



UFRR

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RORAIMA
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E POS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE POS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

MARCIA REGINA SOUSA SANTANA

AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE QUIMIOTIPOS DE
Lippia origanoides Kunth OBTIDOS EM DIFERENTES COLETAS AO LONGO DO
DIA E SUA ATIVIDADE BIOLÓGICA

BOA VISTA, RR
2015

MARCIA REGINA SOUSA SANTANA

**AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE QUIMIOTIPOS DE
Lippia origanoides Kunth OBTIDOS EM DIFERENTES COLETAS AO LONGO
DO DIA E SUA ATIVIDADE BIOLÓGICA**

Dissertação de mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Química, da Universidade Federal de Roraima, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Química. Área de concentração: Química de Produtos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Luiz Antonio M. A. da Costa

Co-orientadora: Prof. Dra. Adriana Flach

BOA VISTA, RR
2015

MARCIA REGINA SOUSA SANTANA

AVALIAÇÃO DO PERFIL QUÍMICO DO ÓLEO ESSENCIAL DE QUIMIOTIPOS
DE *Lippia origanoides* Kunth OBTIDOS EM DIFERENTES COLETAS AO
LONGO DO DIA E SUA ATIVIDADE BIOLÓGICA

Dissertação apresentada como pré-requisito para a conclusão do Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Roraima. Área de concentração: Química de Produtos Naturais. Defendida em 16 de setembro de 2015 e avaliada pela seguinte banca examinadora:

Prof. Dr. Luiz Antonio Mendonça Alves da Costa
Orientador/Departamento de Química - UFRR

Prof. Dr. Rodrigo Schutz Rodrigues
Centro de Estudos da Biodiversidade - UFRR

Prof. Dr. Francisco das Chagas do Nascimento
Departamento de Química - UFRR

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar quero agradecer ao meu Deus por estar sempre cuidando de mim, por ser o meu refúgio, minha fortaleza e o socorro bem presente na hora da angústia. Sabendo que todas as coisas alcançadas foram por intermédio d'Ele, sou eternamente grata ao Senhor por mais essa realização, pela sua provisão que nunca me faltou, sua misericórdia que sempre se renova a cada manhã.

Agradeço aos meus pais, Maria e Mauro pelo apoio, incentivo, dedicação, companheirismo, enfim, por sempre estarem ao meu lado. Agradeço aos meus irmãos Val, Kelly, Marcileia e Vagner e também ao meu cunhado e sobrinhos pelo apoio.

Agradeço ao prof. Luiz Antonio pela oportunidade, por suas orientações, pela paciência e dedicação e pelo seu exemplo como profissional da educação.

Agradeço a prof.^a Adriana Flach pelo incentivo, ajuda e colaboração durante todo esse período de laboratório.

Aos meus amigos e colegas de laboratório: Edineide Cristina, Gilmar e Iolanda, pela amizade, incentivo, ajuda, brincadeiras, descontrações, e tantos momentos bons que compartilhamos.

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Química.

Enfim agradeço a todos que de forma direta ou indireta me ajudaram durante essa trajetória.

“O temor do Senhor é o princípio da ciência:
os loucos desprezam a sabedoria e a
instrução”.

Pv 1:7

RESUMO

Lippia origanoides Kunth (Verbenaceae) é uma planta arbustiva, que em Roraima (Brasil), encontra-se amplamente distribuída em áreas de savana. O óleo essencial de diversas espécies do gênero *Lippia* tem sido estudado quanto às variações quantitativas e qualitativas dos seus constituintes bem como as atividades biológicas, onde se têm obtido bons resultados. Esse trabalho tem por objetivo avaliar o perfil químico do óleo essencial de quimiotipos de *Lippia origanoides* e determinar sua atividade biológica. Para realização das análises coletou-se material a partir de dois indivíduos de *L. origanoides* inicialmente denominados de indivíduo A e indivíduo B, localizados no município de Boa Vista, no bairro Monte Cristo às margens da Rodovia BR 174, no Km 517, em três diferentes horários (8, 12 e 18 horas) nos meses de maio e junho de 2013. Os óleos foram extraídos por hidrodestilação, analisados por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas. A identificação dos constituintes do óleo essencial foi realizada com o auxílio de padrões, índice de Kovats, bibliotecas digitais e comparação com dados da literatura. Para a determinação da atividade antioxidante empregaram-se os métodos de sequestro do radical livre DPPH e o de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico. O perfil cromatográfico dos óleos dos dois indivíduos apresentou diferenças significativas em todos os horários de coleta, e diante disso determinou-se a existência de quimiotipos para a espécie coletada nessa região, sendo que o constituinte majoritário cariofileno foi obtido a partir do indivíduo A sendo denominado de quimiotipo A e o constituinte majoritário carvacrol foi obtido a partir do indivíduo B sendo denominado de quimiotipo B. No quimiotipo A, nos três horários de coleta, forneceu o *E*-cariofileno com teor variando de 17,91 a 23,92%, seguido do óxido de bisabolol 10,43 a 12,57%. No quimiotipo B, o carvacrol apresentou uma pequena faixa variação de 32,52 a 37,41% ao longo do dia nos dois períodos de coletas. Na avaliação antioxidante dos quimiotipos para o ensaio com o radical DPPH foi possível observar que o quimiotipo B apresentou maior atividade, uma vez que o valor de IC_{50} foi de 0,045 mg/mL enquanto que o quimiotipo A forneceu IC_{50} de 2,2 mg/mL. Pelo método da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico o percentual de atividade do quimiotipo B foi melhor e mais próximo do antioxidante sintético BHT, inibindo assim a oxidação do β -caroteno. Quanto à atividade antimicrobiana, não se obteve bons resultados, uma vez que os valores da concentração inibitória mínima (CIM) foram elevados comparados com o padrão antimicrobiano utilizado. Com esses resultados pode-se inferir que *Lippia origanoides* apresenta potencial para a utilização como antioxidante natural.

Palavras-chave: Constituição. Carvacrol. *E*-cariofileno. Atividade antioxidante.

ABSTRACT

Lippia origanoides Kunth (Verbenaceae) is a shrub widely distributed in savanna areas in the state of Roraima (Brazil). The quantitative and qualitative variations of the constituents and biological activities of the essential oil of several species of the genus *Lippia* have been studied, with noted success. This study aims to evaluate the chemical profile of the essential oil of chemotypes from *Lippia origanoides* and determine its biological activity. To perform the analyses, material was collected from two *L. origanoides* individuals initially named individual A and individual B, located in the city of Boa Vista, the margins of highway BR 174, at Km 517, at three different times (8am, 12am and 6pm) in May and June 2013. The oils were extracted by hydrodistillation and analyzed by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The identification of essential oil components was performed with the aid of standards, Kovats index, digital libraries and comparison with the literature data. For the determination of antioxidant activity, free radical DPPH sequestration and co-oxidation of β -carotene/Linoleic acid system methods were used. The chromatographic profile of the oils of the two individuals showed significant differences at all collection times, and thus the existence of chemotypes for the species collected in this region was determined, with Caryophyllene being the major constituent, obtained from the Chemotype A individual, while the major constituent carvacrol was obtained from chemotype B. In chemotype A, during the three collection times, *E*-caryophyllene was supplied with content ranging from 17.91 to 23.92%, followed by bisabolol oxide from 10.43 to 12.57%. In chemotype B, carvacrol showed a small variation range from 32.52 to 37.41% along the day in both periods of collection. In the antioxidant evaluation of chemotypes, it was observed that chemotype B presented higher activity, since the IC₅₀ value was 0.045 mg/mL while chemotype A supplied an IC₅₀ value of 2.2 mg/mL. By the method of oxidation of β -carotene/linoleic acid system, the percentage of chemotype B activity was better and closer to the synthetic antioxidant BHT, thereby inhibiting the oxidation of β -carotene. As for antimicrobial activity, good results were not obtained, since the values of the minimum inhibitory concentration (MIC) were elevated compared to the standard antimicrobial used. With these results it can be inferred that the *Lippia origanoides* has potential for use as a natural antioxidant, being important to monitor the essential oil production in order to obtain oil rich in its active principles.

Key-words: Constitution. Carvacrol. *E*-caryophyllene. Antioxidant activity

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	- Espécies de Verbenaceae amplamente cultivadas no Brasil: A) <i>Duranta erecta</i> ; B) <i>Lantana camara</i>	15
Figura 2	- Constituintes fixos isolados de espécies de <i>Lippia</i>	18
Figura 3	- A) <i>Lippia origanoides</i> ; B) Ramos de <i>Lippia origanoides</i> Contendo brácteas florais.....	19
Figura 4	- Exemplos de alguns terpenos.....	23
Figura 5	- Formação dos terpenos a partir da rota do ácido mevalônico.....	24
Figura 6	- Redução do radical livre DPPH.....	28
Figura 7	- A) β -caroteno; B) Ácido linoleico.....	28
Figura 8	- Sistema de hidrodestilação.....	32
Figura 9	- Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas CG-EM.....	33
Figura 10	- Rendimento do óleo essencial dos indivíduos A e B nos respectivos período e horários de coleta.....	38
Figura 11	- Cromatogramas de íons totais representativos dos óleos essenciais de <i>L. origanoides</i> : A) Quimiotipo A; B) Quimiotipo B.....	39
Figura 12	- Variação dos constituintes majoritários do Quimiotipo A: 1) Maio; 2) Junho.....	42
Figura 13	- Variação dos constituintes majoritários presentes no Quimiotipo B: 1) Maio; 2) Junho.....	43
Figura 14	- Proposta biosintética do timol e carvacrol.....	44
Figura 15	A) Placa após ser borrifada com DPPH concentrado; B) Placa depois de 15 minutos após o borrifamento com DPPH.....	44
Figura 16	- Ensaio da atividade antioxidante do óleo: A) Quimiotipo A; B) Quimiotipo B.....	45
Figura 17	- Ensaio da reação do sistema β -caroteno/ácido linoleico com os óleos e padrões.....	48
Figura 18	- Cinética da reação do óleo no sistema β -caroteno/ácido linoléico.....	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Classificação taxonômica de espécies do gênero <i>Lippia</i> na seção <i>Goniostachyum</i>	20
Tabela 2	- Número de constituintes e percentuais de identificação dos quimiotipos A e B nos respectivos meses e horários de coleta....	41
Tabela 3	- Valores de IC ₅₀ para os óleos dos quimiotipos de <i>Lippia organoides</i> e padrões.....	45
Tabela 4	- Percentual da atividade antioxidante pelo método de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	49
Tabela 5	- Atividade antimicrobiana do óleo essência do quimiotipo A e quimiotipo B.....	50

LISTA DE ABREVIATURAS

μ L - Microlitro
AA% - Atividade antioxidante em %
ATP – Adenosina trifosfato
BHT – Hidróxido Tolueno Butilado
CG-EM - Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas
CIM – Concentração inibitória mínima
DMSO- Dimetilsulfóxido
DNA- Ácido desoxirribonucleico
DPPH-2,2-difenil-1-picrilhidrazila
MVA- Ácido Mevalônico
DRc - Taxa de degradação do controle
DRs - Taxa de degradação na presença do padrão ou extrato
ERO's – Espécies Reativas do Oxigênio
FRAP-Poder Antioxidante de Redução do Ferro
IC₅₀-Concentração inibitória
IFAM - Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas
LBQF - Laboratório de Biotecnologia e Química Fina
LPS - Lipopolissacarídeo
Mg - Miligrama
mL - Mililitro
mM - Milimolar
ND- Não detectado
Nm - Nanômetro
TEAC-Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox
UFRR - Universidade Federal de Roraima
UV- Ultra Violeta
ORAC - Capacidade de Absorção dos Radicais Oxigenados

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	OBJETIVOS	14
2.1	OBJETIVO GERAL.....	14
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	15
3.1	FAMILIA VERBENACEAE.....	15
3.1.1	O gênero <i>Lippia</i>	16
3.1.2	<i>Lippia organoides</i> Kunth	18
3.2	ÓLEOS ESSENCIAIS.....	21
3.2.1	Quimiotipia	25
3.3	ATIVIDADE ANTOXIDANTE.....	26
3.3.1	Métodos para avaliação da atividade antioxidante	27
3.4	ÓLEOS ESSENCIAIS COMO AGENTES ANTIOXIDANTES.....	28
3.5	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS.....	29
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	COLETA.....	31
4.1.1	Extração do óleo essencial	31
4.2	DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL.....	32
4.3	ANÁLISE QUALITATIVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	33
4.4	ANÁLISE QUANTITATIVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH.....	33
4.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO SISTEMA β - CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO.....	34
4.6	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO ÓLEO.....	35
4.6.1	Microorganismos	35
4.6.2	Microdiluição em caldo	35
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	36
5.1	ANÁLISE PRELIMINAR DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Lippia organoides</i> E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA.....	36
5.2	RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	37
5.3	CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL.....	38
5.4	ANÁLISE QUALITATIVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	44
5.5	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH.....	45
5.6	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO SISTEMA β - CAROTENO/ÁCIDO LINOLEICO.....	48
5.7	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	50
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	54
8	APÊNDECE	63

1. INTRODUÇÃO

A importância das plantas aromáticas e/ou medicinais como fontes de substâncias bioativas tem crescido nos últimos anos devido à ampla aplicabilidade que esses produtos alcançam. São inúmeros os trabalhos relacionados com atividades biológicas de compostos fixos e voláteis de plantas devido a grande diversidade de substâncias com possível potencial para esse fim. Com isso tem-se um grande desafio para a descoberta e identificação dessas substâncias.

Diante do crescente número de doenças ocasionadas por danos oxidativos, é grande o interesse em pesquisas para obter novos compostos antioxidantes. Para isso tem-se desenvolvido diversos métodos *in vitro* para a seleção inicial dessas substâncias (ALVES et al., 2010).

Os óleos essenciais são misturas de diferentes compostos orgânicos voláteis constituídos principalmente de mono e sesquiterpenos (PRINS et al, 2006). Possuem aplicabilidade em perfumarias, cosméticos, alimentos e também são utilizados como aromas e fragrâncias em composição farmacêutica. A composição dos óleos essenciais é passível de mudanças decorrentes de fatores relacionados com o ambiente em que a planta que os produz se desenvolve.

Fatores extrínsecos como temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol, precipitação de chuvas e o regime de ventos exercem influência direta (SIMÕES; SPITZER, 2004). A sazonalidade e o ritmo circadiano também são fatores determinantes tanto no rendimento quanto nos teores dos constituintes dos óleos essenciais. Esses aspectos estão relacionados com a formação de quimiotipos, diferentes constituições que os óleos essenciais de uma mesma espécie venham apresentar.

O gênero *Lippia* L., o segundo maior da família Verbenaceae, abrange espécies que são usadas popularmente para diversas enfermidades como gastrointestinais e respiratórias. Muitas espécies apresentam significativa produção de óleos essenciais e muitos estudos são realizados a fim de conhecer o potencial bioativo dos constituintes presentes nesses óleos. O destaque está nas investigações da ação antimicrobiana (PASCUAL et al., 2001).

Visando a continuidade de estudos realizados pelo Grupo de pesquisa de Moléculas Bioativas (BioMol) com uma espécie de *Lippia*, neste trabalho pretende-se avaliar a composição do óleo essencial de dois indivíduos da espécie *Lippia*

origanoides Kunth sob condições ambientais semelhantes, em coletas ao longo do dia em dois meses diferentes do mesmo ano e também avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais desses indivíduos.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o perfil químico do óleo essencial de quimiotipos de *Lippia origanoides* Kunth obtidos em diferentes coletas ao longo do dia e sua atividade biológica.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Coletar folhas da planta em três horários diferentes ao longo do dia;
- Extrair o óleo essencial das folhas da planta;
- Determinar a composição química dos óleos essenciais;
- Avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método da ação sequestradora do radical DPPH;
- Avaliar a atividade antioxidante pelo método da co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico;
- Avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial.

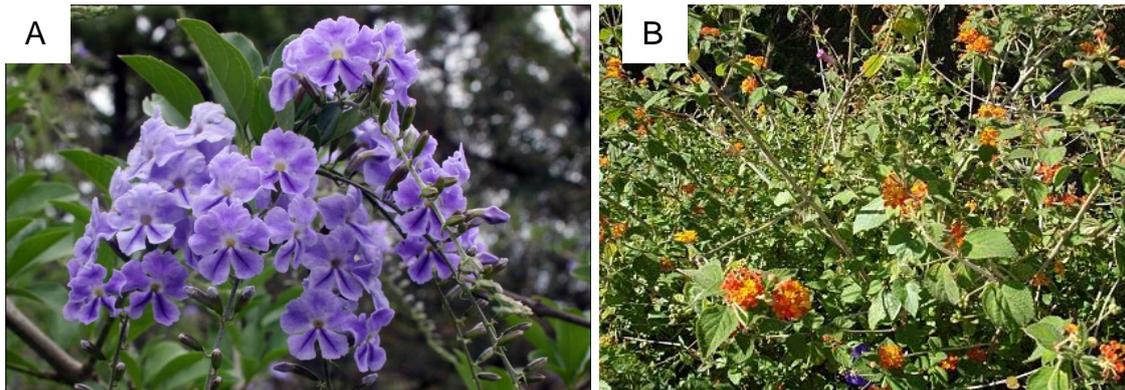
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3. 1. FAMÍLIA VERBENACEAE

A família Verbenaceae abrange uma grande variedade de plantas com flores caracterizadas como arbustos, árvores de pequeno porte, ervas, cipós ou trepadeiras lenhosas. Dentro dessa família, são encontrados aproximadamente, um total de 34 gêneros e 1150 espécies. Estas possuem maior ocorrência na América do Sul, do Norte e América Central em países como Brasil, Venezuela, Equador, Colômbia, México e Estados Unidos, mas especificamente em regiões tropicais e subtropicais (SMITH *et al.*, 2004; HEYWOOD *et al.*, 2007; MARX *et al.*, 2010). No Brasil, existe a ocorrência de 16 gêneros e cerca de 286 espécies dessa família (SALIMENA *et al.*, 2015).

As Verbenaceae têm destaque econômico por possuírem plantas com fins ornamentais como, por exemplo, *Duranta erecta* e *Lantana camara* (Figura 1). Além disso, muitos representantes da família encontram aplicabilidade na medicina popular, como é o caso de algumas espécies do gênero *Aloysia* Juss. que são utilizadas como chás para auxiliar no processo de digestão (ATKINS, 2004).

Figura 1. Espécies de Verbenaceae amplamente cultivadas no Brasil: A) *Duranta erecta*; B) *Lantana camara*



Fonte: DANKO, 2011

As espécies da família Verbenaceae são descritas botanicamente com as seguintes características:

Folhas opostas, raramente verticiladas, simples, sem estípulas, margem geralmente serrada. Inflorescência racemosa; flores pouco vistosas, bissexuadas, zigomorfas, diclamídeas; cálice geralmente pentâmero, gamossépalo, prefloração imbricada, geralmente persistente na frutificação; corola geralmente pentâmera, gamopétala, bilabiada, prefloração imbricada; estames 4,

neste caso didínamo; raramente 2 mais 2 estaminódios; ovário súpero, bicarpelar, geralmente com lóculos divididos por um falso septo, tornando-o tetralocular ou bilocular, quando um dos carpelos é atrofiado (*Lantana*, *por ex.*), estilete terminal, placentação ereta, óvulos 2 por carpelo. Fruto drupa ou esquizocarpo (SOUSA; LORENZI, 2008, p.582).

Outro destaque atribuído às Verbenaceae é em relação à produção de óleos essenciais, sendo que os gêneros de maior abundância dentro da família, *Lantana* L. e *Lippia* L. apresentam uma vasta quantidade de espécies que produzem óleos essenciais e os tais são empregados para fins terapêuticos e medicinais (HEYWOOD *et al.*, 2007).

