



UNIVERSIDADE FEDERAL DO OESTE DO PARÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA, PÓS-GRADUAÇÃO E INOVAÇÃO TECNOLÓGICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM RECURSOS NATURAIS DA AMAZÔNIA

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, COMPOSIÇÃO E
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Myrcia amazonica DC. (Myrtaceae)

VÍCTOR YESID PÉREZ CALAO

Santarém, Pará
Abril, 2014

Víctor Yesid Pérez Calao

**CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, COMPOSIÇÃO E
CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Myrcia amazonica DC. (Myrtaceae)**

ORIENTADORA: PROFA. DRA. ROSA HELENA VERAS MOURÃO

CO-ORIENTADOR: PROFA. DRA. ELENA STASHENKO-CENIVAM/COLOMBIA

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Oeste do Pará – UFOPA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências ambientais, junto ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Recursos Naturais da Amazônia. Área de concentração: Estudos e Manejos dos Ecossistemas Amazônicos. Linha de pesquisa: Bioprospecção de Recursos Naturais da Amazônia.

Santarém, Pará

Abril, 2014

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha filha, a minha mãe e irmãos que sempre se alegram com todas as minhas conquistas, e a minha querida e amada esposa que por esperar na distancia.

AGRADECIMENTOS

Agradeço imensamente, com sentimento profundo de admiração e respeito, a Doutora Rosa Helena Veras Mourão e a Doutora Elena Stashenko, por terem confiado em mim, pela paciência que só tem quem acredita no outro, pelos ensinamentos de que sou capaz de chegar longe com o conhecimento, por seu apoio incondicional, por suas críticas que imediatamente despertaram o desejo de imita-las, por esse carinho que se converteu em proteção longe de casa, por fazer do Brasil meu segundo e querido lar, definitivamente agradecer a vocês por ser quem são.

Agradeço ao LaBBEx e a CENIVAM por esse apoio técnico científico que tornou possível o desenvolvimento da parte experimental desta pesquisa.

Agradeço também a meus pais e irmãos que mesmo na distância sempre me acompanharam nesta grande aventura.

Agradeço a todos meus queridos companheiros e colegas entre eles Wania, Margarida, Marissol, Josan, Valeria, Thuanny, Suelen, Ana Paula, Miyuki, Juliana, Sandra, Leomara, professor Ricardo Bezerra e a todos os membros do LaBBEx por me receberem com esse calor humano e familiar que nunca esquecerei.

Agradeço especialmente a dois grandes amigos, a Luciana por ser sempre fiel e transparente amizade, por sua ajuda linguística e acadêmica durante todo o mestrado, por receber-me como um dos seus, muito obrigado Lu. Também agradeço de coração a meu grande amigo Alex, meu colega e parceiro, companheiro que foi fundamental durante este processo, amigo que levarei sempre em meu coração, amigo de convivência, amigo de pesca, de churrasco, de política, de piadas, amigo de tudo, definitivamente quem tem amigos como vocês não precisa de outros.

Agradeço ao apoio financeiro concedido pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Agradeço finalmente ao programa PGRNA e a UFOPA pela oportunidade concedida.

EPÍGRAFE

“Los seres humanos no nacen para siempre el día en que sus madres los alumbran, sino que la vida los obliga a parirse a sí mismos una y otra vez”.

Gabriel García Márquez.

PÉREZ CALAO, Víctor Yesid. **Caracterização Físico-química, Composição e Capacidade Antioxidante do Óleo Essencial de *Myrcia amazonica* DC. (Myrtaceae)**, 2014. 55 pg. Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais. Área de concentração: Estudos e Manejos dos Ecossistemas Amazônicos - Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, Santarém, 2014.

RESUMO

Na Amazônia, há uma variedade de plantas aromáticas e medicinais com grande potencial econômico, mas poucas já foram exploradas comercialmente. O estudo físico-químico e farmacológico dos produtos obtidos a partir de uma espécie de planta pode levar à descoberta de material de interesse para os seres humanos, e estas substâncias podem ser caracterizados e assim serem utilizadas de diferentes formas. Neste estudo foram realizadas investigações físico-químicas e a atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia amazonica* DC., uma espécie nativa da região. O óleo essencial utilizado para a identificação dos compostos e físico-químicas e os ensaios de atividade anti-oxidantes foi obtido pelo método de hidrodestilação. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa foi utilizada para a identificação dos compostos voláteis presentes nas folhas e flores, a atividade antioxidante foi calculada pelo método de ABTS⁺ e ORAC. Os compostos majoritários de interesse encontrados no óleo essencial foram o Germacreno D(10.09 - 16.56%), Germacreno B(9.59 - 11.09 %) e 1-Epi-Cubenol(14.72 - 20.22%). O rendimento do óleo essencial foi de 0.65% e 0.96 % para folhas frescas e secas, respectivamente, a diferença na composição dos óleos essenciais entre as folhas frescas ou secas foi relevante. O maior valor para a atividade antioxidante do óleo essencial registrado com o método ORAC foi de 1310 µmol Trolox[®]/g de substância, em relação ao método ABTS⁺ com 290 µmol Trolox[®]/g de substância.

Palabras chave: *Myrcia amazonica* DC., ORAC, método ABTS⁺, atividade antioxidante, óleo essencial.

PÉREZ CALAO, Víctor Yesid. **Caracterização Físico-química, Composição e Capacidade Antioxidante do Óleo Essencial de *Myrcia amazonica* DC. (Myrtaceae)**, 2014. 55 pg. Dissertação de Mestrado em Ciências Ambientais. Área de concentração: Estudos e Manejos dos Ecossistemas Amazônicos - Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia. Universidade Federal do Oeste do Pará - UFOPA, Santarém, 2014.

ABSTRAC

In the Amazon region exists a big variety of aromatic and medicinal plants that present a high economic potential, but there are few that have been explored commercially. The physicochemical and pharmacological study obtained of vegetal species can drive us to the finding of substances of interest for the man. In this research was conducted the physicochemical study and the antioxidant activity of essential oil of the leaves of *Myrcia amazonica* DC., (native specie of the region). It was obtained by the hydrodistillation (HD) method the essential oil used for the compounds identification, the physicochemical essays and the antioxidant activity. The essential oil's chemical composition and the volatile compounds found in the flowers were identified by GC-MS. The antioxidant activity was calculated by the ABTS⁺ and the ORAC methods. There were found majority compounds of interest in the composition of essential oil like the Germacrene D (10,09-16,56%), Germacrene B (9,59-11,09%) and 1-Epi-Cubenol (14,72-20,22%). The yield of the essential oil was between the (0,65-0,96%) for fresh leaves and dry respectively, the difference in the composition of the essential oil both dry leaves and fresh leaves was revelant, the highest value for the antioxidant activity of essential oil was recorded with the ORAC (1310 ± 11 µmol Trolox[®]/g substance) method compared to the ABTS⁺ (290 ± 7 µmol Trolox[®]/g substance) method.

Keywords: *Myrcia amazonica* DC., ORAC, method ABTS⁺, antioxidant activity, essential oil.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	iii
1. INTRODUÇÃO	1
1.1 Revisão bibliográfica	3
1.1.1 Óleos essenciais.....	3
1.1.2 Aspectos químico dos OEs.....	4
1.1.3 Processos industriais de extração dos óleos essenciais.....	5
1.1.3.1 Destilação com água (hidrodestilação).....	5
1.1.3.2 Destilação por arraste com vapor.....	6
1.1.3.3 Destilação com água - vapor.....	6
1.1.4 Controle de qualidade de óleos essenciais.....	7
1.1.4.1 Índice de refração.....	7
1.1.4.2 Solubilidade.....	8
1.1.4.3 Densidade.....	8
1.1.4.4 Rotação óptica (α^t_D).....	8
1.1.4.5 Conteúdo de umidade (H) valoração de Karl Fisher.....	9
1.1.4.6 Ponto de congelação (FP).....	9
1.1.4.7 Ponto Flash Point (FLP).....	9
1.1.4.8 Índice de Acidez (AV).....	9
1.1.4.9 Índice de ésteres (EV).....	9
1.1.5 Análises de óleo essencial por Cromatografia gasosa.....	10
1.1.6 Propriedades biológicas dos OEs.....	11
1.1.7 Antioxidantes.....	12
1.1.7.1 Antioxidantes sintéticos e naturais.....	13
1.1.7.2 Antioxidantes sintéticos.....	13

1.1.7.3	Antioxidantes Naturais.....	17
1.1.8	Myrtaceae.....	23
2.	Objetivos	25
2.1	Objetivo Geral.....	25
2.2	Objetivos Específicos.....	25
3.	Referências	26
	CAPÍTULO 1	35
1.	Introdução	37
2.	Material e métodos	38
2.1	Material botânico.....	38
2.2	Obtenção e rendimento do óleo essencial.....	38
2.3	Obtenção do extrato das flores.....	39
2.4	Análise por GC-MS para óleo essencial das folhas e extrato de flores.....	39
2.5	Análises das propriedades físico-químicas do óleo essencial.....	39
2.6	Atividade antioxidante do óleo essencial por ABTS ^{•+} e ORAC.....	40
2.6.1	Ensaio do catión-radical ABTS ^{•+}	40
2.6.2	Capacidade de absorção do radical de oxigênio ORAC.....	41
3.	Resultados e discussão	42
3.1	Rendimento e propriedades físico-químicas óleo essencial de <i>M. amazonica</i>	42
3.2	Análise por GC-MS do óleo essencial de folhas e extrato de flores de <i>M. amazonica</i> DC.....	43
3.3	Capacidade antioxidante do óleo essencial de <i>M. amazonica</i> DC. por ABTS ^{•+} e ORAC.....	46
4.	Conclusões	47
	Referências	49
	ANEXOS	53

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Principais métodos de extração de óleos essenciais.....	7
Figura 2 – Índice de retenção linear.....	10
Figura 3 - Estruturas de alguns compostos antioxidantes sintéticos.....	15
Figura 4 - Espectro de absorção do ABTS e seu cátion-radical ABTS ⁺	19
Figura 5 - Variação do espectro de absorção mediante reação de um radical DPPH.....	20
Figura 6 - Curvas de decaimento da fluorescência induzida por radicais peróxido.....	21
Figura 7 - Mecanismo proposto por Ou e colaboradores (2001) para a oxidação da fluoresceína em presença dos radicais peróxido (AAPH)	22
Figura 8 – <i>Myrcia amazonica</i> DC., em área de savana próximo a comunidade Santa Rosa, cidade de Santarém, Pará, Brasil.....	24

1. INTRODUÇÃO

Tradicionalmente, as plantas aromáticas e/ou medicinais têm sido utilizadas pelo homem em diferentes aspectos da vida cotidiana, seja como medicamento natural, alimento, agente conservante, artigo de higiene pessoal, ou simplesmente como arranjos ornamentais e aromatizantes. Este conhecimento popular foi alterado ao longo do tempo, evoluindo para o agronegócio natural, com aplicações em variados setores da indústria.

Um aspecto que tem tido um impacto significativo no desenvolvimento do agronegócio e de ervas medicinais é o crescimento global que sofreu nos últimos quinze anos, devido ao aumento do consumo de produtos naturais. Atualmente, as plantas aromáticas são importantes matérias-primas para a elaboração de produtos farmacêuticos, alimentos, cosméticos, entre outros. Ao mesmo tempo em que cresce a demanda pelos produtos naturais, tem aumentado também o interesse em conhecer e compreender o comportamento das espécies vegetais em diferentes ambientes de crescimento (Stashenko, 2009).

O Brasil é um país que possui uma diversidade biológica, e oferece uma grande variedade de possibilidades para a exploração adequada dos seus recursos naturais em escala agroindustrial. Porém para obter sucesso é necessário desenvolver pesquisas nas áreas social, econômica e tecnológica, a fim de oferecer uma alternativa para as pessoas interessadas em desenvolver este tipo de indústria e dessa forma obter um produto que seja competitivo nos mercados nacional e internacional.

As plantas aromáticas poderiam ser uma das possibilidades que existem para implantar indústria, voltadas principalmente para a extração de óleos essenciais (OEs). Os óleos essenciais são misturas de compostos orgânicos, produtos do metabolismo secundário de plantas e são utilizados para a preparação de misturas aromatizantes, licores, perfumes, artigos de higiene, para mascarar o cheiro de tinta e borracha, na síntese orgânica fina, como matéria-prima para a elaboração de produtos farmacêuticos, entre outras aplicações (Bandoni, 2000).

Na região amazônica há uma considerável quantidade de plantas aromáticas e medicinais, com alto potencial econômico, no entanto, ainda são poucas as espécies

vegetais com estas propriedades que são exploradas comercialmente, apesar do uso popular de dezenas dessas plantas, como banhos aromáticos, perfumes regionais, repelentes ou até mesmo em rituais religiosos (informações populares). O estudo físico-química e farmacológico de produtos obtidos de uma espécie vegetal pode revelar a ocorrência de substâncias de interesses diversos para o homem, as quais, após serem caracterizadas, podem ser usadas de diversas formas.

Neste contexto e como parte do projeto de investigação de óleos essenciais de espécies da família Myrtaceae, neste trabalho foi realizado um estudo físico-química e investigação da capacidade antioxidante do óleo essencial (OE) obtido por hidrodestilação de *Myrcia amazonica* DC., coletada em áreas de savana da região de Santarém, Pará.

Em Santarém, município da região oeste do estado do Pará, Baixo Amazonas, espécies de *Myrcia* são abundantes e diversificadas, apresentando plasticidade fenotípica cuja circunscrição do taxa é difícil de ser estabelecida e, por conseguinte, muitas vezes tratada como complexo *Myrcia* na qual englobam gêneros similares. Conhecidas com os nomes populares jinja, vassourinha e pedra ume caá, as distinções populares são aleatórias e confusas seja na literatura ou descrição botânica. As myrtaceaes, de um modo geral, são de difícil identificação, e mesmo mateiros experientes podem se enganar, tomando uma espécie por outra. Dessa maneira, são requeridos estudos adicionais, que gerem informações que possam caracterizar as espécies desta família.

A apresentação deste trabalho foi realizada segundo as normas do Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais da Amazônia da Universidade Federal do Oeste do Pará/UFOPA. A dissertação está dividida em: **REVISÃO DA LITERATURA** sobre os aspectos gerais de óleos essenciais, abordagens sobre antioxidantes e família Myrtaceae, seguida de **OBJETIVOS:** geral e específicos. **A METODOLOGIA** e **RESULTADOS** foram apresentados em forma de artigo de acordo com as normas do periódico Food Chemistry (ISSN: 0308-8146). Após revisão o mesmo será traduzido para língua inglesa e submetido para publicação.

1.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1.1 Óleos essenciais: Considerações gerais

Os óleos essenciais (OEs) são os principais odoríferos encontrados em várias partes de plantas. Como evaporam quando expostos ao ar em temperaturas comuns, são chamados óleos voláteis, óleos essenciais ou essências. Este último é utilizado porque os óleos voláteis representam "essências" ou componentes odoríferos das plantas. Os OEs são normalmente encontrados em bolsas secretoras presentes nas partes vitais dos vegetais, tais como: pétalas das flores, folhas, sementes, caule, raiz e frutos (Bakkali et al., 2008). A qualidade do OE é variável podendo-se encontrar vegetais que possuem essências quimicamente diferentes em suas partes.

Os OEs são extraídos principalmente por destilação com vapor de água, hidrodestilação, destilação por degradação térmica e expressão. Praticamente todos os OEs são constituídos por misturas químicas muito complexas, geralmente por terpenos que estão associados ou não outros componentes, a maioria deles volátil, que em conjunto compõem a fragrância da planta de origem (Bandoni *et al.*, 2000; Stashenko *et al.*, 2009).

