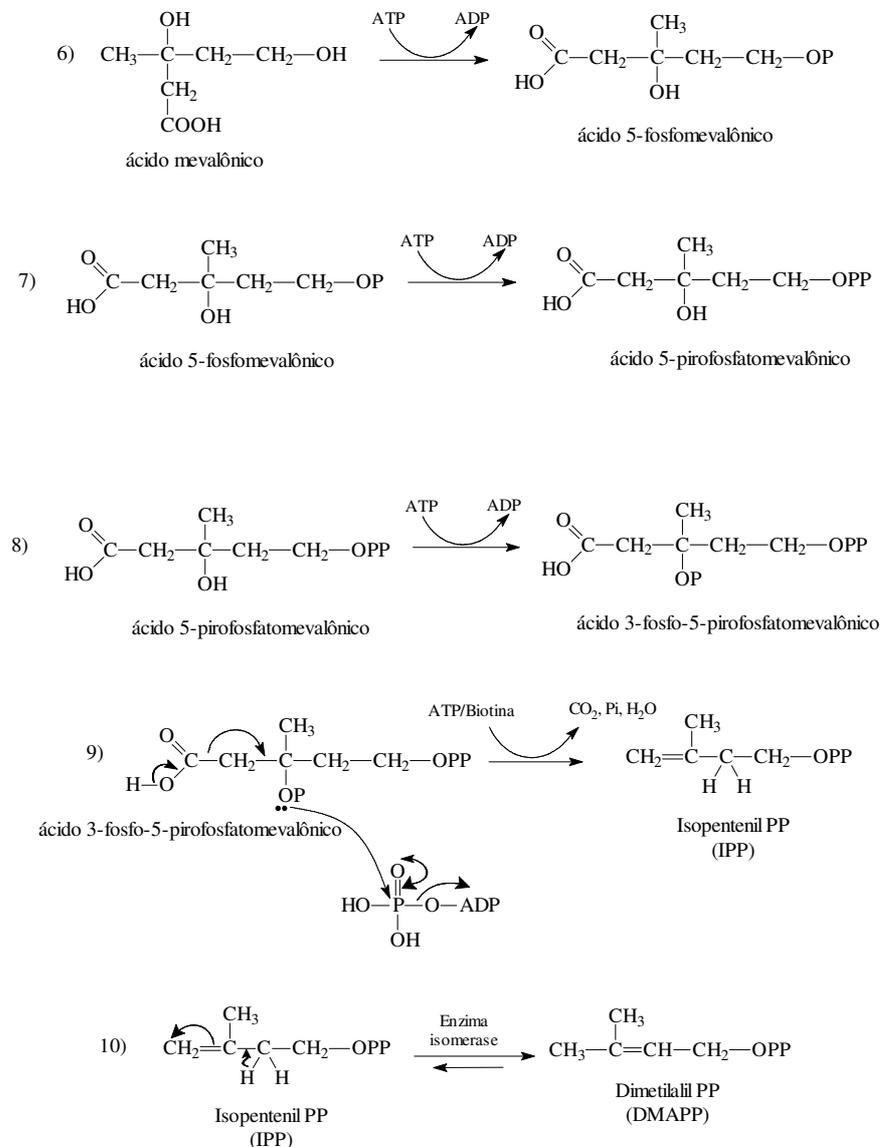


Figura 6- Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP), pela via do mevalonato. (Conclusão)



Fonte: Adaptado de Teixeira (2016)

A formação dos intermediários de terpenos pela via do DXPS foi elucidada em bactérias, algas verdes e nos plastídios das plantas superiores. Por essa via, o piruvato e o D-gliceraldeído-3-fosfato formam o 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato, que dá origem ao 2-C-metil-D-eritritol-4P (MEP). Em seguida, sucessivas reações levam à formação do isopentenil difosfato (IPP) e o dimetilalil difosfato (DMAPP), conforme mostrado na Figura 7 (DEWICK, 2009).

Os terpenos são formados pela combinação de seus intermediários básicos e são classificados pelo número de unidade isoprênica que possuem. A condensação das unidades

isoprênicas IPP e DMAPP leva à formação dos mais variados constituintes químicos dos óleos essenciais.

Figura 7- Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP), pela via da 1-deoxi-D-xilulose-5 fosfato (DXPS). (Continua)

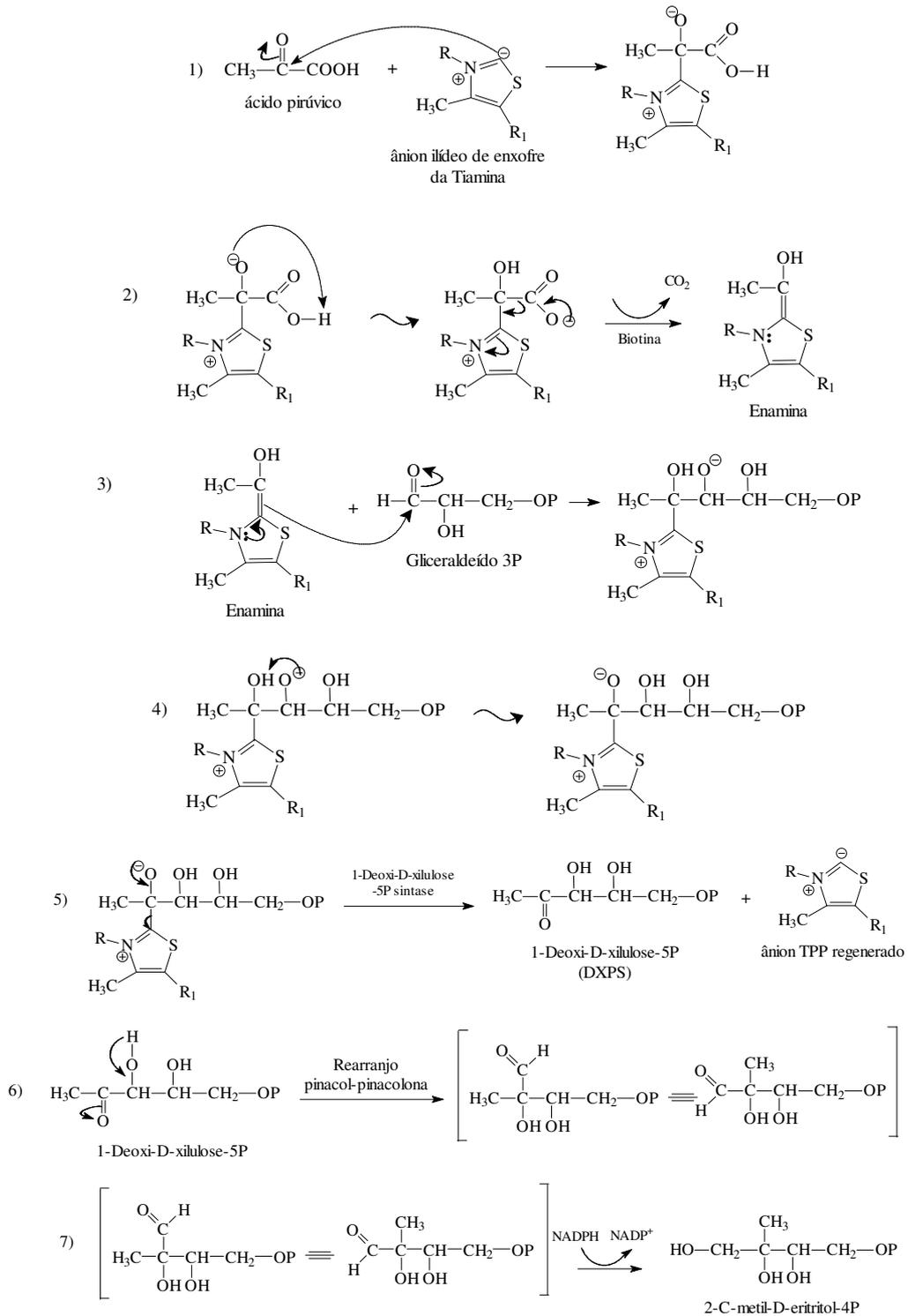
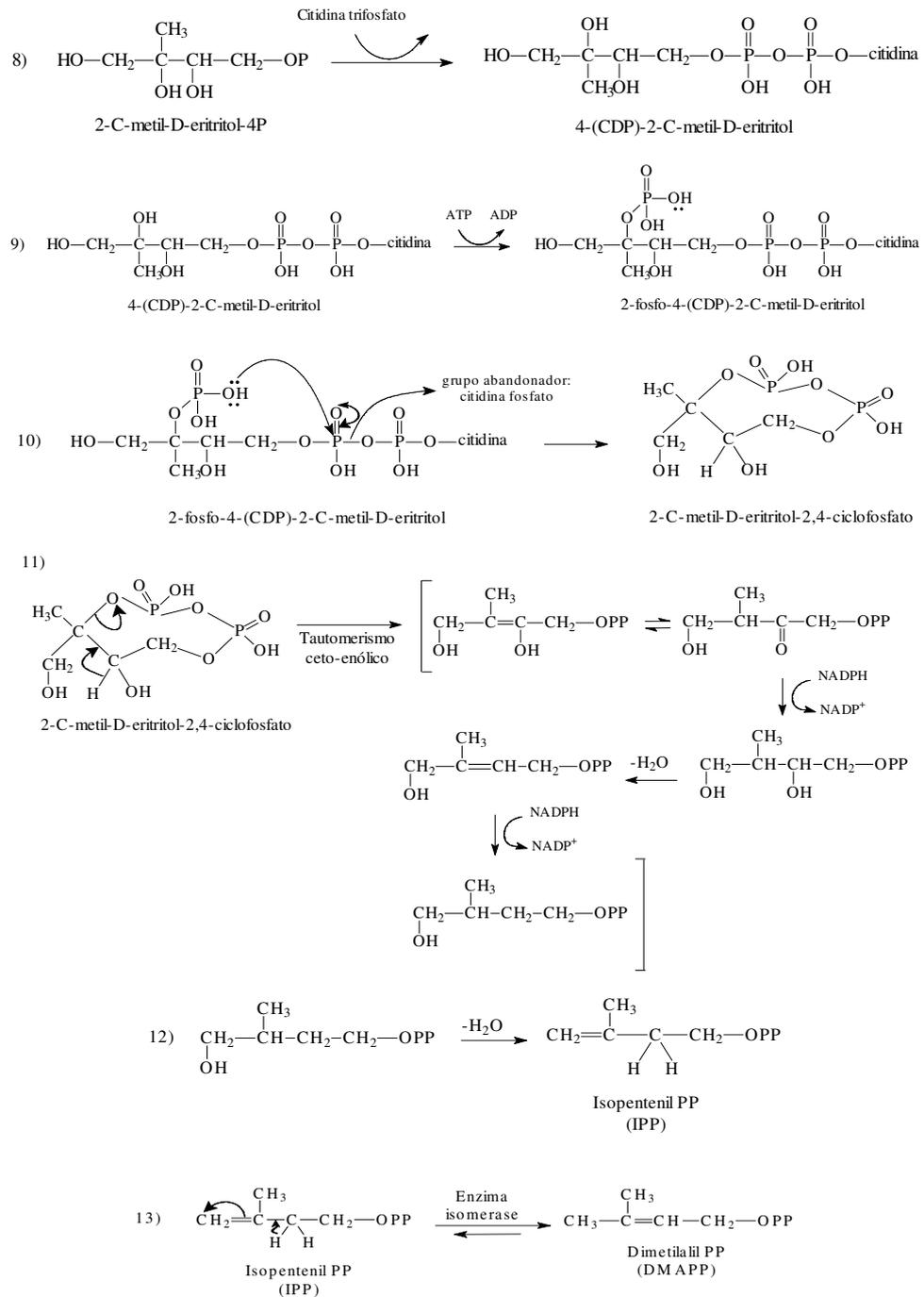


Figura 7- Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP), pela via da 1-deoxi-D-xilulose-5 fosfato (DXPS). (Conclusão)



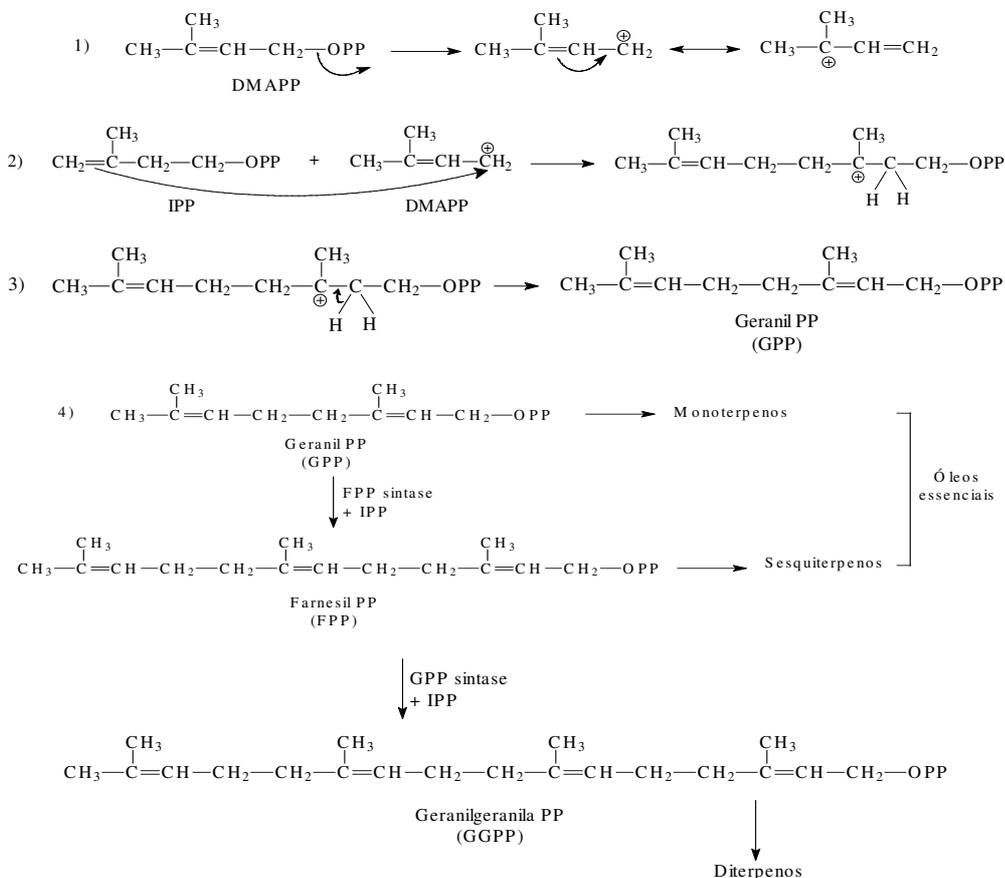
Fonte: Adaptado de Teixeira (2016)

Moléculas formadas por uma unidade isoprênica são denominadas hemiterpenos. A junção de dois isoprenos leva à formação dos monoterpenos (10 átomos de carbonos), que representam cerca de 90% da composição dos óleos essenciais. São moléculas apolares e que

interagem com membranas de microrganismos, cujas atividades biológicas são atribuídas a essa interação. Quando três unidades isoprênicas se juntam, há formação de sesquiterpenos (15 átomos de carbonos). Existem ainda os diterpenos que são formados de quatro unidades do isopreno e possuem 20 átomos de carbono. A junção de isoprenos fornece outras classes de compostos que podem chegar até “n” unidades, como os poli-isoprenos (BAKKALI et al., 2008; SIMÕES et al., 2007). Com relação aos óleos essenciais, altamente voláteis, classes com mais de 15 átomos de carbonos não são muito comuns.

Os monoterpenos com 10 átomos de carbono são formados da reação de adição eletrolítica de unidades de IPP e DMAPP, pela ação da enzima prenil-transferase, forma o intermediário geranil difosfato (GPP, C10), que condensa com outra unidade IPP, fornecendo o farnesil difosfato (FPP, C15), precursor dos sesquiterpenos. Por último, a junção de FPP com outra unidade de IPP leva à produção de geranilgeranila difosfato (GGPP, C20), precursor dos diterpenos (FIGURA 8) (DEWICK, 2009).

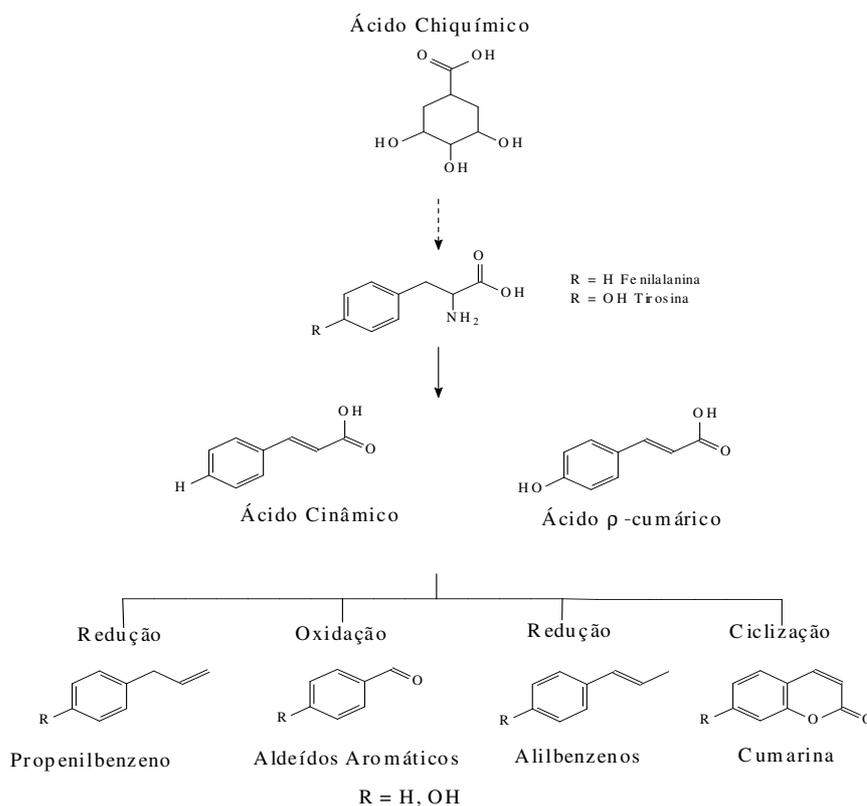
Figura 8 - Formação dos precursores terpênicos pela condensação cabeça-cauda dos precursores básicos dos terpenos IPP e DMAPP



Fonte: Adaptado de Teixeira (2016)

Os fenilpropanoides são formados a partir do ácido chiquímico que, por sua vez, é formado da condensação aldólica de fosfoenopiruvato e eritrose-4-fosfato. Uma vez formado, o ácido chiquímico reage com uma molécula de fosfoenolpiruvato, gerando o ácido corísmico, que é responsável pela síntese de aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina e a tirosina, que por meio da perda de uma molécula de amônia, dão origem aos ácidos cinâmicos e *p*-cumárico, respectivamente. Os ácidos cinâmicos e *p*-cumárico, por sua vez, sofrem inúmeras reações de redução enzimática, formando propenilbenzenos e/ou alilbenzenos, que são oxidados com degradação das cadeias laterais e ciclização a fenilpropanoides (SIMÕES et al., 2007). A Figura 9 ilustra o mecanismo simplificado da formação de fenilpropanoides a partir do ácido chiquímico.

Figura 9- Formação de compostos fenilpropanoides



Fonte: Simões et al. (2007)

2.5.1 Óleos Essenciais e Suas Aplicações de Mercado

De acordo com Bakkali et al. (2008), são conhecidos cerca de 3000 óleos essenciais, dos quais 300 são comercialmente importantes, especialmente para as indústrias farmacêutica, agrônômica, alimentar, sanitária, cosmética e de perfumaria. Os óleos essenciais constituem

matéria-prima para a indústria de perfumaria, produtos de limpeza e indústria alimentícia. Alguns dos seus componentes são utilizados em perfumes, produtos de maquiagem e em produtos sanitários. São empregados na odontologia, na agricultura, como conservantes e aditivos alimentares e como medicamentos naturais. São utilizados também em aromaterapia, em massagens como misturas com óleo vegetal ou em banhos, sendo descritos como produtos com grande potencial terapêutico e farmacológico (BAKKALI et al., 2008; MACHADO; FERNANDES JUNIOR, 2011).

Segundo Souza et al. (2010), os maiores consumidores de óleos essenciais no mundo, são os EUA, a União Europeia, tendo a França como o país líder em importações, o Japão ao lado do Reino Unido, Alemanha, Suíça, Irlanda, China, Cingapura e Espanha.

O mercado de óleos essenciais no Brasil atingiu seu auge em 1973, com produção de 6.300 toneladas por ano. Nesse período, o país era o maior produtor de óleos do mundo, exportando óleos de pau-rosa, sassafrás e menta. O desenvolvimento da indústria de óleos essenciais foi impulsionado pela falta de matéria após a Segunda Guerra Mundial. Entretanto a falta de manejo do solo e a exploração desenfreada dos recursos naturais contribuíram para que o país passasse de maior exportador de óleos essenciais para importador do produto (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). Atualmente, o país é o maior exportador de óleos essenciais de laranja, subproduto da indústria de sucos, com aproximadamente US\$ 472 milhões, ficando atrás dos EUA e do Reino Unido (CONTRADE, 2016).

O mercado de óleos essenciais no Brasil ainda pode evoluir, pois o país possui indústrias produtoras de óleos essenciais, como a Raros, Dierberger, Duas Rodas e Bioessência, que utilizam óleos essenciais em seus produtos e desenvolvem parcerias com centros de pesquisa, algumas dessas indústrias extraem o óleo utilizado, outras os obtém de importações e apenas os processam. A indústria Brasileira de óleos essenciais tem potencial para crescimento, mas carece de manutenção no padrão de qualidade dos óleos, de representatividade nacional e internacional e de investimentos governamentais em pesquisas.

2.5.2 Atividade Antioxidante dos Óleos Essenciais

Os óleos essenciais têm se tornado foco de pesquisas devido às suas propriedades biológicas, em especial, antifúngica, antioxidante e antibacteriana. Os óleos essenciais e seus constituintes têm ganhado destaque devido à sua posição como produto natural e grande aceitação pelos consumidores. De fato, estudos têm relatado suas propriedades antioxidantes,

referindo-os como potenciais substitutos para os antioxidantes sintéticos e, em alguns casos, sugerindo-os para uma aplicação direta em alimentos, lavouras, produtos farmacêuticos e cosméticos (ANDRADE et al., 2012; MIRANDA et al., 2014)

Existem vários estudos que ressaltam as propriedades antioxidantes dos óleos essenciais.

Algumas espécies de plantas possuem componentes químicos que apresentam alta atividade antioxidante em seus óleos essenciais. Entre essas espécies, Cao et al. (2009) destacam as propriedades da erva-cidreira, alecrim, tomilho, orégano, cravinho, salvia, e manjeriço. De acordo com os autores, a ação antioxidante dessas espécies é mais forte do que a dos antioxidantes sintéticos utilizados na indústria. Os autores mostraram em seu trabalho a atividade antioxidante do óleo essencial de *Miletus chinensis*, uma espécie amplamente utilizada na medicina tradicional chinesa. Os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial foram carvacrol, acetato de carvacrila e *p*-cimeno. Em todos os métodos testados, o óleo essencial apresentou promissora atividade antioxidante, que foi atribuída à presença de carvacrol (monoterpeno oxigenado com características fenólicas), como um dos constituintes majoritário do óleo essencial.

Conforti et al. (2009), estudando a atividade antioxidante de espécies (*Stachys*) da família Lamiaceae, obtiveram resultados de atividade antioxidante promissoras para os óleos essenciais. Os óleos essenciais de *S. palustris*, *S. cretica* e *S. Hydrophila* foram os que apresentaram maior atividade. Foi possível observar que os óleos essenciais dessas espécies são formados por compostos carbonílicos, compostos fenólicos, sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos sesquiterpenos.

Guimarães et al. (2011) encontraram moderada atividade antioxidante no óleo essencial de capim-limão e do seu constituinte majoritário citral, utilizando metodologia de redução do radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), devido à dificuldade desses compostos de doarem átomos de hidrogênio ao radical. Todavia, os autores obtiveram resultados expressivos na avaliação da atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico. De acordo com os autores, a significativa atividade do óleo por esse método ocorre pela presença de grupos aldólicos (CHO) nas estruturas dos compostos, conferindo a eles moderada solubilidade, que permite menor diluição na fase aquosa da emulsão, ficando em maior concentração na fase lipídica.

Andrade et al. (2012) estudaram óleos essenciais de três espécies, citronela (*Cymbopogon nardus*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e gengibre (*Zingiber officinale*), e

encontraram considerável atividade antioxidante pelo método de β -caroteno/ácido linoleico para as espécies *C. nardus*, *Z. officinale* e *C. zeylannicum*. Porém, no teste com DPPH apenas *C. nardus* apresentou atividade antioxidante. De acordo com os autores esse teste é impróprio para substâncias lipofílicas, devido à baixa solubilidade do óleo nas condições de análise.

Teixeira et al. (2012), estudando a atividade antioxidante de óleos essenciais de folhas frescas e secas de *Citrumelo swingle*, pelos métodos β -caroteno/ácido linoleico e radical estável DPPH, encontraram baixa atividade antioxidante, sendo maior no primeiro método em relação ao segundo, em que a atividade foi dependente das concentrações analisadas. Os autores explicaram o comportamento do óleo com base em sua constituição química; para eles, os compostos majoritários (limoneno e mirceno) não possuem facilidade de doar átomos de hidrogênio ao radical DPPH.

Abozid e El-Sayed (2013) estudaram o efeito do óleo essencial e do extrato de cravo, *in vitro* e *in vivo*, na proteção de fígado e rins de ratos tratados com peróxido de hidrogênio. Os autores observaram que tanto o óleo essencial como o extrato de cravo protegeram os fígados e rins dos ratos contra a peroxidação lipídica.

Miranda et al. (2014) estudaram a composição química dos óleos essenciais extraídos de folhas frescas de tomilho, capim-limão, alfavaca e manjeriço, e determinaram a sua atividade antioxidante pelos métodos de sequestro de radicais DPPH e pela inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico. A atividade dos óleos foi avaliada frente à atividade dos padrões dos constituintes majoritários dos referidos óleos essenciais timol, citral, eugenol e linalol. Os autores encontraram resultados expressivos para as amostras de eugenol e do óleo essencial de alfavaca. Eles observaram que os óleos essenciais e seus respectivos padrões se agrupam devido à similaridade quanto às quantidades de fenilpropanoides e monoterpênicos.

O gênero *Mentha*, da família Lamiaceae, também apresenta alta atividade antioxidante; em geral, as espécies que apresentam maior atividade nesse gênero possuem carvacrol e timol como constituintes majoritários de seus óleos essenciais (FIALOVA et al., 2014).

Miranda et al. (2016) estudaram a atividade antioxidante do óleo essencial das folhas de *Coniza bonariensis*, *Parthenium hysterophorus*, *Tithonia diversifolia*, *Ambrosiaol ystachya*, *Hedychium coronarium* e *Baccharis dracunculifolia*, em relação à inibição da oxidação de sistema β -caroteno/ácido linoleico e na estabilização do radical DPPH. Os autores verificaram que os óleos estudados não apresentaram concentração inibitória (CI₅₀) significativa nos ensaios de sequestro de radicais DPPH, sendo que, os óleos essenciais de *C. bonariensis*, *P.*

hysterophorus, *A. polystachya*, e *B. dracunculifolia* apresentaram CI_{50} superiores à maior concentração avaliada.

Daniel et al. (2016) utilizaram o óleo essencial de eugenol como sedativo na água de transporte de peixes e observaram que o uso de óleos essenciais na água de transporte contribuiu para retardar a degradação de produtos primários da oxidação lipídica.

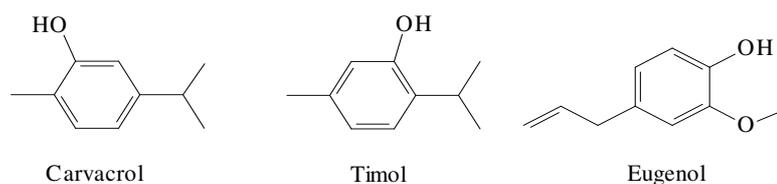
O gênero *Lippia* também é alvo de muitos estudos em relação à atividade antioxidante de seus óleos essenciais. Os óleos essenciais das espécies pertencentes a esses gêneros são constituídos basicamente por citral, carvona, limoneno, entre outros monoterpenos oxigenados. Esses constituintes são considerados como os responsáveis pelas atividades antioxidantes do gênero (TREVISAN et al., 2016).

É possível perceber mediante as pesquisas sobre atividade antioxidante de óleos essenciais que determinados óleos podem ou não apresentar atividade, dependendo da metodologia utilizada. Diversos fatores estão associados a esse fenômeno, dentre eles destacam-se a dificuldade de solubilização e a estrutura química dos constituintes do óleo, sendo esse último o fator mais expressivo na determinação do tipo de atividade. Como os óleos essenciais são constituídos de fenilpropanoides ou monoterpenos oxigenados, as diversas determinações da atividade antioxidante de óleos essenciais mostram que a atividade está diretamente relacionada com a estrutura química do constituinte majoritário do óleo essencial.

2.5.3 Constituintes Químicos de Óleos Essenciais de Importância Farmacológica e Industrial

Entre os constituintes majoritários de óleos essenciais que apresentam atividade antioxidante, destacam-se os derivados de fenilpropanoides (eugenol), de terpenoides com características fenólicas (carvacrol e timol). A estrutura química desses constituintes está apresentada na Figura 10.