3.1.1 O gênero *Lippia*

O gênero *Lippia* é um dos mais abundantes na família verbenaceae e consiste em 100 espécies caracterizadas como plantas herbáceas, subarbustivas e pequenas árvores (O'LEARY *et al.*, 2012). Os indivíduos desse gênero são amplamente encontrados na América do Sul, América central e territórios da África tropical (VERDECOURT, 1992 apud TERBLACHÉ; KORNELIUS, 1996).

As espécies de *Lippia* são largamente empregadas na medicina popular para o tratamento de diversas doenças, principalmente as de caráter respiratório e gastrointestinal. Diversos táxons de *Lippia* são reportados na literatura com estudos que vão desde a investigação da composição química a testes biológicos tanto de compostos fixos como de compostos voláteis (PASCUAL *et al.*, 2001).

Lippia alba (Mill) N.E.Br. é uma das plantas mais utilizadas dentro do gênero, pois suas folhas são usadas na forma de infusões, banhos e xaropes para o tratamento de distúrbios estomacais, afecção das vias respiratórias, hipertensão e como sedativo (DI STASI *et al.*, 2002; BARROS *et al.*, 2009). Devido a sua importância na medicina popular, são inúmeras as pesquisas realizadas com essa espécie principalmente em relação ao óleo essencial e as variações quantitativas e qualitativas do mesmo. (BARROS *et al.*, 2009; OLIVEIRA *et al.*, 2006; BARBOSA, *et al.*, 2006).

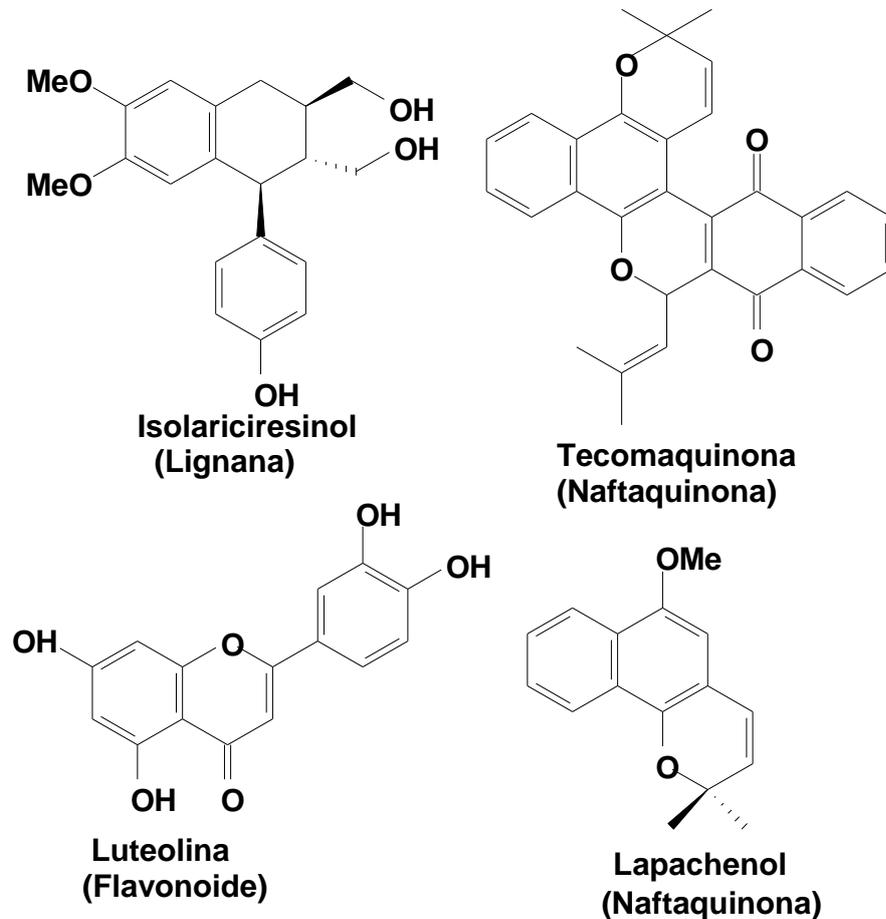
Outra espécie citada na literatura é *Lippia sidoides* Cham., que recentemente foi descrita como sinonímia de *Lippia origanoides* Kunt, com estudos que descrevem principalmente a atividade biológica de seu óleo essencial. Há resultados quanto à atividade larvicida, acaricida e antimicrobiana (CARVALHO *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2014; VERAS *et al.*, 2014). Botelho *et al.* (2007) afirmam

que o óleo essencial de *Lippia sidoides* e seus principais componentes (timol e carvacrol) exercem efeitos antimicrobianos significativos contra patógenos orais, reforçando a premissa do uso popular da planta.

Lippia gracilis Schauer é uma espécie vastamente empregada por comunidades tradicionais do Nordeste do Brasil para o tratamento de gripe, tosse, sinusite, bronquite, congestão nasal, dores de cabeça (LORENZI; MATOS, 2002). Após a realização de um estudo sobre o efeito citotóxico sobre células tumorais do óleo essencial obtido a partir das folhas de *Lippia gracilis*, Ferraz *et al.* (2013) concluíram que o óleo possui significativa atividade antitumoral supondo assim que o óleo essencial de *Lippia gracilis* é um forte recurso medicinal.

Timol, carvacrol, 1,8-cineol, limoneno, *p*-cimeno, linalol, α -pineno e β -cariofileno são principais constituintes voláteis comumente encontrados nos óleos essenciais de espécies de *Lippia*. Esses compostos podem apresentar variações significativas em seus conteúdos influenciados por diversos fatores. Alguns metabolitos secundários fixos encontrados em estudos fitoquímicos de *Lippia* são: flavonoides (HENNEBELLE *et al.* 2008; ALMEIDA *et al.*,2010; GUIMARÃES *et al.*,2012), naftoquinonas (COSTA *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*,2003), iridóides (BARBOSA *et al.*, 2006), e triterpenos (FUNARI *et al.*, 2012; FARIAS *et al.* 2010). A Figura 2 apresenta alguns desses compostos

Figura 2. Constituintes fixos isolados de espécies de *Lippia*



Fonte: COSTA *et al.*, 2002

3.1.2 *Lippia origanoides* Kunth

Lippia origanoides é uma planta arbustiva conhecida popularmente como salva do Marajó e alecrim da Angola nos Estados do Pará e Piauí. Essa espécie é utilizada para o tratamento de infecções respiratórias, gastrointestinais, como um antisséptico e também como tempero culinário. Em países como México a espécie é conhecida como orégano e por vezes é utilizada como condimento substituindo o mesmo. Isso em decorrência da presença de carvacrol (DELGADO-OSPINA, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2007; SANTOS *et al.*, 2004).

Em Roraima, *Lippia origanoides* (Figura 3) é conhecida popularmente como salva do campo e encontra-se amplamente distribuída em áreas de savana. Em estudos anteriores essa espécie era nomeada como *Lippia microphylla* Cham., sendo encontrados registros no acervo do herbário do Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia (INPA), coletas em regiões de Alto Alegre, Boa Vista,

Normandia e Surumú (SILVA,2003). Entretanto, Maia *et al.* (2005) registraram a ocorrência de uma espécie identificada como *Lippia glandulosa* Schauer em área de savana ao longo da BR 174.

Figura 3. A) *Lippia origanoides*; B) Ramos de *Lippia origanoides* contendo brácteas florais.



Fonte: AUTORA, 2015

Em um estudo sobre a delimitação de espécies de *Lippia* na seção *Goniostachyum*, O'leary et al. (2012) baseando-se na morfologia das inflorescências e brácteas florais delimitaram táxons e a partir desse agrupamento descobriram que a espécie *Lippia origanoides* apresenta 28 sinónimas, isso devido a grande dificuldade de distinguir esta espécie de outros táxons desta seção. Entre as sinónimas da espécie encontram-se *Lippia microphylla*, *Lippia sidoides*, *Lippia rígida* Schauer, *Lippia glandulosa*, *Lippia graveolens* Kunth (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação taxinômica de espécies do gênero *Lippia* na seção *Goniostachyum*.

Grupo	Taxón aceito no estudo	Sinonímia
C	<i>Lippia organoides</i> Kunth.	<i>Lantana organoides</i> Martins & Galeotti <i>Lippia affinis</i> Schauer <i>Lippia berlandieri</i> Schauer <i>Lippia berteri</i> Spreng. <i>Lippia candicans</i> Hayek <i>Lippia elegans</i> Cham. <i>Lippia elegans</i> var. <i>macrophylla</i> Moldenke <i>Lippia elegans</i> var. <i>obtusifolia</i> Moldenke <i>Lippia glandulosa</i> Schauer <i>Lippia graveolens</i> Kunth <i>Lippia graveolens</i> f. <i>macrophylla</i> Moldenke <i>Lippia graveolens</i> f. <i>microphylla</i> Moldenke <i>Lippia graveolens</i> f. <i>loeseneriana</i> Moldenke <i>Lippia palmeri</i> S. Watson <i>Lippia palmeri</i> var. <i>spicata</i> Rose <i>Lippia mattogrossensis</i> Moldenke <i>Lippia microphylla</i> Cham. <i>Lippia obscura</i> Briq. <i>Lippia pendula</i> Rusby <i>Lippia polycephala</i> Briq. <i>Lippia polycephala</i> var. <i>aemilii</i> Briq. <i>Lippia rigida</i> Schauer <i>Lippia rubiginosa</i> Schauer <i>Lippia rubiginosa</i> f. <i>pauper</i> Schauer <i>Lippia salviifolia</i> Cham. <i>Lippia schomburgkiana</i> Schauer <i>Lippia soides</i> Cham. <i>Lippia velutina</i> Schauer

Fonte: O'leary *et al.*, 2012

O óleo essencial de *Lippia organoides* tem sido estudado quanto às variações quantitativas nos teores dos seus constituintes majoritários levando a suposição da ocorrência de quimiotipos para essa espécie (STASHENKO *et al.*, 2010; VEGA-VELA; SÁNCHEZ, 2012). Betancur-Galvis *et al.* (2011) analisando a composição química, a atividade antifúngica e citotóxica de 9 óleos essenciais obtidos de *Lippia organoides* coletada a partir de diferentes regiões da Colômbia, classificaram três quimiotipos de acordo com a variação quantitativa nos teores dos constituintes majoritários, sendo eles: quimiotipo timol; quimiotipo carvacrol; quimiotipo *p*-cimeno/trans- β -cariofileno.

Stashenko *et al.* (2013) identificaram também os quimiotipos timol, carvacrol e cariofileno em *L. origanoides*, e nos extratos destes quimiotipos foram detectados os seguintes flavonoides: Pinocembrina, naringenina, luteolina e quercetina. A presença destes compostos fixos e dos isômeros voláteis timol e carvacrol são indícios de que essa espécie possui potencial como antioxidante e antimicrobiano natural.

Estudos realizados por Morais *et al.* (1972) com o óleo essencial de *L. origanoides* revelaram a ausência do carvacrol enquanto que *p*-cimeno (27,8), α -terpineno (22,4%) e timol (20,6%) foram detectados como constituintes majoritário. Ao contrário do relatado anteriormente, Teixeira *et al.* (2014) detectaram majoritariamente a presença de carvacrol (41,51%), *p*-cimeno (18,36%), γ -terpineno (17,03%) e timol (4,86%) em estudos com o óleo essencial dessa espécie. Escobar *et al.* (2010) analisando o óleo essencial de plantas coletadas em diferentes regiões da Colômbia obtiveram carvacrol (20,5%) como constituinte majoritário seguido de *p*-cimeno (14,9%), timol (13,4%) e γ -terpineno (7,5%).

Em um recente trabalho, foi realizado o estudo circadiano e sazonal do óleo essencial de *L. origanoides* e os resultados revelaram óleos ricos em *E*-cinamato de metila e (*E*)-nerolidol, com uma composição diferente de outros óleos anteriormente mencionados, e diante disso, foi relatada a ocorrência de um novo quimiotipo de *L. origanoides*, o que seria o quimiotipo *E*-cinamato de metila e *E*-nerolidol (RIBEIRO *et al.*, 2014).

L. origanoides apresenta potencial para atividades antifúngica (BETANCUR-GALVIS *et al.*, 2011), citotóxica (ZAPATA *et al.*, 2009), pesticidas (SIVIRA *et al.*, 2011), antimicrobianas (OLIVEIRA *et al.*, 2007; RAMÍREZ *et al.*, 2009) e antioxidantes (ARANGO *et al.*, 2012; TEXEIRA *et al.*, 2014).

3.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

As plantas aromáticas são um recurso natural que há muito tempo vêm sendo utilizado pelo homem para finalidades distintas, destacando-se o uso para fins terapêuticos. Essas plantas eram utilizadas por diversas civilizações sob a forma de extratos, unguentos, especiarias e óleos. Como exemplo, os egípcios utilizavam óleos essenciais para fins curativos, em cosméticos e na alimentação. Para a obtenção desses óleos, faziam o uso de forma rudimentar de um método de

extração que foi aperfeiçoado milênios depois na França recebendo a denominação de *enfleurage*. Gregos e babilônicos também faziam uso de óleos aromáticos para cuidados com a saúde e massagens terapêuticas (SANTOS 2011).

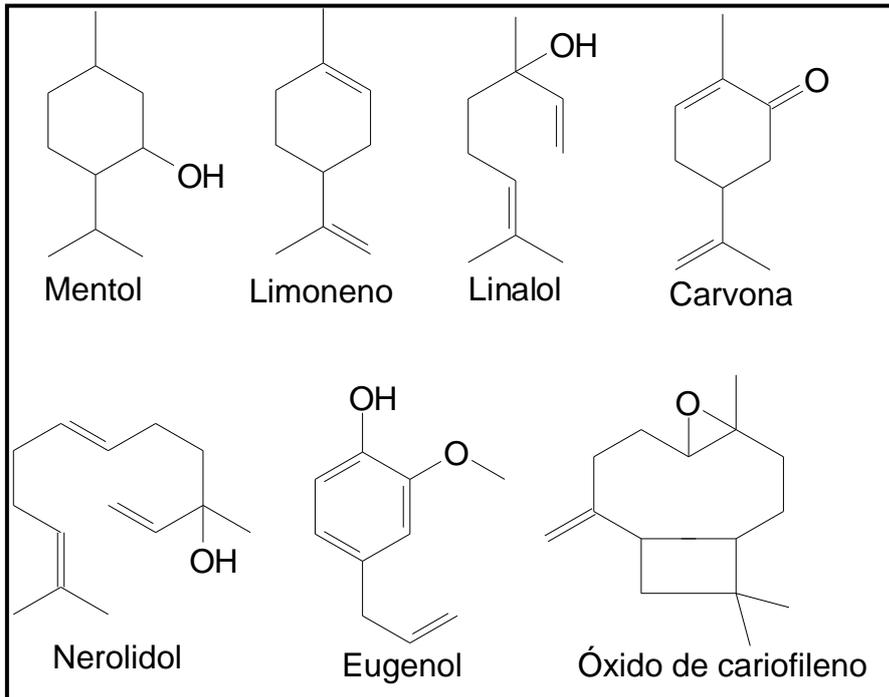
Na atualidade, os óleos essenciais têm sido uma importante fonte de matéria prima para diversas indústrias. De acordo com Bakkali *et al.* (2008) cerca de 3000 óleos essenciais são conhecidos, e desses, 300 são comercialmente importantes, especialmente para a indústria farmacêutica, alimentícia, agrônômica, indústrias sanitárias, de cosméticos e perfumarias (CRAVEIRO e QUEIROZ, 1993; BAKKALI *et al.*, 2008). Segundo Bizzo; Hovell; Rezende (2009), o Brasil tem se destacado na produção de óleos essenciais, ao lado da Índia, China e Indonésia, que são considerados os quatro grandes produtores mundiais. O destaque do Brasil se deve aos óleos essenciais de cítricos, obtidos como subprodutos da indústria de sucos.

Os óleos essenciais são encontrados em plantas aromáticas e podem ser produzidos por diferentes órgãos da planta, ou seja, flores, folhas, caules, galhos, sementes, frutas, raízes, madeira ou cascas. São armazenadas em glândulas secretoras, cavidades, canais oleíferos, células epidérmicas ou tricomas glandulares (SANTOS 2011).

Estão relacionados a várias funções indispensáveis à sobrevivência da planta em seu ecossistema, agindo na defesa contra microrganismos e predadores, e também na atração de agentes polinizadores. Outros atributos pertencentes aos óleos essenciais são: o sabor ácido e picante, instabilidade na presença de ar, luz e calor, a solubilidade em solventes orgânicos apolares e densidade geralmente menor do que da água (SANGWAN *et al.*, 2001; SIMÕES; SPITZER, 2004).

Comumente são definidos como uma mistura complexa de substâncias com características voláteis, lipofílicas e líquidas. Os terpenos (Figura 4) são a classe de compostos com maior abundância em óleos essenciais (mono e sesquiterpenos) e abrangem substâncias com as mais diversificadas funções orgânicas, desde hidrocarbonetos como é o caso da maioria dos monoterpenos até álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos, ésteres e éteres, compostos fenólicos, entre outros (BAKKALI *et al.*, 2008).

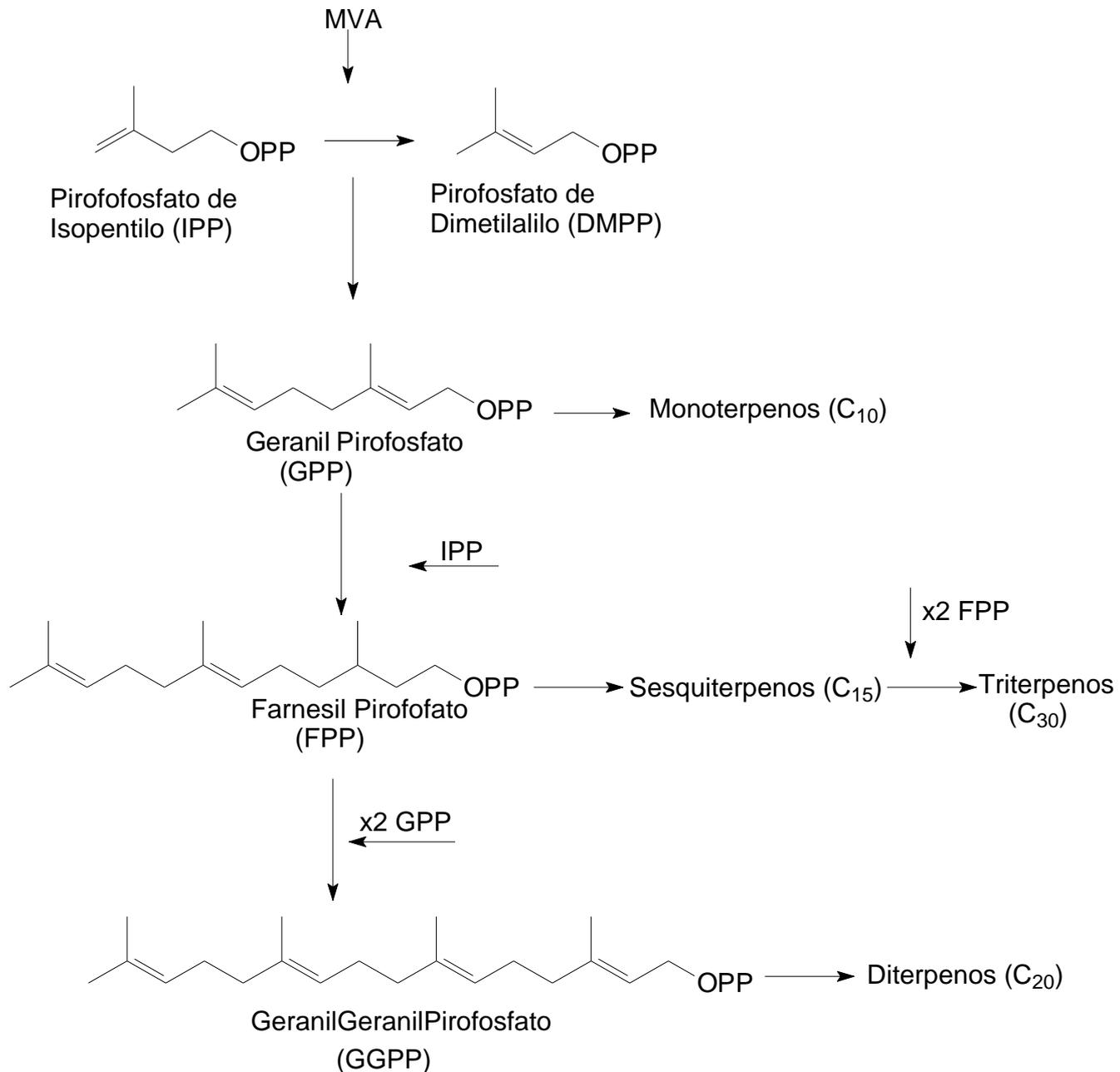
Figura 4. Exemplos de alguns terpenos



Fonte: AUTORA, 2015

Os terpenos são sintetizados a partir de duas rotas biossintéticas, a rota do ácido mevalônico e a rota da 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato. A sua estrutura é composta por unidades pentacarbonadas denominadas de isopreno. E sua classificação se baseia na quantidade de unidades isoprênicas presente na estrutura da molécula: monoterpenos (C10) com duas unidades isoprênicas, sesquiterpenos (C15) com três unidades isoprênicas, diterpenos (C20) com quatro unidades isoprênicas, triterpenos (C30) com seis unidades isoprênicas e assim por diante (Figura 5) (PADUCH *et al.*, 2007).

