



UNIVERSIDADE DA BEIRA INTERIOR

Ciências

**Estudo fitoquímico e de atividades biológicas da
Lippia multiflora Moldenke de Angola**

Mpanzu Nelo

Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em

Química Medicinal

(2º ciclo de estudos)

Orientador: Prof. Doutor Jesus Miguel Lopez Rodilla

Covilhã, Junho de 2018

Dedicatória

Dedico este trabalho aos meus filhos e em memória do meu pai Paulo Nelo, minha mãe Mbiyavanga Anita, meu avô meu chara Henrinque Mpanzu e minha avó Wazinga Graça que as suas almas descancem em paz.

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pela força e vontade que ele concedeu - me durante a minha carreira estudantil e em particular neste ciclo de estudo.

Meus agradecimentos para minha esposa e aos meus filhos, mesmo distante de mim, sempre deram as suas contribuições, que serviram de consolo durante a minha estadia cá na covilhã e que tanto contribuiu para o sucesso dos meus estudos e que os mesmos conseguiram suportar a minha ausência

Aos meus familiares e amigos uma nota de agradecimento pelo apoio moral e psicológico que serviu de auxílio e incentivo pelo todo tempo que estivemos distantes uns aos outros

Um agradecimento privativo para Mariana Filipa Mendes Lucas que sempre esteve disponível quando eu a precisasse meu muito obrigado pela enorme ajuda que muito contribuiu na elaboração desta dissertação.

Um agradecimento ao Professor Nzinga Manzambi “Marcel” e para o Nsevolo Samba pela ajuda que os mesmos prestaram - me na recolha das amostras em Angola e aos meus colegas de laboratório pela ajuda mútua que tivemos durante a realização deste trabalho.

Meu muito obrigado aos meus colegas da turma de mestrado 2016/2017, pela ajuda mútua que nos demos que muito contribuiu na superação de dúvidas durante as revisões.

Um agradecimento ao Governo Agolano e ao Ministério do Ensino Superior de Angola, a Direção Nacional de Formação Avançada e Investigação Científica (DINAFIC), ao Instituto Nacional de Gestão de Bolsa de Estudos e a Escola Superior Politécnica do Zaíre pela concepção da bolsa que contribuiu para meu desenvolvimento científico e não só.

Aos meus professores do curso de química medicinal e os da faculdade de Ciências de saúde, meu muito obrigado pelo tempo disponibilizado para transmitir os seus conhecimentos com paciência e determinação na minha pessoa.

Seria tão ingrato se não dissesse meu muito obrigado à professora Maria Lúcia da Silva, Professor Pedro Rocha, Rui Coca e ao César Pinto que sempre estiveram disponíveis para me ajudar a fazer as análises e determinação das atividades biológicas das minhas Amostras

Um especial agradecimento ao meu orientador Professor **Jesus Miguel Lopez Rodilla** pela paciência ,vontade e determinação que o mesmo teve em orientar este trabalho o seu apoio foi indispensável para a concretização, avanço e conclusão deste trabalho

Mpanzu Nelo

Parece ser difícil, mas acabou por ser feito.

Resumo

O estudo das plantas aromáticas tem vindo a ganhar atenção através das propriedades medicianis e industriais que os seus óleos essenciais possuem. Este trabalho teve como objetivo extrair os óleos essenciais e outros extractos, caracterisá-los e testar as suas atividades biológicas de uma planta colhida em diversos sítios de Angola e em diferentes estados de crescimento. Para isso, os óleos foram extraídos por hidrodestilação utilizando o aparelho do tipo Clenvenger, e foram analisados por GC- MS; os extratos de n-hexano foram separados, purificados por cromatografia em coluna *flash* e analisados por cromatografia de camada fina (TLC), os produtos puros foram identificados por técnicas espectroscópicas, como IV, RMN e MS. Os fenóis totais foram calculados pelo método de Folin - Ciocalteu e os flavonoides totais foram determinados utilizando o método do cloreto de alumínio. As atividades antioxidantes dos extratos aquosos foram determinadas pelo método do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo), as atividades antimicrobianas dos óleos essenciais foram determinadas pelo método de difusão em placas de agar, quer por método de cavidades cilíndricas (poços), quer por método do efeito de vapor, usando os micro organismos *Staphylococcus aureus*, a *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. O neral, citral, elemol, limoneno, *p*-cimeno, germacreno D, epoxineral e o γ -terpineno foram os compostos maioritários das amostras recolhidas em Ndalatando na província do Cuanza Norte, enquanto que o limoneno, a piperitenona, a ipsenona, *cis*-tagetona, *trans*-tagetona, o mirceno, a ocimenona, são os compostos maioritários das amostras recolhidas antes e em plena floração no Wolongo e no Tomboco na província do Zaíre e na amostra recolhida depois da floração no Tomboco os compostos maioritários foram vebenona, ocimenona e limoneno. No extrato de n-hexano foi isolada e identificada pela primeira vez na *Lippia multiflora* Moldenke a piperitenona, através dos seus dados espectroscópicos, assim como a salvigenina. Quanto aos conteúdos fenólicos totais, o extrato aquoso da recolha 4 (R4) é que apresentou mais conteúdos fenólicos totais com 262,4 mg EAG/ mg de matéria seca, e quanto aos flavonoides totais foi o extrato aquoso das flores da Recolha 9 (R9) a que apresentou maior conteúdo de flavonoides totais com 71,0 mg EQ/mg de matéria seca. O extrato aquoso da recolha 4 (R4) apresentou uma atividade antioxidante muito forte, a maior de todas as amostras, com um IC₅₀ igual a 19,1 μ g/mL e AAI igual a 2,7. Para as atividades antimicrobiana vimos que R3, R4, a piperitenona, R9 Flores e R5 são os que mostraram uma forte atividade, face ao *S. aureus* (tabela 22) e R6, R7, R8 flores e R9 folhas, mostraram uma atividade média diante da *S. aureus*, na *E. Coli*, o R3, R4, R9 flores, composto isolado piperitenona (C3L5-3) e R8 folha são os que mostraram uma atividade média para está bactéria e os de mais nenhuma atividade (tabela 22) e finalmente contra *P. aureginosa*, R4, a piperitenona, R9 Flores e R5 que presentaram apenas uma atividade antibacteriana média.

Palavras-chave

Lippia multiflora Moldenke, Angola, óleo essencial, limoneno, piperitenona, atividade antioxidante, atividade anti-microbiana.

Abstract

The study of aromatic plants has gained attention through the medical and industrial properties that their essential oils possess. The objective of this work was to extract the essential oils and other extracts, characterize them and test their biological activities of a plant harvested in disersos sites of Angola and in different states of growth. For this, the oils were extracted by hydrodistillation using the Clenvenger type apparatus and analyzed by GC-MS; the extracts of n-hexane were separated, purified by flash column chromatography and analyzed by thin layer chromatography (TLC), the pure products were identified by spectroscopic techniques, as IR, NMR and MS. Total phenols were calculated by the Folin - Ciocalteu method and the total flavonoids were determined using the aluminum chloride method. The antioxidant activities of the aqueous extracts were determined by the DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) method, the antimicrobial activities of the essential oils were derminated by diffusion method on agar plates, either by cylindrical wells method, either by the vapor effect method, using the microorganisms *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*. Neral, citral, elemol, limonene, *p*-cymene, germacreno D, epoxineral and γ -terpinene were the majority compounds of the samples collected in Ndalatando in the province of Cuanza Norte, while limonene, piperitenone, ipsenone, *cis*-tagetone, *trans*-tagetone, myrcene, ocimenone, are the major compounds of the samples collected before and in full bloom in Wolongo and Tomboco in the province of Zaíre and in the sample collected after flowering in Tomboco. major compounds were vebenone, ocimenone and limonene. In the leaves extract of n-hexane was isolated and identified for the first time in *Lippia multiflora* Moldenke piperitenone, through its spectroscopic data, as well as salvigenin. As for the total phenolic contents, the aqueous extract from collection 4 (R4) was the one with the highest total phenolic contents with 262,4 mg EAG / mg of dry matter, and for the total flavonides was the aqueous extract from the flowers of Collection 9 (R9) with the highest content of total flavonoids with 71,0 mg EQ / mg dry matter. The aqueous extract from collection 4 (R4) presented a very strong antioxidant activity, the highest of all the samples, with an IC₅₀ equal to 19,1 μ g / mL and AAI equal to 2,7. For the antimicrobial activities, R3, R4, piperitenone, R9 Flowers and R5 showed strong activity *S. aureus* (table 22) and R6, R7, R8 flowers and R9 showed mean activity against *S. aureus*, in *E. coli*, R3, R4, R9 flowers, piperitenone (C3L5-3) and R8 leaves are shown maen activity for this bacterium and those of no other activity (table 22), finally against *P. aureginosa*, R4, piperitenone, R9 Flowers and R5 which showed only mean activity.

Key words

Lippia multiflora Moldenke, Angola, essential oil, limonene, piperitenone, antioxidant activity, antimicrobial activity.

Índice

Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas.....	xv
Lista de Acrónimos.....	xviii
Introdução.....	1
Objectivo Geral	1
Objetivos Específico	2
Capítulo I: Revisão da Bibliografia.....	3
1.1. Química dos Produtos Naturais	3
1.2. Produtos naturais na medicina	4
1.3. Plantas medicinais e descoberta de fármacos	5
1.3.1. Descoberta de fármacos a partir do produto natural: a maneira tradicional	6
1.3.2. Descoberta dos fármacos a partir do produto natural: os processos modernos	7
1.4. Usos das plantas Medicinais em África	8
1.5. Usos de plantas medicinais em Angola	10
1.6. Plantas Aromáticas	10
1.7. Óleos essenciais	12
1.7.1. Definição dos óleos essenciais	12
1.7.2. Fatores variabilidade dos óleos essenciais.....	12
1.7.3. Métodos de extração de óleos essenciais	13
1.7.4. Composição química dos Óleos Essenciais	15
1.7.5. Atividades Biológicas dos Óleos Essenciais	16
1.8. O Género <i>Lippia</i>	16
1.9. A <i>Lippia multiflora</i> Moldenke.....	17
1.9.1. Descrição botânica e classificação taxonomica da <i>Lippia multiflora</i> Moldenke.....	17
1.9.2. Habitat e distribuição Geográfica da planta.	19
1.9.3. Usos etno-medicinais da <i>Lippia multiflora</i> Moldenke	19
1.9.4. Metabolitos secundários da <i>Lippia multiflora</i> Moldenke	20
1.9.5. Composição química dos óleos essenciais da <i>Lippia multiflora</i> Moldenke.....	20
1.9.6. Atividades farmacológicas do óleo essencial e outros extratos da <i>Lippia multiflora</i> Moldenke.....	23
1.10. Antioxidantes	23
1.11. Atividades Antibacterianas	26
Capítulo II. Parte Experimental	33
2.1. Recolha da planta.....	33
2.2. Extração do óleo essencial	33
2.3. Extração com solventes	33
2.4. Purificação por Cromatografia.....	34

2.4.1. Cromatografia em coluna do extrato de n-hexano a quente das <i>Lippia multiflora</i> Moldenke.	35
2.5. Análise dos óleos essenciais da <i>Lippia multiflora</i> Moldenke e Determinação estrutural das frações purificadas.	38
2.5.1. Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC - MS).....	38
2.5.2. Análise por Espectroscopia de infravermelho (IV)	39
2.5.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).	39
2.6. Determinação dos fenóis totais.....	39
2.7. Determinação dos flavonoides totais	40
2.8. Atividades biológicas dos óleos essenciais e outros extratos de <i>Lippia multiflora</i> Moldenke	41
2.8.1. Avaliação das atividades anti-oxidante pelo método de DPPH	41
2.8.2. Atividades antibacterianas.....	44
Capítulo III - Resultados e Discussão.....	48
3.1. Extração dos óleos essenciais.	48
3.2. Composição química do óleo essenciais da <i>Lippia multiflora</i> Moldenke de Angola....	49
3.3. Análise de espectros e identificação dos compostos químicos das frações da cromatografia (Flash) do extrato de de n-hexano das folhas da <i>Lippia multiflora</i> Moldenke de Angola.....	58
3.3.1. Análise de das frações da cromatografia de R1	58
3.3.2. Análise de das frações do extrato de n-hexano a quente de recolha 3 (C1L2)...	59
3.3.3. Análise e Identificação espectroscópica das frações cromatográfica da recolha 5 (C3L5)	59
3.4. Determinação dos fenóis totais.....	66
3.5. Determinação dos flavonoides totais	67
3.6. Atividades Biológicas dos óleos essenciais e dos extratos aquosos das folhas e flores da <i>Lippia multiflora</i> Moldenke de Angola	68
3.6.1. Atividade antioxidante dos extratos aquoso - Método DPPH.....	68
3.6.2. Atividades antibacterianas dos óleos essencia da <i>Lippia multiflora</i> Moldenke..	71
Capitulo IV: Conclusões e perspectivas futuras	75
4.1. Conclusões.....	75
4.2. Perspectivas futuras	78
Bibliografia.....	79
ANEXOS	86
Espectros de RMN dos Compostos Isolados	86
1. Espectro de RMN DE ¹ H e ¹³ C e as Correlações HSQC, HMBC e COSY de 3-metil-6-(propan-2-iliden)ciclohex-2-en-1-ona (Piperitenona)	86
2. Espetro de RMN DE ¹ H e ¹³ C de 5-hidroxi-6,7-dimetoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona ou 5-hidroxi 6,7,4' Trimetoxiflovona (salvigenina).....	91

Lista de Figuras

Figura 1, Esquema que ilustra as várias disciplinas científicas onde a formação e experiência em química dos produtos naturais pode ser aplicada com sucesso, adaptado de Cooper & Nicola, 2015

Figura 2: uma visão geral de um processo de descoberta de fármacos a partir produtos naturais tradicionalmente orientado para o bioensaio adaptado de Sarker & Nahar, 2007

Figura 3: uma visão geral de um processo de descoberta moderna de fármacos a partir dos produtos naturais, adaptado de Sarker & Nahar, 2007

Figura 4: composição dos óleos essenciais, adaptado de Handa, Khanuja, Longo, & Rakesh, 2008.

Figura 5: *Lippia multiflora* Moldenke (Nelo 9/01/2018 e Marcel 30/ 03/2018)

Figura 6: classificação taxonómica da *Lippia multiflora* Moldenke Adaptada de (Abena, Ossibi, Tsiba, Andissa, & Ouamba

Figura 7: países Africanos, onde se encontra localizada a *Lippia multiflora* Moldenke, adaptado de (Abena, Ossibi, Tsiba, Andissa, & Ouamba, 2017)

Figura 8. Reação entre o radical livre DPPH e o composto antioxidante (RH), o que resulta na formação da difenil-picrilhidrazina.

Figura 9 - Exemplos de agar com cavidades, na direita após ensaios

Figura 10 - Na esquerda, dispensador e placas dispensadas, na direita um exemplo de ensaio com halos de inibição (consultado em <http://www.tsh.co.in/EqGen.html>; Ahmed A. *et al*, 2012)

Figura 11 - Exemplos de ensaios de difusão por discos de papel [Adaptado de Barani K. *et al*, 2014;

Figura 12- Exemplos de ensaios pela técnica de vapor e os halos de inibição causados

Figura 13: Províncias e município onde foram recolhidas as amostras

Figura 14: Montagem laboratorial de extrações sólido-liquido, usando o extrator Soxhlet

Figura 15: Curva de calibração do ácido gálico para determinação dos fenóis totais, obtida a partir da média das leituras das absorvências em triplicado.

Figura 16: Reta de calibração da quercetina para determinação dos flavonoides totais, obtida a partir da média das leituras das absorvências em triplicado.

Figura 17: Reta de calibração obtida a partir da média das leituras das absorvências dos três ensaios.

Figura 18 - Placas de vidro utilizadas para depositar o meio. Na direita, meios de cultura agar em placa, o meio utilizado (MH2).

Figura 19 - Estirpe ATCC, na direita a zaragatoa que traz a estirpe liofilizada na ponta.

Figura 20 - Culturas Mãe após incubação, da esquerda para a direita, E. coli, S. aureus, P. aeruginosa.

Figura 21 - Na esquerda fotómetro de medição da turvação pela escala McFarland para padronização de inóculos; na direita tubos com suspensões bacterianas.

Figura 22 Da esquerda para a direita, utensílio para realização de poços, aspecto de placa inoculada S. aureus com poços contendo as fracções de óleo a testar antes de incubar, aspecto da placa de controlos E. coli antes de incubar.

Figura 23: Estrutura de 2-Hidroxibenzoato de Metilo ou Salcilito de metilo

Figura 24: Espectro de infravermelho da piperitenona

Figura 25 : Estrutura de 3-metil-6-(propan-2-iliden)ciclohex-2-en-1-ona

Figura 26: Espectro de infravermelho De 5-hidroxi-6,7-dimetoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona

Figura 27: Estrutura de 5-hidroxi-6,7-dimetoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona ou 5-hidroxi 6,7,4' Trimetoxiflovona (salvigenina)

Figura 28: Representação gráfica da % I em função da concentração do extrato aquoso da R4 na célula espectrofotométrica, para a concentração de DPPH de 0,0800 mM.

Figura 29: Representação gráfica da % I em função da concentração do extrato aquoso da R4 na célula espectrofotométrica, para a concentração de DPPH de 0,1214 mM.

Figura 30: Representação gráfica da % I em função da concentração do extrato aquoso da R4 na célula espectrofotométrica, para a concentração de DPPH de 0,2000 mM.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Compostos maioritários da *Lippia multiflora* Moldenke estudadas na literatura

Tabela 2: Dados da extração com n-hexano a quente de todas as recolhas da *Lippia multiflora* Moldenke

Tabela 3: Massa das partes solúveis e insolúveis em metanol dos extratos de hexano das amostras cromatografadas

Tabela 4: frações obtidas depois da cromatografia em coluna em gel de sílica do R1 (C₂ - L₁) com as suas respetivas polaridades de eluição e massas de frações.

Tabela 5: Frações obtidas depois da cromatografia em coluna em gel de sílica do R3 (C₁ - L₂) com as suas respetivas polaridades de eluição e massas das frações

Tabela 6: Frações obtidas depois da cromatografia em coluna em gel de sílica do R5 (C₃ - L₅) com as suas respetivas polaridades de eluição e massas de frações.

Tabela 7: Concentrações das soluções metanólicas de DPPH utilizadas na construção da reta de calibração

Tabela 8: Classificação de uma amostra quanto à sua atividade antioxidante.

Tabela 9 : Volumes e rendimento dos óleos essenciais.

Tabela 10: Composição química dos óleos essenciais da *Lippia multiflora* Moldenke recolhida em 3 regiões de Angola

Tabela 11: Quimiotipos dos óleos essenciais da *Lippia multiflora* Moldenke recolhida em 3 regiões de Angola $\geq 3\%$

Tabela 12: Composição química das frações cromatografadas do R1 depois de passar no GC-MS

Tabela 13: Desvios químicos dos hidrogénios e dos carbonos no RMN da fração C3L5 - 3 e correlações HSQC, HMBC e COSY do composto

Tabela 14: Desvios químicos dos protões e de carbonos no RMN da fração C3L5 - 9

Tabela 15: Teores de fenóis presentes em extrato aquoso de cada recolha.

Tabela 16: Teores de flavonoides presentes em extrato aquoso de cada recolha.

Tabela 17: Parâmetros IC₅₀ e AAI do extrato aquoso da R4, para a concentração de DPPH de 0,0800 mM.

Tabela 18: Parâmetros IC₅₀ e AAI do extrato aquoso da R4, para a concentração de DPPH de 0,124mM

Tabela 19: Parâmetros IC₅₀ e AAI do extrato aquoso da R4 , para a concentração de DPPH de 0,2000 mM

Tabela 20. Resumo dos parâmetros da atividade antioxidante IC_{50} e AAI (média \pm desvio médio) para a amostra do extrato Aquoso da R4 e classificação em relação aos padrões, trolox, ácido gálico e rutina.

