



LUIZ GUSTAVO DE LIMA GUIMARÃES

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *LIPPIA SIDOIDES*
CHAM., *ALOMIA FASTIGIATA* (Gardner)
BENTH, *OCOTEA ODORIFERA* (Vell.) Rohwer,
MIKANIA GLAUCA Mart. E *CORDIA*
VERBENACEA D.C.: IDENTIFICAÇÃO E
QUANTIFICAÇÃO QUÍMICA,
CARACTERIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS
SECRETORAS, ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
ANTIBACTERIANA**

LAVRAS – MG

2010

LUIZ GUSTAVO DE LIMA GUIMARÃES

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *LIPPIA SIDOIDES* CHAM., *ALOMIA*
FASTIGIATA (Gardner) Benth, *OCOTEA ODORIFERA* (Vell.) ROHWER,
MIKANIA GLAUCA Mart. E *CORDIA VERBENACEA* D.C.:
IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO QUÍMICA, CARACTERIZAÇÃO
DAS ESTRUTURAS SECRETORAS, ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
ANTIBACTERIANA**

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

Orientadora

Dr^a Maria das Graças Cardoso

Coorientador

Dr^o Ricardo Magela de Souza

LAVRAS – MG

2010

**Ficha Catalográfica Preparada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Guimarães, Luiz Gustavo de Lima.

Óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Mikania glauca* Mart. e *Cordia verbenacea* D.C.: identificação e quantificação química, caracterização das estruturas secretoras, atividades antioxidante e antibacteriana / Luiz Gustavo de Lima Guimarães. – Lavras : UFLA, 2010.

225 p. : il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2010.

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Metabólitos secundários. 2. Ensaio antioxidante. 3. Atividade biológica. 4. Estruturas secretoras. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 547.71

LUIZ GUSTAVO DE LIMA GUIMARÃES

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *LIPPIA SIDOIDES* CHAM., *ALOMIA*
FASTIGIATA (Gardner) Benth, *OCOTEA ODORIFERA* (Vell.) ROHWER,
MIKANIA GLAUCA Mart. E *CORDIA VERBENACEA* D.C.:
IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO QUÍMICA, CARACTERIZAÇÃO
DAS ESTRUTURAS SECRETORAS, ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E
ANTIBACTERIANA**

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

APROVADA em 11 de junho de 2010.

Dr. Péricles Barreto Alves	UFS
Dr. David Lee Nelson	UFMG
Dr. Ricardo Magela de Souza	UFLA
Dr. Evaristo Mauro de Castro	UFLA
Dr ^a . Esther Maria Ferreira Lucas	UFLA

Dr^a Maria das Graças Cardoso
Orientadora

LAVRAS – MG

2010

À minha esposa, Tatiana, pelo
companheirismo, incentivo,
compreensão e Amor.

DEDICO

Aos meus pais, Nadir e Maria
José, à minha tia Joana, pelo
apoio incondicional, e por
serem minha inspiração.

OFEREÇO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar o dom da vida e conduzi-la, muitas vezes, por caminhos árduos, mas sempre com destinos vitoriosos.

À professora Maria das Graças Cardoso, pela oportunidade, confiança, orientação, pelos ensinamentos científicos e pessoais, e acima de tudo, pela amizade.

Ao professor Ricardo Magela de Souza, pela co-orientação, atenção, disponibilidade e pela disponibilização do laboratório e de materiais.

A todos os colegas do Laboratório de Química Orgânica, Marcos, Maria Luiza Cintia, em especial à Aline, Érica, Juliana, Milene, Lucilene e Paula, pela grande ajuda na condução dos experimentos; sem a ajuda de vocês não teria sido possível.

Aos colegas de Laboratório de Análises Físico-Químicas de Aguardente, Ana Elisa, Jean, Lidiany, Ana, Felipe, Wilder, João e Cleusa, pela convivência harmoniosa e por estarem sempre dispostos a me ajudar.

Ao pessoal do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultra-estrutural, em nome de seu coordenador, prof^o. Eduardo Alves.

Ao prof.^o Evaristo Mauro de Castro, pela concessão do Laboratório de Anatomia Vegetal para a realização dos testes histoquímicos.

À prof^a. Samísia M. Fernandes Machado, do Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe – UFS, pela realização das análises cromatográficas.

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

A todos os professores do Departamento de Química, pela acessibilidade e interesse em ajudar, em especial à professora Esther Maria F. Lucas, pela ajuda com as análises de RMN.

À profª Dorila Piló Veloso e à Drª Ivana Lula, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais, pela realização das análises de RMN.

Às colegas do Laboratório de Bacteriologia, Ana Beatriz e Flávia, pela grande ajuda na condução dos ensaios biológicos.

Às funcionárias do Departamento de Química, Shirley, Ana, e Xulita, pela atenção e ajuda em qualquer momento.

Às funcionárias do Departamento de Fitopatologia Ana Maria, Eloísa, Rute e Eliane, pela atenção e valiosa ajuda.

Aos professores da Universidade Federal do Tocantins, Elisângela, Fernando e Ildon, pelas valiosas sugestões.

A todos os meus colegas de pós-graduação, pela amizade e horas de estudo.

Ao Departamento de Fitopatologia, pelo espaço concedido para os ensaios biológicos.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (Fapemig), pela concessão da bolsa de estudos.

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

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

RESUMO

Tendo em vista os prejuízos gerados na indústria de alimentos devido à oxidação de óleos e gorduras, os estragos causados a diversas culturas por fitopatógenos e, principalmente, os danos causados à saúde dos consumidores pelos compostos sintéticos utilizados como antioxidantes e agrotóxicos, neste trabalho objetiva-se identificar, quantificar e determinar as estruturas secretoras dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Mikania glauca* Mart. e *Cordia verbenacea* (verbenaceae), bem como avaliar as suas atividades antioxidante e antibacteriana. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação, utilizando-se um aparelho de Clevenger modificado, sendo, posteriormente, analisados por GC-EM e GC-DIC. O constituinte majoritário do óleo essencial de *Cordia verbenacea* foi isolado por cromatografia em coluna e submetido à análise de RMN de ^1H e ^{13}C em experimentos uni e bidimensional. A atividade antioxidante foi determinada por meio dos ensaios de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, TBARS e a redução do DPPH. Os testes biológicos para a atividade antibacteriana foram realizados utilizando-se a metodologia de difusão em cavidade Ágar, sobre as fitobactérias *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Pseudomonas syringae* pv. tomato. A caracterização das estruturas secretoras foi feita por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) e pelos testes histoquímicos com os reagentes de Nadi e Sudan III. As análises cromatográficas em CG-EM dos óleos essenciais revelaram a presença de diversos compostos terpênicos (monoterpenos e sesquiterpenos) e de alguns fenilpropanoides. As análises de RMN ^1H e RMN ^{13}C revelaram a presença de um isômero do α -bisabolol, que foi denominado como isobisabolol, como constituinte majoritário do óleo essencial de *C. verbenacea*. Os óleos essenciais das espécies empregadas neste estudo e alguns de seus constituintes majoritários apresentaram atividades antioxidante e antibacteriana relevantes, sendo as maiores atividades em ambos os ensaios biológicos apresentadas pelo óleo essencial de *L. sidoides* e seu constituinte majoritário carvacrol. A caracterização das estruturas secretoras dos óleos essenciais revelou a presença de diversas estruturas, como tricomas, células oleíferas e canais secretores, que variaram de acordo com a espécie vegetal.

Palavras-chave: Metabólitos secundários. Ensaio antioxidante. Atividade biológica. Estruturas secretoras.

ABSTRACT

Because of the losses to the food industry generated by the oxidation of fats and oils, the damage caused to various crops by pathogens, and damage to the health of consumers caused by synthetic compounds used as antioxidants and agrochemicals, the identification and quantification of the essential oils from *Lippia sidoides* Cham., *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Mikania glauca* Mart. and *Cordia verbenacea* (Verbenaceae) were undertaken. Their antioxidant and antibacterial activities were accessed, and the secretory structures for the essential oils were examined. The essential oils were extracted by steam distillation using a modified Clevenger apparatus, and were subsequently analyzed by GC-MS and GC-FID. The major constituent of the essential oil of *Cordia verbenacea* was isolated by column chromatography and subjected to analysis by one- and two-dimensional ^1H and ^{13}C NMR experiments. The antioxidant activity was determined by oxidation of the β -carotene/linoleic acid system, by reaction with reactive species of thiobarbituric acid (TBARS), and by the reduction of diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) free radical. Biological tests for antibacterial activity against the *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria*, and *Pseudomonas syringae* pv. tomato phyto-bacteria were performed using the method of diffusion in an agar cavity. The characterization of secretory structures was accomplished by scanning electron microscopy (SEM) and by histochemical tests with Nadi and Sudan III reagents. Analysis of the essential oils by GC-MS demonstrated the presence of several terpene compounds (monoterpenes and sesquiterpenes) and some phenylpropanoids. The analysis by ^1H and ^{13}C NMR spectroscopy revealed the presence of an isomer of α -bisabolol, which was designated as isobisabolol, as the major constituent of the essential oil of *C. verbenacea*. The essential oils of the species used in this study and some of the major constituents presented relevant antioxidant and antibacterial activities. The highest activities in both biological assays were presented by the essential oil from *L. sidoides* and by its major constituent carvacrol. The characterization of the secretory structures for the essential oils demonstrated the presence of trichomes, secretory canals, and oleiferous cells, which varied according to the species of plant.

Keywords: Secondary metabolites. Antioxidant assays. Biological activity. Secretory structures.

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1	Valores médios dos rendimentos dos óleos essenciais das cinco plantas estudadas, expressos em p/p BLU (base livre de umidade).....	85
Tabela 2	Constituintes químicos dos óleos essenciais e os respectivos teores expressos em porcentagem.....	88
Tabela 3	Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT para o α -bisabolol e para o isobisabolol.....	100
Tabela 4	Quantificação por padronização interna mg/100 mg de OE	105

Capítulo 3

Tabela 1	Valores da atividade antioxidante obtidos pelo ensaio β -caroteno/ácido linoléico.....	128
Tabela 2	Atividade antioxidante empregando-se o método TBARS	131
Tabela 3	Valores de atividade antioxidante empregando o método de redução do DPPH.	132
Tabela 4	Valores de IC_{50} para as atividades antioxidantes dos óleos essenciais e de seus constituintes majoritários diante nos três ensaios empregados.....	133

Capítulo 4

Tabela 1	Concentração mínima inibitória CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos óleos essenciais sobre as bactérias <i>Clavibacter michiganensis</i> , <i>Pseudomonas syringae</i> e <i>Xanthomonas vesicatoria</i>	159
----------	--	-----

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1

Figura 1	Esquema da origem do ácido mevalônico e da 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato, a partir do metabolismo primário....	23
Figura 2	Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) pela via do mevalonato.....	24
Figura 3	Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) pela via da 1-deoxi-D-xilulose -5- P mevalonato....	25
Figura 4	Mecanismo de formação da estrutura básica dos fenilpropanoides a partir do ácido chiquímico.....	26
Figura 5	Células secretoras localizadas no mesófilo foliar.....	29
Figura 6	Forma geral de um tricoma glandular.....	30
Figura 7	Esquema geral do processo de peroxidação lipídica.....	34
Figura 8	Formação dos principais produtos resultantes do processo de oxidação secundária de lipídios insaturados..	35
Figura 9	Reação do malonaldeído com o ácido tiobarbitúrico.....	39
Figura 10	Estrutura química do dicloreto de 2,2'-azobis(2-metilpropionamidina) (AAPH).....	39
Figura 11	Possível mecanismo de geração de radicais em uma amostra lipídica, utilizando o AAPH como gerador de radicais.....	40
Figura 12	Possíveis mecanismos de redução do DPPH.....	42
Figura 13	Estrutura química do labdano ent-(12R),16-diidroxilabda-7,13-dien-15,16-olide.....	57

Capítulo 2

Figura 1	Estruturas químicas dos constituintes majoritários dos óleos essenciais das plantas estudadas.....	91
Figura 2	Formação dos compostos monoterpênicos, fenchona e cânfora, a partir do cátion α -terpinil.....	96
Figura 3	Estruturas dos compostos α -bisabolol (A) e isobisabolol (B).....	99
Figura 4	Estrutura do isobisabolol com algumas correlações observadas no mapa de contornos COSY.....	102
Figura 5	Algumas correlações observadas no mapa de contornos HMBC, na estrutura do isobisabolol.....	103
Capítulo 3		
Figura 1	Estruturas químicas dos constituintes majoritários e dos compostos antioxidantes utilizados nos ensaios de avaliação das atividades antioxidantes.....	130
Figura 2	Mecanismo de formação de um radical peroxil, seguido pela sua neutralização por um terpeno contendo átomos de carbonos alílicos (γ -terpineno).....	137
Figura 3	Mecanismo de redução do DPPH por compostos fenólicos.....	140
Capítulo 5		
Figura 1	Micrografia de MEV da superfície foliar de <i>L. sidoides</i>	181
Figura 2	Caracterização histoquímica da substância presente nos tricomas capitados tipo I (seção transversal do limbo foliar de <i>L. sidoides</i>).....	182
Figura 3	Micrografia de MEV da superfície foliar de <i>C. verbenácea</i>	184
Figura 4	Caracterização histoquímica da substância presente nos	

	tricomas capitados tipo I (seção transversal do limbo foliar de <i>C. verbenace</i>).....	186
Figura 5	Micrografia de MEV da superfície foliar de <i>A. fastigiata</i> .	188
Figura 6	Caracterização histoquímica da substância presente nos tricomas capitados tipo I (seção transversal do limbo foliar de <i>A. fastigiata</i>).....	189
Figura 7	Micrografia de MEV e caracterização histoquímica da substância presente nas células e nos ductos secretores (seção transversal do limbo foliar de <i>M. glauca</i>).....	191
Figura 8	Micrografia de MEV e caracterização histoquímica da substância presente nas células secretoras (seção transversal do limbo foliar de <i>O. odorifera</i>).....	195

LISTA DE SIGLAS

DMAPP	Dimetilalil difosfato
IPP	Isopendenil difosfato
DXP	1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato
ATP	Adenosina trifosfato
PAL	Fenilalanina amonialiase
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
CONTRADE	“Commodity Trad Database”
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
AAPH	dicloreto de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida)
CMI	Concentração mínima inibitória
CCD	Cromatografia em camada delgada
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
BHA	Butil-hidroxi-anisol
PRONAT	Produtos Naturais Ltda
PADETEC	Parque de Desenvolvimento Tecnológico do Ceará
FAO	Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
COPAM	Conselho de Política Ambiental
BLU	Base Livre de Umidade
CG-EM	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
DIC	Detector de Ionização em Chamas
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
DEPT	“Distortionless Enhancement by Polarisation Transfer”
HSQC	“Heteronuclear Single-Quantum Correlation”
COSY	“Correlation Spectroscopy”
HMBC	“Heteronuclear Multiple-Bond Correlation”
PG	Galato de Propila
TBHQ	Tert-butil-hidroquinona
UFC	Unidade Formadora de Colônia
DMSO	Dimetilsulfóxido
BOD	Incubadora com “biological oxygen demand”
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
LME	Laboratório de Microscopia Eletrônica

LISTA DE SÍMBOLOS

^1H	Átomo de hidrogênio com um próton
^{13}C	Carbono 13
J	Constante de acoplamento
δ	Deslocamento químico

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1: Introdução geral	18
1	INTRODUÇÃO	18
2	REFERENCIAL TEÓRICO	21
2.1	Óleos Essenciais	21
2.2	Mercado dos óleos essenciais	27
2.3	Estruturas secretoras de óleos essenciais	28
2.4	Antioxidantes	32
2.5	Ensaio utilizados para avaliar a atividade antioxidante	36
2.5.1	Ensaio de oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico	37
2.5.2	Análise da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)	38
2.5.3	Ensaio de redução do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)	41
2.6	Atividade biológica de óleos essenciais	42
2.7	Óleos essenciais com atividade antioxidante	47
2.8	<i>Lippia sidoides</i> cham	52
2.9	<i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer	53
2.10	<i>Cordia verbenacea</i> D.C.	54
2.11	<i>Mikania glauca</i> Mart. ex baker	55
2.12	<i>Alomia fastigiata</i> (Gardner)	56
2.13	Doenças bacterianas do tomateiro	57
2.14	<i>Clavibacter michiganensis subsp. Michiganensis</i>	58
2.15	<i>Pseudomonas syringae</i> P.V. tomato	59
1.16	<i>Xanthomonas vesicatoria</i>	59
	REFERÊNCIAS	60
	CAPÍTULO 2: Óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i> cham., <i>Alomia fastigiata</i> (gardner) Benth, <i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer, <i>Mikania glauca</i> Mart. e <i>Cordia verbenacea</i> D.C: caracterização e quantificação química.	73
1	INTRODUÇÃO	76
2	MATERIAL E MÉTODOS	79
2.1	Obtenção do material vegetal	79
2.2	Extração do óleo essencial	79
2.3	Análises cromatográficas dos óleos essenciais	80
2.4	Purificação do constituinte majoritário do óleo essencial de <i>Cordia verbenacea</i> (isobisabolol)	83
2.5	Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C da amostra purificada e do α-bisabolol	84

2.6	Espectrometria de massas da amostra purificada	84
3	RESULTADO E DISCUSSÃO	85
3.1	Rendimento dos óleos essenciais	85
3.2	Constituintes químicos dos óleos essenciais	86
3.3	Elucidação estrutural do isobisabolol	98
3.4	Quantificação dos constituintes dos óleos essenciais por meio da padronização interna	103
4	CONCLUSÕES	106
	REFERÊNCIAS	108
	CAPÍTULO 3: Atividade antioxidante dos óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i> Cham., <i>Alomia fastigiata</i> (Gardner) Benth, <i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer, <i>Mikania glauca</i> Mart., <i>Cordia verbenacea</i> D. C. e de seus constituintes majoritários	114
1	INTRODUÇÃO	117
2	MATERIAL E MÉTODOS	121
2.1	Obtenção do material vegetal	121
2.2	Extração do óleo essencial	121
2.3	Padrões utilizados	122
2.4	Atividades antioxidantes dos óleos essenciais e de seus constituintes majoritários	122
2.4.1	Oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico	123
2.4.2	Formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) ...	124
2.4.3	Redução do DPPH	125
2.5	Delineamento estatístico	125
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	127
4	CONCLUSÕES	144
	REFERÊNCIAS	145
	CAPÍTULO 4: Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de <i>Lippia sidoides</i> Cham., <i>Alomia fastigiata</i> (Gardner) Benth, <i>Ocotea odorifera</i> (Vell.) Rohwer, <i>Mikania glauca</i> Mart., <i>Cordia verbenacea</i> D.C. e dos compostos carvacrol, 1,8-cineol e trans-cariofileno	149
1	INTRODUÇÃO	152
2	MATERIAIS E MÉTODOS	156
2.1	Obtenção do material vegetal	156
2.2	Extração dos óleos essenciais	156
2.3	Avaliação da atividade bacteriana <i>in vitro</i>	157
2.4	Delineamento estatístico	158
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	159
4	CONCLUSÕES	166
	REFERÊNCIAS	167
	CAPÍTULO 5: Caracterização morfológica e histoquímica das estruturas secretoras dos óleos essenciais de <i>lippia sidoides</i> cham.,	

	<i>alomia fastigiata</i> (gardner) benth, <i>ocotea odorifera</i> (vell.) rohwer, <i>mikania glauca</i> mart. e <i>cordia verbenacea</i> D.C.....	172
1	INTRODUÇÃO	175
2	MATERIAL E MÉTODOS	177
2.1	Obtenção do material vegetal	177
2.2	Análises morfológicas	177
2.3	Análises histoquímicas	178
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	180
4	CONCLUSÕES	196
	REFERÊNCIAS	197
	APÊNDICE	202

CAPÍTULO 1: Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais, constituintes voláteis orgânicos responsáveis pela fragrância de muitas plantas, são extraídos dos vegetais por diferentes técnicas e que apresentam grande importância em determinadas pesquisas, por serem potencialmente úteis no controle fitossanitário, propiciando o desenvolvimento de técnicas por meio das quais objetiva-se diminuir os efeitos negativos de oxidantes, radicais e micro-organismos que causam prejuízos nas indústrias alimentícias e na agricultura.

Antioxidantes são geralmente utilizados em óleos e alimentos gordurosos para retardar a sua oxidação, a qual pode alterar as características físicas e químicas de tais alimentos, promovendo o desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, que além de torná-los impróprios para o consumo, podem provocar alterações que modificam não só a qualidade nutricional, devido à degradação de compostos essenciais, como algumas vitaminas e determinados ácidos graxos, mas também por produzirem compostos tóxicos, tornando o alimento impróprio para o consumo (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999).

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria alimentícia são o BHA (butil-hidroxi-anisol), BHT (butil-hidroxi-tolueno), PG (galato de propila) e o TBHQ (tert-butil-hidroquinona). No entanto, estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade de esses compostos apresentarem efeitos carcinogênicos em experimentos realizados com animais. Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, pesquisas têm sido dirigidas no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer

associações entre eles, com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos (RAMALHO; JORGE, 2006).

Na agricultura, por muitos anos, uma variedade de diferentes compostos químicos sintéticos, como os benzimidazóis, hidrocarbonetos aromáticos e inibidores da biossíntese de esteróis foram, muitas vezes, utilizados no controle de doenças de plantas e contra a deterioração de frutos e vegetais no período de pós-colheita. Entretanto, atualmente, o emprego desses compostos vem sendo restringido devido aos seus efeitos carcinogênicos, teratogênicos, alta e aguda toxicidade residual, longo período de degradação, poluição ambiental, entre outros (UNNIKISHNAN; NATH, 2002). De acordo com Dianz et al. (2002), outro problema é o desenvolvimento de resistência em decorrência do uso contínuo desses produtos em populações de fitopatógenos.

Em razão dos fatores desfavoráveis ao uso de compostos sintéticos, tem aumentado o interesse pela busca de métodos de controle alternativos, particularmente aqueles que podem propiciar uma alimentação saudável ao homem, que sejam ambientalmente corretos e que apresentem compostos biodegradáveis. A substituição dos antioxidantes e 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, onde são formadas várias substâncias que atuam na defesa do vegetal contra microorganismos fitopatogênicos e animais herbívoros. Isso tem inspirando o desenvolvimento de modernas pesquisas em que se utilizam os óleos essenciais, com o intuito de desenvolver novos produtos que possam ser utilizados sem ocasionar danos ao homem e ao meio ambiente.

Tendo em vista os prejuízos gerados na indústria de alimentos devido à oxidação de óleos e gorduras, os estragos causados a diversas culturas por fitopatógenos, e principalmente os danos causados pelos compostos sintéticos

utilizados como antioxidantes e agrotóxicos, com este trabalho objetiva-se identificar, quantificar e determinar as estruturas secretoras dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Mikania glauca* Mart. e *Cordia verbenacea* (verbenaceae), bem como avaliar as suas atividades antioxidante e antibacteriana.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Óleos Essenciais

Além do metabolismo primário, responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais, as plantas apresentam o chamado metabolismo secundário. Os vegetais produzem uma grande variedade de compostos orgânicos que não possuem ação direta conhecida em seus processos vitais, como fotossíntese, respiração, transporte de solutos, translocação, assimilação de nutrientes, diferenciação ou síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos. Tais substâncias são conhecidas como metabólitos secundários (TAIZ; ZEIGER, 2004).

Entre os metabólicos secundários, há um destaque para os óleos essenciais, devido à sua utilização crescente nas áreas de alimentos (condimentos, aromatizantes de alimentos e bebidas) e cosméticos (perfumes e produtos de higiene). Muitos desses óleos possuem importantes ações biológicas, o que faz com que sejam objetos de estudos, principalmente pela indústria de agroquímicos, no intuito de encontrar substâncias fungicidas, bactericidas e inseticidas naturais.

Simões et al. (2007) definem os óleos essenciais como os produtos obtidos de partes de plantas por meio de destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos. De maneira geral, são misturas de substâncias orgânicas voláteis, de consistência semelhante ao óleo, definida por um conjunto de propriedades, entre as quais se destacam volatilidade, aroma agradável, solubilidade em solventes orgânicos apolares, entre outras. Assim diferem dos óleos fixos, que são misturas de triacilglicerídeos, obtidos geralmente de sementes. São também

denominados de essências, óleos etéreos ou óleos voláteis. Quando recentemente extraídos, são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados; porém, alguns podem apresentar coloração intensa.

Nos vegetais, os óleos essenciais desenvolvem funções relacionadas com sua volatilidade, agindo na atração de polinizadores, na proteção contra predadores, patógenos, perda de água, aumento de temperatura e também desempenhando funções ecológicas, especialmente como inibidores de germinação. Essas características tornam as plantas que os produzem poderosas fontes de agentes biocidas.

Sua constituição química é muito variada, incluindo hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, compostos com enxofre e até compostos com nitrogênio. No entanto, a maioria é constituída de derivados de fenilpropanoídes ou de terpenoídes, sendo os últimos derivados da condensação de um número variável de unidades de 5 carbonos, denominadas unidades isoprênicas. Nos óleos essenciais, encontram-se principalmente as unidades resultantes da condensação de 2 e 3 unidades isoprênicas, denominados monoterpenos e sesquiterpenos, respectivamente (SIMÕES et al., 2007; TAIZ; ZEIGER, 2004).

O isopreno é produzido naturalmente, mas não está envolvido na formação desses compostos; as unidades isoprênicas ativas bioquimicamente são definidas como os ésteres difosfato (pirofosfato) dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopendenil difosfato (IPP), essas duas últimas moléculas é que irão se rearranjar em reações enzimáticas de ionização, condensação e eliminação, necessárias para a biossíntese dos mais diversos terpenoídes (BARRETO; VEIGA JÚNIOR, 2005; DEWICK, 2002).

Bioquimicamente, as unidades isoprênicas podem ser derivadas de duas vias: pela via do ácido mevalônico ou pela via da 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato

(desoxixilulose fosfato-DXP), ambas partindo de compostos pertencentes ao metabolismo primário (Figura 1).

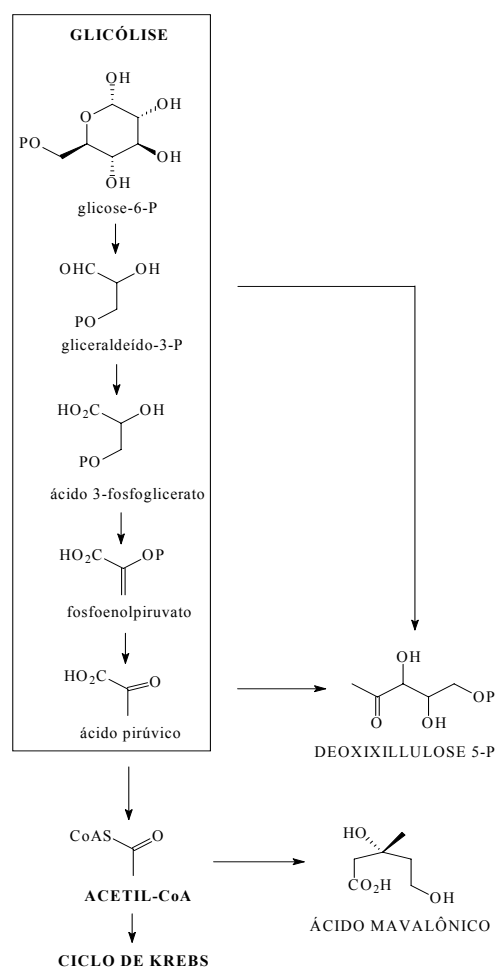


Figura 1 Esquema da origem do ácido mevalônico e da 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato, a partir do metabolismo primário
Fonte: Adaptada de DEWICK, 2002

A biossíntese do ácido mevalônico inicia-se com a condensação de três moléculas de acetil-coenzima A, que irá formar o ácido mevalônico mediante uma série de reações enzimáticas, geralmente dependentes de ATP; posteriormente, o ácido mevalônico sofrerá descarboxilação para gerar o IPP e o DMAPP, como mostrado na Figura 2. Já a 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato é formada pelos intermediários da via glicolítica, ácido pirúvico e gliceraldeído-3-fosfato (Figura 3).

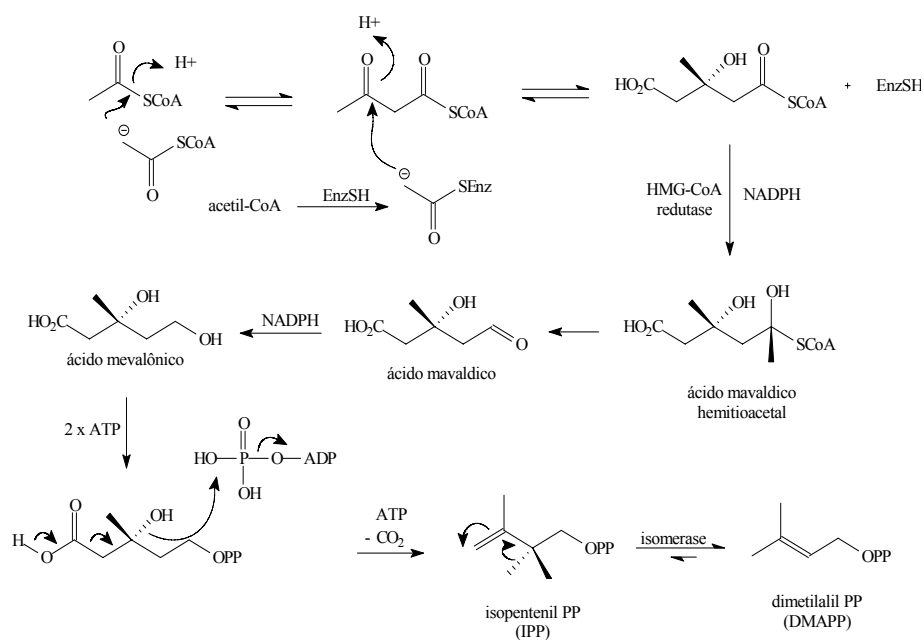


Figura 2 Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) pela via do mevalonato
Fonte: Adaptada de DEWICK, 2002

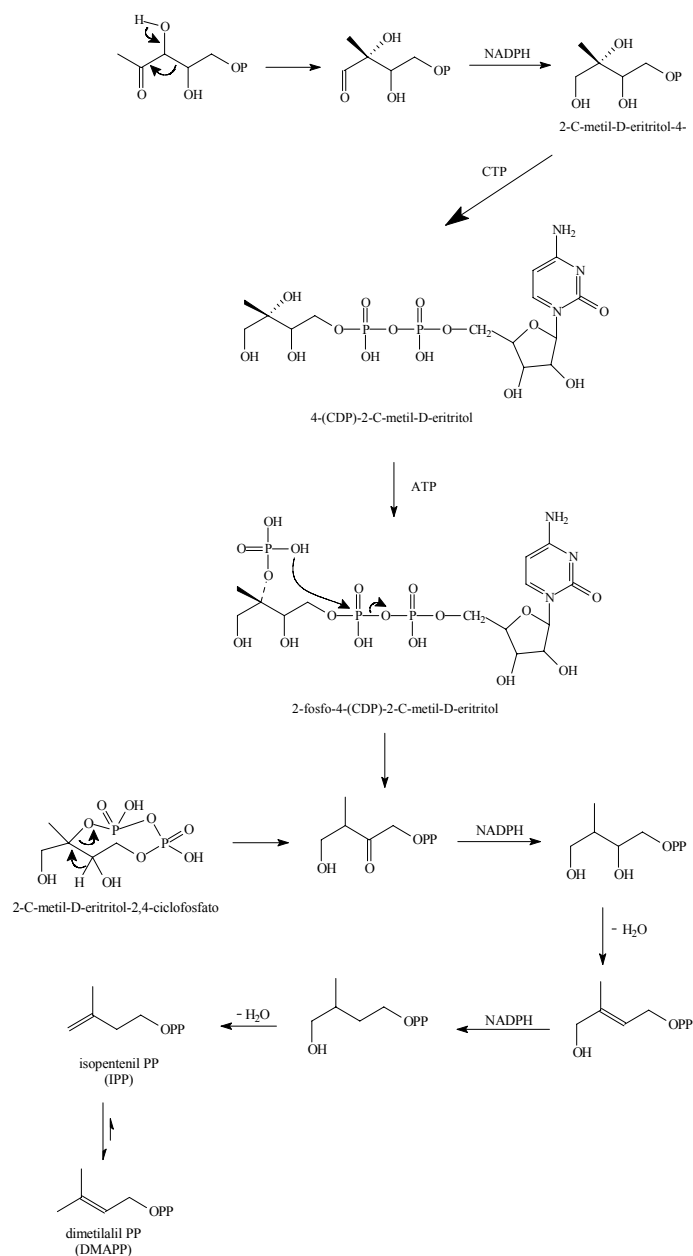


Figura 3 Mecanismo de formação das unidades isoprênica ativa, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) pela via da 1-deoxi-D-xilulose -5- P mevalonato

Fonte: Adaptada de DEWICK, 2002

Os fenilpropanoides, compostos aromáticos que possuem uma cadeia lateral de três átomos de carbono ligada ao anel aromático, formam-se a partir do ácido chiquímico, precursor de vários aminoácidos aromáticos, entre eles a L-fenilalanina. Esse ácido, pela ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL), perde uma molécula de amônia, originando os ácidos cinâmicos ativados. Esses compostos sofrem substituições em uma série de etapas de hidroxilação e metilação, resultando em vários ácidos p-cumáricos, os quais, por meio de reduções enzimáticas, originam propenilbenzenos e alilbenzenos que, por meio de reações de oxidação com degradação das cadeias laterais, geram diversos compostos presentes na constituição de muitos óleos essenciais (Figura 4) (BARRETO; VEIGA JÚNIOR, 2005; SIMÕES et al., 2007)

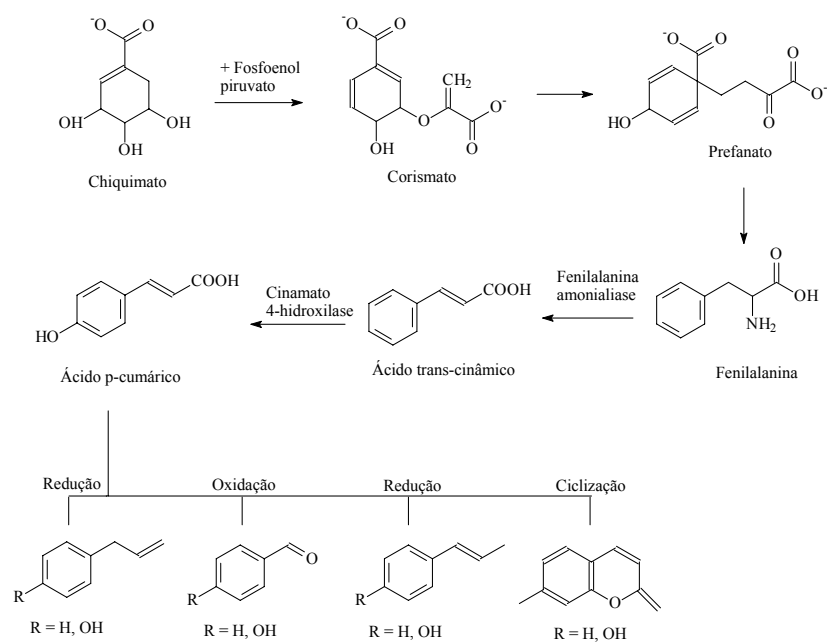


Figura 4 Mecanismo de formação da estrutura básica dos fenilpropanoides a partir do ácido chiquímico

Fonte: Adaptada de SIMÕES et al., 2007

2.2 Mercado dos óleos essenciais

Os óleos essenciais possuem dois grandes mercados: indústrias de sabores e fragrâncias, (utilizam o óleo essencial como um todo, dependendo, assim, das suas características organolépticas) e indústrias, que utilizam apenas determinados componentes isolados ou não, (indústria de bebidas, que utiliza apenas um componente, como é o caso do emprego do limoneno, isolado do óleo essencial de laranja) (BANDONI; CZEPAK, 2008). Dessa forma, muitas empresas comercializam óleos essenciais como matéria-prima para diversos produtos, com aplicações na perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos, entre outras. Há aproximadamente 300 óleos essenciais de importância comercial no mundo, dentre os quais se destacam os óleos essenciais de laranja, menta-japonesa, eucaliptos (tipos cineol e citronelal), citronela, hortelã-pimenta, e outros (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). Entre os óleos essenciais existentes no mercado, 65% provêm de espécies cultivadas, e 30%, de árvores, o que demonstra as exigências quanto à quantidade, qualidade e homogeneidade deles por parte das indústrias consumidoras, evidenciando, assim, a necessidade de cultivo das espécies para produção comercial de óleos essenciais, como forma de obtenção de produtos padronizados e, conseqüentemente, de maior valor comercial (BANDONI; CZEPAK, 2008).

O Brasil ocupa lugar de destaque na produção de óleos essenciais, devendo essa posição aos óleos cítricos, uma vez que são subprodutos da indústria de sucos; no entanto, no passado, o Brasil destacou-se também na produção de óleos essenciais de pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), sassafrás (*Ocotea odorifera*) e menta (*Mentha piperita*), sendo atualmente importador dos dois últimos (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

A exportação brasileira dos óleos essenciais de laranja, limão, menta e outros citrus foram de 30.000.000, 264.285, 5.153, e 399,479 Kg, respectivamente, sendo a França o principal importador desses óleos (INTERNATIONAL TRADE STATISTICS, 2009). De acordo com Bizzo, Hovell e Rezende, (2009), em relação à balança comercial brasileira, em 2008, foram exportados US\$ 309,5 milhões em óleos essenciais, versus US\$ 171,2 milhões importados, sendo 93% do valor obtido com as exportações oriundos de óleos essenciais de frutas cítricas, evidenciando, assim, o domínio dos óleos cítricos no mercado brasileiro.

2.3 Estruturas secretoras de óleos essenciais

Os óleos essenciais são produzidos e acumulam-se em todos os tipos de órgãos vegetais, como flores, folhas, córtex, lenho, raízes, rizomas, frutos e sementes. Todos esses órgãos de determinadas espécies podem conter óleo essencial, mas a composição pode variar conforme sua localização. A síntese e o acúmulo dos óleos estão geralmente associados com a presença de estruturas histológicas especializadas. Segundo Svoboda e Greenaway (2003), essas estruturas são divididas em dois tipos: as que ocorrem na superfície da planta e secretam substâncias diretamente fora da planta, e aquelas que ocorrem no interior do corpo da planta e secretam substâncias nos espaços intercelulares. Os tricomas glandulares são exemplos de estruturas externas, já as células, as cavidades e os canais secretores são exemplos de estruturas internas.

Svoboda, Hampson e Hunter (1999) mostram que as células secretoras são as estruturas mais simples e apenas o seu conteúdo interno a difere das células não secretoras adjacentes (Figura 5). Esse tipo de célula é encontrado em muitas espécies de plantas, como no parênquima foliar de *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus*, *Pogosteemon patchouli*; também podem ser encontradas

em rizomas e sementes, como no *Zingiber officinales* e na *Elettaria cardomomum*, respectivamente. As cavidades secretoras são estruturas mais ou menos esféricas que podem ser formadas de duas maneiras: pela separação de uma das outras células parenquimáticas, formando espaços intercelulares; ou pela modificação de uma célula, formando uma cavidade com epiderme. Esses espaços são limitados por células secretoras que são responsáveis pela produção do óleo essencial. Os principais exemplos de óleos armazenados nesse tipo de estrutura são os óleos de espécies cítricas. Já os ductos secretores são cavidades alongadas, resultantes da junção de várias cavidades secretoras, sendo revestidos por várias células adjacentes, situando-se entre essas células secretoras e as células epiteliais; esse tipo de estrutura pode ser encontrada em toda a família das Apiaceae.

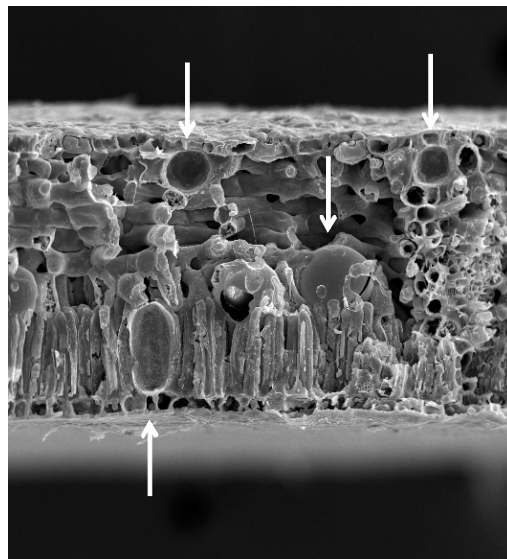


Figura 5 Células secretoras localizadas no mesófilo foliar

Os tricomas glandulares são pelos epidérmicos modificados e podem ser encontrados nas folhas, caules e até mesmo em determinadas partes das flores. De acordo com Combrick et al. (2007), há dois tipos morfológicos de tricomas, que podem ser distinguidos como capitado ou peltado, sendo a morfologia básica a mesma para ambos os tipos, os quais consistem de uma região basal, um pedúnculo e uma cabeça (Figura 6).

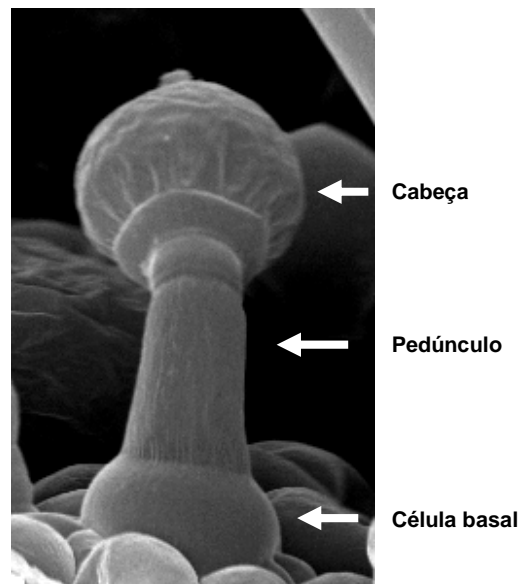


Figura 6 Forma geral de um tricoma glandular

Svoboda, Hampson e Hunter (1999) citam que um tricoma peltado consiste de uma célula basal, pedúnculo curto constituído de apenas uma célula e cabeça multicelular (com mais de duas células, raramente apresentando três ou cinco células). Já um tricoma capitado é aquele que apresenta uma célula basal, um pedúnculo unicelular curto e duas células na cabeça ou uma célula basal; também pode apresentar pedúnculo multicelular e uma pequena cabeça esférica

unicelular. Bisio et al. (1999) classificam os tricomas capitados em tipo I (apresentam cabeças unicelulares arredondadas e cabeças bicelulares) e em tipo II (possuem cabeça unicelular em forma de pera). Estes são muito encontrados ao longo de nervuras na face abaxial da folha.

De acordo com Kolb e Muller (2004), funcionalmente os tricomas protegem as plantas contra herbívoros, calor e luz solar, podendo controlar a temperatura das folhas tão bem como a perda de água. A densidade de tricomas glandulares presentes nas folhas é uma das características morfológicas que podem determinar o número de herbívoros que se alimentam de determinada espécie, uma vez que eles podem armazenar substâncias que apresentam atividades biológicas e propriedades tóxicas, como demonstrado nos trabalhos de Ambrósio et al. (2008), os quais identificaram a presença de lactonas sesquiterpênicas nos tricomas de *Tithonia diversifolia*, substância que apresenta toxicidade sobre algumas espécies de Lepidopteras.

Em muitas plantas, os tricomas glandulares são os responsáveis pela biossíntese e armazenamento de óleos essenciais, sendo, muitas vezes, chamados de glândulas de óleo essencial. Entretanto, há divergências no que diz respeito à correlação entre o número de tricomas e a produção de óleos essenciais. Shanker et al. (1999) demonstraram uma correlação positiva entre a produção de óleo essencial e o número de tricomas presentes em plantas de *Mentha arvensis*. Posteriormente, Deschamps et al. (2006) mostraram que não havia correlação entre a densidade de tricomas e produção de óleos essenciais de *Mentha arvensis* L., *Mentha x piperita* L. e *Mentha cf. aquática* L., supondo que outras características fisiológicas dessas espécies poderiam estar mais relacionadas ao rendimento do óleo essencial do que à densidade de tricomas.

2.4 Antioxidantes

Durante o armazenamento e o processamento de alimentos ricos em óleos e gorduras, eles podem sofrer transformações químicas, como hidrólise e oxidação, afetando a qualidade, decorrente dos processos oxidativos, bem como a sua aceitação pelo consumidor. Em consequência, podem ocorrer prejuízos à saúde do consumidor, em razão dos efeitos tóxicos causados pela ingestão contínua e prolongada de produtos oxidados e radicais produzidos no processo de oxidação (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

Estudos de Kinsella et al. (1993) e de Eder (1999) demonstraram que todas as células podem ser expostas ao ataque de radicais livres. Se não forem controlados, esses agentes podem danificar os componentes celulares, tais como lipídeos de membranas, proteínas e DNA. A peroxidação de tecidos lipídicos pode romper membranas, alterar as funções das plaquetas, modificar a função dos macrófagos, alterar o ácido araquidônico, causar polimerização das proteínas e promover atrogênses, por meio da peroxidação do LDL, além de poder provocar mutação no DNA.

Nos alimentos, a peroxidação lipídica é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, tornando-os impróprios para o consumo, além de provocar outras alterações que podem afetar tanto a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, quanto a integridade e segurança dos alimentos (RAMALHO; JORGE, 2006). Nos sistemas biológicos, a peroxidação lipídica sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares. Causam danos às membranas, interrompendo os mecanismos de troca de metabólitos, podendo causar até a morte celular (LIMA; ABDALLA, 2001).

A peroxidação lipídica consiste na incorporação de oxigênio molecular a um ácido graxo poliinsaturado, resultando em um hidroperóxido lipídico como

produto primário inicial. Esse processo pode ser causado por enzimas, tais como as lipoxigenases, que atuam sobre os ácidos graxos poliinsaturados, catalisando a adição de oxigênio à cadeia hidrocarbonada; reações de fotoxidação, promovida essencialmente pela radiação UV em presença de fotossensibilizadores que absorvem a energia luminosa de comprimento de onda na faixa do visível e a transfere para o oxigênio tripleto, gerando o estado singlete; e por autoxidação (LIMA; ABDALLA, 2001; RAMALHO; JORGE, 2006).

A lipoperoxidação ocorre em três etapas; iniciação, propagação e terminação, conforme mostrado na Figura 7. Na fase de iniciação, ocorre o início da peroxidação, em que o ácido graxo poliinsaturado é atacado por uma espécie capaz de abstrair um átomo de hidrogênio de um grupo metileno (-CH₂-), gerando um radical, que é estabilizado devido à ocorrência de um rearranjo molecular para formar um dieno conjugado. Na presença de oxigênio, o radical alquila combina-se com o oxigênio, formando um radical peroxila, que pode abstrair um hidrogênio alílico de outra molécula de ácido graxo poliinsaturado, originando outro radical alquila (promovendo a etapa de propagação) e um hidroperóxido lipídico. A etapa de finalização ocorre quando os radicais reagem entre si ou com outros compostos, de forma a formarem produtos não radicalares (LIMA; ABDALLA, 2001).

