



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia gracilis* e *Lippia organoides* DA
AMAZÔNIA ORIENTAL

Caroline da Silva Franco

BELÉM-PA

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia gracilis* e *Lippia organoides* DA
AMAZÔNIA ORIENTAL

Autor: Caroline da Silva Franco

Orientador: Prof^o. Dr. José Guilherme Soares Maia

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Joyce Kelly do Rosário da Silva

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

BELÉM-PA

2012

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Biblioteca do Instituto de Ciências da Saúde – UFPA

Franco, Caroline da Silva.

Avaliação da composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de *Lippia gracillis* e *Lippia organóides* da Amazônia Oriental / Caroline da Silva Franco; orientador, José Guilherme Soares Maia, co-orientadora, Joyce Kelly do Rosário da Silva — 2012.

Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas (PPGCF), Belém, 2012.

1. *Lippia gracillis*. 2. *Lippia organóides*. 3. Óleos essenciais. 4. Atividade antifúngica. 5. Atividade antioxidante. 6. Toxicidade. I. Título.
-

CAROLINE DA SILVA FRANCO

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Lippia gracilis* e *Lippia organoides*
DA AMAZÔNIA ORIENTAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, área de concentração: Fármacos e Medicamentos, do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 17 de outubro de 2012

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Guilherme Soares Maia – UFPA
Orientador

Prof^a. Dr^a. Eloísa Helena Aguiar Andrade - UFPA

Prof. Dr. José Maria dos Santos Vieira - UFPA

Aos meus pais Sandra e Soraldo Franco, as pessoas mais importantes da minha vida, pela minha educação, por todo amor, carinho e incentivo que sempre me deram.

Aos meus irmãos André e Matheus Franco pela amizade, amor, carinho e companheirismo.

Ao meu namorado Deny Vilhena pela amizade, amor e compreensão e companheirismo em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por ter me iluminado e permitido ter chegado até aqui.

Agradeço especialmente ao Professor José Guilherme Maia por sua orientação, apoio, paciência e consideração durante esses anos de trabalho.

À Professora Joyce Kelly pela orientação, apoio, paciência e principalmente sua amizade em todos os momentos. Você foi fundamental para que eu chegasse até aqui.

Ao apoio financeiro fornecido pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Pará (FAPESPA).

Aos colegas e professores do laboratório de engenharia de Produtos Naturais da UFPa (LEPRON).

À professora Eloísa Andrade por sua colaboração na análise da composição química dos óleos essenciais.

À professora Maria Cláudia Young do Instituto de Botânico de São Paulo por fornecer as cepas dos fungos *Cladosporium* para os testes de Bioautografia.

Aos meus pais Sandra e Soraldo Franco que sempre acreditaram em mim e me fizeram tudo o que sou hoje através da amizade, amor, carinho, educação e apoio que me sempre me deram. Vocês são as pessoas mais importantes da minha e vida. Muito obrigada por nunca me faltarem!

Aos meus irmãos André e Matheus Franco, meus melhores amigos e companheiros, que sempre estiveram do meu lado me ajudando e incentivando e que estarão comigo para o resto da minha vida. Amo muito vocês!

Aos meus queridos primos-irmãos e amigos Diana, Dimara e Edilberto Franco pela sincera amizade.

À minha querida avó Vitória Lobato por sempre se fazer presente na minha vida me incentivando e ajudando em todos os momentos.

Às minha amigas de longa data Dilcilene Reis e Paula Mayra pela amizade, que mesmo com a distância, permanece por todos esses anos.

Às minhas queridas amigas de graduação Clédja Soares e Nayla Nunes pela amizade e incentivo que me deram por todos esses anos.

Às amigas que fiz durante o mestrado: Meire Silveira, Kaira Souza e Diane Cunha por toda amizade e companheirismo, pelas gargalhadas e muitos momentos felizes vividos. Com vocês essa trajetória se tornou mais doce.

Ao meu amigo Ramon Nascimento, ao Sr. Luís Melo e a Sra. Maria do Socorro Nascimento por todo o apoio, amizade e carinho que me deram nessa fase final do trabalho.

Ao meu namorado Deny Vilhena por nunca me deixar fraquejar e sempre estar ao meu lado nos momentos felizes e nas horas mais difíceis. Obrigada meu amor por toda a paciência, companheirismo e amizade que você dedica à mim, sem você eu não conseguiria.

À todos os meus amigos e familiares.

À todas as pessoas que de maneira direta ou indireta ajudaram para a realização desse trabalho.

RESUMO

O gênero *Lippia* é conhecido por seu caráter aromático e uso medicinal de suas espécies como uma alternativa terapêutica. Os óleos essenciais de *Lippia gracilis* e *L. organoides* coletados no Pará e no Maranhão foram obtidos por hidrodestilação e mostraram-se ricos em monoterpenos. Os compostos majoritários do óleo de *L. gracilis* foram o timol (72,5%); *p*-cimeno (9,3%) e o éter metílico do timol (5,4%); para o óleo de *L. organoides* foram timol (45,8%), *p*-cimeno (14,3%), γ -terpineno (10,5%) e carvacrol (9,9%). Os óleos apresentaram potencial larvicida frente à *Artemia salina* com valores de CL_{50} de $7,4 \pm 0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *L. organoides* e de $18,7 \pm 0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *L. gracilis*, ambas mais ativas que o lapachol ($CE_{50} = 21,2 \pm 2,2 \mu\text{g/mL}$). O óleo essencial de *L. gracilis* apresentou moderada capacidade de sequestro do radical DPPH com valor de $CE_{50} = 35,7 \pm 3,32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ cerca de 8 vezes menos ativo que o padrão trolox (CE_{50} de $4,5 \pm 0,1$).

Além disso, o óleo de *L. gracilis* mostrou-se um bom fungicida natural frente ao fitopatógeno *C. sphaerospermum* com limite de detecção de 5 μg , cerca de 10 vezes menos ativo que o miconazol ($L_D = 0,5 \mu\text{g}$). Por outro lado, o óleo de *L. organoides* não mostrou atividade expressiva ($L_D = 100 \mu\text{g}$).

Palavras-chave: *Lippia gracilis*, *Lippia organoides*, Óleo essencial, Atividade antifúngica, Atividade antioxidante, Toxicidade.

ABSTRACT

The genus *Lippia* is known for its aromatic character and medicinal use of its species as an alternative therapy. Essential oils of *Lippia gracilis* and *L. origanoides* collected in Pará and Maranhão were obtained by hydrodistillation and were rich in monoterpenes. The major compounds oil of *L. gracilis* were thymol (72.5%), p-cymene (9.3%) and thymol methyl ether (5.4%); for oil of *L. origanoides* were thymol (45.8%), p-cymene (14.3%), γ -terpinene (10.5%) and carvacrol (9.9%). The oils had potential larvicide against *Artemia salina* with LC₅₀ values of $7.4 \pm 0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ to *L. origanoides* and $18.7 \pm 0.2 \mu\text{g.mL}^{-1}$ to *L. gracilis*, both more active than lapachol (EC₅₀ = $21.2 \pm 2.2 \mu\text{g/ ml}$). The essential oil of *L. gracilis* showed moderate scavenging capacity DPPH with EC₅₀ value = $35.7 \pm 3.32 \mu\text{g.mL}^{-1}$ about 8 times less active than the standard trolox (EC₅₀ of 4.5 ± 0.1). Furthermore, the oil *L. gracilis* proved to be a good natural fungicide against the phytopathogen *C. sphaerospermum* with limit of detection of 5 μg , about 10 times less active than miconazole (D_L = 0.5 μg). Moreover, the oil *L. origanoides* no showed significant activity (D_L = 100 μg).

Keywords: *Lippia gracilis*, *Lippia origanoides*, essential oil, antifungal activity, antioxidant activity, toxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1	<i>Lippia origanoides</i> Schauer.....	17
FIGURA 2	<i>Lippia gracilis</i> Schauer.....	18
FIGURA 3	<i>Cladosporium sphaerospermum</i> cultivado em placa de petri.....	10
FIGURA 4	Sequestro do DPPH* por um antioxidante.....	22
FIGURA 5	<i>Artemia salina</i> em um estágio de desenvolvimento de 15 dias vista ao microscópio óptico.....	24
FIGURA 6	Sistemas de vidro do tipo Clevenger modificado, acoplados a sistemas de refrigeração.....	28
FIGURA 7	Estrutura química do timol e do 1,8-cineol.....	34
FIGURA 8	Modelo do gráfico utilizado para o cálculo do valor da CL ₅₀ das amostras (dados de <i>L. gracilis</i>).....	36
FIGURA 9	Estrutura química do lapachol.....	37
FIGURA 10	Resultados da atividade de sequestro do radical DPPH para o óleo essencial de <i>L. gracilis</i>	39
FIGURA 11	Bioautograma do óleo essencial de <i>L. gracilis</i>	40