Figura 10 - Estrutura química do Carvacrol, Timol e Eugenol



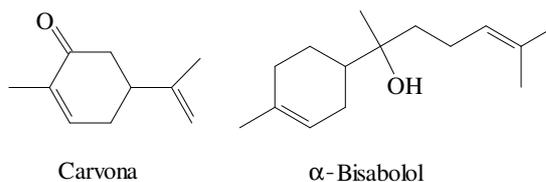
Fonte: Do autor (2018)

Os constituintes carvacrol e timol são isômeros, e, em geral, aparecem juntos nos óleos essenciais, alternando-se como constituintes majoritários. Existem espécies cujo constituinte majoritário é o timol que, quando coletadas em outras regiões, podem apresentar carvacrol como majoritário. Um exemplo dessa variação ocorre com a espécie *Lippia sidoides*, que no trabalho de Guimarães et al. (2014), apresentou como constituintes majoritários carvacrol (26,44%) e eucaliptol (22,63%). No entanto, de acordo com os autores, grande parte dos estudos realizados com plantas desta mesma espécie na região nordeste do Brasil, demonstram a presença do timol como constituinte majoritário de seus óleos essenciais. Essas divergências foram explicadas por Gobbo-Neto e Lopes (2007); de acordo com os autores, a composição química de óleos essenciais depende de uma série de fatores, entre eles destacam-se os fatores climáticos, de solo e a região de coleta.

O carvacrol, juntamente com seu isômero timol, é o constituinte majoritário do óleo essencial de muitas espécies, como orégano (*Origanum Vulgare* L.), tomilho (*Thymus vulgaris* L.), manjeriço (*Ocimum Basilicum*), alecrim-pimenta (*Lippia sidoides*), entre outras (BORGES et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2014; MIRANDA et al., 2014). As atividades biológicas dos óleos essenciais dessas espécies são atribuídas a esses constituintes, que possuem ação antisséptica, antibacteriana, antifúngica, antioxidante e muitas outras que ainda têm sido estudadas (BERTINI et al., 2005).

O eugenol, derivado dos fenilpropanoides, é largamente utilizado em odontologia por seus efeitos anestésicos e analgésicos e atividades germicida, antimicrobiana, antioxidante anti-inflamatória e cicatrizante. Possui efeitos medicinais para o tratamento de náuseas, flatulências, indigestão e diarreia. Entretanto, em altas concentrações, o eugenol apresenta certa citotoxicidade, podendo causar lesões na pele e em membranas biológicas (MARKOWITZ et al., 1992; SILVESTRI et al., 2010; YOO et al., 2005). O eugenol pode ser encontrado no óleo essencial de algumas espécies como o cravo-da-índia (*Syzygium Aromaticum*, também conhecida como *Eugenia caryophyllata* Thunb), alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.) e pimenta da Jamaica (*Pimenta dioica*) (BORGES et al., 2012; de OLIVEIRA et al., 2009).

Os derivados de terpenos e terpenoides também podem apresentar muitas atividades biológicas, entre eles destacam-se a carvona e o α -bisabolol (FIGURA 11), que podem ser encontrados em plantas de grande uso popular, como a hortelã (*Mentha Spicata*), a camomila (*Matricaria chamomilla* L.) e candeia (*Eremanthus erythropappus*).

Figura 11 - Estrutura química dos terpenoides Carvona e α -bisabolol

Fonte: Do autor (2018)

A carvona encontrada nos óleos essenciais é o enantiômero (L)-Carvona e é o constituinte majoritário de mais de 50% dos óleos essenciais de hortelã (*Mentha Spicata*), variedade que não possui mentol. A (L)-carvona é uma cetona terpênica e possui aroma característico de hortelã. Apesar de ser um composto de origem natural, pode ser biossintetizada a partir do limoneno, prática que vem se tornando comum devido à importância desse composto para a indústria, uma vez que a carvona é utilizada como aromatizante e flavorizante na indústria de alimentos e agente modificador de fragrância. Além dessas aplicações, estudos também demonstram que esse constituinte possui atividades antimicrobiana e antioxidante, atividade inseticida contra insetos como *Aedes aegypti* e suas larvas (GOVINDARAJAN et al., 2012; MURUGANATHAN; SRINIVASAN, 2016; SHAHBAZI, 2015; SNOUSSI et al., 2015). Muruganathan e Srinivasan (2016) mostram também que quando esse é utilizado na dieta de ratos diabéticos, auxilia no metabolismo de carboidratos, melhorando o funcionamento das enzimas responsáveis pela regulação dos níveis de glicose no sangue.

Além da hortelã (*Mentha spicata*), a carvona pode ser encontrada em outras espécies de menta, como *Mentha longifolia*, *Mentha suaveolens* E., *Mentha viridis* L., *Mentha haplocalyx* B., em alcarávia (*Carumcarvi* L. *Umbelliferae*) e outras espécies (MURUGANATHAN; SRINIVARAN, 2016; SHAHBAZI, 2015; SNOUSSI et al., 2015).

Outro derivado terpenoide de grande importância para a indústria cosmética e farmacêutica é o α -bisabolol, utilizado em produtos de higiene infantil e para peles sensíveis. Esse composto está presente em formulações de cremes, óleos bronzadores, protetores solares, loções pós-sol, pós-barba, pós-depilação e pastas dentais. O α -bisabolol é um álcool sesquiterpênico insaturado, constituinte químico abundante nos óleos essenciais de camomila (*Matricaria chamomilla*), candeia (*Eremanthus erythropappus*), sândalo indiano (*Santalum album* L.) entre outros (GHASEMI et al., 2016; SANTOS et al., 2015; SINGH et al., 2011; SU et al., 2015). Ele tem substituído o azuleno nas formulações cosméticas, devido às suas atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e cicatrizante, além de sua maior estabilidade

frente ao azuleno e também pelo fato de o α -bisabolol não modificar a coloração das formulações, como o azuleno (SPIEGEL, 2012).

2.6 Cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*)

O cravo-da-índia, pertencente à família Myrtaceae, conhecido cientificamente como *Syzygium aromaticum*, (sinônimo: *Eugenia caryophyllata* Thunb) é uma planta arbórea de origem asiática. Nativa da Indonésia e cultivada em muitos países tropicais, como África e Brasil (FIGURA 12). No sul da Bahia, o cultivo dessa espécie é considerado como atividade de agricultura familiar, com mais de 3.000 propriedades e uma área de cultivo estimada em 8.500 hectares exibindo uma produção anual de 2.200 toneladas de cravo seco (AFFONSO et al., 2012; COSTA et al., 2011; de OLIVEIRA et al., 2009).

Figura 12- Aspecto geral da espécie *Syzygium Aromaticum*



Fonte: Kewscience (2018)

Desde a antiguidade, o cravo-da-índia é uma especiaria muito apreciada não apenas por seu sabor picante e aroma característico, mas por apresentar propriedades terapêuticas. Suas propriedades terapêuticas foram exploradas entre os egípcios como um tônico para fortalecer os trabalhadores nas pirâmides e os chineses também utilizavam a planta para mascarar o hálito na presença do imperador. A espécie é largamente utilizada na culinária, o chá dos botões florais também é de uso popular por seu efeito carminativo, estimulante das funções digestivas,

podendo ser utilizado também em tratamentos respiratórios e de transtornos alimentares (AFFONSO et al., 2012; COSTA et al., 2011).

A espécie é explorada principalmente para extração industrial do óleo essencial obtido a partir dos botões florais, folhas e outras partes da planta, sendo que as atividades biológicas do cravo-da-índia são atribuídas a seu óleo essencial, que é constituído basicamente de eugenol, acetil-eugenol, chavicol e 4-alilfenol (GRANDI, 2014). Pesquisas de da SILVA e RODRIGUES (2014) e SILVESTRI et al. (2010) mostraram que os extratos de cravo-da-índia inibem microrganismos, como *Escherichia coli* e outras bactérias durante a armazenagem de sucos, leites e chás. Apesar de suas potencialidades, o uso do óleo essencial contendo eugenol, extraído do cravo-da-índia, ainda é limitado devido à preocupação, por parte dos órgãos fiscalizadores, com a toxicidade e a concentração segura para uso. Entretanto, o composto puro é liberado para utilização em produtos farmacêuticos e alimentícios.

2.7 Oregano (*Origanum vulgare* L.)

O orégano é uma planta herbácea da família Lamiaceae que cresce principalmente na Europa, norte da África e Ásia, podendo ser cultivada a altitudes de 500 a 3600 m ao longo das bordas de estradas, nas encostas, matas e pastagens (HAN et al., 2017). O aspecto geral da planta encontra-se na Figura 13.

Figura 13- Aspecto geral de *Origanum vulgare* L.



Fonte: Do autor (2018)

Origanum vulgare L, comumente conhecido como orégano, é uma das mais famosas e economicamente importantes ervas culinárias do mundo. É conhecido popularmente por manjerona-selvagem, manjerona-rasteira e manjerona-baiana (GRANDI, 2014;

MORSHEDLOO et al., 2017). É uma espécie típica utilizada tradicionalmente para aromatizar alimentos, como pizza, carnes, salsichas, saladas, guisados, molhos e sopas. O efeito aromatizante de oréganos é atribuído às substâncias aromáticas de seu óleo essencial, rico em carvacrol e/ou timol, terpineno, *p*-cimeno, linalol, terpinen-4-ol e hidrato de sabineno, substâncias que conferem aroma e sabor à especiaria (YAN et al., 2016).

Além da culinária, o orégano é utilizado na medicina popular como carminativo, expectorante, atuando no combate de bronquite e asma, estimulante, tônico, antiviral e antifúngico, antirreumático, entre outros. Pode ser utilizado na forma de infusão, decocto, pó, xarope ou pomada. Embora diferentes compostos químicos, como flavonóides, glicósidos fenólicos, resinas, esteróis e taninos, tenham sido isolados de orégano, apenas o óleo essencial é considerado comercialmente importante exibindo vasta gama de propriedades biológicas, de forma que esse é utilizado em todo o mundo como matéria-prima para produtos medicinais. Pesquisas recentes indicam que o óleo essencial dessa espécie é um promissor substituto dos antioxidantes sintéticos utilizados na indústria, devido ao seu alto potencial antioxidante nos testes *in vitro* (MORSHEDLOO et al., 2017; HAN et al., 2017; YAN et al., 2016).

2.8 Hortelã (*Mentha spicata* L.)

O gênero *Mentha* pertence à família Lamiaceae e é conhecido por sua grande variedade de espécies e híbridos (FIGURA 14). Se distribuem-se desde a Europa, África, Austrália até a América do Norte. É constituído de planta herbáceas, rizomatosas e perenes que crescem de 40 a 130 cm de altura, com grande variação morfológica (KEDIA et al., 2014).

Seu sabor e aroma refrescantes, fazem com que o gênero *Mentha* seja largamente utilizado como agentes aromatizantes na indústria alimentícia e cosmética. Na medicina popular, suas propriedades anti-inflamatória, antiemética, sudorífera, antiespasmódica e analgésica contribuem para que sejam utilizadas no tratamento de náusea, bronquite, flatulência, anorexia, colite ulcerativa e problemas hepáticos. As espécies de *Mentha* são populares tanto na medicina como na culinária. São tradicionalmente usados na forma de chás contra desconforto gastrointestinal, dor no estômago e no peito e sintomas de indigestão (BARROS et al., 2015; MAHBOUBI, 2017).

Figura 14- Aspecto geral de *Mentha spicata* L.



Fonte: Flora (2018) e Amazon (2018)

O nome hortelã é dado à espécie *Mentha spicata*, que é nativa da África, Ásia temperada e Europa, e conhecida por possuir carvona e limoneno como constituintes mais abundantes de seus óleos essenciais, sendo que o constituinte carvona é responsável pelo cheiro distintivo da espécie e por suas atividades biológicas. Durante séculos, *M. spicata* tem sido usada como planta medicinal contra doenças gastrointestinais e respiratórias, mau-hálito e caspa e como agentes carminativos, antiespasmódicos, diuréticos e sedativos (JARADAT et al., 2016; MAHBOUBI, 2017)

O óleo essencial de hortelã é um agente aromatizante em gomas de mascar, cosméticos e dentífricos. Sua composição química varia conforme a região e condições de coleta, de modo que diferentes quimiotipos já foram notificados para o óleo essencial de *M. spicata*, incluindo o quimiotipo rico em carvona, linalol e L-menthona (MAHBOUBI, 2017).

2.9 Candeia (*Eremanthus erythropappus* M.)

Eremanthus erythropappus (DC.) MacLeish, comumente conhecido como candeia, é uma espécie arbórea, neotropical, pertencente à família Asteraceae, cujo gênero é composto por pelo menos 18 espécies, que ocorrem com grandes populações em campos abertos e pastagens. Na forma nativa, encontra-se em altitudes de cerca de 1.000 metros em áreas de cambisol e litosol, com afloramentos rochosos (FIGURA 15) (de PÁDUA; BRANDÃO; de CARVALHO, 2016; MORI et al., 2009).

Figura 15- Aspecto geral de *Eremanthus erythropappus* M.



Fonte: Scolforo et al. (2018)

A candeia ocorre na América do Sul, podendo ser encontrada no nordeste da Argentina, norte e leste do Paraguai e no Brasil. É considerada uma árvore brasileira, pois é característica de biomas, como a Mata Atlântica e Cerrado, estendendo-se desde o Centro-Oeste até o Sudeste do Brasil. Essas árvores crescem para formar regiões florestais densas e com baixa diversidade. Sua madeira é resistente ao ataque de cupins e bactérias, sendo, por isso, muito utilizada como moirões, esteios, caibros, postes, tacos e vigas (CAMOLESI et al., 2010; QUEIROZ; CAJAIBA, 2016; GALDINO et al., 2006). O interesse comercial nesta espécie cresceu substancialmente nos últimos anos devido à grande quantidade de α -bisabolol, sesquiterpenos de grande importância para a indústria, obtidos a partir da extração do óleo essencial do cerne da candeia, podendo ser considerada como uma fonte natural para a obtenção desse constituinte químico (QUEIROZ; CAJAIBA, 2016).

2. 10 Avaliação da atividade antioxidante

A capacidade antioxidante é um termo genérico e complexo, de forma que não pode ser representada por um único teste, pois vários mecanismos químicos estão envolvidos nesse fenômeno. Cerca de vinte testes antioxidantes são relatados e conhecidos, e cada vez mais, novas metodologias têm sido criadas, a fim de elucidar e compreender a capacidade antioxidante total de várias espécies químicas. Assim, testes complementares precisam ser realizados para obter um resultado representativo de toda a atividade antioxidante de uma determinada molécula (CANABADY-ROCHELLE et al., 2018).

O retardamento nas reações oxidativas por ação de outros compostos foi observado pela primeira vez em 1797, por Claude Berthollet, mas só foi esclarecido por Humphry Davy, em

1817, de maneira que, os antioxidantes passaram a ser classificados em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos. Os primários removem ou inativam radicais livres, por meio da doação de átomos de hidrogênio a essas moléculas, interrompendo a reação em cadeia. Os sinergistas possuem pouca ou nenhuma atividade antioxidante, mas podem aumentar a atividade dos antioxidantes primários quando usados em combinação adequada com eles. Os removedores de oxigênio atuam capturando o oxigênio presente no meio, tornando-os indisponíveis para atuarem como propagadores da autoxidação. Os biológicos compreendem a classe das enzimas, que controlam os níveis de radicais em sistemas biológicos e alimentícios. Os agentes quelantes complexam íons metálicos, principalmente cobre e ferro, impedindo que eles catalisem oxidações lipídicas. Por último, os antioxidantes mistos incluem compostos de plantas e animais que têm sido amplamente estudados como antioxidantes em alimentos. Entre eles estão várias proteínas hidrolisadas, flavonoides e óleos essenciais (RAMALHO; JORGE, 2006).

Apesar da classificação de antioxidante ser extensa, três atividades principais descrevem o poder antioxidante são elas a eliminação de vários radicais livres que envolve um mecanismo de transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio, a inibição da peroxidação lipídica que pode ou não, ser seguida pelo consumo de oxigênio e a quelação de metal, como a complexação de íons de ferro ou cobre estudada como mecanismo antioxidante indireto (CANABADY-ROCHELLE et al., 2018).

2.10.1 Métodos Colorimétricos

A determinação da atividade antioxidante utilizando métodos colorimétricos é clássica, e existem vários testes capazes de descrever o poder antioxidante de espécies vegetais e sintéticas, de forma que a atividade antioxidante de uma substância pode ser avaliada por uma grande variedade de testes *in vitro*, que consideram a variação na resposta de absorbância como parâmetro para inferir tal propriedade. Dentre os ensaios colorimétricos mais citados, destacam-se o de sequestro de radicais livres DPPH, a inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, a redução de íons Fe^{+3} do complexo hexacianoferrato (III) - $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$, que avalia o poder redutor de diversas substâncias e a capacidade de sequestro de radicais hidroxila, pela proteção de desoxirribose.

No método de sequestro de radicais DPPH, o mesmo recebe elétrons ou átomos de hidrogênio de uma substância que tenha caráter antioxidante, de forma que o radical DPPH

(coloração púrpura) sofre redução, formando difenilpicrilhidrazina (coloração amarela) com consequente descoloração da solução. A atividade antioxidante pode então ser controlada pelo decréscimo da absorvância na região de absorção púrpura em comprimento de onda de 515 nm (NASCIMENTO et al., 2011).

O sistema β -caroteno/ ácido linoleico é um método colorimétrico que avalia a capacidade de determinados compostos de inibir os radicais formados durante a peroxidação lipídica. Os antioxidantes doam elétrons ao radical formado pela peroxidação do ácido linoleico, impedindo o ataque desses radicais ao β -caroteno. Esse método é apropriado para avaliação de antioxidantes lipofílicos, como óleos essenciais, não sendo indicado para avaliação de substâncias polares (MIRANDA et al., 2016). O método está fundamentado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação oxidativa do ácido linoleico. Assim, na presença de um antioxidante espera-se que a absorvância da solução não sofra variações com o tempo e aquecimento (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Outro método para determinação da atividade antioxidante é o que avalia o poder redutor. Nesse método, a atividade antioxidante é medida pela capacidade de uma substância em reduzir o complexo hexacianoferrato (III). A reação é controlada pela formação do complexo que leva a coloração do azul da prússia, formado por Fe^{2+} (FARIAS et al., 2013). Esse método se difere dos demais, pois não se baseia na estabilização de um radical livre e sim na capacidade da substância analisada em reduzir os íons Fe^{+3} a Fe^{+2} , de modo que o aumento no comprimento de onda em 700 nm indica altas atividades antioxidantes.

A determinação da atividade antioxidante também pode ser realizada pelo método hidroxil, o qual avalia a capacidade de certas substâncias em sequestrar radicais hidroxila, formados pela reação de Fenton, entre os íons Fe^{+2} e peróxido de hidrogênio em solução, que reagem com a 2-deoxirribose degradando-a. Os produtos da degradação da desoxirribose (malonaldeído), interagem com o ácido tiobarbitúrico formando compostos cromogênicos, que podem ser quantificados por espectrofotometria no comprimento de onda de 532 nm. Quando antioxidantes são adicionados a esse sistema, a quantidade de radicais hidroxila diminui, seja pela estabilização, por doação de prótons por parte do antioxidante, ou pelo efeito quelante destes em relação aos íons ferro, o que leva a inibição da reação de Fenton. Como resultado, a intensidade da coloração rosa diminui, e o decréscimo na absorvância caracteriza a atividade antioxidante da substância avaliada (ALVES et al., 2010).

De forma geral, os métodos colorimétricos são eficazes para a determinação da atividade antioxidantes e o fato de existirem muitas metodologias faz com que substâncias com características químicas e de polaridades diferentes possam ser analisadas de forma a obter resultados mais confiáveis.

2.10.2 Métodos Eletroquímicos

Os métodos eletroquímicos possuem grande aplicabilidade no que diz respeito à determinação de íons metálicos e compostos orgânicos em pesticidas, medicamentos, alimentos e outras matrizes, sendo utilizados no controle de qualidade de muitos produtos. Além disso, estudos têm demonstrado que tais métodos podem ser úteis na determinação da atividade antioxidante de diversas moléculas, como uma alternativa e complemento para as técnicas colorimétricas e cromatográficas, pois, a atividade antioxidante está intimamente relacionada com as propriedades redox do analito (FERNANDESA et al., 2015; HOYOS-ARBELÁEZ; VÁZQUEZ; CONTRERAS-CALDERÓN, 2017; UCHIDA; KÄTELHÖN; COMPTON, 2017).

Métodos eletroquímicos avaliam a resposta de um analito quando esse é submetido a uma diferença de potencial, medidas que estão sempre relacionadas com alguma propriedade química do composto analisado. Essas técnicas têm ganhado cada vez mais espaço em análises industriais e laboratoriais por serem rápidas, de menor custo e gerarem menos resíduos, quando comparadas com outras técnicas de análise. Assim, possibilitam a análise direta da amostra, minimizando o tratamento ou pré-tratamento da mesma, além de permitir o estudo de materiais coloridos ou partículas sólidas dispersas em solução, utilizam pequenas quantidades do analito e de solventes (FULGÊNCIO et al., 2014).

Em geral, técnicas eletroquímicas que se baseiam na resposta do sistema frente a uma perturbação de potencial são conhecidas como técnicas voltamétricas, que diferenciam entre si pela natureza da perturbação aplicada ao sistema. Essa perturbação varia desde saltos de potencial até uma função do potencial no tempo como rampa linear, pulso, senoidal ou qualquer função arbitrária. Varredura linear, voltametrias de onda quadrada, pulso diferencial ou cíclica são exemplos de denominações dadas a esses sinais, ou a combinação entre eles, de forma que, cada um desses métodos possui uma forma singular de aplicação do potencial, formando uma grande variedade de técnicas cuja utilização depende do problema a ser abordado (FERNANDESA et al., 2015).

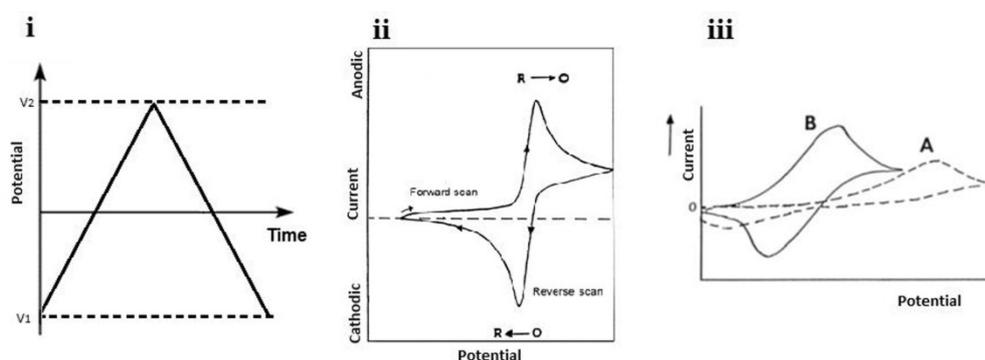
De acordo com Peixoto et al. (2017), a voltametria cíclica e a voltametria de pulso diferencial têm sido as técnicas eletroquímicas mais utilizadas para a determinação da capacidade antioxidante, possibilitando uma indicação qualitativa e/ou quantitativas das espécies ativas na amostra, de forma que é possível analisar diferentes classes de compostos com estruturas moleculares diversas, pois, cada composto apresenta potencialidade redox próprio e singular, resultando em picos de oxidação ou redução em diferentes regiões dos voltamogramas. Informações que se tornam úteis no que diz respeito à avaliação da atividade antioxidante de extratos de plantas e óleos essenciais que possuem complexa constituição química, passivo de efeitos sinérgicos e antagônicos. Por meio da seletividade desses métodos é possível identificar quais espécies, presentes em uma amostra complexa, realmente exercem o efeito antioxidante.

Apesar de seu potencial, os métodos eletroquímicos ainda não foram amplamente investigados e aplicados a todas as classes de compostos. Atualmente, a voltametria cíclica tem sido utilizada com mais frequência, para a avaliação de compostos ativos e antioxidantes. Por meio dessa técnica, autores como Jara-Palácios et al. (2017) avaliaram o potencial antioxidante de subprodutos da vinificação. Dar et al. (2013) estudaram a atividade antioxidante de três medicamentos de origem natural (crocin, podofilotoxina e kaempferol) utilizando ensaios bioquímicos e eletroquímicos. Autores como Keffous et al. (2016) e Peixoto et al. (2017) avaliaram a capacidade antioxidante por voltametria cíclica de extratos de *Limoniastrum feei* e *Bunchosia glandulifera*, respectivamente. Rene et al. (2010) utilizaram a técnica para estudar a capacidade dos compostos fenólicos de estabilizar e neutralizar espécies reativas de oxigênio. Os autores citados conseguiram de forma eficaz explicar e elucidar a atividade antioxidante das amostras avaliadas e corroboraram entre si, no sentido de que os métodos eletroanalíticos podem ser utilizados na avaliação da capacidade antioxidante de forma rápida e eficaz.

Na voltametria cíclica, o potencial de um eletrodo de trabalho é examinado linearmente pela aplicação de uma onda de potencial triangular (FIGURA 16) com ciclos únicos ou múltiplos, dependendo dos objetivos do estudo. A corrente gerada pelo processo de oxirredução é medida por um potenciostato/galvanostato, resultando em um gráfico de corrente *versus* potencial, mais conhecido como voltamograma. Por meio dessa técnica, é possível adquirir informações qualitativas e quantitativas sobre as propriedades e características dos processos que ocorrem na superfície de um eletrodo. Assim, a velocidade de varredura e os potenciais iniciais e finais são utilizados para identificar processos de oxidação e redução, bem como adsorção/dessorção, e ainda determinar se esses processos ocorrem de forma reversível ou

irreversível, contribuindo para o conhecimento sobre a termodinâmica dos processos redox e cinética das reações heterogêneas de transferência de elétrons, reações químicas acopladas e/ou processos de adsorção. A voltametria cíclica fornece parâmetros importantes, como potenciais de pico catódico (processo de redução) e anódico (processo de oxidação), além de corrente de pico catódica e anódica, que podem ser utilizados para avaliar a eficiência antioxidante das moléculas estudadas (HOYOS-ARBELÁEZ; VÁZQUEZ; CONTRERAS-CALDERÓN, 2017; TICIANELLI; GONZALEZ, 2005).

Figura 16 - Sinal de aplicação de potencial no tempo e voltamogramas para voltametria cíclica



(i) Função de potencial no tempo, na forma de onda triangular; (ii) voltamograma típico de sistemas reversíveis. (iii) Voltamograma de sistema quase-reversível (curva B) e irreversível (curva A).

Fonte: Adaptado de Hoyos-Arbeláez; Vázquez; Contreras-Calderón (2017)

Em eletroquímica, são conhecidos dois processos eletródicos: o reversível, quando a reação de transferência de carga é tão rápida que o eletrodo se encontra sempre em equilíbrio eletroquímico tendo a difusão como etapa determinante da cinética do processo global; e o processo irreversível, ocorre quando uma ou mais reações de transferência de carga determinam a velocidade do processo, sendo que nesse, o equilíbrio entre as espécies eletroativas não se mantém. Existem ainda os processos quase reversíveis, em que o transporte de matéria e a reação de transferência de carga apresentam velocidades comparáveis (HOYOS-ARBELÁEZ; VÁZQUEZ; CONTRERAS-CALDERÓN, 2017; SEEBER; ZANARDI; INZELT, 2016). Os voltamogramas característicos de cada um desses processos estão apresentados na Figura 16.

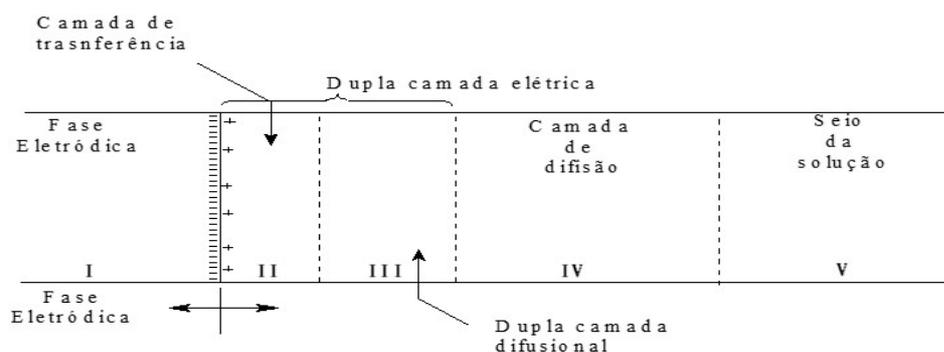
Um sistema eletroquímico, como em voltametria cíclica, utiliza três eletrodos imersos em um eletrólito de suporte. Nesse sistema, um potencial programado é aplicado entre o eletrodo de trabalho e o de referência e uma corrente estabelecida entre o eletrodo auxiliar e de trabalho. Para que ocorra reação na superfície do eletrodo, as moléculas analisadas precisam ser eletroativas, ou seja, passíveis de sofrer processos de redox. Além disso, elas precisam ser

transportadas até a superfície do eletrodo para que a reação eletrodica possa ser estabelecida, gerando corrente. Uma série de processos governa a corrente, entre eles destacam-se a transferência de massa (transferência das espécies à superfície do eletrodo), transferência de carga (transferência de elétrons na superfície do eletrodo) e as reações químicas que precedem ou sucedem a transferência de elétrons, que podem ser homogêneos (protonação/ dimerização) ou heterogêneos (decomposições catalíticas, adsorção, dessorção, cristalização) (PACHECO et al., 2013).

Reações eletrodicas são reações de oxirredução heterogênea que ocorrem principalmente por meio de processos adsorptivos, pela interação de espécies da fase eletrolítica com a superfície eletrodica. A natureza e a força dessas interações variam de forte, quando são estabelecidas ligações covalentes (quimissorção), mediana, pela interação eletrostática entre a superfície carregada do eletrodo e íons/dipolos presentes na solução, a fraca, pelo estabelecimento de forças de Van der Waals (fisissorção) (de AZEVEDO; GOULART, 1997).

O processo de adsorção, como um todo, é de extrema importância e a região interfacial de um eletrodo deve ser considerada, uma vez que qualquer mudança nas regiões individuais pode afetar todo o processo eletrodico. Na Figura 17, encontra-se ilustrada esquematicamente uma visão lateral de um sistema eletrodico (de AZEVEDO; GOULART, 1997).

