



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

EVELYN IVANA TRINDADE DAMASCENO

**COMPOSIÇÃO E CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL E
EXTRATO METANÓLICO E ANÁLISE
SENSORIAL DE LIPPIA GRANDIS SCHAU
(VERBENACEAE)**

BELÉM

2009



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
CURSO DE MESTRADO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

EVELYN IVANA TRIDADE DAMASCENO

**COMPOSIÇÃO E CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL E
EXTRATO METANÓLICO E ANÁLISE
SENSORIAL DE LIPPIA GRANDIS SCHAU
(VERBENACEAE)**

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

ORIENTADOR :

Prof^o. Dr. José Guilherme Soares Maia

BELÉM

2009

D155c Damasceno, Evelyn Ivana Trindade

Composição e capacidade antioxidante do óleo essencial e extrato metanólico e análise sensorial de *Lippia grandis schau* (Verbenaceae) / Evelyn Ivana Trindade Damasceno; Orientador: Prof^o. Dr. José Guilherme Soares Maia. — Belém, 2009.

Dissertação de Mestrado apresentado ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal do Pará, para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2009.

1. *Lippia grandis*. 2. Óleo essencial. 3. Atividade antioxidante. I. Título.



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

EVELYN IVANA TRINDADE DAMASCENO

**COMPOSIÇÃO E CAPACIDADE
ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL E
EXTRATO METANÓLICO E ANÁLISE
SENSORIAL DE LIPPIA GRANDIS SCHAU
(VERBENACEAE)**

BANCA EXAMINADORA :

Profº Dr. José Guilherme Soares Maia
(FEQ - UFPA – Orientador)

Drª Eloísa Helena Aguiar Andrade
(FEQ – UFPA – Membro)

Profº Dr. Jesus Nazareno Silva de Souza
(FEA - UFPA – Membro)

Profº Dr. Pergentino José Cunha Sousa
(Farmácia - UFPA – Membro)

À minha Família, Ivone e Rodolpho Damasceno e ao Leandro Queiroz Alves que me motivam a buscar novos desafios e oportunidades para o crescimento como ser humano.

AGRADECIMENTOS

Ao Professor e Orientador José Guilherme Soares Maia, o meu muito obrigado pela por sua orientação e amizade.

À Eloísa Andrade, pelo auxílio na composição química do óleo essencial.

Ao Professor Pergentino Sousa pelos testes de toxicidade.

À Joyce Kelly pelos momentos de discussões científicas, lazer e amizade.

Ao Júlio Félix pela amizade e companheirismo em laboratório.

À Nayla Nunes, Carol Franco, Ana Paula e Cássia pelos momentos *in lab*, principalmente, nas destilações.

Ao amigo Ferdinando, pelas inúmeras coletas e momentos de descontração.

Ao Professor Jesus Souza pelas inúmeras contribuições nesta dissertação.

Ao Professores Lênio Faria por sua participação na banca examinadora.

Às amigas Anne Suellen, Lorena Maciel, Camila Bastos e Thais Franco, pelos momentos maravilhosos de amizade, companheirismo, dúvidas e batalhas. Obrigada minhas flores.

Ao amigo Antônio pelas conversas animadas durante as horas vagas.

À minha família, amigos, namorado e a todos que contribuíram direta e indiretamente para a conclusão deste trabalho. Obrigada!

“Sempre que os seus esforços forem vistos com indiferença, não desanime: também o sol ao nascer, dá um espetáculo maravilhoso, e a maioria da platéia continua dormindo. Seja persistente! O amanhã trará as emoções de um novo dia!”

(Autor Desconhecido).

RESUMO

O Brasil e, em especial, a Amazônia possuem grande variedade de alimentos naturais oriundos de plantas pouco conhecidas, com provável atividade antioxidante, cujo conhecimento técnico e científico pode contribuir para o desenvolvimento sustentável da região. A espécie *Lippia grandis*, conhecida como “erva-do-marajó”, ocorre em cerrados e campos naturais da Amazônia. É uma planta pouco estudada com dados inexistentes de aplicação como condimento e nutracêutico naturais. Neste estudo foi avaliada a composição química de óleo essencial de *Lippia grandis*, sua atividade antioxidante por diferentes métodos (DPPH, TEAC e Sistema β -caroteno/ ácido linoléico), o teor de fenólicos totais, sua toxicidade, além de análise sensorial. As partes aéreas da planta foram coletadas na Serra dos Carajás, Município de Parauapebas, Estado do Pará, em abril de 2007. O óleo essencial foi hidrodestilado em aparelho Clevenger e analisado por cromatografia em fase gasosa com ionização de chamas (CG-IC) e em acoplamento com a espectrometria de massas (CG-EM). A composição do óleo essencial apresentou como constituintes principais timol (45%), *p*-cimeno (14,26%), γ -terpineno (10,46%) e o éter metílico do timol (4,84%). O óleo, o extrato metanólico e as frações obtidas por partição com água, acetato de etila e diclorometânica foram ensaiados quanto à atividade antioxidante. No método do radical DPPH a fração acetato de etila (CE_{50} 9,0 μ g/mg) apresentou maior atividade. No teste ABTS/TEAC a fração hidroalcoólica (TEAC 336,0 mg/mg amostra) e o óleo essencial (TEAC 131,1 mg/mg amostra) apresentaram a maior e menor atividade, respectivamente. O sistema β -caroteno/ácido linoléico mostrou para o óleo essencial (42,5%) valor elevado de seqüestro do radical, possivelmente pela maior solubilidade da amostra. O extrato metanólico e as frações com acetato de etila, hidroalcoólica e diclorometano apresentaram significativo teor de fenólicos totais, 761,4, 505,0, 336,5 e 223,0 mg de ácido gálico/g de extrato. O óleo essencial (CL_{50} 7,63 \pm 2,42 mg.mL⁻¹) e o extrato metanólico (CL_{50} 121,60 \pm 5,31 mg.mL⁻¹) apresentaram citotoxicidade alta e moderada frente as larvas de *Artemia salina*. Nos testes de toxicidade aguda (DL_{50}) não foi observada nenhuma alteração comportamental ou morte dos animais que ingeriram o extrato aquoso de *Lippia grandis*. A análise sensorial de escala hedônica apresentou bom índice de aceitação, com um percentual de 78% para *Lippia grandis* e 77% para o orégano, usado como padrão.

Palavras-chave: *Lippia grandis*, Óleo essencial, Atividade antioxidante.

ABSTRACT

Brazil and in particular the Amazon have a great variety of natural foods from plants poorly known, with probable antioxidant activity, whose technical and scientific knowledge can contribute to sustainable development of the region. The species *Lippia grandis*, known as "erva-do-marajó" occurs in natural savannas and fields of the Amazon. It is a little studied plant with missing data for the application as natural flavoring and a nutraceutical product. This study evaluated the chemical composition of essential oil of *Lippia grandis*, their antioxidant activity by different methods (DPPH, TEAC and system β -carotene / linoleic acid), the content of phenolic compounds, their toxicity, and sensory analysis. The aerial parts of the plant were collected in the Serra dos Carajás, city of Parauapebas, State of Pará, in April 2007. The essential oil was hidrodistilled in a Clevenger apparatus and analyzed by gas chromatography with flame ionization (GC-FI) and coupled with mass spectrometry (GC-MS). The composition of essential oil presented as major constituents thymol (45%), p-cymene (14.26%), γ -terpinene (10.46%) and the methyl ether of thymol (4.84%). The oil, the methanolic extract and the fractions obtained by partition with water, ethyl acetate and dichloromethane were tested on the antioxidant activity. In the method of the radical DPPH the ethyl acetate fraction (EC_{50} 9.0 $\mu\text{g}/\text{mg}$) showed greater activity. In the test of ABTS/TEAC the hydroalcoholic fraction (TEAC 336.0 mg/mg sample) and the essential oil (TEAC 131.1 mg/mg sample) had the highest and lowest activity, respectively. The system β -caroteno/linoleic acid showed to the essential oil (42.5%) the highest value for the radical scavenging, possibly by the higher solubility of the sample. The methanol extract and the ethyl acetate, hydroalcoholic and dichloromethane fractions showed significant content of phenolic compounds (761.4, 505.0, 336.5 and 223.0 mg of gallic acid/ g of extract, respectively). The essential oil (LC_{50} $7.63 \pm 2.42 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) and methanol extract (CL_{50} $121.6 \pm 5.31 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) showed high and moderate cytotoxicity against the larvae of *Artemia salina*. In the tests of acute toxicity (LD_{50}) was not observed any behavioral changes or death of animals that ingested the aqueous extract of *Lippia grandis*. The sensory analysis of hedonic scale showed good rate of acceptance, with a percentage of 78% for *Lippia grandis* and 77% for the oregano, used as standard.

Keywords: *Lippia grandis*, Essential oil, Antioxidant activity.

LISTA DE SIGLAS

(H ₂ O ₂)	Peróxido de hidrogênio
(NO·)	Radical nitroso
(O ₂ ·)	Oxigênio simpleto
(OH·)	Radical hidroxila
(ONOO·)	Peroxinitrito
BHA	Butil hidroxianisol
BHT	Butil hidroxitolueno
CE ₅₀	Concentração eficaz
CG	Cromatografia a gás
CG-EM	Cromatografia a gás – espectrometria de massa
DG	Galato dodecil
DL ₅₀	Dose Letal
DPPH	1,1-difenil-2-picrilidrazila
EMLG	Extrato metanólico de <i>Lippia grandis</i>
ERO	Espécies reativas de oxigenio
FA-EMLG	Fase acetato de <i>Lippia grandis</i>
FD-EMLG	Fase diclorometano de <i>Lippia grandis</i>
FHA-EMLG	Fase aquosa de <i>Lippia grandis</i>
H ⁺	Átomo de hidrogênio
LOO ⁻	Radical Peróxido
LOOH	Radical lipoperoxido
PG	Galato de propila
R·	Radical genérico
TBHQ	Butil hidroquinona terciária

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécie <i>Lippia grandis</i> coleta na Serra de Carajás (PA)	20
Figura 2. Alguns constituintes químicos do óleo essencial de <i>Lippia grandis</i> Schau	21
Figura 3. Estados de O ₂ segundo a Teoria de Orbital Molecular	23
Figura 4. Mecanismo de início e propagação da lipoperoxidação	25
Figura 5. Desequilíbrio na produção de espécies reativas e na defesa antioxidante do organismo	29
Figura 6. Mecanismo de ação de um antioxidante fenólico	34
Figura 7. Estrutura química dos antioxidantes sintéticos BHA, BHT, PG e TBHQ	35
Figura 8. Estrutura química do β-caroteno e α-tocoferol.	37
Figura 9. Estruturas de alguns compostos fenólicos encontrados em espécies vegetais	38
Figura 10. Estrutura química do radical DPPH e sua reação com A-H (seqüestrador)	40
Figura 11. Reação de captura do radical ABTS pelo Trolox	44
Figura 12. Fluxograma da partição do extrato metanólico para obtenção das fases diclorometânica, acetato de etila e hidroalcoólica	48
Figura 13. Esquema de avaliação em nove níveis de aceitação do teste em escala hedônica	54
Figura 14. Cromatograma em CG do óleo essencial das folhas e ramos finos de <i>Lippia grandis</i>	58
Figura 15. Comparação dos valores TEAC obtidos para as amostras de <i>Lippia grandis</i> e padrões	62
Figura 16. Comparação das amostras de <i>Lippia grandis</i> com padrões para o sistema β-caroteno/ácido linoléico	64
Figura 17. Gráfico Probitos vs. concentração de óleo essencial de <i>Lippia grandis</i>	66
Figura 18. Gráfico Probitos vs. concentração de extrato metanólico de <i>Lippia grandis</i>	67
Figura 19. Histograma de aceitação hedônica através da análise sensorial das amostras de orégano comercial e <i>Lippia grandis</i>	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico	37
Tabela 2. Composição química do óleo essencial das folhas e ramos finos de <i>Lippia grandis</i> .	57
Tabela 3. Teor de polifenóis nos extratos, expressos em miligrama de ácido gálico equivalente por grama de fração.	59
Tabela 4. Porcentagem de inibição em função das faixas de concentrações dos extratos metanólicos, suas frações e o óleo essencial de <i>Lippia grandis</i> (OLG).	60
Tabela 5. Valores de CE ₅₀ para os extratos metanólicos, suas frações e o óleo essencial de <i>Lippia grandis</i> (OLG).	60
Tabela 6. Porcentagem de inibição do β -caroteno pelos extratos metanólicos, suas frações e o óleo essencial de <i>Lippia grandis</i> (OLG) a 5 mg/mL.	63
Tabela 7. Análise estatística da correlação entre a atividade antioxidante e os teores dos polifenóis totais.	65
Tabela 8. Cálculo da CL ₅₀ para o extrato metanólico e óleo essencial de <i>Lippia grandis</i> .	67

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO DA LITERATURA	17
3.1. <i>O GÊNERO LIPPIA</i>	17
3.2 <i>LIPPIA GRANDIS</i>	19
3.3 ÓLEO ESSENCIAL	21
3.4 <i>ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES</i>	22
3.4.1 A reatividade do oxigênio molecular	22
3.4.2 Oxidação lipídica	24
3.4.3 O Paradoxo do Oxigênio	26
3.4.4 Espécies Reativas com Oxigênio (EROs)	27
3.4.5 Estresse Oxidativo	29
3.4.6 Antioxidantes	30
3.4.7 Mecanismo da ação dos antioxidantes	31
3.4.8 Antioxidantes sintéticos	34
3.4.9 Antioxidantes naturais	36
3.4.10 Compostos fenólicos	37
3.5. <i>AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE</i>	40
3.5.1 O método de seqüestro do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila)	40
3.5.2 Sistema β -caroteno-ácido linoléico	42
3.5.3 TEAC	43
4 MATERIAL E MÉTODOS	45
4.1. ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL E DOS EXTRATOS	45
4.1.1 Coleta e identificação do material botânico	45
4.1.2 Processamento do material botânico	45
4.1.3 Obtenção do óleo essencial	45
4.1.4 Metodologia para o cálculo do teor de água do material botânico	46
4.1.5 Cálculo do rendimento	46
4.1.6 Análise química do óleo essencial	46
4.1.7 Obtenção do extrato metanólico	47
4.1.8 Partição do extrato metanólico de <i>Lippia grandis</i>	47
4.2 METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDATIVA PELO MÉTODO DPPH	49
4.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDATIVA PELO MÉTODO TEAC (CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TROLOX EQUIVALENTE)	50
4.4 SISTEMAS β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLÉICO	51
4.5 POLIFENÓIS TOTAIS	51
4.6 BIOENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DO GRAU DE TOXIDADE	52
4.6.1 Cultura das larvas de <i>Artemia salina</i> Leach	52
4.6.2 Preparo das amostras e determinação do valor da CL ₅₀	52
4.6.3 Toxidade aguda do extrato aquoso de <i>Lippia grandis</i> .	53
4.6.3.1. Determinação da DL ₅₀	53
4.7. ANÁLISE SENSORIAL	54
4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	56

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE LIPPIA GRANDIS	56
5.1.1 Análise físico-química	56
5.1.2 Composição Química do óleo essencial de <i>Lippia grandis</i> Schau	56
5.2 CAPACIDADE ANTIOXIDATIVA	59
5.2.1 Polifenóis Totais (PT)	59
5.2.2 Avaliação antioxidante pelo método de seqüestro do radical livre DPPH.	60
5.2.3 Avaliação antioxidante pelo método TEAC.	62
5.2.4 Sistema β -caroteno/ácido linoléico.	63
5.3. CORRELAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ANTIOXIDANTES E POLIFENÓIS TOTAIS.	65
5.4. BIOENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DO GRAU DE TOXIDADE	66
5.4.1 Cultura das larvas de <i>Artemia salina</i> Leach	66
5.4.2 Toxidade Aguda	68
5.5 ANÁLISE SENSORIAL	69
6 CONCLUSÃO	71
REFERENCIAS	73

INTRODUÇÃO

Muitas ervas têm sido usadas em diversas aplicações, incluindo remédios, bebidas, repelentes e cosméticos (DJERIDANE *et al.*, 2006). Muitas espécies têm sido reconhecidas por apresentar propriedades medicinais, como por exemplo, estimulações digestivas, anti-inflamatórias e potencial anticarcinogênico (AABY; HVATTUM; SKREDE, 2004, LUO *et al.*, 2004).

Extratos brutos de plantas e especiarias ricas em fenóis são alvos de interesse da indústria alimentícia por reduzir a degradação oxidativa de lipídios, melhorando a qualidade e o valor nutricional dos alimentos (CZAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2005).

O Brasil, e especialmente a região Amazônica possui uma grande variedade de alimentos e plantas medicinais com atividade antioxidante, cuja caracterização poderia apresentar potencial para o desenvolvimento sustentável da região. No entanto, existem muitas espécies de plantas que ainda não foram avaliadas quanto a sua capacidade antioxidante, sendo apenas conhecidas pela medicina popular (SOUZA *et al.*, 2008).

A espécie *Lippia grandis*, da família Verbenaceae, é conhecida vulgarmente como malva, salva ou salva-do-marajó. Ocorre em savanas e campos naturais da Amazônia. É uma planta pouco estudada e não existem dados referentes à aplicação desta planta em condimentos na indústria alimentícia.

Inúmeras espécies ainda demandam estudos, especialmente, em relação à composição fenólica e atividade antioxidante. A atividade antioxidante é geralmente estudada em comparação à concentração de fenólicos totais, usando métodos tradicionais (CZAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2005, IVANOVA *et al.*, 2005).

Embora extensos estudos de capacidade antioxidante de compostos bioativos já tenham sido realizados, os dados de identificação ainda são insuficientes e incompletos, em

particular, dados quantitativos de polifenóis (CZAPECKA; MARECZEK; LEJA, 2005; IVANOVA *et al.*, 2005).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a composição química do óleo essencial, atividade antioxidante, teor de compostos fenólicos e toxicidade do óleo essencial e do extrato metanólico, além da aplicação pioneira desta planta em alimentos com o auxílio da análise sensorial.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter o óleo essencial e o extrato metanólico de *Lippia grandis*;
- Identificar os constituintes voláteis do óleo essencial por cromatografia de fase gasosa (CG) e cromatografia de fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM);
- Determinar a capacidade antioxidativa do óleo essencial e do extrato metanólico usando a técnica do radical DPPH;
- Determinar o grau de toxicidade aguda do extrato metanólico da planta;
- Analisar a planta seca do ponto de vista sensorial (escala hedônica) com vistas à sua utilização como condimento e aromatizante.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O GÊNERO *LIPPIA*

O gênero *Lippia*, Verbenaceae, compreende cerca de 200 espécies de plantas com ocorrência nas Américas do Sul e Central e África Tropical (MOLDENKE, 1980; VERDCOURT, 1992; TERBLANCHÉ & KOENELIUS, 1996). Algumas características botânicas da família Verbenaceae consistem em arbustos, ervas e árvores, com ou sem espinhos, com folhas opostas ou verticiladas, raramente alternadas, simples, raramente compostas. Frutos indeiscentes (drupas, raro aquênios), ou deiscentes (cápsula de 2-4 alvas) (BERG, 1993).