Figura 5. Formação dos terpenos a partir da rota do ácido mevalônico (MVA).



Fonte: DEWICK, 2009.

Em se tratando de constituição, os óleos essenciais nem sempre se apresentam constantes e sim com variações quantitativas e qualitativas influenciadas por diferentes fatores. Sabe-se que a produção de metabolitos secundários nos vegetais ocorre de acordo com suas necessidades, seja para defesa ou adaptação da planta. Portanto, condições ambientais e climáticas podem ocasionar alterações na biossíntese desses compostos (GOBBO-NETO; LOPES,

2007). De acordo com Sá *et al.* (2012), a composição do óleo essencial obtido a partir das folhas de *Myrcia tomentosa* Aubl. coletadas a cada dois meses, de junho de 2009 a abril de 2010, apresentou variação influenciada pela época de coleta, onde o composto biciclogermacreno foi encontrado em todas as amostras, tendo uma variação de 14,71% para 4,73% nos meses de junho e outubro, respectivamente.

Avaliando a variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. Cerqueira *et al.* (2009), observaram que as coletas realizadas bimestralmente a partir de fevereiro a dezembro de 2003, em Salvador-BH, proporcionaram uma variação supostamente ocasionada por fatores climáticos. Alguns constituintes não identificados, com índices de Kovats de 1582, 1586 e 1602, tiveram a média de suas concentrações nos meses de verão o dobro da média de suas concentrações no inverno.

De acordo com Santos *et al.* (2009), a época de coleta e variação climática influenciaram no rendimento do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*, sendo que os maiores teores foram detectados em setembro e outubro de 2005 e abril de 2006. Barros *et al.* (2009) observaram que a coleta em diferentes épocas do ano influenciou no rendimento do óleo essencial de *Lippia alba*, sendo verificado que os maiores teores de óleo essencial ocorrem no mês de janeiro (verão).

3.2.1 Quimiotipia

A quimiotipia é uma característica que distingue plantas aromáticas morfologicamente semelhantes, por meio da diferença na composição química (SANTO 2011).

Ciccio; Ocampo (2010) afirmam que para a espécie *Lippia alba* a existência de quimiotipos está relacionada com a distribuição biogeográfica, sendo esta a resposta a dois fatores: primeiro a fatores ecológicos e climáticos, que se justificam pela ocorrência de quimiotipos por regiões geográficas com características próprias que resultam na capacidade das espécies para responder as condições do ambiente. O segundo fator está relacionado às condições genéticas da espécie, uma vez que existem espécies com diferentes quimiotipos em um mesmo local e ambiente.

Dentro desse pensamento, Grayer *et al.* (1996) afirmam que para estudos comparativos, é importante que as plantas sejam cultivadas nas mesmas condições.

Várias espécies são relatadas por apresentarem diferentes quimiotipos. No gênero *Lippia*, temos o exemplo de *L. alba*, que apresenta o quimiotipo 1,8-cineole quimiotipo citral, quimiotipo limoneno e quimiotipo mirceno. No gênero *Ocimum*, a espécie *O. gratissimum* L. com o quimiotipo eugenol e metil eugenol. No gênero *Thymus*, *T. vulgaris* L. apresenta o quimiotipo geraniol, quimiotipo α -terpineol, quimiotipo linalol, quimiotipo carvacrol e quimiotipo timol) (ZOGHBI, *et al.*, 1998; THOMPSON *et al.*, 2003; VALE *et al.*, 2002; BENITEZ; LEÓN; STASHENKO *et al.*, 2009).

3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Radicais livres são gerados durante o processo de oxidação tendo importante participação em diversas reações no metabolismo humano. São caracterizados por possuírem elétrons desemparelhados em sua camada mais externa, e isso os torna instáveis e altamente reativos (ALVES *et al.*, 2010)

As ERO's (Especies Reativas de Oxigênio) causam danos ao DNA, e desencadeiam a peroxidação dos lipídios nas membranas celulares, sendo que as mais reativas são os radicais superóxido, hidroperoxila, hidroxila e o peróxido de hidrogênio. Além disso, os radicais livres estão diretamente associados a diversas patologias, desde doenças de caráter degenerativo como Alzheimer, câncer, doenças cardíacas e pulmonares como também ao envelhecimento precoce. A formação de radicais livres ocorre através de fatores endógenos. Entretanto, a exposição a fatores exógenos (radiação UV, dieta, medicamentos, entre outros) também influenciam no aumento do estresse oxidativo, sendo, portanto necessário a presença de antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos na dieta para combater estes agentes agressores (MACHLIN; BENDICH, 1987).

Um antioxidante, de acordo com Halliwell e Gutteridge (1995), é definido como qualquer substância que quando presente em baixas concentrações em comparação com o substrato oxidável, atrasa ou inibe consideravelmente a oxidação desse substrato. Contudo, existem especulações em relação essa definição pelo fato de que o potencial de um agente antioxidante depende do método aplicado para a avaliação do mesmo, uma vez que cada matriz analisada apresenta diferentes

compostos que podem desempenhar ação antioxidante diferenciada. Por isso Halliwell (2007) simplificou a definição para qualquer substância que retarda, impede ou remove o dano oxidativo de uma molécula alvo.

Os agentes antioxidantes podem ter origem em fontes endógenas, como também serem provenientes de outras fontes como a dieta alimentar, contribuindo de forma significativa no combate aos radicais livres. Dentre os compostos antioxidantes naturais destacam-se a vitamina C, vitamina E, carotenos, polifenóis e selênio. A vitamina E (α -tocoferol) é um importante antioxidante lipossolúvel capaz de bloquear a reação de peroxidação lipídica. O β -caroteno e outros carotenoides também são descritos como protetores dos lipídeos atuando na inibição do radical peroxila (PERCIVAL, 1998; SOUSA *et al.*, 2007).

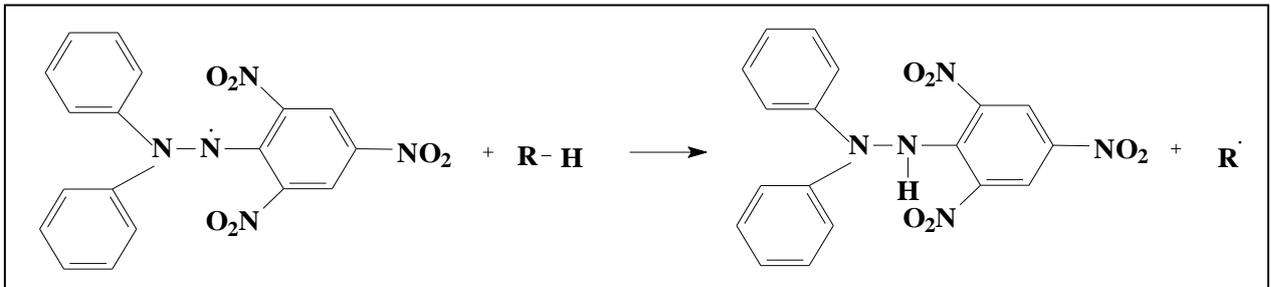
3.3.1 Métodos para avaliação da atividade antioxidante

Diferentes métodos são utilizados para avaliar a atividade antioxidante de produtos naturais a fim de selecionar substâncias promissoras para o combate a doenças degenerativas. De acordo com Prior; Wu; Schaich (2005), os testes antioxidantes podem ser divididos em duas classes: os métodos baseados na transferência de elétrons, envolvendo reações de oxirredução entre oxidante e antioxidante (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox - TEAC, Poder Antioxidante de Redução do Ferro - FRAP, sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil - DPPH e Folin-Ciocalteu). Os outros métodos são baseados na transferência de átomos de hidrogênio com monitoramento da cinética da reação na presença de uma substância oxidável e um antioxidante (Capacidade de Absorção dos Radicais Oxigenados - ORAC, β -caroteno/ácido linoleico, entre outros). Dentre esses métodos *in vitro* os mais utilizados são o ensaio pelo radical DPPH e sistema β -caroteno/ácido linoleico.

O radical DPPH apresenta coloração violeta que, quando na presença de agentes antioxidantes, torna-se amarelo pálido. Isso ocorre porque esse método baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante, ou seja, o radical DPPH (Figura 6) é reduzido ao capturar um hidrogênio de uma substância antioxidante (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). A espectrofotometria é utilizada para avaliar a habilidade de redução do radical DPPH em comprimento de onda entre 515 a 517nm. A capacidade antioxidante é

observada através do cálculo da porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional. O ensaio é rápido e simples e não envolve condições drásticas de temperatura e oxigenação (MOLYNEUX, 2003).

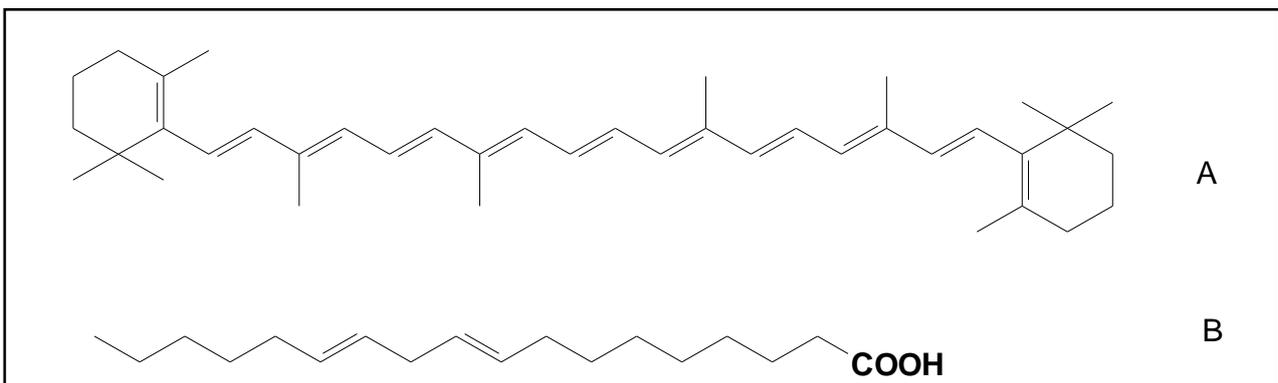
Figura 6. Redução do radical livre DPPH.



Fonte: AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013.

Dentre as técnicas utilizadas para a seleção de antioxidantes naturais com potencial para prevenir doenças crônico-degenerativas, destaca-se o método de oxidação acoplado de β -caroteno e ácido linoleico (Figura 7), que estima a capacidade relativa de compostos antioxidantes para impedir ou retardar a formação de radicais peróxidos na auto-oxidação do ácido linoleico que oxida o β -caroteno na ausência de antioxidantes e conseqüentemente perde a sua cor laranja (MIGUEL, 2010).

Figura 7. A) β -caroteno; B) ácido linoleico.



Fonte: ALVES et al., 2010

3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO AGENTES ANTIOXIDANTES

Os produtos naturais encontram uma ampla aplicabilidade em diversas indústrias, entre elas a farmacêutica. Assim, é importante que se realizem estudos a fim de verificar o potencial bioativo dessas substâncias.

Diante do aparecimento de diversas doenças, tem crescido a busca por fontes naturais de substâncias antioxidantes. Nesse aspecto, os óleos essenciais de diversas espécies têm se destacado com um grande número de estudos sobre o potencial antioxidante dos mesmos. Existe uma grande diversidade de metabolitos secundários na composição dos óleos essenciais. Entretanto a ação antioxidante em sua maioria é atribuída aos compostos fenólicos (AMORATI; FOTI; VALGIMIGLI, 2013).

A exemplo, Damasceno *et al.* (2011) diante da utilização da espécie *L. grandis* Schauer como condimento alimentar e também pela presença de compostos fenólicos em sua composição, realizaram estudos com o óleo essencial da espécie incluindo a capacidade antioxidante. Os resultados mostraram-se significativos, onde a atividade antioxidante foi atribuída à presença dos isômeros fenólicos timol e carvacrol. Além disso, é importante ressaltar que foram utilizados diferentes métodos para avaliação.

O óleo essencial de *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. apresentou um bom potencial antioxidante frente ao radical DPPH, sendo conferido esse resultado também aos compostos timol e carvacrol que segundo o autor, atuam de modo sinérgico (VARDAR-UNLU *et al.*, 2003).

Ruberto e Baratta (2000) avaliando a atividade antioxidante de diversos compostos de diferentes óleos essenciais, observaram que os compostos com maior atividade antioxidante foram os fenólicos. Os autores observaram ainda que apenas três hidrocarbonetos monoterpênicos (terpinoleno, α -terpineno e γ -terpineno) apresentaram considerável efeito antioxidante. Entre os monoterpênicos oxigenados o destaque são para os álcoois alílicos. Os hidrocarbonetos sesquiterpênicos exibiram pouca ou nenhuma ação.

3.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE ÓLEOS ESSENCIAIS

Nos últimos anos tem crescido o número de doenças relacionadas com a ação de microrganismos. E, diante desse aumento também se têm intensificado pesquisas que visam coibir a ação desses causadores de patologias.

Diante disso, e devido ao amplo número de compostos presentes nos óleos voláteis, tem-se feito o uso dos mesmos para testes *in vitro* contra diferentes microrganismos. Os resultados obtidos são de suma importância para diversas indústrias, mais especificamente as de alimentos e farmacêuticas. Os testes antimicrobianos são classificados em três métodos: difusão, diluição e autobiografia (RIOS; RECIO; VILLAR, 1988; OSTROSKY *et al.*, 2008).

O método de difusão é um teste qualitativo, utilizado como prévia para selecionar substâncias com possível potencial antimicrobiano. Já o método de diluição é um teste quantitativo e que determina a Concentração Inibitória Mínima (CIM). De acordo com The National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS, 2003), a CIM é a menor concentração de agente antimicrobiano que inibe completamente o crescimento do organismo nos tubos ou poços de microdiluição conforme detectado a olho nu.

Existe uma discussão em torno dos resultados obtidos na utilização desses testes com óleos essenciais, atribuídos a características como: volatilidade, insolubilidade em água e complexidade de composição. Segundo alguns relatos da literatura essas peculiaridades presentes nos óleos dificultam a comparação e validação dos resultados obtidos (BURT, 2004; NASCIMENTO *et al.*, 2007).

Óleos essenciais de muitas espécies apresentam significativa atividade contra os mais diversificados microrganismos, em especial as que são utilizadas como tempero, condimentos e aromatizantes como, por exemplo, *Thymus vulgaris* (tomilho), *Origanum vulgare* (orégano), entre outros (DORMAN; DEANS, 2000;).

4. MATERIAIS E MÉTODOS

Para a avaliação do perfil químico do óleo essencial de *Lippia origanoides* e determinação da atividade biológica utilizaram-se os seguintes métodos.

4.1 COLETA

Os ramos florais de *Lippia origanoides* foram coletados no Bairro Monte Cristo, no município de Boa Vista – RR, às margens da BR 174, rodovia que liga Boa Vista à Santa Elena do Ueren, na Venezuela, a partir de dois indivíduos que se encontravam próximos um do outro com distância de aproximadamente 2m (N 020°55.021' e W 060°42.650'). As coletas ocorreram em três horários diferentes de um mesmo dia (8, 12 e 18 horas) em dois períodos do ano (Maio e Junho 2013). As plantas das quais foram obtidas as folhas estavam sem inflorescência e possuíam algumas folhas amareladas. O solo estava seco e sem a presença de água nas proximidades, e as condições climáticas consistiam em dia aberto com temperatura elevada.

As exsiccatas foram depositadas no Herbário da Universidade Federal de Roraima (Herbário UFRR) com os tombamentos UFRR 6901 e UFRR 3926. Uma unicata de cada indivíduo foi enviada para o Herbário da Universidade Federal de Juiz de Fora (Herbário CESJ), sendo a espécie identificada pela botânica Dra. Prof^a. Fátima Salimena.

4.1.1 Extração do óleo essencial

Após cada coleta o material fresco foi transportado para o Laboratório de Biotecnologia e Química Fina (LBQF) da Universidade Federal de Roraima (UFRR), onde separaram-se as folhas de aparência saudável, que foram submetidas ao processo de hidrodestilação durante três horas utilizando o aparelho de Clevenger modificado para a obtenção do óleo essencial (Figura 8). Após a extração, o óleo essencial foi separado do hidrolato e coletado num Erlenmeyer de 50mL. Passou-se 5 mL de hexano bidestilado no Clevenger para recuperar eventuais resíduos do óleo e essa solução foi coletada no mesmo Erlenmeyer. A mistura foi seca sob sulfato de sódio anidro, filtrada e deixada na capela de exaustão para evaporação do solvente para o cálculo do rendimento do óleo.

Figura 8 - Sistema de hidrodestilação



Fonte: Autora, 2015

4.2 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos foram analisados em cromatógrafo a gás Shimadzu, modelo GC2010 acoplado ao espectrômetro de massas do mesmo fabricante, modelo QP2010 plus pertencente ao Grupo de Biotecnologia e Química Fina e instalado no Laboratório de Cromatografia do Núcleo de Pesquisas Energéticas (Figura 9). Nas análises o CG-EM foi equipado com coluna capilar Rtx-5 MS (30m X 0,25mm X 0,25 μ m) utilizando o hélio como gás de arraste e com temperaturas programadas de 50 a 260°C com aumento gradativo de 3°C / mim e com split 1:50. Foi injetado no equipamento apenas 1 μ L de uma solução de cada óleo essencial. A identificação dos componentes do óleo essencial foi realizada por comparação de índices de retenção obtidos pela injeção do óleo com hidrocarbonetos lineares (C7-C30) e calculados de acordo com a equação de Van Den Dool; Kratz (1963). Posteriormente, os espectros de massas adquiridos para cada componente do óleo foram comparados com aqueles armazenados nas bibliotecas Wiley 7^a edição e Flavour and Fragrances Natural and Synthetic Compounds e com outros dados publicados (ADAMS, 2007).