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Rendimento e umidade dos óleos essenciais.....	33
TABELA 2	Composição química dos óleos essenciais em porcentagem relativa (%) para as espécies de <i>Lippia</i>	35
TABELA 3	Valores da CL ₅₀ para as amostras de óleos essenciais.....	37
TABELA 4	Toxicidade do padrão lapachol frente às larvas de <i>A. salina</i>	37
TABELA 5	Valor da CE ₅₀ do óleo essencial de <i>L. gracilis</i>	38
TABELA 6	Limites de detecção (LD) dos óleos essenciais frente ao fungo <i>C. sphareospermum</i>	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCD	Cromatografia em camada delgada
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência adquirida
DNA	Ácido desoxirribonucleico
BHA	Hidroxianisol de butila
BHT	Hidroxitolueno de butila
DPPH	1,1-Difenil-2-procririhidrazila
CG-DIC	Cromatografia em fase gasosa com detectores de ionização de chamas
CG/EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
DMSO	Dimetilsulfóxido
CL ₅₀	Concentração letal para causar 50% de morte da população
BDA	Batata Dextrose Ágar
b. l. u	Base livre de umidade
IR	Índice de retenção

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	13
2.	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral.....	15
2.2	Objetivos Especificos.....	15
3.	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	GÊNERO <i>LIPPIA</i>	16
3.1.1	<i>Lippia origanoides</i>	17
3.1.2	<i>Lippia gracilis</i>	18
3.2	BIOAUTOGRAFIA DIRETA.....	18
3.2.1	<i>Cladosporium</i>	18
3.2.2	Bioautografia.....	19
3.3	ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	20
3.3.1	Antioxidantes.....	20
3.3.2	Radicais livres.....	22
3.3.3	Estresse oxidativo.....	22
3.3.4	Método do sequestro do radical DPPH (1,1-Difenil-2-procrririhidrazila).....	22
3.4	TOXICIDADE.....	23
3.4.1	Ensaio biológico com larvas de <i>Artemia salina</i>	23
3.4.2	<i>Artemia salina</i> Leach.....	23
3.4.3	Avaliação da toxicidade.....	24
3.4.4	Correlação entre o bioensaio com <i>Artemia salina</i> e atividade biológica.....	24
4.	MATERIAL E MÉTODOS	26
4.1	MATERIAL UTILIZADO.....	26
4.1.1	Equipamentos e acessórios.....	26
4.1.2	Reagentes utilizados nos ensaios de toxicidade e análise oxidativa.....	26
4.1.3	Padrões utilizados.....	27
4.2	METODOLOGIA.....	27

4.2.1	Coleta e processamento do material vegetal.....	27
4.2.2	Obtenção dos óleos essenciais.....	27
4.2.3	Cálculo do rendimento e umidade.....	28
4.2.4	Análise da composição química dos óleos essenciais.....	28
4.2.5	Bioensaio de toxicidade em <i>Artemia salina</i> Leach.....	29
4.2.5.1	Cultura das larvas.....	29
4.2.5.2	Preparo das amostras e cálculo da CL ₅₀	29
4.2.6	Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH.....	30
4.2.6.1	Preparo da solução de DPPH.....	30
4.2.6.2	Inibição do radical DPPH.....	30
4.2.7	Bioensaio da capacidade antifúngica utilizando o método da bioautografia.....	31
4.2.7.1	Preparo do meio de Cultura.....	31
4.2.7.2	Aplicação das amostras nas placas.....	31
4.2.7.3	Preparo da solução nutritiva e nebulização dos esporos.....	31
4.2.8	Análise estatística.....	32
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	33
5.1	RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS ESPÉCIES DE <i>LIPPIA</i>	33
5.2	BIOENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE <i>ARTEMIA SALINA</i> LEACH.....	36
5.2.1	Toxidade dos óleos essenciais.....	36
5.3	DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE DPPH.....	38
5.4	BIOENSAIO DA CAPACIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE À <i>C. SPHAREOSPERMUM</i>	39
6.	CONCLUSÕES.....	41
	REFERÊNCIAS.....	42

1. INTRODUÇÃO

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade por milhares de anos. A busca por alívio e cura de doenças através da ingestão de ervas e folhas talvez tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa (VIEGAS JR & BOLZANI, 2006).

Os óleos essenciais são produtos naturais utilizados como agentes medicinais desde a antiguidade. O uso de óleos essenciais em alimentos, bebidas, higiene pessoal vem ganhando importância devido a preocupação com a utilização de aditivos sintéticos nesses produtos que podem ser prejudiciais a saúde. Os óleos essenciais têm sido propostos para o controle de doenças humanas como as doenças provenientes da peroxidação lipídica que causam arteriosclerose, doença de Alzheimer, carcinogênese e o envelhecimento (RUBERTO & BARATTA, 2000; MIMICA-DURIK et al., 2004).

Entre as plantas utilizadas como medicinais, destacam-se as espécies da família Verbenaceae pertencente à ordem Lamiales. Os gêneros mais representativos em número de espécies são: *Verbena*, *Lippia*, *Citharexylum*, *Stachytarpheta*, *Glandularia* e *Duranta* (JUDD, 2002). O gênero *Lippia* é o segundo maior da família Verbenaceae (GOMES et al., 2011). Inúmeras propriedades farmacológicas estão relacionadas a espécies deste gênero como a atividade antimicrobiana sobre diversos microrganismos (BASSOLE, 2002).

A avaliação da bioatividade e toxicidade de substâncias orgânicas, sejam elas provenientes de plantas ou produtos sintéticos, é pouco viável em laboratórios tradicionais de química, farmacologia ou microbiologia. A necessidade de se realizar ensaios com procedimentos simples e rápidos levou à busca de metodologias (CAVALCANTE et al., 2000). Métodos usando bioautografia em CCD possuem boa compatibilidade com um grande número de amostras e têm grande utilidade para rastrear extratos de plantas. Para a triagem inicial dos óleos, são utilizados bioensaios simples, rápidos, baratos e com boa reprodutibilidade. Uma das vantagens é o emprego de pequenas quantidades de amostra (MARSTON et al., 2002). Recentemente, tem havido um crescente interesse em a busca por especiarias, plantas aromáticas e medicinais, como fontes de antioxidantes naturais.

No geral, a capacidade antioxidante desses tecidos vegetais está associada com a atividade das enzimas sequestrar o radical livre e com o conteúdo de substâncias antioxidantes, principalmente compostos fenólicos (RUBERTO & BARATTA, 2000; MIMICA-DURIK et al., 2004).

Diante do grande potencial dos produtos naturais e óleos essenciais e da necessidade de se realizar testes rápidos em plantas medicinais com uso tradicional para a descoberta de novos fármacos, principalmente antimicóticos mais eficazes e seguros e com poucos efeitos colaterais a busca de novos compostos antioxidantes que tem importante papel no sistema de defesa do corpo humano. Sendo assim, esse trabalho justifica-se pelo uso de procedimentos simples para testar espécies de *Lippia* que apresentam uma extensa lista de atividades biológicas e farmacológicas entre elas antimicrobianas e antioxidantes e correlacionar essas atividades com a composição química das amostras.

1. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a composição química dos óleos essenciais de *Lippia* e avaliar suas atividades biológicas.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção do óleo essencial das espécies de *Lippia*.
- Avaliação das atividades antioxidantes e antifúngicas dos óleos essenciais de espécies de *Lippia*;
- Avaliação da toxicidade dos óleos essenciais das espécies de *Lippia* coletadas.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 GÊNERO *LIPPIA*

Espécies de Verbenaceae estão distribuídas em 100 gêneros com ocorrência nas regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo como nas regiões áridas do sudoeste dos EUA, nas florestas tropicais da América Central e nos campos rupestres e cerrados do Brasil. Estendem-se até o Uruguai e região central da Argentina. Na África, a ocorrência também coincide com centros de alto endemismo, na região leste, associada às montanhas mais altas e picos alpinos (SALIMENA, 2000). Estas espécies são utilizadas na medicina tradicional e seu potencial biológico está associado à presença de vários compostos químicos com atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e citotóxica (BLOOR, 1995).

O gênero *Lippia* foi primeiramente descrito em 1753 por Linnaeu e atualmente reúne 200 espécies e três centros de diversidade, o Brasil é o maior deles com 111 espécies (SALIMENA, 2002). Está incluído na tribo Lantanaceae Briq., subtribo Lantaninae (JUNELL, 1934) e morfologicamente se assemelha à *Lantana* L., do qual se difere por apresentar fruto esquizocárpico, separado em dois mericarpos unisseminados quando maduro e cálice comprimido, muito reduzido, tubuloso ou conato na base, bilobado (SANDERS, 2001). É conhecido por seu caráter aromático e mais de cinquenta tipos de óleos essenciais têm sido relatados (TERBLACHÉ & KORNELIUS, 1996; PASCUAL et al., 2001).