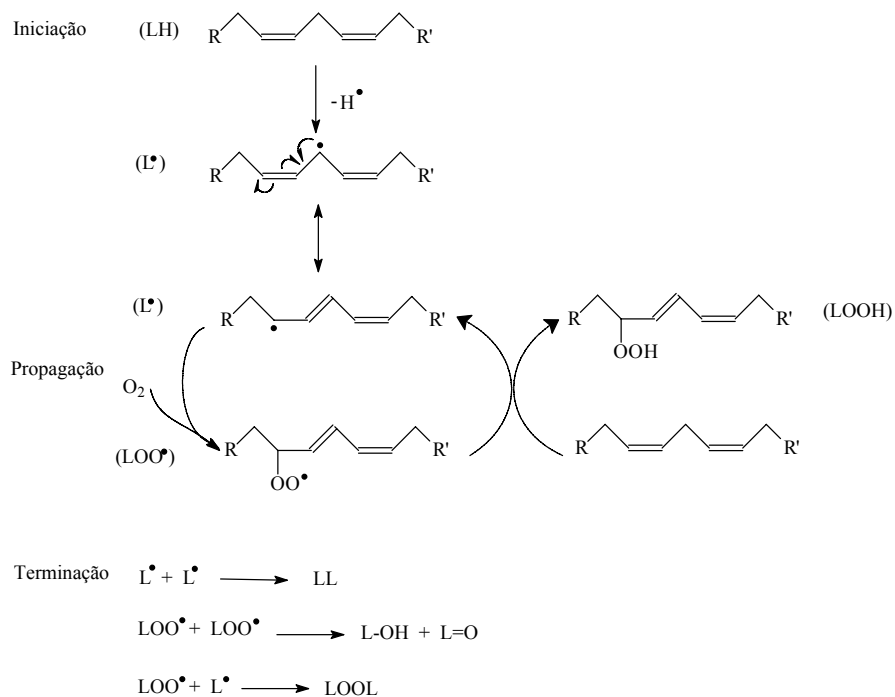


Figura 7 Esquema geral do processo de peroxidação lipídica
 Fonte: Adaptada de LIMA; ABDALLA, 2001

Os hidroperóxidos formados na etapa de propagação podem reagir com outras moléculas de oxigênio, formando diidroperóxidos, hidroperóxil epidióxidos e hidroperoxi bis-epidióxidos; a degradação desses compostos originam os chamados produtos secundários resultantes da oxidação lipídica (Figura 8). Muitos compostos secundários resultantes da oxidação lipídica têm sido identificados, e alguns desses compostos têm sido utilizados como marcadores para avaliar o desenvolvimento de várias doenças degenerativas. Por outro lado, em muitos ensaios antioxidantes em que se avaliam a peroxidação lipídica envolvem o monitoramento de hidroperóxidos ou de um produto da oxidação secundária (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

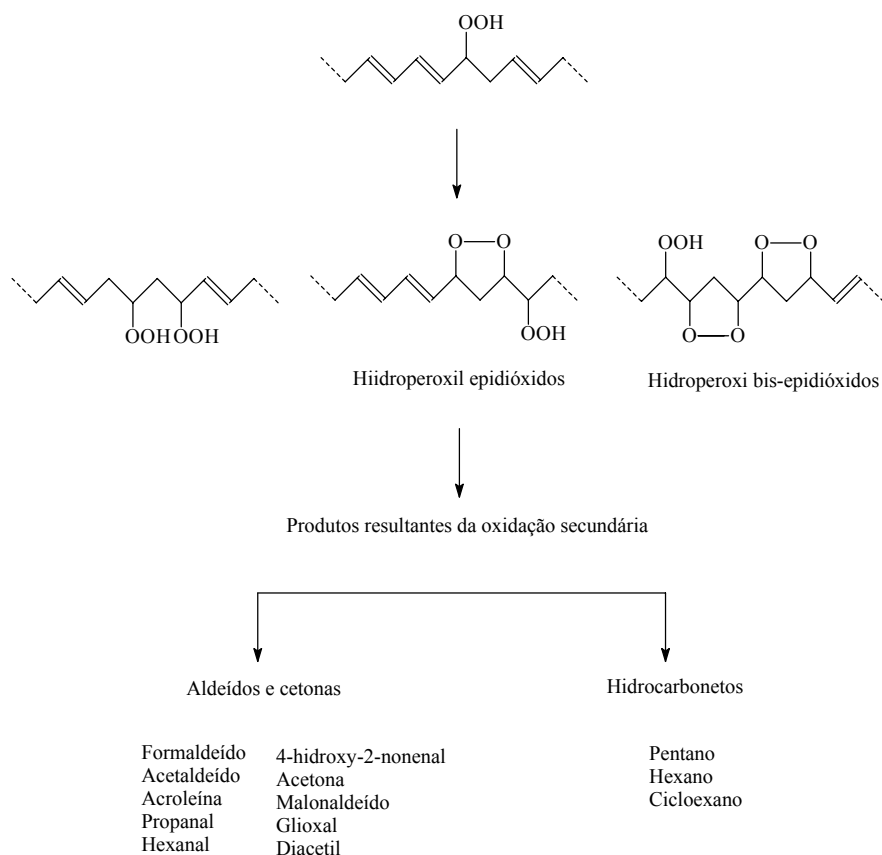


Figura 8 Formação dos principais produtos resultantes do processo de oxidação secundária de lípidios insaturados
 Fonte: Adaptada de MONN; SHIBAMOTO, 2009

Os radicais livres não causam danos somente nos alimentos, mas também ao organismo humano, sendo os grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (ATOUI et al., 2005). A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos

por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena, ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Dessas últimas, destacam-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio, óleos essenciais e carotenoides (SOUSA et al., 2007).

De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que, presentes em concentrações baixas, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato, por meio de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais (ATOUI et al., 2005; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Para que um composto seja utilizado como antioxidante, ele deve apresentar eficácia em baixas concentrações, não causar efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características dos alimentos; ser compatível com o alimento e de fácil aplicação, estável nas condições de processo e armazenamento, sendo ele e seus produtos de oxidação atóxicos, mesmo em doses muito maiores das que normalmente seriam ingeridas no alimento (RAMALHO; JORGE, 2006).

2.5 Ensaios utilizados para avaliar a atividade antioxidante

Uma série de estudos têm sido realizados para avaliar o potencial antioxidante de vários compostos de origem vegetal, assim como também conhecer as suas concentrações adequadas, a influência do sistema lipídico e da temperatura sobre eles, já que há uma forte tendência de substituição dos antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais.

Várias técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante “*in vitro*”, de maneira a permitir uma rápida triagem de substâncias e/ou misturas com potencial antioxidante, que possam ser utilizadas na conservação de alimentos e na prevenção de doenças crônico-degenerativas. De acordo com Huang, Ou e Prior (2005), os ensaios antioxidantes utilizados

atualmente podem ser classificados em duas categorias, aqueles baseados na transferência direta de hidrogênio (métodos diretos), e aqueles baseados na transferência de elétrons (métodos indiretos).

Os métodos diretos caracterizam-se pela competição entre um composto oxidável e o antioxidante pelos radicais gerados por uma fonte de radicais livres. Como substratos para a oxidação, podem ser utilizados lipídios individuais, misturas lipídicas, proteínas, DNA, e até mesmo meios biológicos ricos em lipídios, como plasma sanguíneo, membranas biológicas, entre outros (ROGINSKI; LISSI, 2005). Os métodos indiretos apresentam como característica básica o desenvolvimento de uma reação redox entre o antioxidante e o oxidante, que geralmente é um composto de concentração mensurável, tornando possível o monitoramento da reação (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

Entre os principais ensaios que ocorrem via transferência direta de hidrogênio, encontram-se os ensaios de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico e de formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); já entre aqueles que estão baseados na transferência de elétrons, o principal ensaio é o que avalia a redução do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH).

2.5.1 Ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

O método de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico avalia a capacidade de uma amostra ou composto em proteger um substrato lipídico da oxidação (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). É um ensaio baseado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno causada pelo ataque de radicais resultantes da oxidação do ácido linoleico por espécies reativas de oxigênio presentes no meio. Na ausência de substâncias antioxidantes no meio reacional, ele perde a coloração 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 β -caroteno; com isso o composto perde suas características cromólicas, e conseqüentemente a sua coloração laranja, que é monitorada espectrofotometricamente (JAYAPRAKASHA et al., 2007).

No entanto, de acordo com Silva, Borges e Ferreira (1999), esse é um método simples, sensível, mas não específico, pois substâncias oxidantes ou redutoras podem interferir nesse ensaio. Além disto, a cooxidação do β -caroteno é normalmente efetuada em um meio emulsionado, o que pode causar falta de reprodutibilidade dos resultados obtidos, acrescentando ainda a variação que pode ocorrer devido à reação do β -caroteno com o oxigênio presente no meio. Apesar desses possíveis inconvenientes, o método é amplamente usado, uma vez que não necessita de altas temperaturas, permite a avaliação do potencial antioxidante de compostos termo-sensíveis, podendo ser utilizado na determinação da atividade antioxidante de produtos vegetais.

2.5.2 Análise da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Por meio deste ensaio, avalia-se a atividade antioxidante pela formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Este ensaio é baseado na reação do ácido tiobarbitúrico com determinados compostos formados pela decomposição dos hidroperóxidos, substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico – TBARS (geralmente aldeídos), formados pela oxidação de ácidos graxos poliinsaturados, a reação dessas substâncias com o ácido tiobarbitúrico produz compostos de coloração vermelha, podendo, assim, ter suas presenças avaliadas espectrofotometricamente a 532 nm de comprimento de onda (LIMA; ABDALLA, 2001).

Segundo Osawa, Felício e Gonçalves (2005), entre os principais aldeídos formados pela decomposição dos hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados, durante o processo oxidativo, encontra-se o malonaldeído, que ao reagir com o ácido tiobarbitúrico, produz um composto de cor vermelha (Figura 9). No entanto, o ácido tiobarbitúrico pode reagir com diferentes compostos carbonílicos, os quais são chamados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

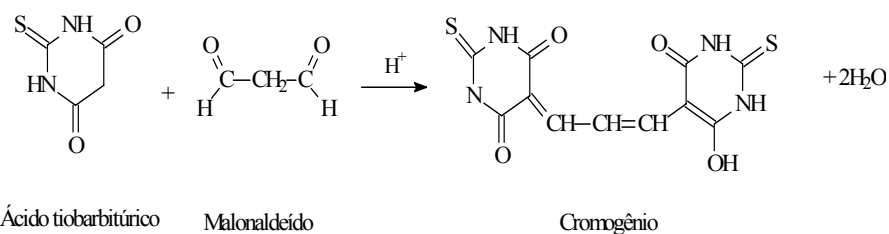


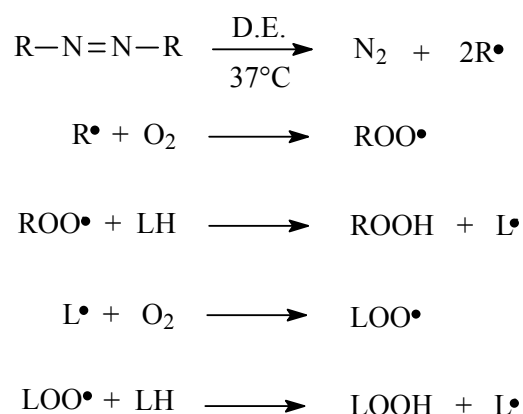
Figura 9 Reação do malonaldeído com o ácido tiobarbitúrico

Na maioria dos ensaios em que se avalia o grau de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), realizados com produtos naturais utiliza-se o dicloreto de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (AAPH) (Figura 10) como gerador de radicais, uma vez que esse composto é capaz de gerar radicais livres por decomposição espontânea a 37°C.



Figura 10 Estrutura química do dicloreto de 2,2'-azobis(2-metilpropionamida) (AAPH)

Esses radicais reagem imediatamente com oxigênio formando peróxidos (Figura 11), que irão reagir com os ácidos graxos insaturados presentes no meio reacional (PEYRAT-MAILLARD; CUVELIER; BERSSET, 2003).



$\text{R-N=N-R} = \text{AAPH}$

$\text{LH} = \text{Ácido linoleico}$

$\text{L}\bullet = \text{Radical formado pela abstração de H do ácido linoleico}$

$\text{LOO}\bullet = \text{Radical peróxil formado pela oxidação do ácido linoleico}$

$\text{D.E.} = \text{Decomposição espontânea}$

Figura 11 Possível mecanismo de geração de radicais em uma amostra lipídica, utilizando o AAPH como gerador de radicais

Esses hidroperóxidos resultantes da reação de oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados, sob aquecimento, dão origem aos compostos que irão reagir com o ácido tiobarbitúrico. Quanto maior o grau de oxidação dos ácidos graxos, maior a coloração do meio resultante; sendo assim, a presença de compostos antioxidantes inibem a oxidação dos ácidos graxos e, conseqüentemente, a produção de compostos reativos ao ácido tiobarbitúrico.

No entanto, a formação dos compostos capazes de reagir com o ácido tiobarbitúrico varia de acordo com as amostras lipídicas, dependendo do grau de insaturação dos ácidos graxos presentes, uma vez que amostras altamente insaturadas desenvolvem mais cor que as insaturadas (OSAWA; FELÍCIO; GONÇALVES, 2005).

2.5.3 Ensaio de redução do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

Neste ensaio avalia-se a redução do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), sendo um ensaio muito utilizado por ser um recurso fácil e preciso para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais (ANAGNOSTOPOULOU et al., 2006). Segundo Hristea et al. (2006), o DPPH apresenta muitas aplicações devido à sua alta estabilidade e à sua coloração púrpura que é perdida ao ser reduzido. Dessa forma, o processo de redução pode ser monitorado espectrofotometricamente no comprimento de onda de 517 nm em solução metanólica ou etanólica (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

A essência desse método está na reação dos compostos antioxidantes com o DPPH que o converte em 1,1-difenil-2-picrilhidrazina, ocorrendo a perda da coloração do meio reacional; o grau de descoloração indica o potencial de reduzir o radical DPPH e, conseqüentemente, a atividade antioxidante (JAYAPRAKASHA et al., 2007). De acordo com Ebrahimabadi et al. (2010), a redução do DPPH pode ocorrer via transferência de um átomo de hidrogênio ou por um mecanismo de transferência de elétrons por parte do composto antioxidante, como demonstrado na Figura 12.

De acordo com Bondet, Brand-Willians e Berset (1997), a principal vantagem deste método é que a atividade antioxidante é avaliada em temperatura

ambiente, eliminando, dessa forma, os riscos de degradação térmica dos compostos testados.

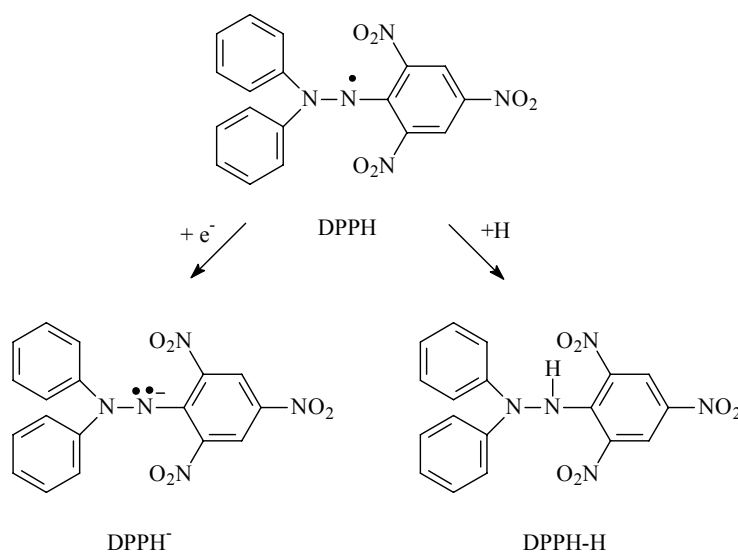


Figura 12 Possíveis mecanismos de redução do DPPH

2.6 Atividade biológica de óleos essenciais

Em geral, as atividades biológicas dos óleos essenciais são bem documentadas, principalmente no que diz respeito às atividades microbiológicas. Vários estudos já foram realizados, nos quais se avaliaram suas atividades sobre micro-organismos deterioradores de alimentos; mas há também um grande número de pesquisadores que relataram suas atividades perante micro-organismos fitopatogênicos, principalmente sobre patógenos causadores de perdas em frutos e vegetais em período de pós-colheita. Entre as suas propriedades físicas, destaca-se a alta volatilidade, tornando-os possíveis agentes

fumigantes na proteção de produtos estocados no período de pós-colheita. No entanto, a eficácia *in vivo* e a atividade prática ainda têm sido pouco estudada (TRIPATHI; DUBEY, 2004).

Guimarães (2007) constatou a atividade fungitóxica do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* sobre os fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizoctonia solani*. Na avaliação da atividade fungitóxica dos componentes majoritários, mirceno e citral (mistura isomérica de geranial e neral), o autor constatou que tal atividade foi exercida pelo citral. Nguefack et al. (2004) mostraram que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e os óleos de *Ocimum gratissimum* e *Thymus vulgaris* apresentaram um grande potencial biológico como conservantes de alimentos, pois foram testados contra *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus fumigatus*, apresentando alta toxicidade. De acordo com Cox, Mann e Markham (2001), o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (“tea tree”) foi considerado um potente anti-séptico, sendo largamente utilizado na Austrália. Os compostos com maior atividade bactericida purificados desse óleo foram o γ -terpineno, α -terpineol, terpinen-4-ol e o linalol, com os valores de CMI (concentração mínima inibitória) variando de 0,125-0,25% v/v.

Kodali et al. (2007) avaliaram as atividades de vários monoterpenos oxigenados sobre a inibição do crescimento micelial de 31 fungos fitopatogênicos, e encontraram valores de inibição para o β -citronelol e para o nerol superiores aos apresentados pelo fungicida Benomil®, demonstrando o potencial desses compostos como agentes fungicidas. Outro monoterpeno que apresentou atividade antimicrobiana foi o 1,8-cineol, encontrado no óleo essencial de *Artemisia asiatica*, considerado como o maior agente anti-*Staphylococcus* presente nesse óleo, com uma CMI de 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Eles também foi ativo contra espécies Gram-negativas, tais como *Escherichia coli* e

Pseudomonas aeruginosa, ambas com CMI de 3 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (KALEMBA; KUSEWICZ; SWIADER, 2002).

Os monoterpenos β -felandreno, limoneno, (Z)- β -ocimeno, β -cariofileno, mirceno e α -felandreno, presentes no óleo essencial da espécie *Haplophyllum tuberculatum*, apresentaram atividade bactericida e fungicida demonstrada por Al-Burtamani et al. (2005). Os micro-organismos estudados foram as bactérias *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella choleraesuis*, *Candida albicans* e *Bacillus subtilis*; e os fungos *Alternaria alternata*, *Bipolaris* sp, *Curvularia lunta*, *Fusarium oxysporium* e *Stemphylium solani*. Esses autores encontraram uma forte atividade desse óleo sobre a inibição do crescimento desses micro-organismos, e consideraram tais compostos como sendo os responsáveis por esse efeito, já que eles são os constituintes majoritários encontrados nesse óleo.

Avaliando o efeito fungitóxico de 37 óleos essenciais sobre *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. graminearum*, Velluti et al. (2004) encontraram atividade fungitóxica para os óleos de orégano (*Origanum vulgare*), cinamomo (*Melia azedarach*) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). Esse parâmetro foi atribuído ao eugenol, composto majoritário dos óleos essenciais de cravo-da-índia e cinamomo; e ao carvacrol, composto majoritário do óleo essencial de orégano. Pereira et al. (2006) citam o citral, terpen-4-ol e eugenol como sendo agentes antimicrobianos, pois avaliando o efeito inibitório dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Origanum vulgare* e *Syzygium aromaticum* sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, concluíram que o efeito apresentado por esses óleos pode ser devido à presença dos seus compostos majoritários citral, terpen-4-ol e eugenol, respectivamente.

Sahin et al. (2004) pesquisaram os efeitos biológicos sobre bactérias e fungos e a atividade antioxidante dos óleos essenciais de cravo-da-índia e de orégano, óleos ricos em eugenol e carvacrol, respectivamente, e comprovaram a

grande eficácia sobre os gêneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizoctonia*. Oxenha, Svoboda e Walters (2005) e Faria et al. (2006) atribuem propriedades microbiológicas ao eugenol. Os primeiros comprovaram em dois quimiotipos de óleos essenciais de *Ocimum basilicum* o efeito fungitóxico sobre *Botrytis fabae* dos compostos metil chavicol, linalol, eucalipitol e eugenol, componentes majoritários desses óleos essenciais, e os outros investigaram a atividade fungitóxica do óleo essencial de *Ocimum gratissimum*, observando a atividade desse sobre o crescimento micelial de *Botryosphaeria rhodina*, *Rhizoctonia* sp. e de duas raças de *Alternaria* sp., pela técnica de bioautografia em CCD utilizando a espécie *Cladosporium herbarum* como fungo padrão; encontraram o eugenol como composto ativo.

Oussalah et al. (2007) avaliaram a atividade antibacteriana de óleos essenciais de diversas plantas contendo eugenol, timol, carvacrol, linalol e neral nas concentrações 0,003, 0,006, 0,013, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4% sobre o crescimento de *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes* e observaram que todos os óleos essenciais apresentaram influência, em determinada concentração, sobre o crescimento das bactérias.

Nostro et al. (2004), comparando o efeito do óleo essencial de orégano e dos padrões carvacrol e timol sobre *Staphylococcus*, não encontraram diferenças significativas. Os valores de CMI observados foram 0,015-0,03% para o carvacrol, 0,03-0,06% para o timol e 0,06-0,125% para o óleo essencial de orégano. Demirci et al. (2006) caracterizaram e avaliaram a atividade fungitóxica contra fitopatógenos do óleo essencial extraído das folhas de *Haplopappus greenei* e encontraram mais de 104 compostos em sua constituição, sendo o carvacrol o componente majoritário, com uma concentração relativa de 8,7%. A atividade biológica desse óleo sobre *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum fragariae* e *Colletotrichum*

gloeosporioides na concentração de 20 mg mL⁻¹ foi analisada por bioautografia em Cromatografia de Camada Delgada (CCD). O carvacrol mostrou não ser seletivo contra as três espécies de *Colletotrichum*, apresentando níveis de atividade antifúngica similar ao Benomyl® e maior que a do Captan®, fungicidas comerciais, revelando, assim, sua promissora utilização como fungicida de origem vegetal.

Burt (2004) observou que os compostos timol e carvacrol provocaram distorção na estrutura física de células bacterianas, causando expansão e consequente desestabilidade na membrana, modificando sua permeabilidade, desnaturando enzimas essenciais e alterando a força próton motora, por meio de variações no pH e potencial elétrico.

Bajpai, Rahman e Kang (2007), estudando o efeito fungitóxico do óleo essencial de *Metasequoia glyptostroboides*, sobre fungos pertencentes ao gênero *Fusarium* e outros, demonstraram que essa planta pode ser utilizada pelas agroindústrias como fungicida natural em alternativa ao uso de produtos químicos sintéticos, no tratamento de muitos micro-organismos fitopatogênicos causadores de grandes prejuízos na agricultura. Aplicando o seu óleo essencial na concentração de 1000 µg mL⁻¹, encontraram inibições de 63% para *Fusarium oxysporum* e *Colletotricum capsici*, 70% para *Phytophthora capsici*, 56% para *Botrytis cinerea* e *Sclerotium sclerotiorum* e 68% para *Fusarium solani* sobre seus crescimentos miceliais, demonstrando, assim, a atividade fungitóxica desse óleo. Os valores de CMI encontrados foram de 500 µg mL⁻¹ para *Fusarium oxysporum*, *Colletotricum capsici* e *Fusarium solani*, e 1000 µg mL⁻¹ para *Phytophthora capsici*, *Botrytis cinerea* e *Sclerotium sclerotiorum*.

Kordali, Kotan e Cakir (2005) avaliaram a atividade antifúngica e antibacteriana dos óleos essenciais isolados das folhas de *Artemisia dracunculus*, *Artemisia absinthium*, *Artemisia spicigera* e *Artemisia santonicum* sobre um grupo de 34 espécies fúngicas e 16 espécies de bactérias fitopatogênicas. Os

óleos essenciais apresentaram atividade fungitóxica praticamente sobre todos os micro-organismos estudados; em alguns casos houve até mesmo total inibição do crescimento micelial na concentração empregada de 20 μL por placa. Sobre as bactérias, os óleos apresentaram uma atividade menor, sendo necessárias concentrações de 600, 900 e 1200 μL de óleo por placa. Lima (2008) demonstrou a atividade bacteriana dos óleos essenciais de *Myristica fragrans* e *Salvia microphylla*, sobre várias bactérias contaminadoras de alimentos, Gram-negativas e Gram-positivas, observando que o óleo essencial de *S. microphylla* apresentou menores valores de CMI (3,90 – 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$) em relação ao óleo essencial de *M. fragrans* (3,90 – 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sobre a maioria das bactérias, exceto para *Escherichia coli*, *Aeromonas hydrophila* e *Staphylococcus aureus*, micro-organismos que demonstraram maiores resistência perante os óleos essenciais estudados.

Os óleos essenciais de cravo-da-índia, capim-limão, citronela e árvore-de-chá apresentaram atividade antibacteriana sobre a fitobactéria *Xanthomonas vesicatoria*, causadora da mancha-bacteriana do tomateiro, em estudos *in vitro* e *in vivo*. *In vivo*, esses óleos essenciais mostraram eficientes contra a mancha-bacteriana do tomateiro, quando aplicados semanalmente ou sete dias antes da inoculação, em concentrações acima de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Imagens feitas por microscopia eletrônica de transmissão revelaram que esses óleos essenciais atuaram na parede celular dessa bactéria, causando a sua degradação (LUCAS, 2009).

2.7 Óleos essenciais com atividade antioxidante

Em muitos estudos, têm sido demonstrado o potencial dos óleos essenciais como antioxidantes de origem vegetal. Vardar-Ünlüs et al. (2003) demonstraram a atividade antioxidante do óleo essencial de *Thymus pectinatus*,

e observaram que essa atividade deve-se aos compostos carvacrol e timol, já que eles apresentaram uma elevada atividade individual, sendo maior que a atividade do antioxidante sintético BHT.

Albuquerque et al. (2003) encontraram atividade antioxidante bastante significativa para os óleos essenciais das espécies de *Plectranthus grandis* e *Plectranthus ornatus*. Entre os compostos identificados, os presentes em maior percentual foram o timol (14,1 %), trans- β -cariofileno (62,4 %) e o germacreno D (20,1 %), possivelmente os responsáveis por tal atividade. Miguel et al. (2004) avaliaram as propriedades antioxidantes dos óleos essenciais de *Thymus caespitosus*, *Thymus camphoratus* e *Thymus mastichina*, utilizando gema de ovo como fonte de lipídios para avaliar o índice de peroxidação com e sem indução. Os óleos essenciais demonstraram atividade antioxidante na ausência de radical induzido, tendo essa aumentada com o aumento da concentração. Entretanto, essas atividades foram menores que a dos antioxidantes utilizados, em comparação ao α -tocoferol, BHA e BHT. Já na presença do radical induzido, com exceção do óleo essencial de *Thymus camphoratus*, os óleos essenciais apresentaram um decréscimo em suas atividades.

A atividade antioxidante de óleos essenciais de três espécies de *Croton* do nordeste do Brasil (*C. zehntneri*, *C. nepetaefolius* e *C. argyrophyloides*) foi estudada por Moraes et al. (2006), os quais encontraram uma maior atividade que a dos antioxidantes BHT e α -tocoferol, para óleo essencial de *Croton argyrophyloides*, quando utilizado apenas na concentração de 500 ppm e 100 ppm; para os óleos essenciais de *Croton zehntneri* e *Croton nepetaefolius*, quando utilizados apenas nas concentrações de 100 ppm.

Alguns óleos essenciais apresentam alta atividade em determinado ensaio, mas em outro, pode apresentar uma menor atividade. Avaliando a atividade antioxidante do óleo essencial de *Teucrium marum* utilizando três metodologias (inibição da oxidação lipídica, inibição de radicais superóxidos e o

ensaio utilizando DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)), e comparando a atividade desse com os antioxidantes ácido ascórbico, BHT e trolox, Ricci et al. (2005) demonstraram a influência do ensaio utilizado sobre a atividade antioxidante do óleo essencial e observaram que, no ensaio do DPPH, o óleo essencial apresentou a segunda maior atividade ($IC_{50} = 13,13 \mu\text{g mL}^{-1}$) sendo menor apenas que a atividade do trolox ($IC_{50} = 11,59 \mu\text{g mL}^{-1}$). No ensaio que avalia a inibição dos radicais superóxidos, o óleo essencial ($IC_{50} = 0,161 \mu\text{g mL}^{-1}$) foi melhor apenas que o BHT ($IC_{50} = 2,35 \mu\text{g mL}^{-1}$). Na inibição da oxidação lipídica, os valores de IC_{50} obtidos mostraram que o óleo essencial ($IC_{50} = 12,48 \mu\text{g mL}^{-1}$) apresentou atividade antioxidante similar ao trolox ($IC_{50} = 11,88 \mu\text{g mL}^{-1}$), menor que ao BHT ($IC_{50} = 3,86 \mu\text{g mL}^{-1}$) e maior que o ácido ascórbico ($IC_{50} = 18,63 \mu\text{g mL}^{-1}$).

Zhang et al.(2006) avaliaram a capacidade antioxidante do óleo essencial de *Petroselinum crispum* por três ensaios *in vitro*: um avaliando a capacidade de oxidação do β -caroteno, outro a atividade dos radicais livres, pelo método do DPPH, e um terceiro, que avalia a capacidade de quelar íons Fe^{+2} . Observaram que esse óleo apresentou atividade antioxidante na inibição da oxidação do β -caroteno e na inativação de radicais livres, não apresentando atividade alguma como quelante dos íons Fe^{+2} . Paralelamente, nessa mesma data, Tepe et al. (2006) avaliaram o potencial antioxidante dos óleos essenciais de *Pimpinella anisetum* e *Pimpinella flabellifolia* utilizando o método do DPPH e o ensaio que avalia a capacidade de inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico. Encontraram atividade antioxidante maior que o do padrão utilizado (ácido ascórbico) para os dois óleos essenciais no ensaio do DPPH; no entanto, quanto à capacidade de inibir a oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico, os dois óleos apresentaram atividades antioxidantes inferiores à do ácido ascórbico, demonstrando a variação quanto a essa atividade, em relação ao ensaio utilizado.

Bozin et al. (2006), avaliando a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris*, pelo ensaio do DPPH, encontraram valores de IC_{50} iguais a 0,39, 0,17, 0,19 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Esses valores foram menores que o valor apresentado pelo BHT (5,37 $\mu\text{g mL}^{-1}$), evidenciando a significativa atividade antioxidante desses óleos essenciais, que se mostraram ricos em fenilpropanoides, como estragol (45,8%), carvacrol (61,3%) e timol (47,9%), respectivamente.

Os óleos essenciais de *Satureja spicigera* e *Satureja cuneifolia* apresentaram atividade antioxidante ($IC_{50} = 127,0 \mu\text{g/mL}$ e $IC_{50} = 89,1 \mu\text{g/mL}$, respectivamente) pelo teste do DPPH, sendo maiores do que a dos antioxidantes BHT ($IC_{50} = 18,0 \mu\text{g/mL}$) e do ácido ascórbico ($IC_{50} = 3,80 \mu\text{g/mL}$). No entanto, no ensaio do ácido linoléico, as atividades apresentadas pelos óleos essenciais foram de 81,0% e 93,7%, respectivamente, sendo menores que as dos compostos BHT (96,6%) e do ácido ascórbico (94,5%) para o mesmo ensaio (EMINAGAOGLU et al., 2007).

Husain et al. (2008) avaliaram a atividade antioxidante do óleo essencial de *Ocimum basilicum* obtido com a variação sazonal, pelas metodologias do β -caroteno/ácido linoleico e do DPPH, e observaram que esses óleos essenciais apresentaram atividade antioxidante significativas apenas perante o ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico. Quantitativamente, esse óleo essencial mostrou-se rico em monoterpenos, tendo como constituinte majoritário o linalol (56,7 – 60,6 %), que apresentou um valor de IC_{50} (16,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) inferior aos apresentados pelos óleos essenciais.

Estudos de Rebelo et al. (2009) demonstraram a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Conocarpus scoparioides*, extraídos de folhas frescas e secas e encontraram valores de EC_{50} de 46,7 e 56,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os óleos essenciais das folhas frescas e secas, respectivamente, revelando, assim, valores significativos para a atividade antioxidante, uma vez que foram apenas duas

vezes maiores que o encontrado para o BHT ($19,8 \mu\text{g mL}^{-1}$). Ambos os óleos apresentaram o timol e o metil éter timol como constituintes majoritários. Sarikurkcü et al. (2009) demonstraram um aumento da atividade antioxidante do óleo essencial de *Vitex agnus-castus* de acordo com o aumento de sua concentração no meio reacional pelos ensaios do sistema β -caroteno/ácido linoleico e de redução do DPPH, nos quais foram utilizadas concentrações entre $0,4 - 2,0 \text{ mg mL}^{-1}$ e de $0,2 - 2,0 \text{ mg mL}^{-1}$, respectivamente, revelando uma relação dose-dependente sobre sua atividade antioxidante. Entretanto, observaram que a atividade antioxidante apresentada por esse óleo essencial perante o ensaio do DPPH foi muito baixa (1,38% na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$), em comparação à atividade apresentada no ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico (86,17% na concentração de $2,0 \text{ mg mL}^{-1}$), evidenciando a influência do ensaio sobre a atividade antioxidante.

Trabalhos de Safaei-Ghomi et al. (2009) avaliaram a atividade antioxidante do óleo essencial de *Thymus caramanicus* e do seu constituinte majoritário carvacrol (85,9 %), utilizando as metodologias do DPPH e de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico. Encontraram valores de IC_{50} de 263,09, 448,05 e de $19,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo essencial, carvacrol e BHT, respectivamente. No ensaio de redução do DPPH, foram encontrados valores de atividade antioxidante relevantes perante o ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico ($79,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo essencial, $50,18 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o carvacrol e de 98,26 para o BHT). Observaram que o óleo essencial apresentou melhor valor de atividade antioxidante que o seu constituinte majoritário carvacrol em ambos os testes; tal efeito foi justificado pelos autores devido à provável ocorrência de um efeito sinérgico, devido à presença de seus constituintes minoritários, que totalizaram 15 % do óleo essencial.

Por outro lado, há estudos que relatam a ausência de atividade antioxidante de alguns óleos essenciais, como os de Lopes-Lutz et al. (2008),

que demonstraram a ausência de atividade antioxidante dos óleos essenciais de algumas espécies de *Artemisia* por ambos os ensaios, de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico e de redução do DPPH.

2.8 *Lippia sidoides* cham

O gênero *Lippia* possui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores pertencentes à família Verbenaceae. Entre as principais espécies desse gênero, encontram-se: *L. gracillis* H.B.K., *L. sidoides* Cham., *L. alba* Mill N.E. Brown, *L. mycrophylla* Cham., *L. gravelous*, *L. alnifolia*, *L. aristata*, *L. grata*, *L. triphylla*, *L. thymoides*, *L. citiodora*, *L. adoensis* e *L. schimperi*. As plantas pertencentes a esse gênero estão distribuídas pelos países das Américas Central e do Sul e em alguns países da África Central (TERBLANCHÉ; KORNELIUS, 1996). Muitas dessas são utilizadas pelas populações como plantas medicinais no controle de diversas doenças gastrintestinais e respiratórias, e algumas espécies já demonstraram atividades antimalarial, antiviral e antibacteriana (PASCUAL et al., 2001).

Lippia sidoides Cham., conhecida popularmente como “alecrim pimenta”, é uma planta muito encontrada no Nordeste brasileiro e que tem mostrado diversas atividades biológicas, o que a tem tornado uma fonte potencial de compostos biologicamente ativos. Suas folhas têm sido utilizadas na medicina popular no tratamento contra acne, feridas, infecções da pele e couro cabeludo, e suas infusões são empregadas para o tratamento de rinite alérgica, infecções vaginais, bucais e de garganta (MARTINS et al., 2003).

Segundo Matos (2000), suas folhas podem apresentar um teor de óleo essencial de até 4,5%, sendo encontrados compostos como timol, carvacrol, 1,8-cineol, ρ -cimeno, 4-terpineol, timol metil éter, trans-cariofileno, entre outros. O estudo fitoquímico de suas folhas tem resultado na elucidação de vários outros

constituintes, como acetato do ácido oleanólico, metil-3,4-diidroxibenzoato, lapachenol, tecomaquinona I, tectoquinona, tectol, tectol acetilado, quercetina, luteolina, glucoluteolina, lippisidoquinona, taxifolina e isolariciresinol (COSTA et al., 2002).

Seu óleo essencial está sendo comercializado no mercado externo, interno e regional pela empresa de Produtos Naturais Ltda (PRONAT), que se encontra incubada no Parque de Desenvolvimento Tecnológico do Ceará (PADETEC) da Universidade Federal do Ceará (UFC).

Estudos recentes têm relatado diversas propriedades biológicas para seu óleo essencial, como a inseticida, contra larvas de *Aedes aegypti* L. (CAVALCANTI et al., 2004) e bactericida, para bactérias de alimentos *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* (BERTINI, 2005; OLIVEIRA, et al., 2006) e contra bactérias do gênero *Streptococcus* e o fungo *Candida albican* (BOTELHO et al., 2007).

2.9 *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer

O gênero *Ocotea* engloba aproximadamente 300 espécies, de grande ocorrência na América tropical; a espécie *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, Lauracea, é conhecida popularmente como canela-sassafrás, sassafrás, canela-cheirosa, entre outros nomes, que podem variar com a região. É uma árvore que pode atingir uma altura de 8 a 25m, apresentando copa densa e arredondada, podendo ser encontrada do sul da Bahia ao Rio Grande do Sul, na Mata Atlântica, podendo ocorrer também com relativa frequência nos campos de altitude da Serra da Mantiqueira em SP e MG (LORENZI, 2008).

O óleo essencial de *O. odorifera* é rico em safrol, composto de grande interesse industrial, uma vez que é utilizado pela indústria química como matéria-prima na manufatura de heliotropina, fixador de fragrâncias e de

butóxido de piperonila, composto usado como agente sinérgico em inseticidas à base de piretroides (FAO, 1995 citado por KEIL, 2007). O Brasil foi o principal exportador de safrol até o início da década de 90; essas exportações foram realizadas por meio do óleo essencial de sassafrás extraído dos troncos das árvores nos estados da região sul do País. Nessa época, a exploração extrativista desta árvore quase levou a espécie à extinção.

2.10 *Cordia verbenacea* D.C.

É um arbusto perene, pertencente à família das Boraginaceae, conhecida popularmente como erva-baleeira e salicilina, encontrada ao longo da costa da Região Sudeste. Suas partes aéreas possuem odor forte e persistente, e têm sido utilizadas pela medicina popular na forma de extratos alcoólicos, decocções e infusões, como anti-ulceral, antimicrobiano, anti-inflamatório, antireumático, analgésico, entre outros (PASSOS et al., 2007). Dentre alguns compostos encontrados em suas partes aéreas, incluem taninos, flavonoides, triterpenos e óleo essencial. De acordo com trabalhos de Carvalho et al. (2004), entre os muitos componentes do óleo essencial de *C. verbenacea*, encontra-se α -pineno (29,69%) e *E*-cariofileno (25,27%) como compostos majoritários, seguidos pelo aloaromadendreno (9,99%), α -humuleno (4,64%), β -gurjuneno (4,11%).

Atualmente, seu óleo essencial é incorporado como princípio ativo na formulação do fitomedicamento nacional Acheflan®, desenvolvido pela empresa Aché Laboratórios Farmacêuticos SA. Em muitos estudos, tem sido demonstrado efeitos anti-inflamatórios de extratos das folhas de *C. verbenacea* (SERTIÉ, 2005; TICLI, et al., 2005). No entanto, trabalhos recentes, como de Passos et al. (2007), revelaram que tal atividade deve-se ao óleo essencial extraído de suas folhas, uma vez que esse apresentou ação anti-inflamatória na dose dependente na redução da carragenina em edemas induzidos em ratos e

camundongos, quando testado em doses de 300 e 600 mg Kg⁻¹ por animal. Os autores afirmaram que tal atividade deve-se à presença dos sesquiterpenos, α -humuleno e *E*-cariofileno, compostos encontrados como constituintes majoritários do seu óleo essencial. Fernandes et al. (2007) revelaram que o tratamento oral com os compostos α -humuleno e *E*-cariofileno apresentaram efeitos inibitórios em diferentes modelos experimentais de inflamação em ratos e camundongos, observaram que ambos reduziram os fatores de ativação plaquetária bradicinina e ovoalbumina de edemas em ratos e, além disso, o α -humuleno foi capaz de diminuir a formação de edema induzido pela injeção de histamina, revelando, assim, potencial de ambos os compostos no tratamento de doenças inflamatórias.

Roldão et al. (2008) mostraram que a administração oral de 125 mg Kg⁻¹ do extrato das folhas de *Cordia verbenacea* em ratos foi capaz de inibir em 78% lesões gástricas induzidas por HCl/etanol (0,3M), revelando sua possível atividade antiúlcera. Entretanto, não foi observada a atividade antioxidante significativa sobre a prevenção da peroxidação lipídica induzida em fígado de ratos, uma vez que apresentou IC₅₀ igual a 76,11 ± 3,76 µg mL⁻¹, ao passo que o valor de IC₅₀ para a quercetina foi de 4,58 ± 0,52 µg mL⁻¹.

2.11 *Mikania glauca* Mart. ex baker

É uma trepadeira, herbácea pertencente à família das Asteraceae, encontrada no Estado de Minas Gerais em matas de galeria e campos rupestres (SANO et al., 2008). Diversas plantas medicinais estão incluídas entre as Asteraceae, destacando-se a carqueja (*Baccharis trimera*), a camomila (*Matricaria recutita*), o guaco (*Mikania* spp.), entre outras. As plantas pertencentes a essa família são muito comuns nas formações abertas do Brasil, principalmente no cerrado, onde a espécie encontra-se bem representada,

ocorrendo aproximadamente 250 gêneros e 200 espécies (SOUZA; LORENZI, 2008).

O gênero *Mikania* possui mais de 450 espécies, sendo largamente representado no Brasil, com mais de 150 espécies ocorrendo em todo o País; entre essas; algumas endêmicas foram descobertas na Chapada Diamantina, localizada no Estado da Bahia (REIS et al., 2008). Não há relatos de estudos fitoquímicos com a espécie *Mikania glauca*; no entanto, ela se encontra na lista de espécies ameaçadas de extinção da flora do Estado de Minas Gerais (CONSELHO DE POLÍTICA AMBIENTAL - COPAM, 1997).

2.12 *Alomia fastigiata* (Gardner)

Há poucos estudos realizados com plantas do gênero *Alomia*. Com a espécie *Alomia fastigiata*, foi relatada a caracterização química de uma cumarina (ROZETTI; FERREIRA,1967) e de uma flavona (LOPES et al., 1997). A espécie mais estudada desse gênero é a *Alomia myriadenia*, que teve o seu extrato etanólico estudado por Zani et al. (2000), os quais determinaram sua atividade sobre linhagens de células cancerígenas humanas. Neste trabalho, os autores isolaram e caracterizaram uma mistura de diterpenos labdanos (12S),16-diidroxilabda-7,13-dien-15,16-olide. Desde então, muitos trabalhos têm sido realizados avaliando atividades biológicas dessas moléculas. Souza-Fagundes et al. (2002) encontraram que o labdano ent-12R,16-diidroxilabda-7,13-dien-15,16-olide (Figura 12) inibiu afitoemaglutinina, estimulando a proliferação de linfócitos humanos presentes em células sanguíneas mononucleares. Trabalhos subsequentes demonstraram que tal ação ocorria devido à indução de apoptose em monócitos por parte desse composto (SOUZA-FAGUNDES et al., 2003).

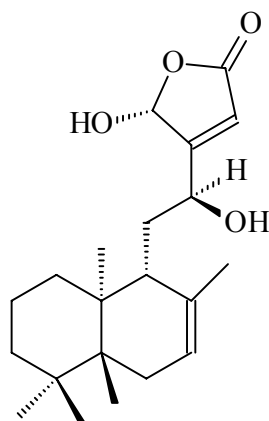


Figura 13 Estrutura química do labdano ent-(12R),16-diidroxilabda-7,13-dien-15,16-olide

Trabalhos de Scio et al. (2003) revelaram a presença de um diterpeno alimano nas partes aéreas de *Alomia myriadenia*, identificado como ent-(8S,12S)-epoxi-(7R),16-diidroxialima-5(10),13-dien-15,16-olide, que juntamente com os labdanos, posteriormente identificados, foram ativos contra células de cânceres humanos. Esse composto, quando testado *in vitro* contra *Trypanosoma cruzi*, foi capaz de causar a morte de 100% dos parasitas em uma concentração de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.13 Doenças bacterianas do tomateiro

A cultura do tomate é uma das olerícolas mais atacadas por fitopatógenos. Estima-se que mais de duzentos já foram descritos; assim, é necessária a utilização de grandes quantidades de agrotóxicos na cultura, sendo a maioria prejudicial aos ecossistemas, além de seus resíduos nos frutos serem uma ameaça à saúde humana (BARRETO; SCALOPPI, 2000). Diversos gêneros, espécies, subespécies e patovares de bactérias fitopatogênicas são

responsáveis por doenças nessa solanácea, assumindo um papel de importância na cultura do tomateiro, uma vez que podem limitar a sua produção.

Segundo Marques et al. (1994), no Brasil já foram registradas, infectando naturalmente o tomateiro, as bactérias *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia carotovora* subsps. *atroseptica* e *carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. No entanto, entre as principais doenças causadas por fitobactérias sobre essa cultura destacam-se o cancro-bacteriano, causado por *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, a mancha-bacteriana, causada por *Xanthomonas vesicatoria* e a pinta-bacteriana, causada por *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

2.14 *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*

É uma bactéria Gram-positiva, baciliforme, móvel ou imóvel, desenvolve-se em temperaturas entre 24 e 28°C e em alta umidade. É o agente causal do cancro-bacteriano, uma doença inexpressiva para o tomateiro industrial, devido à sua baixa incidência; porém, é uma das doenças mais importantes na cultura do tomateiro estaqueado, uma vez que pode destruir grande parte da planta (KIMATI et al., 2005). Pode apresentar dois tipos de colonização no tomateiro: a localizada e a sistêmica. Nas épocas chuvosas, a localizada é a mais comum, uma vez que favorece a disseminação e a penetração das bactérias nos tecidos das plantas, via estômatos, hidatódios e ferimentos. Já a colonização sistêmica é a mais importante, pois as plantas podem murchar parcialmente ou totalmente. A bactéria pode penetrar pelos estômatos, hidatódios, ferimentos e até mesmo pelas raízes. Uma vez no interior da planta, a

bactéria multiplica-se rapidamente, colonizando o sistema vascular (KIMATI et al., 2005).

2.15 *Pseudomonas syringae* P.V. tomato

Trata-se de uma bactéria baciliforme, Gram-negativa, que se move por meio de flagelos polares; desenvolve-se em condições de alta umidade e temperaturas entre 18 e 25°C. É o agente causal da pinta-bacteriana ou mancha-bacteriana pequena, podendo afetar todos os órgãos aéreos (KIMATI et al., 2005). Nas folhas, ocasiona lesões escuras de 2-3 mm de diâmetro, geralmente circundadas por halos cloróticos, podendo haver a formação de manchas necróticas escuras. Os sintomas são semelhantes nas hastes; porém, sem o halo clorótico; nos frutos, pode causar lesões superficiais, escuras e puntiformes, menores que 1 mm de diâmetro (MALAVOLTA JUNIOR et al., 2002).

1.16 *Xanthomonas vesicatoria*

É uma bactéria Gram-negativa, baciliforme, que se move por meio de um flagelo polar, é uma das bactérias causadoras da mancha-bacteriana, doença responsável por causar os maiores prejuízos à cultura do tomate (JONES et al., 2000). A mancha-bacteriana é uma doença de ocorrência em condições de elevada umidade e precipitação, e de temperaturas entre 20 e 30 °C, podendo afetar todos os órgãos da parte aérea da planta. Nas folhas, apresentam pequenas áreas de tecido encharcado, de forma circular ou irregular, que mais tarde necrosam. Nos frutos, os sintomas iniciam-se com pequenas áreas encharcadas que depois necrosam e aumentam de tamanho, provocando lesões deprimidas ou levemente salientes. A doença não leva a planta à morte, mas pode causar baixa produtividade e frutos de má qualidade (KIMATI et al., 2005).

REFERÊNCIAS

ALBUQUERQUE, R. L. et al. Estudo químico e atividade antioxidante do óleo essencial de *Plectranthus grandis*. Will. E *Plectranthus ornatus*. Codd. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 26., 2003, São Paulo. **Anais...** São Paulo: SBQ, 2003. 1 CD-ROM.

AL-BURTAMANI, S. K. S. et al. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *Haplophyllum tuberculatum* from Oman. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 96, n. 1/2, p. 107-112, Jan. 2005.

AMBRÓSIO, S. R. et al. Constituents of glandular trichomes of *Tithonia diversifolia*: Relationships to herbivory and antifeedant activity. **Phytochemistry**, New York, v. 69, n. 10, p. 2052-2060, July 2008.

ANAGNOSTOPOULOU, M. A. et al. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet Orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chemistry**, London, v. 94, n. 1, p. 19-25, Jan. 2006.

ATOUI, A. K. et al. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, London, v. 89, n. 1, p. 27-36, Jan. 2005.

BAJPAI, V. K.; RAHMAN, A.; KANG, S. C. Chemical composition and antifungal properties of the essential oil and crude extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 26, n. 1, p. 28-35, June 2007.

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. 624p.