Figura 9 - Cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas (GG-EM)



Fonte: AUTORA, 2015

4.3 ANÁLISE QUALITATIVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A avaliação qualitativa da atividade antioxidante dos óleos ocorreu por meio de cromatografia em camada delgada (CCD) pelo o método de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-1-hidrazil (DPPH). Os óleos foram aplicados em uma placa cromatográfica e em seguida borrifou-se uma solução de DPPH em etanol a 1Mm e observou-se a descoloração no ponto de aplicação (MENSOR et al., 2001).

4.4 ANÁLISE QUANTITATIVA DA ATIVIADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO

DPPH

O potencial antioxidante do óleo foi determinado com base na atividade sequestrante do radical livre estável DPPH. Diferentes alíquotas da solução estoque para ambos os óleos e padrões com concentração conhecida foram pipetadas e transferidas para balões volumétricos de 5mL, adicionou-se 1500 μ L de uma solução etanólica de DPPH 1mM e completou-se o volume. Para o controle, procedeu-se da mesma forma, porém sem a alíquota da amostra que foi substituída pelo solvente. A solução denominada “branca” foi constituída apenas de DPPH e etanol. A determinação foi feita em espectrofotômetro UV-Visível, marca Shimadzu, modelo UV-mini 1240, a 516 nm. O percentual da atividade antioxidante (AA%) foi calculado de acordo com a equação descrita por Mensor *et al.* (2001). A concentração inibitória (IC₅₀) foi determinada por análise de regressão linear.

$$AA\% = 100 - \left(\frac{(Abs_{amostra} - Abs_{branco})}{(Abs_{controle})} \times 100 \right)$$

Onde: Abs_{amostra}= Absorbância da amostra

Abs_{branco}= Absorbância do branco

Abs_{controle}=Absorbância do controle

4.5ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DA OXIDAÇÃO ACOPLADA DO SISTEMA B-CAROTENO/ACIDO LINOLEICO

Preparou-se uma solução de β -caroteno (10mg/mL), pesando 10 mg de β -caroteno e dissolveu-se em 1 mL de clorofórmio. Em seguida em um Erlenmeyer transferiu-se 40 μ L de ácido linoleico, adicionou-se 265 μ L de Tween 40, 50 μ L da solução de β -caroteno e 1mL de clorofórmio. Após, o clorofórmio foi removido com a utilização de uma corrente de gás nitrogênio, o resíduo obtido foi redissolvido em aproximadamente 150 mL de água aerada.

A absorbância da emulsão formada (sistema β -caroteno/ácido linoleico foi ajustada entre 0,7 a 0,6 nm. Logo após, misturou-se em tubos de ensaio 100 μ L da solução do óleo (2mg/mL) com 5mL da emulsão β -caroteno/ácido linoleico. Homogeneizou-se os tubos em agitador e manteve-se em banho-maria a 40 °C. A oxidação da emulsão foi monitorada em espectrofotômetro a 470nm, no tempo inicial (2 minutos após a adição das soluções no banho-maria) e em intervalos de 15 minutos durante 2 horas, ao abrigo da luz. Para a amostra controle foi utilizado a emulsão β -caroteno/ácido linoleico e como controle positivo foi utilizado o padrão sintético BHT a 1mg/mL e o padrão de timol (1mg/mL). A atividade antioxidante foi expressa como percentual de inibição relativa comparada ao controle depois de 120 minutos utilizando a equação abaixo de acordo com Emmons, Peterson e Paul (1999).

$$AA\% = \frac{(DRc - DRs)}{(DRc)} \times 100$$

Onde: DRc = Taxa de degradação do controle $[\ln(a/b)/120]$

DRs = Taxa de degradação na presença do padrão ou extrato $[\ln(a/b)/120]$

“a” e “b” são as absorbâncias no tempo inicial (0 min) e no tempo final (120) respectivamente.

4.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada em colaboração pela Profa. Dra. Juliana M. V. Martínez de Lucena, no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Amazonas – IFAM.

4.6.1 Microrganismos

Para a determinação da atividade antimicrobiana foram utilizados os seguintes microrganismos: *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), *Streptococcus sanguinis* (ATCC15300), *Escherichia coli* (ATCC8739), *Salmonella entérica* (ATCC13076), *Candida albicans* (Levedura) e *Aspergillus* sp (endofítico isolado de *Pedilanthus tithymaloides* L.

4.6.2 Microdiluição em caldo

Foi preparada uma suspensão do organismo do teste em caldo Mueller-Hinton e a mesma foi ajustada para uma turbidez equivalente à solução padrão McFarland 0,5 aproximadamente de 1 a 4×10^8 (Unidade Formadora de Colônias) UFC/mL. Todos os testes foram feitos em placas de 96 poços e em triplicata. Controle DMSO 10% não inibiu nenhum dos micro-organismos testados. A concentração da solução estoque dos óleos foi de 5 mg/mL. Depois de realizada as diluições seriadas, inoculou-se em cada poço a suspensão bacteriana a ser testada. Como controle foi utilizado uma solução de digluconato de clorexidina, um composto amplamente e utilizado na medicina como antisséptico (em geral em concentrações menores) e na odontologia de 0,12% (locutórios bucais) a 2,0% (solução irrigadora em tratamento de canal), sendo que nessa concentração mais alta é bactericida (NCCLS, 2003).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

Com a coleta planta foram realizadas as análises propostas nesta pesquisa tendo os seguintes resultados.

5.1 ANÁLISE PRELIMINAR DA COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL E IDENTIFICAÇÃO DA PLANTA

Em uma análise preliminar dos óleos essenciais obtidos de dois indivíduos da mesma espécie de *Lippia*, que apresentavam odores diferentes, foi confirmada uma variação na constituição dos óleos. Motivados por essa diferença qualitativa se decidiu realizar uma avaliação circadiana em dois períodos distintos.

Em trabalhos anteriores, a planta em estudo era descrita como *Lippia microphylla* Cham. (SILVA, 2014), contudo, diante de dúvidas em relação à identificação botânica da espécie, decidiu-se por realizar uma nova avaliação botânica para identificar a planta. As uncatas de cada indivíduo encaminhadas à especialista no gênero *Lippia*, Dra. Prof. Fatima Salimena, foram identificados como *Lippia origanoides* Kunt.

Para Salimena (2002) o gênero *Lippia* apresenta uma complexidade taxonômica. Muitas espécies foram excluídas do gênero e outras são consideradas como sinônimas. Baseado em características morfológicas O'leary *et al.* (2012) em uma delimitação de espécies de *Lippia* na seção *Goniostachyum*, definiram que a espécie *Lippia origanoides* apresenta 28 sinônimas, entre elas encontram-se *L. microphylla*, *L. sidoides*, *L. rigida*, *L. glandulosa*, *L. graveolens*. Isso devido à dificuldade de distinguir essa espécie de outros táxons desta seção.

No estudo de O'leary *et al.* (2012) não foram relacionados dados quimiotaxinômicos apenas características morfológicas e filogenética, entretanto, Oliveira *et al.* (2013) após investigarem a constituição de *L. rigida* afirmaram que o estudo é de relevância quimiotaxinômica, uma vez que o mesmo pode ser utilizado para estabelecer semelhança desta espécie com *L. origanoides*.

5.2 RENDIMENTOS DO ÓLEO ESSENCIAL

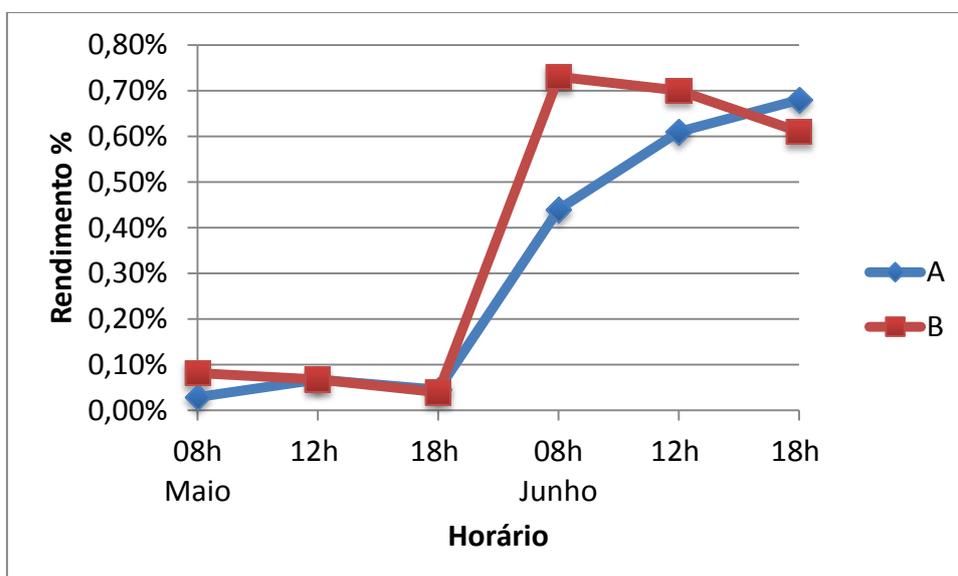
O estudo foi realizado com dois indivíduos de *Lippia origanoides* denominados, indivíduo A e indivíduo B. No ponto de coleta, as margens da BR 174, existem várias plantas da espécie, e esse local fica apenas 12 quilômetros de distância do campus Paricarana da UFRR, facilitando assim o deslocamento para a realização das três coletas no mesmo dia. Esse local é propenso a fatores agressivos, como queimadas, limpezas na margem da rodovia, poluição provocada pelo tráfego de automóveis, entre outros.

Os maiores rendimentos ocorreram no mês junho de para os óleos de ambos os indivíduos (Figura 10). No momento da coleta, foi possível observar que o indivíduo A apresentou um aroma mais acentuado que o indivíduo B.

No trabalho de Maia *et al.* (2005) os rendimentos de 14 óleos de 14 indivíduos da espécie *L. glandulosa* coletados em locais diferentes variaram de 0,5 a 2,9%. Vale ressaltar que os autores também observaram diferença nos aromas dos indivíduos coletados, mas os horários de cada coleta não foram informados.

Recentemente, Ribeiro *et al.* (2014) realizaram um estudo sazonal e circadiano com o óleo essencial de *L. origanoides* coletada no estado do Pará e obtiveram rendimentos que variaram de 1,7% a 4,6%. Tanto o maior quanto o menor teor do óleo foram obtidos no horário de 12h.

Figura 10. Rendimento do óleo essencial do indivíduo A e B nos respectivos períodos e horário de coleta



Fonte: AUTORA, 2015

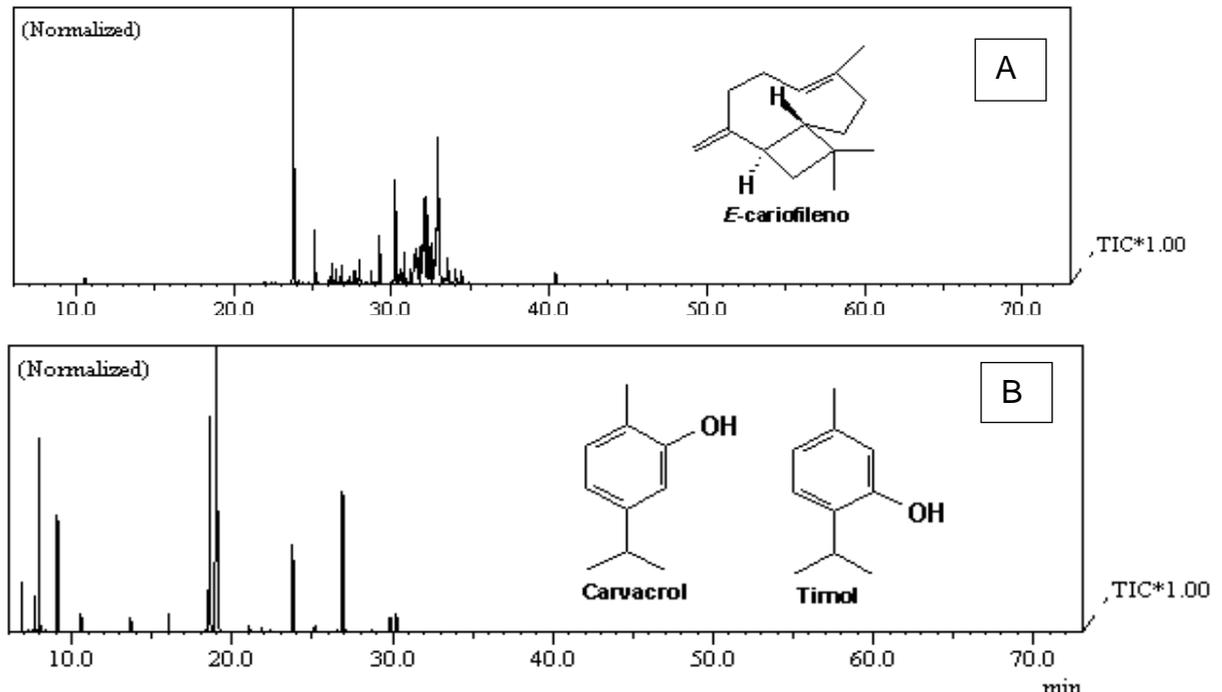
5.3 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos foram submetidos a análises cromatográficas para determinação da composição. O perfil cromatográfico dos óleos apresentou diferenças significativas, como é possível visualizar na figura 11.

Diante da diferença qualitativa dos óleos determinou-se a existência de quimiotipos para a espécie coletada nessa região. Os mesmos foram denominados de acordo com o seu constituinte majoritário, sendo que o constituinte majoritário no óleo obtido a partir do indivíduo A é o cariofileno (quimiotipo A) e o indivíduo B é o carvacrol (quimiotipo B). Grayer *et al.* (1996) propuseram que a classificação em quimiotipos deve ser baseada na combinação de componentes principais em vez de um único composto dominante. Mediante isso, eles consideram um quimiotipo quando o óleo é composto por uma ou mais substâncias com concentrações maiores ou iguais a 20%. Esse foi o método como os autores identificaram os quimiotipos para espécies do gênero *Ocimum*.

De acordo com Simões e Spitzer (2004), quimiotipo pode ser definido como plantas botanicamente idênticas, mas que diferem quimicamente. Fatores como temperatura, a umidade relativa, a duração total de exposição ao sol, precipitação de chuvas o regime de ventos exercem influência direta (SIMÕES e SPITZER, 2004). Contudo os óleos essenciais desse estudo foram extraídos de plantas de *L. origanoides* existentes no mesmo ambiente, onde existem vários indivíduos dessa espécie aparentemente sujeitos aos mesmos fatores. A Figura 11 apresenta o perfil cromatográfico desses indivíduos.

Figura 11. Cromatogramas de íons totais representativos dos óleos essenciais *L. origanoides*: a) Quimiotipo A; b) Quimiotipo B.



Tavares *et al.* (2005) analisando o óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba*, provenientes de diferentes regiões do Brasil, e que foram cultivados em condições semelhantes concluíram que a diversidade na composição do óleo essencial dos quimiotipos estudados não se deve a fatores ambientais, já que plantas cultivadas lado a lado, em um mesmo canteiro, por mais de um ano, mantiveram a composição original. A diferença deve-se provavelmente a diversidade no genótipo das plantas.

A literatura relata a existência de quimiotipos para *Lippia origanoides*. Betancur-Galvis *et al.* (2011) analisando a composição química, a atividade antifúngica e citotóxica de 9 óleos essenciais obtidos de *L. origanoides* coletada a partir de diferentes regiões da Colômbia, classificaram três quimiotipos de acordo com a variação quantitativa nos teores dos constituintes majoritários, sendo eles: quimiotipo timol; quimiotipo carvacrol; quimiotipo *p*-cimeno/*trans*- β -cariofileno. Nos estudos realizados por Ribeiro *et al.* (2014), os autores relataram a ocorrência de um novo quimiotipo de *L. origanoides* caracterizado por um óleo rico em *E*-cinamato de metila e *E*-nerolidol.

Santos *et al.* (2004) identificaram como componente principal o carvacrol (33,5-42,9%) juntamente com γ -terpineno (8,0-10,5%), o timol (5,1-8,4%), timol metil éter (6,1-8,7%) e *p*-cimeno (11,9-15,8%) em amostras coletadas em três diferentes regiões do Brasil. Stashenko *et al.* (2010) determinaram o quimiotipo β -falendreno, *p*-cimeno e limoneno, o quimiotipo carvacrol e o quimiotipo timol de indivíduos coletados em diferentes regiões da Colômbia.

Em muitos desses trabalhos são realizadas apenas uma coleta. Todavia, ao propor a existência de quimiotipo deve-se levar em conta que a composição dos óleos voláteis pode sofrer alterações de acordo com a sazonalidade e horário de coleta. Em um estudo para a obtenção de informação sobre a composição do óleo essencial de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* A. St.-Hil, Valter *et al.* (2008) observaram significativa variação na constituição do óleo. Contudo considerou insuficiente apenas uma coleta para discutir a existência de quimiotipos para a espécie.

Dentro do gênero *Lippia*, existe a ocorrência da quimiotipia para várias espécies, onde a mais reportada na literatura é a espécie *L. alba*. Matos (1991) descreve três quimiotipos para essa espécie, sendo eles: quimiotipo mirceno-citral; quimiotipo limoneno-citral; quimiotipo limoneno-carvona. Em outros trabalhos são ainda identificados quimiotipo β -cariofileno-geranial (CRAVEIRO *et al.*, 1981) e quimiotipo linalol (SIANI *et al.*, 2002).

Os quimiotipos mencionados nesta pesquisa foram avaliados em relação à variação circadiana da composição do óleo essencial para verificar se ocorreria alguma alteração ao longo do dia e também para comprovar a existência de quimiotipos.

No Apêndice A, as tabelas listam a composição nos dois períodos de coleta. Onde as variações encontradas entre os compostos presentes nos óleos essenciais dos quimiotipos foram bem perceptíveis, alguns constituintes apresentam-se em pequenas proporções ou deixam de ser produzidos em alguns horários. Isso ocorre de acordo com as necessidades da planta, que sintetizam diversas substâncias que contribuem tanto para dar coloração e aroma, como também para a proteção contra ataques de predadores (BRAZ-FILHO, 2010).

A tabela 1 reúne valores do número de constituintes detectados para cada quimiotipo, bem como o percentual de identificação. O quimiotipo A, em junho, teve maior número de constituintes quando comparado com o mês de maio. Esse

óleo é composto majoritariamente por sesquiterpenos. Já o quimiotipo B, constituído em sua maioria por monoterpenos, apresentou uma menor faixa de variação do número de constituintes.