Como os OEs são resultado do metabolismo secundário da planta (Figura 1), este é o conceito mais importante para se levar em conta quando se trabalha com essências. Ao falarmos de um alcaloide, um flavonoide ou açúcar, estamos diante de um produto puro, quimicamente definido e com uma fórmula característica. Por outro lado, quando se trata de uma essência, estamos falando de uma mistura de produtos isolados, em proporção e composição muito variáveis, que dependem de vários fatores. Geralmente, o OE não é composto por um único metabólito, mas por uma mistura deles. Todos os componentes desta mistura, em condições normais de temperatura e pressão, são produtos voláteis, que podem ter em comum a sua solubilidade em um determinado solvente (Domínguez *et al.*, 1988; Bandoni *et al.*, 2000).

Outro aspecto importante que se deve ter em mente é que, por ser uma parte do metabolismo secundário da planta, a composição química de um OE está em constante mudança, com diferentes proporções de seus constituintes transformando-se uns em outros, de acordo com a parte da planta, no momento de seu

desenvolvimento ou de acordo com as condições ambientais (Bandoni *et al.*, 2000; Stashenko *et al.*, 2009).

1.1.2 Aspectos químico dos OEs

Os OEs são misturas complexas e eminentemente variáveis de constituintes. Normalmente associados com os monoterpenos e sesquiterpenos, aparecem também na sua composição ésteres, álcoois, aldeídos, cetonas, acetais, fenóis, glicosídeos, ceras, hidrocarbonetos, ácidos graxos lineares, alcalóides, cumarinas e esteróides. Hoje, com o avanço de novas tecnologias e instrumentação na área de ciências da separação, tem-se conhecido muito mais acerca da composição dos óleos essenciais (Muñoz *et al.*, 1987; Bandoni *et al.*, 2000).

Devido à complexidade da sua composição é aconselhável fazer uma diferenciação entre os compostos presentes em um óleo essencial. Deve então ser separados os compostos majoritários, quando estão em uma proporção maior do que 0,5 - 1 %, e os minoritários quando a proporção é menor do que 0.5%, que em alguns casos, podem encontrar-se em grande quantidade, sobretudo nas essências de flores (Bandoni, 2000).

Esta classificação dos constituintes em função do teor presente em cada óleo essencial é fundamental, tanto para determinar a qualidade do óleo, quanto para determinar os seus efeitos organolépticos e fisiológicos. Não existe atualmente um óleo essencial do qual se conheça de forma absoluta a sua composição química, tudo vai depender da sensibilidade da ferramenta analítica e do método de extração (Stashenko, 2009).

O cheiro de uma planta viva não é exatamente o mesmo que tem sua essência isolada. Isto se deve a vários fatores, sendo os mais importantes a volatilidade, a solubilidade, o metabolismo e a localização dos compostos nos tecidos. Para observar na planta os produtos aromáticos "mais pesados" e menos voláteis, é necessário secar para eliminar as impurezas. Como isto não ocorre normalmente, a presença dos produtos mais voláteis mascara continuamente os constituintes aromáticos "mais pesados". Por outro lado, os produtos com uma elevada volatilidade podem ser perdidos durante os processos de extração, especialmente quando se utiliza destilação por arraste com vapor de água. Deve-se levar em conta também, que quando uma substância é obtida por arraste com vapor, alguns componentes ficam

parcialmente retidos na fase aquosa, como o álcool fenilético na essência de rosas ou alguns ácidos mais leves e ésteres. Uma vez que a planta é colhida para a extração de sua essência, o seu metabolismo não permanece inalterado, continua a evoluir, até que finalmente, com a eliminação crescente de água, ocorra a inibição dos processos enzimáticos (Bandoni, 2000).

De acordo com a localização nos tecidos, cada parte da planta pode ter uma essência diferente na sua qualidade olfativa. Pode-se dizer que existe uma essência nas partes mais externas da planta a qual percebemos, e outra nas partes mais internas que não podemos perceber. Quando essas essências se misturam ao serem extraídas produzem um aroma geralmente diferente daquele observado em uma planta viva (Bandoni, 2000).

De forma resumida o OE é um produto volátil, de composição química complexa e com uma enorme variabilidade no que diz respeito à sua qualidade, seu desempenho e sua estabilidade, características essas comuns a muitos produtos naturais.

1.1.3 Processos industriais de extração dos óleos essenciais

Para a extração de OE em escala industrial, existem dois procedimentos que são mais usados, dependendo dos requisitos do material vegetal: **A primeira é a extração a frio** (expressão), o qual envolve pressionar o material vegetal para obter o OE, que é então lavado com água e condensado a temperaturas baixas. Este método é usado para obter OE das cascas de cítricos, que é instável a altas temperaturas, e devido está localizada nas cavidades de secreção lisígena alojada no mesocarpo é muito difícil de extrair. **O segundo método inclui métodos de destilação**, que são descritos abaixo. A Figura 1 mostra o esquema geral de tais processos (Bandoni, 2000).

1.1.3.1 Destilação com água (hidrodestilação)

O princípio da destilação é levar a água para o estado de ebulição de uma suspensão aquosa de um material vegetal aromático, de modo que, os vapores gerados possam ser condensados e recolhidos. O óleo, o qual não é misturado com a água é separada por decantação (Stashenko, 2009). Este sistema de extração é

utilizado especialmente em áreas rurais, que não têm instalações auxiliares para a geração de vapor.

Na hidrodestilação, o material vegetal deve estar sempre em contato com a água. Um fator a considerar é que, se o destilador é aquecido pelo fogo direto, a quantidade de água que está em contato com o material vegetal deve ser suficiente para evitar o sobreaquecimento ou a carbonização do material vegetal, uma vez que, este fator provoca a formação de odores desagradáveis (off-flavours) no produto final (Bandoni *et al.*, 2000; Stashenko *et al.*, 2009).

1.1.3.2 Destilação por arraste com vapor

A extração por arraste com vapor pode ser considerada como o método mais simples e seguro, além de retirar uma maior proporção de componentes odoríferos, que se encontram no material vegetal.

A destilação por arraste com vapor utilizado para remover a maior parte dos óleos essenciais, é uma destilação que mistura dois líquidos imiscíveis e consiste, em resumo, em uma vaporização a temperatura inferior ao ponto de ebulição de cada um dos componentes volátil. Esta vaporização é conseguida pelo efeito de uma corrente direta de vapor de água, que exerce dupla função: aquecimento da mistura até o seu ponto de ebulição, e redução da temperatura de ebulição por adicionar a pressão de vapor que é injetada nos constituintes voláteis dos óleos essenciais. Os vapores gerados no destilador passam através do chamado “pescoço de ganso” (refrigerante) e resfriando em um condensador, onde o retorna a fase líquida (água e óleo essencial), os produtos imiscíveis finalmente se separam em um copo florentino (Bandoni *et al.*, 2000; Stashenko *et al.*, 2009).

1.1.3.3 Destilação com água - vapor

Neste caso, o vapor é produzido por uma fonte externa, ou no interior do corpo do extrator separado do material vegetal. A diferença fundamental entre este e o sistema anteriormente mencionado é que o material vegetal é suspenso sobre uma malha (fundo falso) que impede o contato direto com o meio líquido em ebulição (Bandoni *et al.*, 2000; Stashenko *et al.*, 2009).

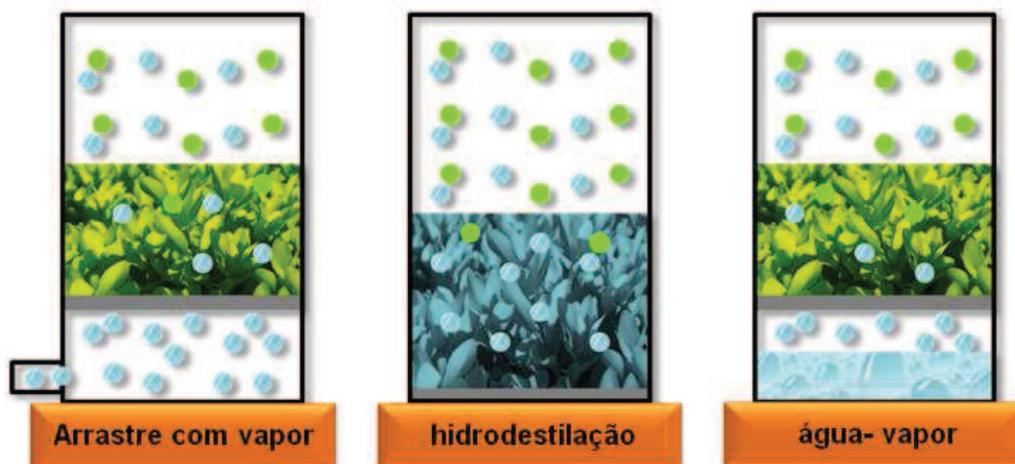


Figura 1 - Principais métodos de extração de óleos essenciais.

1.1.4 Controle de qualidade de óleos essenciais

As ferramentas utilizadas para controle de qualidade de OEs incluem, sobretudo, os métodos físico-químicos e a cromatografia. Os primeiros são métodos simples e efetivos como a medida da densidade, o índice de refração, a rotação óptica, ponto de congelamento, conteúdo de umidade, solubilidade em etanol, ponto de fusão, índice de acidez e índice de ésteres entre outros. Por meio de técnicas de cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS) é possível determinar os componentes químicos presentes nos OEs.

Dentro de todos os níveis da cadeia produtiva de óleos essenciais, o primeiro controle realizado são os parâmetros organolépticos. Este teste é utilizado para verificar se o OE apresenta adulteração, como por exemplo, uma diluição. Em outros casos, o comprador pode exigir uma análise química, a fim de conhecer a taxa em que os componentes principais se encontram, ou em último caso, exigir da empresa certificações de BPM (Business Process Management) ou ISO (International Organization for Standardization) (Bandoni *et al.*, 2000; Díaz *et al.*, 2002). Em seguida abordaremos os aspectos físico-químicos mais utilizados no controle de OEs.

1.1.4.1 Índice de refração

O índice de refração de uma substância transparente mede a relação entre a velocidade da luz no vácuo e a velocidade da luz na substância. Utilizada para a identificação e determinação de uma pureza de compostos e para análise de composição de misturas binárias homogênea de constituintes conhecido. Esta

propriedade é utilizada para controlar a pureza dos OEs, que têm um índice de refração característico (Bandoni, 2000), e é necessária para a sua medição (ISO 280, 1998).

1.1.4.2 Solubilidade

Os óleos essenciais se dissolvem bem em solventes orgânicos tais como benzeno, pentano, éter de petróleo e etc. No entanto, existe grandes diferenças na solubilidade em álcool de 70 a 90% (Bandoni, 2000). OEs são solúveis em meio não polar, também muitas vezes têm uma elevada solubilidade em etanol, que é amplamente explorado em desenvolvimento de fragrâncias (Pomilio et al., 1985). A solubilidade é medida de acordo com a norma internacional (ISO 875, 1999).

1.1.4.3 Densidade

A determinação da densidade permite por algumas vezes inferir sobre a composição dos óleos. O OE com densidade maior de 1,0 g/cm³, contém principalmente fenóis ou seus derivados e seus ésteres, os de densidade mais baixa são ricos em hidrocarbonetos monoterpenos e sesquiterpenos (Bandoni, 2000). Os valores de densidade baixos se devem a um conteúdo de hidrocarbonetos monoterpênicos alto, enquanto com densidades mais elevadas indica maior conteúdo de compostos oxigenados. A densidade é medida de acordo com a norma internacional (ISO 279, 1998).

1.1.4.4 Rotação óptica (α^t_D)

Mede o ângulo descrito pela polarização do plano de uma radiação luminosa em um comprimento de onda de 589.3 ± 0.3 nm, que corresponde a linha D do sódio, quando esta luz atravessa através de uma espessura de 1 cm de OE, a uma dada temperatura (ISO 592, 1998). A natureza enantiomérica do OE pode ser levorotatoria (L, *l*, -), o que significa que a amostra gira no plano da luz polarizada para a esquerda; ou vice-versa (dextrorotatoria = D, *d*, +) (Can e Demirci, 2007). A Rotação óptica é medida de acordo com a norma internacional (ISO 592, 1998).

1.1.4.5 Conteúdo de umidade (H) valoração de Karl Fisher

Com este método é determinada por titulação bivoltamétrica a quantidade de água da amostra. O eléctrodo do equipamento de ponta dupla de platina é submetido a uma corrente eléctrica constante que muda quando o meio de reacção começa a ter iodo livre do agente titulante, para fazer com que a neutralização completa da água na amostra, a fim de manter constante a corrente eléctrica inicial, uma mudança de potencial que é a indicação do ponto final da titulação (ISO 11021, 1999).

1.1.4.6 Ponto de congelação (FP)

Se a temperatura constante, ou a temperatura máxima observada quando o OE no estado líquido super-aquecido libera o calor latente de fusão. O Ponto de congelamento é medido de acordo com a norma internacional (ISO 1041, 1973).

1.1.4.7 Ponto Flash Point (FLP)

A temperatura corrigida para a pressão de 101,325 kPa, em que, por um vaso fechado, o líquido a ser testado, emite vapores com o ar, produzem uma mistura inflamável (ISO/TR 11018, 1997).

1.1.4.8 Índice de Acidez (AV)

Determina KOH (hidróxido de potássio) em mg necessário para neutralizar os ácidos livres presentes em 1 grama de OE (ISO 1242, 1999). Este indicador é importante, uma vez que a maior parte dos processos de degradação de óleos essenciais são catalisados por meios aquosos ácidos, em que ocorrem reacções de hidratação, desidratação, ciclização e hidrólise fundamentalmente (Clark e Chamblee, 1992).

1.1.4.9 Índice de ésteres (EV)

Determina KOH em mg necessário para neutralizar o ácido libertado pela hidrólise de ésteres presentes em 1 g de óleo essencial. O índice de ésteres é medido de acordo com a norma internacional (ISO 709, 2001).

1.1.5 Análises de óleo essencial por Cromatografia gasosa

A cromatografia de gases (GC) é um dos processos mais difundidos para análise química de OEs, por ser uma técnica de separação eficiente para determinar a estrutura química, tanto na indústria quanto nos laboratórios de pesquisa científica (Senatore, 1996; Marino *et al.*, 2001).

A GC é um método de separação física no qual os componentes de uma mistura são distribuídos entre uma fase móvel (MP), que é um gás de arrastre (H₂, He ou N₂) e uma fase estacionária (SP) que recobre as paredes internas de um tubo capilar chamado coluna, que atua como meio de separação (Niessen, 2001). As diferenças no tempo de residência dos analitos em cada fase (repartição) à medida que se deslocam ao longo da coluna, está afetada por as pressões de vapor e por as distintas afinidades com a SP. Cada vez que a molécula entra a coluna é arrastada em direção ao detector pelo fluxo de gás de arrastre. Conseqüentemente, os compostos que possuem propriedades físicas e químicas dissímiles serão detectados em tempos diferentes (Pichard *et al.*, 2003; Stashenko *et al.*, 2010). Dentro dos detectores existentes, o mais usado é o de ionização em chama (FID) empregado nas análises e quantificação de analitos orgânicos que contém grupos hidrocarbonatos (Stashenko e Martínez, 2010).

A identificação dos compostos que emergem da coluna, pode, em princípio, realizar-se mediante a comparação dos tempos de retenção (t_R) experimentos com os compostos padrão; no entanto, o critério cromatográfico mais empregado consiste em fazer o paralelo com os índices de retenção lineares, onde se utiliza uma série de n -alcanos como referência (Niessen, 2001); no lugar de só verificar os t_R .

$$I_R = 100n + 100 \left[\frac{t_{Rx} - t_{Rn}}{t_{RN} - t_{Rn}} \right]$$

Figura 2 – Índice de retenção linear

Onde $n < N$

n = Número de átomos de carbono do hidrocarboneto linear, que sai antes do composto de interesse.

t_{Rx} = Tempo de retenção do composto de interesse.

t_{Rn} = Tempo de retenção do hidrocarboneto linear, que sai antes do composto de interesse.

t_{RN} = Tempo de retenção do hidrocarboneto linear, que sai depois do composto de interesse.