Tabela 21: Parâmetros IC_{50} e AAI dos extratos aquosos de todas as amostras e as suas atividades antioxidantes

Tabela 22. Halos de inibição dos óleos essenciais da *Lippia multiflora* Moldenke de recolhida em Angola

Tabela 23. Tabela dos controlos usados para determinar as atividades antimicrobianas dos óleos essenciais da *Lippia multiflora* Moldenke de recolhida em Angola

Lista de Acrónimos

OMS :Organização Mundial de Saúde

GC - MS : Cromatografia Gasosa acoplada com espectroscopia de Massa

IV: infravermelho

Uv-Vis: Ultravioleta - Visível

RMN: Ressonância Magnética Nuclear

DPPH : 2,2- difenil -1-picrilhidrazilo

R1 e R2: *Lippia multiflora* Moldenke recolhida em Ndalatandu provincia do Cuanza Norte

R3, R6 e R9: *Lippia multiflora* Moldenke recolhida no Tomboco provincia do Zaíre

R4, R5, R7 e R8: *Lippia multiflora* Moldenke recolhida no Wolongo - Mbanza Kongo provincia do Zaíre

C1L2: Cromatografia da 2ª recolha da *Lippia multiflora* Moldenke

C2L1: Cromatografia da 1ª recolha da *Lippia multiflora* Moldenke

C2L1-6: Fração 6 da Cromatografia da 1ª recolha da *Lippia multiflora* Moldenke

C2L1-7: Fração 7 da Cromatografia da 1ª recolha da *Lippia multiflora* Moldenke

C2L1-8 : Fração 8 da Cromatografia da 1ª recolha da *Lippia multiflora* Moldenke

C2L1-9: Fração 9 da Cromatografia da 1ª recolha da *Lippia multiflora* Moldenke

C3L5: Cromatografia da 5ª recolha da *Lippia multiflora* Moldenke

C3L5-3: Fração 3 da Cromatografia da 5ª recolha da *Lippia multiflora* Moldenke

C3L5-9: Fração 9 da Cromatografia da 5ª recolha da *Lippia multiflora* Moldenke

EAG: Equivalente de Ácido Gálico

EQ: Equivalent da Quercetina

IC₅₀ : Concentração necessária para inibir 50%

AAI : Índice de Atividades Antioxidante

AMDIS: Sistema Automatizado de Deconvolução e Identificação Espectral de Massa

UFC/mL: Unidade de formação de colônias por mililitro

Introdução

A investigação sobre novas moléculas com atividades farmacológicas envolve uma série de desafios, que iniciam desde a necessidade populacional de fármacos contra diversas patologias ao propósito mercadológico e lucrativo das indústrias farmacêuticas mundiais. Independente do motivo que leva a descoberta de uma nova substância, várias fases devem ser cumpridas e o elemento inicial, onde e como começar a busca, desempenha um papel fundamental no sucesso final (Silva, 2012).

Os relatos históricos fundamentam que, uma das principais fontes das novas entidades químicas, são os produtos naturais originados, principalmente, de plantas. Inúmeros fármacos comercializados em todo o mundo têm sido obtidos a partir dos produtos naturais como a digoxina, morfina, penicilina, taxol, ácido acetilsalicílico, dentre outros. Muitas ferramentas foram desenvolvidas ao longo de centenas de anos de pesquisa em produtos naturais visando à escolha adequada da fonte de possíveis de novas entidades química. Dentre elas, a quimiosistemática e a etnofarmacologia destacam-se como possíveis instrumentos para a escolha bem sucedida de espécies candidatas a fornecedoras de novas entidades químicas (Silva, 2012, Phillipson, 2001)

A utilização de plantas medicinais pelas populações em todas as faixas de renda em diversas localidades, desde tribos indígenas até os grandes centros urbanos, merece atenção no contexto da incessante pesquisa de novos medicamentos. Através da etnofarmacologia podem-se identificar espécies com uma indicação já estabelecida, mesmo que baseada no senso comum, como possível fonte de novas entidades químicas (NCE). Entretanto, ainda que a utilização mais comum transmitida de geração em geração, várias dessas plantas carecem de indicações cientificamente validadas, provocando, muitas vezes, danos em vez de benefícios aos utentes (Silva, 2012).

A validação experimental de plantas usadas na medicina tradicional constitui uma importante tarefa da academia para com as comunidades que as utilizam, além de dar contribuições para a descoberta de novas entidades químicas.

O conhecimento sobre as plantas medicinais simboliza muitas vezes o único meio terapêutico de muitos povos e grupos étnicos. O uso de produtos naturais como plantas no tratamento e na cura de doenças é tão antigo quanto a espécie humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais (Maciel, Pinto, Veiga Jr, Grynberg , & Echevarria, 2002)

O uso de plantas como fármacos volta para o homem primitivo. Certamente as grandes civilizações dos antigos chineses, índios e norte-africanos forneceram provas escritas da ingenuidade do homem na utilização de plantas para o tratamento de uma grande variedade

de doenças (Phillipson, 2001). Como na Grécia antiga, os estudiosos classificavam plantas e davam descrições deles, auxiliando o processo de identificação (Phillipson, 2001)

As plantas medicinais têm sido usadas para o tratamento de doenças e enfermidades desde o início dos tempos. As escrituras chinesas antigas e os hieróglifos do papiro egípcio descrevem o uso medicinal das plantas, na cultura indígena, por exemplo, as ervas usadas pelos africanos e nativos americanos nos seus rituais de cura, enquanto outros desenvolveram sistemas tradicionais, por exemplo, a medicina do Ayurvedic e a medicina tradicional chinesa em que a terapêutica Herbal foram usados. Pesquisadores descobriram que as pessoas em diferentes partes do mundo tendem a usar as mesmas plantas ou similares para tratar as mesmas doenças (Motaleb, *et al.*, 2011)

Recentemente, a Organização Mundial de saúde (OMS) aferiu que 65 - 80% da população mundial baseiam-se ligeiramente na medicina herbal para os seus cuidados de saúde primários e dos 252 fármacos considerados como básicos e primordiais, 11% são exclusivamente originários de plantas e uma parte considerável é contida por fármacos de síntese obtidos a partir de antecessores naturais (Motaleb, *et al.*, 2011; Yan, *et al.*, 2011; Newman & Cragg, 2013).

O território angolano possui uma vegetação que é rica numa variedade de espécies que ainda se encontram por estudar, e utilizada especificamente para o tratamento de certas enfermidades, como: tosse, bacterianas, inflamações, bronquite, malária, entre outras. Infelizmente, a extensão das colheitas e as queimadas incontroladas estão a causar uma preocupação crescente devido à drástica redução na população de plantas.

Neste trabalho abordamos sobre “ o estudo fitoquímico e de atividades biológicas de uma planta medicinal de Angola”, para este estudo, a planta selecionada é a *Lippia multiflora* Moldenke colhida em duas províncias de Angola nomeadamente as províncias de Kuanza Norte e Zaire.

A escolha desta espécie é justificada pelas suas propriedades medicinais e pela sua utilização frequente por parte da população Agolana sobre tudo na parte norte, na preparação de formas farmacêuticas com finalidade curativa ou mesmo preventiva de certas doenças. A *Lippia multiflora* Moldenke tem sido utilizada em várias tribus angolanas como chá, tempero e como planta medicinal, na cura das enfermidades como, a tosse, bronquite, asma, imflamações, infeções bacterianas, doenças da pele entre outra.

Objectivo Geral

- Realizar um estudo fitoquímico e de atividades biológicas da *Lippia multiflora* Moldenke colhida na Província do Kuanza Norte e na Provincia do Zaire.

Objetivos Específicos

- Extrair o óleo essencial das folhas da *Lippia multiflora* Moldenke colhida em diferentes zonas de Angola.
- Caracterizar e identificar quimicamente o óleo essencial da *Lippia Multiflora* Moldenke por análise em GC - MS e quantificar os componentes dos óleos preparados.
- Comparar a constituição química dos óleos essenciais das *Lippia multiflora* Moldenke colhida em diferentes províncias de Angola.
- Testar as actividades antimicrobiana dos óleos essenciais e as actividades antioxidante dos extratos aquosos das folhas e flores da *Lippia multiflora* Moldenke

Capítulo I: Revisão da Bibliografia

1.1. Química dos Produtos Naturais

Para (Cooper & Nicola, 2015), não é impensável que a humanidade tenha procurado produtos químicos da natureza. Intende-se que as plantas eram alimentos e fármacos. As plantas estavam disponíveis, facilmente coletadas e produziam sementes para futuras colheitas (Cooper & Nicola, 2015). As primeiras civilizações aprenderam do plantio e da agricultura planejada, originando hoje as indústrias de alimentos e tabaco bem definidas. As principais culturas comerciais incluem trigo, arroz, milho, tabaco, cana-de-açúcar, chá e café. Hoje, existem muitos exemplos de produtos naturais importantes como fármacos e alguns são revistos no texto.

Como material de origem para iniciar uma investigação, as plantas eram abundantes e facilmente obtidas. Mais e mais produtos químicos foram isolados e suas estruturas químicas foram elucidadas (Cooper & Nicola, 2015; Balunas & Kinghorn, 2005). As plantas foram utilizadas para fins medicinais em toda a história e culturas e até mesmo em todas as partes. Na verdade, a maioria do mundo ainda depende muito de produtos naturais como remédios de ervas para seus cuidados de saúde primários.

Os Produtos Naturais são produtos de várias fontes naturais, plantas, micróbios, animais e minerais que têm sido a base do tratamento de doenças humanas (Lahlou, 2013; Sarker & Nahar, 2007;). Os produtos naturais podem ser um organismo inteiro tal como, uma planta, um animal ou um microrganismo, parte de um organismo como, folhas ou flores de uma planta, um órgão animal isolado, um extrato de um organismo ou parte de um organismo e de um composto exsudado ou puro, por exemplo, alcalóides, cumarinas, flavonóides, lignanas, esteróides e terpenóides isolados de plantas, animais ou microrganismos (Sarker & Nahar, 2007). Entretanto, na prática, o termo produto natural refere-se a metabólitos secundários, pequenas moléculas de peso molecular inferior a 1500 u.m.a, produzidas por um organismo, mas não exatamente necessárias para a sobrevivência do organismo (Sarker & Nahar, 2007).

Os produtos naturais nunca desaparecerão completamente, porque a sua prática e o conhecimento necessários para ser um investigador com êxito de produtos naturais podem ser aplicados em vários ramos científicos. (Cooper & Nicola, 2015)

As capacidades técnicas de um químico de produtos naturais que trabalham com "desconhecidos" e aprender a isolar pequenas quantidades de material puro, de misturas complexas podem ser transferidas para outras disciplinas científicas e estas são delineadas na figura abaixo, que mostra quantas áreas de pesquisa importantes são possíveis de cientistas de produtos naturais treinados, e suas capacidades técnicas são bem adequadas para contribuir e impactar essas várias disciplinas (Cooper & Nicola, 2015). Há muito interesse, não só da indústria farmacêutica em aplicações de desenvolvimento de fármacos ajustante, mas as

indústrias relacionadas a botânica, os fármacos de ervas, remédios e bioalgas também se expandem. Além disso, as etapas tecnológicas aplicáveis à separação de produtos naturais abrangem aspectos de ciências analíticas e química como, estudos analíticos, de garantia de qualidade (QA), estudos de metabolismo e farmacocinética (PK) usados nas indústrias químicas, agroquímicas e farmacêuticas atuais (Cooper & Nicola, 2015; Balunas & Kinghorn, 2005).

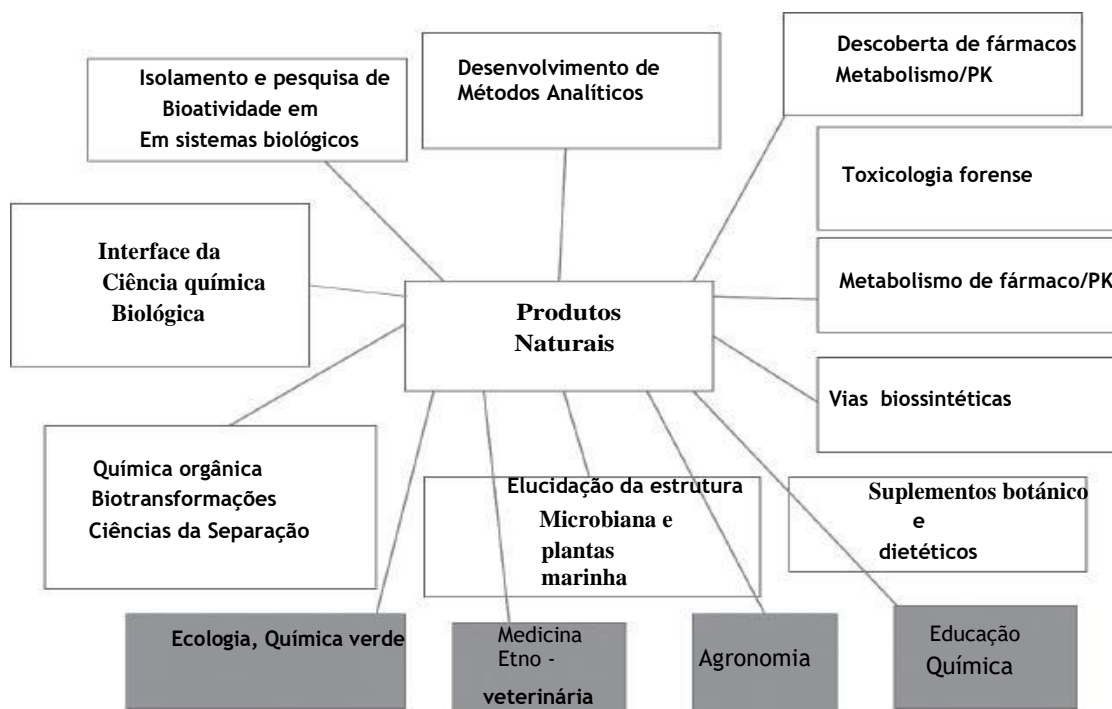


Figura 1, Esquema que ilustra as várias disciplinas científicas onde a formação e experiência em química dos produtos naturais pode ser aplicada com sucesso, adaptado de Cooper & Nicola, 2015

1.2. Produtos naturais na medicina

As plantas medicinais são plantas que fornecem fármacos para pessoas - para prevenir doenças, manter a saúde ou curar doenças (Barata, Rocha, Lopes, & Bettencourt, 2014; Maiti & Geetha, 2007)

O uso de produtos naturais, especialmente plantas, para o tratamento é tão antigo e universal como a medicina em si. O uso terapêutico das plantas certamente remonta às civilizações sumérias e acadianas em cerca do terceiro milênio a.c. Hipócrates (ca. 460 - 377 a.c.), um dos autores antigos que descreveu produtos naturais medicinais de origem vegetal e animal, listou aproximadamente 400 espécies de plantas diferentes para fins medicinais (Sarker & Nahar, 2007 Cunha, Teixeira, Silva, & Roque, 2007).

Os produtos naturais têm sido uma parte integrante dos antigos sistemas de medicina tradicional. O uso de plantas como fármacos remonta ao homem inicial. Certamente, as grandes civilizações dos antigos chineses, índios e norte-africanos forneceram evidências escritas da ingenuidade do homem na utilização de plantas para o tratamento de uma ampla

variedade de doenças. Mesmo agora, as tradições contínuas de terapia de produto natural existem em todo o terceiro mundo, especialmente no Oriente, onde numerosos minerais, substâncias animais e plantas ainda estão em uso comum (Sarker & Nahar, 2007; Phillipson, 2001, Cunha, Teixeira, Silva, & Roque, 2007; Salim, Chin, & Kinghorn, 2008).

De acordo com a Organização Mundial de saúde (OMS), cerca de 3.400.000.000 pessoas no mundo em desenvolvimento dependem de fármacos tradicionais baseados nas plantas. Isto representa cerca de 88 % da população mundial, que dependem principalmente da medicina tradicional para os seus cuidados de saúde primários. Só na China, 7295 espécies de plantas são utilizadas como agentes medicinais (Motaleb M. A., et al., 2011; Newman & Cragg, 2013)

A natureza tem sido uma fonte potencial de agentes terapêuticos por milhares de anos. Um número impressionante de fármacos modernos foi derivado de fontes naturais. Ao longo do século passado, um número de fármacos de primeira venda foi desenvolvido a partir de produtos naturais. Fármaco Anticanceroso vincristina de *Vinca rosea*, morfina analgésico narcótico de *Papaver somniferum*, antipaludismo fármaco artemisinina de *Artemisia annua*, fármacos anticâncer Taxol de *Taxus brevifolia* e antibióticos penicilinas de *Penicillium SSP* e quinina de *Cinchona succirubra* Pav (Sarker & Nahar, 2007).

Para além da medicina moderna derivado do produto natural, os produtos naturais são também utilizados directamente na indústria farmacêutica "natural" que está a crescer rapidamente na Europa e na América do Norte, bem como nos programas tradicionais de medicina que estão a ser incorporados os sistemas primários de saúde do México, da República Popular da China, a Nigéria e outros países em desenvolvimento (Sarker & Nahar, 2007).

1.3. Plantas medicinais e descoberta de fármacos

As plantas que possuem propriedades terapêuticas ou exercem efeito farmacológico benéfico sobre o corpo humano são geralmente designadas como plantas medicinais (Motaleb M. A., et al., 2011). As plantas medicinais sintetizam naturalmente e acumularam algum metabolito de secundário: como alcalóides, esterol, flavonoides, terpenos, saponinas, glicosídeos, cianogénicos, taninos, resinas, lactonas, quininos, óleos voláteis (Motaleb M. A., et al., 2011; Filho & Yunes, 1998, Sarker & Nahar, 2007)

Embora a descoberta de fármacos pode ser considerada um conceito recente que evoluiu da ciência moderna durante o século XX, na realidade o conceito de descoberta de fármacos data de muitos séculos, e tem suas origens na natureza (Sarker & Nahar, 2007).

Uma e outra vez, os seres humanos se voltaram para a mãe natureza para curas, e descobriram moléculas de fármacos únicas. Assim, o termo produto natural tornou-se quase sinónimo com o conceito de descoberta de fármacos. Em processos modernos de descoberta e desenvolvimento de fármacos, os produtos naturais desempenham um papel importante na fase inicial da descoberta de 'Lead', ou seja, a descoberta do composto ativo (determinado

por vários bioensaios) molécula natural, que em si ou seus análogos estruturais poderia ser um candidato ideal para fármacos (Sarker & Nahar, 2007).

Atualmente, o termo "Medicina Alternativa" tornou-se muito comum na cultura ocidental, enfocando a idéia de usar as plantas para fins medicinais. Mas a crença atual de que os medicamentos que recebem cápsulas ou pílulas são os únicos medicamentos que podemos confiar e usar. Mesmo assim, a maioria dessas pílulas e cápsulas que tomamos e usamos durante a vida diária vieram de plantas. Plantas medicinais utilizadas com frequência como matérias-primas para a extração de ingredientes ativos utilizados na síntese de diferentes fármacos. Como no caso de laxantes, anticoagulantes, antibióticos e medicamentos antimalares, contêm ingredientes de plantas. Além disso, os ingredientes ativos de Taxol, vincristina e morfina isolados de foxglove, pervinca, teixo e papoula, respetivamente (Hassan, 2012).

As plantas normalmente contêm diferentes misturas de fitoquímicos, também conhecidos como metabolitos secundários que podem agir de forma individual, aditiva ou em sinergia para melhorar a saúde. Na prática, as plantas medicinais, ao contrário dos medicamentos farmacológicos, geralmente são formadas por vários produtos químicos trabalhando de forma conjunta, sinérgica e de forma sintetizada, para produzir um efeito combinado que supera a atividade total dos constituintes individuais (Mahomoodally, 2013).

Os produtos naturais desempenharam um papel fundamental na pesquisa farmacêutica, já que muitos medicamentos são produtos naturais ou seus derivados. Na verdade, estima-se que cerca de 40% de todos os medicamentos são produtos naturais ou seus derivados semi-sintéticos (Lahlou, 2013)

Os produtos vegetais também desempenham um papel importante nos sistemas de saúde dos restantes 20% da população, que habitam principalmente nos países desenvolvidos. A análise dos dados sobre as receitas dispensadas das Farmácias comunitárias nos Estados Unidos de 1959 a 1980 indicou que aproximadamente 25% continham extratos da planta ou princípios ativos derivados das plantas superiores. Atualmente, pelo menos 119 substâncias químicas, derivadas de 90 espécies vegetais, podem ser consideradas como fármacos importantes que estão em uso em um ou mais países. 8 desses 119 fármacos, 74% foram descobertos como resultado de estudos químicos dirigidos ao isolamento das substâncias ativas de plantas utilizadas na medicina tradicional (Newman, Cragg, & Snader, 2000).