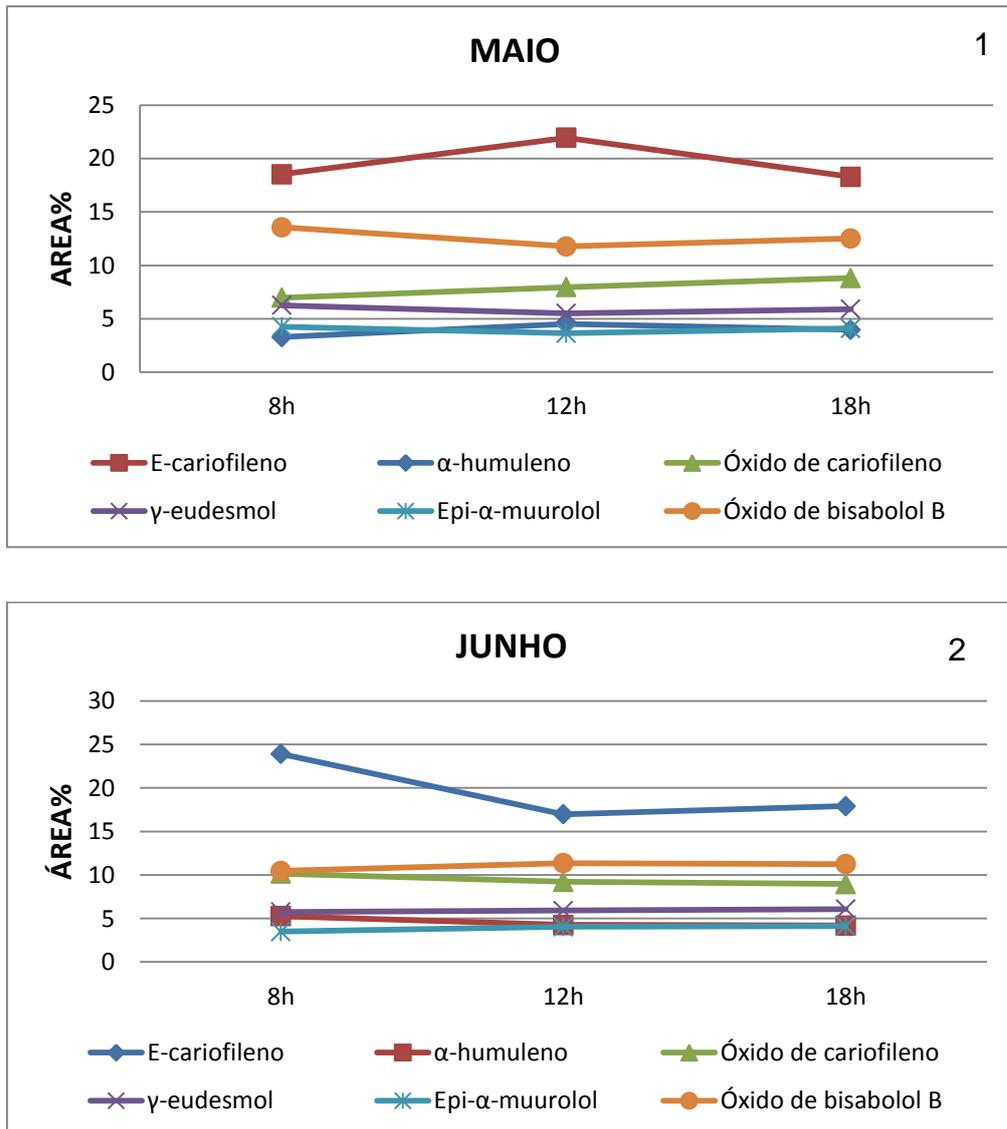
Tabela 2. Número de constituintes e percentuais de identificação dos quimiotipos A e B nos respectivos meses e horários de coleta.

	Quimiotipo	N. de	T. de Ident.	Quimiotipo	N. de	T. de Ident.
	A	Const.	(%)	B	Const.	(%)
Maio	8h	31	89,05%	8h	24	86,12%
	12h	35	91,37%	12h	27	84,06%
	18h	33	90,10%	18h	27	84,99%
Junho	8h	46	94,05%	8h	22	85,63%
	12h	49	91,20%	12h	28	84,19%
	18h	56	91,78%	18h	25	84,81%

O constituinte majoritário para o quimiotipo A foi o *E*-cariofileno nos três horários de coleta com teor variando de 16,98 a 23,92% nos horários e período de coleta, seguido do óxido de bisabolol 10,43 a 13,57%. A figura 12 apresenta a variação dos principais constituintes ao longo do dia para os dois períodos de coletas.

O cariofileno é um hidrocarboneto sesquiterpênico insaturado presente em diversos óleos essenciais, entre eles o óleo de cravo, copaíba e canela. É utilizado em fragrâncias por apresentar odor lenhoso e picante. Dentre as propriedades farmacológicas citadas para o composto estão ação anestésica e neuroprotetora (SKOLD *et al.*,2006; STANDEN; CONNELLAN; LEACH, 2006; CHANG;KIM;CHUN, 2007).

Figura 12. Variação dos constituintes majoritários do quimiotipo A: 1) Maio; 2) Junho



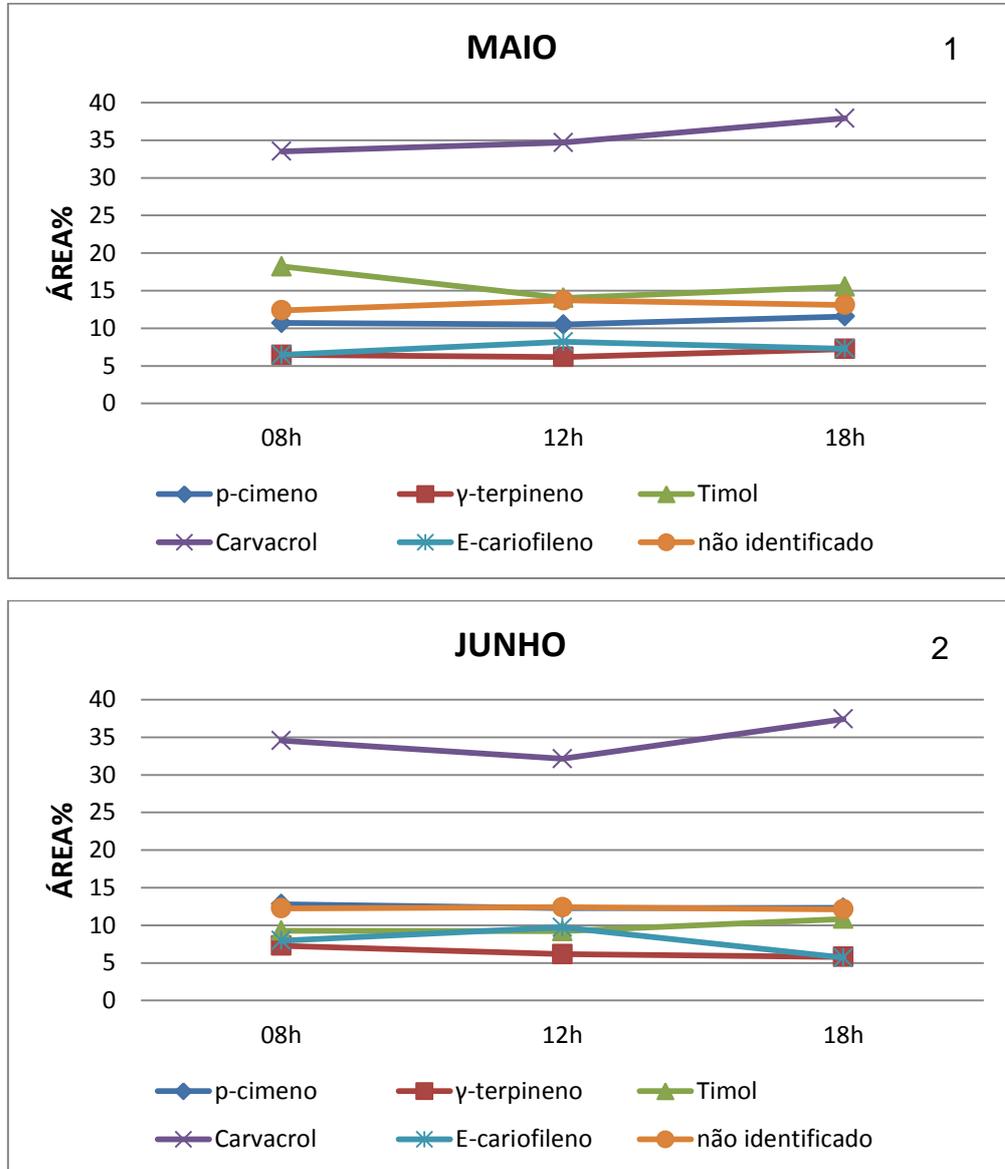
Fonte: AUTORA (2015)

O constituinte majoritário do quimiotipo B foi carvacrol que apresentou uma pequena faixa variação de 32,52 a 37,41% ao longo do dia nos dois períodos de coletas. O timol teve uma faixa de variação de 9,27 a 18,21 (Figura 13).

Os monoterpenos fenólicos carvacrol e timol são encontrados em óleos essenciais de diversas espécies. Geralmente um é majoritário e o outro se apresenta em concentrações inferiores, ou quando não apenas um é detectado. Por exemplo, na espécie *Lippia gracilis* no trabalho de Guilhon *et al.* (2011) o carvacrol foi detectado com teor de 44,43% e o de timol apenas 3,83%. No óleo de *Lippia grandis* segundo Sarrazin *et al.* (2012) o carvacrol apresentou um teor de 37,12% enquanto que o timol apenas 7,83%. No trabalho de Fontenelle *et al.* (2007) foi

detectado apenas o timol com 59,65% de área para a espécie *L. sidoides* (syn. *Lippia organoides*).

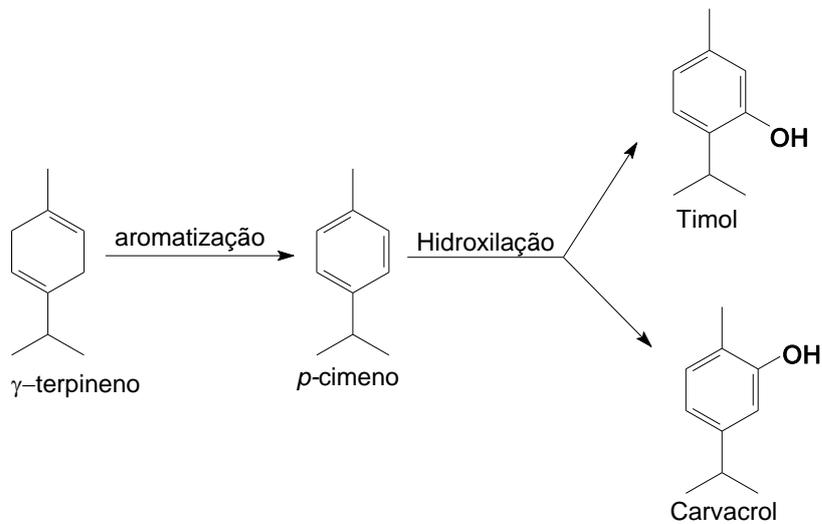
Figura 13. Variação dos constituintes majoritários do quimiotipo B: 1) Maio; 2) Junho



Fonte: AUTORA (2015)

Os isômeros carvacrol e timol possuem como precursores os monoterpenos γ -terpineno e *p*-cimeno, estes normalmente estão presentes em óleos essenciais que os contém. A biossíntese dos isômeros (Figura 14) ocorre com a aromatização do γ -terpineno seguida da hidroxilação seletiva do *p*-cimeno (POULOSE; CROTEAU, 1978).

Figura 14. Proposta Biosintética do timol e carvacrol.



Fonte: POULOSE; CROTEAU (1978).

5.4 ANALISE QUALITATIVA DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Para determinar se o óleo apresenta atividade antioxidante, utilizou-se o método qualitativo que consiste em observar a coloração dos spots da amostra aplicada sobre placas cromatográficas, após borrifar uma solução concentrada de DPPH (Figura 15). Realizou-se esse procedimento para ambos os quimiotipos.

Figura 15. A) Placa após ser borrifada com DPPH; B) Placa depois de 15 minutos após o borrifamento com DPPH



Spot 1 – Quimiotipo A
Spot 2- Quimiotipo B

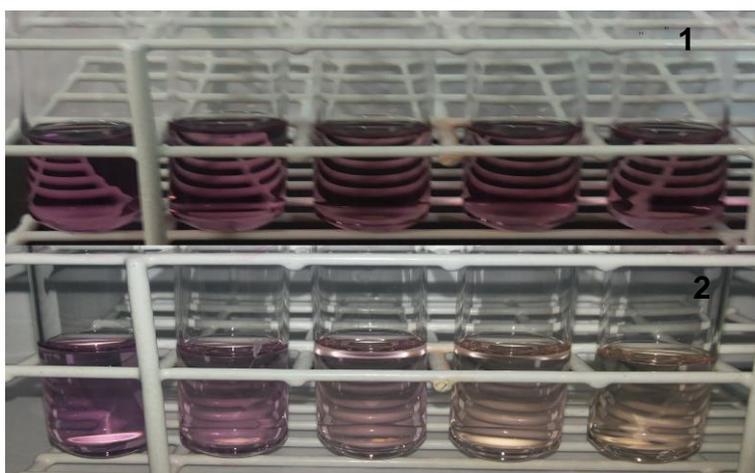
Fonte: AUTORA (2015)

Na análise o óleo do quimiotipo B apresentou reação imediata com o DPPH, evidenciada pela coloração amarelada, indicando o produto de tal reação, a hidrazina. Para o quimiotipo A, o surgimento da coloração amarela requereu um tempo de mais ou menos 15 minutos em relação ao quimiotipo B. Com isso, realizou-se a análise quantitativa dos dois quimiotipos.

5.5 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE MÉTODO DPPH

Após o período de reação, observou-se o decaimento da coloração do radical DPPH devido à presença de substâncias antioxidantes (Figura 16).

Figura 16. Ensaio da atividade antioxidante do óleo essencial de *L. origanoides*: 1) quimiotipo A; 2) quimiotipo B.



Fonte: AUTORA, 2015

Foram medidas as absorvâncias das amostras, branco e controle. Com esses resultados foi possível calcular o percentual de atividade antioxidante (AA%) através da fórmula descrita por Mensor *et al.* (2001). Os dados de cada quimiotipo foram reunidos nas tabelas 2 e 3, Apêndice B.

A construção da curva de calibração foi realizada com os parâmetros concentração e atividade antioxidante (Apêndice C). O gráfico gerado permitiu através da equação da reta calcular a concentração inibitória IC_{50} (Tabela 3).

Tabela 3. Valores de IC₅₀ para os óleos dos quimiotipos de *Lippia origanoides* e padrões.

Amostra	IC ₅₀ (mg/mL)
Quimiotipo A	3,0
Quimiotipo B	0,045
Timol	0,53
Carvacrol	0,63

Diante dos resultados obtidos a partir da avaliação antioxidante dos quimiotipos foi possível observar que o quimiotipo B apresentou maior atividade, uma vez que o valor de IC₅₀ foi de 0,045 mg/mL enquanto que A forneceu IC₅₀ de 3,0 mg/mL. O quimiotipo B é majoritariamente constituído pelo monoterpene fenólico carvacrol (48,48%) tendo também a presença do timol (18,28%) (APÊNDICE B). Esses constituintes de acordo com a literatura são descritos com propriedades antioxidantes, e, portanto, podem ser utilizados como substituintes naturais dos antioxidantes sintéticos (AESCHBACH *et al.*, 1994). O valor de IC₅₀ dos padrões timol e carvacrol foi de 0,53 e 0,63 mg/mL respectivamente e estão de acordo com resultados encontrados na literatura (KULISIC *et al.*, 2004). Esses valores são maiores que o IC₅₀ obtido para óleo, isso pode sugerir que ocorra uma ação sinérgica desses compostos, juntamente com outros constituintes presentes no óleo. Segundo Politeo; Juki; Milo (2006), atividade antioxidante dos óleos essenciais pode ser atribuída tanto para a alta porcentagem dos principais constituintes quanto para a sinergia entre os diferentes constituintes do óleo.

Em relação ao quimiotipo A observou-se um tempo maior de reação para visualizar o decaimento da absorvância e o consumo do radical foi observado porém em menor intensidade comparado com o quimiotipo B. Vale a pena ressaltar que tanto a concentração da solução estoque quanto as concentrações finais da amostra foram superiores as do quimiotipo B. No trabalho de Teixeira *et al.* (2014) foi realizado a atividade antioxidante das espécies *Mentha spicata* e *Lippia origanoides*, sendo que os autores não calcularam o IC₅₀ para o óleo da espécie *Mentha spicata* pelo fato da não ocorrência do consumo de 50% de radical DPPH no intervalo de concentração utilizado para ambos os óleos.

São poucos os trabalhos que reportam a atividade antioxidante do óleo essencial de *L. origanoides*, e os mesmos não tratam da atividade de quimiotipos. No trabalho de Arango *et al.* (2012), o óleo essencial de *L. origanoides* apresentou

um potencial antioxidante com valor de IC₅₀ de 5,58mg/mL, este sendo associado ao constituinte majoritário timol (73,7%). O outro estudo existente na literatura e já relatado anteriormente é de Teixeira *et al.* (2014), que observaram significativa ação antioxidante do óleo essencial dessa espécie com IC₅₀ de 0,477mg/mL. Esse resultado foi associado concentração elevada do carvacrol (41,51%), neste óleo.

Jukic e Milos (2005) avaliaram o efeito antioxidante no óleo essencial de dois quimiotipos de *Thymus vulgaris*, sendo um com predominância de compostos com a função fenólica (timol e carvacrol) e o outro com a predominância do monoterpeneo linalol. Eles verificaram que o efeito mais representativo foi para o quimiotipo com os constituintes fenólicos.

Em outras espécies do gênero a atividade antioxidante também é atribuída aos dois constituintes. Damasceno *et al.* (2011), estudaram a capacidade antioxidante tanto do óleo essencial como de extratos de *Lippia grandis* por diferentes métodos, inclusive o método de sequestro do radical DPPH. Eles obtiveram o valor de IC₅₀ de 0,019 mg/mL. E ainda levantaram a hipótese de que a atividade antioxidante pode ser atribuída aos isômeros timol e carvacrol.

Monteiro e colaboradores (2007) compararam o óleo essencial de *L. sipooides* com timol e eugenol que é considerado um antioxidante natural, através do ensaio antioxidante de remoção do DPPH e concluiu que a atividade do óleo é ligeiramente menor que a do timol, portanto este composto pode ser responsável pela ação antioxidante.

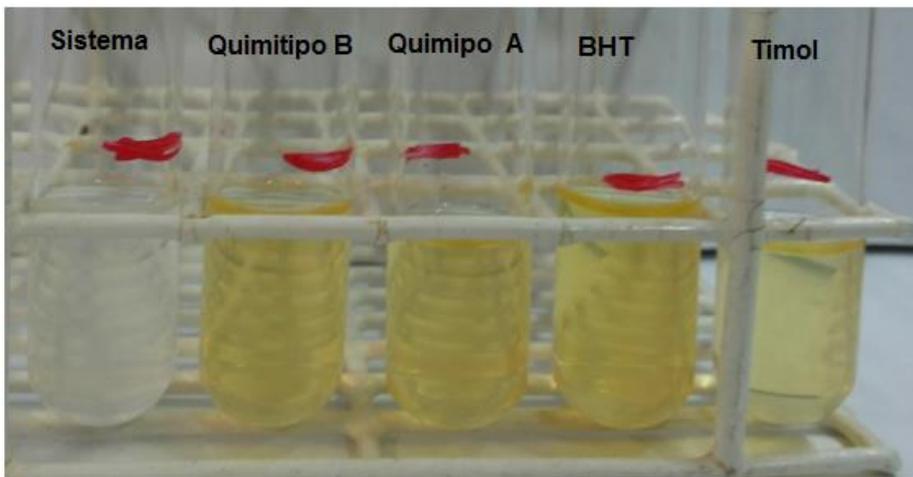
O quimiotipo A não apresentou em sua composição compostos com função fenólica. Sabe-se que o potencial antioxidante dos produtos naturais é por vezes atribuído a presença destes compostos. Como relatado anteriormente o mesmo é caracterizado pela presença majoritária do sesquiterpeno *E*-cariofileno, e no óleo da análise antioxidante o seu teor foi de 50,34%.

Joshi; Verma; Mathela (2010) encontraram um bom potencial antioxidante de óleos essenciais cuja composição continha constituintes como Germacreno D, furanodieno, sabineno, limoneno, entre outros. Politeo; Juki; Milo (2006), avaliando a atividade antioxidante de vários óleos essenciais, dos quais a composição de alguns não tinha compostos com a função fenólica, obtiveram bons resultados. Óleos com a presença majoritária do 1,8-cieneol, linalol, estragol apresentaram boa atividade antioxidante.