Os principais constituintes voláteis freqüentemente encontrados nos óleos de espécies de *Lippia* são timol, carvacrol, 1,8-cineol, limoneno, *p*-cimeno, linalol, α -pineno e β -cariofileno. Muitas espécies de *Lippia* mostram variações intraespecíficas para os componentes de seus óleos essenciais (MATOS et al., 1996; ZOGHBI et al., 1998; ATTI-SERAFINI et al., 2002)

Espécies de *Lippia* são usadas na medicina tradicional como uma alternativa terapêutica devido as suas conhecidas atividades como: analgésica, antiinflamatória, antitérmica, sedativa, antifúngica, anti-hipertensiva, diurética, larvicida, antimicrobiana, antiviral, moluscicida, antimalárica, anticonvulsivantes, anti-espasmódica e atividades estimulantes (VALENTIN et al., 1995; PASCUAL et al., 2001;. ABENA et al., 1998, MONTEIRO et al., 2007).

Nos últimos anos, estudos estão sendo desenvolvidos para a determinação da atividade antimicrobiana de extratos de plantas, e uma grande variedade destes extratos demonstram atividade sobre um extenso número de microrganismos. O extrato de *Lippia sidoides* Cham. possui efeito inibitório utilizando o teste de difusão em disco frente a diversos microrganismos como *Streptococcus mitis*, *S. sanguinis* e *S. mutans*, *S. sobrinuse*, *Lactobacillus casei* com formação de halos de inibição variando de 14 a 23 mm (ALBUQUERQUE, 2007).

3.1.1 *Lippia origanoides*



FIGURA 1 - *Lippia origanoides* Schauer

Lippia origanoides Schauer é um arbusto aromático até 1,8 m de altura, conhecida popularmente como "erva-do-marajó", cresce em áreas de savanas do Norte do Brasil. Na Amazônia suas folhas e galhos são usados para dar sabor aos alimentos e seu chá no tratamento de doenças do estômago e do fígado e em problemas menstruais (MAIA et al., 2001; VERDCOURT, 1992). As variações nas quantidades dos compostos majoritários encontrados em várias amostras de óleos de *L. Origanoides* como o carvacrol, timol, β -cariofileno, p-cimeno, β -mirceno, α -humuleno e γ -terpineno) levaram à classificação da sua composição química por quimiotipos diferentes. Na literatura são encontrados relatos de atividades biológicas e farmacológicas dos óleos essenciais de *L. origanoides*, apresentando principalmente atividades antifúngicas e antibacterianas (OLIVEIRA et al., 2007; DOS SANTOS et al., 2004).

3.1.2 *Lippia gracilis*



FIGURA 2 - *Lippia gracilis* Schauer

Lippia gracilis Schauer é uma planta aromática endêmica do nordeste brasileiro, próprio da vegetação semiárida, conhecida popularmente como “alecrim-da-chapada” ou “alecrim-de-serrote”. É encontrada predominantemente nos estados da Bahia, Sergipe e Piauí (LORENZI & MATOS, 2000). As folhas de *L. gracilis* são usadas no tratamento de infecções da garganta e boca e de problemas vaginais, além disso, são empregadas em tratamentos dermatológicos para acne, panos brancos, impigens, caspa, queimaduras e feridas (GIRÓN et al., 1991; MATOS, 1999).

Algumas espécies de *Lippia* são caracterizadas pela presença de óleos essenciais com atividade antimicrobiana, devido aos monoterpenos fenólicos timol e carvacrol. Dentre estas espécies, destaca-se a *L. gracilis* que apresenta altos teores destes monoterpenos (MATOS et al., 1999).

3.2 BIOAUTOGRAFIA DIRETA

3.2.1 *Cladosporium*

Os fungos são organismos eucariontes, filamentosos ou unicelulares, são heterotróficos e nutrem-se por absorção. São encontrados no solo, plantas, materiais inorgânicos e em ambientes úmidos como carpetes aparelhos condicionadores de ar e umidificadores. Sua reprodução ocorre sexuada ou assexuadamente, germinando em níveis variáveis de pH. Apresentam parede celular

rígida e são aptos a sobreviver em condições adversas como frio intenso, ou longos períodos de seca (PEREIRA, 2007).

Cladosporium é considerado um dos fungos mais cosmopolitas, particularmente em regiões temperadas, onde age como invasor secundário de vegetação morta, seus esporos são considerados importantes alérgenos em todo o mundo e sua prevalência em reações alérgicas mostra grandes variações entre diferentes regiões (SANTOS et al, 2003).

Cladosporium sphaerospermum e *C. cladosporioides* são espécies semelhantes e bastante comuns, com ocorrência registrada em todas as partes do mundo. São saprófitas, contaminante do ar de alimentos, endofíticos com função biológica importante na decomposição de matéria orgânica sendo também forte competidor com outros microrganismos. A característica definitiva entre as duas espécies é o formato do conídio, elipsoidal ou limiforme, sendo raramente encontrado conídios com formato globoso ou subgloboso (DOMSCH et al., 1993; ELLIS, 1971; SAMSON et al., 2000; PEREIRA et al., 2005).

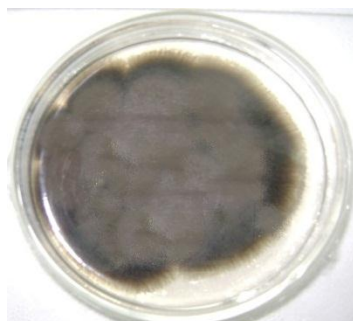


FIGURA 3 – *Cladosporium sphaerospermum* cultivado em placa de petri.

3.2.2 Bioautografia

A bioautografia é um método útil para a localização de substâncias com ação antimicrobiana encontradas em óleos, extratos ou em frações complexas, como os derivados dos produtos naturais (CAMPOS, 2006). Muitas pesquisas são realizadas para a obtenção de novos agentes antimicóticos, tendo em vista a expansão de micoses sistêmicas incluindo aquelas derivadas de casos de AIDS.

Sendo assim, a bioautografia direta, um teste que combina a cromatografia em camada delgada (CCD) e o teste biológico *in situ* é considerada uma excelente técnica para conduzir a fácil localização dos compostos ativos em uma matriz complexa. No método de bioautografia direta os fungos *C. sphaerospermum* e *C. cladosporioides* são empregados como detectores dos compostos tóxicos, óleos essenciais e extratos brutos etanólicos (HOMANS & FUCHS, 1970) *apud* da Silva et al. (2002).

3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

3.3.1 Antioxidantes

Nos últimos anos, uma quantidade substancial de evidências tem indicado o papel chave dos radicais livres e outros oxidantes como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (SOUSA et al., 2007).

Os antioxidantes são substâncias capazes de prevenir os efeitos deletérios da oxidação pela inibição da lipoperoxidação, sequestro de radicais livres e/ou quelatação de íons metálicos. Os antioxidantes podem ser divididos em duas classes: os com atividade enzimática e os sem atividade enzimática. No primeiro grupo estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. No segundo grupo estão moléculas que interagem com espécies radicalares e são consumidas durante a reação. Neste grupo incluem-se os antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos (MOREIRA & MANCINI FILHO, 2003).

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de um ou mais mecanismos, tais como inibição de radicais livres e complexação de metais. Podem ser sintéticos ou naturais. Alguns dos antioxidantes sintéticos mais importantes são hidroxianisol de butila (BHA) e o hidroxitolueno de butila (BHT) e entre os naturais destacam-se ácido ascórbico, vitamina E e β -caroteno (RICE-EVANS et al., 1996).

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. Entretanto, o metabolismo do oxigênio nas células vivas também leva à produção de radicais. Oxidantes são compostos produzidos pelo metabolismo normal do corpo e se não controlados, podem provocar danos extensivos. O estresse oxidativo tem sido associado ao desenvolvimento de muitas doenças crônicas e degenerativas, incluindo o câncer, doenças cardíacas, doenças degenerativas como Alzheimer, bem como está envolvido no processo de envelhecimento. O balanço entre o estresse oxidativo e as funções antioxidantes dos organismos vivos parece ter um papel na carcinogênese. Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado evidências de que antioxidantes fenólicos de cereais, frutas e vegetais são os principais fatores que contribuem para a baixa e significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas encontradas em populações cujas dietas são altas na ingestão desses alimentos. (ROESLER, et al., 2007).

3.3.2 Radicais livres

As moléculas orgânicas e inorgânicas e os átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados, com existência independente, podem ser classificados como radicais livres (HALLIWELL, 1994). Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas. A presença dos radicais é crítica para a manutenção de muitas funções fisiológicas normais (POMPELLA, 1997). Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; YU & ANDERSON, 1997). Entre as principais formas reativas de oxigênio o O_2^- apresenta uma baixa capacidade de oxidação, OH^- mostra uma pequena capacidade de difusão e é o mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. O H_2O_2 não é considerado um radical livre verdadeiro, mas é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos na molécula de DNA por meio de reações enzimáticas (ANDERSON, 1996).

espécie radicalar, o DPPH• é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração amarela, com consequentemente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância. A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou a porcentagem de DPPH• remanescente no meio reacional (SOUSA et al., 2007). A porcentagem de atividade antioxidante (%AA) corresponde à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante. A quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% é denominada concentração eficiente (CE₅₀), também chamada de concentração inibitória (CI₅₀). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor será a sua CE₅₀ e maior a sua atividade antioxidante (SOUSA et al., 2007).