BARRETO, A. S.; VEIGA JÚNIOR, V. F. **Inteligência vegetal na arte da sedução**: interações biológicas, evolução, utilização, extração, identificação, química e farmacologia de óleos essenciais de plantas. Rio de Janeiro: Interciência, 2005. 115 p.

BARRETO, M.; SCALOPPI, E. G. Sistemas de previsão de hortaliças. In: ZAMBOLIN, L. **Manejo integrado-doenças, pragas e plantas daninhas**. Viçosa, MG: Suprema, 2000. p. 169-186.

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

BISIO, A. et al. Glandular hairs and secreted material in *Salvia blephrophylla* brandegeei ex epling grown in Italy. **Annals of Botany**, London, v. 83, n. 4, p. 441-452, Apr. 1999.

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

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2001. 144 p.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, London, v. 30, n. 6, p. 609-615, Sept. 1997.

BOTELHO, M. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 40, n. 3, p. 349-356, Mar. 2007.

BOTTERWECK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHM, R. A. 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. 599-605, July 2000.

BOZIN, B. et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 5, p. 1822-1828, Mar. 2006.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

CARVALHO JÚNIOR, P. M. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenaceae* D. C. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 95, n. 2-3, p. 297-301, Dec. 2004.

CAVALCANTI, E. S. B. et al. Larvicidal activity of essential oils from brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 5, p. 541-544, dez. 2004.

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

CONSELHO DE POLÍTICA AMBIENTAL. **Lista das espécies ameaçadas de extinção da flora do estado de Minas Gerais**. Deliberação 085/97: 45. 1997.

COSTA, S. M. O. et al. Constituintes químicos de *Lippia sidoides* (Cham) Verbenaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 12, n. 1, p. 66-67, 2002. Suplemento.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Microbiology**, New York, v. 91, n. 3, p. 492- 497, Sept. 2001.

DEMIRCI, B. et al. Characterization of volatile constituents of *Haplopappus greenei* and studies on the antifungal activity against phytopathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 5, p. 3146-3150, Mar. 2006.

DESCHAMPS, C. et al. Densidade de tricomas glandulares e produção de óleo essencial em *Mentha arvensis* L., *Mentha x piperita* L. e *Mentha* cf. *aquatic* L. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p. 23-34, dez. 2006.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed. Hoboken: J. Wiley, 2002. 507 p.

DIANZ, F. et al. Fungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolata from strawberry crops in Huelva (southwestern Spain). **Phytoparasitica**, Bet Dagan, v. 30, n. 5, p. 529-534, Oct. 2002.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p.446-452, abr./jun. 2006.

EBRAHIMABADI, A. H. et al. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. **Food Chemistry**, London, v. 119, n. 2, p. 452-458, Marc 2010.

EDER, K. The effects of a dietary oxidized oil on lipid metabolism in rats. **Lipids**, Champaign, v. 34, n. 7, p. 717-723, July 1999.

EMINAGAOGLU, O. et al. The in vitro antioxidant properties of the essential oils and methanol extracts of *Satureja spicigera* (K. Koch) Boiss and *Satureja cuneifolia* ten. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 1, p. 339-343, Jan. 2007.

FARIA, T. J. et al. Antifungal activity of essential oil isolated from *Ocimum gratissimum* L. (eugenol chemiotype) against phytopathogenics fungi. **Brasilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.49, n. 6, p. 867-871, Nov. 2006.

FERNANDES, E. S. et al. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 569, n. 3, p. 228-236, Aug. 2007.

GUIMARÃES, L. G. L. **Estudo da estabilidade e do efeito fungitóxico do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf)**. 2007. 72 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2007.

HRISTEA, E. N. et al. Reaction of 2,2-difhenyl-1-picrylhydrazyl with HO \cdot , O $_2^{\cdot-}$, HO $_2^{\cdot}$, and HOO $^{\cdot}$ radicals and anions. **International of Mlecular Sciences**, Amsterdam, v. 7, n. 5, p. 130-143, May/June 2006.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, Mar. 2005.

HUSSAIN, A. I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, London, v. 108, n. 3, p. 986-995, June 2008.

INTERNATIONAL TRADE STATISTICS. **Contrade**. Geneva, 2009.
Disponível em:<<http://www.intracen.org/tradstat>>. Acesso em: 10 jan. 2010.

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.

JONES, J. B. et al. Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, n. 3, p. 1211-1219, May 2000.

KALEMBA, D.; KUSEWICZ, D.; SWIADER, K. Antimicrobial properties of the essential oil of *Artemisia asiatica* Nakai. **Phytotherapy Research**, London, v. 16, n. 3, p. 288-291, May 2002.

KEIL, S. S. **Crescimento, nutrição e composição do óleo essencial de sassafrás submetido à fertilização e à omissão de nutrientes**. 2007. 100p p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, 663 p.

KINSELLA, J. E. et al. Possible mechanism for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. **Food Technology**, Chicago, v. 47, n. 4, p. 85-89, Apr. 1993.

KOLB, D.; MULLER, M. Light, conventional and environmental scanning electron microscopy of the trichomes of *Cucurbita pepo* subsp. *Pepo* var. *stryriaca* and histochemistry of glandular secretory products. **Annals of botany**, London, v. 93, n. 5, p. 515-526, May 2004.

KORDALI, S. et al. Determination of the chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Artemisia dracunculus* e of the antifungal and antibacterial activities of Turkish *Artemisia absinthium*, *A. dracunculus*, *A. santonicum* and *Artemisia spicigera* essential oils. **Journal of agricultural Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 25, p. 9452-9458, Dec. 2005.

KORDALI, S.; KOTAN, R.; ÇAKIR, A. Screening of antifungal activities of 21 oxygenated monoterpenes in-vitro as plant disease control agents. **Allelopathy Journal**, Haryana, v. 19, n. 2, p. 373-391, Feb. 2007.

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, jul./set. 2001.

LIMA, R. K. **Óleos essenciais de *Myristica fragrans* Houtt. e de *Salvia microphylla* H. B. K.:** caracterização química, atividade biológica e antioxidante. 2008. 144 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

LOPES, J. L. C. et al. Trypanomicidal activity of *Alomia fastigiata*. **Fitoterapia**, Milano, v. 68, n. 2, p. 182, Feb. 1997.

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.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 5. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008. 384 p.

LUCAS, G. C. **Óleos essenciais no controle da mancha bacteriana do tomateiro.** 2009. 95 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

MALAVOLTA JUNIOR, V. A. et al. Caracterização de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* em tomateiro no Brasil e reação de cultivares/genótipos de tomateiro a esse patovar e ao patovar *tomato*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 63-66, jun. 2002.

MARQUES, A. S. S. et al. **Índice de fitobacterioses assinaladas no Brasil**. Brasília: Embrapa, 1994. 65 p.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 2003. 220 p.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. Fortaleza: UFC, 2000. 344 p.

MIGUEL, G. et al. Composition and antioxidant activities of the essential oils of *Thymus caespitius*, *Thymus camphoratus* and *Thymus mastichina*. **Food Chemistry**, London, v. 86, n. 2, p. 183-188, June 2004.

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

MORAIS, S. M. et al. Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 5, p. 907-910, set./out. 2006.

NGUEFACK, J. et al. Evaluation of essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 329-334, Aug. 2004.

NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, Amsterdam, v. 230, n. 2, p. 191-195, Jan. 2004.

OLIVEIRA, F. P. et al. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 16, n. 4, p. 510-516, set./out. 2006.

OSAWA, C. C.; FELÍCIO, P. E.; GONÇALVES, L. A. G. Teste de TBA aplicado a carnes e derivados: Métodos tradicionais, modificados e alternativos. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 4, p. 655-663, jul./ago. 2005.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 414-420, May 2007.

OXENHAM, S. K.; SVOBODA, K. P.; WALTERS, D. R. Antifungal activity of the essential oil of basil (*Ocimum basilicum*). **Journal Phytopathology**, Berlin, v. 153, n. 3, p. 174-180, Mar. 2005.

PASCUAL, M. E. et al. Lippia: tradicional uses, chemistry and pharmacology, a review. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 76, n. 3, p. 201-214, Aug. 2001.

PASSOS, G. F. Anti-inflammatory and anti-allergic properties of the essential oil and active compounds from *Cordia verbenácea*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 110, n. 2, p. 323-333, Mar. 2007.

PEREIRA, A. A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, set. 2008.

PEYRAT-MAILLARD, M. N.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Antioxidant activity of phenolic compounds in 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH)-induced oxidation: Synergistic and antagonistic effects. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Chicago, v. 80, n. 5, p. 443-450, May 2003.

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

REBELO, M. M. et al. Antioxidant capacity and biological activity of essential oil and methanol extract of *Conoclema scoparioides* (Cham. & Schltdl.) Benth. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 1031-1035, 2009.

REIS, A. A. et al. Preliminary studies on the volatile constitution of *Mikania* species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 18, n. 1, p. 683-685, 2008. Suplemento.

RICCI, D. et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil of *Teucrium marum* (Lamiaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 98, n. 1/2, p. 195-200, Apr. 2005.

ROGINSKI, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, London, v. 92, n. 2, p. 235-254, Sept. 2005.

ROLDÃO, E. F. et al. Evaluation of the antiulcerogenic and analgesic activities of *Cordia Verbenacea* DC. (Boraginaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 119, n. 1, p. 94-98, Sept. 2008.

ROZETTI, G. L.; FERREIRA, P. C. Identification of a coumarin from *Alomia fastigiata*. **Revista da Faculdade de Farmácia e Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo**, São Paulo, v. 5, n. 1, p. 253, jan. 1967.

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

SAHIN, F. et al. Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 7, p. 549-557, Oct. 2004.

SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: ecologia e flora**. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. 1279 p.

SARIKURKCU, C. et al. Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 10, p. 2479-2483, Oct. 2009.

SCIO, E. et al. Diterpenes from *Alomia myriadenia* (Asteraceae) with cytotoxic and trypanocidal activity. **Phytochemistry**, New York, v. 64, n. 6, p. 1125-1131, Nov. 2003.

SERTIÉ, J. A. et al. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea* V: oral and topical anti-inflammatory activity, analgesic effects and fetus toxicity of a crude leaf extract. **Phytomedicine**, New York, v. 12, n. 5, p. 338-344, May 2005.

SHANKER, S. et al. Essential oil gland number and ultrastructure during *Mentha arvensis* leaf ontogeny. **Biologia Plantarum**, Praha, v. 42, n. 3, p. 379-387, May/June 1999.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 94-103, jan./fev. 1999.

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

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

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias da Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2008. 703 p.

SOUZA-FAGUNDES, E. M. et al. In vitro activity of labdane diterpene from *Alomi myriadenia* (Asteraceae): immunosuppression via induction of apoptosis in monocytes. **International immunopharmacology**, Amsterdam, v. 3, n. 3, p. 383-392, Mar. 2003.

SOUZA-FAGUNDES, E. M. et al. Screening and fractionation of plant extracts with antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 8, p. 1207-1212, Dec. 2002.

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.

SVOBODA, K.; HAMPSON, J.; HUNTER, T. Secretory tissues: storage and chemical variation of essential oils in secretory tissues of higher plants and their bioactivity. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 9, n. 3, p. 124-131, Mar. 1999.

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

TEPE, B. et al. Screening of the antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of *Pimpinella anestum* and *Pimpinella flabellifolia* from Turkey. **Food Chemistry**, London, v. 97, n. 4, p. 719-724, Aug. 2006.

TERBLANCHÉ, F. C.; KORNELIUS, G. Essencial oil constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae): a literature review. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 8, n. 3, p. 471-485, May 1996.

TICLI, F. K. et al. Roamarinic acid, a new snake venom phospholipase A₂ inhibitor from *Cordia verbenacea* (Boraginaceae): antiserum action potentiation and molecular interaction. **Toxicon**, Elmsford, v. 46, n. 3, p. 318-327, Sept. 2005.

TRIPATHI, P.; DUBEY, N. K. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. **Postharvest Biology and Technology**, Amsterdam, v. 32, n. 3, p. 235-245, June 2004.

UNNIKRISHNAN, V.; NATH, B. S. Hazardous chemical in foods. **Indian Journal Dairy Bioscience**, New Delhi, v. 11, n. 1, p. 155-158, Jan. 2002.

VARDAR-ÜNLÜS, G. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil and methanol extracts of *Thymus pectinatus* Fesch. Et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 1, p. 63-67, Jan. 2003.

VELLUTI, A. et al. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 649-656, Dec. 2004.

ZANI, C. L. et al. Acytotoxic diterpene from *Alomia myriadenia*. **Phytochemistry**, New York, v. 53, n. 8, p. 877-880, Apr. 2000.

ZHANG, H. et al. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. **Food Research International**, Barking, v. 39, n. 8, p. 833-839, Oct. 2006.

CAPÍTULO 2

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *LIPPIA SIDOIDES* CHAM., *ALOMIA FASTIGIATA* (GARDNER) BENTH, *OCOTEA ODORIFERA* (VELL.) ROHWER, *MIKANIA GLAUCA* MART. E *CORDIA VERBENACEA* D.C:
CARACTERIZAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO QUÍMICA.**

RESUMO

Diante da importância econômica e biológica dos óleos essenciais, objetivou-se identificar e quantificar os constituintes químicos dos óleos essenciais das seguintes plantas silvestres coletadas no município de Itumirim-MG: *Lippia sidoides* Cham., *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Mikania glauca* Mart. e *Cordia verbenacea*. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação, utilizando-se um aparelho de Clevenger modificado. As análises qualitativas foram realizadas por meio de cromatografia em fase gasosa, acoplada ao espectrômetro de massas; o constituinte majoritário do óleo essencial de *Cordia verbenacea* foi isolado por cromatografia em coluna, utilizando sílica gel como fase estacionária, e identificado por espectrometria de massas e experimentos de espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C uni e bidimensional. A quantificação dos compostos presentes nos óleos essenciais foi realizada por cromatografia em fase gasosa com detector de ionização em chamas, por meio de normalização de áreas (%) e por padronização interna (mg/100 mg de OE). Os constituintes majoritários encontrados nos óleos essenciais foram o isobisabolol, substância identificada como um isômero do α -bisabolol e cuja estrutura está sendo proposta pela primeira vez neste trabalho, ($65,26 \pm 0,41\%$) (*Cordia verbenacea*); 1,8-cineol ($22,63 \pm 0,40\%$) e carvacrol ($26,44 \pm 0,65\%$) (*Lippia sidoides*); metileugenol ($74,03 \pm 0,99\%$) (*Ocotea odorifera*); α -pineno ($52,79 \pm 5,51\%$) e gernacreno D ($12,26 \pm 2,41\%$) (*Alomia fastigiata*) e α -pineno ($27,12 \pm 0,33\%$), mirceno ($23,80 \pm 0,23\%$) e β -pineno ($21,88 \pm 0,33\%$) (*Mikania glauca*). A quantificação por padronização interna apresentou como constituintes majoritários os mesmos compostos encontrados por normalização de áreas para todos os óleos essenciais. A constituição química dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* e de *Cordia verbenacea* mostraram-se diferentes daquelas encontradas para os óleos essenciais das mesmas espécies, cultivadas em outras regiões; no entanto, não se pode afirmar que se trata de quimiotipos diferentes dessas espécies, uma vez que se encontram em regiões distintas. O constituinte majoritário do óleo essencial de *Cordia verbenacea*, isobisabolol, é um sesquiterpeno oxigenado, isômero constitucional do α -bisabolol e que até então não tinha sua existência relatada pela literatura. Os óleos essenciais de *Mikania glauca* e de *Alomia fastigiata* foram identificados pela primeira vez; porém, apresentaram em suas constituições terpenos comumente encontrados em diversos óleos essenciais.

Palavras-chave: Óleos essenciais. Caracterização química. Quantificação química. Isobisabolol.

ABSTRACT

Because of the economic and biological importance of the essential oils, the identification and quantification of the chemical constituents of the essential oils from four wild plants collected in the city of Itumirim, MG, was performed: *Lippia sidoides* Cham., *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Mikania glauca* Mart. and *Cordia verbenacea*. The essential oils were extracted by steam distillation using a modified Clevenger apparatus. The qualitative analysis was performed by gas chromatography coupled with mass spectrometry. The major constituent of the essential oil from *Cordia verbenacea* was isolated by column chromatography on silica gel and was identified by mass spectrometry and by two-dimensional ^1H and ^{13}C nuclear magnetic resonance spectroscopy. The quantification of the compounds present in the essential oils was performed by gas chromatography, using a flame ionization detector, through standardization of the areas (%) and by the use of an internal standard (mg/100 mg of essential oil). The major constituents found in the essential oils were isobisabolol ($65.26 \pm 0.41\%$) from *Cordia verbenacea*, 1,8-cineole ($22.63 \pm 0.40\%$) and carvacrol (26.44 ± 0.65) from *Lippia sidoides*; methyleugenol ($74.03 \pm 0.99\%$) from *Ocotea odorifera*; α -pinene ($52.79 \pm 5.51\%$) and gernacreno D ($12.26 \pm 2.41\%$) from *Alomia fastigiata*; and α -pinene ($27.12 \pm 0.33\%$), myrcene ($23.80 \pm 0.23\%$) and β -pinene ($21.88 \pm 0.33\%$) from *Mikania glauca*. The same compounds were found to be major constituents in all the essential oils. The chemical compositions of the essential oils from *Lippia sidoides* and *Cordia verbenacea* were shown to be different from those of the essential oils from the same species grown in other regions. However, the plants cannot be said to represent different chemotypes of these species since they were obtained from distinctly different regions. The principal constituent of the essential oil from *Cordia verbenacea*, isobisabolol, is an oxygen-containing sesquiterpene that is an isomer of α -bisabolol and has never before been reported in the literature. The compositions of the essential oils from *Mikania glauca* and *Alomia fastigiata* were determined for the first time, but were found to contain terpenes commonly encountered in various other essential oils.

Keywords: Essential oils. Chemical identification. Chemical quantification. Isobisabolol.

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis e lipofílicas, formadas pelo metabolismo secundário das plantas, caracterizados pelo odor agradável apresentado por grande parte deles. São definidos pela ISO (International Standard Organization) como sendo os produtos obtidos de diferentes partes de plantas por meio diferentes técnicas, como destilação por arraste com vapor d'água, hidrodestilação, extração por CO₂ supercrítico, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos.

Possuem reconhecidas atividades microbiológicas, medicinais, além da fragrância de odor agradável apresentado por alguns deles. Dessa forma, são utilizados na preservação de alimentos, podendo atuar como agentes antioxidantes e antimicrobianos, podem ser utilizados com fins medicinais, como analgésico, sedativo, anti-inflamatório, espasmolítico e anestésico local (BAKKALI et al., 2008). Nos vegetais, desenvolvem funções relacionadas com sua volatilidade, agindo na atração de polinizadores, na proteção contra predadores e patógenos, perda de água, aumento de temperatura e também desempenhando funções ecológicas, especialmente como inibidores de germinação. Essas características tornam as plantas que os produzem poderosas fontes de agentes biocidas (SIMÕES et al., 2004).

Sua constituição química é muito variada, incluindo hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre. No entanto, a maioria é constituída de derivados de fenilpropanoides ou de terpenoides, sendo os fenilpropanoides derivados do ácido chiquímico e os terpenoides resultantes da condensação de um número variável de unidades de 5 carbonos, denominadas unidades isoprênicas, em que os monoterpenos e os sesquiterpenos, que são resultantes da condensação de 2 e

3 unidades isoprênicas, respectivamente, são os compostos preponderantes (SIMÕES et al., 2004; TAIZ; ZEIGER, 2004). O isopreno é produzido naturalmente, mas não está envolvido na formação desses compostos, sendo os ésteres difosfato (pirofosfato) dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopendenil difosfato (IPP) as formas ativas do isopreno. Essas duas moléculas irão se rearranjar em reações enzimáticas de ionização, condensação e eliminação, resultando na formação dos diversos terpenoides presentes nos óleos essenciais. Bioquimicamente essas unidades forforiladas do isopreno são formadas pela via do ácido mevalônico ou pela via da 1-desoxi-D-xilulose 5-fosfato (desoxixilulose fosfato-DXP) (DEWICK, 2002; BARRETO; VEIGA JÚNIOR, 2005).

Segundo Svoboda e Greenaway (2003), os óleos essenciais são produzidos e se acumulam em todos os tipos de órgãos vegetais: flores, folhas e apesar de menos comum, no córtex, lenho, raízes, rizomas, frutos e sementes. Todos os órgãos de determinadas espécies podem conter óleo essencial, mas a sua composição pode variar com a sua localização, estando sua síntese e acúmulo geralmente associados com a presença de estruturas histológicas especializadas. Entre essas estruturas, encontram-se pelos e tricomas glandulares, cavidades secretoras, ductos secretores, células secretoras.

Muitas empresas comercializam óleos essenciais como matéria-prima para diversos produtos, com aplicações na perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos, entre outras. Existem por volta de 300 óleos essenciais de importância comercial no mundo, entre os quais destacam-se os óleos essenciais de laranja, menta-japonesa, eucalipto (tipo 1,8-cineol), citronela, hortelã-pimenta, eucalipto (tipo citronela), entre outros (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009). De acordo com Bandoni e Czepak, (2008), entre os óleos essenciais existentes no mercado, 65% provêm de espécies de pequeno porte cultivadas e 30% de árvores. Entre as espécies silvestres, o pau-rosa é a

principal espécie explorada no Brasil, que já foi um dos principais produtores de óleo essencial de canela-sassafráz, o que levou à quase extinção dessa espécie no sul do país.

Um óleo essencial pode apresentar em sua composição mais de cem compostos; no entanto, geralmente apresenta um ou mais constituintes em maiores teores, acima de 20% em comparação aos demais, sendo denominados de componentes majoritários. Nesse contexto, citam-se o citral (69,31%) e o mirceno (23,77%), constituintes majoritários do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (GUIMARÃES et al., 2008), o eugenol (86,3%), no óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (PEREIRA et al., 2008), o safrol (82,5%), no óleo essencial de *Piper hispidinervum* (NASCIMENTO et al., 2008), o citronelal, que esteve presente em teores que variam de 67,64 a 87,99% no óleo essencial de *Eucalyptus citriodora*, de acordo com a época do ano (CASTRO et al., 2008). A composição química dos óleos essenciais pode variar de acordo com o clima, composição do solo, órgão da planta, idade e estágio vegetativo (ANGIONI et al., 2006; GOBBO-NETO; LOPES, 2007). Assim, com o presente trabalho, objetivou-se identificar e quantificar os constituintes químicos dos óleos essenciais das seguintes plantas silvestres, coletadas no município de Itumirim, Minas Gerais/Brasil: *Lippia sidoides* Cham., *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Mikania glauca* Mart. e *Cordia verbenacea*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

As folhas de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae), *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth (Asteraceae), *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae), *Mikania glauca* Mart. (Asteraceae) e *Cordia verbenacea* (verbenaceae) foram coletadas no mês de outubro de 2007, no período da manhã, no município de Itumirim, Minas Gerais/Brasil. O material coletado foi encaminhado para o Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA) – Lavras/MG, para a extração dos óleos essenciais.

As espécies foram devidamente identificadas pela Prof^a. Dr^a. Mariana Esteves Mansanares, do Departamento de Biologia da UFLA, e uma exsicata de cada espécie encontra-se registrada no Herbário ESAL, localizado no Departamento de Biologia da UFLA, com os seguintes números de registros: 01943 (*Lippia sidoides*), 01963 (*Alomia fastigiata*), 24931 (*Ocotea odorifera*), 233 (*Mikania glauca*) e 13035 (*Cordia verbenacea*).

2.2 Extração do óleo essencial

Para extração dos óleos essenciais, empregou-se a metodologia de hidrodestilação, utilizando-se um aparelho de Clevenger modificado. As folhas frescas de cada espécie vegetal estudada foram picadas e colocadas em um balão de 1 litro de capacidade, recobertas com água, sendo o processo de extração realizado em um período de 2 horas, mantendo a solução em ebulição (GUIMARÃES et al., 2008). As extrações dos óleos essenciais de todas as plantas foram realizadas de duas maneiras: uma, apenas para calcular o

rendimento, e outra, para obtenção de maiores quantidades de óleo essencial, para serem utilizados nas análises cromatográficas, biológicas e antioxidantes.

Para a obtenção dos óleos essenciais utilizados apenas para calcular o rendimento, foram utilizados 50 g de material vegetal, utilizando balão de 1 litro de capacidade. Coletou-se o hidrolato de cada planta, particionou-se com diclorometano em funil de separação, e em seguida, adicionou-se sulfato de sódio anidro à fase orgânica (óleo essencial e diclorometano). Posteriormente, ela foi filtrada, e para a evaporação do solvente, inicialmente foi levada a um rotaevaporador a vácuo (Bücher Rotavapor R 114) e, em seguida, à pistola de secagem. Os óleos essenciais, livres de solvente, foram acondicionados em frascos de vidro âmbar e armazenados em baixas temperaturas. Paralelamente às extrações, realizou-se o teste de umidade, de acordo com o método oficial da AOCS, adaptado por Pimentel et al. (2006). Os rendimentos dos óleos essenciais foram calculados e expressos em peso de óleo por peso de folhas com base livre de umidade (% p/p BLU). Todas as extrações foram realizadas em triplicada.

Para extração dos óleos essenciais utilizados nas análises cromatográficas, biológicas e antioxidantes, utilizaram-se balões de fundo redondo de 4 litros de capacidade. O hidrolato coletado foi centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal a 965,36 x g por cinco minutos; posteriormente, o óleo essencial foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e acondicionado em frasco de vidro âmbar em baixa temperatura e ao abrigo da luz.

2.3 Análises cromatográficas dos óleos essenciais

As análises qualitativas dos óleos essenciais foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe (UFS) – Aracaju – SE, por Cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massa

CG-EM. O cromatógrafo utilizado foi o modelo Shimadzu G-17A equipado com detector seletivo de massa modelo QP5050A. O equipamento foi operado nas seguintes condições: coluna capilar de 30 m x 0,25 mm x 0,25 DI com fase ligada DB-5MS (Folsom, CA, USA); temperatura da fonte de íons de 280 °C; programação da coluna com temperatura inicial de 50 °C por 2 min, com um aumento de 4°C/min., até 200 °C , depois 10 °C/min até 300 °C , finalizando com uma temperatura de 300 °C por 10 min; gás carreador hélio (1mL min⁻¹); pressão inicial na coluna de 100,2 KPa; taxa de split 1:83 e volume injetado de 0,5 µL (1% de solução em diclorometano). Para o espectrômetro de massas (EM), foram utilizadas as seguintes condições: energia de impacto de 70 eV; velocidade de decomposição 1000; intervalo de decomposição de 0,50; e fragmentos de 40 Da e 550 Da decompostos. Foi injetada, nas mesmas condições da amostra, uma série de padrões de hidrocarbonetos lineares (C₉H₂₀ C₂₆H₅₄). Os espectros obtidos foram comparados com o banco de dados da biblioteca Wiley 229 e o índice Kovats, calculado para cada constituinte, foi comparado com o tabelado, de acordo com Adams (2007).

As análises quantitativas foram conduzidas no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA), sendo realizadas por normalização interna (expressas em porcentagens relativas das áreas dos picos correspondentes a cada constituinte, assumindo o mesmo fator de resposta do detector para todos os constituintes) e por padronização interna (expressas em mg do composto avaliado para cada 100 mg do óleo essencial), sendo essa metodologia utilizada apenas na quantificação dos constituintes presentes em uma concentração maior que 1,00 mg do composto para 100 mg do óleo essencial. Essas análises foram feitas utilizando um cromatógrafo gasoso equipado com um detector de ionização de chamas (DIC), utilizando-se um aparelho Shimadzu CG – 17A, nas seguintes condições experimentais: coluna capilar: coluna capilar de sílica fundida (30 m x 0,25 mm)

com fase ligada DB5 (0,25 μm de espessura de filme); temperatura do injetor: 250 °C; temperatura do DIC: 280 °C; programação da coluna: temperatura inicial de 60 °C por dois minutos, seguida por uma taxa de aquecimento de 4 °C/min até 200 °C, em seguida, passando para uma taxa de aquecimento de 10 °C/min até 300 °C, permanecendo nessa temperatura por 10 min.; gás de arraste nitrogênio (2,2 mL min⁻¹); taxa de split 1:20; pressão na coluna de 115 KPa e volume injetado de 1 μL , diluído em hexano (para as quantificações obtidas por normalização de áreas, os óleos foram diluídos na razão de 1:100 (v/v)).

A quantificação por meio de padronização interna foi realizada de acordo com Harris (2007). Foram utilizados como padrões internos os compostos citronelal, borneol, eugenol, α -pineno, α -terpineno e trans,trans-farnesol (sendo utilizados em cada óleo essencial apenas aqueles que não se encontravam presentes na composição). Os compostos presentes nos óleos essenciais utilizados para a construção das curvas analíticas foram 1,8-cineol, metileugenol, α -pineno, β -pineno, *E*-cariofileno, cânfora, carvacrol, α -bisabolol (representado o constituinte majoritário do óleo essencial de *C. verbenacea*) e α -terpineol. Para construção das curvas, variaram apenas as concentrações dos compostos presentes na composição dos óleos essenciais, mantendo a mesma concentração dos padrões internos em todas as soluções.

Inicialmente, foram preparadas soluções com as concentrações dos compostos presentes nos óleos essenciais de 40,0, 20,0, 10,0, 5,0, 2,5, 0,1 e 0,05 mg mL⁻¹ e de 2,00 mg mL⁻¹ para os padrões internos. As curvas analíticas foram construídas entre os seguintes compostos: carvacrol e eugenol; metileugenol e eugenol; α -bisabolol e trans, trans-farnesol; trans-cariofileno e trans, trans-farnesol; α -pineno e α -terpineno; 1,8-cineol e borneol; α -terpineol e borneol; borneol e 1,8-cineol e citronelal e cânfora, de acordo com a seguinte relação:

$$\frac{A_d}{A_p} \times \frac{C_d}{C_p}$$

Em que: A_d = área do composto presente na amostra

A_p = área do padrão interno

C_d = concentração da substância da amostra

C_p = concentração do padrão interno

Em seguida, para a determinação da concentração dos compostos nos óleos essenciais, adicionaram-se quantidades conhecidas dos padrões internos correspondentes, nas soluções contendo 100 mg de óleo essencial. As análises foram feitas em triplicata, sendo o volume injetado de 1 μ L.

2.4 Purificação do constituinte majoritário do óleo essencial de *Cordia verbenacea* (isobisabolol)

O fracionamento foi realizado empregando-se uma coluna de 1 cm de diâmetro e 25 cm de comprimento. Utilizaram sílica gel (230 mesh) como fase estacionária e diclorometano como fase móvel. Foram empregados 70 mg do óleo essencial, sendo coletadas 30 frações de 5 mL com um fluxo aproximado de 1 gota por segundo. As frações foram submetidas à pistola de secagem para a evaporação da fase móvel e, em seguida, foram monitoradas por cromatografia em fase gasosa, utilizando um cromatógrafo gasoso equipado com detector DIC, operado nas condições descritas acima. De acordo com o seu perfil cromatográfico, as frações de número 19 a 29 foram reunidas, obtendo 23,0 mg do composto majoritário com 96,0% de pureza.

2.5 Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C da amostra purificada e do α -bisabolol

Os espectros de ressonância magnética nuclear foram obtidos em aparelho Bruker Avance DRX 400 MHz, do Departamento de Química da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Utilizou-se clorofórmio deuterado como solvente e tetrametilsilano como padrão interno de referência ($\delta = 0$). As constantes de acoplamento escalar (J) foram expressas em Hertz (Hz). Para auxiliar na interpretação dos dados foi utilizada a técnica DEPT 135; em que $\text{CH}_3 =$ sinal positivo, $\text{CH} =$ sinal positivo, $\text{CH}_2 =$ sinal negativo, C não ligado a hidrogênio = sinal de intensidade zero, e espectroscopia de correlações bidimensionais, como COSY, HSQC e HMBC. O α -bisabolol (padrão) foi utilizado como composto de referência, sendo submetido às mesmas análises espectroscópicas que a amostra purificada.

2.6 Espectrometria de massas da amostra purificada

O espectro de massa foi obtido em um equipamento CG-EM Shimadzu modelo QP5050A, do Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe (UFS) – Aracaju – SE. O equipamento foi operado nas mesmas condições utilizadas nas análises de caracterização química dos óleos essenciais.

3 RESULTADO E DISCUSSÃO

3.1 Rendimento dos óleos essenciais

Os valores médios dos teores de óleos essenciais apresentados pelas plantas estudadas estão apresentados na Tabela 1, na qual se observa que a espécie que apresentou o maior teor de óleo essencial foi a *O. odorifera*, seguida pelas espécies *L. sidoides*, *C. verbenacea*, *M. glauca* e *A. fastigiata*. Esses valores encontram-se de acordo com os valores de rendimentos apresentados para espécies cultivadas comercialmente, como aqueles encontrados por Martins et al. (2002) e por Silva et al. (2005) para plantas de capim-limão, que apresentaram 1,30%, 1,06% em relação à matéria seca, respectivamente, e por Deschamps et al. (2008), que encontraram valores médios de rendimento de 0,348% no verão e de 0,177 % no inverno, para a produção de óleos essenciais de espécies de menta.

Tabela 1 Valores médios dos rendimentos dos óleos essenciais das cinco plantas estudadas, expressos em p/p BLU (base livre de umidade).

Plantas	Rendimentos (%)
<i>Lippia sidoides</i>	0,873 ± 0,23
<i>Alomia fastigiata</i>	0,379 ± 0,14
<i>Ocotea odorifera</i>	3,744 ± 0,96
<i>Cordia verbenacea</i>	0,786 ± 0,19
<i>Mikania glauca</i>	0,688 ± 0,16

Randünz et al. (2002), estudando plantas de *L. sidoides* cultivadas sobre tratos culturais adequados, mostraram que elas apresentaram rendimento de 2,918%, valor superior ao apresentado pelas plantas estudadas, sugerindo que se as plantas estudadas fossem cultivadas sobre tratos culturais, poderiam apresentar maiores rendimentos de óleo essencial.

A espécie *M. glauca* apresentou rendimento de óleo essencial superior ao encontrado para plantas pertencentes ao mesmo gênero, como o rendimento de 0,16%, apresentado por plantas de guaco (*M. glomerata*) em trabalhos de (RADÜNZ et al., 2003). O rendimento de óleo essencial apresentado pela *C. verbenacea* foi superior a 0,23 %, rendimento determinado por Carvalho et al. (2004) para plantas da mesma espécie coletadas no estado de São Paulo. Esses valores demonstram o potencial dessas espécies como produtoras de óleos essenciais.

3.2 Constituintes químicos dos óleos essenciais

Os constituintes químicos dos óleos essenciais de *L. sidoides* Cham., *A. fastigiata* (Gardner) Benth, *O. odorifera* (Vell.) Rohwer, *M. glauca* Mart. e *C. verbenacea*, seguidos pelos seus tempos de retenção, índices de Kovats calculados e tabelados e os seus teores expressos em porcentagem (calculados por normalização de áreas) encontram-se na Tabela 2, e as estruturas químicas dos compostos majoritários estão apresentadas na Figura 1.

O óleo essencial de *L. sidoides* apresentou como constituintes majoritários o 1,8-cineol (22,63%) e o carvacrol (26,44%) (Figura 1), sendo constituído em maior parte por compostos fenilpropanólicos, seguidos de monoterpenos oxigenados e hidrocarbonetos monoterpênicos. Esses resultados divergem daqueles encontrados na literatura com plantas dessa mesma espécie oriundas do nordeste brasileiro, região onde a planta é muito encontrada,

principalmente nos estados do Rio Grande do Norte e Ceará (Matos, 2000). Cavalcanti et al. (2004) demonstraram o timol (80,8%) como constituinte majoritário, seguido pelos compostos ρ -cimeno (8,6%), trans-cariofileno (5,1%), γ -terpineno (1,6%), 1,8-cineol (1,3%) e β -mirceno (0,9%), resultados similares àqueles encontrados por Botelho et al. (2007), que identificaram como constituintes majoritários desse óleo o timol (56,7%) e carvacrol (16,7%), seguidos pelo ρ -cimeno (7,13%), timol metil éter (5,06%), aromadrendeno (2,79%), 1,8-cineol (2,39%), γ -elemeno (2,28%), γ -terpineno (1,42%), entre outros, encontrados em menores porcentagens. Fontenelle et al. (2007) não detectaram a presença do carvacrol e do 1,8-cineol no óleo essencial dessa espécie coletada no município de Horizonte/Ce, a qual apresentou o timol (59,65%) e o E-cariofileno (10,60%) como constituintes majoritários. Dessa forma, fica claro que o constituinte majoritário do óleo essencial de *L. sidoides* coletada na região nordeste do País é o timol, diferenciando do óleo essencial estudado, que possui o carvacrol como constituinte majoritário.

Tabela 2 Constituintes químicos dos óleos essenciais e os respectivos teores expressos em porcentagem.

Compostos	TR	IKC	IKT	<i>Lippia sidoides</i>	<i>Alomia fastigiata</i>	<i>Ocotea odorifera</i>	<i>Cordia verbenacea</i>	<i>Mikania glauca</i>
α -tujeno	6,66	916	931	0,97 \pm 0,03	-	-	-	-
α -pineno	6,87	924	939	-	52,79 \pm 5,51	0,72 \pm 0,04	-	27,12 \pm 0,33
canfeno	7,41	942	953	-	0,32 \pm 0,04	0,86 \pm 0,05	-	Nd
sabineno	8,14	968	976	3,57 \pm 0,25	1,26 \pm 0,14	Nd	-	1,82 \pm 0,07
β -pineno	8,24	973	980	0,38 \pm 0,03	2,47 \pm 0,23	0,56 \pm 0,03	-	21,88 \pm 0,33
mirreno	8,75	987	991	1,70 \pm 1,05	0,68 \pm 0,05	Nd	-	23,80 \pm 0,23
α -felandreno	9,18	1006	1005	1,93 \pm 0,05	-	Nd	-	-
α -terpineno	9,61	1016	1018	1,17 \pm 0,04	-	-	-	-
ρ -cimeno	9,88	1025	1026	9,89 \pm 0,31	-	Nd	-	-
β -felandreno	10,04	1029	1031	-	-	-	-	1,71 \pm 2,19
limoneno	10,09	1029	1031	Nd	8,41 \pm 0,90	0,89 \pm 0,02	-	-
1,8-cineol	10,13	1033	1033	22,63 \pm 0,40	-	2,25 \pm 0,14	-	-
Z- β -ocimeno	10,39	1035	1040	-	-	-	-	1,21 \pm 0,01
E- β -ocimeno	10,78	1046	1050	-	4,65 \pm 0,45	-	-	Nd
γ -terpineno	11,14	1058	1062	7,27 \pm 0,11	-	-	-	-
cis-sabineno hidratado	11,43	1070	1068	-	-	-	-	-
terpinoleno	12,57	1084	1088	-	-	-	-	-
linalol	12,66	1099	1098	-	-	0,26 \pm 0,03	-	-
n-nonanal	16,66	1104	1102	-	-	-	0,35 \pm 0,03	-
cânfora	14,26	1148	1143	-	-	7,93 \pm 0,35	-	-
terpin-4-ol	15,51	1181	1177	1,56 \pm 0,03	Nd	Nd	-	Nd
α -terpineol	16,00	1195	1189	0,82 \pm 0,04	-	0,32 \pm 0,01	-	-
verbenona	16,67	1211	1204	Nd	-	-	-	-
Metil-éter-timol	17,62	1229	1235	1,96 \pm 0,03	-	-	-	-
neral	17,85	1239	1240	1,56 \pm 0,02	-	-	-	-
timol	19,73	1290	1290	1,17 \pm 0,10	-	-	-	-
safrol	19,56	1293	1285	-	-	12,26 \pm 0,77	-	-

“Tabela 2, continua”

Compostos	TR	IKC	IKT	<i>Lippia sidoides</i>	<i>Alomia fastigiata</i>	<i>Ocotea odorifera</i>	<i>Cordia verbenacea</i>	<i>Mikania glaucua</i>
carvacrol	20,10	1302	1298	26,44 ±0,65	-	-	-	-
δ-elemeno	21,23	1334	1339	-	-	-	Nd	-
timol acetato	22,48	1364	1355	0,47 ±0,07	-	-	-	-
α-copaeno	22.69	1375	1376	-	0,32 ±0,02	-	0,38 ±0,01	Nd
β-elemeno	23.23	1389	1391	0,43 ±0,02	0,24 ±0,04	-	0,41 ±0,05	0,41 ±0,01
metileugenol	23.68	1412	1401	-	-	74,03 ±0,99	-	-
<i>E</i> -cariofileno	24,17	1419	1418	2,57 ±0,07	5,48 ±0,67	-	11,29 ±0,25	8,55 ±0,21
α-guaieno	24,64	1434	1439	-	-	-	-	Nd
α-humuleno	25.29	1455	1454	1,78 ±0,05	3,87 ±0,67	-	2,55 ±0,04	0,90 ±0,03
dehidro-aromadendrano	25.47	1457	1459	Nd	-	-	-	-
γ-muuroleno	25.95	1474	1477	Nd	-	-	-	-
amorfa-4,7-(11)-dieno	26.19	1480	1481	0,38 ±0,01	-	-	-	-
germacreno D	26.21	1483	1480	-	12,26 ±2,41	-	8,01 ±0,13	1,104 ±0,03
β-selineno	26.98	1488	1485	-	-	-	-	-
biciclogermacreno	26.71	1496	1494	-	2,32 ±0,58	0,27 ±0,01	Nd	8,37 ±0,30
z-α-bisaboleno	26,71	1501	1504	-	-	-	3,91 ±3,83	-
<i>E</i> -β-guaieno	26.91	1503	1500	-	-	Nd	-	-
germacreno A	26.97	1506	1503	-	-	-	-	0,55 ±0,02
γ-cadineno	27.03	1514	1513	-	0,31 ±0,01	-	1,01 ±0,01	0,27 ±0,01
β-bisaboleno	27,06	1508	1509	-	-	-	2,02 ±2,36	-
7-epi-alfa-selineno	27.26	1517	1517	Nd	-	-	-	-
δ-cadineno	27.52	1517	1524	-	0,61 ±0,19	-	0,55 ±0,03	0,69 ±0,03
β-sesquifelandreno	27.61	1523	1524	-	-	-	Nd	-
<i>E</i> -γ-bisaboleno	28,15	1531	1533	-	-	-	2,82 ±0,03	-
Germacreno B	28.62	1558	1556	-	-	-	Nd	-
Óxido de cariofileno	29.42	1582	1581	1,54 ±0,05	Nd	-	0,59 ±0,01	0,48 ±0,02
junenol	30.52	1624	1649	-	3,35 ±1,38	-	-	-

“Tabela 2, conclusão”

Compostos	TR	IKC	IKT	<i>Lippia sidoides</i>	<i>Alomia fastigiata</i>	<i>Ocotea odorifera</i>	<i>Cordia verbenacea</i>	<i>Mikania glauca</i>
epi- α -cadinol	31,24	1643	1640	-	Nd	-	-	-
isobisabolol	32,53	-	-	-	-	-	65,26 \pm 0,41	-
Total				92,03	98,66	99,35	99,15	98,86

TR = Tempo de retenção (minutos), IKC = índice de Kovats calculado, IKT = índice de Kovats tabelado (Adams 2007), Nd = não quantificado (valores < 0,2)

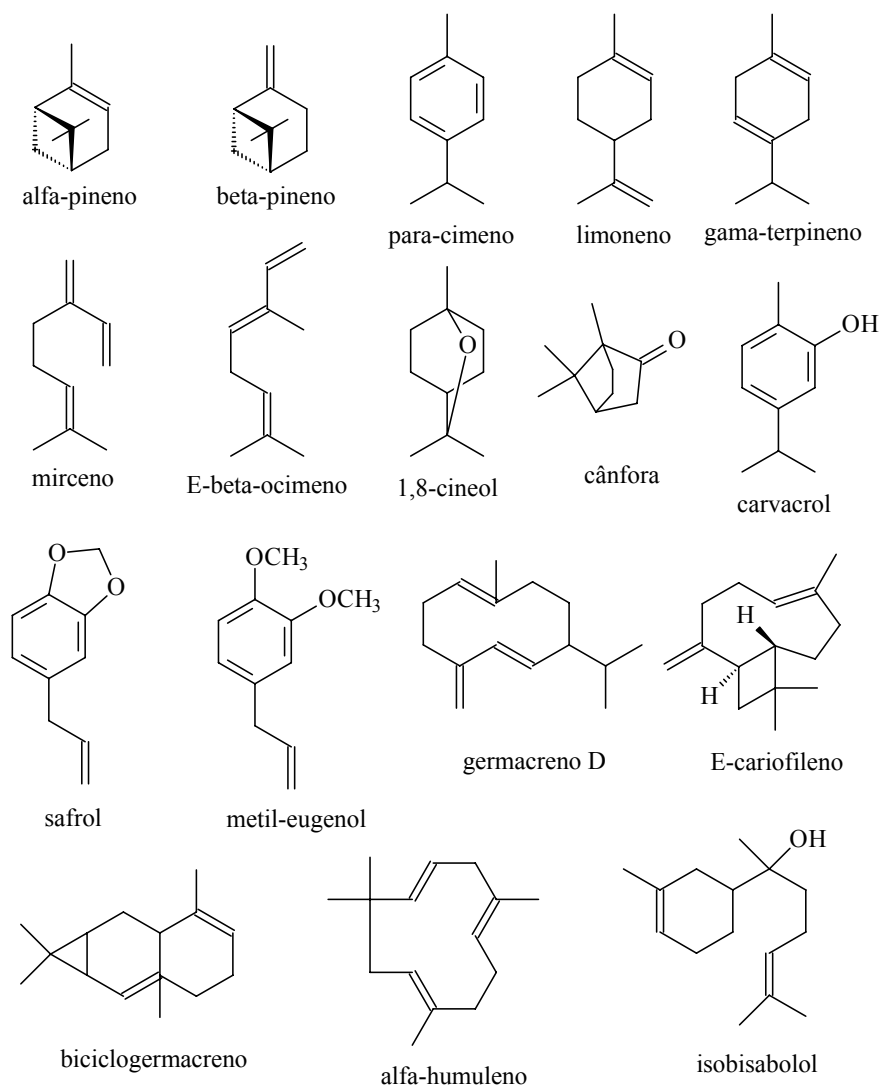


Figura 1 Estruturas químicas dos constituintes majoritários dos óleos essenciais das plantas estudadas

A espécie *O. odorifera*, mais conhecida como canela-sassafrás, apresentou como constituinte majoritário de seu óleo essencial o fenilpropanoide metileugenol (74,03%) seguido pelo fenilpropanoide safrol (12,26%) e pela cânfora (7,93%) (Figura 1), caracterizando um óleo essencial rico em fenilpropanoïdes (85,29%). Esse perfil químico encontrado para o óleo essencial de sassafrás corrobora com aquele encontrado por Rizzini (1971), que cita o metileugenol como o constituinte majoritário do óleo essencial apresentado pela espécie brasileira. Observa-se que essa espécie ocorre em quase todas as regiões do país, exceto no sul, onde o óleo essencial possui o safrol como constituinte majoritário, como demonstrado em trabalhos posteriores de Keil (2007), que, estudando a composição química do óleo essencial de *O. odorifera* descendentes de plantas cultivadas em São José dos Pinhais, em relação a diversos níveis nutricionais, encontrou o safrol como constituinte majoritário, com teores variando entre 28 e 74%, de acordo com a variação nutricional das plantas, resultados diferentes daqueles citados anteriormente por Toledo (2000). Trabalhando com plantas nativas da região metropolitana de Curitiba, esse pesquisador não identificou o safrol como constituinte majoritário do óleo essencial de suas folhas, mas sim o metileugenol.

A composição química do óleo essencial de *C. verbenacea* mostrou-se rica nos sesquiterpenos, *E*-cariofileno (11,29%), germacreno D (8,01%), α -humuleno (2,55%) entre outros, sendo o seu constituinte majoritário o sesquiterpeno oxigenado isobisabolol (65,26%), um isômero do α -bisabolol e até então de estrutura desconhecida (Figura 1). Esses dados são discordantes daqueles encontrados por Carvalho et al. (2004), em que os constituintes majoritários evidenciados desse óleo foram o α -pineno (29,69%) e o *E*-cariofileno (25,27%), seguidos pelo aloaromadendreno (9,99%), α -humuleno (4,64%) e outros compostos minoritários.

O óleo essencial de *A. fastigiata* apresentou como constituintes majoritários o monoterpene α -pineno (52,79 %), seguido pelo sesquiterpene germacreno D (12,26%) e por outros terpenos, como o limoneno (8,41%), E- β -ocimeno (4,65%), E-cariofileno (5,48%), α -humuleno (3,87%) (Figura 1) entre outros, revelando o predomínio de hidrocarbonetos terpênicos em sua constituição.

