



**MARIA LUISA TEIXEIRA**

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cantinoa carpinifolia*  
(Benth.) e *Lippia origanoides* Kunth.:  
COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE E POTENCIAL  
FARMACOLÓGICO**

**LAVRAS-MG  
2016**

**MARIA LUISA TEIXEIRA**

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) e *Lippia  
origanoides* Kunth.: COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE E POTENCIAL FARMACOLÓGICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Produtos Naturais, para a obtenção do título de Doutor.

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso  
Orientadora

Profa. Dra. Silvana Marcussi  
Coorientadora

**LAVRAS-MG  
2016**

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

Teixeira, Maria Luisa .

Óleos essenciais de *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) e *Lippia  
origanoides* Kunth. : composição química, atividade antioxidante e  
potencial farmacológico / Maria Luisa Teixeira. – Lavras : UFLA,  
2016.

191 p. : il.

Tese(doutorado)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Óleos voláteis. 2. Fatores edafoclimáticos. 3. Potencial  
antioxidante. 4. Peçonhas de serpentes. 5. Inibidores enzimáticos. I.  
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

**MARIA LUISA TEIXEIRA**

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) e *Lippia  
origanoides* Kunth.: COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE  
ANTIOXIDANTE E POTENCIAL FARMACOLÓGICO**

**ESSENTIAL OILS of *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) and *Lippia organoides*  
Kunth.: CHEMICAL COMPOSITION, ANTIOXIDANT ACTIVITY AND  
PHARMACOLOGICAL POTENTIAL**

Tese apresentada à Universidade Federal  
de Lavras, como parte das exigências do  
Programa de Pós-Graduação em  
Agroquímica, área de concentração em  
Produtos Naturais, para a obtenção do  
título de Doutor.

APROVADA em 26 de agosto de 2016.

Dr. Eduardo Alves	UFLA
Dra. Fabiana da Silva Felix	UFLA
Dr. Luiz Gustavo de Lima Guimarães	UFSJ
Dr. Sérgio Scherrer Thomasi	UFLA

Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso  
Orientadora

Profa. Dra. Silvana Marcussi  
Coorientadora

**LAVRAS-MG  
2016**

*A Deus, por me dar coragem e determinação para traçar mais este caminho em busca de meus ideais.*  
*Aos meus filhos, Pedro e Maria Clara, por me ensinarem o que é amar outro ser mais que a si mesmo; tenham certeza de que vocês são a melhor dádiva que Deus possa ter me dado.*

*Ao meu amor, meu companheiro, meu amparo, Kaneo, pelo incentivo e confiança. Ainda serei um motivo de muito orgulho para você.*

*À minha mãe, Ângela, que me apoiou na concretização deste nosso sonho e ao meu pai, Edison, que, apesar da saudade e distância (mas sempre em meu coração), me iluminou em mais esta vitória.*

*Aos meus irmãos e sobrinhos, que foram também fundamentais em mais esta etapa vencida.*

**DEDICO**

## AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Lavras, em especial ao Departamento de Química, pela oportunidade concedida.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro e pela bolsa de estudo.

À professora Maria das Graças Cardoso, pela oportunidade e orientação. Você foi e sempre será minha mãe científica, pois com você aprendi muito mais do que um simples roteiro de conteúdos, aprendi lições que levarei para minha vida inteira. Muito obrigada pela sua compreensão, carinho e amizade... sentirei muito sua falta!!! Como sempre lhe digo, minha dívida com você é impagável...

À professora Silvana Marcussi, pela coorientação, atenção, amizade e pela luz que me iluminou... Você foi fundamental na concretização deste trabalho, pois acreditou em mim e não me deixou desistir. Pois, como você mesma disse... “Só não há solução para a morte, e graças a DEUS estamos vivas e com saúde para enfrentar os obstáculos e crescer com o aprendizado que eles nos proporcionam”. Além disso, lhe agradeço pela disponibilização do laboratório e dos materiais.

Aos amigos do Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais, Karen, Juliana Andrade, Luana, Rafaela Brandão, Rafaela Vieira, Danúbia, Anni, Thaís e Vanúzia, pela grande ajuda na condução dos experimentos e, acima de tudo, pela convivência harmoniosa.

Aos amigos do Laboratório de Análise de Qualidade de Aguardente, Wilder, Leonardo, Richard, Gustavo, Allan, Alex, Bruno, Gabriel, Francielly e Cleuza, pela amizade e companheirismo.

Aos colegas Cíntia (*in memoriam*) e Gustavo, pela grandiosa ajuda na coleta do material de trabalho em todos os momentos de que precisei.

Aos colegas do Laboratório de Bioquímica, Carlos e Pedro Henrique, que muito me auxiliaram na execução dos experimentos, em especial à técnica laboratorial Maria Aparecida (Xulita).

Ao Prof. Matheus Puggina de Freitas, do Departamento de Química, pela colaboração na representação dos complexos formados.

À Profa. Mariana Esteves Mansanares, do Departamento de Biologia, pela grande ajuda na identificação botânica das espécies vegetais.

Aos professores Eduardo Alves, Fabiana da Silva Felix, Luiz Gustavo de Lima Guimarães e Sérgio Scherrer Thomasi, pela disponibilidade para participarem como membros da banca avaliadora.

Aos professores de Departamento de Química de forma geral, que foram fundamentais para o meu desenvolvimento intelectual.

Às funcionárias do Departamento de Química, Ana Cristina, Carol, Priscila e Lidiany e da Pós-graduação em Agroquímica, Shirley e Roseni, pela atenção e ajuda em todos os momentos.

A Deus, por me dar energia, saúde, perseverança e força para a realização deste projeto, que há muito tempo era um sonho.

À minha família, pelo incentivo, amor e confiança.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

## RESUMO GERAL

Objetivou-se neste trabalho avaliar a influência do ano de coleta (2014 e 2015) sobre o teor e a constituição química do óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia*, além do seu potencial farmacológico e do óleo de *Lippia origanoides* por meio de ensaios de hemólise, efeitos sobre a atividade de fosfolipases A<sub>2</sub> e serinoproteases de peçonhas de serpentes e sobre processos de coagulação e dissolução de trombos sanguíneos. Objetivou-se também investigar o potencial antioxidante dos óleos essenciais por diversas metodologias. Os óleos essenciais foram obtidos pela técnica de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger modificado e os constituintes identificados e quantificados por CG/EM e CG-DIC. As atividades fosfolipásica e hemolítica foram realizadas por difusão em ágar utilizando gema de ovo (fosfolipídios) e eritrócitos sanguíneos humanos, respectivamente. Para a atividade de serinoproteases, foi utilizado o substrato cromogênico BAPNA. A coagulação induzida pelas peçonhas foi verificada utilizando plasma humano citratado e a atividade trombolítica foi quantificada pelo volume de líquido liberado pelos trombos. A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos de estabilização dos radicais ABTS, DPPH e hidroxil, complexação do fosfomolibdênio, poder redutor, oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico e espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Os rendimentos do óleo essencial de *C. carpinifolia* foram de 0,48% e 0,31% em 2014 e 2015, respectivamente. Os constituintes majoritários do óleo essencial foram α-tujona (32,15 e 29,21%), β-tujona (22,22 e 35,88%), β-cariofileno (8,74 e 5,28%) e sabineno (6,65 e 5,61%), em 2014 e 2015, respectivamente. No óleo de *L. origanoides*, foram carvacrol (41,51%), *p*-cimeno (18,59%), γ-terpineno (17,03%) e timol (4,86%). O potencial antioxidante dos óleos essenciais variou com a metodologia, sendo o BHT, o ácido ascórbico e o óleo de *L. origanoides* mais eficientes. Para o método hidroxil, os óleos foram mais eficazes que o manitol. Em relação à caracterização farmacológica dos óleos essenciais, foi possível observar que apresentaram ação inibitória sobre a atividade de fosfolipases A<sub>2</sub>, induzida pelas peçonhas de *Bothrops atrox*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* e não mostraram-se citotóxicos sobre eritrócitos sanguíneos humanos, sendo o óleo essencial de *C. carpinifolia* em todos volumes testados e o de *L. origanoides*, nos volumes 0,6 e 1,2 μL. No entanto, incubações prévias dos óleos com peçonhas de *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.t.*), ocasionaram potencialização na atividade hemolítica. Pelos resultados obtidos para os testes de coagulação, infere-se que os constituintes dos óleos essenciais interagiram com componentes plasmáticos, visto que a incubação prévia do plasma com os óleos reduziu significativamente o tempo de coagulação. Os volumes 0,6 e 1,2 μL de óleo essencial, pré-incubados com peçonha de *B. jararacussu*, potencializaram a ação de proteases e fosfolipases A<sub>2</sub>, resultando em maior dissolução dos trombos. Porém, quando o



óleo essencial de *L. origanoides* foi pré-incubado com a peçonha de *C.d.t.*, os seus volumes induziram efeito trombótico. Os óleos essenciais proporcionaram aumento na degradação do substrato BAPNA induzida pelas peçonhas de *B. jararaca* e de *L. muta*. Os resultados aprimoram a caracterização farmacológica desses óleos essenciais, ressaltando o potencial de utilização em indústrias fármaco-cosméticas.

**Palavras-chave:** Óleos voláteis. Fatores edafoclimáticos. Potencial antioxidante. Peçonhas de serpentes. Inibidores enzimáticos.

## GENERAL ABSTRACT

The aim of this study was to evaluate the influence of the year of collection (2014 and 2015) on the chemical compositions and the pharmacological potentials of the essential oils from *Cantinoa carpinifolia*. and *Lippia organoides* through hemolysis assays, their effects on the activities of phospholipase A<sub>2</sub> and serine proteases from snake venoms and on coagulation and dissolution of blood clots. The objective was also to investigate the antioxidant potential of the essential oils using different methods. The essential oils were obtained by hydrodistillation using a modified Clevenger apparatus, and the constituents were identified and quantified by GC-MS and GC-FID. The phospholipase and hemolytic activities were determined by agar diffusion using egg yolk (phospholipids) and human blood erythrocytes, respectively. BAPNA was used to determine the serine protease activity. Coagulation induced by venoms was verified using human citrated plasma, and the thrombolytic activity was measured by the volume of liquid released by thrombi. The antioxidant activity was evaluated by the methods involving stabilization of the ABTS, DPPH and hydroxyl radicals, complexation by fosfomolibdênio, reducing power, oxidation of the  $\beta$ -carotene/linoleic acid system and species that react with thiobarbituric acid (TBARS). The essential oil yields from *C. carpinifolia* were 0.48% and 0.31% in 2014 and 2015, respectively. The major constituents of the essential oil were  $\alpha$ -thujone (32.15 and 29.21%),  $\beta$ -thujone (22.22 and 35.88%),  $\beta$ -caryophyllene (8.74 and 5.28%) and sabinene (6.65 and 5.61%) in 2014 and 2015, respectively. Carvacrol (41.51%), *p*-cymene (18.59%),  $\gamma$ -terpinene (17.03%) and thymol (4.86%) were found in the *L. organoides* oil. The antioxidant activity of the essential oils varied with the method employed, and BHT, ascorbic acid and the oil from *L. organoides* were the most efficient. In the hydroxyl method, the oils were more effective than mannitol. Regarding the pharmacological characterization of the essential oils, an inhibitory action against phospholipase A<sub>2</sub> induced by the venoms of *Bothrops atrox*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* and *B. moojen* was observed. No cytotoxicity against human blood erythrocytes was observed with all the volumes of the oil from *C. carpinifolia* tested. No cytotoxicity was observed with 0.6 and 1.2  $\mu$ L of the essential oil from *L. organoides*. However, prior incubations of the oils with venoms of *B. jararacussu*, *B. moojeni* and *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.t.*), caused potentiation of the hemolytic activity. From the results obtained in the coagulation tests, it is inferred that the constituents of the essential oils interacted with serum components, whereas preincubation of the plasma with the oil significantly reduced the clotting time. Volumes of 0.6 and 1.2  $\mu$ L of essential oil, pre-incubated with *B. jararacussu* venom, potentiated the action of proteases and phospholipase A<sub>2</sub>, resulting in greater dissolution of thrombi. But when the essential oil from *L. organoides* was pre-incubated with the venom of

*C.d.t.*, a thrombotic effect was induced. Essential oils provided an increase in the degradation of BAPNA induced by venoms of *B. jararaca* and *Lachesis muta*. The results improved the pharmacological characterization of these essential oils, underscoring their potential for use in drug-cosmetic industries.

**Keywords:** Volatile oils. Edaphoclimatic factors. Antioxidant potential. Snake venoms. Enzyme inhibitors.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Principais rotas de biossíntese dos metabólitos secundários	25
Figura 2	Biossíntese de terpenos via mevalonato.....	30
Figura 3	Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP), pela via da 1-deoxi-D-xilulose-5 fosfato.....	33
Figura 4	Biossíntese de fenilpropanoides.....	36
Figura 5	Aspecto geral da espécie <i>Cantinoa carpinifolia</i> (Benth.) Harley & J.F.B.Pastore.....	43
Figura 6	Aspecto geral da espécie <i>Lippia origanoides</i> Kunth.....	45
Figura 7	Estabilização do radical ABTS• <sup>+</sup> por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.....	49
Figura 8	Formas radicalar (1) e não-radicalar (2) do DPPH.....	50
Figura 9	Formação do radical hidroxil e posterior ataque à 2-desoxirribose e formação do cromóforo róseo a partir do malonaldeído.....	51
Figura 10	Reação hipotética de redução do molibdênio na presença do antioxidante ácido ascórbico (vitamina C).....	52
Figura 11	Reação hipotética de redução do ferro na presença do antioxidante ácido ascórbico (vitamina C).....	53
Figura 12	Formação do radical hidroxil, posterior ataque ao triglicerídeo da gema do ovo (triglicerídeo poliinsaturado) e formação do cromóforo róseo a partir do malonaldeído...	54
Figura 13	Esquema geral do processo de peroxidação lipídica.....	55
Quadro 1	Efeitos das peçonhas ofídicas de acordo com suas	

	atividades fisiopatológicas.....	65
Figura 14	Ação da fosfolipase A <sub>2</sub> sobre fosfolipídio de membrana.....	66

## SEGUNDA PARTE

### ARTIGO 1

Figura 1	Chemical structures of the major compounds present in the essential oil from <i>Cantinoa carpinifolia</i> (a) $\alpha$ -Thujone, (b) $\beta$ -Thujone, (c) $\beta$ -Caryophyllene and (d) Sabinene.....	89
----------	---	----

### ARTIGO 2

Figura 1	Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no óleo essencial de <i>Cantinoa carpinifolia</i> (Benth.) (a) $\alpha$ -tujona, (b) $\beta$ -tujona, (c) $\beta$ -cariofileno e (d) sabineno e, no óleo essencial de <i>Lippia origanoides</i> Kunth., (e) carvacrol, (f) <i>p</i> -cimeno, (g) $\gamma$ -terpineno e (h) timol.....	109
Figura 2	Valores de porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais/controle positivo pelo método de estabilização do radical ABTS.....	111
Figura 3	Provável mecanismo que explica a atividade antioxidante de compostos com características fenólicas (carvacrol) pelo método de estabilização do radical ABTS.....	112
Figura 4	Valores de porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais/controle positivo pelo método de estabilização do radical DPPH.....	114
Figura 5	Provável mecanismo que explica a atividade antioxidante de compostos com características fenólicas (carvacrol) pelo método de estabilização do radical DPPH.....	114
Figura 6	Valores de porcentagem de atividade antioxidante dos	

	óleos essenciais/controle positivo pelo método de estabilização do radical hidroxil.....	116
Figura 7	Provável mecanismo que explica a atividade antioxidante de compostos com características fenólicas (carvacrol) pelo método de estabilização do radical hidroxil.....	117
Figura 8	Valores de absorvância para os óleos essenciais/controle positivo pelo método de complexação do fosfomolibdênio.	119
Figura 9	Provável mecanismo de redução do complexo fosfato/molibdênio na presença do composto com característica fenólica (carvacrol).....	120
Figura 10	Valores de absorvância para os óleos essenciais/controle positivo pelo método do poder redutor.....	121
Figura 11	Provável reação de redução do ferro na presença do ácido ascórbico (vitamina C).....	121
Figura 12	Valores de porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais/controle positivo pelo ensaio de oxidação do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.....	123
Figura 13	Provável mecanismo que explica a atividade antioxidante de compostos com características fenólicas (carvacrol) pela inibição de peroxidação lipídica pelo sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.....	124
Figura 14	Valores de porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais/controle positivo pelo método de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	126
Figura 15	Provável mecanismo que explica a atividade antioxidante de compostos com características fenólicas (carvacrol) pela inibição de peroxidação lipídica pelo método de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	126

### **ARTIGO 3**

- Figura 1 Efeito do óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* sobre a atividade fosfolipásica induzida pelas peçonhas de *Bothrops atrox*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*... 146
- Figura 2 Efeito do óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* sobre a atividade hemolítica induzida pelas peçonhas de *Bothrops jararacussu*, *B. moojeni* e *Crotalus durissus terrificus*..... 147

### **ARTIGO 4**

- Figura 1 Efeito do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre a atividade fosfolipásica induzida pelas peçonhas de *Bothrops atrox*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*... 174
- Figura 2 Efeito do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre a atividade hemolítica induzida pelas peçonhas de *Bothrops jararacussu*, *B. moojeni* e *Crotalus durissus terrificus*..... 176

## LISTA DE TABELAS

### SEGUNDA PARTE

#### ARTIGO 1

Table 1	Yields of the essential oils from <i>Cantinoa carpinifolia</i> (Benth.) Harley & J.F.B.Pastore as a function of the year of collection.....	87
Table 2	Chemical composition of the essential oil of <i>Cantinoa carpinifolia</i> (Benth.) Harley & J.F.B.Pastore leaves as a function of the year of collection.....	88

#### ARTIGO 2

Tabela 1	Percentual de constituintes químicos agrupados dos óleos essenciais das folhas de <i>Cantinoa carpinifolia</i> e <i>Lippia organoides</i> .....	110
Tabela 2	Valores de CI <sub>50</sub> para a porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais de <i>Cantinoa carpinifolia</i> e <i>Lippia organoides</i> e dos controles positivos BHT/Manitol..	118
Tabela 3	Valores de CI <sub>50</sub> para a porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais de <i>Cantinoa carpinifolia</i> e <i>Lippia organoides</i> e do controle positivo BHT.....	128

#### ARTIGO 3

Tabela 1	Porcentagem de atividade trombolítica avaliada em incubados contendo apenas óleo essencial de <i>Cantinoa carpinifolia</i> , peçonhas de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Crotalus durissus terrificus</i> , ou misturas previamente incubadas contendo óleo essencial e peçonha.....	149
Tabela 2	Efeito do óleo essencial de <i>Cantinoa carpinifolia</i> sobre a	



	coagulação de plasma citratado humano induzida por diferentes peçonhas de serpentes.....	151
Tabela 3	Efeito do óleo essencial de <i>Cantinoa carpinifolia</i> sobre a atividade enzimática de serinoproteases induzida por diferentes peçonhas de serpentes.....	153
<b>ARTIGO 4</b>		
Tabela 1	Porcentagem de atividade trombolítica avaliada para o óleo essencial de <i>Lippia organoides</i> , peçonhas de <i>Bothrops jararacussu</i> e <i>Crotalus durissus terrificus</i> , ou misturas previamente incubadas contendo óleo essencial e peçonha.....	177
Tabela 2	Efeito do óleo essencial de <i>Lippia organoides</i> sobre a coagulação de plasma citratado humano induzida por diferentes peçonhas de serpentes.....	179
Tabela 3	Efeito do óleo essencial de <i>Lippia organoides</i> sobre a atividade enzimática de serinoproteases induzida por diferentes peçonhas de serpentes.....	181

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico ácido)
ATP	Adenosina trifosfato
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno
BLU	Base Livre de Umidade
CG-DIC	Cromatografia Gasosa – Detector por Ionização de Chamas
CG/EM	Cromatografia Gasosa/ Espectrometria de Massas
CI <sub>50</sub>	Concentração que apresenta 50% de atividade antioxidante
COEP	Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Lavras
COMTRADE	Commodity Trad Database
DIC	Detector por Ionização de Chamas
DIC	Delineamento Inteiramente Casualizado
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DWB	Dry Weight Basis
DXPS	1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato
FAL	Fenilalanina amoniliase
FID	Flame Ionization Detector
FPP	Farnesil difosfato
GC-MS	Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry
GPP	Geranil difosfato
GGPP	Geranilgeranil difosfato
IPP	Isopentenil difosfato
IR	Índice de retenção
ISO	International Standard Organization
MEP	2C-metil-D-eritritol-4-fosfato
NADPH	Forma reduzida da Nicotinamida Adenina Dinucleótido Fosfato
OMS	Organização Mundial de Saúde
PEP	Fosfoenolpiruvato
PBS	Phosphate Buffered Saline
PG	Galato de propila
PLA <sub>2s</sub>	Fosfolipases A <sub>2</sub>
SDS	Sodium dodecyl sulphate
TBHQ	Tert-butil-hidroquinona
UFLA	Universidade Federal de Lavras

## LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Unidade de temperatura: Graus Celsius
%	Unidade: Porcentagem
L	Unidade de volume: Litro
mL	Unidade de volume: Mililitro
µL	Unidade de volume: Microlitro
g	Unidade de massa: Grama
m	Unidade de medida: Metro
mm	Unidade de medida: Milimetro
µm	Unidade de medida: Micrômetro
mL min <sup>-1</sup>	Unidade de vazão ou fluxo: Mililitros/minuto
mg mL <sup>-1</sup>	Unidade de concentração: Miligrama/mililitro
µg mL <sup>-1</sup>	Unidade de concentração: Micrograma/mililitro
°C min <sup>-1</sup>	Razão: Graus Celsius/minuto
cm	Unidade de medida: Centímetro
mg	Unidade de massa: Miligrama
nm	Unidade de medida: Nanômetro
min	Unidade de tempo: Minuto
h	Unidade de tempo: Hora
w/w	Razão: massa/massa

## SUMÁRIO

	<b>PRIMEIRA PARTE</b>	
1	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
2	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>23</b>
2.1	Produtos de origem vegetal.....	23
2.2	Metabólitos secundários.....	23
2.3	Óleos essenciais.....	25
2.3.1	Biossíntese dos constituintes dos óleos essenciais.....	28
2.4	Plantas em estudo.....	41
2.4.1	Plantas da família Lamiaceae.....	41
2.4.1.1	<i>Cantinoa carpinifolia</i> (Benth.) Harley & J.F.B.Pastore....	42
2.4.2	Plantas da família Verbenaceae.....	43
2.4.2.1	<i>Lippia origanoides</i> Kunth.....	44
2.5	Radicais livres e Antioxidantes.....	46
2.5.1	Ensaio antioxidantes.....	48
2.5.1.1	Estabilização do radical ABTS <sup>•</sup> [2,2'-azinobis (3- etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)].....	48
2.5.1.2	Estabilização do radical DPPH <sup>•</sup> (2,2-difenil-1- picrilhidrazila).....	49
2.5.1.3	Método de estabilização do radical hidroxil (OH <sup>•</sup> ).....	50
2.5.1.4	Método de complexação do fosfomolibdênio.....	51
2.5.1.5	Método do poder redutor.....	52
2.5.1.6	Método de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	53
2.5.1.7	Ensaio de oxidação do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico..	55
2.5.2	Atividade antioxidante dos óleos essenciais.....	56
2.6	Potencialidades biológicas dos óleos essenciais.....	59
2.6.1	Utilização das peçonhas como ferramentas laboratoriais...	63
2.6.2	Composição química de peçonhas ofídicas, atividades farmacológicas e tóxicas.....	64
2.6.2.1	Fosfolipases A <sub>2</sub> .....	66
2.6.2.2	Proteases (metaloprotease e serinoprotease).....	68
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>71</b>
	<b>SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....</b>	<b>82</b>
	<b>ARTIGO 1 - Chemical composition of the essential oil from <i>Cantinoa carpinifolia</i> (Benth.) Harley &amp; J.F.B.Pastore as a function of the year of collection.....</b>	<b>82</b>
	<b>ARTIGO 2 - Atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos óleos essenciais de <i>Cantinoa carpinifolia</i> (Benth.) e <i>Lippia</i></b>	

<i>origanoides</i> Kunth.....	96
ARTIGO 3 - Óleo essencial de <i>Cantinoa carpinifolia</i> (Lamiaceae): ação sobre proteases e fosfolipases A <sub>2</sub> .....	132
ARTIGO 4 - Estudo farmacológico do óleo essencial de <i>Lippia organoides</i> (Verbenaceae).....	160
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	188
APÊNDICE.....	189

## **PRIMEIRA PARTE**

### **1 INTRODUÇÃO**

As plantas medicinais e aromáticas têm sido empregadas na medicina popular por apresentarem atividades biológicas com efeitos terapêuticos. Os produtos obtidos dessas, como os óleos essenciais, estão sendo amplamente comercializados nas indústrias farmacêuticas, agrônômicas, de alimentos e cosméticas, para serem utilizados em diversos fins, substituindo ou associando-se aos compostos empregados habitualmente. A empregabilidade dessas substâncias é relativa ao seu aroma e às propriedades, como antimicrobiana, inseticida, alelopática, anti-inflamatória, antiparasitária, antioxidante e antiproliferativa e outras (SACCHETTI et al., 2005; BHALLA; GUPTA; JAITAK, 2013; TEIXEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014; AZEVEDO et al., 2014; ANDRADE et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015; FOE et al., 2016).

Sabe-se que nos dias atuais a incidência de doenças neurodegenerativas vem aumentando, sendo muitas dessas serem causadas pelo excesso de radicais livres. Além dos danos causados ao organismo humano, como o surgimento dessas doenças e de outras patologias, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares, catarata, envelhecimento, doenças inflamatórias, entre outras (MIGUEL, 2010), os radicais livres podem atuar sobre os ácidos graxos presentes em alimentos, induzindo o ranço, o desenvolvimento de odores e sabores desagradáveis, e com isso, perde-se o valor nutricional e comercial do alimento.

Visando a reduzir a ação desses radicais, as indústrias de alimentos têm recorrido à utilização dos antioxidantes sintéticos, como o butil-hidroxi-anisol (BHA), 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT), entre outros. No entanto, estudos toxicológicos têm demonstrado que eles possuem potencial

carcinogênico (BOTTERWECK et al., 2000). Dessa forma, pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de encontrar produtos naturais, a partir da medicina popular, com atividade antioxidante, os quais possibilitarão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, com o propósito de diminuir o uso de compostos sintéticos nos alimentos.

A medicina popular também é de grande importância no tratamento de acidentes provocados por serpentes peçonhentas, principalmente em países emergentes. Muitas espécies vegetais são usadas com esse propósito por comunidades que não dispõem de acesso imediato à soroterapia tradicional (CARVALHO et al., 2013).

A busca por inibidores naturais de peçonhas de serpentes é fundamental para complementar a terapia tradicional, principalmente no que diz respeito à neutralização dos efeitos locais. Os produtos naturais são uma fonte abundante de inibidores enzimáticos e de compostos farmacologicamente ativos, sendo capazes de interromper a atividade de algumas peçonhas e de toxinas isoladas (GUIMARÃES et al., 2014).

Em decorrência do aumento da importância dos óleos essenciais no mercado mundial e das suas atividades, biológica e farmacológica, da ampla variedade da flora brasileira e ainda quase inexplorada, são imprescindíveis mais estudos que viabilizem a aplicação dessas substâncias naturais.

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho avaliar a influência do ano de coleta sobre o teor e a constituição química do óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* (Benth.), além de avaliar o seu potencial farmacológico e do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth., por meio de ensaios de indução e/ou inibição de hemólise e de avaliação de seus efeitos sobre a atividade de fosfolipases A<sub>2</sub> e serinoproteases de peçonhas de serpentes, bem como sobre os processos de coagulação e dissolução de trombos sanguíneos induzidos por diferentes peçonhas de serpentes. Além disso, investigou-se o potencial

antioxidante desses óleos essenciais por diversas metodologias, incluindo estabilização de radicais livres, complexação de metais e inibição de peroxidação lipídica.

## **2 REFERENCIAL TEÓRICO**

### **2.1 Produtos de origem vegetal**

Dados da Organização Mundial de Saúde – OMS indicam que grande parte dos habitantes do planeta utilizam algum tipo de recurso vegetal como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde. Além disso, a retomada do conhecimento das plantas medicinais junto à população tem requerido atenção especial decorrente a muitos fatores, como o acelerado processo de mudança social que tem levado à perda de valiosas informações sobre a utilização terapêutica das plantas; o desaparecimento de espécies vegetais ainda desconhecidas do universo científico; o aumento de interesse da população mundial pela fitoterapia; e o uso do artifício etnofarmacológico pelas indústrias farmacêuticas na procura de novos fármacos (LEITE, 2008).

### **2.2 Metabólitos secundários**

Ao conjunto das transformações das moléculas orgânicas que ocorrem nas células vivas, catalisadas por enzimas específicas, tendo como função suprir o organismo de energia, renovar suas moléculas e garantir a continuidade do estado organizado, dá-se a designação de metabolismo. A presença dessas enzimas específicas propicia uma determinada orientação a essas transformações, designando-as de rotas metabólicas. Os compostos químicos formados e degradados são chamados de metabólitos e são divididos em dois

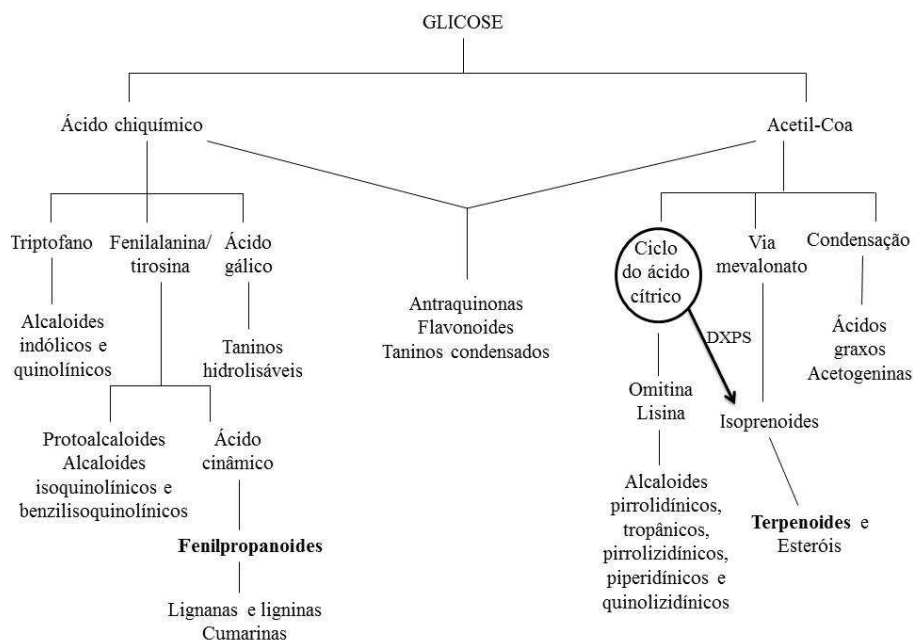


grandes grupos, os metabólitos primários, como os carboidratos, proteínas, ácidos nucleicos, lipídios e outras substâncias importantes que participam da nutrição e dos processos metabólicos vitais à manutenção da vida do organismo (SIMÕES et al., 2007). O outro grupo originado dos metabólitos primários são os metabólitos secundários, geralmente produzidos em pequenas quantidades, possuindo características químicas muito variadas, e sendo responsáveis por funções pouco definidas, o que não os torna menos importantes (DEWICK, 2009).

Por vários anos, os metabólitos secundários foram considerados como produtos de excreção do vegetal, sem vantagem biológica; todavia, com os estudos relacionados às plantas, tem-se encontrado muito sobre a finalidade dessas substâncias, como a utilidade para o desenvolvimento fisiológico das plantas e seus papéis como intercessores das interações entre as plantas e outros organismos (alelopatia) (SIMÕES et al., 2007).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas advêm do metabolismo da glicose, via dois principais intermediários, o ácido chiquímico e o acetil-CoA, formando os alcaloides, os flavonoides, as cumarinas, os taninos, as quinonas, os óleos essenciais (constituídos basicamente de terpenos e fenilpropanoides), entre outros (Figura 1). Esses compostos apresentam alto valor comercial, não apenas na área farmacêutica, como também alimentar, agrônômica e de perfumaria.

Figura 1- Principais rotas de biossíntese dos metabólitos secundários.



Fonte: Simões et al. (2007).

### 2.3 Óleos essenciais

De acordo com a International Organization for Standardization (ISO), óleos essenciais são definidos como produtos obtidos de uma planta ou das suas partes, por destilação (hidrodestilação ou destilação por arraste com vapor d'água); ou de pericarpos de frutos cítricos, por processo mecânico apropriado sem aquecimento, designado expressão (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais são também denominados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, por apresentarem aspecto oleoso à temperatura ambiente. Eles são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados, com exceção dos óleos essenciais que apresentem alto teor de azuleno, como o de camomila e mil-

folhas (SIMÕES et al., 2007). Segundo Bandoni e Czepak (2008), os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias orgânicas lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas que exibem como propriedades físico-químicas elevada volatilidade, instabilidade na presença de luz, de oxigênio, de substâncias oxidantes e redutoras, em meios com pH extremos, ou na presença de traços de metais que podem catalisar reações de decomposição e transformação.

De acordo com Figueiredo, Pedro e Barroso (2014), o óleo essencial representa apenas uma parte da constituição volátil passível de ser obtida de uma planta. Com efeito, o componente volátil pode ser extraído por outras metodologias; nesse caso, os extratos obtidos não devem ser designados óleos essenciais.

O Brasil se destaca como um dos maiores países produtores de óleos essenciais, ao lado da Índia, China e Indonésia. A produção de óleos essenciais provenientes de frutos cítricos oriundos de subprodutos da indústria de sucos é responsável pela posição atual do Brasil. Em conformidade com a base de dados americana, United Nations Commodity Trade Statistics Database, UNCTSD - COMTRADE (2016), o Brasil é o maior exportador de óleo essencial de laranja, com aproximadamente 470 milhões de dólares, seguido pelos Estados Unidos (370 milhões de dólares) e Reino Unido (80 milhões de dólares). No passado, o Brasil se destacou como exportador de óleos essenciais de pau-rosa, sassafrás e menta. Apesar desse destaque na produção mundial, o país apresenta muitos problemas, como falta de manutenção do padrão de qualidade dos óleos, representatividade nacional e baixos investimentos governamentais no setor, que levam a um quadro que não prospera.

Durante muito tempo, os óleos essenciais eram estudados pelo aroma e por propiciar sabor aos alimentos e bebidas; nos últimos anos, eles têm sido estudados por serem produtos naturais, sendo aceitos pelos consumidores pelo

possível fato de não conferirem riscos à saúde e por apresentarem propriedades multifuncionais. Entre essas propriedades, destacam-se a antibacteriana, a antifúngica, a inseticida, a alelopática, a antiparasitária, a sequestradora de radicais, a anti-inflamatória, a antiproliferativa e outras (SACCHETTI et al., 2005; BHALLA; GUPTA; JAITAK, 2013; TEIXEIRA et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2014; AZEVEDO et al., 2014; ANDRADE et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2015; FOE et al., 2016).

Essas propriedades biológicas dos óleos essenciais estimulam as pesquisas que envolvem suas potencialidades farmacológicas e o possível emprego tanto dos óleos essenciais, como de seus constituintes, isoladamente nas indústrias de medicamentos, cosméticos, alimentos e na agroindústria, substituindo ou associando-se aos compostos utilizados tradicionalmente.

A constituição química dos óleos essenciais está constantemente em modificação, alterando conforme a origem botânica, o quimiotipo, fatores edafoclimáticos e o procedimento de cultivo das plantas e de obtenção. Varia também conforme a origem geográfica, secagem, época de colheita e tipo de adubação (BANDONI; CZEPAK, 2008; LOPES-LUTZ et al., 2008).

A ocorrência de óleos essenciais em angiospermas monocotiledôneas, com exceção das plantas da família Poaceae, e em gimnospermas é relativamente rara; no entanto, plantas ricas em óleos essenciais são abundantes em angiospermas dicotiledôneas. Esses compostos podem estar acumulados em certos órgãos nas plantas, como flores (laranjeira e bergamoteira), folhas (capim-limão, eucalipto e louro), cascas dos caules (canela), madeira (sândalo e pau-rosa), raízes (vetiver), rizomas (cúrcuma e gengibre), frutos (anis-estrelado, funcho e erva-doce) e sementes (noz-moscada). Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos essenciais, sua composição pode variar segundo a localização (SIMÕES et al., 2007).

Dependendo da família taxonômica em estudo, o óleo essencial pode ser encontrado em diversas estruturas de armazenamento, tais como pelos ou tricomas glandulares (Lamiaceae e Verbenaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae e Poaceae), canais oleíferos (Apiaceae) ou em bolsas lisígenas e esquizolisígenas (Pinaceae e Rutaceae) (SIMÕES et al., 2007).

Essas estruturas, segundo Svoboda e Greenaway (2003), são divididas em estruturas de secreção internas (cavidades e os canais secretores) e externas (tricomas glandulares). Os tricomas são estruturas que podem ocorrer nas folhas, caules e flores. Dados de Combrick et al. (2007) mostram que existem três tipos de tricomas: o glandular capitado (com pedúnculo alongado e cabeça secretora); o glandular peltado (sem pedúnculo ou com pedúnculo reduzido); e o tricoma não glandular (constituído de uma célula basal em nível com a epiderme e de quatro a cinco células intermediárias esclerenquimatosas e uma longa célula apical).

### **2.3.1 Biossíntese dos constituintes dos óleos essenciais**

Os óleos essenciais podem apresentar constituição química muito variada, incluindo hidrocarbonetos terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e até compostos com enxofre. Na mistura, esses compostos se apresentam em diferentes concentrações; contudo, geralmente um, dois ou três desses são encontrados em maiores proporções, sendo denominados de majoritários. Apesar da complexidade da composição, os constituintes dos óleos essenciais são derivados de fenilpropanóides e/ou de terpenos, sendo esses últimos predominantes na forma de monoterpenos e sesquiterpenos (BANDONI; CZEPAK, 2008; SIMÕES et al., 2007).

Os **compostos terpênicos** são formados a partir de dois intermediários básicos (unidades preniladas), o IPP (isopentenil difosfato) e o DMAPP (dimetilalil difosfato). Os terpenos representam uma grande variedade de substâncias vegetais (SIMÕES et al., 2007).

A classificação dos terpenos ocorre pelo número de unidades isoprênicas que possuem. Aqueles com 10 átomos de carbonos, que têm duas unidades isoprênicas, são classificados como monoterpenos; os de 15 átomos de carbono (três unidades C<sub>5</sub>) são os sesquiterpenos e aqueles de 20 átomos de carbono (quatro unidades C<sub>5</sub>) são os diterpenos (SIMÕES et al., 2007; TAIZ; ZEIGER, 2004).

Para Dewick (2009), os terpenos são biossintetizados a partir de metabólitos primários, partindo-se de duas rotas distintas. Pela rota do mevalonato (Figura 2), três moléculas de acetil-CoA são ligadas por uma série de reações para formar o ácido mevalônico; esse intermediário é pirofosforilado, descarboxilado e desidratado, formando o isopentenil difosfato (IPP). Essa é a unidade prenilada ativa para a formação dos terpenos, que se interconverte por isomerização em dimetilalil difosfato (DMAPP). As moléculas de IPP e seu isômero DMAPP sintetizado unem-se para formar terpenos maiores, por meio do modelo “cabeça-cauda”. A adição eletrofílica de unidades de IPP e DMAPP, pela ação da enzima prenil-transferase, forma o intermediário geranyl difosfato (GPP, C<sub>10</sub>), que condensa com outra unidade IPP, fornecendo o farnesil difosfato (FPP, C<sub>15</sub>). Por último, a junção de FPP com outra unidade de IPP leva à produção de geranylgeranyl difosfato (GGPP, C<sub>20</sub>), precursor dos diterpenos.