3.4 TOXICIDADE

3.4.1 Ensaio biológico com larvas de *Artemia salina*

Existe uma grande necessidade de bioensaios os quais possam detectar um amplo espectro de atividades biológicas em plantas e, que além de confiáveis, possam ser empregados para produtos químicos naturais, que sejam rápidos, fáceis e de baixo custo, para monitorar o fracionamento e triagem fitoquímica. O ensaio de toxicidade utilizando larvas de *A. salina* preenche a esses requisitos, sendo muito útil no biomonitoramento da atividade de extratos e plantas (MEYER et al.,1982; SIQUEIRA, 2001).

3.4.2 *Artemia salina* Leach

Artemia salina é um crustáceo da classe Anostracea, que vive em águas salinas e salobras de todo o mundo. Apresenta quatro estágios de desenvolvimento (ovo, náuplio, metanáuplio e adulto) e alguns mecanismos de adaptação que as tornam cosmopolitas, como a osmorregulação, a presença de pigmentos respiratórios como a hemoglobina e a disponibilidade de alternativas reprodutivas que facilitam a dispersão e a perpetuação dessa espécie. Essas alternativas de reprodução se referem à oviparidade, viviparidade, partenogênese e encistamento (diapausa), quando as condições ambientais são impróprias. Os indivíduos adultos

apresentam notável dimorfismo sexual e, em condições adequadas, é possível eclodir simultaneamente as larvas em cultura (LOPES, 2005).



FIGURA 5- *Artemia salina* em um estágio de desenvolvimento de 15 dias vista ao microscópio óptico. Fonte: www.bioaquatica.blogspot.com

3.4.3 Avaliação da toxicidade

O ensaio da letalidade de *Artemia salina* foi proposto por Michael, Thompson e Abramovitz (1956), e mais tarde desenvolvido por Vanhaecke et al. (1981) e Sleet e Brendel (1983). O ensaio consiste em avaliar a capacidade das amostras em causar a morte dos microcrustáceos de *Artemia salina* cultivados em laboratórios. É considerado como uma ferramenta útil para a avaliação preliminar da toxicidade, sendo empregado para detecção de toxinas fúngicas, toxicidade de extratos e óleos de plantas, metais pesados, toxinas de cianobactérias, pesticidas e teste de citotoxicidade de materiais dentários (CARBALLO et al., 2002).

A letalidade de organismos simples é utilizada para um rápido monitoramento da resposta biológica (MEYER et al., 1982). O ensaio de letalidade permite a avaliação da toxicidade geral e, portanto, é considerado essencial como bioensaio preliminar no estudo de compostos com potencial atividade biológica (COLEGATE & MOLYNEUX, 1993).

3.4.4 Correlação entre o bioensaio com *Artemia salina* e atividade biológica

Alguns autores afirmam que não existe nenhuma correlação entre o bioensaio com *A. salina* e os efeitos toxicológicos em um animal inteiro (HARTL & HUMPF, 2000; PIMENTA et al., 2003), no entanto, é válido acrescentar que diversos trabalhos tentam correlacionar a toxicidade sobre esta espécie com outras

atividades biológicas, como antifúngica, antiviral, antimicrobiana, parasiticida, antitumoral e tripanocida (SAHPAZ et al., 1994). MCLAUGHLIN e colaboradores (1993) investigaram a utilização do ensaio com *A. salina* como um “*pré-screening*” da atividade antitumoral de extratos de plantas, determinando uma correlação positiva entre letalidade do “camarão de salmoura” e a toxicidade.

Os metabólitos do fungo *Fusarium sheldon*, encontrado em plantações de milho, tiveram suas toxicidades comparadas utilizando o bioensaio, que provou ser um sistema conveniente e rápido para avaliação de toxicidade deste grupo de micotoxinas fuminosinas (HARTL & HUMPF, 2000).

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL UTILIZADO

4.1.1 Equipamentos e acessórios

- Aquário de vidro (capacidade 10,63 m³);
- Balança analítica CELTAC, modelo FA2104N;
- Balança semi-analítica BIOPRECISA, modelo BS3000A;
- Bomba de aeração;
- pHmetro SCHOT, modelo Handylab 1.;
- Pipetadores automáticos LABMATE e EPPENDORF (2-10 µL, 10-100 µL, 100-1000 µL, 1000-5000 µL);
- Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas THERMO ELECTRON CORPORARION, modelo DSQII;
- Cromatógrafo a gás THERMO ELECTRON CORPORARION, modelo FOCUS GC;
- Cubetas de plásticos para espectrofotometria, caminho óptico de 1 cm.
- Espectrofotômetro U/V Vísivel GBC 196.

4.1.2 Reagentes utilizados nos ensaios de toxicidade e análise oxidativa

- Carbonato de sódio P. A (99,5% de pureza); VETEC.
- Cloreto de sódio P. A (99-105% de pureza); VETEC.
- Cloreto de magnésio hexahidratado P.A (99-102% de pureza); VETEC.
- Cloreto de cálcio dihidratado P.A (74-78% de pureza); VETEC.
- Cloreto de Potássio P.A (99% de pureza); VETEC.
- Sulfato de sódio anidro P.A (99% de pureza); VETEC.
- Dimetilsulfóxido (99,5% de pureza); SIGMA.
- Fosfato de Potássio Monobásico P.A. anidro; VETEC.
- DPPH (85%de pureza) FLUKA
- Água ultrapura (MILIQ)
- Metanol grau espectrofotométrico / cromatográfico (99% de pureza), VETEC.

4.1.3 Padrões utilizados

- Lapachol (98% de pureza) – SIGMA ALDRICH (para o bioensaio da *A.salina*)
- Trolox[®] (98% de pureza) SIGMA

4.2 METODOLOGIA

4.2.1 Coleta e processamento do material vegetal

As partes aéreas (galhos e ramos finos) das espécies de *Lippia* foram coletadas em expedições científicas a Floresta Nacional de Carajás, localizada no município de Parauapebas, região Sudeste do estado do Pará e ao Município de Carolina, Maranhão.

As exsiccatas das espécies *L. gracilis* (#MG 200187) e *L. origanoides* (#MG 133921) identificadas e registradas no herbário do Museu Paraense Emílio Goeldi (Belém / PA). O material foi transportado em sacos plásticos, seco em estufa de ventilação e moído em moinho de facas.

4.2.2 Obtenção dos óleos essenciais

O material triturado foi pesado, submetido à extração por hidrodestilação. em processo contínuo por 3h, em sistemas de vidro do tipo Clevenger modificado (figura 6), acoplados a sistemas de refrigeração, com temperatura da água de condensação em torno de 15°C. Os óleos obtidos foram centrifugados e secos com sulfato de sódio anidro, armazenados em ampolas de vidro âmbar, na ausência de oxigênio e, conservados em ambiente refrigerado a 5 – 10°C.



FIGURA 6- Sistemas de vidro do tipo Clevenger modificado, acoplados a sistemas de refrigeração.

4.2.3 Cálculo do rendimento e umidade

O rendimento bruto em óleo foi calculado através da relação do volume do óleo obtido, com a massa do material vegetal utilizado na hidrodestilação. O cálculo do rendimento em óleo para base do material livre de umidade (BLU) foi obtido através da relação entre massa, óleo e umidade.

O teor de água foi determinado através do aparelho sistema de secagem por infravermelho (GEHAKA). O teor de umidade foi calculado através da relação entre a quantidade de massa inicial ($M_i = 5 \text{ g}$) e a massa final (M_f) do material botânico.

4.2.4 Análise da composição química dos óleos essenciais

A identificação dos componentes voláteis foi feita por CG/EM, utilizando um espectrofotômetro DSQ II THERMO ELETRON, nas seguintes condições: coluna DB-5ms (30m x 0,25 mm; 0,25 μm de espessura do filme); programa de temperatura: 60°C-240°C (3°C/min); gás de arraste: hélio (velocidade linear de 32 cm/s, a 100°C); tipo de injeção: "splitless" (0,1 μL de uma solução do óleo 0,2% em hexano); espectros de massas: impacto eletrônico, 70Ev; temperatura da linha de transferência 200°C.

A identificação dos componentes voláteis foi feita por comparação dos seus espectros de massas e índices de retenção com os existentes nas bibliotecas do sistema de dados e da literatura. A análise quantitativa dos óleos foi feita por CG-DIC FOCUS nas mesmas condições, utilizando nitrogênio como gás de arraste.