Muitas espécies de *Lippia* são tradicionalmente usadas no tratamento gastrointestinais e respiratórios (MORTON, 1981) e apresentam atividades malaricida (GASQUET *et al.*, 1993), antiviral (ABAD *et al.*, 1995) e citostática (LOPEZ; ROJAS; JIMENEZ, 1979). As folhas da maioria das espécies de *Lippia* são utilizadas como condimento na preparação de alimentos (MORTON, 1981). Ainda com respeito à culinária, é importante ressaltar o isolamento do sesquiterpeno (+)-hernandulcina, o composto majoritário de *Lippia dulcis* Trevir, 1000 vezes mais doce que a sacarose, esta muito utilizada em alimentos (KANEDA *et al.*, 1992).

O gênero *Lippia* é bem conhecido pelo seu caráter aromático. Mais de 50 tipos de óleos essenciais de *Lippia* já foram relatados. Os principais compostos voláteis identificados previamente foram α -pineno, *p*-cimeno, limoneno, 1,8-cineol, linalol, cânfora, mircenona, carvona, α -tujona, tagetenona, piperitenona, perilaldeído, neral, geranial, timol, carvacrol, acetato de timila, β -cariofileno, β -cubebeno e β - e γ -elemeno (MENUT *et al.*, 1995; ZOGHBI *et al.*, 1998; MATOS *et al.*, 1999; VERMIN *et al.*, 2001).

No caso da espécie *Lippia integrifolia* (Gris.) Hieron encontrou-se cetonas baseadas em um único esqueleto sesquiterpênico, como lippifoli-1(6)-em-5-ona (africanona) e integrifolian-1,5-diona (integriflona) (VELASCO-NEGUERUELA *et al.*, 1993, CATALÁN *et al.*, 1994).

Na espécie *Lippia schomburgkiana*, coletada no estado do Maranhão, encontrou-se elevado teor de monoterpenos oxigenados, sendo o 1,8-cineol (84,0%) o composto majoritário (SILVA *et al.*, 2007). Outros exemplares desta planta coletados no estado do Piauí apresentaram apenas 6,2% desse componente no óleo (SANTOS *et al.*, 2004). De fato, algumas espécies como a *Lippia glandulosa* apresentam variabilidade na composição química do óleo essencial devido a fatores ambientais e características morfológicas das plantas, como hibridização e polimorfismos (MAIA *et al.*, 2005). Quando vegetais botanicamente idênticos se diferem quimicamente, estes podem ser separados em tipos químicos (quimiotipos) e recebem designações de acordo com os componentes majoritário do óleo (SIMÕES *et al.*, 2004).

No caso da *Lippia alba* (Mill) N.E.Brown. diversos estudos, no Brasil, abordam as diferenças na constituição química do seu óleo essencial. Por exemplo, no Pará, foram encontrados três tipos químicos: citral, carvona e 1,8-cineol (ZOGHBI *et al.*, 1998); no Ceará, outros três tipos químicos foram designados como micerno-citral, limoneno-citral e limoneno-carvona (MATOS *et al.*, 1996); na Bahia foi encontrado citral (SILVA *et al.*, 2003). Outros tipos químicos de *Lippia alba* foram relatados em Cuba e Argentina (PINO, ORTEGA e ROSADO, 1996; VELASCO-NEREGUELA *et al.*, 1993).

Na região Amazônica, existem estudos que abordam essas diferenças químicas nos óleos essenciais das espécies de *Lippia*. Dentre eles, as três variedades de *Lippia lupulina* encontradas no estado do Mato Grosso: uma amostra coletada na Chapada dos Guimarães cujo óleo essencial é rico em 4-terpinenol (41,3%), outro espécime coletado em Poxoréo

possui alto teor de 1,8-cineol (15,5%) e β -cariofileno (12,3%) e a última amostra coletada em Santo Antonio do Levenger cujos componentes principais do óleo são os hidrocarbonetos sesquiterpênicos germacreno D (14,8%), β -cariofileno (12,7%) e biciclogermacreno (15,4%) (ZOGHBI *et al.*, 2001).

Um outro exemplo interessante é a ocorrência de dois tipos químicos de *Lippia multiflora* Mold na África: o primeiro tipo químico é rico em cetonas acíclicas como ipsdienona e ocimenona; e o segundo tipo possui alto teor de monoterpenos aromáticos como timol, carvacrol e *p*-cimeno (AGANANIET *et al.*, 2005).

Dentre outros metabólicos secundários encontrados em espécies de *Lippia*, há uma variedade de derivados de ácido cafeico, como o verbascosídeo ou acteosídeo encontrados na *L. multiflora*, *L. dulcis* e *L. tripylla* (PASCUAL *et al.*, 2001).

Alguns estudos descrevem ainda flavonoides, frequentemente flavonas, como componentes principais dos extratos. Outros componentes relatados na literatura são indóis, saponinas, taninos, alcalóides, e naftoquinoides, como lapachenol e isocatalponol oriundos do extrato metanólico das partes aéreas de *L. sidoides* (PASCUAL *et al.*, 2001).

3.2 LIPPIA GRANDIS

A espécie *Lippia grandis* Schau (Figura 1, p.18) é um arbusto que pode alcançar cerca de 2 m, folhas pecíoladas, sem estipulas, flores pequenas, reunidas em inflorescências vistosas, pentâmeras diclamídeas, hermafroditas, corola bilabiada com lábio anterior trilobado e posterior reduzido, cálice curto, membranoso, fruto com dois mericarpos plano-convexos (DI STASI *et al.*, 1989).

Conhecida como salva, malva, malva-do-marajó, ocorre em savanas e campos naturais da Amazônia. É uma planta pouco estudada e não existem dados referentes à

aplicação desta planta em condimentos na indústria alimentícia. No entanto, a folha desta planta é geralmente utilizada como chá para tratar doenças do fígado e problemas menstruais (VERDCOURT, 1992).



Figura 1. Espécie *Lippia grandis* coletada na Serra de Carajás (PA).
Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

Maia e colaboradores (2003) identificaram que nos óleos essenciais de *Lippia grandis* existem dois perfis químicos distintos, designados timol e 1,8-cineol. De maneira geral, os principais componentes encontrados foram timol, 1,8-cineol e carvacrol (Figura 2) além de (*E*)- nerolidol, α -pineno, *p*-cimeno, éter metílico de timol e β -cariofileno dependendo da parte da planta estudada, da época e local de coleta (Figura 2, p. 19).

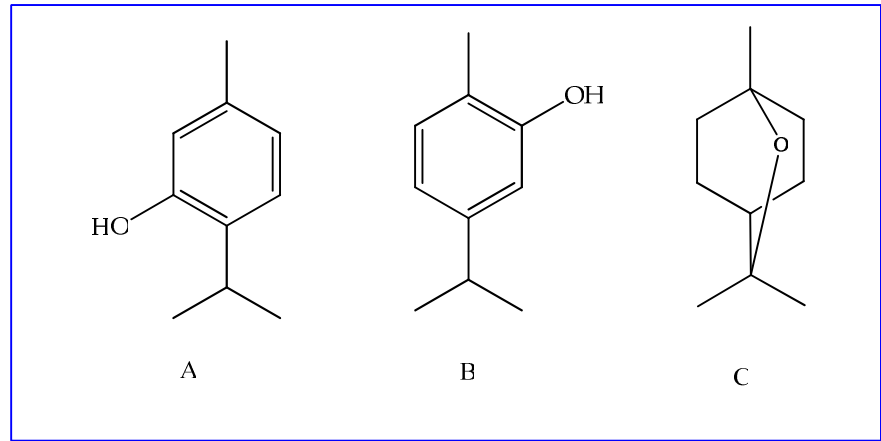


Figura 2. Alguns constituintes químicos do óleo essencial de *Lippia grandis* Schau: timol; carvacrol e 1,8-cineol.

Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

3.3 ÓLEO ESSENCIAL

Os óleos essenciais são compostos complexos, voláteis e naturais caracterizados por forte odor e produzidos por plantas aromáticas como metabólitos secundários (BURT, 2004; BAKKALI *et al.*, 2008). São misturas contendo dezenas de substâncias com diferentes concentrações e, em geral, caracterizadas pela presença de alguns constituintes majoritários, com concentrações entre 20 e 70% quando comparados a outros em baixíssimas concentrações (traços) (BURT, 2004; BAKKALI *et al.*, 2008). Por exemplo, carvacrol (30%) e timol (27%) são os componentes majoritários do óleo essencial de *Origanum compactum*, enquanto que o mentol (59%) e mentona (19%) são os constituintes principais do óleo essencial de *Mentha piperita* (BAKKALI *et al.*, 2008).

Os óleos essenciais raramente apresentam cor, são lipossolúveis, solúveis em solventes orgânicos e podem ser metabolizados em todos os órgãos das plantas, como folhas, flores, sementes, frutos, armazenados em células secretoras, cavidades e células da epiderme (BAKKALI *et al.*, 2008).

Na natureza, os óleos essenciais apresentam um importante papel na proteção das plantas contra certas bactérias, fungos, vírus, insetos, além de herbívoros, ao reduzir o apetite por essas plantas (BURT, 2004; BAKKALI *et al.*, 2008).

Há vários métodos para extração de óleos essenciais, entre estes se inclui a destilação sob baixa e elevadas pressão, empregando vapor d'água (BURT, 2004).

As classes de compostos principais encontrados nos óleos essenciais são terpenóides e lignóides, além de constituintes aromáticos e alifáticos (BAKKALI *et al.*, 2008). A ação dos terpenóides como antioxidantes nas plantas, ainda não está totalmente esclarecida, mas alguns deles ou seus precursores agem como um sistema de eliminação de moléculas agressivas externas na fase gasosa, tal como a emissão de isopreno que evita os danos do ozônio (LORETO *et al.*, 2001). Os terpenóides representam à base das numerosas drogas vegetais usadas no tratamento da dor, do frio, bronquite e das doenças gastrointestinais (KOHLENER *et al.*, 2000).

3.4 ESTRESSE OXIDATIVO E ANTIOXIDANTES

3.4.1 A reatividade do oxigênio molecular

Segundo a Teoria do Orbital Molecular, a molécula do oxigênio diatômico ($O_2 =$ oxigênio molecular ou triplete), em seu estado fundamental possui dois elétrons desemparelhados no orbital antiligante π^* (Figura 3a, p.21).

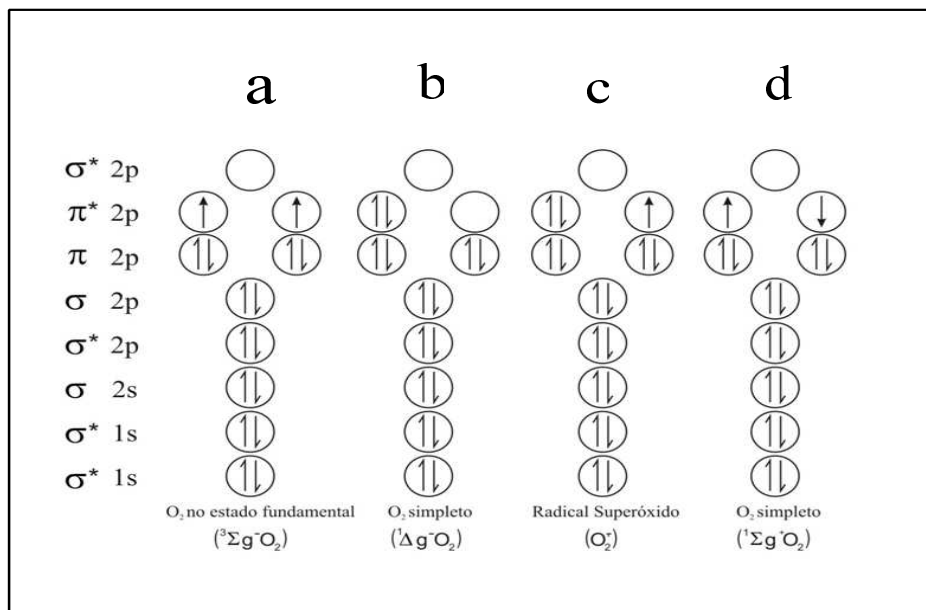


Figura 3. Estados de O_2 segundo a Teoria de Orbital Molecular. Adaptado de Halliwell & Gutteridge (1990).

Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

Nota-se que os dois elétrons apresentam *spins paralelos* e este fato restringe a reatividade da molécula, porque quando a mesma tenta oxidar outro átomo ou molécula, os elétrons que serão aceitos pelo oxigênio devem também ter *spins* paralelos para permanecerem nos orbitais vazios (HALLIWELL, GUTERIDGE, 1990).

No entanto, esta condição é difícil de ser encontrada porque a maioria das moléculas são não-radicaís ligados covalentemente e os dois elétrons que formam uma ligação covalente têm spins opostos, ocupando o mesmo orbital molecular. Assim, a reatividade do oxigênio com biomoléculas é restringida pelo spin (HALLIWELL, GUTERIDGE, 1990).

Entretanto, é possível eliminar a restrição de spin da molécula de oxigênio, movendo um dos elétrons desemparelhados, o qual sofre uma inversão de spin e assim, os dois elétrons passam a se emparelhar (Figura 3b, p.21). Isto requer energia e forma oxigênio simpleto, o qual não é designado de radical (por não possuir elétron desemparelhado), mas é uma forma excitada do oxigênio molecular. Há duas formas de oxigênio simpleto: uma com dois elétrons em orbitais diferentes (Figura 3d, p.21) e outra, quando os elétrons ocupam o mesmo orbital (Figura 3b, p.21). A primeira forma é considerada muito instável e antes de

reagir com outras moléculas ela se converte no estado $^1\Delta_g$ (Figura 3b), o que é mais estável (HALLIWELL, GUTERIDGE, 1990).

A excitação do O_2 ao estado simpleto pode ocorrer quando pigmentos absorvem fótons, entram em estado de excitação eletrônica e transferem energia para o O_2 , resultando nas formas excitadas. Como exemplo de sistemas pigmentados exposto à luz, cita-se os componentes oculares no processo de visão e os cloroplastos (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 1990).

3.4.2 Oxidação lipídica

A oxidação de lipídios é um fenômeno complexo induzido pelo oxigênio na presença de iniciadores, tais como: calor, luz, pigmentos fotossensíveis e íons metálicos. Este processo pode ocorrer por três caminhos de reação (LAGUERRE, LECONT, VILLENEUVE, 2007):

- a) Auto-oxidação não-enzimática mediada por radicais livres;
- b) Foto-oxidação não-enzimática e não-radicalar;
- c) Oxidação enzimática

Os radicais livres são os agentes causadores e iniciadores da peroxidação dos lipídios (ácidos graxos poliinsaturados), particularmente aqueles que compõem as membranas celulares. A peroxidação lipídica é um processo auto-catalítico que transcorre em três etapas (COLOMER, 2003, LAGUERRE, LECONT, VILLENEUVE, 2007, SCHREIBELT *et al.*, 2007, DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005). A etapa de iniciação se desenvolve quando os radicais livres captam um átomo de hidrogênio (H^+) de um carbono metilênico de um ácido graxo polinsaturado, formando duplas ligações coplanares alternadas, denominados

de dienos conjugados. Após a perda desse átomo de hidrogênio, o átomo de carbono passa a possuir um elétron desemparelhado gerando um radical (R \cdot) que se estabiliza formando outro dieno conjugado (COLOMER, 2003, LAGUERRE *et al.*, 2007).

Na etapa de propagação, o dieno conjugado reage com o oxigênio dando origem ao radical peróxido (LOO \cdot), no qual em seguida capta outro H $^+$ de outro ácido graxo polinsaturado, formando um lipoperóxido (LOOH) e a outro radical carbonila (Figura 4, p.23). Na fase de terminação, os radicais formados reagem entre si, formando um produto estável e inativo (L-L) (COLOMER, 2003, LAGUERRE, LECONT, VILLENEUVE, 2007).

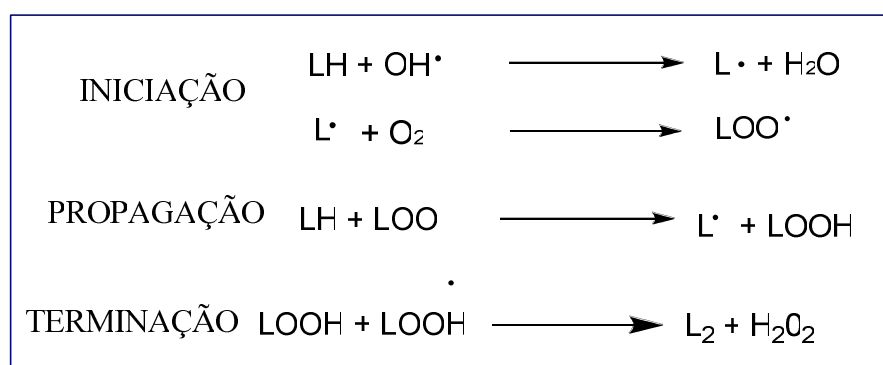


Figura 4. Mecanismo de início, propagação e terminação da lipoperoxidação (LH: ácido graxo insaturado; L \cdot : radical lipídico; LOO \cdot : radical peroxila e LOOH: hidroperóxido lipídico).

Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

Existe um crescente interesse em encontrar alternativas para o problema de oxidação dos lipídios em alimentos devido à deterioração provocada nos mesmos. A oxidação é influenciada pela temperatura, luz, ar, propriedades químicas e físicas dos substratos e a presença de catalisadores ou inibidores (MAISUTHISAKUL; SUTTAJIT; PONGSAWATMANIT, 2007).

3.4.3 O Paradoxo do Oxigênio

A utilização do oxigênio nos processos metabólicos possibilitou a evolução e a diferenciação dos seres simples unicelulares até às espécies atuais mais complexas, nas quais se insere a espécie humana. Contudo, se, por um lado, a utilização do oxigênio, através da utilização de substratos energéticos é favorável à existência de vida complexa na Terra, por outro, tem-se revelado nefasta para os seres que o utilizam, danificando as estruturas celulares e subcelulares dos organismos aeróbios (APPELL, SOARES & DUARTE, 1992; ASCENSÃO *et al.*, 2005; MOTA, FIGUEIREDO & DUARTE, 2004; VOLLAARD, SHEARMAN & COOPER, 2005).

De fato, estima-se que aproximadamente 2 a 5% da totalidade do oxigênio consumido pelas mitocôndrias nos vários tecidos possam originar compostos extremamente reativos, potenciais agentes oxidantes ou redutores (espécies reativas de oxigênio, ERO), caracterizados por possuírem elétrons desemparelhados nas suas orbitais exteriores (ASCENSÃO *et al.*, 2005; DI MEO & VENDITTI, 2001; MOTA, FIGUEIREDO & DUARTE, 2004).

Pela sua instabilidade, estas moléculas tendem a reagir com as estruturas orgânicas adjacentes, alterando-lhes a sua estrutura e, conseqüentemente, a sua funcionalidade (ASCENSÃO *et al.*, 2005; DI MEO & VENDITTI, 2001; TONKONOJI & SAHLIN, 2002). O poder lesivo destas moléculas é de tal forma que algumas das nossas células as usam para combater os agentes biológicos invasores (DUARTE *et al.*, 1994; LEEUWENBURGH & HEINECKE, 2001; VOLLAARD, SHEARMAN & COOPER, 2005).

Para explicar esse paradoxo do oxigênio, é necessário saber que são os produtos das reações metabólicas que apresentam toxicidade e não a molécula de oxigênio em si. Este problema pode se solucionado pelo reforço dos níveis de antioxidantes para auxiliar no

sistema imunológico na captura natural desses radicais livres (LEEUVENBURGH & HEINECKE, 2001).