1.3.1. Descoberta de fármacos a partir do produto natural: a maneira tradicional

No tradicional, método da descoberta do fármaco dos produtos naturais, alvos do fármaco são expostos aos extratos brutos, e no exemplo de um sucesso, isto é qualquer evidência da atividade, o extrato é fracionado e o composto ativo é isolado e identificado. Cada passo de fracionamento e isolamento é geralmente seguido por bioensaios, e o processo é chamado de isolamento guiado por bioensaio (Sarker & Nahar, 2007). Figura 2 ilustra uma visão geral de

um processo de descoberta de fármacos a partir dos produtos naturais tradicionalmente orientado por bioensaio. Às vezes, uma rota simples de isolamento de produtos naturais, independentemente da bioatividade, também é aplicada, o que resulta no isolamento de uma série de compostos naturais (pequena biblioteca de compostos) adequado para qualquer screening de Bioatividade. No entanto, o processo pode ser lento, não eficiente e de trabalho intensivo, e não garante que o screening de " leads " seria quimicamente viável ou mesmo patenteável.

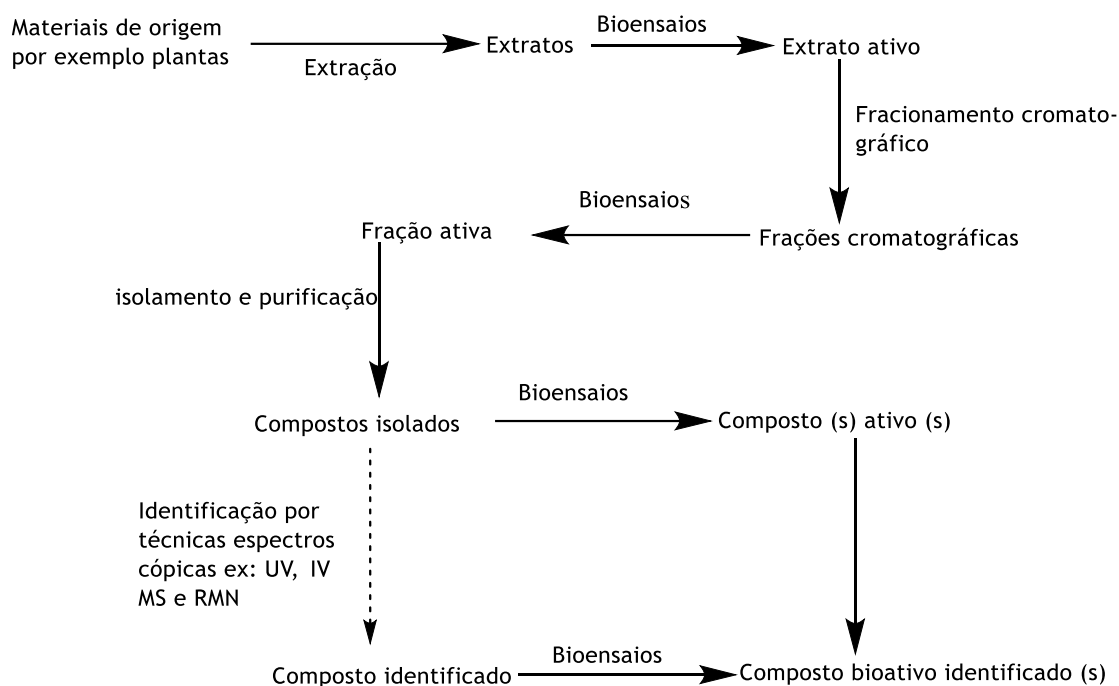


Figura 2: uma visão geral de um processo de descoberta de fármacos a partir produtos naturais tradicionalmente orientado para o bioensaio adaptado de Sarker & Nahar, 2007

1.3.2. Descoberta dos fármacos a partir do produto natural: os processos modernos

Abordagens modernas de descoberta de fármacos envolvem HTS (High-throughput screening), onde, aplicando automação completa e robótica, centenas de moléculas podem ser selecionados usando vários ensaios dentro de um curto período de tempo, e com quantidades muito pequenas de compostos (Sarker & Nahar, 2007). A fim de incorporar os produtos naturais nos programas modernos de HTS, é necessário construir uma biblioteca de produtos naturais (uma colecção de produtos naturais desreplcados). A desreplcação é o processo pelo qual se pode eliminar a recorrência ou re-isolamento de compostos idêntico ou similares de vários extratos. Uma série de técnicas acopladas são utilizadas para a desreplcação, no caso de LC-PDA (cromatografia líquida - detector de fotodiodos), LC-MS (cromatografia líquida-detector de massa) e LC-RMN (cromatografia líquida-espectroscopia de ressonância magnética nuclear) (Sarker & Nahar, 2007).

Quando no passado recente era extremamente difícil, demorado e de trabalho intensivo para construir tal biblioteca dos produtos naturais purificados, com o advento de tecnologias mais novas e melhoradas relacionadas à separação, ao isolamento e a identificação dos produtos naturais a situação melhorou notavelmente. Agora, é possível preparar uma biblioteca de "alta qualidade" e "quimicamente diversificada" de produtos naturais que podem ser adequados para qualquer programa de HTS modernos. As bibliotecas de produtos naturais também podem ser de extractos brutos, fracções de cromatografia ou compostos purificado (Sarker & Nahar, 2007). No entanto, o melhor resultado pode ser obtido a partir de uma biblioteca de produtos naturais pura totalmente identificada, uma vez que fornece aos cientistas a oportunidade de lidar com o "Lead" rapidamente para o trabalho de desenvolvimento, por exemplo, síntese total ou parcial, lidar com a formulação de fatores, em ensaios in vivo e testes clínicos (Sarker & Nahar, 2007).

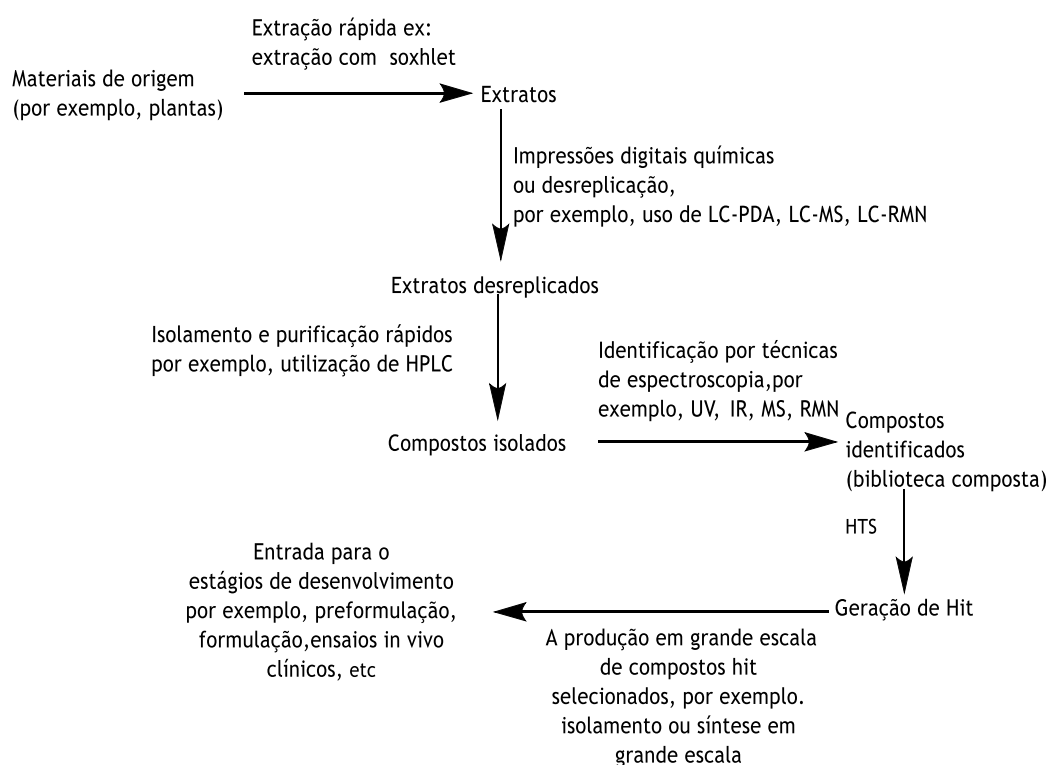


Figura 3: uma visão geral de um processo de descoberta moderna de fármacos a partir dos produtos naturais, adaptado de Sarker & Nahar, 2007

1.4. Usos das plantas Medicinais em África

Em todos os países do mundo existe o conhecimento tradicional relacionado à saúde dos seres humanos e dos animais. A importância da medicina tradicional como fonte de cuidados de saúde primários foi oficialmente reconhecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS) na Declaração de Atenção Primária de Saúde de Alma Ata (1978) e tem sido abordada globalmente desde 1976 pelo Programa de Medicina Tradicional da OMS (RUKANGIRA, S/D).

A medicina tradicional africana é a mais antiga, e talvez a mais variada, de todos os sistemas terapêuticos. A África é considerada o berço da humanidade com uma rica diversidade biológica e cultural marcada pelas diferenças regionais nas práticas de cura (Mahomoodally, 2013). A medicina tradicional africana em suas formas variadas é holística envolvendo o corpo e a mente. O curador tradicional geralmente diagnostica e trata a base psicológica de uma doença antes de prescrever os fármacos, particularmente plantas medicinais para tratar os sintomas (Mahomoodally, 2013).

Na verdade, a África possui enormes recursos de biodiversidade e presume - se que contenha entre 40 e 45 mil espécies de plantas com potencial de desenvolvimento e das quais 5 mil espécies são usadas medicinalmente. Isso não é surpreendente, uma vez que a África está situada dentro do clima tropical e subtropical e é um fato conhecido que as plantas armazenam metabolitos secundários importantes através da evolução como um meio natural de sobreviver em um ambiente hostil (Mahomoodally, 2013).

O interesse sustentado na medicina tradicional no sistema de saúde africano pode ser justificado por duas razões principais. O primeiro é o acesso inadequado a medicamentos alopáticos e formas ocidentais de tratamentos, pelo que a maioria das pessoas em África não pode pagar o acesso a cuidados médicos modernos, quer porque é muito caro ou porque não há prestadores de serviços médicos. Em segundo lugar, há uma falta de tratamento médico moderno eficaz para algumas doenças, como a malária e / ou o HIV /SIDA, que, embora global na distribuição, afetam desproporcionalmente a África mais do que outras áreas do mundo (Mahomoodally, 2013).

O uso amplo da medicina tradicional em África, que é predominantemente de plantas medicinais, tem sido considerado vinculado a razões culturais e econômicas. É por isso que a OMS incentiva aos Estados membros africanos a promover e integrar as práticas médicas tradicionais no seu sistema de saúde (Mahomoodally, 2013).

Apesar da sua existência ao longo de muitos séculos e do seu uso expansivo durante a última década, na maioria dos países africanos, a medicina tradicional, incluindo as ervas medicinais, ainda não foi oficialmente reconhecida, e a regulamentação e o registro de medicamentos à base de plantas não foram bem estabelecidos (Rukangira, S/D).

Embora, na maioria dos países africanos, mais de 80% da população confie na medicina tradicional para suas necessidades primárias de cuidados de saúde, os governos ainda não promulgaram edictos ou decretos em frente à regulamentação e ao reconhecimento da prática da medicina tradicional. Mesmo em países onde há um reconhecimento aparente, a orçamentação adequada para facilitar o funcionamento do Comitê de Medicina Tradicional é geralmente inadequada ou totalmente inexistente (Rukangira, S/D).

Em muitos países da África, toda a comunidade de medicina tradicional parece estar operando fora do quadro da legislação nacional sobre a coleta e comércio de espécies selvagens (RUKANGIRA, S/D). Há também um grande comércio interafricano de plantas

medicinais, novamente quase que totalmente fora dos controles usuais de comércio internacional (RUKANGIRA, S/D). Existe, portanto, a necessidade de formular e desenvolver políticas e legislação nacionais e regionais em termos de comércio e acesso a esses recursos, se os benefícios máximos forem colhidos para que tais políticas sejam bem-sucedidas. Muitos países africanos não têm procedimentos para registrar preparações de plantas medicinais, embora sejam amplamente utilizados para as necessidades de cuidados de saúde da maioria das pessoas. Os regulamentos, se houver, são muito rigorosos, exigindo os mesmos padrões esperados de medicamentos modernos (RUKANGIRA, S/D).

1.5. Usos de plantas medicinais em Angola

Angola está localizada na costa atlântica do sul da África e limita com a Namíbia ao sul, a Zâmbia ao leste e a República Democrática do Congo ao norte. O clima varia de tropical no norte a subtropical no sul. A vegetação natural consiste em florestas tropicais úmidas, savanas e desertos (Vasisht & Kumar, 2004).

A maior parte da população no país sofre de desnutrição e muitas epidemias, no caso do paludismo, febre amarela, tifoide entre outras que são as maiores causas da morte no país, entre tanto, muitas famílias têm acesso a medicamentos e tratamentos modernos limitados. As plantas medicinais atendem as necessidades das pessoas rurais para cuidados de saúde e também são uma fonte de renda suplementar. Entre 235 espécies classificadas encontradas em Angola, 40 espécies são usadas em medicina tradicional (Vasisht & Kumar, 2004).

As plantas medicinais são os principais prestadores de cuidados de saúde no país, mas não fazem parte do programa nacional de cuidados de saúde (Vasisht & Kumar, 2004).

Não há textos legislativos ou regulamentares oficiais, instalações de treinamento ou programas que regem a prática da medicina tradicional e nenhum procedimento de licenciamento para as plantas medicinais (Vasisht & Kumar, 2004).

1.6. Plantas Aromáticas

Ao longo da evolução as espécies vegetais desenvolveram vias metabólicas que lhes permitem sintetizar uma grande diversidade de metabolitos secundários. Entre esses metabolitos incluem-se alguns compostos de baixo peso molecular que, por serem voláteis e dotados de aroma, são usualmente designados como compostos aromáticos (Cunha, Cavaleiro, & Salgueiro, 2005). As plantas que os elaboram e acumulam em quantidades apreciáveis, são por isso, denominadas plantas aromáticas (Cunha, Cavaleiro, & Salgueiro, 2005).

As plantas aromáticas são utilizadas pelo seu aroma e sabor possuem compostos aromáticos, a maioria dos quais são óleos essenciais que são voláteis à temperatura ambiente. Estes compostos são sintetizados e armazenados em estruturas especiais chamadas glândulas que estão localizadas em diferentes partes da planta, como folhas, flores, frutas, sementes, cascas e raízes (Barata, Rocha, Lopes, & Bettencourt, 2014).

Para (Barata, Rocha, Lopes, & Bettencourt, 2014; Solomou, Martinos, Skoufogiann, & Danalato, 2016), as plantas medicinais e aromáticas podem ser divididas em cinco grupos com base as suas utilizações:

Como matérias-primas para extração de óleo essencial: este é o principal uso das plantas medicinais e aromáticas no mundo

Como especiarias: são plantas em que suas partes não frondosas são usadas como aromatizantes ou tempero.

Como ervas: são plantas nas quais suas partes floridas ou frondosas são usadas como sabor ou tempero.

Grupo medicinal: o desenvolvimento de medicamentos naturais ou semi-sintéticos,

Grupo diverso: estes são plantas medicinais e aromáticas utilizados de algumas maneiras diferentes das mencionadas acima, por exemplo: como medicamentos, cosméticos, corantes, purificadores de ar, desinfetantes, pesticidas botânicos, ervas / chás, e repelentes de insetos.

Importância económica das plantas aromáticas

As espécies de plantas medicinais e aromáticas (MAPs) formam um recurso vital para o desenvolvimento empresarial. Muitas MAPs foram profundamente enraizadas e associadas à civilização e evolução humanas desde tempos imemoriais (Kala, 2015).

A nível mundial, o valor económico das plantas aromáticas, reflecte - se particularmente sobre os óleos essenciais delas são obtidos. Porém, a terapêutica principalmente a nível da fitoterapia usa um grande número de plantas nos cuidados primários de saúde (Cunha, Cavalheiro, & Salgueiro, 2005).

Atualmente, o consumo de óleos essenciais é tão impercebível quanto omnipresente, mas a importância da sua grandeza pode ser testemunhada pelas 45.000 a 50.000 toneladas que são produzidas e transacionada anualmente, não incluindo a essências de terebintina cuja produção anual supera as 250.000 toneladas que são consumidas pela indústria química para semi - síntese de compostos a incluir em perfumes para a preparação de solventes (Cunha, Cavalheiro, & Salgueiro, 2005).

A indústria alimentar e de bebidas recorre, de forma crescente, aos óleos essenciais para satisfazer a exigências dos consumidores por produtos alimentares aromatizados com aditivos naturais. Os óleos essenciais de espécies de Citrus, Mentha e Cinamomum lideram pela sua procura, uma vasta lista de outros óleos que substituem, na confecção industrial de alimentos, as tradicionais plantas condimentares e especiarias (Cunha, Cavalheiro, & Salgueiro, 2005).

A Índia foi considerada um tesouro de espécies valiosas de plantas medicinais e aromáticas. Essas plantas foram usadas ao longo dos anos para o bem-estar humano na promoção da saúde

e fármacos. Eles desempenham um papel importante nos cuidados de saúde de 80% da população mundial (Singh, Katiyar, & Mishra, 2010).

Os óleos essenciais são materiais - primas de uso mais recente e restritos, como é o caso da indústria de alimentos compostos para animais, onde são incluídos, quer como aromatizantes, contribuindo para a aceitabilidade dos alimentos compostos, quer como modificadores de funções fisiológicas (Cunha, Cavalheiro, & Salgueiro, 2005). Na agricultura é premissora a utilidade dos óleos essenciais como repelentes de insectos, insecticidas ou moluscicidas.

As características odeórficas de diversos óleos essenciais fundamentam a sua utilidade na farmácia, como adjuvantes correctivos de sabor e odor em medicamentos destinados à administração por via oral, ou como aromatizantes em medicamentos para aplicação sobre a pele e mucosas (Cunha, Cavalheiro, & Salgueiro, 2005, Singh, Katiyar, & Mishra, 2010). A indústria farmacêutica recorre também a alguns constituintes de óleos essenciais como matérias - primas para a semi - síntese de outros compostos. São os casos da síntese do mentol a partir do α - pineno, da valina a partir do safrol ou do eugenol e da vitamina A a partir do citral (Cunha, Cavalheiro, & Salgueiro, 2005, Singh, Katiyar, & Mishra, 2010).

As plantas aromáticas economicamente importantes servem como fonte insubstituível de sabor e fragrâncias, produtos farmacêuticos. As plantas aromáticas possuem substâncias odoríferas e voláteis que ocorrem como óleos essenciais, exsudados de goma, bálsamo e oleoresina em uma ou mais partes, a saber, raiz, madeira, casca, folhagem, flor e frutas. Em algumas espécies de plantas, um dos principais constituintes do óleo pode predominar em muitas espécies de plantas. Nenhum composto único predomina e, em vez disso, há um equilíbrio de vários componentes. (Singh, Katiyar, & Mishra, 2010)

1.7. Óleos essenciais

1.7.1. Definição dos óleos essenciais

O termo "óleos essenciais" é um termo genérico para os componentes líquidos e altamente voláteis das plantas, marcado por um odor forte e característico. De fato, os óleos essenciais são misturas naturais de moléculas voláteis e odoríferas, sintetizados pelas células secretoras de plantas aromáticas (Bagora, 2014).

1.7.2. Fatores variabilidade dos óleos essenciais

A composição química do óleo essencial de algumas plantas pode variar dentro da mesma espécie, essas variedades químicas são comumente designadas como quimiotipos (Franchomme, Jollois, & Pénoël, 2001; Fekih, 2014; Baser & Buchbauer, 2016). A palavra quimiotipo é derivada do quimiotopo ou da quimioterapia (Fekih, 2014; Franchomme, Jollois, & Pénoël, 2001; Soro L. C., *et al.*, 2016). Esta variação pode ser devido a muitos fatores, dos quais citamos o mais importante:

Origem botânica

A composição de um óleo essencial varia de acordo com as espécies produtoras. Na verdade, a extração de óleo essencial do mesmo órgão de duas plantas diferentes não dá a mesma composição química, por exemplo, duas espécies de sálvia: sálvia medicinal (*Salvia officinalis*) e sálvia sclarea (*Salvia sclarea*), ambos os quais podem ser vendidos como óleo de sálvia. O primeiro, que é rico em cetonas neurotóxicas, pode causar convulsões epiléticas, enquanto o segundo possui ésteres antiepiléticos aromáticos (Fekih, 2014).

O corpo produtor

A composição e rendimento de um óleo essencial variam de acordo com a parte da planta a partir da qual é extraída.

Origem Geográfica

Isso permite conhecer o meio ambiente em que a planta cresce e assim caracterizar o óleo essencial obtido. Existem diferenças na composição química dependendo do país de origem. A mesma planta que cresce em diferentes lugares com mudança de localização geográfica (altitude e latitude), com variação na natureza do solo, pode produzir diferentes óleos essenciais. No *Thymus vulgaris* (Tomilho de geraniol) produz esta molécula de geraniol apenas no inverno, enquanto que o acetato de geraniol irá substituí-la no verão (Fekih, 2014).