Hidrocarbonetos terpênicos também foram os compostos predominantes no óleo essencial de *M. glauca*, com 27,12% de α -pineno, 23,80% de mircenolol, 21,88% de β -pineno, 8,55% de E-cariofileno, 8,37% de biciclogermacreno (Figura 1), seguidos por outros terpenos presentes em menores teores. A predominância de hidrocarbonetos terpênicos também foi relatada para os óleos essenciais de outras espécies de *Mikania*. Bedi et al. (2003) encontraram o α -pineno (20%) e o germacreno D (19,8%) como os constituintes majoritários do óleo essencial de *M. cordata* (Burm.f.) B.L. Robison, seguidos pelos monoterpeneos β -pineno (8,7%) e α -tujeno (7,1%). Os sesquiterpeneos germacreno D e E-cariofileno foram encontrados como os constituintes majoritários do óleo essencial de *M. glomerata* Spreng, com teores de 41,45% e 14,53%, respectivamente (DUARTE et al., 2005). Reis et al. (2008), estudando a composição química dos óleos essenciais de três espécies de *Mikania*s encontradas na Chapada Diamantina/BA, identificaram 46 terpenos nos óleos essenciais dessas espécies. No óleo essencial de *M. hookeriana*, os constituintes majoritários foram α -pineno (23,34%) seguido pelo germacreno D (11,14%). No óleo essencial de *M. hagei*, o constituinte majoritário foi o β -selineno (45,78%) e, no de *M. jeffreyi*, foram encontrados os monoterpeneos limoneno (30,83%), β -pineno (25,64%) e o α -pineno (17,35%) como majoritários. Entretanto, os autores verificaram que todos os óleos essenciais dessas espécies apresentaram em suas constituições os monoterpeneos α e β -pineno, limoneno, β -tujeno e os sesquiterpeneos E-cariofileno e germacreno D.

De acordo com Gobbo-Neto e Lopes (2007), a produção de metabólitos secundários pode ser influenciada por diversos fatores ambientais, como sazonalidade, índice pluviométrico, ritmo circadiano, altitude, temperatura, ciclo vegetativo da planta, tipo de solo, entre outros. Nesse contexto, em vários trabalhos relatam-se variações quantitativas e qualitativas na composição química dos óleos essenciais de diversas plantas. Lago et al. (2006) demonstraram uma variação quantitativa na composição química do óleo de *Pittosporum undulatum* Vent. coletado em períodos distintos do ano, havendo uma variação de 67,0 a 80,8% no teor de seu constituinte majoritário (+)-limoneno, de acordo com diferenças de temperatura, umidade do ar e precipitação, observadas no decorrer do experimento.

Hudaib et al. (2002) evidenciaram a influência do ciclo vegetativo sobre a composição química do óleo essencial de *Thymus vulgaris* L., encontrando menores níveis de hidrocarbonetos monoterpênicos (γ -terpineno) e maiores níveis de compostos oxigenados (linalol, borneol e timol) e de sesquiterpenos (E-cariofileno e seus derivados oxigenados) em plantas mais velhas (5 anos) do que em plantas mais jovens (2 anos). Jordán et al. (2006) encontraram maiores teores de timol em plantas de *Thymus hyemalis* no período de maturação dos frutos e em plantas de *Thymus vulgaris* no período de floração. Hussain et al. (2008) demonstraram a influência da temperatura sobre a composição química do óleo essencial de *Ocimum basilicum*, observando teores menores de hidrocarbonetos monoterpênicos em períodos mais quentes, relatando a sua possível evaporação.

Silva et al. (2007) pesquisando plantas selvagens e cultivadas de *Baccharis trimera*, coletadas em diferentes épocas do ano, demonstram por meio de análise por correlação canônica a influência do tipo de solo na composição química de seus óleos essenciais, em que óleos essenciais que apresentavam o E-cariofileno foram encontrados em plantas selvagens presentes em solo rico em

Mn e saturado em Al. Já os óleos essenciais ricos em ledol e guaiol foram produzidos por plantas cultivadas em solo balanceado, relativamente básico, com a presença de P, K, S, Cu e Zn. A influência da sazonalidade sobre a via metabólica responsável pela formação de determinados componentes do óleo essencial de *Lavandula stoechas* L. foi demonstrada por Angioni et al. (2006), que avaliaram os teores de cânfora e de fenchona, constituintes majoritários desse óleo essencial, e que derivam do cátion α -terpenil (Figura 2). Os valores desses compostos mostraram-se opostos de acordo com a época do ano, havendo um aumento no teor de fenchona quando ocorre a diminuição no teor de cânfora e vice-versa.

Esses estudos corroboram com os resultados encontrados para o óleo essencial de *L. sidoides*, que apresentou o carvacrol e o 1,8-cineol como constituintes majoritários e não o timol, como relatado pela literatura para o óleo essencial dessa mesma espécie coletada na região nordeste do País, evidenciando a possível influência de fatores edafoclimáticos sobre a composição química do seu óleo essencial.

Os resultados encontrados para o óleo essencial de *C.verbenacea*, que não teve seu componente majoritário relatado pela literatura, não se encontram de acordo com aqueles apresentados por Curado et al. (2006). Esse, trabalhando com o óleo essencial de plantas de *Lychnophora ericoides* coletadas nos municípios de Cristalina e Vianópolis, ambos pertencentes ao Estado de Goiás, encontraram o α -bisabolol (61,53%) como constituinte majoritário no óleo essencial de plantas coletadas no município de Vianópolis e o *E*-nerolidol (41,61%) como constituinte majoritário do óleo essencial de plantas coletadas no município de Cristalina, não ocorrendo a presença do α -bisabolol nesse óleo essencial. Os autores observaram a influência do solo, onde o α -bisabolol estava presente no óleo essencial de plantas cultivadas em solos mais ácidos, com alta capacidade de troca de cátions; já o *E*-nerolidol foi característico do óleo essencial de

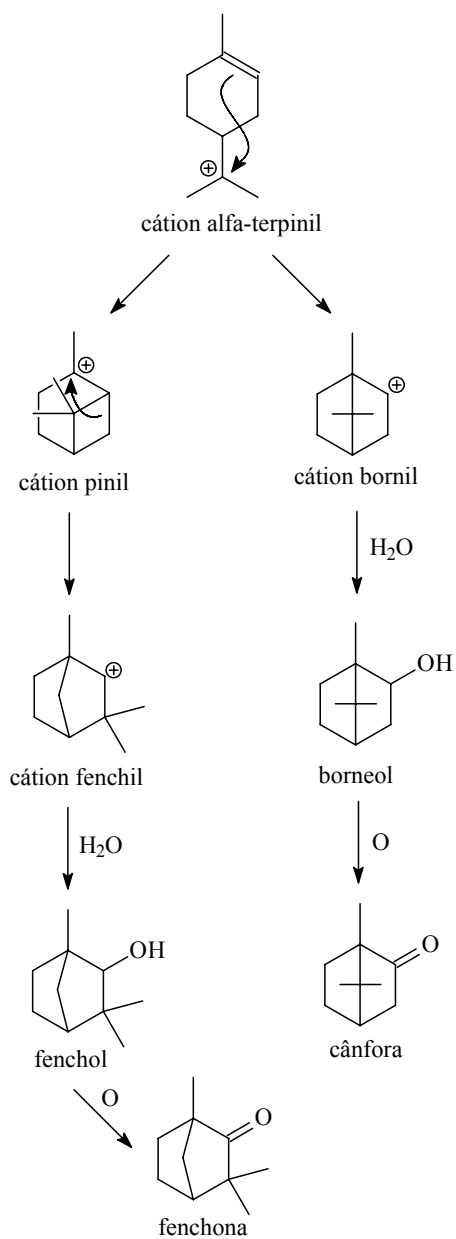


Figura 2 Formação dos compostos monoterpênicos, fenchona e cânfora, a partir do cátion α -terpinil

plantas cultivadas em solos ricos em matéria orgânica, com P e com basicidade considerável. Medina-Holguín et al. (2008), estudando óleos essenciais de *Anemopsis californica* coletadas em 17 locais no Estado do Novo México/USA, encontraram três tipos de variações químicas nesse óleo. O primeiro com altas concentrações de elemicina, o segundo com altas concentrações de metileugenol e o terceiro com altas concentrações de piperitona/timol. Essas variações já haviam sido observadas anteriormente em populações de plantas geograficamente distintas, uma vez que o metileugenol foi encontrado em plantas da Região Sudeste do Estado, que apresenta clima seco e quente; a elemicina foi encontrada em plantas do nordeste do Estado e o óleo rico em piperitona/timol foi encontrado em plantas da Região Norte, com predominância em locais de clima ameno e com maiores índices de precipitação pluviométrica

De acordo com Sangwan et al. (2001), as características genotípicas relacionadas com os fatores ambientais também são determinantes no controle biossintético dos metabólitos secundários, entre esses os óleos essenciais. Barros et al. (2009) afirmam que as condições climáticas podem influenciar as atividades enzimáticas em determinada espécie vegetal e, conseqüentemente, interferir na biossíntese de determinados metabólitos secundários, incluindo compostos terpênicos.

Apesar de os óleos essenciais de *L. sidoides* e de *C. verbenacea* apresentarem diferenças quantitativas e qualitativas dos resultados apresentados pela literatura para os óleos essenciais dessas mesmas espécies, evidenciando um poliforfismo para esses óleos essenciais, ainda não se pode afirmar a existência de quimiotipos entre essas espécies, uma vez que elas foram cultivadas em regiões geograficamente distintas, possuindo, assim, fatores edafoclimáticos diferentes.

3.3 Elucidação estrutural do isobisabolol

A elucidação estrutural do isobisabolol (Figura 3) foi realizada por meio dos dados por espectrometria de massas (EM) e por espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) em experimentos uni e bidimensionais, realizados para o α -bisabolol padrão (Fluk – 95,0%) e para a substância purificada do óleo essencial de *C. verbenacea* (isobisabolol).

Os principais picos apresentados no espectro de massas de baixa resolução obtidos para a substância obtida do óleo essencial de *C. verbenacea*, de acordo com a relação m/z (%), foram: 43 (100); 41,05 (92,82); 67,05 (30,15); 69,05 (76,14); 79,05 (20,13); 93,00 (46,68); 109,10 (43,56); 119,15 (41,90); 204 (11,73).

Não se observou a presença do pico do íon molecular em m/z 222; no entanto, foi observada a presença de um pico de m/z 204, correspondente à perda de uma molécula de H₂O do íon molecular. A ausência do pico do íon molecular deve-se à baixa estabilidade apresentada por ele, uma vez que íons moleculares de álcoois terciários geralmente são pouco estáveis (SILVERSTEIN et al., 2006).

Os espectros obtidos nos experimentos de RMN para o isobisabolol e o α -bisabolol encontram-se no apêndice B. Os dados obtidos por RMN de ¹H, ¹³C e DEPT 135 para o α -bisabolol e para o isobisabolol estão apresentados na Tabela 3.

De acordo com os espectros de RMN de ¹H para o α -bisabolol (Figura 3), observam-se sinais de hidrogênios vinílicos em δ_H 5,15 (t, $J = 6,8$, 1H) e 5,40 (H-3', m, 1H), de quatro grupos metílicos em δ_H 1,10 (H-1, s, 3H); 1,65 (H-7, s, 3H); 1,62 (H-8, s, 3H); 1,10 (H-7', s, 3H), de sete sinais referentes a hidrogênios metilênicos em δ_H 1,55-1,46 (H-3, m, 2H); 2,10-2,00 (H-4, m, 2H); 1,85-1,73 e 2,00-1,95 (H-2', m, 2H); 2,00-1,95 (H-5', m, 2H); 1,35-1,21 e 1,95-1,88 (H-6',

m, 2H), e de um sinal atribuído aos hidrogênios metínicos em δ_H 1,60-1,54 (H-1', m, 3H).

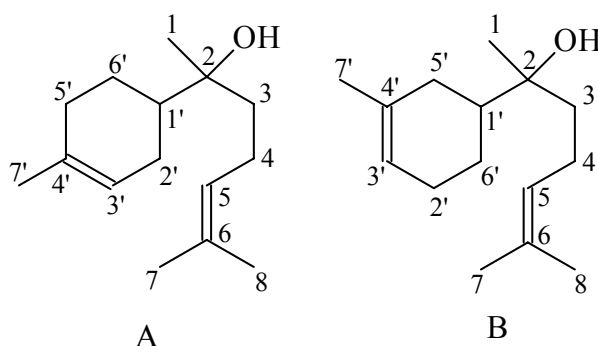


Figura 3 Estruturas dos compostos α -bisabolol (A) e isobisabolol (B)

Os espectros de RMN de ^{13}C para o α -bisabolol e para o isobisabolol apresentaram cada um 15 sinais (Tabela 3). O subespectro DEPT 135, obtido tanto para o bisabolol quanto para o α -bisabolol, revelou a presença de quatro carbonos metílicos ($-\text{CH}_3$), cinco carbonos metilênicos ($-\text{CH}_2$), três carbonos metínicos ($-\text{CH}$) e três carbonos, que não se encontram ligados a átomos de hidrogênios (Tabela 3).

Os sinais obtidos para o α -bisabolol nas análises de RMN de ^1H e de ^{13}C encontram-se de acordo com os apresentados pela literatura (CARLE et al., 1992).

Tabela 3 Dados de RMN de ^1H , ^{13}C e DEPT 135 para o α -bisabolol e para o isobisabolol.

carbonos	α -bisabolol			isobisabolol		
	^{13}C (ppm)	C (DEPT)	^1H (ppm) ($J = \text{Hz}$)*	^{13}C (ppm)	C (DEPT)	^1H (ppm) ($J = \text{Hz}$)*
1	25,66	CH ₃	1,69 (s, 3H)	25,40	CH ₃	1,69 (s, 3H)
2	74,24	C	-	74,03	C	-
3	40,13	CH ₂	1,55-1,46 (m, 2H)	39,01	CH ₂	1,54-1,47 (m, 2H)
4	22,08	CH ₂	2,10-2,00 (m, 2H)	22,01	CH ₂	2,10-2,00 (m, 2H)
5	124,64	CH	5,1 (t, $J = 6,8$, 1H)	124,39	CH	5,15 (t, $J = 7,2$, 1H)
6	131,55	C	-	131,38	C	-
7	23,16	CH ₃	1,65 (s, 3H)	23,02	CH ₃	1,65 (s, 3H)
8	17,63	CH ₃	1,62 (s, 3H)	17,37	CH ₃	1,62 (s, 3H)
1'	42,99	CH	1,60-1,54 (m, 1H)	42,97	CH	1,61-1,54 (m, 1H)
2'	26,93	CH ₂	1,85-1,73 (m, 1H, Ha) 2,00-1,95 (m, 1H, Hb)	25,81	CH ₂	1,95-1,85 (m, 1H, Ha) 2,10-2,00 (m, 1H, Hb)
3'	120,59	CH	5,40 (m, 1H)	121,0	CH	5,40 (m, 1H)
4'	134,03	C	-	133,51	C	-
5'	31,04	CH ₂	2,00-1,95 (m, 2H)	30,85	CH ₂	2,0-1,95 (m, 2H)
6'	23,31	CH ₂	1,35-1,21 (m, 1H, Ha) 1,95-1,88 (m, 1H, Hb)	23,73	CH ₂	1,34-1,23 (m, 1H, Ha) 1,84-1,77 (m, 1H, Hb)
7'	23,32	CH ₃	1,10 (s, 3H)	23,66	CH ₃	1,14 (s, 3H)

* m = multipleteo; s = singleteo; t = tripleteo.

O espectro de RMN de ^1H do isobisabolol mostrou-se muito semelhante ao do α -bisabolol; no entanto, de acordo com o espectro de RMN de ^1H obtido para o isobisabolol, o multiplete que apresenta deslocamento δ 1,84-1,77 ppm apresenta uma multiplicidade semelhantes a um duplete; já no espectro do α -bisabolol, o multiplete com deslocamento de δ 1,85-1,73 ppm apresenta uma multiplicidade semelhante a um tripleto.

Nos mapas de contornos obtidos pelo experimento de correlação heteronuclear (C-H) HSQC para os compostos isobisabolol e α -bisabolol, observam-se diferenças em relação aos sinais de RMN ^1H , que estão correlacionados aos sinais de ^{13}C , dos carbonos em δ 26,93 e δ 23,31. No α -bisabolol, o sinal de ^{13}C observado em δ 26,93 está correlacionado aos sinais de H em δ 1,85-1,73 e δ 2,00-1,95 e o sinal de ^{13}C observado em δ 23,31 correlaciona-se aos sinais de H em δ 1,35-1,21 e δ 1,95-1,88, ao passo que, no isobisabolol, o sinal de ^{13}C observado em δ 26,93 está correlacionado aos sinais de H em δ 1,95-1,85 e δ 2,10-2,00 e o sinal de ^{13}C observado em δ 23,31 correlaciona-se aos sinais de H em δ 1,34-1,23 e δ 1,84-1,77.

Mediante tais correlações, observa-se a inversão entre os valores dos deslocamentos de um hidrogênio de 2' na molécula do α -bisabolol com um hidrogênio 6' na molécula do isobisabolol, evidenciando que tais moléculas apresentaram estruturas diferentes. Tais evidências espectroscópicas tornam a existência de diferenças estruturais entre esses dois compostos em relação apenas à parte cíclica de sua cadeia.

Ainda de acordo com os mapas de contornos HSQC para os dois compostos, pode-se observar que cada um dos carbonos (6' e 2') apresenta correlações com dois hidrogênios de deslocamentos químicos diferentes, caracterizando a presença de hidrogênios diastereotrópicos. No mapa de contornos COSY do isobisabolol, observa-se correlação entre os sinais gerados pelo hidrogênio 3' com 2', 6' e 1' (Figura 4). A correlação entre os sinais

atribuídos aos hidrogênios 3' e 6' do isobisabolol evidencia a existência de um acoplamento escalar entre esses hidrogênios, possibilitando a confirmação da estrutura representada na Figura 3 B para o isobisabolol.

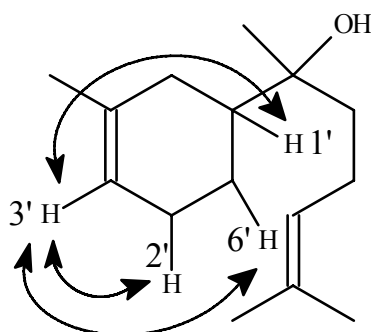


Figura 4 Estrutura do isobisabolol com algumas correlações observadas no mapa de contornos COSY

As correlações entre os sinais observados no mapa de contornos HMBC também auxiliam na confirmação de tal estrutura para o isobisabolol, pois observa-se correlações entre H-3' e os carbonos que apresentam $\delta = 25,81$ (C-2'), $\delta = 23,73$ (C-6') e $\delta = 42,97$ (C-1'), sendo a correlação do sinal do H-3' com o sinal gerado pelo carbono que apresenta deslocamento igual 42,97 (C-1') mais fraca, sugerindo uma correlação J_4 . De acordo com os espectros de ^{13}C tipo DEPT 135 dos compostos α -bisabolol e isobisabolol, o carbono que apresenta $\delta = 42,97$ é um carbono metínico, e segundo o mapa de contornos HSQC o hidrogênio que gera o sinal correlacionado ao sinal gerado por esse carbono é o H-1', sendo assim esse é o carbono que se liga à cadeia lateral, e é o carbono presente no anel mais distante de C-3'. apresentadas na Figura 5.

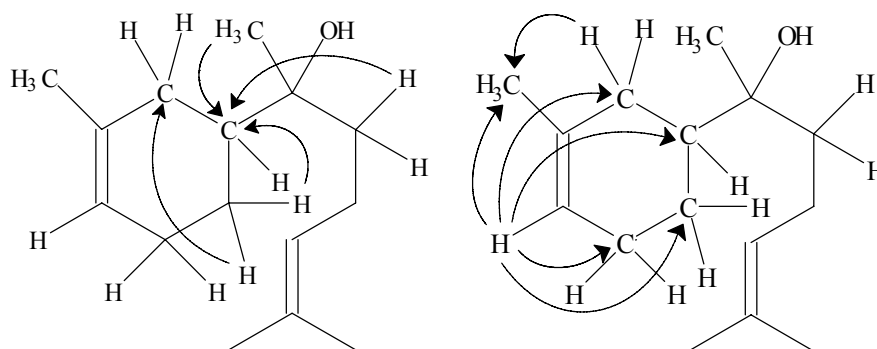


Figura 5 Algumas correlações observadas no mapa de contornos HMBC, na estrutura do isobisabolol

3.4 Quantificação dos constituintes dos óleos essenciais por meio da padronização interna

Na Tabela 4 apresenta-se o teor dos principais constituintes dos óleos essenciais estudados e determinados por meio de padronização interna; no entanto, uma comparação entre os teores obtidos por normalização de áreas (Tabela 2) com os obtidos por padronização interna não seria prudente, uma vez que trata-se de meios analíticos muito distintos.

De acordo com Cicchetti, Merie e Chaintreau (2008), quantificações dos componentes de óleos essenciais por normalização de áreas são denominadas de 'semiquantificação', uma vez que o detector DIC não apresenta a mesma resposta para todos os compostos presentes no óleo essencial. Havendo uma superestimação dos teores de hidrocarboneto terpênicos em relação aos outros compostos oxigenados, tendo em vista que esse detector apresenta uma maior sensibilidade a hidrocarbonetos, e como os teores de todos os compostos presentes no óleo essencial são calculados por normalização de áreas, há a necessidade de métodos analíticos mais precisos, como o de padronização interna, principalmente para expressar teores dos componentes de óleos

essenciais utilizados em ensaios biológicos, podendo, assim, correlacionar a sua composição com as atividades observadas, por meio da utilização dos óleos essenciais de padrões de seus constituintes, obtendo, assim, resultados confiáveis e reais.

A não confiabilidade nas quantificações dos constituintes dos óleos essenciais realizadas por normalização de áreas utilizando os detectores de ionização em chama (DIC) e de espectrometria de massas (EM) deve-se ao fato de os sinais gerados por esses detectores não dependerem apenas da concentração, mas também das estruturas químicas e da composição elementar dos compostos orgânicos (BICCHI et al., 2008).

No espectrômetro de massas, a abundância dos fragmentos é específica para cada composto, uma vez que ela depende de sua estrutura; sendo assim, cada composto produz um número de íons específicos na fonte, então, para cada composto haverá uma resposta diferente do detector. O detector DIC, que é o mais utilizado em análises quantitativas de óleos essenciais, pode apresentar uma variação de até 60% entre um composto e outro, o que varia de acordo com a sua estrutura (BICCHI et al., 2008). Essa variação se deve ao fato de o número de íons produzidos na chama ser proporcional ao número de carbonos, e que grupos funcionais, como carbonila, álcool, halogênios e aminas produzem poucos íons na chama (HOLLER; SKOOG; CROUCH, 2009).

Sendo assim, pode-se afirmar que compostos oxigenados presentes nos óleos essenciais terão respostas inferiores às de outros compostos presentes no mesmo óleo essencial que seja constituído apenas por átomos de carbonos e hidrogênios (hidrocarbonetos).

Tabela 4 Quantificação por padronização interna mg/100mg de OE.

Composto	<i>Lippia sidoides</i>	<i>Alomia fastigiata</i>	<i>Ocotea odorifera</i>	<i>Cordia verbenaceae</i>	<i>Mikania glauca</i>
α -pineno	-	37,09 \pm 0,07	-	-	21,72 \pm 0,07
sabineno	1,85 \pm 0,02	-	-	-	-
β -pineno	-	-	-	-	17,51 \pm 0,05
mirreno	-	-	-	-	19,94 \pm 0,02
ρ -cimeno	6,52 \pm 0,03	-	-	-	-
limoneno	-	05,18 \pm 0,83	-	-	-
1,8-cineol	17,75 \pm 0,05	-	-	-	-
(E)- β -ocimeno	-	1,42 \pm 0,02	-	-	-
γ -terpineno	4,71 \pm 0,04	-	-	-	-
terpinoleno	1,27 \pm 0,02	-	-	-	-
cânfora	-	-	2,57 \pm 0,02	-	-
terpin-4-ol	1,14 \pm 0,01	-	-	-	-
Metil-éter-timol	1,26 \pm 0,19	-	-	-	-
geranial	1,18 \pm 0,07	-	-	-	-
safrol	-	-	6,72 \pm 0,03	-	-
carvacrol	20,10 \pm 1,01	-	-	-	-
metileugenol	-	-	65,29 \pm 0,30	-	-
E-cariofileno	1,695 \pm 0,02	4,60 \pm 0,83	-	9,32 \pm 0,26	7,96 \pm 0,01
α -humuleno	-	3,14 \pm 0,09	-	1,95 \pm 0,06	-
Germacreno D	-	11,68 \pm 0,27	-	6,47 \pm 0,12	-
biciclogermacreno	-	1,80 \pm 0,05	-	-	8,40 \pm 0,04
z - α -bisaboleno	-	-	-	3,29 \pm 0,07	-
β -bisaboleno	-	-	-	1,43 \pm 0,04	-
E- γ -bisaboleno	-	-	-	2,07 \pm 0,03	-
junenol	-	2,95 \pm 0,05	-	-	-
isobisabolol	-	-	-	52,02 \pm 0,12	-

4 CONCLUSÕES

Ocotea odorifera apresentou o maior rendimento de óleo essencial ($3,744 \pm 0,96$ %), seguida pelas espécies *Lippia sidoides* ($0,873 \pm 0,23$ %), *Cordia verbenacea* ($0,786 \pm 0,19$ %), *Mikania glauca* ($0,688 \pm 0,16$ % e *Alomia fastigiata* ($0,379 \pm 0,14$ %).

O óleo essencial de *L. sidoides* apresentou como constituintes majoritários o 1,8-cineol ($22,63 \pm 0,40$ %) e o carvacrol ($26,44 \pm 0,65$ %), seguidos por outros compostos fenilpropanoides, monoterpenos oxigenados e hidrocarbonetos monoterpênicos.

A espécie *O. odorifera* apresentou um óleo essencial rico em fenilpropanoides (85,29 %), sendo o metileugenol ($74,03 \pm 0,99$ %) o constituinte majoritário, seguido pelo safrol ($12,26 \pm 0,77$ %) e pela cânfora ($7,93 \pm 0,35$ %).

A. fastigiata apresentou como constituintes majoritários de seu óleo essencial o monoterpeno α -pineno ($52,79 \pm 5,51$ %) e o sesquiterpeno germacreno D ($12,26 \pm 2,41$ %), seguidos por outros terpenos presentes em menores concentrações, como o limoneno ($8,41 \pm 0,90$ %), E- β -ocimeno ($4,65 \pm 0,45$ %), E-cariofileno ($5,48 \pm 0,67$), α -humuleno ($3,87 \pm 0,67$ %).

O óleo essencial de *M. glauca* mostrou-se rico em compostos terpênicos, com $27,12 \pm 0,33$ % de α -pineno, $23,80 \pm 0,23$ % de mirceno, $21,88 \pm 0,33$ de β -pineno, $8,55 \pm 0,21$ % de E-cariofileno, $8,37 \pm 0,30$ % de biciclogermacreno.

Foi possível purificar por cromatografia em coluna, utilizando sílica gel como fase estacionária e caracterizar por meio de técnicas espectroscópicas (RMN e EM) o sesquiterpeno oxigenado isobisabolol, um isômero do α -bisabolol e até então de estrutura desconhecida, e se encontra entre os constituintes do óleo essencial de *C. verbenacea*.

A espécie *C. verbenacea* apresentou como constituinte majoritário de seu óleo essencial o isobisabolol ($65,26 \pm 0,41\%$), seguido pelo E-cariofileno ($11,29 \pm 0,25\%$), germacreno D ($8,01 \pm 0,13\%$) e o α -humuleno ($2,55 \pm 0,13\%$).

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Carol Stream: Allured, 2007. 800p.
- ANGIONI, A. et al. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. SSP. *Stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 12, p. 4364-4370, June 2006.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.
- 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. 624p.
- BARRETO, A. S.; VEIGA JÚNIOR, V. F. **Inteligência vegetal na arte da sedução: interações biológicas, evolução, utilização, extração, identificação, química e farmacologia de óleos essenciais de plantas**. Rio de Janeiro: Interciência, 2005. 115 p.
- BARROS, E. M. C. et al. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia Alba* (Mill) N. E. Brown (verbenaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 4, p. 861-867, 2009.
- BEDI, G.; TONZIBO, Z. F.; N'GUESSAN, T. Y. Chemical constituents of the essential oil of *Mikania cordata* (Burm.f.) B.L. Robinson from Abidjan (Ivory Coast). **Journal of the Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 15, n. 3, p. 198-199, May/June 2003.
- BICCHI, C. et al. Quantitative analysis of essential oils: a complex task. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 23, n. 6, p. 382-391, Nov./Dec. 2008.

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

BOTELHO, M. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medicinal and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 40, n. 3, p. 349-356, Mar. 2007.

CARLE, R. et al. Determination of site-specific natural isotope fractionation in (-)- α -bisabolols. **Phytochemistry**, New York, v. 31, n. 1, p. 171-174, Jan. 1992.

CARVALHO JÚNIOR, P. M. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenaceae* D. C. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 95, n. 2-3, p. 297-301, Dec. 2004.

CASTRO, N. E. A. et al. Avaliação de rendimento e dos constituintes químicos do óleo essencial de folhas de *Eucalyptus citriodora* Hook. colhidas em diferentes épocas do ano em municípios de Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 10, n. 1, p. 70-75, jan. 2008.

CAVALCANTI, E. S. B. et al. Larvicidal activity of essential oils from brazilian plants against *Aedes aegypti* L. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 99, n. 5, p. 541-544, maio 2004.

CICCHETTI, E.; MERIE, P.; CHAINTREAU, A. Quantitation in gas chromatography: usual practices and performances of a response factor database. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 23, n. 6, p. 450-459, Nov./Dec. 2008.

CURADO, M. A. et al. Environmental factors influence on chemical polymorphism of the essential oils of *Lychnophora ericoides*. **Phytochemistry**, New York, v. 67, n. 21, p. 2363-2369, Nov. 2006.

DESCHAMPS, C. et al. Avaliação sazonal do rendimento de óleo essencial em espécies de *Menta*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 32, n. 3, p. 725-730, mar. 2008.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed. Hoboken: J. Wiley, 2002. 507 p.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-candida activity of brazilian madicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 97, n. 2, p. 305-311, Feb. 2005.

FONTENELLE, R. O. S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 59, n. 5, p. 934-940, May 2007.

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

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

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2008. 867 p.

HOLLER, F. J.; SKOOG, D. A.; CROUCH, S. R. **Princípios de análise instrumental**. 6. ed. Porto Alegre: Bookman, 2009. 1056 p.

HUDAIB, M. et al. GC/MS evaluation of thyme (*Thymus vulgaris* L.) oil composition and variations during the vegetative cycle. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, Amsterdam, v. 29, n. 4, p. 691-700, July 2002.

HUSSAIN, A. I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, London, v. 108, n. 3, p. 986-995, June 2008.

JORDÁN, M. J. et al. Seasonal variation of *Thymus hyemalis* Lange and Spanish *Thymus vulgaris* L. essential oils composition. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 24, n. 3, p. 253-263, Nov. 2006.

KEIL, S. S. **Crescimento, nutrição e composição do óleo essencial de sassafrás submetido à fertilização e à omissão de nutrientes.** 2007. 100p p. Tese (Doutorado em Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2007.

LAGO, J. H. G.; FÁVERO, O. A.; ROMOFF, P. Microclimatic factors and phenology influences in the chemical composition of the essential oils from *Pittosporum undulatum* Vent. leaves. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 17, n. 7, p. 1334-1338, 2006.

MARTINS, P. M. et al. Influência da temperatura e velocidade do ar de secagem no teor e composição química do óleo essencial de capim-limão. **Acta Horticulturae**, The Hague, v. 569, n. 3, p. 155-160, 2002.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais:** guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil. Fortaleza: UFC, 2000. 344 p.

MEDINA-HOLGUÍN, A. L. et al. Chemotypic variation of essential oils in the medicinal plant, *Anemopsis californica*. **Phytochemistry**, New York, v. 69, n. 4, p. 919-927, Feb. 2008.

NASCIMENTO, F. R. et al. Efeito do óleo essencial de pimenta longa (*Piper hispinervum* C.DC) e do emulsificante Tween® 80 sobre o crescimento micelial de *Alternaria alternata* (Fungi: Hyphomycetes). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 3, p. 503-508, Mar. 2008.

PEREIRA, A. A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, set. 2008.

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, mar./abr. 2006.

RADÜNZ, L. L. et al. Secagem de alecrim pimenta (*Lippia sidoides* Cham.) em secador de leito fixo. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 5, n. 1, p. 79-82, jan. 2002.

RANDÜNZ, L. L. et al. Influência da temperatura do ar de secagem na qualidade do óleo essencial extraído de guaco (*Mikania glomerata* Sprengel). **Revista Brasileira de Armazenamento**, Viçosa, MG, v. 28, n. 2, p. 41-45, jul./dez. 2003.

REIS, A. A. et al. Preliminary studies on the volatile constitution of *Mikania* species. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 18, n. 1, p. 683-685, 2008. Suplemento.

RIZZINI, C. T. **Árvores e madeiras úteis do Brasil: manual de dendrologia brasileira**. 2. ed. São Paulo. E. Blücher, 1971. 294 p.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, Dordrecht, v. 34, n. 1, p. 3-21, May 2001.

SILVA, F. G. et al. Seasonal variability in the essential oils of wild and cultivated *Baccharis trimera*. **Journal of Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, n. 5, p. 990-997, 2007.

SILVA, V. F. et al. Rendimento do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D. C.) Stapf.) submetidos a diferentes métodos de cortes e secagens. **Magistra**, Cruz das Almas, v. 17, n. 3, p. 107-153, set./dez. 2005.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: Livros Técnicos e Científicos, 2006. 490 p.

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

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.

TOLEDO, M. D. T. de. **Estudo botânico e fitoquímico de *Ocotea odorífera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae) da região metropolitana de Curitiba**. 2000. 109p. Dissertação (Mestrado em Botânica) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2000.

CAPÍTULO 3

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *LIPPIA*
SIDOIDES CHAM., *ALOMIA FASTIGIATA* (GARDNER) BENTH,
OCOTEA ODORIFERA (VELL.) ROHWER, *MIKANIA GLAUCA* MART.,
CORDIA VERBENACEA D. C. E DE SEUS CONSTITUINTES
MAJORITÁRIOS**

RESUMO

Tendo em vista a importância biológica dos óleos essenciais e o grande número de trabalhos realizados com o intuito de avaliar sua atividade antioxidante, com este trabalho objetivou-se avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Mikania glauca* Mart. e *Cordia verbenacea*, e de seus constituintes majoritários. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação, utilizando-se um aparelho de Clevenger modificado. A atividade antioxidante deles e de seus constituintes majoritários foi determinada perante os ensaios que avaliam a oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico; a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a redução do radical estável DPPH. Verificou-se efeito significativo dos fatores compostos, concentração e também da interação desses fatores sobre a atividade antioxidante apresentada pelos óleos essenciais e seus constituintes majoritários, diante de cada ensaio realizado. Por meio dessa interação, observou-se a existência da variação da atividade antioxidante, dependendo do óleo essencial ou do constituinte e da sua concentração, para cada metodologia separadamente, de uma maneira dose-dependente. O óleo essencial de *L. sidoides* foi o que mostrou maior atividade antioxidante, apresentando os menores valores de IC_{50} em todos os ensaios. No ensaio do β -caroteno/ácido linoléico, o óleo essencial de *L. sidoides*, juntamente com os compostos γ -terpineno, carvacrol e timol, foram os que apresentaram maior atividade antioxidante. No ensaio que avalia a atividade antioxidante perante a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, o óleo essencial de *L. sidoides* foi o único que apresentou valor de IC_{50} inferior a 40 mg mL^{-1} ($14,27 \text{ mg mL}^{-1}$), não apresentando estatisticamente diferença dos demais valores de IC_{50} apresentados pelo γ -terpineno, carvacrol, timol, metileugenol e os padrões antioxidantes. No ensaio de redução do DPPH, o óleo essencial *L. sidoides* apresentou um valor de IC_{50} de $86,71 \mu\text{g mL}^{-1}$, menor que os apresentados pelo carvacrol, timol e os padrões antioxidantes. A atividade antioxidante apresentada pelo óleo essencial de *L. sidoides* foi atribuída ao seu constituinte majoritário carvacrol, que também apresentou elevada atividade antioxidante, quando avaliado isoladamente. Foi possível observar a influência da metodologia utilizada sobre a atividade antioxidante apresentada para os diferentes óleos essenciais e compostos avaliados, evidenciando a importância da metodologia utilizada sobre a sua atividade antioxidante.

Palavras-chave: Óleos essenciais. Ensaio antioxidante. Sistema β -caroteno/ácido linoleico. Ácido tiobarbitúrico. 2,2-difenil-1-picrilhidrazila.

ABSTRACT

Essential oils are biologically important and a large number of studies to evaluate their antioxidant activities have been performed. The present study sought to evaluate the antioxidant activities of the essential oils from *Lippia sidoides* Cham, *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Mikania glauca* Martm, and *Cordia verbenacea*, and their major constituents. Essential oils were extracted by steam distillation using a modified Clevenger apparatus. The antioxidant activity of these oils and the major constituents were determined using tests that evaluate the oxidation of the β -caroteno/linoleic acid system, the formation of reactive species of thiobarbituric acid (TBARS), and the reduction of the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) stable free radical. There was a significant effect of the type of compound, the concentration, and the interaction of these factors on the antioxidant activity presented by the essential oils and their major constituents on each test performed. The existence of a variation in antioxidant activity that depends on the type of essential oil or its constituents and the concentrations utilized for each method, in a dose-dependent manner, was observed. The essential oil of *L. sidoides* presented the highest antioxidant activity, presenting the lowest IC_{50} values in all tests. The essential oil of *L. sidoides*, along with the compounds γ -terpinene, carvacrol and thymol, presented the highest antioxidant activity in the β -caroteno/linoleic acid trial. The essential oil of *L. sidoides* was the only oil that presented an IC_{50} lower than 40 mg mL^{-1} (14.27 mg mL^{-1}) in the test that evaluates the antioxidant activity against the formation of reactive species of thiobarbituric acid, with no statistically significant difference from the IC_{50} values presented by γ -terpinene, carvacrol, thymol, methyleugenol and antioxidant standards. In the reduction of DPPH, the essential oil from *L. sidoides* presented an IC_{50} value of 86.71 mg mL^{-1} , lower than those presented by carvacrol, thymol and the antioxidant standards. The antioxidant activity presented by the essential oil from *L. sidoides* was attributed to carvacrol, its major constituent, which also exhibited high antioxidant activity when evaluated in alone. The influence of the method utilized on the antioxidant activity presented by the different essential oils and the individual compounds was also observed and demonstrated the importance of the method utilized on the results obtained in the determination of the antioxidant activity.

Keywords: Essential oils. Antioxidant assays. β -caroteno/linoleic acid system. Thiobarbituric acid. 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl.

1 INTRODUÇÃO

Durante o armazenamento e o processamento de alimentos ricos em óleos e gorduras, esses podem sofrer transformações químicas, como a oxidação decorrente dos processos oxidativos, afetando a sua qualidade bem como a sua aceitação pelo consumidor. Em consequência, podem ocorrer prejuízos à saúde do consumidor devido aos efeitos tóxicos causados pela ingestão contínua e prolongada de produtos oxidados e radicais produzidos no processo de oxidação (BOBBIO; BOBBIO, 2001).

Em vários trabalhos, demonstra-se que todas as células são expostas ao ataque de radicais livres. Caso não controlados, esses agentes podem danificar os componentes celulares, tais como lipídeos de membranas, proteínas e DNA. A peroxidação de tecidos lipídicos pode romper membranas, alterar as funções das plaquetas, modificar a função dos macrófagos, alterar o ácido araquidônico, causar polimerização das proteínas e promover atrogêneses por meio da peroxidação do LDL, além de provocar mutação no DNA (EDER, 1999; KINSELLA et al., 1993).

Nos alimentos, a peroxidação lipídica é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, tornando-os impróprios para o consumo, além de provocar outras alterações que podem afetar a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, como também à integridade e segurança dos alimentos (RAMALHO; JORGE, 2006). Já nos sistemas biológicos, a peroxidação lipídica sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares causa danos às membranas, interrompendo os mecanismos de troca de metabólitos, podendo causar até a morte celular (LIMA et al., 2001).

Os radicais livres não causam danos somente nos alimentos, mas também são os grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças

degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (ATOUI et al., 2005). A produção de radicais livres é controlada nos seres vivos por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena, ou serem provenientes da dieta alimentar e outras fontes. Destas últimas, destacam-se os tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenoides (SOUSA et al., 2007).

De forma geral, denominam-se antioxidantes as substâncias que, presentes em baixas concentrações, comparadas ao substrato oxidável, retardam significativamente ou inibem a oxidação do substrato, por meio de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de íons metálicos (ATOUI, 2005; DUARTE-ALMEIDA, et al., 2006).

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria alimentícia são o BHA (butil-hidroxi-anisol), BHT (butil-hidroxi-tolueno), PG (galato de propila) e o TBHQ (tert-butil-hidroquinona). No entanto, estudos toxicológicos desses compostos têm demonstrado o seu potencial carcinogênico sobre animais (BOTTERWECK; VERHAGEN; GOLDBOHM, 2000). Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, pesquisas têm sido dirigidas no sentido de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, os quais permitirão substituir os sintéticos ou fazer associações entre eles, com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos (RAMALHO; JORGE, 2006).

Apesar de os antioxidantes naturais, na maioria das vezes, apresentarem capacidades antioxidantes menores que as dos compostos sintéticos, a legislação é mais flexível em relação a estes; no entanto, ressalta-se a necessidade de estudos econômicos e toxicológicos antes de sua utilização (OLIVEIRA et al., 2009).

Várias técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante “*in vitro*”, de maneira a permitir uma rápida triagem de substâncias e/ou misturas com potencial antioxidante, que possam ser utilizadas na conservação de alimentos e na prevenção de doenças crônico-degenerativas. De acordo com Huang, Ou e Prior (2005), os ensaios antioxidantes utilizados atualmente podem ser classificados em duas categorias: ensaios baseados na transferência direta de hidrogênio (métodos diretos), e ensaios baseados na transferência de elétrons (métodos indiretos).

Os métodos diretos são caracterizados pela competição entre um composto oxidável e o antioxidante pelos radicais gerados por uma fonte de radicais livres. Como substratos para a oxidação, podem ser utilizados lipídios individuais, misturas lipídicas, proteínas, DNA, e até mesmo meios biológicos ricos em lipídios, como plasma sanguíneo, membranas biológicas, entre outros (ROGINSKI; LISSI, 2005). Nos métodos indiretos, o processo é caracterizado por uma reação redox entre o antioxidante e o oxidante, que geralmente é um composto de concentração mensurável, tornando possível o monitoramento da reação. Entre as principais análises representantes dos métodos diretos, encontram-se os ensaios de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico e de formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS); entre os representantes dos métodos indiretos, o principal ensaio é aquele que avalia a redução do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

A complexidade dos óleos essenciais, constituídos por uma mistura de vários compostos com diferentes grupos funcionais, com polaridades e propriedades químicas distintas, apresentando resultados variáveis diante dos ensaios que avaliam as atividades antioxidantes, torna-se necessária a abordagem com diferentes ensaios. Nesse contexto, objetivou-se avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Alomia*

fastigiata (Gardner) Benth, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Mikania glauca* Mart. e *Cordia verbenacea* D. C., bem como de seus constituintes majoritários, por meio dos ensaios que avaliam a oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, bem como a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a redução do DPPH.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

As folhas de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae), *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth (Asteraceae), *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae), *Mikania glauca* Mart. (Asteraceae) e *Cordia verbenacea* (verbenaceae) foram coletadas no mês de outubro de 2007, no período da manhã, no município de Itumirim – Minas Gerais/Brasil. O material coletado foi encaminhado para o Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química – UFLA, para a extração dos óleos essenciais.

2.2 Extração do óleo essencial

Para extração dos óleos essenciais, empregou-se a metodologia de hidrodestilação, utilizando-se um aparelho de Clevenger modificado acoplado a um balão de fundo redondo. As folhas frescas de cada espécie vegetal estudada foram picadas e colocadas no balão de 4 litros de capacidade e recobertas com água, sendo o processo de extração realizado em um período de 2 horas, mantendo a solução em ebulição (GUIMARÃES et al., 2007). O hidrolato coletado foi centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal a 965,36 x g por cinco minutos; posteriormente, o óleo essencial foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e acondicionado em frasco de vidro âmbar escuro, em baixa temperatura e ao abrigo da luz.

2.3 Padrões utilizados

Todos os padrões empregados foram de grau P. A; 1,8-cineol (Acrôs - 99%), metil eugenol (Aldrich - 99%), carvacrol (Aldrich - 98%), α -pineno (Aldrich - 99%), β -pineno (Aldrich - 99%), trans-cariofileno (Fluk - 98,5%), cânfora (Acrôs - 97%), α -bisabolol (Fluk - 95,0%), α -terpineol (Merck - 99%), borneol (Acrôs - 98%), eugenol (Vetec - 99%), e α -terpineno (Aldrich - 85%), α -tocoferol (Acrôs - 99%), ácido ascórbico (Acrôs - 99%), BHT (Acrôs - 99%).

2.4 Atividades antioxidantes dos óleos essenciais e de seus constituintes majoritários

A atividade antioxidante dos óleos essenciais e de seus componentes principais foi determinada perante os ensaios que avaliam a oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico; a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a redução do radical estável DPPH.

Para cada uma das três metodologias empregadas, os valores de IC₅₀ (concentração que apresenta 50% de atividade antioxidante) dos óleos essenciais, de seus constituintes majoritários e dos compostos antioxidantes utilizados como referência foram calculados por meio de análise de regressão, entre a concentração e a atividade apresentada por cada composto, sendo calculada apenas para os óleos essenciais ou compostos que apresentaram atividade superior a 50% nas concentrações utilizadas em cada metodologia.

2.4.1 Oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

A avaliação da atividade antioxidante utilizando o ensaio do clareamento do β -caroteno foi realizada de acordo com as metodologias apresentadas por Wang (2008) e Lopes-Lutz et al. (2008), com pequenas modificações. Foi preparada uma solução de β -caroteno em clorofórmio ($2,0 \text{ mg mL}^{-1}$); em seguida foram adicionados a esta $60 \text{ }\mu\text{L}$ de ácido linoléico, 600 mg de Tween 20® e $1,5 \text{ mL}$ de clorofórmio, sendo o clorofórmio evaporado em rotaevaporador a vácuo (Bücher Rotavapor R 114).

Posteriormente, 150 mL de água destilada saturada com oxigênio foram acrescentados na mistura sob agitação constante (emulsão A). Em seguida, $2,8 \text{ mL}$ da emulsão A foram adicionados em tubos de ensaio e sob ela foram acrescentados $200 \text{ }\mu\text{L}$ das soluções metanólicas dos compostos em estudos, nas concentrações de $5,0$; $10,0$; $25,0$; $50,0$; $100,0$ e $200,0 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Paralelamente, prepararam-se duas soluções, uma sem o antioxidante (controle) e outra com os mesmos reagentes de A, sem o β -caroteno (emulsão B – branco).

As leituras das amostras foram realizadas nos tempos 0 e 60 minutos após adicionado o antioxidante sobre a emulsão A em espectrofotômetro (Shimatzu UV-160 1PC), no comprimento de onda de 470 nm . A porcentagem de inibição (porcentagem de atividade antioxidante AA%) foi calculada por meio da seguinte fórmula: $AA\% = 100 \times (DC - DA)/DC$, em que AA (atividade antioxidante); DC (grau de degradação do controle = $[\ln(a/b)/60]$); DA (grau de degradação na presença da amostra = $[\ln(a/b)/60]$); a (absorbância no tempo 0); b (absorbância final, 60 minutos após a incubação).