Figura 17 - Visão lateral de um sistema eletrodico



Fonte: Adaptado de Azevedo e Goulart (1997)

Pela Figura 17 e pelo postulado de Helmholtz, é possível perceber que a distribuição de cargas ao longo do eletrodo (região I) produz uma orientação das moléculas do solvente imediatamente vizinha ao eletrodo, criando uma camada elétrica de carga total e densidade de carga igual ao eletrodo de trabalho, porém, com sinal oposto, mantendo a neutralidade elétrica do sistema, sendo esse fenômeno responsável pela formação da dupla camada (regiões II e III).

Formada por duas lâminas de cargas opostas em sinais, em que as moléculas do solvente na camada adjacente, não possuem mobilidade por estarem adsorvidas no eletrodo (plano interno de Helmholtz), sendo que na região II a transferência de carga ocorre por influência de um campo elétrico e, na região III, o princípio da neutralidade de carga não é seguido. Quando a corrente elétrica flui para fora dessa dupla camada, encontra uma região na qual a neutralidade é satisfeita (região IV). Essa região se estende a partir da fronteira da camada interna até a fronteira da região denominada seio da solução (plano externo de Helmholtz), onde as moléculas do analito possuem certa mobilidade, e sofrem atração do eletrodo por interações de longa distância. A diferença na composição dos constituintes nas regiões IV e V gera um gradiente de concentração em IV, do qual a velocidade de transporte de massa é dependente, sendo essa modificada pela variação contínua de potencial (de AZEVEDO; GOULART, 1997; PACHECO et al., 2013; SEEBER; ZANARDI; INZELT, 2016).

Na voltametria cíclica, o transporte de massas ocorre pelo processo de difusão (movimento das moléculas/íons eletroativos ao eletrodo por gradiente de concentração) e quando a difusão controla o transporte de massas, a corrente capacitiva (não faradáica) é minimizada, de forma que a corrente observada é resultante apenas da interação do analito com o eletrodo (corrente faradáica), sendo essa proporcional à concentração do analito no seio da solução (PACHECO et al., 2013; SEEBER; ZANARDI; INZELT, 2016).

2.10. 3 Efeito Quelante Sobre Íons Ferro (II)

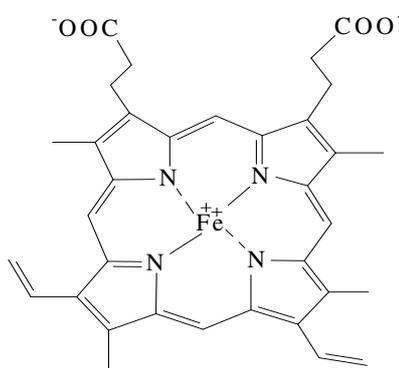
Os íons metálicos como Mn^{2+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} e Zn^{2+} são essenciais para o bom funcionamento biológico, pois atuam na transmissão de sinais nervosos, no transporte de oxigênio (respiração celular), na síntese e metabolismo de neurotransmissores e como cofatores para uma série de enzimas. Entretanto, o acúmulo anormal de íons gera radicais livres, o que leva a danos celulares e promove lesão e morte celular, uma vez que podem se acumular nos órgãos vitais, produzindo complicações, como insuficiência hepática, insuficiência cardíaca, insuficiência renal, doenças neurodegenerativas e anormalidades endócrinas (MARY; VIJAYAKUMAR; SHANKAR, 2018; SHEIKH; DESAI; TIRGAR, 2017).

Uma das formas de se controlar os níveis de íons metálicos excedentes nos tecidos é por meio da terapia de quelação, que utiliza de compostos que possuem a habilidade de formarem complexos estáveis com os íons em questão (SHEIKH; DESAI; TIRGAR, 2017).

O ferro é um dos metais mais importantes para os organismos vivos, na forma de íon Fe^{+2} , sendo responsável pelo transporte de oxigênio, quando ligado à hemoglobina. Sem a presença desse íon, a hemoglobina se torna incapaz de transportar o oxigênio do pulmão para as demais células e órgãos. Apesar de ser extremamente importante, a maior parte do ferro disponível encontra-se na forma de Fe^{+3} , pois em um ambiente oxigenado, os íons Fe^{+2} não são estáveis e se convertem rapidamente à sua forma férrica, com formação de espécies reativas de oxigênio (reação de Fenton). Desse modo, os organismos vivos desenvolveram estratégias para extrair Fe^{+2} do ambiente e estocá-lo de forma a impedir sua livre circulação, que pode causar infestações microbianas e excesso de espécies reativas de oxigênio no organismo (HALLIWELL, 2006).

Um dos maiores exemplos de agentes quelantes na natureza é a hemoglobina, pois essa se liga coordenadamente aos íons Fe^{+2} (FIGURA 18) e os utiliza para transportar oxigênio, ao mesmo tempo em que impede a sua oxidação por ação do oxigênio transportado. Assim, a presença de um agente quelante, como a hemoglobina, faz toda a diferença para que o oxigênio chegue a células (ALENKINA et al., 2018). O efeito quelante não é importante apenas para os sistemas biológicos. A adição dessas substâncias em produtos cosméticos e alimentícios garante maior durabilidade desses produtos, uma vez que complexam íons metálicos presentes nesses produtos, impedindo que reajam com o oxigênio atmosférico e outros constituintes presentes nas formulações, contribuindo para a formação de espécies reativas de oxigênio que levam rápida deterioração do produto.

Figura 18 - Interação da hemoglobina com íons Fe^{+2}



Fonte: Adaptado de Alenkina et al. (2018)

A atividade antioxidante envolve vários mecanismos, entre eles a quelação de metais, frequentemente estudada como mecanismo antioxidante indireto, uma vez que, após a

complexação do metal, as reações oxidativas são atrasadas ou inibidas. Esse efeito tem sido estudado por meio de várias metodologias, utilizando técnicas colorimétricas (SHEIKH; DESAI; TIRGAR, 2017), eletroanalíticas (GONÇALVES; BATTISTIN, 2009) e técnicas de ressonância plasmática superficial (SPR) (CANABADY-ROCHELLE et al., 2018).

Gonçalves et al. (2009) e Gonçalves e Battistin (2009) utilizaram potenciometria para estudar o efeito coordenante de óleos essenciais do gênero *Mentha* sobre íons Ferro (II). De acordo com os autores, métodos potenciométricos podem ser úteis para avaliar não só a capacidade coordenante, como também a cinética de coordenação.

Além da potenciometria, é possível estudar o efeito quelante por meio de técnicas voltamétricas, avaliando o comportamento eletroquímico de íons ferro (II) na ausência e na presença de moléculas com características quelantes (CHU; WAN, 1993). Uma vez quelado, as características físico-químicas do metal se alteram e os componentes do quelato compartilham propriedades entre si, alterando o sistema estudado e afetando todo o processo eletródico (CAETANO-SILVA et al., 2017).

2.10.4 Cálculos Teóricos

A química computacional é uma ferramenta que pode ser utilizada para a análise e interpretação de dados experimentais, pois permite o cálculo teórico de parâmetros físico-químicos, a caracterização e a predição da estrutura e da estabilidade de sistemas químicos, informações muitas vezes difíceis de serem obtidas experimentalmente. Basicamente compreendida em quântica (métodos ab initio, semiempírico, funcional de densidade entre outros) e clássica (mecânica dinâmica - determinístico e monte carlo – estocástico), a química teórica vem se tornando bastante popular nas últimas décadas, de forma que uma forte interação entre químicos teóricos e experimentais tem sido observada (GIACOMELLI et al., 2004; MORGON, 2001).

No que diz respeito aos métodos quânticos, a teoria do funcional da densidade (DFT) está entre os métodos mais populares disponíveis em química computacional, pois permite determinar as propriedades de muitos elétrons utilizando funcionais, que, no método em questão, é função de densidade eletrônica. Essa técnica é importante para o cálculo de geometrias e energias de moléculas (RAJAN; MURALEEDHARAN, 2017).

Os cálculos teóricos possuem inúmeras aplicabilidades, dentre elas pode-se destacar sua utilização no estabelecimento de uma correlação entre a estrutura química e a atividade

biológica, por meio de modelos matemáticos. Assim, a atividade antioxidante tem sido explicada por meio da química computacional, por envolver a capacidade de doação de prótons e elétrons e a estabilização de elétrons desemparelhados. Parâmetros que permitem prever se a molécula apresenta condições mínimas para exercer atividade antioxidante (GIACOMELLI et al., 2004).

Dentre os parâmetros físico-químicos que auxiliam na avaliação da atividade antioxidante, destaca-se o cálculo da energia de dissociação homolítica da ligação O-H (ΔH) das moléculas na forma gasosa e em água, sendo a diferença desses dois parâmetros a que fornece informações sobre a estabilidade dos produtos formados após a quebra da ligação. Tal parâmetro avalia a facilidade de transferência de átomos do hidrogênio de uma molécula bioativa (antioxidante) para o radical. De acordo com Giacomelli et al. (2004), a energia de dissociação é o parâmetro mais apropriado para a avaliação da capacidade antioxidante.

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido nos Laboratórios de Química Orgânica - Óleos Essenciais, Analítica e Eletroanalítica e Modelagem Molecular do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras.

3.1 Material Vegetal

Os materiais vegetais, folhas de hortelã e botões florais secos de cravo-da-índia, foram adquiridos em um estabelecimento comercial de Lavras, Minas Gerais. O cerne de candeia foi cedido pelo Laboratório de Estudos e Projetos em Manejo Florestal – Lemaf do Departamento de Ciências Florestais e as folhas frescas de orégano foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras.

Os constituintes majoritários dos óleos essenciais foram obtidos na forma de padrões sintéticos puros pela Sigma-Aldrich.

3.2 Extração dos Óleos Essenciais

Os óleos essenciais das espécies estudadas foram obtidos por hidrodestilação, utilizando um aparelho de Clevenger modificado acoplado a um balão de fundo redondo de 5 L, conforme metodologia descrita por Brasil (2010).

Para a extração das folhas frescas e secas de orégano e hortelã, adicionaram-se ao balão cerca de 250 g de material vegetal e 2,5 L de água. Os óleos essenciais de cravo-da-índia e candeia, por sua vez, foram extraídos a partir de 300 g de botões florais e 500 g de cerne da madeira, respectivamente. O processo de hidrodestilação teve duração de 2 horas para todas as espécies, com exceção do óleo essencial de candeia no qual a ebulição foi mantida por 8 horas (ALTOE et al., 2013).

Os hidrolatos obtidos foram centrifugados em centrífuga (FANEM, 206-R) a 9,6 g por 15 min. Os óleos foram retirados com o auxílio de uma micropipeta de Pasteur e armazenados em vidro âmbar sob refrigeração.

A extração foi realizada em triplicata e o rendimento (%) calculado em p/p em Base Livre de Umidade (BLU), conforme Equação 1.

$$\%R = \frac{100 \times \text{peso do óleo}}{\frac{\text{Peso da amostra} - (\text{peso da amostra} \times \text{umidade})}{5}}$$

Equação 1

Em que R representa o rendimento do óleo essencial (base livre de umidade).

3.3 Determinação da umidade

Paralelamente à extração dos óleos essenciais, foi realizado o teste para determinação do teor de umidade do material vegetal, seguindo método descrito por Pimentel et al. (2008). Em um balão volumétrico de 250 mL, acoplado a um condensador com coletor volumetricamente graduado (Dean Stark), foram adicionados 5 g de material vegetal e 80 mL de ciclohexano. O sistema foi submetido à ebulição durante 2 horas, aferindo-se o volume de água ao final desse período.

O teor de umidade foi calculado com base no volume de água presente em 100 g de amostra.

3.4 Identificação e Quantificação dos Constituintes Químicos dos Óleos Essenciais

A identificação dos constituintes químicos do óleo essencial foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM- Shimadzu,

QP5050A) utilizando-se uma coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase ligada a DB5 (0,25 μm de espessura). O gás de arraste utilizado foi He a um fluxo de 1,18 mL min^{-1} a 210 $^{\circ}\text{C}$. A temperatura iniciou-se em 60 $^{\circ}\text{C}$, seguida de um aumento de 3 $^{\circ}\text{C}$ até 240 $^{\circ}\text{C}$; posteriormente, a 10 $^{\circ}\text{C}$, até chegar em 300 $^{\circ}\text{C}$, a qual permaneceu constante por 7 min. A temperatura do injetor foi de 220 $^{\circ}\text{C}$ e a do detector (ou interface) de 240 $^{\circ}\text{C}$. Foram injetados 0,1 μL de amostra, diluída em hexano a uma taxa de partição de 1:100.

Na avaliação quantitativa, utilizou-se um cromatógrafo gasoso (Shimadzu CG – 17A) equipado com detector por ionização de chamas (FID). Os parâmetros experimentais de análise foram os mesmos utilizados na identificação por CG/EM, com temperatura do detector de 300 $^{\circ}\text{C}$.

Os constituintes foram identificados comparando os índices de retenção calculados pela equação de Van Den Dool e Kratz (1963) em relação à série homóloga de alcanos ($n\text{C}_8$ - $n\text{C}_{18}$) e com extrapolação para C_{19} e C_{20} , com os índices de retenção da literatura, segundo Adams (2007) e duas bibliotecas do equipamento NIST107 e NIST2. Tais bibliotecas permitiram a comparação dos espectros obtidos com os existentes.

3.5 Atividade Antioxidante: Diluição das Amostras

Nas análises antioxidantes, foram utilizados os óleos essenciais de cravo-da-índia, hortelã, candeia e orégano; os padrões sintéticos eugenol, carvona, α -bisabolol e carvacrol; e os antioxidantes sintéticos (controle para as análises) ácido ascórbico, 2,6-ditertbutil-4-hidroxitolueno (BHT) e manitol diluídos em água, para os testes eletroquímicos e de estabilização de radicais hidroxila; e, em etanol, para as demais análises.

Nas análises colorimétricas, as soluções foram preparadas mediante a pesagem de 0,0125 g de cada amostra (óleos essenciais ou padrões sintéticos), solubilizadas em 25 mL de solvente (etanol ou água), formando soluções-estoque de concentração 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, que foram diluídas para as seguintes concentrações 25, 50, 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Ao final do processo de diluição, cada amostra apresentou sete soluções de concentrações crescentes, que foram avaliadas com relação à capacidade antioxidante (REZENDE et al., 2017).

Para os testes eletroanalíticos, foram preparadas soluções-estoque de 15000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mediante a adição de 0,0750 g de cada amostra (óleos essenciais ou padrões sintéticos) a um balão volumétrico de 5 mL. As soluções-estoque foram diluídas diretamente nas células eletroquímicas nas concentrações de 2,5, 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.6 Atividade Antioxidante: Sequestro de Radicais Livre DPPH

A determinação da atividade antioxidante pela estabilização do radical livre DPPH foi realizada segundo metodologia descrita por Teixeira et al. (2012), com modificações. Para isso, uma solução etanólica de DPPH com concentração de 40 mg L⁻¹ foi preparada e mantida sob refrigeração e ao abrigo de luz.

Foram adicionados a tubos de ensaio 0,3 mL de amostra nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 µg mL⁻¹, seguido da adição de 2,7 mL da solução de DPPH. Simultaneamente, foram preparados o controle negativo e o branco. O controle negativo foi preparado pela adição de 0,3 mL de etanol e 2,7 mL de solução de DPPH, e o branco, pela adição de 2,7 mL de etanol e 0,3 mL da solução de óleo essencial ou padrão na maior concentração. As misturas permaneceram ao abrigo de luz por 60 min; após esse período, foram realizadas leituras de absorbância em espectrofotômetro UV/ Vis (Shimadzu UV-160 1 PC) a 515 nm. A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi calculada pela Equação 2.

$$\%AA = 1 - \frac{A_{\text{amostra}}}{A_{\text{controle}}} \times 100$$

Equação 2.

Em que: A_{amostra} é a absorbância da solução contendo todos os reagentes e A_{controle} é a absorbância do controle.

O padrão de comparação utilizado na análise foi o antioxidante sintético BHT e todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.7 Atividade Antioxidante: Sistema β-caroteno/ ácido linoleico

A atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ ácido linoleico foi determinada segundo metodologia descrita por Kulisic et al. (2004), com modificações. Para tal, duas soluções denominadas A e B foram preparadas.

A solução A foi preparada em um balão de fundo redondo de 500 mL, no qual adicionaram-se 0,03 g de β-caroteno, 0,3 g de ácido linoleico, 3,0 g de Tween 20 e 150 mL de clorofórmio. A mistura foi rota-evaporada por 60 min a 50 °C, para eliminação do clorofórmio. Ao resíduo, foram adicionados 750 mL de água destilada saturada em oxigênio.

Para o preparo da solução B, adicionaram-se 0,02 g de ácido linoleico, 0,2 g de Tween 20 e 10 mL de clorofórmio a um balão de fundo redondo de 250 mL. O clorofórmio foi rotavevaporado e, ao resíduo, foram adicionados 50 mL de água saturada em oxigênio.

A determinação da atividade antioxidante foi realizada com quatro repetições; para isso, 0,2 mL de amostras nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 2,5 mL de solução A foram adicionados aos tubos de ensaio. Paralelamente, foram preparados o controle negativo e o branco. O controle negativo foi obtido pela adição de 0,2 mL de etanol e 2,5 mL de solução A e o branco pela adição de 2,5 mL da solução B e 0,2 mL da amostra na maior concentração. Foram realizadas leituras em espectrofotômetro UV/Vis (Shimadzu UV-160 1 PC) a 470 nm no tempo inicial ($t = 0$) e, após 60 minutos de incubação, a 50 °C na ausência de luz.

A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) foi calculada pela Equação 3.

$$\%AA = 100 \times \left[1 - \frac{(A_0 - A_t)}{(A_{00} - A_{0t})} \right]$$

Equação 3

Em que A_0 e A_{00} representam as absorvâncias da amostra e do controle no início da incubação e A_t e A_{0t} representam as absorvâncias da amostra e do controle após 60 minutos de incubação.

Utilizou-se o antioxidante sintético BHT como padrão para comparações.

3.8 Determinação da Atividade Antioxidante: Radical Hidroxila

A avaliação da atividade antioxidante pelo método de captura do radical hidroxila (OH^\bullet) foi realizada seguindo metodologia descrita por Boulanouar et al. (2013) com modificações.

Em tubos de ensaio, foram adicionados 100 μL de amostra diluída em água destilada nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 100 μL da mistura de FeSO_4 0,005 mol L^{-1} /EDTA 0,0064 mol L^{-1} ; 100 μL de desoxirribose 0,001 mol L^{-1} ; 700 μL de solução tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} (pH 7,4) e 100 μL de H_2O_2 0,05 mol L^{-1} . Em seguida, os tubos foram incubados a 37 °C por 120 minutos. Decorrido esse período, foram adicionados 500 μL de TCA 0,2 mol L^{-1} (ácido tricloroacético) e 500 μL de TBA 0,07 mol L^{-1} (ácido tiobarbitúrico), seguidos de nova incubação a 95 °C por 10 min. Após o resfriamento dos tubos, realizaram-se as leituras em espectrofotômetro UV/Vis (Shimadzu UV-1601PC) a 532 nm.

A atividade antioxidante (AA%) foi calculada utilizando a Equação 4.

$$AA\% = (A_{\text{controle}} - A_{\text{amostra}}/A_{\text{controle}}) \times 100$$

Equação 4

Em que A_{controle} representa a absorbância do controle negativo (sem amostra) e A_{amostra} , a absorbância das amostras. O manitol foi utilizado como padrão para fins de comparação dos resultados. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

3.9 Atividade Antioxidante: Poder Redutor

A determinação do poder redutor das amostras foi realizada segundo metodologia descrita por Kanatt, Chander e Sharma (2007), com modificações. Foram adicionados aos tubos de ensaio 50 μL de amostra nas seguintes concentrações 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; 500 μL de solução tampão fosfato 0,01 mol L^{-1} (pH 7,4) e 500 μL de hexacianoferrato III de potássio 0,03 mol L^{-1} . Em seguida, a mistura foi agitada em vortex (Phoenix/AP-56) e incubada a 50 $^{\circ}\text{C}$ por 20 min. Após a incubação, adicionaram-se 500 μL de TCA 0,612 mol L^{-1} (ácido tricloroacético), 1500 μL de água destilada e 300 μL de FeCl_3 0,006 mol L^{-1} . Em seguida, as leituras foram realizadas em espectrofotômetro UV/Vis (Shimadzu UV-1601PC) a 700 nm.

Para a determinação do poder redutor, foram construídas curvas de absorbância *versus* concentração da amostra, tendo o ácido ascórbico como controle das análises, que foram realizadas em triplicata. O poder redutor das amostras foi inferido pela inclinação das retas.

3.10 Atividade Antioxidante: Voltametria Cíclica

A voltametria cíclica foi utilizada para estudar o comportamento eletroquímico dos óleos essenciais e padrões sintéticos na superfície de um eletrodo de carbono vítreo. A avaliação da atividade antioxidante por meio dessa técnica foi adaptada de Tonello et al., 2016.

As medidas voltamétricas foram realizadas em potenciostato/galvanostato Ivium Technologies (Vertex) interfaceado pelo software IviumSoft versão 1.1+. Utilizou-se uma célula eletroquímica com três eletrodos, sendo carbono vítreo como eletrodo de trabalho, fio de platina como eletrodo auxiliar e eletrodo de Ag/AgCl saturado em KCl como eletrodo de referência. O eletrodo de trabalho foi polido antes e após cada medição em alumina e lavado

com água destilada em abundância. Utilizou-se como eletrólito de suporte uma solução tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4), que também foi utilizada para obtenção do branco das análises.

Após otimizações, obtiveram-se voltamogramas com um ciclo, a uma velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} em uma janela de potencial de + 0,000 V a + 0,900 V. Na célula contendo 15 mL de eletrólito de suporte, foram adicionados 500 μL de amostra (soluções estoques de óleos essenciais e padrões sintéticos).

Antes de cada análise, as soluções na célula eletroquímica foram completamente desgaseificadas pelo borbulhamento com nitrogênio. As amostras foram diluídas em água destilada e todas as medidas foram realizadas à temperatura ambiente e em triplicata.

3.11 Atividade Antioxidante: Determinação do efeito quelante sobre íons Fe^{+2}

A capacidade quelante dos óleos essenciais e dos padrões sobre íons Fe^{+2} foi realizada segundo metodologia adaptada de Gonçalves et al. (2009) e Vega-Hernández et al. (2017).

Foram obtidos voltamogramas cíclicos a 50 mV s^{-1} em uma janela de potencial de -0,200 V a +1,200 V. A célula eletroquímica foi composta por três eletrodos Ag/AgCl (saturado em KCl) como referência e fio de platina como auxiliar e carbono vítreo como eletrodo de trabalho. Utilizou-se como eletrólito de suporte sulfato de sódio (NaSO_4) $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ anidro e sulfato de ferro II ($\text{FeSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$) $0,00150 \text{ mol L}^{-1}$ como fonte de íons Fe^{+2} .

Partindo-se de 10 mL de eletrólito de suporte e 5 mL de $\text{FeSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$, adicionaram-se quantidades crescentes de solução estoque $15000 \mu\text{g mL}^{-1}$ de amostra (óleo essencial ou padrão sintético) de forma que o efeito quelante fosse avaliado nas seguintes concentrações de 2,5, 5, 10, 20, 50, 100, 150, 200, 250 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Utilizou-se o ácido ascórbico como antioxidante padrão para comparações.

A determinação do efeito quelante foi realizada mediante o cálculo da altura do pico de oxidação do Fe^{+2} com o aumento na concentração das amostras (óleos essenciais e padrões sintéticos), na célula eletroquímica. A altura de pico anódico de (Fe^{+2}) foi calculada pela diferença entre a maior e a menor corrente de oxidação em μA . A altura foi determinada a partir do estabelecimento de um potencial médio para todas as amostras analisadas.

Construiu-se também uma curva analítica da concentração *versus* corrente de Fe^{+2} pela adição sucessiva de uma solução estoque $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ de FeSO_4 a uma célula contendo 10 mL de NaSO_4 $0,05 \text{ mol L}^{-1}$ e 5 mL de água destilada. As condições de análise foram as mesmas descritas anteriormente; todos os testes foram realizados em triplicata. Por meio da curva

concentração *versus* corrente de Fe^{+2} e da equação da reta, foi possível confirmar o efeito quelante das amostras analisadas frente aos íons ferro (II).

3.12 Cálculos Teóricos: Entalpia de dissociação

As geometrias das moléculas foram obtidas buscando a minimização de energia utilizando o método DFT/ ω B97X-D (CHAI; HEAD-GORDON, 2008) com funções de base de Pople 6-31+G (d, p) (FRISCH; POPLÉ; BINKLEY, 1984). Tal método foi escolhido por se apresentar como uma alternativa aos métodos tradicionais *ab initio* e semiempíricos no estudo de propriedades do estado fundamental de sistemas moleculares contendo muitos elétrons, pois se baseia na densidade eletrônica e, conseqüentemente, na distribuição de carga em uma molécula, de forma a descrever as propriedades das moléculas de forma mais realística, com maior rigor e menor custo computacional. Foram empregados cálculos de frequência para obtenção dos valores de entalpia padrão e correções de energia no ponto zero (1.00 atm e 298.15 K), e para garantir que os mínimos de energia não representam pontos de sela (mínimos que na realidade são máximos). A entalpia de solvatação foi obtida a partir do ciclo termodinâmico (ANDRADE et al., 2017); para isso, as estruturas foram otimizadas em água implícita (a fim de desconsiderar interações entre soluto-solvente, tornando o cálculo mais simples e possível) utilizando o modelo PCM (*Polarized Continuum Model*) (TOMASI; MENNUCCI; CAMMI, 2005), que define a região ocupada pelo soluto como um conjunto de esferas que circundam os átomos da molécula. Os cálculos foram realizados utilizando do programa Gaussian 09 (FRISCH et al., 2009).

3.13 Análise Estatística

O delineamento experimental para os testes colorimétricos realizados foi inteiramente casualizado, utilizando o programa Sisvar para comparação das médias por meio do teste Scott Knott (FERREIRA et al., 2011).

As médias da atividade antioxidante para os óleos essenciais e seus respectivos padrões foram comparadas pelo teste Scott Knott com 5% de significância em um esquema fatorial (9 x 7), sendo nove amostras de óleos essenciais e padrões analisadas (cravo-da-índia, eugenol, orégano, carvacrol, hortelã, carvona, candeia, α -bisabol e um controle BHT ou manitol) e sete concentrações (25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), com três repetições. Para a análise

do poder redutor, realizou-se um esquema fatorial (9 x 1), sendo nove amostras de óleos essenciais e padrões (cravo-da-índia, eugenol, orégano, carvacrol, hortelã, carvona, candeia, α -bisabol e um controle ácido ascórbico) e uma inclinação obtida das curvas concentração *versus* absorvância, com três repetições.

4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

4.1 Rendimento dos Óleos Essenciais

A partir dos resultados de umidade, foi possível calcular o teor de água presente nas plantas e o rendimento em base livre de umidade (% p/p BLU) do óleo essencial das espécies estudadas (TABELA 1).

Tabela 1 – Rendimento em Base Livre de Umidade dos óleos essenciais

Óleo Essencial	Teor de Umidade (%)	Rendimento (% p/p BLU)
Cravo-da-índia	10,48	2,43
Hortelã	11,00	0,54
Orégano	72,94	1,31
Candeia	7,64	0,87

Fonte: Do autor (2018)

Apesar de as espécies cravo-da-índia e hortelã terem sido obtidas na forma de planta seca, verificou-se, após o teste de umidade, que as plantas possuíam teor de água de 10,48 e 11%, respectivamente. É possível perceber que o processo de secagem em vegetais não esgota a quantidade de água presente na planta, visto que tais processos visam apenas à redução de água nos tecidos vegetais, de forma que a secagem de plantas aromáticas se dá até que o teor de umidade seja constante e não nulo (GASPARIN; CHRIST; COELHO, 2017). Embora o teor de umidade de plantas submetidas à secagem não seja nulo, valores de umidade acima de 10% podem favorecer o desenvolvimento de fungos e bactérias, além de contribuir para a atividade hidrolítica de diversas enzimas, as quais podem comprometer a qualidade dos princípios ativos presentes na planta (ROSADO et al., 2011). Dessa forma, verifica-se uma inadequação no processo pelo qual as plantas estudadas no presente trabalho foram submetidas.

As espécies hortelã e cravo-da-índia são plantas aromáticas e medicinais conhecidas e utilizadas pela sociedade e indústrias dos mais diversos setores, de modo que são encontradas majoritariamente em sua forma seca, devido à facilidade de manuseio e comercialização. Além disso, o processo de secagem da planta diminui consideravelmente o processo de deterioração do material vegetal, uma vez que retarda e interrompe muitas reações enzimáticas que continuam mesmo após a colheita (LUZ; EHLERT; INNECCO, 2009; ROSADO et al., 2011). Sabe-se que o processamento do material vegetal influencia de maneira significativa no que tange à quantidade e à qualidade dos princípios ativos presentes nas plantas, de forma que o teor e a constituição química dos óleos essenciais podem ser afetados pelo processo de secagem, uma vez que são constituintes voláteis e de fácil degradabilidade na presença de luz e calor (GUIMARÃES et al., 2008). A eliminação da água em plantas medicinais, quando realizada de forma correta, pode contribuir para o aumento percentual de princípios ativos em relação ao peso de planta. Entretanto, se o processo não for adequado, pode favorecer o crescimento microbiano, reações de hidrólise e oxidação degradando os constituintes químicos presentes na planta (LUZ; EHLERT; INNECCO, 2009; ROSADO et al., 2011).

O cravo-da-índia apresentou o maior rendimento de extração em relação às demais espécies estudadas. Vários autores que estudaram o óleo essencial dessa espécie encontraram rendimentos expressivos. Silvestri et al. (2010), estudando a atividade antioxidante e antibacteriana do óleo essencial de cravo-da-índia, encontraram um rendimento de 1,87%. Araujo et al. (2016), avaliando a atividade larvicida do óleo essencial de cravo contra *Aedes aegypti* L., verificaram um rendimento de extração de 19%. O alto rendimento de extração para essa espécie, atrelado a suas atividades biológicas, tem sido um dos fatores que instigam o estudo desse óleo em vários ramos da pesquisa, pois a grande quantidade de óleo obtida após os processos de extração faz com que a aplicação industrial seja possível.