Conservação de plantas

As plantas devem ser secas no ar e na sombra, porque efeito, a modificações químicas, físicas e bioquímicas devido à ação da luz e da temperatura podem afetar a qualidade do óleo.

1.7.3. Métodos de extração de óleos essenciais

O processo de extração é um fator determinante da pureza do óleo (Schiller & Schiller, 2008). Os óleos essenciais laboratorialmente podem ser extraídos por diferentes métodos, entre os quais alguns como:

Treinamento a vapor

A maioria dos óleos essenciais são obtidos por destilação e destilação a vapor, são possíveis três variáveis dependendo da textura e fragilidade da matéria-prima a ser tratada

Destilação:

Este método, conhecido desde os tempos mais antigos, de origem árabe, e otimizado por Groists, é um processo que utiliza o arrastamento de substâncias aromáticas pelo vapor de água. A destilação direta (sem água) é impraticável porque deve estar em alta temperatura, superaquecida, e a planta proporcionaria produtos de degradação termica (Franchomme, Jollois, & Pénoël, 2001).

Dois métodos são descritos abaixo:

O método de Moritz: é uma hidrodestilação simples que Uma suspensão de uma matéria prima vegetal na água é aquecida até a ebulição, de maneira que o vapor de água absorva as substâncias voláteis da matéria vegetal. Este vapor é recuperado e condensado numa superfície fria. O óleo essencial separa-se da água por diferença de densidade à qual não é miscível

A hidrodestilação pode ser realizada sem ou com retorno de água no balão. Esta reciclagem é chamada coesão e o sistema projetado para a operação é chamado Clevenger. Seu maior interesse reside no uso do sistema coeso, permitindo uma destilação contínua, sem alterar a quantidade de água no balão.

O método de Parnas-Wagner: em destilação de vapor saturado, o material da planta é colocado num recipiente perfurado acima da base do imóvel e não está em contato com a água. Os princípios voláteis são conduzidos pelo vapor de água, depois arrefecido e finalmente separado da fase por decantação

Hydrodifusão:

A hidrodifusão envolve a passagem de uma corrente de vapor de água de baixa pressão através da massa da planta. A composição dos produtos obtidos é substancialmente diferente qualitativamente da dos produtos obtidos pelos métodos anteriores

Extração por fluido supercrítico

É empregado para a extração de aromas, fragrâncias e perfumes de uma ampla variedade de produtos naturais. Este método de extração é superior e mais rápido que a destilação. Maior difusividade e menores viscosidades de fluidos supercríticos permitem melhor penetração e equilíbrio mais rápido. Além disso, o poder solvente é manipulável, livre da tensão superficial e das propriedades de umedecimento e facilmente adotável para isolar compostos altamente termolábeis. O CO₂ é o solvente preferido em virtude de seu baixo custo, não tóxica, não corrosivo, não inflamável, fácil de manusear, necessitando de condições de processamento suaves durante a extração, bom poder solvente para álcoois, aldeídos, ésteres e cetonas (Joy, Thoma, Mathew, Jose, & Joseph, 2014; Rassem, Nour, & Yunus, 2016).

Nesse processo, a volatilidade e a solubilidade são empregadas. As variações de temperatura e pressão são manipuladas com a maior vantagem. Após a extração, o solvente é separado da fase de extrato pela variação das condições de operação e é reciclado após a maquiagem. O CO₂ líquido é completamente miscível com os componentes dos óleos essenciais como aldeídos, cetonas, ésteres e álcoois. Ao mesmo tempo, proteínas, amidos, sais minerais e água são insolúveis em CO₂ líquido. Os óleos essenciais obtidos por extração com CO₂ líquido são superiores àqueles obtidos por destilação a vapor e extração com solvente. Extração de vários produtos naturais, tais como piretrinas de flor de crisântemo, óleos essenciais de anis, cominho, anis cravo, canela e gengibre são cada vez mais feitos por este processo (Joy, Thoma, Mathew, Jose, & Joseph, 2014; Rassem, Nour, & Yunus, 2016).

Prensagem a frio

O processo de extração por expressão a frio é certamente o mais simples, mas também o mais limitado. É reservado para a extração de compostos voláteis no pericarpo de frutas cítricas ou cítricos que são de grande importância para a indústria de perfumes e cosméticos. No entanto, eles são produtos frágeis devido à sua composição em terpenos. É um tratamento mecânico que envolve rasgar o pericarpo rico em células secretoras. Em seguida, toda a planta é pressionada para espremer o material da polpa e liberar o óleo essencial das bolsas. O óleo essencial sobe para a superfície do material e é separado do material por centrifugação (Rassem, Nour, & Yunus, 2016).

Extração assistida por microondas

A tecnologia de extração de microondas foi desenvolvida nas últimas décadas para fins analíticos. O processo de extração baseia-se na absorção da energia do microondas pelos componentes do material da planta e que são medidos por uma constante dielétrica, esta absorção também depende da frequência da onda e da temperatura do material vegetal.

Maceração

Flores, como a rosa e jasmim, são embebidas em óleo quente para libertar os seus componentes aromáticos no óleo.

Extração por solventes voláteis

A técnica de extração "convencional" por solvente consiste em colocar no extrator um solvente volátil e o material vegetal a ser tratado. Através de lavagens sucessivas, o solvente irá carregar em moléculas aromáticas, antes de ser enviado ao concentrador para ser destilado à pressão atmosférica.

A extração de solvente orgânico volátil continua sendo o método mais comum, os solventes mais amplamente utilizados atualmente são hexano, ciclo-hexano, etanol, metanol, diclorometano e acetona. O solvente escolhido, além de ser autorizado, ter alguma estabilidade contra o calor, a luz ou o oxigênio, sua temperatura de ebulição será preferencialmente baixa para facilitar sua remoção e não deve reagir quimicamente com o extrato. A extração é realizada com um aparelho Soxhlet ou um aparelho Lickens-Nickerson.

1.7.4. Composição química dos Óleos Essenciais

Os principais constituintes de óleos essenciais são mostrados na Figura 4, a partir do qual pode se concluir que a maioria dos óleos essenciais consistem em hidrocarbonetos, ésteres, terpenos, lactonas, fenóis, aldeídos, ácidos, álcoois, cetonas e ésteres. Entre estes, os compostos oxigenados (álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis) são a principal fonte de odor. Eles são mais estáveis contra influências oxidantes e resinificadoras do que outros constituintes. Por outro lado, constituintes não saturados como monoterpenos e

sesquiterpenos têm a tendência de oxidar na presença de ar e luz (Handa, Khanuja, Longo, & Rakesh, 2008).

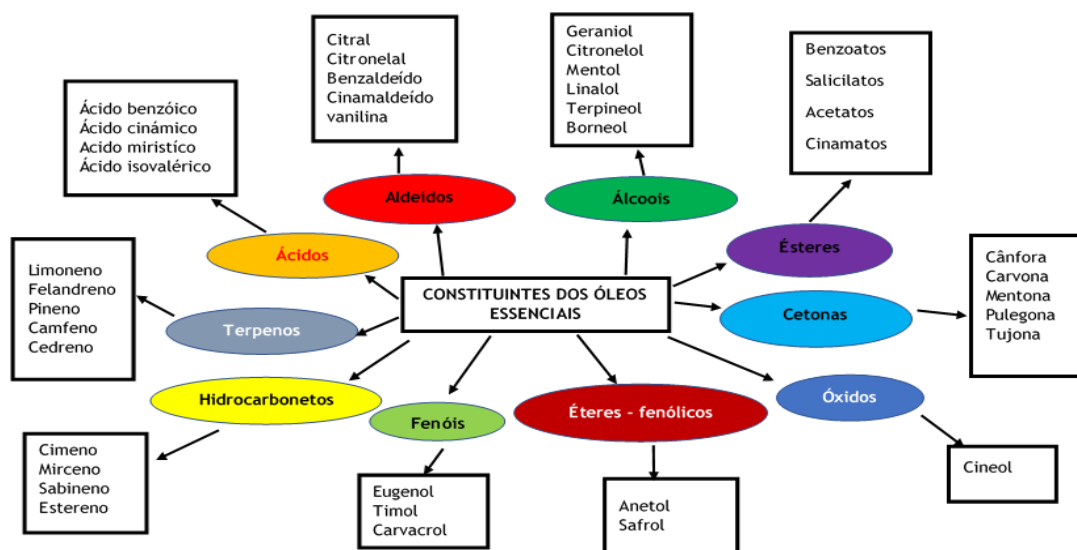


Figura 4: composição dos óleos essenciais, adaptado de Handa, Khanuja, Longo, & Rakesh, 2008.

1.7.5. Atividades Biológicas dos Óleos Essenciais

Uma das atividades biológicas que com maior frequência se atribui aos fármacos aromáticos, tanto nas plantas como nos óleos essenciais, é a atividade antimicrobiana, em particular a antibacteriana e antifúngica (Cunha, Cavaleiro, & Salgueiro, 2005). A atividade está, em geral associada à presença de compostos oxigenados com tamanho molecular reduzido, capazes de estabelecer pontes de hidrogénio e com hidrosolubilidade razoável, como o neral, timol, o carvacrol, o eugenol, o linalol, o geraniol, esses compostos atuam por modificação da permeabilidade da membrana externa dos microorganismos e por inibição de enzimas das cadeias respiratória, comprometendo o balanço energético da célula (Cunha, Cavaleiro, & Salgueiro, 2005).

A eficácia na inibição do desenvolvimento de bactérias Gram negativas e Gram positivas, de leveduras e de fungos filamentosos, mesmo estirpes usualmente resistentes aos antibióticos convencionais, tem motivado o interesse para avaliação e caracterização da atividade antimicrobiana de óleos essenciais sobre os diversos microorganismos (Cunha, Cavaleiro, & Salgueiro, 2005). Outras atividades dos óleos essenciais foram demonstradas “in vitro”, como as atividades anti-infecciosa, atividades bacteriostáticas, fungistáticas, atividade anti-helmíntica, analgésica e anti-inflamatória, anti-oxidante, anti-viral, anticancerígena, antinocicetivos (Cunha, Cavaleiro, & Salgueiro, 2005; Baser & Buchbauer, 2016).

1.8. O Género *Lippia*

O género *Lippia* (Verbenaceae) inclui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores. As espécies são distribuídas principalmente pelos países da América do Sul e da América Central e territórios da África Tropical (Pascual, Slowing, Carretero, Mata, &

Villar, 2001; Simon, *et al.*, 2008; Salimena, 2010). O gênero *Lippia* pode ser caracterizado por apresentar plantas arbustivas ou subarbustivas, com folhas decussadas, geralmente com indumento glandular, florescências parciais capituliformes ou espiciformes, congestas, axilares, brácteas membranáceas ou cartáceas, verdes ou coloridas, amarelas, róseas ou vináceas, ultrapassando ou não o comprimento das flores; flores sésseis, cálice comprimido, 2-alado, induplicado, membranáceo, inconspícuo, persistente no fruto; corola hipocraterimorfa, alva, rósea, magenta, lilás ou amarelas, tubo reto ou curvo, limbo 4-5 lobado, lábio superior ou adaxial 2-lobado, lábio inferior ou abaxial único, 2 lobos laterais; estames 4; ovário monocarpelar, bilocular, 2-ovulado, estigma lateral. Fruto dividido na maturidade em dois mericarpos (Salimena, 2010)

As espécies de *Lippia* estão distribuídas nas regiões áridas do sudoeste dos EUA, nas florestas tropicais decíduas da América Central e nos campos rupestres e cerrados do Brasil, regiões de altos índices de endemismos, estendendo-se até o Uruguai e a região central da Argentina. Na África sua ocorrência também coincide com centros de alto endemismo, na região leste, associada às montanhas mais altas e picos alpinos (Salimena, 2010). O gênero é de grande importância econômica devido aos diferentes usos dos óleos essenciais, sendo muitas espécies medicinais (Salimena, 2010). O uso na medicina popular das plantas pertencentes ao gênero *Lippia* segue um perfil geral, na maioria dos casos sendo utilizadas as folhas ou partes aéreas e flores, preparadas na forma de infusão ou decocto e administradas por via oral. As principais indicações são para o tratamento de doenças dos sistemas respiratório e digestivo e para tratar infecções em geral (Pascual, Slowing, Carretero, Mata, & Villar, 2001).

1.9. A *Lippia multiflora* Moldenke

1.9.1. Descrição botânica e classificação taxonomica da *Lippia multiflora* Moldenke

Descrição botânica

A *Lippia multiflora* Moldenke é uma planta perene que apresenta um caule lenhoso ereto em grumos que pode atingir até 2,7 a 4 m de altura, se não for cortada (Abena, Ossibi, Tsiba, Andissa, & Ouamba, 2017; Kunle & Egharevba, 2012; Kunle, Okogun, Egamana, Emojevwe, & Shok, 2003;). As hastes de *Lippia multiflora* são angulares, pubescentes e ramificadas nas extremidades. Eles têm folhas grandes, verde azulado, oblongo, três ou quatro, com uma base cuneada longa, ápice acuminado, margem finamente dentada e pubescência esbranquiçada (Abena, Ossibi, Tsiba, Andissa, & Ouamba, 2017; Bagora, 2014). *Lippia multiflora* tem inflorescências em espigões terminais umbeliformes, globosos ou cilíndricos. As flores são brancas e pequenas em glomérulos cilíndricos curtos, tem 5 - 7 mm de largura, de 5 mm a 2 cm de comprimento. (Abena, Ossibi, Tsiba, Andissa, & Ouamba, 2017). A fruta tem cor amarela escura, doce e comestível onde se encontram as sementes (Abena, Ossibi, Tsiba, Andissa, & Ouamba, 2017). Multiplicação feita por sementes e polinização por abelhas, formigas vermelhas (Bagora, 2014).



Figura 5: *Lippia multiflora* Moldenke (Nelo 9/01/2018 e Marcel 30/ 03/2018)

Classificação taxonômica da *Lippia multiflora* Moldenke.

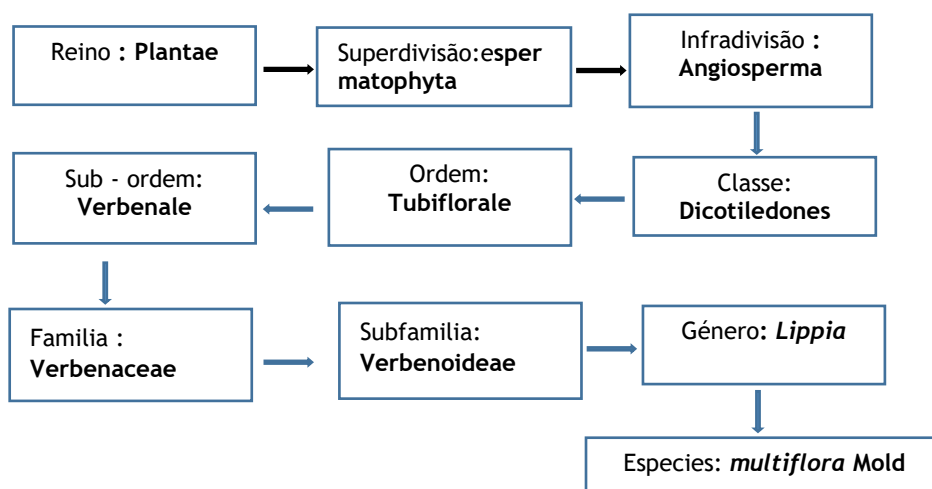


Figura 6: classificação taxonômica da *Lippia multiflora* Moldenke Adaptada de (Abena, Ossibi, Tsiba, Andissa, & Ouamba, 2017)

2001; Soro, *et al.*, 2015). Alguns habitantes de zonas rurais cozinham as ervas e usam-na para aliviar o estresse e melhorar o sono, esta planta é parte da composição de alguns fármacos tradicionais africanas melhoradas, incluindo a Malarial no Mali, Tetraciclina no Congo, usada para o tratamento de várias doenças (Etou-Ossibi, *et al.*, 2005).

No sul do Congo, a *Lippia multiflora* Moldenke é usado para baixar hipertermia e a pressão arterial (Etou-Ossibi, *et al.*, 2005). Possui propriedades hipotensivas, alívio da fadiga e propriedades diuréticas (Kanko, Sawaliho, Kone, Koukoua, & N'Guessan, 2004). Na medicina popular, a *Lippia multiflora* Moldenke tem um uso extensivo no tratamento de insuficiência hepática e febre (Abena, *et al.*, 2003). Na Costa do Marfim, a *Lippia multiflora* Moldenke é usado por dois interesses, um interesse por causa do seu uso em alimentos, como substituto de bebida de chá e como condimento e interesse pelos seus muitos usos na medicina tradicional (Soro, *et al.*, 2015). As folhas, cozidas com **dendê** e depois transformadas em bebidas, ajudam a evacuar a placenta pós-parto. É um remédio infantil comum para a febre e constipação acompanhada por uma purga leve e também é usado para resfriados comuns e queixas no peito (Kunle & Egharevba , 2012). A infusão foliar é utilizada como febrilugante sudorífera (diaforética). Faz parte de várias receitas de plantas complexas para os tratamentos da doença do sono, especialmente para a icterícia grave. Uma decocção de folhas é usada na Guiné para fumigação e banho e como uma aplicação quente para problemas de ouvidos (Irvine, 1961) citado por (Kunle & Egharevba , 2012). Em Angola a *Lippia multitflora* Moldenke é usado como chá, para aliviar as dores do peito, as constipações, relaxantes para tosse, tratamento de doenças respiratórias como bronquite, no norte as folhas da *Lippia multiflora* Moldenke, também servem de condimento, quando cozidas.

1.9.4. Metabolitos secundários da *Lippia multiflora* Moldenke

Vários investigadores explanaram muitos compostos conhecidos e metabolitos secundários na *Lippia multiflora* Moldenke. Tais metabolitos que pertencem a classes especiais de compostos orgânicos que possuem potentes atividades farmacológicas e foram relatados na literatura incluem, óleos essenciais, ligninas, celulose, taninos, amido, oxalatos, flavonóides, saponina, glicósidos, péptidos, cafeína, terpenos e alcalóides (Pascual, Slowing, Carretero, Mata, & Villar, 2001; Jigam, Akanya, Ogbadoyi, Dauda, & Evans, 2009; Kunle & Egharevba , 2012).

1.9.5. Composição química dos óleos essenciais da *Lippia multiflora* Moldenke

A *Lippia multiflora* Moldenke é uma planta aromática largamente distribuída nos países tropicais e subtropicais, sendo seu valor econômico atribuído especialmente ao óleo essencial obtido das partes aéreas. Através dos estudos encontrados, sugere-se a caracterização de três quimiotipos de acordo com a composição em 1,8-cineol, timol, farnesol e sesquiterpenóides. (Kunle & Egharevba , 2012) . Os poucos estudos sobre os constituintes fixos presentes na *Lippia multiflora* destacam a presença de triterpenos, flavonóides e fenilpropanóides (Chanh;

Koffi; Chanh, 1988; Kanko *et al.*, 2004b). A tabela a baixo ilustra os compostos voláteis maioritários encontrados nas *Lippia multiflora* Moldenke estudadas.