Para termo de comparação, foram utilizados os antioxidantes ácido ascórbico, α -tocoferol e BHT (Figura 1), nas concentrações de $5,0$; $10,0$; $25,0$; $50,0$; $100,0$; $200,0 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.4.2 Formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Foi utilizada a metodologia empregada por Kulisic et al. (2004), seguida de pequenas modificações. Inicialmente, em um tubo de ensaio, foi adicionado 0,5 mL de gema de ovo homogeneizada em água (10 % p/v) (como fonte de lipídeos), 0,1 mL das soluções metanólica dos óleos essenciais e de seus constituintes majoritários, previamente preparadas nas concentrações de 5,0; 10,0; 25,0 e 50,0 g L⁻¹. Em seguida, adicionou-se 0,4 mL de água destilada, completando o volume no tubo para 1,0 mL. Posteriormente, foram adicionados 0,05 mL da solução de diidrocloreto de 2,2'-azobis-(2-aminodienopropano) na concentração de 0,07 mol L⁻¹ em água (para induzir a peroxidação lipídica), 1,5 mL de uma solução de ácido acético 20% em água (pH 3,5) e 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,8% p/v diluído em uma solução de dodecilsulfato de sódio 1,1% p/v em água. Após agitação por 30 segundos, aqueceu-se a solução resultante a 95°C por 60 minutos. Resfriou-se à temperatura ambiente e, posteriormente, adicionaram 5,0 mL de butan-1-ol em cada tubo, centrifugando as soluções a 1200 x g por dez minutos. Com o auxílio de uma pipeta de Pauster, recolheu-se a fase orgânica, e sua absorbância foi lida em espectrofotômetro (Shimatzu UV-160 1PC) a 532 nm. A atividade antioxidante foi determinada em porcentagem (AA%), de acordo com a seguinte equação: $AA\% = [1 - (A_{amostra} / A_{controle})] \times 100$, em que $A_{Controle}$ são os valores de absorbância das soluções sem a presença das amostras (soluções totalmente oxidadas) e $A_{amostra}$ são os valores das absorbâncias das soluções na presença dos compostos avaliados.

Neste ensaio, os antioxidantes utilizados como referência, ácido ascórbico, α -tocoferol e BHT, foram utilizados nas concentrações de 0,1; 0,4; 2,0 e 4,0 g L⁻¹.

2.4.3 Redução do DPPH

A avaliação da atividade antioxidante diante do consumo de DPPH foi realizada de acordo com as metodologias de Sousa et al. (2007) e Lopes-Lutz et al. (2008), seguidas de pequenas modificações. Foi preparada uma solução em metanol de DPPH na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$, a qual foi mantida sob refrigeração e ao abrigo da luz. Paralelamente, foram preparadas soluções metanólicas dos óleos essenciais e dos seus constituintes majoritários, nas concentrações 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e $500,0 \mu\text{g mL}^{-1}$. As misturas reacionais foram preparadas em tubos de ensaio, adicionando-se 0,3 mL das soluções das amostras a 2,7 mL da solução de DPPH em metanol ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$). Em seguida, as leituras de absorbância foram realizadas em espectrofotômetro (Shimatzu UV-160 IPC) a 517 nm, no tempo de 60 min após junção das duas soluções. A porcentagem da atividade antioxidante foi calculada de acordo com a seguinte equação: $[1-(A_{\text{amostra}}/A_{\text{controle}})] \times 100$, em que A_{amostra} é a absorbância da solução contendo todos os reagentes e A_{controle} é a absorbância da solução-controle (solução contendo todos os reagentes menos os compostos avaliados). Como branco, foi utilizada a mistura de 2,7 mL de metanol e a solução metanólica dos compostos avaliados, nas respectivas concentrações. As concentrações dos antioxidantes ácido ascórbico, α -tocoferol e BHT foram 1,0; 2,5; 5,0; 10,0; 25,0 e $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$.

2.5 Delineamento estatístico

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, com três repetições. Os tratamentos foram dispostos no esquema fatorial de 20 x 6 para avaliação quanto à atividade antioxidante perante os ensaios de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico e de redução do radical estável DPPH,

sendo constituídos pelas combinações dos níveis referentes aos compostos avaliados (óleos essenciais e padrões) e às concentrações (5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 200,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para o ensaio do sistema β -caroteno/ácido linoleico e 5,0; 10,0; 25,0; 50,0; 100,0 e 500,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para o ensaio de redução do DPPH). Para a avaliação antioxidante perante o ensaio que avalia a inibição da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), os tratamentos foram dispostos no esquema fatorial de 20 x 4, sendo constituídos pelas combinações dos níveis referentes aos compostos avaliados (óleos essenciais e padrões) e às concentrações (5,0; 10,0; 25,0 e 50,0 g L^{-1}).

As análises de variância foram feitas para os experimentos fatoriais, sendo utilizado o Teste de Scott-Knott (5%), para comparar os efeitos médios, e o teste F, para confirmar a variação nas atividades antioxidantes dos compostos para cada concentração utilizada. Foram ajustadas equações de regressão para avaliar a atividade antioxidante dos compostos em cada metodologia para cada concentração.

Para os compostos utilizados como referência, ácido ascórbico, BHT e α -tocoferol, perante cada metodologia utilizada, foram feitas as análises de variância, seguida pelo Teste F para verificar o efeito das concentrações sobre a atividade antioxidante deles, e análise de regressão para avaliar os efeitos de cada concentração sobre a atividade antioxidante de cada composto. As análises foram realizadas utilizando o programa Sisvar (FERREIRA, 2000).

Para comparação dos valores médios de IC_{50} obtidos por meio das análises de regressão para todos os compostos (óleos essenciais, padrões e compostos de referência) em cada metodologia, foi aplicado o teste de Tukey (5%), utilizando o programa Genes (CRUZ, 2009).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos na avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais de *L. sidoides* Cham., *A. fastigiata* (Gardner) Benth, *O. odorifera* (Vell.) Rohwer, *M. glauca* Mart. e *C. verbenacea*, e de seus constituintes majoritários, pelos três ensaios (oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, redução do radical estável DPPH e formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico), verificou-se efeito significativo dos fatores compostos, concentração e também da interação desses fatores sobre as atividades antioxidantes apresentadas pelos óleos essenciais e seus constituintes majoritários diante de cada ensaio realizado. Por meio dessa interação, observou-se a existência da variação da atividade antioxidante, dependendo do óleo essencial ou do constituinte e da concentração, para cada metodologia separadamente.

Foi observado também um aumento da atividade antioxidante de acordo com o aumento da concentração, revelando uma relação dose-dependente sobre a atividade antioxidante dos óleos essenciais e de seus constituintes. Essa relação dose-dependente sobre a atividade antioxidante e a concentração do óleo essencial foi relatada nos trabalhos de Sarikurkcü et al. (2009), que avaliaram a atividade antioxidante do óleo essencial de *Vitex agnus castus* pelos ensaios β -caroteno/ácido linoleico e redução dos radicais livres DPPH e constataram uma relação dose-dependência da atividade antioxidante do óleo essencial perante os dois ensaios.

Os valores de atividade antioxidante dos óleos essenciais e de seus constituintes majoritários em relação às suas concentrações, avaliadas pelo ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico, estão apresentadas na Tabela 1. Observa-se que todos os óleos essenciais apresentaram atividades antioxidantes significativas. Entre os compostos avaliados, aqueles pertencentes

Tabela 1 Valores da atividade antioxidante dos óleos essenciais e de seus constituintes majoritários, expressos em porcentagem de inibição perante o ensaio β -caroteno/ácido linoleico.

Compostos	Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						Média geral
	5	10	25	50	100	200	
Óleos essenciais							
<i>Ocotea odorifera</i>	15,82 ^{aB}	23,50 ^{aB}	37,74 ^{bB}	40,91 ^{bB}	61,82 ^{cC}	72,84 ^{cC}	42,11 ^D
<i>Lippia sidoides</i>	60,08 ^{aC}	75,05 ^{aD}	84,56 ^{bD}	87,79 ^{bD}	88,49 ^{bD}	90,19 ^{bD}	81,03 ^G
<i>Mikania glauca</i>	2,38 ^{aA}	6,38 ^{aA}	20,37 ^{aA}	31,08 ^{bB}	43,20 ^{bB}	59,07 ^{cC}	27,08 ^C
<i>Alomia fastigiata</i>	17,05 ^{aB}	19,36 ^{aB}	34,81 ^{aB}	46,69 ^{bB}	50,16 ^{bB}	66,26 ^{bC}	39,05 ^D
<i>Cordia verbenacea</i>	28,92 ^{aB}	31,19 ^{aB}	50,31 ^{bC}	61,74 ^{bC}	62,45 ^{bC}	77,81 ^{cC}	52,07 ^E
Padrões							
α -pineno	1,74 ^{aA}	3,24 ^{aA}	7,35 ^{aA}	16,12 ^{aA}	48,52 ^{bB}	71,27 ^{cC}	24,71 ^B
β -pineno	1,29 ^{aA}	1,69 ^{aA}	9,53 ^{aA}	15,75 ^{aA}	30,37 ^{bA}	47,43 ^{bB}	11,73 ^B
ρ -cimeno	5,70 ^{aA}	5,97 ^{aA}	12,33 ^{aA}	16,84 ^{aA}	18,43 ^{aA}	19,11 ^{aA}	13,50 ^A
limoneno	10,61 ^{aA}	13,41 ^{aA}	18,54 ^{aA}	21,48 ^{aA}	32,35 ^{bA}	38,79 ^{bB}	22,53 ^B
1,8-cineol	4,22 ^{aA}	13,45 ^{aA}	13,72 ^{aB}	14,29 ^{aA}	14,55 ^{aA}	29,90 ^{aA}	15,02 ^A
cânfora	25,36 ^{aB}	26,49 ^{aB}	27,82 ^{aB}	20,93 ^{aA}	24,91 ^{aA}	23,91 ^{aA}	24,90 ^B
γ -terpineno	28,79 ^{aB}	57,33 ^{bC}	68,82 ^{bD}	78,28 ^{cD}	82,01 ^{cD}	87,50 ^{cD}	67,12 ^F
α -terpineol	1,46 ^{aA}	2,15 ^{aA}	7,27 ^{aA}	7,99 ^{aA}	13,76 ^{aA}	13,98 ^{aA}	7,77 ^A
linalol	0,25 ^{aA}	1,33 ^{aA}	11,94 ^{aA}	21,38 ^{bA}	36,41 ^{bB}	41,38 ^{bB}	18,78 ^B
safrol	-4,62 ^{aA}	3,92 ^{aA}	32,47 ^{bB}	61,21 ^{cC}	63,89 ^{cC}	75,64 ^{cC}	38,75 ^C
carvacrol	65,66 ^{aC}	76,01 ^{aD}	84,17 ^{bD}	86,64 ^{bD}	89,29 ^{bD}	92,20 ^{bD}	82,33 ^G
timol	36,05 ^{aB}	49,56 ^{aC}	82,25 ^{bD}	87,44 ^{bD}	89,43 ^{bD}	90,71 ^{bD}	72,57 ^F
metil-eugenol	2,56 ^{aA}	9,23 ^{aA}	22,72 ^{aB}	35,95 ^{bB}	50,10 ^{bB}	69,12 ^{cC}	31,62 ^C
E-cariofileno	17,21 ^{aB}	22,22 ^{aB}	46,83 ^{bC}	67,11 ^{cC}	80,15 ^{cD}	86,33 ^{cD}	53,31 ^E
α -bisabolol	4,10 ^{aA}	5,72 ^{aA}	9,68 ^{aA}	10,62 ^{aA}	30,45 ^{bA}	68,16 ^{cC}	21,46 ^B
Média geral	20,93 ^a	22,05 ^a	34,68 ^b	41,56 ^c	50,52 ^d	60,21 ^e	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma linha e pela mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p = 0,05$)

às classes dos fenilpropanoides e sesquiterpenos foram os que apresentaram as maiores atividades, quando presentes nas mesmas concentrações, comparadas às apresentadas pelos óleos essenciais, já os compostos monoterpênicos, com exceção do α -pineno e do γ -terpineno (Figura 1), não apresentaram atividades antioxidantes relevantes.

Perante o ensaio que avalia a atividade antioxidante por meio da inibição da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, os óleos essenciais, quando presentes nas mesmas concentrações, apresentaram atividades antioxidantes inferiores àquelas apresentadas pelos fenilpropanoides, superiores às dos monoterpênicos, com exceção do γ -terpineno, e semelhantes às dos sesquiterpenos, como pode ser observado pelos valores descritos na Tabela 2.

O ensaio que avalia a atividade antioxidante de acordo com a redução do radical estável DPPH foi o mais seletivo, uma vez que apenas o óleo essencial de *L. sidoides* e os fenilpropanoides, carvacrol e timol (Figura 1) apresentaram atividades antioxidantes significativas perante essa metodologia, como pode ser observado pelos dados da Tabela 3.

Para os compostos em que foram possíveis calcular os valores IC_{50} , as análises de regressão de primeira e segunda ordem foram significativas; no entanto, os coeficientes de correlação apresentados pelas equações de regressão de segunda ordem demonstraram que ela ajustava-se melhor ao comportamento da relação dose-dependência entre a concentração e a atividade antioxidante, para todos os compostos avaliados; sendo assim, os valores de IC_{50} apresentados nos três ensaios foram calculados por meio de equações de segundo grau para todos os compostos, os quais encontram-se apresentados na Tabela 4.

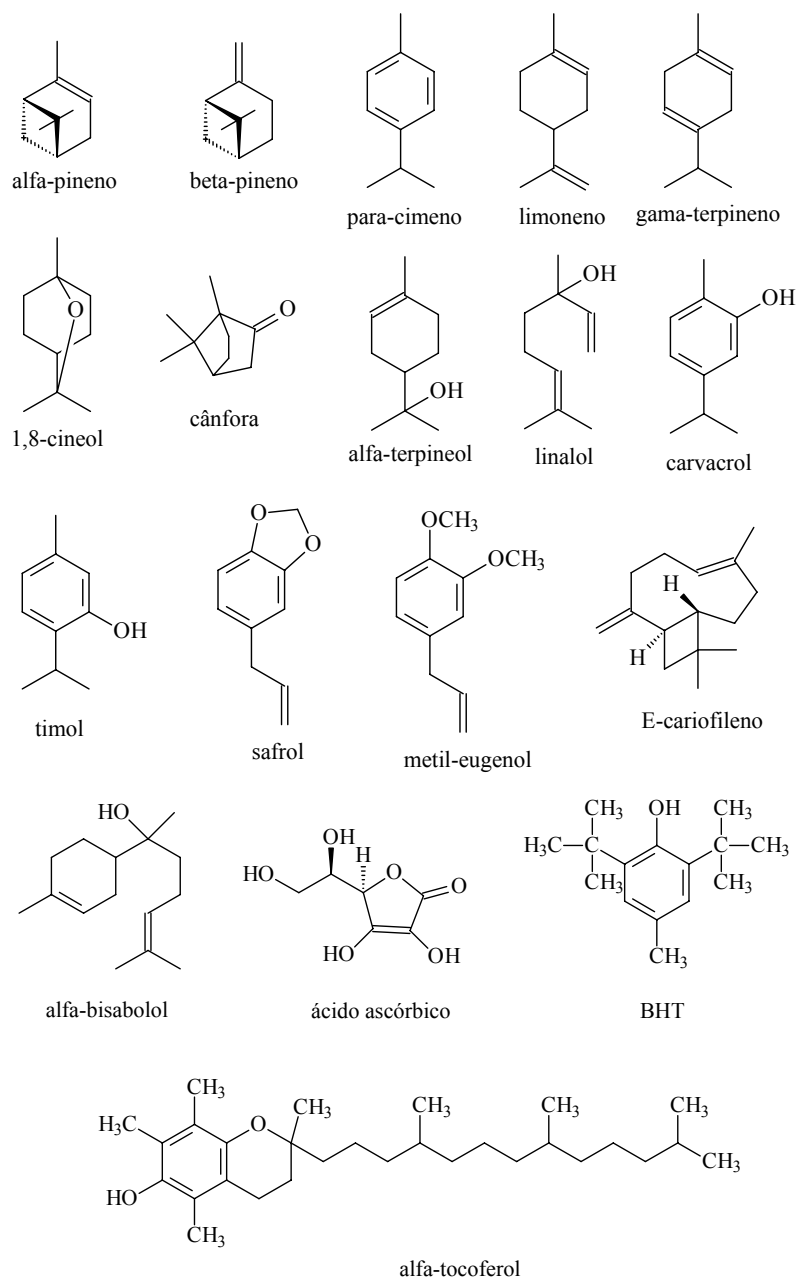


Figura 1 Estruturas químicas dos constituintes majoritários e dos compostos antioxidantes utilizados nos ensaios de avaliação das atividades antioxidantes

Tabela 2 Atividade antioxidante dos óleos essenciais e de seus constituintes majoritários, espessos em porcentagem de inibição empregando-se o método TBARS.

Composto	Concentrações g L ⁻¹				Média geral
	5	10	25	50	
Óleos essenciais					
<i>Ocotea odorifera</i>	11,38 ^{aE}	22,71 ^{bF}	25,53 ^{bD}	45,55 ^{cF}	26,29 ^E
<i>Lippia sidoides</i>	18,36 ^{aF}	37,10 ^{bG}	54,12 ^{cF}	54,29 ^{cG}	40,97 ^G
<i>Mikania glauca</i>	12,50 ^{aE}	33,52 ^{bG}	34,74 ^{bE}	46,95 ^{cF}	31,93 ^F
<i>Alomia fastigiata</i>	6,88 ^{aD}	13,68 ^{bE}	24,46 ^{cD}	26,56 ^{cD}	17,89 ^D
<i>Cordia verbenacea</i>	14,01 ^{aE}	15,63 ^{aE}	36,67 ^{bE}	36,96 ^{bE}	25,82 ^E
Monoterpenos					
α-pineno	3,90 ^{aC}	4,04 ^{aC}	5,78 ^{aB}	6,27 ^{aB}	4,99 ^B
β-pineno	9,70 ^{aE}	11,80 ^{aD}	21,12 ^{bD}	27,05 ^{cD}	17,42 ^D
ρ-cimeno	-1,09 ^{aB}	-0,44 ^{aB}	0,75 ^{aA}	1,08 ^{aA}	0,07 ^A
limoneno	-2,09 ^{aB}	1,95 ^{aC}	14,53 ^{bC}	18,35 ^{bC}	8,18 ^C
1,8-cineol	-5,96 ^{aB}	-1,57 ^{bA}	-0,96 ^{bA}	-0,41 ^{bA}	-2,23 ^A
cânfora	4,54 ^{aC}	7,56 ^{aE}	13,82 ^{bC}	14,21 ^{bB}	10,03 ^C
γ-terpineno	24,22 ^{aG}	41,07 ^{bH}	72,68 ^{cH}	84,21 ^{dJ}	55,54 ^I
α-terpineol	3,84 ^{aC}	14,46 ^{bE}	34,83 ^{cE}	45,30 ^{dF}	24,61 ^E
linalol	0,52 ^{aC}	3,51 ^{aC}	16,74 ^{bC}	17,44 ^{bC}	9,55 ^C
Fenilpropanoides					
safrol	9,51 ^{aE}	11,95 ^{aD}	29,69 ^{bE}	45,76 ^{cF}	24,23 ^E
carvacrol	37,82 ^{aI}	61,03 ^{bI}	71,53 ^{cH}	77,27 ^{dI}	61,91 ^J
timol	31,60 ^{aH}	44,38 ^{bH}	63,06 ^{cG}	71,83 ^{dH}	52,72 ^H
metil-eugenol	1,15 ^{aC}	16,26 ^{bE}	32,27 ^{cE}	50,73 ^{dG}	25,10 ^E
Sesquiterpenos					
E-cariofileno	5,53 ^{aD}	6,98 ^{aC}	21,55 ^{bD}	29,04 ^{cD}	15,77 ^D
α-bisabolol	-7,31 ^{aA}	8,48 ^{bD}	16,87 ^{cC}	27,15 ^{dD}	11,29 ^C
Média geral	9,17 ^a	17,88 ^b	29,49 ^c	35,88 ^d	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma linha e pela mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p = 0,05$)

Tabela 3 Atividade antioxidante dos óleos essenciais e de seus constituintes majoritários, expressos em porcentagem de inibição, empregando o método de redução do DPPH.

Composto	Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)						Média geral
	5	10	25	50	100	500	
Óleos essenciais							
<i>Ocotea odorifera</i>	0,02 ^{aA}	0,06 ^{aA}	0,66 ^{aA}	2,61 ^{bB}	2,87 ^{bB}	8,59 ^{cD}	2,47 ^C
<i>Lippia sidoides</i>	5,41 ^{aB}	11,91 ^{bB}	23,57 ^{cB}	37,35 ^{dC}	52,30 ^{eD}	84,33 ^{fH}	35,81 ^F
<i>Mikania glauca</i>	0,38 ^{aA}	0,13 ^{aA}	0,32 ^{aA}	0,82 ^{aA}	0,13 ^{aA}	1,01 ^{aA}	0,46 ^B
<i>Alomia fastigiata</i>	0,56 ^{aA}	0,63 ^{aA}	0,76 ^{aA}	0,85 ^{aA}	0,85 ^{aA}	3,06 ^{bC}	1,12 ^B
<i>Cordia verbenacea</i>	0,32 ^{aA}	0,35 ^{aA}	0,44 ^{aA}	0,58 ^{aA}	0,77 ^{aA}	2,11 ^{bB}	0,76 ^B
Padrões							
α -pineno	0,13 ^{aA}	0,20 ^{aA}	0,30 ^{aA}	0,53 ^{aA}	0,57 ^{aA}	0,75 ^{aA}	0,41 ^B
β -pineno	0,31 ^{aA}	0,31 ^{aA}	0,35 ^{aA}	0,35 ^{aA}	0,54 ^{aA}	1,46 ^{aB}	0,55 ^B
ρ -cimeno	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,03 ^{aA}	0,00 ^A
limoneno	0,00 ^{aA}	0,03 ^{aA}	0,09 ^{aA}	0,29 ^{aA}	0,33 ^{aA}	0,33 ^{aA}	0,18 ^A
1,8-cineol	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,13 ^{aA}	0,17 ^{aA}	0,37 ^{aA}	0,37 ^{aA}	0,16 ^A
cânfora	0,03 ^{aA}	0,10 ^{aA}	0,23 ^{aA}	0,36 ^{aA}	0,36 ^{aA}	0,50 ^{aA}	0,27 ^A
γ -terpineno	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,00 ^A
α -terpineol	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,00 ^A
linalol	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,64 ^{aA}	0,11 ^A
safrol	0,01 ^{aA}	0,11 ^{aA}	1,31 ^{bA}	2,32 ^{bB}	4,77 ^{cC}	22,58 ^{dF}	5,18 ^D
carvacrol	10,63 ^{aC}	18,15 ^{bC}	31,84 ^{cC}	44,51 ^{dD}	58,30 ^{eE}	83,83 ^{fH}	41,21 ^G
timol	20,73 ^{ad}	27,26 ^{bd}	39,64 ^{cd}	49,91 ^{dE}	61,82 ^{eF}	84,88 ^{fH}	47,37 ^H
metil-eugenol	0,15 ^{aA}	0,81 ^{aA}	0,91 ^{aA}	2,01 ^{bB}	4,62 ^{cC}	26,98 ^{dG}	5,91 ^E
E-cariofileno	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,00 ^{aA}	0,17 ^{aA}	0,47 ^{aA}	0,11 ^A
α -bisabolol	0,01 ^{aA}	0,29 ^{aA}	0,69 ^{aA}	0,84 ^{aA}	0,88 ^{aA}	11,62 ^{bE}	2,39 ^C
Média geral	2,06 ^a	3,06 ^b	5,06 ^c	7,18 ^d	9,34 ^e	16,66 ^f	

Médias seguidas pela mesma letra minúscula na mesma linha e pela mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem significativamente pelo teste de Scott-Knott ($p = 0,05$).

Tabela 4 Valores de IC₅₀ para as atividades antioxidantes dos óleos essenciais e de seus constituintes majoritários pelos três ensaios empregados.

Composto	Ensaio Antioxidante		
	β -caroteno/ácido linoléico	TBARS	DPPH
	IC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	IC ₅₀ (mg mL^{-1})	IC ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Óleos essenciais			
<i>Ocotea odorifera</i>	64,97 ^{cde}	--	---
<i>Lippia sidoides</i>	4,23 ^h	14,27 ^{ab}	86,71 ^a
<i>Mikania glauca</i>	111,85 ^{ab}	--	---
<i>Alomia fastigiata</i>	79,21 ^c	--	---
<i>Cordia verbenacea</i>	39,97 ^{def}	--	---
Monoterpenos			
α -pineno	116,79 ^a	--	---
β -pineno	-	--	---
ρ -cimeno	-	--	---
limoneno	-	--	---
1,8-cineol	-	--	---
cânfora	-	--	---
γ -terpineno	11,25 ^{fgh}	8,51 ^b	---
α -terpineol	-	--	---
linalol	-	--	---
Fenilpropanoides			
safrol	66,86 ^{cd}	--	---
carvacrol	3,85 ^h	3,25 ^b	71,95 ^b
timol	6,76 ^{gh}	9,21 ^b	59,85 ^c
metil-eugenol	82,41 ^{bc}	39,20 ^a	---
Sesquiterpenos			
E-cariofileno	36,27 ^{efg}	--	---
α -bisabolol	-	--	---
Padrões			
Ácido ascórbico	71,43 ^c	2,43 ^b	4,43 ^e
α -tocoferol	<0,15	0,78 ^b	8,47 ^d
BHT	<0,15	2,65 ^b	7,57 ^d

- Compostos que apresentaram valores de IC₅₀ maiores que 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ -- Compostos que apresentaram valores de IC₅₀ maiores que 40 mg mL^{-1} --- Compostos que apresentaram valores de IC₅₀ maiores que 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$

Médias seguidas pelas mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey (P = 0,05)

Pelos resultados apresentados na Tabela 4, observa-se que perante os três ensaios utilizados, o óleo essencial de *L. sidoides* foi o que apresentou maior atividade antioxidante, apresentando os menores valores de IC₅₀ em todos os ensaios. No ensaio do β-caroteno/ácido linoléico, o óleo essencial de *L. sidoides* foi o que apresentou maior atividade antioxidante, juntamente com os compostos γ-terpineno, carvacrol e timol (Figura 1).

No ensaio que avalia a atividade antioxidante perante a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, o único óleo essencial que teve seu valor de IC₅₀ inferior a 40 mg mL⁻¹ foi o óleo essencial de *L. sidoides*, com IC₅₀ igual a 14,27 mg mL⁻¹; no entanto, esse valor não diferiu estatisticamente dos demais valores de IC₅₀ apresentados pelo γ-terpineno, carvacrol, timol, metileugenol (Figura 1) e os padrões antioxidantes. No ensaio de redução do DPPH, o valor de IC₅₀ para esse óleo essencial foi de 86,71 μg mL⁻¹, valor menor que os apresentados pelo carvacrol, timol (Figura 1) e os padrões antioxidantes.

De acordo com os resultados apresentados, pode-se afirmar que os óleos essenciais ricos em terpenos apresentaram melhores valores para a atividade antioxidante perante o ensaio de oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico. Resultados semelhantes a esses foram encontrados por Hussain et al. (2008), que avaliaram a atividade antioxidante do óleo essencial de *Ocimum basilicum* de acordo com a variação sazonal pelas metodologias do β-caroteno/ácido linoleico e do DPPH. Eles observaram que esses óleos essenciais apresentaram atividade antioxidante significativas apenas perante ao ensaio do β-caroteno/ácido linoleico. Pelos dados das análises qualitativas, esses óleos mostraram-se ricos em linalol (monoterpeno oxigenado) (Figura 1), que apresentou valor de IC₅₀ de 16,4 μg mL⁻¹, diferindo dos valores determinados neste trabalho, para os óleos essenciais ricos em compostos terpênicos, que foram de 39,97, 79,21 e 111,85 μg mL⁻¹ para os óleos essenciais de *C. verbenacea*, *A. fastigiata* e *M. glauca*,

respectivamente. Estudos de Sarikurkcu et al. (2009) demonstraram que óleo essencial de *Vitex agnus-castus* na concentração de 1,0 mg mL⁻¹ apresentou atividade antioxidante de 1,38% perante o ensaio do DPPH; empregando-se o ensaio do β -caroteno/ácido linoleico na concentração de 2,0 mg mL⁻¹, sua atividade foi de 86,17%. Esse óleo essencial também mostrou-se rico em terpenos, possuindo como constituintes majoritários o α -pineno (10,60%) e o 1,8-cineol (24,98%) (Figura 1).

Recentemente, Ebrahimabadi et al. (2010) avaliaram a atividade antioxidante do óleo essencial de *Stachys inflata* e de seus constituintes majoritários linalol (28,55%) e α -terpineol (9,45%) (Figura 1) pelos dois ensaios, de redução do radical estável DPPH e pela proteção da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico. Pelo ensaio de redução do DPPH, o óleo essencial não apresentou atividade antioxidante; no ensaio β -caroteno/ácido linoléico, a atividade foi de 25,01% , valor menor que o apresentado pelo BHT (87,59%), mas suficiente para mostrar que, no ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, os óleos essenciais ricos em terpenos apresentam atividades superiores àquelas apresentadas pelos mesmos óleos, quando avaliadas pelo ensaio de redução do radical estável DPPH. Segundo Sacchetti et al. (2005), os óleos essenciais ricos em terpenos apresentam maior atividade antioxidante perante o ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico devido à sua especificidade por compostos lipofílicos. Porém, isso não explica os valores significantes das atividades antioxidantes encontradas para o óleo essencial de *L. sidoides* e seu constituinte majoritário carvacrol (Figura 1), que se trata de um composto fenólico.

Segundo Huang, Ou e Prior (2005), no ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, ocorre a transferência de um átomo de hidrogênio para o radical peroxil formado pela oxidação do ácido linoleico, convertendo-o em um hidroperóxido; dessa forma, a molécula de β -caroteno permanece intacta,

uma vez que esse ensaio é baseado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno causada pelo ataque de radicais resultantes da oxidação do ácido linoléico, por espécies reativas de oxigênio presentes no meio (JAYAPRAKASHA et al., 2007; MOON; SHIBAMOTO, 2009). Safaei-Ghomi et al. (2009) relatam que compostos contendo átomos de hidrogênio em carbonos alílicos e/ou benzílicos apresentam melhores atividades neste teste, devido à relativa facilidade de abstração do átomo de hidrogênio desses grupos pelos radicais peroxil formados nas circunstâncias do teste (Figura 2). Dessa maneira, pode-se afirmar que a capacidade antioxidante de compostos fenólicos perante esse ensaio deve-se às suas capacidades de doação de átomos de hidrogênio, e que a atividade apresentada por terpenos que contenham carbonos alílicos pode estar relacionada à afinidade do ensaio por compostos lipofílicos e à capacidade deles em doar um átomo de hidrogênio. Entretanto, a capacidade de doação de átomos de hidrogênios não explica as atividades apresentadas por terpenos que não possuam carbonos alílicos.

A atividade antioxidante apresentada pelo óleo essencial de *O. odorifera* e pelos seus constituintes majoritários safrol e metil-eugenol (Figura 1), no ensaio de oxidação de sistema β -caroteno/ácido linoléico, estão de acordo com os resultados encontrados por Zhang et al. (2006) para o óleo essencial de *Petroselinum crispum*, que apresentou IC_{50} igual a $5,12 \text{ mg mL}^{-1}$ utilizando essa mesma metodologia. Após fracionamento do óleo essencial, essa atividade foi atribuída aos compostos miristicina e apiol, fenilpropanoides que apresentam grupos metoxila em sua estrutura; assim como o metil-eugenol (Figura 1), tal atividade foi relacionada à capacidade de doação de elétrons dos grupos metoxila, podendo ser aumentada devido à presença do anel benzênico. No entanto, Miranda et al. (2000) sugeriram que o aumento da atividade antioxidante de compostos com grupos metoxilas pode estar relacionado com aumento da lipofilicidade dos compostos, devido à presença desses grupos,

aumentando a concentração desses compostos em meios lipofílicos. A atividade antioxidante apresentada pelo metil-eugenol perante a inibição da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico pode ser explicada por esse fato.

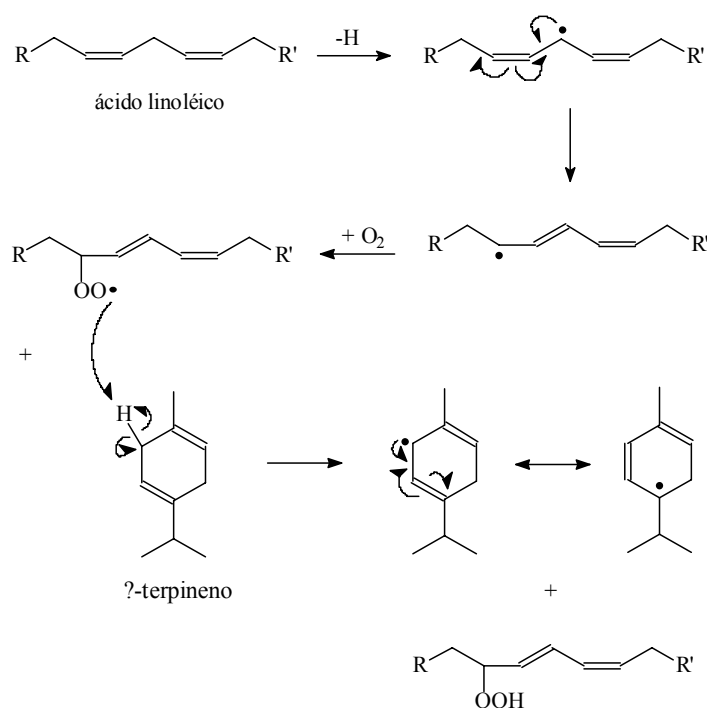


Figura 2 Mecanismo de formação de um radical peroxil, seguido pela sua neutralização por um terpeno contendo átomos de carbonos alílicos (γ -terpineno)

A baixa atividade antioxidante apresentada pelo ácido ascórbico encontra-se de acordo com os resultados apresentados por Kulisic et al. (2004), que justificam tal efeito afirmando que compostos polares ficam mais concentrados na fase aquosa da emulsão, e conseqüentemente, mais diluídos na fase lipídica, sendo, dessa forma, menos efetivos na proteção do β -caroteno.

Para o autor, este ensaio, que avalia a oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, é mais indicado para investigação da atividade antioxidante de compostos lipofílicos, podendo ser utilizada para óleos essenciais. Por outro lado, compostos muito polares que apresentam baixas atividades perante esse teste podem ter sua atividade antioxidante avaliada por outros ensaios.

Os resultados encontrados no ensaio de redução do DPPH demonstram a existência da atividade antioxidante apenas para compostos que apresentam alta capacidade de doar um elétron, como compostos fenólicos. A atividade apresentada pelo óleo essencial de *L. sidoides* nesse ensaio pode ser justificada pelo alto teor de carvacrol presente nesse óleo essencial.

Bozin et al. (2006), avaliando a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Ocimum basilicum*, *Origanum vulgare* e *Thymus vulgaris*, também pelo ensaio de redução do DPPH, encontraram valores de IC_{50} para as atividades antioxidantes desses óleos iguais a 0,39, 0,17, 0,19 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Esses valores foram menores que o valor apresentado pelo BHT (5,37 $\mu\text{g mL}^{-1}$), evidenciando a significativa atividade antioxidante desses óleos essenciais, que pelas análises qualitativas, demonstraram a presença dos fenilpropanóides estragol (45,8 %) no óleo essencial de *O. basilicum*, carvacrol (61,3 %) no óleo essencial de *O. vulgare* e timol (47,9%) no óleo essencial de *T. vulgaris*. Chizzola et al. (2008), avaliando atividade antioxidante de vários quimiotipos de *T. vulgaris*, observaram que os quimiotipos ricos em timol foram os que apresentaram maiores atividades antioxidantes, quando comparadas às atividades encontradas para os quimiotipos em que os óleos essenciais apresentavam maiores teores de terpenos, como α -terpineol, geraniol e sabineno hidratado.

Rebelo et al. (2009) demonstraram a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Conocarpus scoparioides*, encontrando valores de EC_{50} de 46,7 e 56,1 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os óleos essenciais extraídos de folhas frescas e secas,

respectivamente. Todos os valores encontrados mostraram-se significativos, pois foram apenas duas vezes maior que o encontrado para o BHT ($19,8 \mu\text{g mL}^{-1}$); ambos os óleos apresentaram o timol e o timol metil éter como constituintes majoritários. Outro estudo que avaliou atividade antioxidante de óleo essencial rico em composto fenólico foi realizado por Safaei-Ghomi et al. (2009), com o óleo essencial de *Thymus caramanicus* e de seu constituinte majoritário carvacrol diante das metodologias do DPPH e β -caroteno. Os autores encontraram valores de IC_{50} de 263,09, 448,05 e de $19,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo essencial, carvacrol e BHT, respectivamente. Para o ensaio DPPH, também encontram valores de atividade antioxidante relevantes, e frente ao ensaio β -caroteno/ácido linoléico, os valores encontrados foram de $79,03 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo essencial, $50,18 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o carvacrol e de 98,26 para o BHT. Observaram que o óleo essencial apresentou melhor atividade antioxidante que o seu constituinte majoritário carvacrol em ambos os testes, atribuindo tal efeito à provável ocorrência de um efeito sinérgico devido à presença de seus constituintes minoritários que somam 15 % do óleo essencial.

De acordo com Ebrahimabadi et al. (2010), a redução do DPPH pode ocorrer via transferência de um átomo de hidrogênio ou por um mecanismo de transferência de elétrons por parte do composto antioxidante. Isso explica os altos valores de atividades antioxidantes apresentados pelos compostos carvacrol, timol e os óleos essenciais ricos nesses compostos, uma vez que esses compostos podem doar o átomo de hidrogênio da hidroxila fenólica, formando um radical fenólico, que pode ser estabilizado pela ressonância com os elétrons π do anel aromático (HIDALGO et al., 2009) (Figura 3).

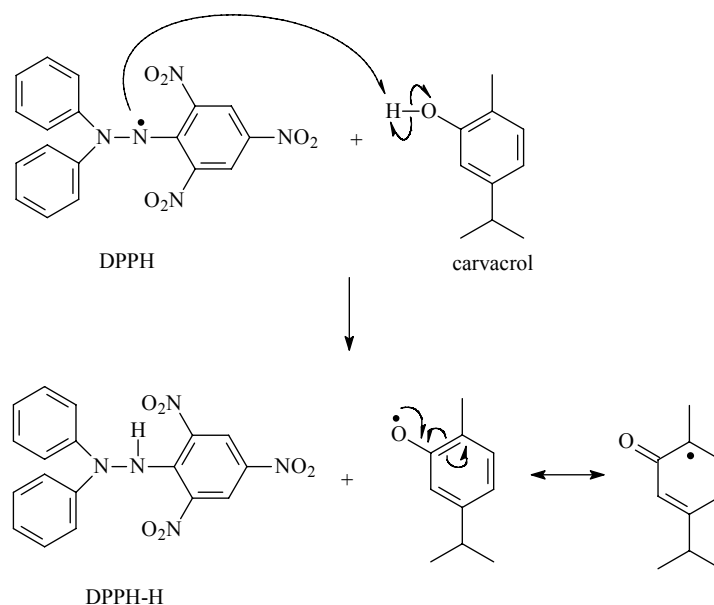


Figura 3 Mecanismo de redução do DPPH por compostos fenólicos

Por outro lado, a baixa atividade observada pelos compostos terpênicos pode ser explicada pelo fato de eles não serem capazes de doar um átomo de hidrogênio, além da baixa solubilidade apresentada por esses compostos no meio reacional do ensaio de redução do DPPH, uma vez que esse utiliza o metanol ou o etanol como solvente. Para Viuda-Matos et al. (2009), esses fatores podem ser considerados como a principal limitação desse ensaio para avaliar a atividade antioxidante de amostras lipofílicas, como muitos óleos essenciais.

Os valores maiores encontrados para os antioxidantes ácido ascórbico, α -tocoferol e BHT, diante o ensaio de redução do DPPH, podem estar relacionados com o maior número de hidroxilas fenólicas presentes em suas estruturas, uma vez que quando maior o número delas na estrutura do composto antioxidante, mais moléculas de DPPH podem ser reduzidas (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSSET, 1995).

Perante a metodologia que avalia a atividade antioxidante pela inibição da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), todos os óleos essenciais podem ser considerados antioxidantes (Tabela 2); no entanto, o óleo essencial que apresentou maior atividade foi de *L. sidoides* (54,29 %), seguido pelos óleos de *O. odorifera* (45,55%), *M. glauca* (46,95%), *C. verbenacea* (36,96%) e *A. fastigiata* (26,56%). O único óleo essencial que apresentou valor de IC₅₀ menor que 50 mg mL⁻¹ foi o óleo essencial de *L. sidoides*, que teve seu valor de IC₅₀ estatisticamente igual aos valores apresentados pelos compostos, timol, carvacrol e γ -terpineno, e os antioxidantes ácido ascórbico, BHT e α -tocoferol (Tabela 4). Esses resultados corroboram com aqueles descritos por Kulisic et al. (2004), que não encontraram diferenças entre a atividade antioxidante apresentada pelo óleo essencial de *O. vulgare*, e suas frações ricas em compostos que possuem os grupos CHO e CH em suas estruturas, como os compostos timol e carvacrol. Resultados semelhantes também foram encontrados por Viuda-Martos et al. (2009), com os óleos essenciais de tomilho, orégano, cravo-da-índia, sálvia, alecrim e os antioxidantes ácido ascórbico e BHT.

A alta atividade antioxidante apresentada pelo hidrocarboneto monoterpênico, γ -terpineno, diante do ensaio TBARS, está de acordo com os resultados encontrados por Ruberto e Baratta (2000), que utilizando a mesma metodologia, avaliaram a atividade antioxidante de quase 100 compostos puros que normalmente são encontrados nos mais diversos óleos essenciais. Entre os compostos avaliados, citam-se aqueles considerados com maior atividade antioxidante, como os hidrocarbonetos monoterpênicos γ -terpineno, α -terpineno e terpinoleno que, na concentração de 1000 ppm, apresentaram 79,5, 71,5 e 64,6% de atividade antioxidante, respectivamente. Outros compostos que também apresentaram atividade antioxidante significativas foram os fenilpropanoides timol e carvacrol, com valores de 55,7 e 69,9%,

respectivamente. Tais atividades foram atribuídas à presença de grupos metilênicos nas estruturas dos hidrocarbonetos terpênicos, e à capacidade de doação de um átomo de hidrogênios pelos compostos timol e carvacrol.

Comparando a atividade antioxidante dos compostos timol e carvacrol (Tabela 4), observa-se que, apesar de esses compostos serem isômeros, o carvacrol apresentou maior atividade nos ensaios do β -caroteno/ácido linoleico e de redução do DPPH que o timol, resultados que corroboram com os encontrados por Ruberto e Baratta (2000) e por Bozin et al. (2006), que também relatam maiores atividades do carvacrol, quando comparadas às do timol.

Os resultados apresentados encontram-se de acordo com os apresentados por Ruberto e Baratta (2000), demonstrando que compostos com capacidade de doação de átomos de hidrogênio, como compostos fenólicos e compostos com a presença de grupos alílicos, como alguns monoterpenos, podem atuar satisfatoriamente, prevenindo a oxidação primária de compostos lipídicos.

Diante dos resultados encontrados, não se pode estabelecer uma relação entre a estrutura dos compostos e sua atividade antioxidante de acordo com a metodologia utilizada, principalmente devido a possíveis reações de produtos resultantes do meio reacional do ensaio com um outro composto presente no ensaio. Para os óleos essenciais, a dificuldade em estabelecer uma correlação entre a atividade antioxidante e os seus componentes é ainda maior devido à sua complexa composição, além da possível ocorrência de sinergismo, antagonismo e aditividade entre os componentes minoritários. Citam-se também a possível influência de outros fatores, tais como concentração, temperatura, luz, tipo de substrato e estado físico do sistema, sobre o ensaio antioxidante utilizado (TOMAINO, 2005; VIUDA-MARTOS, et al., 2009).

No entanto, de uma maneira geral, pode-se concluir que óleos essenciais ricos em terpenos apresentam maior atividade antioxidante perante o ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, ao passo que, aqueles que

possuem compostos fenólicos como constituintes majoritários, apresentam altas atividades antioxidantes perante este ensaio e também perante os ensaios de redução do DPPH e de formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico. Óleos essenciais ricos em alguns terpenos que possuem grupos metilênicos em suas estruturas, como o γ -terpineno, também apresentam atividade antioxidante relevante perante ao ensaio que avalia a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico.

4 CONCLUSÕES

O óleo essencial de *L. sidoides* apresentou maior atividade antioxidante, com os menores valores de IC₅₀ em todos os ensaios. Essa atividade deve-se ao carvacrol, seu constituinte majoritário.

No ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, o óleo essencial de *L. sidoides* apresentou atividade antioxidante igual à apresentada pelos compostos γ -terpineno, carvacrol e timol.

No ensaio que avalia a atividade antioxidante perante a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico, a atividade antioxidante apresentada pelo óleo essencial de *L. sidoides* foi igual à atividade apresentada pelos compostos γ -terpineno, carvacrol, timol, metileugenol e os padrões antioxidantes.

Perante o ensaio de redução do DPPH, os compostos que apresentaram a maior atividade antioxidante foram o carvacrol, timol e os padrões antioxidantes.

Os óleos essenciais apresentaram variações em relação à sua atividade antioxidante de acordo com a metodologia empregada, evidenciando a influência da metodologia utilizada sobre a sua atividade antioxidante.

REFERÊNCIAS

ATOUI, A. K. et al. Tea and herbal infusions: their antioxidant activity and phenolic profile. **Food Chemistry**, London, v. 89, n. 1, p. 27-36, Jan. 2005.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2001. 144 p.

BOTTERWECK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHM, R. A. 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. 599-605, July 2000.

BOZIN, B. et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 4, p. 1822-1828, Feb. 2006.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-wissenschaft und-Technologie**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, Jan. 1995.

CHIZZOLA, R.; MICHITSCH, H.; FRANZ, C. Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: comparison of different extracts and essential oil chemotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 21, p. 6897-6904, Nov. 2008.

CRUZ, C. D. **Programa Genes (versão Windows):** aplicativo computacional em genética e estatística. Viçosa, MG: UFV, 2009. 648 p.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, abr./jun. 2006.

EBRAHIMABADI, A. H. et al. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. **Food Chemistry**, London, v. 119, n. 2, p. 452-458, Mar. 2010.

- EDER, K. The effects of a dietary oxidized oil on lipid metabolism in rats. **Lipids**, Champaign, V. 34, n. 7, p. 717-723, July 1999.
- FERREIRA, D. F. análises estatísticas por meio do sisvar para windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.
- GUIMARÃES, L. G. L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) STAPF). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 1476-1480, nov./dez. 2007.
- HIDALGO, M. E. et al. Antioxidant capacity of eugenol derivatives. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1467-1470, nov./dez. 2009.
- HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, Mar. 2005.
- HUSSAIN, A. I. et al. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activities of basil (*Ocimum basilicum*) essential oils depends on seasonal variations. **Food Chemistry**, London, v. 108, n. 3, p. 986-995, June 2008.
- 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.
- KINSELLA, J. E. et al. Possible mechanism for the protective role of antioxidants in wine and plant foods. **Food Technology**, Chicago, v. 47, n. 4, p. 85-89, Apr. 1993.
- KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, London, v. 85, n. 4, p. 633-640, May 2004.
- 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, jul./set. 2001.

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.

MIRANDA, C. L. et al. Antioxidant and prooxidant actions of prenylated and nonprenylated chalcones and flavanones in vitro. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 9, p. 3876-3884, Sept. 2000.

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

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

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

REBELO, M. M. et al. Antioxidant capacity and biological activity of essential oil and methanol extract of *Conoclinium scoparioides* (Cham. & Schltdl.) Benth. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 20, n. 6, p. 1031-1035, nov./dez. 2009.

ROGINSKI, V.; LISSI, E. A. Review of methods to determine chain-breaking antioxidant activity in food. **Food Chemistry**, London, v. 92, n. 2, p. 235-254, Sept. 2005.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, London, v. 69, n. 1, p. 167-174, May 2000.

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.

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.

SARIKURKCU, C. et al. Studies on the antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of *Vitex agnus castus* L. fruits from Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, n. 10, p. 247-2483, Oct. 2009.

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

TOMAINO, A. et al. Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, London, v. 89, n. 4, p. 549-554, Mar. 2005.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a mediterranean diet. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 25, n. 1, p. 13-19, Jan./Feb. 2009.

WANG, W. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. **Food Chemistry**, London, v. 108, n. 3, p. 1019-1022, June 2008.

ZHANG, H. et al. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. **Food Reserch International**, Amsterdam, v. 39, n. 8, p. 833-839, Oct. 2006.