5.6 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DO SISTEMA β -CAROTENO/ACIDO LINOLEICO

A atividade antioxidante está relacionada com a capacidade de proteção de alguns compostos diante de processos ou reações que conduzem a oxidação excessiva. Sabe-se que essa oxidação causa diversos danos ao sistema biológico. No método da co-oxidação do β -caroteno e ácido linoleico, a atividade antioxidante foi determinada através da eficiência dos antioxidantes, aqui os compostos voláteis, em bloquear ou inibir a formação dos radicais peróxidos. Para isso foi elaborado uma emulsão aquosa (sistema) contendo 100 μ L do óleo essencial dos dois quimiotipos (Figura 17). Os padrões utilizados foram o antioxidante sintético BHT e o monoterpeno timol.

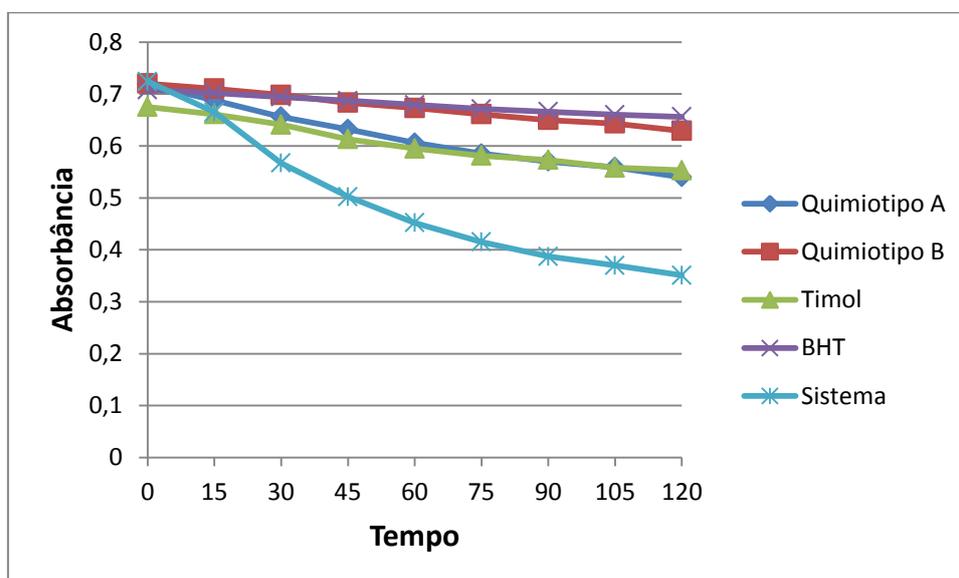
Figura 17. Ensaio da reação do sistema β -caroteno/ácido linoleico com os óleos e padrões



Fonte: AUTORA, 2015

Foram realizadas as leituras a cada 15 minutos a fim de obter as absorbâncias das amostras. Com os resultados das mesmas foi possível construir o gráfico (Figura 18) demonstrando a cinética da reação.

Figura 18. Cinética da reação do óleo no sistema β -caroteno/ácido linoleico.



Fonte: AUTORA, 2015

O gráfico revela o decaimento da absorbância do sistema pela ausência de antioxidantes. Isso é possível observar pela perda da coloração laranja conforme figura 19. No entanto para as amostras e padrões é perceptível que os mesmos bloquearam a oxidação do β -caroteno. O percentual da atividade antioxidante foi calculado, utilizando os valores das absorbâncias em função do tempo de análise. A tabela 4 lista esses valores de cada amostra e padrões.

Tabela 4. Percentual da atividade antioxidante pelo método de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico.

Amostras	AA%
Quimiotipo A	62,00±1,85
Quimiotipo B	82,28±1,44
Timol	71,18
BHT	89,45

O percentual de atividade do Quimiotipo B foi melhor e mais próximo do antioxidante sintético BHT, enquanto que A apresentou a menor atividade. O padrão de timol também apresentou um bom percentual antioxidante por este método, e como relatado anteriormente esse composto é indicado como constituinte ativo nesse tipo de avaliação.

A avaliação da atividade antioxidante é importante a combinação de métodos diferentes. Entretanto existe uma dificuldade de comparar os resultados entre os métodos. Por isso, pode-se dizer que o potencial antioxidante dependerá do método escolhido, a concentração da amostra, a solubilidade, entre outros (VIUDA-MARTOS *et al.*, 2010).

Kulisic *et al.* (2004) avaliaram a atividade antioxidante do óleo essencial do orégano por diferentes métodos e nesse estudo os autores mostraram que um único método é suficiente para estimar a atividade antioxidante de uma amostra. Eles afirmam ainda que o método do sistema β -caroteno/ácido linoleico pode ser útil especialmente para as investigações de antioxidantes lipofílicos e é adequado para a investigação de a atividade antioxidante dos óleos essenciais

5.7 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Mediante a análise da atividade antimicrobiana pelo processo de diluição em caldo obtiveram-se os resultados da CIM, definida como a menor concentração do antimicrobiano capaz de inibir o crescimento dos microrganismos. A tabela 5 lista esses valores.

Tabela 5. Atividade antimicrobiana do óleo essencial do Quimiotipo A e Quimiotipo B.

Microrganismos	Quimiotipo A	Quimiotipo B	Clorexidina 2%
<i>Staphylococcus aureus</i> (G+)	Inativo	2500,0 µg/mL	2,5 µg /mL
<i>Streptococcus sanguinis</i> (G+)	2500,0 µg/mL	Inativo	10,0 µg /mL
<i>Escherichia coli</i> (G-)	Inativo	1250,0 µg /mL	2,5 µg /mL
<i>Salmonela enterica</i> (G-)	Inativo	1250,0 µg /mL	10,0 µg /mL
<i>Candida albicans</i> (levedura)	5000,0 µg /mL	Inativo	10,0 µg /mL
<i>Aspergillus</i> sp. (f. filamentoso)	NT	1250,0 µg /mL	5,0 µg /mL

NT – Não testado, quantidade de óleo foi insuficiente.

Os resultados não foram satisfatórios, uma vez que os valores da concentração inibitória mínima foram muito altos quando comparados com os valores do padrão de referência. O quimiotipo A foi totalmente inativo para três microrganismos testado, enquanto que no Quimiotipo B apenas dois microrganismos apresentaram nenhuma sensibilidade ao óleo.

Não existe um padrão para determinar se os valores de CIM obtidos em testes com óleo essencial são satisfatórios, tendo, portanto, muitas controvérsias de resultados. O que se sabe é que quanto mais esses valores forem próximos dos padrões antimicrobianos utilizados, melhor será o potencial da substância testada. Entretanto, o nível de inibição aceitável não é definido, pois alguns autores consideram somente resultados similares aos padrões, enquanto que outros consideram significativos resultados quando os níveis de inibição são superiores (BURT, 2004; DUARTE, 2006).

A exemplo, Botelho *et al.* (2007) afirmam que o óleo essencial de *L. sidoides* e seus principais compostos sendo timol e carvacrol apresentaram boa ação antimicrobiana contra o principal grupo de microrganismos cariogênico. Entretanto, os valores de CIM variam de 2500 a 1000 µg/mL para o óleo e 625 a 5000µg/mL para os constituintes majoritários. Já os valores do padrão utilizado foram de 2,3 a 37µg/mL.

A ação antimicrobiana do óleo essencial de *L. origanoides* é bem reportada na literatura, tanto com análises qualitativas (difusão), quanto quantitativas (diluição), e em todos estes trabalhos os resultados são tidos como positivos.

Segundo Sarrazin *et al.* (2015), o óleo apresentou-se bioativo e durante a análise sazonal manteve-se constante ao longo do ano. Vale apenas ressaltar que o óleo apresentou majoritariamente o composto carvacrol em todos os meses do ano, com uma variação de 47,2 a 35,9 %, sendo, portanto designado como um quimiotipo.

Andrade *et al.* (2014) também relatam que o óleo da espécie apresenta atividade antimicrobiana, inibindo o crescimento dos microrganismos *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Salmonella cholerasuis* (ATTCC 10708). Os autores realizaram o ensaio de difusão em disco com óleos coletados em três épocas diferentes, com o carvacrol e o seu precursor *p*-cimeno apresentando teores mais elevados com média de área de 29,0% e 25,57%, respectivamente.

Betancur-Galvis *et al.* (2011) realizaram a atividade antifúngica com 9 óleos obtidos de diferentes regiões da Colômbia e diante das análises cromatográficas para identificação dos constituintes, os mesmos foram caracterizados em três quimiotipos. Dos óleos testados da espécie aludida apenas o quimiotipo timol foi

mais ativo contra alguns dos fungos utilizados, com valores de MIC de 31 e 63 $\mu\text{g/mL}$. O quimiotipo *p*-cimeno/trans- β -cariofileno apresentou fraca atividade.

No mesmo trabalho, os constituintes timol, carvacrol, *p*-cimeno, γ -terpineno, trans- β -cariofileno e β -mirceno também foram avaliados quanto à atividade antifúngica. Timol e carvacrol foram os que apresentaram melhor atividade, principalmente para o fungo *A. fumigatus* (125 $\mu\text{g/mL}$). Entretanto, o óleo mostrou-se mais ativo para o mesmo fungo, sendo possível inferir um provável efeito sinérgico na ação do quimiotipo.

Outro trabalho que evidenciou atividade antimicrobiana da espécie estudada foi o de Oliveira *et al.* (2007), com bons resultados contra cepas de *S. aureus* e *C. albicans*, através do método de difusão. Também de acordo com Santos *et al.*, (2004) os óleos de *Lippia origanoides* apresentaram atividade contra as bactérias e os fungos utilizados no ensaio microbiológico, pelo método qualitativo.

Em sua grande maioria os metabolitos secundários atuam em conjunto diante de algumas atividades biológicas. Essa integração é chamada de sinergia. Para os óleos essenciais, isso pode acontecer pelo fato dos mesmos apresentarem uma mistura de compostos com estruturas diferenciadas. Nesse sentido, é importante, para fins biológicos, estudar o óleo e não apenas os constituintes isolados, pelo simples fato da amplitude de informação que estes podem fornecer para essa atividade, diante do conceito de sinergismo (BAKKALI *et al.*, 2008).

O elevado número de compostos com as mais diversificadas funções orgânicas presentes nos óleos voláteis indica que a ação antimicrobiana não é atribuída a um mecanismo específico, mas existem vários alvos nas células dos organismos submetidos a estas atividades (BURT, 2004).

Segundo Helander *et al.* (1998), o mecanismo de ação dos isômeros fenólicos timol e carvacrol para a inibição de bactéria ocorre pela desintegração da membrana exterior, principalmente das bactérias gram-negativas, liberando lipopolissacarídeo (LPS) e aumentando a permeabilidade da membrana citoplasmática para o ATP.

De acordo com Burt (2004), os mecanismos de ação dos constituintes presentes nos óleos essenciais de diversas plantas ainda não são totalmente identificados, sendo necessário ampliar pesquisas para esse foco, uma vez que a elucidação desses mecanismos seria útil para aplicações tecnológicas.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nesse trabalho são de relevância para o conhecimento da espécie que é nativa no Estado.

Inicialmente diante da diferença de odor das folhas dos indivíduos de *Lippia origanoides* e posteriormente confirmada pelas análises cromatográficas realizadas foi detectado a existência de dois quimiotipos, sendo importante destacar que foram realizadas coletas ao longo do dia por dois períodos, reafirmando assim a ocorrência de quimiotipia para essa espécie.

O quimiotipo A foi caracterizado pela abundância de sesquiterpenos, sendo majoritário o composto *E*-cariofileno em todos os horários e nos dois períodos de coleta. Por sua vez, que o quimiotipo B foi marcado pela presença de monoterpenos, como o carvacrol. Os óleos obtidos ao longo do dia não apresentaram variação qualitativa, somente nos teores dos constituintes.

Quanto à avaliação da atividade antioxidante, o quimiotipo B mostrou-se com um potencial significativo, com IC₅₀ menor do que o observado na literatura para essa espécie. Como relatado anteriormente o óleo desse quimiotipo contém altos teores de carvacrol, seguido do timol e ambos os compostos possui função fenólica, classe de compostos que são considerados como promissores antioxidantes naturais.

No método de co-oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, ambos os quimiotipos apresentaram bons percentuais de atividade antioxidante, entretanto o quimiotipo B e um padrão de timol forneceram um percentual bem mais próximo do padrão BHT.

A atividade antimicrobiana não forneceu bons resultados, uma vez que os valores da concentração inibitória mínima foram bem acima dos encontrados para o padrão utilizado no método.

Esta pesquisa apresenta importância pelo fato de que para uma espécie ser utilizada como um fármaco ou fitoterápico, o conhecimento dos seus princípios ativos é relevante para o emprego dos mesmos.

7. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. 4ª ed. Allured Publishing Corporation Carol Stream, 2007.

AESCHBACH, R. *et al.* Antioxidant actions of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. **Food and Chemical Toxicology**. n. 32. n. 1. p. 31-36, 1994.

ALMEIDA, M. C. S. *et al.* Flavonoides e outras substâncias de *Lippia sidoides* e suas atividades antioxidantes. **Química Nova**, v. 33, n. 9, p.1877-1881, 2010.

ALVES, C.Q. *et al.* Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, Vol. 33, N. 10, p. 2202-2210, 2010.

AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant Activity of Essential Oils. **Journal Agricultural and Food Chemistry**., V 61, p.10835–10847, 2013.

ANDRADE, V. A. *et al.* Antimicrobial activity and acute and chronic toxicity of the essential oil of *Lippia origanoides*. **Pesquisa Veterinária Brasileira**. v.34, n.12, p.1153-1161, 2014.

ARNAGO, O.B *et al.* Antioxidant activity of essential oils of oregano (*Lippia origanoides* H.B.K) GROWN IN ALTO PATIA. **Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial**. v. 10 n. 2 p.79 – 86, 2012.

ATKINS, S. 2004. Verbenaceae. Pp. 449-468. In: K.KUBTZKI; J.W.KADEREIT (eds.). **The Families and Genera of Vascular Plants**, v. 7. Berlin, Springer-Verlag.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology** v.46 p.446–475, 2008.

BARBOSA, F. da F.*et al.* A. Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N. E. BROWN. **Química Nova**, Vol. 29, No. 6, p. 1221-1225, 2006

BARROS, F. M. C.; ZAMBARDA, E. de O.; HEINZMAN, B. M. Variabilidade e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 4, p. 861-867, 2009.

BENITEZ, N. P.; LEÓN, E. M. M.; STASHENKO, E. E. Eugenol and Methyl Eugenol Chemotypes of Essential Oil of Species *Ocimum gratissimum* L. and *Ocimum campechianum* Mill. from Colombia. **Journal of Chromatographic Science**, v. 47, p. 800- 804, 2009.

BETANCUR-GALVIS, L. *et al.* 141 Antifungal, cytotoxic and chemical analyses of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K grown in Colombia. **Salud uis**, v.43, n.2, p.141-148, 2011.

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

BOTELHO, M. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. V 40, n. 3, p. 340-356, 2007.

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

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v.33, p.229-239, 2010.

CARVALHO, A. F. U. et al. Larvicidal Activity of the Essential Oil from *Lippia sidoides* Cham. Against *Aedes aegyptis* Linn. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, p. 569-571, 2003.

CERQUEIRA, M. D. et al. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). **Química Nova**, v. 32, n. 6, p. 1544-1548, 2009.

CICCIÓ, J. F; OCAMPO, R. Distribución biogeográfica de *Lippia allba* (Mill.) N. E. Br.ex Britton e Wilson y quimiotipos en America y el Caribe. IN. Dellacassa, E. (Org). **Normalización de Productos Naturales Obtenidos de especies de la flora aromática Latino americana**, Porto Alegre: EDIPUCRS, 2010 p. 107-131.

CHANG, H.; KIM, H. J.; CHUN, H. S. Quantitative structure–activity relationship (QSAR) for neuroprotective activity of terpenoids. **Life Sciences**. v. 80 p.835–841, 2007

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

CRAVEIRO, A. A. et al. Essential oils from Brazilian Verbenaceae genus *Lippia*. **Journal of Natural Products**. v. 44, n.5, p. 598-601, 1981.

CRAVEIRO, A. A.; QUEIROZ, D. C. Óleos Essenciais e Química Fina. **Química Nova**, v. 16, n. 3, p. 224-228, 1993.

DAMASCENO, E. I. T. et al. Antioxidant capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** V. 21, n. 1, p. 78-85, 2011.

DANKO, S. J. *Lantana câmara* (Shrub Verbena). Disponível em: www.stephendanko.com/blog. Acesso em: 20/05/2015.

DELGADO-OSPINA, J. Efecto de la fertilización en la producción de materia seca y extracción de nutrientes en tres accesiones de *Lippia origanoides* H.B.K. **Acta Agronómica**, Vol. 61, núm. 4 p. 1-5, 2012.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 3.rd ed., Jhon Wiley e Sons Ltd. Chichester:, 2009, 539p.

DI STASI, L.C. *et al.* Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**. v. 73. p.69-91, 2002.

DORMAN, H.J.D.; DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**. v.88, p.308–316, 2000.

DUARTE, M. C. T. Atividade Antimicrobiana de Plantas Mediciniais e Aromáticas Utilizadas no Brasil. **Multiciência**. V.7, p.1-16, 2006.

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

EMMONS, C. L.; PETERSON D. M.; PAUL, G. L. Antioxidan capacity of Oat (*Avena sativa* L.) Extracts. 2. In vitro antioxidant and contents of phenolic and tocol antioxidants. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 4894-4898, 1999.

ESCOBAR, P. *et al.* Chemical composition and antiprotozoal activities of Colombian *Lippias* pp. essential oils and their major components. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 2, p. 184-190, 2010.

FARIAS, M.R.*et al.* Triterpenoid Saponins from *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown. **Journal of the Brazilian. Chemical. Society**, Vol. 21, N. 5, p. 927-933, 2010.

FERRAZ, R. P. C.*et al.* Cytotoxic effect of leaf essential oil of *Lippia gracilis* Schauer (Verbenaceae). **Phytomedicine**, v. 20, p.615– 621, 2013.

FONTENELLE, R. O. S. Chemical composition, toxicological aspects and antifungal activity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p.934–940, 2007.

FUNARI, C. S. *et al.* Chemical and antifungal investigations of six *Lippia* species (Verbenaceae) from Brazil. **Food Chemistry**, v.135, p. 2086–2094, 2012.

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

GOMES *et al.*, Acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on unengorged larvae and nymphs of *Rhipicephalus sanguineus* (Acari: Ixodidae) and *Amblyomma cajennense* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v. 137 p. 41–45, 2014.

GRAYER, R. J. *et al.* Intraspecific taxonomy and essential oil chemotypes in sweet basil, *Ocimum basilicum*. **Phytochemistry**, v 43, n. 5, p. 1033-1039, 1996.

GUILHON, C. *et al.* Characterization of the anti-inflammatory and antinociceptive activities and the mechanism of the action of *Lippia gracilis* essential oil. **Journal of Ethnopharmacology**, v.135, p. 406–413, 2011.

GUIMARÃES, A. G. *et al.* Phytochemical characterization and antinociceptive effect of *Lippia gracilis* Schauer. **Journal of Natural Medicines**, V. 66, p.428–434, 2012.

HALLIWEL, B; GUTTERIDGE, J. M. C. The definition and measurement of antioxidants in biological systems. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 18, n. 1, p. 125-126, 1995.

HALLIWEL, B. Biochemistry of oxidative stress. **Biochemical Society Transactions**. V. 35, p. 1147-1150, 2007.

HELANDER, I. M. *et al.* Characterization of the Action of Selected Essential Oil Components on Gram-Negative Bacteria. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3590-3595, 1998.

HENNEBELLE, T. *et al.* Antioxidant and Neurosedative Properties of Polyphenols and Iridoids from *Lippia alba*. **Phytotherapy Research**, v.22, p.256–258, 2008.