Tabela 1: Compostos maioritários da *Lippia multiflora* Moldenke estudadas na liteuratura

Local de recolha da planta	Composição percentual nas folhas ≥ 5	Composição percentual nas flores ≥ 5	Referências
Cotonou (Benin)	1,8-Cineol (39,9%), sabineno (11,1%); linalol(10,9%; α - terpineol (10,0%); α - pineno 5,1%		Avlessi, Alitonou, Sohounloue, Menut, & Bessiere, 2005)
Ayeremou (Toumodi Cote d'Ivoire)	1,8 - Cineol (41,1%), Geranial (13,9%); α - terpineol (11,9%); Neral (9,0%); Sabineno (5,0%).	1,8 - Cineol (41,1%), Geranial (13,9%); α - terpineol (11,9%); Neral (9,0%); Sabineno (5,0%).	Kanko, Sawaliho, Kone, Koukoua, & N'Guessan, 2004
Korhogo (Côte d'Ivoire)	(E)-tagetona(30,2%),(Z)-Tagetona(11,3%),Ipsenona(8,9%), myrceno(8,2), β -cariofileno(6.5%), p-cimeno(6.3%)		Pèlissier, <i>et al.</i> , 1994
Ouagadougou (Burkina Faso)	Timol (29,9%); p - Cimeno (26, 2%), Acetato de Timol (11, 7%)		Bassole, <i>et al.</i> , 2003
Burkina Faso	p-cimeno(21,3%), timilo(14,0%), β -cariofileno(12,9%), carvacrol(9,3%) carvona(8,6), 1,8 - cineol(5,0%)		Bassolé, <i>et al.</i> , 2010
Nigéria	Linalol (26,7%); Geraniol (20,4%); Limoneno (15,4%); β - Cimeno (8,4%)		Oladimeji, Orafidiya, Ogunniyi, & Adewunmi, 2000
Ouagadougou (Burkina Faso)	β - cariofileno (27,3%); elemol (22, 0%); óxido de cariofileno (8,6%), germacreno D (6,0%)	β -cariofileno (29,3%);elemol (11, 9%); germacreno D (15,0%); 1,8 - Cineol (8,4%)	Mevy <i>et al</i> (2007)
Abidjan (Cote d'Ivoir)	Geranial (29,1%); neral(21,9%); geraniol (8,4%); Linalol(6,9%); timol(6,6%)		Soro L. C., <i>et al.</i> ,2015 ;2016)
Toumodi (Cote d'Ivoir)	Geraniol(25,7%);Geranial(23,6%); Neral(15,7%); (E) - β - farneseno(6,4%)		
Bandoukou (Cote d'Ivoire)	Timol(50,4%); acetato de timilo(11,4%); p - cimeno(9,5%); δ - terpineol (6,8%); Carvacrol(6,3%); γ		

	- terpineno(5,7%)		
AF. Bridge (Gana)	Linalol(28,8%); germacreno D(27,9%); β- cariofileno(9,5%); 1,8 - cineol(6,7%)		Simon, <i>et al.</i> , 2008
Seikwa (Gana)	(E)-β-farneseno(12,7%), β - bisaboleno(6,1%).		
Buem (Gana)	(E)- β - farneseno(6,3%), β - bisaboleno(5,3%)		
Golo (Gana)	(E)-β-farneseno(10,4%), β - bisaboleno(9,5%).		
HO(Gana)	p-cimeno(22,8%);limoneno(12,2%); timol(7,1%); germacreno D(5,4%)		
Nyankpala(Gana)	Timol(39,9%); acetato de timilo(15,8%); p- cimeno(15,6%);γ-terpineno(8,3%); Carvacrol(5,9%).		
Sari (Gana)	Timol(40,4%); p- cimeno(18,5%); acetato de timilo(14,0%); Carvacrol(5,9%); γ - terpineno(5,8%)		
Amantin (Gana)	Timol(35,0%); acetato de timilo(18,0%); p- cimeno(17,5%); γ - terpineno(10,5%) Carvacrol(5,9%);		
Atebu (Gana)	Timol(29,8%); acetato de timilo(16,8%); p- cimeno(16,4%); γ - terpineno(10,5%); Carvacrol(4,7%)		
Kobre (Gana)	Timol(35,0%); acetato de timilo(17,1%); p- cimeno(14,2%); γ - terpineno(12,7%)		
Nsaw (Gana)	1,8-cineol(42,5%); α-terpineol(13,0%); sabineno (12,3%); Linalol(10,9%); gremacreno D (5,6%)		
Kofiase - kubesia (Gana)	1,8-cineol(46,9%);sabineno(14,%); Linalol(11,0%); gremacreno D (7,7%)		
Kindamba(Congo Brazzaville)	p-cimeno(41,1%); timol(19,0%); acetato de timilo(14,2%); Carvacrol(5,2%)		Abena, <i>et al.</i> , 2003

1.9.6. Atividades farmacológicas do óleo essencial e outros extratos da *Lippia multiflora* Moldenke.

As propriedades farmacológicas da *Lippia multiflora* Moldenke são geralmente atribuídas ao óleo essencial, apesar de outros extratos terem mostrado também algumas atividades. Em doses de 2, 4 e 8ml/kg, o óleo essencial de *Lippia multiflora* Moldenke mostrou um efeito analgésico significativo e Tranquilizante comparado ao diazepam, dependente da dose de convulsões induzidas por ácido acético em camundongos e antipirética em ratos, no modelo de hiperpirexia induzida por levedura de cerveja (Abena, Ngondzo-Kombeti, & Bioka, 1998; Abena, Atipo-Ebata, Hondi Assah, & Diatwa, 2001; Abena, *et al.*, 2003). O óleo essencial de *Lippia multiflora* tem atividade antimicrobiana (Pèlissier, *et al.*, 1994), Bassolé *et al.*, 2010). De fato, é mais ativo em bactérias Gram-negativas (Bassolé *et al.*, 2003). Outros estudos também mostraram que este óleo é um inseticida, antimalárico in vitro contra *P. falciparum* (Valentin, *et al.*, 1995; Tia, *et al.*, 2011), antioxidante e antiradical (Avlessi, Alitonou, Sohounhloue, Menut, & Bessiere, 2005), calmante em camundongos, por reduzir a atividade locomotora induzida por anfetamina, e relaxante muscular em diafragma isolado de rato, Anti-hipertensivo e antitromboxano sintetase em ratos (Chanh, Koffi, Chanh (1988). Antioxidante in vitro (Agnaniet, Makani, Akagah, Menut, & Bessière, 2005). Toxicidade contra *Artemia salina* (Ajaiyeoba, *et al.*, 2006). Antimalárico in vitro contra o *Plasmodium falciparum* (BENOIT-VICAL, *et al.*, 1996). Pediculicida contra *Pediculus humanus corporis* e *Pediculus humanus capitis* e escabícida em humanos com escabiose (Oladimeji, Orafidiya, Ogunniyi, & Adewunmi, 2000). Antimicrobiano in vitro contra o *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *E. coli*, *Listeria innocua*, *Proteus mirabilis*, *Salmonella enterica*, *Shigella dysenteria*, *S. aureus* e *S. Camorum* (Bassole, *et al.*, 2003; Bassolé, *et al.*, 2010). Antimicrobiano in vitro contra *S. aureus*, *E. coli*, *S. typhii*, *B. subtilis*, *C. albicans* (Kunle, Okogun, Egamana, Emojevwe, & Shok, 2003). Atividade anti-bacteriana contra *Bacillus cereus*, Gram positivo ou *Staphylococcus aureus* ou *Escherichia coli* Gram negativa (Owolabi, *et al.*, 2009).

1.10. Antioxidantes

O termo antioxidante foi definido de várias maneiras, como substâncias que em pequenas quantidades são capazes de prevenir ou retardar grandemente a oxidação de materiais facilmente oxidáveis, ou qualquer substância quando presente em baixas concentrações comparadas com aquelas de um substrato oxidável atrasa significativamente ou previne oxidação dessas substâncias que ocorrem sob a influência de oxigênio atmosférico ou espécies reativas de oxigênio. São utilizados para a estabilização de produtos poliméricos, petroquímicos, alimentícios, cosméticos e farmacêuticos. (Moharram & Youssef, 2014)

Antioxidante é uma molécula que inibe a oxidação de outras moléculas. A oxidação é uma reação química que transfere elétrons ou hidrogênio de substâncias para um agente oxidante. Reações de oxidação podem produzir radicais livres. Por sua vez, esses radicais podem iniciar reações em cadeia, quando as reações em cadeia ocorrem numa célula, pode

causar danos ou morte à célula. Os antioxidantes terminam essas reações em cadeia removendo intermediários de radicais livres e inibindo outras reações oxidativas (Moharram & Youssef, 2014).

1.10.1. Radicais livres e mecanismos de estresse oxidativo

Os radicais livres são átomos, moléculas ou iões com eletrões desemparelhados que são altamente instáveis e ativas para reações químicas com outras moléculas. Eles derivam de três elementos: oxigênio, nitrogênio e enxofre, criando assim espécies reativas de oxigênio (ROS), espécies reativas de nitrogênio (RNS) e espécies reativas de enxofre (RSS). Os ROS incluem radicais livres como o aniões superóxido (O_2^-), radical hidropoxila (HO_2^-), radical hidroxila (OH^-), óxido nítrico (NO) e outras espécies como peróxido de hidrogênio (H_2O_2), oxigênio singleto (1O_2), ácido hipocloroso (HClO) e peroxinitrito (ONOO). Os SNR derivam do NO por reagir com O_2 , e formar ONOO. RSS são facilmente formados pela reação de ROS com tióis (Lüet al., 2010). O radical hidropoxila (HO_2) se desassocia em pH 7 para formar o ânion superóxido (O_2^-).

1.10.2. Benefícios para a saúde dos antioxidantes

Os antioxidantes são responsáveis pelos mecanismos de defesa do organismo contra as patologias associadas ao ataque dos radicais livres. Assim, o consumo de antioxidantes derivados de plantas está envolvido na prevenção de doenças degenerativas causadas por estresse oxidativo, como câncer, doença Parkinson, Alzheimer ou aterosclerose (Moharram & Youssef, 2014, Yadav, *et al.*, 2016, Pisoschi & Negulescu, 2011).

Recentemente, os antioxidantes têm atraído considerável atenção em relação aos radicais e estresse oxidativo, profilaxia e terapia contra o câncer e longevidade. Os fenóis e polifenóis são os analitos alvo em muitos desses casos; eles podem ser detectados por enzimas como a tirosinase ou outras fenol oxidases, ou mesmo por tecidos vegetais contendo estas enzimas (Pisoschi & Negulescu, 2011).

1.10.2. Classificação de antioxidantes

Existem diferentes atributos para classificar os antioxidantes. O primeiro atributo é baseado na função (antioxidantes primários e secundários). O segundo atributo é baseado em antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (Moharram & Youssef, 2014, Pisoschi & Negulescu, 2011)

1- Antioxidantes primários

Eles são os antioxidantes que quebram a cadeia, que reagem com os radicais lipídicos e os convertem em produtos mais estáveis. Antioxidantes deste grupo são principalmente fenólicos, em estrutura e incluem os seguintes: antioxidantes minerais, vitaminas antioxidantes e fitoquímicos que incluem flavonóides, catequinas, carotenóides, β -caroteno, licopeno, diterpeno de, pimenta do reino, tomilho, alho, cominho e seus derivados. (Hurrell, 2003, Yadav, *et al.*, 2016).

2. antioxidantes secundários

Estes são compostos fenólicos que desempenham a função de capturar radicais livres e interromper as reações em cadeia. Os compostos incluem: hidróxi anisole butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT) e galato de propilo (PG) (Moharram & Youssef, 2014).

Entre os antioxidantes não enzimáticos, muitos são obtidos a partir de fontes alimentares. Os antioxidantes dietéticos podem ser classificados em várias classes das quais os polifenóis apresentam a maior classe. Os polifenóis consistem em ácidos fenólicos e flavonóides. As outras classes de antioxidantes dietéticos incluem vitaminas, carotenóides, organossulfurados e minerais (Moharram & Youssef, 2014).

1.10.3. Métodos para avaliação de atividades antioxidante

vários métodos analíticos de avaliação da capacidade antioxidante se enquadram em categorias distintas, um dos métodos mais usado é o método de DPPH

Avaliação de atividade antioxidante pelo método de DPPH

O DPPH• (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo) é um radical livre estável, devido à deslocalização do elétron sobressalente em toda a molécula. Assim, o DPPH não dimeriza, como acontece com a maioria dos radicais livres. A deslocalização na molécula do DPPH• determina a ocorrência de uma cor púrpura, com uma faixa de absorção com um máximo de cerca de 520nm (Pisoschi & Negulescu, 2011).

Quando o DPPH• reage com um doador de hidrogênio, a forma reduzida (molecular) (DPPH) é gerada, acompanhada pelo desaparecimento da cor violeta. Portanto, a diminuição da absorbância depende linearmente da concentração de antioxidantes (Pisoschi & Negulescu, 2011). Trolox, o ácido gálico e a rutina são usados como antioxidantes padrões (Pisoschi & Negulescu, 2011, Lucas, 2017)

Este método tem como sustento principal a atividade sequestradora do radical DPPH. Esta atividade é expressa através da percentagem de inibição (%I), que é a percentagem de DPPH eliminado. Os resultados obtidos permitem a determinação de (IC₅₀), que é a concentração da substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH. Quanto maior o consumo de DPPH por um antioxidante menor será o seu IC₅₀ e consequentemente maior será a sua atividade antioxidante (Lucas, 2017)

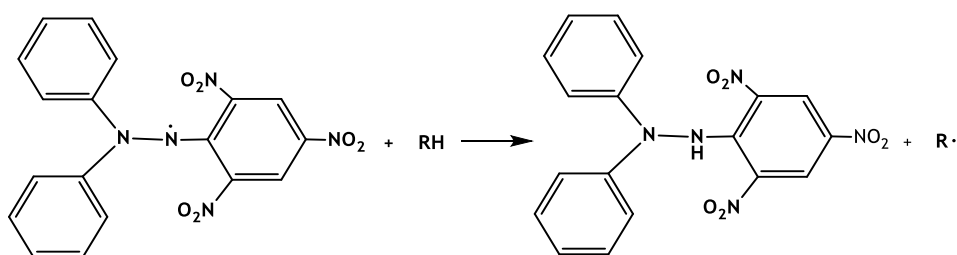


Figura 8. Reação entre o radical livre DPPH e o composto antioxidante (RH), o que resulta na formação da difenil-picrilhidrazina.

1.11. Atividades Antibacterianas

O desenvolvimento de resistência bacteriana a antibióticos presentemente disponíveis obrigou a necessidade de procurar novos agentes antibacterianos. As bactérias gram-positivas, como o *Staphylococcus aureus*, são as principais responsáveis pelas infecções pós-operatórias, síndrome do choque tóxico, endocardite, osteomielite e intoxicação alimentar. Bactéria Gram negativa tal como a *Escherichia coli* está presente no intestino humano e causa infecção do trato urinário inferior, coleocystis ou septicemia (Amenu, 2014).

A resistência múltipla aos fármacos em microorganismos patogênicos humanos tem sido desenvolvida devido ao uso indiscriminado de fármacos antimicrobianos comerciais comumente usado no tratamento de doenças infecciosas (Adwan, Abu-Shanab, & Adwan, 2009, Amenu, 2014).

O desenvolvimento de resistência a antibióticos é multifatorial, incluindo a natureza específica da relação entre bactérias e antibióticos, o uso de agentes antibacterianos, características do hospedeiro e fatores ambientais (Amenu, 2014).

Esta situação forçou os cientistas a procurar novas substâncias antimicrobianas de várias fontes como novos agentes quimioterápicos antimicrobianos, mas o custo de produção de fármacos sintéticos é alto e elas produzem efeitos adversos em comparação com fármacos derivados de plantas (Amenu, 2014).

Essas substâncias antimicrobianas são de origem natural, e acredita-se que suas influências no meio ambiente sejam poucas e possam ser usadas como agentes de controle biológico.

Destes micróbios resistentes a antibióticos, o *Staphylococcus aureus* resistente à Meticilina (MRSA) é uma das principais causas de infecções nosocomiais. As infecções por MRSA são muito difíceis de curar porque as cepas de MRSA são resistentes a quase todos os antibióticos clinicamente disponíveis. Para a maioria das cepas de MRSA, os medicamentos do tipo glicopeptídeo, como a vancomicina, são os únicos agentes antimicrobianos eficazes. No entanto, *S. aureus* resistente à vancomicina (VRSA) tem sido relatado (Amenu, 2014, (Adwan, Abu-Shanab, & Adwan, 2009).

A *Pseudomonas aeruginosa* também causa infecções nosocomiais como resultado de sua natureza onipresente, capacidade de sobreviver em ambientes úmidos e resistência a muitos antibióticos e antissépticos. Um dos principais problemas é o surgimento de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* multirresistentes resistentes a diferentes classes de agentes antimicrobianos. talvez, esse alto grau de resistência a múltiplos fármacos esteja relacionado à presença de sistemas de efluxo de antibióticos que fornecem resistência a múltiplos agentes antimicrobianos (Adwan, Abu-Shanab, & Adwan, 2009, Amenu, 2014).

Entero-bacteriaceae multirresistente, principalmente *Escherichia coli*, produz enzimas β -lactamases-M (ESBLs) de espectro estendido. Essas enzimas foram denominadas por sua maior

atividade contra cefotaxima, já que outros substratos oximino-beta-lactâmicos, como a ceftazidima, a ceftriaxona ou o cefepime, emergiram na comunidade como uma importante causa de infecções do trato urinário (ITUs) (Amenu, 2014). Relatórios recentes também descreveram a *E. coli* produtora de ESBL como uma causa de infecções na corrente sanguínea associadas a esses problemas comunitários de ITU (Amenu, 2014). Algumas plantas mostram uma atividade significativa contra bactérias patogênicas humanas (Amenu, 2014).

No entanto, atualmente, os extratos vegetais raramente são usados como antimicrobianos ou como antibióticos sistêmicos e isso pode ser devido ao seu baixo nível de atividade, especialmente contra bactérias gram-negativas (Amenu, 2014).

1.11.1. Métodos para avaliação de atividades anti microbianas

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica dos extratos vegetais. Os mais conhecidos incluem método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição.

1.11.1.1. Métodos de difusão em placa de agar

Estes métodos consistem na utilização de um suporte nutritivo sólido, com a consistência de um gel, existem vários, consoante o meio nutritivo que se deseje ou para o microrganismo em questão (Muller-Hinton, Sabouraud, entre outros). Sobre esse suporte testam-se métodos físicos de difusão, desafiando um microrganismo contra uma substância biologicamente activa. As inoculações destes meios são, geralmente, feitas numa placa de Petri onde o ágar, ainda líquido, é depositado e deixado a solidificar, actualmente já se usam placas de Petri com o respectivo agar já preparado e pronto a usar. A avaliação da actividade é feita por comparação entre o halo de inibição em volta de um disco embebido ou cavidade contendo a substância teste e o halo de inibição de uma substância da qual se conhece a actividade antibacteriana (Ostrosky, *et al.*, 2008; Ferreira, *et al.*, 2010).

As alterações na constituição do agar ou a sua incorrecta preparação, a sua espessura na placa de Petri, uma densidade de inóculo não adequada, temperaturas demasiado elevadas ou tempo de incubação excessivo, erros de medição de halos de inibição, contaminações ou outras interacções que possam existir com o agente antimicrobiano, são factores que interferem com a interpretação dos resultados (Alves, *et al.*, 2008).

Tendo em consideração as dimensões dos halos, podemos classificar o microrganismo de :

- **Sensível** - Se o diâmetro do halo de inibição for superior a 3 mm;
- **Medianamente sensível** - Se o diâmetro do halo de inibição estiver compreendido entre os 2 e os 3 mm;
- **Resistente** - Se o diâmetro do halo de inibição for menor ou igual a 2 mm; (Ostrosky, *et al.*, 2008)

Como controlo positivo é usado um agente quimioterápico padrão com actividade antimicrobiana reconhecida e como controlo negativo é usado o solvente utilizado para a diluição da substância em estudo. As temperaturas e o tempo aconselháveis para incubação podem variar dependendo do microrganismo, geralmente, para bactérias as temperaturas rondam os 35-37°C com tempos de incubação entre 24 e as 48 horas (Ostrosky, *et al.*, 2008).

Perfuração de cavidades cilíndricas

Na perfuração de cavidades (também designadas de poços), o agar é perfurado com um utensílio de aço inoxidável estéril, um segmento cilíndrico oco, capaz de remover um segmento cilíndrico de agar do meio (já inoculado), criando uma cavidade com 5 mm de diâmetro por 4 mm de altura, a qual é posteriormente preenchida com a substância que se deseje testar (Ostrosky *et al.*, 2008).

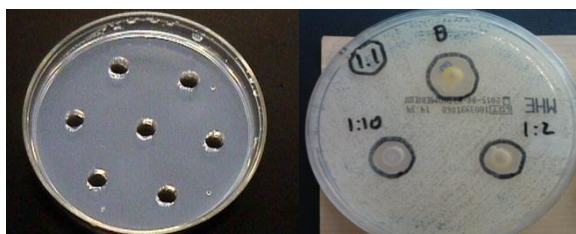


Figura 9 - Exemplos de agar com cavidades, na direita após ensaios

Cilindros de aço inoxidável

Método desenvolvido por Abraham *et al* em 1941 e mais tarde modificado por Schmidt e Moyer em 1944, ambos na perspectiva de testarem a difusão de antibióticos ao colocar cilindros ocos de aço sobre o meio agar já inoculado e preenchendo-os com o antibiótico em questão. Produzem-se halos de em torno da base do cilindro, dependendo da concentração do antibiótico e é um procedimento típico na aferição de soluções farmacêuticas, nomeadamente de penicilina. São usados também cilindros de porcelana ou vidro, ambos com as mesmas dimensões dos de aço inoxidável, 8 mm diâmetro exterior e 6 mm de diâmetro interior, altura de 10 mm e são depositados, geralmente, 6 por placa de 20x100 mm equidistantemente. Já existem dispensadores que efectuem esta tarefa, garantindo a equidistância e não danificando o agar, mas também garantindo as condições de esterilidade (fig.10). Na adaptação desta técnica, aos óleos essenciais, são colocados sobre o agar cilindros com dimensões similares às da perfuração em agar. É assim criado um depósito de aço inoxidável sobre o agar, o qual é posteriormente preenchido com a substância teste (Ostrosky, *et al.*, 2008).