4.2.5 Bioensaio de toxicidade em *Artemia salina* Leach.

4.2.5.1 Cultura das larvas

Preparou-se uma solução de água salgada artificial (salmoura) para viabilizar a eclosão dos ovos de *Artemia salina*. A salmoura consistiu em uma mistura de 46 g de NaCl, 22 g de MgCl₂.6H₂O, 8 g 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 mortedadas larvas por diminuição do pH durante o período de incubação (LEWAN et al., 1992). A salmoura foi colocada em um recipiente de vidro, revestido externamente de papel alumínio (para evitar a penetração da luminosidade do meio externo), composto por duas divisórias e de um sistema de oxigenação constituído de bomba de aeração, em ambos os lados. Uma das divisórias foi iluminada por uma lâmpada de 40 W. Os ovos de *A. salina* (25 mg) foram depositados na divisória sem a iluminação a fim de que, após a eclosão, as larvas migrassem em direção a luz; uma vez que elas apresentam afinidade pela mesma (fototropismo positivo). Após um período de 24h de eclosão, as larvas foram consideradas apropriadas para os testes (MEYER et al., 1982).

4.2.5.2 Preparo das amostras e cálculo da CL₅₀

As amostras de óleos essenciais foram preparadas em tubos de ensaio, primeiramente nas concentrações de 100, 50, 25, 10, 5 e 1 µg.mL⁻¹. Em cada tubo teste foram adicionadas 10 larvas de *A. salina* com auxílio de micropipetas automáticas. Foi usado como solvente a água da salmoura e dimetilsulfóxido (DMSO), numa proporção de 95:5. O volume final da solução contida no tubo de ensaio foi de 5 mL. No grupo controle e no controle positivo com o lapachol foi utilizado o solvente acima mencionado e 10 larvas nas mesmas condições do bioensaio. Após 24h de contato das larvas de *A. salina* com a solução das amostras foram contadas as larvas mortas (em cada uma das concentrações) e calculada a taxa de mortalidade e o valor da CL₅₀, utilizando o método estatístico Probitos (FINNEY, 1971).

4.2.6 Determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH

4.2.6.1 Preparo da solução de DPPH

Para realização do teste de DPPH foi preparada uma solução com metanol a 60 µM. A absorvância inicial foi de 517 nm para concentração da amostra de $0,62 \pm 0,02$, a temperatura ambiente.

Para avaliar a atividade antioxidante, foi preparada a mistura reacional 1950µL da solução do radical DPPH e 50µL da amostra previamente diluída em metanol em diversas concentrações. A leitura da absorvância das amostras foi obtida a fim de se observar o efeito da concentração do substrato sobre o radical DPPH. A leitura da absorvância foi monitorada em intervalos de 5 e 10 minutos até ser atingida a absorvância constante.

5.2.6.2 Inibição do radical DPPH

A atividade de sequestro do radical de cada amostra foi calculada seguindo com a porcentagem de inibição (PI) do radical DPPH.

$$I_{\text{DPPH}}(\%) = [1 - (\text{Abs}_A / \text{Abs}_B)] \times 100$$

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

4.2.7 Bioensaio da atividade antifúngica utilizando o método da bioautografia.

4.2.7.1 Preparo do meio de Cultura

O fungo *C. sphaerospermum* Penzig (SPC 491) foi cedido pelo Instituto de Botânica de São Paulo. O fungo foi cultivado em meio sintético de Batata Dextrose Ágar (BDA). Para o preparo do meio utilizou-se $3,9 \text{ g.mL}^{-1}$ do meio sintético em pó em água destilada e autoclavado a 120° C por 15 minutos. Foram feitos repiques dos fungos em placas de petri e foram incubados em ambiente escuro por 14 dias a uma temperatura de 22° C . As cepas foram mantidas em tubos de ensaio na mesma temperatura em uma sala apropriada e exclusiva para a sua manutenção, os repiques para manter as cepas foram realizados a cada quinze dias.

4.2.7.2 Aplicação das amostras nas placas

As amostras foram solubilizadas a uma concentração de 40 mg.mL^{-1} em metanol. Foram feitas sucessivas diluições a partir das quais foram retiradas alíquotas de $10 \mu\text{L}$ e aplicadas na placa resultando em quantidades correspondentes a 200, 100, 50, 25, 10, 5, 2,5, $1 \mu\text{g/spot}$. O miconazol foi utilizado como controle positivo. O solvente foi removido da placa cromatográfica 24h antes da aplicação dos esporos (CAFÊU et al., 2005).

4.2.7.3 Preparo da solução nutritiva e nebulização dos esporos

A bioautografia direta consistiu na nebulização de suspensões de esporos do fungo *C. sphaerospermum*. A solução nutritiva foi preparada a partir de uma solução salina contendo KH_2PO_4 (7,0 g), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (3,0 g), KNO_3 (4,0 g), $\text{MgSO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ (1,0 g), esta solução foi misturada com glicose 30% na proporção de 6:1 e autoclavada a 120°C por 20 minutos. Os esporos dos fungos foram adicionados nesta solução nutritiva para se obter uma suspensão. As placas cromatográficas foram nebulizadas com a suspensão e em seguida incubadas em câmara úmida a 25° C por 48 h. O aparecimento de zonas de inibição na placa

nebulizada com *C. sphaerospermum* ou indica a presença de substância(s) com potencial antifúngico (SILVA et. al., 1998).

O miconazol é usado como padrão antifúngico. O limite de detecção foi determinado para as amostras potencialmente ativas. Os resultados foram expressos com base nos valores da concentração do limite de detecção para se produzir um halo de inibição e, em seguida, comparada como o padrão (CAFÊU et al., 2005).

4.2.8 Análise estatística

Os experimentos foram realizados em triplicata. O teste de Tukey foi usado para avaliar as diferenças da inibição do radical DPPH (software GraphPadPrism 5.0). Resultados com valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DAS ESPÉCIES DE *LIPPIA*

Os óleos essenciais apresentaram coloração amarelo-claro. O óleo essencial de *L. gracilis* apresentou rendimento de 3,7% e o de *L. origanoides* foi de 2,1%. Os teores de umidade foram de 5,0% e 11,8% para *L. origanoides* e de *L. gracilis*, respectivamente. A tabela 1 relaciona as espécies, quantidade de óleo obtido, umidade e rendimento.

TABELA 1 – Rendimento e umidade dos óleos essenciais.

Espécie	Rendimento B.L.U. (%)	Umidade (%)
<i>Lippia gracilis</i>	3,7	11,8
<i>Lippia origanoides</i>	2,1	5,0

Foram identificados 92,8% da composição química do óleo essencial de *L. gracilis*. Os compostos majoritários foram o timol (72,5%), *p*-cimeno (9,3%) e éter metílico do timol (5,4%). O óleo mostrou composição química diferenciada quando comparado ao óleo do espécime coletado no Ceará que apresentou como principais constituintes carvacrol (50,13%), *p*-cimeno (10,73%) e β -cariofileno (5,96%) (NETO et al., 2009).

No óleo essencial de *L. origanoides* foram identificados 96% da composição química e os componentes principais foram timol (45,8%), *p*-cimeno (14,3%), γ -terpineno (10,5%) e carvacrol (9,9%) (DAMASCENO et al., 2011). Maia e colaboradores (2003) descreveram que o óleo essencial de *L. origanoides* como dois tipos químicos: timol e 1,8-cineol (Figura 7) variando de acordo com as condições ambientais que a espécie está submetida como clima, estação do ano, localização e etc.

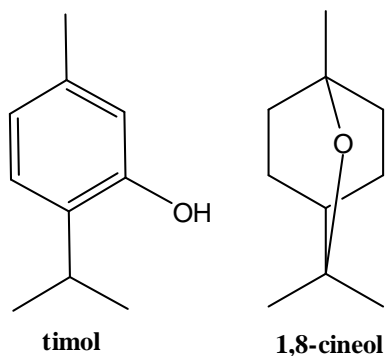


FIGURA 7 – Estrutura química do timol e do 1,8-cineol

A presença de timol como constituinte majoritário dos óleos *L. organoides* e de *L. gracilis* pode ser observado em estudos realizados com outras espécies de *Lippia*. A literatura menciona teores elevados de timol e carvacrol como principais componentes de *L. schomburgkiana* (SANTOS et al, 2004; OLIVEIRA et al, 2007). Neves e colaboradores (2008) realizaram a determinação dos compostos químicos presentes no óleo essencial de *L. gracilis* Schauer em dois locais da caatinga de Pernambuco, Buíque e Ouricuri. O estudo mostrou a presença de carvacrol e *p*-cimeno como constituintes principais em Buíque e timol, γ -terpineno e 4-metoxi-acetofenona como compostos majoritários em Ouricuri.

As estruturas destes compostos encontram-se na Tabela 1 e os dados da composição química na tabela 2.