Os demais se utilizam critérios espectroscópicos, *i.e.*, os espectros de massas (relaciona massa/carga dos íons formados versus sua abundancia), obtidos da análises GC acoplada à espectrometria de massas (MS) e sua comparação com os de compostos padrão registrados em uma base de dados de massas (Rouessac *et al.*, 2003; Prats *et al.*, 2005).

Enquanto a quantificação dos componentes das amostras, os procedimentos se baseiam na comparação de suas áreas, com as de uma dissolução padrão (método de padrão externo) analisada com as mesmas condições cromatográficas, o com a área de um composto padrão introduzido a uma concentração conhecida na amostra (método de padrão interno (Istd)).

Também se emprega o procedimento de normalização simples, onde a área de qualquer pico cromatográfico se expressa como uma porcentagem da área total de todos os picos (Rouessac e Rouessac, 2003).

1.1.6 Propriedades biológicas dos OEs

Das diferentes propriedades terapêuticas atribuídas aos OEs, destacam-se as antivirais (Allahverdiyev *et al.*, 2004; Garozzo *et al.*, 2009), inseticida (Ayvaz *et al.*, 2010), analgésica e antiinflamatória (Silva *et al.*, 2003), anticancerígena (Sylvestre *et al.*, 2006), antiparasitárias (Asha *et al.*, 2001; Pessoa *et al.*, 2002), antispasmódica (Sousa, *et al.*, 2010), larvicida (Pavela, 2009), antinociceptiva (Santos *et al.*, 1998), antiplasmodica (Benoit- Vical *et al.*, 2003), gastroprotetora (Santos e Rao, 2001) e antimicrobiana (Ezzat, 2001; Viljoen, *et al.*, 2003; Aslim *et al.*, 2008; Hanamanthagouda *et al.*, 2010) dentre outras.

Além das propriedades terapêuticas os Oes são usados em preparações culinárias não apenas como aromatizantes e agentes de sabor, mas também como conservantes naturais (Kalemba *et al.*, 2003; Burt *et al.*, 2004). Como conservantes de alimentos e outros produtos, os OEs podem parar, impedir ou inibir a deterioração

oxidativa e danos causados ou bactérias, fungos (Pokorny *et al.*, 2001; Antolovich *et al.*, 2002; Kalemba *et al.*, 2003; Burt *et al.*, 2004).

Atualmente existe uma pressão crescente dos consumidores em cima das indústrias de alimentos e cosméticos para a diminuição do uso de conservantes sintéticos em seus produtos, substituindo-os por substâncias naturais (Jirovetz e Buchbauer, 2005). Portanto, o conhecimento das atividades antimicrobianas, antioxidantes e citotóxicos são importantes para a aplicação dos OEs em diferentes indústrias.

1.1.7 Antioxidantes

Os antioxidantes podem inibir ou retardar os processos de oxidação de dois modos, a saber, por aprisionamento de radicais em tais casos, os compostos são descritos como antioxidantes primários, ou por um mecanismo que não envolve diretamente os radicais de captura, em tais casos, os compostos são chamados antioxidantes secundários (Pokorny *et al.*, 2001). Antioxidantes secundários operaram por uma variedade de mecanismos, incluindo a complexação de íons metálicos, aprisionamento de oxigênio, conversão de hidroperóxido de espécies não radicais, absorção de radiação UV (ultravioleta) ou desativação do oxigênio singlete (Pokorny *et al.*, 2001).

Um antioxidante é um composto caracterizado como eficaz *in vivo* se cumprir os seguintes requisitos (Gvozdjaková *et al.*, 2008; Rao *et al.*, 2012):

- Deve reagir efetivamente com os radical livre;
- O produto da reação do antioxidante com o radical livre não deve ser mais tóxico para o organismo que o radical removido;
- O antioxidante potencial deve estar presente no organismo em uma concentração suficiente para neutralizar o efeito do radical livre;
- O tempo de vida média do antioxidante deve ser suficientemente largo para reacionar com o oxidante;
- Os radicais formados pelo antioxidante não devem realizar reações em cadeia, mas são neutralizados por reação com outros radicais, para formar um produto estável.

Os antioxidantes podem ser classificados de acordo com diferentes critérios, de acordo com a solubilidade, o sistema de defesa e origem (Akoh *et al.*, 2002; Panchawat *et al.*, 2010) (Tabela 1). Com tudo, durante as ultimas duas décadas aparecem cada vez mais, diferentes compostos antioxidantes de origem natural, que podem ter efeitos benéficos contra a deterioração oxidativa.

Tabela 1 - Classificação dos antioxidantes segundo os diferentes critérios.

Critério	Classificação	Ejemplos
Solubilidade	Hidrofílicos	Vitamina C.
	Hidrofóbicos	Carotenóides e vitamina E.
Mecanismo de defesa	Preventivos	Glutaciona peroxidase, catalase.
	Capturadores de radicais	Flavonoides, BHT.
	Reparadores	Enzimas proteolíticas ou reparadoras de DNA.
Origem	Natural	Quercetina, pinocembrina.
	Sintético	BHA, TBHQ.

1.1.7.1 Antioxidantes sintéticos e naturais

Os consumidores e organizações de controle estão preocupados com a segurança das comidas e, sobretudo com os possíveis efeitos nocivos dos aditivos sintéticos na saúde do ser humano. Apesar do baixo custo e alta estabilidade dos antioxidantes sintéticos, estudos realizados detectaram um possível efeito carcinogênico, dos quais tem contribuído para a diminuição do seu consumo (Botterweck *et al.*, 2000). Assim, estudos recentes, estão focando no isolamento e identificação de antioxidantes de origem natural (Akoh e Min, 2002).

1.1.7.2 Antioxidantes sintéticos

Os antioxidantes sintéticos foram introduzidos décadas atrás (1940). Entre estes, encontram-se fenóis butilados e polifenóis, que são mais baratos (US \$20-40 por Kg) que os naturais e muitas vezes mais eficaz no retardamento do processo de degeneração oxidativa (Akoh *et al.*, 2002; Venkatesh *et al.*, 2011).

Os antioxidantes sintéticos são compostos químicos que não são produzidos pela

natureza, são adicionados a diversos produtos para evitar ou prevenir a oxidação. No entanto, há um grande número de requisitos sobre o uso, uma vez que eles devem ser aprovados para a regulação destes aditivos. Portanto, apenas alguns antioxidantes sintéticos têm sido usados em alimentos (Akoh e Min, 2002).

O butil-hidroxitolueno (BHT) e o butil-hidroxianisol (BHA) são os antioxidantes sintéticos mais usados nas comidas segundo o “*National Research Council Food Additive Committee*”. O BHA tem uma estabilidade efetiva para proteger o sabor e a cor das comidas. Além disso, o BHA é mais eficaz para preservar as comidas que contem gorduras de animais, com ácidos graxos de cadeia curta. O BHT e BHA possuem pontos de ebulição de 265 e 268 °C, respectivamente, ambas as substâncias podem ser utilizadas em materiais de embalagem de alimentos, quer por adição directa dos revestimentos internos ou indirectamente, como emulsões, onde eles migram para a comida. Estes antioxidantes têm mostrado ter um efeito sinérgico quando usados em combinação, em particular em produtos de nozes (Kumar et al, 2006; Venkatesh et al, 2011.).

O BHT é produzido nos EUA, na Europa ocidental, Japão, entre outras. Embora, a utilização de BHT não esteja aumentando, ainda é elevada. Seu preço é entre US \$1,6 e US \$2 por kg, tornando-se o antioxidante mais econômico até agora (Kumar, 2006). O BHA e BHT produz uma grande atividade antioxidante. Portanto, as comidas contem misturas acima de 0,02% BHA / BHT (Akoh e Min, 2002).

Outro antioxidante sintético bastante utilizado é a *tert*-butilhidroquinona (TBHQ), utilizada principalmente na preservação dos alimentos, especialmente nos óleos vegetais, mais do que o BHA e BHT. No entanto, TBHQ não é permitido em alimentos no Canadá e os EUA, quando esta combinado com o gaiato de propilo (Akoh e Min, 2002). Na figura 3 estão ilustradas as estruturas dos antixodiantes mais utilizados.

De acordo com um estudo de Botterweck e colaboradores (2000) entre 120.852 homens e mulheres entre 55 a 69 anos de idade, que tinham uma dieta rica em alimentos como óleos, maionese e sopas secas que contêm BHA e BHT, não foram encontrado evidencias claras entre a dieta com baixos níveis de BHA e BHT e o risco de câncer de estômago. No entanto, “*The International Agency for Research on Cancer*”, concluiu que não há provas suficientes para a carcinogenicidade de BHA em animais de experimentação, mas é limitada ao BHT (Noguchi et al, 2000; IARC, 2013).

Um resumo dos regulamentos, aplicações e propriedades da BHA, BHT e TBHQ estão demonstrados na tabela 2 (Sahidi e Zhong , 2005).

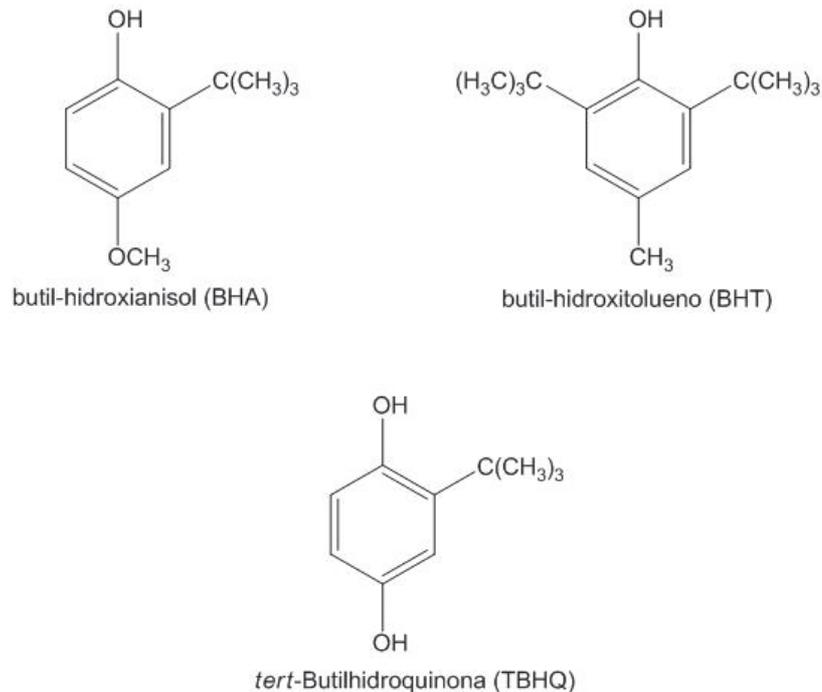


Figura 3 - Estruturas de alguns compostos antioxidantes sintéticos.

Estudos realizados *in vivo* do BHA em camundongos (Iverson, 1999) demonstraram uma resposta positiva nos estômagos dos camundongos, representada por uma inflamação na mucosa. Esta patologia foi observada quando o BHA foi administrado por sonda óleo, ou quando administrado na dieta pela mistura seca (BHA 2%). Utilizando o mesmo protocolo, o TBHQ apresentou o mesmo efeito, porém menos pronunciado que o BHA, igualmente, o BHT produziu um incremento na proliferação celular, mas o efeito foi menor que o observado pelo BHA.

A síntese de novos antioxidantes sintéticos para os alimentos está limitada por custos crescentes na pesquisa e desenvolvimento. Os custos estão associados com a avaliação da segurança e o tempo necessário para a regulamentação e aprovação do uso desses aditivos. Estas restrições aliada a preferencia por aditivos naturais, tem levado a industria a investigar materiais naturais como uma nova fonte de antioxidantes (Akoh e Min, 2002).

Tabela 2 - Propriedades, aplicações e regulações do BHA (Butil-hidroxianisol), BHT (Butil-hidroxitolueno) e TBHQ (*tert*-Butilhidroquinona).

Nome	BHA	BHT	TBHQ
Utilização em comidas	Carnes, especiarias, cereais, purês desidratados, vitaminas, leveduras, óleos vegetais, queijos procesados, margarinas e óleos essenciais	Cereais, produtos preparados no forno, batatas fritas, óleos vegetais, legumes, sanduíches, manteiga, margarina e frutos do mar congelados.	Cereais secos, gorduras, margarina, batatas fritas, carnes de aves, salsichas, embutidos, tortas de carnes e óleos vegetais.
Funções na alimentação	Protege contra os radicais livres formados durante a auto-oxidação de lipídios insaturados e também atividade antimicrobiana como um composto fenólico.	Antioxidante, conservante, evita a rancidez oxidativa em óleos que contém radicais livres formados pela auto-oxidação de lipídios insaturados, atividade antimicrobiana.	Evita a rancidez oxidativa dos alimentos que ocorre pela formação de radicais livres
Efeito sinérgico;	BHT, galato de propilo, metionina, ácido cítrico e fosfórico	BHA.	BHA e ácido cítrico.
Questões de segurança alimentar	Demonstrou-se a formação de tumores no estômago animais.	Este antioxidante não foi submetido à uma grande revisão.	Foi demonstrado mutagenicidade <i>in vivo</i> .
Legislação	EUA: nível máximo aprovado para uso geral; FDA 0,02% e USDA 0,01%, em peso da gordura. Reino Unido e Europa: aprovado. Canadá: aprovado. Austrália / países ao redor do Oceano Pacífico e Japão: aprovado.	EUA: nível máximo aprovado para uso geral; FDA 0,02% e USDA 0,01%, em peso da gordura. Reino Unido e Europa: aprovado. Canadá: aprovado. Austrália / países ao redor do Oceano Pacífico e Japão: aprovado.	EUA: não é permitido para uso em combinação com o galato de propilo, FDA e USDA 0,02% a 0,01%, em peso da gordura. Europa: Reino Unido, Noruega, Dinamarca, Suécia, Suíça: não é permitido utilizar em alimentos. Austrália, Nova Zelândia: apenas uso alimentar. Japão: a sua utilização em alimentos não é permitido

FDA: *Food and Drug Administration*.

USDA: *The U.S. Department of Agriculture*

1.1.7.3 Antioxidantes Naturais

Os antioxidantes naturais são compostos oriundos de plantas, frutas e fontes animais, interferem na formação de RL e retardam a oxidação, prevenindo por exemplo, o desenvolvimento de odores e sabores não desejados nas comidas, resultantes da oxidação. Os produtos alimentícios estão sujeitos a diferentes processos na sua preservação e armazenamento, e antioxidantes adicionados podem diminuir esses processos, por isso esses produtos são enriquecidos com quantidades adicionais de antioxidantes, desde que estejam dentro dos limites permitidos (Tzia et al. 2003, Kumar et al, 2006) As fontes mais comuns de antioxidantes naturais são cereais, frutas cítricas, cacau, o grão de café, ervas e especiarias, dentre outras (Tabela 3) (Tzia e Liadakis, 2003).

Tabela 3 - Antioxidantes naturais utilizados como conservantes de alimentos.

Composto	Fonte Natural
Vitamina C	Frutas (frutas cítricas), alguns vegetais, tomate.
Vitamina E / tocoferóis	Cereais, brócolis, couve-flor, azeites (oliva, girassol), amêndoa, avelã.
β-Caroteno	Pimentão, espinafre, tomate, cenoura, batata doce, damasco, mamão.
Flavonóides	Batata, tomate, alface, cebola, trigo, chocolate, uva, vinho, chá
Antocianinas	Alto conteúdo em vinhos tintos, alguns em uísque
Licopeno	Tomate, papaia, melancia, uvas vermelhas.
CoQ10	Farelo de trigo, carnes orgânicas (fígado de frango).