Figura 10 - Na esquerda, dispensador e placas dispensadas, na direita um exemplo de ensaio com halos de inibição (consultado em <http://www.tsh.co.in/EqGen.html>; Ahmed A. *et al*, 2012)

Difusão em discos de papel

Na difusão em discos de papel, aplicam-se 10 µl de diferentes concentrações da substância antimicrobiana a testar sobre os discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro que são depositados sobre o agar inoculado com o microrganismo a testar. A sua distância até à lateral da placa e a outros discos deve ser maior que 15 mm, de modo a não sobrepor as zonas de inibição. O pH do meio de cultura deve estar entre 7,2 e 7,4, e a altura recomendada é de aproximadamente 4 mm. (Ostrosky *et al.*, 2008).

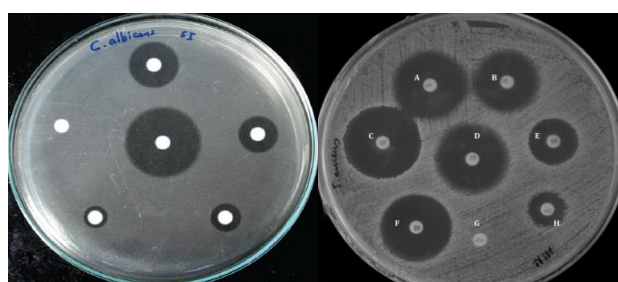


Figura 11 - Exemplos de ensaios de difusão por discos de papel [Adaptado de (Barani, *et al.*, 2014); <http://labs.7bscience.com/lab-3---antibiotics.html>]

Efeito de vapor do óleo essencial em placa de agar

Para verificar se o vapor de um determinado óleo exerce actividade sobre o microrganismo teste, numa placa já com um meio inoculado, coloca-se, na tampa da mesma, uma porção do óleo a testar e, passando a tampa a ser a base da placa, coloca-se o meio inoculado por cima (placa de agar invertida). Uma adaptação reportada é a de utilizar discos de papel estéreis, saturados com óleo a testar e colocados no centro da tampa da placa. Incuba-se, invertida a $37 \pm 1^\circ\text{C}$, durante 24h (Lisin *et al*, 1999; Ostrosky *et al*, 2008).

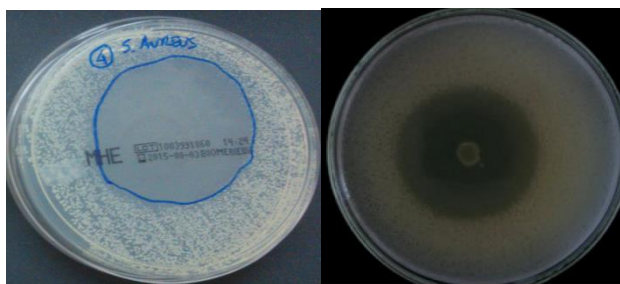


Figura 12- Exemplos de ensaios pela técnica de vapor e os halos de inibição causados

Interferentes nos métodos de avaliação antibacteriana

Apesar de se terem vindo a desenvolver cada vez melhores e mais aperfeiçoados métodos de avaliação *in vitro*, que produzem resultados mais reprodutíveis e confiáveis, no caso dos óleos essenciais isso tem-se provado uma tarefa árdua. Em grande parte, isso deve-se às peculiaridades que os óleos apresentam, não só pela sua complexidade química, mas também pela sua volatilidade e insolubilidade em água, factores que interferem significativamente nos resultados, tornando-os de difícil comparação com outros estudados (Nascimento, *et al.*, 2007). As metodologias de *screening* já sofreram diversas alterações com intuito de obter resultados mais confiáveis. Mas mesmo sabendo que alguns factores são controláveis, tais como a composição dos meios de cultura, os microrganismos, o pH, a disponibilidade de oxigénio, a preparação do inóculo ou as condições de incubação e que são conhecidos por influenciar os resultados, torna-se ainda assim, difícil padronizar um método (Alves, *et al.*, 2008).

Meios de Cultura

Os meios de cultura utilizados têm o intuito de promover o crescimento de microrganismos em condições laboratoriais. Não devem conter substâncias que afectem a actividade da substância a estudar. Deve evitar-se a formação de estrias, bolhas, brechas, ou qualquer outra irregularidade ao verter o meio líquido e até que solidifique nas placas de Petri, visto que a espessura, a concentração e a uniformidade do agar afectam consideravelmente os resultados dos ensaios de difusão. O meio Müller-Hinton agar é o mais citado. Considera-se que este é o melhor meio para testes de sensibilidade a antibióticos contra bactérias devido à sua boa reprodutibilidade e possuir baixos teores de inibidores (Ostrosky, *et al.*, 2008).

pH

O pH influencia de forma acentuada o crescimento microbiano, tendo quase cada espécie um valor ideal ou um intervalo de pH onde a taxa de proliferação é máxima ou óptima. Dentro de uma gama de crescimento segundo o pH, existem os microrganismos acidófilos com

crescimento ideal a pH entre 1,0 e 5,0, os neutrófilos entre 5,5 e 8,0, os alcalófilos entre 8,5 e 11,5 e os alcalófilos extremos com pH acima de 10. O metabolismo celular é perturbado ou alterado quando se dão variações bruscas no pH citoplasmático, podendo inibir a actividade enzimática, proteínas de transporte membranar e causando inviabilidade de diversas funções celulares. Nesta perspectiva, deve seleccionar-se um meio ou meios com gamas de pH adequadas ao crescimento do microrganismo teste e que também não interfiram com as actividades das substâncias a ser testadas, por exemplo, um meio com acidez elevada diminui a actividade microbiana de substâncias com caracter básico, como a estreptomicina, mas intensifica a actividade de

substâncias ácidas como a penicilina. Elevadas concentrações de CO₂ na atmosfera circundante alteram significativamente o pH da superfície dos meios, devendo ser evitadas (Ostrosky *et al.*, 2008).

Oxigénio

O oxigénio, O₂, é uma molécula quase universal em ambientes celulares e está sempre a ser fornecido pelas grandes quantidades de água que esses ambientes celulares necessitam. Contudo, as células procariotas apresentam um grande leque de respostas metabólicas face ao oxigénio molecular disponível. Essas adaptações diferenciam-nas em:

- **Aeróbias estritas**, que necessitam de O₂ para crescimento e usam-no metabolicamente como receptor final de electões;
- **Anaeróbias estritas**, que não necessitam nem usam O₂ como nutriente, aliás, o O₂ é para estas bactérias uma substância tóxica, que as mata ou inibe o crescimento. Subsistem por fermentação, respiração anaeróbia, fotossíntese bacteriana ou pelo ainda não muito conhecido processo de metanogenese;
- **Anaeróbias Tolerantes**, usam um metabolismo exclusivamente fermentativo mas, ao contrario das anaeróbias estritas, são insensíveis à presença de O₂. Vivem por fermentação quer o O₂ esteja ou não presente;
- **Anaeróbias Facultativas**, têm um metabolismo preferencial, mas podem alternar entre os dois tipos de metabolismo, quando na ausência de O₂, usam fermentação ou respiração anaeróbia, na presença de O₂ mudam para respiração aeróbia;
- **Microaerofilas**, são aeróbias e necessitam de oxigénio, no entanto, crescem somente em ambientes cuja concentração de oxigénio é inferior à existente no ar. Quando em meio liquido, não crescem junto da superfície, onde o oxigénio ainda se difunde com alguma facilidade, nem junto do fundo do recipiente onde a ausência de oxigénio é expectável, têm uma zona de

crescimento dependente da concentração de O₂. Esta tolerância parece dever-se à sua sensibilidade a radicais superóxidos ou peróxidos que tendem a formar-se em ambientes muito oxigenados (Tortora, Funke, & Case, 2010)

Preparação e padronização do inóculo

A susceptibilidade dos microrganismos frente a agentes antimicrobianos está implicitamente relacionada com a quantidade de inóculo. Essa quantidade de inóculo deverá ser padronizada para cada procedimento. Nos casos de crescimento em placa, a padronização é ajustada a 10⁶ UFC/mL, o que garante um bom crescimento e proliferação na superfície do agar, permitindo uma boa visualização da possível inibição. Para testes de diluição em caldo ajusta-se a padronização para 10⁸ UFC/mL (Ostrosky *et al.*, 2008).

Para métodos de diluição e difusão a preparação do inóculo deve ser feita a partir de 4 ou 5 colónias da cultura pura do microrganismo a testar. A suspensão deve ser lida fotometricamente, certificando que atinge o valor de 0,5 na escala MacFarland, o que corresponde a uma densidade de aproximadamente 10⁸ UFC/mL. O inóculo pode continuar a ser ajustado fotometricamente ou por diluição padronizada do caldo nutriente, se a densidade de tais culturas for razoavelmente constante. Após obter a padronização desejada, o inóculo deve ser aplicado nos meios de cultura num intervalo de até 30 min. (Ostrosky, *et al.*, 2008)

Condições de incubação

Quer nos métodos com meios sólidos, quer nos métodos em caldo, as temperaturas de incubação para bactérias oscilam entre os 35-37°C, com premissa de que os meios em caldo deverão fazê-lo sob constante agitação quando assim for exigido. Por vezes esta simples etapa é bastante limitante, por exemplo no caso particular de uma estufa, quer seja pelo facto de ser necessário algum espaço (caso da macrodiluição, series de tubos), quer pelo facto de quando em meio sólido, se incubam placas, que são bastante susceptíveis a variações de temperatura, inviabilizando o uso da estufa para outros usos correntes a fim de minimizar oscilações na temperatura, ou ainda, se não se possuir uma estufa com agitação, caso necessária (Ostrosky, *et al.*, 2008)

Capítulo II. Parte Experimental

Neste capítulo são apresentados os materiais e os métodos e procedimentos utilizados a partir da recolha de material vegetal até aos processo determinação das atividades biológicas dos óleos essenciais e dos extratos aquosos da planta em estudo.

2.1. Recolha da planta

As folhas de *Lippia multiflora* foram recolhidas em duas Províncias de Angola, nomeadamente a província do Cuanza Norte no município de Ndalatando R₁ e R₂ em Março de 2017, e na província do Zaire, nos municípios de Mbanza kongo (R₄, R₅ e R₇) em janeiro de 2018 e no município do Tomboco R₃ e R₆ em setembro de 2017, janeiro e Abril de 2018 respetivamente.

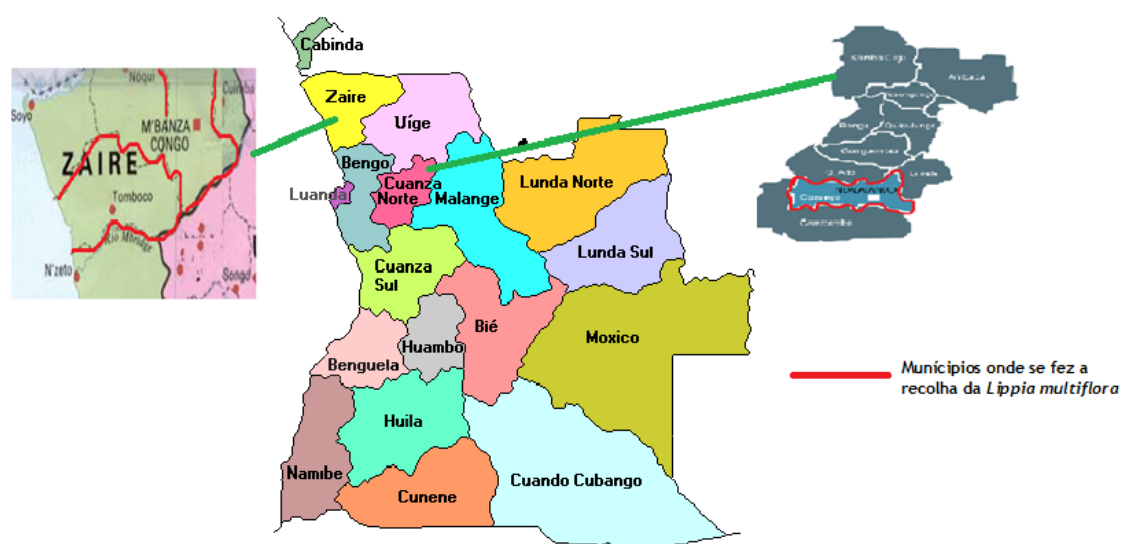


Figura 13: Províncias e município onde foram recolhidas as amostras

2.2. Extração do óleo essencial

Para a extração dos óleos essenciais foi usado o método de hidrodestilação através da utilização de um aparelho tipo Clevenger. Num balão de fundo redondo de 2 L adicionou-se 200g folhas de *Lippia multiflora* Moldenke, cerca de 1,5 L de água destilada. Ao fim de 2-3 horas, o óleo essencial é posteriormente recolhido, identificado e guardado no frigorífico para posterior análise. Os extratos aquosos foram filtrados e conservados para realizar posteriormente os testes de atividade antioxidante e para determinação dos seus fenóis e flavonoides totais.

2.3. Extração com solventes

Os compostos dos restantes materiais vegetais, foram extraídos em solventes orgânicos, como o *n*-hexano a quente, acetona e etanol à temperatura ambiente.

Extração com *n*-hexano a quente

Os compostos das folhas de *Lippia multiflora* Moldenke foram extraídos com *n*-hexano a quente utilizando um extrator de Soxhlet durante 24 horas e os extratos foram separados do solvente usando um evaporador rotativo (com bomba Buchi VAC V-500 com controlador de pressão Buchi vacuum Controller V-850 e colocado em banho a 40°C, num Buchi 461 Water Bath), como ilustra a imagem da figura 14.



Figura 14: Montagem laboratorial de extrações sólido-líquido, usando o extrator Soxhlet

Depois de evaporar os solventes os extratos obtidos foram pesados e as suas massas estão descritas na tabela 2.

Tabela 2: Rendimentos das extrações com *n*-hexano a quente de todas as recolhas da *Lippia multiflora* Moldenke

Recolhas	Código	Massa de partida (g)	Massa do extrato (g)	Redimento (%)
1	R ₁	642,92	10,367	1,61
3	R ₃	173,16	2,30	1,33
5	R ₅	860	6,1803	0,72
6	R ₆	93	2,0865	2,24

2.4. Purificação por Cromatografia

Depois da extração, os compostos dos extratos de *n*-hexano foram separados e purificados utilizando técnicas cromatográficas. O tipo de cromatografia utilizada foi a cromatografia em coluna utilizando como fase estacionária sílica em gel (C.C), a pressão moderada, utilizando uma bomba Buchi Pump Module C-601#, sendo as frações recolhidas por um coletor automático Buchi Fraction Collector C-660, e analisada cada fração por cromatografia em camada fina em gel de sílica (TLC)

2.4.1. Cromatografia em coluna do extrato de n-hexano a quente das *Lippia multiflora* Moldenke.

Depois da extração, os extratos de n-hexano aquecido foram decerados, isto é, foram dissolvidos em metanol a quente e lavados com metanol a frio com vista a separar a parte dissolvida em metanol das ceras (parte insolúvel em metanol) por meio de uma filtração a vácuo, para posterior cromatografia em coluna. A tabela a seguir ilustra as massas das partes solúveis em metanol e das partes insolúveis em metanol (ceras) de pois do processo da sua separação denominada deceração.

Tabela 3: Massa das partes solúveis e insolúveis em metanol dos extratos de hexano das amostras cromatografadas.

Recolha	Parte solúvel em metanol Massa do extrato(g)	Parte insolúvel em metanol (Ceras) Massa das ceras (g)
R1	5,741	1,1011
R3	1,038	0,416
R5	3,992	1,099

2.4.1.1. Cromatografia em coluna da parte solúvel em metanol do extrato de n-hexano a quente de R₁

Das 5,741g da parte solúvel em metanol, foram retiradas 3,00 g que foram cromatografadas. Para purificar os compostos dos extratos de hexano, foi feita uma cromatografia em coluna de gel de sílica, utilizando para eluição os solventes n-hexano e misturas de n-hexano/acetato de etilo com as polaridades de 98: 2, 95: 5, 90:10, 80:20, 70:30,60: 40, 50:50 e 100 % de acetato de etilo para eluir os compostos mais polares. Os compostos foram separados por cromatografia em camada fina de gel de sílica (TLC), baseando - se nos seus fatores de retenção (R_f).

Tabela 4 : Frações obtidas depois da cromatografia em coluna em gel de sílica do R1 (C₂ - L₁) com as suas respectivas polaridades de eluição e massas de frações.

Balão	Frações	Solventes e polaridade de eluição/ TLC	Massa do produto (mg)
1	33	98:2/9:1	6,0
2	42 - 44	95:5/9:1	8,0
3	45 - 46	//	48,6
4	47 - 48	//	23,0
5	49	//	27
6	50	//	118,2
7	51	//	145, 6
8	52	//	17,5
9	53	90:10/7:3	1186
10	54	//	551,6
11	55	//	185,0
12	56	//	203,3
13	57	//	160,1
14	58	90:10/6:4	115
15	59	//	80,2
16	60	90:10/1:1	4,0
17	61	//	9,5
18	62	//	12,0
19	63	//	6,0
20	64	70:30/1 acetato de etilo	6,8
21	65	//	
22	66	//	
23	67	60:40/1 acetato de etilo	
24	68	//	2,6
25	69	100/1 acetato de etilo	

2.4.1.2. Cromatografia em coluna da parte solúvel em metanol do extrato n-hexano a quente de R₃

Das 2,300 g da parte solúvel em metanol, foram retiradas 1,038 g e foi cromatografada. Para purificar os compostos dos extratos de hexano, foi feita uma cromatografia em coluna de gel de sílica, utilizando para eluição os solventes n - hexano/acetato de etilo com as polaridades de 100%, 98: 2, 95: 5, 90:10, 80:20, 70:30,60: 40, 50:50 e 100 % de acetato de etilo para eluir os compostos mais polares. Os compostos de cada fração foram analisados por cromatografia em camada fina de gel de sílica(TLC), baseando - se nos seus fator de retenção (R_f).

Tabela 5: Frações obtidas depois da cromatografia em coluna em gel de sílica do R3 (MN C₁ - L₂) com as suas respetivas polaridades de eluição e massas das frações

Balão	Frações	Solventes e polaridades de eluição / TLC	Massa do produto (mg)
1	38 - 44	98:2/9:1	21,8
2	50 - 51	95:5/9:1	197,0
3	52 - 54	95:5/9:1	26,8
4	55 - 56	95:5/9:1	78,3
5	57	95:5/9:1	280,0
6	58 - 61	90:10/9:1	45,3
7	62 - 65	90:10/8:2	11,4
8	66 - 68	90:10/8:2	20,5
9	69 - 71	90:10/7:3	53,8
10	72	80:20/7:3	76,3
11	73 - 74	80:20/7:3	800,0
12	75 - 77	80:20/7:3	73,0
13	78 - 79	80:20/7:3	44,0
14	80 - 82	80:20/7:3	12,0
15	83	80:20/7:3	4,0
16	84 - 89	70:30/6:4	104,8
17	90 - 92	60:40/6:4	6,2
18	93 - 96	60:40/6:4	3,7
19	97 - 98	100 Acetato de etilo/1:1	15,5
20	99	100 Acetato de etilo/1:	25,60
21	100 - 101	100 Acetato de etilo/1:1	18,0
22	102 - 103	100 Acetato de etilo/1:1	102,0

2.4.1.3. Cromatografia em coluna da parte solúvel em metanol do extrato de n-hexano a quente de R₅

Das 3,992 g da parte solúvel em metanol, foram retiradas 3,000 g e foi cromatografada. Para purificar os compostos dos extratos de hexano, foi feita uma cromatografia em coluna de gel de sílica, utilizando para eluição os solventes n-hexano:acetato de etilo com as polaridades de 100%, 98: 2, 95: 5, 90:10, 80:20, 70:30,60: 40, 50:50 e 100 % de acetato de etilo para eluir os compostos mais polares. Os compostos foram separados por cromatografia em camada fina de gel de sílica(TLC), baseando-se nos seus fatores de retenção(R_f).

Tabela 6: Frações obtidas depois da cromatografia em coluna em gel de sílica do R5 (C₃ - L₅) com as suas respetivas polaridades de eluição e massas de frações.