3.4.4 Espécies Reativas com Oxigênio (EROs)

As ERO's são estruturas radicalares e não radicalares contendo um ou mais elétrons não emparelhados, tornando-as altamente instáveis, com vida curta e quimicamente muito reativas (CHEN; YEN, 2007, LAGUERRE *et al.*, 2007, DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005, SCHREIBELT *et al.*, 2007). Algumas dessas espécies são:

- ($O_2\cdot$) oxigênio simpleto
- ($OH\cdot$) radical hidroxila
- ($NO\cdot$) radical nitroso
- ($ONOO^-$) peroxinitrito
- (H_2O_2) peróxido de hidrogênio

A definição dessas espécies reativas também inclui os metais de transição quando estes possuem um ou mais elétrons desemparelhados. Em concentração moderada os radicais livres desempenham importantes papéis fisiológicos. No entanto, em concentrações elevadas podem prejudicar a maioria dos constituintes celulares tornando-se altamente perigosos para os organismos vivos (COLOMER, 2003, SCHREIBELT *et al.*, 2007, LAGUERRE, LECONT, VILLENEUVE, 2007).

No organismo humano o metabolismo produz constantemente ERO's que podem reagir acidentalmente com proteínas, DNA, RNA, promovendo assim vários tipos de doenças degenerativas, como o câncer, aterosclerose e outras patologias (HALLIWEEL, 1996, DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005).

Entre os componentes celulares suscetíveis têm-se, ainda, os lipídios, carboidratos e macromoléculas do tecido conjuntivo (COLOMER, 2003, DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005) (Figura 5, p.27). O fluxograma mostrado na Figura 5 revela que os antioxidantes apresentam duas vias, a endógena e a exógena, sendo esta última representada pela alimentação. Assim, as substâncias antioxidantes encontradas numa alimentação saudável (flavonóides, carotenóides, vitamina C) em conjunto às enzimas antioxidantes presentes no organismo humano são capazes de retardar a peroxidação lipídica e evitar doenças degenerativas como o câncer.

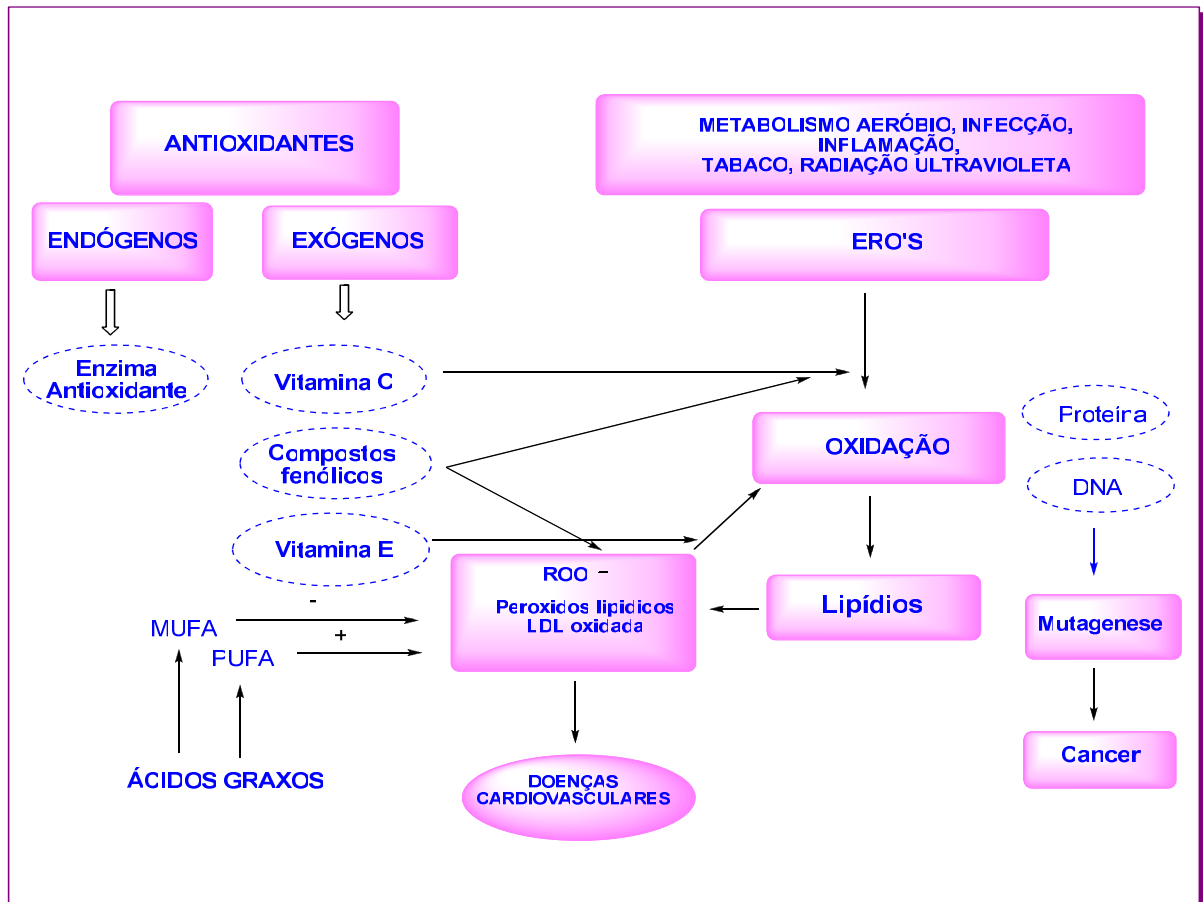


Figura 5. Desequilíbrio na produção de espécies reativas e na defesa antioxidante do organismo (COLOMER, 2003).

Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

3.4.5 Estresse Oxidativo

Atualmente existe um grande interesse no estudo dos antioxidantes devido, principalmente, às descobertas sobre o efeito dos radicais livres no organismo. A oxidação é parte fundamental da vida aeróbica e do nosso metabolismo e, assim, os radicais livres são produzidos naturalmente ou por alguma disfunção biológica. Esses radicais livres cujo elétron desemparelhado encontra-se centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominados ERO ou ERN (Espécies Reativo de Nitrogênio) (PIETTA, 2000).

No organismo, encontram-se envolvidos na produção de energia, fagocitose, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes (HALLIWELL, 1992).

As condições fisiológicas das células exigem, assim, equilíbrio entre as condições pró-oxidante e antioxidante. O rompimento do estado estacionário com excesso de condições pró-oxidantes favorece injúrias celulares, sendo a condição denominada estresse oxidativo, tendo como consequência danos às biomoléculas como DNA, os lipídios e proteínas. Dessa forma, pode-se relacionar a este processo várias patologias como artrite, choque hemorrágico, doenças do coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS (HALLIWELL, 1992).

Há evidências de que o estresse oxidativo esteja associado não apenas aos processos patológicos, mas também aos eventos fisiológicos relacionados à senescência. Uma das teorias do envelhecimento aponta que o estresse oxidativo decorrente do desacoplamento das reações de transporte de elétrons e da elevação dos níveis de metal causa aumento de ERO's, oxidação de proteínas, elevação de proteínas inativas e conseqüente acúmulo destas, por deficiência dos sistemas de degradação protéica, levando a alteração da homeostase celular (LINTON, DAVIES, DIAN, 2001).

3.4.6 Antioxidantes

Como conceito geral os antioxidantes consistem em substâncias que, ao estarem presentes em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável (lipídios, proteínas, DNA, carboidratos), retardam ou previnem significativamente a oxidação do mesmo (HALLIWELL, 1994, KALIORA; DEDOUSSIS; SCHMIDT, 2006, DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005).

Os antioxidantes primários podem inibir ou retardar a oxidação por seqüestro dos radicais livres por doação de átomos de hidrogênio ou elétrons. Os antioxidantes secundários funcionam por diversos mecanismos, incluindo as ligações com íons metálicos, seqüestro de oxigênio, conversão de hidroperóxidos a espécies não-radicalares, absorção de radiação UV e neutralização do oxigênio simpleto (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005).

Quando as defesas naturais são superadas por uma geração excessiva de oxidantes o estresse ocorre. Macromoléculas celulares e extracelulares (proteínas, lipídios e ácidos nucléicos) são atingidas causando injúrias e alteração na função imunológica (HUGHES, 1999, SCHREIBELT *et al.*, 2007).

Então, os antioxidantes se apresentam como uma alternativa para minimizar os danos oxidativos nos seres vivos e prevenir a deterioração oxidativa nos alimentos. O aumento da ingestão de antioxidantes dietéticos pode ajudar a manter um adequado nível antioxidante, definido como o balanço entre antioxidantes e oxidantes em organismos vivos (HALLIWELL *et al.*, 1995; MELO; GUERRA, 2002, KALIORA *et al.*, 2006).

3.4.7 Mecanismo da ação dos antioxidantes

Os antioxidantes são compostos que ajudam a retardar e inibir a oxidação de lipídios e em alimentos tendem a reduzir a velocidade de reações de rancidez, ajudando a manter a qualidade nutricional e aumentando sua vida útil (ZHENG; WANG, 2001, LAKO *et al.*, 2007). Está repetido. Mover para um único ponto que expresse antioxidantes, ou eliminar.

Os estudos sobre os antioxidantes têm ressaltado principalmente o uso de nutrientes isolados no tratamento e prevenção de doenças. Entretanto, nos alimentos é encontrada uma grande variedade de substâncias que podem atuar em sinergismo na proteção das células e tecidos (RANGKADILOK *et al.*, 2007).

Os compostos antioxidantes atuam evitando a formação de radicais livres, durante o processo oxidativo, através de diversos mecanismos de ação, entre eles:

a) Captura de oxigênio simpleto

O oxigênio simpleto pode iniciar reações de degradação oxidativa e radicalar em presença de moléculas saturadas, em particular os lipídios. As moléculas inibidoras do efeito do oxigênio simpleto impedem a iniciação de uma parte importante de reações de degradação e podem, então, ser consideradas como antioxidantes preventivos (FRANKEL; MEYER, 2000, DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005).

Algumas moléculas naturais são caracterizadas por estas propriedades antioxidantes, como por exemplo, β -caroteno, ácido ascórbico e flavonóides (HALLIWELL, 1994; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

b) Inibição da ação de enzimas oxidantes

A atividade de certas enzimas pode gerar espécies iniciadoras de reações radicalares, este é o caso especial da xantina oxidase. As moléculas capazes de inibir estas enzimas podem ser consideradas antioxidantes (FRANKEL; MEYER, 2000). A xantina oxidase é inibida pelos flavonóides, particularmente pelas flavonas (HARBONE; WILLIANS, 2000, DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005).

c) Enzimas antioxidantes

Dentre os numerosos meios de proteção dos seres vivos, perante as espécies químicas reativas, existe uma bateria de enzimas capazes de reconhecer especificamente as biomoléculas degradadas (DNA e proteínas), de eliminá-las e substituí-las (HALLIWELL, 1994). Certas enzimas se encarregam também de neutralizar diretamente os iniciadores de

reações radicalares, ou reduzindo as espécies radicalares, ou ainda, reciclando os antioxidantes oxidados. As principais enzimas que intervêm nesses mecanismos são: superóxido dismutase, catalase, glutathione peroxidase e glutathione (SILVA, 2002, SCHREIBELT *et al.*, 2007).

d) Quelação de íons metálicos

Os íons metálicos, em particular, o cobre e o ferro, são iniciadores muito importantes de reações radicalares e sua imobilização na forma de complexos organometálicos é, por isso, um mecanismo antioxidante muito importante (FRANCIS, 1989). Os flavonóides que possuem um anel B substituído por dois grupos hidroxilas em posição *orto* são muito eficazes (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005).

e) Captura de radicais livres

A família mais importante de antioxidante é aquela que agrupa as moléculas capazes de transferir um átomo de hidrogênio para uma espécie radicalar, seguindo um esquema reacional do tipo:



Esses antioxidantes agem durante as etapas de propagação das reações radicalares. O poder antioxidante é influenciado pela força de ligação A-H. Assim quanto maior o potencial da redução da molécula, isto é, quanto mais fraca a energia da ligação A-H, mais a atividade antioxidante será importante (ROBARDS *et al.*, 1999; RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

Geralmente, os compostos fenólicos são moléculas antioxidantes capazes de deter as reações radicalares de propagação. Podem por conjugação, estabilizar o radical fenoxila formado (Figura 6, p.32) (RICE-EVANS; MILLER; PAGANGA, 1997).

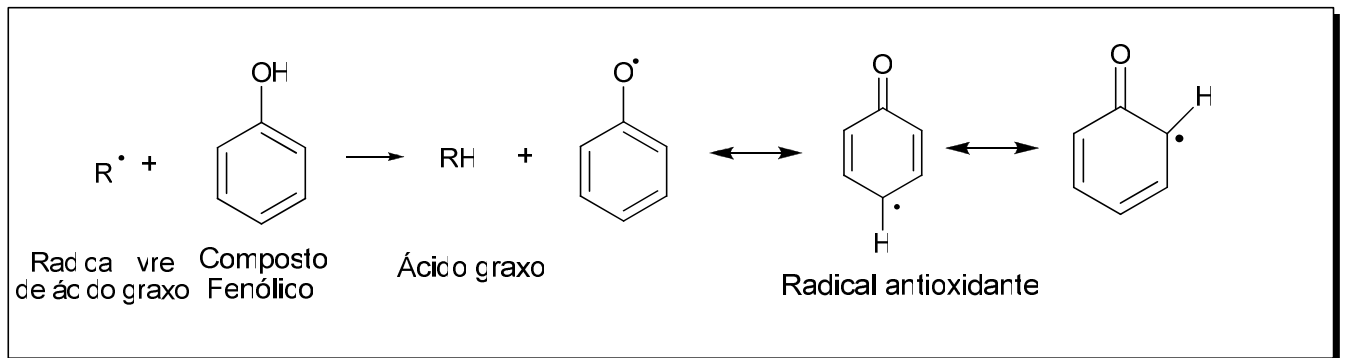


Figura 6. Mecanismo de ação de um antioxidante fenólico.
Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

3.4.8 Antioxidantes sintéticos

A aplicação de antioxidantes sintéticos como inibidores da oxidação lipídica é bem conhecida na indústria de alimentos (DELGADO-ZAMARREÑO *et al.*, 2007, JAYATHILAKAN, SHARMA, RADHAKRISHNA, 2007, SAAD *et al.*, 2007, ZHANG; WENG, 2004). Esses antioxidantes sintéticos são geralmente utilizados para prevenir ou retardar a oxidação lipídica durante o processamento ou estocagem de óleos, gorduras e alimentos gordurosos e têm sido utilizados pela indústria de alimentos há mais de 50 anos (SAAD *et al.*, 2007).

Os principais antioxidantes sintéticos (Figura 7, p.34) são os fenóis com várias substituições no anel que são excelentes doadores de elétrons ou de hidrogênio, e, além disso, seus radicais intermediários são relativamente estáveis devido à conjugação por ressonância e a falta de posições na molécula apropriada para serem atacadas pelo oxigênio molecular (NAWAR, 1996).

Antioxidantes largamente usados como butil hidroxitolueno (BHT) e butil hidroxianisol (BHA), são bastante efetivos. Ainda são utilizados, também, o galato dodecil (DG), butil hidroquinona terciária (TBHQ) e galato de propila (PG) (DELGADO-ZAMARREÑO *et al.*, 2007, JAYATHILAKAN *et al.*, 2007, SAAD *et al.*, 2007, ZHANG; WENG, 2004).

Os antioxidantes sintéticos são altamente ativos e baratos. São incolores, inodoros e insípidos, porém eles geralmente possuem atividade somente em baixas temperaturas, se tornando inativos a elevadas temperaturas. Nessas condições, BHA, BHT e TBHQ são evaporados e o PG é decomposto, particularmente quando uma quantidade considerada de água é expelida do alimento durante o processamento (ZHANG; WU, WENG, 2004).

Geralmente, adiciona-se cerca de 150 µg/g de antioxidantes sintéticos em óleos e gorduras, isoladamente ou em combinação. Assim, a determinação desses antioxidantes se torna necessário de acordo com as atribuições legais de cada país, assim como os procedimentos de controle de qualidade nas indústrias de alimentos (SAAD *et al.*, 2007).

As conclusões em torno da utilização de antioxidantes sintéticos são contraditórias, pois há quem acredite que os mesmos produzem efeitos tóxicos *in vivo* e que baixas doses desses compostos fenólicos possam produzir a carcinogênese (DELGADO-ZAMARREÑO *et al.*, 2007; POKORNY, 1991).

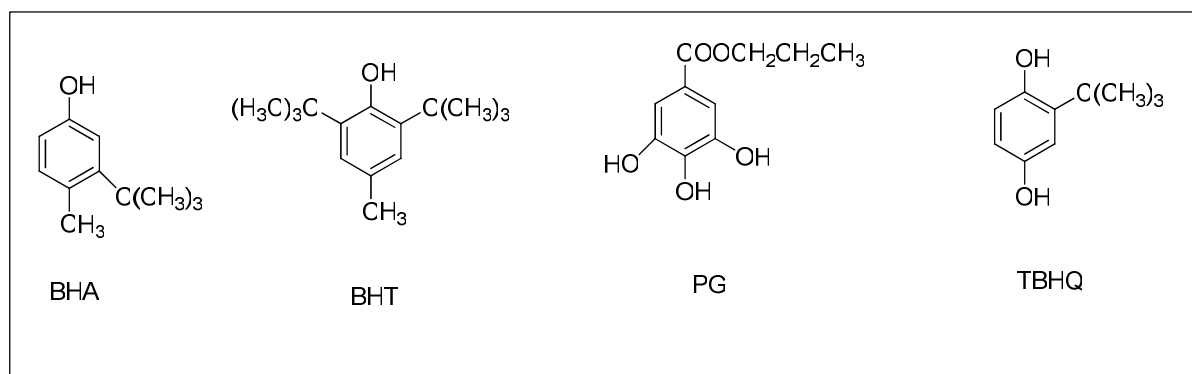


Figura 7. Estrutura química dos antioxidantes sintéticos BHA, BHT, PG e TBHQ.
Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

Os antioxidantes sintéticos continuam a ser discutido por sua segurança como aditivo alimentar, conseqüentemente existe um aumento no interesse no uso de antioxidantes naturais (ZHENG; WU, WANG, 2004; CAILLET *et al.*, 2007; SAAD *et al.*, 2007). Por esta razão, há um grande interesse no estudo dos aditivos naturais com potencial antioxidante.

3.4.9 Antioxidantes naturais

Entre os cientistas de alimentos, há um aumento na tendência da substituição dos antioxidantes sintéticos pelos naturais, que, em geral, são considerados os mais seguros (BOUAZIZ *et al.*, 2008).

A substituição de antioxidantes sintéticos por naturais pode acarretar muitos benefícios à saúde e funcionalidade tais como, solubilidade em água e óleo, um interesse particular de emulsões, em alimentos. Entretanto, algumas ervas e condimentos apresentam aplicações limitadas, tal como a característica odorífera pertinente a certas ervas, o que as tornam prejudicadas nas etapas de desodorização (REGLERO *et al.*, 1999).

As propriedades antioxidantes de muitas ervas e condimentos naturais foram descritas como sendo efetivas na redução do processo de peroxidação de lipídios, em óleos e alimentos gordurosos, e tem sido o alvo de muitos grupos de pesquisa (POKORNY, 1991).

As substâncias antioxidantes naturais necessitam, no entanto, serem testadas para que a segurança seja eficaz. As matrizes de origem vegetal apresentam muitos compostos com atividade antioxidante. Algumas plantas são estudadas como fonte segura de antioxidante natural para a indústria de alimentos, com o isolamento de vários compostos, muitos deles sendo polifenóis (HAGERMAN *et al.*, 1998).