Figura 2 - Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP), pela via do mevalonato. (Continua)

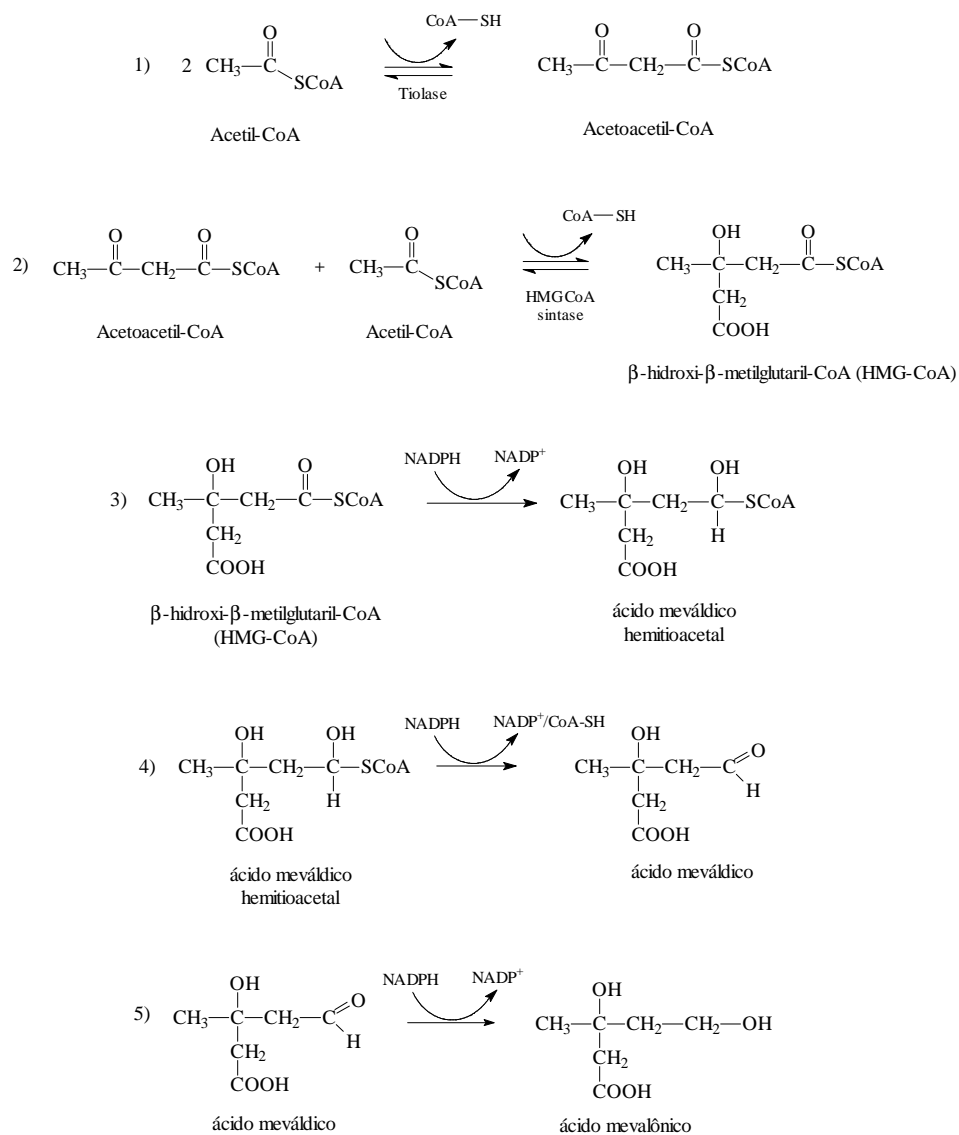


Figura 2 - Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP), pela via do mevalonato. (Continua)

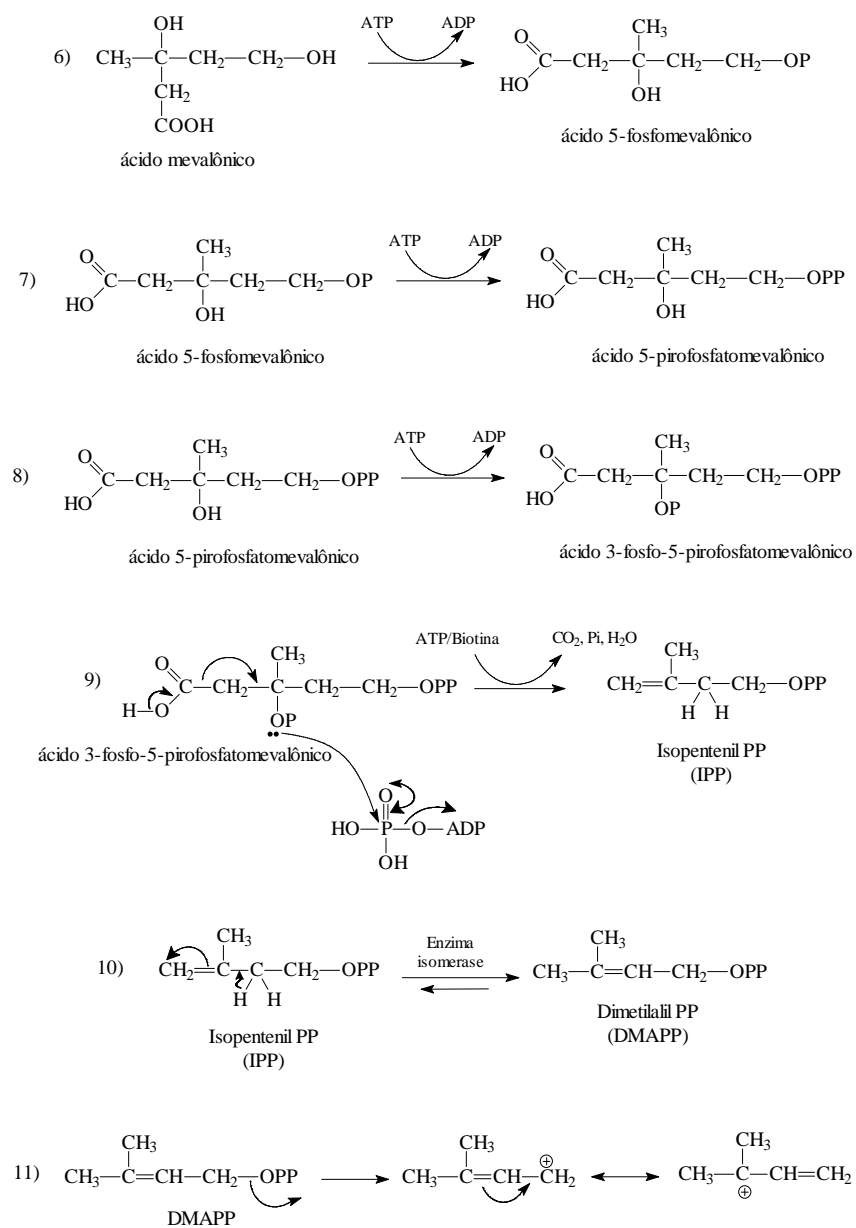
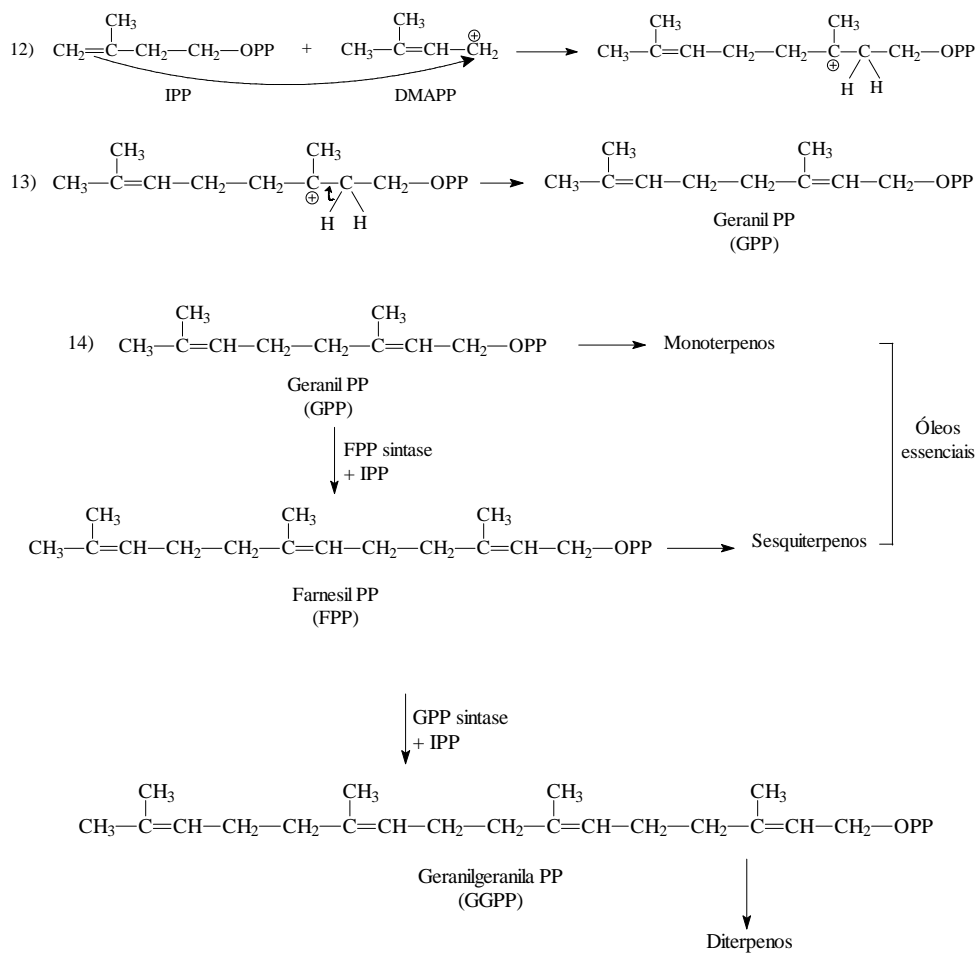




Figura 2 - Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP), pela via do mevalonato. (Conclusão)



Fonte: Adaptada de Dewick (2009).

A outra rota de biossíntese de terpenos (produção do IPP) que ocorre nos cloroplastos (plastídios) é a 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS) (Figura 3). Por essa via, o piruvato e o D-gliceraldeído-3-fosfato formam o 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato que, posteriormente, dá origem ao 2-C-metil-D-eritritol-4P (MEP). Em seguida, são formados por sucessivas reações o isopentenil difosfato (IPP) e o dimetilalil difosfato (DMAPP) (DEWICK, 2009).

Figura 3 - 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)

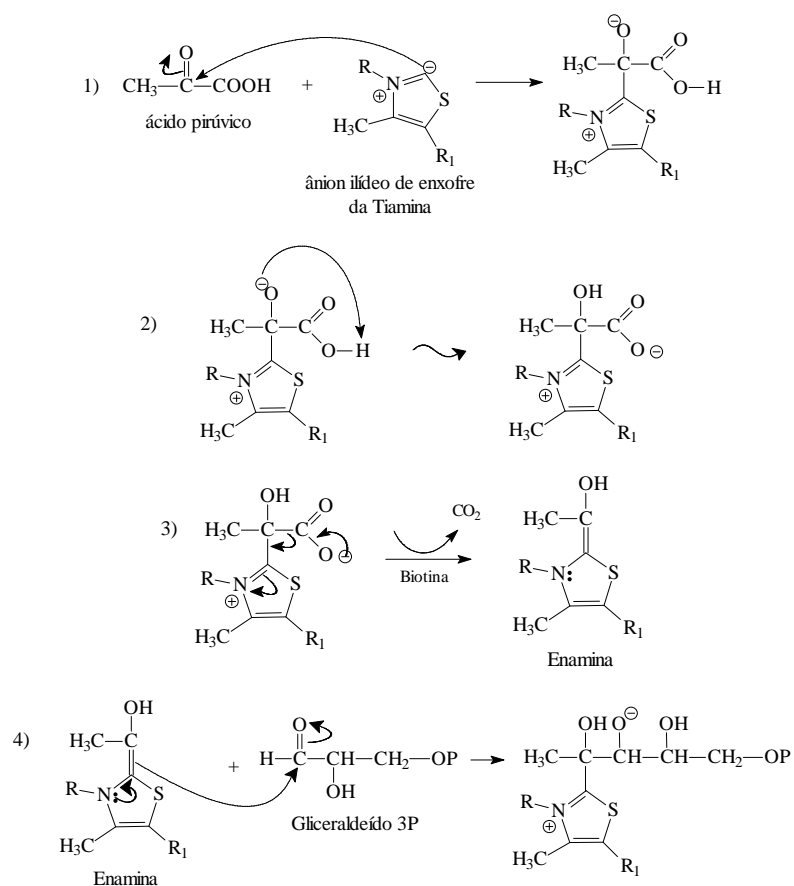


Figura 3 - Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP), pela via da 1-deoxi-D-xilulose-5 fosfato (DXPS). (Continua)

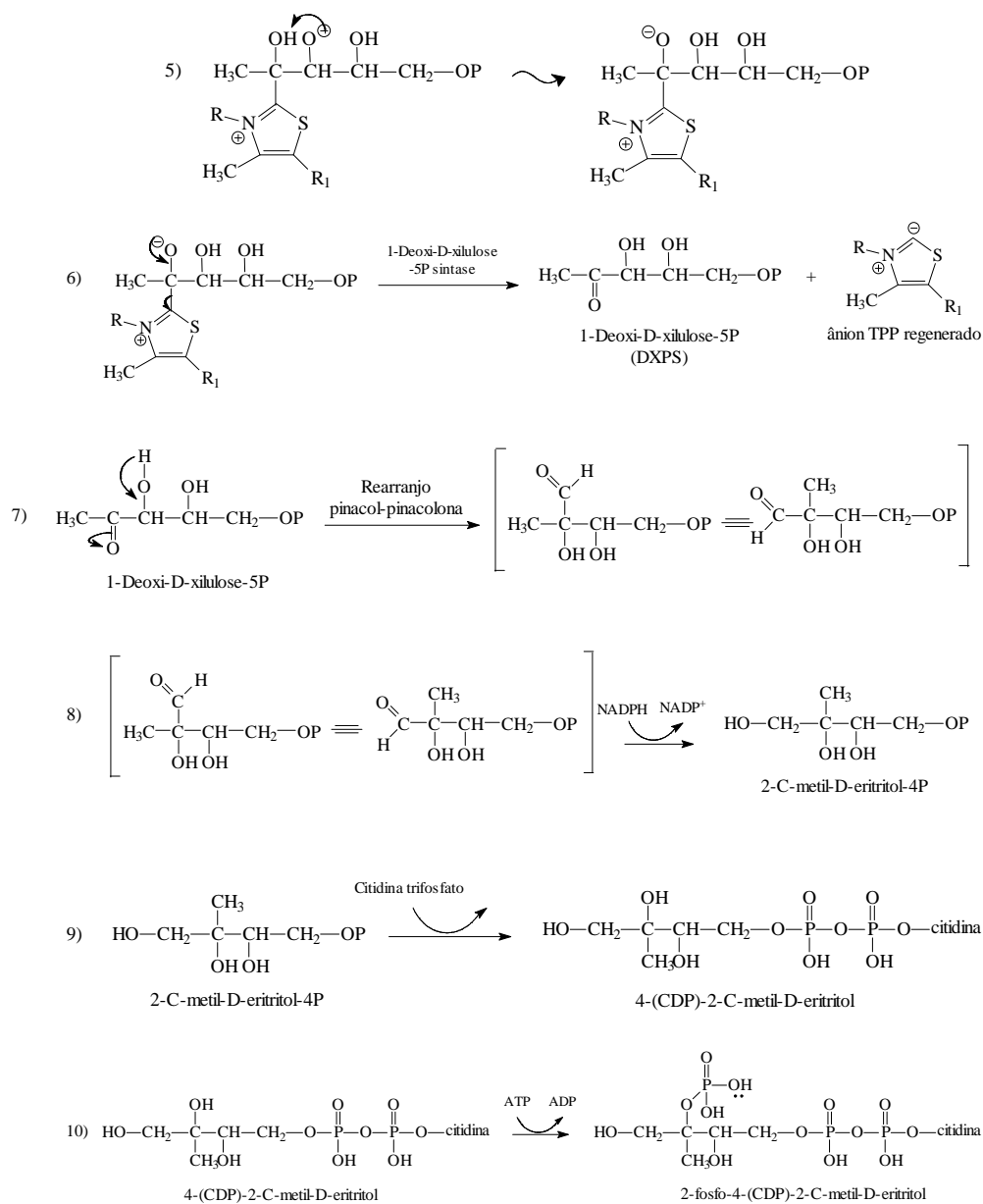
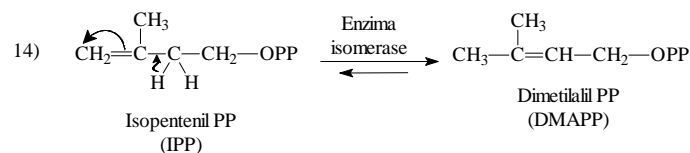
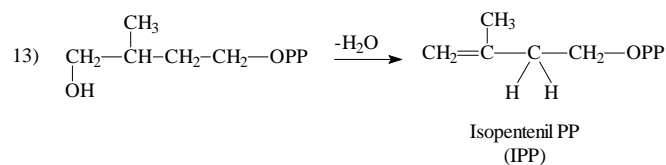
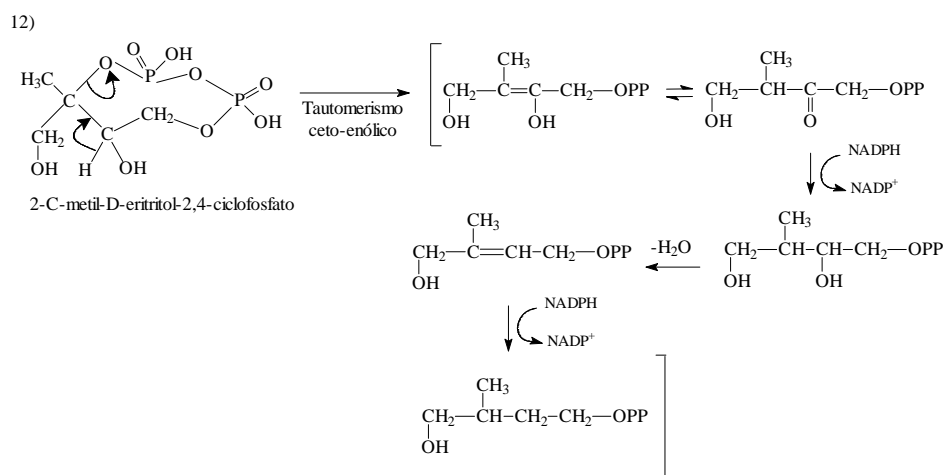
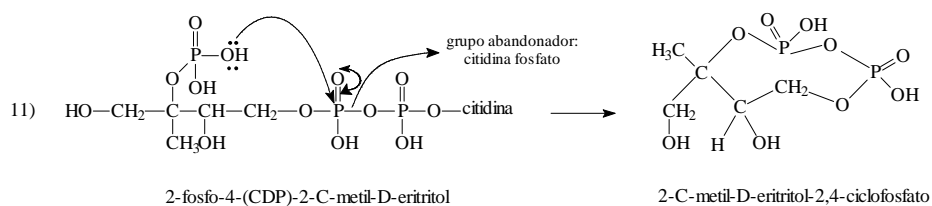


Figura 3 - Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP), pela via da 1-deoxi-D-xilulose-5 fosfato (DXPS). (Conclusão)



Fonte: Adaptado de Dewick (2009).

Provenientes de um precursor comum, as estruturas terpênicas sintetizadas pelas duas rotas (melavonato e DXPS) podem ser modificadas por reações de reduções, oxidações e ciclizações, formando vários compostos terpênicos, que constituem um dos maiores grupos de metabólitos secundários provenientes dos vegetais (DEWICK, 2009).

Os **fenilpropanoides**, oriundos da via do chiquimato, são menos abundantes do que os terpenoides e são caracterizados por apresentar um anel benzênico com uma cadeia lateral composta por três átomos de carbono, com uma dupla ligação, podendo apresentar uma hidroxila na posição *para*. Os fenilpropanoides também podem conter em suas estruturas outros grupos funcionais oxigenados (SIMÕES et al., 2007).

Inicialmente, ocorre a formação do ácido chiquímico que se dá pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose, o fosfoenolpiruvato (via glicolítica) e a eritrose-4-fosfato (via das pentoses). Após ser formado, o ácido chiquímico, por várias reações, é convertido nos aminoácidos fenilalanina e tirosina. Pela ação da enzima fenilalanina amonialiase (FAL), os aminoácidos perdem uma molécula de amônia, formando os ácidos cinâmico e *p*-cumárico (Figura 4). Por fim, por meio de reações de redução, oxidação e ciclização, os ácidos cinâmico e *p*-cumárico originam os diferentes fenilpropanoides (SIMÕES et al., 2007).

Figura 4 - Biossíntese de fenilpropanoides. (Continua)

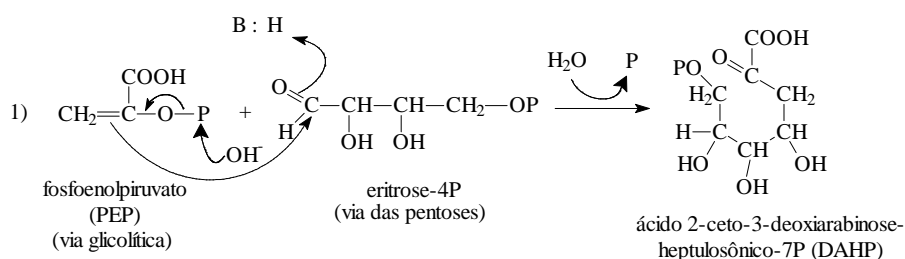


Figura 4 - Biossíntese de fenilpropanoides. (Continua)

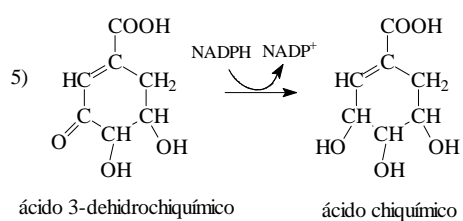
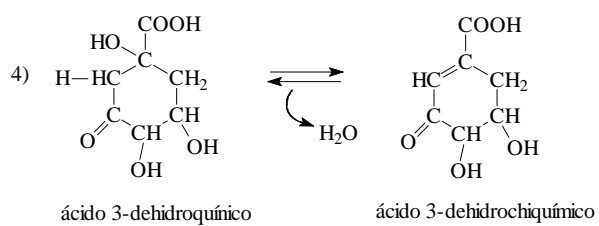
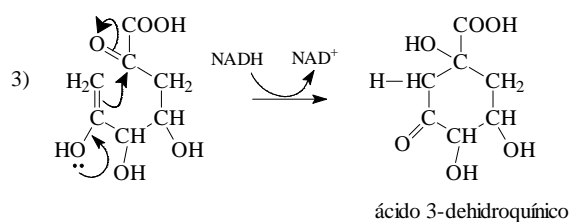
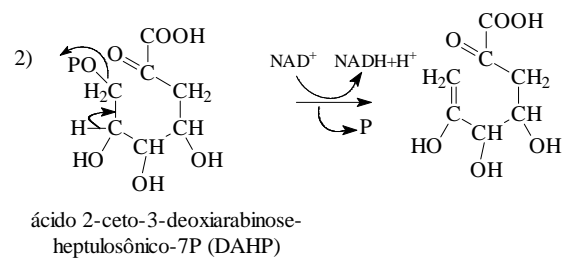


Figura 4 - Biossíntese de fenilpropanoides. (Continua)

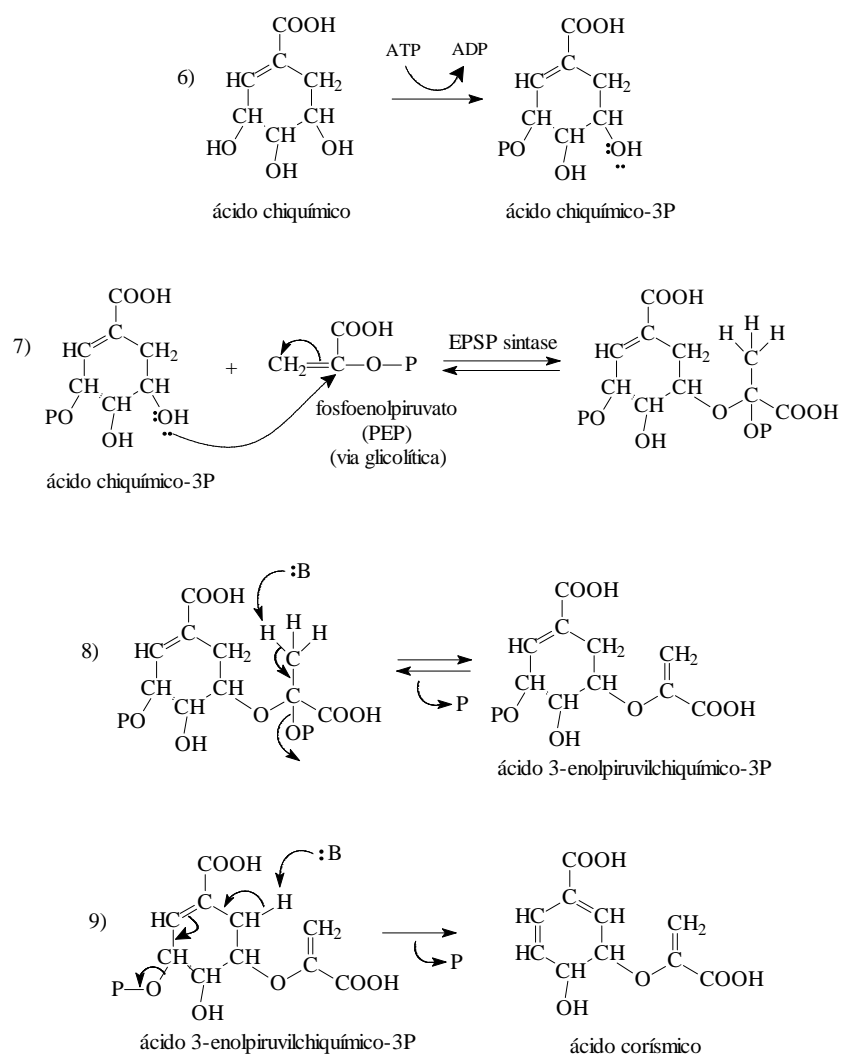


Figura 4 - Biossíntese de fenilpropanoides. (Continua)

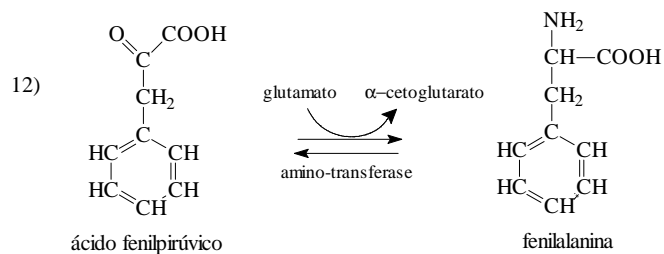
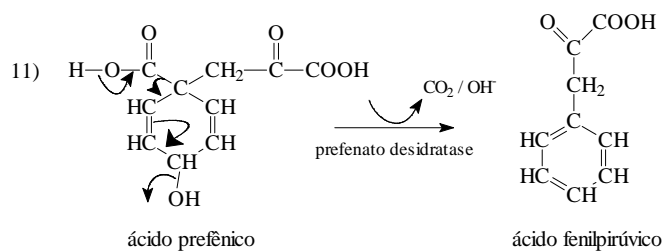
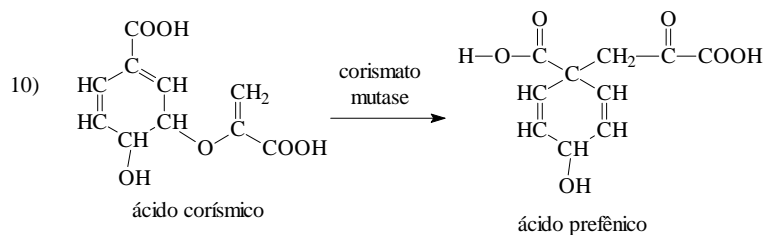
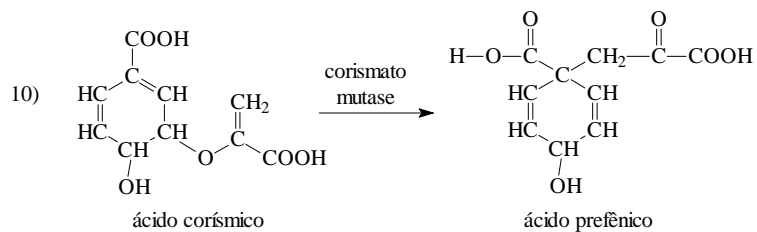
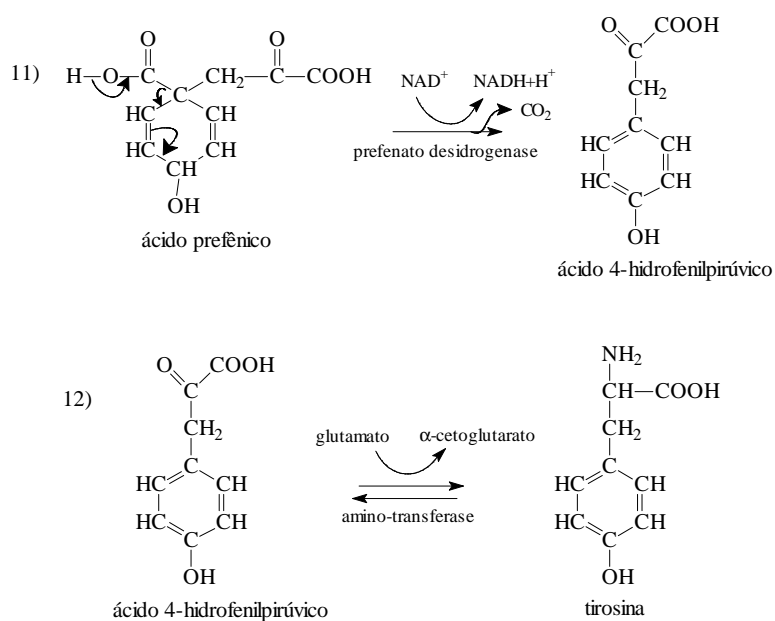
**Síntese do aminoácido fenilalanina****Síntese do aminoácido tirosina**



Figura 4 - Biossíntese de fenilpropanoides. (Continua)



### Síntese dos fenilpropanoides a partir dos aminoácidos fenilalanina e tirosina

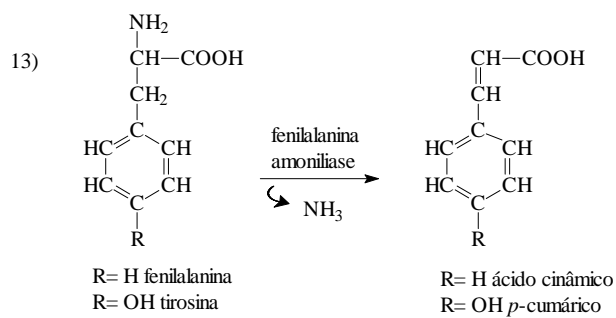
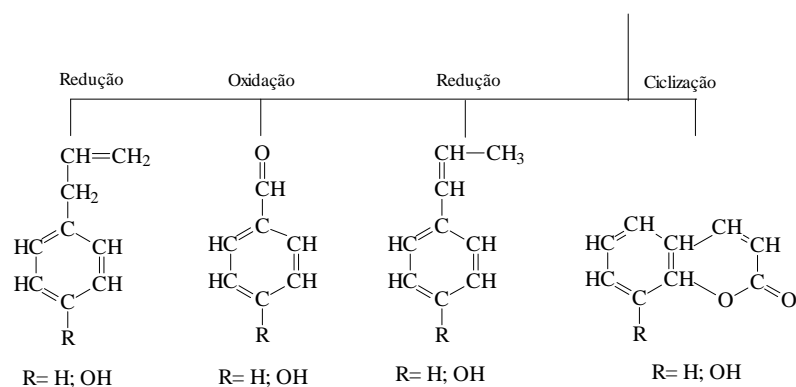


Figura 4 - Biossíntese de fenilpropanoides. (Conclusão)



Fonte: Simões et al. (2007)

## 2.4 Plantas em estudo

O Brasil tem posição de destaque em relação à biodiversidade encontrada ao longo de seu território, exibindo a flora com mais espécies diferenciadas de todo o mundo. Considerando a diversidade vegetal e a irrisória porcentagem de espécies vegetais investigadas fitoquimicamente, o reino vegetal representa um enorme depósito de moléculas biologicamente ativas e de consequente importância comercial a serem descobertas. Assim, o estudo das plantas de nosso país torna-se de grande importância.

### 2.4.1 Plantas da família Lamiaceae

As plantas da família Lamiaceae compreendem aproximadamente 4000 espécies distribuídas em 220 gêneros, entre elas, citam-se: arbusto, árvore, erva, lianácea e subarbusto. Espécies dessa família encontram-se distribuídas em

quase todas as regiões, especialmente no Mediterrâneo e Ásia Central (LEMES; FERRI, 2011). De acordo com Harley et al. (2016), estima-se que pelo menos 46 gêneros e 524 espécies ocorrem no Brasil.

As espécies da família Lamiaceae acumulam substâncias com ampla variedade estrutural, como esteroides, flavonoides, iridoides e terpenoides, incluindo os triterpenos pentacíclicos. A esses últimos, são atribuídas várias atividades, como antitumoral, anti-HIV, anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, antifúngica, entre outras (LEMES; FERRI, 2011).

A família Lamiaceae compreende plantas ricas em óleos essenciais destinados às indústrias na produção de fármacos, perfumes e cosméticos, como lavanda (*Lavandula angustifolia*) e boldo-brasileiro (*Plectranthus barbatus*). Algumas espécies, como a sálvia (*Salvia splendens*), também são cultivadas como plantas ornamentais (SOUZA; LORENZI, 2012).

#### **2.4.1.1 *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) Harley & J.F.B.Pastore**

*Cantinoa carpinifolia* Benth., popularmente conhecida como rosmarinho ou rasmaninho, é uma planta herbácea da família Lamiaceae. Pode ser encontrada entre diversas formações vegetais, como campos cerrados, campos rupestres, bordas de matas de galeria e de encosta (BOTREL et al., 2006).

É uma planta que vem sendo explorada na medicina popular no tratamento de gripes, resfriados e reumatismo. Suas folhas são geralmente submetidas à infusão e compressas (SILVA; MOURA, 2011).

Atualmente, a espécie *Hyptis carpinifolia* foi realocada ao gênero *Cantinoa*, sendo renomeada *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) (Figura 5) (SILVALUZ et al., 2012).

Figura 5 - Aspecto geral da espécie *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) Harley & J.F.B.Pastore.



Fonte: Do autor (2016)

Várias espécies pertencentes ao gênero *Hypsis* (atualmente *Cantinoa*) representam uma importante fonte de constituintes bioativos, que são conhecidos pelas amplas atividades antimicrobiana, anticarcinogênica e inseticida. Os óleos essenciais obtidos a partir das várias partes das plantas do gênero *Hypsis* são constituídos principalmente por mono e sesquiterpenos (McNEIL; FACEY; PORTER, 2011).

#### **2.4.2 Plantas da família Verbenaceae**

A família Verbenaceae abrange aproximadamente 98 gêneros e 2614 espécies em todo o continente Sul-Americano. O Brasil reúne a maior riqueza da família, com 16 gêneros distribuídos em 286 espécies (sendo 187 endêmicas) nos diferentes habitats, desde arbusto, árvore, erva, lianácea e subarbusto, encontrados nas regiões tropicais e subtropicais (SALIMENA et al., 2016),

apresentando distribuição pantropical, mas principalmente neotropical (BUENO; LEONHARDT, 2011).

As espécies da família Verbenaceae ocupam todas as regiões do país, ocorrendo em vegetações do tipo Campo Rupestre, Cerrado e Floresta Ombrófila (Floresta Pluvial), sendo presente em diversos domínios fitogeográficos, como Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (SALIMENA et al., 2016).

São várias aplicações que as espécies dessa família possuem, podendo ser utilizadas na forma de chás, bem como ornamentais e na elaboração de produtos de higiene pessoal (MELO et al., 2010). Uma característica da família Verbenaceae é a presença de tricomas secretores, geralmente produtores de óleos essenciais de grande valor medicinal.

#### **2.4.2.1 *Lippia origanoides* Kunth.**

*Lippia origanoides* Kunth., conhecida no norte do Brasil como "salva-do-marajó" e "alecrim-d'angola" (Figura 6), é uma espécie arbustiva com um ciclo de vida perene, cujas partes aéreas são utilizadas na culinária como aromatizante de pratos regionais, no tratamento de doenças gastrointestinais, de doenças respiratórias e como antisséptico para a boca e para irritação de garganta (SARRAZIN et al., 2015). É utilizada na forma de infusão ou decocto, administrados oralmente ou por meio de emplastos (MESA et al., 2009).

Figura 6 - Aspecto geral da espécie *Lippia origanoides* Kunth.



Fonte: Do autor (2016).

A bioatividade do óleo essencial de *L. origanoides* foi avaliada por diversos pesquisadores. Pode-se citar, atividade antimicrobiana contra alguns microrganismos patogênicos (PINTO et al., 2013), repelente sobre pragas em grãos armazenados (CABALLERO-GALLARDO; OLIVERO-VERBEL; STASHENKO, 2012), antioxidante e inseticida (TEIXEIRA et al., 2014), contra protozoários (BORGES et al., 2012), antígenotóxica, além de muitas outras atividades com aplicação na medicina popular, como para o tratamento de doenças gastrointestinais e respiratórias (VICUÑA; STASHENKO; FUENTES, 2010). Essas qualidades dão à planta e ao seu óleo essencial um potencial biológico para seu uso como medicamento no controle de algumas doenças infecciosas e também demonstram importantes propriedades de interesse para os mercados de cosméticos e alimentos.

Os compostos majoritários voláteis frequentemente encontrados nos óleos essenciais de diversas espécies de *Lippia* são o timol, carvacrol, 1,8-cineol, limoneno, *p*-cimeno, linalol,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -cariofileno. As plantas dessas espécies

exibem variações na constituição química dos seus óleos essenciais, como no caso da *L. origanoides*, cujos três quimiotipos registrados na Amazônia brasileira e colombiana apresentaram como compostos majoritários o *p*-cimeno,  $\alpha$  e  $\gamma$ -terpineno, timol, carvacrol,  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -felandreno e  $\delta$ -careno (STASHENKO et al., 2008).

## 2.5 Radicais livres e antioxidantes

De acordo com Pereira e Cardoso (2012), radicais livres são intermediários de reação que possuem elétrons não pareados em sua camada externa, sendo espécies instáveis e extremamente reativas, que se multiplicam em cascata e têm vida média muito curta. Esses radicais podem ser denominados de espécies reativas de oxigênio (ERO), se o elétron estiver centrado em átomos de oxigênio e de espécies reativas de nitrogênio (ERN), caso esteja em átomos de nitrogênio. No organismo, são importantes quando produzidos em quantidades adequadas (naturalmente em processo fisiológico), pois estão envolvidos com a produção de ATP, fagocitose e regulação do crescimento celular (ABRAHÃO et al., 2010).

Em determinadas condições, os radicais livres passam a ser produzidos em excesso, processo denominado de estresse oxidativo, e como consequência, atacam e danificam moléculas encontradas no organismo, resultando na peroxidação lipídica das membranas, nas modificações oxidativas das proteínas, nas lesões no ácido desoxirribonucleico (DNA) e na lesão de reperfusão. Assim, leva a alterações teciduais responsáveis por diversas patologias, incluindo o câncer (reações dos radicais livres com a timina do DNA produzem quebras unifilamentares do DNA, e tais danos estão implicados na transformação maligna das células), doenças cardiovasculares e doenças neurodegenerativas (os radicais livres agem acelerando o processo degenerativo e a perda da

estabilidade celular) (OLSZEWER, 2008). Além dos danos causados ao organismo humano, os radicais livres podem atuar sobre os ácidos graxos presentes em alimentos, resultando na geração do ranço, no desenvolvimento de odores e sabores desagradáveis, e na perda do seu valor nutricional e comercial.

Esses processos nos organismos e em alimentos podem ser reduzidos pela modificação das condições aos quais estão inseridos ou pela utilização de substâncias antioxidantes.

Os antioxidantes são definidos como substâncias capazes de retardar ou inibir a oxidação de substratos oxidáveis. Podem ser enzimáticos, como superóxidos dismutases citoplasmática e mitocondrial, catalase, glutaciona peroxidase e glutaciona redutase; não enzimáticos, tais como glutaciona, ácido lipóico, albumina, ubiquinona, metalotioneínas, transferrina e ceruloplasmina; e exógenos ou dietéticos, como  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E),  $\beta$ -caroteno, ascorbato (vitamina C), compostos fenólicos e demais metabólitos secundários vegetais, além de zinco, cobre, selênio e magnésio (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Além desses antioxidantes, têm-se os sintéticos, como os polifenóis, butil-hidroxi-anisol (BHA), 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT), tert-butil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG) (SOUSA et al., 2007). No entanto, estudos toxicológicos têm demonstrado efeito carcinogênico dos antioxidantes sintéticos em experimentos com animais (BOTTERWECK et al., 2000). Já em humanos, a relevância dessa observação ainda não está clara com isso, o uso dessas substâncias é restrito em vários países (RAMALHO; JORGE, 2006).

As substâncias antioxidantes atuam em diversos níveis na proteção do organismo. O primeiro mecanismo de defesa contra os radicais livres é inibir a sua formação, interceptando os radicais formados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas. Outro mecanismo é a restauração das lesões ocasionadas



pelos radicais livres, removendo os danos da molécula de DNA e reconstituindo as membranas celulares danificadas (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

### **2.5.1 Ensaios antioxidantes**

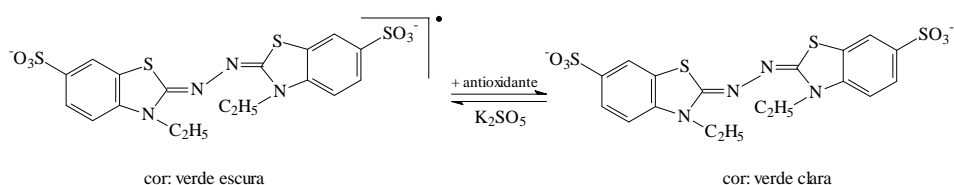
Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessantes, na prevenção de doenças crônico-degenerativas e na proteção de um substrato lipídico contra a oxidação. Dentre esses métodos, destacam-se os baseados na neutralização de radicais (estabilização dos radicais ABTS, DPPH e hidroxil); a complexação de metais (redução do molibdênio e poder redutor) e a inibição da peroxidação lipídica (TBARS e sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico).