HEYWOOD, V.H.; BRUMMITT; CULHAN, A. & SEBERG, O. **Flowering plant families of the world**, Firefly Books: Ontario, Canada, 423 p. 2007.

JOSHI, S. C.; VERMA, A. R.; MATHELA, C. S. Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oils of Himalayan Lauraceae species. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 37–40, 2010.

JUKIC, M.; MILOS, M. Catalytic Oxidation and Antioxidant Properties of Thyme Essential Oils (*Thymus vulgaris* L.) **Croatica Chemica Acta**, v.78, n.1, p.105–110, 2005.

KULISIC, T. *et al.* Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, v. 85, p. 633–640, 2004.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. **Plantas medicinais no Brasil: Nativas e Exóticas**. 4^a.ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2002.

MACHLIN, L.J.; BENDICH, A. Free radical tissue damage: protective role of antioxidant nutrients. **FASEB Journal**, Bethesda, v.1, n.6, p.441-445, 1987.

MAIA, J.G.S. *et al.* Essential Oil Variation in *Lippia glandulosa* Schauer. **Journal Essential Oil Research**, v. 17, p. 676-680, 2005.

MARX, H. E. *et al.* A molecular phylogeny and classification of verbenaceae. **American Journal of Botany**, V. 97 n. 10 p. 1647–1663, 2010.

MATOS, F. J. A. et al. Constituintes Químicos de Plantas Medicinais Brasileiras. 1. ed. Fortaleza: Edições UFC, 1991. v. 1. 416p.

MENSOR, L. L. et al. Screening of Brazilian Plant Extracts for Antioxidant Activity by the Use of DPPH Free Radical Method. **Phytotherapy Research**, v.15, p. 127–130, 2001.

MIGUEL, M.G. Antioxidant and Anti-Inflammatory Activities of Essential Oils: A Short Review. **Molecules**, v.15, p. 9252-9287, 2010.

MOLYNEUX P. The use of the stable free radical diphenyl picryl hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Journal of Science and Technology**, V. 26, n. 2, p. 212-219, 2003.

MONTEIRO, M. V. B. et al. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. Leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p. 378–382, 2007.

MORAIS, et al. Óleos essenciais da Amazônia contendo timol. **Acta Amazônica**, 2, p.45-46, 1972.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 1, p. 108-113, 2007.

NCCLS. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

O'LEARY, N. et al. Species delimitation in *Lippia* section *Goniostachyum* (Verbenaceae) using the phylogenetic species concept. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 170, p. 197–219, 2012

OLIVEIRA, D. R. et al. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v. 101, p. 236–240, 2007.

OLIVEIRA, D. R. et al. Ethnopharmacological study of two *Lippia* species from Oriximiná. **Brazil Journal of Ethnopharmacology**, v.108 p.103–108, 2006.

OLIVEIRA, F. C. et al. Chemical constituents of *Lippia rigida* Schauer (Verbenaceae). **Biochemical Systematics and Ecology**, v.51, p. 328–330, 2013.

OSTROSKY, E. A. et al. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.18, n.2, p. 301-307, 2008

PADUCH, R. et al. Terpenes: substances useful in human healthcare. **Archivum Immunologiae et Therapia Experimentalis**, v. 57 p. 315-327, 2007.

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

PERCIVAL, M. Antioxidants. **Clinical Nutrition Insights**, v. 31, p. 1- 4, 1998.

POLITEO, O.; JUKI, M.; MILO, M. Chemical Composition and Antioxidant Activity of Essential Oils of Twelve Spice Plants. **Croatica Chemica Acta**, v.79, n. 4, p. 545-552, 2006.

POULOSE, A. J; CROTEAU, R. Biosynthesis of Aromatic Monoterpenes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 187, n. 2, p. 307-314, 1978.

PRINS, C. L.; LEMOS, C. S. L.; FREITAS, S. P. Efeito de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **Revista Brasileira de Psicologia Medicinal**, v. 8, n.4, p. 92-95, 2006.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination of Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.53, p.4290-4302, 2005.

RAMÍREZ, L. S. *et al.* Actividad antibacteriana de aceites esenciales de *Lippia organoides* de diferentes Orígenes de Colombia. **Ciencia**, v.17, n.4, p. 313 - 321, 2009.

RIBEIRO, A. F. et al. Circadian and seasonal study of the cinnamate chemotype from *Lippia organoides* Kunth. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 55 p. 249-259, 2014.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C.; VILLAR, A. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. **Journal of Ethnopharmacology**, v.23 p.127- 149, 1988.

RODRIGUES, F. F. G. et al. Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Lippia microphylla* Cham. **Acta Scientiarum Biological Sciences**, v. 33, n. 2, p. 141-144, 2011.

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

SÁ, F. A. S. et al. Essential oils in aerial parts of *Myrcia tomentosa*: composition and variability. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, V. 22, n. 6, p. 1233-1240, 2012.

SALIMENA, F. R. G. Novos sinônimos e tipificações em *Lippia* Sect. *Rhodolippia* (Verbenaceae). **Darwiniana**, v. 40, n. 1-4, p. 121-125, 2002.

SALIMENA, F.R.G.; Thode, V.; Mulgura, M.; O'Leary, N.; França, F.; Silva, T.R.S. *Verbenaceae* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB246>. Acesso em: 18 Mar. 2014.

SANGWAN, N. S. et al. Regulation of essential oil production in plants. **Plant Growth Regulation**, v.34: p. 3–21, 2001.

SANTOS, H. S. et al. Cytotoxic Naphthoquinones from Roots of *Lippia microphylla*. **Z. Naturforsch.** v.58 p.517-520, 2003.

SANTOS, F. J. B. et al. Composition and Biological Activity of Essential Oils from *Lippia organoides* H.B.K. **Journal Essential Oil Research**, v.16 p.504-506, 2004.

SANTOS, A. da S. et al. **Óleos essenciais: uma abordagem econômica e industrial**. Rio de Janeiro: Interciência, 2011, 386p.

SANTOS, A. et al. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19. n. 2A. p. 436-441, 2009.

SARRAZIN, S.L. F. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia grandis* Schauer (Verbenaceae) from the western Amazon. **Food Chemistry**, v. 134, p.1474–1478, 2012.

SARRAZIN, S. L. F. et al. Antimicrobial and Seasonal Evaluation of the Carvacrol-Chemotype Oil from *Lippia organoides* Kunth. **Molecules**, v. 20, p.1860-1871, 2015.

SIANI, A.C. et al. Linalool from *Lippia alba*: Study of the Reproducibility of the Essential Oil Profile and the Enantiomeric Purity. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p.3518-3521, 2002.

SILVA, M. G de V. et al. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, v. 70 p.32-34, 1999.

SILVA, E. M. **Descrição Botânica, caracterização Química e avaliação nematocida do óleo essencial da *Lippia microphylla* Cham. de Boa Vista Roraima, 2003**. Monografia (Especialização em Química) – Universidade Federal de Roraima.

SILVA, M. M. **Estudo da composição química do óleo essencial de *Lippia microphylla* Cham. em três anos diferentes e atividade antioxidante, 2014**. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal de Roraima.

SIMÕES C. M. O.; SPITZER, V. Óleo Voláteis In: SIMÕES C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª. ed. Florianópolis: Editora da UFSC, 2004, p. 466-495.

SIVIRA, A. et al. Toxicity of Ethanolic Extracts from *Lippia organoides* and *Gliricidia sepium* to *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval) (Acari: Tetranychidae). **Neotropical Entomology**, v. 40, n.3, p.375-379, 2011.

SKOLD, M. et al. The fragrance chemical β -caryophyllene - air oxidation and skin sensitization. **Food and Chemical Toxicology**, v.44, p. 538–545, 2006.

SMITH, N. et al. **Flowering Plants of the Neotropics**. Princeton University Press, New Jersey, 2004, 594p

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

SOUZA, V. C. & LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APGII.2** ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum, 703 p. 2008.

STANDEN, M.D.; CONNELLAN, P.A.; LEACH, D.N. Natural killer cell activity and lymphocyte activation: Investigating the effects of a selection of essential oils and components in vitro. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 16, p.133–139, 2006.

STASHENKO, E. E. et al. *Lippia origanoides* chemotype differentiation based on essential oil GC-MS and principal component analysis. **Journal of Separation Science**, v. 33, p. 93–103, 2010.

STASHENKO, E.E. et al. Chromatographic and mass spectrometric characterization of essential oils and extracts from *Lippia* (Verbenaceae) aromatic plants. **Journal of Separation Science**, v. 36, p.192–202, 2013.

STASI et al. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, V. 73, p. 69-91, 2002.

TAVARES et al. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, n.1 p. 1-5, 2005.

TERBLANCHÉ, F. C; KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the Genus *Lippia* (Verbenaceae) – A Literature Review. **Journal Essential Oil Research**, V. 8, p. 471-485, 1996.

TEXEIRA, M. L. Essential Oils from *Lippia origanoides* Kunth. and *Mentha spicata* L.: Chemical Composition, Insecticidal and Antioxidant Activities. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p.1181-1190, 2014.

THOMPSON, J. D. et al. Qualitative and quantitative variation in monoterpene co-occurrence and composition in the essential oil of *Thymus vulgaris* chemotypes. **Journal of Chemical Ecology**, v. 29, n. 4, p. 859-880, 2003.

VALE, T. G. et al. Central effects of citral, myrcene and limonene, constituents of essential oil chemotypes from *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown. **Phytomedicine**, v. 9p. 709–714, 2002.

VALTER, J.L. et al. Variação química no óleo essencial de seis indivíduos de *Duguetia furfuracea* (Annonaceae). **Revista Brasileira Farmacognosia**, V.18, n. 3, p.373-378, 2008.

VAN DOOL, H.; KRASTZ, P.D.D. A. A generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal Chromatography**, v. 2, p. 463-471, 1963.

VARDAR-UNLU, G. *et al.* Antimicrobial and Antioxidant Activity of the Essential Oil and Methanol Extracts of *Thymus pectinatus* Fisch. et Mey. Var. *pectinatus* (Lamiaceae). **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p.63-67, 2003.

VEGA-VELA, N. E.; SÁNCHEZ, M. I. C. Genetic structure along an altitudinal gradient in *Lippia origanoides*, a promising aromatic plant species restricted to semiarid areas in northern South America. **Ecology and Evolution**, v.2, n.11, p. 2669–2681, 2012.

VERAS *et al.* Antimicrobial Effect of *Lippia sidoides* and Thymol on Enterococcus faecalis Biofilm of the Bacterium Isolated from Root Canals. **The Scientific World Journal**, p. 1-5, 2014.

VIUDA-MARTOS, M. *et al.* Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet. **Flavour Fragrance Journal**, v. 25, p.13–19.

ZAPATA, B. *et al.* Cytotoxic activity of essential oils of *Lippia origanoides* H.B.K and its major constituents. **Salud UIS**, v.41, p. 215-222, 2009.

ZOGHBI *et al.* Essential Oils of *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. Growing Wild in the Brazilian Amazon. **Flavour and Fragrances Journal**, v. 13, 47-48, 1998.

APÊNDICE A

Constituição do óleo essencial do quimiotipo A mês de Maio

Nome	8 h			12h		18h	
	IK _L	IK _C	Área%	IK _C	Área%	IK _C	Área%
Isopropil tiglate	976	ND	ND	ND	ND	975	0,11
Linalol	1097	1100	0,32	1100	0,25	ND	ND
α-copaeno	1377	ND	ND	1376	0,21	1376	0,15
β-elemeno	1391	ND	ND	1392	0,19	ND	ND
E-cariofileno	1419	1420	18,53	1420	21,95	1420	18,29
Não identificado	-	ND	ND	1424	0,27	1424	0,21
α-ioneno	1430	1427	0,15	1426	0,29	1426	0,21
β-copaeno	1432	1429	0,22	1429	0,39	1429	0,32
Não identificado	-	1444	0,17	1443	0,26	1443	0,18
α-humuleno	1455	1453	3,29	1453	4,51	1453	3,97
Germacreno D	1485	1477	0,45	1476	0,8	1476	0,71
α-amorfeno	1485	1481	1,31	1480	1,6	1480	1,27
β-selineno	1490	1486	0,99	1486	1,62	1486	1,52
Butanoato de Fenil etil 3-metil	1491	1492	0,49	1491	0,44	1492	0,41
Valenceno	1496	1495	1,21	1495	1,74	1495	1,58
α-Muurolene	1500	ND	ND	1500	0,32	ND	ND
α-bulneseno	1510	1505	0,15	1505	0,13	ND	ND
δ-amorfeno	1512	1508	0,61	1507	0,41	1507	0,61
β-bisaboleno	1506	ND	ND	1509	0,31	ND	ND
γ-cadineno	1514	1514	0,23	1514	0,33	1514	0,31
Não identificado	-	1516	0,83	1516	0,95	1516	0,95
δ-cadineno	1523	1524	1,9	1524	2,14	1524	1,89
Não identificado	-	ND	ND	ND	ND	1532	0,46
Não identificado	-	1544	0,73	1543	0,68	1543	0,59
Germacreno B	1561	1557	2,94	1557	3,37	1557	2,93
Oxido de cariofileno	1583	1583	6,98	1583	7,96	1583	8,81
Não identificado	-	1588	0,72	1587	0,53	1587	0,65
Não identificado	-	1590	0,27	ND	ND	ND	ND
Viridiflorol	1593	1593	0,88	1592	0,97	1592	1,02
Guaiol	1601	1598	1,79	1598	1,41	1598	1,43
Humuleno epoxido II	1608	1609	0,89	1608	0,88	1609	1,08
Não identificado	-	1614	1,11	1613	1,11	1613	1,14
1,10-di-epi-Cubenol	1619	1615	1,89	1615	1,74	1615	1,84
Não identificado	-	1618	2,86	1618	2,57	1618	2,8
Não identificado	-	1621	1,6	1621	1,03	1621	0,83
10-epi-γ- eudesmol	1624	1626	2,56	1626	2,19	1626	2,35
1-epi-cubenol	1629	1629	3,41	1630	3,18	1629	3,52
γ-eudesmol	1632	1633	6,26	1632	5,51	1633	5,9
α-Cariofila-4(14), 8(15) -dien-5-ol	1641	1637	4,45	1636	4,52	1637	5,43

ND= Não detectado; IK_L=Índice de Kovats da Literatura; IK_C= Índice de Kovats Calculado.

Cont.: Constituição do óleo essencial do quimiotipo A mês de Maio

Nome	IK _L	8h		12h		18h	
		IK _C	Área%	IK _C	Área%	IK _C	Área%
Epi- α -muurolol	1642	1643	4,24	1643	3,65	1643	4,09
α -muurolol	1646	1648	1,56	1647	1,25	1647	1,44
β -eudesmol	1651	1651	3,63	1650	2,99	1650	3,32
α -cadinol	1656	1656	13,97	1655	11,77	1655	12,52
Não identificado	-	1659	1,3	1658	1,23	1658	1,41
Não identificado	-	1666	0,2	ND	ND	1666	0,26
Não identificado	-	1668	0,25	ND	ND	ND	ND
Z- α -santalol	1675	1672	1,87	1672	1,43	1672	1,75
α -bisabolol	1686	1684	0,91	1684	0,33	1684	0,53
Eudesma-4(15), 7-dien-1-beta-ol	1688	1687	0,23	ND	ND	1687	0,2
Eudesm-7(11)-en-4-ol	1700	1696	0,74	1696	0,59	1696	0,59
Não identificado	-	1868	0,7	ND	ND	1886	0,42
Não identificado	-	1969	0,21	ND	ND	ND	ND
TOTAL	-		100		100		100
Total de identificação	-		89,05%		91,37%		90,1%

ND= Não detectado; IK_L=Índice de Kovats da Literatura; IK_C= Índice de Kovats Calculado.

Constituição do óleo essencial do quimiotipo A mês de Junho

Nome	8h			12h		18h	
	IR _L	IR _C	Área%	IR _C	Área%	IR _C	Área%
Octen-3-ol	979	984	0,17	ND	ND	ND	ND
<i>p</i> -cimeno	1025	1024	0,14	ND	ND	1025	0,1
Não identificado	-	1031	0,19	ND	ND	ND	ND
Linalol	1097	1100	1,93	ND	ND	1101	0,19
Ciclosativeno	1371	ND	ND	ND	ND	1372	0,11
α -copaeno	1377	1376	0,36	1376	0,24	1376	0,35
E-cariofileno	1419	1420	23,92	1420	16,96	1421	17,41
Não identificado	-	1424	0,37	1424	0,3	1424	0,34
α -ioneno	1430	1426	0,28	1427	0,25	1427	0,29
β -copaeno	1432	1429	0,54	1430	0,46	1430	0,52
Não identificado	-	1444	0,22	1444	0,24	1444	0,25
Não identificado	-	ND	ND	ND	ND	1449	0,12
β -humuleno	1455	1453	5,17	1454	4,26	1454	4,19
γ -muuroleno	1480	1477	0,98	1477	1,00	1477	0,94
Germacreno D	1485	1481	1,27	1481	1,33	1481	1,19
β -selineno	1490	1486	1,59	1486	1,66	1487	1,63
trans-Muurola-4(14),5-dieno	1494	1491	0,49	1492	0,37	1492	0,37
Valenceno	1496	1495	1,78	1495	1,83	1496	1,69
Epizonareno	1502	ND	ND	1499	0,14	1499	0,15
α -muuroleno	1501	ND	ND	1501	0,27	1501	0,24
δ -amorfenol	1512	1508	0,23	1508	0,42	1508	0,38
Não identificado	-	ND	ND	1510	0,32	1510	0,31
γ -cadineno	1514	1514	0,43	1514	0,4	1515	0,35
Não identificado	-	1516	0,8	1516	0,89	1517	0,79
δ -cadineno	1523	1524	2,13	1524	2,53	1525	2,25
Não identificado	-	ND	ND	1533	0,21	1533	0,49
Não identificado	-	ND	ND	1535	0,16	1536	0,15
α -cadineno	-	ND	ND	1538	0,2	1538	0,19
Não identificado	-	ND	ND	1542	0,11	ND	ND
Não identificado	-	1544	0,4	1544	0,85	1544	0,83
Não identificado	-	ND	ND	1552	0,11	1552	0,11
Germacreno B	1561	1557	2,52	1557	2,84	1558	2,33
Oxido de cariofileno	1583	1583	10,16	1583	9,21	1583	8,96
cis- β -elemenono	1590	1588	0,38	1588	0,55	1588	0,45
Viridiflorol	1593	1593	0,66	1593	1,05	1593	0,87
Guaiol	1601	1598	1,09	1598	1,49	1599	1,23
trans- β -elemenono	1601	ND	ND	1602	0,2	ND	ND
Humuleno epóxido II	1608	1609	0,87	1609	1,13	1609	1,19
Não identificado	-	1613	0,78	1614	1,02	1614	1,12
Cubenol<1,10-di-epi	1619	1615	1,66	1616	1,99	1616	1,74
Não identificado	-	1618	2,09	1618	2,71	1618	2,62

ND= Não detectado; IR_L=Índice de Kovats da Literatura; IR_C= Índice de Kovats Calculado.