O óleo vegetal e qualquer derivado de oliva, por exemplo, consistem numa fonte rica em antioxidantes naturais. Estes incluem os carotenóides, tocoferóis (Figura 8, p.35) e compostos fenólicos que agem por diferentes mecanismos para conferir um sistema de defesa eficaz contra o ataque de radicais livres (BOUAZIZ *et al.*, 2008).

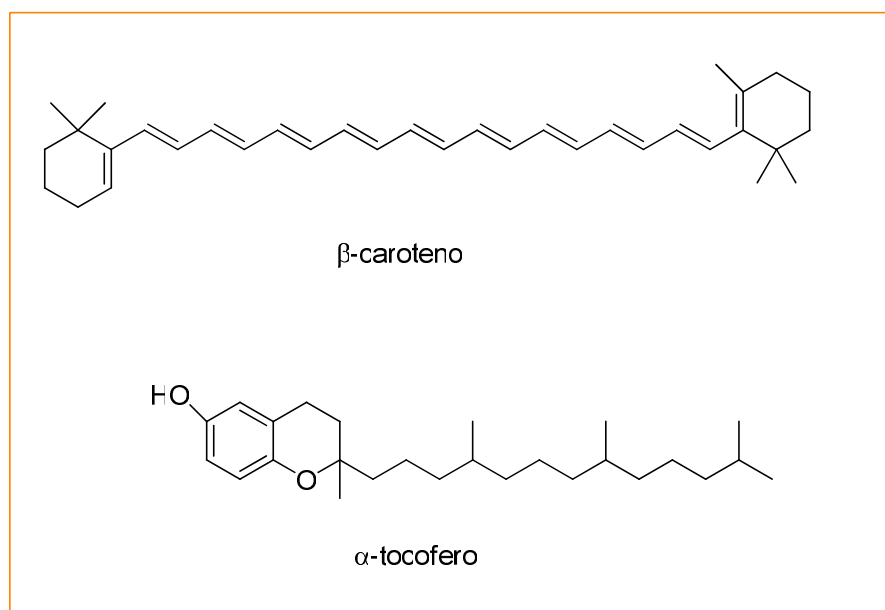


Figura 8. Estrutura química do β -caroteno e α -tocoferol.
Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

3.4.10 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são, somente, encontrados em matrizes de origem vegetal e são conhecidos pela proteção de constituintes facilmente oxidáveis em alimentos (BOUAZIZ *et al.*, 2008; KÄHKÖNEN *et al.*, 1999, KALIORA *et al.*, 2006).

A classificação dos compostos fenólicos de acordo com o número de carbonos foi sugerida por Harboune (1989) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação dos compostos fenólicos de acordo com o esqueleto básico.

Esqueleto básico	Classes de compostos fenólicos
C ₆	Fenóis simples, benzoquinonas
C ₆ -C ₁	Ácidos fenólicos
C ₆ -C ₂	Acetofenonas, ácidos fenilacéticos
C ₆ -C ₃	Fenilpropanóides, fenilpropenos, cumarinas, isocumarinas,

	ácidos cinâmicos, cromonas.
C_6-C_4	Naftoquinonas
$C_6-C_1-C_6$	Xantonas, benzofenonas
$C_6-C_2-C_6$	Estilbeno, antroquinonas
$C_6-C_3-C_6$	Flavonóides, isoflavonóides e chalconas
$(C_6-C_3)_2$	Lignanas
$(C_6-C_3-C_6)_2$	Diflavonoides
$(C_6)_n$	Melaninas vegetais
$(C_6-C_3)_n$	Ligninas
$(C_6-C_1)_n$	Taninos Hidrolisáveis
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Taninos condensados

Fonte: Oldoni, 2007

A estrutura básica dos flavonóides é o núcleo flavan que consiste em 15 átomos de carbonos dispostos em três anéis ($C_6-C_3-C_6$), denominado A, B e C (Figura 9, p.37). Várias classes de flavonóides diferem no nível de oxidação e saturação do anel C, enquanto que os compostos individuais incluem a diferenciação de composto na substituição dos anéis A e B. As diferenças na estrutura e substituição influenciam na estabilidade do radical fenoxila e conseqüentemente nas propriedades antioxidantes dos flavonóides (KÄHKÖNEN *et al.*, 1999).

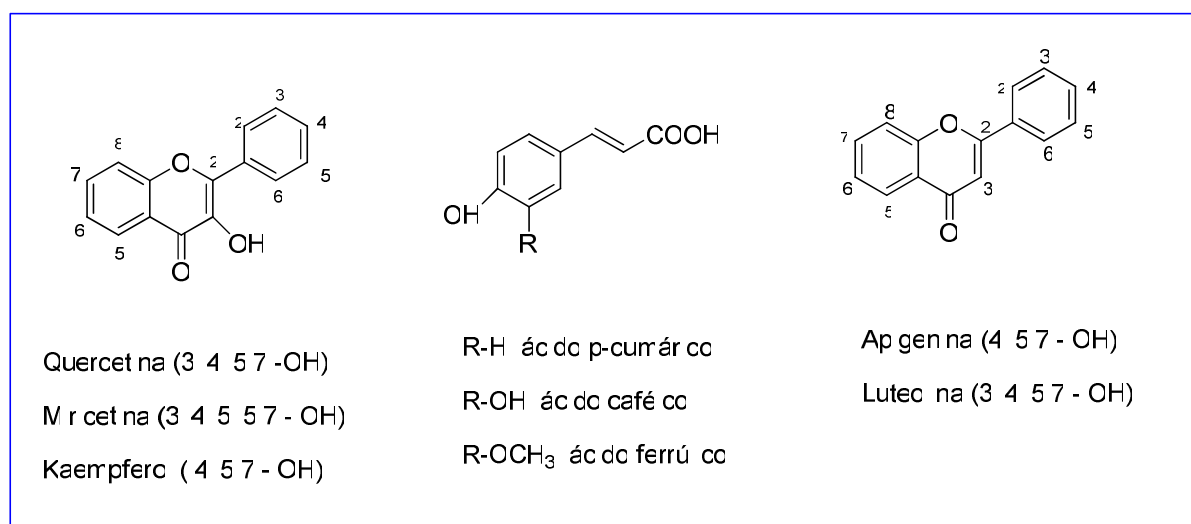


Figura 9. Estruturas de alguns compostos fenólicos encontrados em espécies vegetais.
Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

A atividade antioxidante de compostos fenólicos em plantas é principalmente devido às propriedades redox de sua estrutura química, que podem funcionar como neutralizadores de radicais livres, quelando metais de transição, e extinguindo as formas simpleto e tripleto de oxigênio, por deslocalização ou decomposição de peróxido (CHUN *et al.*, 2005).

Vinhos apresentam uma grande variedade de compostos polifenólicos, sendo as antocianinas os mais abundantes (FOGLIANO *et al.*, 1999). Atividade antioxidante também foi determinada em bebidas como uísque (MCPHAIL *et al.*, 1999) e saquê (KITAGAKI; TSUGAWA, 1999).

Chás verdes e pretos têm sido fortemente estudados em virtude de suas propriedades antioxidantes. Lin e co-autores (1998) identificaram que essas bebidas podem apresentar cerca de 30% do peso seco em compostos fenólicos.

Os extratos de chá verde e sementes de uva mostraram maior atividade antioxidante em DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila) do que o BHA (PAREJO *et al.*, 2002), enquanto que os extratos de erva-doce foram similares ao BHT (BANDONIENE *et al.*, 2000).

Dragland e colaboradores (2003), Wang (2003), Wu e co-autores (2004) observaram que o orégano e outras espécies, pertencentes à família Lamiaceae, apresentaram propriedades antioxidantes.

Alguns extratos de especiarias como gengibre, quando adicionados em óleo de girassol, milho e oliva, apresentaram elevados tempos de inibição de reações radicalares quando comparados aos de BHA e BHT (MURCIA *et al.*, 2004).

3.5. AVALIAÇÃO ANTIOXIDANTE

3.5.1 O método de seqüestro do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila)

O método de seqüestro de radical DPPH é bastante utilizado para avaliar a evolução da atividade antioxidante em alimentos, extratos de plantas, óleos essenciais e substâncias puras (PRAKASH, 2001).

O radical DPPH é um radical livre estável e a sua atividade de seqüestro de radical pode ser determinada pelo decréscimo de absorbância a 517 nm, devido à redução pelo antioxidantes (AH) (Figura 10, p.39) ou por reações com espécies radicalares (ARNAO, 2000). Caso uma amostra seja capaz de seqüestrar o radical livre DPPH provocará uma mudança de coloração de azul/púrpura para amarelo devido à formação de difenilpicrilidrazila.

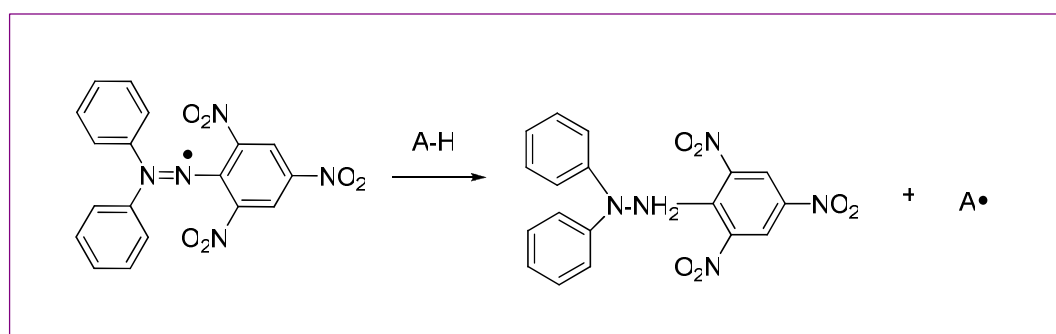


Figura 10. Estrutura química do radical DPPH e sua reação com A-H (seqüestrador).
Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

Geralmente, os antioxidantes podem neutralizar radicais por dois mecanismos principais: por transferência de átomos de hidrogênio e transferência de elétrons (PRIOR, WU, SCHAICH, 2005).

Embora o método DPPH seja geralmente classificado como reação de transferência de elétrons, este radical também pode reagir por transferência de átomos de hidrogênio (GODEVAC *et al.*, 2007).

Neste método, a eficiência do antioxidante é medida à temperatura ambiente, eliminando o risco de degradação térmica das moléculas testadas. Porém o mecanismo reacional depende da conformação estrutural do antioxidante (BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSSET, 1997).

O extrato hidroalcoólico da erva-cidreira (*Melissa officinalis* L.) em bioensaio com DPPH mostrou ser capaz de neutralizar radicais livres em pH fisiológico, ajudando a prevenir a iniciação e a propagação de reações em cadeia mediada por radicais, as quais podem contribuir para o estresse oxidativo (DASTMALCHI *et al.*, 2007).

O valor da CE₅₀ (concentração eficaz), definido como a concentração de antioxidante requerido para o seqüestro de 50% dos radicais DPPH no período reacional, é um parâmetro amplamente utilizado para quantificar atividade antioxidante (ARNAO, 2000).

Os extratos aquosos e etanólicos de algumas plantas, entre elas o alecrim (*Rosmarinus officinallis* L.) (MATA *et al.*, 2007), apresentaram boas atividades de seqüestro de radical. Os melhores resultados foram encontrados nas espécies do gênero *Mentha* com valores de CE₅₀ inferiores ao do BHT.

Deba e co-autores (2008) verificaram que os óleos essenciais das folhas e flores de *Bidens pilosa* foram capazes de reduzir o radical DPPH com CE₅₀ em torno de 50 µg/mL, enquanto que as atividades dos antioxidantes naturais e sintéticos ficaram entre 21 e 36 µg/mL.

Ruberto e Baratta (2000) estudaram 98 componentes químicos puros e mostraram que hidrocarbonetos monoterpênicos apresentaram um efeito protetor significativo, frente ao

método DPPH, com diversas variações devido aos diferentes grupos funcionais existentes em óleos essenciais.

Prior, Wu e Schaich (2005) classificaram o comportamento de seqüestro de espécies reativas de oxigênio de acordo com a cinética da reação:

- Inferior a 5 minutos (rápido);
- Entre 5 e 30 minutos (intermediário);
- Superior a 30 minutos (lenta).

3.5.2 Sistema β -caroteno-ácido linoléico

O método de capacidade antioxidante β -caroteno-ácido linoléico é determinado pela quantificação da inibição de compostos orgânicos voláteis e hidroperóxidos de dienos conjugados a partir da oxidação do ácido linoléico (TEP, SOKMEN, 2007, DAPKEVICIUS *et al.*, 1998).

Neste método, o β -caroteno sofre uma rápida descoloração na ausência de um antioxidante. Isto acontece em virtude de uma oxidação dupla: β -caroteno e ácido linoleico, este último sendo o gerador dos radicais do sistema (SARIKURKCU *et al.*, 2007).

As ERO's do ácido linoléico que são formados pela retirada de um átomo de hidrogênio de um dos grupos metilenos atacam as moléculas poliinsaturadas do β -caroteno. A presença de diferentes antioxidantes pode bloquear a descoloração do β -caroteno pela neutralização dos radicais linoleato formado no sistema. Como resultado o β -caroteno é oxidado e a cadeia é quebrada, fazendo com que o sistema perca sua característica cromófora, e sua coloração laranja é monitorada por espectrofotometria (SARIKURKCU *et al.*, 2007).

Tep e Sokmen (2007) encontraram importantes correlações positivas entre o potencial da atividade antioxidante do sistema β -caroteno-ácido linoléico e a concentração de compostos fenólicos presentes em extratos de subespécies de *Tanacetum*.

3.5.3 TEAC

O método TEAC vem sendo utilizado para verificar a capacidade antioxidante de matrizes biológicas, como o plasma, bem como de substâncias simples, componentes ou extratos de alimentos (BERG *et al.*, 1999). Este método pode envolver a redução desses radicais indicadores pela transferência de elétrons ou átomos de hidrogênio. A determinação espectrofotométrica tem a vantagem de ser rápida e simples de ser realizada, tornando a técnica amplamente acessível (BERG *et al.*, 1999).

O método baseia-se na captura do radical ABTS (2,2' azinobis 3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), que é azul-esverdeado e relativamente estável, convertendo-o em um produto incolor (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). O grau de descoloração reflete a cinética de diminuição da concentração do radical ABTS, podendo ser caracterizado por um máximo de absorvância de 415, 645, 734 e 815 nm. Dentre eles, 415 e 734 nm são adotados para o acompanhamento espectrofotométrico da reação (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005). O radical ABTS é gerado via oxidação do ABTS com o persulfato de potássio (RE *et al.*, 1999). O valor TEAC é determinado por comparação da capacidade de captura do antioxidante Trolox, o equivalente hidrossolúvel da vitamina E em um tempo fixo (Figura 11, p.42) (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

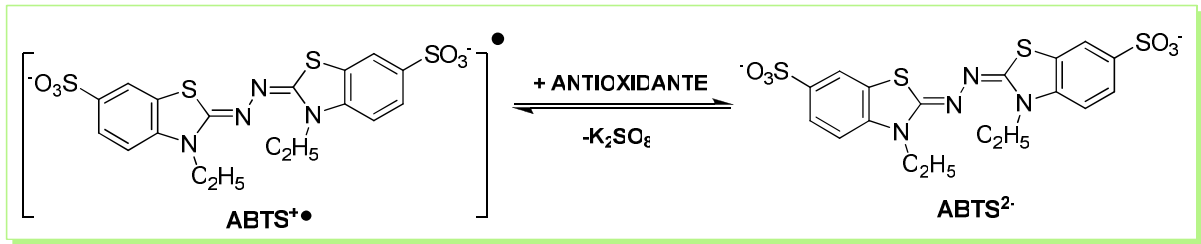


Figura 11. Reação de captura do radical ABTS pelo Trolox.
Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

O ABTS tem a vantagem de ser solúvel em solventes aquosos e orgânicos e não é afetada pela força iônica, então pode ser aplicada em diversos meios para determinar a atividade antioxidante de compostos hidrofílicos e lipofílicos (PRIOR; WU; SCHAICH, 2005).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL E DOS EXTRATOS

4.1.1 Coleta e identificação do material botânico

Partes aéreas de *Lippia grandis* (arbusto lenhoso em touceiras escandente de até dois metros de altura, com flores brancas com fundo amarelo e botões brancos em glomérulas axilares), em uma vegetação de canga hematética, solo latossolo vermelho, proveniente da Serra de Carajás, município de Parauapebas, estado do Pará, foram coletadas em abril de 2007 e identificada como *Lippia grandis* por comparação ao exemplar MG133921.

4.1.2 Processamento do material botânico

Folhas e ramos finos de *L. grandis* foram secas a temperatura ambiente (em torno de 30°C e UR de 85%) num período de sete dias e, em seguida, trituradas em moinhos de facas. O armazenamento de parte do material após a destilação do óleo essencial foi realizado em sacos plásticos sob refrigeração (T= 7°C).

4.1.3 Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação, de uma parte do material botânico seco, triturado, pesado, em processo contínuo por um período de 4 h, usando-se sistema de vidro do tipo Clevenger modificado, acoplado a sistema de refrigeração, com temperatura da água de condensação em torno de 15°C. O óleo obtido foi centrifugado, desidratado com

Na₂SO₄ anidro, armazenado em ampolas de vidro âmbar, na ausência de oxigênio e, conservado em ambiente refrigerado entre 5 e 10°C.

4.1.4 Metodologia para o cálculo do teor de água do material botânico

O teor de água foi determinado através de destilação azeotrópica utilizando tolueno como solvente e coletor de vidro tipo Dean & Stark, de acordo com método WHO (1998). Foi pesado cerca de 5g da amostra e acrescentado 30 mL de tolueno em um balão de 250 mL por 60 minutos. O teor de umidade foi calculado com base no volume de água após a separação das fases (decantação) e expressos em porcentagem volume/massa.

4.1.5 Cálculo do rendimento

O cálculo do rendimento bruto em óleo foi realizado através da relação do volume do óleo obtido, com a massa do material vegetal utilizado na hidrodestilação. Também foi calculado o rendimento em óleo para a base do material livre de água (b.l.u).

4.1.6 Análise química do óleo essencial

A análise da composição química foi obtida através de cromatografia em fase gasosa/espectrometria de massas (CG/EM) em sistema Thermo, modelo DSQII, equipado com coluna capilar de sílica DB-5MS (30m x 0,25 mm; 0,25µm de espessura de filme) nas seguintes condições operacionais: programação de temperatura: 60°C-240°C, com gradiente de 3°C/min; temperatura do injetor: 240°C; gás de arraste: hélio, em velocidade linear de 32 cm/s (medido a 100°C); tipo de injeção splitless (0,1 µL de uma solução na proporção de

2µL de óleo para 1 mL de *n*-hexano); espectrômetro de massas: impacto eletrônico, energia do elétron a 70 eV; temperatura da fonte de íons: 200°C.

Os componentes químicos foram identificados através das comparações dos seus espectros de massa (EM) e índices de retenção (IR) com os de substâncias padrão, existentes nas bibliotecas do sistema e, com dados da literatura (Adams, 2007). Os IR foram obtidos utilizando-se uma curva de calibração de uma série homóloga de *n*- alcanos injetados nas mesmas condições cromatográficas das amostras.