Balão	Frações	Solventes e polaridades de eluição / TLC	MASSA DO PRODUTO (mg)
1	33	hexano	
2	49	98:5	2019
3	50 - 52	90:10/8:2	438
4	53 - 56		587
5	57 - 64	80:20/	162,1
6	65 - 69	//	15,7
7	70 - 76	//-70:30	23
8	77 - 84	//	23
9	85 - 88	//	17
10	89 - 90	70:30	5
11	91	60:40	13
12	92 - 96		2
13	97 - 98	50:50	5
14	99 - 104	//	47
15	105 - 106	100 acetato de etila	9
16	107 - 108	95: 5 acet eti -MetOH	22
17	109	95: 5 acet eti -MetOH	22
18	110 - 113	95: 5 acet eti -MetOH	37,5
19	114 - 116	95: 5 acet eti -MetOH	3
20	117 - 120	95: 5 acet eti -MetOH	25
21	121 - 125	95: 5 acet eti -MetOH	22
22	126 - 128	95: 5 acet eti -MetOH	2

2.5. Análise dos óleos essenciais da *Lippia multiflora* Moldenke e Determinação estrutural das frações purificadas.

2.5.1. Análise por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (GC - MS)

Os óleos essenciais da *Lippia multiflora* Moldenke foram analisados por cromatografia gasosa, através do uso de um cromatógrafo Agilent technologie 7890A associado a um espetrómetro de massa do tipo MS A 5975C inert XLMSD. A técnica de ionização usada foi de impacto eletrónico de 70 eV.

A coluna usada foi J &W DB5 - ms com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro e 0,25 µm de espessura de filme, realizado com a seguinte programação de temperatura: 60°C durante 5

minutos, e a seguir aumenta a temperatura 10°C por minuto até os 250°C. A temperatura do injetor foi de 250°C, a da fonte foi de 230°C, a da interface foi de 280°C e a do quadrupolo foi de 180°C. O gás de arraste usado é o hélio e o seu caudal foi de 1 mL/minuto.

2.5.2. Análise por Espectroscopia de infravermelho (IV)

As leituras foram realizadas num espectrofotômetro Thermo Scientific, modelo Nicolet IS 10. As amostras foram colocadas sobre o diamante, previamente limpo com isopropanol. O espectro foi realizado utilizando o software OMNIC.

2.5.3. Espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN).

Espectros de ressonância magnética nuclear de próton (¹H-RMN) e carbono (¹³C-RMN): efectuaram-se num espectrofotômetro Bruker Avance II 400, a 400 MHz para o próton e a 100 MHz para o carbono, respetivamente. Os desvios químicos (δ) são expressos em partes por milhão (ppm) e as constantes de acoplamento (J) em Hertz. O solvente usado foi o clorofórmio deuterado (CDCl₃), usando como referência o sinal do pico residual do solvente deuterado sendo para o ¹H a 7,26 ppm e para o ¹³C a 77,2 ppm.

2.6. Determinação dos fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes nas amostras foi feita utilizando o método de Folin Ciocalteu (Miliauskas, Venskutonis, & van Beek, 2004; Tawaha, Alali, Gharaibeh, Mohammad, & El-Elimat, 2007; Lucas, 2017). Para tal foi necessário a elaboração de uma curva de calibração do ácido gálico.

Construção da reta de calibração

Foram preparadas diferentes concentrações de soluções metanólicas de ácido gálico, como ponto de partida preparar uma solução-mãe de ácido gálico em metanol, com concentração 500 mg/L, as outras soluções foram preparadas por diluição da solução-mãe, com diferentes concentrações: 50, 100, 125, 150, 200, 225, 250, 300, 325, 350 e 400 mg/L.

Num tubo de ensaio foram adicionados 450 µL de água destilada, 50 µL de uma das soluções metanólicas referidas anteriormente. Adicionou-se 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu 0,2 N (preparado a partir de uma solução comercial de 2 N por diluição com água destilada de forma a obter a concentração pretendida).

Deixou-se reagir 5 minutos à temperatura ambiente, adicionar 2 mL de carbonato de sódio (solução aquosa de 75 g/L).

Incubou-se durante 90 minutos, num banho de água a 30 °C, com agitação intermitente.

As absorvâncias das soluções preparadas foram lidas a 765 nm contra um branco, usando um espectrofotômetro UV-Vis, modelo Evolution 160 (Thermo Fisher Scientific, Madison, EUA).

O branco foi preparado segundo o explicado anteriormente, substituindo-se os 50 µL de solução de ácido gálico por 50 µL de metanol. O ensaio foi realizado em triplicado.

A partir destas leituras construiu-se uma reta de calibração da absorvância em função da concentração de ácido gálico (Gráfico 1).

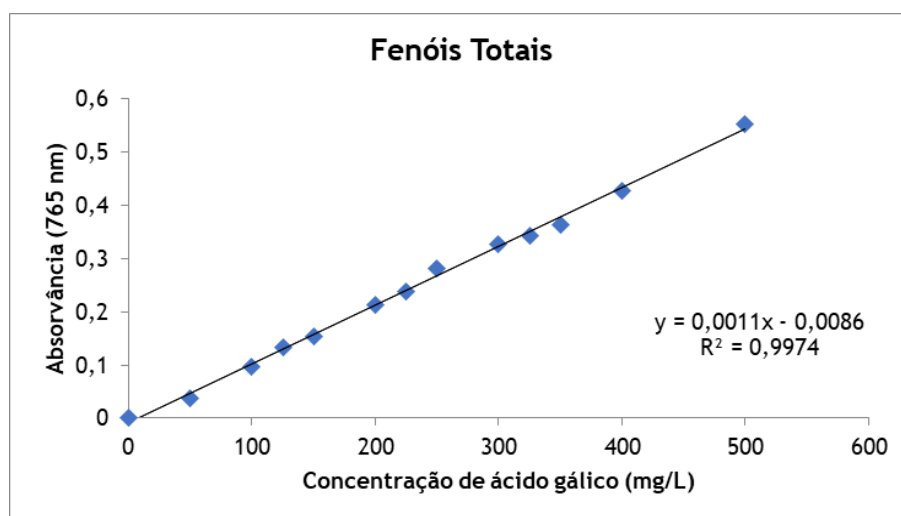


Figura 15: Curva de calibração do ácido gálico para determinação dos fenóis totais, obtida a partir da média das leituras das absorvências em triplicado.

Para a determinação dos fenóis totais nos extratos, procedeu-se como descrito anteriormente, substituindo os 50 μ L iniciais por 50 μ L de cada um dos extratos em metanol.

A quantidade de fenóis totais em cada um dos extratos foi calculada utilizando a equação da reta de calibração e é apresentada em miligramas de equivalentes de ácido gálico por gramas de matéria seca. Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.7. Determinação dos flavonoides totais

A determinação do teor de flavonóide totais presentes nas amostras foi feita utilizando o método - Método de cloreto de alumínio, através do procedimento proposto por (Pourmorad, Hosseinimehr, & Shahabimajd, 2006; Lucas, 2017) . Para tal foi necessário a elaboração de uma curva de calibração de quercetina.

Construção da reta de calibração

Diferentes concentrações de soluções metanólicas de quercetina foram preparado, para tal, foi preparada uma solução-mãe de quercetina em metanol, com a concentração de 200 μ g/mL. A partir desta foram reparadas diferentes soluções por diluição da solução-mãe, com diferentes concentrações: 12,5; 30; 50; 70; 100; 130 e 150 μ g/mL, respetivamente.

Num tubo de ensaio foram adicionados: 500 μ L de uma das soluções metanólicas referidas anteriormente, 1,5 mL de metanol, 0,1 mL de solução aquosa de cloreto de alumínio (10%), 0,1 mL de solução aquosa de acetato de potássio 1 M e 2,8 mL de água destilada. Deixou-se reagir 30 minutos à temperatura ambiente, com agitação intermitente, as absorvâncias das soluções preparadas foram media a 415 nm contra um branco. Usando um espectrofotômetro UV-Vis, modelo Evolution 160 (Thermo Fisher Scientific, Madison, EUA).

O branco foi preparado segundo o explicado anteriormente, substituindo-se os 500 µL de solução por 500 µL de metanol. O ensaio foi realizado em triplicado.

A partir destas leituras construiu-se uma reta de calibração da absorvância em função da concentração de quercetina (Gráfico 2).

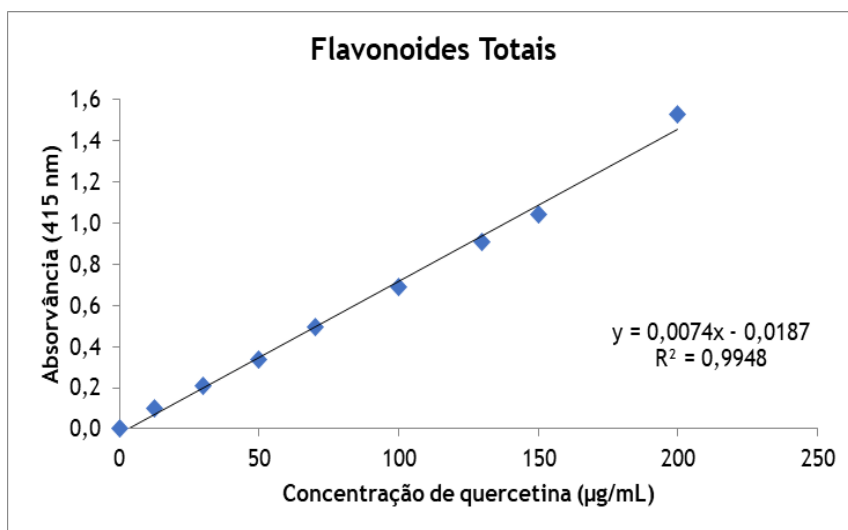


Figura 16: Reta de calibração da quercetina para determinação dos flavonoides totais, obtida a partir da média das leituras das absorvâncias em triplicado.

Para a determinação do teor de fenóis totais no extrato foram substituído os 500 µL da quercetina iniciais por 500 µL de uma solução do extrato em metanol e procedeu-se como explicado anteriormente.

Para calcular a quantidade de flavonoides totais presente no extrato utilizou-se a equação da reta de calibração da quercetina em metanol. O resultado é expresso em miligramas de equivalentes de quercetina por grama de matéria seca (mg EQ/g matéria seca). Os ensaios foram realizados em triplicado.

2.8. Atividades biológicas dos óleos essenciais e outros extratos de *Lippia multiflora* Moldenke

2.8.1. Avaliação das atividades anti-oxidante pelo método de DPPH

A atividade anti-oxidante dos extratos é medida em função da doação de hidrogénio ou na capacidade de eliminação de radicais por meio do método do radical do 2,2-difenil-1-picrilidrazilo (DPPH) como descrito por (Scherer & Godoy, 2009, Lucas, 2017), que é amplamente usado para descrever o poder antiradical de diferentes matrizes (Scherer & Godoy, 2009, Lucas, 2017).

Construção da reta de calibração

Foi preparada uma solução-mãe de DPPH em metanol, com a concentração de 0,217 mM e a partir desta, foram preparadas diferentes soluções por diluição com diferentes concentrações (Tabela 7).

Tabela 7: Concentrações das soluções metanólicas de DPPH utilizadas na construção da reta de calibração.

[DPPH] em mM	[DPPH] em mg/L
0,0108	4,25
0,0216	8,50
0,0432	17,00
0,0648	25,50
0,0864	34,00
0,1080	42,50
0,1296	51,00
0,1512	59,50
0,1739	68,43
0,1955	76,93
0,2160	85,00

Depois foram lidas as absorvâncias das soluções preparadas a 517 nm contra um branco constituído apenas por metanol, usando um espectrofotômetro UV-Vis, modelo Evolution 160 (Thermo Fisher Scientific, Madison, EUA). O ensaio foi realizado em triplicado.

A partir destas leituras construiu-se uma linha de calibração da absorvância em função da concentração de DPPH em mg/L (Gráfico 3) (Scherer & Godoy, 2009, Lucas, 2017).

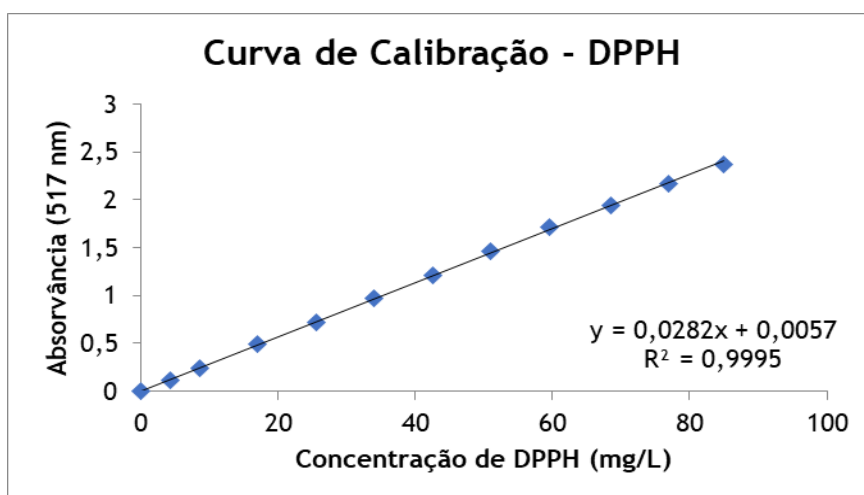


Figura 17: Reta de calibração obtida a partir da média das leituras das absorvâncias dos três ensaios.

Avaliação de atividade antioxidante

Para determinar a atividade antioxidante das nossas amostras foi necessário a preparação diária de três soluções de DPPH de concentrações 0,2000, 0,1242 e 0,0800 mM, por isso foi necessário pesar 0,0197g e dissolver em 250mL de metanol. As outras soluções foram preparadas a partir da diluição da solução mãe (Scherer & Godoy, 2009, Lucas, 2017).

Para as amostras foram preparadas soluções com concentrações 25, 50, 100, 150, 200 e 250 µg/mL, para isso, foram pesadas 0,0062g de amostra e foi dissolvida em 25mL de etanol, para obter a solução mãe com uma concentração de 250 µg/mL, as restantes soluções foram preparadas por diluição da solução mãe da amostra (Scherer & Godoy, 2009, Lucas, 2017).

Para cada extrato, 0,10 mL de amostra diluída com 3,90 mL de solução metanólica de DPPH nas três concentrações diferentes. Utilizar sempre um branco, em que se adiciona 0,1 mL de MeOH. As misturas reaccionais foram agitadas e incubadas durante 90 minutos no escuro a temperatura ambiente. Ler a absorvência a 517 nm utilizando espectrofotómetro Thermo scientific evolution.

Após a determinação das absorvências calculou-se a percentagem de inibição com base na fórmula seguinte:

$$\% I = \frac{Abs_0 - Abs_1}{Abs_0} \times 100$$

Onde Abs₀ é a absorvência do controlo aos 90 minutos e Abs₁ é a absorvência da amostra aos 90 minutos.

A concentração dos extratos responsáveis por 50% da inibição (IC₅₀) foi calculada a partir da linearidade obtida na representação gráfica da %I em função da concentração de amostra na célula do espectrofotómetro. Pela reta de calibração obteve-se a concentração de DPPH no controlo aos 90 minutos e a partir desta e da IC₅₀ é calculado o índice de atividade antioxidante (AAI), com a seguinte fórmula (Scherer & Godoy, 2009, Lucas, 2017):

$$AAI = \frac{[DPPH \text{ no controlo aos 90 minutos}] (\mu\text{g/mL})}{IC_{50} (\mu\text{g/mL})}$$

O valor de AAI obtido permitiu classificar a atividade antioxidante do extrato de acordo com as categorias da **Tabela 8**.

Tabela 8: Classificação de uma amostra quanto à sua atividade antioxidante

Atividade Antioxidante	AAI
Pobre	AAI < 0,5
Moderada	0,5 < AAI < 1,0
Forte	1,0 < AAI < 2,0
Muito Forte	AAI > 2,0

2.8.2. Atividades antibacterianas

2.8.2.1. Meios de Cultura

Nestes testes foram utilizados meios de cultura Muller Hinton agar (MH2-Ref. 43301; BioMérieux SA) (Figura 18). O meio MH2 é um meio que já se encontra preparado em placas e que possui 4 mm de espessura. Em alguns ensaios, procedeu-se a uma repetição em placas de vidro com meio preparado no momento do ensaio, Muller Hinton agar e garantindo uma espessura de 4 mm. Tal facto deveu-se à forte interacção que alguns óleos tiveram com o plástico das placas comerciais, derretendo e até perfurando a placa durante o período de incubação.

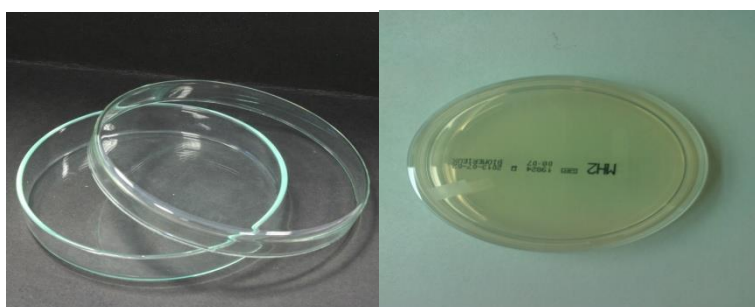


Figura 18 - Placas de vidro utilizadas para depositar o meio. Na direita, meios de cultura agar em placa, o meio utilizado (MH2).

2.8.2.2. Microrganismos teste

Os microrganismos usados nesta avaliação antimicrobiana foram reconstituídos no BR-Laboratório Ambiental e Alimentar Lda, provenientes da American Type Culture Collection (ATCC), distribuídos por *Culti-loops*® (OXOID LDA.) (Figura 19). Em questão, foram o *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923/Lote 902840), a *Escherichia coli* (ATCC 25922/Lote 931370) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853/Lote 931372) (mantidas entre 2-8°C). Estas estirpes permitem assim, facilmente, a obtenção de culturas padronizadas para teste.

Como mencionado anteriormente a escolha recaiu nos seguintes parâmetros, *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), representante da flora humana superficial, *Escherichia coli* (ATCC 25922) representante da flora intestinal, e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) uma bactéria ubíqua representativa do meio ambiente.

Como a partir de cada estirpe ATCC se podem realizar várias inoculações, foram efectuadas culturas puras (designadas Culturas mãe) (Figura 20) de cada estirpe ATCC a testar em placas com meio Muller-Hinton (MH2) que incubaram durante 24h e posteriormente foram armazenadas (2-8°C). As estirpes originais ATCC foram devidamente armazenadas.



Figura 19 - Estirpe ATCC, na direita a zaragatoa que traz a estirpe liofilizada na ponta.



Figura 20 - Culturas Mãe após incubação, da esquerda para a direita, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*.

2.8.2.3. Densidade do inóculo

Como a densidade do inóculo influencia o resultado dos ensaios, padronizou-se a quantidade de inóculo a ser utilizada, a fim de assegurar a reprodutibilidade analítica. Após recuperação das estirpes liofilizadas da ATCC, seguindo as instruções do fabricante para obtenção das placas mãe, inocularam-se a partir destas últimas, pelo método de estrias, três novas placas de MH2 (uma para cada microrganismo). Estas placas irão designar-se placas de trabalho, das quais se retirarão colônias para padronização. As placas mãe serão a fonte de todos os ensaios que se tenham que repetir, salvaguardando assim o uso das estirpes ATCC.

As placas de trabalho incubaram-se a 37 ± 1 °C durante 24 h. Retiraram-se algumas colônias isoladas do microrganismo a testar para soro fisiológico, de modo a obter uma turvação correspondente ao padrão de McFarland de 0,5 ($\cong 10^8$ UFC/ml, num comprimento de onda de 550 nm, T-74,9%, A-0,125).

As padronizações dos inóculos, na escala McFarland, foram medidas com auxílio de um aparelho para o efeito, DENSIMAT - Densitómetro de faixa entre 0,5 e 7,5 na escala de McF (Cód. 99234 BioMérieux) (Figura 21). O densitómetro é activado simplesmente pela colocação do tubo com a suspensão no compartimento de leitura. A densidade bacteriana é medida de imediato e é directamente proporcional à densidade da suspensão expressa em unidades de MacFarland (0,5 correspondente a 10^8 UFC/mL). De seguida, diluiu-se a suspensão de 10^8 UFC/mL para $\cong 10^6$ UFC/mL, adequada para testes com bactérias. Utilizou-se sempre como

solução de diluição soro fisiológico estéril (solução salina estéril a 0,85%). Todo este processo foi realizado numa câmara de segurança biológica e na presença de chama.