Entre os antioxidantes naturais os mais comuns incluem compostos fenólicos, por exemplo, tocoferóis, flavonoides e cumarinas e compostos relacionados, derivados do ácido cinâmico e chalconas, diterpenos fenólicos e ácidos fenólicos. Para que um antioxidante natural seja utilizado, este composto extraído de uma fonte

natural deve satisfazer diversos critérios, nomeadamente, não ter cheiro, sabor ou cor, que pode ser dada ao produto, em adição, uma atividade antioxidante alta em pequenas concentrações do produto. Por exemplo, os antioxidantes estão presentes ou adicionados aos alimentos funcionais em concentrações muito baixas, normalmente não superior a 0,02% (Tzia e Liadakis, 2003).

Existem várias metodologias e ensaios para a avaliação das propriedades antioxidantes de uma substância ou mistura. Os mais comumente utilizados são testes de triagem com aprisionamento direto da espécie de radicais cromóforos sintéticos, tais como os radicais DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) e ABTS (ácido-2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sulfónico)) (Arnao et al., 2002) entre outros. O radical ABTS tem um máximo de absorção a 342 nm, possui uma elevada solubilidade em água e uma boa estabilidade química. Quando oxidado pela remoção de um elétron, o radical estável ABTS-cátion gerado, tem um espectro de absorção característico e uma elevada absorção molar a 414 nm (Arnao et al., 2002). No entanto, possui bandas de absorção elevada nas regiões de 645, 734 e 815 nm (Antolovich et al., 2002). A Figura 4 mostra o espectro de absorção dos radicais ABTS-cátion. Na reação entre os radicais ABTS-cátion e a substância antioxidante, a espécie radical é compensada pelo ganho de um elétron. O desaparecimento dos radicais ABTS-cátion pode ser estimada pela diminuição da absorção de praticamente qualquer comprimento de onda entre 400 e 900 nm, ainda que normalmente trabalhe em 734 nm (Rice-Evans et al., 1994; Re et al., 1999; Arnao et al., 2002). A metodologia deste ensaio foi originalmente criado por Rice-Evans e Miller (Rice-Evans e Miller, 1994) e melhorado por Re e Rice-Evans (Re et al., 1999). A capacidade dos antioxidantes presentes em uma amostra para prevenir a oxidação do ABTS^{•+} se compara com o Trolox[®], um análogo hidrossolúvel da vitamina E, e se expressa com valores TEAC (*Trolox equivalent antioxidant capacity*). O valor TEAC se define como a concentração de uma solução de Trolox[®] com potencial antioxidante equivalente a uma concentração de 1 mM de composto antioxidante em estudo (Antolovich et al., 2002).

O método DPPH consiste em avaliar a capacidade antioxidante via atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH[•]). O radical DPPH[•] possui coloração púrpura absorvendo a um comprimento de onda máximo de aproximadamente 516 nm. Por ação de um antioxidante (AH) ou uma espécie radicalar (R[•]), o DPPH[•] é reduzido formando difenil-picril-hidrazina, de coloração

amarela, com conseqüente desaparecimento da absorção, podendo a mesma ser monitorada pelo decréscimo da absorbância (Figura 5). A partir dos resultados obtidos determina-se a porcentagem de atividade antioxidante ou sequestradora de radicais livres e/ou porcentagem de DPPH· remanescente no meio reacional (Sousa et al., 2007).

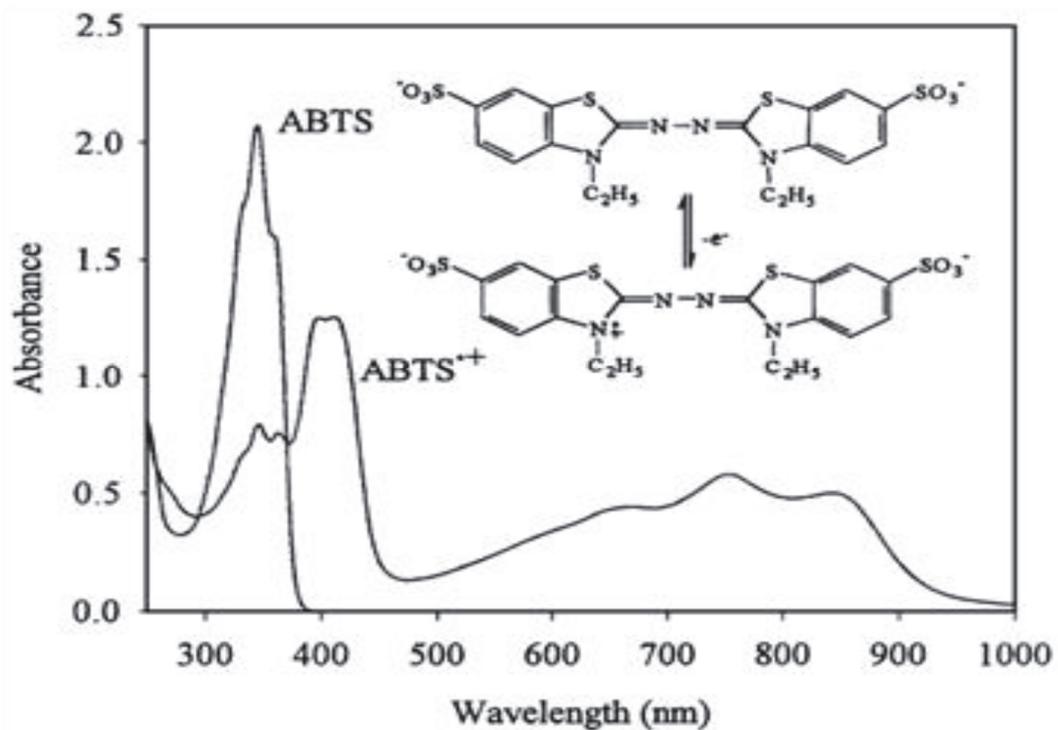


Figura 4 - Espectro de absorção do ABTS e seu cátion-radical ABTS^{•+}.

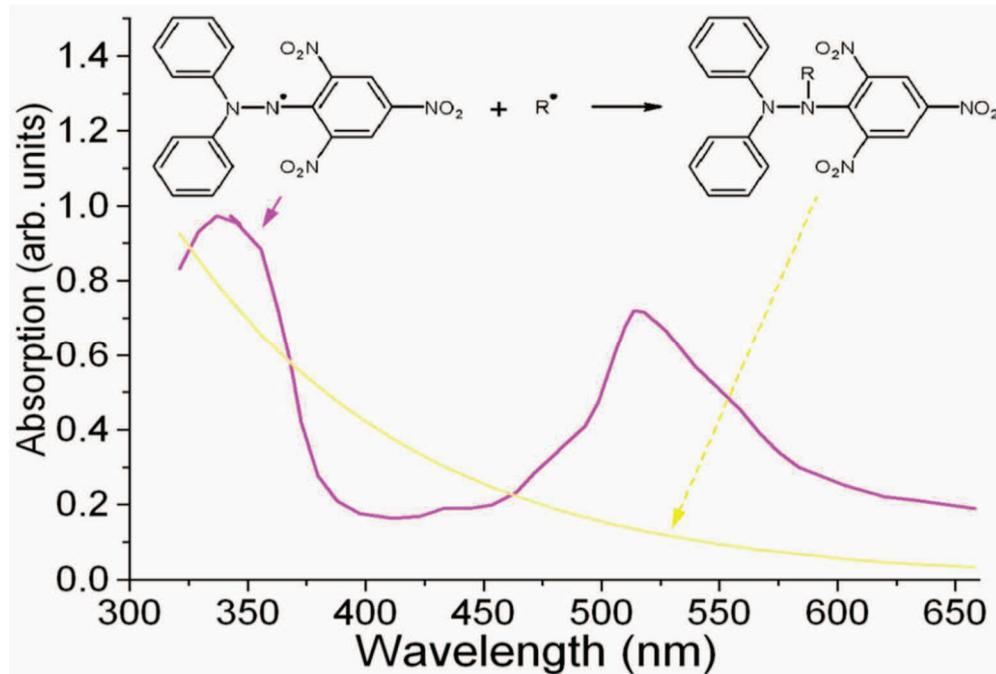


Figura 5 - Variação do espectro de absorção mediante reação de um radical DPPH.

Outro ensaio para determinar a capacidade antioxidante é o método de medir a capacidade de absorção de radicais de oxigénio (ORAC), esta baseia-se na inibição da oxidação do radical peróxido, o qual é iniciado por decomposição térmica de um composto azo, cloreto de AAPH (2,2'-azobis(2-amidinopropano)). A reação de oxidação de radicais peróxido foi estudada pela primeira vez por Glazer e Ghiselli (Glazer et al, 1988; Glazer et al, 1990; Ghiselli et al, 1994). No entanto, este estudo não foi capaz de quantificar os resultados e simplesmente fazer a leitura de uma única amostra. Um desenvolvimento subsequente por Cao (Cao et al., 1993), usando uma molécula fluorescente, a B-ficoeritrina (PE-B), a proteína isolada a partir de *Porphyridium cruentum*, foi capaz de reduzir alguns destes problemas. A perda de fluorescência da PE-B indicam o dano causado pelos radicais peróxido, e o efeito protetor do antioxidante foi medido pela área sob a curva (ABC) da amostra em comparação com o alvo, a combinação da inibição percentual e o tempo de inibição de um radical livre com o antioxidante em uma quantidade única. A ABC (Figura 6) é calculada como descrito abaixo:

$$ABC = 0.5 + f_1/f_0 + f_2/f_0 + \dots + f_{34}/f_0 + 0.5 (f_{35}/f_0)$$

Onde f_0 = fluorescência inicial medida a 0 min

f_i = fluorescência medida a um tempo i .

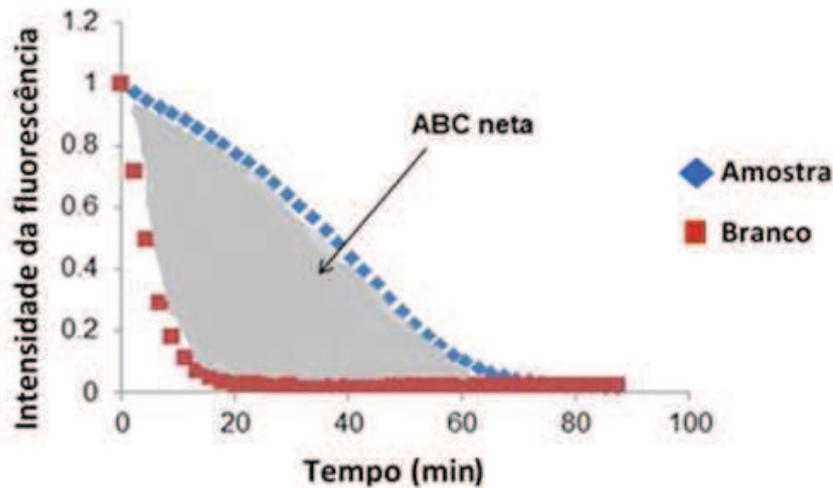


Figura 6 - Curvas de decaimento da fluorescência induzida por radicais peróxido

Mas o B-PE produz muitas inconsistências, o que resultou na variabilidade da reação com radicais peróxido, também não é foto estável. Esta desvantagem levou à busca de uma molécula que pudesse substituí-lo. Em seguida, foi reportado o uso de fluoresceína 3',6'-di-hidroxi-spiro-(isobenzofuran-1[3H],9'[9H]-xanten)-3-ona como uma molécula fluorescente com excelente fotoestabilidade (Ou *et al.*, 2001), método que envolveu tempo e trabalho considerável. Este mecanismo de oxidação foi elucidado e caracterizados por LC/MS (modo de ionização foi de modo negativo) que envolve, primeiro, a oxidação de FL (Figura 7) quando ROO retira um átomo de hidrogênio a partir do grupo fenólico, para formar um radical fenoxi estável (FLO), que pode ser submetido rapidamente a dimerização para dar FL 1 (m/z 661). Alternativamente, a FLO • CO₂ pode atacar vestígios encontrados na solução tampão, e produzir FL 2 (m/z 375,0). Em adição a subtração de hidrogênio ROO pode estar ligado às ligações duplas para formar um radical estável que pode reagir com um outro radical peróxido, formando um endoperóxido intermédia, que se decompõe para originar o produto FL 3 (m/z 349,0). Além disso, é o principal produto de oxidação de FL e FL 4 (m/z 221,3) ele não apresenta fluorescência e é derivado de FL 3. Mais tarde, o método ORAC foi semi- automatizado e adaptado a um analisador COBAS FARA II, mas a automação completa foi conduzido por Huang (Huang *et al.*, 2002) em um leitor de microplacas de 96 poços, este estudo foi realizado em meio aquoso, restringindo a avaliação da atividade antioxidante a antioxidantes lipofílicos. No entanto, estudos realizados por Huang (Huang *et al.*, 2002) foram capazes de superar esse obstáculo usando RMCD (*randomly methylated-cyclodextrin*).

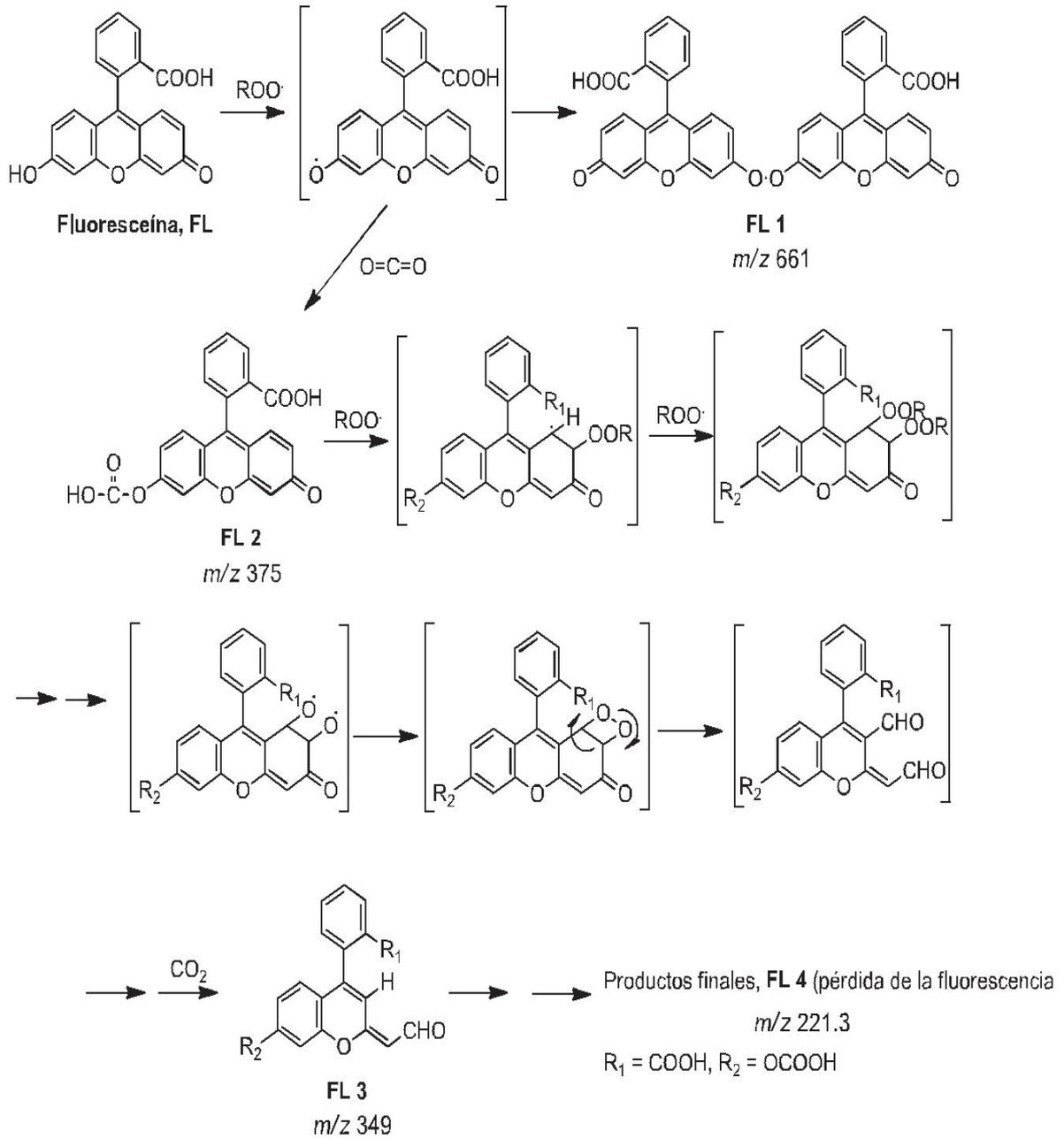


Figura 7 - Mecanismo proposto por Ou e colaboradores (2001) para a oxidação da fluoresceína em presença dos radicais peróxido (AAPH).