#### **2.5.1.1 Método de estabilização do radical ABTS<sup>•+</sup> [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]**

O método do ABTS é um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante de substâncias isoladas ou de misturas complexas por meio da captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS<sup>•+</sup>), que pode ser gerado por meio de uma reação química. Este é formado por meio de uma reação do ABTS com persulfato de potássio (Figura 7), apresentando cor esverdeada. Depois de formado, o radical é reduzido de ABTS<sup>•+</sup> para ABTS na presença de substâncias antioxidantes (doadoras de átomos de hidrogênio ou de elétrons), sendo medido espectrofotometricamente no intervalo de comprimento de onda de 600-750 nm. Com essa metodologia, pode-se medir a atividade antioxidante de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica, além de apresentar vantagem pela relativa simplicidade do método, o

que permite a sua aplicação na rotina de qualquer laboratório (BORGES et al., 2011).

Figura 7 - Estabilização do radical ABTS<sup>•+</sup> por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.



Fonte: Moon; Shibamoto (2009).

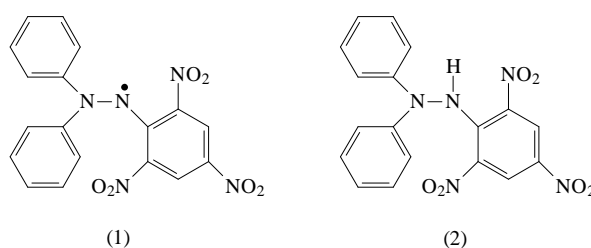
### 2.5.1.2 Método de estabilização do radical DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)

O método do DPPH é um dos métodos indiretos mais antigos, proposto originalmente em 1950, sendo mais tarde utilizado para determinar o potencial antioxidante de compostos fenólicos isolados e de amostras biologicamente relevantes. Uma das características desse método é que não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação (BORGES et al., 2011).

A molécula de DPPH é caracterizada como um radical livre estável pela deslocalização do elétron desemparelhado por toda a molécula (possui três anéis aromáticos, apresentando efeito de ressonância, que é importante para estabilizar a carga eletrônica do radical DPPH<sup>•</sup>). Essa propriedade confere a molécula uma coloração violeta (banda de absorção em cerca de 520 nm). Esse ensaio baseia-se na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em neutralizar o radical DPPH<sup>•</sup>, reduzindo-o a um derivado de hidrazina (Figura 8). Quando uma determinada substância é adicionada à solução de DPPH, e essa age como doadora de átomos de hidrogênio (ou de elétrons), ocorre uma

mudança simultânea na coloração de violeta para amarelo pálido (ALVES et al., 2010).

Figura 8 - Formas radicalar (1) e não radicalar (2) do DPPH.

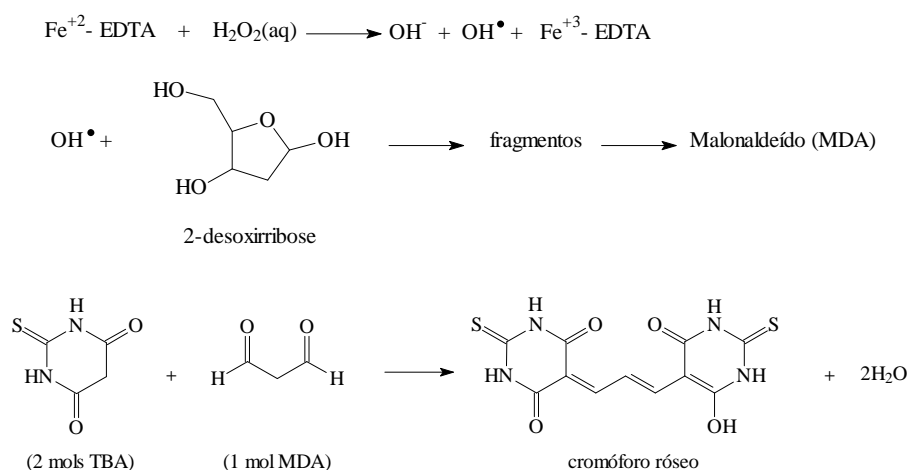


Fonte: Alves et al. (2010).

### 2.5.1.3 Método de estabilização do radical hidroxil (OH<sup>•</sup>)

O ensaio para avaliar a atividade antioxidante empregando-se a 2-desoxirribose é um dos métodos mais específicos para determinar o sequestro do radical hidroxil (OH<sup>•</sup>). Nesse método, o radical OH<sup>•</sup> é gerado pela reação Fenton, em que o sulfato de ferro (II) reage com o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA), formando o complexo Ferro(II)-EDTA que, posteriormente reage com o peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) formando Ferro(III)-EDTA e OH<sup>•</sup>. O radical gerado pode reagir com a 2-desoxirribose para formar produtos (entre eles, o malonaldeído). A reação do malonaldeído com o ácido tiobarbitúrico (TBA) sob aquecimento, em pH baixo, forma um produto (cromóforo) que apresenta coloração rosada, sendo monitorado por espectrofotometria na região do visível (532 nm) (Figura 9). Substâncias que tenham propriedades antioxidantes podem competir com a 2-desoxirribose pelo radical, produzindo uma diminuição na intensidade da coloração (ALVES et al., 2010).

Figura 9 - Formação do radical hidroxil e posterior ataque à 2-desoxirribose e formação do cromóforo róseo a partir do malonaldeído.



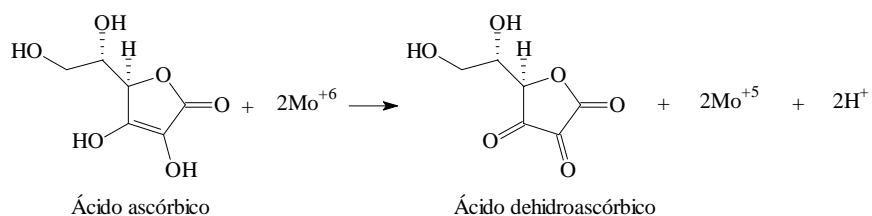
Fonte: Adaptada de Alves et al. (2010); Moon; Shibamoto (2009).

#### 2.5.1.4 Método de complexação do fosfomolibdênio

Este método, descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999), fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) na presença de substâncias com capacidade antioxidante (Figura 10). Dessa forma, ocorre a formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V) (complexo fosfomolibdato de amônio), em meio ácido, o qual é determinado espectrofotometricamente a 695nm.

A coloração inicial da solução é amarela e torna-se verde à medida que o molibdênio se reduz, e isso só ocorre na presença de substâncias com a tendência de serem estabilizadas quando essas substâncias forem oxidadas. Esse método apresenta a vantagem de verificar o potencial antioxidante tanto de substâncias lipofílicas quanto de hidrofílicas (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

Figura 10 - Reação hipotética de redução do molibdênio na presença do antioxidante ácido ascórbico (vitamina C).



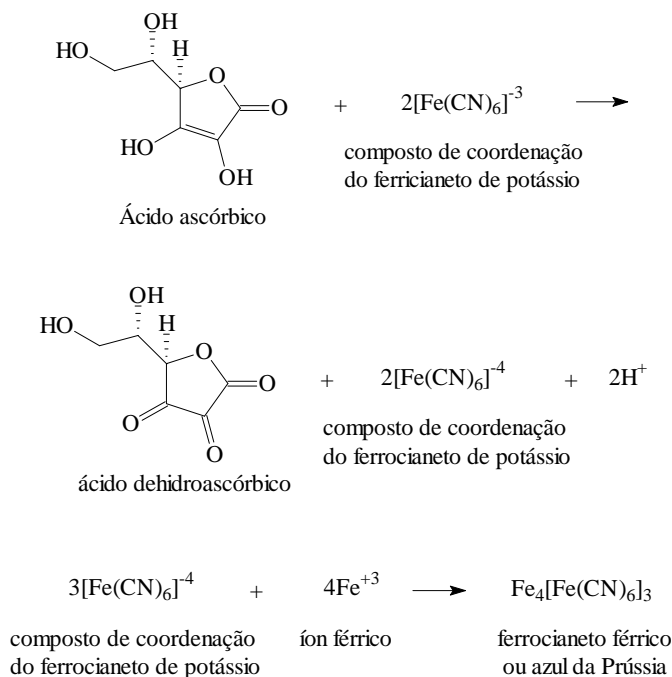
Fonte: Do autor (2016)

### 2.5.1.5 Método do poder redutor

O teste que avalia o poder redutor baseia-se na redução do íon ferricianeto a ferrocianeto que, na presença do íon férrico (proveniente do  $\text{FeCl}_3$ ), forma o azul da prússia (SANTOS et al., 2007). Assim, a provável substância antioxidante sofre oxidação, doando átomo de hidrogênio ou elétrons ao ferricianeto para o mesmo ser reduzido a ferrocianeto. Dessa maneira, esse, por sua vez, reage com o íon férrico, proporcionando a coloração característica decorrente da formação do azul da prússia (Figura 11).

A habilidade de reduzir o complexo ferricianeto pode ser atribuída à maior facilidade de doação de átomos de hidrogênio pelos compostos fenólicos. Além disso, o número e a posição dos grupos hidroxilas em compostos fenólicos também regem a sua atividade antioxidante (FOE et al., 2016).

Figura 11 - Reação hipotética de redução do ferro na presença do antioxidante ácido ascórbico (vitamina C).



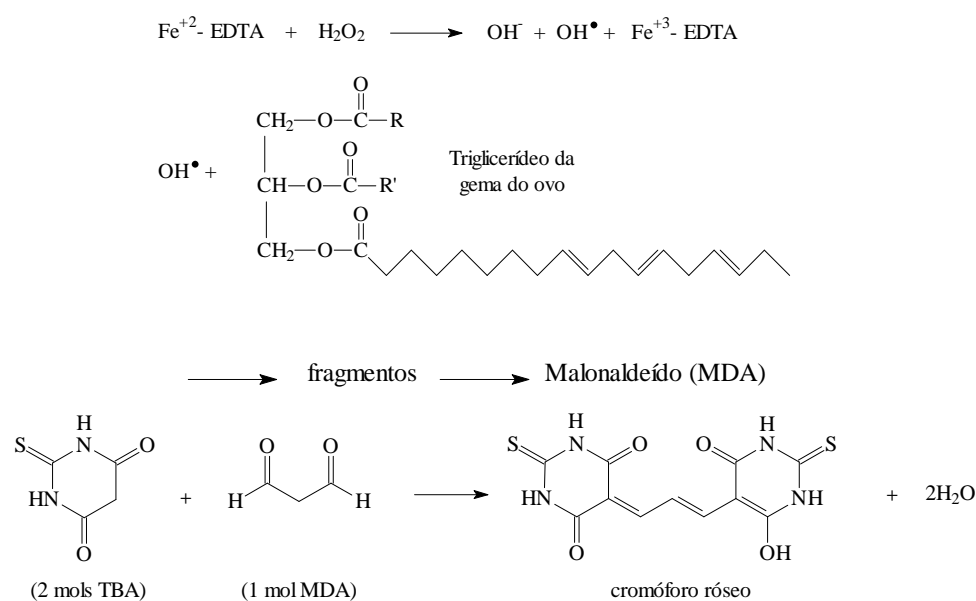
Fonte: Do autor (2016).

#### 2.5.1.6 Método de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

É um teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com determinados produtos da decomposição dos hidroperóxidos. A formação desses hidroperóxidos se dá pelo ataque do radical hidroxil (reação Fenton) à porção lipídica da gema de ovo. Um dos principais produtos formados no processo oxidativo é o malonaldeído, que é um biomarcador útil para investigar a fase final de peroxidação lipídica. Nesse método, uma molécula de malonaldeído reage com duas moléculas de ácido tiobarbitúrico para formar um complexo de cor rósea, o qual absorve em 532-535 nm (Figura 12). A reação ocorre em meio

ácido (pH 1-2) e em alta temperatura (100 °C), no sentido de aumentar a sua velocidade (SANTOS et al., 2007).

Figura 12 - Formação do radical hidroxil, posterior ataque ao triglicerídeo da gema do ovo (triglicerídeo poliinsaturado) e formação do cromóforo róseo a partir do malonaldeído.



Fonte: Adaptada de Moon; Shibamoto (2009).

O ensaio malonaldeído/ácido tiobarbitúrico tornou-se um dos ensaios mais populares para estudos relacionados à peroxidação lipídica, e ainda é amplamente utilizado para avaliar a atividade antioxidante de vários produtos naturais (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

### 2.5.1.7 Ensaio de oxidação do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

O método do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico permite avaliar a capacidade de uma determinada substância ou amostra em prevenir a oxidação do  $\beta$ -caroteno (substrato lipídico), protegendo-o dos radicais livres resultantes da oxidação do ácido linoleico (peroxidação) por espécies reativas de oxigênio presentes no meio. A reação é monitorada espectrofotometricamente pela perda da coloração do  $\beta$ -caroteno em 470 nm. Segundo Jayaprakasha et al. (2007), na ausência de substâncias antioxidantes, o  $\beta$ -caroteno perde a cor alaranjada rapidamente, uma vez que os radicais livres formados pela perda de um próton de um grupo metileno dialílico do ácido linoleico ataca as insaturações da molécula de  $\beta$ -caroteno (Figura 13) (ALVES et al., 2010).

Figura 13 - Esquema geral do processo de peroxidação lipídica. (Continua)

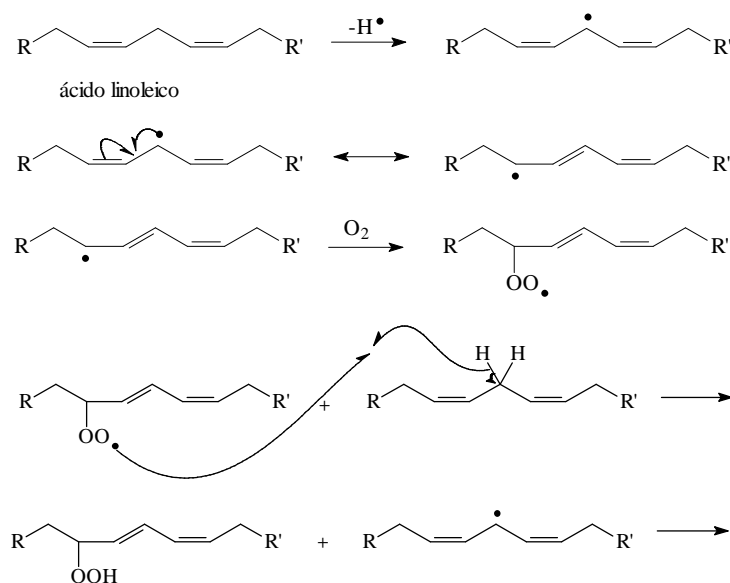
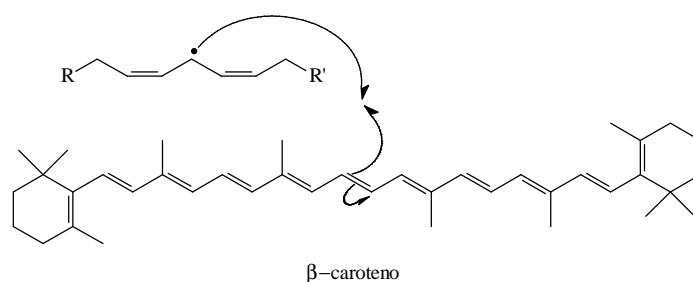




Figura 13 - Esquema geral do processo de peroxidação lipídica. (Conclusão)



Fonte: Adaptada de Lima; Abdalla (2001).

O método da cooxidação empregando o sistema β-caroteno/ácido linoleico é um teste simples e sensível, e por não utilizar altas temperaturas, permite a determinação da atividade antioxidante de substâncias termossensíveis.

### 2.5.2 Atividade antioxidante dos óleos essenciais

Muitos óleos essenciais têm exibido resultados promissores como agentes antioxidantes, apresentando atividades no controle de radicais livres, de substâncias oxidantes e na inibição de peroxidação lipídica, semelhantes aos compostos sintéticos (ANDRADE et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2014; SILVA et al., 2015).

Nogueira Sobrinho et al. (2016) avaliaram, pelos métodos de estabilização do radical DPPH e sistema β-caroteno/ácido linoleico, a atividade antioxidante do óleo essencial de *Baccharis trinervis* (Asteraceae), que é uma espécie encontrada na América Latina e utilizada na medicina popular como anti-séptico, auxiliando na digestão e no tratamento de picadas de serpentes. Os constituintes majoritários encontrados no óleo foram β-felandreno, sabineno,

(Z)- $\beta$ -ocimeno e  $\alpha$ -tujeno. O óleo essencial mostrou atividade antioxidante significativa para ambos os métodos, com valores de  $CI_{50}$  de  $49,0 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $28,87 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

Ye, Dai e Hu (2013), investigando a atividade antioxidante do óleo essencial de *Allium cepa* L. (cebola, família Liliaceae) pelos métodos estabilização dos radicais ABTS e DPPH e pelo método do metal quelante, encontraram moderada atividade antioxidante do óleo. Para o primeiro método, obtiveram um  $CI_{50}$  de  $670 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; para o segundo, de  $630 \mu\text{g mL}^{-1}$ ; e para o terceiro, de  $510 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Com os resultados obtidos, os autores sugeriram que o óleo essencial de *A. cepa* pode ser uma nova fonte de agentes antioxidantes naturais aplicável em sistemas alimentares.

Estudos realizados por Rather et al. (2012) sobre a atividade antioxidante do óleo essencial de *Juglans regia* L. (família Juglandaceae), que possui como constituintes majoritários o  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, limoneno,  $\beta$ -cariofileno e germacreno-D, utilizando os métodos de sequestro de radicais DPPH e de radical hidroxil, demonstraram uma atividade antioxidante elevada, quando comparada com os controles positivos (ácido ascórbico e BHT), com  $CI_{50}$  de  $34,5$  e  $56,4 \mu\text{g mL}^{-1}$ , para os métodos, respectivamente.

O estudo da atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Myristica fragrans* e *Salvia microphylla* foi realizado por Lima et al. (2012). Os óleos essenciais foram obtidos por meio de hidrodestilação e foram utilizados os testes  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e do sequestro de radicais DPPH para avaliar a sua atividade antioxidante. O terpin-4-ol, sabineno e  $\gamma$ -terpineno foram encontrados como os constituintes principais do óleo essencial de *M. fragrans* analisados por cromatografia em fase gasosa (CG-EM e CG/DIC), ao passo que para o óleo essencial de *S. microphylla*, foram encontrados o (E)-cariofileno,  $\alpha$ -eudesmol,  $\beta$ -eudesmol e  $\gamma$ -eudesmol. A atividade antioxidante dos óleos essenciais de *M.*

*fragrans* e *S. microphylla* foi demonstrada pelo teste de ácido  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, com  $CI_{50}$  de 976 e 770  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

Alguns óleos essenciais apresentam elevada atividade antioxidante por determinado método, mas em outro, podem apresentar uma atividade reduzida, ou não apresentar atividade. Guimarães et al. (2011) estudaram a atividade antioxidante do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e de seu constituinte majoritário, o citral, empregando os métodos de estabilização do radical DPPH e o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. Observaram que o óleo essencial e o citral apresentaram pequena atividade antioxidante perante a primeira metodologia. Segundo os autores, isso pode ser justificado devido à não facilidade de doação de um hidrogênio por parte desses compostos, para estabilizar o radical DPPH. Perante a metodologia que emprega o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, esses compostos apresentaram atividades antioxidantes crescentes, de acordo com as concentrações utilizadas, chegando a apresentar valores de 46,45% e de 38,00% na concentração de 100  $\mu\text{g L}^{-1}$  para o óleo essencial e seu constituinte majoritário (citral), respectivamente. Isso pode ser pelo fato de a lipofilicidade dos compostos interagir melhor ao meio reacional.

A atividade antioxidante *in vitro* dos óleos essenciais de *Mentha pulegium* L. (L) e *Mentha viridis* L. foi avaliada por Silva e colaboradores (2015) perante os métodos hidroxil, poder redutor e redução do molibdênio. O óleo essencial de *M. pulegium* apresentou como constituintes majoritários a pulegona, mentol e mentona, e no óleo de *M. viridis*, foram encontrados o linalol, carvona e  $\alpha$ -terpineno. Pelo método hidroxil, o óleo essencial de *M. pulegium* apresentou a maior atividade antioxidante, seguido pelo de *M. viridis* e, pelo controle positivo, manitol. No entanto, pelo método do poder redutor, apenas o controle positivo BHT e óleo essencial de *M. pulegium* apresentaram atividade. Utilizando o método de redução do molibdênio, os óleos essenciais

exibiram uma atividade antioxidante um terço menor do que a observada para o controle BHT.

Foe et al. (2016) averiguaram a atividade antioxidante dos óleos essenciais extraídos das plantas de *Allium sativum*, *Allium cepa*, *Drypetes gossweileri* e *Pentadiplandra brazzeana*, coletadas em Camarões (África Central) e encontraram como constituintes majoritários o dissulfeto de dialila, para ambas as espécies *Allium*, benzilcianida e benzilisotiocianato, respectivamente; para as outras plantas e os ensaios antioxidantes empregados, foram o método de estabilização do radical DPPH e o de redução do ferro (FRAP). Os óleos essenciais apresentaram alta atividade antioxidante pelo método de estabilização do radical DPPH (*P. brazzeana* < *A. sativum* < *D. gossweileri* < *A. cepa* < ácido ascórbico), mas baixa pelo método de redução do ferro. Esses resultados sugerem que a constituição química dos óleos essenciais favorece a inibição de radicais livres; no entanto, esses óleos não são capazes de complexar metais.

## **2.6 Potencialidades biológicas dos óleos essenciais**

As plantas aromáticas têm sido utilizadas na medicina popular por possuírem atividades biológicas com efeitos terapêuticos. Além disso, os produtos dessas plantas, como os óleos essenciais, estão sendo amplamente comercializados nas indústrias farmacêuticas, agrônômicas, de alimentos e cosméticas; para serem utilizados em diversos fins, substituindo ou associando-se aos compostos empregados habitualmente. A utilidade dessas substâncias está relacionada ao seu aroma e a propriedades, como antimicrobiana, inseticida, anti-inflamatória, antioxidante e antiproliferativa.

As características odoríferas dos óleos essenciais fundamentam a sua inserção como corretivos de sabor e/ou odor em medicamentos destinados à

administração por via oral, como aromatizantes em medicamentos de uso tópico, e incorporados em alimentos processados. Além disso, a indústria farmacêutica recorre a alguns óleos essenciais para isolar compostos naturais que servem de protótipo para a síntese de outras moléculas (CAVALEIRO, 2007).

O tratamento de infecções induzidas por bactérias, fungos e vírus configura um enorme desafio nos tempos modernos, considerando os efeitos secundários de alguns fármacos e principalmente o aumento da resistência que os microrganismos estão desenvolvendo em relação aos agentes antimicrobianos. Portanto, há a necessidade de encontrar alternativas mais eficazes e seguras. Os produtos naturais, como os óleos essenciais, têm recebido muita atenção como uma nova fonte de moléculas bioativas com baixo efeito colateral e significativa atividade terapêutica (MOHAMMADI et al., 2014). Assim, cabe ressaltar que o modo de ação dos óleos essenciais pode estar relacionado com a presença de determinados compostos que têm a capacidade de modificar a permeabilidade da membrana externa dos microrganismos e/ou inibir enzimas importantes para a sua multiplicação e sobrevivência (CUNHA; ROQUE; NOGUEIRA, 2012).

Em relação a atividade inseticida dos óleos essenciais, vale destacar que a substituição dos agrotóxicos sintéticos pelos produtos naturais, geralmente atóxicos para mamíferos e específicos em sua ação, está recebendo uma atenção considerável. Nesse contexto, incluem-se principalmente os compostos derivados do metabolismo secundário, amplamente distribuídos na composição dos óleos essenciais que atuam na defesa do vegetal contra os insetos (RATTAN, 2010). Dessa maneira, a atividade dos óleos essenciais sobre os insetos pode ocorrer de diversas formas, causando mortalidade, deformações em diferentes estágios de desenvolvimento, como também repelência e deterrência, sendo a atividade repelente o modo de ação mais comum dos óleos essenciais e de seus componentes majoritários (ISMAN, 2006).

As atividades anti-inflamatória e antioxidante estão intimamente relacionadas, uma vez que quando se tem uma resposta inflamatória a agentes estranhos, ocorre a produção de espécies reativas de oxigênio. A atividade anti-inflamatória dos óleos essenciais e de seus constituintes caracteriza-se pela inibição da liberação de mediadores químicos de inflamação, como, por exemplo, citocinas, leucotrienos, prostaglandinas, etc. Uma publicação de Lima et al. (2013) refere-se ao potencial anti-inflamatório do carvacrol, constituinte encontrado em grande concentração em muitos óleos essenciais, pela redução da produção de importantes mediadores de inflamação.

Em adição, a terapêutica do câncer baseia-se em artifícios de natureza não discriminatória, acarretando, na maioria das vezes, danos colaterais às células normais. Assim, a descoberta de fármacos antineoplásicos de fácil administração e fraca indução de efeitos colaterais é a principal meta almejada por estudiosos da área (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

As plantas são importantes fontes de protótipos, e os óleos essenciais extraídos dessas, têm sido alvo para o tratamento de várias formas de neoplasias malignas. Esses produtos naturais apresentam muitos constituintes químicos e, dessa maneira, podem exibir vários mecanismos de ação, que quando testados, expressam efeitos sinérgicos ou antagonísticos (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

A medicina popular também é de grande importância no tratamento de acidentes provocados por serpentes peçonhentas, especialmente em países em desenvolvimento. Diversas espécies vegetais são utilizadas com essa finalidade por comunidades que não dispõem de acesso imediato à soroterapia tradicional (CARVALHO et al., 2013).

A procura de inibidores naturais de peçonhas de serpentes é substancial para complementar a terapia tradicional, especialmente no que se refere à neutralização de efeitos locais. Os produtos naturais são uma fonte rica de inibidores enzimáticos e de compostos farmacologicamente ativos, sendo

capazes de cessar a atividade de algumas peçonhas e de toxinas isoladas (GUIMARÃES et al., 2014).

Um grande número de extratos vegetais já foram avaliados e apresentaram atividade antiofídica por inibirem fisiopatologias causadas pelas peçonhas. Como exemplos, citam-se os extratos de *Tropaeolum majus* – Tropaeolaceae (OSTROWSKI; VALENTINI; PAVANELLI, 2014), *Renealmia alpinia* - Zingiberaceae (PATIÑO et al., 2012), *Nectandra angustifolia* – Lauraceae (TORRES et al., 2011), *Eclipta alba* - Asteraceae (DIOGO et al., 2009), *Schizolobium parahyba* – Caesalpinoideae (MENDES et al., 2008), *Casearia sylvestris* - Flacourtiaceae (CAVALCANTE et al., 2007), *Mikania glomerata* - Asteraceae (MAIORANO et al., 2005) e muitos outros.

Além dos extratos, alguns óleos essenciais já foram testados para essa finalidade. Miranda et al. (2014) demonstraram a ação inibidora do óleo essencial de folhas e rizomas de *Hedychium coronarium* sobre as atividades coagulante e fibrinogenolítica induzidas pelas peçonhas de *Lachesis muta*, *Bothrops atrox* e *Bothrops moojeni*. As inibições das atividades relatadas apontam para a presença de inibidores de proteases no óleo essencial avaliado, visto que serino e metaloproteases correspondem às principais classes de enzimas, presentes nessas peçonhas, responsáveis por alterações hemostáticas. Os autores sugerem que monoterpenos, majoritários na composição desses óleos, sejam os responsáveis pelas inibições observadas (MIRANDA et al., 2014). Em 2016, Miranda e colaboradores demonstraram que os óleos essenciais de *Conyza bonariensis* e *Tithonia diversifolia* também possuíam constituintes capazes de inibir a ação coagulante induzida pelas mesmas peçonhas, previamente descritas. Contudo, a incubação prévia do plasma sanguíneo com os óleos, procedendo com posterior adição das peçonhas, resultou em ação pró-coagulante, sugerindo possíveis interações de constituintes dos óleos com proteínas plasmáticas que participam da cascata de coagulação sanguínea. Os

mesmos autores observaram 100% de inibição da atividade fibrinogenolítica induzida pelas peçonhas de *Lachesis muta* e *Bothrops moojeni*, realizando incubações prévias dessas peçonhas com os óleos essenciais de *Ambrosia polystachya* e *Baccharis dracunculifolia* (MIRANDA et al., 2016).

Os óleos essenciais, por serem constituídos por uma ampla variedade de moléculas biologicamente ativas, possuem alto potencial de aplicação médica e científica; contudo, ainda são escassos os estudos relacionados às suas propriedades farmacológicas e toxicológicas; dessa forma, torna-se de grande valia a ampla caracterização de óleos essenciais e seus constituintes majoritários, possibilitando a determinação de futuras aplicações.

### **2.6.1 Utilização das peçonhas como ferramentas laboratoriais**

As peçonhas de serpentes têm sido extensivamente empregadas como ferramentas laboratoriais para induzir proteólise e atividades fosfolipásica, hemolítica, de agregação plaquetária e coagulação sanguínea *in vitro*, além de induzir inflamação, resposta imunológica e diversos efeitos tóxicos *in vivo*. Dessa forma, as diferentes classes de moléculas que compõem essas peçonhas são de grande valia na caracterização farmacológica e tóxica de potenciais inibidores de origem natural ou sintética.

Inibidores de proteases têm sido amplamente investigados por indústrias farmacêuticas com vistas ao desenvolvimento de fármacos de ampla aplicação, como, por exemplo, para o tratamento de doenças inflamatórias e/ou relacionadas a alterações nos metabolismos gastrointestinais (SAŁAGA; SOBCZAK; FICHNA, 2013; VERGNOLLE, 2016).

Em adição, pesquisas científicas têm feito uso de peçonhas e fosfolipases A<sub>2</sub> isoladas, como ferramentas para estudar fisiopatologias relacionadas a processos inflamatórios, assim como avaliar inibidores de



fosfolipases em busca de modelos moleculares para o desenvolvimento de fármacos (QUACH; ARNOLD; CUMMINGS, 2014; ONG et al., 2015; NOMURA; CASIDA, 2016).

A inibição exercida por óleos essenciais sobre atividades induzidas por peçonhas de serpentes de diversos gêneros direciona para novas aplicações desses compostos ou de seus constituintes, configurando também uma maneira de caracterizá-los farmacologicamente (OSTROWSKI; VALENTINI; PAVANELLI, 2014; MIRANDA et al., 2014, MIRANDA et al., 2016).

### **2.6.2 Composição química de peçonhas ofídicas, atividades farmacológicas e tóxicas**

As serpentes peçonhentas encontradas no Brasil são principalmente da família Viperidae, sendo as do gênero *Bothrops* as mais comuns e responsáveis por mais de 80% dos acidentes ofídicos, seguido pelos gêneros *Crotalus* (9,2%) e *Lachesis* (2,7%) (BRASIL, 2012).

Os sinais clínicos e a patologia decorrente dos envenenamentos ofídicos estão relacionados à composição das peçonhas (como exemplificado no Quadro 1) e apresentam variações tanto entre gêneros distintos, como entre as diferentes espécies que compõem um mesmo gênero (BRASIL, 2012).

Segundo Morais e colaboradores (2012), as peçonhas de serpentes podem induzir efeitos locais, como hemorragia, necrose, edema e dor intensa, e efeitos sistêmicos, como coagulopatia, hemorragia interna, choque cardiovascular e insuficiência renal aguda.

Quadro 1 - Efeitos das peçonhas ofídicas de acordo com suas atividades fisiopatológicas.

<b>Atividades</b>	<b>Peçonhas</b>	<b>Efeitos</b>
Inflamatória aguda	Botrópicas e laquélicas	Lesão endotelial e necrose no local da picada; liberação de mediadores inflamatórios
Coagulante	Botrópicas, laquélicas e crotálicas	Incoagulabilidade sanguínea
Hemorrágica	Botrópicas e laquélicas	Sangramentos na região da picada (equimose) e a distância (gengivorragia, hematúria, etc)
Neurotóxica	Crotálicas e elapídicas	Bloqueio da junção neuromuscular (paralisia de grupos musculares)
Miotóxica	Crotálicas	Rabdomiólise (mialgia generalizada, mioglobínúria)
“Neurotóxica” vagal	Laquélicas	Estimulação colinérgica (vômitos, dor abdominal, diarreia, hipotensão, choque)

Fonte: Brasil (2012).

As peçonhas de serpentes correspondem a complexas misturas de moléculas bioativas compostas predominantemente por proteínas. Essas moléculas compreendem cerca de 90 a 95% do peso seco das peçonhas, incluindo enzimas, toxinas não enzimáticas e proteínas não tóxicas. As frações não proteicas são constituídas por cátions metálicos, carboidratos, nucleosídeos, aminas biogênicas e quantidades menores de aminoácidos livres e lipídios (CUNHA; MARTINS, 2012).

A fração proteica das peçonhas é responsável por interferir na hemostasia, em processos inflamatórios e por causarem hemorragias, podendo destacar as fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s), as metaloproteases, serinoproteases, L-aminoácido oxidases, hialuronidases e outras, como desintegrinas (ligam-se especificamente em integrinas) e lectinas tipo-C (ligam-se especificamente em

carboidratos de superfície celular), que não apresentam ação enzimática mas interferem em diversas funções celulares (GAY et al., 2005).

A constituição complexa faz com que essas peçonhas apresentem diferentes atividades farmacológicas, além de desempenhar importante papel como arma ofensiva, incapacitando e imobilizando sua presa (função principal), na defesa contra predadores (função secundária) e para auxiliar na digestão (WARRELL, 2010).

As classes das enzimas de peçonhas de serpentes, fosfolipases A<sub>2</sub> e proteases em geral, serão destacadas pelo fato de os testes *in vitro* utilizados neste trabalho avaliarem a inibição ou potencialização, das atividades exercidas por essas enzimas, induzidas por constituintes dos óleos essenciais em estudo.

### 2.6.2.1 Fosfolipases A<sub>2</sub>

As fosfolipases apresentam a função de catalisar a hidrólise da ligação 2-acil éster de 3-*sn* em fosfolípidios de membrana, liberando ácidos graxos livres e lisofosfolípidios (Figura 14), podendo causar danos em diferentes tipos celulares e tecidos biológicos, contribuindo, assim, para a formação de edema e demais alterações fisiológicas resultantes da ação de mediadores inflamatórios produzidos a partir da estrutura do ácido araquidônico, que, por sua vez, corresponde a um dos ácidos graxos liberados pela hidrólise de fosfolípidios (HIGUCHI et al., 2007).

Figura 14 - Ação da fosfolipase A<sub>2</sub> sobre fosfolípido de membrana. (Continua)

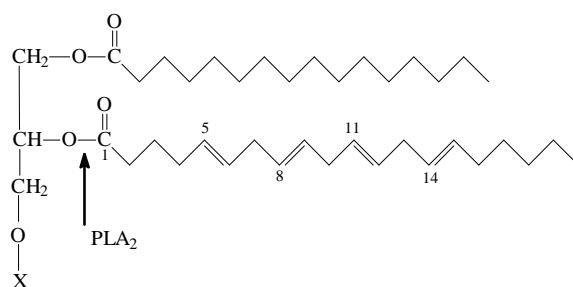
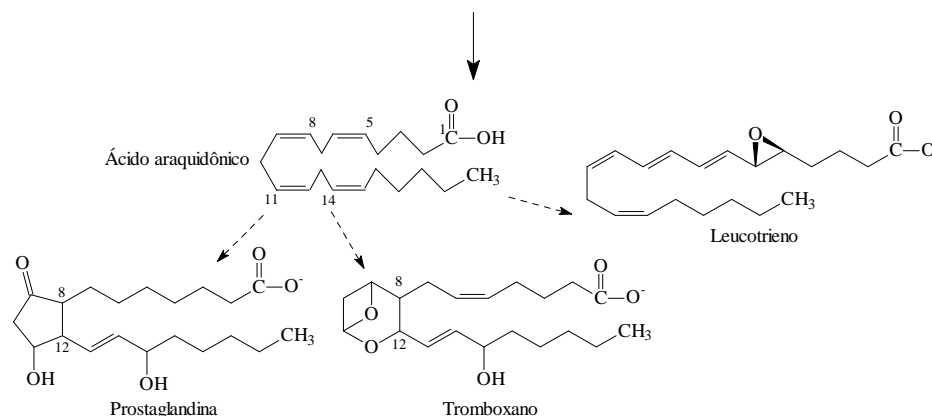


Figura 14 - Ação da fosfolipase A<sub>2</sub> sobre fosfolípido de membrana. (Conclusão)



Fonte: Nelson e Cox (2014).

A superfamília das fosfolipases é dividida em 5 classes diferentes e as fosfolipases secretórias de peçonhas de serpentes são divididas em dois grupos, sendo GI (provenientes de peçonhas da família Elapidae) e GII (peçonhas da família Viperidae e subfamília Crotalinae) (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

O grupo II é subdividido em fosfolipases Asp49 e Lys49. A primeira possui um resíduo de aspartato na posição 49, apresentando alta atividade catalítica sobre substratos artificiais, e a segunda, possui um resíduo de lisina na mesma posição, apresentando pouca ou nenhuma atividade catalítica (SOARES; FONTES; GIGLIO, 2004).

As PLA<sub>2</sub>s de peçonhas de serpentes cataliticamente ativas estão associadas com atividades farmacológicas e/ou tóxicas, como, por exemplo, efeitos sobre plaquetas, neurotoxicidade, atividade anticoagulante e miotoxicidade (DE PAULA et al., 2009). Para exercer sua ação catalítica, essas enzimas necessitam de íons cálcio como cofator (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As PLA<sub>2</sub>s são enzimas que correspondem à maior porcentagem do conteúdo proteico das peçonhas de serpentes, sendo atribuída a elas uma grande variedade de efeitos farmacológicos (DOLEY; ZHOU; KINI, 2010).

#### **2.6.2.2 Proteases (metaloproteases e serinoproteases)**

As peçonhas de serpentes possuem enzimas proteolíticas, como metaloproteases e serinoproteases, que afetam o sistema hemostático por diversos mecanismos.

As metaloproteases de peçonhas de serpentes (SVMPs – *Snake Venom Metalloproteinases*) abrangem um grande grupo de enzimas dependentes de zinco (Zn<sup>2+</sup>), que são capazes de lisar proteínas da membrana dos vasos sanguíneos, ou seja, degradam os componentes da membrana basal vascular, permitindo o extravasamento do sangue, e como consequência, causam hemorragias locais e sistêmicas (FOX; SERRANO, 2005). A toxicidade dessas enzimas também está relacionada à patogenia da mionecrose local, aos danos teciduais (como edema, necrose e apoptose) e às reações inflamatórias (ZYCHAR et al., 2010). Estima-se que 32% no mínimo das enzimas presentes nas peçonhas da família Viperidae sejam metaloproteases (FOX; SERRANO, 2005).

De maneira geral, a atividade *in vitro* das metaloproteases está correlacionada com a proteólise dos elementos da matriz extracelular (colágeno tipo IV, laminina, fibronectina), das proteínas do plasma (fibrinogênio, fibrina, fator de Willenbrand, protrombina) e das proteínas da superfície celular (integrinas e caderinas). Além do mais, as metaloproteases de peçonhas podem interagir com receptores das plaquetas, de células endoteliais e fibroblastos, ativando ou inibindo a resposta celular (MOURA-DA-SILVA; BUTERA; TANJONI, 2007).

Assim, metaloproteases têm sido amplamente isoladas e caracterizadas e algumas delas já possuem aplicação clínica, como, por exemplo, Ancrod ou Viprinex®, que corresponde a uma protease isolada da peçonha de *Calloselasma rhodostoma*, com função no tratamento de eventos trombóticos.

As serinoproteases de peçonhas de serpentes (SVSPs – *Snake Venom Serineproteases*) pertencem a uma grande família de peptidases responsáveis pelas alterações no sistema hemostático, como descrito anteriormente, pela ativação dos fatores de coagulação sanguínea, pela inibição da agregação plaquetária e por atuarem sobre os sistemas fibrinolíticos e da calicreína-cinina (SERRANO; MAROUN, 2005).