TABELA 2-Composição química dos óleos essenciais em porcentagem relativa (%) para as espécies de *Lippia*

Constituintes	IR	IR (Lit.)	<i>L. gracilis</i>	<i>L. organoides</i>
α-Pineno	939	932		2,5
Sabineno	975	969		0,3
β-Pineno	979	974	1,55	2,4
Mirceno	978	988		
δ-Carene	1002	1001		0,6
α-terpineno	1008	1014		
p-cimeno	1016	1020	9,3	14,3
(E)-β-ocimeno	1050	1044		0,6
γ-terpineno	1051	1054		10,5
Terpinoleno	1089	1086		0,2
Linalol	1097	1095		0,3
Umbelulone	1171	1167		0,3
Terpinen-4-ol	1177	1174		0,7
α-terpineol	1188	1186		0,3
Timol-metil-eter	1235	1232	5,37	4,8
Carvacrol-metil-éter	1245	1241		0,3
Timol	1289	1289	72,5	45,8
Carvacrol	1299	1298		9,9
α-copaeno	1377	1374		0,9
Neril acetato	1362	1359		0,1
E-cariofileno	1417	1417		1,7
<i>trans-α-Bergamoteneo</i>	1435	1432		0,6
α-humuleno	1452	1452	1,35	0,5
Dehidroaromadendreno	1460	1460		0,1
Butil-hidroxi-ansiol	1484	1488	2,75	
Germacreno D	1485	1484		0,1
α-Muroleno	1489	1500		0,1
γ-cadieno	1500	1513		
δ-cadineno	1523	1522		0,6
Óxido de cariofileno	1583	1582		0,4
Époxidohumuleno II	1608	1608		0,1

- Lit: ADAMS, 2007; IR: índice de retenção

5.2 BIOENSAIO DE TOXICIDADE FRENTE *ARTEMIA SALINA* LEACH.

Nos testes com o grupo controle, não foi verificado mortalidade. Isto demonstra que é viável a utilização do DMSO como solvente para o ensaio. Os valores de CL_{50} foram calculados através da conversão da porcentagem de mortalidade das larvas em Probitos; o que possibilitou traçar a equação da reta em função dos valores das concentrações em escala logarítmica.

No gráfico 1, observa-se as conversões em Probitos dispostas no eixo das abscissas e as concentrações das amostras em $\mu\text{g.mL}^{-1}$ dispostas no eixo das ordenadas. Verifica-se também a equação da reta acompanhada do coeficiente de correlação (R^2), bem como os pontos da reta que representam a média dos valores obtidos em triplicata para cada concentração.

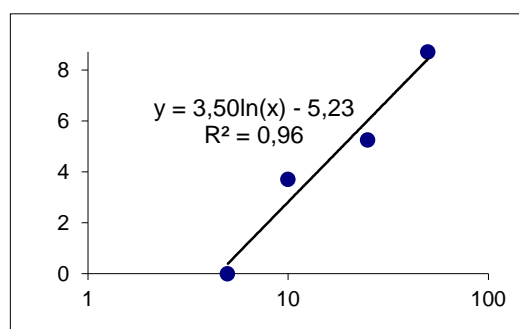


FIGURA 8- Modelo do gráfico utilizado para o cálculo do valor da CL_{50} das amostras (dados de *L. gracilis*).

5.2.1 Toxicidade dos óleos essenciais

Segundo Meyer e colaboradores (1982) as amostras que apresentarem CL_{50} com valores abaixo de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ são consideradas ativas toxicológica e biologicamente. Portanto, consideram-se todas as amostras analisadas como bioativas; uma vez que não houve CL_{50} acima de $1000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ como podemos observar na tabela abaixo.

TABELA 3 - Valores da CL₅₀ para as amostras de óleos essenciais.

Amostra	Concentrações (µg.mL ⁻¹)	Mortalidade (%)	R ^{2*}	CL ₅₀ Óleo (µg.mL ⁻¹)**	Intervalo de confiança (95%)
<i>L. gracilis</i>	50	100	0,96	18,7 ± 0,2	18,6 – 18,6
	25	56,7			
	10	10,0			
	5	0,0			
<i>L. origanoides</i>	25	100	0,97	7,4 ± 0,19	7,2 – 7,6
	10	46,7			
	5	20,0			
	1	0			

* coeficiente de correlação; ** média ± desvio padrão.

No bioensaio com larvas de *A. salina*, o lapachol (Figura 8) foi utilizado como controle positivo de toxicidade. A taxa de mortalidade variou de 0 a 100% de acordo com a tabela 4.

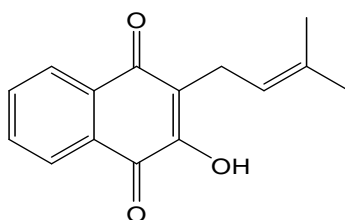


FIGURA 9 - Estrutura química do lapachol

TABELA 4 - Toxicidade do padrão lapachol frente às larvas de *A. salina*.

Amostra	Concentrações (µg.mL ⁻¹)	Mortalidade (%)	R ^{2*}	CL ₅₀ Óleo (µg.mL ⁻¹)**	Intervalo de confiança a (95%)
Lapachol	50	100,0	0,93	21,2 ± 2,2	18,3 – 24,5
	25	66,7			
	10	3,3			
	5	0			

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

Os óleos testados apresentaram uma taxa de mortalidade variando de 0 a 100%, de acordo com a faixa de concentração. As concentrações testadas 50 a $5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para as amostras de *L. gracilis* e de 25 a $1 \mu\text{g.mL}^{-1}$ para *L. origanoides*. A amostra com menor toxicidade foi *L. gracilis* ($CL_{50} = 18,7 \pm 0,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e mostrou atividade mais próxima ao do lapachol ($CL_{50} = 21,2 \pm 2,2 \mu\text{g.mL}^{-1}$). O óleo essencial de *L. origanoides* se mostrou extremamente tóxico ($CL_{50} = 7,4 \pm 0,192 \mu\text{g.mL}^{-1}$), ligeiramente mais tóxico que resultados apresentados na literatura, como os resultados de Rebelo e colaboradores (2009) que identificaram o componente timol (34%) como majoritário no óleo essencial de *Conocheas coparioides* frente à *A. salina* este se apresentou como altamente tóxico, com CL_{50} em torno de $7,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

5.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DE SEQUESTRO DO RADICAL LIVRE DPPH

A avaliação da atividade antioxidante das amostras pelo sequestro do radical livre DPPH foi medida pela descoloração do meio reacional de violeta para amarelo claro e assim pelo decréscimo da absorbância a 517 nm. O valor da CE_{50} foi calculado através da interpolação por regressão linear. Esse valor indica a concentração capaz de inibir em 50% a reação radicalar, ou seja, quanto menores os valores da CE_{50} , maiores as porcentagens de inibição dessas reações envolvendo o radical DPPH.

TABELA 5 - Valor da CE_{50} do óleo essencial de *L. gracilis* (folhas)

Amostra	Concentrações ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	CE_{50} Óleo ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)**
<i>L. gracilis</i>	100	$35,7 \pm 3,32$
	50	
	20	
	10	

A amostra apresentou atividade antioxidante, no entanto, cerca de oito vezes menos reativa do que o padrão Trolox que apresentou uma CE_{50} de $4.5 \pm 0,1$. O óleo essencial das folhas de *Lippia gracilis* reagiu com o DPPH por 60 minutos. A atividade antioxidante do óleo pode ser justificada pela presença de mais de 80% de timol e carvacrol. A literatura menciona estas substâncias como responsáveis pela elevada atividade antioxidante do óleo essencial do orégano (*Origanum vulgare*) no processo de oxidação dos alimentos (LAGOURI, 1993).

Para Ramos e colaboradores (2003), os valores de CE_{50} inferiores a $30 \mu\text{g.mL}^{-1}$ 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 origanóide* (DAMASCENO et al. 2009).

A inibição do radical DPPH variou conforme a concentração. Os respectivos valores estão listados na Figura 9.

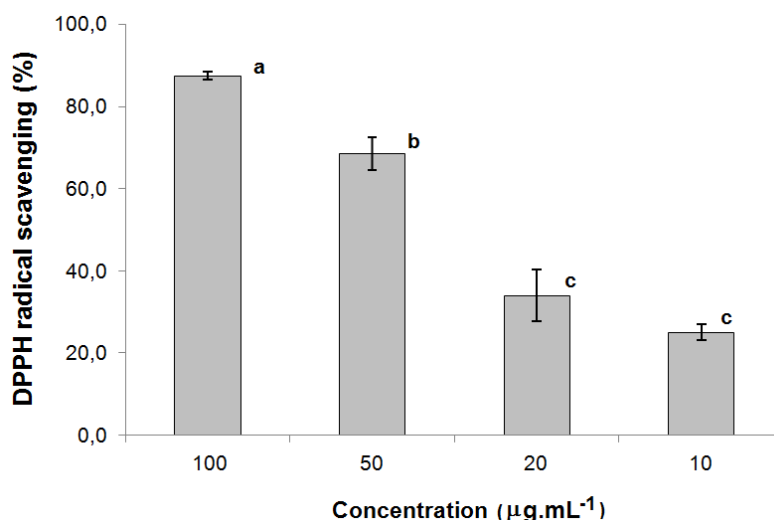


Figura 10. Resultados da atividade de sequestro do radical DPPH para o óleo essencial de *L. gracilis*. Barras de erros mostram o desvio padrão ($n = 3$). ^{a,b,c} Valores com a mesma letra não apresentam diferença estatística significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

5.4 BIOENSAIO DA CAPACIDADE ANTIFÚNGICA FRENTE À *C. SPHAREOSPERMUM*.

A atividade antifúngica, realizada através do método de bioautografia direta frente ao fungo fitopatogênico *C. sphareospermum*. Após 48h os halos de inibição foram observados e os limites de detecção são mostrados na tabela 5.