1.1.8 Myrtaceae

A família Myrtaceae da qual a planta em estudo faz parte, compreende cerca de 100 gêneros e 3.500 espécies de árvores e arbustos que se distribuem por todos os continentes, à exceção da Antártica, mas com nítida predominância nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Barroso *et al.*, 1991; Marchiori *et al.*, 1997).

As mirtáceas têm sido organizadas tradicionalmente em duas subfamílias, Leptospermoideae e Myrtoideae, esta última incluindo todas as mirtáceas americanas, exceto o gênero monotípico *Tepualia* (Marchiori e Sobral, 1997).

Atualmente, a nova classificação infra-família proposta reconhece duas subfamílias, Myrtoideae e Psiloxylloideae, e 17 tribos (Wilson *et al.*, 2005). Todas as mirtáceas brasileiras estão incluídas na Tribo Myrteae (Wilson *et al.*, 2005). Representada por aproximadamente 1.000 espécies. Myrtaceae é uma das famílias mais importantes do Brasil (Landrum e Kawasaki, 1997) destacando-se, com mais de uma centena de espécies, os gêneros *Eugenia*, *Myrcia* e *Calyptanthus*, enquanto o restante dos gêneros possui menos de 60 espécies brasileiras (Barroso *et al.*, 1994; Landrum *et al.*, 1997).

Myrtaceae é uma das famílias lenhosas dominantes em várias formações vegetais brasileiras, especialmente na Floresta Atlântica onde mais de 50 espécies podem ocorrer sintopicamente (Peixoto *et al.*, 1990; Landrum *et al.*, 1997; Tabarelli *et al.*, 1999; Oliveira Filho *et al.*, 2000; Guilherme *et al.*, 2004). As mirtáceas brasileiras geralmente não produzem madeiras valiosas, restringindo-se ao fornecimento de lenha, à utilização em pequenas peças ou objetos e outras formas de uso local (Marchiori e Sobral, 1997). Por outro lado, há numerosas espécies frutíferas, algumas exploradas comercialmente (ex. goiabeira, *Psidium guajava* L., jabuticabeira, *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg, pitangueira, *Eugenia uniflora* L.).

Essas espécies representam apenas uma pequena fração do grande potencial econômico da família, tendo em vista o grande número de frutos comestíveis produzidos por espécies não comerciais (Landrum e Kawasaki, 1997).

Algumas espécies estão desaparecendo da natureza antes mesmo que se tenha conhecimento básico de sua biologia (Landrum e Kawasaki, 1997), como pode ser visto pelas listas de espécies de Myrtaceae ameaçadas no Brasil divulgadas em (Biodiversitas, 2008). Apesar de sua importância na estrutura das florestas e outras

formações vegetais nativas, estudos de cunho ecológico abordando especificamente as mirtáceas brasileiras ainda são escassos (Pizo *et al.*, 2002; Gressler *et al.*, 2005).

Com poucos dados na literatura o foco do nosso estudo foi a planta *Myrcia amazonica* DC. (Figura 9), pertencente ao gênero *Myrcia*.

Myrcia é um dos gêneros mais representativos da família Myrtaceae com cerca de 300 espécies que são distribuídas pelo território brasileiro. Dentro dos diferentes usos como medicamento natural encontrados no gênero espécies com ação diurética, anti-hemorragico, adstringente, hipoglicemiante e antihipertensiva entre outras (Russo *et al.*, 1990). Apesar de ter um grande número de espécies de *Myrcia* requer ainda um maior número de publicações que descrevem a química deste gênero e a possibilidade de outros usos.

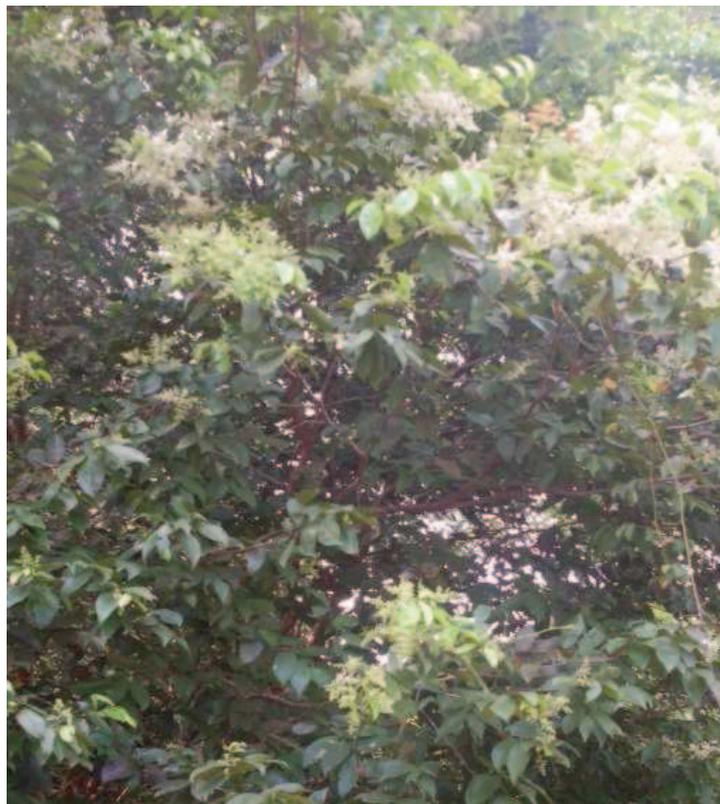


Figura 8 – *Myrcia amazonica* DC., em área de savana próximo a comunidade Santa Rosa, cidade de Santarém, Pará, Brasil.

Alguns estudos têm sido realizados com diferentes myrcias entre eles em *M. citrifolia* onde foi relatada a ocorrência de eucaliptina, uma flavona C-metilado. O extrato metanólico de *M. multiflora* mostrou potente atividade inibidora aldose

redutase (Yoshikawa *et al.*, 1998; Matsuda *et al.*, 2002), uma enzima que está relacionada com algumas complicações da diabetes mellitus (Robison *et al.*, 1995; Srivastava *et al.*, 2003). O fracionamento desse extrato levou ao isolamento de flavanonas glicosiladas (myrciacitrinas I e II) e acetofenonas glicosilada (myrciafenonas A e B). Os óleos essenciais de 17 espécies já foram estudados e ficou demonstrado que sesquiterpenos foram predominantes em todos exceto em *M. myrtifolia* (De Cerqueira *et al.*, 2007), e houve uma larga predominância de monoterpenos e *M. acuminatissima* e *M. bombycina* nos quais o conteúdo de monoterpenos foi apenas ligeiramente maior que o de sesquiterpenos (Henriques *et al.*, 1997; Zoghbi *et al.*, 2003; Limberger *et al.*, 2004).

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar as características físico-químicas, composição química e a capacidade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia amazonica* DC. (Myrtaceae) coletada em savana de Santarém, Pará.

2.2 Objetivos Específicos

- Determinar o teor de óleo essencial de folhas frescas e secas *Myrcia amazônica*;
- Determinar por GC-MS, os principais constituintes químicos do óleo essencial obtido de folhas frescas e secas de *M. amazonica*;
- Determinar por GC-MS, os principais constituintes químicos do extrato obtido de flores de *M. amazonica*;
- Analisar o perfil físico-químico do óleo essencial de folhas de *M. amazonica*;
- Determinar a capacidade antioxidante do óleo essencial de folhas de *M. amazonica*.

3. Referências

- AKOH, C. y MIN, D. **Food lipids chemistry, nutrition, and biotechnology**. Marcel Dekker. Nueva York. n. 15, p. 512-522, 2002.
- ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P.D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S.; ROBARDS, K. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**, v. 127, p.183-198, 2002.
- ARNAO, M.B.; ACOSTA, M.; CANO, A. Antioxidant activity: An adaptation for measurement by HPLC. In: CAZES, J. (Ed.) **Encyclopedia of Chromatography**. Marcel Dekker: New York, p.105–110, 2002.
- ARUOMA, O. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. **Journal of the American Oil Chemists' Society**. v. 75, p. 199-212, 1998.
- ASHOK, B. y ALI, R. The aging paradox: free radical theory of aging. **Experimental Gerontology**. v. 34, p. 293-303, 1999.
- BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils. Rev. **Food and Chemycal Toxicology**. v. 46, p. 446–475, 2008.
- BANDONI, A. **Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica**, su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores. Argentina: Red de Editoriales Universitarias: La Plata, pp. 13-43, 149-171, 197- 232, 2000.
- BARROSO, G. M.; **Sistemática de angiospermas do Brasil**, Imprensa da Universidade Federal de Viçosa: Viçosa, v. 2, 1991.
- BARROSO, G. M.; PERÓN, V. Myrtaceae. In: Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo, RJ. **Aspectos florísticos das espécies vasculares**. (M.P.M. Lima.; R.R Guedes-bruni). Rio de Janeiro: jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1, p. 261-302, 1994.

BIODIVERSITAS. **Lista das Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção**. Disponível em: <<http://www.biodiversitas.org.br/floraBr/grupo3fim.asp>>. Acesso em: 10 feb. 2013.

BOTTERWECK, A., VERHAGEN, H., GOLDBOHM, R., KLEINJANS, J. y BRANDT, P. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: Results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**. v. 38, p. 599-605, 2000.

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.

CAO, G., ALESSIO, H. y CUTLER, R. Oxygen-Radical absorbance capacity assay for antioxidants. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 14 p. 303-311, 1993.

CAN, K.H.; DEMIRCI, F.; Chemistry of essential oils. In: **Flavour and fragrances: chemistry bioprocessing and sustainability**, Anadolu University, Faculty of Pharmacy: Eskişehir, Turkey, 2007.

CLARK, B.; CHAMBLEE, T. Acid-catalyzed reaction of citrus oils and other terpene-containing flavors. In: **Off-Flavors in Foods and Beverages: Developments in Food Science**, v. 28, p. 229-285. 1992.

DE CERQUEIRA, M. D.; SOUZA-NETA, L. C.; PASSOS, M. G. V. M.; LIMA, E. O.; ROQUE, N. F.; MARTINS, D.; GUEDES, M. L. S.; CRUZ, F. G. Seasonal Variation and Antimicrobial Activity of *Myrcia myrtifolia* Essential Oils. **Journal of The Brazilian Chemical Society**, v.18 (5), p. 998-1003, 2007.

DÍAZ J., A.; AVILA L., M.; OYOLA, J. Biocomercio Sostenible. **Estudio del Mercado Nacional de Aceites Esenciales**. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt. Bogotá, p. 85, 2002.

- DOMÍNGUEZ, A. X. **Métodos de investigación fitoquímica**, Limusa: México, 1988.
- FANG, Y., YANG, S. y WU, G. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**. v18. p. 872-879, 2002.
- GHISELLI, A., SERAFINI, M., MAIANI, G., AZZINI, E. y FERRO, A. A fluorescence-based method for measuring total plasma antioxidant capability. **Free Radical Biology and Medicine**.v. 18, p. 29-36, 1994.
- GLAZER, A. Fluorescence-based assay for reactive oxygen species: a protective role for creatinine. **FASEB Journal**. v. 9, p. 2487-2491, 1988.
- GLAZER, A. Phycoerythrin fluorescence-based assay for reactive oxygen species. **Methods in Enzymology**. v. 186, p. 161-168 1990.
- GRESSLER, E. Floração e Frutificação de Myrtaceae de Floresta Atlântica: Influência de Fatores Climáticos, limitações Ecológicas e Filogenéticas. Tese: Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Rio Claro, 2005.
- GVOZDJÁKOVÁ, A. **Mitochondrial medicine**. Mitochondrial metabolism, diseases, diagnosis and therapy. Springer. Eslovaquia. n. 2, p. 23, 2008.
- HENRIQUES, A. T., SOBRAL, M., BRIDI, R., LAMATY, G., MENUT, C., BESSIÈRE, J. M. Essential oils from five southern brazilian species of Myrcia (Myrtaceae). **J. Essent. Oil Res.**, Winston-Salem, v.9, p.13-18, 1997.
- HUANG, D., OU, B., HAMPSCH, M., FLANAGAN, J. y DEEMER, E. Development and validation of oxygen radical absorbance capacity assay for lipophilic antioxidants using randomly methylated β -cyclodextrin as the solubility enhancer. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 1815-1821, 2002.
- HUANG, D., OU, B., HAMPSCH, M., FLANAGAN, J. and PRIOR, R. High-throughput assay of oxygen radical absorbance capacity (ORAC) using a multichannel liquid handling system coupled with a microplate fluorescence reader in 96-well format. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 50, p. 4437-4444, 2002.

International Organization for Standardization, **Essential oils**: determination of optical rotation, ISO 592, 2 ed., 1998.

International Organization for Standardization, **Essential oils**: determination of refractive index, ISO 280, 2 ed. 1998.

International Organization for Standardization, **Essential oils**: determination of relative density at 20 °C, ISO 279, Reference Method, 1998.

International Organization for Standardization, **Essential oils**: determination of freezing point, ISO 1041, 1973.

International Organization for Standardization, **Essential oils**: Evaluation of miscibility in ethanol, ISO 875, 2 ed. 1999.

International Organization for Standardization, **General guidance on the determination of flashpoint**, Technical report ISO/TR 11018.

International Organization for Standardization. **Essential oils**: determination of acid value, ISO 1242, 1999.

International Organization for Standardization. **Essential oils**: determination of ester value, ISO 709, 2001.

IVERSON, F. *In vivo* studies on butylated hydroxyanisole. **Food and Chemical Toxicology**. 1999. 37. pp. 993-997.

JIROVETZ, L.; BUCHBAUER, G. **Processing, análisis and application of essential oils**. Har Krishan Bhalla & Sons: Dehradun, India. 2005.

KALEMBA, D.; KUNICKA, A. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. **Current Medicinal Chemistry**, v.10, p. 813-829, 2003.

KOHEN, R. y NISKA, A. Oxidation of biological systems: oxidative stress phenomena, antioxidants, redox reactions, and methods for their quantification. **Toxicologic Pathology**, v. 30, p. 620-650, 2002.

KUMAR, A. **Antioxidants**: Natural and synthetic. Amani International. Alemania. p. 4, 24. 2006.

LANDRUM, L.; KAWASAKI, M. A Rare and Potentially Economic fruit of Brazil cambuci, *Campomanesia Phaea* (Myrtaceae). **Economic Botany**, v. 51, p. 403-407, 1997.

LANDRUM, L.; KAWAZAKI, M. **The genera of Myrtaceae in Brazil**: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia*, v. 49, p. 508-536, 1997.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T.; MENUT, C.; BRESSIÈRE, J. M. Óleos Voláteis de Espécies de *Myrcia* Nativas do Rio grande do Sul. **Química Nova**, v. 27, No. 6, p. 916-919, 2004.

MARCHORI, J.N.C.; SOBRAL, M. Dentrelogia das Angiospermas: **Myrtales**. Santa Maria: Editora da UFSM. p. 304, 1997.

MATSUDA, H.; NISHIDA, N.; YOSHIKAWA, M. Antidiabetic Principles of Natural Medicines; Aldose Reductase Inhibitors from *Myrcia multiflora* DC.; Structures of Myrciacitrins III, IV, and V. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin** N° 50, v. 3, p.429-431, 2002.

MUÑOZ, F. **Plantas medicinales y aromáticas, estudio, cultivo y procesado**. Mundi Prensa: Madrid, v. 365, p. 281-285, 1987.