A grande maioria dessas enzimas, por serem capazes de promover a coagulação, assemelham-se à trombina, sendo assim denominadas enzimas trombina-símile de peçonhas de serpentes. Essas enzimas são responsáveis pela formação do coágulo de fibrina ao final da cascata de coagulação sanguínea (CASTRO et al., 2004) e, por serem consideradas trombina-símile, podem ser classificadas em três categorias: AB: enzimas que semelhantes à trombina, convertem o fibrinogênio em fibrina pela hidrólise das cadeias A $\alpha$  e B $\beta$ , liberando os fibrinopeptídeos A e B; A: clivam apenas a cadeia A $\alpha$  do fibrinogênio; e B: apenas a cadeia B $\beta$  do fibrinogênio (SERRANO; MAROUN, 2005). Apesar de possuírem uma atividade semelhante à trombina, orientam apenas a formação de um coágulo frouxo, uma vez que não são capazes de ativar o fator XIII da cascata de coagulação, responsável pela estabilização do coágulo de fibrina (BRAUD; BON; WISNER, 2000).

As serinoproteases também podem apresentar outras atividades biológicas, como a ativação do sistema complemento e do processo inflamatório, participam do processo de diferenciação celular e também podem atuar sobre o sistema nervoso (WU et al., 2001). Essas enzimas, quando exercem atividade de forma isolada, não são consideradas letais, mas contribuem para o efeito tóxico

quando exercem suas funções juntamente às demais proteínas que compõem as peçonhas (BRAUD; BON; WISNER, 2000).

O interesse médico-científico pelas enzimas trombina-símile tem aumentado muito nos últimos anos, por suas diferenças quando comparadas com a própria trombina (MARSH; WILLIAMS, 2005). Na clínica médica, essas serinoproteases são promissoras como agentes defibrinogénantes, podendo ser utilizadas em pessoas com trombose, infarto do miocárdio, doenças periféricas e isquemia aguda (STOCKER; MEIER, 1988).

Como exemplo de aplicação, pode ser citada a serinoprotease Batroxobin, isolada de peçonha de serpentes da espécie *Bothrops moojeni*, que é comercializada com o nome Defibrase (Pentapharm), sendo utilizada em terapias de infarto cerebral agudo, angina pectoris inespecífica e surdez súbita.

## REFERÊNCIAS

ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 414-420, mar./abr. 2010.

ALVES, C. K. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, out. 2010.

ANDRADE, M. A. et al. Biological activity of the essential oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 46, n. 1, p. 189-194, Jan./Mar. 2015.

ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr./jun. 2012.

AZEVEDO, C. M. O. et al. *In vitro* biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, Chichester, v. 14, p. 1-8, Aug. 2014.

BANDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores. Vitória: EDUFES, 2008. 623 p.

BHALLA, Y.; GUPTA, V. K.; JAITAK, V. Anticancer activity of essential oils: a review. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 93, n. 15, p. 3643-3653, Dec. 2013.

BORGES, A. R. et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, San Diego, v. 132, n. 2, p. 123-128, Oct. 2012.

BORGES, L. L. et al. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopedia Biosfera**: Centro Científico Conhecer, Goiânia, v. 7, n. 12, p. 1-20, maio 2011.



BOTREL, R. T. et al. Uso da vegetação nativa pela população local no município de Ingaí, MG, Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 20, n. 1, p. 143-156, 2006.

BOTTERWECK, A. A. M. et al. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 38, n. 7, p. 599-606, July 2000.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Boletim eletrônico epidemiológico**. 2012. Disponível em: <[http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim\\_eletronico\\_02\\_ano10.pdf](http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/boletim_eletronico_02_ano10.pdf)>. Acesso em: 10 maio 2016.

BRAUD, S.; BON C.; WISNER, A. Snake venom acting on hemostasis. **Biochimie**, Paris, v. 82, n. 9-10, p. 851-859, Sept./Oct. 2000.

BUENO, O. L.; LEONHARDT, C. Distribuição e potencial paisagístico dos gêneros *Citharexylum* L. e *Verbenoxylum* Tronc. no Rio Grande do Sul, Brasil. **Iheringia**, Porto Alegre, v. 66, n. 1, p. 47-60, jul. 2011.

CABALLERO-GALLARDO, K.; OLIVERO-VERBEL, J.; STASHENKO, E. E. Repellency and toxicity of essential oils from *Cymbopogon martinii*, *Cymbopogon flexuosus* and *Lippia organoides* cultivated in Colombia against *Tribolium castaneum*. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 50, p. 62-65, July 2012.

CARVALHO, B. M. A. et al. Snake venom PLA<sub>2</sub>s inhibitors isolated from brazilian plants: synthetic and natural molecules. **BioMed Research International**, London, v. 2013, p. 1-8, Aug. 2013.

CASTRO, H. C. et al. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **CMLS: cellular and molecular life sciences**, Basel, v. 61, n. 7-8, p. 843-856, Apr. 2004.

CAVALCANTE, W. L. G. et al. Neutralization of snake phospholipase A<sub>2</sub> toxins by aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) in mouse neuromuscular preparation. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 112, n. 3, p. 490-497, July 2007.

CAVALEIRO, C. Plantas aromáticas e óleos essenciais em farmácia e medicina. In: \_\_\_\_\_. **Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais**. 3. ed. Lisboa: Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências, 2007. p. 55-62.

COMBRICK, S. et al. Morphology and histochemistry of glandular trichomes of the *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). **Annals of Botany**, London, v. 99, n. 6, p. 1111-1119, Apr. 2007.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 2, n. 1, p. 47-58, ago. 2010.

CUNHA, A. P.; ROQUE, O.; NOGUEIRA, M. **Plantas aromáticas e óleos essenciais composição e aplicações**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2012. 678 p.

CUNHA, E. M.; MARTINS, O. A. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* – uma revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, Avaré, v. 2, n. 2, p. 21-26, 2012.

DE PAULA, R. C. et al. Structural and pharmacological features of phospholipases A<sub>2</sub> from snake venoms. **Protein & Peptide Letters**, Hilversum, v. 16, n. 8, p. 899-907, Feb. 2009.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3. ed. Hoboken: J. Wiley, 2009. 327 p.

DIOGO, L. C. et al. Inhibition of snake venoms and phospholipases a<sub>2</sub> by extracts from native and genetically modified *Eclipta alba*: isolation of active coumestans. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Copenhagen, v. 104, n. 4, p. 293-299, Apr. 2009.

DOLEY, R.; ZHOU, X.; KINI, M. Snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. In: MACKESSY, S. **Handbook of venoms and toxins of reptiles**. 1. ed. Boca Raton: Taylor & Francis, 2010. p. 173-205.

FIGUEIREDO, A. C. S.; PEDRO, L. G. M.; BARROSO, J. M. G. Plantas aromáticas e medicinais - óleos essenciais e voláteis. **Revista da Associação Portuguesa de Horticultura**, Lisboa, v. 114, p. 29-33, 2014.

FOE, F. M. C. N. et al. Chemical composition, *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oils of four dietary and medicinal plants from Cameroon. **BioMed Research International**, London, v. 16, p. 117-128, Apr. 2016.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, Elmsford, v. 45, n. 8, p. 969-985, June 2005.

GAY, C.C. et al. Proteolytic, edematogenic and myotoxic activities of a hemorrhagic metalloproteinase isolated from *Bothrops alternatus* venom. **Toxicon**, Elmsford, v. 46, n. 5, p. 546-554, Oct. 2005.

GUIMARÃES, C. L. et al. Biodiversity as a source of bioactive compounds against snakebites. **Current Medicinal Chemistry**, Schiph, v. 21, n. 25, p. 2952-2979, 2014.

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

HARLEY, R. et al. **Lamiaceae in lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2016. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB142>>. Acesso em: 17 mar. 2016.

HIGUCHI, D. A. et al. Purification and partial characterization of two phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, Paris, v. 89, p. 319-328, 2007.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 51, p. 45-66, July 2006.

JAYAPRAKASHA, G. K. et al. Antioxidant and antimutagenic activities of *Cinnamomum zeylanicum* fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 3-4, p. 330-336, May 2007.

LEITE, J. P. V. Desenvolvimento da fitoterapia. In:\_\_\_\_\_. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Atheneu, 2008. Cap. 1, p. 3-20.

LEMES, G. F.; FERRI, P. H. Constituintes químicos de *Hyptidendron canum* (Pohl ex Benth.) R. Harley (Lamiaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 1, p. 39-42, 2011.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 293-303, set./dez. 2001.

LIMA, M. S. et al. Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 699, n. 1-3, p. 112-117, Jan. 2013.

LIMA, R. K. et al. Bactericidal and antioxidant activity of essential oils from *Myristica fragrans* houtt and *Salvia microphylla* H.B.K. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Urbana, v. 89, n. 3, p. 523-528, Mar. 2012.

LOPES-LUTZ, D. et al. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. **Phytochemistry**, New York, v. 69, n. 8, p. 1732-1738, May 2008.

MAIORANO, V. A. et al. Antiophidian properties of the aqueous extract of *Mikania glomerata*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 102, n. 3, p. 364-370, Dec. 2005.

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, Elmsford, v. 45, n. 8, p. 1171-1181, June 2005.

McNEIL, M.; FACEY, P.; PORTER, R. Essential oils from the *Hyptis* genus-a review (1909-2009). **Natural Product Communications**, Westerville, v. 6, n. 11, p. 1775-1796, Nov. 2011.

MELO, J. I. M. et al. Verbenaceae *Sensu lato* em um trecho da Esec Raso da Catarina, Bahia, Brasil. **Revista Caatinga**, Mossoró, v. 23, n. 3, p. 41-47, ago. 2010.

MENDES, M. M. et al. Anti-snake-venom properties of *Schizolobium parahyba* (Caesalpinaideae) aqueous leaves extract. **Phytotherapy Research**, London, v. 22, n. 7, p. 859-866, July 2008.

MESA, A. C. et al. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 6, p. 878-884, set. 2009.

MIGUEL, M. G. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants: a review. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 25, n. 5, p. 291-312, Sept./Oct. 2010.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Clotting and fibrinogenolysis inhibition by essential oils from species of the Asteraceae family. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 59, e16150775, June 2016.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Preliminary assessment of *Hedychium coronarium* essential oil on fibrinogenolytic and coagulant activity induced by *Bothrops* and *Lachesis* snake venoms. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 20, n. 39, p. 1-8, Sept. 2014.

MOHAMMADI, A. et al. Antifungal activities and chemical composition of some medicinal plants. **Journal de Mycologie Médicale**, Paris, v. 24, n. 2, p. e1-e8, June 2014.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food componentes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, Jan. 2009.

MORAIS, N. C. G. et al. Isolation and characterization of moojenin, an acid-active, anticoagulant metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. **Toxicon**, Elmsford, v. 60, n. 7, p. 1251-1258, Dec. 2012.

MOURA-DA-SILVA, A. M.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of snake venom metalloproteinases in cell biology: effects on platelets, inflammatory and endotelial cells. **Current Pharmaceutical Design**, San Francisco, v. 13, n. 28, p. 2893-2905, 2007.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 1328 p.

NOGUEIRA SOBRINHO, A. C. et al. Chemical composition, antioxidant, antifungal and hemolytic activities of essential oil from *Baccharis trinervis* (Lam.) Pers. (Asteraceae). **Industrial Crops and Products**: an international journal, Amsterdam, v. 84, p.108-115, June 2016.

NOMURA, D. K.; CASIDA, J. E. Lipases and their inhibitors in health and disease. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, p. 1-12, Apr. 2016. In Press. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0009279716301181>>. Acesso em: 10 maio 2016.

OLIVEIRA, C. M. et al. Chemical characterization and *in vitro* antitumor activity of the essential oils from the leaves and flowers of *Callistemon viminalis*. **American Journal of Plant Sciences**, Washington, v. 6, n. 16, p. 2664-2671, Oct. 2015.

OLIVEIRA, C. M. et al. Chemical composition and allelopathic activity of the essential oil from *Callistemon viminalis* (Myrtaceae) blossoms on lettuce (*Lactuca sativa* L.) seedlings. **American Journal of Plant Sciences**, Washington, v. 5, n. 24, p. 3551-3557, Nov. 2014.

OLSZEWER, E. **Clínica ortomolecular**. 2. ed. São Paulo: Rocca, 2008. 544 p.

ONG, W. Y. et al. Synthetic and natural inhibitors of phospholipases A<sub>2</sub>: their importance for understanding and treatment of neurological disorders. **ACS Chemical Neuroscience**, Washington, v. 6, n. 6, p. 814-831, June 2015.

OSTROWSKI, A. P.; VALENTINI, S. A.; PAVANELLI, M. F. Atividade anticoagulante do extrato aquoso, hidroetanólico e óleo essencial das folhas de *Tropaeolum majus*. **SaBios: revista de saúde e biologia**, Campo Mourão, v. 9, n. 2, p. 46-53, maio/ago. 2014.

PATIÑO, A. C. et al. Efecto inhibitorio de extractos de *Renealmia alpinia* Rottb. Maas (Zingiberaceae) sobre el veneno de *Bothrops asper* (mapaná). **Biomédica: revista del Instituto Nacional de Salud**, Bogotá, v. 32, n. 3, p. 365-374, Mar. 2012.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, v. 3, n. 4, p. 146-152, Nov. 2012.

PINTO, C. P. et al. Antimicrobial activity of *Lippia* species from the Brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2013, p. 1-5, Aug. 2013.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 269, n. 2, p. 337-341, May 1999.

QUACH, N. D.; ARNOLD, R. D.; CUMMINGS, B. S. Secretory phospholipase A<sub>2</sub> enzymes as pharmacological targets for treatment of disease. **Biochemical Pharmacology**, New York, v. 90, n. 4, p. 338-348, Aug. 2014.

RATHER, M. A. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oil of *Juglans regia* L. and its constituents. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 19, n. 13, p. 1185-1190, Oct. 2012.

RATTAN, R. S. Mechanism of action of insecticidal secondary metabolites of plant origin. **Crop Protection**, Guildford, v. 29, n. 9, p. 913-920, Sept. 2010.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes usados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, jul./ago. 2006.

SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, London, v. 91, n. 4, p. 621-632, Aug. 2005.

SALAŁAGA, M.; SOBCZAK, M.; FICHNA, J. Inhibition of proteases as a novel therapeutic strategy in the treatment of metabolic, inflammatory and functional diseases of the gastrointestinal tract. **Drug Discovery Today**, Kidlington, v. 18, n. 15-16, p. 708-715, Aug. 2013.

SALIMENA, F. R. G. et al. **Verbenaceae in lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico, 2016. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB246>>. Acesso em: 11 mar. 2016.

SANTOS, M. H. et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 604-610, maio/jun. 2007.

SARRAZIN, S. L. et al. Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Molecules**, Basel, v. 20, n. 2, p. 1860-1871, Jan. 2015.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipases A<sub>2</sub> superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1761, n. 11, p. 1246-1259, Nov. 2006.

SERRANO, S. M.; MAROUN, R. C. Snake venom serino proteinases: sequence homology vs. Substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, Elmsford, v. 45, n. 8, p. 1115-1132, June 2005.

SILVA, I. C.; MOURA, R. B. Espécies de Asteraceae e Lamiaceae usadas na medicina popular da região Sudeste para problemas respiratórios: o que as evidências científicas indicam. **Revista Fitos**, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 21-28, dez. 2011.

SILVA, L. F. et al. Óleo essencial de *Satureja montana* L.: análise cromatográfica, determinação das atividades antioxidante e antifúngica. **Exacta**, Belo Horizonte, v. 8, n. 2, p. 55-63, nov. 2015.

SILVA-LUZ, C. L. et al. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Lamiaceae. **Boletim de Botânica**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 109-155, 2012.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia**: da planta ao medicamento. 6. ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.

SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Phospholipases A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. **Current Organic Chemistry**, Hilversum, v. 8, n. 17, p.1677-1690, Nov. 2004.

SOUSA, C. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, Jan. 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. 3. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 2012. 768 p.

STASHENKO, E. E. et al. Composition and antioxidant activity of essential oils of *Lippia organoides* H. B. K. grown in Colombia. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 3, n. 4, p. 563-566, Jan. 2008.

STOCKER, K.; MEIER, J. Trombin-like snake venom enzymes. In: PIRKLE, H.; MARHLAND, F. S. **Hemostasis and animal venoms**. New York: M. Dekker, 1988. v. 7, p. 67-84.



SVOBODA, K. P.; GREENAWAY, R. I. Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L. (summer savory) and phytochemical comparison of different varieties. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 13, n. 4, p. 196-202, Apr. 2003.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.

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**, Washington, v. 5, n. 9, p. 1181-1190, 2014.

TORRES, A. M. et al. Neutralizing effects of *Nectandra angustifolia* extracts against *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 6, n. 9, p. 1393-1396, Sept. 2011.

UNITED NATIONS COMMODITY TRADE STATISTICS DATABASE. **COMTRADE**. Disponível em: <<http://comtrade.un.org/>>. Acesso em: 17 mar. 2016.

VERGNOLLE, N. Protease inhibition as new therapeutic strategy for GI diseases. **Gut Online**, v. 12, p. 1-11, Apr. 2016. Disponível em: <<http://gut.bmj.com/content/early/2016/04/12/gutjnl-2015-309147.full.pdf+html>>. Acesso em: 10 maio 2016.

VICUÑA, G. C.; STASHENKO, E. E.; FUENTES, J. L. Chemical composition of the *Lippia origanoides* essential oils and their antigenotoxicity against bleomycin-induced DNA damage. **Fitoterapia**, Milano, v. 81, n. 5, p. 343-349, July 2010.

WARRELL, D. A. Snake bite. **Lancet**, London, v. 375, n. 9708, p. 77-88, Jan. 2010.

WU, W. B. et al. Purification, molecular cloning and mechanism of action of graminelysin I, a snake-derived metalloproteinase that induces apoptosis of human endothelial cells. **The Biochemical Journal**, London, v. 357, n. 3, p. 719-728, Aug. 2001.

YE, C. L.; DAI, D. H.; HU, W. L. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil from onion (*Allium cepa* L.). **Food Control**, Amsterdam, v. 30, n. 1, p. 48-53, Mar. 2013.

ZYCHAR, B. C. et al. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A<sub>2</sub> to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon**, Elmsford, v. 55, n. 2-3, p. 227-234, Feb./Mar. 2010.

## SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

### **ARTIGO 1 - Chemical composition of the essential oil from *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) Harley & J.F.B.Pastore as a function of the year of collection**

Artigo submetido ao Conselho Editorial do periódico “**Journal of Essential Oil Research**” e formatado conforme normas do referido periódico.

#### **Chemical composition of the essential oil from *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore as a function of the year of collection**

#### **Abstract**

Essential oils are odorous compounds stored in special cells of plants and often have functional properties of exceptional importance. The objective of this study was to evaluate the influence of the year of collection on the content and the composition of the essential oil from *Cantinoa carpinifolia* (Benth.). There are few studies regarding the metabolites of this species. The essential oils were extracted by hydrodistillation using a modified Clevenger apparatus in March of 2014 and 2015. The identification and quantification of chemical constituents were accomplished by gas chromatography coupled to mass spectrometry and by gas chromatography equipped with a flame ionization detector. The yield of the essential oil from the fresh leaves in 2014 (0.48%) was higher than that from that obtained in 2015 (0.31%). The principal components were  $\alpha$ -Thujone (32.15 and 29.21%),  $\beta$ -Thujone (22.22 and 35.88%),  $\beta$ -Caryophyllene (8.74 and 5.28%) and Sabinene (6.65 and 5.61%), respectively, these being principally oxygenated monoterpenes (67.83 and 77.17%). These variations in the composition of the

essential oil from *Cantinoa carpinifolia* may have been influenced by environmental factors (precipitation and temperature), because the plant was collected in different years and in the same location.

Keywords: Lamiaceae; edaphoclimatic factors; natural products; thujone.

## Introduction

Brazil has an exceptional variety of flora, and the study of the functional properties of the species that compose it is necessary. The Lamiaceae family belongs to the Tubiflorae (Lamiales) order and includes about 200 genera and approximately 3200 species distributed throughout the world. Among these genera, the *Hyptis* Jacq. (*Cantinoa*), which is composed of about 300 widely distributed species, occurs in tropical semi-arid regions of America and Africa [1]. The group is characterized by the presence of strongly aromatic plants, herbaceous shrubs, quadrangular stems, and flowers with stamens attached to the lower lip of the corolla [2].

The diversity of the biological activities of the *Hyptis* genera has led to studies of the chemical composition of essential oils present in the plants. Currently, the *Hyptis carpinifolia* species was reassigned to the genus *Cantinoa*, being renamed *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) Harley & J.F.B.Pastore [3]. However, few studies exist regarding the species.

*Cantinoa carpinifolia* Benth., popularly known as “rosmaninho” (rosemary) or rasmaninho, can be found among different vegetation types such as cerrada, dirty fields, grasslands, rocky fields, gallery forests, edges and slopes [4]. It is a plant widely used in folk medicine for the treatment of diseases such as colds, flu and rheumatism. The leaves are usually subjected to infusion and compresses [5]. In addition to these two forms of use of the plant, active

substances such as essential oils can also be obtained from the plants. These oils are characterized as secondary metabolites produced by plants that, depending on the family, occur in specialized secretory structures. They are also characterized as complex mixtures of organic compounds and are associated with various fundamental functions for the survival of the plants [6].

The compositions of the essential oils of plants of the genus *Hyptis* (*Cantinoa*) are very complex and include several classes of secondary metabolites that include monoterpene and sesquiterpene hydrocarbons and their oxygenated analogs, among other classes. These compounds are probably synthesized via the mevalonate or deoxyxylulose phosphate (DXP) pathways. However, constituents synthesized via do shikimate (phenylpropanoid) pathway are generally not observed in this genus.

In addition to the complex chemical compositions of these essential oils, other factors (genetic or edaphoclimatic) tend to influence the synthesis of these metabolites, directing the metabolic pathway for the formation of different chemical constituents. These differences in the constitution significantly influence their biological properties. The objectives of this work were to determine the content and chemically characterize the essential oil extracted from the leaves of *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) Harley & J.F.B.Pastore plants collected in March 2014 and March 2015.

## **Material and Methods**

### ***Collection of plant material***

The *Cantinoa carpinifolia* plant was collected in the municipality of Itumirim, Minas Gerais, Brazil, at the geographical coordinates, latitude 21° 19' 01" S, longitude 44° 52' 16" W and altitude 871 m, in March 2014 and March 2015.

The plant material was sent to the Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais of the Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras (UFLA), and the leaves were cleaned and separated according to the degree of imperfection.

For the botanical identification of the species, leaves, flowers and fertile branches were collected at the same site and sent to the ESAL Herbarium, located in the Departamento de Biologia of the UFLA. The *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) Harley & J.F.B.Pastore species was identified by Dr. Mariana Esteves Mansaranes, Departamento de Biologia of the UFLA, and a voucher specimen was deposited under the herbarium number 28489.

#### ***Extraction of essential oils***

The essential oils were extracted in the Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais of the Universidade Federal de Lavras by hydrodistillation using a modified Clevenger apparatus [7]. Approximately 320 g of fresh leaves was placed in a round bottom flask (5 liters) with 2500 mL of distilled water. Three extractions were performed by distilling over a 2 hours period. The essential oil was separated from the hydrolact by centrifugation using a bench centrifuge with a horizontal crosspiece (FANEM model 206 Baby®I BL) at 965 g for 5 minutes. The oil was removed with the aid of a Pasteur pipette, transferred to a glass vial protected from light and moisture, and stored at low temperature.

#### ***Determination of moisture***

To a 250 mL round bottom flask equipped with a Dean-Stark apparatus was added 5 g of fresh plant material in 80 mL of cyclohexane. The mixture was

heated under reflux for 2 hours, and the volume of water that distilled was measured [8]. The yield of essential oil was calculated and expressed in weight of oil per gram of material on a dry weight basis (DWB).

### ***Identification and quantification of the constituents of essential oils***

The identification of the chemical constituents of the essential oils was accomplished by gas chromatography coupled to mass spectrometry (Shimadzu model QP 5050A GC-MS) at the Central de Análises e Prospecção Química of the Universidade Federal de Lavras. The following conditions were employed: fused silica capillary column (30 m x 0.25 mm) with a DB 5 (0.25 mm thick film) bonded phase. The carrier gas was He with a flow rate of 1.18 mL min<sup>-1</sup>; the temperature was programmed from 60 °C, followed by an increase of 3 °C min<sup>-1</sup> up to 240 °C, then at 10 °C to 300 °C, where the temperature was maintained for 7 minutes. The injector temperature was 220 °C, the ion source temperature, was 200 °C and the detector (or interface) temperature was 240 °C; the injected sample volume was 1.0 µL in hexane; the split ratio was 1:100, and the column pressure was 71.0 kP. The mass spectrometer conditions were: scanning detector, 1.000; scan interval of 0.50 fragments and fragments detected in the range of 45 to 500 Da. The Van den Dool and Kratz equation with a homologous series of n-alkanes (nC<sub>8</sub>-nC<sub>18</sub>) was used to calculate the retention ratio. The identification of the components was achieved by comparison of the retention indices with those of the literature [9]. Two NIST107 and NIST21 libraries that enable the comparison of data from the spectra with those existing in the libraries were used. The quantitative assessment was accomplished on a Shimadzu GC-17A gas chromatograph equipped with a flame ionization detector (FID), and the operating conditions were the same as those employed in

the identification of the constituents of oils by GC-MS, however, the detector temperature was 300 °C.

## Results and Discussion

### *Yield*

The yields of essential oils from the fresh material according to the year of collection are shown in Table 1. The yield of the essential oil was 0.48% for the fresh leaves of *Cantinoa carpinifolia* in 2014 and 0.31% for the fresh leaves collected in 2015.

Table 1. Yields of the essential oils from *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) Harley & J.F.B.Pastore as a function of the year of collection

<b>Year of collection</b>	<b>Moisture content (%)</b>	<b>Essential oil (% w/w DWB)</b>
<b>1<sup>st</sup> extraction 2014</b>	33	0.48
<b>2<sup>st</sup> extraction 2015</b>	30	0.31

\* Dry Weight Basis (DWB).

Silva et al. (2013) [10] obtained a yield of 0.2% on a dry-weight basis for the essential oil from the leaves of *Hyptis villosa* Pohl. Benth. (Lamiaceae). According to these authors, the low yield of the essential oil from that species is similar to the yields obtained by other researchers with other plants of this genus. This low yield appears to be characteristic of the *Hyptis* (*Cantinoa*) genus [11,12,13,14,15]. These results corroborate those found in the present study because, even if there is a difference in yield between the years of collection (a higher yield was obtained in 2014), the yields are still very low.



According to Burt (2004) [16], these variations in the yields of the essential oil from the same species of plant can be attributed to differences in harvest season, soil type, regional climate, relative humidity on the day of harvest, among other factors. Thus, the change in yield of the essential oil can be attributed to climate parameters such as air temperature and precipitation in the years before the collection because the plants were collected in the same place and the same time of year.

#### ***Identification and quantification of the constituents in the essential oils***

Sixteen constituents were identified in the essential oils from *Cantinoa carpinifolia* and are described in Table 2. The major constituents in the material collected in the years 2014 and 2015 were, respectively,  $\alpha$ -Thujone (32.15 and 29.21%),  $\beta$ -Thujone (22.22% and 35.88%),  $\beta$ -Caryophyllene (8.74% and 5.28%) and Sabinene (6.65% and 5.61%). The structures are shown in Figure 1. The oils contained the same constituents, but they differed in their proportions, so the diastereoisomer present in greater concentration in the essential oil of the plant collected in 2014 was  $\alpha$ -Thujone and that collected in 2015 was the  $\beta$ -Thujone.

Table 2. Chemical composition of the essential oil of *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) Harley & J.F.B.Pastore leaves as a function of the year of collection

Peak	Compounds	RT	RI cal	%	
				1 <sup>st</sup> extraction	2 <sup>st</sup> extraction
				2014	2015
1	Sabinene	7.311	921	6.65	5.61
2	$\beta$ -Pinene	7.495	923	1.11	0.87
3	Octan-3-ol	8.010	929	0.89	0.85
4	1,8-Cineole	9.318	1003	2.95	3.96

5	$\alpha$ -Thujone	12.240	1091	32.15	29.21
6	$\beta$ -Thujone	12.691	1094	22.22	35.88
7	Dihydrocarveol	13.476	1099	0.69	1.22
8	Verbenol	13.839	1101	1.00	0.42
9	<i>cis</i> -Pinocamphone	15.108	1109	6.39	4.83
10	Terpinen-4-ol	15.289	1110	1.45	0.71
11	$\alpha$ -Terpineol	15.911	1114	0.98	0.94
12	$\alpha$ -Copaene	23.665	1293	4.57	2.46
13	$\beta$ -Caryophyllene	25.510	1379	8.74	5.28
14	$\alpha$ -Humulene	26.958	1383	0.71	0.30
15	Germacrene-D	28.015	1387	6.34	3.47
16	Caryophyllene oxide	32.012	1481	3.16	3.99
<b>Grouped components</b>					
Monoterpene hydrocarbons				7.76	6.48
Oxygenated monoterpenes				67.83	77.17
Sesquiterpene hydrocarbons				20.36	11.51
Oxygenated sesquiterpene				3.16	3.99
Others				0.89	0.85

\*RT = Retention time; R<sub>ical</sub> = calculated retention index; % = percentage

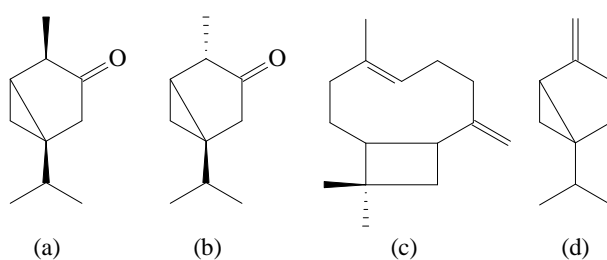


Figure 1. Chemical structures of the major compounds present in the essential oil from *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) (a)  $\alpha$ -Thujone, (b)  $\beta$ -Thujone, (c)  $\beta$ -Caryophyllene and (d) Sabinene

Verma, Padalia, Chauhan (2015) [17] studying the essential oil chemical composition of *Salvia officinalis* L. collected in northern India found as the main constituent  $\alpha$ -thujone to the three parts of the plant; leaves, inflorescence and shoot. Because they belong to the same family, the essential oils of *S. officinalis* and *C. carpinifolia* showed a similar chemical composition. According Pelkonen, Abass Wiesner (2013) [18], the thujone, one monoterpene ketone is present in varying quantities in a number of plants and is considered a significant component of many dietary supplements, and botanical herbal medicines. The quantity of diastereoisomers of thujone present in the essential oil from *C. carpinifolia* varied with the year of collection. This variation may be related to climate factors to which the plants were subjected, such as the amount of rain and sunlight. Moreover, these isomers may have been synthesized via different pathways or even interconverted by an isomerase present in the plants.

According to Gobbo Neto and Lopes (2007) [19], the production of secondary metabolites can be influenced by many environmental factors, such as seasonality, rainfall, circadian rhythm, altitude, temperature, vegetative plant cycle, and soil type, among others. The qualitative changes in the chemical composition of the essential oils from *Cantinoa carpinifolia* might be influenced by these environmental factors because the plants were collected in different years and in the same local. Among these environmental factors, atmospheric temperature and precipitation stand out because the plants were collected in different years and these were the factors that varied most from one year to the next.

Among the compounds shown in Figure 1 and the data in Table 2, the compounds present in higher quantities in the essential oils extracted in 2014 and 2015 were oxygen-containing monoterpenes (67.83% and 77.17%), followed by sesquiterpene hydrocarbons (20.36% and 11.51%, respectively).

These data corroborate those of many surveys that reported the presence of oxygen-containing monoterpenes as the principal constituents of essential oils from many species of the genus *Hyptis* (*Cantinoa*) [20-22]. However, the results differ from many studies reported in the literature in which a high percentage of sesquiterpene compounds are observed. For other *Hyptis* species, *H. marrubioides* [20], *H. suaveolens* [11], *H. verticillata* [23], over 40% of the essential oil is composed of sesquiterpenoids, and for *H. pectinata*, this class of compounds constituted 90% of the composition of the essential oil [24].

### **Conclusion**

The yield of essential oil from fresh leaves of *Cantinoa carpinifolia* in 2014 was higher than that of the year 2015. The principal constituents found in the essential oil from the plants collected in the years 2014 and 2015 were  $\alpha$ -Thujone,  $\beta$ -Thujone,  $\beta$ -Caryophyllene and Sabinene, respectively. In general, the compounds present in higher proportions were oxygenated monoterpenes, followed sesquiterpene hydrocarbons.

### **Acknowledgements**

The authors thank the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), and the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support and for furnishing scholarships and a PVNS fellowship (D. L. Nelson).

## References

1. P. F. Stevens. *Angiosperm Phylogeny Website*, 2001. Disponível em: <http://www.mobot.org/MOBOT/research/Arweb/> acessado em Novembro 2015.
2. R. M. Harley. *An explosive pollination mechanism in Eriope crassipes, a Brazilian labiate*. Botanical Journal of the Linnean Society, **3**, 159-164 (1971).
3. C. L. Silva-Luz, C. G. Gomes, J. R. Pirani, R. M. Harley. *Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Lamiaceae*. Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo, **30**, 2, 109-155 (2012).
4. R. T. Botrel, L. A. Rodrigues, L. J. Gomes, D. A. Carvalho, M. A. L. Fontes. *Uso da vegetação nativa pela população local no município de Ingaí, MG, Brasil*. Acta Botanica Brasilica, **20**, 1, 143-156 (2006).
5. V. E. G. Rodrigues, D. A. Carvalho. *Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande –Minas Gerais*. Ciência e Agrotecnologia, **25**, 1, 102-123 (2001).
6. C. M. O. Simões, E. P. Schenkel, G. Gosmann, J. C. P. Mello, L. A. Mentz, P. R. Petrovick. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6. ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.
7. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Farmacopeia brasileira*. 5. ed. Brasília, 2010. v. 1, p. 198-199.

8. F. A. Pimentel, M. G. Cardoso, A. P. S. P. Salgado, P. M. Aguiar, V. F. Silva, A. R. Morais, D. L. Nelson. *A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants*. *Química Nova*, **29**, 2, 373-375 (2006).
9. R. P. Adams. *Identification of essential oils components by gas chromatography / mass spectroscopy*, 4th ed., Carol Stream: Allured, 2007.
10. R. F. Silva, C. M. Rezende, H. C. D. Santana, R. F. Vieira, H. R. Bizzo. *Scents from Brazilian Cerrado: chemical composition of the essential oil from the leaves of Hyptis villosa Pohl ex Benth (Lamiaceae)*. *Journal of Essential Oil Research*, **25**, 5, 415-418 (2013).
11. N. R. Azevedo, I. F. P. Campos, H. D. Ferreira, T. A. Portes, J. C. Seraphin, J. R. Paula, S. C. Santos, P. H. Ferri. *Essential oil chemotypes in Hyptis suaveolens from Brazilian Cerrado*. *Biochemical Systematics and Ecology*, **30**, 205-216 (2002).
12. P. P. Botrel, J. E. B. P. Pinto, A. C. C. Araújo, S. K. V. Bertolucci. *Variations in the content and volatile composition of Hyptis marrubioides EPL. cultivated in the field and in the greenhouse*. *Química Nova*, **33**, 33-37 (2010).
13. P. C. Facey, R. B. R. Porter, P. B. Reese, L. A. D. Williams. *Biological activity and chemical composition of the essential oil from Jamaican Hyptis verticillata Jacq*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 4774-4777 (2005).
14. A. O. L. Gabi-Baba, H. B. Shariff. *Mosquito repellent activity and phytochemical characterization of essential oils from Striga hermonthica, Hyptis*

spicigera and *Ocimum basilicum leaf extracts*. *British Journal of Pharmacology and Toxicology*, **3**, 43-48 (2012).

15. C. M. A. Oliveira, M. R. R. Silva, L. Kato, C. C. Silva, H. D. Ferreira, L. K. H. Souza. *Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of Hyptis ovalifolia Benth. (Lamiaceae)*. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, **15**, 756-759 (2004).

16. S. Burt. *Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods*. *International Journal of Food Microbiology*, **94**, 3, 223-253 (2004).

17. R. S. Verma, R. C. Padalia, A. Chauhan. *Harvesting season and plant part dependent variations in the essential oil composition of Salvia officinalis L. grown in northern India*. *Journal of Herbal Medicine*, **5**, 165-171 (2015).

18. O. Pelkonen, K. Abass, J. Wiesner. *Thujone and thujone-containing herbal medicinal and botanical products: Toxicological assessment*. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, **65**, 100-107 (2013).

19. L. Gobbo-Neto, N. P. Lopes. *Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários*. *Química Nova*, **30**, 2, 374-381 (2007).

20. P. P. Botrel, J. E. B. P. Pinto, V. Ferraz, S. K. V. Bertolucci, F. C. Figueiredo. *Teor e composição química do óleo essencial de Hyptis marruboides Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade*. *Acta Scientiarum. Agronomy*, **32**, 3, 533-538 (2010).

21. A. F. Silva, L. C. A. Barbosa, E. A. M. Silva, V. W. D. Casali, E. A. Nascimento. *Composição química do óleo essencial de Hyptis suaveolens (L.) Poit. (Lamiaceae)*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, **6**, 1, 1-7 (2003).
22. B. Bayala, I. H. Bassole, C. Gnoula, R. Nebie, A. Yonli, L. Morel, G. Figueredo, J. B. Nikiema, J. M. Lobaccaro, J. Simpure. *Chemical composition, antioxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of essential oils of plants from Burkina Faso*. PLoS One, **9**, 3, 1-11 (2014).
23. J. A. Pino, A. Bello, A. Urquiola, R. Marbot. *Essential oil of Hyptis verticillata Jacq. from Cuba*. Revista CENIC Ciências Químicas, **33**, 55-56 (2002).
24. L. J. R. P. Raymundo, C. C. Guilhon, D. S. Alviano, M. E. Matheus, A. R. Antonioli, S. C. H. Cavalcanti, P. B. Alves, C. S. Alviano, P. D. Fernandes. *Characterization of the anti-inflammatory and antinociceptive activities of the Hyptis pectinata (L.) Poit essential oil*. Journal of Ethnopharmacology, **134**, 725-732 (2011).



**ARTIGO 2 - Atividade antioxidante *in vitro* dos óleos essenciais de *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) e *Lippia origanoides* Kunth.**

**RESUMO**

Tem-se notado um aumento na busca por produtos naturais de interesse em indústrias farmacêuticas, alimentícias e cosméticas, com potencial de uso, na tentativa de substituir substâncias sintéticas, que têm sido relatadas por ocasionar danos tanto à saúde do homem e de outros animais, como ao meio ambiente. Entre os produtos de origem vegetal, os óleos essenciais vêm se ressaltando por suas atividades biológicas. Objetivou-se avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos óleos essenciais de *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) (rosmaninho) e *Lippia origanoides* Kunth. (alecrim-d'angola) por diferentes metodologias. A obtenção dos óleos essenciais foi realizada por hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger modificado; a identificação e quantificação dos constituintes, por CG/EM e CG-DIC. A atividade antioxidante foi avaliada utilizando o método de estabilização dos radicais ABTS, DPPH e hidroxil, método de complexação do fosfomolibdênio, método do poder redutor, ensaio de oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e método de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Pelas análises cromatográficas, os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de *C. carpinifolia* foram  $\alpha$ -tujona (32,15%),  $\beta$ -tujona (22,22%),  $\beta$ -cariofileno (8,74%) e sabineno (6,65%), e no óleo essencial de *L. origanoides*, foram carvacrol (41,51%), *p*-cimeno (18,36%),  $\gamma$ -terpineno (17,03%) e timol (4,86%). A atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Cantinoa carpinifolia* e de *Lippia origanoides* e dos controles positivos, BHT e ácido ascórbico variou com a metodologia empregada; em grande parte dessas, os controles e o óleo essencial de *L. origanoides* foram mais eficientes no sequestro de radicais, na complexação de metais e na inibição de peroxidação lipídica. Em relação ao método do radical hidroxil, os óleos se mostraram mais eficazes que o próprio manitol. Esses resultados demonstram que o óleo essencial de *Lippia origanoides*, rico em carvacrol, composto com característica fenólica, é um potente antioxidante e que poderá ser empregado, após ampla caracterização farmacológica e toxicológica, em indústrias alimentícias, de cosméticos e também na terapêutica de processos inflamatórios, em indústrias farmacêuticas.

**Palavras-chave:** Óleos voláteis. Estabilização de radicais livres. Complexação de metais. Inibição da peroxidação lipídica.

***In vitro* antioxidant activities of the essential oils from *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) and *Lippia organoides* Kunth.**

**ABSTRACT**

The search for natural products of interest to the pharmaceutical, food and cosmetic industries has increased in an attempt to replace synthetic substances, which have been reported to cause damage to the health of humans and other animals, as well as the environment. Among the products of plant origin, essential oils are noteworthy because of their biological activities. This study sought to evaluate the *in vitro* antioxidant activity of the essential oils from *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) (Rosemary) and *Lippia organoides* Kunth. (guinea fowl rosemary) using different methods. The extraction of the essential oils was performed by hydrodistillation using a modified Clevenger apparatus. Identification and quantification of the constituents was achieved by GC-MS and GC-FID. The antioxidant activity was evaluated using the method of stabilization of the ABTS, DPPH and hydroxyl radicals, fosfomolibdênio complexation method, the reducing power method, the oxidation assay of the  $\beta$ -carotene/linoleic acid system and the method involving species reactive to thiobarbituric acid (TBARS). The principal constituents found in the essential oil from *C. carpinifolia* were  $\alpha$ -thujone (32.15%),  $\beta$ -thujone (22.22%),  $\beta$ -caryophyllene (8.74%) and sabinene (6.65%), and carvacrol (41.51%), *p*-cymene (18.36%),  $\gamma$ -terpinene (17.03%) and thymol (4.86%) were found in the essential oil from *L. organoides*. The antioxidant activities of the essential oils from *Cantinoa carpinifolia* and *Lippia organoides* and the positive controls BHT and ascorbic acid varied with the method employed. The controls and the essential oil from *L. organoides* were more efficient in sequestering radicals, in metal complexation, and in inhibition of lipid peroxidation. Compared with the method of the hydroxyl radical, the oils were more effective than mannitol. These results demonstrate that the essential oil from *Lippia organoides*, which is rich in the phenolic compound carvacrol, is a potent antioxidant and may be employed, after extensive pharmacological and toxicological characterization, in food and cosmetic industries and in the treatment of inflammatory processes in the pharmaceutical industry.