A análise quantitativa do óleo essencial foi feita por cromatografia de gás-ionização de chama (CG/IC), usando-se um GC FOCUS, com coluna capilar de sílica DB5-MS (30m x 0,25 mm; 0,25µm de espessura de filme), nitrogênio como gás de arraste e temperatura programada de 60-240 °C com gradiente de 3°C/min.

4.1.7 Obtenção do extrato metanólico

O material botânico seco (12g) e triturado, também, foi submetido à extração com extrator Soxhlet, em torno de 60°C, utilizando-se metanol (250 mL) como solvente, durante um período de 3 horas, com uma média de 20 refluxos. O extrato foi concentrado em evaporador rotativo HEIDORPH 400 sob vácuo e, após a evaporação total do solvente, mantido em dessecador.

4.1.8 Partição do extrato metanólico de *Lippia grandis*

O extrato metanólico (EMLG) (300 mg) foi solubilizado em 20 mL de uma mistura de metanol/ água 1: 1 e submetido a uma partição líquido-líquido, com diclorometano e acetato de etila. Foram obtidas as fases diclorometânica (FD-EMLG), acetato de etila (FA-

EMLG) e hidroalcolica (FHA-EMLG). O fluxograma (Figura 12, p.46) resume o processo de partição do extrato.

Após a marcha de separação, as frações foram concentradas em evaporador rotativo, sendo que a fração aquosa, em seguida, foi liofilizada.

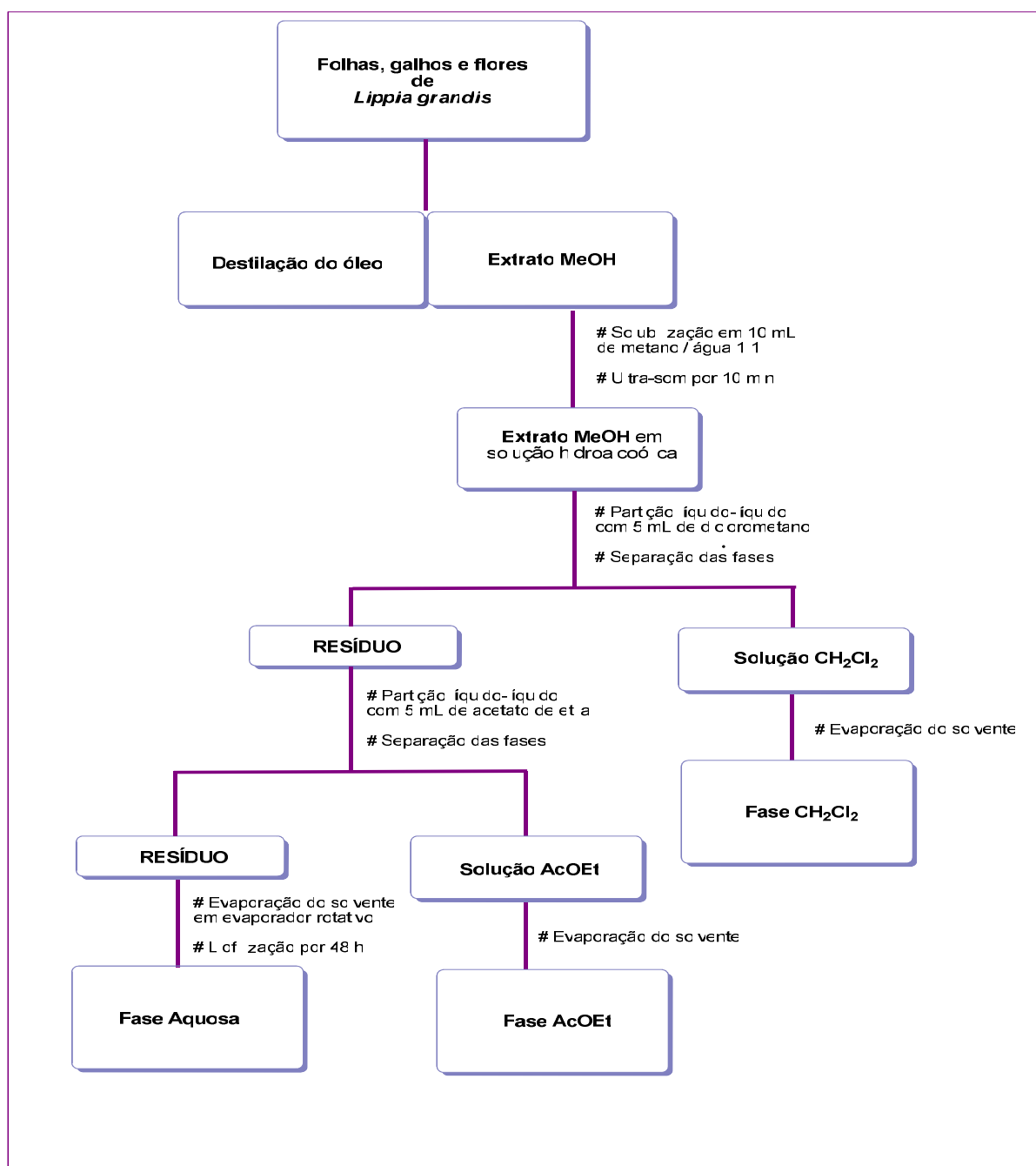


Figura 12. Fluxograma da partição do extrato metanólico para obtenção das fases diclorometânica, acetato de etila e aquosa.

Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

4.2 METODOLOGIA DE AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDATIVA PELO MÉTODO DPPH

Preparou-se uma solução estoque de radical DPPH (0,5 mM) em metanol. A solução foi diluída a uma concentração de aproximadamente 60 μM com uma absorbância inicial de $0,62 \pm 0,02$, a 517 nm, em temperatura ambiente.

A solução-mãe de Trolox (10 mg/mL) foi preparada e, a partir desta, as demais concentrações para a determinação da CE_{50} do Trolox e possível comparação dos efeitos das amostras com esse padrão.

A mistura reacional na cubeta para todas as amostras foi composta pela adição de 1950 μL da solução do radical DPPH em 50 μL das amostras diluídas. Para cada leitura realizada um branco de metanol foi utilizado como controle.

As amostras foram mensuradas de maneira a observar o efeito da concentração sobre o radical DPPH, a leitura da absorbância foi monitorada em intervalos de 5 e 10 minutos até ser atingido a absorbância constante (HU, CHEN; YANG, 2004, SACHETTI *et al.*, 2004, CHOI *et al.*, 2000, YAMAGUCHI *et al.*, 1998).

a) Inibição do radical DPPH

As atividades de seqüestro de radicais de cada amostra foram calculadas de acordo com a porcentagem de inibição (PI) do radical DPPH.

$$PI\%_{DPPH} = \left[\frac{(A_A - A_B)}{A_B} \right] \cdot 100 \quad (1)$$

Onde A_B e A_A são valores de absorbância do branco e da amostra, respectivamente, no término da reação.

b) *Comparação com o padrão Trolox, BHA e Ácido Ascórbico.*

Os padrões Trolox, BHA e Ácido Ascórbico foram utilizados como referencia frente ao método DPPH. O número de miligramas de Trolox equivalente/mL de cada amostra, dado pela equação:

$$mg_{Trolox} = \frac{(A_A - A_B)}{(A_A - A_T)} \cdot \frac{[Trolox]}{1000} \cdot \frac{250,29}{1000} \cdot \frac{1000}{10} \cdot D \quad (2)$$

Onde A_B é a absorbância do branco; A_A é a absorbância da amostra; A_T é a absorbância do Trolox; $[Trolox]$ é a concentração do trolox na mistura reacional da solução utilizadas como padrão; 250,29 é o peso molecular do Trolox e D é o fator de diluição

4.3 AVALIAÇÃO DA CAPACIDADE ANTIOXIDATIVA PELO MÉTODO TEAC (CAPACIDADE ANTIOXIDANTE TROLOX EQUIVALENTE)

O radical ABTS foi gerado pela reação de uma solução aquosa de ABTS com $K_2S_2O_8$ (2,45 mmol/L) ao abrigo de luz por 12-16 h. A solução ABTS de trabalho foi ajustada a uma absorbância de $0,700 \pm 0,02$, a 734 nm, em temperatura ambiente.

As amostras foram diluídas na solução de trabalho de ABTS, de forma a alcançar uma absorbância que corresponde na faixa de 20 a 80 % de inibição. A reação foi acompanhada durante seis minutos, com intervalos de 10 segundos.

A solução trolox foi adicionada à mesma solução de trabalho de ABTS sob diferentes concentrações para ser calculado o valor TEAC (Trolox Equivalent Antioxidant Capacity) com função da curva de quantificação deste padrão (RE *et al.*, 1999).

4.4 SISTEMAS β -CAROTENO/ÁCIDO LINOLÉICO

Baseia-se num princípio de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoléico e avaliado de acordo com o método descrito por Marco (1968), modificado por Miller (1971).

Para o preparo da mistura reativa, adicionou-se 20 μ L de ácido linoléico, 200 mg de Tween 20, 500 μ L de solução de β -caroteno a 2 mg/mL em clorofórmio e 500 μ L de clorofórmio em erlenmeyer. Posteriormente, a mistura foi submetida à completa evaporação do clorofórmio. A esta mistura isenta de clorofórmio, adicionou-se cerca de 50 mL de peróxido de hidrogênio, agitando vigorosamente.

A mistura reativa, assim preparada, apresentou-se límpida com absorvância entre 0,6 e 0,7 em 470 nm.

As amostras foram incubadas a 45°C para acelerar as reações de oxidação e iniciar o descoramento do β -caroteno. As leituras das absorvâncias foram realizadas imediatamente e com intervalos de 15 min, durante 120 min, em espectrofotômetro. As análises foram realizadas em triplicatas. Como foram expressos os resultados obtidos? Em %?

4.5 POLIFENÓIS TOTAIS

A concentração de polifenóis totais foi determinada pelo método colorimétrico de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965), adaptado por Silva *et al.* (2007), com base na mistura dos ácidos fosfowolfrâmico e tungstênio em meio básico, que se reduz ao oxidar os compostos fenólicos, originando óxidos azuis de wolfrâmio (W_8O_{23}) e molibdeno (Mo_8O_{23}).

A absorvância foi determinada a 760 nm. Os cálculos foram baseados na curva de calibração obtida com ácido gálico sob diferentes concentrações. Os polifenóis totais foram expressos em miligrama de equivalente de ácido gálico por mg de extrato.

4.6 BIOENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DO GRAU DE TOXIDADE

4.6.1 Cultura das larvas de *Artemia salina* Leach

Foram pesados em torno de 25 mg de ovos de *Artemia salina* Leach. e incubados em uma câmara com água salgada artificial, com temperatura ambiente em torno de 25°C e sistema de oxigenação constituído por uma bomba de aeração (MEYER *et al.*, 1982).

A câmara foi composta de duas divisórias: uma, onde foram colocados os ovos ao abrigo de luz e a outra iluminada por uma luz artificial gerada por uma lâmpada. Esta divisão foi feita porque as larvas têm afinidade pela luz, ou seja, apresentam fototropismo positivo, conseqüentemente, após a migração para a divisória do aquário iluminada foi possível separá-las facilmente dos ovos que não eclodiram (MEYER *et al.*, 1982).

A água salgada (salmoura) consistiu em uma mistura de 46 g de NaCl, 22 g de MgCl₂·6H₂O, 8g de Na₂SO₄, 2,6 g de CaCl₂·2H₂O ou CaCl₂·6H₂O, 1,4 g de KCl dissolvidos em 2000 mL de água destilada. O pH da salmoura foi ajustado a 9,0 usando Na₂CO₃ para evitar risco de morte das larvas por diminuição do pH durante o processo de incubação (LEWAN, ANDERSON, MORALES-GOMES, 1992).

4.6.2 Preparo das amostras e determinação do valor da CL₅₀

Foram preparados soluções do óleo essencial e extrato metanólico de *Lippia grandis* utilizando água da salmoura (sem larvas) e dimetilsulfóxido (DMSO) como solventes das amostras.

Após 48 horas de eclosão dos ovos, cerca de 10 larvas foram acrescentadas às soluções do óleo e extrato, sendo contadas com o uso de uma micropipeta automática. Os

tubos foram preenchidos a uma volume total de 5 mL com água salgada artificial. Para cada amostra foram testadas concentrações variando de 1 a 1000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (em triplicata) para determinar a relação da dose-resposta.

Após 24 horas de contato das larvas de *A. salina* com as soluções das amostras foi contado o número de larvas mortas em cada uma das amostras. O valor da CL_{50} foi calculado através da interpolação logarítmica, utilizando a conversão dos percentuais de mortalidade em Probitos, visando encontrar a concentração da amostra capaz de matar 50% das larvas (FINNEY, 1971).

4.6.3 Toxicidade aguda do extrato aquoso de *Lippia grandis*.

4.6.3.1. Determinação da DL_{50}

Neste estudo foram utilizados 40 camundongos Swiss albinos, machos, pesando em torno de 32g, divididos em grupos de 10 animais. Cada grupo, em jejum de 12 horas, recebeu por via oral (cânula oro-gástrica) doses do extrato aquoso de 1000, 3000 e 5000 mg/kg. Em seguida, os animais foram colocados em gaiolas e alimentados com ração e água *ad libitum* e observados durante 72 horas para observação dos parâmetros comportamentais. O número de mortes de cada grupo é expresso como o percentual do número total de animais que receberam o extrato. A determinação da DL_{50} é feita através da interpolação semi-logarítmica.

4.7. ANÁLISE SENSORIAL

O estudo da análise sensorial da planta *Lippia grandis* foi realizado utilizando-se um produto do tipo mini pizza para avaliação em escala hedônica. A aceitabilidade das amostras foi avaliada com a participação de 30 provadores não-treinados, com idade entre 19 e 50 anos, de ambos os sexos. O teste foi realizado em laboratório, sob condições controladas. A avaliação da amostra foi definida de uma forma global (impressão geral), incluindo odor e sabor, utilizando para isso uma escala hedônica de 9 pontos (Figura 13,p.52).

TESTE DE ACEITAÇÃO DE PIZZA COM ERVAS
NOME: _____
VOCÊ ESTÁ RECEBENDO UMA AMOSTRA PIZZA COM ERVAS. POR FAVOR, PROVE E AVALIE O QUANTO VOCÊ GOSTOU OU DESGOSTOU DA MESMA UTILIZANDO A ESCALA ABAIXO:
<input type="radio"/> GOSTEI MUITÍSSIMO
<input type="radio"/> GOSTEI MUITO
<input type="radio"/> GOSTEI MODERADAMENTE
<input type="radio"/> GOSTEI LIGEIRAMENTE
<input type="radio"/> NÃO GOSTEI NEM DESGOSTEI
<input type="radio"/> DESGOSTEI LIGEIRAMENTE
<input type="radio"/> DESGOSTEI MODERADAMENTE
<input type="radio"/> DESGOSTEI MUITO
<input type="radio"/> DESGOSTEI MUITÍSSIMO

Figura 13. Esquema de avaliação em nove níveis de aceitação do teste em escala hedônica.

Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

4.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística dos resultados, em triplicata, foi realizada segundo algumas medidas de variabilidade (desvio padrão e coeficiente de variância) e o teste de tukey, com nível de significância de 95% ($p < 0,05$), utilizando o software Excel (2003).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LIPPIA GRANDIS*

5.1.1 Análise físico-química

O óleo essencial de *Lippia grandis* apresentou coloração amarelo-claro e rendimento de 0,8% em relação à planta seca. Outros dados físico-químicos foram obtidos como o índice de refração a 25°C que foi 1,475 e a densidade igual 0,89 g.mL⁻¹.

5.1.2 Composição Química do óleo essencial de *Lippia grandis* Schau

Foram identificadas 28 substâncias no óleo essencial de *L. grandis* (Tabela 2) totalizando 98% da composição do óleo. Cada componente químico foi identificado através da comparação de seu espectro de massas com espectros existentes na literatura (ADAMS, 2007), com espectros avaliados pelo banco de dados (WILLEY, NIST) do equipamento e, também, pela comparação do índice de retenção com aqueles da literatura.

O óleo essencial apresenta timol como componente majoritário, em torno de 45%. Também foram identificados teores significativos do éter metílico do timol (4,84%), p-cimeno (14,26%), γ -terpineno (10,45%) (Figura 14, p.55).

Maia e colaboradores (2003) descreveram que o óleo essencial da espécie *L. grandis* pode apresentar dois tipos químicos: timol e 1-8-cineol. Afirmaram também que esta composição pode variar de acordo com as condições ambientais que esta espécie está submetida como clima, estação do ano, localização, etc.

Tabela 2. Composição química do óleo essencial das folhas e ramos finos de *Lippia grandis*.

Constituintes		IR	%	Maia <i>et al.</i> (2003) ^{a, b, c.}		
1	α -pineno	939	2.51	2.00	0.40	0.20
2	Sabineno	975	0.25	2.50	-	-
3	β -pineno	979	2.41	1.30	0.10	-
4	δ -careno	1002	0.60	-	0.10	-
5	<i>p</i> -cimeno	1025	14.26	-	7.10	14.00
6	(E)- β -ocimeno	1050	0.15	0.10	-	-
7	γ -terpineno	1060	10.45	1.80	0.60	3.70
8	Terpinoleno	1089	0.21	0.30	0.10	-
9	Linalol	1097	0.29	-	2.00	1.30
10	Umbelulona	1171	0.25	-	-	-
11	4-terpineol	1177	0.68	4.30	0.50	0.80
12	α -terpineol	1189	0.33	13.70	0.30	-
13	Verbenona	1205	0.07	-	0.50	-
14	timol metil éter	1235	4.84	-	3.90	3.60
15	carvacrol metil éter	1245	0.30	-	-	-
16	timol	1290	45.82	-	67.40	19.30
17	Carvacrol	1299	9.93	-	0.20	21.20
18	α -copaeno	1377	0.86	0.20	-	-
19	acetato de nerila	1362	0.05	-	-	-
20	β -cariofileno	1417	1.69	0.70	4.70	12.10
21	trans- α -bergamoteno	1435	0.15	0.20	-	0.20
22	α -humuleno	1455	0.49	0.70	0.30	0.80
23	Aromadendreno	1460	0.05	0.20	-	-
24	germarceno-D	1485	0.06	0.30	-	-
25	α -muruleno	1489	0.14	0.10	-	-
26	δ -cadineno	1523	0.62	0.30	-	0.30
27	óxido de cariofileno	1583	0.35	0.50	2.00	3.70
28	epóxido de humuleno II	1608	0.08	0.30	0.10	-

Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

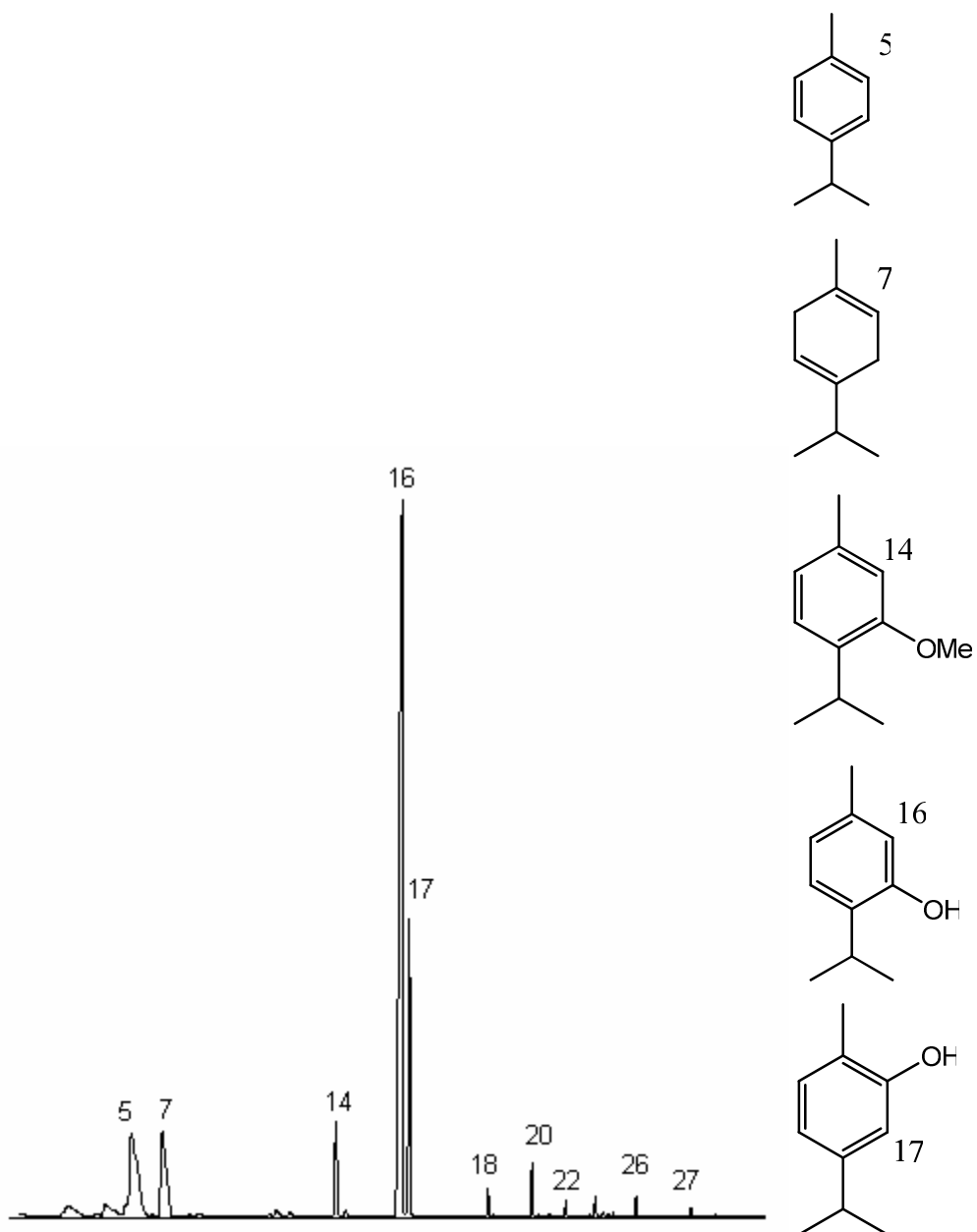


Figura 14. Cromatograma do óleo essencial das folhas e ramos finos de *Lippia grandis*. **5.** *p*-cimeno (14,26%); **7.** γ -terpineno (10,45%); **14.** éter metílico do timol (4,84%); **16.** timol (45,82%); **17.** carvacrol (9,93%); **18.** α -copaeno (0,86%); **20.** β -cariofileno (1,69%); **22.** α -humuleno (0,49%); **26.** δ -cadineno (0,62%); **27.** óxido de cariofileno (0,35%).

Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

5.2 CAPACIDADE ANTIOXIDATIVA

5.2.1 Polifenóis Totais (PT)

Os resultados de polifenóis totais obtidos para os extratos metanólicos (**EMLG**), fase acetato de etila (**FA-EMLG**), fase diclorometânica (**FD-EMLG**) e fase hidroalcoólica (**FHA-EMLG**) estão dispostos na Tabela 3. O rendimento das frações na marcha de separação foi equivalente a 24,0; 38,0 e 20,7% para as frações diclorometano, acetato de etila e aquosa, respectivamente.

Tabela 3. Teor de polifenóis nos extratos, expressos em miligrama de ácido gálico equivalente por grama de fração.

Amostras	PT
EMLG	761,4 ± 0,2
FA-EMLG	505,0 ± 5,7
FD-EMLG	223,0 ± 4,6
FHA-EMLG	336,5 ± 3,5

Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

De acordo com esses dados, pode-se notar um elevado teor de fenólicos totais (em torno de 761 mg EAG/ g) no extrato metanólico de *Lippia grandis*. Outra informação importante é que as frações obtidas na separação também obtiveram bons resultados, sendo destacado, a fração acetato de etila e aquosa com 505 e 336 mg AG/g, respectivamente.

Considerando-se que o rendimento do extrato metanólico foi de 8,53%, o resultado de polifenóis totais para o mesmo foi de 89,26 ± 0,02 mg EAG/g de material vegetal seco.

Wojdyło, Oszmianski, Czemerz (2007) identificaram teores de polifenóis totais para a família Asteraceae em torno de 0,12 mg EAG/ g de extrato. Miliauskas, Venskutonis e van Beek (2004) afirmaram que esta concentração em teor de polifenóis totais pode ser um indicativo de uma possível atividade antioxidante da amostra.

5.2.2 Avaliação antioxidante pelo método de seqüestro do radical livre DPPH.

Os resultados de inibição do DPPH estão dispostos na Tabela 4. A partir desses valores, puderam-se calcular os valores das CE₅₀ (Tabela 5) através da interpolação por regressão linear. Este valor indica a concentração capaz de inibir em 50% a reação radicalar, ou seja, quanto menores os valores da CE₅₀, maiores as porcentagens de inibições dessas reações envolvendo o radical DPPH.

Tabela 4. Porcentagem de inibição em função das faixas de concentrações dos extratos metanólicos, suas frações e o óleo essencial de *Lippia grandis* (OLG).

Amostras	Concentração (µg /mL)	Inibição %
EMLG	10,00-45,00	28,94-87,74
OLG	11,25-56,25	39,24-86,23
FA-EMLG	2,50-15,00	7,94-84,94
FD-EMLG	50,00-200,00	24,61-64,05
FHA-EMLG	6,25-25,00	15,08-80,52

Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

Tabela 5. Valores de CE₅₀ para os extratos metanólicos, suas frações e o óleo essencial de *Lippia grandis* (OLG).

Amostras	CE ₅₀ (µg /mL)
EMLG	19,74 ± 1,19
OLG	20,39 ± 0,81
FA-EMLG	9,02 ± 0,06
FD-EMLG	134,49 ± 9,12
FHA-EMLG	16,43 ± 0,45
Trolox	2,59 ± 0,06
Ácido Ascórbico	5,17 ± 0,05
BHA	4,01 ± 0,27

Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

De acordo com a Tabela 5, a fração acetato de etila apresentou maior atividade de seqüestro de DPPH, já que esta apresentou menor valor de CE₅₀. Isto pode ter acontecido em virtude de uma possível purificação do composto bioativo, pois de acordo com Brand,

Cuvellier e Berset (1995), a interação de antioxidantes com o radical DPPH depende da estrutura conformacional. Assim algumas variações encontradas na composição das amostras permitem diferentes interações dos compostos com o radical livre e a conseqüente atividade seqüestrante.

De acordo com Silva (2007), o valor de CE₅₀ do óleo essencial de *Lippia schomburgkiana*, em atividade antioxidante utilizando o radical DPPH, ficou em torno de 13 µg.mL⁻¹.

Para Ramos e colaboradores (2003), os valores de CE₅₀ inferiores a 30 µg.mL⁻¹ indicam bom potencial como seqüestrador de radicais livres, o que foi observado pelos extratos metanólicos, as frações acetato de etila e hidroalcoólica e o óleo essencial de *Lippia grandis*.

A fração acetato de etila correspondeu a mais ativa, quanto ao seqüestro do radical DPPH, e correspondeu a um terço da atividade do trolox, e à metade do ácido ascórbico e do BHA.

Os resultados das atividades antioxidantes podem ser comparados com o padrão de referência Trolox, e expressos em micromoles equivalentes do Trolox (TE) por 100 mg de amostra. A capacidade antioxidativa do extrato metanólico, óleo essencial e das frações acetato de etila, diclorometano e aquosa foi de 762, 787, 259, 519 e 634 mg TE/g, respectivamente.

O teor de compostos fenólicos pode ser associado à atividade antioxidante, através de inúmeros estudos *in vitro*. Desta maneira, o teor de fenólicos totais encontrados no extrato metanólico e suas frações podem estar atuando na redução das reações radicalares envolvendo o DPPH.

5.2.3 Avaliação antioxidante pelo método TEAC

A Figura 15 (p.59) mostra os valores TEAC obtidos para o extrato metanólico, as frações acetato de etila, diclorometânica, aquosa e o óleo essencial de *Lippia grandis*. Pode-se perceber, ainda, o comportamento destas amostras quando comparadas aos padrões trolox, BHA e ácido ascórbico.

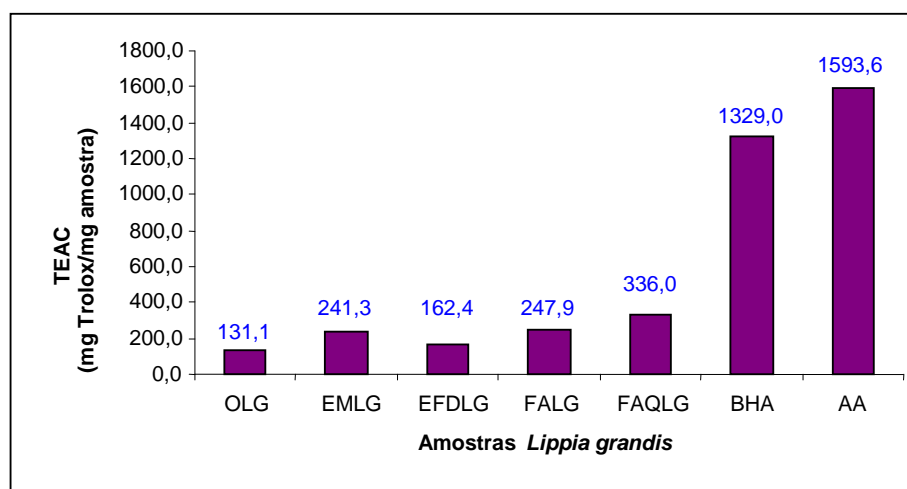


Figura 15. Comparação dos valores TEAC obtidos para as amostras de *Lippia grandis* e padrões.

Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

Na Figura 15, é possível identificar que a fração hidroalcoólica e o óleo essencial apresentam a maior e menor atividade no seqüestro do radical ABTS, respectivamente.

Um estudo de Puertas-Mejia e colaboradores (2002) mostrou um valor TEAC baixo para o óleo essencial de *Lippia alba* (3,61 mg de trolox por grama). Este valor quando comparado aquele do óleo essencial de *Lippia grandis* (131 mg de trolox por mg), revela ser muito menos ativo.

Estes comportamentos foram explicados por Re e colaboradores (1999) quando percebeu que o método TEAC é bastante aplicado em meios hidrofílicos. Em meio hidrofóbicos, seria possível se realizar adaptações quando os antioxidantes, na presença do radical ABTS, estivessem em meio também lipofílicos.

Wojdyło, Oszmianski e Czemerzys (2007) encontraram um valor médio de TEAC em torno de 33,2 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ de extrato metanólico de 32 plantas, ou seja, o extrato metanólico de *Lippia grandis* supera esta média em 66 % (97,6 $\mu\text{mol TE}/100\text{g}$ de extrato).

A Figura 15 mostra, ainda, que os padrões BHA e ácido ascórbico apresentam valores TEAC superiores aos das amostras de *Lippia grandis*, possivelmente, em virtude da estrutura química polar, e principalmente, em função da pureza que apresentam.

5.2.4 Sistema β -caroteno/ácido linoléico

A Tabela 6 mostra o comportamento do sistema β -caroteno/ácido linoléico quando em presença dos extratos metanólicos, suas frações e o óleo essencial de *Lippia grandis*, em uma concentração de 5 mg/mL.

Tabela 6. Porcentagem de inibição do β -caroteno pelos extratos metanólicos, suas frações e o óleo essencial de *Lippia grandis* (OLG) a 5 mg/mL.

	% Inibição
EMLG	22,9 \pm 1,0
OLG	42,5 \pm 4,6
FA-EMLG	27,4 \pm 1,6
FD-EMLG	21,5 \pm 1,2
FHA-EMLG	31,8 \pm 2,2

Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

Conforme a Tabela 6, o óleo essencial foi o que apresentou maior atividade no sistema β -caroteno/ácido linoléico. Isto porque em sistema multifases, a eficiência dos antioxidantes é grandemente afetada pelas propriedades de solubilidade, o que determina em parte a sua distribuição na fase.

Porter (1993) afirmou que os antioxidantes hidrossolúveis tendem a ser mais ativo que os lipossolúveis em óleo. De forma inversa, os antioxidantes lipofílicos tendem a apresentar uma melhor proteção de uma emulsão óleo em água que os hidrofílicos. Isto

acontece, pois existem suposições de que a iniciação da oxidação lipídica está localizada na interface do sistema.

Assim, para o óleo, a oxidação ocorre na interface ar/óleo onde os antioxidantes hidrofílicos estão concentrados, enquanto que a oxidação em emulsões está localizada na interface água/óleo onde os antioxidantes lipofílicos estão localizados (RICE-EVANS, MILLER, PAGANGA, 1997).

A Figura 16 (p.61) apresenta a comparação da inibição das amostras de *Lippia grandis* com os padrões Trolox, ácido ascórbico e BHA que foram utilizados.

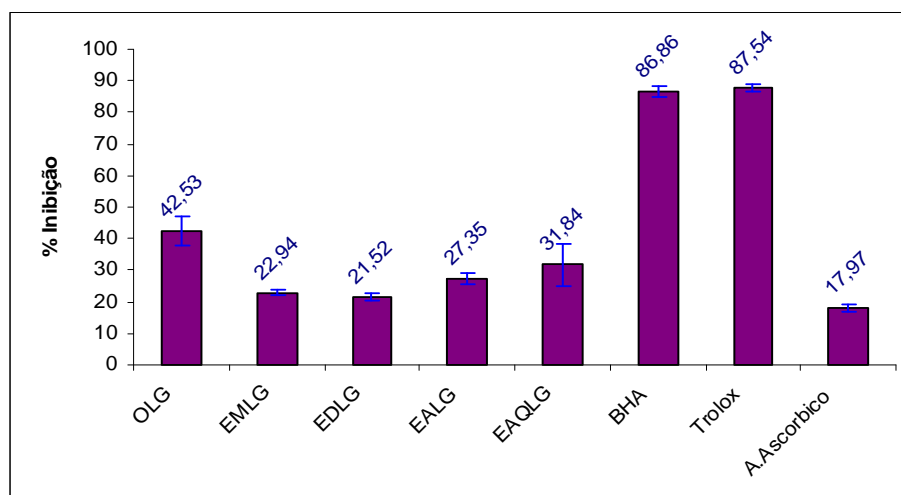


Figura 16. Comparação das amostras de *Lippia grandis* com padrões para o sistema β -caroteno/ácido linoléico.

Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

O extrato metanólico e a fração diclorometanica de *Lippia grandis* não diferem entre si, ao nível de 95%. No entanto, as mesmas são distintas para o óleo essencial e a fração hidroalcoólica.

O óleo essencial apresenta atividade correspondente a cerca de 50% dos padrões Trolox e BHA e mais de 100% da atividade do ácido ascórbico.

5.3. CORRELAÇÃO ENTRE OS MÉTODOS ANTIOXIDANTES E POLIFENÓIS TOTAIS.

A Tabela 7 apresenta os coeficientes de determinação e correlação (r^2 e r) para os métodos de capacidade antioxidante TEAC, DPPH, sistema β -caroteno e polifenóis totais.

Tabela 7. Análise estatística da correlação entre a atividade antioxidante e os teores dos polifenóis totais.

	r^2	r
PT X DPPH	0,410	0,640
PT X TEAC	0,022	0,148
PT X SBC¹	0,025	0,159
DPPH X TEAC	0,615	0,784
DPPH X SBC	0,414	0,643
SBC X TEAC	0,852	0,923

Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

¹ Sistema β -caroteno/ácido linoléico

A atividade antioxidante determinada pelos métodos TEAC, DPPH e o sistema β -caroteno não se apresenta correlacionada com os teores de polifenóis totais encontrados nas amostras, ao nível de 95%. Saldanha (2005) também não encontrou correlações significativas entre o teor total de polifenóis e o sistema β -caroteno e DPPH para extratos de erva-mate e chá-verde.

Isto pode ocorrer caso não sejam os compostos polifenólicos os responsáveis pelo seqüestro de radicais envolvidos nesses métodos. Ou ainda, que estes compostos fenólicos estejam sofrendo algum tipo de sinergismo com outros componentes existentes nas amostras o que reduz a atividade antioxidante em matrizes complexas.

Entre os métodos de atividade antioxidante apenas se encontrou correlação significativa entre o sistema β -caroteno e TEAC, ao nível de 93%.

Saldanha (2005) encontrou, ainda, maior atividade antioxidante (sistema β -caroteno) em extratos aquosos de erva-mate tostada, sendo que estes apresentaram menor teor de

polifenóis totais que do extrato aquoso de erva-mate verde. Apontando, novamente, a evidência de que outros compostos estariam agindo em sinergia para conferir a capacidade antioxidante.

5.4. BIOENSAIO PARA DETERMINAÇÃO DO GRAU DE TOXIDADE

5.4.1 Cultura das larvas de *Artemia salina* Leach

Os valores de CL_{50} para as amostras de óleo essencial e extrato metanólico foram calculados através da conversão da porcentagem de mortalidade das larvas em Probitos, traçando assim a equação da reta em função dos valores das concentrações em escala logarítmica.

De acordo com as Figuras 17 e 18 (p.64), observa-se este comportamento para o óleo essencial e extrato metanólico de *Lippia grandis*.

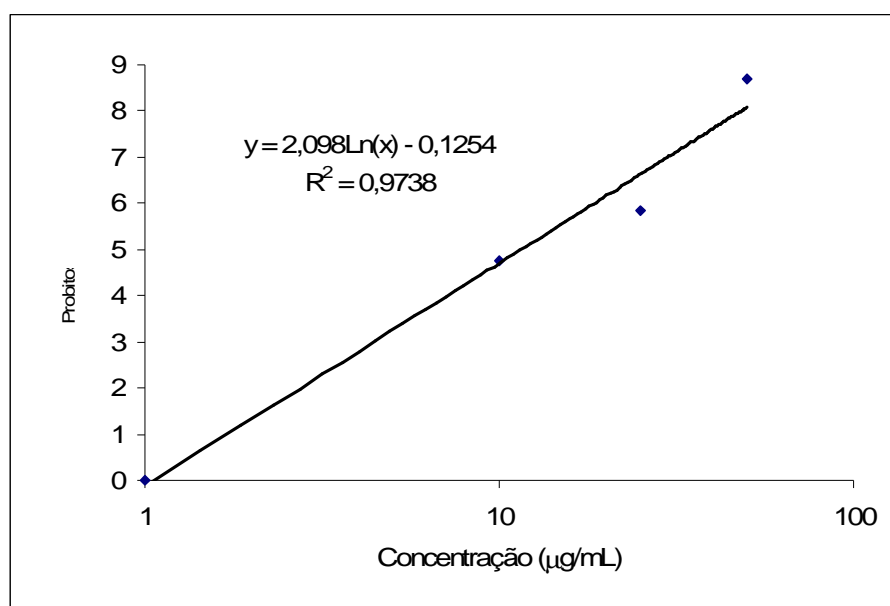


Figura 17. Gráfico Probitos vs. concentração de óleo essencial de *Lippia grandis*.

Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

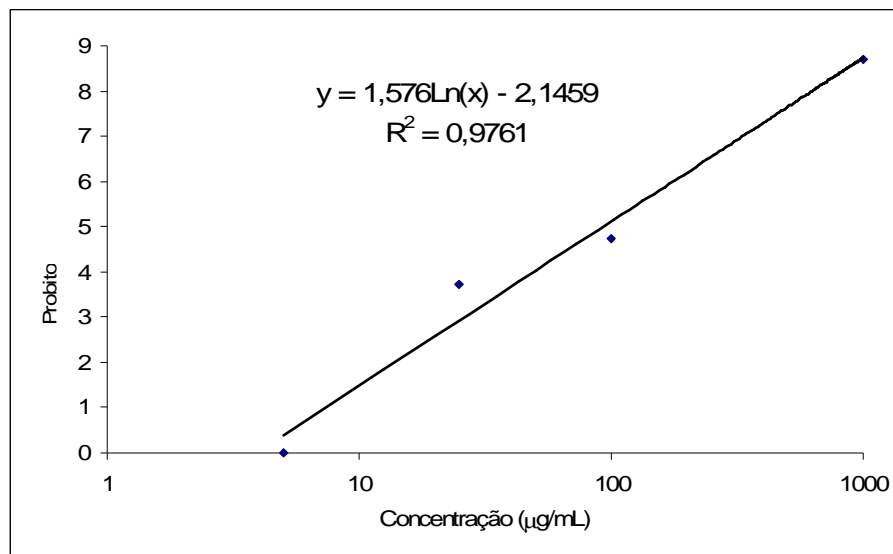


Figura 18. Gráfico Probíto vs. concentração de extrato metanólico de *Lippia grandis*.

Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

Os valores de CL_{50} para as amostras encontram-se na Tabela 8. A toxicidade, frente *A.salina*, das amostras apresentaram valores de CL_{50} inferiores a $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo as amostras consideradas bioativas, de acordo com Meyer *et al* (1982).

Tabela 8. Cálculo da CL_{50} para o extrato metanólico e óleo essencial de *Lippia grandis*.

Amostras	Concentração $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Mortalidade %	CL_{50} $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	Coefficiente Correlação média
Óleo	50	100	$10,21 \pm 2,42$	0,974
	25	80		
	10	40		
	1	0		
Extrato metanólico	1000	100	$93,15 \pm 3,83$	0,976
	100	40		
	25	10		
	5	0		

Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

Lopes e colaboradores (2002) estabeleceram os seguintes critérios de classificação de toxicidade com base nos níveis de CL_{50} em *Artemia salina*: $CL_{50} < 80 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; altamente tóxico, CL_{50} entre 80 e $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$; moderadamente tóxico, e $CL_{50} > 250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ de baixa toxicidade ou não-tóxico.

Silva e colaboradores (2007) identificaram o componente timol (34%) como majoritário no óleo essencial de *Conobea scoparioides*. Frente à *A. salina*, este se apresentou como altamente tóxico, com CL_{50} em torno de $7,8 \mu\text{g. mL}^{-1}$.

Silva (2007) identificou na espécie *Lippia schomburgkiana* o composto majoritário 1,8-cineol (66%) em seu óleo essencial que também apresentou alta toxicidade ($CL_{50} = 49,64 \mu\text{g. mL}^{-1}$) frente *A. salina*.

Em geral, o teste de *A. salina* é útil para avaliar a toxicidade das plantas. Entretanto, embora ofereça muitas vantagens tais como rapidez, simplicidade e baixo custo, para se obter um valor real da toxicidade as amostras devem ser sujeitas a uma comparação com os valores de DL_{50} obtidos para a toxicidade aguda oral testada em animais de sangue quente como ratos e camundongos.

5.4.2 Toxicidade Aguda

A dose máxima de 5000 mg.mL^{-1} de extrato aquoso por Kg de animal, administrada oralmente, não causou alterações dos parâmetros comportamentais ou morte dos camundongos. Este resultado indica que o extrato aquoso apresentou valor de DL_{50} elevado, ou seja, baixa toxicidade (SILVA *et al.*, 2003).

A toxicidade do óleo essencial de *L.grandis* não foi analisada, já que dados da literatura mostram que timol (composto majoritário) apresenta baixa toxicidade (FARHAT, AFFARA & GALI-MUHTASIB, 2001).

5.5 ANÁLISE SENSORIAL

Previamente a esta etapa foram realizados testes de toxicidade aguda das folhas e galhos secos de *Lippia grandis* em camundongos, com o intuito de investigar um possível risco na participação humana na etapa sensorial. Como foi observada anteriormente, a planta em estudo foi considerada de baixa toxicidade em camundongos.

Na aplicação do teste sensorial participaram 30 julgadores, com idades de 19 a 50 anos, de ambos os sexos.

O percentual de aceitação dos produtos foi igual a 77,3% para o orégano e 78,0% para a *L.grandis*. A Figura 19 (p.67) apresenta o histograma de aceitação em escala hedônica.

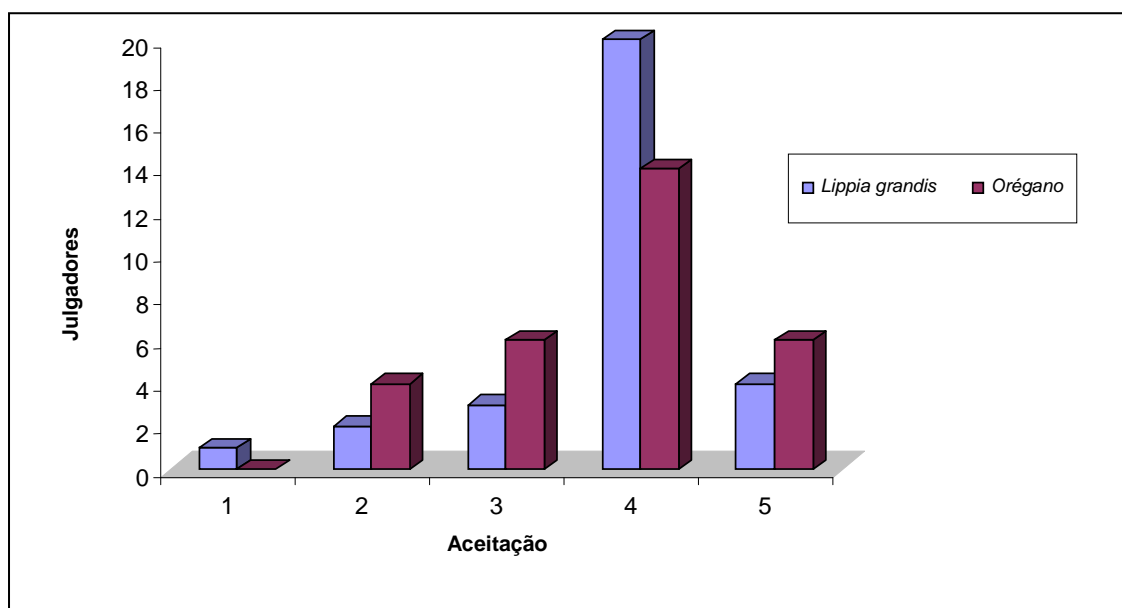


Figura 19. Histograma de aceitação hedônica através da análise sensorial das amostras de orégano comercial e *Lippia grandis*.

Fonte: DAMASCENO, Evelyn Trindade, 2008.

As amostras de *Lippia grandis* apresentaram bons índices de aceitação sensorial, similares ao orégano, apresentando conceito entre *gostei moderadamente* e *gostei muito*.

Silva (2007) encontrou um percentual de aceitação sensorial em torno de 78, 70% para amostra de *L. schomburgkiana* em torradas. Pode-se afirmar que esses valores reforçam resultados descritos na literatura quanto ao potencial culinário da planta similar ao orégano (OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Alguns analistas perceberam características sensoriais diferentes entre as amostras de orégano e *L. grandis*, destacando a ultima como sendo mais forte, gosto mais destacado ou ainda mais ardente.

De maneira geral, os analistas consideraram uma possível substituição do orégano por *L. grandis* bastante atrativa segundo o caráter sensorial (odor e sabor).

6 CONCLUSÃO

- A composição do óleo essencial de *Lippia grandis* apresentou o composto timol como componente majoritário, sendo também identificados os compostos éter metílico de timol, carvacrol, *p*-cimeno, γ -terpineno.
- O extrato metanólico e as frações diclorometano, acetato de etila e hidroalcoólica apresentaram bons rendimentos e elevados teores de fenólicos totais.
- Nos testes de atividade antioxidante, frente ao radical DPPH, a fração acetato de etila apresentou maior seqüestro deste radical, apresentando menor valor de CE₅₀, próximo ao padrão Trolox e superior as demais amostras de extrato metanólico, frações diclorometano, hidroalcoólica e ao óleo essencial de *Lippia grandis*.
- Frente ao radical ABTS, nos testes de TEAC, a fração aquosa e o óleo essencial de *Lippia grandis* apresentaram a maior e a menor atividade de seqüestro do radical, respectivamente.
- O menor valor de atividade antioxidante, utilizando o radical ABTS, que foi apresentado pelo óleo essencial de *Lippia grandis*, obteve valores elevados quando comparado com demais resultados de seqüestro de radicais de óleos essenciais.
- A atividade antioxidante estudada pelo sistema β -caroteno/ácido linoléico mostrou valores elevados de seqüestro de radical para o óleo essencial de *Lippia grandis*, possivelmente, em virtude da solubilidade das amostras.
- A atividade antioxidante determinada pelos métodos TEAC, DPPH e o sistema β -caroteno não apresentaram correlações significativas com os teores de fenólicos totais, possivelmente, por presença de interferentes nas matrizes complexas estudadas.

- O óleo essencial e o extrato metanólico de *Lippia grandis* foram considerados altamente e moderadamente tóxicos, respectivamente, frente aos testes de *Artemia salina*.
- Durante os testes de toxicidade aguda, não foram percebidas nenhuma alteração comportamental ou mortes dos camundongos que sofreram a ingestão de extrato aquoso de *Lippia grandis*. Este último é assim considerado de baixa toxicidade.
- A análise sensorial de escala hedônica apresentou bons índices de aceitação, com um percentual para *Lippia grandis* em torno de 78% e para o orégano na faixa de 77%, utilizando como meio mini-pizzas.

REFERENCIAS

- AABY, K.; HVATTUM, E.; SKREDE, G. Analysis of flavonoids and other phenolic compounds using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection: Relationship to antioxidant activity. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.4595–4603, 2004.
- ABAD, M.J.; SÁNCHEZ, S.; BERMEJO, P.; VILLAR, A.; CARRASCO, L. Antiviral activity of some medicinal plants. **Methods and Findings**, v.17, p.108, 1995.
- ADAMS, R.P. **Identification of essential oil componentes by gas chromatography/Mass spectroscopy**. Ed. Allured. 2007.
- AESCHBACH, R.; LOÈ LIGER, J.; SCOTT, B. C.; MURCIA, A.; BUTLER, J.; HALLIWELL, B.; ARUOMA, O. T. Antioxidant action of thymol, carvacrol, 6-gingerol, zingerone and hydroxytyrosol. **Food Chemical Toxicology**, v.32, p.31-36, 1994.
- AGANANIET, H.; MAKANI, T.; AKAGAH, A.; MENUT, C.; BESSIERE, J.M. Aromatic plants of tropical Central Africa. Part XLV. Volatile constituents and antioxidant activity of essential from *Lippia multiflora* Mold. Growing in Gabon. **Flavour and Fragrance Journal**, v.20, p. 34-38, 2005.
- APPELL, H-J.; DUARTE, J.A.; GLÖSER, S.; REMIÃO, F.; CARVALHO, F.; BASTOS, M.L.; SOARES, J.M.C. Administration of tourniquet: II. Prevention from postischemic oxidative stress can reduce muscle edema. **Arch. Orthop. Trauma Surg.**, v.116, p.101-05, 1997.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in the determination of antioxidant activity using chromogen radicals: A practical case. **Trends in Food Science and Technology**, v.11, p.419–421, 2000.
- ASCENSÃO, A.; MAGALHÃES, J.; SOARES, J.M.; FERREIRA, R.M.; NEUPARTH, M.J.; APPELL, H.J.; DUARTE, J.A; Cardiac mitochondrial respiratory function and oxidative stress: the role of exercise. **Int. J. Sports Med.**, v.26, p.258-67, 2005.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**.v.46, p.446-475, 2008.
- BANDONIENE, D.; PUKALSKAS, A.; VENSKUTONIS, P. S.; GRUZDIENE, D. Preliminary screening of antioxidant activity of some plant extracts in rapeseed oil. **Food Research International**, v.33, p. 785–791, 2000.
- BERG, M. E. **Plantas medicinais na Amazônia: contribuição ao seu conhecimento sistemático**. 2.^a ed. rev. e aum. Belém, Museu Paraense Emílio Goeldi, coleção Adolpho Ducke.1993
- BERG, R.; HAENEN, G.R.M.M.; VAN DEN BERG, H.; BAST, A. Applicability of an improved Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC) assay for evaluation of antioxidant capacity measurements of mixtures. **Food Chemistry**, v.66, p.511–517, 1999.

- BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidants activity using DPPH free radical method. **Lebensm-Wiss.u.-Technology**, v.30, p.609-615, 1997.
- BOUAZIZ, M.; FKI, I.; HEDYA, J.; MOHAMED, A.; SAYADI, S. Effect of storage on refined and husk olive oils composition: Stabilization by natural antioxidants from Chemlal olive leaves. **Food Chemistry**, v.108, p. 253-262, 2008.
- BRAND, W.; CUVELLIER, M.E; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT – Food Science and Technology**. London, v.28, n.1, p.25-30, 1995.
- 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.
- CAILLET, S.; YU, H.; LESSARD, S.; LAMOURREUX, G. Fenton reaction applied for screening natural antioxidants. **Food Chemistry**, v.100, p.542-552, 2007.
- CATALAN, C.A.N.; LAMPASONA, M.E.P.; FENIK, I.J.S.; CERDA-GARCIA-ROJAS, C.M.; MORAS-PÉREZ, Y.; JOSEPH-NATHAN, P. Minor constituents of *Lippia integrifolia*. **Journal of Natural Products**, v.57, p. 206-210, 1994.
- CHEN, H. Y.; YEN, G.C. Antioxidant activity and free radical-scavenging capacity of extracts from guava (*Psidium guajava* L.) leave. **Food Chemistry**, v.101, p.686-694, 2007.
- CHOI, H.S.; SUN SONG, H.; UKEDA, H.; SAWAMURA, M. Radical-scavenging activities of *citrus* essential oils and their components: Detection using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, p.416-4161, 2000.
- CHUN, S.S.; VATTEM, D.A.; LIN, Y.T.; SHETTY, K. Phenolic antioxidants from clonal oregano (*Origanum vulgare*) with antimicrobial activity against *Helicobacter pylori*. **Process Biochemistry**, v. 40, p.809-816, 2005.
- COLOMER, M.F. **Efectos antioxidantes del aceite de oliva y de sus compuestos fenólicos**. 2003. Tese de doutorado - Universidade Autonoma de Barcelona, 2003.
- CZAPECKA, E., MARECZEK, A., LEJA, M. Antioxidant activity of fresh and dry herbs of some Lamiaceae species. **Food Chemistry**, v. 93, p.223–226, 2005.
- DAPKEVICIUS, A.; VENSKUTONIS, R.; VAN BEEK, T.A.; LINSSEN, P.H. Antioxidant activity of extract obtained by different isolation procedures from some aromatic herbs grown in Lithuania. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v.77, p.140-146, 1998.
- DASTMALCHI, K.; DAMIEN DORMAN, H.J.; OINONEN, P.P.; DARWIS, Y.; LAAKSO, I.; HILTUNEN, H. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. **Food Science and Technology**, 2007.
- DEBA, F.; XUAN, T.D.; YASUDA, M.; TAWATA, S. Chemical composition and antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oils from *Bidens pilosa* Linn. Var. *Radiata*. **Food Control**, v.19, p.346-452, 2008.

DEL RIO, D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v.15, p. 316-328, 2005.

DELGADO-ZAMARREÑO, M.M.; GONZALEZ-MAZA, I.; SANCHEZ-PEREZ, A.; CARABIAS-MARTINEZ, R. Analysis of synthetic phenolic antioxidants in edible oil by micellar electrokinetic capillary chromatography. **Food Chemistry**, v.100, p. 1722-1727, 2007.

DI MEO, S.; VENDITTI, P. Mitochondria in exercise-induced oxidative stress. **Biol. Signals Recept.**, v.10, p.125-40, 2001

DJERIDANE, A.; YOUSFI, M.; NADJEMI, B.; BOUTASSOUNA, D.; STOCKER, P.; VIDAL, N. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. **Food Chemistry**, v.97, p.654–660, 2006

DRAGLAND, S.; SENOO, H.; WAKE, K., HOLTE, K.; BLOMHOFF, R. Several culinary and medicinal herbs are important sources of dietary antioxidants. **Journal of Nutrition**, v.133, p.1286–1290, 2003.

DUARTE, J.A.; CARVALHO, F.; BASTOS, M.L.; SOARES, J.M.C.; APPELL, H-J. Endothelium-derived oxidative stress may contribute to exercise-induced muscle damage. **Int. J. Sports Med.**, v.14, p.440-43, 1994.

FARHAT, G.N.; AFFARA, N.I.; GALI-MUHTASIB, H.U. Seasonal changes in the composition of the essential oil extract of East Mediterranean sage (*Salvia libanotica*) and its toxicity in mice. **Toxicon**, v.39, p.1601-1605, 2001.

FINNEY, D.J. **Probits analysis**. 3^o ed. Cambridge University Press. 1971.

FOGLIANO, V.; VERDE, V.; RANDAZZO, G.; RITIENE, A. Method for measuring antioxidant activity and its application to monitoring the antioxidant capacity of wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p.1035-1040, 1999.

FRANCIS, F.J. Food colorants: anthocyanins. **Critical review in Food Science and Nutrition**, v.28 (4), 1989.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of Food Science Agriculture**, v.80, p.1925-1941, 2000.

GASQUET, M.; DELMAS, F.; TIMÓN-DAVID, P.; KEITA, A.; GUINDO, M.; KOITA, N.; DIALLO, D.; DOUMBO, O. Evaluation on vitro and in vivo of a traditional antimalarial, Malarial-5. **Fitoterapia**, v. 64, p.423-426, 1993.

GODEVAC, D.; VUJISIC.; MOJOVIC, M.; IGNJATOVIC.; SPASOJEVIC.; VAJS, V. Evaluation of antioxidant capacity of *Allium ursinum* L. volatile oil and its effect on membrane fluidity. **Food Chemistry**, 2007.

HAGERMAN, A. E.; RIEDL, K. M.; JONES, G. A.; SOVIK, K. N .; RITCHARD, N. T.; HARTZFELD, P. W.; RIECHEL, T. L. High molecular weight plant polyphenolics (tannins)

as biological antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.1887-1892, 1998.

HALIWEEL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods in Enzymology**, New York, v.186 (Part B), p. 1-85, 1990.

HALLIWELL B. Reactive oxygen species and the central nervous system. **J Neurochem** 1992; 59:1609-23.

HALLIWELL, B. Antioxidants in human health and disease. **Annual Review of Nutrition**, v.16, p.33-50, 1996.