NIESSEN, W.M.A. **Current practice of gas chromatography-mass spectrometry**, Chapter 1, Marcel Dekker, INC.: New York, 2001.

NOGUCHI, N., WATANABE, A. y HONGLIAN, S. Diverse functions of antioxidants. **Free Radical Research**. v 33,p. 809-817, 2000.

OLIVEIRA-FILHO, A. T.; FONTES M. A. L. Patterns of Floristic Differentiation Among Atlantic Forests in Southeastern Brazil and the Influence of Climate. *Biotropica* v. 32(4b): p. 793-810, 2000.

OU, B., HAMPSCH, M. y PRIOR, R. Development and validation of an improved oxygen radical absorbance capacity assay using fluorescein as the fluorescent probe. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 49, p. 4619-4626, 2001.

PANCHAWAT, S., RATHORE, K. y SISODIA, S. A review on herbal antioxidants. *International Journal of PharmTech Research*. v. 2, p. 232-239, 2010.

PEIXOTO, A. L.; A. H. GENTRY. Diversidade e Composição Florística da Mata de Tabuleiro na Reserva Florestal de Linhares (Espírito Santo, Brasil). *Rev. bras. Bot.* v. 13, p. 19-25, 1990.

PICHARD, E.; STUART B. Practical laboratory skills training guides. **Gas chromatography, RSC**: Cambridge, UK, p. 1-7, 2003.

PIZO, M. A. 2002. The Seed-dispersers and Fruit Syndromes of Myrtaceae in the Brazilian Atlantic Forest. In: LEVEY, D. J.; SILVA, W. R.; GALETTI, M. Seed Dispersal and Frugivory: **Ecology, Evolution and Conservation**. CAB International. 2002.

POKORNY, J.; YANISHLIEVA, N.; GORDON, M. (Eds). **Antioxidants in food: practical applications**. CRC Press: Boca Raton, 2001.

POMILIO, A. B.; SELDES, A. M.; BURTÓN, G. **Introducción al estudio de los productos naturales**. Monografías OEA: Washington, 1985.

PRATS, M.S.; JIMÉNEZ, A. **Encyclopedia of Chromatography**. 2^a ed. Taylor and Francis Group: Boca Ratón, 2005.

RAO, V. Phytochemicals as nutraceuticals-global approaches to their role in nutrition and health. InTech. Croacia. p. 3, 2012.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.P.; 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.

RICE-EVANS, C. E.; MILLER, N. J. Total antioxidant status in plasma and body fluids. **Methods in Enzymology**, v.234, p.279-293, 1994.

ROBISON, W. G.; LAVERT, N. M.; LOU, M. F. The Role of Aldose Reductase in Diabetic Retinopathy: Prevention and Intervention Studies. **Progress in Retinal and Eye Research**, v.14, p.593-640, 1995.

ROUESSAC, F.; ROUESSAC, A. Cromatografía de gases en: **Análisis química, métodos y técnicas instrumentales modernas**, McGraw Hill: Madrid, España, p. 464, 2003.

RUSSO, E.; REICHEL, A.; DESA, J.; FURLANETTO, R.; MOISES, R.; KASAMATSU, T.; CHACRA, A. Clinical Trial of Myrcia uniflora and Bauhinia forficata Leaf Extracts in Normal and Diabetic Patients. **Brazilian Journal of Medical Biological Research**. v. 23, p. 11 - 20, 1990.

SAHIDI, F. y ZHONG, Y. Bailey's industrial oil and & Sons. n. 12, p. 493-498, 2005.

Some naturally occurring and synthetic food components, furocoumarins and ultraviolet radiation, Disponível em:

<http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol40/volume40.pdf>>Acesso em: 18 jul. 2013.

SOUSA, C. M. de M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S. A.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M, S.; CHAVES, M.H. FENÓIS TOTAIS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE CINCO PLANTAS MEDICINAIS. **Química Nova**, v. 30(2),p. 351-355, 2007.

SRIVASTAVA, S. K.; RAMANA, K. V.; CHANDRA, D.; SRIVASTAVA, S.; BHATNAGAR, A. Regulation of Aldose Reductase and the Polyol Pathway Activity by Nitric Oxide. **Chemico-Biological Interactions**. v. 143–144, p. 333-340, 2003.

STASHENKO, E.; COMBARIZA, Y.; PUERTAS, M. A. **Aceites esenciales**: técnicas de extracción y análisis. Universidad Industrial de Santander: Bucaramanga, 1998.

STASHENKO, E. **Aceites Esenciales**. División de Publicaciones UIS: Bucaramanga, 2009.

STASHENKO, E.; MARTÍNEZ, J.; GC y GC-MS: configuración del equipo versus aplicaciones, **Scientia Chromatographica**, v. 2(3), 23-46, 2010.

TABARELLI, M.; MANTOVANI, W. A Riqueza de Espécies Arbóreas na Floresta Atlântica de Encosta no Estado de São Paulo. **Rev. bras. Bot.** v. 22, p. 217-223, 1999.

TOLEDO, M. **Tituladores Mettler Toledo DL31/DL38**. Fundamentos de la valoración volumétrica según Karl-Fischer, con 10 aplicaciones seleccionadas, Folleto aplicativo v. 26, p. 6-8.

TZIA, C. y LIADAKIS, G. **Extraction optimization in food engineering**. Marcel Dekker. Nueva York. n. 10, p. 340-341, 2003.

VENKATESH, R. y SOOD, D. A review of the physiological implications of antioxidants in food. Tesis de pregrado. Worcester Polytechnic Institute. p. 22-24, 2011.

VERMERRIS, W. y NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry**. Springer. Dordrecht. v. 1, p. 2, 58, 2006.

WILSON, P. G.; O'BRIEN, M. M.; HESLEWOOD, M. M.; QUINN, C. J. Relationships within Myrtaceae sensu lato based on a matK phylogeny. **Plant Systematics and evolutions**. v. 251, p. 3–19, 2005.

YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; NISHIDA, N.; LI, Y.; TOGUCHIDA, I.; YAMAHARA, J.; MATSUDA, H. Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and alpha-glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, 1998, v. 46(1), p. 113.

ZOGHBI, M. D.; ANDRADE, E. H. A.; DA SILVA, M. H. L.; CARREIRA, L. M. M.; MAIA, J. G. S.; Essential oils from three *Myrcia* species. **Flavour and Fragrance Journal**. v. 18, p. 42 – 424, 2003.

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA, COMPOSIÇÃO E CAPACIDADE ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Myrcia amazonica* DC. (Myrtaceae)*

Víctor Yesid Pérez Calao

Elena Stashenko

Rosa Helena Veras Mourão

* Capítulo escrito de acordo com as normas do periódico Food Chemistry (ISSN 0308-8146), após revisão o mesmo será traduzido para língua inglesa e submetido ao periódico.

Caracterização físico-química, composição e capacidade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia amazonica* DC.

Víctor Yesid Pérez calao^{a,*}, Elena Stashenko^b, Rosa Helena Veras Mourão^a

^a Programa de Pós-Graduação em Recursos Naturais - Universidade Federal do Oeste do Pará/ UFOPA, Rua Vera Paz, s/n Santarém 68135110 - Santarém, Pará, Brasil

^b Universidad Industrial de Santander, CENIVAM, Cra 27 con calle 9 Ciudad Universitaria, Bucaramanga, Santander, Colombia

RESUMO

Neste estudo foram realizadas investigações físico-químicas e a atividade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia amazonica* DC., uma espécie nativa da região. O óleo essencial utilizado para a identificação dos compostos e físico-químicas e os ensaios de atividade anti-oxidantes foi obtido pelo método de hidrodestilação. A cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa foi utilizada para a identificação dos compostos voláteis presentes nas folhas e flores, a atividade antioxidante foi calculada pelo método de ABTS⁺ e ORAC. Os compostos majoritários de interesse encontrados no óleo essencial foram o Germacreno D(10.09 - 16.56%), Germacreno B(9.59 - 11.09 %) e 1-Epi-Cubenol(14.72 - 20.22%). O rendimento do óleo essencial foi de 0.65% e 0.96 % para folhas frescas e secas, respectivamente, a diferença na composição dos óleos essenciais entre as folhas frescas ou secas foi relevante. O maior valor para a atividade antioxidante do óleo essencial registrado com o método ORAC foi de 1310 µmol Trolox[®]/g de substância, em relação ao método ABTS⁺ com 290 µmol Trolox[®]/g de substância.

Palabras chaves: *Myrcia amazonica* DC., ORAC, ABTS⁺, atividade antioxidante, óleo essencial.

1. Introdução

A família Myrtaceae compreende cerca de 100 gêneros e 3.500 espécies de árvores e arbustos que se distribuem por todos os continentes, à exceção da Antártica, mas com nítida predominância nas regiões tropicais e subtropicais do mundo (Barroso, 1994, Marchiori e Sobral 1997), incluindo espécies frutíferas e medicinais. No Brasil a família é representada por 23 gêneros e cerca de 1000 espécies, sendo o gênero *Myrcia* um dos mais importantes, com aproximadamente 300 espécies distribuídas sobre todo o território brasileiro (Landrum & Kawasaki, 1997). Tribos indígenas e comunidades tradicionais brasileira têm usado várias espécies deste gênero como adstringente, diuréticos, contra diabetes mellitus, para estancar hemorragias e no tratamento de hipertensão e úlceras (Russo et al., 1990).

Do ponto de vista químico tem sido detectado em espécies de mirtáceas, sobretudo, a presença de β -amirina e eucaliptina, em folhas de *M. citrifolia* (Aubl.) Urb. (Gottlieb et al., 1972); flavanonas (mirciatricina I e II), acetofenas (mirciafenonas A e B) e flavonóis (mirciatricina, mearnsitrina, quercitrina, desmantina-1 e guaiajaverina), em folhas de *M. multiflora* (Yoshikawa, et al., 1998). Nos óleos essenciais de espécies de *Myrcia*, estudos têm mostrado a presença de monoterpenos, sesquiterpenos, compostos aromáticos e alifáticos. Para a maioria das espécies estudadas a fração sesquiterpênica foi predominante (De cerqueira et al., 2007), e houve uma larga predominância de monoterpenos e *M. acuminatissima* e *M. bombycina* nos quais o conteúdo de monoterpenos foi apenas ligeiramente maior que o de sesquiterpenos (Henriques et al., 1997; Zoghbi et al., 2003; Limberger et al., 2004). Zoghbi et al., (2003) analisaram os óleos voláteis de partes aéreas de *M. bracteata* (Rich.) DC., *M. cuprea* e *M. sylvatica* (G. Mey.) DC., e relataram a presença de mirceno, (*E*)-nerolidol, (*E*)- β -farneseno, espatulenol, β -cariofileno, germacreno D, selina-11-em-4- α -ol e ciscalameneno, como os componentes mais representativos para as espécies estudadas.

Os óleos essenciais e extratos de plantas têm atraído grande interesse científico, devido ao seu potencial como fonte de antioxidantes naturais e compostos biologicamente ativos. Dentre as espécies produtoras de óleo essencial e com uso bastante diversificado, destaca-se plantas da família Myrtaceae, nas quais é frequente a presença de sesquiterpenos cíclicos.

Como parte do projeto de investigação de óleos essenciais de espécies da família Myrtaceae da região Oeste do Pará, Brasil, Baixo Amazonas, onde espécies de *Myrcia* são abundantes e apresentam potencial de uso, o objetivo deste trabalho foi avaliar as características físico-químicas e a capacidade antioxidante do óleo essencial de *Myrcia amazonica* DC. coletada em savana de Santarém, Pará.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material botânico

Amostras de folhas e flores de *Myrcia amazonica* DC. foram coletadas em outubro de 2012 entre 8:00 a 9:00 a.m de exemplar nativo em área de savana próximo a comunidade Santa Rosa, Km 21 da Rodovia Everaldo Martins, estrada que liga a cidade de Santarém a vila Alter do Chão, Pará, Brasil (S 02° 30.464' W 054° 50.931'). Exsicatas da espécie encontram-se depositadas no herbário do Instituto Nacional de Pesquisa do Amazonas (INPA - Manaus AM) sob número de registro 250.3639.

Parte do material vegetal (folhas) usado para extração de óleo essencial foi seco em estufa com circulação de ar forçada a 40 °C, pulverizadas em moinho elétrico, e o pó obtido foi armazenado em embalagem hermeticamente fechadas até o momento do uso.

2.2 Obtenção e rendimento do óleo essencial

O óleo essencial de *M. amazonica* DC. foi obtido de folhas secas (370 g de pó) e frescas (370 g de material picado) por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger (Ming et al., 1996). O tempo de extração foi fixado em 150 min, considerado a partir do primeiro condensado gerado pela fervura da água contida no balão, realizando-se nove repetições extrativas para cada amostra. Para remoção de água residual do óleo essencial este foi filtrado com sulfato de sódio anidro.

O cálculo de rendimento dos óleos essenciais foi realizado com base na matéria livre de umidade, através da relação entre o volume de óleo obtido e a biomassa vegetal utilizada na extração (Farmacopéia Brasileira, 2001) de acordo com a seguinte equação:

$$\% p/p = \left(\frac{g \text{ do óleo essencial}}{g \text{ do material vegetal seco}} \right) \times 100$$

2.3 Obtenção do extrato das flores

Para o preparo do extrato das flores de *M. amazonica* DC. foram utilizadas 11 g de flores em 50 mL de diclorometano mantido à temperatura de 5 °C durante 20 dias. Em seguida, o extrato foi filtrado com sulfato de sódio anidro para remoção de impurezas e água.

2.4 Análise por GC-MS para óleo essencial das folhas e extrato de flores

A análise cromatográfica e espectros de massa das amostras foram obtidos usando um Agilent Technologies 6890 Plus Series GC System, acoplado a um detector seletivo de massa Agilent Technologies MSD 5973 Network Mass Selectivity Detector, e estão equipados com uma porta de injeção split/splitless (250 °C, razão de divisão 30:1), um mostrador automático Agilent Technologies 7863 e um Auto sampler Agilent Technologies 7863. A separação dos analitos foi realizada em uma coluna capilar apolar DB-5MS (J & W Scientific, Folsom, CA, EUA) de 60 m × 0,25 mm, DI x 0,25 µm, df, fase estacionária de 5%-fenil-poli (metil-siloxano). O gás de arraste utilizado na análise foi o hélio (99,995%), com uma pressão de entrada na cabeça da coluna de 16,47 psi. A temperatura do forno foi programada de 45 °C (5 min) a 4 °C/min até 150 °C (2 min), sendo aumentada a uma taxa de 5 °C/min até 250 °C onde se mantém isotermicamente por 5 min, e posteriormente aumentando para 10 °C/min até 275 °C, temperatura em que permanece constante durante 15 min.

Os espectros de massa foram obtidos por impacto de elétrons (EI) a 70 eV de energia. As temperaturas da câmara de ionização e linha de transferência foram mantidas a 230-285 °C, respectivamente. Espectros de massa e correntes de íons, (Total Ion Current) foram obtidas em um analisador quadrupolo, através de varredura automática de frequência (full scan), na faixa de massa de m/z 40-350.

Os dados cromatográficos foram obtidos e processados com o sistema de dados Hewlett-Packard MS ChemStation G17001DA (Versão D 00.01.27, 2002), que inclui a base de dados Wiley, NIST e Adams, 2004.

2.5 Análises das propriedades físico-químicas do óleo essencial

Todas as provas físico-químicas do óleo essencial de *M. amazonica* DC., densidade, índice de refração, solubilidade em etanol, rotação óptica, conteúdo de umidade, ponto de congelamento, ponto flash point, índice de acidez e índice de

ésteres foram realizadas segundo as normas internacionais ISO (International Standard Organization, 279, 280, 875, 592, 11021, 1041, TR 111018, 1242, 709). Todos os reagentes utilizados nos ensaios foram de grau analítico. Para controlar a temperatura nas análises onde é necessário mantê-la constante foi usado um banho refrigerado.