**Keywords:** Volatile oils. Stabilization of free radicals. Metal complexation. Inhibition of lipid peroxidation.

## INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais pelos seres humanos data de milhares de anos devido às suas propriedades medicinais e nutricionais. Muitos compostos naturais extraídos das plantas expressam importantes atividades biológicas. Entre esses compostos, destacam-se os óleos essenciais, que estão atraindo cada vez mais a atenção da indústria farmacêutica, agrônômica, de alimentos e cosmética, por suas várias funções, em especial pelas atividades antioxidante, antimicrobiana e antiproliferativa.

Na última década, tem havido um interesse crescente na investigação sobre o papel dos antioxidantes de origem vegetal na saúde humana e em alimentos. Dessa forma, antioxidante pode ser definido como sendo uma substância que, quando presente em pequenas quantidades em relação às do substrato oxidável, impede ou retarda significativamente a oxidação deste pela presença de radicais livres. Os lipídios, as proteínas, os ácidos nucleicos, os carboidratos e outras biomoléculas podem sofrer oxidação, isto é, ser o substrato oxidável. A oxidação dessas moléculas pode ser responsável pelo surgimento de diversas patologias, incluindo o câncer, doenças cardiovasculares, doenças neurodegenerativas, catarata, envelhecimento, doenças inflamatórias, entre outras (MIGUEL, 2010).

A oxidação também é um problema na indústria alimentar, uma vez que as vitaminas lipossolúveis e os ácidos graxos essenciais podem sofrer oxidação durante os processos de processamento e armazenamento com o consequente desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, tornando os alimentos impróprios para o consumo, além de provocar outras alterações que podem afetar a sua qualidade nutricional (RAMALHO; JORGE, 2006).

Na indústria alimentar, os antioxidantes vêm sendo largamente empregados; os mais utilizados são os compostos sintéticos, butil-hidroxi-anisol

(BHA), 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT), tert-butil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG). No entanto, pesquisas avaliando a toxicologia dessas substâncias demonstraram potencial carcinogênico sobre animais (BOTTERWECK et al., 2000).

Em virtude do aumento da importância dos óleos essenciais no mercado mundial e do seu potencial biológico, da variedade excepcional da flora brasileira e ainda inexplorada, são necessários mais estudos que viabilizem a utilização dessas substâncias naturais.

A espécie *Cantinoa carpinifolia* Benth., popularmente conhecida como rosmaninho ou rasmaninho, é uma planta herbácea da família Lamiaceae, encontrada entre diversas formações vegetais e tem sido explorada na medicina popular no tratamento de gripes, resfriados e reumatismo (SILVA; MOURA, 2011). A espécie *Lippia origanoides* Kunth., conhecida no norte do Brasil como "salva-do-marajó" e "alecrim-d'angola", é uma espécie arbustiva com um ciclo de vida perene, cujas partes aéreas são utilizadas na culinária como aromatizante de pratos regionais, no tratamento de doenças gastrointestinais, de doenças respiratórias e como antisséptico para a boca e para irritação de garganta (SARRAZIN et al., 2015).

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos óleos essenciais de *Cantinoa carpinifolia* e *Lippia origanoides* por diferentes metodologias, como estabilização de radicais livres, complexação de metais e inibição de peroxidação lipídica.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Obtenção do material vegetal

A espécie *Cantinoa carpinifolia* foi coletada no município de Itumirim-MG (latitude 21° 19' 01" S, longitude 44° 52' 16" W e altitude 871m) e a espécie *Lippia origanoides*, no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), na cidade de Lavras-MG (latitude 21° 14' S, longitude 45° 00' W e altitude 918 m).

Para a identificação botânica das espécies, folhas e ramos férteis, foram coletados no mesmo local e encaminhados para o Herbário ESAL (DBI/UFLA). A espécie *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) Harley & JFBPastore foi identificada pela Dra. Mariana Esteves Mansaranes (DBI/UFLA) e uma exsicata encontra-se depositada com o número de registro 28489. A espécie *Lippia origanoides* Kunth. foi identificada pela especialista Dra. Fátima Salimena, da Universidade Federal de Juiz de Fora, e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário ESAL, com o número de registro 26840.

### Extração dos óleos essenciais

Os óleos essenciais das folhas de ambas as plantas foram extraídos no Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais da UFLA, pelo método de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger modificado (BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010). As extrações foram realizadas em triplicata, destilando-se por 2 horas cada material vegetal. Posteriormente à extração, o óleo essencial foi separado do hidrolato por centrifugação e armazenado em frasco de vidro âmbar e em baixa temperatura.

Os rendimentos dos óleos essenciais foram expressos em peso de óleo por peso de material vegetal com Base Livre de Umidade (BLU); dessa forma, foi realizado o teste de umidade de acordo com a metodologia descrita por Pimentel et al. (2006).

### **Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais**

Os constituintes químicos dos óleos essenciais foram identificados por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM-Shimadzu, modelo QP 5050A), de acordo com as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase ligada DB5 (0,25 µm de espessura de filme); gás He como gás de arraste com fluxo de 1,18 mL min<sup>-1</sup>; programação da temperatura, início em 60 °C, aumento de 3 °C min<sup>-1</sup> até 240 °C, depois a 10 °C até 300 °C, mantendo-se constante por 7 min; temperatura do injetor: 220 °C, temperatura da fonte de íons: 200°C e do detector (ou interface): 240 °C; volume da amostra injetado foi de 1,0 µL, diluída em hexano; taxa de partição do volume injetado de 1:100 e pressão na coluna de 71,0 kPa. As condições do espectrômetro de massas para a análise qualitativa dos constituintes foram: detector de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmento e fragmentos detectados na faixa de 45 a 500 Da. Para calcular o índice de retenção, foi utilizada a equação de Van den Dool e Kratz em relação à série homóloga de n-alcenos (nC<sub>8</sub>-nC<sub>18</sub>). A identificação dos constituintes foi realizada comparando-se os índices dos compostos obtidos com os índices de retenção da literatura (ADAMS, 2007) e pela comparação dos espectros obtidos para cada componente com aqueles presentes nas bibliotecas do equipamento NIST107 e NIST21.

A análise quantitativa dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada utilizando um cromatógrafo gasoso Shimadzu CG-17A equipado com detector

por ionização de chamas (DIC) e as condições operacionais foram idênticas às utilizadas na identificação dos constituintes; contudo, a temperatura do detector foi de 300 °C. Os dados de identificação e quantificação dos compostos presentes no óleo essencial podem ser acessados na tese de Teixeira (2016).

### **Atividade antioxidante *in vitro* dos óleos essenciais**

Muitas técnicas têm sido empregadas para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* de diferentes tipos de substâncias. Entre essas, destacam-se as que se baseiam na neutralização de radicais (estabilização dos radicais ABTS, DPPH e hidroxil); na complexação de metais (redução do molibdênio e poder redutor) e na inibição da peroxidação lipídica (sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e TBARS).

Os experimentos *in vitro* para avaliar o potencial antioxidante dos óleos essenciais de *Cantinoa carpinifolia* e de *Lippia origanoides* foram realizados no Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais, no Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras.

### **Método de estabilização do radical ABTS\* [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)]**

A atividade antioxidante dos óleos essenciais foi avaliada pela atividade de estabilização do radical ABTS [2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)], de acordo com a metodologia descrita por Guerreiro e colaboradores (2013). O radical ABTS foi obtido pela reação entre o ABTS (7,00 mmol L<sup>-1</sup>) com persulfato de potássio (2,45 mmol L<sup>-1</sup>), após um período de 12 a 16 horas à temperatura ambiente, no escuro. O radical formado foi diluído com etanol até absorvância de 0,7 ( $\pm 0,02$ ) a 734 nm. Em 1900  $\mu$ L do radical ABTS,

previamente diluído, foram adicionados 100 µL das diluições dos óleos essenciais em etanol nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 µg mL<sup>-1</sup>. A reação controle foi preparada com 1900 µL de etanol e 100 µL da diluição mais concentrada dos óleos essenciais, e o controle negativo, com 1900 µL da solução de ABTS e 100 µL de etanol. Após 10 minutos de reação no escuro, foram realizadas leituras de absorvância em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1601PC) a 734 nm, sendo para fins de comparação, testado o controle positivo BHT (2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno) nas mesmas concentrações utilizadas para os óleos essenciais.

A porcentagem de atividade antioxidante obtida pelo método de estabilização do radical ABTS foi calculada empregando-se a seguinte equação:

$$\%AA = [(A_{cont} - A_{am})/A_{cont}] \times 100$$

Em que:  $A_{cont}$ : absorvância do controle negativo;  $A_{am}$ : absorvância da amostra analisada.

#### **Método de estabilização do radical DPPH<sup>•</sup> (2,2-difenil-1-picrilhidrazila)**

Foi preparada uma solução etanólica de DPPH na concentração de 40 µg mL<sup>-1</sup>. Os óleos essenciais foram diluídos em etanol nas concentrações 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 µg mL<sup>-1</sup>. Em tubos de ensaio, foram adicionados 2700 µL da solução estoque de DPPH, seguido da adição de 300 µL das diluições dos óleos essenciais. Paralelamente foi preparada a reação-controle, contendo 2700 µL de etanol e 300 µL da diluição mais concentrada dos óleos essenciais, e o controle negativo, contendo 2700 µL da solução estoque de DPPH e 300 µL de etanol. Após 60 minutos (tubos acondicionados na ausência de luz), foram realizadas leituras de absorvância em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1601PC) no comprimento de onda de 515 nm (LOPES-LUTZ et



al., 2008). Para fins de comparação, foi testado um controle positivo BHT, nas mesmas concentrações utilizadas para os óleos essenciais.

A porcentagem de atividade antioxidante obtida pelo método de estabilização do radical DPPH foi calculada empregando-se a seguinte equação:

$$\%AA = [(A_{\text{cont}} - A_{\text{am}})/A_{\text{cont}}] \times 100$$

Em que:  $A_{\text{cont}}$ : absorvância do controle negativo;  $A_{\text{am}}$ : absorvância da amostra analisada.

### **Método de estabilização do radical hidroxil (OH<sup>•</sup>)**

A avaliação da atividade antioxidante pelo método do radical hidroxil OH<sup>•</sup> foi baseada na metodologia descrita por Boulanouar et al. (2013). Em tubos de ensaio, foram adicionados 100 µL das amostras dos óleos essenciais nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 µg mL<sup>-1</sup>, diluídos em água, 100 µL da mistura [FeSO<sub>4</sub>-EDTA], 100 µL de desoxirribose, 700 µL de solução tampão fosfato 0,1 mol L<sup>-1</sup> (pH= 7,4) e 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 113 mmol L<sup>-1</sup>. Posteriormente, os tubos foram incubados em banho-maria a 50 °C, onde permaneceram por 60 minutos. Em seguida, foram adicionados 500 µL de TCA (ácido tricloroacético) e 500 µL de TBA (ácido tiobarbitúrico), no intuito de finalizar a reação. Após a adição dos ácidos, os tubos foram incubados a 95 °C por 10 minutos. A leitura foi realizada, imediatamente após o resfriamento dos tubos, em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1601PC) a 532 nm. No controle negativo, a solução de óleo essencial foi substituída por 100 µL de água. O controle positivo utilizado para fins de comparação foi o manitol, nas mesmas concentrações utilizadas para os óleos essenciais.

A porcentagem de atividade antioxidante foi calculada de acordo com a equação:

$$\%AA = [(A_{\text{cont}} - A_{\text{am}})/A_{\text{cont}}] \times 100$$

Em que:  $A_{\text{cont}}$ = absorvância do controle negativo;  $A_{\text{am}}$ = absorvância da amostra analisada.

### **Método de complexação do fosfomolibdênio**

Em tubos de ensaio adicionaram-se 100  $\mu\text{L}$  das diluições dos óleos essenciais nas concentrações 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  em etanol e 2000  $\mu\text{L}$  da solução do complexo de fosfomolibdato de amônio (ácido sulfúrico 10%, fosfato de sódio 28  $\text{mmol L}^{-1}$  e molibdato de amônia 4  $\text{mmol L}^{-1}$ ). Os tubos foram fechados, agitados e colocados em banho-maria a 95 °C por 60 minutos. Após o resfriamento, realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1601PC) a 695 nm (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo nas mesmas concentrações utilizadas para os óleos essenciais para fins de comparação e os resultados foram expressos em absorvância.

### **Método do poder redutor**

Para avaliar a atividade antioxidante pelo método do poder redutor, 50  $\mu\text{L}$  das amostras nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , foram adicionadas a 500  $\mu\text{L}$  de solução tampão fosfato 200  $\text{mmol L}^{-1}$  (pH= 6,0) e 500  $\mu\text{L}$  de hexacianoferrato III de potássio 1%. A mistura foi agitada e incubada a 50 °C por 20 minutos. Posteriormente, foram adicionados 500  $\mu\text{L}$  de TCA 10% (ácido tricloroacético), 1500  $\mu\text{L}$  de água destilada e 300  $\mu\text{L}$  de  $\text{FeCl}_3$  0,1%. Em seguida, as leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1601PC) a 700 nm (BOUNATIROU et al., 2007).

Como controle positivo para fins de comparação, foi utilizado o ácido ascórbico nas mesmas concentrações utilizadas para os óleos essenciais e os resultados foram expressos em absorbância.

### **Ensaio de oxidação do sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico**

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 60 mg de ácido linoleico, 600 mg de Tween 20, 6 mg de  $\beta$ -caroteno e 30 mL de clorofórmio. Após homogeneização, o clorofórmio foi totalmente evaporado utilizando evaporador rotatório (Büchi Rotavapor R114) a 50 °C. Após a remoção do clorofórmio, o resíduo foi dissolvido em 150 mL de água destilada saturada de oxigênio (emulsão A). Alíquotas de 2500  $\mu$ L da emulsão A foram transferidas para tubos de ensaio e, em seguida, foram adicionados 200  $\mu$ L das diluições dos óleos essenciais em etanol, nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500  $\mu$ g mL<sup>-1</sup>. A reação-controle foi preparada com 2500  $\mu$ L da emulsão A e 200  $\mu$ L da diluição mais concentrada dos óleos essenciais. A absorbância foi medida imediatamente em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1601PC) a 470 nm, os tubos foram incubados a 50 °C para a reação de oxidação e, após 60 minutos, foi novamente aferida a absorbância (LOPES-LUTZ et al., 2008). Para fins de comparação, foi testado o BHT controle positivo nas mesmas concentrações utilizadas para os óleos essenciais.

A porcentagem de atividade antioxidante para esse método foi expressa utilizando-se a equação:

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

Em que:  $A_0$ : absorbância no início da incubação, com a amostra;  $A_t$ : absorbância depois de 60 minutos, com a amostra;  $A_{00}$ : absorbância no início da incubação, sem a amostra,  $A_{0t}$ : absorbância depois de 60 minutos, sem a amostra.

### Método de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A metodologia empregada para avaliar a atividade antioxidante pelo método TBARS foi a descrita por Dandlen et al. (2010) com pequenas adaptações. Em tubos de ensaio, foram adicionados 500 µL de gema de ovo (fonte de lipídios) homogeneizada em água destilada (10% m/v), 100 µL das soluções etanólicas dos óleos essenciais nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 µg mL<sup>-1</sup>, 100 µL de uma solução [FeSO<sub>4</sub>-EDTA] 6 mmol L<sup>-1</sup>, 100 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 10 mmol L<sup>-1</sup> e 200 µL de água destilada. Os tubos foram agitados por 30 segundos e aquecidos em banho-maria a 50 °C por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 1500 µL de uma solução de ácido acético 20% em água (pH= 3,5) e 1500 µL de ácido tiobarbitúrico 0,8% m/v diluído em uma solução de dodecilsulfato de sódio 1,1% p/v em água. Por 30 segundos, os tubos foram agitados, aquecidos a 95 °C por 60 minutos e, em seguida a solução foi resfriada à temperatura ambiente. Após o resfriamento, foram adicionados 2000 µL de butan-1-ol em cada tubo, e as soluções foram centrifugadas a 1200 g por 10 minutos. A fase orgânica foi recolhida e foram realizadas leituras de absorbância utilizando um espectrofotômetro (Shimadzu UV-1601PC) no comprimento de onda de 532 nm. No controle negativo, a solução de óleo essencial foi substituída por 100 µL de etanol. Para fins de comparação, foi testado o BHT como controle positivo nas mesmas concentrações utilizadas para os óleos essenciais.

A porcentagem de atividade antioxidante para o método TBARS foi calculada utilizando a equação:

$$\%AA = [(A_{\text{cont}} - A_{\text{am}})/A_{\text{cont}}] \times 100$$

Em que: A<sub>cont</sub>= absorbância do controle negativo; A<sub>am</sub>= absorbância da amostra analisada.

### **Análise estatística**

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado (DIC) com um esquema fatorial de 3 x 7 (óleos essenciais/controle positivo x concentrações), com três repetições. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR (FERREIRA, 2011) e os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo Teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Além do teste qualitativo, foram ajustadas equações de regressão (5% de probabilidade), que foram utilizadas para calcular a  $CI_{50}$  (Concentração que apresenta 50% de atividade antioxidante) dos óleos essenciais/controle positivo.

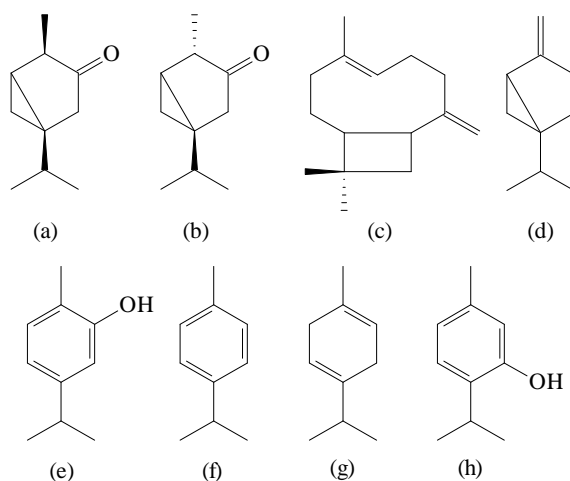
## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **Rendimento e caracterização química dos constituintes dos óleos essenciais**

O rendimento do óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* em Base Livre de Umidade foi de 0,48% e do óleo de *Lippia origanoides* foi de 0,37%.

Os compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *C. carpinifolia* foram  $\alpha$ -tujona (32,15%),  $\beta$ -tujona (22,22%),  $\beta$ -cariofileno (8,74%) e sabineno (6,65%) (TEIXEIRA, 2016) e, no óleo essencial de *Lippia origanoides*, foram carvacrol (41,51%), *p*-cimeno (18,36%),  $\gamma$ -terpineno (17,03%) e timol (4,86%) (TEIXEIRA et al., 2014) (Figura 1).

Figura 1 - Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) (a)  $\alpha$ -tujona, (b)  $\beta$ -tujona, (c)  $\beta$ -cariofileno e (d) sabineno e, no óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth., (e) carvacrol, (f) *p*-cimeno, (g)  $\gamma$ -terpineno e (h) timol.



Analisando os dados de porcentagem dos constituintes majoritários (Tabela 1), nota-se uma maior predominância de monoterpenos em relação aos sesquiterpenos para ambos os óleos essenciais. Além disso, uma maior predominância dos monoterpenos oxigenados, principalmente para o óleo essencial de *C. carpinifolia*. Entre esses constituintes, destacam-se as cetonas ( $\alpha$  e  $\beta$ -tujona) presentes no óleo essencial de *C. carpinifolia*, embora, para o óleo essencial de *L. origanoides*, tenham sido encontrados predominantemente monoterpenos com características fenólicas (carvacrol e timol), além dos monoterpenos aromático e não aromático, *p*-cimeno e  $\gamma$ -terpineno, respectivamente.

Tabela 1 - Porcentagem de constituintes químicos agrupados dos óleos essenciais das folhas de *Cantinoa carpinifolia* e *Lippia origanoides*.

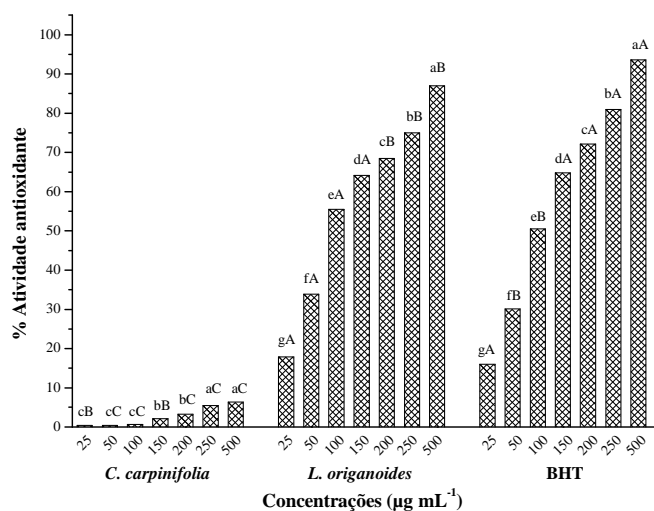
<b>Componentes agrupados</b>	<b><i>C. carpinifolia</i></b>	<b><i>L. origanoides</i></b>
Monoterpenos hidrocarbônicos	7,76	45,57
Monoterpenos oxigenados	67,83	49,50
Sesquiterpenos hidrocarbônicos	20,36	3,58
Sesquiterpenos oxigenados	3,16	0,62
Outros	0,89	0,04

#### **Atividade antioxidante *in vitro* dos óleos essenciais**

O método ABTS é um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante de substâncias isoladas ou de misturas complexas. Neste, o radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) é reduzido na presença de substâncias antioxidantes (doadoras de átomos de hidrogênio ou de elétrons). A vantagem dessa metodologia é medir a atividade antioxidante de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (BORGES et al., 2011).

Os valores da porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais e do BHT em relação às suas concentrações, avaliadas pelo método de estabilização do radical ABTS, estão apresentados na Figura 2. Foi observado um aumento da atividade antioxidante de acordo com o aumento da concentração, revelando uma relação dose-dependente.

Figura 2 - Valores de porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais/controlado positivo pelo método de estabilização do radical ABTS.



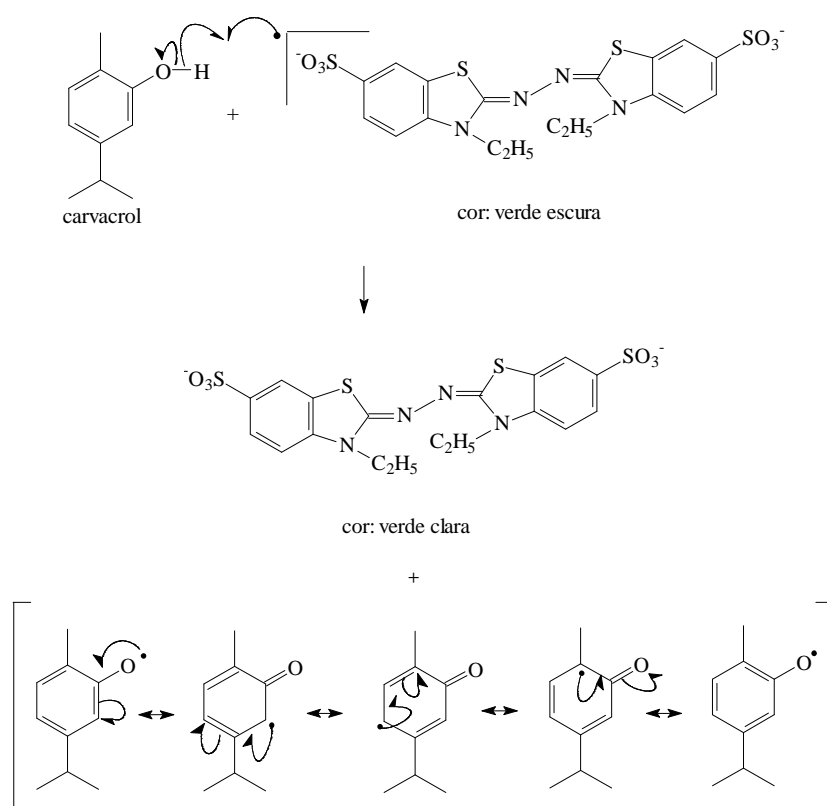
\*As médias seguidas pela mesma letra minúscula, comparando as concentrações dentro de cada óleo essencial/BHT, e da mesma letra maiúscula, comparando os óleos essenciais/controlado positivo dentro de cada concentração, não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Comparando-se os óleos essenciais e o controle positivo analisados nas mesmas concentrações, nota-se que o óleo essencial de *L. origanoides* proporcionou uma maior atividade antioxidante, sendo essa semelhante ao BHT, principalmente nas menores concentrações. Essa atividade pode estar relacionada com a presença do constituinte majoritário do óleo, o carvacrol, que age doando um próton ao radical e logo se estabiliza por ressonância (Figura 3). Ressalta-se que a constituição química do óleo essencial de *C. carpinifolia* desfavorece a avaliação de atividade antioxidante por esse método, uma vez que os constituintes que correspondem aproximadamente 55,0% da composição desse óleo são cetonas monoterpênicas bicíclicas saturadas ( $\alpha$  e  $\beta$ -tujona), que ao doarem átomos de hidrogênio, não geram muitas estruturas contribuintes



equivalentes (híbridos de ressonância) quanto os compostos com características fenólicas.

Figura 3 - Provável mecanismo que explica a atividade antioxidante de compostos com características fenólicas (carvacrol) pelo método de estabilização do radical ABTS.



Fonte: Do autor (2016)

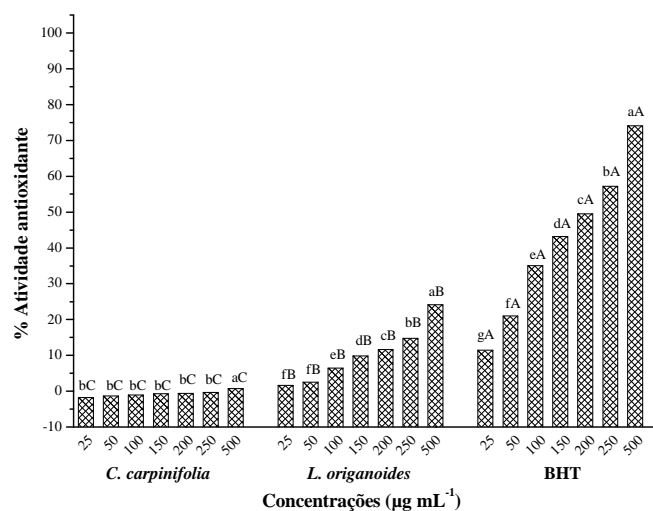
Os resultados encontrados para esse método corroboram com os de Ruberto e Baratta (2000), pois segundo os autores, os fenóis são antioxidantes eficientes e responsáveis pela elevada atividade antioxidante de muitos óleos

essenciais que os contêm, uma vez que podem doar um átomo de hidrogênio e o novo radical formado pode ser estabilizado por ressonância.

Outro método de estabilização de radicais é o de estabilização do radical DPPH, o qual se baseia na medida da capacidade antioxidante de uma determinada substância em neutralizar o radical DPPH, reduzindo-o a um derivado de hidrazina. Assim, quando uma substância é adicionada à solução de DPPH, e essa age como doadora de átomos de hidrogênio (ou de elétrons), ocorre uma mudança simultânea na coloração de violeta para amarelo pálido (ALVES et al., 2010).

Pelos dados apresentados na Figura 4, para o método de estabilização do radical DPPH, pode-se observar que a porcentagem de atividade antioxidante também foi dose-dependente para o óleo essencial de *Lippia* e controle positivo BHT, sendo esse último capaz de estabilizar o radical de maneira mais efetiva, seguido pelo óleo essencial de *L. origanoides*. Os resultados obtidos para o óleo essencial de *C. carpinifolia* sugerem uma atividade pró-oxidante, nas menores concentrações (valores negativos de atividade antioxidante). Além disso, foi possível observar que a porcentagem de atividade antioxidante para os óleos essenciais e para o controle BHT foi mais reduzida, quando comparado com o método ABTS. Alguns fatores podem ter influenciado nesse resultado, como o fato de o radical DPPH ser um radical mais persistente que o normal e o maior impedimento estérico para estabilizá-lo, uma vez que o radical ABTS deve reagir pelas extremidades, facilitando sua redução. A Figura 5 descreve o provável mecanismo que explica a reação (estabilização) do carvacrol com o radical DPPH.

Figura 4 - Valores de porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais/controlado positivo pelo método de estabilização do radical DPPH.



\*As médias seguidas pela mesma letra minúscula, comparando as concentrações dentro de cada óleo essencial/BHT, e da mesma letra maiúscula, comparando os óleos essenciais/controlado positivo dentro de cada concentração, não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 5 - Provável mecanismo que explica a atividade antioxidante de compostos com características fenólicas (carvacrol) pelo método de estabilização do radical DPPH. (Continua)

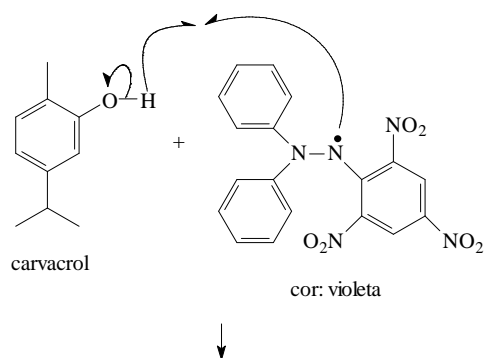
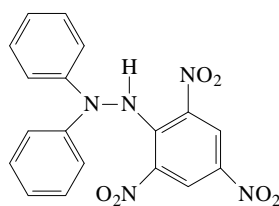


Figura 5 - Provável mecanismo que explica a atividade antioxidante de compostos com características fenólicas (carvacrol) pelo método de estabilização do radical DPPH. (Conclusão)



cor: amarelo pálido

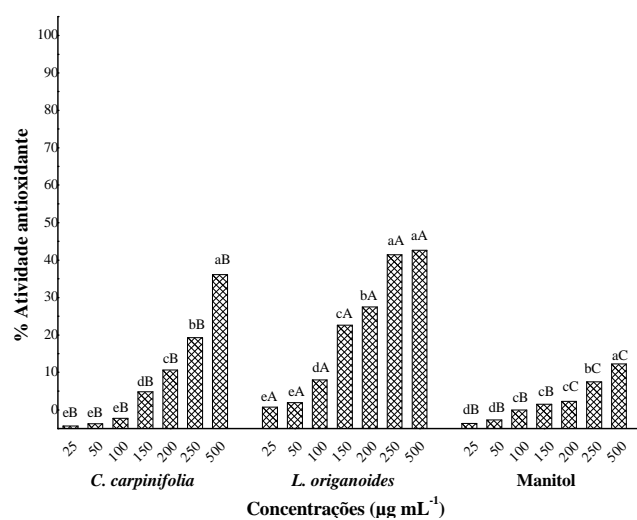
Fonte: Do autor (2016)

O ensaio para avaliar a atividade antioxidante empregando-se a 2-desoxirribose é um dos métodos mais específicos para determinar a captura do radical hidroxil ( $\text{OH}^{\bullet}$ ). Nesse método, o radical hidroxil é gerado por reação Fenton e reage com a 2-desoxirribose para formar diversos produtos, entre eles, o malonaldeído. A reação do malonaldeído com o ácido tiobarbitúrico, sob aquecimento em pH ácido, forma um produto cromóforo róseo (ALVES et al., 2010). Dessa maneira, substâncias que tenham propriedades antioxidantes podem competir com a 2-desoxirribose pelo radical e, ao formar outro radical, esse é estabilizado por estruturas de ressonância.

Pelos dados apresentados na Figura 6, pode-se observar que a porcentagem de atividade antioxidante foi dose-dependente e, nas menores concentrações, o óleo essencial de *C. carpinifolia* e o açúcar manitol apresentaram um efeito pró-oxidante, ou seja, além de não protegerem a 2-desoxirribose da oxidação, eles auxiliaram na sua oxidação. O óleo essencial de *L. organoides* foi o que apresentou melhores resultados com este método, possivelmente devido à capacidade de estabilização dos compostos com

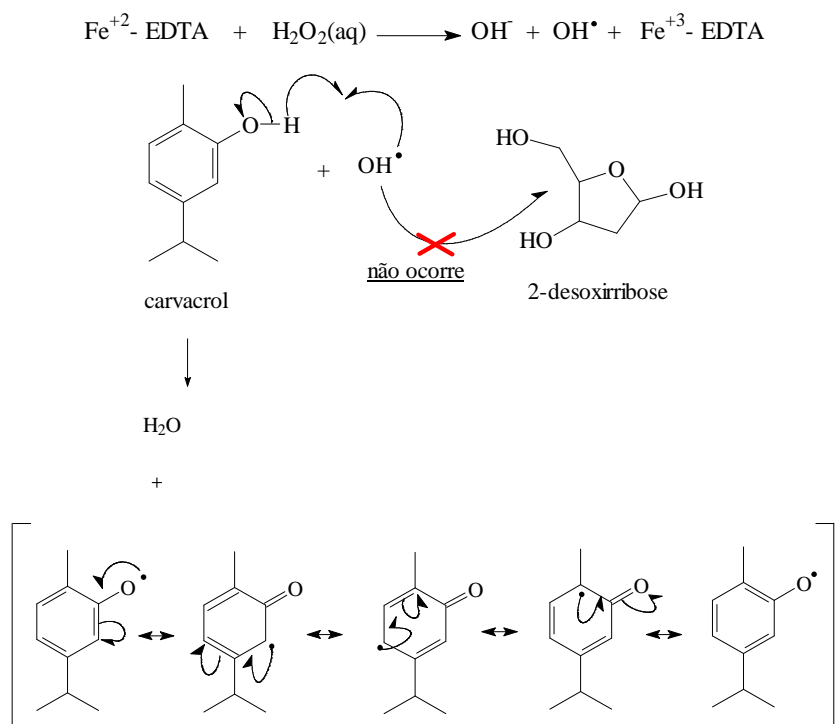
características fenólicas presentes no óleo (principalmente o carvacrol), após a doação dos átomos de hidrogênio ao radical hidroxil (Figura 7).

Figura 6 - Valores de porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais/controlado positivo pelo método de estabilização do radical hidroxil.



\*As médias seguidas pela mesma letra minúscula, comparando as concentrações dentro de cada óleo essencial/controlado positivo, e da mesma letra maiúscula, comparando os óleos essenciais/controlado positivo dentro de cada concentração, não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 7 - Provável mecanismo que explica a atividade antioxidante de compostos com características fenólicas (carvacrol) pelo método de estabilização do radical hidroxil.



Fonte: Do autor (2016)

Os valores de  $\text{CI}_{50}$  foram calculados de acordo com as equações de regressão de primeira e segunda ordem, dependendo dos coeficientes de correlação. Verifica-se pelos dados descritos na Tabela 2, para a metodologia do ABTS, que o valor de  $\text{CI}_{50}$  para o controle BHT foi semelhante ao do óleo essencial de *L. origanoides*, 109 e 110  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. No entanto, para o método do DPPH, o BHT exibiu um menor valor de  $\text{CI}_{50}$  (249  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), seguido do óleo de *L. origanoides* (>1000  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), não sendo possível o cálculo para óleo de *C. carpinifolia*. Esses resultados corroboram a hipótese de que o radical ABTS é mais susceptível à estabilização do que o DPPH, uma vez

que esse último é considerado um radical mais persistente que o normal. Perante o método de estabilização do radical hidroxil, os valores de  $CI_{50}$  obtidos para os óleos essenciais foram menores que o obtido para o manitol, inferindo-se que ambos os óleos proporcionaram maior atividade antioxidante quando comparados com o controle positivo ( $>1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Tabela 2 - Valores de  $CI_{50}$  para a porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Cantinoa carpinifolia* e *Lippia organoides* e dos controles positivos BHT/Manitol.

Óleos essenciais/ controle positivo	Método antioxidante		
	ABTS	DPPH	Hidroxil
	$CI_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})$	$CI_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})$	$CI_{50} (\mu\text{g mL}^{-1})$
<i>Cantinoa carpinifolia</i>	>1000	-	636
<i>Lippia organoides</i>	110	>1000	484
BHT/Manitol	109	249	>1000

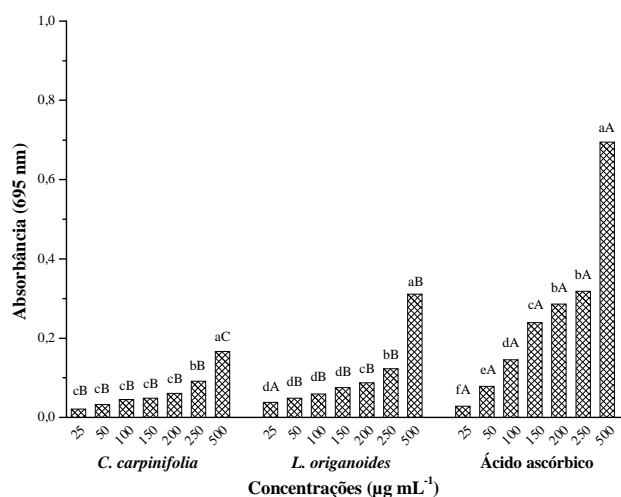
Para verificar a atividade antioxidante de substâncias, além dos métodos que avaliam o potencial de estabilização de radicais, pode-se citar os métodos que determinam a capacidade de complexação de metais pelas substâncias em análise. O método de complexação do fosfomolibdênio fundamenta-se na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) na presença de substâncias com capacidade antioxidante e isso ocorre pelo fato de essas substâncias serem estabilizadas quando elas forem oxidadas (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

Esse método apresenta a vantagem de verificar o potencial antioxidante tanto de substâncias lipofílicas quanto de hidrofílicas.

A coloração inicial do complexo é amarela e torna-se verde à medida que o molibdênio se reduz, e com isso, os valores de absorvância aumentam. Assim, o controle positivo, ácido ascórbico, foi o que apresentou os maiores valores de absorvância e esse aumento ocorreu de maneira dose-dependente com

as concentrações testadas (Figura 8). Por apresentar em sua estrutura química duas hidroxilas ligadas a carbonos com instauração, o ácido ascórbico é capaz de reduzir dois átomos de molibdênio concomitantemente, fato não observado para os constituintes majoritários de ambos os óleos essenciais em estudo. Além disso, na maior concentração testada, o óleo de *Lippia* resultou em uma maior absorvância, ao ser comparado com o óleo de *Cantinoa*, possivelmente devido à maior concentração do composto majoritário do óleo (carvacrol), sendo possível a doação do próton ao molibdênio que se estabiliza por ressonância (Figura 9).

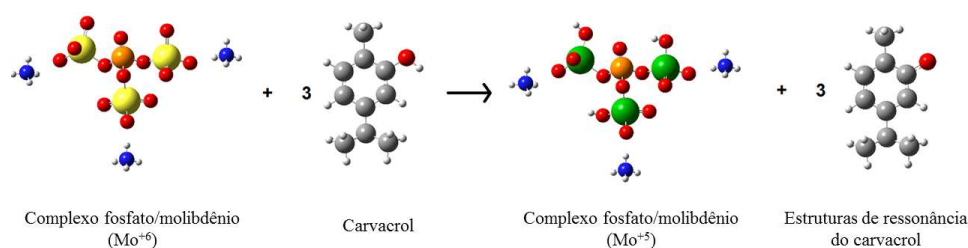
Figura 8 - Valores de absorvância para os óleos essenciais/controle positivo pelo método de complexação do fosfomolibdênio.



\*As médias seguidas pela mesma letra minúscula, comparando as concentrações dentro de cada óleo essencial/controle positivo, e da mesma letra maiúscula, comparando os óleos essenciais/controle positivo dentro de cada concentração, não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.