CAPÍTULO 4

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE
LIPPIA SIDOIDES CHAM., *ALOMIA FASTIGIATA* (GARDNER)
BENTH, *OCOTEA ODORIFERA* (VELL.) ROHWER, *MIKANIA GLAUCA*
MART., *CORDIA VERBENACEA* D. C. E DOS COMPOSTOS
CARVACROL, 1,8-CINEOL E TRANS-CARIOFILENO**

RESUMO

O tomateiro é suscetível a inúmeros fitopatógenos. Entre eles, diversos gêneros, espécies, subespécies e patovares de bactérias fitopatogênicas são responsáveis por doenças nessa solanácea, assumindo um papel de importância na cultura, uma vez que podem limitar a sua produção. Tendo em vista as atividades antibacterianas apresentadas por diversos óleos essenciais, objetivou-se avaliar essas atividades nos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Mikania glauca* Mart. e *Cordia verbenacea* (verbenaceae), sobre as fitobactérias *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*. As plantas foram coletadas no município de Itumirim-MG e os óleos essenciais de suas folhas, extraídos por hidrodestilação, utilizando-se um aparelho de Clevenger modificado. As análises das atividades antibacterianas dos óleos essenciais estudados foram realizadas utilizando a metodologia de Difusão em Cavidade Ágar. O óleo essencial de *L. sidoides* foi capaz de inibir o crescimento de todos os micro-organismos estudados, apresentando os menores valores de CMI: 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sobre *C. michiganensis* e *P. syringae* e 15,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sobre *X. vesicatoria*, sendo capaz de inibir o crescimento tanto de bactérias Gram-positivas como Gram-negativas. O carvacrol, constituinte majoritário do óleo essencial de *L. sidoides*, também apresentou alta atividade anti-bacteriana, com CMI igual a 3,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sobre todas as três bactérias estudadas, possivelmente sendo responsável pela atividade apresentada pelo óleo essencial de *Lippia sidoides*. As bactérias *Clavibacter michiganensis* e *Xanthomonas vesicatoria* foram as mais sensíveis aos óleos essenciais, sendo a *Pseudomonas syringae* a mais resistente à ação deles. Com este trabalho, demonstrou o potencial do óleo essencial de *L. sidoides* e de seu constituinte majoritário, carvacrol, como agentes antibacterianos sobre essas três bactérias fitopatogênicas.

Palavras-chave: Óleos essenciais. Tomateiro. Bactérias fitopatogênicas. Atividades antibacterianas.

ABSTRACT

The tomato is susceptible to numerous pathogens. Among these, various genera, species, subspecies and pathovars of phytopathogenic bacteria are responsible for diseases in this solanaceous and assume an important role in our culture, since they can limit production. In view of the antibacterial activities presented by several essential oils, the activities of the essential oils from *Lippia sidoides* Cham., *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Mikania glauca* Mart. and *Cordia verbenacea* (Verbenaceae) against the phyto-bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria* and *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* were determined. Plants were collected in the municipality of Itumirim, MG, and the essential oils were extracted from the leaves by steam distillation using a modified Clevenger apparatus. Analyses of the antibacterial activities of the essential oils were studied using the method of Agar Diffusion in Cavity. The essential oil from *L. sidoides* was inhibited the growth of all the microorganisms studied and presented the lowest MIC values: 7.81 mg mL⁻¹ against *C. michiganensis* and *P. syringae* and 15.62 g mL⁻¹ with *X. vesicatoria*. It inhibited the growth of both Gram-positive and Gram-negative bacteria. Carvacrol, the principal constituent of the essential oil from *L. sidoides*, also presented a high antibacterial activity with a MIC equal to 3.9 mg mL⁻¹ against all three bacteria, possibly being responsible for the activity presented by the essential oil of *Lippia sidoides*. *Clavibacter michiganensis* and *Xanthomonas vesicatoria* bacteria were the most sensitive to the essential oils, and *Pseudomonas syringae* was the most resistant. This study demonstrated the potential of the essential oil from *L. sidoides* and its major constituent, carvacrol, as antibacterial agents against these three pathogenic bacteria.

Keywords: Essential oils. Tomato. Phytopathogenic bacteria. Antibacterial activities.

1 INTRODUÇÃO

A cultura do tomate é afetada por inúmeros fitopatógenos, tendo sido identificados e descritos mais de duzentos, sendo necessária a utilização de grandes quantidades de agrotóxicos nas plantações, a maioria prejudicial aos ecossistemas, além de seus resíduos nos frutos serem uma ameaça à saúde humana (BARRETO; SCALOPPI, 2000). Diversos gêneros, espécies, subespécies e patovares de bactérias fitopatogênicas são responsáveis por doenças em solanáceas, assumindo um papel de importância na cultura do tomateiro, uma vez que podem limitar sua produção. Segundo Marques et al. (1994), no Brasil já foram registradas, infectando naturalmente o tomateiro, as bactérias *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* e *carotovora*, *Erwinia chrysanthemi*, *Pseudomonas corrugata*, *Pseudomonas marginalis* pv. *marginalis*, *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*, *Ralstonia solanacearum* e *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria*. Entre essas, as principais causadoras de doenças na cultura são: *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*, causadora do cancro-bacteriano, *Xanthomonas vesicatoria*, causadora da mancha-bacteriana, e a *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato*, causadora da pinta-bacteriana.

O cancro-bacteriano é uma doença inexpressiva para o tomateiro industrial, devido à sua baixa incidência. Porém, é uma doença de elevada importância na cultura do tomateiro estaqueado, uma vez que pode destruir grande parte da plantação (KIMATI et al., 2005). A pinta-bacteriana nas folhas do tomateiro ocasiona lesões escuras de 2-3 mm de diâmetro, geralmente circundadas por halos cloróticos, podendo haver a formação de manchas necróticas escuras, e lesões superficiais, escuras e puntiformes (MALAVOLTA JUNIOR et al., 2002). Segundo Jones et al. (2000), a mancha-bacteriana é considerada a doença mais importante do tomateiro, sendo de ocorrência em

condições de elevada umidade e precipitação e de temperaturas entre 20 e 30°C. A mancha-bacteriana pode afetar todos os órgãos da parte aérea da planta. Nas folhas, apresentam pequenas áreas de tecido encharcado, de forma circular ou irregular, que mais tarde necrosam. Nos frutos, os sintomas iniciam-se com pequenas áreas encharcadas, que depois necrosam e aumentam de tamanho, provocando lesões deprimidas ou levemente salientes. No entanto, a doença não leva a planta à morte, mas pode causar baixa produtividade e frutos de má qualidade (KIMATI et al., 2005).

Em geral, as atividades biológicas dos óleos essenciais são bem documentadas, principalmente no que diz respeito às atividades microbiológicas. Vários estudos têm sido realizados avaliando suas atividades frente a diversos tipos de micro-organismos. Como deterioradores de alimentos, patógenos e fitopatógenos, revelando o potencial de determinados óleos essenciais no controle de tais micro-organismos. De acordo com Cox, Mann e Markham (2001), o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (“tea tree”) é considerado um potente antisséptico, sendo largamente utilizado na Austrália. Os compostos com maior atividade bactericida purificados desse óleo foram o γ -terpineno, α -terpineol, terpinen-4-ol e o linalol com CMI (concentrações mínimas inibitórias), variando de 0.125-0.25% v/v. Kordali, Kotan e Cakir (2007) avaliaram as atividades de vários monoterpenos oxigenados sobre a inibição do crescimento micelial de 31 fungos fitopatogênicos e encontraram valores de inibição para o β -citronelol e para o nerol superiores aos apresentados pelo fungicida Benomil®, demonstrando o potencial desses compostos como agentes fungicidas. Outro monoterpeno que apresentou atividade antimicrobiana foi o 1,8-cineol, encontrado no óleo essencial de *Artemisia asiatica* e considerado como o maior agente anti-*Staphylococcus* presente nesse óleo, com uma CMI de 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Esse também foi ativo contra espécies Gram-negativas, tais como

Escherichia coli e *Pseudomonas aeruginosa*, ambas com CMI de 3 $\mu\text{L mL}^{-1}$ (KALEMBA; KUSEWICZ; SWIADER, 2002).

Sahin et al. (2004) pesquisaram os efeitos antimicrobianos e antioxidantes dos óleos essenciais de cravo-da-índia e de orégano, óleos ricos em eugenol e carvacrol, respectivamente, e comprovaram a eficácia deles em bactérias e fungos, dos gêneros *Escherichia*, *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Aspergillus*, *Fusarium*, *Penicillium* e *Rhizoctonia*. Oussalah et al. (2007) avaliaram a atividade antibacteriana de óleos essenciais de diversas plantas ricas em eugenol, timol, carvacrol, linalol e neral, nas concentrações 0,003, 0,006, 0,013, 0,025, 0,05, 0,1, 0,2, 0,4 % sobre o crescimento de *Escherichia coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, e observaram que todos os óleos essenciais apresentaram influência, em determinada concentração, sobre o crescimento das bactérias.

Avaliando o efeito fungitóxico de 37 óleos essenciais sobre *Fusarium verticillioides*, *F. proliferatum* e *F. graminearum*, Velluti et al. (2004) encontraram atividade fungitóxica para os óleos de orégano (*Origanum vulgare*), cinamomo (*Melia azedarach*) e cravo-da-índia (*Syzygium aromaticum*). Atribuíram essa atividade ao eugenol, composto majoritário dos óleos essenciais de cravo-da-índia e cinamomo, e ao carvacrol, composto majoritário do óleo essencial de orégano. Pereira (2006) cita o eugenol como sendo um excelente agente antimicrobiano, pois avaliando o efeito inibitório dos óleos essenciais de *Cymbopogon citratus*, *Origanum vulgare* e *Syzygium aromaticum* sobre as bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, concluiu que o efeito apresentado por esses óleos provavelmente foi devido à presença dos seus compostos majoritários citral, terpen-4-ol e eugenol, respectivamente.

Apesar de haver um grande número de trabalhos em que se avalia e comprovam as atividades de diversos óleos essenciais sobre micro-organismos, poucos estudos foram realizados avaliando a atividade deles sobre bactérias

fitopatogênicas. Diante disso, com o presente trabalho objetivou-se avaliar as atividades bacterianas dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Mikania glauca* Mart. e *Cordia verbenacea* D. C., sobre as fitobactérias *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*, *Xanthomonas vesicatoria* e *Pseudomonas syringae* pv. *tomato*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

As folhas de *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae), *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth (Asteraceae), *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae), *Mikania glauca* Mart. (Asteraceae) e *Cordia verbenacea* (verbenaceae) foram coletadas no mês de outubro de 2007, no período da manhã, no município de Itumirim – Minas Gerais/Brasil. O material coletado foi encaminhado para o Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Química – UFLA, para a extração dos óleos essenciais.

2.2 Extração dos óleos essenciais

Para extração dos óleos essenciais, empregou-se a metodologia de hidrodestilação, utilizando-se um aparelho de Clevenger modificado acoplado a um balão de fundo redondo. As folhas frescas de cada espécie vegetal foram picadas, colocadas no balão e recobertas com água, sendo o processo de extração realizado em um período de 2 horas, mantendo a solução em ebulição (GUIMARÃES et al., 2007). Foram utilizados balões de fundo redondo de 4 litros de capacidade. O hidrolato coletado foi centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal a 965,36 x g por cinco minutos. Posteriormente, o óleo essencial foi retirado com uma pipeta de Pasteur e acondicionado em frasco de vidro âmbar escuro em baixa temperatura e ao abrigo da luz.

2.3 Avaliação da atividade bacteriana *in vitro*

As análises das atividades bacterianas dos óleos essenciais estudados foram realizadas no Laboratório de Bacteriologia do Departamento de Fitopatologia da UFPA, utilizando a metodologia de Difusão em Cavidade Ágar (LIMA, 2008). Foram utilizados os isolados de *C. michiganensis* subsp. *Michiganensis* (*Cmm*), *Xanthomonas vesicatoria* (*Xv*) e *Pseudomonas syringae* pv. *Tomato* (*Pst*). As bactérias foram preservadas em ultra freezer e, posteriormente, inoculadas em plantas de tomateiro, para comprovar sua virulência. As folhas e as hastes que apresentaram sintomas foram utilizadas como fonte de inóculo para *X. vesicatoria*, *P. syringae* e *C. michiganensis*, respectivamente, para a realização dos ensaios. Os isolamentos das bactérias foram feitos a partir de materiais vegetais previamente infectados pela técnica de estrias paralelas, utilizando o meio MB1 como meio de cultura (KADO; HESKETT, 1970; ALFENAS; MAFIA, 2007). As bactérias foram cultivadas no mesmo meio por 24 horas a 28 °C, antes do preparo do inóculo. As suspensões bacterianas foram ajustadas em espectrofotômetro para $A_{600} = 0,30$, correspondendo aproximadamente a 5×10^8 UFC mL⁻¹ para *Xv* (LUCAS, 2009); $A_{560} = 0,10$, correspondendo aproximadamente a 8×10^8 UFC mL⁻¹ para *Cmm* (LABARRIOS et al., 2004); e $A_{540} = 0,20$, correspondendo aproximadamente a 5×10^8 UFC mL⁻¹ para *Pst* (SILVA et al., 2008).

Adicionou-se uma fina camada de meio de cultura MB1 às placas de Petri de 15 cm de diâmetro e, após a solidificação foram colocadas esferas de vidro previamente esterilizadas sobre ele. Alíquotas das suspensões bacterianas foram adicionadas a 20 mL de meio (MB1) semi-sólido, de maneira a obter uma concentração final de 10^8 UFC mL⁻¹; em seguida, verteu-se o meio semi-sólido contendo a suspensão bacteriana sobre a camada sólida contendo as pérolas de vidro. Após solidificação, as esferas de vidro foram retiradas com pinças estéreis

para a formação dos “slots” de 0,4 mm, nos quais foram adicionados 10 μL das soluções dos óleos essenciais diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO). As soluções foram preparadas em escala logarítmica, nas proporções de 1:1, 1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128 (óleo essencial/solvente), obtendo-se concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90 $\mu\text{L mL}^{-1}$. As placas foram armazenadas em geladeira 5 °C por duas horas e, posteriormente, incubadas por 48 horas a 28 °C em BOD, antes da verificação da presença e medição dos diâmetros dos halos. Além dos óleos essenciais, tiveram suas atividades bacterianas avaliadas os compostos 1,8-cineol, carvacrol e trans-cariofileno.

2.4 Delineamento estatístico

As análises foram realizadas em triplicadas, obtendo, assim, os valores médios da concentração mínima inibitória [(CMI), (concentração mínima dos óleos essenciais, em que as bactérias não apresentaram crescimento visível de colônias)] (BURT, 2004). As placas foram dispostas de maneira inteiramente casualizadas, sendo os valores dos diâmetros dos halos de inibição do crescimento bacteriano submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste de Tukey (5%), utilizando o programa Sisvar (FERREIRA, 2000).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O óleo essencial de *L. sidoides* apresentou os menores valores de CMI (Tabela 1), sendo capaz de inibir o crescimento *in vitro* de todos os isolados bacterianos avaliados. Entre as espécies estudadas, *P. syringae* pv tomato foi a mais resistente, tendo seu crescimento inibido apenas pelo óleo essencial de *L. sidoides* e seu constituinte majoritário carvacrol. Os outros óleos essenciais foram capazes de inibir o crescimento de *C. michiganensis* e *X. vesicatoria*; no entanto, apresentaram maiores valores de CMI que os apresentados pelo óleo essencial de *L. sidoides*.

Tabela 1 Concentração mínima inibitória CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de óleos essenciais sobre o crescimento *in vitro* de *Clavibacter michiganensis* sudsp. *Michiganensis* (*Pmm*), *Pseudomonas syringae* pv. tomato (*Pst*) e *Xanthomonas vesicatoria* (*Xv*).

Gram	CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	<i>Cmm</i>	<i>Pst</i>	<i>Xv</i>
	+	-	-
Óleos essenciais			
<i>Lippia sidoides</i>	7,81	7,81	15,62
<i>Alomia fastigiata</i>	62,5	NO	500
<i>Ocotea odorifera</i>	62,5	NO	31,25
<i>Mikania glauca</i>	31,25	NO	500
<i>Cordia verbenacea</i>	15,62	NO	62,5
Padrões			
Carvacrol	3,9	3,9	3,9
1,8-cineol	NO	NO	500
<i>E</i> -cariofileno	500	NO	NO

NO = inibição não observada

Os valores de CMI dos óleos essenciais permitem inferir que a bactéria Gram-positiva *C. michiganensis* foi a mais sensível perante a ação deles. Os compostos 1,8-cineol e trans-cariofileno não apresentaram atividades significativas sobre nenhuma das bactérias estudadas.

Em vários trabalhos relata-se que bactérias Gram-positivas são mais susceptíveis à atividade de óleos essenciais que bactérias Gram-negativas. Lima (2008), estudando a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Myristica fragrans* e *Salvia microphylla* sobre diversas bactérias, observou maiores atividades dos mesmos sobre as bactérias Gram-positivas. Tepe et al. (2005), avaliando a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Salvia tomentosa*, observaram a ausência de atividade desse óleo sobre os micro-organismos Gram-negativos estudados, *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. A *Escherichia coli*, bactéria Gram-negativa foi o micro-organismo mais resistente à ação desses óleos essenciais, sendo o de *Myristica fragrans*; que apresentou valor de CMI de 250,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e o de *Salvia microphylla* que não foi capaz de inibir o seu crescimento em nenhuma das concentrações utilizadas. Santos et al. (2008), avaliando a atividade bacteriana do óleo essencial de *Hyptis pectinata* sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, encontraram maior atividade sobre bactérias Gram-positivas, sendo necessárias doses mais elevadas para causar efeito sobre as bactérias Gram-negativas.

Todas as bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa, a qual faz com que elas tenham uma superfície hidrofílica devido à presença de moléculas de lipopolissacarídeos. Porém, pequenos solutos hidrofílicos são capazes de passar por essa membrana externa por meio de poros hidrofílicos formados por canais de proteínas de membranas. Dessa maneira, considera-se que a membrana externa sirva como uma barreira de penetração para macromoléculas e compostos hidrofóbicos, e é por essa razão que bactérias Gram-negativas são relativamente resistentes a antibióticos e outras drogas

hidrofóbicas, assim como os óleos essenciais (MANN; COX; MARKHAM, 2000; NIKAIDO, 1996;). No entanto, a atividade antibacteriana sobre bactérias Gram-negativas apresentadas por compostos, como o carvacrol, podem ser justificadas pela capacidade desses compostos hidrofóbicos de chegarem ao citoplasma dessas bactérias, passando pelos poros de proteínas presentes em sua membrana externa (HELANDER et al., 1998).

Os resultados encontrados para o óleo essencial de *C. verbenacea* corroboram com aqueles apresentados por Carvalho et al. (2004), os quais pesquisaram a atividade do óleo essencial de *Cordia verbenacea* sobre várias bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e leveduras e observaram uma inibição de 88,80% sobre as Gram-positivas, 93,30% sobre leveduras, e sobre as Gram-negativas, apresentou atividades apenas sobre três cepas de *Proteus mirabilis* e uma de *Proteus vulgaris*.

Fontenelle et al. (2007) já haviam demonstrado atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. sidoides* sobre dez cepas de *Malassezia canis*, cinco de *Candida albicans* e três de *Candida tropicalis*, revelando sua potencialidade como agente no controle microbiano. A alta atividade apresentada pelo óleo de *L. sidoides* deve-se à presença do carvacrol em sua constituição. Em muitos trabalhos relatam-se as atividades antimicrobianas desse composto e de seu isômero timol. A não seletividade apresentada por esse composto diante das bactérias Gram-negativas e Gram-positivas corroboram com trabalhos de Bozin et al. (2006), que avaliaram as atividades antimicrobianas dos óleos essenciais de *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris* e *Ocimum vulgare* sobre cinco cepas de bactérias Gram-positivas e oito de bactérias Gram-negativas, como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, entre outras. Os óleos essenciais de *O. vulgare* e *T. vulgaris* apresentaram atividade sobre o crescimento bacteriano de todas as bactérias avaliadas. Essa atividade foi atribuída aos compostos carvacrol e timol, encontrados nas concentrações de 76,24 % no óleo de *O.*

vulgare e 55,17 % no óleo de *T. vulgaris*. Os maiores valores de atividade apresentados pelo óleo de *O. vulgare* foram justificados pelo maior teor de carvacrol apresentado (61,32 %). Por outro lado, o óleo essencial de *O. basilicum*, que apresentou teor de carvacrol de 0,33 % e ausência de timol, foi o que apresentou menor atividade antibacteriana.

Os três micro-organismos estudados foram resistentes ao 1,8-cineol, divergindo de trabalhos em que se demonstrou a atividade bacteriana desse composto, como aqueles realizados por Moorey e Canillac (2002), que avaliaram a atividade bacteriostática e bactericida dos monoterpenos α e β -pineno, (R e S)-limoneno, 1,8-cineol e borneol frente à *Listeria monocytogenes*, e observaram o efeito bactericida do 1,8-cineol, quando presente na concentração de 0,375% sobre esse micro-organismo.

Apesar de em muitos estudos demonstrar-se a atividade antibacteriana de muitos óleos essenciais, pouco se sabe a respeito do seu mecanismo de ação e de seus compostos isolados. Vários trabalhos relatam uma possível interação com a membrana celular. De acordo com Sikkema, Bont e Poolman (1995), a permeabilidade de membranas celulares é dependente da hidrofobicidade dos solutos que estão em sua volta e da sua composição. Segundo Lambert et al. (2001), o coeficiente de partição do óleo essencial na membrana celular é de fundamental importância para sua efetividade, fato que está relacionado às variações nas atividades dos óleos essenciais frente à diferentes bactérias, principalmente no que diz respeito às bactérias com diferentes tipos de Gram.

Cox, Mann e Markham (2000) demonstraram a capacidade do óleo essencial de melaleuca em alterar a estrutura da membrana celular de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Candida albicans*, tornando-a permeável a compostos que normalmente não são capazes de passar por membranas normais. Sikkema, Bont e Poolman (1994) demonstraram que, devido às características lipofílicas, os monoterpenos possuem maior afinidade

com a parte interna das membranas do que com a fase aquosa que as envolve. Concomitantemente, a maior afinidade desses compostos pelo interior das membranas celulares resulta na sua expansão, aumentando a sua fluidez e alterando a atividade de suas proteínas de membrana. Gustafson et al. (1998), examinando células de *Escherichia coli* expostas ao óleo essencial de melaleuca, com microscopia eletrônica de transmissão, confirmaram as alterações na membrana celular causadas pelos compostos presentes nesse óleo essencial, demonstrando a perda de material eletro-denso pela membrana e coagulação de alguns constituintes citoplasmáticos. Resultados semelhantes foram encontrados por Lucas (2009), que visualizando células de *Xanthomonas vesicatioia* tratadas com os óleos essenciais de cravo-da-índia, capim-limão, citronela e melaleuca, por meio de microscopia eletrônica de transmissão (MET), detectaram a ocorrência de degradação da parede celular, seguida da perda de material eletro-denso, bem como alteração na densidade citoplasmática em todas as células bacterianas.

Grupos polares e apolares presentes no anel aromático de compostos presentes no óleo essencial, ou no composto isolado, podem influenciar sua atividade biológica. Segundo Sikkema, Bont e Poolman (1995), a presença de grupos hidroxilas presentes no eugenol e carvacrol podem aumentar a solubilidade dessas moléculas na suspensão aquosa e, conseqüentemente, sua capacidade de passar através da porção hidrofílica da membrana celular. Ultee, Kets e Smid (1999), estudando o mecanismo de ação do carvacrol sobre *Bacillus cereus*, demonstraram a capacidade desse composto em interagir com a membrana desse micro-organismo, alterando sua permeabilidade para cátions H^+ e K^+ e diminuindo a concentração intracelular de ATP. Para esses autores, a dissipação do gradiente de íons leva ao comprometimento dos processos essenciais na célula e, finalmente, à morte celular.

Lambert et al. (2001), avaliando a influência do óleo essencial de orégano e de seus constituintes majoritários timol e carvacrol sobre a integridade da membrana, demonstraram a perda de íons e a diminuição do pH interno das células de *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*. De acordo com esses mesmos autores, tanto o óleo essencial quanto seus constituintes majoritários causam danos à membrana celular, atuam sobre os ácidos nucleicos intracelulares e causam a perda de potássio e fosfato das células desses micro-organismos.

Gill e Holley (2006a) demonstraram que o eugenol e o carvacrol causaram perturbação à membrana citoplasmática de *Escherichia coli* e *Laetobacillus sakei*, aumentando a sua permeabilidade. Isso foi confirmado pelo aumento de ATP extracelular e decréscimo de ATP intracelular, além de causarem a diminuição da motilidade dessas bactérias por meio da diminuição do movimento dos flagelos, devido à dissipação do gradiente de prótons da membrana. O eugenol e o carvacrol foram capazes de inibir ATPases vinculadas às membranas de *Escherichia coli* e de *Listeria monocytogenes* (GILL; HOLLEY, 2006b).

Di Pasqua et al. (2006), avaliando a influência dos compostos timol, carvacrol, limoneno, cinamaldeído e eugenol sobre o perfil de ácidos graxos constituintes da membrana celular de *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* serovar *typhimurium*, *Pseudomonas fluorescens*, *Brochothrix thermosphacta* e *Staphylococcus aureus*, constataram alterações substanciais no perfil de ácidos graxos apresentados pela membrana celular de *Escherichia coli*. Na presença de limoneno, cinamaldeído, carvacrol e eugenol, observaram uma diminuição na concentração de ácido palmítico e aumento nas concentrações dos ácidos linoleico, docosanoico e eicosapentaenoico. Sobre os perfis de ácidos graxos das membranas dos outros micro-organismos estudados, observaram alterações

menos significativas que as observadas sobre a membrana celular de *Escherichia coli*.

Burt et al. (2007) observaram que o carvacrol causou a diminuição na produção de flagelina e induziu a formação de proteínas de choque térmico, as quais são produzidas pelas células bacterianas quando ela se encontra sob estresse causado pela presença de compostos tóxicos. Consequentemente, ocorreu a ausência de flagelos e a falta de motilidade das células.

4 CONCLUSÕES

Entre os óleos essenciais avaliados, o óleo de *L. sidoides* foi o que apresentou os menores valores de CMI ($7,81-15,62 \mu\text{g mL}^{-1}$) perante todas as bactérias estudadas.

O carvacrol inibiu tanto bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas, apresentando um valor de CMI igual a $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente a todas as bactérias.

P. syringae pv. tomato foi o micro-organismo mais resistente à ação dos óleos essenciais. Seu crescimento foi inibido apenas pelo óleo essencial de *L. sidoides* e pelo carvacrol.

REFERÊNCIAS

ALFENAS, A. C.; MAFIA, R. G. **Métodos em fitopatologia**. Viçosa, MG: UFV, 2007. 382 p.

BARRETO, M.; SCALOPPI, E. G. Sistemas de previsão de hortaliças. In: ZAMBOLIN, L. **Manejo integrado-doenças, pragas e plantas daninhas**. Viçosa, MG: Suprema, 2000. p. 169-186.

BOZIN, B. et al. Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 5, p. 1822-1828, Mar. 2006.

BURT, S. A. et al. Carvacrol induces heat shock protein 60 and inhibits synthesis of flagellin in *Escherichia coli* O157:H7. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 73, n. 14, p. 4484-4490, July 2007.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods: a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

CARVALHO JÚNIOR, P. M. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenaceae* D. C. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 95, n. 2-3, p. 297-301, Dec. 2004.

COX, S. D. et al. The mode of antimicrobial action of the essential oil of melaleuca alternifolia (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, New York, v. 88, n. 1, p. 170-175, Mar. 2000.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Microbiology**, New York, v. 91, n. 3, p. 492- 497, Sept. 2001.

DI PASQUA, R. et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 7, p. 2745-2749, Apr. 2006.

FERREIRA, D. F. análises estatísticas por meio do sisvar para windows versão 4.0. In: REUNIÃO ANUAL DA REGIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Anais...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 255-258.

FONTENELLE, R. O. S. et al. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 59, n. 5, p. 934-940, May 2007.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Disruption of *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes* and *Laetobacillus sakei* cellular membranes by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 108, n. 1, p. 1-9, Apr. 2006a.

GILL, A. O.; HOLLEY, R. A. Inhibition of membrane bound ATPase of *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* by plant oil aromatics. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 111, n. 2, p. 170-174, Sept. 2006b.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) STAPF). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, nov./dez. 2007.

GUSTAFSON, J. E. et al. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 194-198, Mar. 1998.

HELANDER, I. K. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Dublin, v. 46, n. 11, p. 3590-3595, Nov. 1998.

JONES, J. B. et al. Systematic analysis of xanthomonads (*Xanthomonas* spp.) associated with pepper and tomato lesions. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, Reading, v. 50, n. 3, p. 1211-1219, May 2000.

KADO, C. I.; HESKETT, M. G. Selective media for isolation of *Agrobacterium*, *Corynebacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* and *Xanthomonas*. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 60, n. 6, p. 96-97, June 1970.

KALEMBA, D.; KUSEWICZ, D.; SWIADER, K. Antimicrobial properties of the essential oil of *Artemisia asiatica* Nakai. **Phytotherapy Research**, London, v. 16, n. 3, p. 288-291, May 2002.

KIMATI, H. et al. **Manual de fitopatologia: doenças das plantas cultivadas**. 4. ed. São Paulo: Agronômica Ceres, 2005. v. 2, 663 p.

KORDALI, S.; KOTAN, R.; ÇAKIR, A. Screening of antifungal activities of 21 oxygenated monoterpenes in-vitro as plant disease control agents. **Allelopathy Journal**, Haryana, v. 19, n. 2, p. 373-391, Feb. 2007.

LABARRIOS, L. A. A. et al. Detección de *Clavibacter michiganensis* subsp. *nebraskensis* (Schuster, Hoff, Mandel y Lazar) Vidaver y Mandel, usando la reacción en cadena de la polimerasa. **Revista Mexicana de Fitopatología**, México, v. 22, n. 2, p. 239-245, Feb. 2004.

LAMBERT, R. J. W. et al. Astudy of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, New York, v. 91, n. 3, p. 453-462, Sept. 2001.

LIMA, R. K. **Óleos essenciais de *Myristica fragrans* Houtt. e de *Salvia microphylla* H. B. K.:** caracterização química, atividade biológica e antioxidante. 2008. 144 p. Tese (Doutorado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

LUCAS, G. C. **Óleos essenciais no controle da mancha bacteriana do tomateiro**. 2009. 95 p. Dissertação (Mestrado em Fitopatologia) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.

MALAVOLTA JUNIOR, V. A. et al. Caracterização de *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* em tomateiro no Brasil e reação de cultivares/genótipos de tomateiro a esse patovar e ao patovar *tomato*. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 69, n. 1, p. 63-66, jun. 2002.

MANN, C. M.; COX, S. D.; MARKHAM, S. L. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 294-297, Aug. 2000.

MARQUES, A. S. S. et al. **Índice de fitobacterioses assinaladas no Brasil**. Brasília: Embrapa, 1994. 65 p.

MOOREY, A.; CANILLAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control**, Guildford, v. 13, n. 4/5, p. 289-292, May 2002.

NIKAIDO, H. Outer membrane. In: NEIDHARDT, F. C. ***Escherichia coli* and *Salmonella*: cellular and molecular biology**. Washington: American Society for Microbiology, 1996. p. 29-47.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* 0157:H7, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 414-420, May 2007.

PEREIRA, A. A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, set. 2008.

SAHIN, F. et al. Biological activities of the essential oil and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *Vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. **Food Control**, Guildford, v. 15, n. 7, p.549-557, Oct. 2004.

SANTOS, P. O. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Hyptis pectinata* (L.) poit. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 7, p. 1648-1652, 2008.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **Journal of biological Chemistry**, Bethesda, v. 269, n. 11, p. 8022-8028, Mar. 1994.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiology Reviews**, Washington, v. 59, n. 2, p. 201-222, Apr. 1995.

SILVA, J. R. C. et al. Bactérias endofíticas no controle e inibição In vitro de *Pseudomonas syringae* pv tomato, agente da pinta bacteriana do tomateiro. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1062-1072, jul./ago. 2008.

TEPE, B.; DAFERERA, D. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chemistry**, London, v. 90, n. 3, p. 333-340, June 2005.

ULTEE, A.; KETS, E. P. W.; SMID, E. J. Mechanisms of action of carvacrol on the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 65, n. 10, p. 4606-4610, Oct. 1999.

VELLUTI, A. et al. Initial screening for inhibitory activity of essential oils on growth of *Fusarium verticillioides*, *f. proliferatum* and *F. graminearum* on maize-based agar media. **Food Microbiology**, London, v. 21, n. 6, p. 649-656, Dec. 2004.

CAPÍTULO 5

**CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DAS
ESTRUTURAS SECRETORAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *LIPPIA*
SIDOIDES CHAM., *ALOMIA FASTIGIATA* (GARDNER) BENTH,
OCOTEA ODORIFERA (VELL.) ROHWER, *MIKANIA GLAUCA* MART.
E *CORDIA VERBENACEA* D.C.**

RESUMO

Os óleos essenciais são produzidos e acumulam-se em todos os tipos de órgãos vegetais, como flores, folhas, córtex, lenho, raízes, rizomas, frutos e sementes. Todos esses órgãos, em determinada espécie, podem conter óleo essencial, mas sua composição deste pode variar conforme sua localização. A síntese e o acúmulo dos mesmos estão geralmente associados com a presença de estruturas histológicas especializadas, que podem estar presentes nas superfícies externas das plantas, como os tricomas glandulares, ou no interior do corpo da planta, como as células, cavidades e os canais secretores. Com este trabalho, teve-se como objetivo caracterizar morfológicamente e histoquimicamente as estruturas secretoras dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Mikania glauca* Mart. e *Cordia verbenacea* D.C. As folhas das plantas estudadas foram coletadas no município de Itumirim – MG; as análises morfológicas das superfícies externas e das estruturas internas foram feitas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A visualização das estruturas internas foi realizada por meio de cortes transversais com o auxílio de nitrogênio líquido. Para as análises histoquímicas, foram utilizadas folhas frescas, seccionadas à mão livre com lâmina de aço, transversalmente na região da nervura central, sendo coradas com os reagentes Sudan III (lipídios totais) e o reagente de Nadi (terpenos). Nas espécies *L. sidoides*, *C. verbenaceae* e *A. fastigiata*, foram encontrados tricomas glandulares e não glandulares, sendo encontrados tricomas glandulares dos tipos capitado e peltado em *L. sidoides*, capitados dos tipos I e II em *C. verbenacea*, e capitados do tipo I em *A. fastigiata*. A presença de óleos essenciais no seu interior foi confirmada pelas análises histoquímicas. Os tricomas não glandulares tectores foram observados, espalhados pelas superfícies, adaxial e abaxial das folhas dessas três espécies. Não foi observada a presença de tricomas nas superfícies foliar de *M. glauca*, sendo observada a presença de canais e de cavidades secretoras de formato esférico espalhadas por todo o mesofilo foliar. As análises histoquímicas revelaram a presença de óleo essencial no interior dos canais e das cavidades. A espécie *O. odorifera* não apresentou tricomas; de acordo com as análises histoquímicas, o seu óleo essencial encontra-se armazenado em células secretoras presentes em todo o mesofilo.

Palavras-chave: Óleos essenciais. Estruturas histológicas. Tricomas glandulares. Caracterização morfológica. Caracterização histoquímica.

ABSTRACT

The essential oils are produced and accumulate in all types of plant organs such as flowers, leaves, cortex, wood, roots, rhizomes, fruits and seeds. All of these organs may contain the essential oil in certain species, but the composition may vary according to the location. The synthesis and accumulation of these oils are usually associated with the presence of specialized histological structures, which may be present on the external surfaces of plants, such as glandular trichomes, or inside the plant body, such as cells, secretory cavities and channels. This study sought to characterize the secretory structures for essential oils from *Lippia sidoides* Cham., *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Mikania glauca* Mart. and *Cordia verbenacea* DC morphologically and histochemically. The leaves of the plants studied were collected at Itumirim, MG, and the morphological analysis of the external surfaces and internal structures were accomplished by scanning electron microscopy (SEM). The visualization of the internal structures was performed by means of cross sections with the aid of liquid nitrogen. For histochemical analysis, fresh leaves, sectioned freehand across the midrib region with a steel blade, were used. They were stained with Sudan III reagent (total lipids) and the Nadi reagent (terpenes). Glandular and non-glandular trichomes were found in the *L. sidoides*, *C.verbenacea* and *A. fastigiata* species. Capitate and peltate types were found in *L. sidoides*. The I and II capitate types were found in *C. verbenacea*, and the type I capitate in *A. fastigiata*. The presence of essential oils within these trichomes was confirmed by histochemical analysis. The non-glandular trichomes were observed scattered over all the adaxial and abaxial surfaces of the leaves of these three species. The presence of trichomes on leaf surfaces of *M. glauca* was not observed, while the presence of channels and spherical secretory cavities scattered throughout the leaf mesophyll were revealed. The histochemical analysis revealed the presence of essential oil in the interior of the canals and cavities. The *O. odorifera* species presented no trichomes; according to the histochemical tests, the essential oil is stored in secretory cells present throughout the mesophyll.

Keywords: Essential oils. Histological structures. Glandular trichomes. Morphological characterization. Histochemical characterization.

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são produzidos e acumulam-se em todos os órgãos vegetais, e a sua composição pode variar conforme as características fisiológicas e ambientais e mesmo o processo de hidrodestilação (PINTO et al., 2007; PEREIRA et al., 2008). A síntese e o acúmulo dos óleos essenciais estão geralmente associados com a presença de estruturas secretoras especializadas. Segundo Svoboda e Greenaway (2003), essas estruturas são divididas em estruturas de secreção internas (cavidades e os canais secretores) e externas (tricomas glandulares).

As células secretoras diferem das demais células do mesófilo, pela morfologia e composição química (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). As cavidades secretoras são estruturas que podem ser formadas pelo afastamento das células (esquizogenia) ou pela apoptose (lisigenia) e diferenciação de um epitélio (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009). Os tricomas glandulares são estruturas que podem ser encontradas nas folhas, caules e flores. De acordo com Combrick et al. (2007), há dois tipos morfológicos de tricomas glandulares, que podem ser distinguidos como capitado (com pedúnculo alongado e cabeça secretora) ou peltado (sem pedúnculo ou com pedúnculo reduzido), descrições semelhantes à publicada por (SVOBODA; HAMPSON; HUNTER, 1999). Bisio et al. (1999) classificam os tricomas capitados em: tipo I (apresentam cabeças unicelulares arredondadas e cabeças bicelulares); e em tipo II (possuem cabeça unicelular em forma de pera).

De acordo com a distribuição e a estrutura dos tricomas presentes na epiderme das plantas, eles podem apresentar funções de proteção contra herbívoros, controlar a temperatura das folhas e a perda de água (Bosabalidis, 2002; Kolb & Muller, 2004). A anatomia foliar das plantas pode variar de acordo com os fatores ambientais (REZENDE et al., 2008). De acordo com

Liakoura et al. (1997), a presença de compostos fenólicos presentes nessas estruturas protegem a planta contra os danos causados pela radiação UV-B. A alta densidade de tricomas glandulares demonstrou um aumento na repelência de ácaros em microtomateiros (MALUF et al., 2007), e a densidade de tricomas possui relação direta com a produção de zingibereno nessa espécie (GONÇALVES et al., 2006).

O conhecimento sobre a anatomia foliar de plantas medicinais é uma valiosa contribuição para a correta identificação das espécies estudadas (Perrota & Arambarri, 2004), sendo estudos dessa natureza essenciais para o manejo e conservação das espécies nativas medicinais (COLLARES; ARAMBARRI, 2008) bem como para a compreensão das relações dessas espécies com o ambiente (NASCIMENTO-SILVA; PAIVA, 2007).

Diante da importância biológica e comercial dos óleos essenciais, torna-se necessário um melhor entendimento das estruturas responsáveis pela sua produção, armazenamento e secreção. Sendo assim, objetivou-se caracterizar morfológica e histoquimicamente as estruturas secretoras dos óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Mikania glauca* Mart. e *Cordia verbenacea* D. C.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

As folhas de e ramos férteis destinados à identificação das espécies e preparação de exsicatas de *L. sidoides* Cham. (Verbenaceae), *A. fastigiata* (Gardner) Benth (Asteraceae), *O. odorifera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae), *M. glauca* Mart. (Asteraceae) e *C. verbenacea* (verbenaceae) foram coletadas no município de Itumirim - MG.

As espécies foram devidamente identificadas pela Dra. Mariana Esteves Mansanares, do Departamento de Biologia da UFLA e uma exsicata de cada espécie encontra-se registrada no Herbário ESAL, localizado no Departamento de Biologia da UFLA, com os seguintes números de registros 01943 (*Lippia sidoides*), 01963 (*Alomia fastigiata*), 24931 (*Ocotea odorifera*), 233 (*Mikania glauca*) e 13035 (*Cordia verbenacea*).

2.2 Análises morfológicas

As análises ultraestruturais foram feitas por meio de microscopia eletrônica de avredura (MEV), sendo realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME) do Departamento de Fitopatologia da UFLA, utilizando um microscópio modelo LEO EVO 40.

Foram utilizadas folhas adultas, lavadas em água corrente, e cortadas em dimensões aproximadas de 0,5 x 0,5 cm na região contendo a nervura central. O material foi imerso em solução fixadora de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), pH 7,2, por um período de 24 horas. Em seguida, os fragmentos foram lavados três vezes em tampão cacodilato 0,05 M, por 10 minutos. Em seguida, as seções foram transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio (OsO₄) 1,0%

por 1 hora. Posteriormente, o material foi lavado em água destilada por três vezes e desidratado em soluções aquosas de acetona nas concentrações de 25%, 50%, 75% e 90% e 100%. Após a desidratação, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030 para substituição da acetona por CO₂ e complementação da secagem (ROBARDS, 1978). As amostras obtidas foram montadas em suportes de alumínio *stubs* com fita de carbono sobre uma película de papel-alumínio e cobertos com ouro no evaporador Balzers SCD 050, sendo, em seguida, observados em Microscópio Eletrônico de Varredura.

Para a visualização das estruturas internas, foram feitas secções transversais utilizando nitrogênio líquido. Após a fixação do material em solução de Karnovsky com pH 7,2 por um período de 24 horas, ele foi transferido para solução aquosa de glicerol 30%, permanecendo por 30 minutos. Em seguida, o material foi imerso em nitrogênio líquido e cortado sobre uma superfície metálica resfriada com nitrogênio líquido, sendo posteriormente colocado em solução de tetróxido de ósmio 1,0% em água por 1 hora. A partir desse ponto, foram seguidos os mesmos procedimentos feitos com o material preparado para a observação das estruturas externas.

2.3 Análises histoquímicas

Os estudos anatômicos das estruturas secretoras por microscopia de luz foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal do Departamento de Biologia da UFLA. Folhas frescas foram seccionadas à mão livre com lâmina de aço, transversalmente na região da nervura central (SANTOS et al., 2004). Os cortes obtidos foram colocados em vidro de relógio contendo água destilada. Posteriormente, foram selecionados, e em seguida, os cortes foram distribuídos em vidros de relógio contendo Sudan III para a verificação de lipídeos, cutina e suberina (SOSSAE, 1995) e reagente de Nadi (DAVID; CORDE, 1964) para

detecção de terpenos. Os cortes corados com Sudan III permaneceram imersos nesse reagente por 15 minutos e, em seguida, foram lavados em água destilada. Os cortes corados com reagente de Nadi ficaram imersos nesse reagente por 60 minutos no escuro e, em seguida, foram lavados em tampão fosfato de sódio 0,1 M pH 7,2 por 5 minutos. Depois de corados, os cortes foram montados em lâminas semipermanentes com água glicerinizada. As observações foram feitas no Microscópio de Luz (Leica DMLS) com câmera fotográfica acoplada (Canon PowerShot S40).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas eletromicrografias obtidas por MEV das superfícies foliares de *L. sidoides* (Figura 1), observou-se a presença de tricomas glandulares e não glandulares em ambas as faces, adaxial e abaxial. Entre os tricomas glandulares, encontram-se tricomas capitados do tipo I e tricomas peltados; ambos são encontrados nas superfícies adaxial e abaxial. Os tricomas capitados são mais abundantes em ambas as faces e observa-se maior densidade dessas estruturas na superfície abaxial em relação à adaxial. Os tricomas não glandulares também foram verificados como sendo de dois tipos: o primeiro possui formato cônico, unicelulares e com paredes espessas, apresentando células subsidiárias especiais em torno da base e estando presentes apenas na superfície adaxial; o segundo apresentou-se como tector longo, pluricelular, apresentando maior densidade na superfície abaxial, principalmente sobre as nervuras.

As análises histoquímicas do limbo foliar revelaram a presença de substâncias lipídicas no interior das células das cabeças dos tricomas peltados e capitados pelas reações positivas com os reagentes Sudan III e de Nadi, evidenciando a presença de terpenos (Figura 2). Infere-se, portanto, que o óleo essencial produzido por essa espécie encontra-se armazenado nos vacúolos ou oleossomos das células presentes na cabeça desses tricomas glandulares. Quanto ao seu mecanismo de secreção, nada se pode afirmar, visto que a MEV não revelou a presença de poros ou de membranas rompidas.

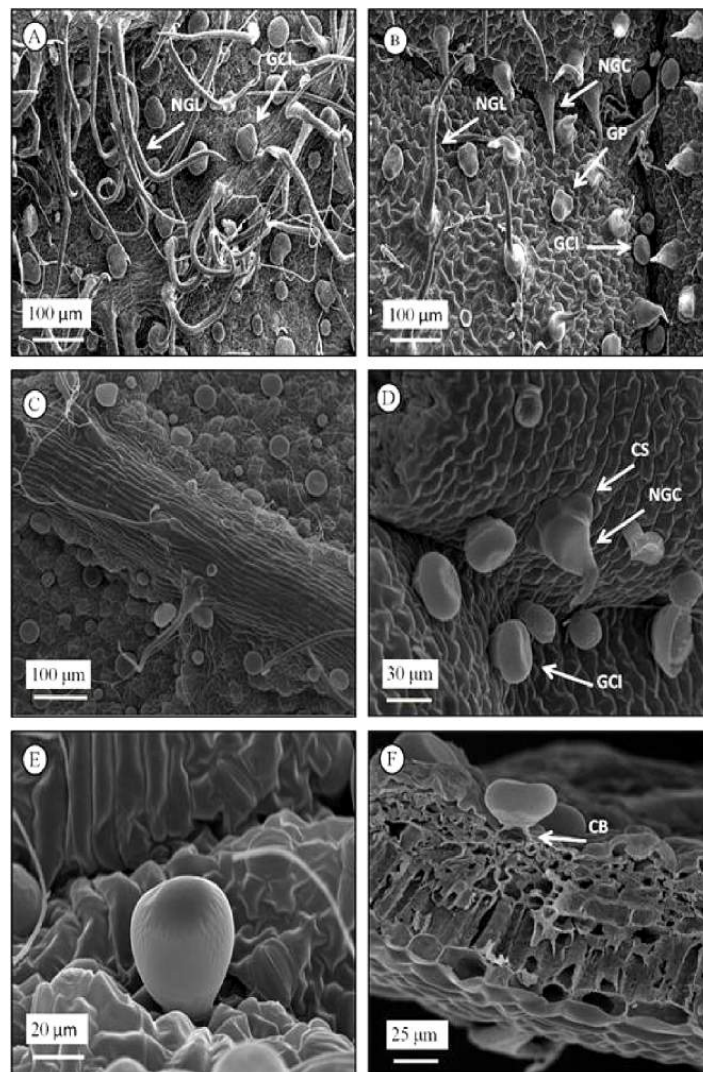


Figura 1 Eletromicrografia de varredura da superfície foliar de *L. sidoides*. A – Tricomas glandulares capitados tipo I (GCI) e tricomas não glandulares tectores longos (NGL) presentes na superfície abaxial. B – Tricomas não glandulares tectores longos (NGL), tricomas não glandulares cônicos (NGC), tricomas glandulares capitados tipo I (GCI) e tricomas glandulares peltados (GP) presentes na superfície adaxial. C – Tricomas não glandulares e glandulares presentes na nervura central na face abaxial. D – Tricoma não glandular cônico (NGC) com células subsidiárias (CS) na base e tricomas glandulares capitados tipo I (GCI). E – tricoma capitado tipo I. F – Seção transversal, com detalhe de uma célula basal (CB) de um tricoma glandular capitado tipo I

Segundo Moura, Isaias e Soares. (2005), muitos autores já demonstraram a secreção de óleos essenciais por meio de tricomas em plantas pertencentes à família Verbenaceae. Combrick et al. (2007), estudando as estruturas secretoras de *Lippia scaberrima*, encontraram estruturas semelhantes às descritas no presente trabalho em pela *L. sidoides*. Os tricomas peltados apresentaram maiores teores de óleo essencial; os capitados, além de compostos lipofílicos, como óleos essenciais, apresentaram compostos hidrofílicos, principalmente compostos fenólicos.