2.6 Atividade antioxidante do óleo essencial por ABTS⁺ e ORAC

2.6.1 Ensaio do cation-radical ABTS⁺.

A determinação da capacidade antioxidante dos óleos essenciais e das substâncias controle (BHT e α -Tocoferol) foi realizado com base nos procedimentos realizados por Re et al., (1999), foi empregada microscopia VIS a 750 nm, em um leitor de microplacas Turner Biosystems Inc., ModulusTM II Microplate Multimode Reader, com 96 poços. Uma solução de cation radical ABTS⁺ foi preparado pela mistura de uma solução de ABTS (7 mM) com persulfato de potássio (2,45 mM). A mistura foi homogeneizada em ultrasson durante 30 minutos e deixou reagir por 24 horas a 4 °C, na ausência de luz. A partir desta solução, diariamente, soluções de trabalho de $0,710 \pm 0,003$ absorção foram preparadas.

A preparação do Trolox[®] (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico), para a curva de calibração foi realizada com diluições de 10 a 100 μ M em etanol 96%.

O óleo essencial foi diluído com etanol até que a sua adição a um volume de solução de ABTS⁺ (absorvância: $0,71 \pm 0,03$), resultando em uma inibição entre 10 e 80% da absorvância do branco. Para as substâncias controle 1 mM das soluções estoque foram preparadas, que também foram diluídas até inibições serem produzidas entre 10 e 80%.

A porcentagem de inibição do óleo essencial das substâncias de referencia foi calculada com a seguinte equação:

$$\text{Inibição de } A_{\lambda=750}(\%) = [1 - A_f / A_o] \times 100$$

Onde:

A_f : Absorbância medida 30 min após a adição do possível antioxidante.

A_o : Absorbância do branco de reação (cation-radical sem inibir).

A capacidade antioxidante foi determinada mediante a diminuição na coloração azul-esverdeada do cátion radical de ABTS⁺, que reagem com o possível antioxidante (AH), gera o incolor ABTS (Campos e Lissi, 1999), como se segue:



Os valores da capacidade antioxidante das amostras foram expressas como mol de Trolox[®] / g de amostra, tendo em conta a curva de calibração de Trolox[®].

2.6.2 Capacidade de absorção do radical de oxigênio ORAC

Este ensaio foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Huang et al., (2002). Fluoresceína (FL), foi adicionado a diluições na microplaca, agitou-se e incubou-se a 37 °C durante 15 minutos. Após este tempo decorrido é adicionada rapidamente uma solução AAPH, e a diminuição na fluorescência de fluoresceína, em função do tempo foi registada. Medidas padrão Trolox[®] foi usado como controle, e foi quantificada através da curva de calibração.

A resposta à capacidade antioxidante das amostras foi a área sob a curva (ABC), em relação à curva do branco, o qual é diretamente proporcional ao valor ORAC expressos em µmol Trolox[®] / g de amostra. O valor ABC foi calculado da seguinte forma:

$$\mathbf{ABC} = 0.5 + f_1/f_0 + \dots + f_i/f_0 + \dots + f_{34}/f_0 + 0.5(f_{35}/f_0)$$

Onde:

f₀ : Fluorescência inicial medida em 0 minutos.

f_i : Fluorescência medida em tempo i.

$$\text{ABC}_{\text{NETA}} = \text{ABC}_{\text{AMOSTRA}} - \text{ABC}_{\text{BRANCO}}.$$

O valor de ORAC é calculado com a seguinte equação:

$$\text{ORAC} = \frac{\text{ABC}_{\text{AH}}}{\text{ABC}_{\text{Trolox}}} \times \frac{[\text{Trolox}]}{[\text{AH}]}$$

Onde:

ABC_{AH} : Área sob a curva, na presença de antioxidante.

ABC_{Trolox} : Área sob a curva de Trolox[®].

[Trolox] : Concentração de Trolox[®].

[AH] : Concentração de antioxidante.

3. Resultados e discussão

3.1 Rendimento e propriedades físico-químicas óleo essencial de *M. amazonica*.

O óleo essencial de *M. amazonica*, após extração por hidrodestilação, apresentou um rendimento de 0.65% para folhas frescas e de 0.96% para folhas secas, ambos com aparência amarela e aroma agradável. O rendimento do óleo essencial de *M. amazonica* foi favorecido pela secagem das folhas. Isto indica que se o processo de secagem for bem conduzido, poderá favorecer a eficiência do processo de extração por hidrodestilação.

Na tabela 1 estão apresentados os resultados físico-químicos do óleo essencial obtido de folhas frescas de *M. amazonica*. A criação de uma ficha técnica para óleos essenciais possibilita criar o uso posterior para diferentes aplicações.

Pela ficha técnica criada para o óleo essencial de *M. amazonica* pode ser observado que o mesmo apresenta uma densidade abaixo de 1 g/cm³, o que indica ser rico em terpenos, um ponto de congelamento que favorece seu armazenamento por um longo período além de ter a vantagem de ser utilizado em processos industriais onde se utiliza baixas temperaturas. O seu percentual de umidade baixo o torna pouco oxidável e dificulta o ataque por fungos. Vale destacar ainda, que a sua solubilidade em etanol pode ser aproveitada na indústria de fragrância, o que torna um óleo com prospecção para diferentes usos.

Tabela 1

Propriedades físico-químicas do óleo essencial de folhas de *Myrcia amazonica* DC.

Norma	Parâmetro avaliado	Resultado
ISO 1242:1999	Índice de acidez (mg de KOH/g de OE) ¹	0,6
ISO 709: 2001	Índice de ésteres (mg de KOH/g de OE) ^{1,2}	1,50
ISO 279: 1998	Densidade relativa	0,927 ± 0,001
ISO 280: 1998	Índice de refração (n _D)	1,509 ± 0,001
ISO 11021: 1999	Umidade (%)	0,5 ± 0,1
ISO/TR 11018: 1997	Flash Point (°C)	92,5 ± 1
ISO 1041: 1973	Ponto de congelamento (°C)	<-20
ISO 592: 1998	Rotação óptica ³	32,0 ± 0,4
Solubilidade do OE em etanol (norma ISO 875, 1999)¹		
Concentração % (v/v)		Etanol 95 %
V ^I (Solúvel)		0,0 – 0,4 mL
V ^{II} (Opalescente)		0,4 – 0,5 mL
V ^{III} (Solúvel)		0,5 – 0,6 mL
V ^{IV} (Opalescente)		0,6 – 3,5 mL
V ^V (Solúvel)*		3,5 – 20 mL

OE: Óleo essencial; 1 Massa de OE (2g); 2 tempo de fervura da água (90 minutos); 3 Medição de temperatura ambiente 24 ± 2 °C em tubo de 10 cm de comprimento; *Precipitação de uma pequena fração do OE.

3.2 Análise por GC-MS do óleo essencial de folhas e extrato de flores de *M. amazonica* DC.

Os constituintes químicos do óleo essencial de *Myrcia amazonica* DC., foram avaliados em função da planta fresca e seca. Como pode ser observado na tabela 2 os compostos com maior quantidade relativa (%) para ambas as amostras foram germacreno D (10.09 – 16.56 %), Germacreno B (9.59 – 11.09 %) para folhas frescas e secas respectivamente e 1-Epi-Cubenol (14.72 folhas secas e 20.22% para folhas frescas). Apesar dos óleos essenciais obtidos com a planta seca apresentarem os mesmos compostos majoritários da planta fresca, o perfil e teor da composição química entre as amostras foram divergentes. Para o extrato das flores os mesmos constituintes majoritários foram observados, porém, estes em concentrações mais elevadas a exceção de germacreno B (tabela 3). Estes resultados demonstram que os constituintes majoritários do OE da espécie, estão distribuídos em varias partes da planta.

A presença de germacreno D e B já foi verificada em outras espécies de plantas aromáticas, apresentando atividade antiinflamatória e analgésica (Vieira et al., 2009), atividade larvicida (Ramirez et al., 2011), atividade antibacteriana (Jimenez et al., 2012) e atividade antiinflamatória (Dambolena et al., 2011).

Tabela 2

Quantidade relativa (%) e identificação dos componentes do OE de *Myrcia amazonica* DC.(folhas secas e frescas)

Nº	<i>I_R</i> exp. DB- 5MS	Componentes	Quantidade relativa, %. Folha fresca.	Quantidade relativa, %. Folha seca.	Nº	<i>I_R</i> exp. DB- 5MS	Componentes	Quantidade relativa, %. Folha fresca.	Quantidade relativa, %. Folha seca.
1	855	3Z-Hexenol	0.33	-	28	1502	Viridifloreno	0.50	0.58
2	868	N-Hexanol	0.16	-	29	1505	γ-Patchouleno	0.60	0.62
3	937	α-Pineno	1.87	0.37	30	1507	Epizonareno	1.04	0.70
4	982	β-Pineno	1.57	0.39	31	1511	Biclogermacreno	2.27	2.71
5	989	Myrceno	0.19	-	32	1516	δ-Amorfeno	2.31	2.45
6	1033	Limoneno	0.28	-	33	1528	γ-Cadineno	3.71	5.66
7	1047	E-β-Ocimeno	0.13	-	34	1530	δ-Cadineno	2.06	2.20
8	1200	β-Fenchyl álcool	0.14	-	35	1534	<i>trans</i> -Calameneno	0.76	0.98
9	1345	δ-Elemeno	2.27	2.21	36	1546	Selina-3,7(11)-diene	-	2.17
10	1381	α-Ylangeno	0.22	0.47	37	1550	α-Cadineno	1.96	2.35
11	1383	Ciclosativeno	-	0.13	38	1559	Elixene	2.08	1.87
12	1387	α-Copaeno	0.17	0.28	39	1563	Silphiperfol-5-en-3-ol A	3.20	2.65
13	1398	β-Elemeno	2.50	2.56	40	1582	Germacreno B	9.59	11.09
14	1433	Copaeno	0.26	0.31	41	1600	Espatuleno	0.18	0.15
15	1436	E-Cariofileno	3.41	4.96	42	1603	Óxido de Cariofileno	0.44	0.25
16	1440	γ-Elemeno	2.15	2.66	43	1612	α-Guaiol	1.30	0.37
17	1444	β-Copaeno	0.26	0.29	44	1638	1-Epi-Cubenol	20.22	14.72
18	1447	α-Guaieno	0.31	0.57	45	1645	Muurola-4,10(14)-dien-1-β-ol	1.82	2.46
19	1454	6,9-Guaiadieno	0.44	0.65	46	1650	γ-Eudesmol	1.06	0.44
20	1459	<i>cis</i> -Muurola-3,5-dieno	0.51	0.59	47	1660	α-Muurolol	6.21	3.36
21	1463	9-epi-β-Cariofileno	0.34	0.46	48	1673	α-Cadinol	2.52	1.42
22	1472	Humuleno	1.92	2.23	49	1676	α-Eudesmol	1.07	0.49
23	1476	<i>trans</i> -Muurola-4(14),5-dieno	0.79	1.00	50	1679	Selin-11-en-4-α-ol	0.38	0.26
24	1488	γ-Muuroleno	0.89	1.46	51	1681	Bulnesol	0.46	0.30
25	1491	Valenceno	-	0.47	52	1718	Alcanfor Juniper	1.16	0.49
26	1493	α-Amorfeno	1.62	-	53	1730	Isoespatuleno	0.15	0.45
27	1498	Germacreno D	10.09	16.56	54	1793	Drimenol	0.16	0.15

Tabela 3

Quantidade relativa (%) e identificação dos componentes do extrato de flores de *Myrcia amazonica* DC..

N°	<i>I_R</i> exp. DB-5MS	Componentes	Quantidade relativa, %. Flores.
1	937	α-Pineno	2.1
2	982	β-Pineno	1.3
3	1035	Álcool benzílico	2.6
4	1047	E-β-Ocimeno	0.9
5	1116	Álcool fenil etílico	2.5
6	1198	Salicilato de metilo	1.2
7	1434	E-Cariofileno	6.1
8	1438	γ-Elemeno	0.5
9	1453	Allo-aromadendreno	0.6
10	1470	Humuleno	2.1
11	1485	γ-Muuroleno	1.3
12	1489	α-Elemeno	0.9
13	1494	Germacreno D	27.6
14	1497	δ-Selineno	0.6
15	1503	β-Selineno	1.9
16	1509	α-Selineno	2.1
17	1514	δ-Amorfenol	1.6
18	1525	γ-Cadineno	5.9
19	1528	δ-Cadineno	2.6
20	1533	<i>trans</i> -Calameneno	0.4
21	1544	Selina-3,7(11)-diene	0.6
22	1548	α-Cadineno	1.0
23	1552	β-Panasinseno	0.8
24	1559	Elixene	1.2
25	1576	Germacreno B	5.0
26	1599	Óxido de Cariofileno	0.5
27	1630	1-Epi-Cubenol	18.4
28	1636	N.I	0.7
29	1642	Muurolo-4,10(14)-dien-1-β-ol	1.0
30	1655	α-Muurolol	2.1
31	1673	α-Cadinol	0.8
32	1680	Bulnesol	0.8
33	1686	Cadaleno	0.7
34	1846	N.I	1.6

N.I = Não identificado

3.3 Capacidade antioxidante do óleo essencial de *M. amazonica* por ABTS⁺ e ORAC

A capacidade antioxidante de óleo essencial equivalente a Trolox[®] (TEAC) representa a concentração da solução de Trolox[®] que tem a mesma capacidade de consumo que os radicais livres de óleo essenciais. Com a finalidade de comparar os resultados de capacidade antioxidante do óleo essencial que é obtido por meio de métodos diferentes (ABTS⁺ e ORAC) com uma curva padrão de referência, o antioxidante Trolox[®] foi realizado em concentrações de 10 mM a 100 mM utilizando etanol absoluto como um solvente no caso de ABTS⁺ e metanol com o método ORAC. A partir da equação de correlação com a qual a sua equivalência correspondente Trolox[®] são expressos de acordo com o percentual de atividade antioxidante obtida (tabela 4). Cada teste foi realizado em triplicata.

Os métodos também foram avaliados por dois dos antioxidante sintético mais comumente usados BHT (hidroxitolueno butilado) e α -tocoferol, a fim de fazer uma comparação dos resultados. Os resultados obtidos, mostram que o óleo essencial de *M. amazonica* apresenta uma capacidade antioxidante maior pelo método ORAC comparado com o método ABTS⁺ ou seja, a composição do óleo essencial favorece o mecanismo de transferência de hidrogênio (TAH).

Tabela 4

Atividade antioxidante do óleo essencial de folhas frescas de *Myrcia amazonica* DC. (Myrtaceae) pelos métodos do radical ABTS⁺ (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) e ORAC (capacidade de absorção do radical de oxigênio).

Amostra	Valor ORAC ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$/g substância)	VALOR ABTS⁺ ($\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$/g substância)
Óleo essencial	1310 \pm 11	290 \pm 7
α -Tocoferol	530 \pm 17	1510 \pm 48
BHT	330 \pm 28	4200 \pm 231

BHT - antioxidante sintético (hidroxitolueno butilado); Trolox[®] (ácido-6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-carboxílico)

4. Conclusões

Com esta investigação foi gerado o primeiro estudo físico-químico e da atividade antioxidante do óleo essencial obtido das folhas e flores de *Myrcia amazonica* DC., contribuindo para a caracterização da espécie prevendo usos futuro na indústria de produtos naturais.

O óleo essencial obtido pelo método de hidrodestilação teve um alto rendimento, e este valor de extração é aceitável comercialmente quando se compara com outras espécies aromáticas.

A composição do óleo essencial não foi alterada com o processo de secagem, gerando uma vantagem no armazenamento da espécie seca.

Os compostos majoritários do óleo essencial de folhas e do extrato das flores de *Myrcia amazonica* DC. foram Germacreno D, Germacreno B e 1-Epi-Cubenol.