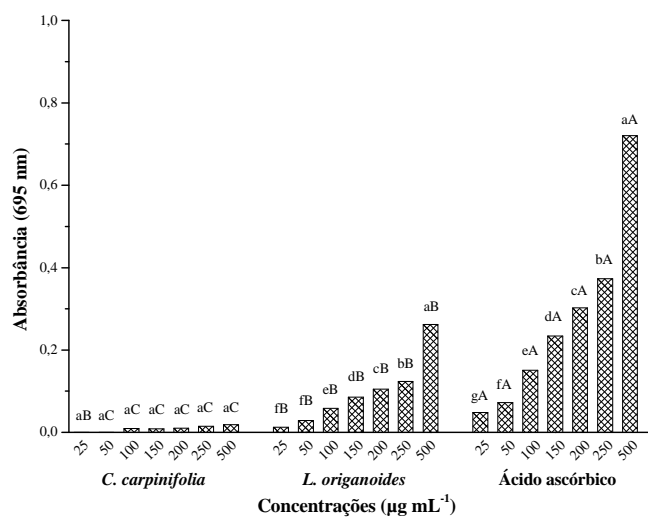
Figura 9 - Provável mecanismo de redução do complexo fosfato/molibdênio na presença do composto com característica fenólica (carvacrol)



Fonte: Do autor (2016)

Outro teste que avalia a complexação de metais é o do poder redutor, o qual se baseia na redução do íon ferricianeto a ferrocianeto que, na presença do íon férrico (proveniente do FeCl<sub>3</sub>), forma o azul da prússia (SANTOS et al., 2007). Assim, a substância antioxidante terá que sofrer oxidação, doando átomo de hidrogênio ou elétrons ao ferricianeto, que após as sucessivas reações, forma o azul da prússia, apresentando um maior valor de absorvância. Ressalta-se que compostos fenólicos apresentam uma maior habilidade de reduzir o complexo pela maior facilidade de doação de átomos de hidrogênio (FOE et al., 2016). Por ser um método mais restrito, os valores de absorvância para ambos os óleos essenciais foram menores; no entanto, o óleo de *L. origanoides*, por ter uma constituição química favorável (compostos com características fenólicas, como carvacrol e timol), apresentou maiores valores quando comparado com o de *C. carpinifolia* em todas as concentrações testadas, que quase não apresentou atividade perante esse método. O ácido ascórbico que foi empregado como controle positivo exibiu maiores valores de absorvância do que os óleos analisados, e isso pode ser devido ao fato de estruturalmente ser apto a reduzir duas moléculas do composto de coordenação do ferricianeto de potássio simultaneamente (Figuras 10 e 11).

Figura 10 - Valores de absorvância para os óleos essenciais/controle positivo pelo método do poder redutor.



\*As médias seguidas pela mesma letra minúscula, comparando as concentrações dentro de cada óleo essencial/controle positivo, e da mesma letra maiúscula, comparando os óleos essenciais/controle positivo dentro de cada concentração, não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 11 - Provável reação de redução do ferro na presença do ácido ascórbico (vitamina C). (Continua)

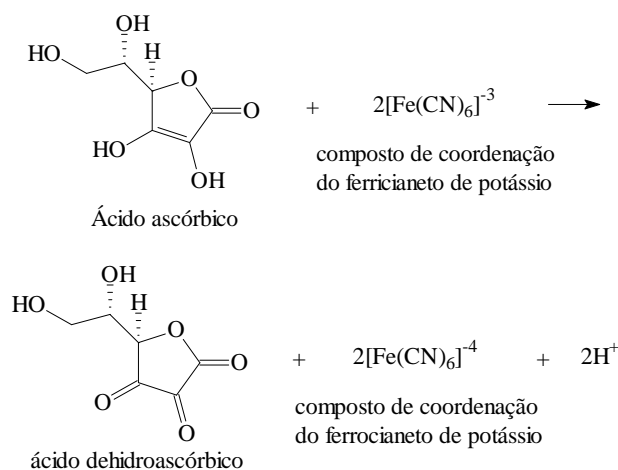
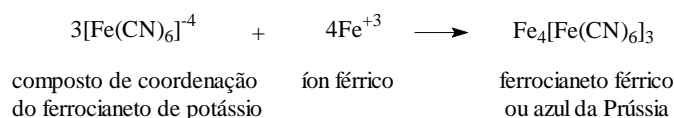


Figura 11 - Provável reação de redução do ferro na presença do ácido ascórbico (vitamina C). (Conclusão)



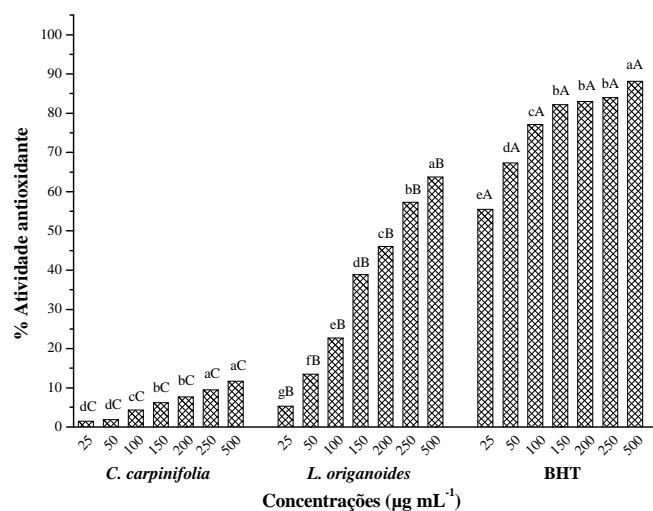
Fonte: Do autor (2016)

A inibição da peroxidação lipídica é outro fundamento utilizado na determinação da atividade antioxidante de uma determinada substância ou amostra. Dentre os métodos, o sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico avalia a capacidade das substâncias em prevenir a oxidação do  $\beta$ -caroteno (substrato lipídico), protegendo-o dos radicais livres resultantes da oxidação do ácido linoleico (peroxidação), por espécies reativas de oxigênio presentes no meio reacional (ALVES et al., 2010). É um método útil para a investigação de antioxidantes lipofílicos.

Na ausência de substâncias antioxidantes, a solução de  $\beta$ -caroteno perde a cor alaranjada, uma vez que os radicais livres formados pela perda de um próton de um grupo metileno dialílico do ácido linoleico ataca as insaturações da molécula de  $\beta$ -caroteno.

Em relação aos resultados obtidos, foi observado um aumento da atividade antioxidante de acordo com o aumento da concentração, revelando uma relação dose-dependente (Figura 12).

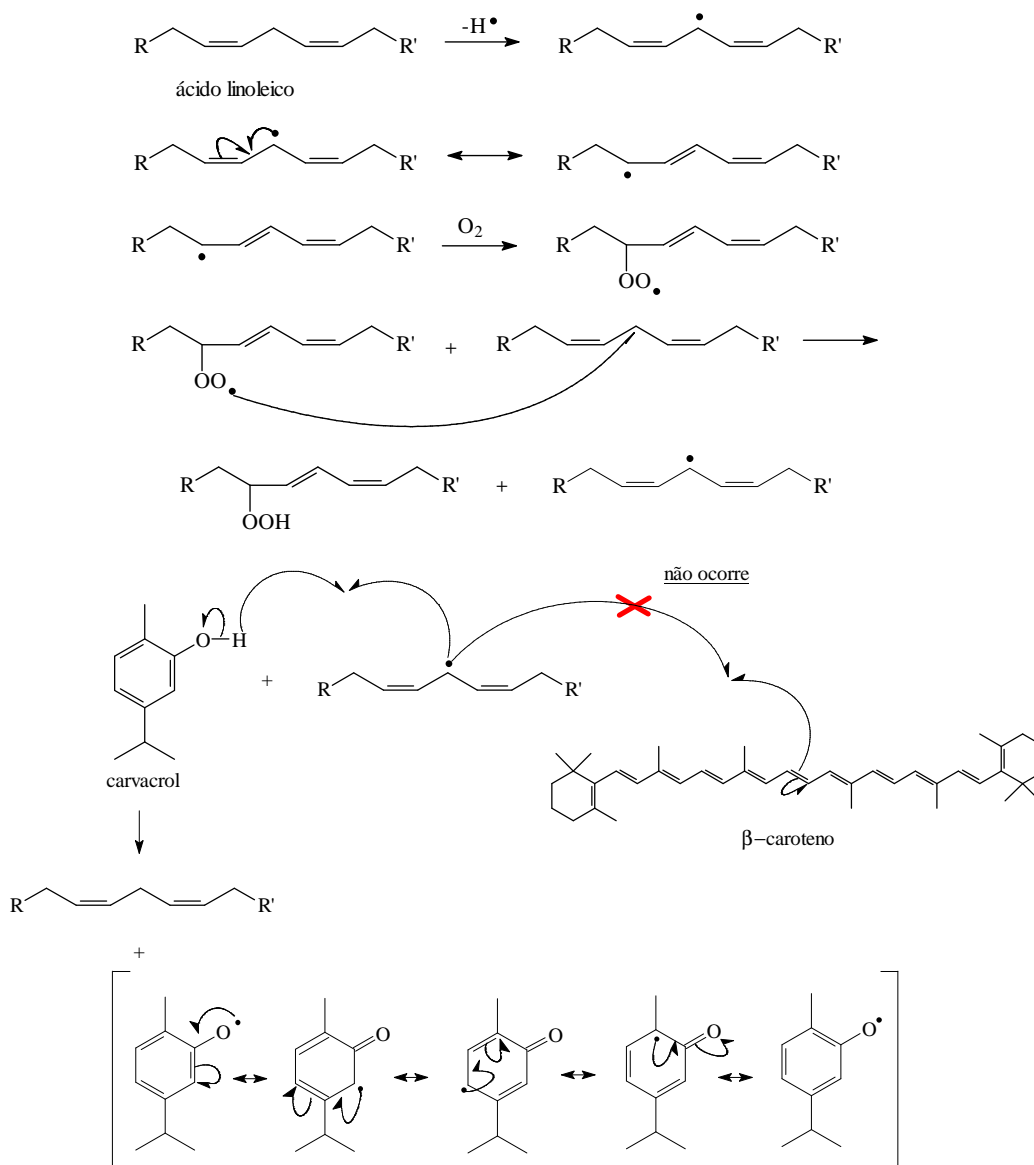
Figura 12 - Valores de porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais/controlado positivo pelo ensaio de oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.



\*As médias seguidas pela mesma letra minúscula, comparando as concentrações dentro de cada óleo essencial/controlado positivo, e da mesma letra maiúscula, comparando os óleos essenciais/controlado positivo dentro de cada concentração, não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Safaei-Ghomi et al. (2009) relataram que compostos contendo átomos de hidrogênio em carbonos alílicos, benzílicos e fenólicos apresentam maiores atividades pelo método  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, devido à relativa facilidade de abstração do átomo de hidrogênio desses grupos pelos radicais peróxil formados nas circunstâncias do teste. Dessa maneira, pode-se afirmar que a capacidade antioxidante de compostos fenólicos perante esse ensaio se deve às suas capacidades de doação de átomos de hidrogênio (Figura 13), confirmando, desse modo, a elevada capacidade antioxidante do óleo essencial de *L. origanoides* e do controle BHT, quando comparados com o óleo de *C. carpinifolia*.

Figura 13 - Provável mecanismo que explica a atividade antioxidante de compostos com características fenólicas (carvacrol) pela inibição de peroxidação lipídica pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico.



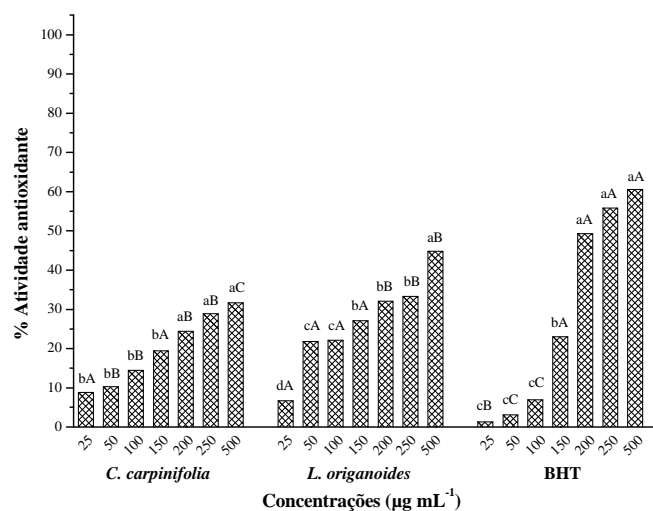
Fonte: Do autor (2016)

Outro método que avalia a inibição da peroxidação lipídica é o teste baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com determinados produtos da decomposição dos hidroperóxidos (TBARS). Nesse método, ocorre a formação dos hidroperóxidos pelo ataque do radical hidroxil (reação Fenton) à porção lipídica da gema de ovo. Assim, um dos principais produtos formados é o malonaldeído, que reage com o ácido tiobarbitúrico, formando um complexo de cor rósea (SANTOS et al., 2007). Substâncias com potencial antioxidante protegem os lipídios da gema do ovo contra a oxidação.

A porcentagem de atividade antioxidante das substâncias em análise aumentou com o acréscimo da concentração; nas menores, os óleos essenciais apresentaram resultados superiores que o BHT, utilizado como controle positivo. Entretanto, para as maiores concentrações, o BHT foi mais eficiente (Figura 14). Esses resultados demonstram que o método TBARS não se mostrou muito confiável, e isso pode ser referente à reatividade do ácido tiobarbitúrico com aldeídos que não se originaram da peroxidação lipídica, uma vez que a gema de ovo é uma matriz muito complexa e variável.

Além disso, observa-se que os constituintes do óleo essencial de *Lippia* foram mais hábeis na proteção dos lipídios da gema de ovo, quando comparados com os de *Cantinoa*, por ser constituído por compostos com facilidade de estabilização após reação com os hidroperóxidos presentes no meio reacional (Figura 15). Esses dados corroboram com os de Ruberto e Baratta (2000), que relataram que compostos com hidroxilas ligadas ao anel aromático (fenóis) têm maior atividade antioxidante, pelo fato de doarem átomos de hidrogênio, e o novo radical formado pode ser estabilizado por ressonância.

Figura 14 - Valores de porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais/controlado positivo pelo método de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).



\*As médias seguidas pela mesma letra minúscula, comparando as concentrações dentro de cada óleo essencial/controlado positivo, e da mesma letra maiúscula, comparando os óleos essenciais/controlado positivo dentro de cada concentração, não diferem entre si pelo Teste Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade.

Figura 15 - Provável mecanismo que explica a atividade antioxidante de compostos com características fenólicas (carvacrol) pela inibição de peroxidação lipídica pelo método de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Continua)

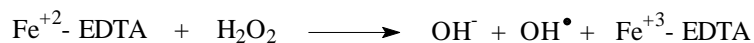
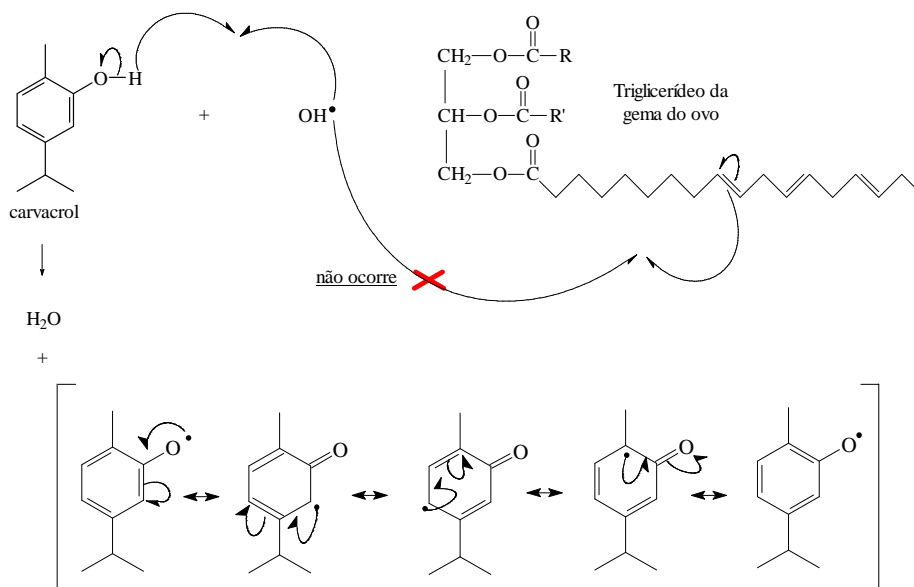


Figura 15 - Provável mecanismo que explica a atividade antioxidante de compostos com características fenólicas (carvacrol) pela inibição de peroxidação lipídica pelo método de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) (Conclusão)



Fonte: Do autor (2016)

Os valores de  $CI_{50}$  foram calculados de acordo com as equações de regressão de primeira e segunda ordem, dependendo dos coeficientes de correlação. Verifica-se pelos dados descritos na Tabela 3, para as metodologias do sistema  $\beta$ -caroteno-ácido linoleico e TBARS, que o controle positivo BHT apresentou uma maior atividade antioxidante, seguido do óleo de *L. origanoides* e de *C. carpinifolia*, respectivamente.



Tabela 3 - Valores de  $CI_{50}$  para a porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Cantinoa carpinifolia* e *Lippia origanoides* e do controle positivo BHT.

Óleos essenciais/controle positivo	Método antioxidante	
	$\beta$ -caroteno	TBARS
	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
<i>Cantinoa carpinifolia</i>	>2000	778
<i>Lippia origanoides</i>	215	527
<b>BHT</b>	<25	233

A constituição química complexa e diferenciada dos óleos essenciais de *Cantinoa carpinifolia* e de *Lippia origanoides* proporcionou atividades antioxidantes distintas, uma vez que os compostos presentes nos óleos essenciais podem atuar de forma isolada, antagônica ou mesmo em sinergismo, exibindo vários mecanismos de ação; além disso, tem que ser levado em consideração o fato de as metodologias empregadas para avaliar a atividade antioxidante *in vitro* apresentar em mecanismos diferentes inerentes de forma distinta à ação de cada composto.

## CONCLUSÃO

A atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Cantinoa carpinifolia* e de *Lippia origanoides* e dos controles positivos, BHT e ácido ascórbico variou com a metodologia empregada; em grande parte delas, os controles e o óleo essencial de *L. origanoides* foram mais eficientes. Em relação ao método do radical hidroxil, os óleos se mostraram mais eficazes que o próprio manitol.

Esses resultados demonstram que o óleo essencial de *Lippia origanoides*, rico em carvacrol, composto com característica fenólica, é um potente antioxidante, podendo agir como redutor ou estabilizador de radicais livres, atuando nas reações de oxidação lipídica, assim como na quelação de

metais. Isso implica que esse óleo essencial poderá ser empregado, após ampla caracterização farmacológica e toxicológica, em indústrias alimentícias, de cosméticos e também na terapêutica de processos inflamatórios, em indústrias farmacêuticas.

## AGRADECIMENTOS

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro e pelas bolsas de estudo.

## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography / mass spectroscopy**. 4th ed. Carol Stream: Allured, 2007.
- ALVES, C. K. et al. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, out. 2010.
- BORGES, L. L. et al. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopedia Biosfera: Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 7, n. 12, p. 1-20, maio 2011.
- BOTTERWECK, A. A. M. et al. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands Cohort Study. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 38, n. 7, p. 599-606, July 2000.
- BOULANOUAR, B. et al. Antioxidante activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. **Industrial Crops and Products: an international journal**, Amsterdam, v. 46, p. 85-96, Apr. 2013.

BOUNATIROU, S. Chemical composition, antioxidante and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. Et Link. **Food Chemistry**, London, v. 105, n. 1, p. 146-155, Jan. 2007.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. Brasília, 2010. v. 1, p. 198-199.

DANDLEN, S. A. et al. Antioxidant activity of six Portuguese thyme species essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 25, p. 150-155, Jan. 2010.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

FOE, F. M. C. N. et al. Chemical composition, *in vitro* antioxidant and anti-inflammatory properties of essential oils of four dietary and medicinal plants from Cameroon. **BioMed Research International**, London, v. 16, p. 117-128, Apr. 2016.

GUERREIRO, A. C. et al. The effect of temperature and film covers on the storage ability of *Arbutus unedo* L. fresh fruit. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 159, p. 96-102, July 2013.

LOPES-LUTZ, D. et al. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. **Phytochemistry**, New York, v. 69, n. 8, p. 1732-1738, May 2008.

MIGUEL, M. G. Antioxidant activity of medicinal and aromatic plants: a review. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 25, n. 5, p. 291-312, Sept./Oct. 2010.

PIMENTEL, F. A. et al. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, jan. 2006.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 269, n. 2, p. 337-341, May 1999.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes usados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, jul./ago. 2006.

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

SAFAEI-GHOMI, J. et al. GC/MS analysis and in vitro antioxidant activity of essential oil and methanol extracts of *Thymus caramancus* Jalas and its main constituent carvacrol. **Food Chemistry**, London, v. 115, n. 4, p. 1524-1528, Aug. 2009.

SANTOS, M. H. et al. Influência do processamento e da torrefação sobre a atividade do café (*Coffea arabica*). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 604-610, jul. 2007.

SARRAZIN, S. L. et al. Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Molecules**, Basel, v. 20, n. 2, p. 1860-1871, Jan. 2015.

SILVA, I. C.; MOURA, R. B. Espécies de Asteraceae e Lamiaceae usadas na medicina popular da região Sudeste para problemas respiratórios: O que as evidências científicas indicam. **Revista Fitos**, São Paulo, v. 6, n. 1, p. 21-28, dez. 2011.

TEIXEIRA, M. L. **Óleos essenciais de *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) e *Lippia origanoides* Kunth.**: composição química, atividade antioxidante e potencial farmacológico. 2016. 193 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

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**, Washington, v. 5, n. 9, p. 1181-1190, Apr. 2014.

**ARTIGO 3 - Óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* (Lamiaceae): ação sobre proteases e fosfolipases A<sub>2</sub>.****RESUMO**

A procura por inibidores naturais de toxinas presentes nas peçonhas de serpentes é de suma valia, objetivando encontrar complementos para a soroterapia tradicional, uma vez que essa se mostra pouco efetiva em neutralizar efeitos locais. Os óleos essenciais destacam-se como promissoras fontes de possíveis inibidores enzimáticos, por possuírem uma complexa constituição química. Nesse contexto, objetivou-se no presente trabalho avaliar o potencial farmacológico do óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* por ensaios de hemólise, efeitos sobre a atividade de fosfolipases A<sub>2</sub> e serinoproteases de peçonhas de serpentes e sobre os processos de coagulação e dissolução de trombos sanguíneo. O óleo essencial foi obtido pela técnica de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger modificado, e a identificação e quantificação dos constituintes, pelas análises em CG/EM e CG-DIC. As atividades fosfolipásica e hemolítica foram realizadas pela técnica de difusão em cavidade ágar utilizando como substratos gema de ovo (fosfolipídios) e eritrócitos sanguíneos humanos, respectivamente. A atividade de serinoproteases foi realizada utilizando-se o substrato cromogênico BAPNA. O efeito do óleo essencial sobre a coagulação induzida pelas peçonhas foi verificado utilizando plasma humano citratado e cronometrando o tempo para a formação do coágulo. A atividade trombolítica foi quantificada pelo volume de líquido liberado pelos trombos. Os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de *C. carpinifolia* foram  $\alpha$ -tujona (32,15%),  $\beta$ -tujona (22,22%),  $\beta$ -cariofileno (8,74%) e sabineno (6,65%). O óleo essencial exerceu maior ação inibitória sobre a atividade fosfolipásica induzida pelas peçonhas de *Bothrops atrox* e *B. moojeni* e potencializou a atividade hemolítica previamente incubado com peçonhas de *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t.), promovendo aumentos estatisticamente significantes, entre 20 e 60%, principalmente para peçonhas botrópicas. Os volumes 0,6 e 1,2  $\mu$ L, pré-incubados com peçonha de *B. jararacussu*, potencializaram a ação de proteases e fosfolipases A<sub>2</sub>, resultando maior dissolução dos trombos. Para os testes de coagulação, os dados sugerem que os constituintes do óleo interagiram com componentes plasmáticos, visto que a incubação prévia do plasma com o óleo reduziu significativamente o tempo de coagulação. Potencialização da ação de toxinas também foi observada no teste de atividade serinoproteolítica, em que o óleo essencial proporcionou aumento na degradação de BAPNA induzida por peçonhas de *B. jararaca* e de *L. muta*. De maneira geral, pode-se observar que o óleo essencial não se mostrou citotóxico e promoveu ação inibitória sobre fosfolipases A<sub>2</sub>. Contudo, interações

de seus constituintes com componentes sanguíneos humanos parecem aumentar a disponibilidade deles como substratos para proteases presentes nas peçonhas. Os dados ampliam a caracterização farmacológica desse óleo essencial; porém, estudos adicionais são necessários para determinar mecanismos de ação, possibilitando sua utilização de forma eficaz e segura.

**Palavras-chave:** Plantas medicinais. Monoterpenos oxigenados. Peçonhas de serpentes. Ação sobre enzimas.

**The essential oil from *Cantinoa carpinifolia* (Lamiaceae): inhibitory activity against proteases and phospholipase A<sub>2</sub>.**

**ABSTRACT**

A great demand for natural inhibitors of toxins present in snake venoms exists, in an attempt to find complements for the traditional antivenom because it is ineffective in counteracting local effects. Essential oils have emerged as promising sources of potential enzyme inhibitors because they have a complex chemical composition. The aim of the present study was to evaluate the pharmacological potential of the essential oil from *Cantinoa carpinifolia* via hemolysis assays, its effects on the activities of phospholipase A<sub>2</sub> and serine proteases from snake venoms and on the coagulation process and the dissolution of blood clots. The essential oil was obtained by hydrodistillation using the modified Clevenger apparatus, and the identification and quantification of constituents was accomplished by analysis by GC-MS and GC-FID. The phospholipase and hemolytic activities were determined by the diffusion in agar technique, as well as using egg yolk substrate (phospholipid) and human blood erythrocytes, respectively. The serine protease activity was determined using BAPNA. The effect of the essential oil on the coagulation induced by the venoms was verified using citrated human plasma and timing the clot formation. Thrombolytic activity was measured by the volume of liquid released by thrombi. The principal constituents found in the essential oil from *C. carpinifolia* were  $\alpha$ -thujone (32.15%),  $\beta$ -thujone (22.22%),  $\beta$ -caryophyllene (8.74%) and sabinene (6.65%). The essential oil had a greater inhibitory action against phospholipase activity induced by the venoms of *Bothrops atrox* and *B. moojeni* and potentiated the hemolytic activity after being previously incubated with venoms of *B. jararacussu*, *B. moojeni* and *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.t.*). It caused statistically significant increases between 20 and 60%, mostly for bothropic venoms. Volumes of 0.6 and 1.2  $\mu$ L, pre-incubated with venom from *B. jararacussu*, potentiated the action of proteases and phospholipase A<sub>2</sub>, and resulted in a greater dissolution of thrombus. In coagulation tests, the data suggested that oil constituents interacted with serum components, whereas preincubation of the plasma with the oil significantly reduced the clotting time. Potentiation of the toxic action was also observed in serinoproteolítica activity tests, in which the essential oil provided an increase in BAPNA hydrolysis induced by *B. jararaca* and *L. muta* venoms. In general, the essential oil was not cytotoxic and had an inhibitory effect on phospholipase A<sub>2</sub>. However, interactions of its constituents with human blood components seem to increase their availability as substrates for proteases found in the venoms. The data extend the pharmacological characterization of this essential oil; however,

additional studies are needed to determine mechanisms of action to permit their effective and safe use.

**Keywords:** Medicinal plants. Monoterpene oxygenates. Snake venoms. Enzyme inhibition.



## INTRODUÇÃO

Acidentes ofídicos configuram problema de saúde pública e, embora se enquadrem entre as consideradas “doenças negligenciadas”, atingem milhões de pessoas anualmente, em todo o mundo, podendo causar graves sequelas e morte. A busca por produtos naturais com propriedades antiofídicas tem motivado estudos de caracterização tóxica e farmacológica de extratos e de óleos essenciais de várias espécies vegetais. Em adição, o uso de peçonhas e toxinas de animais como ferramentas laboratoriais, induzindo atividades *in vitro*, também têm contribuído para ampliar a caracterização de compostos naturais que atuam sobre diferentes classes de enzimas, tendo repercussão na fisiologia e farmacologia humana, considerando a alta homologia estrutural e funcional existente entre classes de enzimas ofídicas e endógenas humanas, como, por exemplo, algumas proteases e fosfolipases.

O maior conhecimento sobre as propriedades farmacológicas e toxicológicas de extratos e óleos essenciais direcionam para a grande importância econômica e etnofarmacológica de seus princípios ativos, principalmente os metabólitos secundários. Esses compostos possuem diversas propriedades como antioxidante, anti-inflamatória, bactericida, fungicida, e muitos são capazes de inibir ou potencializar a ação de diferentes enzimas, por meio de interações específicas.

Alguns óleos essenciais, ricos em terpenos, têm sido descritos com ação sobre proteases fibrinogenolíticas, apresentando efeitos sobre a cascata de coagulação sanguínea, fibrinólise, agregação de plaquetas e, conseqüentemente, eventos hemorrágicos induzidos por peçonhas de serpentes (MIRANDA et al., 2014; 2016).

Nesse contexto, destaca-se o uso popular de diferentes formulações vegetais com propriedades antiofídicas, capazes de neutralizar os efeitos locais

induzidos pelo envenenamento (ex: hemorragia, edema e necrose) contra os quais a soroterapia tradicional mostra-se pouco efetiva. A ausência de estudos científicos que investiguem o potencial antiofídico de óleos essenciais e a importância de explorar o potencial tóxico-farmacológico de metabólitos secundários presentes nesses óleos destacam essas linhas de pesquisa como relevantes e inovadoras.

Diante do exposto, objetivou-se no presente trabalho avaliar o potencial farmacológico do óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) por meio de ensaios de indução e/ou inibição de hemólise, de avaliação de efeitos sobre a atividade de fosfolipases A<sub>2</sub> e serinoproteases de peçonhas de serpentes, bem como de efeitos sobre os processos de coagulação e dissolução de trombos sanguíneos induzidos por diferentes peçonhas de serpentes.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção do material vegetal**

A espécie *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) Harley & JFBPastore foi coletada no município de Itumirim-MG, apresentando como coordenadas geográficas latitude 21° 19' 01" S, longitude 44° 52' 16" W e altitude 871m, no mês de março de 2014. Essa foi identificada pela Dra. Mariana Esteves Mansaranes, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário ESAL com o número de registro 28489.

### **Extração do óleo essencial**

O óleo essencial foi extraído das folhas frescas de *Cantinoa carpinifolia* utilizando o método de hidrodestilação com o aparelho de Clevenger modificado (BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010) no Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais da UFLA. Foram realizadas três extrações, destilando-se por 2 horas. Transcorrido esse tempo, o óleo essencial foi separado do hidrolato por centrifugação, utilizando uma centrífuga de bancada de cruzeta horizontal (Fanem Baby®I Modelo 206 BL) a 965 g por 5 min. Com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, o óleo foi retirado, acondicionado em frasco de vidro sob proteção de umidade e luz, e armazenado em baixa temperatura.

Paralelamente à extração, foi realizado o teste de umidade de acordo com Pimentel et al. (2006) e o rendimento do óleo essencial foi calculado e expresso em peso de óleo por peso de material com Base Livre de Umidade (BLU).

### **Identificação e quantificação dos constituintes do óleo essencial**

A identificação dos constituintes químicos do óleo essencial foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM- Shimadzu, modelo QP 5050A), sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase ligada DB5 (0,25 µm de espessura de filme); He como gás de arraste com fluxo de 1,18 mL min<sup>-1</sup>; a temperatura foi programada, iniciando-se em 60 °C, seguindo de um aumento de 3 °C min<sup>-1</sup> até atingir 240 °C, depois a 10 °C até atingir 300 °C, mantendo-se constante essa temperatura por 7 min; temperatura do injetor: 220 °C, temperatura da fonte de íons: 200 °C e temperatura do detector

(ou interface): 240 °C; o volume da amostra injetada foi de 1,0 µL, diluída em hexano; taxa de partição do volume injetado de 1:100 e pressão na coluna de 71,0 kPa. As condições do espectrômetro de massas foram: detector de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos e fragmentos detectados na faixa de 45 a 500 Da. Para o cálculo do índice de retenção, foi utilizada a equação de Van den Dool e Kratz em relação à série homóloga de n-alcenos (nC<sub>8</sub>-nC<sub>18</sub>). A identificação dos constituintes foi realizada com base na comparação dos índices de retenção da literatura (ADAMS, 2007). Também foram utilizadas duas bibliotecas do equipamento NIST107 e NIST21, que permitem a comparação dos dados dos espectros com aqueles existentes nas bibliotecas. Na avaliação quantitativa, utilizou-se um cromatógrafo gasoso Shimadzu CG-17A equipado com detector por ionização de chamas (DIC) e as condições operacionais foram as mesmas empregadas na identificação dos constituintes dos óleos, realizada por CG-EM; entretanto, a temperatura do detector foi de 300 °C. Os dados de identificação e quantificação dos compostos presentes no óleo essencial podem ser acessados na tese de Teixeira (2016).

### **Obtenção de material biológico humano**

Os testes para avaliar o potencial farmacológico do óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* foram realizados no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Lavras e os protocolos de pesquisa envolvendo material biológico humano foram previamente aprovados pelo COEP (Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos) da UFLA, com o número de protocolo 42467115.6.0000.5148 (Apêndice A).

O sangue de três voluntários (10 mL cada) foi coletado em tubos BD Vacutainer® de Citrato de Sódio Tamponado 0,109 mol e 0,105 mol (3,2%), na proporção de nove partes de sangue para uma parte de solução de citrato,

conforme recomendado pela CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Eritrócitos e plasma citratado foram separados por processo de centrifugação, sendo utilizados, respectivamente, para os testes de atividade hemolítica e coagulante. Para a avaliação da atividade trombolítica, 10 mL de sangue foram coletados de um único voluntário, sem adição de anticoagulante, sendo imediatamente distribuído em uma placa de microtitulação (100 µL por poço), para a obtenção dos trombos.

### **Peçonhas de serpentes**

As peçonhas cristalizadas de cada espécie, *Bothrops atrox*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.t.*) e *Lachesis muta*, foram obtidas no Serpentário Bioagents, localizado em Batatais-SP e armazenadas a 4 °C. Para a realização dos experimentos, as peçonhas foram dissolvidas em solução tampão fosfato (PBS, pH= 7,2) e as concentrações, expressas em massa/volume ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### **Efeito do óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* sobre a atividade fosfolipásica induzida por peçonhas**

A atividade fosfolipásica (GUTIÉRREZ et al., 1988) foi avaliada em meio sólido elaborado com PBS (solução tampão fosfato), contendo 1% de ágar, 0,01M de cloreto de cálcio, 0,005% de azida de sódio e 1:3 de gema de ovo (fonte de lecitinas). O meio foi vertido em placas de Petri e, após a sua solidificação, orifícios de 4 mm de diâmetro foram elaborados para a aplicação das amostras. Controles contendo o óleo essencial puro, nos volumes de 0,6; 1,2; 1,8 e 2,4 µL e peçonhas puras *B. atrox*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram realizados.

A ação do óleo essencial sobre a atividade fosfolipásica induzida pelas diferentes peçonhas foi avaliada após incubação prévia das peçonhas com o óleo essencial nos diferentes volumes mencionados, em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C por período de 12 horas e a avaliação foi realizada pela medida do diâmetro do halo translúcido formado (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982). Os resultados obtidos para os controles contendo apenas as peçonhas foram consideradas como 100% de atividade fosfolipásica, possibilitando a conversão dos valores de diâmetros obtidos para as amostras incubadas, em porcentagem.

#### **Atividade hemolítica: indução/ inibição**

A atividade hemolítica foi avaliada em meio sólido (GUTIÉRREZ et al., 1988) seguindo o mesmo método descrito para a atividade fosfolipásica; porém, realizando a substituição da gema de ovo por eritrócitos humanos.

Os eritrócitos foram obtidos por centrifugação de sangue coletado em tubos BD Vacutainer® de citrato de sódio tamponado, seguindo com três lavagens em PBS.

O potencial citotóxico do óleo essencial puro foi avaliado utilizando volumes de 0,6; 1,2; 1,8 e 2,4 µL. Controles contendo peçonhas de *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *C.d.t.* (25 µg mL<sup>-1</sup>) puras também foram realizados.

O efeito do óleo essencial sobre a atividade hemolítica induzida pelas peçonhas foi avaliado após incubação das peçonhas em banho-maria a 37 °C por 30 minutos, com os volumes do óleo citados anteriormente. Os resultados obtidos para os controles contendo apenas as peçonhas foram considerados como 100% de atividade hemolítica, possibilitando a conversão dos valores de diâmetros, obtidos para as amostras incubadas, em porcentagem.

**Atividade trombolítica: indução/ inibição**

O sangue coletado de um voluntário sem a adição de anticoagulante foi distribuído em placas de microtitulação (100  $\mu\text{L}$  por poço) para a obtenção de trombos. O óleo essencial nos volumes 0,6 e 1,2  $\mu\text{L}$  foi incubado com as peçonhas de *B. jararacussu* e *C.d.t.* (80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) isoladamente, por 30 minutos a 37 °C. Os tratamentos foram adicionados aos poços contendo os trombos seguindo com incubação a 37 °C por 12 horas. A atividade foi quantificada pelo volume de líquido liberado pelos trombos, sendo esse aspirado com o auxílio de uma pipeta automática (GREMSKI et al., 2007; CINTRA et al., 2012).

**Efeito do óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* sobre a coagulação induzida por peçonhas de serpentes**

A atividade coagulante foi realizada utilizando metodologia descrita por Selistre et al. (1990). O plasma humano citratado (200  $\mu\text{L}$ ) foi adicionado em tubos de ensaio, que permaneceram em banho-maria a 37 °C para estabilização da temperatura, com posterior adição do óleo essencial nos volumes de 0,6; 1,2 e 1,8  $\mu\text{L}$  e observação por um período de 45 minutos, com leve agitação a cada 10 minutos. O óleo não induziu coagulação no período observado; então, o incubado foi novamente avaliado após 24 horas para confirmação da ausência de atividade.

A ação inibidora do óleo sobre a atividade coagulante induzida pelas peçonhas foi avaliada conforme metodologia descrita por Valentin e Lambeau (2000), com adaptações de volumes e tempos de incubação das amostras. Ensaio preliminares foram realizados para determinar a dose mínima coagulante (DMC) de cada peçonha, capaz de coagular 200  $\mu\text{L}$  de plasma sanguíneo citratado em aproximadamente 60s.

Dois experimentos foram realizados, a fim de avaliar as possíveis interações do óleo essencial com as toxinas de ação coagulante presentes nas peçonhas e as possíveis interações dos constituintes do óleo essencial com os componentes do plasma sanguíneo que participam da cascata de coagulação. No primeiro ensaio, o óleo essencial nos volumes citados anteriormente foi previamente incubado com as peçonhas de *B. moojeni* ( $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *C.d.t.* ( $13 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e *L. muta* ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), por 10 minutos a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ ; decorrido esse tempo, os incubados foram adicionados a tubos contendo plasma citratado ( $200 \mu\text{L}$ ) e o tempo de coagulação cronometrado. No segundo ensaio, foi realizada incubação prévia do plasma com os diferentes volumes do óleo essencial a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 10 minutos, procedendo com a adição das peçonhas e contagem do tempo de coagulação.

#### **Efeito do óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* sobre a atividade de serinoproteases de peçonhas de serpentes**

A atividade de serinoproteases foi avaliada utilizando o substrato sintético cromogênico BAPNA (N- $\alpha$ -benzoil-L-arginil-*p*-nitroanilida) (ZAQUEO et al., 2016). O substrato BAPNA foi previamente diluído em DMSO (dimetilsulfóxido) e adicionado a 1% em Tris-HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$  e pH 8,1.

Duas variáveis de interação molecular foram avaliadas, sendo consideradas interações dos constituintes do óleo essencial com serinoproteases presentes nas peçonhas e interações dos constituintes do óleo essencial com o substrato BAPNA. Assim, no primeiro ensaio, o óleo essencial nos volumes de 0,6; 1,2 e 1,8  $\mu\text{L}$  foram previamente incubados com as peçonhas de *B. jararaca* e *L. muta* ( $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 10 minutos a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , seguindo com avaliação da atividade serinoproteolítica. No segundo ensaio, o substrato BAPNA foi previamente incubado com diferentes volumes do óleo essencial a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  por 10



minutos, seguindo com adição das peçonhas e avaliação da atividade serinoproteolítica. As amostras foram aferidas em espectrofotômetro a 415 nm, após 90 minutos de reação. O espectrofotômetro foi zerado utilizando como branco a solução do substrato diluída em água. Os valores de absorvância foram convertidos em unidades de enzimas ativas, considerando 0,09 nm de absorvância equivalente a uma unidade por minuto. Os resultados obtidos para os controles contendo apenas as peçonhas foram considerados como 100% de atividade serinoproteolítica, possibilitando a conversão dos valores de unidade de enzimas ativas, obtidos para as amostras incubadas, em porcentagem.

### **Análise estatística**

O delineamento experimental adotado foi o inteiramente casualizado (DIC) com três repetições. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR (FERREIRA, 2011). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias foram comparadas com o controle (peçonha) por contraste uma a uma, utilizando o Teste de Scheffé ao nível de 5% de probabilidade.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os constituintes  $\alpha$ -tujona (32,15%),  $\beta$ -tujona (22,22%),  $\beta$ -cariofileno (8,74%) e sabineno (6,65%) foram os compostos majoritários encontrados no óleo essencial das folhas de *C. carpinifolia* e o rendimento do óleo foi de 0,48% (BLU) (TEIXEIRA, 2016).