Apesar de apresentar baixo rendimento, o óleo de hortelã é largamente empregado na indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética, o que corrobora com os dados obtidos, pois o óleo essencial de hortelã foi o que apresentou menor rendimento entre as espécies estudadas. Fato esse, relatado por diversos autores, como Shahsavarpour et al. (2017), que avaliaram o rendimento do óleo essencial de *Mentha spicata* L. extraído por CO₂ supercrítico em diferentes pressões e temperaturas, como uma forma de propor um método mais simples e de maior rendimento para a obtenção do óleo essencial de hortelã; apesar da variação na forma e nas condições de extração, os autores relataram um rendimento ótimo de 0,4894%, dados que se assemelham ao encontrado no presente estudo. Barros et al. (2015) também relataram baixos

rendimentos de extração para espécies de *Mentha* (0,02-0,54%). De acordo com os autores, o rendimento médio dessa espécie situa-se em torno de 0,05 a 1,6% e varia de acordo com o genótipo, o estágio de desenvolvimento da planta e as condições ambientais.

O óleo essencial das folhas de orégano e do cerne da candeia foi extraído a partir de planta fresca, o que explica o alto teor de umidade obtido para as folhas de orégano. Embora material seco apresente maior estabilidade química, devido à interrupção de processos metabólicos que ocorrem mesmo após a coleta da planta, a utilização de material fresco torna-se indispensável para a produção e detecção de alguns componentes específicos (PIMENTEL et al., 2008). Independentemente do alto teor de umidade, o óleo essencial de orégano apresentou o segundo maior rendimento (1,31%); esse valor corrobora com aquele encontrado por Romero et al. (2015), que estudando o seu efeito contra fungos patogênicos, encontraram 1,5% de rendimento. Apesar de possuir um bom rendimento de extração, autores como Marcial et al. (2016) encontraram baixo rendimento (0,86%), o que difere do encontrado no presente trabalho.

O rendimento de extração do óleo essencial de candeia de origens distintas foi estudado por Galdino et al. (2006), que observaram um rendimento de aproximadamente 0,30 %, de forma que os valores obtidos no presente trabalho (0,87%) são ligeiramente maiores do que os relatados pelos autores. Santos et al. (2017) obtiveram maiores quantidades de óleos essenciais pela extração com CO₂ supercrítico, sendo que o rendimento médio obtido pelos autores varia de 1,54 a 2,35%.

Independentemente da planta estudada, a qualidade e a quantidade de óleo essencial podem ser influenciadas por diversos fatores, entre eles as condições edafoclimáticas, horário de coleta, bem como preparo do material vegetal para extração como os processos de secagem (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

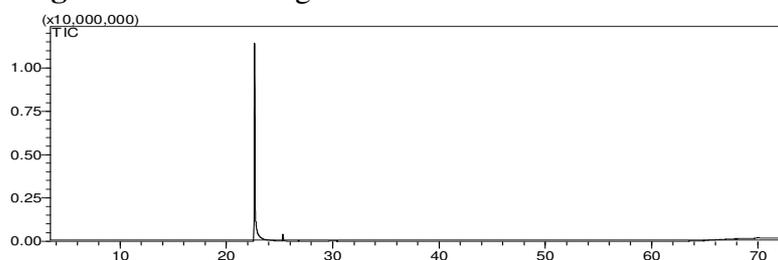
4.2 Identificação e Quantificação Química dos Constituintes Presentes nos Óleos Essenciais de cravo-da-índia, orégano, hortelã e candeia

O cromatograma obtido para o óleo essencial de cravo-da-índia (FIGURA 19) evidencia a presença de pelo menos três constituintes químicos, sendo o primeiro pico o de maior porcentagem de área. Os constituintes presentes no óleo estão apresentados na Tabela 2.

Foram quantificados (CG/DIC) três constituintes químicos; entretanto, apenas dois deles puderam ser identificados (CG/EM), de forma que é possível perceber que o óleo

essencial de cravo-da-índia é composto majoritariamente por eugenol (96,33%). A estrutura química dos constituintes encontra-se na Figura 20.

Figura 19 - Cromatograma do óleo essencial de cravo-da-índia



Fonte: Do Autor (2018)

Tabela 2 - Caracterização química do óleo essencial de cravo-da-índia

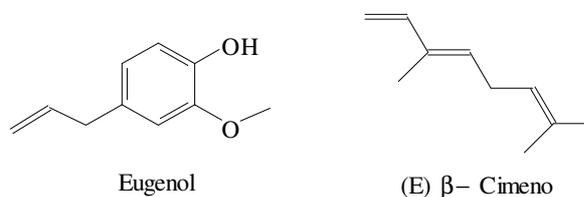
tretenção (s)	% Área	IR_{calculado}	IR_{tabelado}	Composto
22,660	96,33	1356*	1356	Eugenol
25,313	1,79	1419	-	-
26,788	1,87	1455*	1044	(E) β-Ocimeno
Total				99,99%

IR_{cal} – Índice calculado; IR_{tab} – Índice de retenção da literatura; * Confirmados pelo índice de Kovats; - Quantificado, mas não identificado.

Fonte: Do autor (2018)

Estudos de Costa et al. (2011) descrevem o cravo-da-índia como uma das fontes naturais para obtenção de eugenol, sendo que esse composto está presente em pelo menos 90 % do óleo essencial dessa espécie, informações que corroboram com o presente trabalho. O eugenol pertence à classe dos fenilpropanoides, oriundo da rota do ácido chiquímico, a partir de fenilalanina/tirosina, sendo considerado um composto fenólico devido à hidroxila ligada ao anel aromático. Esse composto é responsável pelo sabor, odor e valor econômico do cravo-da-índia e de seu óleo essencial, tornando-o conhecido e largamente utilizado tanto na culinária como na medicina devido a suas muitas propriedades biológicas. Além do eugenol, a caracterização química revelou a presença do monoterpene (E) β-Ocimeno (1,87%) como um dos constituintes minoritários presentes no óleo essencial. Esses dados corroboram com aqueles encontrados por SCHERER et al. (2009), que relatam a presença de 1,52% de (E) β-Ocimeno no óleo essencial de cravo-da-índia.

Figura 20 - Estrutura dos constituintes químicos majoritários do óleo essencial de cravo-da-índia

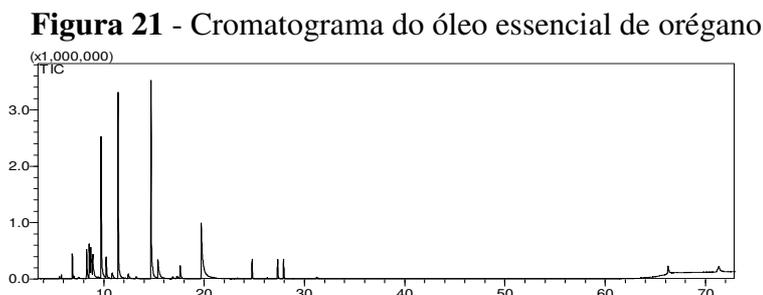


Fonte: Do autor (2018)

A caracterização química do óleo essencial não revelou a presença de constituintes, como cariofileno, acetato de eugenila e α -humuleno, como a maioria dos estudos fitoquímicos tem demonstrado (CORTÉS-ROJAS; SOUZA; OLIVEIRA, 2014). Silvestre et al. (2010) encontraram como constituintes majoritários eugenol (90,3%), além de β -cariofileno (4,83%) e acetato de eugenila (1,87%). Costa et al., (2011) observaram a presença de eugenol (83,6%), acetato de eugenila (11,6%) e cariofileno (4,2%) como majoritários para o óleo essencial de cravo. Araujo et al. (2016), estudando a atividade larvicida do óleo essencial de cravo-da-índia encontraram eugenol (65,99%), β -cariofileno (28,32%), α -humulemo (2,34%), acetato de eugenila (3,33%). O processo de secagem da planta possivelmente colaborou para a ausência dos constituintes relatados na literatura, uma vez que deve ter contribuído para transformações enzimáticas, devido aos resquícios de água ou para a volatilização/degradação de alguns dos compostos.

Pelos dados relatados e pelo cromatograma obtido, é possível inferir que o constituinte quantificado, com 1,79% de área, mas não identificado, pode ser o acetato de eugenila, uma vez que ele foi encontrado na maioria dos trabalhos citados.

A Figura 21 e a Tabela 3 representam o cromatograma e a caracterização química para o óleo essencial de orégano.



Fonte: Do autor (2018)

O cromatograma obtido para orégano apresenta picos bem definidos, o que sugere a presença de, no mínimo, dezoito constituintes químicos, dos quais quatro deles estão em maior concentração no óleo essencial. Verificou-se que o óleo essencial de orégano é constituído principalmente de monoterpenos, com exceção do γ -cadineno e biciclogermacreno, que representam a classe dos sesquiterpenos e do acetato de linalila.

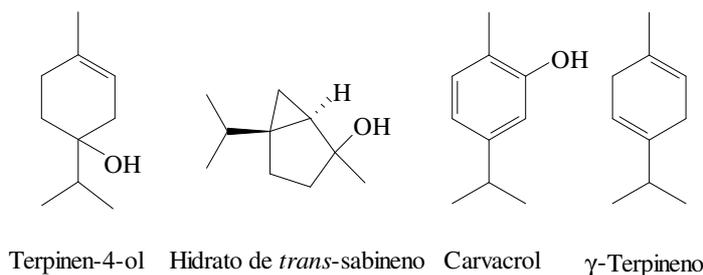
Tabela 3 - Caracterização química do óleo essencial de orégano

Retenção(s)	% Área	IR _{calculado}	IR _{tabelado}	Composto
6,874	2,17	973*	969	Sabineno
7,042	0,39	979*	974	β -Pineno
8,286	2,78	1018*	1014	α -Terpineno
8,559	4,07	1026*	1020	<i>p</i> -Cimeno
8,713	1,61	1030*	1024	Limoneno
8,908	2,34	1035*	1044	(E) β -Ocimeno
9,740	10,58	1058*	1054	γ-Terpineno
10,240	2,12	1072*	1065	hidrato <i>cis</i> -Sabineno
10,843	0,82	1088*	1089	Terpinoleno
11,429	20,56	1104*	1098	hidrato <i>trans</i>-Sabineno
12,448	0,85	1128*	1214	Formiato de linalil
14,713	22,94	1182*	1174	Terpinen-4-ol
15,411	3,11	1199*	1186	α -Terpineol
17,615	2,44	1250*	1254	Acetato de linalila
19,725	15,64	1299*	1298	Carvacrol
27,336	2,22	1481	1513	γ -Cadineno
27,926	3,01	1495*	1500	Biciclogermacreno
Total				97,65%

IR_{cal} – Índice calculado; IR_{tab} – Índice de retenção da literatura; * Confirmados pelo índice de Kovats. Fonte: Do autor (2018)

O óleo essencial de orégano possui como constituintes majoritários os monoterpenos oxigenados terpinen-4-ol (22,94%), hidrato de *trans* sabineno (20,56%), carvacrol (15,63%) e o monoterpeno γ -terpineno (10,58%). As estruturas dos constituintes majoritários estão apresentadas na Figura 22.

Figura 22 - Estruturas dos constituintes majoritários do óleo essencial de orégano



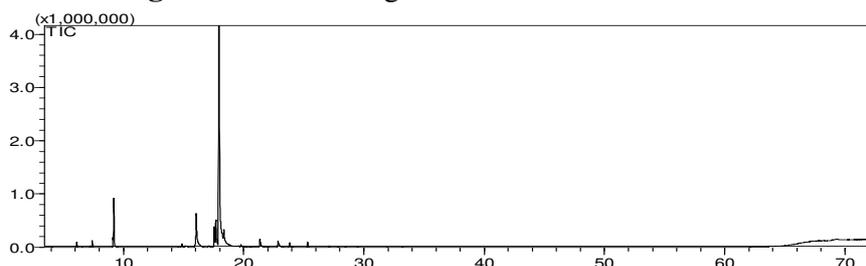
Fonte: Do autor (2018)

Terpinen-4-ol e hidrato de *trans* sabineno são álcoois terciários terpênicos e o γ -terpineno pertence à classe dos hidrocarbonetos terpênicos, que têm suas vias de síntese a partir das vias do mevalomato e DXPS. Apesar de ser um composto fenólico, o carvacrol possui a mesma via de síntese dos terpenos, sendo classificado como um terpenoide com características fenólicas. Os compostos terpinen-4-ol (22,94%) e γ -terpineno são encontrados em óleos essenciais de espécie vegetais da família Myrtaceae, mais especificamente no gênero *Melaleuca*. Entretanto, tais compostos podem ser encontrados como constituintes majoritários de óleos essenciais das espécies do gênero *Origanum* pertencentes à família Lamiaceae (ALIGIANNIS et al., 2001; BALDISSERA et al., 2016;). Aligiannis et al. (2001), estudando a composição química de duas espécies do gênero *Origanum*, encontraram carvacrol, terpinen-4-ol, linalol, sabineno, α -terpineno, e γ -terpineno como constituintes majoritários no óleo essencial das duas espécies. Em seus estudos sobre atividade larvicida do óleo essencial de orégano Govindarajan et al. (2016) encontraram como constituintes majoritários carvacrol (38,30%) e terpinen-4-ol (28,70%). Luz et al. (2016), avaliando a influência da fertilização orgânica do solo sobre a composição química do óleo essencial de orégano, encontraram como majoritários carvacrol (47,67 a 66,88%), γ -terpineno (11,75 a 17,49 %), *o*-cimeno (6,51 a 12,57%) e mirceno (2,05 a 2,85%). Os dados encontrados no presente trabalho corroboram com os encontrados pelos autores citados no que diz respeito à constituição química, mas a % de seus majoritários difere da literatura, tendo o carvacrol com apenas 15,64%, ao passo que na maioria dos trabalhos tal composto representa grande parte da constituição química dos óleos essenciais de orégano. No entanto, essas variações são comuns aos óleos essenciais extraídos de *Origanum vulgare*, por ser uma espécie extremamente variável em morfologia da planta, tricomias, quimiotipo e composições de óleo essencial. Mais de sessenta mono e sesquiterpenos diferentes já foram relatados em seus óleos essenciais; por esse motivo, os constituintes timol e carvacrol, bem como seus precursores γ -terpineno e *p*-cimeno, são considerados como

marcadores para o gênero, pois são os responsáveis pelo aroma característico e propriedades biológicas dos óleos essenciais de orégano (MORSHEDLOO et al., 2017)

O cromatograma para o óleo essencial de hortelã (FIGURA 23) evidencia pelo menos oito constituintes químicos, dos quais quatro deles podem ser considerados como majoritários. Os constituintes identificados e quantificados no óleo essencial de hortelã estão apresentados na Tabela 4.

Figura 23- Cromatograma do óleo essencial de hortelã



Fonte: Do autor (2018)

Todos os constituintes químicos encontrados no óleo essencial de hortelã pertencem à classe dos monoterpenos oxigenados, com exceção do acetato de dihidrocarvil, que possui 12 átomos de carbono. Os constituintes majoritários do óleo essencial de hortelã são carvona (71,80%), dihidrocarveol (8,59%), *trans*-carveol (5,16%) e eucaliptol (4,27%). Na Figura 24, encontram-se as estruturas químicas dos constituintes majoritários.

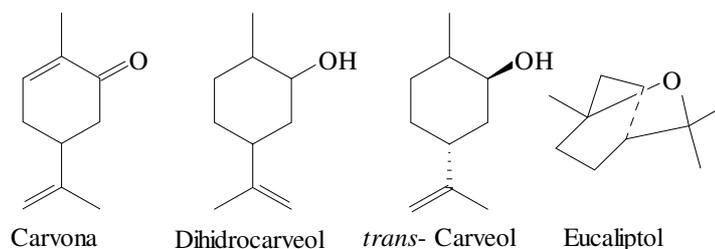
Tabela 4 - Caracterização química do óleo essencial de hortelã

retenção(S)	% Área	IR _{calculado}	IR _{tabelado}	Composto
9,204	4,27	1032*	1026	Eucaliptol
16,053	8,59	1203*	1192	Dihidrocarveol
17,533	5,16	1237	1215	<i>trans</i>- Carveol
17,681	3,85	1240*	1233	Pulegona
17,942	71,80	1246*	1239	Carvona
18,349	2,12	1256	1234	Heptilideno acetona
21,351	1,92	1325	1306	Acetato de dihidrocarvil
22,850	2,27	1361	1226	<i>cis</i> -carveol
Total				99,98%

IR_{cal} – Índice calculado; IR_{tab} – Índice de retenção da literatura; * Confirmados pelo índice de Kovats. Fonte: Do autor (2018)

Mentha spicata é o nome científico para o hortelã, espécie de *mentha* que possui como constituinte majoritário a carvona, sendo que a presença desse constituinte como majoritário no óleo essencial de hortelã caracteriza a espécie estudada.

Figura 24- Estruturas químicas dos constituintes majoritários do óleo essencial de hortelã



Fonte: Do autor (2018)

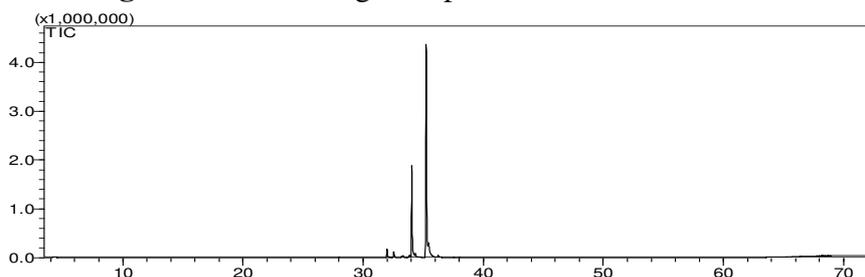
A carvona é uma cetona terpênica e pertence à classe dos monoterpenos oxigenados. Tais compostos são derivados da Via DXPS, uma vez que essa favorece principalmente a formação de monoterpenos e diterpenos, ocorrendo nos plastídios das plantas (DUDAREVA et al., 2005). Por possuir um carbono quiral, a carvona existe na forma de enantiômeros, sendo a forma mais encontrada no óleo essencial de hortelã a R-(-)-carvona, que é responsável pelo sabor e odor da espécie (SOUZA et al., 2013). Chrysargyris et al. (2017), pesquisando o essencial de *Mentha spicata*, encontraram como constituintes majoritários carvona (74,27%), limoneno (11,39%), eucaliptol (5,99%) e germacreno D (3,13%). Shahbazi (2015), por sua vez, encontrou carvona (78,76%), limoneno (11,50%), dihidrocarveol (1,43%), além de compostos minoritários como constituintes químicos para o óleo de hortelã. Recentemente, Shahsavarpour et al. (2017), estudando o óleo essencial de hortelã, obtiveram como constituintes majoritários carvona (45,96%), pulegona (13,89%) e limoneno (12,81%) em valores inferiores aos encontrados para o óleo essencial tanto no presente estudo, quanto nas demais literaturas.

Os resultados obtidos pelos autores mencionados corroboram em parte com os obtidos no presente trabalho, uma vez que possuem constituintes químicos comuns como carvona, eucaliptol e dihidrocarveol. Entretanto, é possível perceber que, em grande parte da literatura, o constituinte limoneno aparece juntamente com a carvona, sendo o segundo em abundância no óleo essencial. De acordo com Chrysargyris et al. (2017), os constituintes químicos mais encontrados no óleo essencial de hortelã são carvona, limoneno e eucaliptol. A ausência do constituinte limoneno no presente trabalho pode ser atribuída a um processo natural

de biotransformação, mediante ataque de bactérias do gênero *Pseudomonas*, uma vez que essas bactérias têm sido utilizadas para a síntese de carvona a partir de limoneno (MOLINA; PIMENTEL; PASTORE, 2013).

O cromatograma obtido para o óleo essencial de candeia (FIGURA 25) evidencia a presença de pelo menos quatro constituintes químicos. Na Tabela 5, estão apresentados os constituintes químicos encontrados no óleo essencial da espécie estudada.

Figura 25- Cromatograma para o óleo essencial de candeia



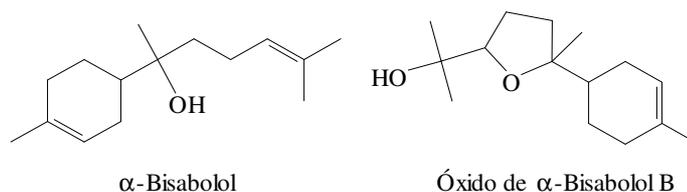
Fonte: Do autor (2018)

O óleo essencial de candeia é constituído por sesquiterpenos oxigenados e possui como majoritários o α -bisabolol (78,11%) e o óxido de α -bisabolol B (FIGURA 26). A porcentagem de α -bisabolol no óleo estudado corrobora com a encontrada por Galdino et al. (2006), que, estudando a composição e o rendimento do óleo essencial de candeia de diferentes localidades, encontraram de 63,1 a 72,9 % de α -bisabolol no óleo essencial de candeia.

Tabela 5- Caracterização química do óleo essencial de candeia

$t_{\text{retenção}}(\text{s})$	% Área	$\text{IR}_{\text{calculado}}$	$\text{IR}_{\text{tabelado}}$	Composto
31,984	2,57	1602	1582	Óxido de Cariofileno
32,550	1,72	1618	1577	Espatuleno
34,054	17,60	1658*	1657	Óxido de α-bisabolol B
35,258	78,11	1690*	1685	α-bisabolol
Total				100%

IR_{cal} – Índice calculado; IR_{tab} – Índice de retenção da literatura; * Confirmados pelo índice de Kovats. Fonte: Do autor (2018)

Figura 26- Estrutura dos constituintes majoritários do óleo de candeia

Fonte: Do autor (2018)

O cerne da candeia é conhecido por ser uma fonte natural para obtenção de α -bisabolol, álcool terciário de origem terpênica que devido a suas propriedades biológicas, tem sido utilizado em diversos produtos farmacêuticos e cosméticos (MORI et al., 2009). Os constituintes, óxido de cariofileno e espatulenol, encontrados no presente trabalho, foram relatados como constituintes do óleo de folhas de candeia, conforme identificado por Silvério et al. (2013), que estudaram a composição química do óleo essencial de folhas e caule de *E. erythropappus*. De acordo com Mori et al. (2009), a porcentagem de α -bisabolol apresentou uma correlação negativa com a idade, indicando que quanto mais antiga a árvore, menor o teor de α -bisabolol no óleo essencial.

Os constituintes químicos encontrados no presente trabalho, que diferem da literatura, são justificados pelo fato de a constituição química dos óleos essenciais ser influenciada por vários fatores, como condições de coleta, o horário, estação do ano e condições climáticas, além da idade e estágio do ciclo vegetativo da planta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

4.3 Atividade Antioxidantes dos Óleos Essenciais e seus Constituintes Majoritários: Avaliação Colorimétrica

4.3.1 Atividade Antioxidante: Estabilização de Radicais Livres: DPPH

Os valores de porcentagem de atividade antioxidante (% A A) dos óleos essenciais e seus componentes majoritários em relação às suas concentrações, avaliados pelo método de estabilização de radicais DPPH, estão apresentados na Tabela 6. A análise de variância para o teste em questão foi significativa com $p < 0,05$ para a interação amostra (óleos essenciais e padrões sintéticos) *versus* concentração, com coeficiente de variação de 3,83 % (FIGURA 1A, APÊNDICE A).

Tabela 6- Porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais e seus constituintes majoritários: estabilização de radicais DPPH

Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	% A A						
	25	50	100	150	200	250	500
BHT	17,16bG	31,80cF	45,48bE	58,09cD	65,82bC	71,10bB	85,01bA
Cravo	30,20aG	47,40bF	69,08aE	76,86bD	82,91aC	85,03aB	89,21aA
Eugenol	29,80aG	49,39aF	69,13aE	79,26aD	82,36aC	85,16aB	88,99aA
Orégano	1,03dD	1,95eD	2,99dC	3,64eC	4,62dC	5,50dB	8,79dA
Carvacrol	6,12cF	8,40dE	11,43cD	13,95dC	14,62cC	17,37cB	23,72cA
Hortelã	1,71dB	0,02fC	0,68eC	0,22fC	0,60eC	6,72dA	2,49eB
Carvona	1,06dA	1,65eA	1,03eA	0,80fA	0,39eA	0,28fA	0,77fA
Candeia	0,14dB	0,87fB	0,24eB	1,31fB	0,68eB	3,32eA	2,60eA
α-bisabolol	0,06dB	0,24fB	3,27dA	0,06fB	0,25eB	0,41fB	0,86fB

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Fonte: Do autor (2018)

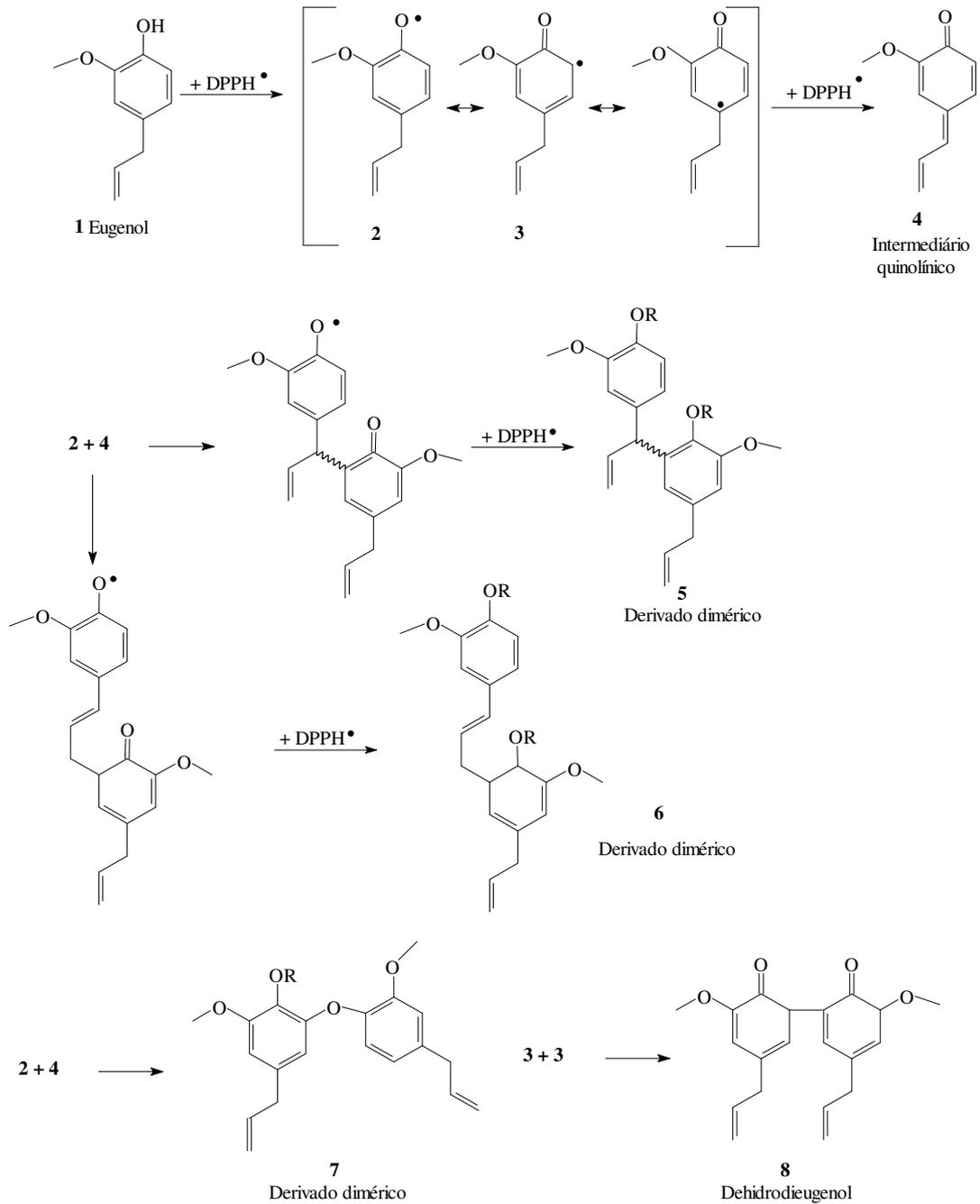
Estatisticamente, o óleo essencial de cravo-da-índia e o padrão eugenol apresentaram maior porcentagem de atividade antioxidante na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo de 89,21 e 88,99%, respectivamente, seguidos pelo controle BHT 85,01%, representando os mais eficazes dentre os compostos avaliados na estabilização dos radicais DPPH. O carvacrol e o óleo essencial de orégano apresentaram de moderada a baixa atividade 23,72% e 8,79%, respectivamente, e os óleos essenciais de hortelã e candeia, juntamente com seus majoritários carvona e α -bisabolol, não apresentaram atividade antioxidante. Pode-se observar que os compostos com capacidade de estabilização de radicais apresentam resposta dose dependente, enquanto os que não possuem essa capacidade respondem de maneira desordenada, de forma que esses valores não podem ser considerados para estimativa da atividade antioxidante.

A caracterização química do óleo essencial de cravo-da-índia explica o fato de a atividade antioxidante do óleo ser estatisticamente igual a de seu constituinte majoritário eugenol, uma vez que esse contribui com 96,33% de sua constituição química. Da mesma forma, o óleo essencial de orégano apresentou menor atividade que seu constituinte carvacrol, pois ele compõe apenas 15,64% de sua constituição. O fato de a atividade do óleo essencial de orégano ser 37% menor do que a do carvacrol indica que a atividade do óleo é dependente desse constituinte, sendo que os demais podem estar interferindo positiva ou negativamente.