Levando em consideração os valores encontrados para as substâncias de referencia BHT e α -tocoferol (330 ± 28 e 530 ± 17 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g substância) respectivamente, o óleo essencial de *Myrcia amazonica* DC. apresentou a maior atividade antioxidante pelo método ORAC (1310 ± 11 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g substância).

No ensaio de catión-radical ABTS⁺, o óleo essencial apresentou um resultado abaixo (290 ± 7 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g substância) dos obtidos pelos antioxidantes BHT e α -tocoferol (4200 ± 231 e 1510 ± 48 $\mu\text{mol Trolox}^{\text{®}}$ / g substância) respectivamente, provavelmente devido a ausência de compostos capazes de diminuir a absorbância do catión-radical ABTS⁺, assim o método ORAC foi o mais adequado para determinar as propriedades antioxidantes do óleo essencial avaliado.

Com base nas reações químicas envolvidas nos ensaios utilizados para determinar a capacidade antioxidante, o óleo essencial preferiu o mecanismo de transferência de um átomo de hidrogênio (HAT), em quanto que os antioxidantes

sintéticos avaliados (BHT e α -tocoferol) preferem os mecanismos baseados na transferência de elétrons.

Os resultados expostos neste trabalho auxiliarão estudos futuros para o aproveitamento do óleo essencial de *Myrcia amazonica* no campo agroindustrial.

Conflito de interesse

Os autores declaram que não há conflito de interesse.

Referências

AKOH, C. y MIN, D. Food lipids chemistry, nutrition, and biotechnology. Marcel Dekker. Nueva York. 2002. Capítulo 15. pp. 512-522.

BADARINATH, A., MALLIKARJUNA, K., MADHU, C., RAMKANTH, S., RAJAN, T. y GNANAPRAKASH, K. A review on *In-vitro* antioxidant methods: Comparisons, correlations and considerations. *International Journal of PharmTech Research*. 2010. 2. pp. 1276-1285.

BARROSO, G. M.; PERÓN, V. Myrtaceae. In: Reserva Ecológica de Macaé de Cima, Nova Friburgo, RJ. Aspectos florísticos das espécies vasculares. (M.P.M. Lima.; R.R Guedes-bruni). Rio de Janeiro: jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1, p. 261-302, 1994.

CAMPOS, A. y LISSI, E. Kinetics of the reaction between 2,2-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) derived radical cations and phenols. *International Journal of Chemical Kinetics*. 1999. 29. pp.219-224.

DAMBOLENA, J., MERILES, J., LÓPEZ, A., GALLUCCI, M., GONZÁLEZ, S., GUERRA, P., BRUNO, A., ZUNINO, M. Actividad antifúngica del aceite esencial de cinco especies de *Juniperus* de Argentina. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*. 2011. v. 10 (2). pp. 104 - 115

DE CERQUEIRA, M. D.; SOUZA-NETA, L. C.; PASSOS, M. G. V. M.; LIMA, E. O.; ROQUE, N. F.; MARTINS, D.; GUEDES, M. L. S.; CRUZ, F. G. Seasonal Variation and Antimicrobial Activity of *Myrcia myrtifolia* Essential Oils. *Journal of The Brazilian Chemical Society*, v.18 (5), p. 998-1003, 2007.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4.ed. São Paulo: Atheneu, v.2, 2001.

Gottlieb, O. R.; Silva, M. L.; Maia, J. G. S. *Phytochemistry*. 1972. 11. p. 1185.

HALLIWELL, B. Antioxidant characterization, methodology and mechanism.
Biochemical Pharmacology. 1995. 49. pp. 1341-1348.

HUANG, D., OU, B. y PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays.
Journal of Agricultural and Food Chemistry. 2005. 53. pp. 1841-1856.

International Organization for Standardization, Essential oils: determination of optical rotation, ISO 592, 2 ed., 1998.

International Organization for Standardization, Essential oils: determination of refractive index, ISO 280, 2 ed. 1998.

International Organization for Standardization, Essential oils: determination of relative density at 20 °C, ISO 279, Reference Method, 1998.

International Organization for Standardization, Essential oils: determination of freezing point, ISO 1041, 1973.

International Organization for Standardization, Essential oils: Evaluation of miscibility in ethanol, ISO 875, 2 ed. 1999.

International Organization for Standardization, General guidance on the determination of flashpoint, Technical report ISO/TR 11018.

International Organization for Standardization. Essential oils: determination of acid value, ISO 1242, 1999.

International Organization for Standardization. Essential oils: determination of ester value, ISO 709, 2001.

JIMÉNEZ, D., ARAQUE, M., ROJAS, L., CORDERO, A., BRICEÑO, B.
Componentes volátiles y actividad antibacteriana del vástago de *Myrcia splendens* (Sw.) DC. *Rev Fac Farm*. 2012. 54 (1). pp. 7-11

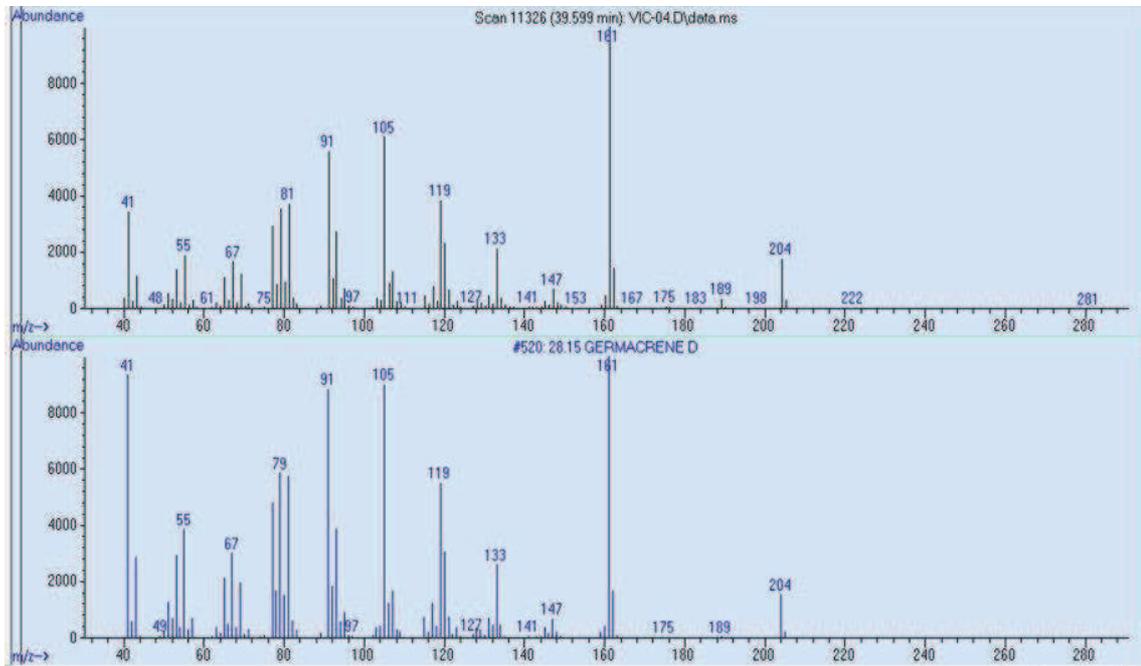
- JIMÉNEZ, D., CORDERO, A., ROJAS, L., RODRÍGUEZ, A. Estudio de los componentes volátiles de las hojas y flores de *Magnolia grandiflora* L., que crece en el Estado Mérida, Venezuela. *Rev Fac Farm.* 2007.1. p. 49
- LANDRUM, L.; KAWAZAKI, M. The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia*, v. 49, p. 508-536, 1997.
- MARCHORI, J.N.C.; SOBRAL, M. Dentreologia das Angiospermas: Myrtales. Santa Maria: Editora da UFSM. p. 304, 1997.
- MING, L.; FIGUEIREDO, R.; MACHADO, S.; ANDRADE, R. Yield of Essential Oil and Citral Content in Different Parts of Lemongrass Leaves (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf) Poaceae. *Acta Hort.* 426: 231-240. 2000.
- PANCHAWAT, S., RATHORE, K. y SISODIA, S. A review on herbal antioxidants. *International Journal of PharmTech Research.* 2010. 2. pp. 232-239
- RAMÍREZ, R., MORA, F., AVILA, J., ROJAS, L., USUBILLAGA, A., SEGNINI, S., CARMONA, J. Composición química y actividad larvicida del aceite esencial de *Annona cherimola* Mill. de Los Andes venezolanos contra el mosquito *Aedes aegypti* (L.). *Rev Fac Farm.* 2011. 53 (2). pp. 2-6
- RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.P.; 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.
- STASHENKO, E. Aceites Esenciales. División de Publicaciones UIS: Bucaramanga, 2009.
- VIEIRA, G., SOUSA, O., ABREU, M., SENNA, L., COELHO, M. Analgesic and Anti-inflammatory Properties of Essential Oil from *Ageratum fastigiatum*. *Brazilian Archives of Biology and Technology.* 2009. v. 52, n. 5. pp. 1115-1121

YOSHIKAWA, M.; SHIMADA, H.; NISHIDA, N.; LI, Y.; TOGUCHIDA, I.; YAMAHARA, J.; MATSUDA, H. Antidiabetic principles of natural medicines. II. Aldose reductase and alpha-glucosidase inhibitors from Brazilian natural medicine, the leaves of *Myrcia multiflora* DC. (Myrtaceae): structures of myrciacitrins I and II and myrciaphenones A and B. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, 1998, v. 46(1), p. 113.

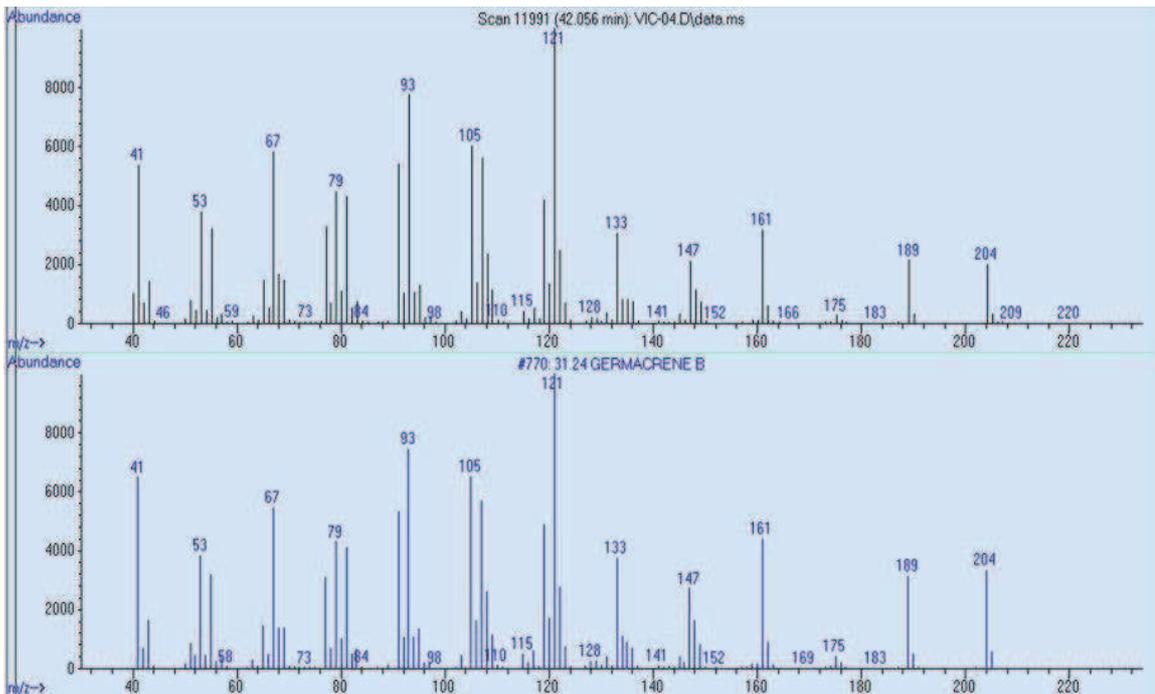
ZOGHBI, M. D.; ANDRADE, E. H. A.; DA SILVA, M. H. L.; CARREIRA, L. M. M.; MAIA, J. G. S.; Essential oils from three *Myrcia* species. *Flavour and Fragrance Journal*. v. 18, p. 42 – 424, 2003.

ANEXOS

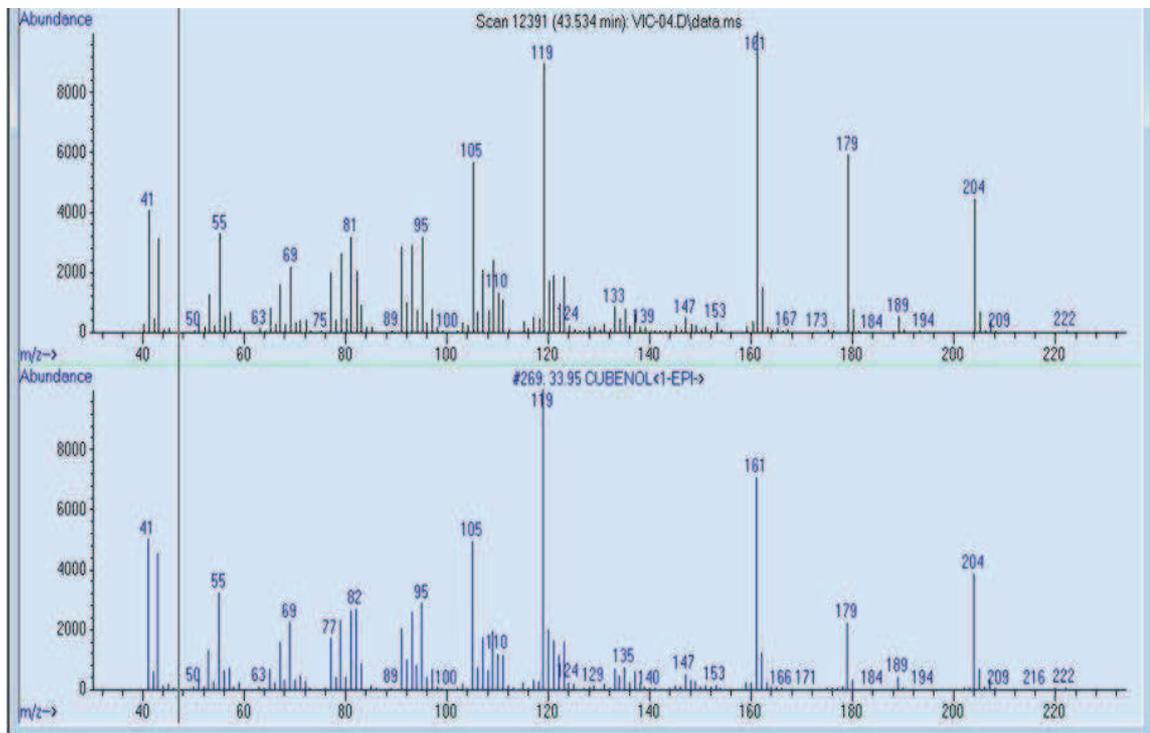
ANEXO A – Espectro de massas do composto Germacreno D, (Experimental e Base de dados).



ANEXO B – Espectro de massas do composto Germacreno B, (Experimental e Base de dados).



ANEXO C – Espectro de massas do composto 1-Epi-Cubenol, (Experimental e Base de dados).



ANEXO D – Registro de Identificação Botânica da espécie.



HERBÁRIO INPA
Manaus-Amazonas-Brasil

MYRTACEAE

INPA: 250364

Myrcia amazonica DC.

Det.: Ramos, J.F. - março 2013

Brasil, Pará, Santarém: Comunidade São Brás. Solo arenoso, vegetação: savana, período seco.

2°30'46" S, 54°50'93" W

Arbusto, podendo atingir até 3 m de altura, Flor: com coloração variando de branco para amarelo, folhas pontiagudas, fruto pequeno e arredondado, caule liso.

Calao, V.Y.P. s.n.

12 outubro 2012