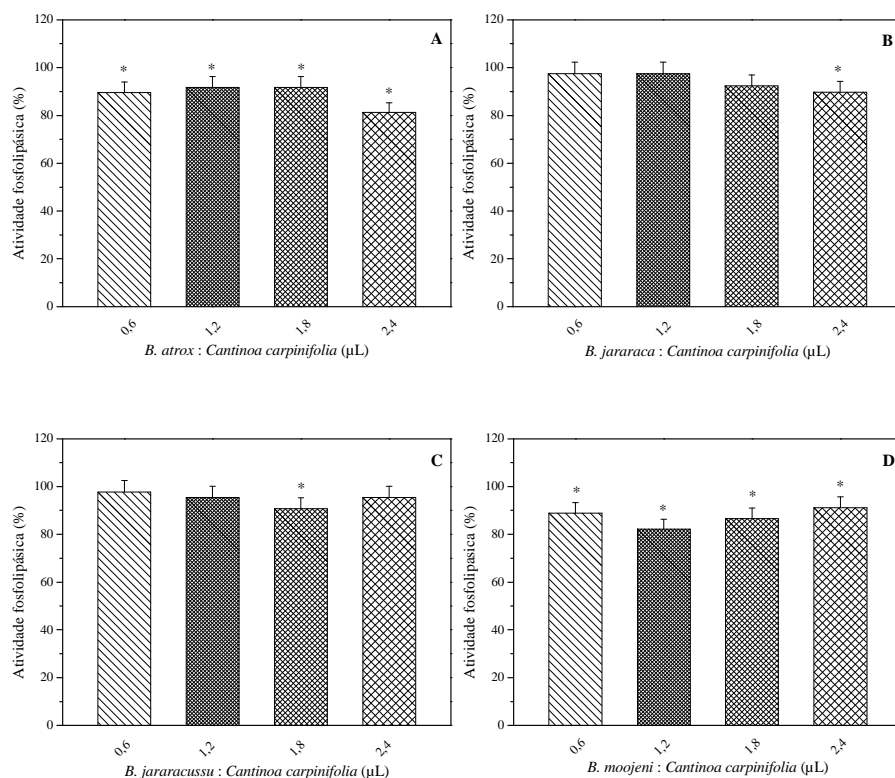
Os percentuais dos constituintes majoritários desse óleo essencial foram monoterpenos oxigenados (67,83%, principalmente cetonas e álcoois), sesquiterpenos hidrocarbônicos (20,36%) e monoterpenos hidrocarbônicos (7,76%).

As fosfolipases de peçonhas (PLA<sub>2</sub>s) modificam a microviscosidade da fase lipídica das membranas, afetando a atividade funcional de enzimas ligadas à membrana (KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006). Além do mais, podem desencadear a produção de mediadores de inflamação por meio da liberação de ácido araquidônico (precursor na síntese de eicosanoides), resultante da quebra de fosfolipídios de membrana.

Inibidores naturais de fosfolipases A<sub>2</sub> têm sido amplamente descritos, uma vez que podem atuar por mecanismos distintos, como, por exemplo, por meio de ligação a sítios hidrofóbicos presentes na estrutura dessas enzimas, pelo sequestro de cofatores iônicos essenciais para a atividade catalítica, pela ação antioxidante neutralizando espécies reativas geradas durante a ação das enzimas, e pela interação a resíduos de aminoácido presentes no sítio catalítico impedindo a ligação da enzima ao substrato (MARCUSI et al., 2007; CARVALHO et al., 2013).

No presente trabalho, o óleo essencial de *C. carpinifolia* exerceu ação inibitória, estatisticamente significativa (iguais ou superiores a 10%) sobre a atividade fosfolipásica induzida pelas peçonhas de *Bothrops atrox*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*. O efeito inibidor do óleo foi mais efetivo sobre as peçonhas de *B. atrox* e *B. moojeni*, sendo observadas inibições em todos os volumes de óleo avaliados (0,6; 1,2; 1,8 e 2,4 µL) (Figura 1). Contudo, maiores inibições de atividade fosfolipásica induzida por peçonhas têm sido descritas na literatura, para extratos aquosos e hidroalcoólicos, sendo atribuídas, principalmente, à ação de compostos fenólicos (GUIMARÃES et al., 2014), os quais não foram encontrados na composição do óleo essencial de *C. carpinifolia*.

Figura 1 - Efeito do óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* sobre a atividade fosfolipásica induzida pelas peçonhas de *Bothrops atrox*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*.



\*Os dados foram convertidos em porcentagem de atividade, considerando os resultados dos controles positivos, contendo apenas peçonhas ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), como 100%.

\*Significativo em relação ao controle (peçonha) pelo Teste de Scheffé ao nível de 5% de probabilidade.

A atividade hemolítica ou citotóxica sobre eritrócitos, amplamente utilizada como complementação da caracterização toxicológica de óleos essenciais (ASGARY et al., 2013; JUGL-CHIZZOLA, 2005; XAVIER et al., 2015), permite também avaliar a ação de inibidores sobre a atividade de proteases e fosfolipases  $A_2$ , uma vez que essas apresentam-se em alta

concentração nas peçonhas e são responsáveis por degradar proteínas e fosfolipídios, respectivamente, que compõem as membranas celulares (USHANANDINI et al., 2006; DHANANJAYA et al., 2011; TORRES et al., 2011; MOURA et al. 2011; GUIMARÃES, et al., 2014).

O óleo essencial de *C. carpinifolia*, avaliado no presente estudo, não induziu hemólise, mostrando-se não citotóxico sobre eritrócitos humanos, nas condições avaliadas. Entretanto, incubações prévias do óleo essencial com as peçonhas de *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *Crotalus durissus terrificus* resultaram em potencialização da atividade hemolítica induzida pelas peçonhas. As maiores potencializações foram obtidas para as peçonhas botrópicas, em que os valores de hemólise foram estatisticamente diferentes do controle positivo (somente peçonha), entre 20 e 60%, após incubações com 0,6; 1,2; 1,8 e 2,4  $\mu$ L do óleo. Para a peçonha de *C.d.t.*, apenas o volume de 2,4  $\mu$ L de óleo essencial promoveu incremento estatisticamente significativo nessa atividade (Figura 2).

Figura 2 - Efeito do óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* sobre a atividade hemolítica induzida pelas peçonhas de *Bothrops jararacussu*, *B. moojeni* e *Crotalus durissus terrificus*.(Continua)

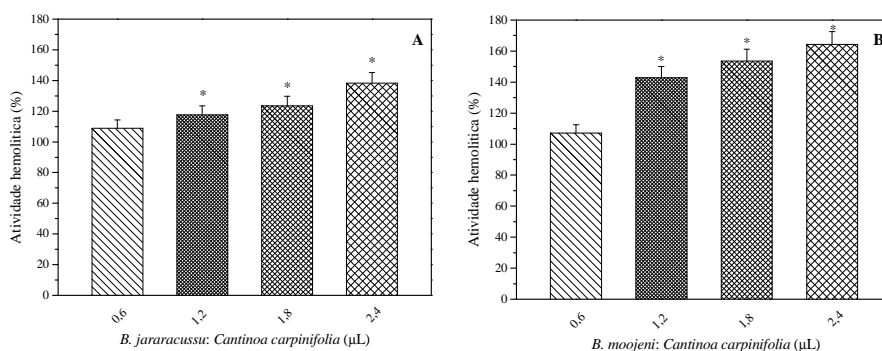
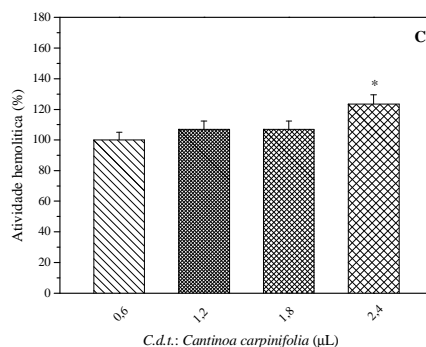


Figura 2 - Efeito do óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* sobre a atividade hemolítica induzida pelas peçonhas de *Bothrops jararacussu*, *B. moojeni* e *Crotalus durissus terrificus*.(Conclusão)



\*Os dados foram convertidos em porcentagem de atividade, considerando os resultados dos controles positivos, contendo apenas peçonhas ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), como 100%.

\*Significativo em relação ao controle (peçonha) pelo Teste de Scheffé ao nível de 5% de probabilidade.

A peçonha de *B. jararacussu*, na atividade trombolítica, foi considerada como controle positivo, e os volumes liberados pelos trombos com ela tratados foram considerados como 100% de atividade trombolítica. A ação inversa (trombótica) exercida pela peçonha de *C.d.t.* resultou nos menores valores de atividade trombolítica, apresentando valores próximos ao obtido para o controle negativo, contendo apenas PBS ( $30 \mu\text{L}$ ).

O óleo essencial puro no volume de  $1,2 \mu\text{L}$  induziu dissolução dos trombos, apresentando porcentagem de atividade trombolítica de 55,77%, sendo essa duas vezes maior que a obtida para *C.d.t.* (24,39%) (Tabela 1).

Ambos os volumes de óleo essencial avaliados, pré-incubados com peçonha de *B. jararacussu*, potencializaram a ação de proteases e fosfolipases  $A_2$ , resultando em maior dissolução dos trombos em comparação ao controle contendo apenas a peçonha (Tabela 1). Interações dos constituintes do óleo essencial com enzimas presentes nas peçonhas poderiam promover alterações

estruturais nessas moléculas, proporcionando aumento de afinidade pelos substratos das enzimas ou mesmo facilitando a coordenação e ligação dessas a cofatores iônicos. Contudo, deve-se também considerar possíveis interações dos constituintes do óleo essencial com moléculas presentes nas superfícies celulares de células sanguíneas ou mesmo com proteínas, lipídios e demais moléculas encontradas no sangue de forma livre. Nesse contexto, interações específicas de metabólitos secundários vegetais com proteínas ou mesmo interações hidrofóbicas inespecíficas desses metabólitos com lipídios devem ser consideradas.

Tabela 1 - Porcentagem de atividade trombolítica avaliada em incubados contendo apenas óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia*, peçonhas de *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus*, ou misturas previamente incubadas contendo óleo essencial e peçonha.

Tratamentos	Atividade trombolítica (%)
<sup>a</sup> <i>C.d.t.</i>	24,39
<i>C.d.t.</i> + OE 0,6 µL	85,72*
<i>C.d.t.</i> + OE 1,2 µL	142,77*
<i>B. jararacussu</i> + OE 0,6 µL	162,76*
<i>B. jararacussu</i> + OE 1,2 µL	182,72*
OE 0,6 µL	32,95
OE 1,2 µL	55,77

Foi realizada a subtração do volume de PBS (controle negativo) e os dados foram convertidos em porcentagem de atividade, considerando os valores obtidos para a peçonha de *B. jararacussu* com 100% de atividade trombolítica. <sup>a</sup>A peçonha de *C.d.t* possui ação trombótica. \*Incubados que diferem estatisticamente de seu respectivo controle contendo apenas peçonha (<5%).

Algumas hipóteses acerca dos mecanismos de interações têm sido descritas em literatura; porém, poucos trabalhos confirmam essas interações, como, por exemplo, modelos moleculares computacionais, demonstrando sítios de ligação de compostos vegetais nas estruturas das enzimas (TICLI et al., 2005;

dos SANTOS et al., 2010; dos SANTOS et al., 2011; de ALVARENGA et al., 2011; ARAFAT et al., 2014).

A atividade trombótica induzida pela peçonha de *C.d.t.* foi inibida após incubação com o óleo essencial, sendo obtidas porcentagens de atividade trombolítica de 85,72 e 142,77%, para os volumes de 0,6 e 1,2  $\mu\text{L}$ , respectivamente, em comparação a 24,39% observado para a peçonha pura (Tabela 1). Os resultados demonstram o efeito inibidor dos constituintes do óleo essencial sobre toxinas pró-coagulantes presentes na peçonha de *C.d.t.*

Os resultados obtidos nos ensaios de coagulação (Tabela 2) sugerem que os constituintes do óleo essencial interagem principalmente com componentes plasmáticos, visto que a incubação prévia do plasma com o óleo e posterior adição das peçonhas induz reduções estatisticamente significantes do tempo de coagulação. Essas interações podem resultar em maior exposição dos fatores de ativação da cascata de coagulação, facilitando a quebra deles por proteases presentes nas peçonhas. A redução do tempo de coagulação também foi observada após incubação prévia das peçonhas com o óleo essencial e posterior adição do plasma; contudo, valores estatisticamente significantes foram observados apenas para o volume de 1,8  $\mu\text{L}$  do óleo (Tabela 2), possivelmente porque nessas condições experimentais o óleo essencial teve menos tempo para interagir com os constituintes do plasma antes de as toxinas exercerem sua atividade.

Tabela 2 - Efeito do óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* sobre a coagulação de plasma citratado humano induzida por diferentes peçonhas de serpentes.

<b>Incubação prévia do óleo essencial + Peçonha (10 min. à 37 °C) com posterior adição do plasma</b>			
<b>Tempo de coagulação (s)</b>			
<i>C. carpinifolia</i> ( $\mu\text{L}$ )	<i>B. moojeni</i>	<i>C.d.t.</i>	<i>L. muta</i>
<b>0</b>	<b>63,7</b>	<b>66,0</b>	<b>62,7</b>
<b>0,6</b>	62,3	61,0	63,3
<b>1,2</b>	57,7	57,3	55,0
<b>1,8</b>	52,3*	47,0*	48,0*
<b>Incubação prévia de plasma + Óleo essencial (10 min. à 37 °C) com posterior adição da peçonha</b>			
<b>Tempo de coagulação (s)</b>			
<i>C. carpinifolia</i> ( $\mu\text{L}$ )	<i>B. moojeni</i>	<i>C.d.t.</i>	<i>L. muta</i>
<b>0</b>	<b>63,7</b>	<b>66,0</b>	<b>62,7</b>
<b>0,6</b>	50,3*	46,0*	43,3*
<b>1,2</b>	46,3*	44,3*	41,7*
<b>1,8</b>	44,7*	39,3*	31,0*

As doses coagulantes mínimas (DCM) foram pré-determinadas para as peçonhas de *B. moojeni* ( $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *C.d.t.* ( $13 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e *L. muta* ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). \*Significativo nas colunas em relação ao controle (peçonha) pelo Teste de Scheffé ao nível de 5% de probabilidade.

Miranda et al. (2014) relataram redução no tempo de coagulação do plasma após incubação do plasma com óleo essencial extraído dos rizomas e folhas de *Hedychium coronarium* e posterior adição das peçonhas de *Lachesis muta* e *B. atrox*, sugerindo interações entre os constituintes dos óleos essenciais e os fatores da cascata de coagulação presentes no plasma. As incubações prévias dos óleos com as peçonhas e posterior adição do plasma resultaram em aumento no tempo de coagulação, sugerindo interações com as proteases presentes nas peçonhas.

Interações similares foram também observadas por Miranda et al. (2016), que avaliaram o efeito dos óleos essenciais de *Baccharis*



*dracunculifolia*, *Conyza bonariensis*, *Tithonia diversifolia* e *Ambrosia polystachya* sobre a coagulação induzida pelas peçonhas de *B. moojeni*, *B. atrox* e *Lachesis muta*. Esses autores identificaram monoterpenos como constituintes majoritários nos óleos essenciais de *C. bonariensis*, *T. diversifolia* e *B. dracunculifolia*, e sesquiterpenos como constituintes majoritários do óleo essencial de *A. polystachya*, sendo essas composições similares à encontrada para o óleo essencial avaliado no presente trabalho, em que monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos hidrocarbônicos e monoterpenos hidrocarbônicos, juntos, correspondem a aproximadamente 95% de sua composição.

As serinoproteases pertencem a uma das classes de proteases presentes nas peçonhas, responsáveis pelos efeitos do envenenamento sobre a hemostasia (ZELANIS et al., 2015). Em ensaios utilizando substrato específico para serinoproteases, foram observadas potencializações parciais de sua atividade enzimática procedendo com incubações prévias do substrato com o óleo essencial e posterior adição das peçonhas, assim como com incubações prévias das peçonhas com o óleo essencial e posterior adição do substrato. Entre os resultados estatisticamente diferentes dos controles, realizados apenas com peçonhas, destacam-se os efeitos do óleo nos volumes de 1,2 e 1,8  $\mu\text{L}$  sobre a peçonha *L. muta*, avaliados nas duas diferentes incubações (Tabela 3). O maior valor de potencialização (38,02%) foi observado após incubação prévia do óleo essencial no volume de 1,8  $\mu\text{L}$  com a peçonha de *L. muta* (Tabela 3).

Tabela 3 - Efeito do óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* sobre a atividade enzimática de serinoproteases induzida por diferentes peçonhas de serpentes.

<b>Incubação prévia do óleo essencial + Peçonha (10 min. à 37 °C) com posterior adição do substrato BAPNA</b>		
<b>Atividade de Serinoprotease (%)</b>		
<b><i>C. carpinifolia</i> (µL)</b>	<b><i>B. jararaca</i></b>	<b><i>L. muta</i></b>
<b>0,6</b>	101,85	109,51*
<b>1,2</b>	103,94	117,49*
<b>1,8</b>	102,31	138,02*
<b>Incubação prévia do substrato BAPNA + Óleo essencial (10 min. à 37 °C) com posterior adição da peçonha</b>		
<b>Atividade de Serinoprotease (%)</b>		
<b><i>C. carpinifolia</i> (µL)</b>	<b><i>B. jararaca</i></b>	<b><i>L. muta</i></b>
<b>0,6</b>	99,28	102,87
<b>1,2</b>	103,94	105,39*
<b>1,8</b>	107,33*	118,21*

Os dados foram convertidos em porcentagem de atividade, considerando os controles contendo apenas peçonhas como 100%. \*Significativo nas colunas em relação ao controle (peçonha) pelo Teste de Scheffé ao nível de 5% de probabilidade.

Independentemente do contexto do ofidismo, inibidores de serinoproteases possuem importante papel em processos fisiológicos como coagulação sanguínea, fibrinólise e resposta imune (SAFAVI; ROSTAMI, 2012; MAI et al., 2016). Dessa forma, a caracterização de moléculas naturais com ação inibidora sobre proteases pode direcionar para a descoberta de modelos moleculares para o desenvolvimento de novos fármacos.

Devido à natureza lipofílica dos componentes dos óleos essenciais, quando aplicados topicamente, esses são capazes de agir na membrana celular das células da epiderme e da derme. Por esse mecanismo ocorre a penetração dos componentes do óleo essencial para o interior das células. Uma vez no citoplasma, estes componentes podem atuar no metabolismo das organelas, assim como interagir com diferentes moléculas que participam das vias metabólicas. Se esses compostos entrarem na corrente sanguínea dos capilares

da derme profunda, podem então atuar em células de órgãos-alvo mais distantes (WOLFFENBÜTTEL, 2010).

Dessa forma, considerando a baixa efetividade da soroterapia tradicional no tratamento dos efeitos locais, o óleo essencial mostra-se promissor para utilização tópica, uma vez que apresenta ação inibitória sobre as classes de toxinas que compõem a maior porcentagem do peso seco das peçonhas (fosfolípases A<sub>2</sub> e proteases) e são as principais responsáveis pelos danos locais. Além disso, os óleos essenciais não requerem preparações farmacêuticas específicas, podendo ter aplicação direta logo após a extração; muitos são descritos em literatura com propriedades antimicrobianas, anti-inflamatória e cicatrizante, ações essas de grande valia no tratamento do envenenamento ofídico.

Trabalhos futuros que promovam o isolamento dos constituintes dos óleos essenciais e a elucidação dos mecanismos de interação entre metabólitos secundários, proteínas das peçonhas e proteínas do organismo animal são imprescindíveis para o desenvolvimento de novas terapias antiofídicas ou adjuvantes para a soroterapia tradicional, podendo definir condições ideais de aplicação dos óleos essenciais.

## CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Cantinoa carpinifolia* não apresentou citotoxicidade sobre eritrócitos sanguíneos humanos; porém, as interações de seus constituintes com toxinas presentes nas peçonhas de *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *C.d.t.* resultou em potencialização desta atividade, induzida pelas peçonhas.

A potencialização na atividade de proteases também foi observada nos testes de coagulação de plasma sanguíneo, dissolução de trombos e na atividade serinoproteolítica. Entretanto, o óleo essencial apresentou ação inibidora sobre a

atividade de fosfolipases A<sub>2</sub>, sustentando a hipótese de haver maior interação dos constituintes do óleo com componentes sanguíneos atuantes na cascata de coagulação do que propriamente com as toxinas ofídicas.

O isolamento e ampla caracterização dos constituintes do óleo essencial que possuem efeito sobre as atividades avaliadas são de grande valia, possibilitando o melhor entendimento das interações entre compostos vegetais e moléculas sanguíneas, permitindo estudos da fisiologia e farmacologia humana e a proposição de formulações farmacêuticas eficazes e seguras, visando ao tratamento de diferentes patologias relacionadas a distúrbios da coagulação e fibrinólise.

Vale ressaltar também que as peçonhas de serpentes têm sido amplamente utilizadas em estudos de mecanismos fisiológicos normais e patológicos; dessa forma, torna-se importante a caracterização de novos compostos naturais que sejam capazes de interagir com as diferentes classes das toxinas, ampliando a caracterização mecanicista dessas valiosas ferramentas de pesquisa.

## **AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro e pelas bolsas de estudo.

**REFERÊNCIAS**

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography / mass spectroscopy**. 4th ed. Carol Stream: Allured, 2007.
- ALVARENGA, E. S. de et al. Synthesis and evaluation of sesquiterpene lactone inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, Elmsford, v. 57, n. 1, p. 100-108, Jan. 2011.
- ARAFAT, A. S. et al. Homology modeling, molecular dynamics and atomic level interaction study of snake venom 5' nucleotidase. **Journal of Molecular Modeling**, London, v. 20, n. 3, p. 2156, Mar. 2014.
- ASGARY, S. et al. Chemical analysis and biological activities of *Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* essential oils. **Pharmaceutical Biology**, Heidelberg, v. 51, n. 2, p. 137-144, Feb. 2013.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. Brasília, 2010. v. 1, p. 198-199.
- CARVALHO, B. M. A. et al. Snake venom PLA<sub>2</sub>s inhibitors isolated from brazilian plants: synthetic and natural molecules. **BioMed Research International**, London, v. 2013, p. 1-8, Aug. 2013.
- CINTRA, A. C. O. et al. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, Elmsford, v. 60, n. 1, p. 70-82, July 2012.
- DHANANJAYA, B.L. et al. Anti-venom potential of aqueous extract of stem bark of *Mangifera indica* L. against *Daboia russellii* (Russell's viper) venom. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, New Delhi, v. 48, n. 3, p. 175-183, June 2011.
- FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.
- GREMSKI, L. H. et al. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. **Toxicon**, Elmsford, v. 50, n. 1, p. 120-134, July 2007.

- GUIMARÃES, C. L. et al. Biodiversity as a source of bioactive compounds against snakebites. **Current Medicinal Chemistry**, Schiph, v. 21, n. 25, p. 2952-2979, 2014.
- GUTIÉRREZ, J. et al. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, Elmsford, v. 26, n. 4, p. 411-413, 1988.
- JUGL-CHIZZOLA, M. Effects of *Thymus vulgaris* L. as feed additive in piglets and against haemolytic *E. coli in vitro*. **Berliner und Münchener tierärztliche Wochenschrift**, v. 118, n. 11-12, p. 495-501, Nov. 2005.
- KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **CMLS: cellular and molecular life sciences**, Basel, v. 63, n. 24, p. 3030-3041, Dec. 2006.
- MAI, N. H. et al. Characterization of a Kunitz-type protease inhibitor (MjKuPI) reveals the involvement of MjKuPI positive hemocytes in the immune responses of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. **Developmental & Comparative Immunology**, New York, v. 63, p. 121-127, Oct. 2016.
- MARCUSSI, S. et al. Snake venom phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 7, n. 8, p. 743-56, 2007.
- MIRANDA, C. A. S. F. et al. Clotting and fibrinogenolysis inhibition by essential oils from species of the Asteraceae family. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 59, e16150775, June 2016.
- MIRANDA, C. A. S. F. et al. Preliminary assessment of *Hedychium coronarium* essential oil on fibrinolytic and coagulant activity induced by *Bothrops* and *Lachesis* snake venoms. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 20, n. 39, p. 1-8, Sept. 2014.
- MOURA, L. D. A. et al. Antiophidian properties of a dolastane diterpene isolated from the marine brown alga *Canistrocarpus cervicornis*. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, Amsterdam, v. 1, p. 61-66, 2011.
- PIMENTEL, F. A. et al. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, jan. 2006.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection in phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Abingdon, v. 20, n. 1, p. 7-14, Mar. 1982.

SAFAVI, F.; ROSTAMI, A. Role of serine proteases in inflammation: Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases. **Experimental and Molecular Pathology**, San Diego, v. 93, n. 3, p. 428-433, Dec. 2012.

SANTOS, N. A. dos et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops pirajai* venom complexed with rosmarinic acid. **Acta Crystallographica: section F, structural biology communications**, Copenhagen, v. 66, pt. 6, p. 699-701, June 2010.

SANTOS J. dos et al. Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid: new insights into Lys49-PLA<sub>2</sub> inhibition. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 12, e28521, 2011.

SELISTRE, H. S. et al. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, Elmsford, v. 28, n. 3, p. 261-273, 1990.

TEIXEIRA, M. L. **Óleos essenciais de *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) e *Lippia organoides* Kunth.**: composição química, atividade antioxidante e potencial farmacológico. 2016. 193 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2016.

TICLI, F. K. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, Elmsford, v. 46, n. 3, p. 318-327, Sept. 2005.

TORRES, A. M. et al. Neutralizing effects of *Nectandra angustifolia* extracts against *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Natural Product Communications**, Westerville v. 6, n. 9, p. 1393-1396, Sept. 2011.

USHANANDINI, S. et al. The anti-snake venom properties of *Tamarindus indica* (leguminosae) seed extract. **Phytotherapy Research**, London, v. 20, n. 10, p. 851-858, Oct. 2006.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipases A<sub>2</sub> tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A<sub>2</sub>?. **Biochemie**, v. 82, n. 9-10, p. 815-831, Sept. 2000.

WOLFFENBÜTTEL, A. N. **Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia**: abordagem técnica e científica. São Paulo: Roca, 2010.

XAVIER, A. L. et al. Chemical composition, antitumor activity, and toxicity of essential oil from the leaves of *Lippia microphylla*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Tubingen, v. 70, n. 5-6, p. 129-137, 2015.

ZAQUEO, K. D. et al. BbrzSP-32, the first serine protease isolated from *Bothrops brazili* venom: purification and characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 195, p.15-25, May 2016.

ZELANIS, A. et al. Snake venom serine proteinases specificity mapping by proteomic identification of cleavage sites. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 113, p. 260-267, Jan. 2015.



**ARTIGO 4 - Estudo farmacológico do óleo essencial de *Lippia origanoides* (Verbenaceae).****RESUMO**

A busca por novos inibidores de toxinas presentes nas peçonhas de serpentes é essencial para complementar ou até mesmo substituir a soroterapia tradicional, especialmente em relação aos compostos que atuam na diminuição dos efeitos locais observados em acidentes com animais peçonhentos. As plantas constituem fontes valiosas de compostos farmacologicamente ativos e o estudo e a utilização dessas representam um mercado em crescimento. O Brasil dispõe de uma variedade excepcional de espécies vegetais em sua flora; com isso, torna-se viável o estudo da composição e das propriedades farmacológicas de substâncias obtidas das espécies que as compõem. *Lippia origanoides* Kunth. (Verbenaceae), conhecida popularmente por alecrim-d'angola, é utilizada na medicina popular para o tratamento de doenças gastrointestinais e respiratórias. Objetivou-se neste trabalho estudar farmacologicamente o óleo essencial de *L. origanoides*, avaliando a indução e/ou inibição de hemólise, os efeitos sobre as atividades de fosfolipases A<sub>2</sub> e de serinoproteases de peçonhas de serpentes, além dos efeitos sobre os processos de coagulação e dissolução de trombos sanguíneos induzidos por peçonhas de serpentes. O óleo essencial foi extraído pela técnica de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger modificado; seus constituintes químicos foram identificados e quantificados por CG/EM e CG-DIC, respectivamente. A técnica de difusão em cavidade ágar utilizando como substratos lecitinas de gema de ovo e eritrócitos sanguíneos foi utilizada para determinar as atividades fosfolipásica e hemolítica, respectivamente. O efeito do óleo essencial sobre a coagulação do plasma citratado induzido por peçonhas foi avaliado cronometrando o tempo para a formação do coágulo. A atividade trombolítica foi quantificada pela medida do volume de líquido liberado e a atividade serinoproteolítica foi avaliada utilizando-se o substrato cromogênico BAPNA. Os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de *L. origanoides* foram carvacrol, *p*-cimeno,  $\gamma$ -terpineno e timol. O óleo essencial apresentou ação inibidora, de aproximadamente 10%, sobre a atividade de fosfolipases A<sub>2</sub> induzida pelas peçonhas de *Bothrops atrox*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* e não se mostrou citotóxico sobre eritrócitos quando avaliado nos volumes 0,6 e 1,2  $\mu$ L. No entanto, incubações prévias do óleo essencial nesses volumes com as peçonhas de *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.t.*) resultaram em potencialização da atividade hemolítica, sendo observados aumentos de 30 e 50% para as peçonhas botrópicas, nos respectivos volumes avaliados. O óleo essencial apresentou efeito pró-coagulante, principalmente quando avaliado após pré-incubação desse com o plasma humano citratado. Os volumes 0,6 e 1,2  $\mu$ L de óleo essencial, pré-

incubados com peçonha de *B. jararacussu*, potencializaram a ação de proteases e fosfolipases A<sub>2</sub>, resultando em maior dissolução dos trombos; no entanto, quando pré-incubados com a peçonha de *C.d.t.*, foi observada atividade pró-trombótica. A atividade serinoproteolítica induzida pelas peçonhas de *B. jararaca* e *Lachesis muta* foi potencializada após incubação prévia do óleo com as peçonhas. Os resultados obtidos neste trabalho ampliam a caracterização farmacológica do óleo essencial de *L. origanoides*; porém, novos estudos são fundamentais para definir mecanismos de ação viabilizando o emprego desse óleo essencial em formulações destinadas à utilização humana de maneira eficaz e segura.

**Palavras-chave:** Produtos naturais. Monoterpenos oxigenados. Ação sobre a hemostasia. Inibidores enzimáticos.

**Pharmacological study of the essential oil of *Lippia origanoides* (Verbenaceae).**

**ABSTRACT**

The search for new inhibitors of toxins present in the snake venoms is essential to supplement or even replace the traditional serum therapy, especially in relation to compounds that act in the reduction of the local effects observed in accidents with poisonous animals. Plants are valuable sources of pharmacologically active compounds, and their study and use represent a growing market. Brazil has an exceptional variety of plant species in its flora, and the study of the composition and pharmacological properties of substances obtained from plant species is feasible. *Lippia origanoides* Kunth. (Verbenaceae), popularly known as guinea fowl rosemary, is used in folk medicine for the treatment of gastrointestinal and respiratory diseases. The aim of this work was to pharmacologically study the essential oil from *L. origanoides* and evaluate the induction or inhibition of hemolysis, the effects on the activities of phospholipase A<sub>2</sub> and serine proteases from snake venoms, and the effects on the coagulation and dissolution of blood clots induced by snake venoms. The essential oil was extracted by hydrodistillation using the modified Clevenger apparatus; its chemical constituents were identified and quantified by GC-MS and GC-FID, respectively. The diffusion in agar using lecithins from egg yolk and blood erythrocytes as substrates was used to determine phospholipase and hemolytic activities, respectively. The effect of the essential oil on the coagulation of citrated plasma induced by venoms was assessed by timing the clot formation. Thrombolytic activity was quantified by measuring the volume of liquid released and the serinoproteolytic activity was evaluated using BAPNA. The principal constituents found in the essential oil from *L. origanoides* were carvacrol, *p*-cymene,  $\gamma$ -terpinene and thymol. The essential oil had inhibited approximately 10% of the phospholipase A<sub>2</sub> activity induced by the *Bothrops atrox*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* and *B. moojeni* venoms. Volumes 0.6 and 1.2  $\mu$ L were not cytotoxic against erythrocytes. However, prior incubation of the these volumes of the essential oil with the venoms of *B. jararacussu*, *B. moojeni* and *Crotalus durissus terrificus* (*C.d.t.*) resulted in potentiation of the hemolytic activity, and increases of 30 and 50% for bothropic venoms were observed with this volume. The essential oil exhibited a procoagulant effect, particularly when measured after preincubation with human citrated plasma. Volumes 0.6 and 1.2  $\mu$ L of essential oil, pre-incubated with *B. jararacussu* venom, potentiated the action of proteases and phospholipase A<sub>2</sub> and caused a greater dissolution of the thrombus. However, a pro-thrombotic activity was observed when it was preincubated with the *C.d.t.* venom. The serinoproteolítica activity induced by the *B. jararaca* and *Lachesis muta* venoms

was potentiated after preincubation of the oil with the venoms. The results of this study extend the pharmacological characterization of the essential oil of *L. origanoides*. However, further studies are essential to define mechanisms of action to enable the effective and safe use of this essential oil in formulations for humans.

**Keywords:** Natural products. Monoterpene oxygenates. Hemostatic action. Enzyme inhibitors.

## INTRODUÇÃO

Os acidentes com animais peçonhentos, principalmente com serpentes, representam um relevante risco para a saúde pública em todo o mundo, especialmente em regiões tropicais onde esses acidentes são mais comuns. O tratamento disponível é a soroterapia tradicional; no entanto, apesar de ser eficaz para a maioria das ações sistêmicas, em alguns casos pode ser responsável por reações adversas que se manifestam na pele, no trato gastrointestinal e nos sistemas respiratório e circulatório. Além disso, a soroterapia é geralmente pouco efetiva em impedir a progressão dos efeitos locais (CARVALHO et al., 2013).

Dadas às limitações da terapia com anticorpos, investigações baseadas nas interações das toxinas e potenciais inibidores naturais podem resultar no desenvolvimento de tratamentos alternativos que reduzam os efeitos tóxicos e farmacológicos de peçonhas de serpentes. Em adição, o emprego de peçonhas e toxinas de animais como ferramentas laboratoriais também têm se mostrado de grande valia, auxiliando na caracterização de compostos naturais que interagem com diversas classes de enzimas, tendo aplicação farmacêutica e/ou cosmética.

O emprego de plantas medicinais para tratar acidentes ofídicos tem ocorrido desde os primórdios das civilizações humanas, reforçando a importância médica e econômica dos trabalhos científicos e etnofarmacológicos que avaliam as potencialidades terapêuticas das espécies vegetais, também no contexto do ofidismo. Esses trabalhos têm averiguado a viabilidade de utilizar extratos brutos de plantas e princípios ativos isolados na inibição de coagulação, hemorragia, inflamação, miotoxicidade, edema, cardiotoxicidade, entre outros efeitos induzidos por peçonhas de serpentes. Os constituintes ativos oriundos dos vegetais podem atuar como inibidores enzimáticos, inativadores químicos ou imunomoduladores, sendo possível a interação com as moléculas presentes

nas peçonhas de diferentes espécies de serpentes (DIOGO et al., 2009; da SILVA et al., 2012; VÁSQUEZ et al., 2013; MARCUSSI et al., 2007).

Perante a ampla aplicabilidade farmacêutica, cosmética e alimentícia dos metabólitos secundários, como os óleos essenciais e da falta de estudos relacionados às suas propriedades antiofídicas, ampliar a caracterização das atividades desses óleos e seus mecanismos de ação corresponde a uma nova e promissora linha de pesquisa a ser desenvolvida.

*Lippia origanoides* Kunth., conhecida no norte do Brasil como "salva-do-marajó" e "alecrim-d'angola", é uma espécie arbustiva com um ciclo de vida perene, cujas partes aéreas são utilizadas na culinária como aromatizante de pratos regionais, no tratamento de doenças gastrointestinais, de doenças respiratórias e como antisséptico para a boca e para irritação de garganta (SARRAZIN et al., 2015).

Diante disso, objetivou-se com o presente trabalho investigar o potencial farmacológico do óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth., avaliando a indução e/ou inibição de hemólise, os efeitos sobre as atividades de fosfolipases A<sub>2</sub> e de serinoproteases de peçonhas de serpentes, além de obter dados de sua ação sobre os processos de coagulação de plasma humano e dissolução de trombos sanguíneos humanos induzidos por peçonhas de serpentes.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

### **Obtenção e identificação do material vegetal**

A espécie *Lippia origanoides* Kunth. foi coletada no Horto de Plantas Mediciniais da Universidade Federal de Lavras (UFLA), na cidade de Lavras-MG (latitude 21° 14'S, longitude 45° 00'W e altitude 918m). A identificação botânica da espécie foi realizada pela especialista Dra. Fátima Salimena, da

Universidade Federal de Juiz de Fora, sendo uma exsicata depositada no Herbário ESAL (DBI/UFLA), com o número de registro 26840.

### **Extração do óleo essencial**

O óleo essencial foi obtido das folhas frescas de *Lippia origanoides* utilizando a técnica de hidrodestilação com o aparelho de Clevenger modificado (BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2010). Três extrações foram realizadas por 2 horas e o óleo essencial foi separado do hidrolato por centrifugação, utilizando uma centrífuga de bancada de cruzeta horizontal (Fanem Baby®I Modelo 206 BL), a 965 g por 5 minutos. O óleo foi acondicionado em frasco de vidro sob proteção de umidade e luz, e armazenado em baixa temperatura.

Paralelo à extração, o teste de umidade foi realizado de acordo com Pimentel et al. (2006); o rendimento do óleo essencial foi calculado e expresso em peso de óleo por peso de material com Base Livre de Umidade (BLU).

### **Identificação e quantificação dos constituintes do óleo essencial**

Utilizando a cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM- Shimadzu, modelo QP 5050A), foi realizada a identificação dos constituintes químicos do óleo essencial de *Lippia origanoides* sob as seguintes condições operacionais: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm) com fase ligada DB5 (0,25 µm de espessura de filme); He como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>, a temperatura foi programada para iniciar em 60 °C, seguindo com aumentos de 3 °C min<sup>-1</sup>, até atingir 240 °C e aumentos de 10 °C até atingir 300 °C, mantendo-se constante essa temperatura por 7 min; temperatura do injetor de 220 °C, temperatura da fonte de íons de 200 °C e

temperatura do detector (ou interface) de 240 °C; o volume da amostra injetada foi de 1,0 µL, diluída em hexano; taxa de partição do volume injetado de 1:100 e pressão na coluna de 71,0 kPa. As condições do espectrômetro de massas foram: detector de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmentos, detectados na faixa de 45 a 500 Da. Para o cálculo do índice de retenção, foi utilizada a equação de Van den Dool e Kratz em relação à série homóloga de n-alcenos (nC<sub>8</sub>-nC<sub>18</sub>). A identificação dos constituintes foi realizada com base na comparação dos índices de retenção da literatura (ADAMS, 2007). Também foram utilizadas duas bibliotecas do equipamento, NIST107 e NIST21, para comparação com os dados dos espectros obtidos. Na avaliação quantitativa, utilizou-se um cromatógrafo gasoso Shimadzu CG-17A equipado com detector por ionização de chamas (DIC) e as condições experimentais foram as mesmas empregadas na identificação dos constituintes dos óleos, realizada por CG-EM, com a modificação na temperatura do detector para 300 °C. Os dados de identificação e quantificação dos compostos presentes no óleo essencial podem ser acessados em Teixeira et al. (2014).

### **Obtenção de material biológico humano**

Para verificar o potencial farmacológico do óleo essencial de *Lippia origanoides*, os protocolos de pesquisa que requerem uso de material biológico humano foram previamente aprovados pelo COEP (Comitê de Ética em Pesquisa com Humanos) da UFLA, com o número de protocolo 42467115.6.0000.5148 (Apêndice A).

Em tubos BD Vacutainer® de Citrato de Sódio Tamponado 0,109 mol e 0,105 mol (3,2%), o sangue de três voluntários (10 mL cada um) foi coletado na proporção de nove partes de sangue para uma parte de solução de citrato, como recomendado pela CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). O plasma



citratado foi separado por centrifugação, e os eritrócitos empregados na elaboração do meio utilizado para a avaliação da atividade hemolítica. Para a atividade trombolítica, 10 mL de sangue foram coletados na ausência de anticoagulante, e distribuídos em uma placa de microtitulação (100  $\mu\text{L}$  por poço), imediatamente após a coleta.