HALLIWELL, B. Free Radicals and Antioxidant: A personal view. **Nutrition Reviews**, v.52, p.253-265, 1994.

HALLIWELL, B.; AESCHBACH, R.; LOLIGER, J.; ARUOMA, O.I. The characterization of antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v.33, p.601-617, 1995.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p.481-504, 2000.

HARBOUNE, J.B. Methods in plant biochemistry. **Plant Phenolics**. London: Academic Press. v.1.1989.

HU, Q.; XU, J.; CHEN, S.; YANG, F. Antioxidant activity of extracts of black sesame seeds (*Sesamum indicum* L.) by supercritical carbon dioxide extraction. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, p.943-947, 2004.

HUGHES, D.A. Effects of dietary antioxidants on the immune function of middle-aged adults. **Process Nutrition Society**, v.58, p.79-84, 1999.

IVANOVA, D.; GEROVA, D.; CHERVENKOV, T.; YANKOVA, T. Polyphenols and antioxidant capacity of Bulgarian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v.96, p.145-150, 2005.

JAYATHINLAKAN, K.; SHARMA, G.K.; RADHAKRISHNA, A.S.; Antioxidant potential of synthetic and natural antioxidants and its effect on warmed-over-flavour in different species of meat. **Food Chemistry**, v.105, p.908-916, 2007.

KÄHKÖNEN, M. P.; HOPIA, A. I.; VUORELA, H. J.; RAUHA, J.P.; PIHLAJA, K.; KUJALA, T. S. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p. 3954-3962, 1999.

KALIORA, A.C.; DEDOUSSIS, G.V.Z.; SCHMIDT, H. Dietary antioxidants in preventing atherogenesis. **Atherosclerosis**, v.187, p.1-17, 2006.

KANEDA, N.; LEE, L. S.; GUPTA, M.P.; SOEJARTO, D.D.; KINGHORN, D. (+)-4 β -hydroxy-hernandulcin, a new sweet sesquiterpene from the leaves and flowers of *Lippia dulcis*. **Journal Natural Products**, v.55, p.1136-1141, 1992.

KITAGAKI, H.; TSUGAWA, M. 1,1-Diphenil-2-picrylhydrazyl radical (DPPH) scavenging ability of sake during storage. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.87, p.328-332, 1999.

KOHLER, C.; VAN RENSEN, I.; MÄÄRZ, R.; SCHINDLER, G.; GRAEFE, E. U.; VEIT, M.; Bioavailability and pharmacokinetics of natural volatile terpenes in animals and humans. **Planta Med.**, 66, p. 495-505, 2000;

LAGOURI, V; BLEKAS,G; TSIMIDOU,M; KOKKINI, S; BOSKOU,D.Composition and antioxidant activity of essential oils from Oregano plants grown in Greece. **Z Lebensmitt. Unters. Forsch.** 197, p. 20-23, 1993.

LAGOURI, V; BOSKOU, D. Screening for antioxidant activity of essential oils obtained from spices. **In Food Flavors: Generation, Analysis and Process Influence**, ed. G. Charalambous, p. 869-879. Elsevier, Amsterdam, 1995.

LAGUERRE, M.; LECONTE, J.; VILLENEUVE, P. Evaluation of the ability of antioxidants to counteract lipid oxidation: Existing methods, new trends and challenges. **Lipid Research**, v.46, p.244-282, 2007.

LAKO, J.; TRENERRY,V.C.; WAHLQVIST,M.; WATTANAPENPAIBOON,N.; SOTHEESWARAN,S.; PREMIER, R. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. **Food Chemistry**, v. 101, p.1727–1741, 2007.

LEEUWENBURGH, C.; HEINECKE, J.W. Oxidative stress and antioxidants in exercise. **Curr. Med. Chem.**, v.8, p.829-38, 2001.

LEWAN, L.; ANDERSON, M.; MORALES-GOMEZ, P. The use of *Artemia salina* in toxicity testing. **Alternatives to Laboratory Animals**, v.20, p.297-301, 1992.

LIN, J.K.; LIN, C.H.; LIANG, Y.C.; LIN-SHIAU, S.Y.; JUAN, I.M. Survey of catechins, gallic acid, and methylxantines in green, puerh and black teas. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.46, p.3635-3642, 1998.

LINTO, S.; DAVIES, M.J.; DEAN, R.T. Protein oxidation and ageing. **Experimental Gerontology**, Elmosford, v.36, n.9, p.1503-1518, 2001.

LOPES, W.B.; MORONI, F.T.; BRANDEBURGO, M.; HAMAGUCHI, I. Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação de toxicidade de extratos vegetais. **Revista Horizonte Científico**, v.1, p.1-10, 2002.

LÓPEZ, A.A.M.; ROJAS, H.N.M.; JIMÉNEZ, M.C.A. Plant extracts with cytostatic properties growing in Cuba. **Revista Cubana Medicinal. Trop.** p.105-111, 1979.

LORETO, F.; MANNOZZI, M.; MARIS, C.; NASCETTI, P.; FERRANTI, F.; PASQUALINI, S.; Ozone quenching properties of isoprene and its antioxidant role in leaves. **Plant Physiol.**, 126, 993-1000, 2001;

LUO, Y.; CAI, Q.; SUN, M.; CORKE, H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. **Life Science**, v.74, p.2157–2184, 2004.

MAIA, J. G. S.; TAVEIRA, F.S.; ANDRADE, E.H.; SILVA, M.H.L.; ZOGHBI, M.G.B. Essential oils of *Lippia grandis* Schau. **Flavour and Fragrance Journal**, v.18, p.417-420, 2003.

MAIA, J.G.S.; SILVA, M.H.L.; ANDRADE, E.H.A.; CARREIRA, L.M.M. Essential oil variation in *Lippia glandulosa* Schauer. **Journal of Essential Oil Research**. Journal of Essential Oil Research, v.17, p.676-680, 2005.

MAISUTHISAKUL, P.; SUTTAJIT, M.; PONGSAWATMANIT. Assessment of phenolic content and free radicals scavenging capacity of some Thai indigenous plants. **Food Chemistry**, v.100, p.1409-1418, 2007.

MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 45, p. 594-598, 1968.

MATA, A.T.; PROENÇA, C.; FERREIRA, A.R.; SERRALHEIRO, M.L.M.; NOGUEIRA, J.M.F.; ARAUJO, M.E.M. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chemistry**, v.103, p. 778-786, 2007.

MATOS, F.J.A.; MACHADO, M.I.L.; CRAVEIRO, A.A.; ALENCAR, J.W.; SILVA, M.G.V. Medicinal plants of Northeast Brazil containing thymol and carvacrol – *Lippia sydoides* Cham. and *L. gracilis* H. B. K. (Verbenaceae). **Journal of Essential Oil Research**, v.11, p. 666-668, 1999.

MCPHAIL, D. B.; GARDNER, P. T.; DUTHIE, G. G.; STEELE, G. M.; REID, K. Assessment of the antioxidant potential of scotch whiskeys by electron spin resonance spectroscopy, relationship to hydroxyl-containing aromatic components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.47, p.1937-1941, 1999.

MELO, E.A.; GUERRA, N.B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presente em alimentos. **Boletim da SBCTA**, v.36, p.1-11, 2002.

MENUT, C.; LAMATY, G.; SOHOUNHLOUE, D.K.; DANGOU, J.; BESSIÉRE, J.M. Aromatic plants of Tropical West Africa. III. Chemical composition of leaf oil of *Lippia multiflora* Moldenke from Benin. **Journal Essential Oil Research**, v.7, p. 331-333, 1995.

MEYER, B.N.; FERRIGNI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; MC LAUGHLIN, J.L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v.45, p.31-34, 1982.

MILIAUSKAS, G.; VENSKUTONIS, P.R.; VAN BEEK, T. A. Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. **Food Chemistry**. v.85, p.231-237.2004.

MILLER, H. E. A simplified method for the evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, v. 48, p. 91, 1971.

MOLDENKE, H.N. Phytologia Memoirs II. A Sixty Summary of the Verbenaceae, Avicenniaceae, Stilbaceae, Chloanthaceae, Symphoremaceae, Nyctanthaceae and Eriocaulaceae of the World as to Valid Taxa. **Geographic Distribution and Synonymy**, USA, 1980.

MORTON. **Atlas of Medicinal Plants of Middle America**, v.1, Springfield, Illinois, USA, p. 745-750.1981.

MOTA, M.P.; FIGUEIREDO, P.; DUARTE, J.A. Teorias biológicas do envelhecimento. **Rev. Port. Cienc. Desp.**, v.4, p.81-110, 2004.

MURCIA, M. A.; EGEE, I.; ROMOJARO, F.; PARRAS, P.; JIMÉNEZ, A. M.; MARTÍNEZ-TOME, M. Antioxidant evaluation in dessert spices compared with common food additives, influence of irradiation procedure. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p. 1872–1881, 2004.

NAWAR, W.W. Lipids. In: FENNEMA, O.R. **Food Chemistry**. 3 ed. New York: Marcel Dekker. 1996: 225-319. (Food Science and Technology).

OLDONI, T.L.C. **Isolamento e identificação de compostos com atividade antioxidante de uma nova variedade de própolis brasileira produzida por abelhas da espécie *Apis mellifera***. 2007. Dissertação de Mestrado. Piracicaba, Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, 2007.

OLIVEIRA, D, R.; LEITÃO, G.G.; BIZZO, H.R.; LOPES, D.; ALVIANO, D.S.; ALVIANO, C.S.; LEITÃO, S.G. Chemical and antimicrobial analyses of essential oil of *Lippia origanoides* H.B.K. **Food Chemistry**, v.101, p.236-240, 2007.

PAREJO, I.; VILADOMAT, F.; BASTIDA, J.; ROSAS-ROMEIO, A.; FLERLAGE, N.; BURILLO, J. Comparison between the radical-scavenging activity and antioxidant activity of six distilled and non-distilled mediterranean herbs and aromatic plants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p.6882–6890, 2002.

PASCUAL, M.E.; SLOWING, K.; CARRETERO, E.; MATA, D.S.; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 76, p.201-214, 2001.

PIETTA G. Flavonoids as antioxidants. **J Nat Prod**, v.63, p.1035-1042, 2000

PINO, J.A.; ORTEGA, A.; ROSADO, A. Chemical composition of the essential oil of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown Cuba. **Journal of Essential Oil Research**, v.8, p.445-446, 1996.

POKORNY J. Natural antioxidant for food use. **Trends in Food Science Technology**, v.9, p. 223-227, 1991.

PORTER, W. L. Paradoxal behavior of antioxidants in foods and biological systems. **Toxicological and Industrial Health**. London, v.9, p.93-122, 1993.

PRAKASH, A. Antioxidant activity. **Medallion Laboratories-Analytical Progress Press**, v.19, p.1-6, 2001.

PRIOR, R.L.; WU, X.; SCHAICH, K. Standardized Methods for the Determination Antioxidant Capacity and Phenolics in Foods and Dietary Supplements. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.10, p. 4290-4302, 2005.

PUERTAS-MEJIA, M.; HILLEBRAND, S., STASHENKO, E., WINTERHALTER, P. *In vitro* radical scavenging activity of essential oils from Columbian plants and fractions from oregano (*Origanum vulgare* L.) essential oil. **Flavour and Fragrance Journal**, v.17, p.380–384, 2002

PULIDO, R.; BRAVO, L.; CALIXTO, F.S. Antioxidant Activity of Dietary Polyphenols As Determined by a Modified Ferric Reducing/Antioxidant Power Assay. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v.48, p.3396-3402, 2000.

RANGKADILOK, N.; SITTHIMONCHAI, S.; WORASUTTAYANGKURN, L.; MAHIDOL, C.; RUCHIRAWAT, M.; SATAYAVIVAD, J. **Evaluation of free radical scavenging and antityrosinase activities of standardized longan fruit extract**, v.45, p.328-336, 2007.

RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, v.26, p.1231-1237, 1999.

REGLERO, R. G. J.; TABERA, G. J. J.; IBAÑEZ, E. M.; LOPEZ-SEBASTIAN, L. S.; RAMOS, M. E.; BALLESTER, S. L.; BUENO, M. J. M. Proceso de extracción con fluidos supercríticos para la producción de antioxidantes naturales y antioxidante obtenido mediante dicho proceso. **Patente España**, p. 128-99, 1999.

RICE-EVANS, C.A.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in plant science**, v.2, 1997.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P.D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their roles in oxidative process in fruits. **Food Chemistry**, v.66, p.401-436, 1999.

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

SAAD, B.; SING, Y.Y.; NAWI, M.A.; HASHIM, N.; ALI, A.S.M.; SALEH, M.I.; SULAIMAN, S.F.; TALIB, K.M.; AHMAD, K. Determination of synthetic phenolic antioxidants in food items using reversed-phase HPLC. **Food Chemistry**, v.105, p. 389-394, 2007.

SACCHETTI, G.; MEDICI, A.; MAIETTI, S.; RADICE, M.; MUZZOLI, M.; MANFREDINI, S.; BRACCIOLI, R. Composition and functional properties of the essential oils of Amazonian basil, *Ocimum micranthum* Wild., Labiatae in comparison with commercial essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.3486-3491, 2004.

SALDANHA, L.A. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* de extrato de erva mate (*Ilex paraguariensis*) verde e tostada e chá verde (*Camellia sinensis*)**. 2005. Dissertação de Mestrado. Univesidade de São Paulo. 2005.

SANTOS, F.J.B.; LOPES, J.A.D.; CITO, A.M.G.L.; OLIVEIRA, E.H.; LIMA, S.G.; REIS, F.A.M. Composition and biological activity of essential oil from *Lippia organoides* H.B.K. **Journal of Essential Oil Research**, v.16, p.504-506, 2004.

SARIKURKCU, C.; TEPE, B.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; HARMANDAR, M. Studies on the antioxidants activity of the essential oil and methanol extract of *Marrubium globosum* subsp. *Globosum* (Lamiaceae) by three different chemical assays. **Biosource Technology**, 2007.

SCHREIBELT, G.; HORSSENA, J.V.; ROSSUMA, S.V.; DIJKSTRAA, C.D.; DRUKARCHB, B.; VRIESA, H.E. Therapeutic potential and biological role of endogenous antioxidant enzymes in multiple sclerosis pathology. **Brain Research Review**, v.56, p.322-330, 2007.

SILVA, E.M. **Otimização de métodos de análise de antocianinas: atividade antioxidante e quantificação rápida**. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Federal do Pará, 2002.

SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEZ, H.; REES, J.F.; LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v.101, p.1012-1018, 2007.

SILVA, J.K.R **Avaliação da capacidade antioxidativa e toxicológica do óleo essencial e extrato metanólico de *Aniba Canellila* (HBK) Mez.** (2006). Dissertação de Mestrado. Belém: UFPA/CCEN, 91p, 2006.

SILVA, J.K.R.; REBELO, M.M.; ANDRADE, E, H.A.; SOUSA, P.J.C.; MAIA, J.G.S. **Toxicidade dos óleos essenciais e extratos de *Aniba anellila*, *Conohea scoparioides* e *Hyptis crenata***. Sociedade Brasileira de Química, 2007. ???

SILVA, N.A. **Capacidade antioxidativa, toxicidade e análise sensorial de *Lippia schomburgkiana* Schauer.** (2007). Dissertação de Mestrado. Belém: UFPA/CCEN, 92p, 2007.

SILVA, J.; ABEBE, W.; SOUSA, S.M.; DUARTE, V.G.; MACHADO, M.I.L.; MATOS, F.J.A. Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Eucalyptus*. **Journal of Ethnopharmacology**, v.89, p.277-283, 2003.

SIMÕES, C.M.O.; SCHNKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5ª edição. Porto Alegre/Florianópolis, Ed. UFRGS/Ed.UFSC, 2004, 1102p.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A. Colorimetry of total phenolic with phosphomolybdicphosphotungstic reagents. **American Journal Enology Viticulture**, v.16, p.144-158, 1965.

SOUZA, J.N.S.; SILVA, E.M. LOIR, A REES, J.F.ROGEZ, H.LARONDELLE, Y. Analytical, Nutritional and Clinical Methods Antioxidants capacity of four polyphenols-rich Amazonian plant extracts: A correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. **Food Chemistry**, v.106, p.331-339, 2008.

TEPE, B.; SOKMEN, A. Screening of the antioxidative properties and total phenolic contents of three endemic *Tanacetum* subspecies from Turkish flora. **Biosource Technology**, v.98, p. 3076-3079, 2007.

TERBLANCHÉ, F.C.; KOENELIUS, G. Essential constituents of the genus *Lippia* (Verbenaceae) – A literature review. **Journal Essential Oil Research**, v.8, p. 471-485, 1996.

TONKONOGLI, M.; SAHLIN, K. Physical exercise and mitochondrial function in human skeletal muscle. **Exerc. Sport. Sci. Rev.**, v.30, p.129-37, 2002.

VELASCO-NEGUERELA, A.; PÉREZ-ALONSO, M.; GUZMÁN, C.A.; ZYGADLO, J.A.; ARIZA-ESPINAR, L.; SANZ, J.; GARCÍA-VALLEJO, M.C. Volatile constituents of four *Lippia* species from Córdoba (Argentina). **Journal of Essential Oil Research**, v.5, p.513-524, 1993.

VERDCOURT B. Verbenaceae. **In: Flora of Tropical East Africa**, p. 27, Balkema AA/Brookfield, Rotterdam. 1992.

VERMIN, G.; LAGEOT, C.; GAUDOU, E.M.; PARKANYI, C. Analysis of the essential oil of *Lippia graveolens* HBK from El Salvador. **Journal of Flavour and Fragrance**, v.16, p. 219-226, 2001.

VOLLAARD, N.B.; SHEARMAN, J.P.; COOPER, C.E. Exercise-induced oxidative stress: myths, realities and physiological relevance. **Sports Med.**, v.35, p.1045-62, 2005.

WANG, S. Y. Antioxidant capacity of berry crops, culinary herbs and medicinal herbs. **Acta Horticulture**, v.620, p.461–473, 2003.

WOJDYŁO, A.; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chemistry**, v.105, p.940-949, 2007.

WU, X.; BEECHER, G. R.; HOLDEN, J. M.; HAYTOWITZ, D. B.; GEBHARDT, S. E.; PRIOR, R. L. Lipophilic and hydrophilic antioxidant capacities of common foods in the United States. **Journal of the Agricultural and Food Chemistry**, v.52, p.4026–4037, 2004.

YAMAGUCHI, T.; TAKAMURA, H.; TERUYOSHI, M.; TERAOKA, J. HPLC Method for evaluation of the free radical scavenging activity of foods by using 1,1-diphenyl-2-picrylhydrazyl. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, v.62, p.1201-1204, 1998.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality methods for medicinal plant materials**. Geneva: WHO, 115, p.1998.

ZHANG, C.X.; WU, H.; WENG, X.C. Two novel synthetic antioxidants for deep frying oils. **Food Chemistry**, v.84, p.219-222, 2004.

ZHENG, W.; WANG, S.V. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, v.49, p.5165-5170, 2001.

ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; SANTOS, A.S.; SILVA, M.H.L.; MAIA, J.G.S. Essential oils of *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br growing wild in the Brazilian Amazon. **Flavour and Fragrance Journal** v. 13, p. 47-48, 1998.

ZOGHBI, M.G.B.; ANDRADE, E.H.A.; SILVA, M.H.L.; MAIA, J.G.S. Volatile constituents of *Lippia lupulina* Cham. **Flavour and Fragrance Journal** , v.17, p. 29-31, 2001.