Os óleos essenciais de cravo-da-índia e orégano são conhecidos por apresentarem altos valores de atividade antioxidante, relatados por vários autores, como Sebaaly et al. (2015), Silvestre et al. (2010), Sarikurkcu et al. (2015), Mechergui et al. (2016), entre outros. Para os

representando a maior % de área e outros 2 dímeros que aparecem em pequenas proporções (0,2%), formados da condensação C5 (3) a C7 e C9 (4), respectivamente.

Figura 28- Mecanismo de reação de estabilização de DPPH por eugenol



Fonte: Adaptado de Bortolomeazzi et al. (2010)

4.3.2 Atividade Antioxidante. Peroxidação lipídica: Sistema β -caroteno/ ácido linoleico

A determinação da atividade antioxidante pelo teste colorimétrico β -caroteno/ ácido linoleico avalia a habilidade de proteção lipídica dos compostos estudados. A porcentagem de atividade antioxidante (% A A) dos óleos essenciais, de seus majoritários e do controle BHT em relação às concentrações analisadas estão apresentadas na Tabela 7. Os fatores concentração, amostra e a interação desses com a % A A apresentaram um efeito significativo, com $p < 0,05$ e coeficiente de variação de 13.29 % (FIGURA 2A, APÊNDICE A).

Tabela 7- Porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais e seus constituintes majoritários: sistema β -caroteno/ ácido linoleico

Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	% A A						
	25	50	100	150	200	250	500
BHT	68,20aD	70,91aD	77,14aC	80,20aB	82,36aB	83,22aB	91,56aA
Cravo	45,71bD	48,69bD	63,86bC	72,11bB	77,88aA	78,63bA	80,83bA
Eugenol	36,45cF	52,81bE	65,88bD	73,35bC	84,05aB	86,37aB	93,81bA
Orégano	17,74dD	20,94dD	41,41cC	45,32dC	56,05cB	56,53cB	65,11cA
Carvacrol	23,36dF	34,73cE	45,22cD	63,29cC	68,74bB	72,21bB	81,93bA
Hortelã	0,00eA	0,00eA	0,00dA	0,27eA	0,03dA	0,12dA	0,15dA
Carvona	0,00eA	0,00eA	0,00dA	0,11eA	0,07dA	0,00dA	0,05dA
Candeia	0,43eA	0,23eA	0,31dA	0,71eA	0,65dA	0,38dA	0,59dA
α- bisabolol	0,47eA	0,47eA	0,64dA	0,52eA	0,32dA	0,24dA	0,42dA

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Fonte: Do autor (2018)

O BHT e o eugenol exibiram maior potencial de proteção lipídica 91,56 e 93,81% respectivamente, seguidos pelo cravo-da-índia (80,83%) e carvacrol (81,93%), que foram estatisticamente iguais, na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e pelo óleo essencial de orégano (65,11%). Os óleos essenciais de hortelã e candeia, bem como seus majoritários carvona e α - bisabolol, não apresentaram atividade antioxidante pelo teste β -caroteno/ ácido linoleico. Pode-se observar que a atividade antioxidante do óleo de cravo e do eugenol foram estatisticamente iguais, exceto nas concentrações de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em que a % A A do óleo foi maior do que a do padrão e, nas concentrações de 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em que se verificou o efeito inverso. As porcentagens de atividade antioxidante do carvacrol foram estatisticamente maiores que a do óleo essencial de orégano, exceto na concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em que foram iguais. As amostras que apresentaram capacidade de proteção lipídica exibiram um efeito

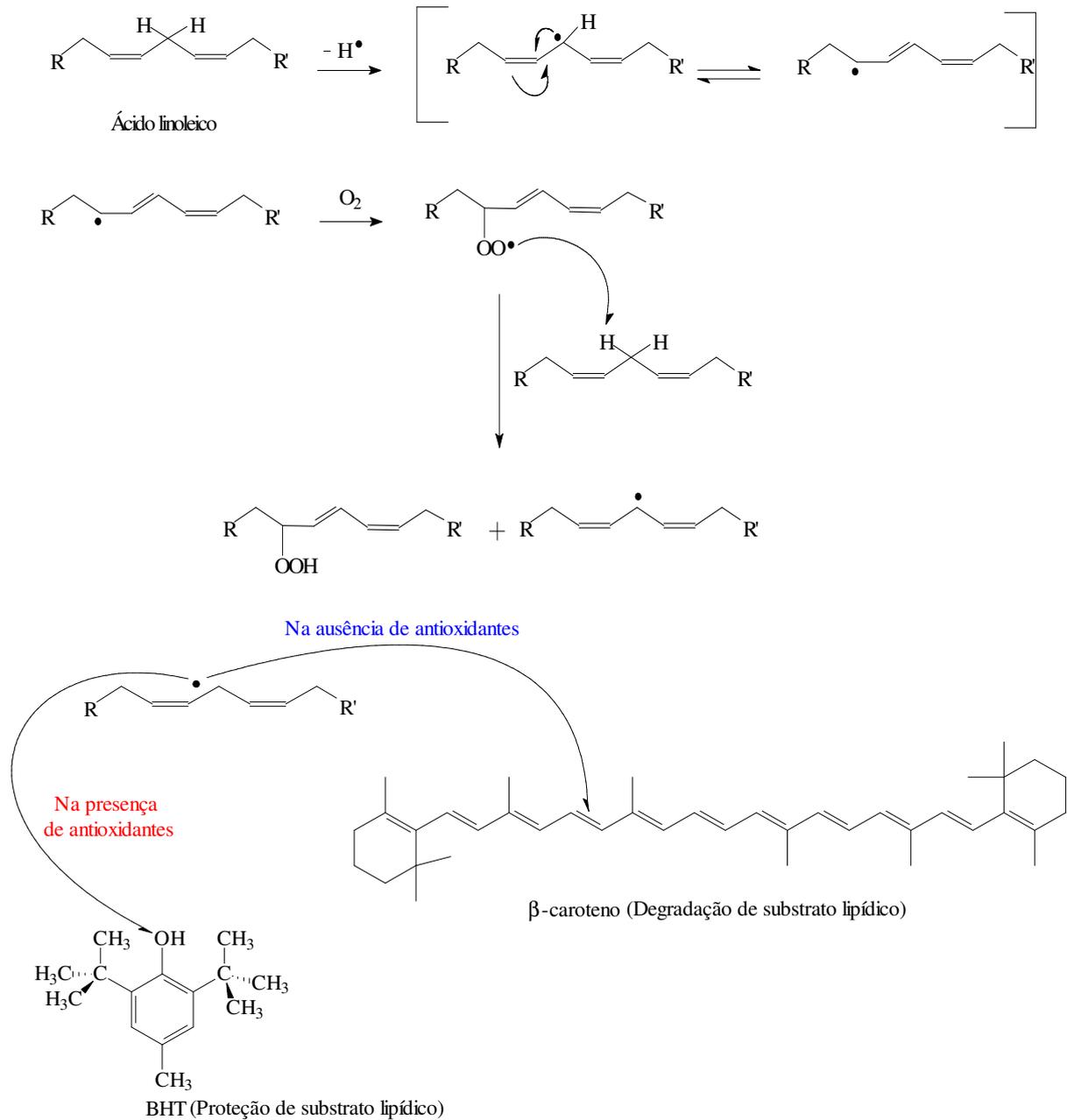
dose-dependente e as que não apresentaram atividade variaram irregularmente com o aumento da concentração.

Comparando os resultados obtidos no presente teste com o de estabilização de radicais DPPH, é possível perceber que as amostras mantiveram suas atividades, sendo que nas duas avaliações o BHT, eugenol e o óleo de cravo foram os que tiveram melhores resultados, ao passo que os óleos de hortelã e candeia bem como seus majoritários continuaram sem exibir nenhum efeito antioxidante. Observa-se que o carvacrol e o óleo essencial de orégano apresentaram-se mais eficazes na proteção de substratos lipídicos do que na estabilização de radicais DPPH, resultados esses que corroboram com os encontrados por Andrade et al. (2013), Miranda et al. (2016) e Teixeira et al. (2014), que atribuíram esse efeito à maior especificidade do sistema β -caroteno/ácido linoleico para avaliação de antioxidantes lipídicos.

Os resultados encontrados estão de acordo com a literatura, pois segundo Ebrahimabadi et al. (2010), os compostos fenólicos são aqueles que mostram melhor atividade antioxidante por essa metodologia, devido à fácil abstração de um átomo de hidrogênio do grupo hidroxila ligado ao anel, por radicais peróxidos. De acordo com Miranda et al. (2016), mono e sesquiterpenos, como os encontrados nos óleos essenciais de hortelã e candeia, não são eficazes na proteção de substratos lipídicos por não possuírem átomos de hidrogênio na posição alílica e/ou posições benzílicas, informações essas que corroboram com o presente estudo.

Apesar de os compostos fenólicos possuírem uma potente ação antioxidante sobre o sistema β -caroteno/ácido linoleico, ainda não há um esclarecimento com relação ao seu mecanismo *in vivo*. O eugenol, por exemplo, possui capacidade inibitória da peroxidação lipídica na fase de iniciação e de propagação. A capacidade de sequestro de O_2 ativo impede a formação de radicais lipídicos, inibindo a iniciação da peroxidação, ao passo que sua metabolização a um dímero (dieugenol) inibe a peroxidação propriamente dita pela estabilização dos radicais formados (AFFONSO et al., 2012).

O mecanismo ilustrado na Figura 29 apresenta uma proposta para reações de peroxidação lipídica, em que é possível observar a reação de iniciação pela perda de elétrons na forma de $(H\cdot)$ por ação de luz, calor e/ou oxigênio molecular, bem como o processo de propagação de cadeia. A alta reatividade dos radicais gerados na iniciação faz com que haja rápida deterioração de substratos lipídicos, como o β -caroteno. Entretanto, é possível observar, tanto na figura como nos resultados, que a presença de um antioxidante desvia o mecanismo da reação, no sentido de proteger e prolongar a vida útil do substrato.

Figura 29- Mecanismo de proteção de peroxidação e proteção lipídica

Fonte: Do autor (2018)

4.3.3 Atividade Antioxidante: Estabilização de radicais Hidroxila

Os resultados para o teste de captura de radicais hidroxila, expressos em % A A, estão apresentados na Tabela 8. Observou-se um efeito significativo ($p < 0,05$) dos fatores; amostra (óleos essenciais, padrões sintéticos e manitol), concentração e da interação desses fatores com

a % de atividade antioxidante, com fator de correção de 17,35 % (TABELA 3A, APÊNDICE A).

Tabela 8- Porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais e seus constituintes majoritários: estabilização de radicais hidroxila

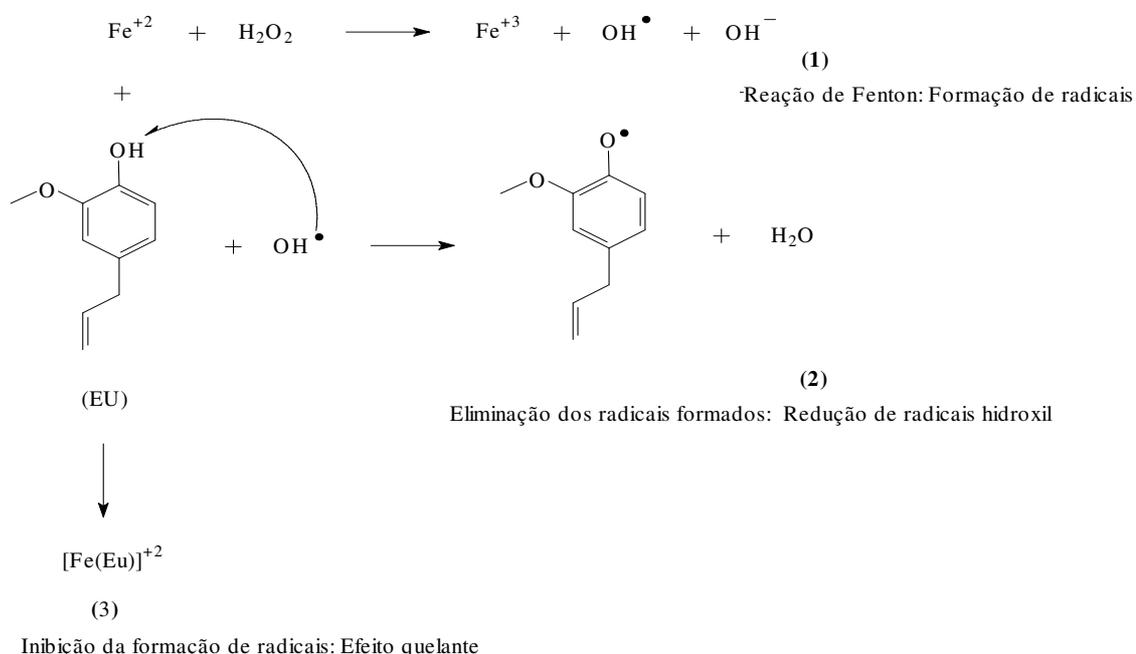
Concentração $\mu\text{g mL}^{-1}$	% A A						
	25	50	100	150	200	250	500
Manitol	3,78aE	7,08bD	11,36bC	18,50aB	18,57aB	18,89bB	25,21dA
Cravo	1,09bF	8,30bE	12,73aD	13,34bD	19,53aC	37,92aB	49,89aA
Eugenol	4,29aE	10,44aD	14,26aC	16,50aB	17,70aB	18,88bB	41,93bA
Orégano	1,73bC	2,43cC	3,01cC	4,48dC	7,77aB	15,08cA	16,06eA
Carvacrol	3,48aC	8,73bB	9,60bB	10,03cB	10,72bB	10,75dB	29,77cA
Hortelã	0,55bA	0,41cA	0,16dA	0,17eA	0,25dA	0,19eA	0,11fA
Carvona	0,00bA	0,00cA	0,00dA	0,00eA	0,00dA	0,24eA	0,06fA
Candeia	0,09bA	0,15cA	0,13dA	0,28eA	0,33dA	0,30eA	0,00fA
α-bisabolol	0,08bA	0,25cA	0,56dA	0,00eA	0,17dA	0,40eA	0,68fA

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas e maiúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Fonte: Do autor (2018)

Estatisticamente, o óleo essencial de cravo-da-índia exibiu maior potencial de captura de radicais hidroxila, com 49,89 %, seguido pelos padrões eugenol (41,93%) e carvacrol (29,77%) pelo controle, manitol (25,21%) e pelo óleo essencial de orégano (16,06%). Assim como nos demais testes colorimétricos, os óleos essenciais de hortelã e candeia e seus majoritários não apresentaram atividade antioxidante. Foi possível perceber um efeito dose dependente para as amostras que apresentaram atividade. De forma geral, os resultados obtidos para o presente ensaio foram menores do que os obtidos nos ensaios de estabilização de radicais DPPH e proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico. A baixa eficiência de estabilização dos radicais hidroxila por parte das amostras testadas pode ser devido à incompatibilidade das moléculas com o meio reacional, uma vez que o ensaio é realizado em meio aquoso, o que dificulta a ação dos óleos essenciais e seus constituintes, devido ao caráter lipofílico dos mesmos. Além disso, altas concentrações de radicais hidroxila no meio reacional podem estar entre os fatores que contribuem para esse fenômeno, uma vez que não é possível estimar a concentração de radicais formados na mistura, nem conhecer a natureza exata deles, de forma que se torna difícil obter uma proporção adequada de antioxidante/ radical no sistema. Assim como no presente trabalho, Silva et al. (2015) encontraram baixos valores de atividade antioxidante para o manitol, sugerindo a necessidade de

substituição desse por outro com maior eficiência, como, por exemplo, o ácido ascórbico. De acordo com os estudos de Mir, Bhat e Ahangar (2014), a capacidade de eliminação de radicais hidroxila segue a seguinte ordem de atividade quercetina > curcumina > morina > rutina > daflon > diosmina > ácido ascórbico > tiourea > DMSO > manitol > ácido benzoico. A ordem de reatividade proposta pelos autores sugere que os flavonoides são os compostos com maior potencial de estabilização de radicais hidroxila. Da mesma forma que ocorre com flavonoides, a habilidade de estabilizar radicais hidroxila, em compostos fenólicos como eugenol e carvacrol, pode ser explicada pela presença do grupo OH ligado ao anel aromático (LÜ et al., 2010; MIR; BHAT; AHANGAR, 2014). Assim, de acordo com Lü et al. (2010), a atividade de eliminação de OH para compostos com características fenólicas pode ser conseguida por meio da eliminação direta ou prevenção da formação dos radicais através da quelatação de íons metálicos (Fe^{+2} ou Cu^{+2}) ou conversão de H_2O_2 em outros compostos menos reativos. Uma proposta para esse tipo de mecanismo pode ser vista na Figura 30.

Figura 30- Estabilização de radicais hidroxila: Doação de átomos de hidrogênio e/ou efeito quelante



Fonte: Do autor (2018)

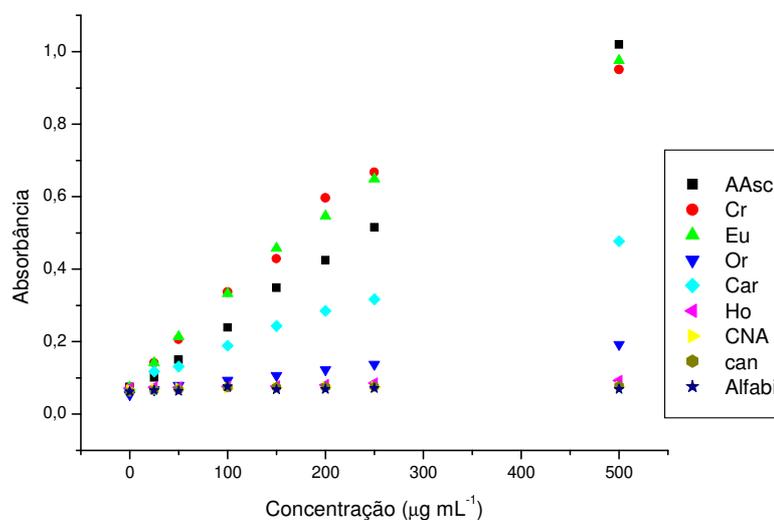
A baixa atividade antioxidante apresentada pelo óleo essencial de orégano e a ausência de atividade para os óleos de candeia e hortelã e seus constituintes majoritários pode ser

justificada pelo fato de o α -bisabolol e alguns constituintes dos óleos essenciais de orégano e hortelã, como o terpine-4-ol e o dihidrocarveol, serem álcoois terpênicos e com tal, reagem rapidamente com $\text{OH}\cdot$, formando radicais alcóxidos altamente instáveis que contribuem para a degradação do substrato desoxirribose, exibindo um efeito pró-oxidante (MIR; BHAT; AHANGAR, 2014).

4.3.4 Atividade Antioxidante: Redução de íons Fe^{+2} : Poder Redutor

Uma das formas de se avaliar a atividade antioxidante de determinados compostos é por meio de reações que promovam a redução de íons metálicos Fe^{+3} do complexo ferricianeto de potássio a Fe^{+2} . A atividade antioxidante pode ser avaliada pelo aumento na absorbância no comprimento de onda de 700 nm. A variação da absorbância com o aumento da concentração para as amostras avaliadas pode ser vista na Figura 31.

Figura 31- Efeito da concentração das amostras na formação do azul da prússia



Fonte: Do autor (2018)

A capacidade de redução de íons ferro pode ser relacionada com as inclinações das curvas obtidas a partir da Figura 31 (TABELA 9), de forma que, quanto maior a inclinação da reta, maior o efeito redutor da molécula. A análise de variância para as médias das inclinações apresentou um efeito significativo com $p < 0,05\%$ a análise de variância pode ser vista na Tabela 4 A, Apêndice A.

Tabela 9- Relação entre as inclinações de reta e a atividade antioxidante das amostras

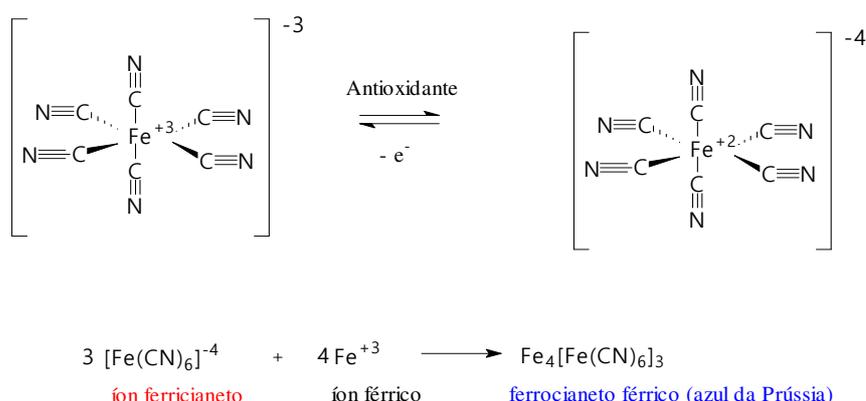
Amostras	Inclinação
Ácido Ascórbico	$1,9 \times 10^{-3}$ a
Cravo-da-índia	$1,8 \times 10^{-3}$ a
Eugenol	$1,8 \times 10^{-3}$ a
Orégano	$2,7 \times 10^{-4}$ c
Carvacrol	$8,0 \times 10^{-4}$ b
Hortelã	$4,2 \times 10^{-5}$ d
Carvona	$1,6 \times 10^{-5}$ d
Candeia	$2,7 \times 10^{-5}$ d
α -bisabolol	$1,0 \times 10^{-5}$ d

As médias seguidas pelas mesmas letras minúsculas nas linhas não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott, ao nível de 5% de probabilidade. Fonte: Do autor (2017).

A atividade do eugenol, do óleo essencial de cravo e do ácido ascórbico foram estatisticamente iguais e superiores as das demais amostras. O óleo essencial de orégano apresentou capacidade de redução de íons ferro inferior, quando comparado com seu constituinte majoritário, carvacrol. Semelhante aos demais testes colorimétricos, os óleos essenciais de hortelã e candeia, juntamente com os padrões carvona e α -bisabolol, não apresentaram atividade antioxidante. Teixeira et al. (2013) encontraram altos valores de atividade pelo método do poder redutor para os óleos essenciais de cravo-da-índia e orégano. Os resultados encontrados pelos autores corroboram com os obtidos para o óleo de cravo; tal atividade foi atribuída à presença de altos teores de eugenol no óleo estudado. A atividade obtida pelos autores para o óleo de orégano foi maior do que a encontrada no presente trabalho, divergência que pode ser explicada pela diferença na composição química entre os óleos. Rezende et al. (2017), estudando a atividade antioxidante de óleos essenciais de cinco espécies de plantas medicinais, não encontraram atividade pelo método do poder redutor para o óleo essencial de *Mentha piperita*, dados que corroboram com o presente trabalho, uma vez que os autores encontraram carvona como constituinte majoritário.

A atividade antioxidante pelo método do poder redutor está relacionada com a capacidade das moléculas em doar elétrons aos íons ferro (FIGURA 32), sofrendo oxidação. Compostos fenólicos são facilmente oxidáveis, pois, uma vez que doam seus elétrons, são estabilizados por estruturas de ressonância, que conferem ao radical formado certa estabilidade, de forma que a atividade antioxidante desses compostos depende da estrutura química e da concentração dessas espécies (SALARBASHI et al., 2014).

Figura 32- Mecanismo de redução de íons ferro



Fonte: Do autor (2018)

4. 4 Atividade Antioxidantes dos Óleos Essenciais e seus Constituintes Majoritários: Avaliação Eletroanalítica

4. 4. 1 Atividade Antioxidante: Voltametria Cíclica

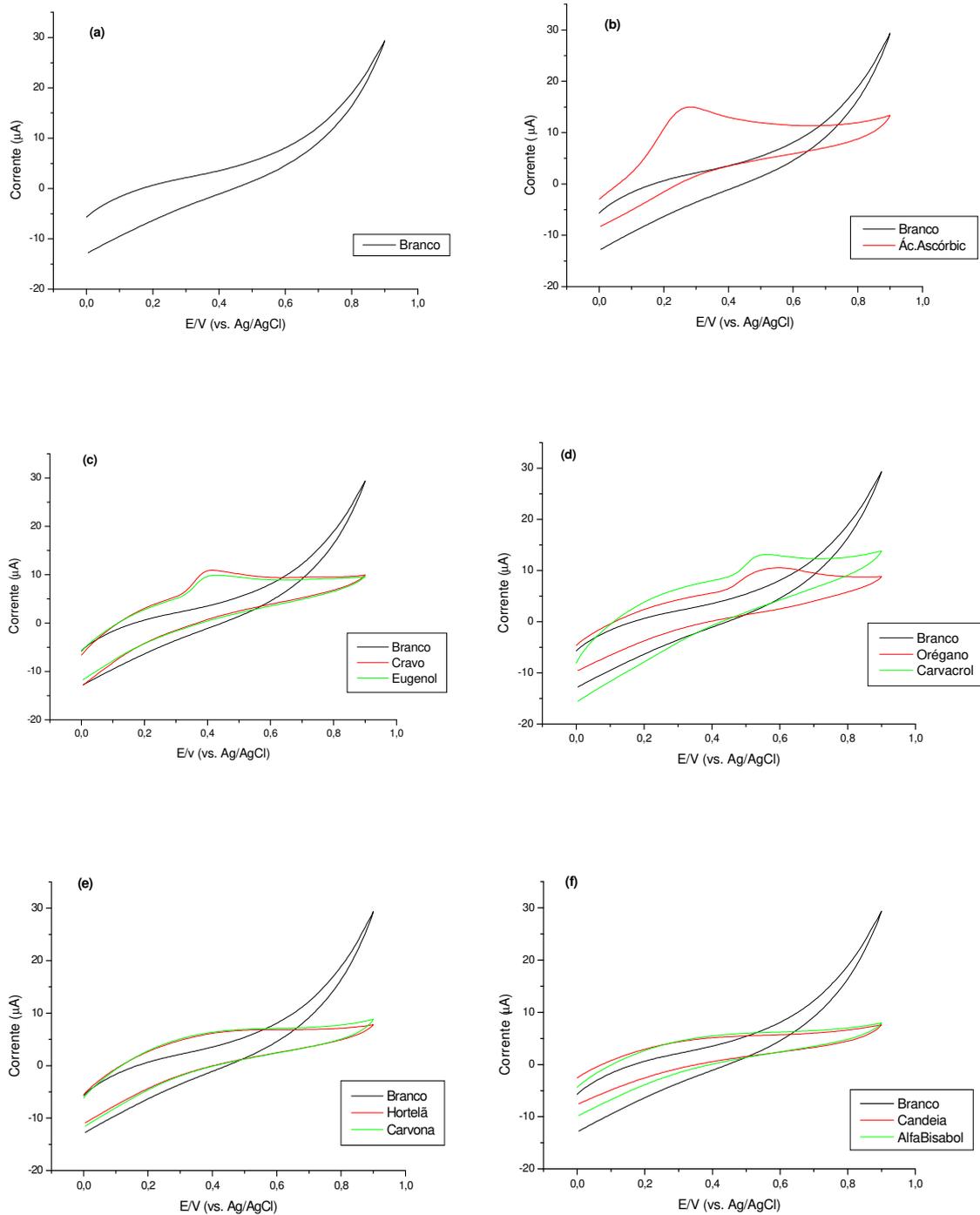
Os voltamogramas obtidos para os óleos essenciais e seus constituintes majoritários estão apresentados na Figura 33.

Foi possível perceber, pela corrente obtida da varredura de potencial sobre tampão fosfato (a), que esse é inerte no potencial estudado, o que o caracteriza como um bom eletrólito de suporte, uma vez que não apresentou pico característico de processos redox. Ao comparar os voltamogramas obtidos após a adição de ácido ascórbico, cravo e eugenol e orégano e carvacrol (voltamogramas b, c e d, respectivamente) com o perfil do eletrólito de suporte (voltamograma a), foi possível perceber um aumento na corrente de pico anódica, resultante do processo de oxidação das espécies citadas na superfície do eletrodo. O óleo essencial de hortelã e de candeia, bem como seus majoritários carvona e α -bisabolol, voltamogramas (e) e (f), respectivamente, apresentaram-se inertes nas condições estudadas. Os constituintes presentes

nesses óleos são, em sua maioria, álcoois terciários ou cetonas, que não são passíveis de sofrer processos oxidativos, exceto em condições drásticas e mediante a presença de reagentes específicos (SOLOMONS; FRYHLE, 2013). Essa característica explica a inatividade dessas amostras na superfície do eletrodo e nos ensaios colorimétricos, uma vez que essas amostras não foram capazes de estabilizar radicais DPPH e hidroxila ou proteger substratos lipídicos, como o β -caroteno e desoxirribose, nem contribuíram para a redução dos íons férricos.

Os voltamogramas para as espécies eletroativas são característicos de processos irreversíveis devido, principalmente, à ausência de picos na região de varredura de potencial reversa. De acordo com Tonello et al. (2016), isso pode ser atribuído a reações acopladas que consomem os produtos de oxidação formados durante a varredura anódica. A ausência de picos de redução pode ser uma evidência da estabilidade relativa dos intermediários e produtos formados após o processo de oxidação. Essa estabilidade é um pré-requisito de bons antioxidantes, uma vez que o processo de estabilização de radicais livres envolve a formação de espécies reduzidas como intermediários das reações. O fato de os intermediários não reagirem de maneira rápida faz com que sejam capazes de proteger biomoléculas e substratos lipídicos.

Figura 33- Voltamogramas cíclicos em eletrodo de carbono vítreo à velocidade de varredura de 50 mV s^{-1}



Voltamogramas cíclicos em Tampão fosfato $0,01 \text{ mol L}^{-1}$ (pH 7,4) (a), Ácido Ascórbico (b), óleo essencial de cravo-da-índia e eugenol (c), óleo essencial de orégano e carvacrol (d), óleo essencial de hortelã e carvona (e) e óleo essencial de candeia e α -bisabolol (f) a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Fonte: Do Autor (2018)

O perfil oxidativo para o óleo essencial de cravo-da-índia foi semelhante a de seu constituinte majoritário eugenol. O mesmo ocorreu para o óleo essencial de orégano e seu majoritário carvacrol. Por esse resultado, é possível inferir que eugenol e carvacrol são os únicos constituintes eletroativos nos óleos estudados, e que os demais constituintes apresentaram-se inertes nas condições avaliadas.