### **Peçonhas de serpentes**

As peçonhas das espécies *Bothrops atrox*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu*, *Bothrops moojeni*, *Crotalus durissus terrificus* (C.d.t.) e *Lachesis muta*, na forma cristalizada, foram obtidas do Serpentário Bioagents, localizado em Batatais-SP e acondicionadas a 4 °C. Os experimentos foram realizados com soluções das peçonhas elaboradas em solução tampão fosfato (PBS, pH= 7,2) e as concentrações, expressas em massa/volume ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

### **Óleo essencial de *Lippia origanoides*: avaliação do efeito sobre a atividade fosfolipásica induzida por peçonhas**

A atividade fosfolipásica foi realizada em meio sólido preparado com PBS, 1% de ágar, 0,01M de cloreto de cálcio, 0,005% de azida de sódio e 1:3 de gema de ovo (fonte de lecitinas) (GUTIÉRREZ et al., 1988). O meio foi vertido em placas de Petri e, após sua solidificação, foram feitos orifícios de 4 mm de diâmetro, nos quais as amostras foram aplicadas. Previamente foram testados controles contendo o óleo essencial puro, nos volumes de 0,6; 1,2; 1,8 e 2,4  $\mu\text{L}$  e as peçonhas puras de *B. atrox*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* (10  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

O efeito do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre a atividade fosfolipásica induzida por peçonhas foi verificado após incubação prévia das

peçonhas com o óleo essencial nos volumes de 0,6; 1,2; 1,8 e 2,4  $\mu\text{L}$ , em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. A avaliação foi realizada pela medida do diâmetro do halo translúcido, formado ao redor dos orifícios após 12 horas de incubação dos meios em câmara de cultivo celular a 37 °C (PRICE; WILKINSON; GENTRY, 1982). Os controles (peçonhas) foram considerados como 100% de atividade fosfolipásica, o que possibilitou a transformação dos valores em diâmetros para porcentagem de atividade.

#### **Atividade hemolítica: indução/ inibição**

A atividade hemolítica foi realizada em meio sólido, seguindo a metodologia de elaboração do meio descrita para a atividade fosfolipásica, procedendo com a substituição das lecitinas de gema de ovo por eritrócitos humanos (GUTIÉRREZ et al., 1988).

O efeito citotóxico do óleo essencial de *Lippia organoides* foi verificado empregando volumes de 0,6; 1,2; 1,8 e 2,4  $\mu\text{L}$ . As peçonhas de *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *C.d.t.* (25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) puras foram utilizadas como controles, sendo os resultados considerados como 100% de atividade hemolítica, o que possibilitou a transformação dos valores em diâmetros dos halos translúcidos para porcentagem de atividade. O efeito do óleo essencial sobre a atividade hemolítica induzida pelas peçonhas foi avaliado após a incubação das peçonhas em banho-maria a 37 °C por 30 minutos com o óleo, nos volumes de 0,6 e 1,2  $\mu\text{L}$ .

#### **Atividade trombolítica: indução/ inibição**

As amostras de óleo essencial de *Lippia organoides* nos volumes de 0,6 e 1,2  $\mu\text{L}$  e as peçonhas de *B. jararacussu* e *C.d.t.* (80  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) isoladamente,

foram incubadas previamente por 30 minutos a 37 °C, sendo posteriormente adicionadas sobre os trombos, em placas de microtitulação, que permaneceram em câmara de cultivo celular a 37 °C por 12 horas. Controles contendo apenas as peçonhas ou os óleos também foram realizados. A quantificação da atividade trombolítica foi realizada pela medida do volume de líquido liberado pelos trombos (GREMSKI et al., 2007; CINTRA et al., 2012). Dos dados de volumes, foi subtraído o volume do controle negativo (PBS).

#### **Avaliação do efeito do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre a coagulação induzida por peçonhas de serpentes**

A atividade coagulante foi avaliada utilizando a metodologia descrita por Selistre et al. (1990). O plasma humano citratado (200 µL) foi adicionado em tubos de ensaio e mantido em banho-maria a 37 °C, para estabilização da temperatura. Volumes de 0,6; 1,2 e 1,8 µL do óleo essencial foram adicionados ao plasma, seguindo com observação dos incubados por um período de 45 minutos com leve agitação a cada 10 minutos.

O efeito do óleo essencial sobre a atividade coagulante induzida por peçonhas foi avaliado de acordo com a metodologia proposta por Valentin e Lambeau (2000), com modificações de volumes e tempos de incubação das amostras. Foram realizados ensaios-pilotos para definir a dose mínima coagulante (DMC) de cada peçonha, capaz de coagular 200 µL de plasma sanguíneo citratado em aproximadamente 60s.

Com o propósito de verificar as prováveis interações do óleo essencial de *Lippia origanoides* com toxinas coagulantes presentes em peçonhas de serpentes e as interações dos constituintes desse óleo essencial com os componentes do plasma que atuam na cascata de coagulação, foram realizados dois experimentos.

No primeiro experimento, o óleo essencial nos volumes de 0,6; 1,2 e 1,8  $\mu\text{L}$  foi incubado com as peçonhas de *B. moojeni* ( $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *C.d.t.* ( $13 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e *L. muta* ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), isoladamente, por 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , após esse tempo, os incubados foram adicionados a tubos de ensaio contendo plasma citratado ( $200 \mu\text{L}$ ) e o tempo foi cronometrado até a formação do coágulo. No segundo experimento, o plasma foi incubado previamente com o óleo essencial nos diferentes volumes, a  $37^\circ\text{C}$  por 10 minutos, com posterior adição das peçonhas e contagem do tempo de coagulação.

#### **Avaliação do efeito do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre a atividade de serinoproteases de peçonhas de serpentes**

A atividade de serinoproteases foi investigada utilizando o substrato sintético cromogênico BAPNA (N- $\alpha$ -benzoil-L-arginil-p-nitroanilida) (ZAQUEO et al., 2016). O substrato foi dissolvido em DMSO (dimetilsulfóxido) e adicionado a 1% em Tris-HCl  $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ , pH 8,1.

Dois tipos de interações moleculares foram avaliadas, sendo a primeira dos constituintes do óleo essencial com serinoproteases presentes nas peçonhas, e a segunda, dos constituintes do óleo com o substrato BAPNA. Dessa forma, no primeiro ensaio, o óleo essencial de *Lippia origanoides*, nos volumes de 0,6; 1,2 e 1,8  $\mu\text{L}$ , foi previamente incubado com as peçonhas de *B. jararaca* e *L. muta* ( $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) por 10 minutos a  $37^\circ\text{C}$ , com posterior avaliação da atividade serinoproteolítica, e no segundo ensaio, os mesmos volumes do óleo foram previamente incubados com o BAPNA, com posterior adição das peçonhas e avaliação da atividade serinoproteolítica.

Foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 415 nm, após 90 minutos de reação e os valores de absorvância foram convertidos em unidades

de enzima ativas, considerando 0,09 nm de absorvância equivalente a uma unidade por minuto.

Os controles, contendo apenas peçonhas, foram considerados como 100% de atividade serinoproteolítica, possibilitando a conversão dos valores de unidades de enzima ativas para porcentagem de atividade. Ensaios pilotos também foram realizados para avaliar a atividade das peçonhas, com o objetivo de definir as doses responsáveis pela obtenção de valores de absorvância entre 0,6 e 0,5 nm.

### **Análise estatística**

O delineamento experimental utilizado foi o inteiramente casualizado (DIC) com três repetições. O programa estatístico empregado foi o SISVAR (FERREIRA, 2011). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas com o controle (peçonha) por contraste uma a uma, por meio do Teste de Scheffé, ao nível de 5% de probabilidade.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Os constituintes majoritários identificados no óleo essencial de *Lippia origanoides* foram carvacrol (41,51%), *p*-cimeno (18,36%),  $\gamma$ -terpineno (17,03%) e timol (4,86%) e o rendimento de óleo essencial em Base Livre de Umidade foi de 0,37% (TEIXEIRA et al., 2014).

Os constituintes agrupados desse óleo essencial, em porcentagem, foram monoterpenos oxigenados (49,50%, principalmente o carvacrol, que é um composto com característica fenólica) e monoterpenos hidrocarbônicos (45,57%).

Os dados apresentados na Figura 1 demonstram que o óleo essencial de *Lippia origanoides* possui atividade inibitória sobre PLA<sub>2</sub>s presentes nas peçonhas de *Bothrops atrox*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*, induzindo valores estatisticamente significativos principalmente no volume de 2,4 µL. Entretanto, considerando a constituição química desse óleo essencial, valores mais expressivos de inibição eram esperados, uma vez que este apresenta em sua constituição alto teor de carvacrol (41,51%), constituinte com estrutura de característica fenólica, o que diverge dos resultados descritos na literatura. Guimarães et al. (2014) encontraram elevadas inibições de atividade fosfolipásica para extratos aquosos e hidroalcoólicos, sendo estas atribuídas, principalmente a ação de compostos fenólicos.

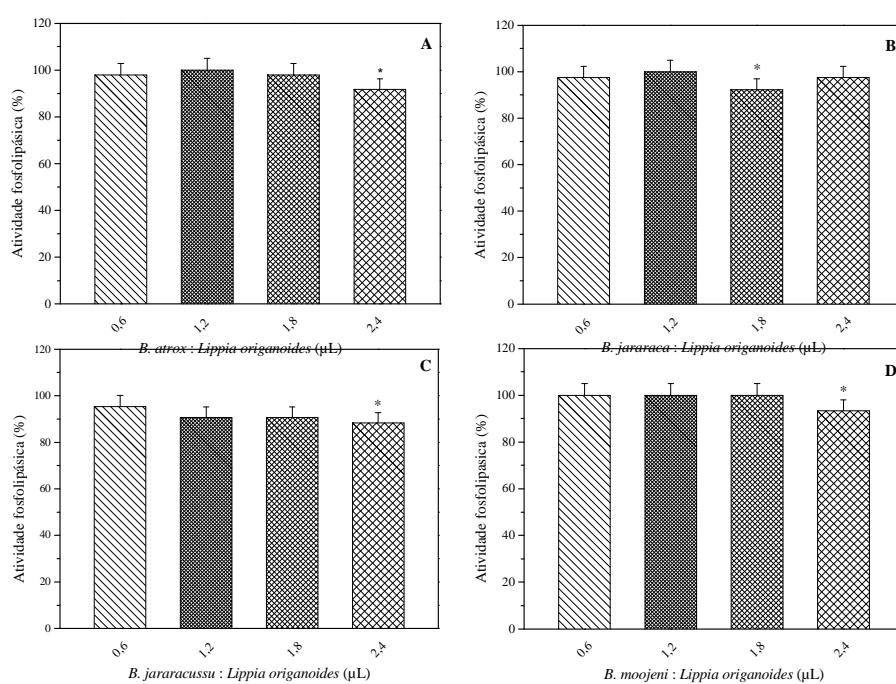
As fosfolipases de peçonhas (PLA<sub>2</sub>s) são capazes de modificar a microviscosidade da fase lipídica das membranas, o que irá afetar a função das enzimas ligadas à membrana plasmática (KOH; ARMUGAM; JEYASEELAN, 2006). A atividade de PLA<sub>2</sub> também resulta na liberação do ácido araquidônico, a partir da quebra de fosfolipídios de membrana, sendo esse precursor de lípidos bioativos (por exemplo, prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos) que atuam em vários processos fisiológicos, incluindo respostas inflamatórias e imunológicas (PARENTE, 2001).

O efeito inibitório sobre fosfolipases de peçonhas sugere um possível potencial anti-inflamatório para os óleos essenciais, sendo que a quebra dos fosfolipídios por PLA<sub>2</sub>s presentes na peçonha pode ser comparada com a atividade de fosfolipases endógenas de mamíferos.

Inibidores naturais de fosfolipases A<sub>2</sub> podem atuar por meio de diferentes mecanismos de ação, como ligação a sítios hidrofóbicos existentes na estrutura dessas enzimas, sequestro de cofatores iônicos fundamentais na atividade catalítica, ação antioxidante pela estabilização de espécies reativas e interação a resíduos de aminoácidos encontrados no sítio catalítico dessas

enzimas, impossibilitando a ligação da enzima ao substrato (MARCUSSEI et al., 2007; CARVALHO et al., 2013).

Figura 1 - Efeito do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre a atividade fosfolipásica induzida pelas peçonhas de *Bothrops atrox*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*.



\*Os dados foram convertidos em porcentagem de atividade, considerando os resultados dos controles positivos, contendo apenas peçonhas ( $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), como 100%.

\*Estatisticamente diferente do controle (peçonha) pelo Teste de Scheffé ao nível de 5% de probabilidade.

Como descrito acima, são vários os mecanismos que justificam a atividade de inibidores naturais de fosfolipases  $A_2$  e, considerando a natureza lipofílica das substâncias que compõem os óleos essenciais, um provável mecanismo de ação seria a ligação a sítios hidrofóbicos presentes na estrutura

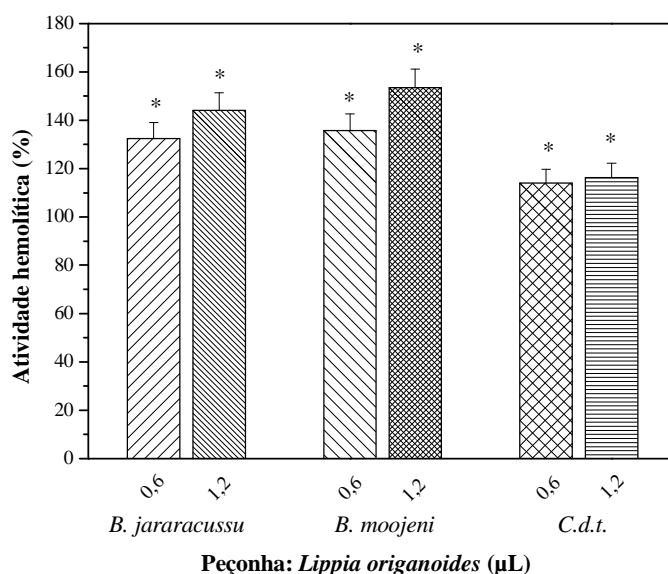
dessas enzimas. Em adição, o óleo essencial de *Lippia origanoides* apresenta elevada atividade antioxidante “*in vitro*” (TEIXEIRA et al., 2014), podendo também influenciar na atividade de enzimas por meio da estabilização de espécies reativas.

A avaliação da atividade citotóxica de óleos essenciais sobre eritrócitos é muito utilizada para complementar a caracterização toxicológica desses compostos (ASGARY et al., 2013; XAVIER et al., 2015). Além disso, quando os óleos essenciais são incubados com peçonhas, isso permite também avaliar a ação deles como inibidores de proteases, fosfolipases A<sub>2</sub> e L-aminoácido oxidases, visto que essas enzimas são responsáveis por degradar proteínas, fosfolipídios e gerar espécies reativas, respectivamente, apresentando ação citotóxica por diferentes mecanismos (DIOGO et al., 2009; DHANANJAYA et al., 2011; TORRES et al., 2011; MOURA et al. 2011; PATIÑO et al., 2012; GUIMARÃES, et al., 2014).

O óleo essencial de *Lippia origanoides* não induziu hemólise nos volumes de 0,6 e 1,2 µL. No entanto, incubações prévias do óleo essencial com as peçonhas de *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *Crotalus durissus terrificus* resultaram em potencialização da atividade hemolítica, principalmente para as peçonhas botrópicas, com aumentos na atividade entre 30 e 50%, para 0,6 e 1,2 µL de óleo, respectivamente (Figura 2). A lipofilicidade dos óleos essenciais pode ser o fator-chave na interação das peçonhas com a membrana eritrocitária humana, uma vez que, por apresentarem essa característica, pode ter interagido com os lipídios da membrana, alterando o rearranjo estrutural desta, assim como os transportes atrás da mesma, possibilitando uma ação mais efetiva de enzimas como proteases e fosfolipases.



Figura 2 - Efeito do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre a atividade hemolítica induzida pelas peçonhas de *Bothrops jararacussu*, *B. moojeni* e *Crotalus durissus terrificus*.



\*Os dados foram convertidos em porcentagem de atividade, considerando os resultados dos controles positivos, contendo apenas peçonhas ( $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), como 100%.

\*Estatisticamente diferente do controle (peçonha) pelo Teste de Scheffé ao nível de 5% de probabilidade.

Em relação à atividade trombolítica, a peçonha de *B. jararacussu* foi considerada como controle positivo, sendo os volumes de líquido liberados pelos trombos tratados com essa peçonha considerados como 100% de atividade trombolítica. Já a peçonha de *C.d.t.* apresentou ação trombólítica, sendo responsável pela liberação de volumes próximos aos obtidos para o controle negativo PBS (30  $\mu\text{L}$ ).

O óleo essencial puro nos volumes de 0,6 e 1,2  $\mu\text{L}$  induziu a dissolução dos trombos, exibindo porcentagens de atividade trombolítica de 50,06 e 97,13%, respectivamente, sendo essas duas e quatro vezes superiores ao valor obtido para *C.d.t.* (24,39%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Porcentagem de atividade trombolítica avaliada para o óleo essencial de *Lippia origanoides*, peçonhas de *Bothrops jararacussu* e *Crotalus durissus terrificus*, ou misturas previamente incubadas contendo óleo essencial e peçonha.

Tratamentos	Atividade trombolítica (%)
<sup>a</sup> <i>C.d.t.</i>	24,39
<i>C.d.t.</i> + OE 0,6 µL	21,52*
<i>C.d.t.</i> + OE 1,2 µL	12,96*
<i>B. jararacussu</i> + OE 0,6 µL	129,95*
<i>B. jararacussu</i> + OE 1,2 µL	157,04*
OE 0,6 µL	50,06*
OE 1,2 µL	97,13*

Os dados foram convertidos em porcentagem de atividade, considerando os valores obtidos para a peçonha de *B. jararacussu* como 100% de atividade trombolítica. <sup>a</sup>A peçonha de *C.d.t.* possui ação trombólítica. \*Incubados que diferem estatisticamente de seu respectivo controle contendo apenas peçonha (<5%).

Em relação às pré-incubações do óleo essencial de *L. origanoides* com a peçonha de *C.d.t.*, pode-se observar (Tabela 1) que a atividade trombólítica induzida pela peçonha foi potencializada após incubação com o óleo, sendo obtidas porcentagens de atividade trombólítica de 21,52 e 12,96%, para os volumes de 0,6 e 1,2 µL, respectivamente, em comparação a 24,39% observado para a peçonha pura. Os dados evidenciam que constituintes do óleo essencial de *Lippia origanoides* atuam sobre os substratos das enzimas, tornando-os mais acessíveis à ação das mesmas.

Sabe-se que as peçonhas de serpentes correspondem a complexas misturas de moléculas bioativas (CUNHA; MARTINS, 2012); dessa forma, as interações que os metabólitos secundários vegetais irão apresentar com aquelas moléculas podem variar com o tipo de serpente. Assim, o óleo essencial de *L. origanoides*, como descrito anteriormente, potencializou a atividade trombólítica de *C.d.t.*; no entanto, ambos os volumes do óleo, pré-incubados com peçonha de *B. jararacussu*, potencializaram a ação de proteases e fosfolipases A<sub>2</sub> dessa peçonha, proporcionando maior dissolução dos trombos em comparação ao

controle positivo (apenas peçonha), ou seja, potencializaram a atividade trombolítica da peçonha de *B. jararacussu*, com um aumento de 29,95 e 57,04% para os volumes de 0,6 e 1,2  $\mu\text{L}$  de óleo essencial, respectivamente.

São várias as interações que podem tentar explicar os resultados obtidos na avaliação do efeito trombolítico do óleo essencial de *L. origanoides*, como a interação dos constituintes do óleo com enzimas que compõem as peçonhas, induzindo alterações estruturais nas mesmas, que resultariam em aumento da afinidade dessas pelos seus substratos ou maior facilidade em coordenar a ligação à cofatores iônicos; a interação dos constituintes do óleo essencial com moléculas da superfície celular de células sanguíneas ou interações com proteínas, lipídios e outros constituintes sanguíneos tornando-os mais acessíveis à ação das enzimas.

Na literatura, modelos moleculares computacionais têm demonstrado sítios de ligação de compostos vegetais nas estruturas das enzimas (TICLI et al., 2005; dos SANTOS et al., 2010; dos SANTOS et al., 2011; de ALVARENGA et al., 2011; ARAFAT et al., 2014).

Os resultados do efeito do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre a coagulação de plasma citratado humano induzida pelas peçonhas de *B. moojeni*, *C.d.t.* e *L. muta* estão descritos na Tabela 2. Considerando os efeitos observados, pode-se sugerir que a incubação prévia do óleo essencial de *L. origanoides* (1,8  $\mu\text{L}$ ) com as peçonhas e posterior adição ao plasma citratado resultou em reduções do tempo de coagulação de 37 e 35% para as peçonhas de *B. moojeni* e *C.d.t.*, respectivamente.

No experimento em que o óleo essencial (1,8  $\mu\text{L}$ ) foi incubado com o plasma e a peçonha adicionada posteriormente, foram obtidas reduções de 44; 56 e 56% no tempo de coagulação, para as peçonhas de *B. moojeni*, *C.d.t.* e *L. muta*, respectivamente.

Os resultados dos testes de coagulação (Tabela 2) sugerem que os constituintes do óleo essencial de *Lippia origanoides* interagem com componentes plasmáticos que atuam na cascata de coagulação, uma vez que induzem reduções no tempo de coagulação, estatisticamente mais significantes que as observadas após incubação prévia das peçonhas com óleo.

As interações entre constituintes do óleo e componentes plasmáticos provavelmente protegem fatores da cascata de coagulação contra a ação de proteases presentes nas peçonhas.

Resultados similares foram observados por Miranda e colaboradores (2014), que observaram reduções no tempo de coagulação do plasma, após incubação desse com óleos essenciais de rizomas e folhas de *Hedychium coronarium* (conhecido popularmente como lírio-do-brejo), e subsequente adição das peçonhas de *L. muta* e *B. atrox*. De acordo com os autores, estes resultados sugerem interações dos constituintes dos óleos essenciais com os fatores da cascata de coagulação presentes no plasma. No entanto, incubações prévias dos óleos com as peçonhas proporcionaram acréscimos nos tempos de coagulação, sugerindo também a presença de interações entre constituintes dos óleos essenciais e proteases presentes nas peçonhas.

Tabela 2 - Efeito do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre a coagulação de plasma citratado humano induzida por diferentes peçonhas de serpentes. (Continua)

<b>Incubação prévia do óleo essencial + Peçonha (10 min. à 37 °C) com posterior adição do plasma</b>			
<i>L. origanoides</i> ( $\mu$ L)	<b>Tempo de coagulação (s)</b>		
	<i>B. moojeni</i>	<i>C.d.t.</i>	<i>L. muta</i>
<b>0</b>	57,7	76,6	54,0
<b>0,6</b>	59,7	64,3*	56,0
<b>1,2</b>	52,0*	55,7*	53,7
<b>1,8</b>	36,0*	50,0*	41,0*

Tabela 2 - Efeito do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre a coagulação de plasma citratado humano induzida por diferentes peçonhas de serpentes. (Conclusão)

<b>Incubação prévia de plasma + Óleo essencial (10 min. à 37 °C) com posterior adição da peçonha</b>			
<b>Tempo de coagulação (s)</b>			
<i>L. origanoides</i> ( $\mu\text{L}$ )	<i>B. moojeni</i>	<i>C.d.t.</i>	<i>L. muta</i>
<b>0</b>	57,7	76,6	54,0
<b>0,6</b>	41,7*	46,7*	33,3*
<b>1,2</b>	35,3*	38,7*	30,7*
<b>1,8</b>	32,7*	33,0*	23,7*

As doses coagulantes mínimas (DCM) foram pré-determinadas para as peçonhas de *B. moojeni* ( $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), *C.d.t.* ( $13 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e *L. muta* ( $5 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). \*Valores estatisticamente diferentes nas colunas em relação ao controle (peçonha), pelo Teste de Scheffé ao nível de 5% de probabilidade.

O efeito pró-coagulante de óleos essenciais incubados inicialmente com o plasma citratado e posterior adição de peçonha também foi observado por Miranda et al. (2016). Avaliando os óleos essenciais de *Baccharis dracunculifolia*, *Conyza bonariensis*, *Tithonia diversifolia* e *Ambrosia polystachya* sobre a coagulação induzida pelas peçonhas de *B. moojeni*, *B. atrox* e *L. muta*, os pesquisadores obtiveram reduções no tempo de coagulação para todos os óleos essenciais, utilizando como indutora do efeito a peçonha de *L. muta*. Considerando a constituição química agrupada dos óleos essenciais de *C. bonariensis*, *T. diversifolia* e *B. dracunculifolia*, monoterpenos hidrocarbônicos foram identificados como os constituintes majoritários, com 92,20; 86,80 e 58,60%, seguido dos sesquiterpenos hidrocarbônicos, com 5,10; 13,40 e 36,60%, respectivamente. A constituição química desses óleos essenciais difere da constituição do óleo de *Lippia origanoides*, uma vez que foram identificados principalmente monoterpenos oxigenados (49,50%), seguidos de monoterpenos hidrocarbônicos (45,57%).

As serinoproteases fazem parte de uma classe de enzimas proteolíticas presentes nas peçonhas de serpentes e que afetam o sistema hemostático das vítimas de acidentes ofídicos, podendo alterar a agregação plaquetária, a coagulação sanguínea, a pressão arterial e a fibrinólise (ZELANIS et al., 2015).

Para avaliar o efeito do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre a atividade de serinoproteases de peçonhas de *B. jararaca* e *L. muta*, foi utilizado o substrato cromogênico BAPNA, que permite quantificar a atividade de hidrolases peptídicas por colorimetria, sendo que, quanto maior a atividade enzimática, maior a quantidade de *p*-nitroanilina liberada como produto da reação.

Em ensaios de incubação prévia do óleo com as peçonhas de *B. jararaca* e *L. muta*, possíveis interações dos constituintes do óleo essencial com serinoproteases presentes nas peçonhas resultaram em aumento da degradação do substrato BAPNA (Tabela 3).

Foram observados aumentos de 17 e 30% na atividade de *B. jararaca*, e 26,49 e 38,54% na atividade de *L. muta*, para os volumes de óleo de 1,2 e 1,8 µL, respectivamente.

Tabela 3 - Efeito do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre a atividade enzimática de serinoproteases induzida por diferentes peçonhas de serpentes. (Continua)

<b>Incubação prévia do óleo essencial + Peçonha (10 min. à 37 °C) com posterior adição do substrato BAPNA</b>		
<i>L. origanoides</i> (µL)	<b>Atividade de Serinoprotease (%)</b>	
	<i>B. jararaca</i>	<i>L. muta</i>
0,6	102,27	124,62*
1,2	117,04*	126,49*
1,8	130,00*	138,54*

**Incubação prévia do substrato BAPNA + óleo essencial (10 min. à 37 °C) com posterior adição da peçonha**

Tabela 3 - Efeito do óleo essencial de *Lippia origanoides* sobre a atividade enzimática de serinoproteases induzida por diferentes peçonhas de serpentes. (Conclusão)

<i>L. origanoides</i> (µL)	Atividade de Serinoprotease (%)	
	<i>B. jararaca</i>	<i>L. muta</i>
0,6	102,13	98,42
1,2	95,37	100,47
1,8	93,95	111,36*

Os dados foram convertidos em porcentagem de atividade, considerando os controles contendo apenas peçonhas como 100%. \*Valores estatisticamente diferentes nas colunas em relação ao controle (peçonha), pelo Teste de Scheffé ao nível de 5% de probabilidade.

A incubação prévia do substrato BAPNA com o óleo essencial e posterior adição da peçonha de *B. jararaca* não influenciou na indução/inibição da atividade serinoproteolítica da mesma, uma vez que os resultados foram estatisticamente iguais ao controle nos volumes avaliados. Já para a peçonha de *L. muta*, foi verificada potencialização parcial de sua atividade enzimática apenas para o maior volume de óleo (11,36%). Assim, pode-se sugerir que o óleo essencial de *Lippia origanoides* não interage com o substrato sintético, mas sim com as serinoproteases presentes nas peçonhas.

Pesquisas sobre inibidores de serinoproteases mostram-se relevantes uma vez que essas enzimas estão relacionadas com alguns processos fisiológicos, como a coagulação sanguínea, a fibrinólise e a resposta imune, associadas ou não ao ofidismo (SAFAVI; ROSTAMI, 2012; MAI et al., 2016).

## CONCLUSÃO

O óleo essencial de *Lippia origanoides* apresentou ação inibidora sobre a atividade de fosfolipases A<sub>2</sub> induzida pelas peçonhas de *B. atrox*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* e não se mostrou citotóxico sobre eritrócitos sanguíneos humanos nos menores volumes testados. Entretanto, foram

observadas interações dos constituintes do óleo com toxinas presentes nas peçonhas de *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *C.d.t.*, uma vez que o mesmo potencializou a atividade hemolítica induzida pelas peçonhas. O óleo essencial apresentou efeito pró-coagulante, principalmente quando incubado inicialmente com o plasma humano citratado e potencializou a dissolução de trombos induzida pela peçonha de *B. jararacussu* e a ação trombótica de *C.d.t.*. A atividade serinoproteolítica induzida pelas peçonhas de *B. jararaca* e *L. muta* também foi potencializada pelo óleo essencial, especialmente quando o mesmo foi incubado com as respectivas peçonhas. Dessa maneira, os resultados obtidos sugerem que os constituintes do óleo essencial interagiram com componentes sanguíneos atuantes na cascata de coagulação, assim como com as toxinas ofídicas, coagulantes, hemorrágicas e trombóticas pertencentes às diferentes classes de metaloproteases e serinoproteases que compõem as peçonhas de serpentes.

Os resultados obtidos neste trabalho ampliam a caracterização farmacológica do óleo essencial de *L. origanoides* e sugerem seu potencial de uso farmacêutico, uma vez que constituintes do óleo interagem com proteínas sanguíneas humanas relacionadas à manutenção da hemostasia, assim como interagem com proteases presentes em peçonhas responsáveis por diversas alterações fisiopatológicas em organismos animais, incluindo humanos.

## **AGRADECIMENTOS**

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pelo apoio financeiro e pelas bolsas de estudo.



## REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography / mass spectroscopy**. 4th ed. Carol Stream: Allured, 2007.
- ALVARENGA, E. S. de et al. Synthesis and evaluation of sesquiterpene lactone inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, Elmsford, v. 57, n. 1, p. 100-108, Jan. 2011.
- ARAFAT, A. S. et al. Homology modeling, molecular dynamics and atomic level interaction study of snake venom 5' nucleotidase. **Journal of Molecular Modeling**, London, v. 20, n. 3, p. 2156, Mar. 2014.
- ASGARY, S. et al. Chemical analysis and biological activities of *Cupressus sempervirens* var. *horizontalis* essential oils. **Pharmaceutical Biology**, Heidelberg, v. 51, n. 2, p. 137-144, Feb. 2013.
- BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. Brasília, 2010. v. 1, p. 198-199.
- CARVALHO, B. M. A. et al. Snake venom PLA<sub>2</sub>s inhibitors isolated from brazilian plants: synthetic and natural molecules. **BioMed Research International**, London, v. 2013, p. 1-8, Aug. 2013.
- CINTRA, A. C. O. et al. Batroxase, a new metalloproteinase from *B. atrox* snake venom with strong fibrinolytic activity. **Toxicon**, Elmsford, v. 60, n. 1, p. 70-82, July 2012.
- CUNHA, E. M.; MARTINS, O. A. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* – uma revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, Avaré, v. 2, n. 2, p. 21-26, 2012.
- DHANANJAYA, B.L. et al. Anti-venom potential of aqueous extract of stem bark of *Mangifera indica* L. against *Daboia russellii* (Russell's viper) venom. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, New Delhi, v. 48, n. 3, p. 175-183, June 2011.
- DIOGO, L. C. et al. Inhibition of snake venoms and phospholipases A<sub>2</sub> by extracts from native and genetically modified *Eclipta alba*: isolation of active coumestans. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Copenhagen, v. 104, n. 4, p. 293-299, Apr. 2009.

FERREIRA, D. F. Sisvar: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, nov./dez. 2011.

GUIMARÃES, C. L. et al. Biodiversity as a source of bioactive compounds against snakebites. **Current Medicinal Chemistry**, Schiphol, v. 21, n. 25, p. 2952-2979, 2014.

GREMSKI, L. H. et al. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. **Toxicon**, Elmsford, v. 50, n. 1, p. 120-134, July 2007.

GUTIÉRREZ, J. et al. An alternative in vitro method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, Elmsford, v. 26, n. 4, p. 411-413, 1988.

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **CMLS: cellular and molecular life sciences**, Basel, v. 63, n. 24, p. 3030-3041, Dec. 2006.

MAI, N. H. et al. Characterization of a Kunitz-type protease inhibitor (MjKuPI) reveals the involvement of MjKuPI positive hemocytes in the immune responses of kuruma shrimp *Marsupenaeus japonicus*. **Developmental & Comparative Immunology**, New York, v. 63, p. 121-127, Oct. 2016.

MARCUSSI, S. et al. Snake venom phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, Hilversum, v. 7, n. 8, p. 743-56, 2007.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Clotting and fibrinogenolysis inhibition by essential oils from species of the Asteraceae family. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 59, e16150775, June 2016.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Preliminary assessment of *Hedychium coronarium* essential oil on fibrinogenolytic and coagulant activity induced by *Bothrops* and *Lachesis* snake venoms. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 20, n. 39, p. 1-8, Sept. 2014.

MOURA, L. D. A. et al. Antiophidian properties of a dolastane diterpene isolated from the marine brown alga *Canistrocarpus cervicornis*. **Biomedicine & Preventive Nutrition**, Amsterdam, v. 1, n. 1, p. 61-66, 2011.

PARENTE, L. Pros and cons of selective inhibition of cyclooxygenase-2 *versus* dual lipoxygenase/cyclooxygenase inhibition: is two better than one? **The Journal of Rheumatology**, Toronto, v. 28, n. 11, p. 2375-2382, Nov. 2001.

PATIÑO, A. C. et al. Efecto inhibitorio de extractos de *Renealmia alpinia* Rottb. Maas (Zingiberaceae) sobre el veneno de *Bothrops asper* (mapaná). **Biomédica**: revista del Instituto Nacional de Salud, Bogotá, v. 32, n. 3, p. 365-374, Mar. 2012.

PIMENTEL, F. A. et al. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, jan. 2006.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. O. Plate method for detection in phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Abingdon, v. 20, n. 1, p. 7-17, Mar. 1982.

SAFAVI, F.; ROSTAMI, A. Role of serine proteases in inflammation: Bowman-Birk protease inhibitor (BBI) as a potential therapy for autoimmune diseases. **Experimental and Molecular Pathology**, San Diego, v. 93, n. 3, p. 428-433, Dec. 2012.

SANTOS J. dos et al. Structural and functional studies of a bothropic myotoxin complexed to rosmarinic acid: new insights into Lys49-PLA<sub>2</sub> inhibition. **PLoS One**, San Francisco, v. 6, n. 12, e28521, 2011.

SANTOS, N. A. dos et al. Crystallization and preliminary X-ray crystallographic studies of a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops pirajai* venom complexed with rosmarinic acid. **Acta Crystallographica**: section F, structural biology communications, Copenhagen, v. 66, pt. 6, p. 699-701, June 2010.

SARRAZIN, S. L. et al. Antimicrobial and seasonal evaluation of the carvacrol-chemotype oil from *Lippia origanoides* Kunth. **Molecules**, Basel, v. 20, n. 2, p. 1860-1871, Jan. 2015.

SELISTRE, H. S. et al. Isolation and characterization of hemorrhagic, myonecrotic and edema-inducing toxins from *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa) snake venom. **Toxicon**, Elmsford, v. 28, n. 3, p. 261-273, June 1990.

SILVA, M. L. da et al. Anti-snake venom activities of extracts and fractions from callus cultures of *Sapindus saponaria*. **Pharmaceutical Biology**, Heidelberg, v. 50, n. 3, p. 366-375, Mar. 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**, Washington, v. 5, n. 9, p. 1181-1190, 2014.

TICLI, F. K. Rosmarinic acid, a new snake venom phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, Elmsford, v. 46, n. 3, p. 318-327, Sept. 2005.

TORRES, A. M. et al. Neutralizing effects of *Nectandra angustifolia* extracts against *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 6, n. 9, p. 1393-1396, Sept. 2011.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipases A<sub>2</sub> tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipases A<sub>2</sub>?. **Biochimie**, Paris, v. 82, n. 9-10, p. 815-831, Sept. 2000.

VÁSQUEZ, J. et al. Snakebites and ethnobotany in the Eastern region of Antioquia, Colombia - the traditional use of plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 146, n. 2, p. 449-455, Mar. 2013.

XAVIER, A. L. et al. Chemical composition, antitumor activity, and toxicity of essential oil from the leaves of *Lippia microphylla*. **Zeitschrift für Naturforschung C**, Tübingen, v. 70, n. 5-6, p. 129-137, 2015.

ZAQUEO, K. D. et al. BbrzSP-32, the first serine protease isolated from *Bothrops brazili* venom: purification and characterization. **Comparative Biochemistry and Physiology - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, New York, v. 195, p.15-25, May 2016.


ZELANIS, A. et al. Snake venom serine proteinases specificity mapping by proteomic identification of cleavage sites. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 113, p. 260-267, Jan. 2015.

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

Os dados obtidos neste trabalho reafirmam a importância dos óleos essenciais como ricas fontes de moléculas biologicamente ativas, com várias possibilidades de aplicação em inúmeras áreas do conhecimento, sendo, entretanto necessária ampla caracterização farmacológica e toxicológica, buscando determinar seus mecanismos de ação e, com isso, definir doses efetivas e seguras, possibilitando sua aplicação.

## APÊNDICE

### APÊNDICE A – Parecer consubstanciado do CEP.

<p>UNIVERSIDADE FEDERAL DE LAVRAS</p> 
<b>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</b>
<p><b>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</b></p> <p><b>Título da Pesquisa:</b> Caracterização química e potencial biológico de óleos essenciais  <b>Pesquisador:</b> Maria das Graças Cardoso  <b>Área Temática:</b>  <b>Versão:</b> 3  <b>CAAE:</b> 42467115.6.0000.5148  <b>Instituição Proponente:</b> Universidade Federal de Lavras  <b>Patrocinador Principal:</b> Financiamento Próprio</p>
<p><b>DADOS DO PARECER</b></p> <p><b>Número do Parecer:</b> 1.174.295  <b>Data da Relatoria:</b> 07/08/2015</p> <p><b>Apresentação do Projeto:</b> OK</p> <p><b>Objetivo da Pesquisa:</b> OK</p> <p><b> Avaliação dos Riscos e Benefícios:</b> OK</p> <p><b>Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:</b> OK</p> <p><b>Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:</b> OK</p> <p><b>Recomendações:</b></p> <p><b>Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:</b> Todas as pendências éticas foram atendidas.</p> <p><b>Situação do Parecer:</b> Aprovado</p> <p><b>Necessita Apreciação da CONEP:</b> Não</p>
<p><b>Endereço:</b> Campus Universitário Cx Postal 3037  <b>Bairro:</b> PRP/COEP <b>CEP:</b> 37.200-000  <b>UF:</b> MG <b>Município:</b> LAVRAS  <b>Telefone:</b> (35)3829-5182 <b>E-mail:</b> coep@imac.ufla.br</p>

## APÊNDICE B – Cromatogramas dos óleos essenciais das plantas estudadas

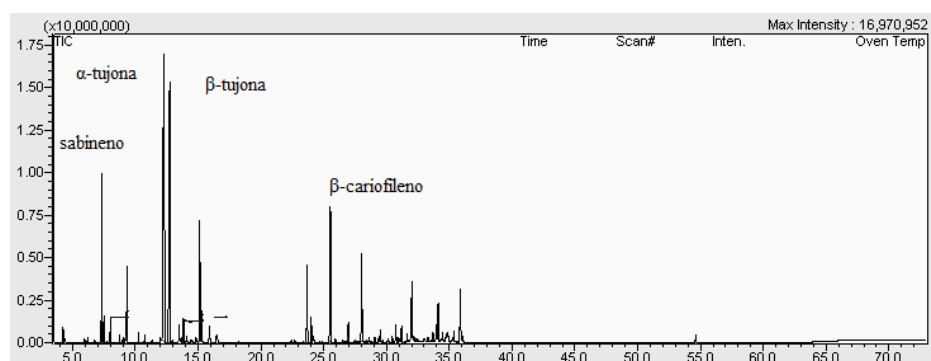
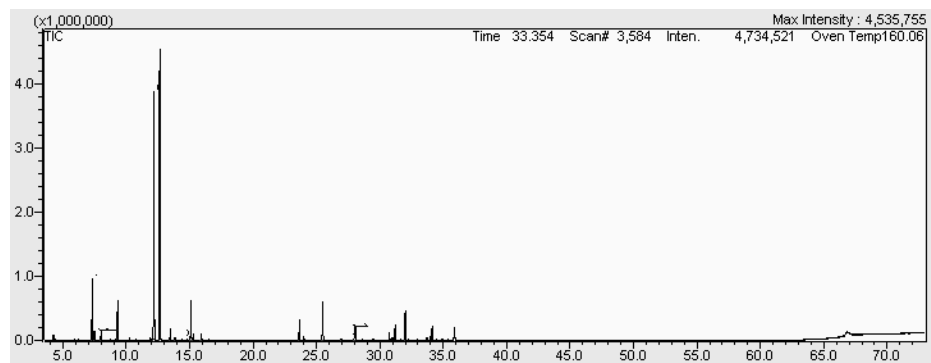
Figura 1B - Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas frescas de *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) em março de 2014.Figura 2B - Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas frescas de *Cantinoa carpinifolia* (Benth.) em março de 2015.

Figura 3B - Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas frescas de *Lippia origanoides* Kunth.