TABELA 6 – Limites de detecção (LD) dos óleos essenciais frente ao fungo *C. sphareospermum*.

Amostra	Limite de detecção $\mu\text{g/mL}^{-1}$
<i>L. gracilis</i>	5,0
<i>L. origanoides</i>	100,0

A atividade antifúngica frente à *C. sphareospermum* foi mais efetiva para o óleo das folhas de *L. gracilis*, pois apresentou limite de detecção de 5 μg , cerca de 10 vezes menos ativo que o miconazol que possui o limite de detecção de 0,5 μg . O óleo de *L. origanoides* apresentou limite de detecção de 100 μg , como mostra a figura 10.

O óleo essencial de *L. alba* e seus extratos brutos apresentam uma boa atividade antifúngica (SANTOS, 1996; OLIVEIRA, 2000; RAO et al., 2000) o que pode ser comprovado pela atividade antifúngica apresentada pelos extratos clorofórmico e cetônico da raiz de *L. alba* verificada nos estudos de Aguiar et al.(2008). Segundo Silva et al. (2011) extratos da *Lippia sidoides* Cham. apresenta atividade antifúngica frente às leveduras do gênero *Cândida*.

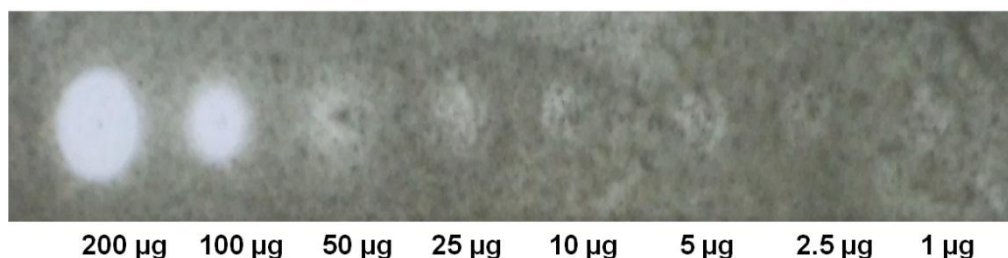


Figura 11. Bioautograma do óleo essencial de *L. gracilis*. As placas foram borrifadas com a cultura de *C. sphareospermum*. Zonas brancas indicam inibição do crescimento dos esporos.

6. CONCLUSÕES

As espécies *L. gracilis* e *L. origanoides* apresentaram bom rendimento em óleo essencial e composição química semelhante aos estudos descritos na literatura com elevado teor do fenólico timol, comum entre gênero.

O ensaio com larvas de *A. salina* indicou alta toxicidade, com valores de CL_{50} menores que o lapachol, usado como indicativo de atividade citotóxica. O óleo essencial de *L. gracilis* mostrou-se eficiente como seqüestrador de radicais DPPH com moderada atividade antioxidante e apresentou potencial fungicida frente a *C. sphareospermum*.

Os resultados obtidos reforçam o uso de espécies de *Lippia* como alternativa terapêutica na medicina tradicional. O óleo essencial de *L. gracilis* e *L. origanoides* podem ser utilizados como matéria-prima na elaboração de fármacos, fungicidas naturais, cosméticos e alimentos, o que provocaria um uso racional destas espécies com ampla distribuição na Amazônia.

REFERÊNCIAS

- ABENA, A.A; NGONDZO-KOMBETI, G. R; BIOKA, D. Psychopharmacologic properties of *Lippia multiflora*. **Encephale**.v.24: p. 449-454.1998.
- ADAMS, R. P. Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography / Mass Spectrometry. **Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL**, 804p, **2007**.
- AGUIAR, J. S.; COSTA, M. C. C. D.; NASCIMENTO, S. C.; SENA, K. X. F. R. Atividade antimicrobiana de *Lippia alba*(Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 18, n.3, 2008.
- ALBUQUERQUE, A. C. L. **Efeito antimicrobiano dos extratos da *Matricaria arcutia* Linn. E *Lippia sidoides* Cham. sobre microrganismos do biofilme dental**. 2007.120p. Dissertação (Mestrado - Área de concentração em Diagnóstico Bucal) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. 2007.
- AMES, B. N; SHIGENAGA, M. K.; HAGEN, T. M. Oxidants, antioxidants, and the degenerative diseases of aging. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**.v.90, n.17, p.7915-7922, 1993.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**. v.350, n.1, p.103-108, 1996.
- ATTI-SERAFINI, L.; PANSERA, M. R.; SANTOS, A. C.; ROSSATO, M.; PULETTI G. F.; ROTA, L. D.; PAROUL, N.; MOYNA, P. Variation in essential oil yield and composition of *Lippia alba* (Mill. N. E. Br.) grown in southern Brazil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais** v. 4, p. 72-74, 2002.
- BASSOLE, H. N; OVATTARD, A. S; NEBLE, R; OVATTARA, C. A. T; KABORE, Z. I, TRAORE, S. A. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia Multiflora* from Burkina Faso. **Phytochemistry**. v. 62, p.209-212. 2002.
- BLOOR, S. J. A survey of extracts of New Zealand indigenous plants for selected biological activities. **New Zeal J Bot**. v.33, p. 523-540,1995.
- CAFÊU, M. C.; SILVA, G. H.; TELES, H. L.; BOLZANI, V. DA S.; ARAÚJO, A. R.; YOUNG, M. C. M.; PFENNING, L. H. Substâncias antifúngicas de *Xylaria* sp., um fungo endofítico isolado de *Palicourea marcgravii* (Rubiaceae).**Química Nova**, v. 28 (6), 991-995. 2005.
- CAMPOS, M. P. DE. **Análise do potencial antimicrobiano de extrato, frações e substâncias puras obtidas de *Piper solmsianum***. 2006. 90f. Dissertação Mestrado. Universidade do Vale do Itajaí, 2006.

CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z. L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D.A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. **Biomed Central Biotechnology**, v. 2, p.17, 2002.

CAVALCANTE, M.F.; OLIVEIRA, M.C.C.; VELANDIA, J.R.; ECHEVARRIA, A. **Síntese de 1,3,5-triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach**. Química Nova, v. 23(1), 20-22, 2000.

CERUTTI, P. A. Oxidant stress and carcinogenesis. **European Journal of Clinical Investigation**,v.21,n.1, p.1-5, 1991.

CERUTTI, P. A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, v.344, n. 8926, p.862-863, 1994.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J.; Bioactive Natural Products: Detection, Isolation and Structural Determination; **Colegate, S. M.**, Ed.; CRC Press; 441p.1993.

COWAN, M. M. Plants products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Review**. V:12, p.564-82, 1999.

DAMASCENO, E. I. T; SILVA, J. K. R.; ANDRADE, E.H.; SOUSA, P. J. C.; MAIA, J. G. S. Antioxidant capacity and larvicida activity of essential oil and extracts from *Lippia organoides*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. v. 21(1), p. 78-85, 2011.

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

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

ELOFF, J. N. A proposal on expressing the antibacterial activity of plant extracts—a small first step in applying scientific knowledge to rural primary health care. **South African Journal of Science**, p. 116–118. 2000.

FINNEY D.J. Probits analysis.3^a ed. Cambridge University Press.1971.

GIRÓN, L. M.; FREIRE, V.; ALONZO, A.; CÁRCERES,A. **Journal ofEthnopharmacol**. v. 34, p. 173, 1991.

GOMES, S. V. F.; NOGUEIRA, P. C. L.; MORAES, V. R. S. Aspectos químicos e biológicos do gênero *Lippia* enfatizando *Lippia gracilis* Schauer. **Eclética Química**. v. 36, n. 1, 2011.

GÜNTZEL , A. R. C. **Avaliação das atividades farmacológicas de extrato de *Casearia sylvestris*Sw**. 2008. 68f. Dissertação (Mestrado em Ambiente e Desenvolvimento) – Centro Universitário UNIVATES, Rio Grande do Sul, 2008.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**. v.52, n.8, p.253-265, 1994.

HARTL, M. and HUMPF, H-U.Toxicity assessment of fumonisins using the brine shrimp (*Artemia salina*) bioassay. **Food and Chemistry Toxicology**, v. 38, p. 1097-1102, 2000.

JUNELL, S. Zur Gynaceummorphologie und Systematik der Verbenaceen und Labiaten. **Symbolae Botanicae Upsalienses**. v. 4, p. 1-219. 1934.

LAGOURI, V.; BLEKAS, G.; TSIMIDOU, M.; BOSKOU, D. Compostion and antioxidant activity of essential oil from orégano plants grow in greece. **Z. Lebensmitt.-Unters. Forsch.**V.197, p. 20-23, 1993.