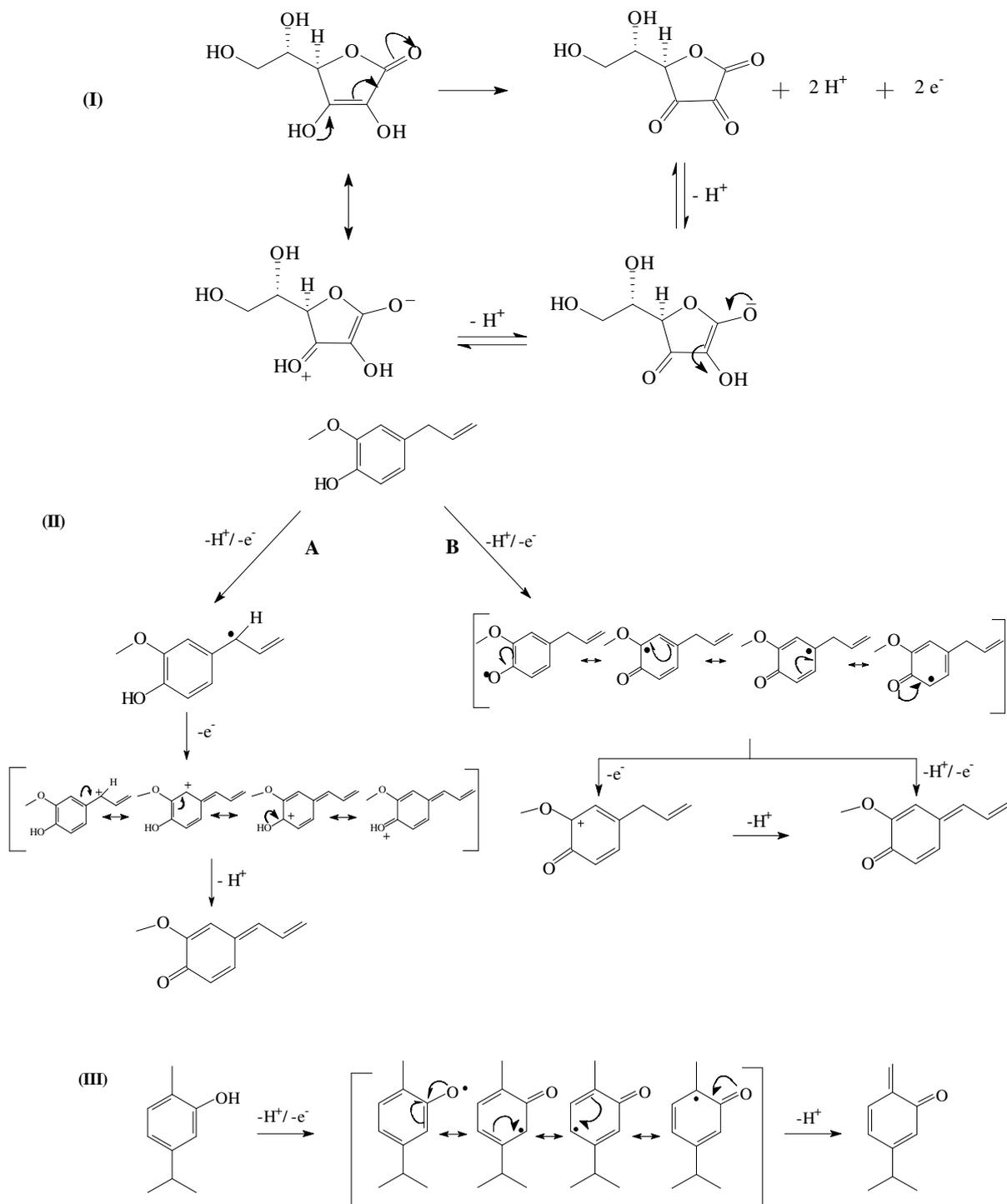
Correntes anódicas obtidas de compostos fenólicos e seus derivados, como eugenol e carvacrol, são geralmente atribuídas a oxidação das hidroxilas fenólicas, com formação de suas correspondentes quinonas (OLIVEIRA et al., 2016). O mecanismo de oxidação para as espécies eletroativas está ilustrado na Figura 34.

De acordo com Clayden et al. (2000), o ácido ascórbico que possui a estrutura química de um diol pode ser oxidado com perda de dois elétrons para formação do ácido L- deidroascórbico (I).

A oxidação de compostos fenólicos em meio aquoso tem sido amplamente estudada e seu mecanismo varia conforme as condições reacionais (MALYSZKO; KARBARZ, 2006; TONELLO et al., 2016; YILDIZ et al., 2017). De acordo com Tonello et al. (2016) a primeira etapa da eletro-oxidação de fenóis ocorre pela perda de um elétron, com a formação de um cátion radicalar, que desprotona rapidamente a quinona. A eletro-redução do eugenol (II) foi proposta por Yildiz et al. (2017), que utilizando modelos computacionais, evidenciaram que essa ocorre por pelo menos duas rotas (**A** e **B**), sendo que a rota (**A**) representa o mecanismo energeticamente preferível com uma diferença de energia relativa de 0,2 eV.

De forma geral, a oxidação pode ser acompanhada por outros eventos além da transferência de elétrons, como transferência de átomos ou íons. Mas o efeito resultante é sempre a perda eletrônica e a modificação do número de oxidação das espécies (SKOOG et al., 2014). O mecanismo proposto para as moléculas estudadas indica a transferência de elétrons e átomos de hidrogênio, resultando em uma transferência de carga que deveria ter levado a formação de dois picos de oxidação. Entretanto, apenas um pico foi observado durante a varredura de potencial, o mesmo fenômeno foi verificado Malyszko et al. (2006) que estudaram a oxidação eletroquímica do trolox e α -tocoferol, compostos fenólicos utilizados como agentes antioxidantes. De acordo com os autores, isso significa que o processo envolve duas transferências eletrônicas sucessivas no mesmo potencial.

Figura 34- Proposta de mecanismo de oxidação do ácido ascórbico (I), eugenol (II) e carvacrol (III)



- (a) Oxidação do ácido ascórbico, adaptado de Clayden et al. (2000), (b) Rotas oxidativas do eugenol, adaptado de Yildiz et al. (2017), (c) Oxidação do carvacrol.

Outro parâmetro importante que deve ser avaliado em um voltamograma é o valor do potencial (E) e da corrente (I) de pico anódico (TABELA 10), que, no presente trabalho, foram obtidos com o auxílio do software que gerencia o potenciostato.

Tabela 10- Potenciais e corrente de oxidação para os óleos essenciais e seus respectivos constituintes majoritários

Amostra	Epa (V)	Ipa (μ A)
Ácido Ascórbico	0,28	11,84
Cravo-da-índia	0,42	7,96
Eugenol	0,42	5,79
Orégano	0,59	5,53
Carvacrol	0,56	5,54
Hortelã	-	-
Carvona	-	-
Candeia	-	-
α -bisabolol	-	-

Epa- Potencial de pico anódico; Ipa- Corrente de pico anódico.

- Ausência de picos de oxidação em meio neutro (Tampão Fosfato).

Fonte: Do autor (2018)

O potencial (Epa) e a intensidade (Ipa) de oxidação são utilizados por diversos autores para atribuir a força e eficiência antioxidante. De acordo com a literatura, a maior capacidade antioxidante está relacionada com um menor potencial de oxidação e maior intensidade de corrente. Segundo Galato et al. (2001), Keffous et al. (2016) e Reis et al. (2009), quanto menor forem os valores de Epa para um determinado composto, maior a será sua habilidade de doação de elétrons. Nesse sentido, pode-se observar que o ácido ascórbico exibiu menor potencial de oxidação, seguido do eugenol e do óleo de cravo, que apresentaram o mesmo potencial, e do carvacrol e orégano, que pouco se diferiram. Esses resultados estão de acordo com os encontrados nos ensaios colorimétricos, em que na maior parte deles, o eugenol e o óleo essencial de cravo foram mais eficazes do que o carvacrol e o óleo de orégano.

O baixo potencial de oxidação e sua habilidade de doação de elétrons pronunciada justificam a alta atividade antioxidante exercida pelo ácido ascórbico. Keffous et al. (2016) encontraram um Epa de 0,36 V para o ácido ascórbico, voltamograma obtido em carbono vítreo a pH 3,2 e utilizando KCl como eletrólito de suporte. O valor encontrado pelos autores é superior ao obtido no presente trabalho.

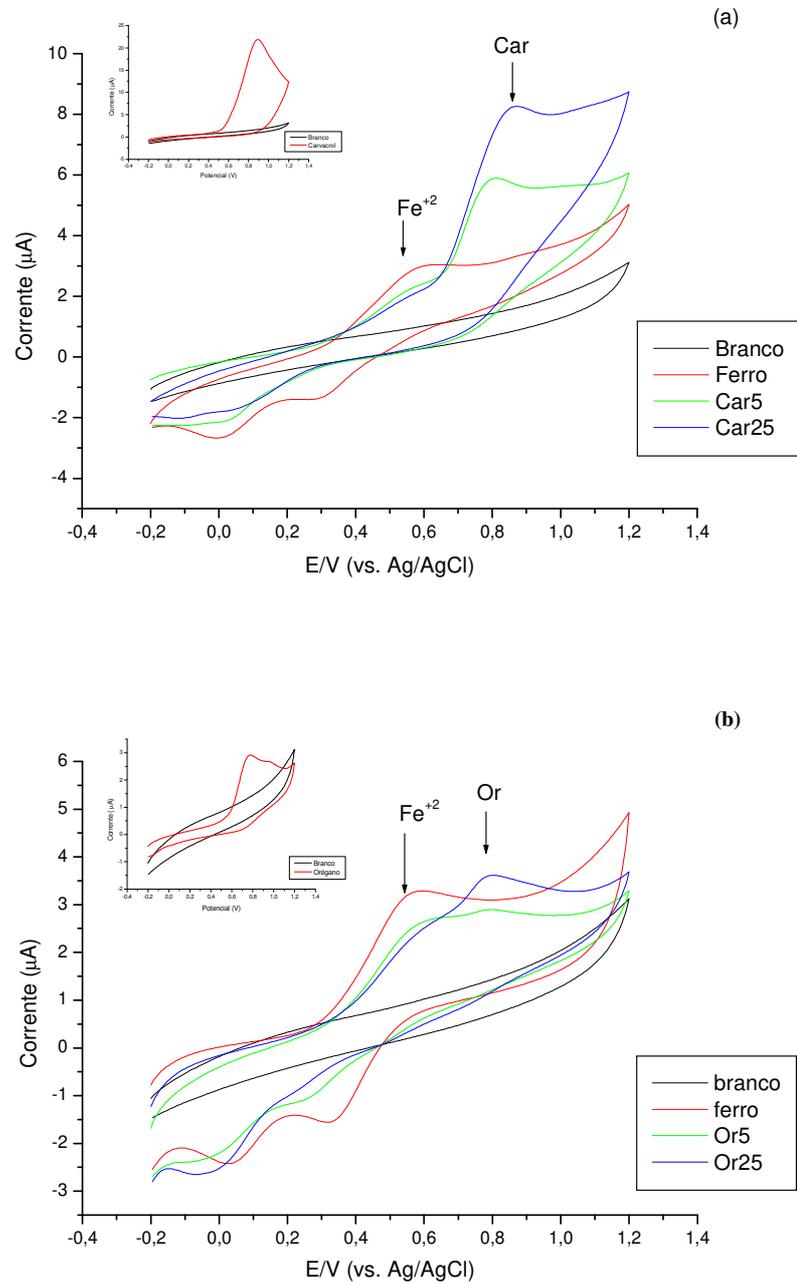
Os potenciais de oxidação obtidos para o eugenol e carvacrol corroboram com os encontrados por Arteaga et al. (2012), que estudaram a atividade antioxidante de padrões sintéticos de óleos essenciais utilizando técnicas eletroanalíticas e colorimétricas. Os autores obtiveram picos de oxidação em 0,41 e 0,55 V para eugenol e carvacrol, respectivamente. Tonello et al. (2016), estudando o comportamento eletroquímico em eletrodo de carbono vítreo, usando tampão fosfato (pH 10) como eletrólito de suporte, encontraram menores potenciais para esses dois compostos, sendo 0,30 V para o eugenol e 0,42 V para carvacrol. Apesar de terem obtidos menores valores de Epa, a ordem de oxidação foi semelhante à encontrada no presente trabalho.

Variação de potencial para uma mesma amostra em diferentes trabalhos pode ser explicado por modificações nas condições experimentais, em que os voltamogramas foram registrados, bem como a natureza das amostras utilizadas (ARTEAGA et al., 2012).

4.4.2 Atividade Antioxidante: Efeito Quelante sobre íons Fe²⁺

A capacidade quelante dos óleos essenciais e dos padrões sintéticos determinados por voltametria cíclica está representada na Figura 35, na qual se encontram os voltamogramas do carvacrol e óleo essencial de orégano, que foram escolhidos para representar o efeito encontrado na maioria das amostras avaliadas. Os voltamogramas completos para todas as amostras podem ser vistos nas Figuras 1 a 9 B, Apêndice B. Todos os voltamogramas foram obtidos em pH 5 (característico do eletrólito de suporte), sendo que esse foi monitorado e não apresentou variações no decorrer dos ensaios, mantendo-se constante. O sulfato de sódio (NaSO₄) foi escolhido como eletrólito de suporte, pois, de acordo com os estudos de Karami, Yaghoobi e Ramazani (2010), esse sal contribui para o aumento da densidade de corrente de íons metálicos em solução, além de ser inerte nas condições estudada, o que foi confirmado mediante a varredura de potencial.

Figura 35- Voltamogramas cíclicos ilustrativos do efeito quelante de carvacrol e óleo essencial de orégano



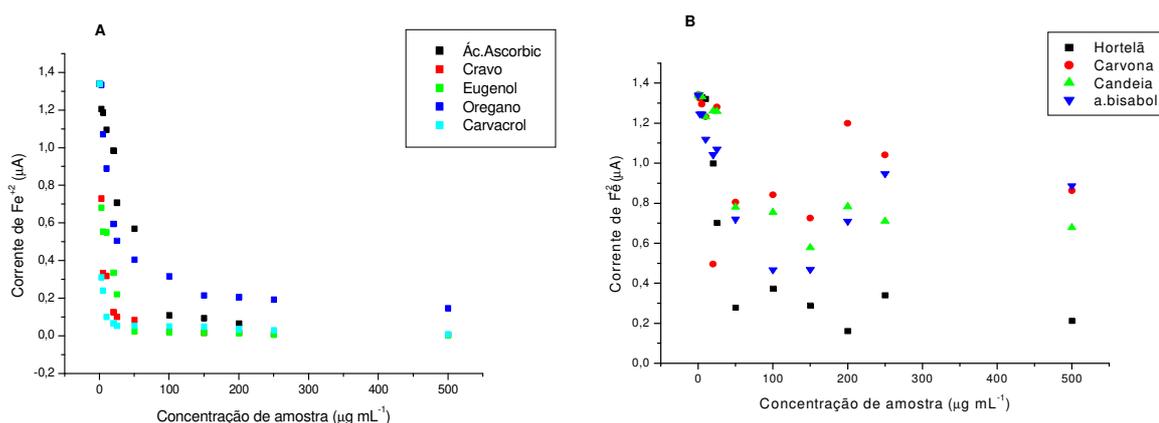
- Efeito quelante obtido para carvacrol (a) e óleo essencial de orégano (b), nas concentrações de 5, 25, 150 e 500 µg mL⁻¹, na superfície de eletrodo de carbono vítreo com NaSO₄ 0,05 mol L⁻¹ como eletrólito de suporte e FeSO₄ 5x10⁻⁴ mol L⁻¹ como fonte de íons ferro (II) a Velocidade de varredura de 50 mV s⁻¹.

Efeito quelante é o nome dado à habilidade de certas moléculas em proteger íons metálicos em solução, formando complexos que impedem a oxidação desses íons em sistemas biológicos, matrizes orgânicas, como produtos alimentícios, cosméticos e, no caso do presente

estudo, na superfície de um eletrodo. Com base nisso, foi possível perceber a partir dos voltamogramas que, na presença de ácido ascórbico, eugenol, carvacrol e óleos essenciais de cravo-da-índia e orégano, o pico de oxidação do ferro (II) diminuiu significativamente. Observa-se que a corrente anódica de íons ferro na presença de espécies eletroativas diminuiu exponencialmente até a concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de amostra (óleos essenciais e padrões); a partir dessa concentração, a diminuição na corrente se manteve constante até $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 36 A).

O comportamento da corrente de oxidação de Fe^{+2} com o aumento da concentração dos óleos essenciais de hortelã e candeia e de seus majoritários carvona e α -bisabolol não exibiu nenhum padrão, tendo variado irregularmente durante os tratamentos (Figura 36 B).

Figura 36- Relação entre a corrente de oxidação de Fe^{+2} e a concentração das amostras.



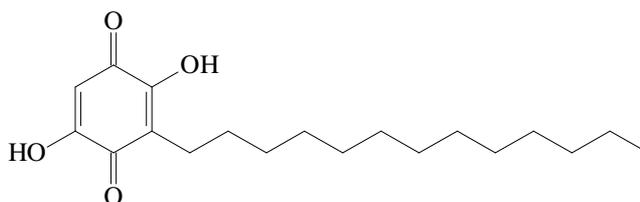
Fonte: do autor (2018)

Foi possível verificar uma redução na corrente anódica de Fe^{+2} de 99,6% para o ácido ascórbico e eugenol; 99,5 e 99,4% para o carvacrol e óleo de cravo-da-índia, respectivamente, 89% para o óleo essencial de orégano e 84,2% para o óleo de hortelã, na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. As demais amostras não reduziram a corrente de oxidação do ferro (II) nem em 50%.

De maneira geral, o ácido ascórbico, eugenol, carvacrol e o óleo essencial de cravo-da-índia apresentaram o mesmo efeito quelante. O efeito quelante do óleo essencial de orégano foi inferior à de seu constituinte majoritário, o que pode ser justificado, como nos demais ensaios, pela porcentagem de carvacrol no óleo e pela presença de outros constituintes que podem

potencializar ou inibir o efeito antioxidante. Vale ressaltar que o efeito quelante de óleos essenciais e padrões sintéticos ainda não foram elucidados. Entretanto, estudos envolvendo compostos fenólicos e cumarinas foram realizados por meio de outras técnicas. Segundo Castelluccio et al. (1995), a formação de quelatos com metais de transição como o ferro é favorecida por substituintes na posição *orto* de compostos fenólicos. Vega-Hernández et al. (2017) estudaram o efeito quelante do composto fenólico rapanona (2,5-dihydroxy-3-tridecylcyclohexa-2,5-diene-1,4-dione) (FIGURA 37) e, através de ensaios eletroquímicos, verificaram a formação de complexos rapanona-Fe (II) / Fe (III), capazes de inibir as reações de Fenton-Haber-Weiss. De acordo com os autores, a complexação dos íons ferro (II) altera os parâmetros cinéticos e termodinâmicos do ferro dissolvido, tornando-o menos reativo e até mesmo indisponível para processos oxidativos. Fato que foi ser evidenciado pela diminuição da corrente anódica de Fe^{+2} no presente estudo.

Figura 37- Estrutura química da rapanona



Fonte: Do autor (2018)

De acordo com Vega-Hernández et al. (2017), o mecanismo que envolve o processo de complexação por compostos com estrutura química complexa, como a rapanona, não é simples de ser obtido, uma vez que o processo quelante envolve pelo menos a presença de um sistema cíclico planar de seis membros com deslocalização eletrônica, além de grupos hidroxilas e alquilas adjacentes. Estudos mais avançados precisam ser desenvolvidos nessa área, a fim de determinar a forma exata com que os íons Fe^{+2} são quelados, bem como a estrutura do complexo formado.

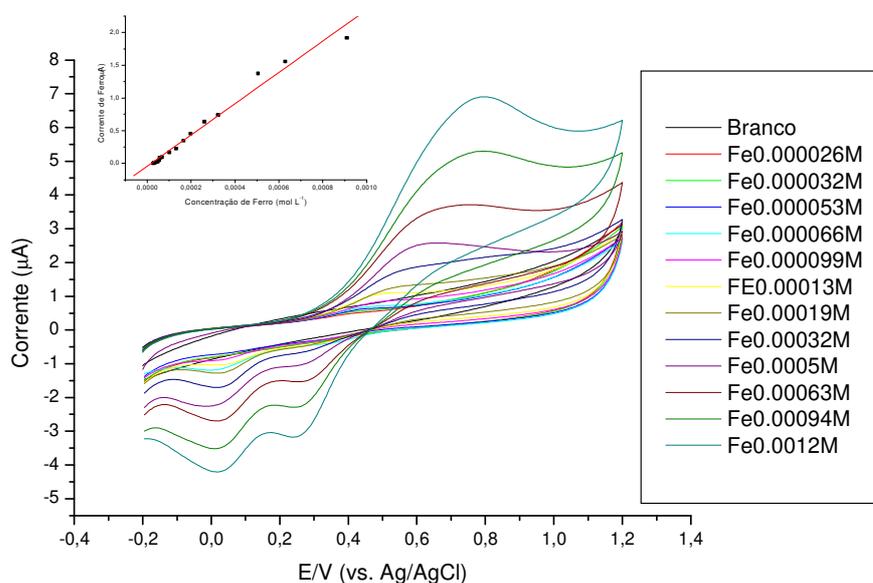
Os resultados encontrados no presente trabalho para o óleo essencial de hortelã estão de acordo com aqueles obtidos por Gonçalves et al. (2009), que encontraram um efeito coordenante mediano para *Mentha spicata* utilizando técnicas potenciométricas. Vale ressaltar que o óleo essencial de hortelã em $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou pico de oxidação anódica, ausente em concentrações inferiores, e em mesma concentração utilizando tampão fosfato como eletrólito de suporte. O fato de a carvona não ter exibido a mesma resposta indica que outro

constituente químico presente no óleo essencial de hortelã é eletroativo na superfície do eletrodo nas condições avaliadas. Isso ocorre porque a composição do eletrólito de suporte pode alterar a superfície do eletrodo utilizada e influenciar os potenciais de oxidação e redução observados (REIS et al., 2009).

Assim como a diminuição da absorbância indica efeito quelante nos testes colorimétricos, a diminuição da corrente de Fe^{+2} indicou que os íons estão de alguma forma impedidos ou protegidos contra a oxidação na superfície do eletrodo, sugerindo, assim, um efeito coordenante e quelante por parte das amostras estudadas (CANABADY-ROCHELLE et al., 2015; ISLAM; YU; XU, 2016).

Um estudo do comportamento eletroquímico do FeSO_4 na superfície do eletrodo foi realizado, a fim de confirmar os resultados obtidos. Avaliou-se a corrente de pico anódica com o aumento gradual da concentração de íons Fe^{+2} em solução (FIGURA 38).

Figura 38- Variação da corrente de ferro (II) com relação à concentração



Fonte: Do autor (2018)

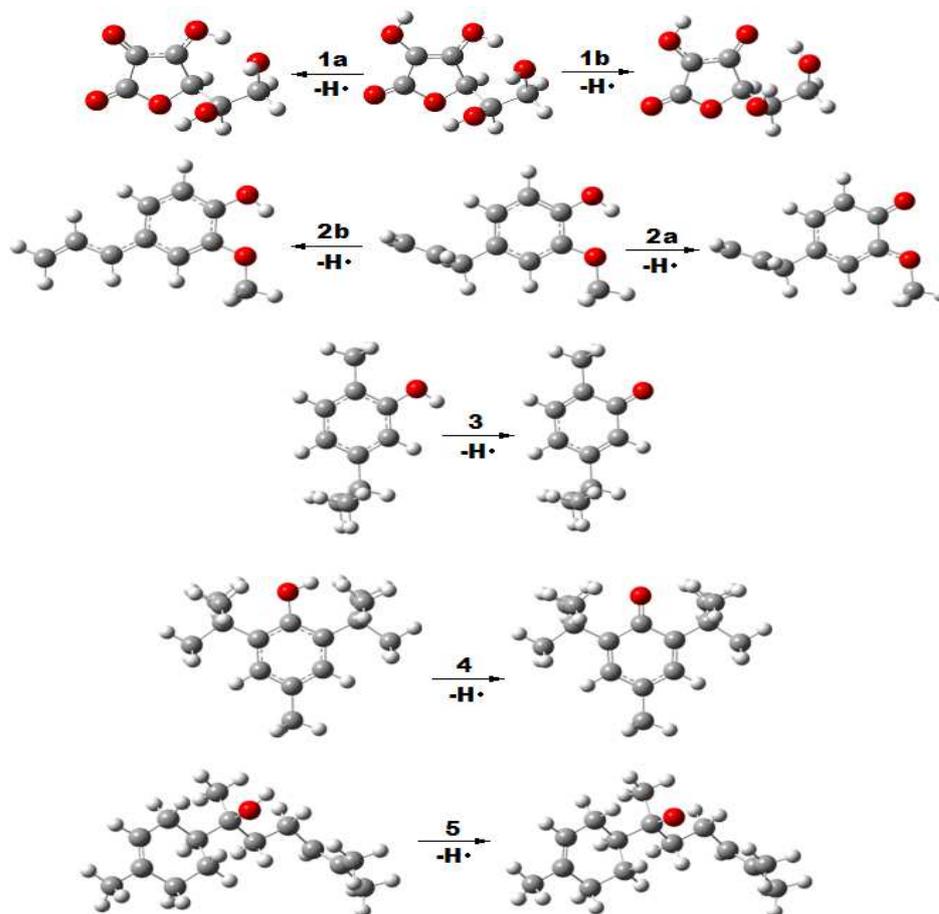
A corrente de oxidação do ferro aumentou linearmente com a concentração, exibindo um deslocamento de potencial para valores mais positivos de 0,5 a 0,75 V. Esse deslocamento também foi observado nos voltamogramas obtidos durante os ensaios; porém, para valores de potenciais mais negativos, pois a concentração de ferro diminuiu ao longo do experimento. O

voltamograma de ferro exibiu dois picos de redução na região de varredura de potencial reverso, que indicam a reversibilidade do processo e a regeneração dos íons Fe^{+2} . Pode-se observar nos voltamogramas obtidos durante os ensaios que os picos reversos diminuíram com o aumento da concentração das amostras, inferindo que, em altas concentrações de antioxidante, a quantidade de íons Fe^{+2} livre é baixa o suficiente para que seu processo redox não seja detectado por voltametria cíclica.

4.5 Avaliação da Atividade Antioxidante: Cálculos Teóricos de Entalpia de Dissociação das Moléculas

Os cálculos teóricos de entalpia de dissociação da ligação O-H foram obtidos para os antioxidantes BHT e ácido ascórbico e para os constituintes majoritários dos óleos essenciais, com exceção da carvona, por não possuir grupamento O-H. Os parâmetros teóricos foram calculados após a otimização das estruturas, para as moléculas protonadas e desprotonadas (FIGURA 39). Os valores de entalpia padrão em fase gasosa e água implícita e a entalpia de solvatação estão apresentados na Tabela 11.

Figura 39 - Estruturas tridimensionais otimizadas em nível ω B97X-D/6-31+G(d,p), em fase gasosa. Geometrias similares foram obtidas em água implícita



Estruturas tridimensionais de ácido ascórbico (1 a e b), eugenol (2 a e b), carvacrol (3), BHT (4) e α -bisabolol (5). Fonte: Do autor (2018).

Tabela 11- Entalpia padrão em fase gasosa e água implícita (ΔH° , kcal mol⁻¹) e entalpia de solvatação ($\delta\Delta H^*_S$, kcal mol⁻¹), calculadas para os equilíbrios 1-5, em nível ω B97X-D/6-31+G(d,p).

Parâmetros	1a	1b	2a	2b	3	4	5
$\Delta H^\circ_{GÁS}$	80,3	73,8	83,8	44,6	83,0	76,4	102,1
$\Delta H^\circ_{ÁGUA}$	76,9	77,3	80,0	44,5	82,2	76,2	102,8
$\delta\Delta H^*_S$	-3,3	3,5	-3,7	-0,1	-0,8	-0,2	0,7

1a e 1b - ácido ascórbico, **2a e 2b** - eugenol, **3** - carvacrol, **4** - BHT e **5** - α -bisabolol. Fonte: Do autor (2018)

Em condições padrão, a dissociação da ligação O-H para todas as moléculas analisadas não é favorável, pois $\Delta H > 0$, que significa que a reação ocorre mediante o fornecimento de calor, ou sob condições específicas, como na presença de espécies radicalares, fato evidenciado ao longo de todo o trabalho. Analisando os valores da Tabela 11, nota-se que a estrutura do

eugenol (**2b**) é a que apresentou entalpia de dissociação menos positiva (mais favorável), tanto em fase gasosa quanto em água, seguido das estruturas **1a** do ácido ascórbico e de BHT (**4**). O ácido ascórbico (**1a**) e o BHT (**4**) apresentaram entalpia padrão em água implícita similar, em condições padrão, essas moléculas juntamente com a estrutura (**2b**) do eugenol são as mais adequadas a gerar radical hidrogênio. Esses resultados corroboram com o fato de essas duas moléculas serem amplamente utilizadas pela indústria como agentes antioxidantes, pois em meio propício, são capazes de transferir átomos de hidrogênio, a fim de estabilizar radicais livres, de forma que são facilmente oxidadas.