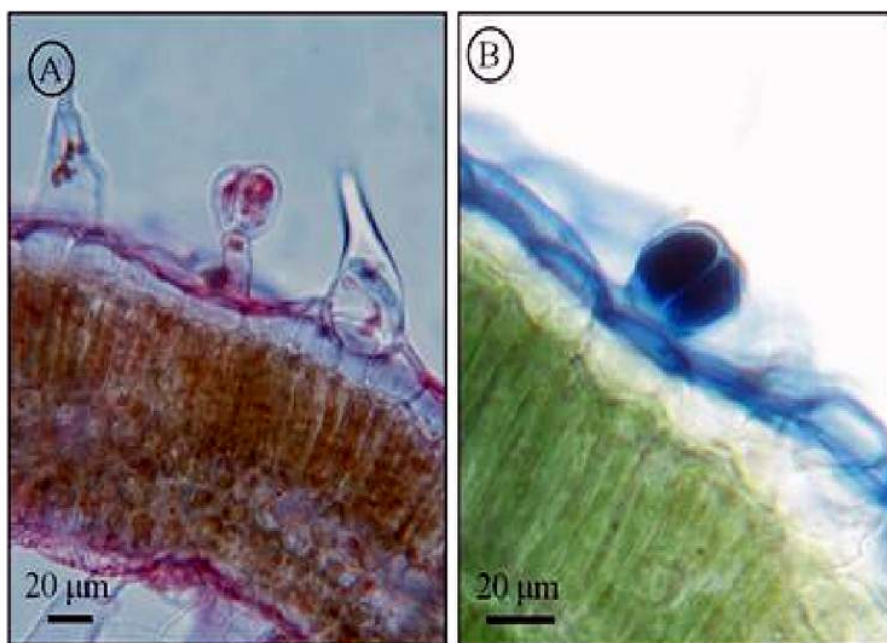


Figura 2 Secções transversais das folhas de *L. sidoides*. A – tricoma capitado tipo I e tricoma não glandular presentes na superfície adaxial, evidenciando a presença de substâncias lipofílicas presentes no interior do tricoma. B – Tricoma capitado tipo I na superfície adaxial, confirmando a presença de terpenos (óleo essencial)

As diferenças na composição química dos tricomas em *L. sidoides* está de acordo com os resultados relatados na literatura para outras espécies. Valenti et al (1997), estudando os tricomas presentes na superfície foliar de *Salvia aurea*, observaram a presença de diversas classes de compostos, como polissacarídeos, polifenóis e proteínas, presentes no material secretado, além do óleo essencial. De acordo com Hallahan (2000), os tricomas geralmente são caracterizados por uma única ou por um tipo predominante de secreção, sendo os peltados caracterizados por serem típicos produtores de óleos essenciais; já os tricomas capitados podem produzir secreções mais complexas, com frações lipofílicas e hidrofílicas. Maggi et al. (2010) demonstraram que a composição do material secretado pelos tricomas glandulares presentes nas folhas de *Melittis melissophyllum* L. subsp. *Melissophyllum* varia de acordo com o tipo de tricoma, sendo os tricomas peltados os maiores sítios de produção e acumulação de óleos essenciais nessa espécie. Nos outros tipos de tricomas (capitados), foram encontradas secreções mais complexas, contendo substâncias hidrofílicas e lipofílicas, havendo também a presença de óleo essencial, porém em menores teores.

As folhas de *C. verbenacea* apresentaram dois tipos de tricomas glandulares e dois tipos de tricomas não glandulares, como pode ser observado nas eletromicrografias de varredura (Figura 3). Os tricomas glandulares apresentados por essa espécie foram ambos capitados, porém dos tipos I e II, estando ambos presentes nas superfícies adaxial e abaxial, havendo a predominância de tricomas capitados do tipo I. Os tricomas capitados do tipo II encontraram-se, em sua maioria, nas regiões intervenais do limbo foliar. Os tricomas não glandulares são semelhantes àqueles apresentados pela *L. sidoides*, com a ocorrência dos tricomas cônicos apenas na superfície adaxial, e de tricomas tectores espalhados por toda a superfície abaxial.

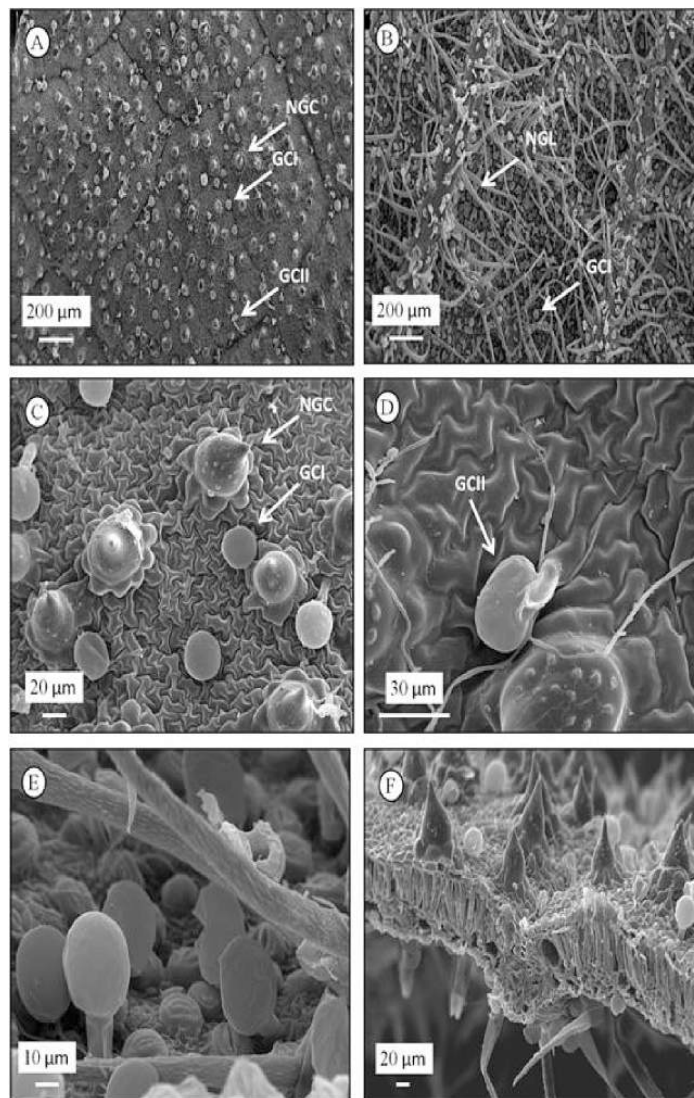


Figura 3 Eletromicrografia de varredura da superfície foliar de *C. verbenacea*. A – Tricomas glandulares capitados tipo I (GCI), capitado tipo II (GCII) e tricomas não glandulares cônicos (NGC) presentes na superfície adaxial. B – Tricomas não glandulares longos (NGL) e tricomas glandulares capitados tipo I (GCI), presentes na superfície abaxial. C – Tricomas não glandulares cônicos (NGC) e tricomas glandulares capitados tipo I (GCI), presentes na superfície adaxial. D – Tricoma glandular capitado tipo II (GCII) sobre a superfície adaxial. E – Tricoma capitado tipo I. F – Seção transversal demonstrando a presença de tricomas não glandulares e glandulares

A presença de óleos essenciais no interior dos tricomas glandulares de *C. verbenacea* foi confirmada pelas análises histoquímicas (Figura 4), que revelaram as reações positivas nas substâncias presentes no interior da cabeça desses tricomas com o reagente Sudan III e o reagente de Nadi, confirmando a presença de substâncias lipídicas e terpênicas, respectivamente.

A maior quantidade de tricomas capitados do tipo I em relação aos tricomas capitados do tipo II também foi observada em trabalhos de Ascensão, Marques e Pais (1995) em plantas de *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). Os resultados apresentados corroboram com estudos realizados por Ventrella e Marinho (2008) sobre a morfologia e a histoquímica dos tricomas presentes no limbo foliar de *C. verbenacea*. Os mesmos autores observaram que os tricomas capitados do tipo II, chamados por eles de tricomas reniformes, também apresentavam cabeça unicelular elipsoidal com pedúnculo longo e curvado, sendo mais abundantes nas regiões intervenais. Esses autores encontraram tricomas não glandulares cônicos, unicelulares, com paredes espessas e enrugadas e porção apical calcificada, apresentando células subsidiárias especiais em torno da base. A presença de óleos essenciais foi verificada por esses autores apenas nos tricomas capitados tipo I, e por meio da reação positiva das substâncias presentes no interior dos tricomas capitados do tipo II com OsO_4 . Atribuíram a esses tipos de tricomas presença de compostos fenólicos, posteriormente identificados como flavonoides.

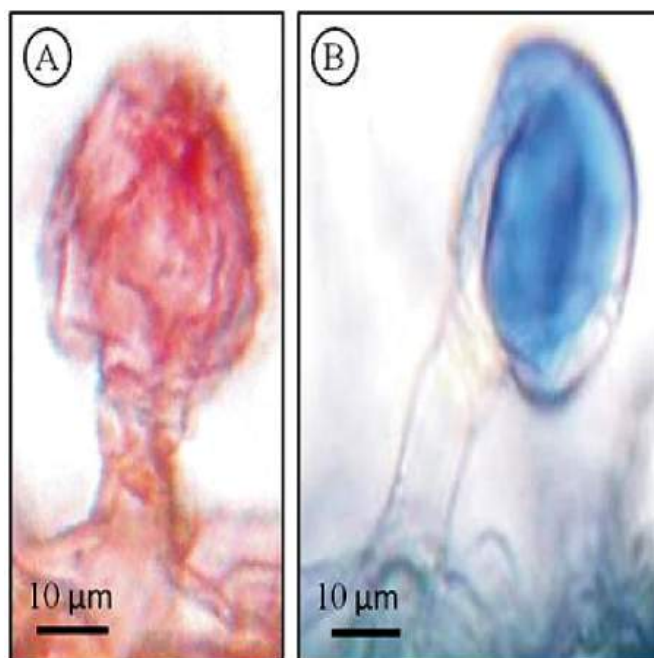


Figura 4 Secções transversais das folhas de *C. verbenacea*. A – tricoma capitado tipo I com reação positiva para o reagente Sudan III, caracterizando a presença de compostos lipídicos. B – Tricoma capitado tipo I com reação positiva para o reagente de Nadi, evidenciando a presença de terpenos (óleo essencial)

A presença de tricomas glandulares e não glandulares nas superfícies foliares de plantas pertencentes à família Verbenaceas é muito comum, assim como a sua diversidade. Isso pode ser observado nos trabalhos de Passos, Meira e Barbosa (2009) com as espécies *Lantana camara* e *Lantana radula*, que apresentaram tricomas glandulares e não glandulares em ambas as superfícies de suas folhas. Esses tricomas são de três tipos: o primeiro, constituído de uma célula basal, pedúnculo curto, e cabeça contendo de duas a oito células; o segundo, apresentando mais de uma célula basal, com pedúnculo curto com duas ou quatro células na cabeça; o terceiro, com duas células basais e uma célula apical dilatada, sendo esse tipo de tricoma encontrado em maior concentração na

face abaxial da superfície celular. Os tricomas não glandulares foram semelhantes aos apresentados pela *C. verbenacea*.

Tricomas glandulares capitados do tipo I e tricomas tectores foram observados espalhados pelas superfícies adaxial e abaxial das folhas de *A. fastigiata*, por meio das análises de MEV (Figura 5). Os tricomas capitados do tipo I encontram-se localizados em pequenas depressões da epiderme, apresentando uma célula basal e pedúnculo curto, podendo apresentar cabeça constituída de uma ou duas células. Os tricomas tectores foram pluricelulares, estando presentes em maiores quantidades no interior de uma depressão formada na face adaxial sobre a nervura central das folhas dessa espécie vegetal. Os testes com os reagentes Sudan III e de Nadi revelaram a presença de substâncias terpênicas no interior dos tricomas capitados do tipo I (Figura 6), demonstrando a sua função de armazenamento e de secreção do óleo essencial produzido por essa espécie. O mecanismo de secreção do óleo essencial apresentado pelos tricomas glandulares capitados presentes nas superfícies foliares está relacionado com a ruptura da cutícula que envolve a cabeça desses tricomas, (Figura 5E).

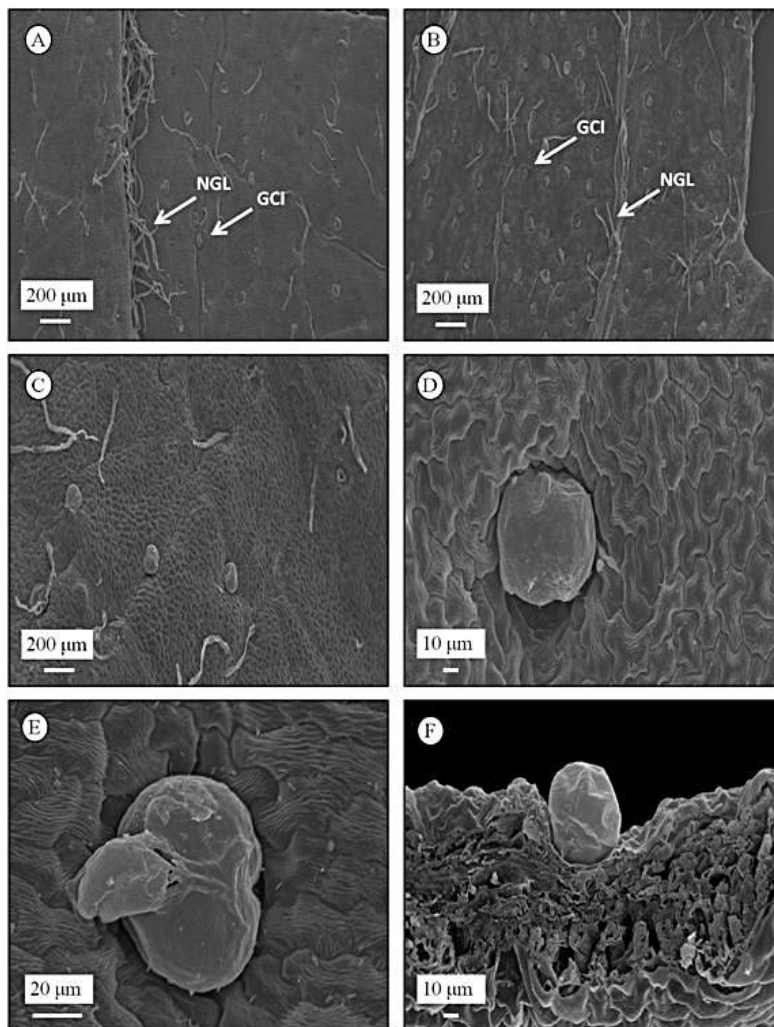


Figura 5 Eletromicrografias de varredura da superfície foliar de *A. fastigiata*. A – Tricomas glandulares capitados tipo I (GCI), e tricomas não glandulares longos (NGL) presentes na superfície adaxial. B – Tricomas glandulares capitados tipo I (GCI), e tricomas não glandulares longos (NGL) presentes na superfície abaxial. C – Tricomas não glandulares longos e tricomas glandulares capitados tipo I presentes na superfície adaxial. D – Tricoma glandular capitado presente em uma pequena depressão na epiderme sobre a superfície adaxial. E – Detalhe do extravasamento de substância por meio da ruptura da cutícula de um tricoma capitado tipo I. F – Seção transversal demonstrando a presença de um tricoma glandular capitado tipo I inserido em uma depressão da epiderme na superfície adaxial

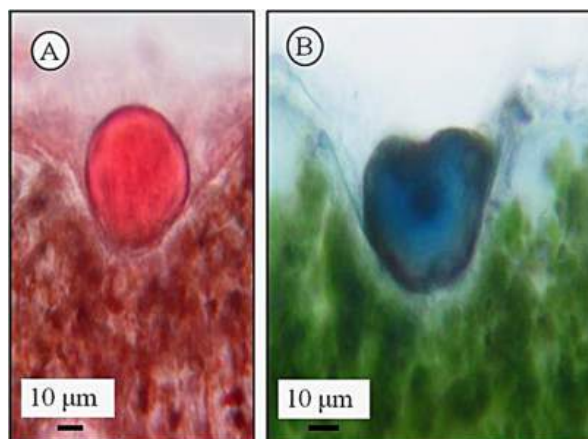


Figura 6 Secção transversal das folhas de *A. fastigiata*. A – Tricoma capitado tipo I inserido em uma depressão epidérmica, com reação positiva para o reagente Sudan III, caracterizando a presença de compostos lipídicos. B – Tricoma capitado tipo I com reação positiva para o reagente de Nadi, evidenciando a presença de compostos terpênicos (óleo essencial)

A presença de tricomas de morfologia semelhante aos presentes em *A. fastigiata*, compostos por uma célula basal, um pedúnculo curto e uma cabeça arredondada e que se encontram presentes em depressões da epiderme é comumente encontrada em plantas pertencentes à família Lamiaceae, como aquelas encontradas por Bisio et al. (1999), em plantas de *Salvia blepharophylla*, e por Marin et al. (2008), em plantas de *Thymus malyi*. Segundo esses autores, essas estruturas são responsáveis pela síntese e secreção do óleo essencial produzido por essas espécies. Tricomas glandulares capitados presentes em depressões epidérmicas também foram encontrados na espécie *Elephantopus mollis* (Asteraceae), por Empinotti e Duarte (2008). Segundo Oliveira et al. (2000), a presença de tricomas glandulares com pedúnculo curto e cabeça pluricelular e bisseriada, inseridos em depressões epidérmicas, são típicos da família Asteraceae.

Não foi observada a presença de tricomas nas superfícies abaxial e adaxial das folhas de *M. glauca*, por meio das imagens obtidas por MEV e pelas imagens das secções foliares obtidas por microscopia de luz. No entanto, as observações das secções transversais obtidas por meio de cortes realizados na presença de nitrogênio líquido, por MEV, demonstraram a presença de canais e de pequenas cavidades de formato esférico, espalhadas por todo o mesófilo foliar (Figura 7).

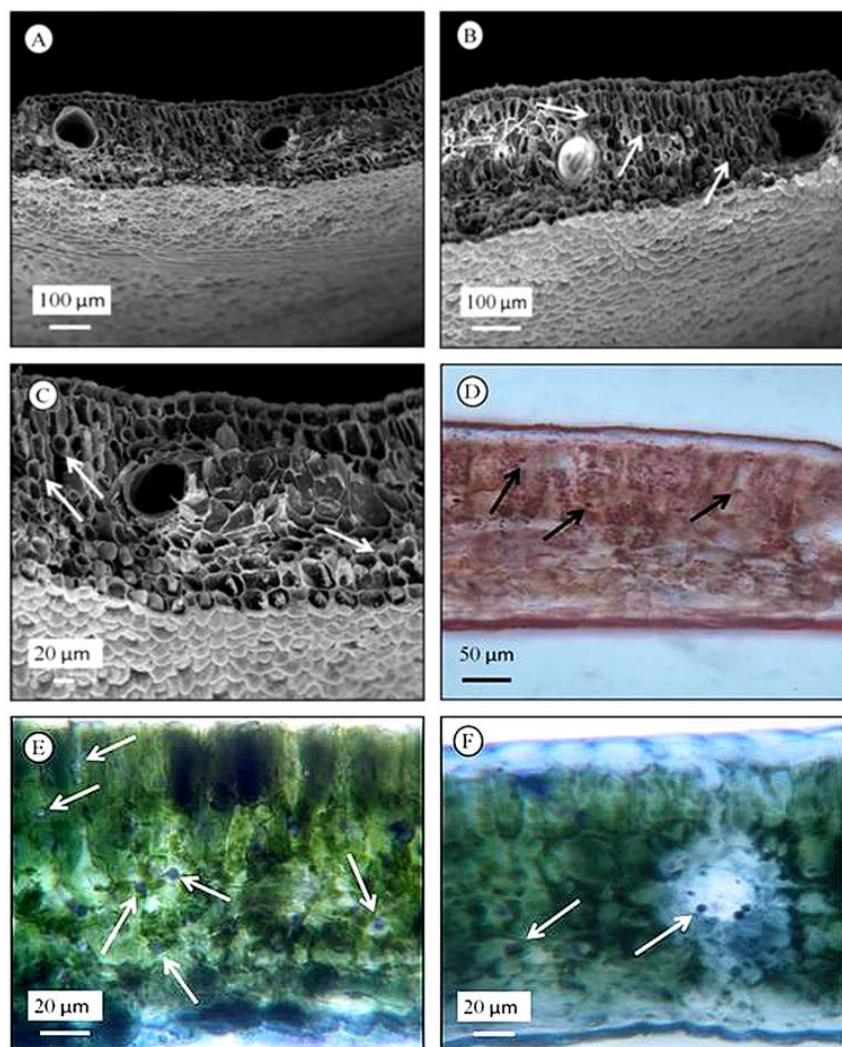


Figura 7 Eletromicrografia de varredura e seções transversais das folhas de *M. glauca*.

A – Canais secretores. B – Células secretoras. C – Detalhe de um canal secretor e de pequenas células secretoras. D – Presença de substâncias lipídicas no interior das células secretoras, evidenciada pela reação positiva frente ao reagente Sudan III. E – Presença de compostos terpênicos no interior das células secretoras, revelada pela reação positiva com o reagente de Nadi. F – Canal secretor com gotículas de compostos terpênicos em seu interior

As análises histoquímicas revelaram reação positiva com o reagente Sudan III, demonstrando pequenas gotas de substâncias lipídicas espalhadas por todo o mesofilo e no interior dos canais secretores (Figura 7). A presença de gotículas de terpenos espalhadas por todo o mesofilo e sobre a superfície interna dos canais secretores pode ser observada por meio da reação positiva com o reagente de Nadi, sugerindo a presença de óleos essenciais no interior das pequenas cavidades espalhadas pelo mesofilo e também no interior dos canais secretores.

Segundo Fahn (1979) e Cury e Appezzato-da-Glória (2009), muitas vezes canais e cavidades podem ser confundidos, sendo os canais secretores, estruturas constituídas por um epitélio secretor que delimita um espaço intercelular alongado, como pode ser visualizado na Figura 7 C, confirmando, dessa maneira, a sua presença no mesofilo foliar de *M. glauca*. A ausência de tricomas glandulares na superfície foliar de *M. glauca* corrobora com os resultados apresentados por Fonseca, Meira e Casali (2006). Santos et al. (2006), estudando as estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* (Anacardiaceae), mostraram a presença de óleos essenciais no interior dos canais secretores, juntamente com outros compostos, como polissacarídeos (mucilagem) e compostos fenólicos (agliconas flavonóidicas). A presença de substâncias lipídicas espalhadas pelo parênquima foi detectada na espécie *Achillea millefolium*, também pertencente à família Asteraceae, sendo essas substâncias identificadas como óleos essenciais (GREGIO; MOSCHETA, 2006).

As espécies *A. fastigiata* e *M. glauca*, pertencentes à família Asteraceae, apresentaram estruturas secretoras muito distintas. No entanto, de acordo com Aguilera, Meira e Ferreira (2004), muitas estruturas secretoras já foram relatadas para essa família, na qual podem ocorrer a presença de hidatódios, nectários, canais, cavidades, idioblastos e diversos tipos de tricomas.

De acordo com as eletromicrografias obtidas por MEV para a canela-sassafrás (*O. odorifera*) (Figura 8), observa-se a ausência de tricomas em ambas as superfícies, sugerindo a presença de estruturas internas responsáveis por armazenar o óleo essencial dessa espécie. A presença dessas estruturas foi confirmada pelas análises histoquímicas, que demonstraram a presença de células oleíferas, perante a reação positiva com o reagente Sudan III, a qual evidencia a presença de substâncias lipídicas. Com o reagente de Nadi, foi possível classificar essas substâncias, como terpenos, podendo, assim, afirmar que são óleos essenciais (Figura 7). Essas células oleíferas também foram observadas por meio das imagens obtidas por MEV das secções transversais, preparadas com o auxílio de nitrogênio líquido (Figura 8), onde é possível visualizar essas células, que se encontram espalhadas por todo o mesofilo foliar, e que são variáveis quanto ao tamanho e à forma, podendo apresentar formatos esférico e elíptico.

A presença de células secretoras em *O. odorifera* corrobora com trabalhos realizados com plantas pertencentes ao mesmo gênero, como os de Farago et al. (2005), relacionados ao estudo da anatomia foliar de *Ocotea puberula*, que revelaram estruturas secretoras de substâncias de natureza lipofílica e mucilaginosas distribuídas por todo o mesofilo; os de Coutinho et al. (2006b), que estudaram a morfoanatomia das folhas de *Ocotea duckei*, verificaram a presença de células secretoras espalhadas por todo o parênquima foliar dessa espécie. Em outro trabalho, envolvendo a anatomia foliar de *Ocotea gardneri*, Coutinho et al. (2006a) encontraram células secretoras de formato arredondado ou elíptico presentes no parênquima, onde as células elípticas eram maiores e localizadas principalmente junto à face adaxial. Toledo, Alquini e Nakashima (2004), estudando os aspectos estruturais das folhas de *O. odorifera*, observaram cavidades oleíferas espalhadas por todo o mesofilo foliar, sendo aquelas localizadas no parênquima paliçádico de morfologia ovalada e as

localizadas no parênquima esponjoso de formado esférico, resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho.

De acordo com Esau (1993), várias famílias apresentam células secretoras com conteúdo oleoso; geralmente, esse tipo de células secretoras são células parenquimáticas ampliadas e que ocorrem nos tecido vascular e fundamental do caule e da folha.

Segundo Metcalfe (1987), a presença de células secretoras de óleos ou de mucilagem é comum em plantas pertencentes à família Lauraceae, sendo essas células normalmente esféricas, com paredes suberizadas e com conteúdo amarelado. De acordo com Fahn (1990), essas células diferem das demais pelo conteúdo, forma, tamanho e espessamento da parede. Já as cavidades e canais diferem das células secretoras pelo fato de serem resultado de apoptose (espaços lisígenos) ou de sua separação (espaços esquizógenos). Nos espaços lisígenos, células parcialmente desintegradas aparecem ao longo da periferia deles; no entanto, os espaços esquizolisígenos são geralmente delimitados por células intactas (ESAU, 1993).

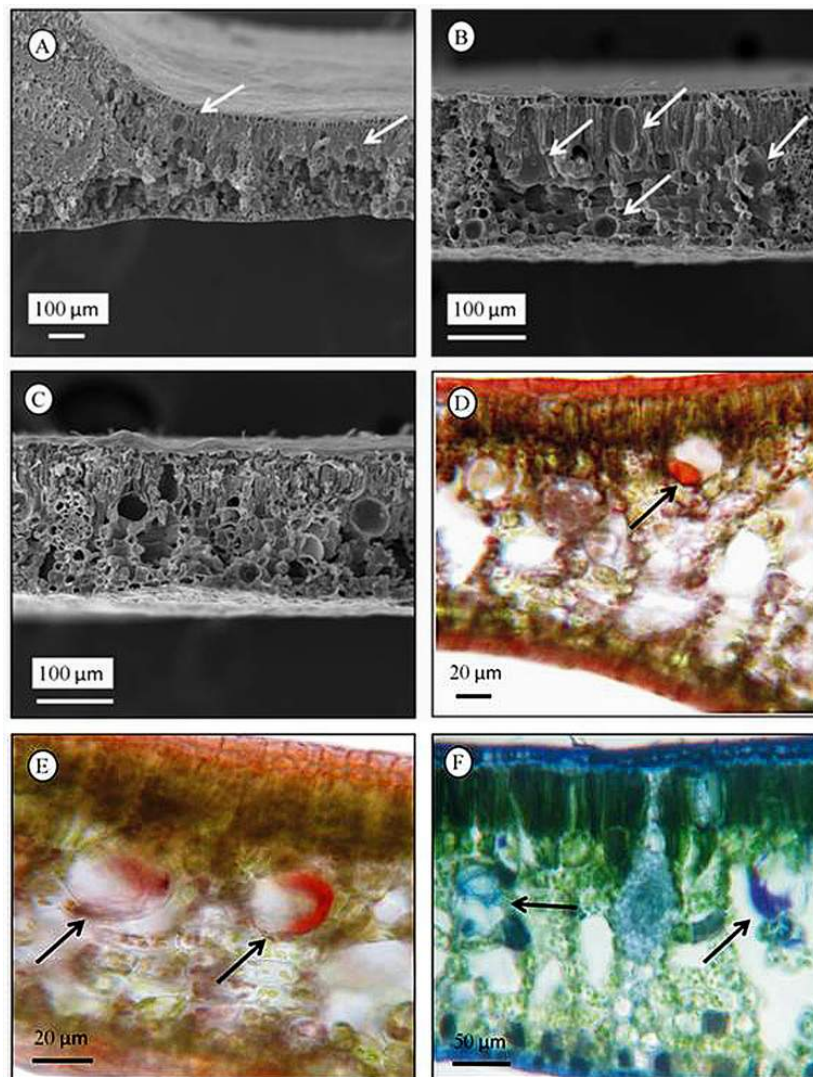


Figura 8 Eletromicrografia de varredura e secções transversais das folhas de *O. odorifera*. A – Células secretoras espalhadas por todo o mesofilo. B – Células secretoras de formato elíptico e esférico. C – Detalhe de células secretoras. D – Presença de substâncias lipídicas no interior das células secretoras, evidenciadas pela reação positiva frente ao reagente Sudan III. E – Substâncias lipídicas presentes no interior de células secretoras, evidenciadas pela reação positiva frente ao reagente Sudan III. F – Presença de compostos terpênicos no interior das células secretoras, revelada pela reação positiva com o reagente de Nadi

4 CONCLUSÕES

As estruturas secretoras dos óleos essenciais das espécies *L. sidoides* Cham., *A. fastigiata* (Gardner) Benth, *O. odorifera* (Vell.) Rohwer, *M. glauca* Mart. e *C. verbenacea* D. C. foram caracterizadas morfológicamente por MEV e por análises histoquímicas.

Nas espécies *L. sidoides*, *C. verbenacea* e *A. fastigiata*, os óleos essenciais encontram-se em tricomas glandulares espalhados por sua superfície foliar.

As espécies *M. glauca* e *O. odorifera* não apresentaram estruturas secretoras externas, estando o óleo essencial de *M. glauca* armazenado em canais e cavidades oleíferas, ambas presentes no mesófilo foliar. O óleo essencial de *O. odorifera* encontra-se armazenado em células secretoras inseridas no mesófilo foliar.

REFERÊNCIAS

- AGUILERA, D. B.; MEIRA, R. M. S. A.; FERREIRA, F. A. Anatomia e histoquímica dos órgãos vegetativos de *Siegesbeckia orientalis* (Asteraceae). **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 22, n. 4, p. 483-489, out./dez. 2004.
- ASCENSÃO, L.; MARQUES, N.; PAIS, M. S. Glandular trichomes on vegetative and reproductive organs of *Leonotis leonurus* (Lamiaceae). **Annals of Botany**, London, v. 75, n. 6, p. 619-626, June 1995.
- BISIO, A. et al. Glandular hairs and secreted material in *Salvia blephrophylla* brandegeei exeppling grown in Italy. **Annals of Botany**, London, v. 83, n. 4, p. 441-452, Apr. 1999.
- BOSABALIDIS, A. M. Structural features of *Origanum* species. In: KINTZIOS, S. E. **Oregano**: the genera *Origanum* and *Lippia*. London: Taylor and Francis, 2002. p. 11-64.
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal**: estrutura e função de órgãos vegetativos. Lavras: UFLA, 2009. 234 p.
- COLLARES, M. N.; ARANBARRI, A. M. *Ziziphus mistol* (Rhamnaceae): Morfo-anatomía y Arquitectura Foliar. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 27, n. 4, p. 568-77, July/Aug. 2008.
- COMBRICK, S. et al. Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). **Annals of Botany**, London, v. 99, n. 6, p. 1111-1119, Apr. 2007.
- COUTINHO, D. F. et al. Morfo-anatomia foliar de *Ocotea gardneri* (Meisn.) Mez (Lauraceae – Lauroideae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 16, n. 2, p. 178-184, mar./abr. 2006a.
- COUTINHO, D. F. et al. Morphoanatomical study of the leaves of *Ocotea duckei* Vattimo (Lauraceae-Lauroideae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 16, n. 4, p. 537-544, out./dez.2006b.

- CURY, G.; GLÓRIA, B. A. da. Internal secretory spaces in thickened underground systems of Asteraceae species. **Australian Journal of Botany**, Melbourne, v. 57, n. 3, p. 229-239, June 2009.
- DAVID, R.; CORDE, J. P. Caloración différentielle dès inclusions lipidique et terpeniques dès pseudophylles du *Pin maritimeau* moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus Hebdomadaires dès Séances de l' Academie dès Sciences Paris**, Paris, v. 258, p.1338-1340, 1964.
- EMPINOTTI, C. B.; DUARTE, M. R. Estudo anatômico de folhas e caule de *Elephantopus mollis* Kunth. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 18, n. 1, p. 108-116, jan./fev. 2008.
- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: E. Blücher, 1993. 293 p.
- FAHN, A. **Plant anatomy**. 4. ed. Oxford: Pergamon, 1990. 588 p.
- FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic, 1979. 391 p.
- FARAGO, P. V. et al. Análise morfo-anatômica de folhas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Maringá, v. 15, n. 3, p. 250-255, maio/jun. 2005.
- FONSECA, M. C. M.; MEIRA, R. M. S. A.; CASALI, V. W. D. Anatomia dos órgãos vegetativos e histolocalização de compostos fenólicos e lipídicos em *Porophyllum ruderale* (Asteraceae). **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 24, n. 4, p. 707-713, out./dez. 2006.
- GONCALVES, L. D. et al. Relação entre zingibereno, tricomas foliares e repelência de tomateiros a *Tetranychus evansi*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 41, n. 2, p. 267-273, fev. 2006.
- GREGIO, S. J. D.; MOSCHETA, I. S. Anatomia da raiz, caule e folha e identificação de estruturas secretoras de *Achillea millefolium* L. (Asteraceae). **Acta Scientiarum: biological sciences**, Maringá, v. 28, n. 4, p. 327-334, 2006.

HALLAHAN, D. L. Plant trichomes. In: HALLAHAN, D. L.; GRAY, J. C. **Advances in botanical research**. New York: Academic, 2000. p. 1-30.

KARNOVSKY, M. J. A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, Stuttgart, v. 27, n. 1, p. 137-138, Oct. 1965.

KOLB, D.; MULLER, M. Light, conventional and environmental scanning electron microscopy of the trichomes of *Cucurbita pepo* subsp. *Pepo* var. *stryriaca* and histochemistry of glandular secretory products. **Annals of botany**, London, v. 93, n. 5, p. 515-526, May 2004.

LIAKOURA, V. et al. Trichome density and its UV-B protective potential are affected by shading and leaf position on the canopy. **Environmental and Experimental Botany**, Elmsford, v. 38, n. 3, p. 223-229, Dec. 1997.

MAGGI, F. et al. Histochemical localization of secretion and composition of the essential oil in *Melittis melissophyllum* L. subsp. *Melissophyllum* from Central Italy. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 25, n. 2, p. 63-70, Mar./Apr. 2010.

MALUF, W. R. et al. Higher glandular trichome density in tomato leaflets and repellence to spider mites. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 42, n. 9, p. 1227-1235, set. 2007.

MARIN, M. et al. Micromorphology of trichomes of *Thymus malyi* (Lamiaceae). **Journal of Microscopy**, Oxford, v. 232, n. 3, p. 406-409, Sept. 2008.

METCALFE, C. R. **Anatomy of the dicotyledons: magnoliales, illiciales and laurales**. 2. ed. Oxford: Clarendon, 1987. 224 p.

MOURA, M. Z. D.; ISAIAS, R. M. S.; SOARES, G. L. G. Ontogenesis of internal secretory cells in leaves of *Lantana camara* (Verbenaceae). **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 148, n. 4, p. 427-431, Aug. 2005.

NASCIMENTO-SILVA, O.; PAIVA, J. G. A. Estudos morfológicos e anatômicos em folhas adultas de *Spondias tuberosa* Arruda (Anacardiaceae Lindley). **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, Caribe, v. 6, n. 2, p. 36-43, Feb. 2007.

OLIVEIRA, F. et al. Caracterização morfohistológica e verificação da atividade microbiológica da espécie vegetal *Mikania cordifolia* (Lf.) Willd. **Lecta**, Bragança Paulista, v. 18, n. 1, p. 33-63, dez. 2000.

PASSOS, J. L.; MEIRA, R. M. S. A.; BARBOSA, L. C. A. Foliar anatomy of the species *Lantana camara* and *L. radula* (Verbenaceae). **Planta Daninha**, Viçosa, MG, v. 27, n. 4, p. 689-700, out./dez. 2009.

PEREIRA, F. J. et al. Isolamento, composição química e atividade anti-inflamatória do óleo essencial do pericarpo de *Copaifera langsdorffii* Desf. de acordo com hidrodestilações sucessivas. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 27, n. 3, p. 369-74, May/June 2008.

PERROTA, V. G.; ARAMBARRI, A. M. *Schinus longifolia* var. *longifolia* (Anacardiaceae): Anatomía Foliar y Caulinar. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 23, n. 2, p. 142-147, fev. 2004.

PINTO, J. E. B. P. et al. Aspectos morfofisiológicos e conteúdo de óleo essencial de plantas de alfazema-do-Brasil em função de níveis de sombreamento. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 25, n. 2, p. 210-214, fev. 2007.

REZENDE, R. K. S. et al. Organogênese em capítulos florais e avaliação de características anatômicas da folha de *Gerbera jamesonii* Adlam. **Ciência Agrotecnica**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 821-827, jul./set. 2008 .

ROBARDS, A. W. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: HALL, J. L. **Electron microscopy and cytochemistry of plant cells**. New York: Elsevier, 1978. p. 343-444.

SANTOS, B. F. et al. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras do caule de *Spondias dulcis* Forst. F. (Anacardiaceae). **Revista Árvore**, Viçosa, MG, v. 30, n. 3, p. 481-489, set./dez. 2006.

SANTOS, B. R. et al. Aspectos da anatomia e do óleo essencial em folhas de Pindaíba (*Xylopia brasiliensis* Spreng.). **Ciência e Tecnologia**, Rio de Janeiro, v. 28, n. 2, p. 345-349, mar. 2004.

SOSSAE, F. C. **Anatomia e Fitoquímica Foliar de *Tetradenia riparia* (Hochstetter)**. 1995. 85 p. Dissertação (Mestrado em Biologia) – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 1995.

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.

SVOBODA, K.; HAMPSON, J.; HUNTER, T. Secretory tissues: storage and chemical variation of essential oils in secretory tissues of higher plants and their bioactivity. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 9, n. 3, p. 124-131, Mar. 1999.

TOLEDO, M. G. T.; ALQUINI, Y.; NAKASHIMA, T. Aspectos estruturais das folhas de *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer (Lauraceae) em dois ambientes distintos. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 85, n. 3, p. 89-93, set. 2004.

VALENTI, G. S. et al. Structural and histochemical investigation of the glandular trichomes of *Salvia áurea* L. leaves, and chemical analysis of the essential oil. **Annals of Botany**, London, v. 79, n. 3, p. 329-336, Mar. 1997.

VENTRELLA, M. C.; MARINHO, C. R. Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Cordia verbenacea* DC. (boarginaceae) leaves. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 31, n. 3, p. 457-467, dez. 2008.

APÊNDICE

APÊNDICE A – Cromatogramas dos óleos essenciais das cinco plantas estudadas

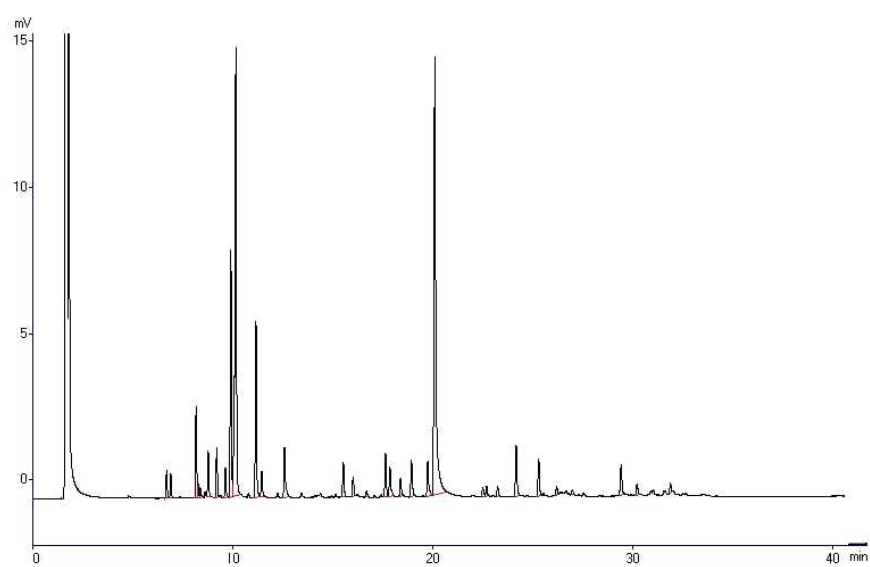


Figura 1A Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas frescas de *L. sidoides*

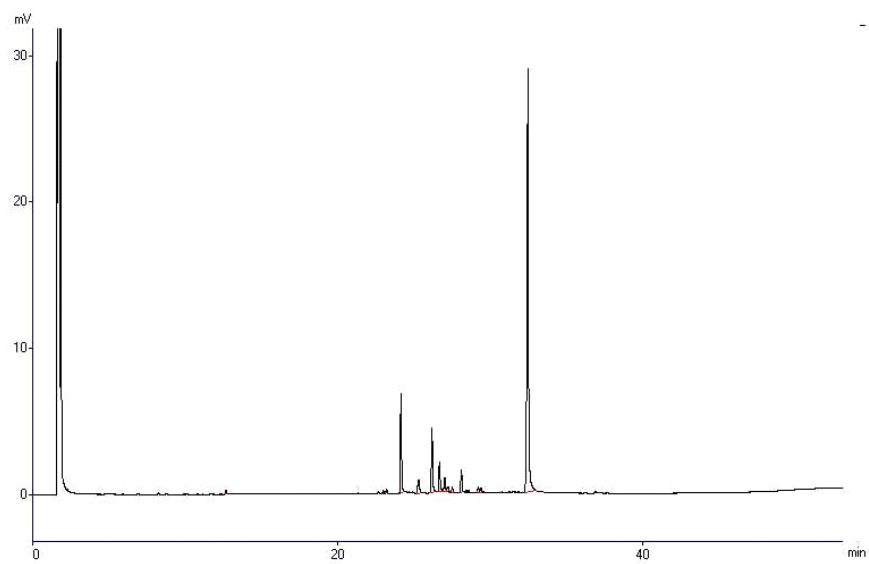


Figura 2A Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas frescas de *C. verbenacea*

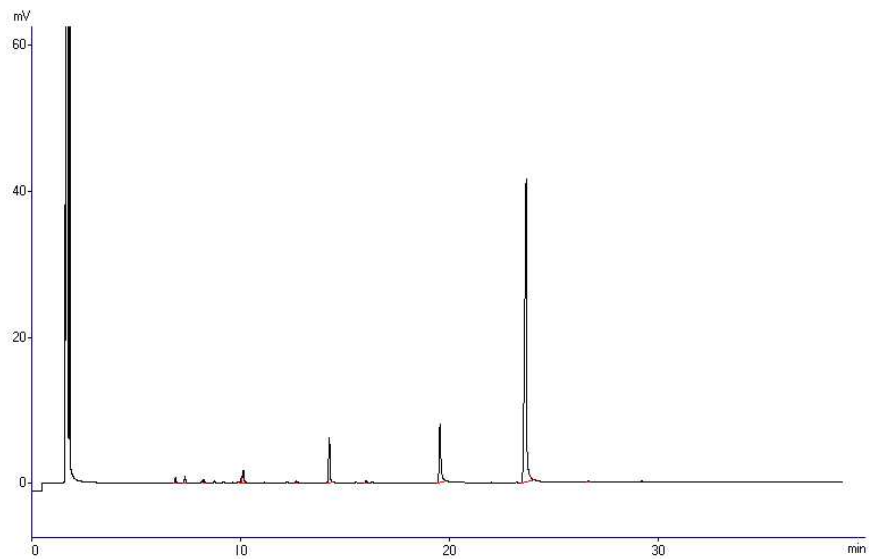


Figura 3A Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas frescas de *O. odorifera*

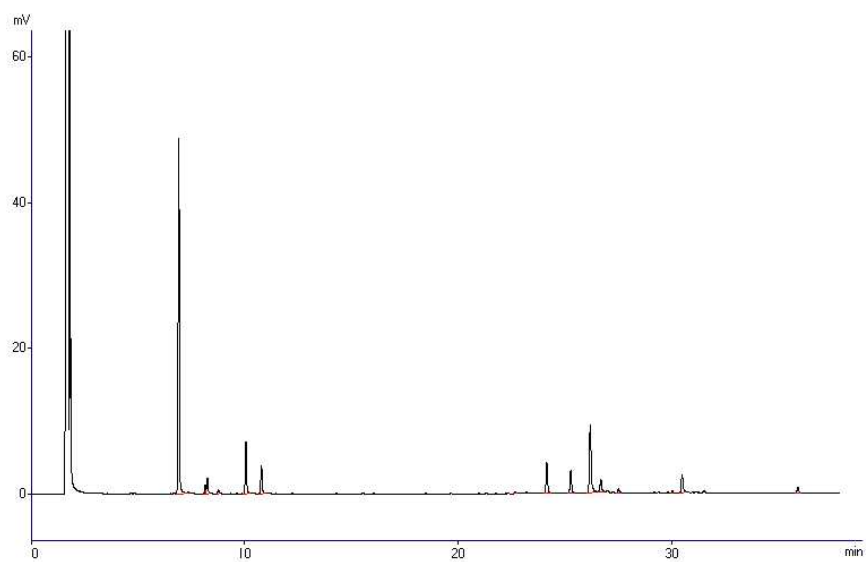


Figura 4A Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas frescas de *A. fastigiata*

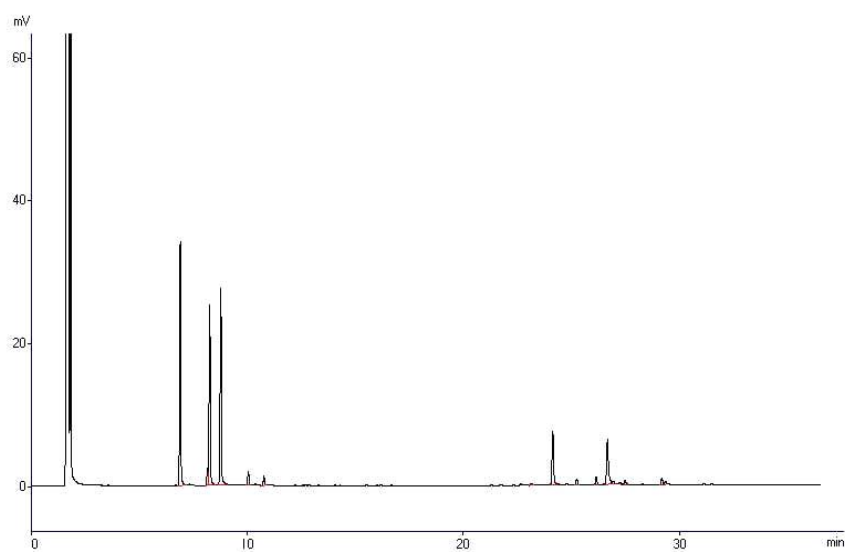
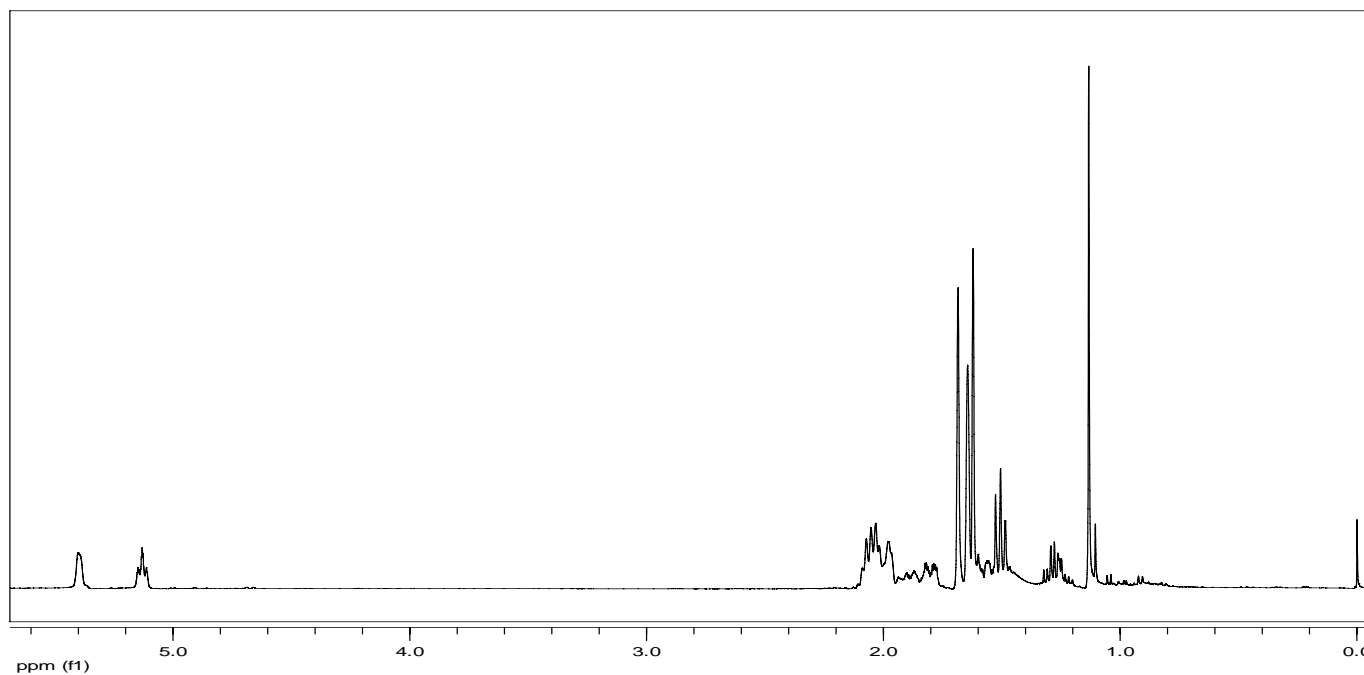


Figura 5A Cromatograma do óleo essencial obtido das folhas frescas de *M. glauca*

APÊNDICE B – Espectros de RMN (Uni e bidimensionais) do isobisabolol e do α -bisabololFigura 1B Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do isobisabolol.