Cont.: Constituição do óleo essencial do quimiotipo A mês de Junho

Nome	8h			12h		18h	
	IK _L	IK _C	Área %	IK _C	Área %	IK _C	Área %
Não identificado	-	ND	ND	1622	0,32	1622	0,19
10-epi-gama-eudesmol	1624	1626	1,9	1626	2,3	1627	2,35
1-epi-Cubenol	1629	1630	2,98	1630	3,57	1631	3,31
γ-eudesmol	1632	1633	5,75	1633	5,98	1633	6,07
cariofila-4(14),8(15)-dien-5.alfa-ol	1641	1637	5,28	1637	5,47	1638	6,05
epi-α-muurolol	1642	1643	3,49	1643	4,05	1644	4,11
α-muurolol	1646	1647	1,12	1647	1,38	1648	1,4
β-eudesmol	1651	1651	2,72	1651	3,2	1651	3,37
α-cadinol	1658	1655	10,46	1656	11,37	1656	11,25
Não identificado	-	1659	1,1	1659	1,41	1659	1,56
Não identificado	-	ND	ND	1666	0,15	1667	0,42
Z-α-santalol	1675	1672	1,22	1672	1,87	1672	2,19
α-bisabolol	1686	ND	ND	1685	0,45	1685	0,43
Eudesma-4(15),7-dien-1-beta-ol	1688	ND	ND	1687	0,18	1688	0,17
Eudesm-7(11)-en-4-ol	1700	1696	0,38	1696	0,6	1696	0,69
Total	-		100	-	100	-	100
Total de identificação	-		94,05%	-	91,2%	-	90,7%

ND= Não detectado; IK_L=Índice de Kovats da Literatura; IK_C= Índice de Kovats Calculado.

Constituição do óleo essencial do Quimiotipo B mês de Maio

Nome	IK _L	08 h		12h		18h	
		IK _C	Área%	IK _C	Área%	IK _C	Área%
Mirceno	991	993	2,27	993	1,99	992	2,16
α-falendreno	1003	1006	0,13	1006	0,11	1005	0,13
Silvestreno	1009	1011	0,1	ND	ND	1011	0,11
α-terpineno	1017	1017	1,82	1017	1,67	1016	1,88
p-cimeno	1025	1024	10,7	1024	10,48	1023	11,57
Limoneno	1029	1028	0,35	1028	0,31	1028	0,34
β-ocimeno	1037	1036	0,13	1036	0,12	1035	0,13
γ-terpineno	1060	1058	6,45	1058	6,19	1057	7,25
Não identificado	-	ND	ND	1066	0,10	1065	0,25
Linalol	1097	1100	1,17	1100	1,12	1100	1,58
Ipsdineol	1145	ND	ND	ND	ND	1145	0,2
terpinen-4-ol	1177	1177	0,88	1177	0,82	1177	0,95
Timol metil éter	1235	1235	1,17	1235	0,86	1234	0,38
Não identificado	-	1289	0,14	1289	0,15	1288	0,23
Timol	1290	1295	18,21	1295	14,03	1294	10,51
Carvacrol	1299	1306	33,52	1306	34,68	1305	37,9
acetato do timol	1352	1354	0,39	1354	0,41	1354	0,3
Acetato do carvacrol	1373	1373	0,34	1373	0,48	1372	0,34
Geranil acetato	1381	1385	0,21	1384	0,21	1384	0,19
E-cariofileno	1419	1420	6,46	1420	8,19	1419	7,29
α-humuleno	1455	1453	0,5	1454	0,67	1453	0,59
Germacreno D	1485	ND	ND	1481	0,12	ND	ND
não identificado	-	ND	ND	1486	0,12	ND	ND
Não identificada	-	1488	0,14	1488	0,26	1487	0,14
Não identificado	-	1496	12,37	1497	13,71	1496	13,09
β-bisaboleno	1506	ND	ND	1510	0,10	ND	ND
não identificado	-	ND	ND	ND	ND	1532	0,12
não identificado	-	1544	0,15	1544	0,21	1543	0,16
não identificado	-	1573	1,08	1573	1,39	1572	1,02
Oxido de cariofileno	1583	1583	1,32	1583	1,50	1582	1,19
TOTAL			100		100		100
Total de Identificação			86,12%		84,06%		84,99%

ND= Não detectado; IK_L=Índice de Kovats da Literatura; IK_C= Índice de Kovats Calculado.

Constituição do óleo essencial do Quimiotipo B mês de Junho

Nome	IK _L	8h		12h		18h	
		IK _C	Área %	IK _C	Área %	IK _C	Área %
Mirceno	991	993	2,91	994	2,74	993	2,4
α -falendreno	1003	1006	0,16	1007	0,14	1006	0,11
Silvestreno	1009	1012	0,13	1012	0,14	1011	0,09
α -terpineno	1017	1017	2,32	1017	2,15	1017	1,91
<i>p</i> -cimeno	1025	1024	12,8	1025	12,27	1024	12,31
Limoneno	1029	1028	0,5	1029	0,47	1028	0,42
<i>Z</i> - β -ocimeno	1037	1036	0,22	1037	0,18	1036	0,17
γ -terpineno	1060	1058	7,29	1058	6,16	1057	5,79
Não identificada	-	ND	ND	ND	ND	1066	0,13
Linalol	1097	1101	1,28	1101	1,78	1100	2,06
Terpinen-4-ol	1177	1178	1,04	1178	1,16	1177	1,18
timol metil éter	1235	1236	0,44	1236	0,5	1235	0,52
Não identificada	-	1289	0,21	1289	0,24	1289	0,27
timol	1290	1295	9,87	1295	9,22	1295	10,85
Não identificada	-	1299	0,51	1299	0,51	1298	0,55
Carvacrol	1299	1306	34,56	1306	32,13	1306	37,41
timol acetato	1352	1355	0,29	1355	0,49	1354	0,44
carvacrol acetato	1373	1373	0,33	1373	0,55	1373	0,49
Geranil acetato	1381	ND	ND	1385	0,29	1384	0,3
<i>E</i> -cariofileno	1419	1420	7,96	1420	9,73	1419	5,7
trans- α -bergamoteno	1435	ND	ND	1437	0,16	ND	ND
α -humuleno	1455	1454	0,69	1454	0,96	1453	0,44
Não identificada	-	ND	ND	1487	0,17	1487	0,11
Não identificada	-	ND	ND	1488	0,17	ND	ND
Não identificado	1489	1497	12,25	1497	12,39	1496	12,12
β -bisaboleno	1506	ND	ND	1510	0,15	ND	ND
Não identificada	-	ND	ND	1544	0,25	ND	ND
Não identificada	-	1573	1,4	1573	1,79	1572	1,71
óxido de cariofileno	1583	1583	2,84	1583	3,11	1582	2,52
Total			100		100		100
Identificação			85,63%		84,19%		84,81%

ND= Não detectado; IK_L=Índice de Kovats da Literatura; IK_C= Índice de Kovats Calculado

APÊNDICE B

Tabela 2. Doseamento da amostra do Quimiotipo A.

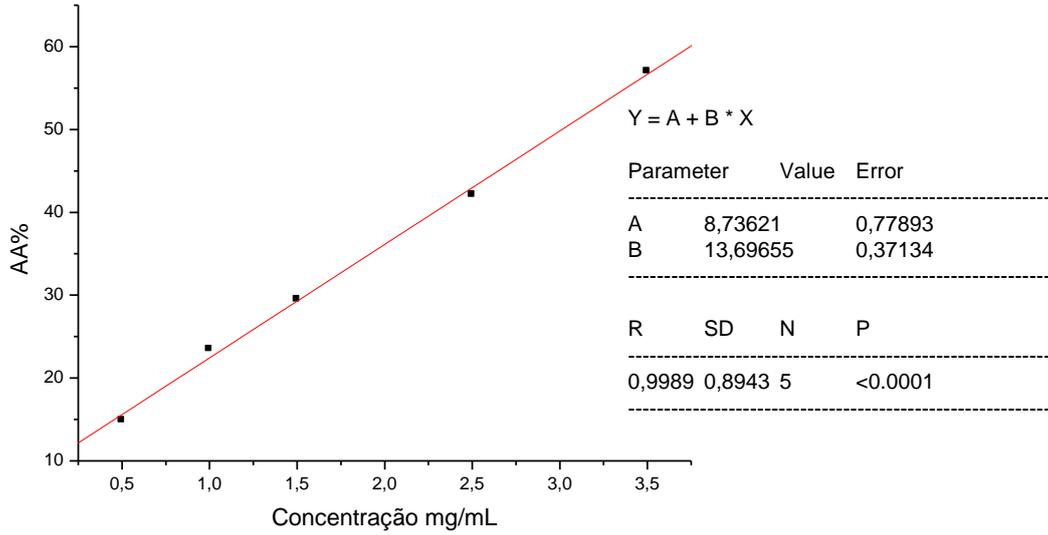
Concentração	Amostra Abs ± DP	Branco Abs ± DP	AA%
0,5 mg/mL	0,654±0,001	0,039±0,001	14,88
1,0 mg/mL	0,582±0,002	0,039±0,001	23,45
1,5 mg/mL	0,540±0,008	0,039±0,001	29,49
2,0 mg/mL	0,483±0,005	0,038±0,002	37,50
2,5 mg/mL	0,451±0,008	0,037±0,001	42,13
3,0 mg/mL	0,420±0,002	0,039±0,001	54,63
3,5 mg/mL	0,404±0,004	0,039±0,001	56,88
Controle Abs ± DP	0,714±0,03		

Tabela 3. Doseamento da amostra do Quimiotipo B.

Concentração	Amostra Abs ± DP	Branco Abs ± DP	AA%
0,004mg/mL	0,380±0,003	0,039±0,001	17,23
0,02mg/mL	0,322±0,004	0,039±0,001	31,31
0,04 mg/mL	0,248±0,002	0,039±0,001	49,27
0,06 mg/mL	0,204±0,002	0,038±0,002	59,70
0,08 mg/mL	0,139±0,001	0,037±0,001	75,48
Controle Abs ± DP	0,412±0,001		

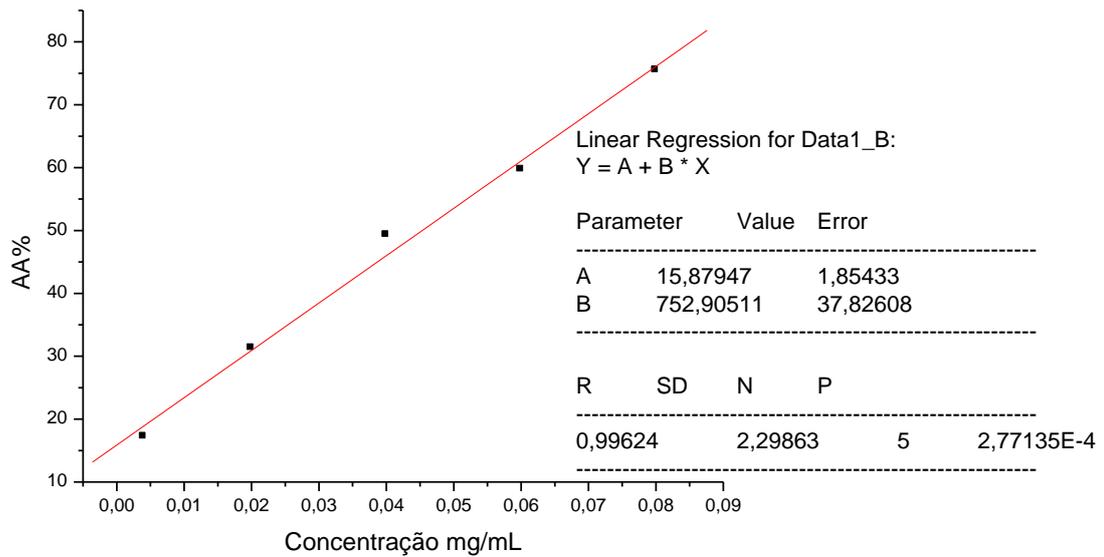
APÊNDICE C

Figura 17. Curva de calibração do Quimiotipo A.



Fonte: AUTORA, 2015

Figura 18. Curva de calibração do Quimiotipo B



Fonte: AUTORA, 2015

APÊNDICE D

Constituição do óleo essencial dos Quimiotipos de *L. origanoides* usados na atividade antioxidante.

Nome	IK _L	Quimiotipo A		Quimiotipo B	
		IK _C	Área%	IK _C	Área%
Não identificado	-	ND	ND	971	0,13
Mirceno	991	ND	ND	989	0,70
α -terpineno	1017	ND	ND	1012	0,58
p -cimeno	1025	ND	ND	1020	15,08
Limoneno	1029	ND	ND	1024	0,14
γ -Terpineno	1060	ND	ND	1053	3,73
Linalol	1097	1104	0,4	1095	1,14
Terpine-4-ol	1172	ND	ND	1172	0,58
Timol metil éter	1235	ND	ND	1230	2,27
Timol	1290	ND	ND	1291	18,28
Carvacrol	1299	ND	ND	1303	48,48
Acetato de 3-fenil-propil	1368	1370	0,34	ND	ND
α -copaeno	1377	1375	0,51	ND	ND
<i>E</i> -cariofileno	1419	1425	50,34	1420	1,7
Citroviol	1426	1426	1,93	ND	ND
β -copaeno	1432	1429	0,41	ND	ND
Aromadendreno	1441	1435	0,32	ND	ND
α -humuleno	1455	1453	4,59	ND	ND
Alloaromadendreno	1460	1460	0,22	ND	ND
γ -muuroleno	1480	1476	0,65	ND	ND
Germacreno D	1485	1480	1,73	ND	ND
β -salineno	1490	1485	0,75	ND	ND
Não identificado	-	ND	ND	1490	4,39
Butanoato de fenil etil 3-metil	1491	1490	0,2	ND	ND
δ -salineno	1493	1494	1,21	ND	ND
α -muuroleno	1500	1499	0,14	ND	ND
Epizonareno	1502	1506	0,21	ND	ND
β -bisaboleno	1506	1508	0,72	ND	ND
Propanoato de anisila	1512	1512	1,51	ND	ND
Não identificado	-	1515	0,52	ND	ND
δ -cadineno	1523	1523	2,58	ND	ND
Trans-calameneno	1529	1532	0,44	ND	ND
Não identificado	-	1542	0,44	ND	ND
Não identificado	-	1550	0,2	ND	ND
Germacreno B	1561	1556	0,93	ND	ND
<i>E</i> -nerolidol	1563	1564	0,42	1558	1,21
epóxido de α -cedreno	1576	ND	ND	1573	1,59
Oxido de cariofileno	1583	1583	8,10	ND	ND

ND= Não detectado; IK_L=Índice de Kovats da Literatura; IK_C= Índice de Kovats Calculado.

Cont.: Constituição do óleo essencial dos Quimiotipos de *L. origanoides* usados na atividade antioxidante.

Nome	IK _L	Quimiotipo A		Quimiotipo B	
		IK _C	Área%	IK _C	Área%
Gaiiol	1601	1597	0,41	ND	ND
Não identificado	-	1601	0,39	ND	ND
Humuleno epoxido II	1608	1607	0,3	ND	ND
Cubenol<1,10-di-epi>	1619	1614	0,18	ND	ND
Não identificado	-	1616	0,4	ND	ND
<10-epi>γ-Eudesmol	1624	1625	0,43	ND	ND
Não identificado	-	1629	1,4	ND	ND
carifila-4(14),8(15)-dien-5.α-ol	1641	1632	2,33	ND	ND
carifila-4(14),8(15)-dien-5.β-ol	1641	1637	4,2	ND	ND
epi-α-cadinol	1640	1642	1,56	ND	ND
α-muurolol	1646	1646	0,64	ND	ND
β-eudesmol	1651	1650	0,72	ND	ND
α-cadinol	1654	1655	3,82	ND	ND
Oxido B de α-bisabolol	1658	1657	0,88	ND	ND
E-Cariofieleno<14-hidroxi-9-epi>	1670	1671	1,11	ND	ND
Não identificado		1705	1,42	ND	ND
Total identificação %			95,23		95,48
Monoterpenos %			0,4		90,98
Sesquiterpenos %			90,85		4,5

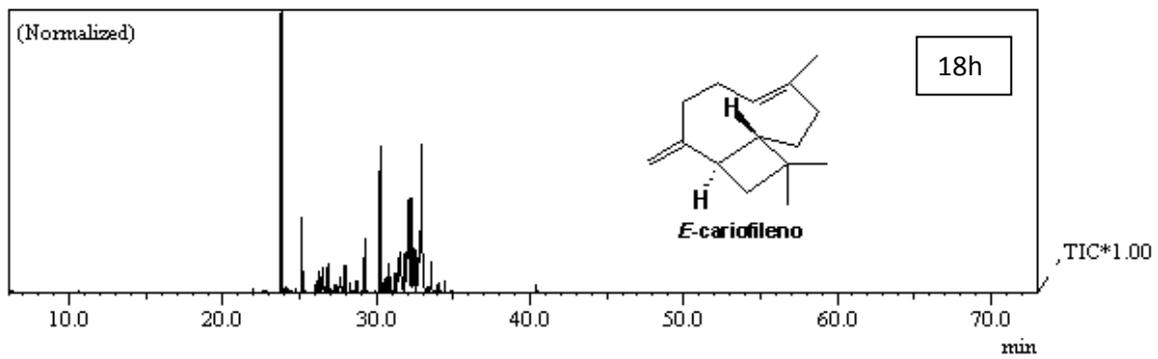
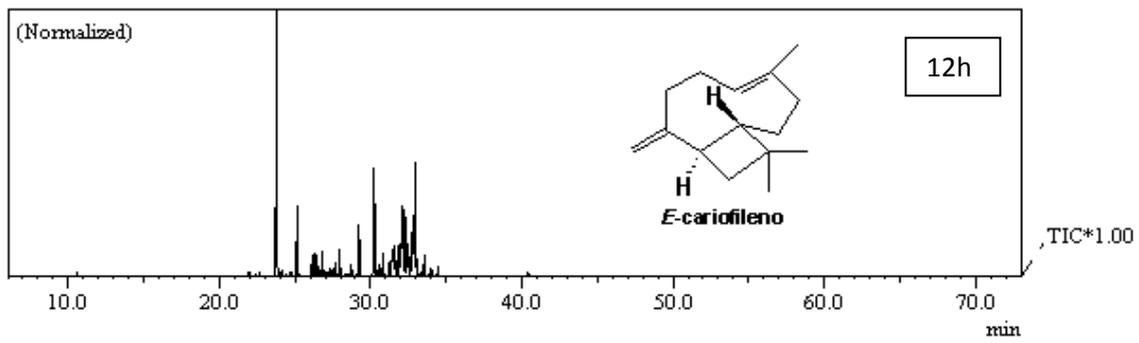
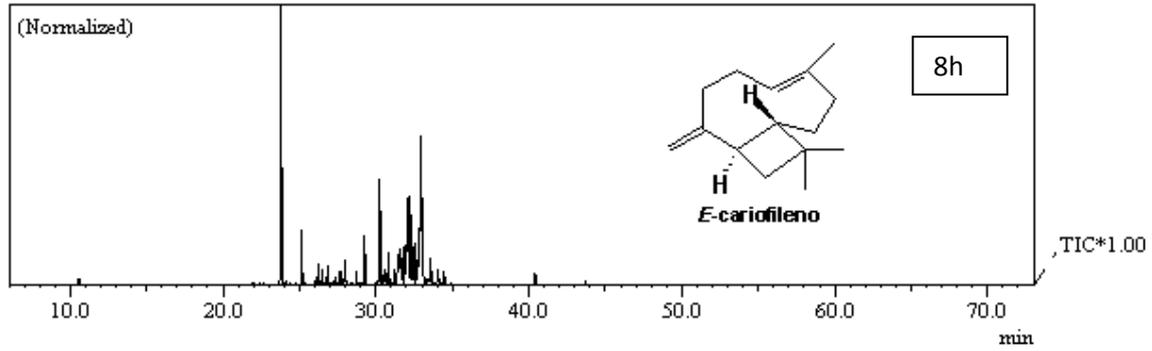
ND= Não detectado; IK_L=Índice de Kovats da Literatura; IK_C= Índice de Kovats Calculado.

APÊNDICE E

Cromatogramas do quimiotipos nos três horários de coleta do mês de maio

Coleta do mês de Maio

Quimiotipo A



Coleta do mês Maio

Quimiotipo B