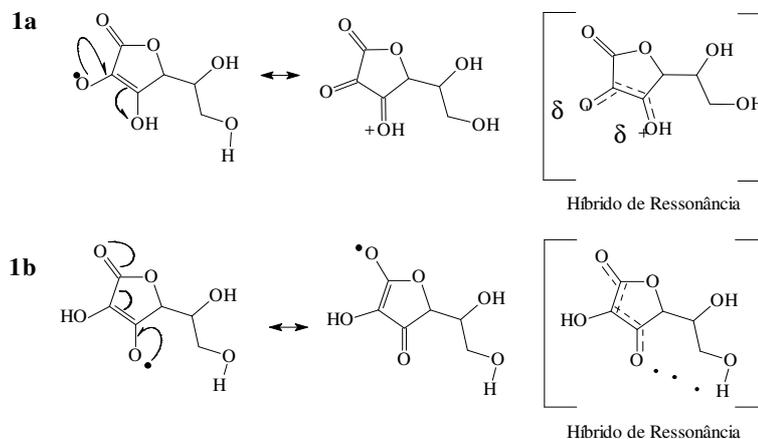
Dentre as moléculas estudadas, o α -bisabolol (**5**) apresentou entalpia de dissociação mais positiva, tanto em fase gasosa quanto em água, podendo ser considerada como a molécula menos favorável à dissociação. Radicais formados a partir de álcoois terciários são instáveis devido à proximidade de grupos alquilas, doadores de elétron por efeito indutivo, que aumentam a densidade eletrônica sobre o átomo de oxigênio, que, em resposta, retêm com maior força o átomo de hidrogênio (SOLOMONS; FRYHLE, 2013). Isso comprova e explica a ausência de atividade antioxidante dessa molécula e do óleo essencial de candeia nos ensaios colorimétricos e eletroquímicos. De acordo com GIACOMELLI et al. (2004), a transferência de hidrogênio torna-se menos favorável com o aumento da entalpia de dissociação, moléculas com essas características não são consideradas como bons agentes antioxidantes.

A energia de solvatação, obtida a partir do ciclo termodinâmico GÁS→ÁGUA, indica que as estruturas de eugenol (**2a**) e ácido ascórbico (**1a**) são as mais estabilizadas em solução aquosa, uma vez que apresentam os valores mais negativos de $\delta\Delta H^*_s$, -3.7 e -3.3 kcal mol⁻¹, respectivamente. O processo de solvatação conduz o sistema à estabilidade, sabe-se que quanto maior o tamanho do íon, maior será o número de moléculas de solventes a rodeá-lo, e maior será sua estabilidade em solução. Por analogia, a estabilidade dos radicais formados após a perda de hidrogênio depende do espalhamento da carga ou elétron no radical. Pode-se observar que o híbrido de ressonância do radical formado a partir de eugenol (**2a e 2b**) possui maior espalhamento de carga em relação aos demais radicais. De acordo com Castelluccio et al. (1995), o substituinte metoxilado na posição *orto* em relação à hidroxila garante maior estabilização do radical formado. Além disso, o eugenol possui pelo menos dois sítios propícios para a formação de radicais, conforme demonstrado por Yildiz et al. (2017), o que contribui para que apresente maior atividade antioxidante devido à maior estabilidade do radical formado após a doação de átomos de hidrogênio.

Substituintes alquilas no anel aromático não contribuem para a deslocalização e espalhamento de carga no radical, de forma que as moléculas de BHT e carvacrol, apesar de apresentarem energias de solvatação negativas, são menos estabilizadas em solução aquosa do que as estruturas de **(1a)** e **(2)**. O radical formado da liberação de hidrogênio por parte do α -bisabolol não pode ser estabilizado por deslocalização eletrônica, por possuir carga pontual, fato que foi evidenciado e comprovado pela maior energia de solvatação para essa molécula.

A entalpia de dissociação para o ácido ascórbico foi calculada para as duas hidroxilas presentes no anel heterocíclico. Pelos valores encontrados, observou-se que a estrutura com maior estabilidade é aquela formada pela perda de hidrogênio no carbono 2 (**1a**), resultado que não condiz com aqueles encontrados por Clayden (2000). Segundo esse, a hidroxila no carbono 3 é mais ácida do que a do carbono 2, pois contribui para um maior espalhamento de carga (FIGURA 40). Entretanto, é possível inferir pela observação das moléculas tridimensionais, obtidas por otimização, que a estrutura **1b** pode estabelecer ligações de hidrogênio intramolecular entre o oxigênio em C3 e o hidrogênio da hidroxila de C6, levando a uma diminuição do efeito de solvatação e a um aumento na energia de solvatação.

Figura 40- Estruturas de ressonância para o ácido ascórbico desprotonado



Fonte: Adaptado de Clayden (2000)

Pesquisas de Cheng et al. (2003) e Cheng et al. (2002) descrevem que a medida da energia de dissociação da ligação O-H determina a facilidade da transferência do hidrogênio para um radical, de forma que, quanto menor o valor, mais fraca é a ligação e mais estável é o radical formado após a abstração do hidrogênio. Os resultados encontrados a partir dos cálculos teóricos corroboram com os evidenciados durante todo o trabalho, tendo o eugenol e o óleo de cravo-da-índia potencial antioxidante equiparável ao dos antioxidantes sintéticos ácido ascórbico e BHT, seguidos pelo carvacrol e óleo essencial de orégano.

5 CONCLUSÃO

Os constituintes majoritários identificados nos óleos essenciais foram eugenol para o óleo de cravo-da-índia; terpinen-4-ol, hidrato de *trans*-sabineno, carvacrol e γ -terpineno para o óleo de orégano; carvona, dihidrocarveol, *trans*-carveol e eucaliptol para o óleo de hortelã; α -bisabolol e óxido de α -bisabolol B para o óleo essencial de candeia.

Os óleos essenciais de cravo-da-índia e orégano, juntamente com seus constituintes majoritários eugenol e carvacrol, apresentaram atividade antioxidante frente aos ensaios colorimétricos de estabilização de radicais DPPH e hidroxila, proteção do sistema β -caroteno/ácido linoleico e mostraram-se potentes agentes redutores no ensaio de poder redutor.

O ácido ascórbico, dentre todas as amostras avaliadas, possui maior facilidade em oxidar-se, demonstrando o menor potencial de pico de oxidação no estudo eletroquímico seguido pelo óleo de cravo-da-índia e eugenol, por carvacrol e óleo essencial de orégano. As demais amostras foram inativas na superfície do eletrodo.

Das amostras avaliadas carvacrol, eugenol, ácido ascórbico e os óleos essenciais de cravo-da-índia, orégano e hortelã foram as que apresentaram efeito quelante frente os íons ferro (II).

O eugenol e o ácido ascórbico possuem menores valores de entalpia de solvatação e, consequentemente, maior tendência a perder átomos de hidrogênio.

A capacidade antioxidante do óleo essencial de cravo-da-índia e eugenol foi semelhante à atividade dos antioxidantes sintéticos BHT e ácido ascórbico, em todos os ensaios realizados, sendo considerados uma alternativa para as indústrias farmacêuticas e alimentícias, na substituição ou associação com os sintéticos, mediante a estudos mais avançados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABOZID, M. M.; EL-SYED, S. M. Antioxidant and protective effect of clove extracts and clove essential oil on hydrogen peroxide treated rats. **International Journal of ChemTech Research**, v. 5, n. 4, p. 1477-1485, 2013.
- ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**, Carol Stream: Allured, p. 469, 2007.
- AFFONSO, R. S. et al. Aspectos químicos e biológicos do óleo essencial de cravo da Índia. **Revista Virtual de Química**. v.4, n. 2, p. 146-161, May., 2012.
- ALENKINA, I.V. et al. Comparative analysis of the heme iron electronic structure and stereochemistry in tetrameric rabbit hemoglobin and monomeric soybean leghemoglobin using Mössbauer spectroscopy with a high velocity resolution. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 191, p. 547-557, 2018.
- ALIGIANNIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of agricultural and food chemistry**. v. 49, n. 9, p. 4168-70, Sep., 2001.
- ALTOE, T. F. et al. Variation in the chemical composition of the oil from cultivated *Eremanthus erythropappus* according to the extraction time. In: 44th International Symposium on Essential Oils, 2013, Budapeste - Hungria. **Livro de Resumos do 44th International Symposium on Essential Oils**, v. 1, p. 135-135, 2013.
- ALVES, C. Q. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- AMAZON. *Mentha spicata* L. Disponível em: <<https://www.amazon.co.uk/MINT-Mentha-spicata-Garden-spearmint/dp/B001UPV3T6>>. Acesso em 11 de Janeiro de 2018.
- ANDRADE, L. A. et al. DFT study on the complexation of anions with 1, 4, 7, 10, 13, 16-hexaazacyclooctodeca-2, 5, 8, 11, 14, 17-hexaene. **Journal of Inclusion Phenomena and Macrocyclic Chemistry**. v. 89, n. 3-4, p. 273-280, Dec., 2017.
- ANDRADE, M. A. et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. **Antioxidants**, Basel, v. 2, n. 4, p. 384-397, Nov., 2013.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, Abr./Jun., 2012.
- APRIOKU, J. S. Pharmacology of free radicals and the impact of reactive oxygen species on the testis. **Journal of reproduction & infertility**, v. 14, n. 4, p.158, Oct./Dez., 2013.
- ARAÚJO, A. F. et al. Larvicidal activity of *Syzygium aromaticum* (L.) Merr and *Citrus sinensis* (L.) Osbeck essential oils and their antagonistic effects with temephos in resistant populations

of *Aedes aegypti*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. Rio de Janeiro, v. 111, n. 7, Epub Jul., 2016.

ARTEAGA, J. F. et al. Comparison of the simple cyclic voltammetry (CV) and DPPH assays for the determination of antioxidant capacity of active principles. **Molecules**. v. 17, n. 5, p. 5126-5138, May., 2012.

AYALA, A.; MUÑOZ, M. F.; ARGÜELLES, S. Lipid peroxidation: production, metabolism, and signaling mechanisms of malondialdehyde and 4-hydroxy-2-nonenal. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2014, n. 8, p. 1-31, May., 2014.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb., 2008.

BALDISSERA, M. D. et al. In vitro and in vivo action of terpinen-4-ol, γ -terpinene, and α -terpinene against *Trypanosoma evansi*. **Experimental parasitology**. [S.I], v. 162, p. 43-8, Mar., 2016.

BARBOSA, K. B. F. et al. Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios. **Brazilian Journal of Nutrition**, v. 23, n. 4, p. 629-643, Jul/Ago, 2010.

BARROS, A. S. de. et al. Chemical composition and functional properties of essential oils from *Mentha* species. **Industrial Crops and Products**. v. 76, p. 557-64, Dec, 2015.

BATISTA, R. B. et al. Efeito da Aplicação Foliar de Ácidos Graxos na "Via das Lipoxigenases" de Plantas de Soja. **Química Nova**, v. 25, n. 6/A, p. 914-920, 2002.

BERTINI, L. M. et al. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v. 17, n. 3-4, p. 80-83, 2005.

BIANCHI, M. de L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais Livres e os Principais Antioxidantes da Dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p.123-130, maio/ago, 1999.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BORGES, A. M. et al. Determinação de óleos essenciais de alfavaca (*Ocimum gratissimum* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) e tomilho (*Thymus vulgaris* L.) **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 4, p. 656-665, 2012.

BORTOLOMEAZZI, R. et al. Formation of dehydrodiisoeugenol and dehydrodieugenol from the reaction of isoeugenol and eugenol with DPPH radical and their role in the radical scavenging activity. **Food chemistry**. v. 118, n. 2, p. 256-65, Jan., 2010.

BOULANOUAR, B. et al. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. **Industrial Crops and Products**, Philadelphia, v. 46, p. 85-96, Apr, 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). In: *Farmacopeia Brasileira*, Brasília, 5th ed. v. 1, p. 198-199, 2010.

CAETANO-SILVA, M. E. et al. Synthesis of whey peptide-iron complexes: Influence of using different iron precursor compounds. **Food Research International**. v. 101, p.73-81, Nov., 2017.

CAMOLESI, F. J. et al. Ajuste, seleção e teste de identidade de modelo para volume e número de moirões da candeia (*Eremanthus erythropappus*). **Cerne**, v. 16, n. 4, 2010.

CANABADY-ROCHELLE, L. L. et al. Determination of reducing power and metal chelating ability of antioxidant peptides: Revisited methods. **Food chemistry**. v. 183, p. 129-35, Sep., 2015.

CANABADY-ROCHELLE, L. L. et al. SPR screening of metal chelating peptides in a hydrolysate for their antioxidant properties. **Food chemistry**. v. 239, p. 478-485, Jan., 2018.

CAO, L. et al. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant properties of *Mosla chinensis* Maxim. **Food Chemistry**, v.115, n. 3, p. 801-805, 2009.

CASTELLUCCIO, C. et al. Antioxidant potential of intermediates in phenylpropanoid metabolism in higher plants. **Febs Letters**. v. 368, n. 1, p. 188-192, Jul., 1995.

CHAI, J. D.; HEAD-GORDON, M. Long-range corrected hybrid density functionals with damped atom-atom dispersion corrections. **Physical Chemistry Chemical Physics**. v. 10, n. 44, p. 6615-6620, 2008.

CHENG, Z. et al. Study on the multiple mechanisms underlying the reaction between hydroxyl structure and activity relationship, **Bioorganic and Medical Chemistry**, v. 10, p. 4067-4073, 2002.

CHENG, Z. et al. Quantitative elucidation of the molecular mechanisms of hydroxyl radical quenching reactivity of phenolic compounds, **Bioorganic Chemistry**, v. 31, n. 2, p. 149-162, 2003.

CHRYSARGYRIS, A. et al. Antioxidant and antibacterial activities, mineral and essential oil composition of spearmint (*Mentha spicata* L.) affected by the potassium levels. **Industrial Crops and Products**. v. 103, p. 202- 212, Sep., 2017.

CHU, C. M.; WAN, C. C. Effect of citric acid as a chelating agent on anodic behavior of pure iron with potentiostatic polarization and cyclic voltammetry methods. **Materials chemistry and physics**, [S.I], v. 33, n. 3, p. 189-196, Mar., 1993.

CLAYDEN, J. et al. **Organic Chemistry**, Oxford University Press, United Kingdom, p. 1469, 2000.

CONFORTI, F. et al. Comparative chemical composition, free radicalscavenging and cytotoxic properties of essential oils of six *Stachys* species from different regions of the Mediterranean Area. **Food Chemistry**,v. 116, p. 898-905, 2009.

CONTRADE, United National CONTRADE Database- International Trade Statistics- Import/Export Data. Disponível em: <http://comtrade.un.org/>. Acessado em 16-03-2016.

CORTÉS-ROJAS, D. F.; SOUZA, C. R. DE; OLIVEIRA, W. P. CLOVE (*Syzygium aromaticum*): a precious spice. **Asian Pacific journal of tropical biomedicine**. [S.I], v. 4, n. 2, p. 90-6, Feb., 2014.

COSTA, A. T. et al. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & LM Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 13, n. 2, p. 240-245, Mar./Abr., 2011.

da SILVA F. J. E.; RODRIGUES, S. S. F. B. Prospecção tecnológica do uso do óleo essencial de cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) e do eugenol na formulação de produtos para higiene pessoal, alimentos e medicamentos. **Cadernos de Prospecção**, v. 5, n. 3, p. 152, 2014.

DANIEL, A. P. et al. Oxidative stability during frozen storage of fillets from silver catfish (*Rhamdia quelen*) sedated with the essential oil of *Aloysia triphylla* during transport. **Ciência Rural**, v. 46, n. 3, p. 560-566, 2016.

DAR, R. A. et al. Evaluation of antioxidant activity of crocin, podophyllotoxin and kaempferol by chemical, biochemical and electrochemical assays. **Arabian Journal of Chemistry**. v. 10, p. S1119-S1128, Feb., 2013.

de AZEVEDO, D. C.; GOULART, M. O. Estereosseletividade em reações eletródicas. **Química nova**, Maceió, AL, v. 20, n. 2, p. 159-168, 1997.

de OLIVEIRA, R. A.; REIS, T. V.; do SACRAMENTO, C. K.; DUARTE, L. P.; de OLIVEIRA, F. F. Constituintes químicos voláteis de especiarias ricas em eugenol. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. 3, p. 771-775, 2009.

de PÁDUA, J. A.; BRANDÃO, M. M. de CARVALHO, D. Spatial genetic structure in natural populations of the overexploited tree *Eremanthus erythropappus* (DC.) Macleish (Asteraceae). **Biochemical Systematics and Ecology**. v. 66, p. 307-311, Jun., 2016.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products A Biosynthetic Approach**. John Wiley, New York 3. ed. p. 187-306, 2009.

DORMAN, H. J. et al. In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 15, n. 1, p. 12-16, 2000.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Antioxidant activity of phenolics compounds from sugar cane (*Saccharum officinarum* L.) juice. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 61, n. 4, p. 187, 2006.

DUDAREVA, N. et al. The nonmevalonate pathway supports both monoterpene and sesquiterpene formation in snapdragon flowers. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. [S.I], v. 102, n. 3, p. 933-8, Jan., 2005.

DUKIĆ, M. N. et al. The effect of plant secondary metabolites on lipid peroxidation and eicosanoid pathway. **Lipid Peroxidation**, p. 193-210, 2012.

EBRAHIMABADI, A. H. et al. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. **Food Chemistry**. v. 119, n. 2, p. 452-8, Mar., 2010.

EKLUND, P. C. et al. Chemical studies on antioxidant mechanisms and free radical scavenging properties of lignans. **Organic & biomolecular chemistry**. [S.I.], v. 3, n. 18, p. 3336-47, 2005.

FARIAS, K. S. et al. Antioxidant properties of species from the Brazilian cerrado by different assays. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 15, n. 4, p. 520-528, 2013.

FERNANDESA, K. H. et al. Considerações técnicas quanto ao uso da voltametria de varredura escalonada em processos adsortivos. **Química Nova**. v. 38, n. 3, p. 431-435, 2015.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computerstatistic alanalysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p.1039-1042, 2011.

FERREIRA, I. C. R. F.; ABREU, R. M. V. Stress oxidativo, antioxidantes e fitoquímicos. **Bioanálise**, n. 2, p. 32-39, Jul/Dez, 2007.

FIALOVA, S. et al. Analysis and Antioxidant Potential and Analysis of Essential Oils of Different *Mentha* Species. **Chemické Listy**, v. 108, n. 10, p. 984-989, 2014.

FLORA. *Mentha spicata* L. Disponível em: <<http://www.i-flora.com/steckbriefe/suche-nach-arten/art/show/mentha-spicata.html>>. Acesso em 11 de Janeiro de 2018.

FRISCH, M. J. et al. Gaussian 09, Revision A.02, Gaussian, Inc., Wallingford, CT, 2009.

FRISCH, M. J.; POPLE, J. A.; BINKLEY, J. S. Self-consistent molecular orbital methods 25. Supplementary functions for Gaussian basis sets. **The Journal of chemical physics**. v. 80, n. 7, p. 3265-9, Apr., 1984.

FULGÊNCIO, A. C. C. et al. L. New voltammetry-based analytical method for indirect determination of procymidone in Brazilian apples. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 1, p. 31-38, 2014.

GALATO, D. et al. Antioxidant capacity of phenolic and related compounds: correlation among electrochemical, visible spectroscopy methods and structure–antioxidant activity. **Redox Report**. v. 6, n. 4, p. 243-50, Aug, 2001.

GALDINO, A. P. et al. Estudo sobre o rendimento e qualidade do óleo de candeia (*Eremanthus* ssp) e a influência das diferentes origens comerciais da sua madeira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v. 8, n. 4, p. 44-6, Out., 2006.

GASPARIN, P. P.; CHRIST, D.; COELHO, S. R. Drying of *Mentha piperita* leaves on a fixed bed at different temperatures and air velocities. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 48, n. 2, p. 242-50, Apr./June, 2017.

GHASEMI, M. et al. Increase of Chamazulene and α -Bisabolol Contents of the Essential Oil of German Chamomile (*Matricaria chamomila* L.) Using Salicylic Acid Treatments under Normal and Heat Stress Conditions. **Foods**, v. 5, n. 3, p. 56, 2016.

GIACOMELLI, C. et al. Antioxidant activity of phenolic and related compounds: a density functional theory study on the O–H bond dissociation enthalpy. **Redox report**. v. 9, n. 5, p. 263-269, Oct, 2004.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GONÇALVES, R. S.; BATTISTIN, A. Potentiometry as electrochemical method for determination of chelating ability of essential oils for reduced ion. I-Studies with *Mentha* essential oils. **Pesquisa Agropecuária Gaúcha**, Porto Alegre, v. 15, n. 1, p. 39-43, 2009.

GONÇALVES, R. S. et al. A. Antioxidant properties of essential oils from *Mentha* species evidenced by electrochemical methods. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu v. 11, n. 4, p.372-382, 2009.

GOVINDARAJAN, M. et al. Chemical composition and larvicidal activity of essential oil from *Mentha spicata* (Linn.) against three mosquito species. **Parasitology Research**, v. 110, n. 5, p. 2023-2032, 2012.

GOVINDARAJAN, M. et al. Larvicidal potential of carvacrol and terpinen-4-ol from the essential oil of *Origanum vulgare* (Lamiaceae) against *Anopheles stephensi*, *Anopheles subpictus*, *Culex quinquefasciatus* and *Culex tritaeniorhynchus* (Diptera: Culicidae). **Research in veterinary science**. [S.I], v. 104, p. 77-82, Feb., 2016.

GRANDI, T. S. M. **Tratado das Plantas Mediciniais: mineiras, nativas e cultivadas**. Belo Horizonte: Adequatio Estúdio, 2014.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, v. 42, n. 2, p. 464-472, 2011.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf). **Química Nova**, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, 2008.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Óleo Essencial de *Lippia sidoides* Nativas de Minas Gerais: Composição, Estruturas Secretoras e Atividade Antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 45, n. 2, p. 267-275, abr/jun, 2014.

HAJJI, M. et al. Chemical composition, angiotensin I-converting enzyme (ACE) inhibitory, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oil from *Periploca laevigata* root barks. **Food Chemistry**, v. 121, p. 724-731, 2010.

HALLIWELL, B. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life. **Plant physiology**. v. 141, n. 2, p. 312-322 Jun., 2006.

HAN, F. et al. Chemical composition and antioxidant activities of essential oils from different parts of the oregano. **Journal of Zhejiang University. Science. B**, v. 18, n. 1, p. 79, 2017.

HOYOS-ARBELÁEZ, J.; VÁZQUEZ, M.; CONTRERAS-CALDERÓN, J. Electrochemical methods as a tool for determining the antioxidant capacity of food and beverages: A review. **Food chemistry**. v. 221, p. 1371-1381, Apr., 2017.

ISLAM, T.; YU, X.; XU, B. Phenolic profiles, antioxidant capacities and metal chelating ability of edible mushrooms commonly consumed in China. **LWT-Food Science and Technology**. v. 72, p. 423-31, Oct., 2016.

JARADAT, N. A. et al. The effect of inhalation of *Citrus sinensis* flowers and *Mentha spicata* leave essential oils on lung function and exercise performance: a quasi-experimental uncontrolled before-and-after study. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v. 13, n. 1, p. 36, 2016.

JARA-PALACIOS, M. J. et al. Cyclic voltammetry to evaluate the antioxidant potential in winemaking by-products. **Talanta**. v. 165, p. 211-215, Apr., 2017.

KANATT, S. R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. **Food Chemistry**, London, v. 100, p. 451-458, 2007.

KARAMI, H.; YAGHOUBI, A.; RAMAZANI, A. Sodium sulfate effects on the electrochemical behaviors of nanostructured lead dioxide and commercial positive plates of lead-acid batteries. **International Journal of Electrochemical Science**, v. 5, p. 1046-59, Jul., 2010.

KEDIA, A. et al. Antifungal, antiaflatoxigenic, and insecticidal efficacy of spearmint (*Mentha spicata* L.) essential oil. **International Biodeterioration & Biodegradation**. v. 89, p. 29-36, Apr., 2014.

KEFFOUS, F. et al. Determination of the antioxidant activity of *Limoniastrum feei* aqueous extract by chemical and electrochemical methods. **Cogent Chemistry**. v. 2, n. 1, p. 1186141, Dec., 2016.

KELL, D. B.; PRETORIUS, E. Serum ferritin is an important inflammatory disease marker, as it is mainly a leakage product from damaged cells. **Metallomics**, v. 6, n. 4, p. 748-773, 2014.

KEWSCIENCE. **Plants of the world online**. Disponível em: <<http://powo.science.kew.org/taxon/urn:lsid:ipni.org:names:601421-1#image-gallery>>. Acesso 11 de Janeiro de 2018.

KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, London, v. 85, n. 4, p. 633-640, May 2004.

LOBO, V. et al. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy reviews**, v. 4, n. 8, p. 118, 2010.

LÜ, J. M. et al. Chemical and molecular mechanisms of antioxidants: experimental approaches and model systems. **Journal of cellular and molecular medicine**, v. 14, n. 4, p. 840-860, 2010.

LUZ, J. M. et al. Organic fertilization and composition of oregano essential oil. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**. [S.I.], v. 15, n. 5, p. 301-14, set., 2016.

LUZ, J. M.; EHLERT, P. A.; INNECCO, R. U. Horário de colheita e tempo de secagem da alfavaca-cravo. **Horticultura Brasileira**. 2009.

MACHADO, B. F. M. T.; FERNANDES JUNIOR, A. Óleos Essenciais: Aspectos Gerais e Usos em Terapias Naturais. **Cadernos acadêmicos, Tubarão**, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MAHBOUBI, M. *Mentha spicata* as natural analgesia for treatment of pain in osteoarthritis patients. **Complementary therapies in clinical practice**. v. 26, p. 1-4, Feb., 2017.

MALYSZKO, J.; KARBARZ, M. Electrochemical oxidation of trolox and α -tocopherol in acetic acid: A comparative study. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. v. 595, n. 2, p. 136-144, Oct., 2006.

MARCIAL, G. E. et al. Influence of oregano essential oil on traditional Argentinean cheese elaboration: Effect on lactic starter cultures. **Revista Argentina de microbiología**. [S.I.], v. 48, n. 3, p. 229-35, Sep., 2016.

MARKOWITZ, K. et al. Biologic properties of eugenol and zinc oxide-eugenol: a clinically oriented review. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology**, v. 73, n. 6, p. 729-737, 1992.

MARY, C. P.; VIJAYAKUMAR, S.; SHANKAR, R. Metal chelating ability and antioxidant properties of Curcumin-metal complexes—A DFT approach. **Journal of Molecular Graphics and Modelling**. v. 79, p. 1-4, Jan., 2018.

MCCORD, JOE M. The evolution of free radicals and oxidative stress. **The American journal of medicine**, v. 108, n. 8, p. 652-659, 2000.

MECHERGUI, K. et al. Effect of harvest year on production, chemical composition and antioxidant activities of essential oil of oregano (*Origanum vulgare* subsp glandulosum (Desf.) Ietswaart) growing in North Africa. **Industrial Crops and Products**. v. 90, p. 32-7, Nov., 2016.

MIR, S. A.; BHAT, A. S.; AHANGAR, A. A. A new Fenton assay for Hydroxyl radical scavengers by monitoring Catechol oxidation. **International Journal of PharmTech Research**. v. 6, n. 2, p. 759-768, 2014.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Correlação entre composição química e eficácia antioxidante de óleos essenciais de plantas condimentares por análise de agrupamentos hierárquicos (HCA). **Exacta**, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2014.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas. **Revista Ciência Agronômica**, v. 47, n. 1, p. 213-220, jan/mar, 2016.

MOLINA, G.; PIMENTEL, M. R.; PASTORE, G. M. Pseudomonas: a promising biocatalyst for the bioconversion of terpenes. **Applied microbiology and biotechnology**. [S.I], v. 97, n. 5, p.1851-64, Mar., 2013.

MORGON, N. H. Computação em química teórica: informações técnicas. **Química nova**, São Paulo, v. 24, n. 5, Sept./ Oct., 2001.

MORI, C. L. S de O. et al. Influence of altitude, age and diameter on yield and alpha-bisabolol content of candeia trees (*Eremanthus erythropappus*). **Cerne**, Lavras, v. 15, n. 3, p. 339-345, Jul./Set., 2009.

MORSHELOO, M. R. et al. Effect of prolonged water stress on essential oil content, compositions and gene expression patterns of mono-and sesquiterpene synthesis in two oregano (*Origanum vulgare* L.) subspecies. **Plant Physiology and Biochemistry**. v. 111, p. 119-28, Feb., 2017.

MURUGANATHAN, U.; SRINIVASAN, S. Beneficial effect of carvone, a dietary monoterpene ameliorates hyperglycemia by regulating the key enzymes activities of carbohydrate metabolism in streptozotocin-induced diabetic rats. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 84, p. 1558–1567, 2016.

NASCIMENTO, J. C. et al. Determinação da atividade antioxidante pelo método DPPH e doseamento de flavonoides totais em extratos de folhas da *Bauhinia variegata* L. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, n. 4, p. 327-332, 2011.

OLIVEIRA, C. M. et al. Study of quinones reactions with wine nucleophiles by cyclic voltammetry. **Food chemistry**, [S.I], v. 211, p. 1-7, Nov., 2016.

PACHECO, W. F. et al. Voltametrias: Uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**. v. 5, n. 4, p.516-537, Aug, 2013.

PEIXOTO C. R. M. de et al. Voltammetric determination of total antioxidant capacity of Bunchosia glandulifera tree extracts. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. v. 799, p. 519-524, Aug., 2017.

PIMENTEL, F. A., et al. Influência da temperatura de secagem sobre o rendimento e a composição química do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) BUR. & K. SHUM. **Química Nova**, [S. I], v. 31, n. 3, p. 523-526, Fev., 2008.

QUEIROZ, A.; CAJAIBA. J. A. sustainable process for (–)- α -bisabolol extraction from *Eremanthus erythropappus* using supercritical CO₂ and ethanol as co-solvent. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 110, p. 39-46, Apr., 2016.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical interventions in aging**, v. 2, n. 2, p. 219, 2007.

RAJAN, V. K.; MURALEEDHARAN, K. A computational investigation on the structure, global parameters and antioxidant capacity of a polyphenol, Gallic acid. **Food chemistry**. v. 220, p. 93-99, Apr., 2017.