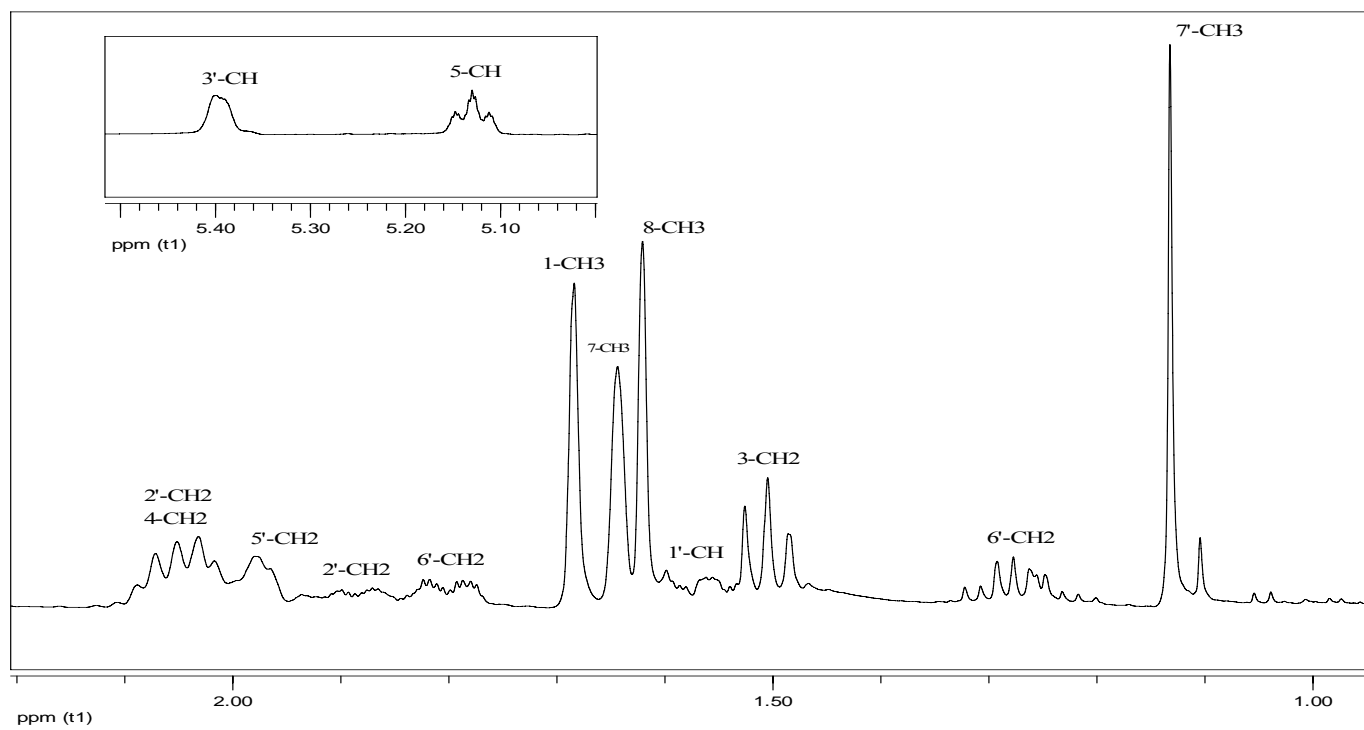


Figura 2B Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do isobisabolol e sessão expandida na região δ_{H} 5,0-5,5

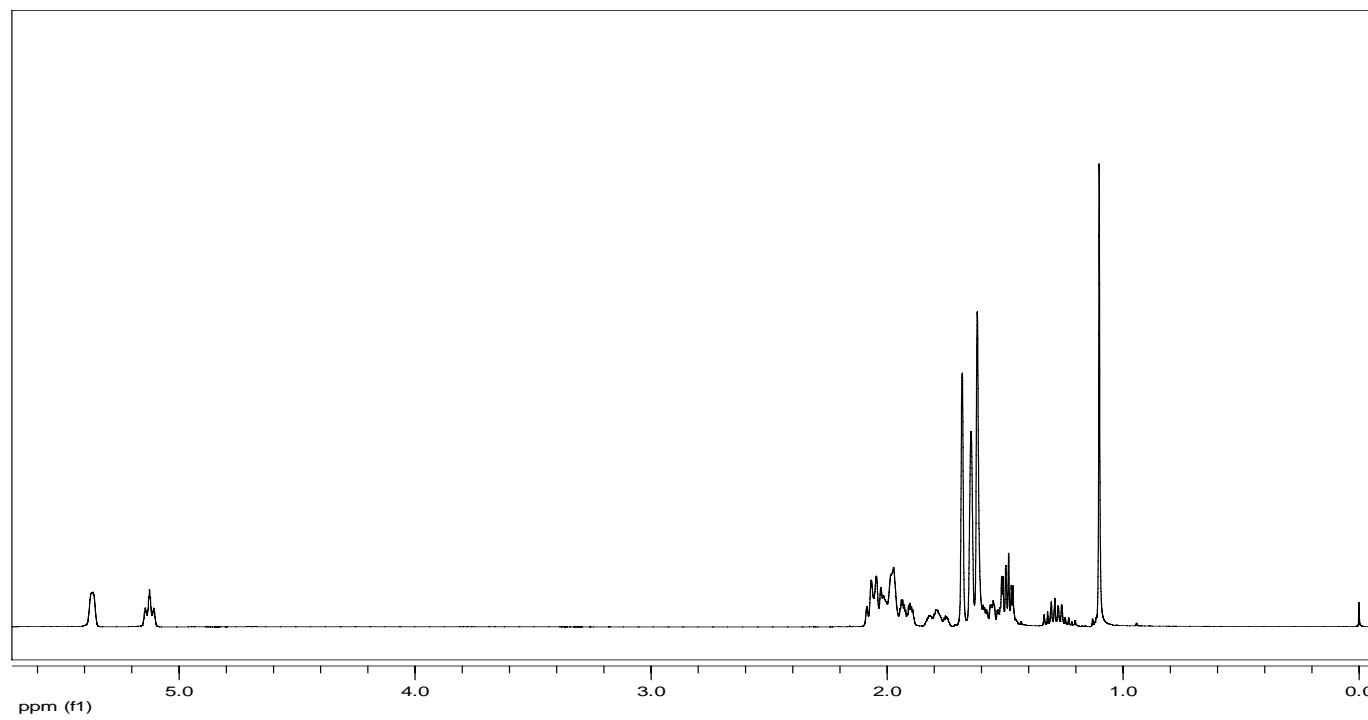


Figura 3B Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do α -bisabolol

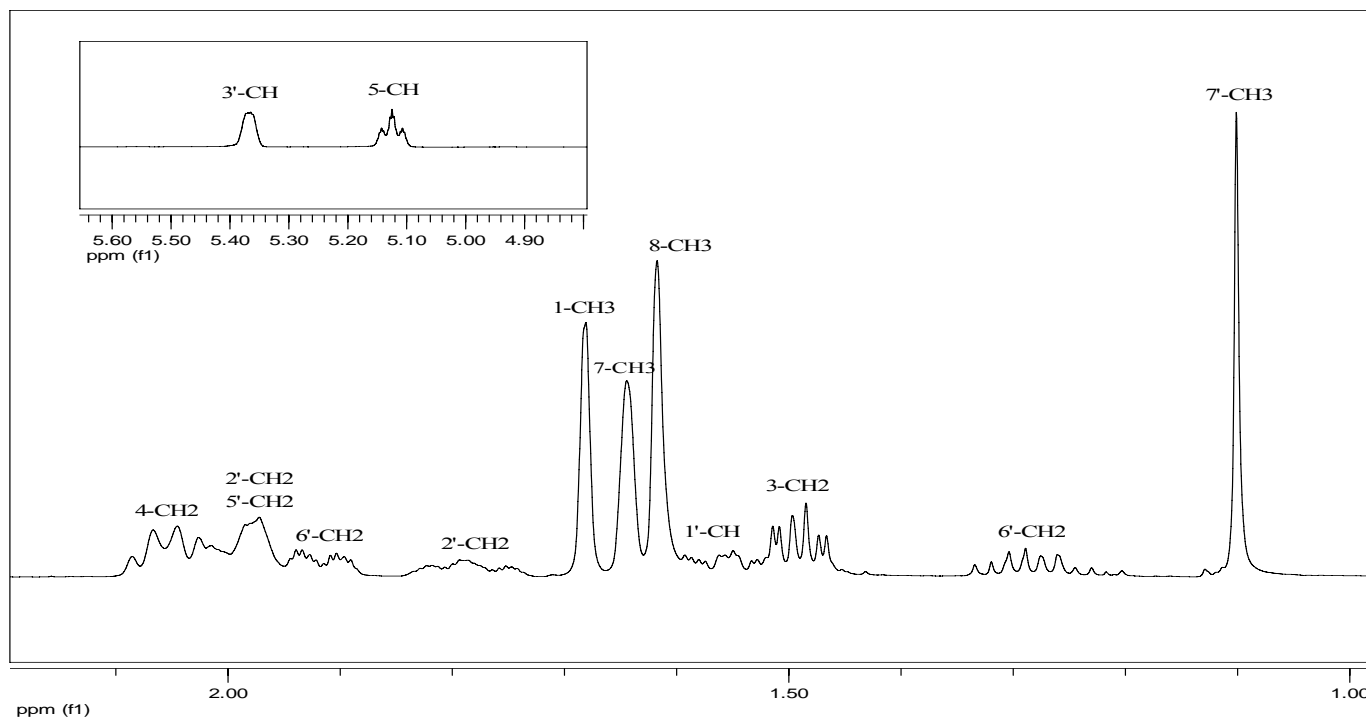


Figura 4B Espectro aproximado de RMN de ^1H (400 MHz, CDCl_3) do α -bisabolol e sessão expandida na região δ_{H} 4,8-5,6

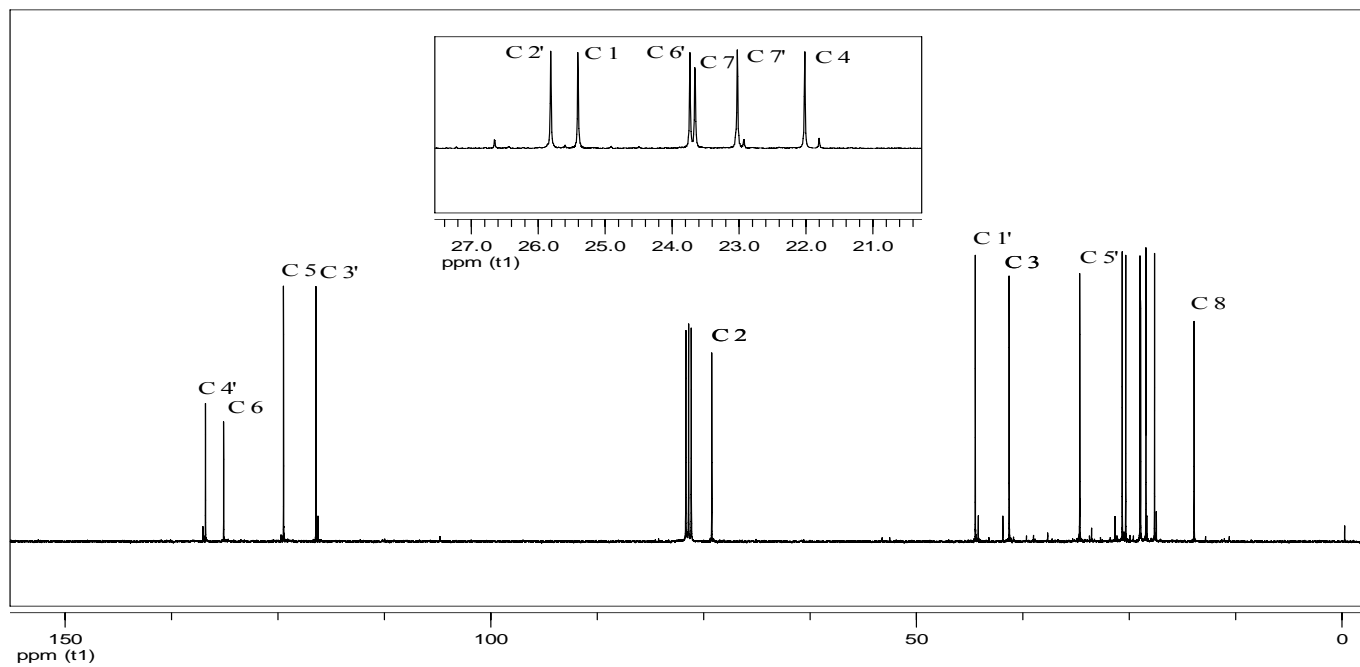


Figura 5B Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do isobisabolol e sessão expandida na região δ_{C} 20,0-27,2

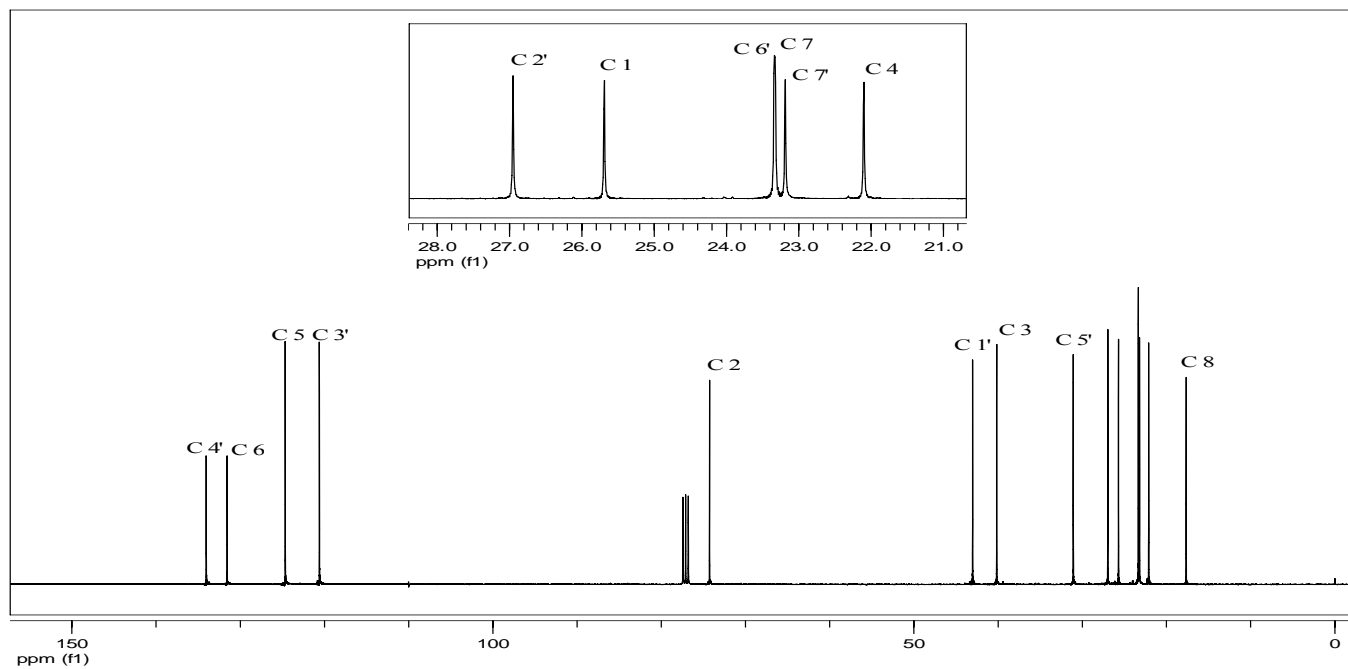


Figura 6B Espectro de RMN de ^{13}C (400 MHz, CDCl_3) do α -bisabolol e sessão expandida na região δ_{C} 20,9-28,2

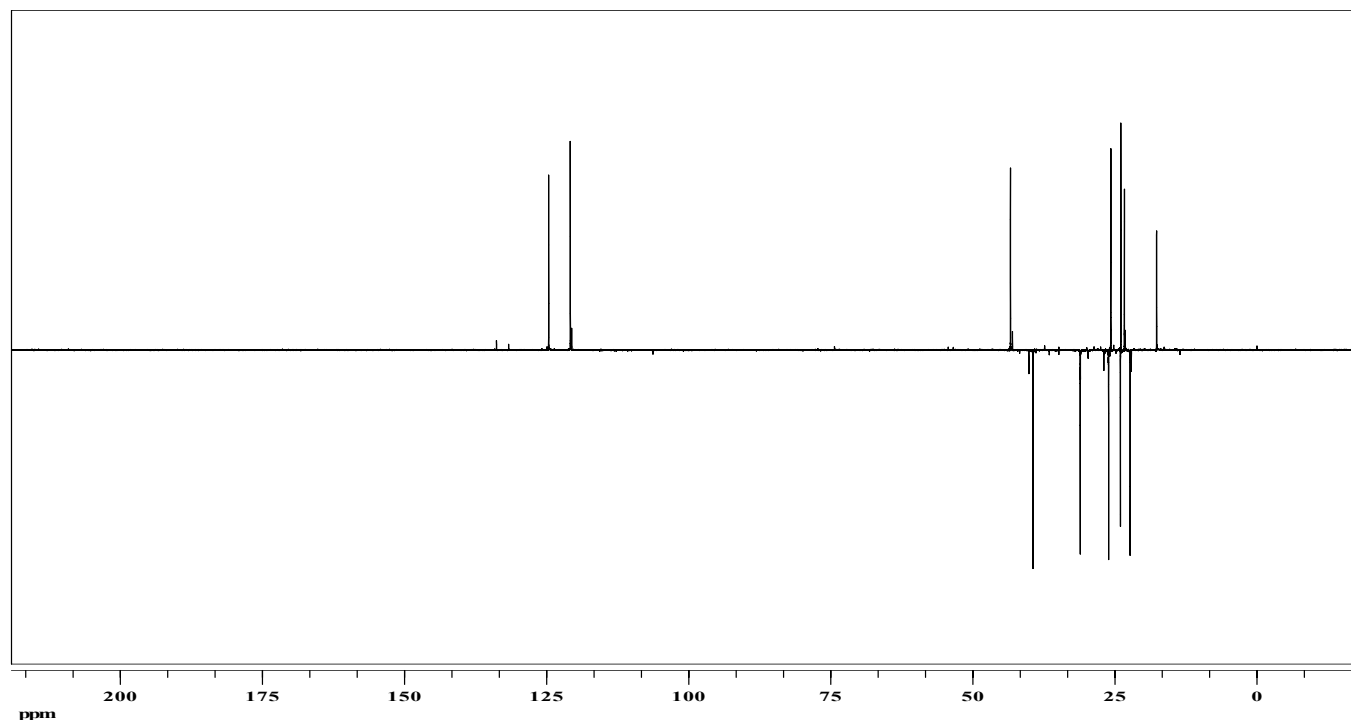


Figura 7B Espectro de RMN de $^{13}\text{C}/\text{DEPT}$ (400 MHz, CDCl_3) do isobisabol

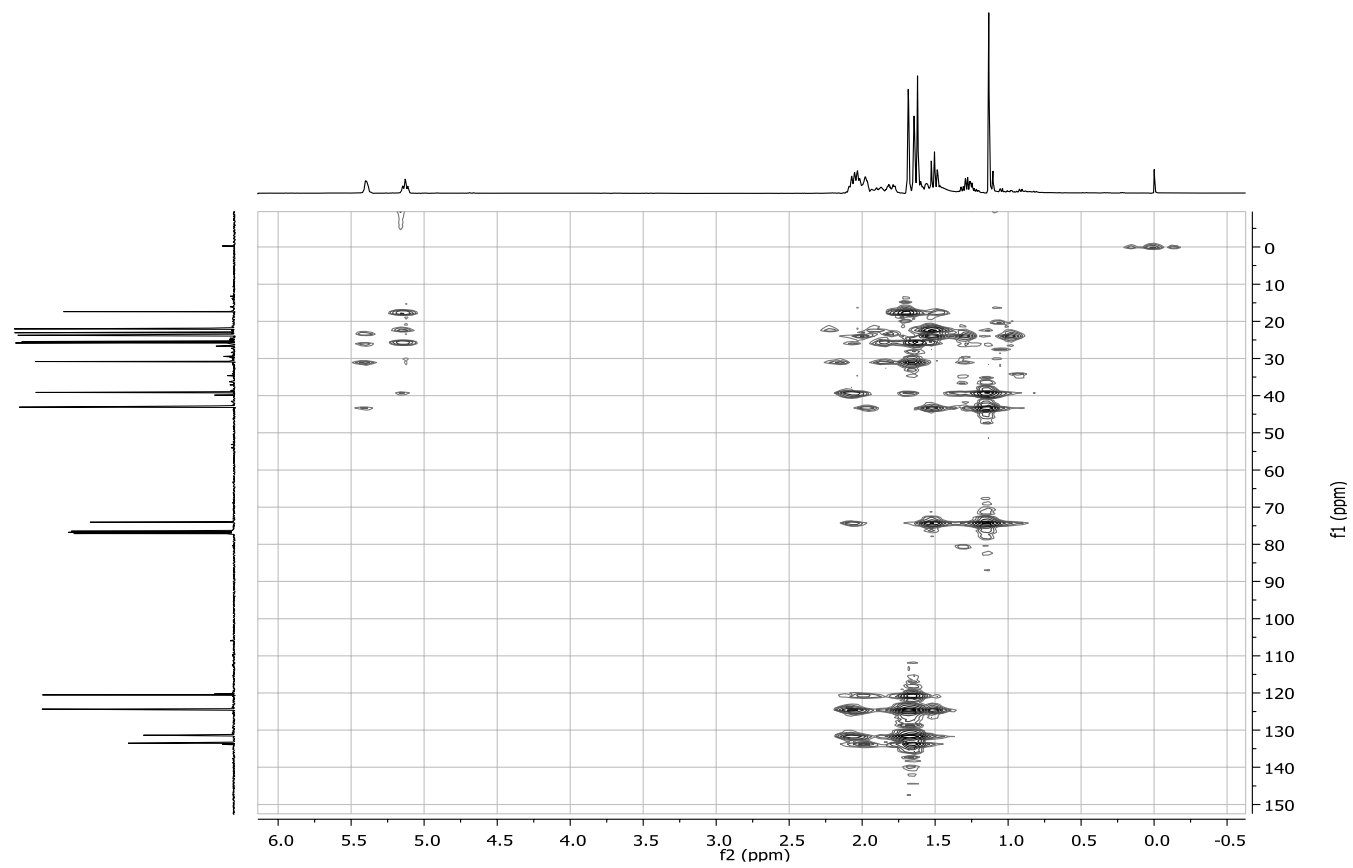


Figura 8B Mapa de contornos HMBC ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) do isobisabolol

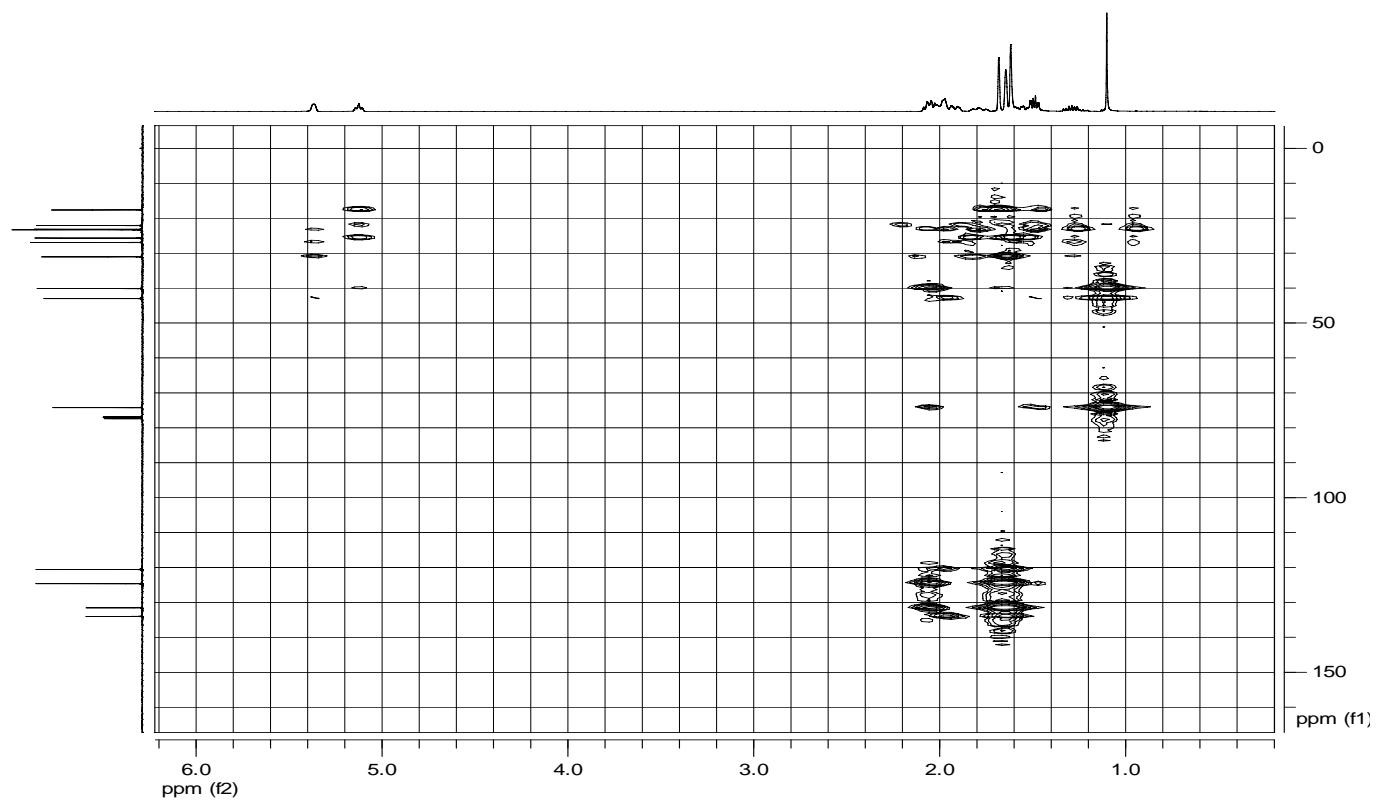


Figura 9B Mapa de contornos HMBC ($^{13}\text{C} \times ^1\text{H}$) do α -bisabolol

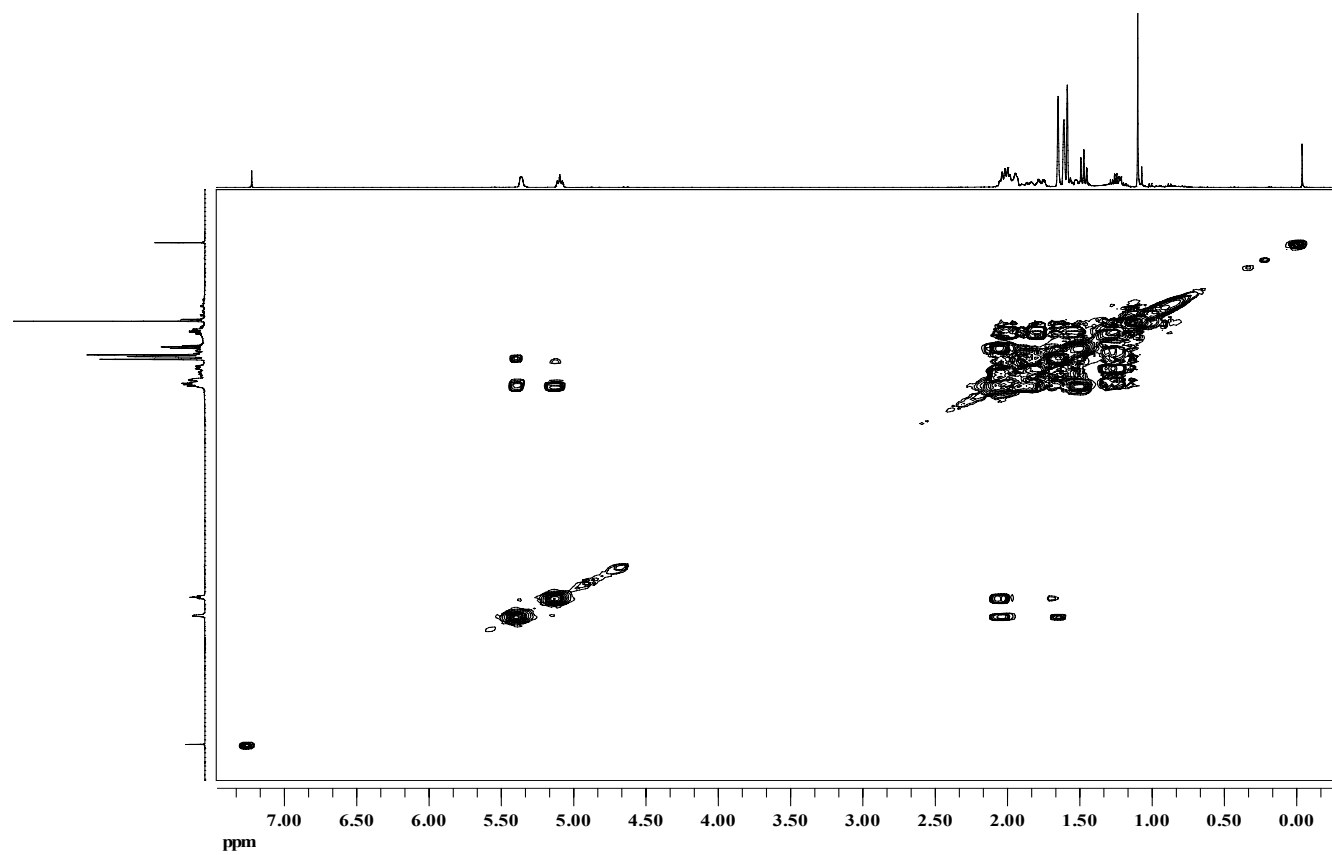


Figura 10B Mapa de contornos COSY (¹H x ¹H) do isobisabolol

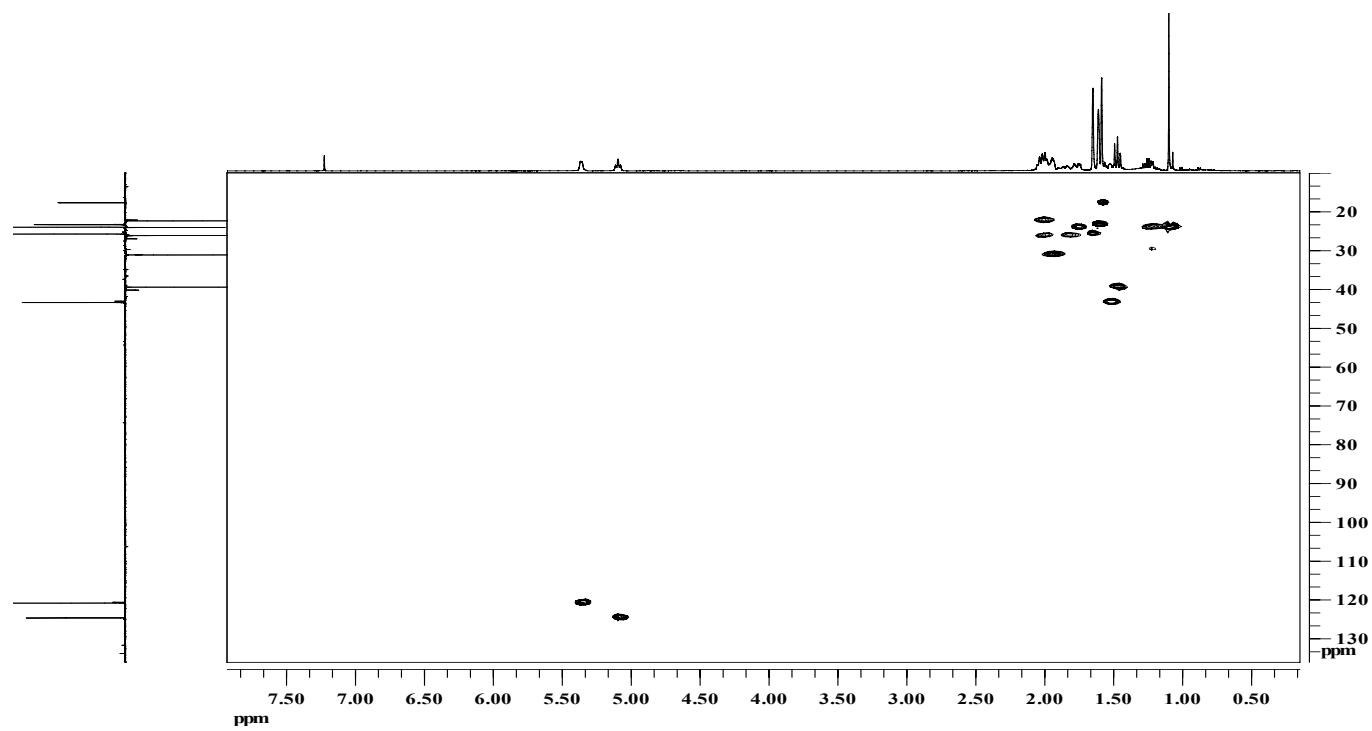


Figura 11B Mapa de contornos HSQC ($^{13}\text{C}/\text{DEPT} \times ^1\text{H}$) do isobisabolol

APÊNDICE C – Espectro de Massas e proposta mecanística de fragmentação do isobisabolol

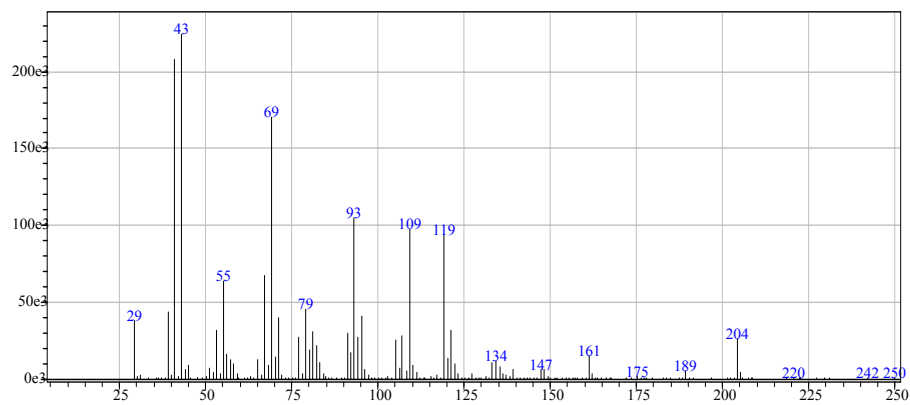


Figura 1C Espectro de massas (70 eV) de baixa resolução para o isobisabolol

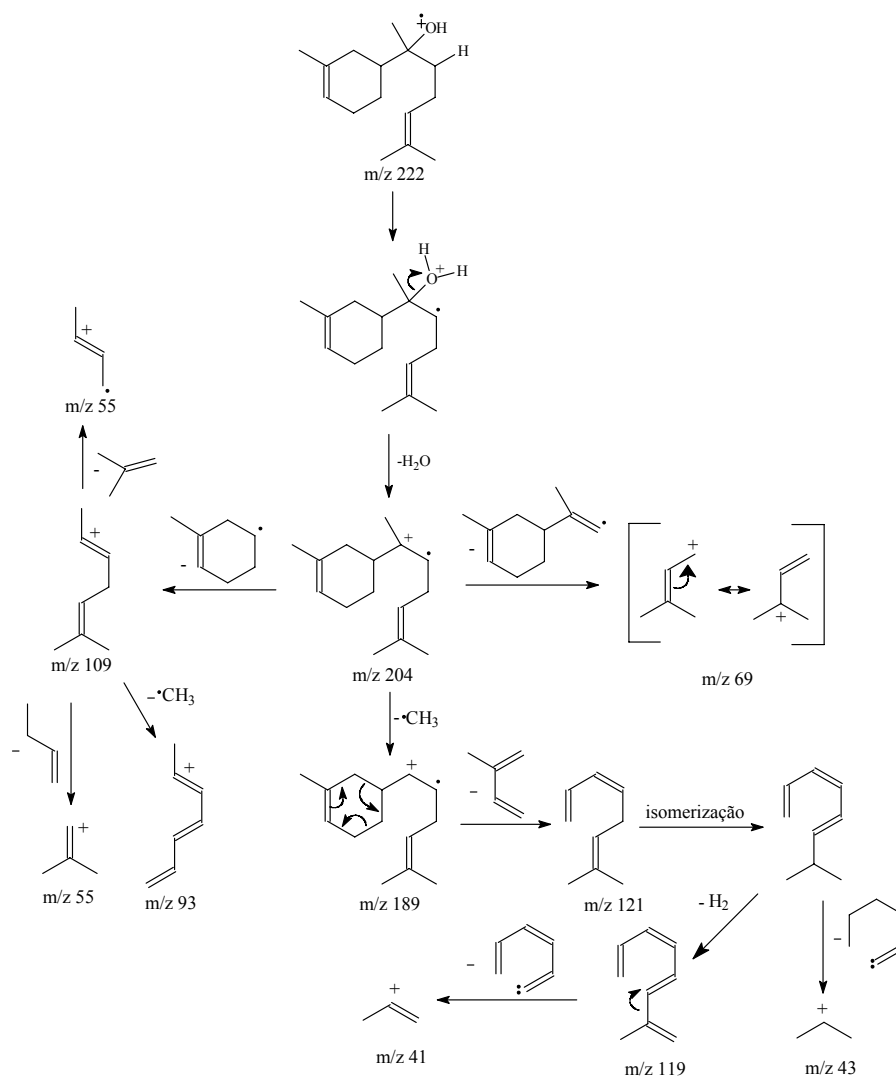


Figura 2C Proposta mecanística de fragmentação do isobisabolol

APÊNDICE D – Tabelas de análises de variância das atividades antioxidantes

Tabela 1D Análise de variância com aplicação do teste F (0,05%) para os valores observados de atividade antioxidante dos óleos essenciais e de seus constituintes majoritários, pelo ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
composto	19	182921.3234	9627.4380	76.361	0.000
concentração	5	69289.20991	13857.841	109.915	0.000
composto*concentração	94	62282.74742	662.58241	5.255	0.000
erro	238	30006.48276	126.07765		
CV (%)	29,36				
Média geral	38,24				

Tabela 2D Análise de variância com aplicação do teste F (0,05%) para os valores observados de atividade antioxidante dos óleos essenciais e de seus constituintes majoritários, pela metodologia em que se avalia a formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
composto	19	74249.138	3907.849379	454.080	0.000
concentração	3	25531.055	8510.351817	988.876	0.000
composto*concentração	57	10980.426	192.639058	22.384	0.000
erro	160	1376.9736	8.606085		
CV (%)	12,70				
Média geral	23,11				

Tabela 3D Análise de variância com aplicação do teste F (0,05%) para os valores observados de atividade antioxidante dos óleos essenciais e de seus constituintes majoritários pela metodologia em que se avalia a capacidade de redução do radical estável DPPH em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
composto	19	76630.32339	4033.174	9282.313	0.000
concentração	5	8531.764911	1706.3529	3927.155	0.000
composto*concentração	95	26963.20036	283.23162	653.216	0.000
erro	240	104.280252	0.434501		
CV (%)	9,12				
Média geral	7,23				

Tabela 4D Análise de variância com aplicação do teste F (0,05%) para os valores observados de atividade antioxidante do composto utilizado como referência (ácido ascórbico) pelo ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
concentração	5	11307.860248	2261.572050	223.472	0.000
erro	12	121.441785	10.120149		
CV (%)	9,53				
Média geral	33,39				

Tabela 5D Análise de variância com aplicação do teste F (0,05%) para os valores observados de atividade antioxidante dos compostos utilizados como referência (ácido ascórbico, α -tocoferol e BHT) pela metodologia em que se avalia a formação de espécies reativas do ácido tiobarbitúrico (TBARS) em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>F _c
composto	2	2543.956626	1271.978313	136.462	0.000
concentração	3	12857.32113	4285.773711	459.793	0.000
composto*	6	715.151374	119.191896	12.787	0.000
concentração					
erro	24	223.706053	9.321086		
CV (%)	6,88				
Média geral	44,39				

Tabela 6D Análise de variância com aplicação do teste F (0,05%) para os valores observados de atividade antioxidante dos compostos utilizados como referência (ácido ascórbico, α -tocoferol e BHT) pela metodologia em que se avalia a capacidade de redução do radical estável DPPH em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>F _c
composto	2	2327.13612	1163.568064	1633.595	0.000
concentração	5	58051.5858	11610.31717	16300.345	0.000
composto*	10	1609.26908	160.926909	225.934	0.000
concentração					
erro	36	25.641876	0.712274		
CV (%)	1,44				
Média geral	58,75				

APÊNDICE E – Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais sobre os micro-organismos estudados

Tabela 1E Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Alomia fastigiata*, *Ocotea odorifera*, *Mikania glauca*, *Cordia verbenacea* e dos compostos carvacrol, 1,8-cineol e trans-cariofileno sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halo de inibição (cm)							
	<i>L.</i> <i>sidoides</i>	<i>A.</i> <i>fastigiata</i>	<i>O.</i> <i>odorifera</i>	<i>M.</i> <i>glauca</i>	<i>C.verbenacea</i>	carvacrol	1,8- cineol	trans- cariofileno
3,90	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,63a	0,00a	0,00a
7,81	0,20ab	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,80a	0,00a	0,00a
15,62	0,63ab	0,00a	0,00a	0,00a	0,60ab	1,04a	0,00a	0,00a
31,25	0,93bc	0,00a	0,00a	0,00a	0,70ab	1,20a	0,00a	0,00a
62,5	1,60c	0,40ab	0,40ab	0,40ab	0,90ab	3,43b	0,00a	0,00a
125	2,76d	0,40ab	0,60ab	0,67ab	1,23bc	3,57b	0,00a	0,00a
250	4,93e	0,67ab	0,77ab	0,80ab	1,37bc	5,87c	0,00a	0,00a
500	5,67e	0,93b	0,97b	0,97b	1,83c	7,60d	0,00a	0,60a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P = 0,05)

Tabela 2E Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Alomia fastigiata*, *Ocotea odorifera*, *Mikania glauca*, *Cordia verbenacea* e dos compostos carvacrol, 1,8-cineol e trans-cariofileno sobre *Xanthomonas vesicatoria*.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halo de inibição (cm)							
	<i>L.</i> <i>sidoides</i>	<i>A.</i> <i>fastigiata</i>	<i>O.</i> <i>odorifera</i>	<i>M.</i> <i>glauca</i>	<i>C.verbenacea</i>	carvacrol	1,8- cineol	trans- cariofileno
3,90	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,65a	0,00a	0,00a
7,81	0,20ab	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,70a	0,00a	0,00a
15,62	0,62bc	0,00a	0,20ab	0,00a	0,00a	1,00ab	0,00a	0,00a
31,25	0,87cd	0,00a	0,20ab	0,00a	0,00a	1,50b	0,00a	0,00a
62,5	1,10cd	0,00a	0,60bc	0,00a	0,20a	2,03c	0,00a	0,00a
125	1,33d	0,00a	0,67bc	0,00a	0,20a	3,50d	0,00a	0,00a
250	2,13e	0,00a	0,73c	0,00a	0,20a	4,30e	0,00a	0,00a
500	3,10f	0,77b	0,73c	0,70b	0,20a	4,77f	0,60b	0,00a

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P = 0,05)

Tabela 3E Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Alomia fastigiata*, *Ocotea odorifera*, *Mikania glauca*, *Cordia verbenacea* e dos compostos carvacrol, 1,8-cineol e trans-cariofileno sobre *Pseudomonas syringae* pv. tomato.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halo de inibição (cm)								
	<i>L.</i> <i>sidoides</i>	<i>A.</i> <i>fastigiata</i>	<i>O.</i> <i>odorifera</i>	<i>M.</i> <i>glauca</i>	<i>C.verbenacea</i>	carvacrol	1,8- cineol	trans- cariofileno	
3,90	0,20a	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,60a	0,00a	0,00a	
7,81	0,27a	0,00a	0,00a	0,00a	0,63a	0,00a	0,00a	0,00a	
15,62	0,67b	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,70a	0,00a	0,00a	
31,25	0,82bc	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,70a	0,00a	0,00a	
62,5	0,90c	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,70a	0,00a	0,00a	
125	1,00c	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,70a	0,00a	0,00a	
250	1,00c	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,73a	0,00a	0,00a	
500	1,00c	0,00a	0,00a	0,00a	0,00a	0,73a	0,00a	0,00a	

Médias seguidas pela mesma letra na coluna não diferem significativamente pelo teste de Tukey (P = 0,05)

APÊNDICE F - Tabelas de análises de variância das atividades bacterianas dos óleos essenciais

Tabela 1F Análise de variância com aplicação do teste F (0,05%) para os valores observados de formação de halos de inibição dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Alomia fastigiata*, *Ocotea odorifera*, *Mikania glauca*, *Cordia verbenacea* e dos compostos carvacrol, 1,8-cineol e trans-cariofileno sobre *Clavibacter michiganensis* subsp. *Michiganensis*.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
composto	7	200.665625	28.666518	216.841	0.000
concentração	7	115.691458	16.527351	125.017	0.000
composto*concentração	49	144.806042	2.955225	22.354	0.000
erro	128	16.921667	0.132201		
CV (%)	41,50				
Média geral	0,87				

Tabela 2F Análise de variância com aplicação do teste F (0,05%) para os valores observados de formação de halos de inibição dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Alomia fastigiata*, *Ocotea odorifera*, *Mikania glauca*, *Cordia verbenacea* e dos compostos carvacrol, 1,8-cineol e trans-cariofileno sobre *Xanthomonas vesicatoria*.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
composto	7	111.343333	15.906190	388.425	0.000
concentração	7	33.235833	4.747976	115.944	0.000
composto*concentração	49	52.777292	1.077088	26.302	0.000
erro	128	5.241667	0,040951		
CV (%)	38,32				
Média geral	0,53				

Tabela 3F Análise de variância com aplicação do teste F (0,05%) para os valores observados de formação de halos de inibição dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Alomia fastigiata*, *Ocotea odorifera*, *Mikania glauca*, *Cordia verbenacea* e dos compostos carvacrol, 1,8-cineol e trans-cariofileno sobre *Pseudomonas syringae* pv. tomato.

FV	GL	SQ	QM	FC	Pr>Fc
composto	7	18.138633	2.591233	392.518	0.000
concentração	7	0.356966	0.050995	7.725	0.000
composto*concentração	49	1.953346	0.039864	6.039	0.000
erro	128	0.845000	0.006602		
CV (%)	45,81				
Média geral	0,18				