LANGFIELDA ,R. D; SCARANOB ,F. J; HEITZMANA, M. E;KONDOA, M.; HAMMONDA, G. B.; NETO, C. Use of a modified microplate bioassay method to investigate antibacterial activity in the Peruvian medicinal plant *Peperomiagalioides*, **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

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

LOPES, W.; MORONI, F. T.; BRANDEBURGO, M. I. H.; HAMAGUCHI, A. **Desenvolvimento de um método alternativo ao uso de animais de laboratório para avaliação da toxicidade de extratos vegetais**. In: XIV Congresso Brasileiro de Toxicologia. Recife, Pernambuco, Livro de resumos, 341p, p.92. 2005

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Nova Odessa: Plantarum**, 2.ed, 544p, 2008.

MAIA, J. G. S; ZOGHBI, M. G. B; ANDRADE, E. H. A. **Plantas aromáticas da Amazônia e seus óleos essenciais; Belém**: Museu Paraense Emílio Goeldi. 2001.

MARSTON, A., KISSLING, J., HOSTETTMANN, K. A rapid TLC bioautographic method for the detection of acetylcholinesterase and butyrylcholinesterase inhibitors in plants. **Phytochemical Analysis**. Anal.13, 51-54. 2002.

MATOS, F. J. A.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A.; ALENCAR, J. W. AND SILVA, M. G. V. Medicinal plants Northeast Brazil containing Thymol and Carvacrol- *Lippia sidoides* Cham. And *L. gracilis* H. B. K (Verbenaceae). **Journal of Essential OilResearch**. v. 11, p. 666-668.1999.

MATOS, F. J. A.; Plantas medicinais da medicina popular do Nordeste. **Fortaleza, Edições UFC**, 1999.

MCLAUGHLIN, J. L.; CHANG, C. and SMITH, D. L. Simple bench-top bioassays (brine shrimp and potato discs) for the discovery of plants antitumor compounds.**IN: Human Medicinal Agents from Plants**, ed. A. D. Kinghom and M. F. Balandrin,.,American Chemical Society. V. 112, p. 137 1993.

MEYER, B.N.; FERRIGINI, N.R.; PUTNAM, J.E.; JACOBSEN, L.B.; NICHOLS, D.E.; McLAUGHLIN, J.L. Brine Shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Médica**, v. 45(30), p. 31-34, 1982.

MIMICA-DURIK, N.; BOZIN, B.; SOKOVIC, M.; SIMIN, N. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. **J Agric FoodChem** v. 52, p. 2485-2489, 2004.

MONTEIRO, M. V. B.; DE MELO LEITE, A. K. R.; BERTINI, L. M.; DE MORAIS, S. M.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S. Topical anti-inflammatory, gastroprotective and antioxidant effects of the essential oil of *Lippia sidoides* Cham. leaves. **J Ethnopharmacol**, v. 111, p. 378-382, 2007.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI FILHO, J. Efeito dos compostos fenólicos de especiarias sobre lípidos polinsaturados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**, v. 39, n. 3, p. 130-133, 2003.

NETO, E. M.; MATOS, J. A.; MELO, M. C. N.; CARVALHO, C. B. M.; GUIMARÃES, S. B.; PESSOA, O. D. L.; SILVA, S. L.; SILVA, S. F. R.; VASCONCELOS. The essential oil from *Lippia gracilis* Schauer, Verbenaceae, in diabetic rats. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.20, n. 2, p. 261-266, 2010.

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

PASCUAL, M. E; SLOWING, K; CARRETERO, E; SÁNCHEZ MATA, D; VILLAR, A. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: review. **J Ethnopharmacol**, v. 76, p. 201- 214.2001.

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

PIMENTA, L. P. S.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A., SILVA, L. G. F. and BOAVENTURA, M. A. D. Biological screening of Annonaceous Brazilian Medicinal Plants using *Artemiasalina*(Brine Shrimp Test). **Phytomedicine** v. 10, p. 209-212, 2003.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research, Bern**, v.67,n.5, p.289-297, 1997.

POULSEN, H.E., PRIEME, H., LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European Journal of Cancer Prevention**, v.7, n.1, p.9-16, 1998.

RICE-EVANS, C.; MILLER, N.J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. **FreeRad.Biol. Med.New York**, v. 20, n. 7, p. 933-956, 1996.

ROESLER, R; MALTA, L. G; CARRASCO, L. C; HOLANDA, R. B; SOUSA, C. A. S; PASTORE, G. M Atividade antioxidante de frutas do cerrado
Antioxidant activity of cerrado fruits. **Ciênc. Tecnol. Aliment**, v.27 n.1. 2007.

ROY, P., KULKARNI, A.P. Oxidation of ascorbic acid by lipoxygenase: effect of selected chemicals. **Food Chemical Toxicology**, v.34, n.6, p.563-570, 1996.

RUBERTO, G; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chem**, v. 69, p. 167-174.2000.

SAHPAZ, S.; BORIS, C.; LOIEAU, P. M.; CORTES, D. Cytotoxic and antiparasitic activity from *Annona senegalensis* seeds. **Planta Médica**, v. 60 (6): 538-540, 1994.

SALIMENA, F. R. G. Novos sinônimos e tipifi cações em *Lippiasect*. *Rhodo Lippia Schauer* (Verbenaceae). **Darwiniana**. v. 40(1-4), p. 121-125. 2002.

SALIMENA, F. R. G. **Revisão taxonômica de *Lippiasect*. *Rhodo lippia Schauer* (Verbenaceae)**. 2000. 125f. Tese de Doutorado. Instituto de Biociências. Universidade de São Paulo. Brasil, 2000.

SANDERS, R. W. **The genera of Verbenaceae in the south-eastern United States. Harvard Papers in Botany**.v. 5(2), p. 303-358. 2001.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. **Review. European Journal of Biochemistry**, v.215, n.2, p.213-219, 1993.

SILVA, J. R. de A. Ésteres triterpênicos de *Himatanthus sukuuba* (Spruce) Woodson. **Química Nova**, v. 21 (6), p. 702-704. 1998.

SILVA, R.V., NAVICKIENE, H.M.D., KATO, M.J., BOLZANI, V.S., MÉDIA, C.I., YOUNG, M.C.M., FURLAN, M. Antifungal amides from *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. **Phytochemistry**, v. 59(5), p. 521–527. 2002.

SILVA, V. A.; FREITAS, A. F. R.; PEREIRA, M DO S. V.; OLIVEIRA, C. R. M.; DINIZ, M DE F. F. M.; PESSOA, H. L. F. Eficácia antifúngica dos extratos da *Lippia sidoides* Cham. e *Matricaria recutita* Linn. Sobre leveduras do gênero *Cândida*. **Revista de Biologia e Farmácia (Biofar)**, v. 5, n 1, 2011.

SILVA, J. K. do R.; SOUSA, P. J.; ANDRADE, E. H.; MAIA, J. G. S. Antioxidant Capacity and Citotoxicity of Essential Oil and Methanol Extract of *Aniba canelila*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 55, p. 9422-9426, 2007.

SIQUEIRA, J.M.; ZIMINIANI, M.G.; RESENDE, U.M.; BOAVENTURA, M.A.D. Estudo fitoquímico das cascas do caule de *Duguetia glabriúscula*-Annonaceae, biomonitoramento pelo ensaio de toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 24 (2): p.185-187, 2001.

SOUSA, C. M de M; SILVA, H. R; VIEIRA JR, G. M; AYRES, M. C. C; COSTA, C. L. S; ARAÚJO, D. S; CAVALCANTE, L. C. D; BARROS, E. D. S; ARAÚJO, P. B. M;

BRADÃO, M. S; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30(2), p. 351-355, 2007.

STAHL, W., SIES, H. Antioxidant defence: vitamins E and C and carotenoids. **Diabetes, Supplement 2. New York**, v.46, p.14-S18, 1997.

TERBLANCHÉ, F. C, KORNELIUS, G. Essential oil constituents of the genus *Lippia*(Verbenaceae)- **A literature review. JEssent Oil Res**, v. 8, p. 471-485. 1996.

VALENTIN, A; PÉLISSIER, Y; BENOIT, F; MARION, C; KONE, D; MALLIE, M; BASTIDE, J. M; BESSIERES, J. M. Composition and antimalarial activity *in vitro* of volatile components of *Lippiamultiflora*. **Phytochemistry**.v. 40, p. 1439-1442,1995.

VIEGAS JR, C.; BOLZANI, V. DA S. Os produtos Naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**. v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006.

WITZUM, J.L. The oxidative hypothesis of atherosclerosis.**Lancet**, v.344, n.8926, p.793-795, 1994.

YU, T-W; ANDERSON, D. Reactive oxygen species - induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **MutationResearch**,v.379, n.2, p.201-210, 1997.

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 Fragr J**. v.13, p.47-48, 1998.

NEVES, I. A.; OLIVEIRA, J. C. S.; SELVA, T. M. G.; SCHWARTZ, A. O. E.; CAMARA, C. A. G. Composição química do óleo das folhas de *Lippia gracilis* Schauer de duas localidades de Pernambuco. **Journal of Essential Oil Research**. V. 20, p.157, 2008.