RAMALHO, V. C., JEORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

REIS, N. S et al. Métodos eletroquímicos usados para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. **Latin American Journal of Pharmacy**, [S.I], v. 28, n. 6, p. 949-953, July., 2009.

RENE, A. et al. How do phenolic compounds react toward superoxide ion? A simple electrochemical method for evaluating antioxidant capacity. **Analytical chemistry**. v. 82, n. 20, p. 8703-10, Sep., 2010.

REZENDE, D. A. C. S. et al. Characterization of the Biological Potential of the Essential Oils from Five Species of Medicinal Plants. **American Journal of Plant Sciences**, v. 8, n. 2, p. 154-170, Jan., 2017.

ROMERO, A. L. et al. Composição química e atividade do óleo essencial de *origanum vulgare* sobre fungos fitopatogênicos. **Journal of Health Sciences**. v. 14, n. 4, Jul., 2015.

ROSADO, L. D et al. Influência do processamento da folha e tipo de secagem no teor e composição química do óleo essencial de manjeriço cv. Maria Bonita. **Ciência e agrotecnologia**. Lavras, v. 35, n. 2, p. 291-296, mar./abr., 2011.

ROSAHL, S. Lipoxygenases in plants-their role in development and stress response. **Zeitschrift für Naturforschung C**, v. 51, n. 3-4, p. 123-138, 1996.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food chemistry**, v. 69, n. 2, p. 167-174, 2000.

SALARBASHI, D. et al. Development of new active packaging film made from a soluble soybean polysaccharide incorporated *Zataria multiflora* Boiss and *Mentha pulegium* essential oils. **Food chemistry**. v. 146, p. 614-22, Mar., 2014.

SANTIAGO, J. A. et al. Essential oil from *Chenopodium ambrosioides* L.: secretory structures, antibacterial and antioxidant activities. **Acta Scientiarum. Biological Science**, Maringá, v. 38, n. 2, p. 139-147, Apr.-June., 2016.

SANTOS, K. A. et al. Candeia (*Eremanthus erythropappus*) oil extraction using supercritical CO₂ with ethanol and ethyl acetate cosolvents. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 128, p. 323-330, October 2017.

SANTOS, K. A. et al. Wood and industrial residue of candeia (*Eremanthus erythropappus*): supercritical CO₂ oil extraction, composition, antioxidant activity and mathematical modeling. **The Journal of Supercritical Fluids**. v. 31, p. 114:1-8, Aug., 2016.

SANTOS, N. O. et al. Assessing the Chemical Composition and Antimicrobial Activity of Essential Oils from Brazilian Plants- *Eremanthus erythropappus* (Asteraceae), *Plectrantuns barbatus*, and *P. amboinicus* (Lamiaceae). **Molecules**, v. 20, n. 5, p. 8440-8452, 2015.

SARIKURKCU, C. et al. Composition, antioxidant, antimicrobial and enzyme inhibition activities of two *Origanum vulgare* subspecies (subsp. *vulgare* and subsp. *hirtum*) essential oils. **Industrial Crops and Products**. v. 70, p. 178-84, Aug., 2015.

SCHERER, R. et al. Antioxidant and antibacterial activities and composition of Brazilian spearmint (*Mentha spicata* L.). **Industrial crops and products**. v. 50, p. 408-13, Oct., 2013.

SCHERER, R. et al. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. Botucatu, v.11, n.4, p.442-449, Jan, 2009.

SCOLFORO, J. R. et al. Manejo sustentado das candeias: *Eremanthus erythropappus* (DC.) McLeish e *Eremanthus incanus* (Less.) Less. **NEMAF-Núcleo de estudos em Manejo Florestal**. Disponível em: <www.nucleoestudo.ufla.br/nemaf/candeia/manual_completo.pdf>. Acesso em: 11 de janeiro de 2018.

SEBAALY, C. et al. Preparation and characterization of clove essential oil-loaded liposomes. **Food chemistry**. v. 178, p. 52-62, Jul., 2015.

SEEBER, R.; ZANARDI, C.; INZELT, G. The inherent coupling of charge transfer and mass transport processes: the curious electrochemical reversibility. **ChemTexts**. v. 2, n. 2 p. 8, Jun., 2016.

SHAHBAZI, Y. Chemical composition and in vitro antibacterial activity of *Mentha spicata* essential oil against common food-borne pathogenic bacteria. **Journal of pathogens**, v. 2015, p. 1-5, 2015.

SHAHSAVARPOUR, M., et al. Extraction of essential oils from *Mentha spicata* L.(Labiatae) via optimized supercritical carbon dioxide process. **The Journal of Supercritical Fluids**. [S. I], v. 130, p. 253–260, Feb, 2017.

SHEIKH, N. A.; DESAI, T. R.; TIRGAR, P. R. Evaluation of iron chelating and antioxidant potential of *Epilobium hirsutum* for the management of iron overload disease. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. v. 89, p. 1353-1361, May., 2017.

SILVA. L. F. et al. Chemical characterization, antibacterial and antioxidant activities of essential oils of *Mentha viridis* L. and *Mentha pulegium* L. (L). **American Journal of Plant Sciences**. v. 6, n. 5, p. 666-675, Mar., 2015.

SILVÉRIO, M. S. et al. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Eremanthus erythropappus* (DC) McLeisch (Asteraceae). **Molecules**. v. 18, n. 8, p. 9785-96, Aug., 2013.

SILVESTRI, J. D. F. et al. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). **Revista Ceres**. Viçosa, v. 57, n.5, p. 589-594, set/out, 2010.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: Da Planta ao Medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS, p. 1104, 2007.

SINGH, O. et al. Chamomile (*Matricaria chamomilla* L.): an overview. **Pharmacognosy reviews**, v. 5, n. 9, p. 82, 2011.

SKOOG, et al. **Fundamentos de Química Analítica**. 9. ed. São Paulo: Cengage Learning, p. 950, 2014.

SNOUSSI, M. et al. Mentha spicata essential oil: chemical composition, antioxidant and antibacterial activities against planktonic and biofilm cultures of *Vibrio* spp. strains. **Molecules**, v. 20, n. 8, p. 14402-14424, 2015.

SOLOMONS, T, W, G; FRYHLE, C. B. Química Orgânica. 10. ed. Rio de Janeiro: LTC, v. 1, p. 616, 2013.

SOUZA S. A. M. et al. Óleos Essenciais: Aspectos Econômicos e Sustentáveis. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 6, n. 10, p. 4, 2010.

SOUZA, F. V. et al. (-)-Carvone: Antispasmodic effect and mode of action. **Fitoterapia**. v. 85, p. 20-24, Mar., 2013.

SPIEGEL, M. Alpha-Bisabolol–Naturalness vs. Sustainability? **SÖFW-Journal**, v. 138, n. 1-2, 2012.

SU, S. S. et al. Cloning and characterization of a farnesyl pyrophosphate synthase from *Matricaria recutita* L. and its upregulation by methyl jasmonate. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 1, p. 349-361, 2015.

TEIXEIRA, B. et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**. v. 43, p. 587-95, May., 2013.

TEIXEIRA, M. L. et al. *Citrumelo Swingle*: Caracterização Química, Atividade Antioxidante e Antifúngica dos Óleos Essenciais das Cascas Frescas e Secas. **Magistra**, Cruz das Almas-Bahia, v. 24, n. 3, p. 194-203, jul./set. 2012.

TEIXEIRA, M. L. et al. Essential Oils from *Lippia origanoides* Kunth. and *Mentha spicata* L.: Chemical Composition, Insecticidal and Antioxidant Activities. **American Journal of Plant Sciences**. v. 5, n. 9, p. 1181, Apr., 2014.

TEIXEIRA, M. L. **Óleos essenciais de *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) e *Lippia origanoides* Kunth.**: composição química, atividade antioxidante e potencial farmacológico. 2016. 191 p. Tese (Doutorado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

TENORE, G. C. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of the essential oil of *Salvia lanigera* from Cyprus. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 1, p. 238-243, 2011.

TICIANELLI, E. A.; GONZALEZ, E. R. **Eletroquímica**: Princípios e Aplicações. 2. ed. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 2005. - (Textos Acadêmicos, 17)

TOMASI, J.; MENNUCCI, B.; CAMMI, R. Quantum mechanical continuum solvation models. **Chemical reviews**. v. 105, n. 8, p. 2999-3094, Aug., 2005.

TONELLO, N, et al. Square wave voltammetry with multivariate calibration tools for determination of eugenol, carvacrol and thymol in honey. **Talanta**. v. 158, p. 306-314, Set., 2016.

TREVISAN, M. T. et al. Composition of Essential Oils and Ethanol Extracts of the Leaves of *Lippia* Species: Identification, Quantitation and Antioxidant Capacity. **Records of Natural Products**, v. 10, n. 4, p. 485-496, 2016.

UCHIDA, Y.; KÄTELHÖN, E.; COMPTON, R. G. Cyclic voltammetry with non-triangular waveforms: Electrochemically reversible systems. **Journal of Electroanalytical Chemistry**. v. 801, p. 381-387, Sep., 2017.

VAN DEN DOOL, H.; KRATZ, P. D. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal Chromatography Amsterdam**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VEGA-HERNÁNDEZ K. de La. et al. Discerning the antioxidant mechanism of rapanone: A naturally occurring benzoquinone with iron complexing and radical scavenging activities. **Journal of Inorganic Biochemistry**. v. 170, p. 134-147, May., 2017.

WOMENI, H. M. et al. Oxidative stabilization of RBD palm olein under forced storage conditions by old Cameroonian green tea leaves methanolic extract. **NFS Journal**, v. 3, p. 33-40, 2016.

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

YILDIZ, G. et al. Electrochemical oxidation mechanism of eugenol on graphene modified carbon paste electrode and its analytical application to pharmaceutical analysis. **Talanta**, [S.I.], v. 173, p. 1-8, May., 2017.

YIN, H.; XU, L.; PORTER, N. A. Free radical lipid peroxidation: mechanisms and analysis. **Chemical reviews**, v. 111, n. 10, p. 5944-5972, 2011.

YOO, C. B. et al. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. **Cancer letters**, v. 225, n. 1, p. 41-52, 2005.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Tabelas de análises de variância dos ensaios colorimétricos

Tabela 1A - Análise de variância: Teste de estabilização de radicais DPPH

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr > FC
Amostra	8	157367.125131	19670,890641	23780,896	0,000
Concentração	6	11332.024704	1888,670784	2283,287	0,000
Amostra*Concentração	48	16821.896639	350,456180	423,680	0,000
Erro	126	104.223667	0,827172		
Total corrigido	188	185625.270141			
CV (%) =	3,83				
Média geral:	23.7470370	Número de observações:	189		

Obs. Codificações usadas para as FV do quadro de ANAVA

1: Amostra

2: Concentração

3: Amostra*Concentração

4: Fim

Fonte: Do autor (2018)

Tabela 2A - Análise de variância: Teste de proteção lipídica sistema β -caroteno/ácido linoleico

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr > FC
Amostra	8	266879.039292	33359.879912	1529.283	0,000
Concentração	6	17860.516921	2976.752820	136.460	0,000
Amostra*Concentração	48	17667.869939	368.080624	16.874	0,000
Erro	189	4122.859447	21.814071		
Total corrigido	251				
CV (%) =	13,29				
Média geral:	35.1399206	Número de observações:	252		

Obs. Codificações usadas para as FV do quadro de ANAVA

1: Amostra

2: Concentração

3: Amostra*Concentração

4: Fim

Fonte: Do autor (2018)

Tabela 3A - Análise de variância: Teste de captura de radicais hidroxila

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr > FC
Amostra	8	11618.288236	1452.286029	738.113	0,000
Concentração	6	4748.938040	791.489673	402.268	0,000
Amostra*Concentração	48	6097.977979	127.041208	64.568	0,000
Erro	126	247.913467	1.967567		
Total corrigido	251				
CV (%) =	17,35				
Média geral:	8.0848677		Número de observações:	189	

Obs. Codificações usadas para as FV do quadro de ANAVA

1: Amostra

2: Concentração

3: Amostra*Concentração

4: Fim

Fonte: Do autor (2018)

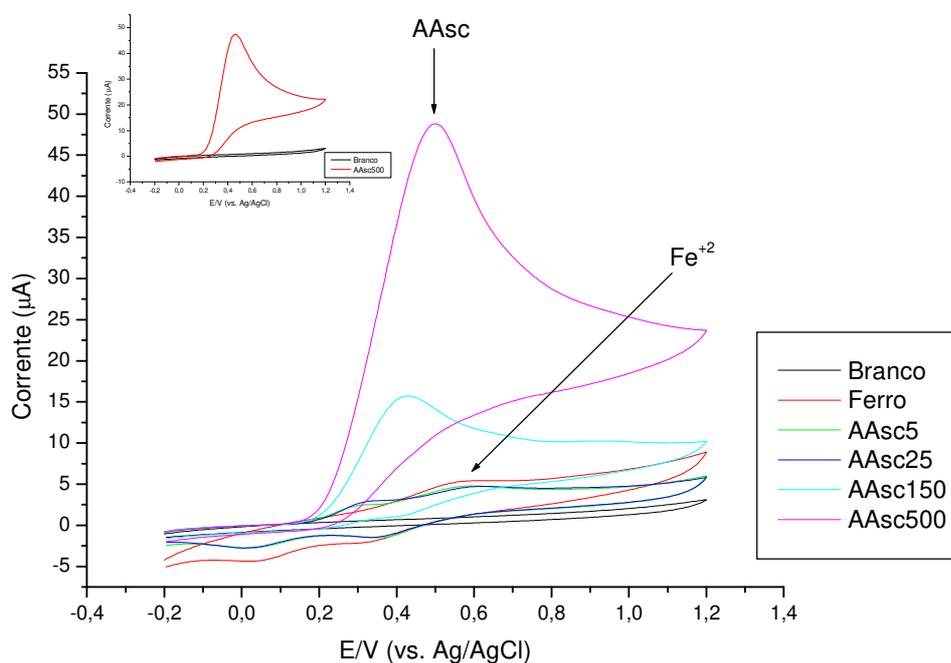
Tabela 4A - Análise de variância: Teste Poder Redutor

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr > FC
Amostra	8	0.000018	0.000002	245.610	0,000
Erro	18	1.6164E-0007	8.9801E-0009		
Total corrigido	26	0.000018			
CV (%) =	12.77				
Média geral:	0.0007419		Número de observações:	27	

Fonte: Do autor (2018)

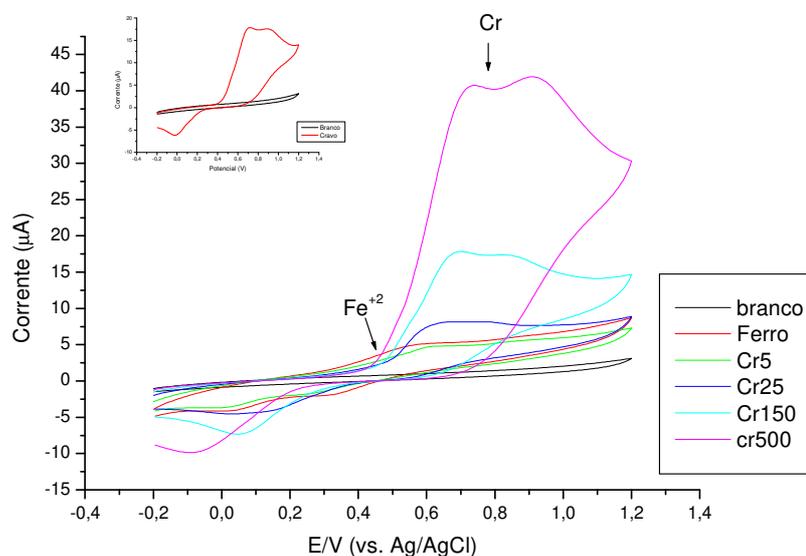
APÊNDICE B – Voltamogramas cíclicos: Avaliação do efeito quelante dos óleos essenciais e padrões sintéticos.

Figura 1 B- Voltamograma cíclico: Efeito quelante do ácido ascórbico sobre íons ferro (II).



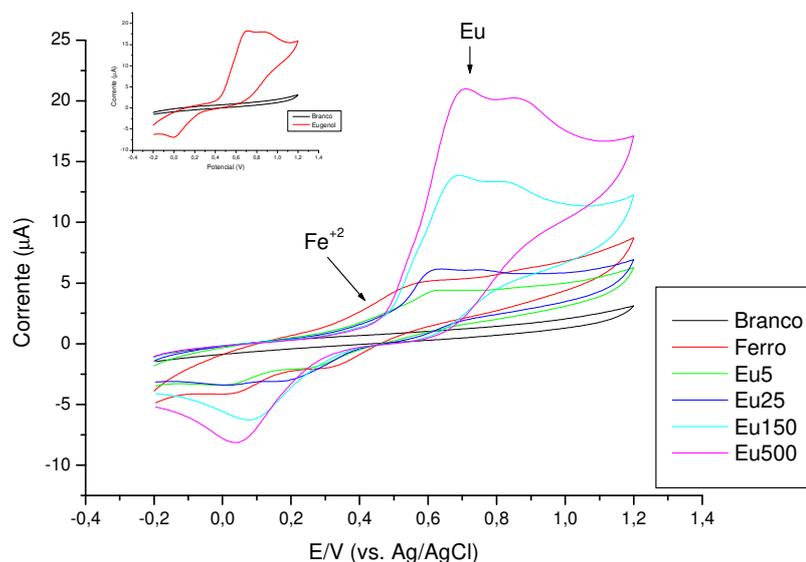
Efeito quelante obtido para ácido ascórbico nas concentrações de 5, 25, 150 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, na superfície de eletrodo de carbono vítreo com NaSO_4 0,05 mol L^{-1} como eletrólito de suporte e FeSO_4 5×10^{-4} mol L^{-1} como fonte de íons ferro (II) a Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Fonte: Do Autor (2018)

Figura 2 B - Voltamograma cíclico: Efeito quelante do óleo essencial de cravo-da-índia sobre íons ferro (II).



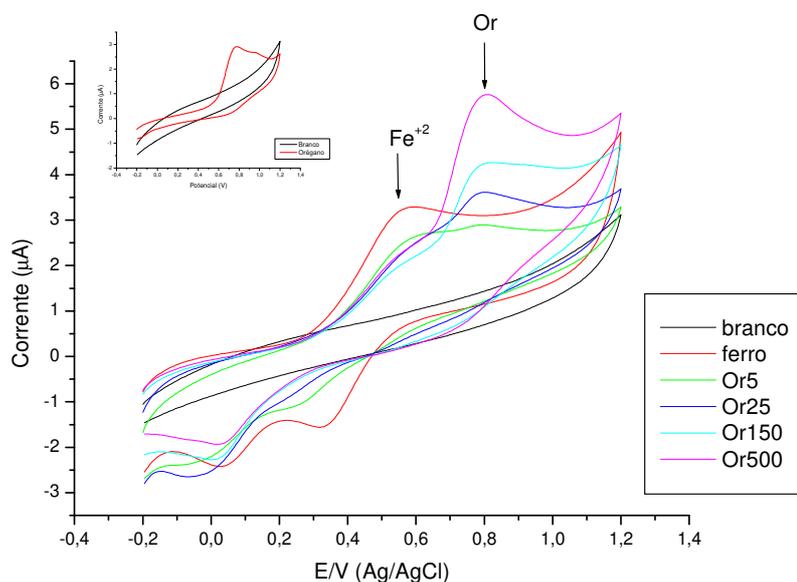
Efeito quelante obtido para óleo essencial de cravo-da-índia nas concentrações de 5, 25, 150 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em eletrodo de carbono vítreo com NaSO_4 0,05 mol L^{-1} como eletrólito de suporte e FeSO_4 5×10^{-4} mol L^{-1} como fonte de íons ferro (II) a Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Fonte: Do autor (2018)

Figura 3 B - Voltamograma cíclico: Efeito quelante do eugenol sobre íons ferro (II).



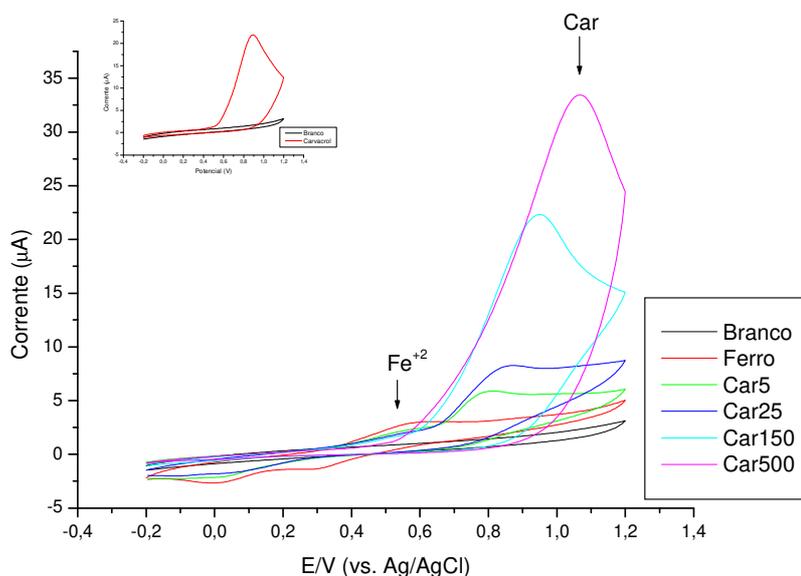
Efeito quelante obtido para eugenol nas concentrações de 5, 25, 150 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em eletrodo de carbono vítreo com NaSO_4 0,05 mol L^{-1} como eletrólito de suporte e FeSO_4 5×10^{-4} mol L^{-1} como fonte de íons ferro (II) a Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Fonte: Do Autor (2018).

Figura 4 B - Voltamograma cíclico: Efeito quelante do óleo essencial de orégano sobre íons ferro (II).



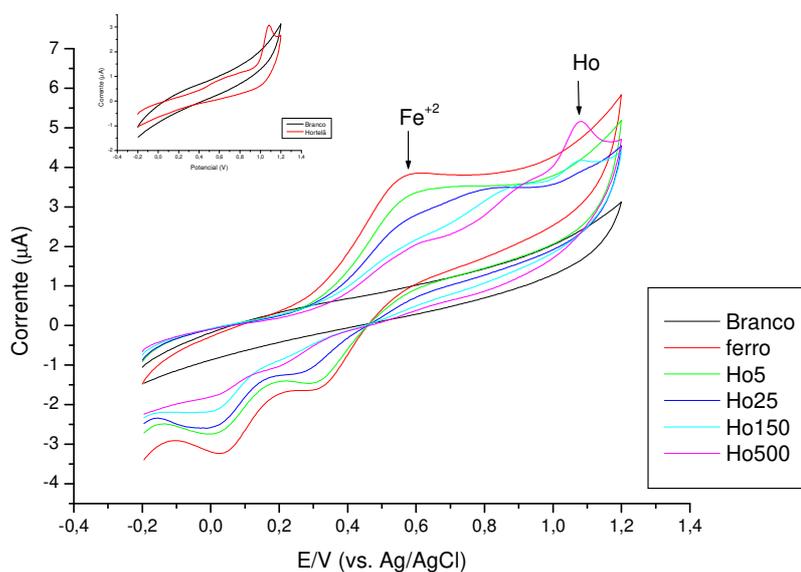
Efeito quelante obtido para óleo essencial de orégano nas concentrações de 5, 25, 150 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em eletrodo de carbono vítreo com NaSO_4 0,05 mol L^{-1} como eletrólito de suporte e FeSO_4 5×10^{-4} mol L^{-1} como fonte de íons ferro (II) a Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Fonte: Do Autor (2018).

Figura 5 B - Voltamograma cíclico: Efeito quelante do carvacrol sobre íons ferro (II).



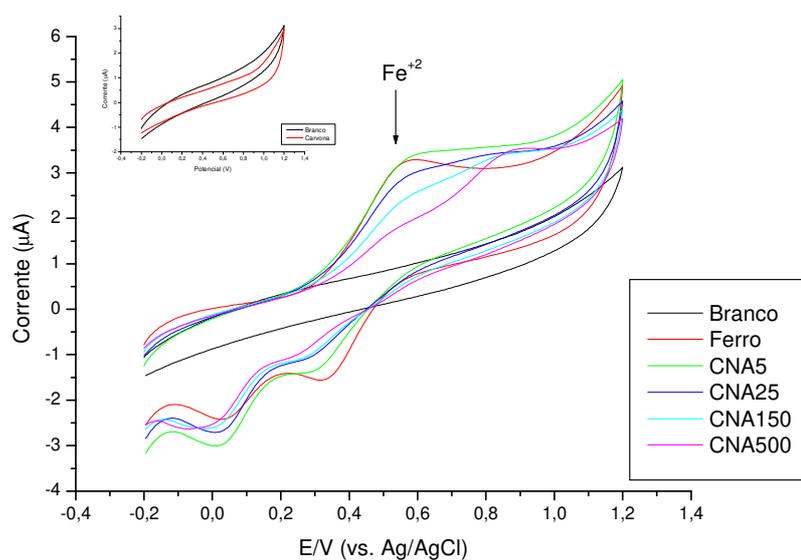
Efeito quelante obtido para carvacrol nas concentrações de 5, 25, 150 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em eletrodo de carbono vítreo com NaSO_4 0,05 mol L^{-1} como eletrólito de suporte e FeSO_4 5×10^{-4} mol L^{-1} como fonte de íons ferro (II) a Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Fonte: Do Autor (2018).

Figura 6 B - Voltamograma cíclico: Efeito quelante do óleo essencial de hortelã sobre íons ferro (II).



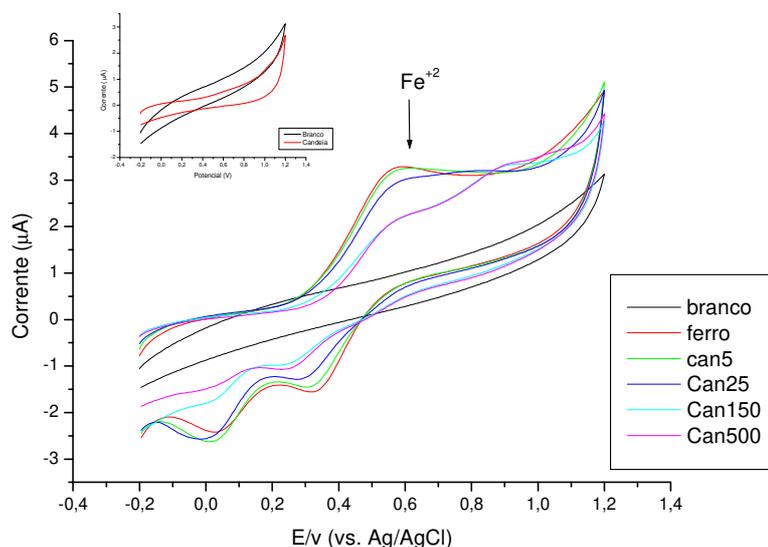
Efeito quelante obtido para óleo essencial de hortelã nas concentrações de 5, 25, 150 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em eletrodo de carbono vítreo com NaSO_4 0,05 mol L^{-1} como eletrólito de suporte e FeSO_4 5×10^{-4} mol L^{-1} como fonte de íons ferro (II) a Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Fonte: Do Autor (2018).

Figura 7 B - Voltamograma cíclico: Efeito quelante do carvona sobre íons ferro (II).



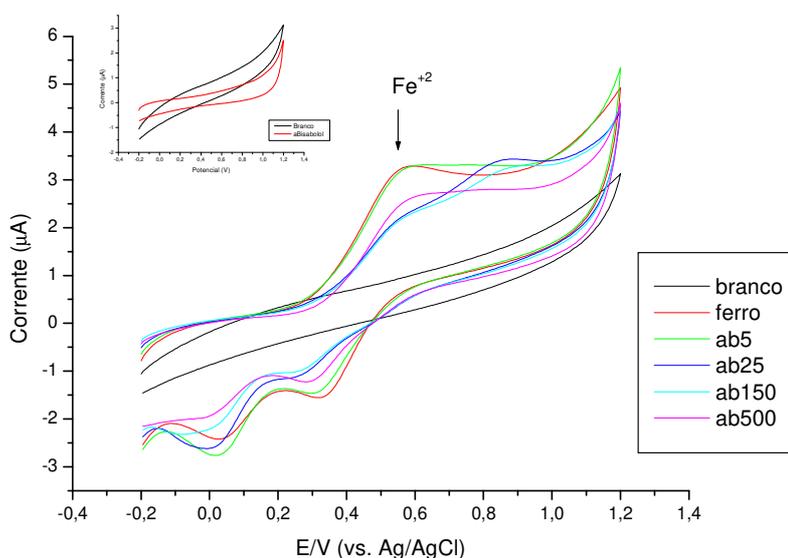
Efeito quelante obtido para carvona nas concentrações de 5, 25, 150 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em eletrodo de carbono vítreo com NaSO_4 0,05 mol L^{-1} como eletrólito de suporte e FeSO_4 5×10^{-4} mol L^{-1} como fonte de íons ferro (II) a Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Fonte: Do Autor (2018).

Figura 8 B - Voltamograma cíclico: Efeito quelante do óleo essencial de candeia sobre íons ferro (II).



Efeito quelante obtido para óleo essencial de candeia nas concentrações de 5, 25, 150 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em eletrodo de carbono vítreo com NaSO_4 0,05 mol L^{-1} como eletrólito de suporte e FeSO_4 5×10^{-4} mol L^{-1} como fonte de íons ferro (II) a Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Fonte: Do Autor (2018).

Figura 9 B - Voltamograma cíclico: Efeito quelante do α -bisabolol sobre íons ferro (II).



Efeito quelante obtido para α -bisabolol nas concentrações de 5, 25, 150 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, em eletrodo de carbono vítreo com NaSO_4 0,05 mol L^{-1} como eletrólito de suporte e FeSO_4 5×10^{-4} mol L^{-1} como fonte de íons ferro (II) a Velocidade de varredura de 50 mV s^{-1} . Fonte: Do Autor (2018).