Figura 21 - Na esquerda fotómetro de medição da turvação pela escala McFarland para padronização de inóculos; na direita tubos com suspensões bacterianas.

2.8.2.4. Métodos de difusão em agar

A avaliação da actividade antimicrobiana foi realizada através do método de difusão em meio sólido agar, quer por método de cavidades cilíndricas (poços) com uma altura de 4 mm e diâmetro de 5 mm, quer pelo método do efeito de vapor. Estes métodos permitem-nos ter uma ideia da potencial actividade antimicrobiana do óleo essencial em estudo, através da leitura dos halos de inibição. Como controlos positivos, utilizaram-se os antibióticos penicilina na concentração de 0,05 mg/ml (acção contra Gram-positivos) e gentamicina na concentração de 10 mg/ml (acção de largo espectro). Como controlo negativo foi utilizado o DMSO.

2.8.2.4.1. Difusão em agar por perfuração de cavidades cilíndricas

A partir da suspensão inoculada com o microrganismo a testar, espalhou-se a mesma uniformemente com um swab (zaragatoa) estéril sobre a placa de agar MH2 (tendo o cuidado de eliminar o excesso de inóculo). Deixou-se em repouso durante 15 minutos, de modo a que o meio de cultura absorvesse o inóculo. De seguida, procedeu-se à realização dos poços com o dispositivo adequado, foram preenchidos com 70 µL dos óleos essenciais, do controle negativo e do controlo positivo (Figura 22).

Após um período de repouso de 15 minutos à temperatura ambiente, as placas foram incubadas a uma temperatura média de 37°C durante 18-24h. Após este período de incubação, foram anotados os resultados. Todo este processo foi realizado em condições de esterilidade.



Figura 22 - Da esquerda para a direita, utensílio para realização de poços, aspecto de placa inoculada *S. aureus* com poços contendo as fracções de óleo a testar antes de incubar, aspecto da placa de controlos *E. coli* antes de incubar.

2.8.2.4.2. Difusão em agar por efeito de vapor em placa

O protocolo prático foi realizado do seguinte modo: espalhou-se, uniformemente, com uma zaragatoa estéril, a suspensão do microrganismo a testar sobre a placa de agar. Deixou-se em repouso durante 15 minutos de modo a que o meio de cultura absorvesse o inóculo. De maneira a realizar um teste comparativo (volume de óleo a testar) com o método de difusão em agar, adicionou-se 70 μ l do óleo no centro da tampa da placa de Petri a uma distância de 1 cm do agar inoculado. Inverteu-se a placa e deixou-se a incubar a uma temperatura média de 37 °C durante 18-24 h. Ao fim do período de incubação, anotou-se o efeito do óleo no crescimento bacteriano. Este processo foi realizado em condições estéreis.

Capítulo III - Resultados e Discussão

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos no estudo fitoquímico dos óleos essenciais e do extrato de n-hexano das folhas da *Lippia multiflora* Moldeke de Angola e nas avaliações biológicas, por determinação da atividade antibacterianas dos óleos essenciais e atividade antioxidante dos extratos aquosos das folhas e flores da mesma plantas.

3.1. Extração dos óleos essenciais.

Os óleos essenciais foram extraídos das folhas e flores da *Lippia multiflora* Moldenke, recolhida em duas províncias de Angola, dividida em nove (9) recolhas, nomeadamente de R1 à R9. As duas primeiras amostras R1 e R2 foram recolhidas em Ndalatando numa única fase em plena floração, R3, R6 e R9 foram recolhidas na Província do Zaire no município do Tombonko em três fases depois, antes e em plena floração e R4, R5, R7 e R8 foram recolhidas na província do Zaire no município de Mbanza Kongo, esta foi colhida em duas fases distintas antes e em plena floração.

Através da hidrodestilação num aparelho de Clevenger durante 2h, extrairam-se os óleos essenciais, depois calculou-se os rendimentos dos volumes obtidos em cada recolha, a partir da massa de folhas hidrodestiladas como ilustra a tabela a seguir.

Tabela 9 : Volumes e rendimento dos óleos essenciais.

Epoca	Recolha	massa da planta em g		Volume do óleo em mL		Rendimento do óleo (%)	
		Partes da planta		Partes da planta		Partes da planta	
		Folha	Flores	Folha	Flores	Folha	Flores
Antes da floração	R4	316	x	1,37	x	0,44	x
	R5	400	x	4	x	1,00	x
	R6	400	x	5	x	1,25	x
	R7	229	x	3,9	x	1,70	x
Em plena floração	R1	200	x	1,5	x	0,75	x
	R2	200	x	1,7	x	0,85	x
	R8	127	77	1,5	4	1,18	5,19
	R9	400	105	4,5	4	1,12	3,80
Depois da floração	R3	400	x	4	x	1,00	x

Analisando os rendimentos obtidos na extração de óleo essencial de todas as amostras concluímos que as flores produziram mais óleo que todas as folhas recolhidas antes, em plena e depois da floração

3.2. Composição química do óleo essenciais da *Lippia multiflora* Moldenke de Angola

Após a análise dos cromatogramas e espectros de GC-MS, foram identificados os compostos de cada uma das amostras e os mesmos foram postos numa tabela com as suas respetivas percentagens como indica a tabela a baixo

Tabela 10: Composição química dos óleos essenciais da *Lippia multiflora* Moldenke recolhida em 3 regiões de Angola

Compostos	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8 FOLHAS	R8 FLORES	R9 FOLHAS	R9 FLORES
	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%	%
Sabineno	Tr	Tr						Tr		Tr	Tr
p-cimeno	10,39	1,57								0,86	1,20
Limoneno	32,83	13,33	11,16	37,15	40,64	22,62	39,63	40,70	33,29	18,68	25,95
2,3-epoxigeranial	Tr										
2,3-epoxineral	4,04										
Neral	25,33	24,35									
Citral	21,72	28,34									
Canfeno											Tr
Carvacrol										11,49	
α -cedreno	Tr										
Aromadendreno	Tr	Tr									
γ -muuroleno	Tr	Tr									
Elemol	5,69	14,64									
Nerolidol	Tr										
oxido de humuleno								0,31		Tr	
Espatulenol	Tr										
Isoespatulenol	Tr										

α -fellandreno		Tr					Tr				
α -tujeno		Tr								Tr	Tr
α -pineno			Tr	Tr	Tr	Tr	Tr	0,18	0,22	0,37	Tr
Mirceno			2,44	3,44	2,05	3,01	6,78	1,36	4,25	3,86	4,86
Ipsenona			2,68	19,38	7,59	4,46	7,31	1,63	3,75	6,50	4,74
Vervenona			55,87								
α -terpineol			Tr			Tr			Tr	0,58	
Ocimenona			18,92			14,84				2,39	8,35
β -cariofileno		0,49	2,38	1,50	2,65		2,31	2,71	2,06	2,26	1,19
α -humuleno			Tr	0,88	1,54	1,33	1,44		1,22		0,18
β -farneseno			Tr			1,32		1,90		3,03	Tr
germacreno D		6,88	Tr	Tr	Tr	0,62			Tr	0,54	Tr
Oxido de cariofileno	Tr		Tr	0,47	0,57	0,39	0,86	2,27	0,50	1,38	Tr
γ -terpineno		4,74								0,37	1,45
α - terpineno											Tr
Linalol		Tr					0,74	0,63	0,38	0,62	Tr
Borneol		Tr									
Geraniol		0.23									
β -cubeneno		Tr									
β -elemeno		Tr									
Zingibereno		0,53									
δ -cadinol		1,00									
Guaiol		1,18									
Hediacariol		0,80									
β -copaen-4 α -ol		Tr									
Dihidrotagetona				Tr							

cis-tagetona			0,87	9,88	2,16	2,82	2,45	1,72	8,45	2,15	0,66
trans-tagetona				12,34	10,53	7,89	6,56				
Piperitenona			Tr	13,99	28,00	16,36	28,73	34,83	34,25	11,58	15,54
p-menta-trans-2,8-dien-1-ol					1,83	0,76	0,69	4, 29	7, 11	0,38	Tr
Isopiperitona					1,73				1,03		
Isopiperitenona								1,14			
acetato de trans-carveilo			Tr		0,69		0,59	0,98			
cetona artemisia						20,31				28,34	
Vervenol							1,90				
oxido cis-limoneno									tr,		
Carvona							tr	0,86	0,41		
Cis - Carveol								Tr	Tr		
Timol										1,30	1,40
Acetato de timol										1,19	2,01
Acetato de cis - carvilo									0,74		
Trans - carveol								2,07	1,07	0,40	Tr
acetato de carveilo									1,24		
% total identificado	99,44	98,23	94,32	99,03	99,98	96,72	99,99	97,58	98,97	98,27	67,53
Total não identificado	Tr	1,55	5,67	0,97						0,31	
Mistura	Tr					0,65		2,42		1,40	Tr
% do óleo	0,75	0,85	1,00	0,44	1,00	1,25	1,70	1,18	5,19	1,12	3,80

Fundamentando os resultados apresentados na tabela acima no que se refere a composição química dos óleos essenciais da *Lippia multiflora* Moldenke, constata-se que:

O limoneno é o único monoterpeno que aparece em todas as amostras da *Lippia multiflora* Moldenke, recolhida em Anngola. O limoneno é o composto maioritário na composição química dos óleos essenciais de Angola. O limoneno, 1-metil-4-prop-1-en-2-ilciclo-hexeno com fórmula molecular $C_{10}H_{16}$, é um monoterpeno monocíclico presente na composição dos óleos essenciais de diversas espécies de plantas aromáticas, dentre as quais, encontram-se a *Lippia alba* e *Artemisia dracunculus*, além de ser encontrado nos óleos essenciais dos cítricos como limão, laranja e tangerina (AMARAL, *et al.*, 2007), grande quantidade de limoneno é isolado do nos frutos de citron Finge, espécies de Salvia , frutas *Citrullus colocynthis* , *Citrus medica* L. cv. Diamant, *Adansonia digitata* , *Curcuma longa* (Murali & Saravanan, 2012). Essas plantas têm sido usadas na medicina tradicional para o tratamento de diabetes, anti-hiperlipidemia em ratos diabéticos induzidos por estreptozotocina, câncer, diarreia, dor de cabeça, hipertensão, inflamação e reumatismo. (Murali & Saravanan, 2012).

Diversos estudos têm sido realizados para demonstrar os efeitos desse monoterpeno. O limoneno pode ser eficaz no tratamento da asma brônquica devido ao seu efeito anti-inflamatório que, provavelmente, ocorre pela inibição de citocinas, produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) e inativação da migração de eosinófilos (Hirota, *et al.*, 2010). Além disso, o limoneno apresenta atividade quimiopreventiva para câncer de mama, pulmão, pele e fígado (Crowell, 1997).

A percentagem de limoneno encontra-se significativamente maior nas amostras recolhidas no municípios de Mbanza Kongo, e no Ndalatando, quando comparado com as do município do Tomboco ocupando uma percentagem máxima de 40,70 para as amostras de Mbanza kongo, 32,83 para as amostras de Ndalatando e 25,95 para as amostras do Tomboco. Comparando o teor de limoneno nas amostra antes em plena floração e depois da floração nas amostras, constata-se que a percentagem de limoneno é ligeiramente elevada na amostra recolhida em plena floração cobrindo 40,72% que nas amostras recolhidas antes da floração que tem uma valor máximo de 40, 64% nas amostras do município de Mbanza Kongo, e que parece ser o contrário nas amostra do município do Tomboco em que a percentagem de limoneno é maior na amostra recolhida antes da floração que na amostra recolhida em plena floração cobrindo uma percentagem de 22, 62% nas amostra recolhida antes da floração, 18,68% e 25,95% nas amostras recolhidas em plena floração (folhas e flores) e 11,16% na amostra recolhida depois da floração.

Outra comparação em relação ao teor limoneno nos óleos essenciais é o grau de humidade, onde as amostras mais secas produziram mais limoneno em relação às amostras húmidas em todas as mostras estudadas.

Comparando nas folhas e nas flores, o teor de limoneno é maior nas amostras R8 e R9, vimos que a amostra recolhida no Wolongo o teor de limoneno é mais elevado nas folhas que nas flores o que é o contrário de amostra recolhida no Tomboco.

Uma novidade na composição química dos óleos essenciais da *Lippia multiflora* Moldenke recolhida nos dois municípios da província do Zaire em Angola, é a presença da piperitenona ou 3-metil-6-(propan-2-iliden)ciclohex-2-en-1-ona como segundo composto maioritário. Este compostos nunca tinha aparecido na composição química do óleo essencial da espécie *Lippia multiflora* Moldenke como descrito por (Kunle & Egharevba , 2012), este só apareceu na espécie *Lippia javanica* e *Lippia Adoensis* Host como descrito por (Manenzhe, Potgieter, & Ree, 2004, Pascual, Slowing, Carretero, Mata, & Villar, 2001)

A piperitenona apareceu em quantidade maior nas amostras recolhidas no município de Mbanza Kongo (no Wolongo) nas folhas e nas flores na época de plena floração que antes da floração com 34,84% nas folhas e 34,25% nas flores, enquanto que antes da floração, as folhas secas (R5 e R7) apresentaram mais teor de piperitenona com 28,00 % e 28,73 % respetivamente e 13, 99% na amostra húmida.

Nas amostras recolhidas no município do Tomboco, constatamos o contrário que aconteceu nas amostras do município de Mbanza Kongo onde o teor da piperitenona é mais elevado na amostra recolhida em plena floração, nestas o teor de piperitona é mais nas amostras recolhidas antes da floração com 16,36% da sua abundância, 11,58% nas folhas e 15,54% nas flores na amostra recolhida em plena floração.

A Ipsenona ou 2-metil-6-metilidenoct-7-en-4-ona é o outro monoterpeno que aparece numa percentagem significativa nas amostras do Wolongo recolhida antes da floração (R4, R5 e R7) com 19,38%, 7,59% e 7,31%, respetivamente e o mesmo não se apresenta numa percentagem mais significativa nas amostras recolhida em plena floração, com 1,63% nas folhas e 3,75% nas flores. Comparando com as amostras recolhidas no Tomboco, as amostras recolhidas na época de plena floração (R9), apresenta mais teor de Ipsenona que nas amostras recolhidas antes e depois da floração.

O R3 é a única amostra recolhida depois da floração no município do Tomboco na província do Zaire. Na composição do óleo essencial desta amostra constata-se que o composto maioritário é a vervenona com uma percentagem total de 55,87%, seguido pela Ocimenona com um valor percentual de 18,92 e por limoneno com uma percentagem de 11,16 %, ipsenona com 2,68%, β - cariofileno com 2,38% e mirceno com 2,44%.

Nas amostras recolhidas no Tomboco antes da floração (R6) apresenta mais teor de ocimenona, com 14,83 % e nas flores da amostra R9 com 8,35%.

Os isómeros da tagetona aparecerem apenas nas amostras recolhidas antes da floração são a cis e trans tagetona, onde trans-tagetona apresentou-se numa percentagem mais elevada do que a cis-tagetona em todas as amostras.

O β -cariofileno é o sesquiterpeno que aparece quase em todas amostras dos óleos, também o óxido de cariofileno e o α -pineno, mas em percentagens não significativas.

O carvacrol apresentou-se apenas no óleo da amostra recolhida no Tomboco em plena floração com 11,49% apenas nas folhas.

O neral e citral são outros monoterpenos que só apresentam-se nas amostras recolhidas em Ndalatando na província do Cuanza Norte, R1 e R2 onde se apresentam como segundo constituinte mais abundante do óleo essencial desta amostra com uma percentagem de 25,33 de neral e 21,72% de citral para R1 e 24,35 % de neral e 28,34 % de citral para o R2, apesar de que as percentagens, tendem a variar com o grau de humidade das amostras.

O p-cimeno se apresenta numa percentagem significativa apenas duas amostras de Ndalatandu é que em outras amostras, não se apresenta.

Também o elemol é um sesquiterpeno que só apresenta-se exclusivamente nas amostras recolhidas em Ndalatandu (R1 e R2) em que o seu teor nas duas amostras também variou com o grau de humidade, sendo a mais húmida produziu mais elemol com uma percentagem de 14,64% em relação à menos húmida que só produziu 5,69%

Outro sesquiterpeno que apareceu apenas no R2, ou seja, na amostra mais húmida é o Germacreno D com uma percentagem de 6,88%. Também na amostra mais húmida apareceu outro monoterpeno numa percentagem observável é o γ -terpineno com uma percentagem de 4,74%.

Comparando a composição química dos óleos essenciais da *Lippia multiflora* Moldenke recolhida em Angola com o que existe na literatura consultada, concluímos que a *Lippia multiflora* Moldenke de Angola tem uma composição muito diferente com o que se encontra na literatura, que na sua maioria é composto de 1,8 -cineol. (Kunle & Egharevba , 2012).

Quimiotipos

Um quimiotipo é derivado de uma planta que tem a mesma aparência e características visuais, mas é quimicamente composta por diferentes componentes (Clarke, 2008). Um quimiotipo de óleo essencial tem propriedades terapêuticas diferentes devido à presença de diferentes componentes químicos (Clarke, 2008)

Tabela 11: Quimiotipos dos óleos essenciais da *Lippia multiflora* Moldenke recolhida em 3 regiões de Angola $\geq 3\%$

Recolha	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8(1)	R8(2)	R9(1)	R9(2)
Quimiotipos	Limoneno(32,89), Ner al(25,33), Citral (21,72), p-cimeno (10,39), Elemol (5,69) 2,3 epoxineral (4,04)	Citral(28,34), Neral (24,35), Elemol(14,64) Limoneno(13,33), Germacreno D (6,8), γ -terpineno (4,70)	Verveno na (55,87) Ocimeno na (18,92) Limoneno (11,16)	Limoneno (37,15) Ipsenona(19,38), Piperitenona (13,99), Trans-tagetona (12,34) Cis-tagetona (9,88)	Limoneno(40,64) Piperitenona (28,00), Trans-tagetona (10,53), Ipsenona (7,59).	Limoneno(22,62) Cetona artemisia(20,31), Piperiteno na(16,36), Ocimenona (14,84), Trans-tagetona (7,89), Ipsenona(4,46)	Limoneno(39,63) Piperitona(28,73), Ipsenona(7,31) Mirceno (6,78) Trans-tagetona (6,56)	Limoneno(40,70) Piperitona (34,83) p-mentatrans - 2,8 - dien - 1-ol (4,29)	Limoneno (33,29) Piperitona (34,25) Cis-tagetona (8,45) p-mentatrans-2,8-dien-1-ol(7,11) mirceno (4,25) Ipsenona (3,75)	cetona artemisia (28,34) Limoneno(18,68) Piperitenona (11,58) Cravacrol (8,45) p-mentatrans-2,8-dien-1-ol (7,11), mirceno (4,25) , β -farneseno (3,03)	Limoneno (25,95) Piperitenona (15,54) ocimeno na(8,35), mirceno (4,88) Ipsenona (4,74)

3.3. Análise de espectros e identificação dos compostos químicos das frações da cromatografia (Flash) do extrato de n-hexano das folhas da *Lippia multiflora* Moldenke de Angola

3.3.1. Análise de das frações da cromatografia de R1

Depois, da sua purificação por cromatografia, a análise espectroscópica revelou grandes misturas nas frações C2L1 - 6, C2L1 - 7, C2L1 - 8 e C2L1 - 9, para identificação dos compostos químicos na mistura, as mesmas foram analisadas por GC-MS revelando a seguinte composição.

Tabela 12: Composição química das frações cromatografadas do R1 depois de passar no GC-MS

Frações	C2L1 - 6	C2L1 - 7	C2L1 - 8	C2L1 - 9
Compostos				
	%	%	%	%
1-acetil-2-metil-1-ciclohexanol	4,90			
neral	11,47%	17,31	9,85	9,03
citral	7,93	3,44	11,42	37,02
epóxi-linalol	9,58	21,33	24,89	
epóxi-linalol isomero	7,58	19,79	21,09	
2,3-epoxineral				
elemol				3,79
neofitadieno				0,31
6,10,14-trimetil-2-pentadecanona				0,77
ácido hexadecanóico				0,68
fitol				6,76
carvenolida		tr		
neofitadieno				0,31
neofitadieno isomero				1,15
Total identificado	41,46	61,87	67,25	59,82
Total não identificado	30,40	24,41	10,43	36,12
Mistura	28,12	11,46	21,09	0,86

Dos resultados obtidos pela análise feita das frações acima referidas, vimos que nestas frações, temos vários componentes voláteis, que foram extraídos por n-hexano que fazem

parte dos óleos essenciais, daí, podemos concluir, que o extrato de hexano tem na sua maioria compostos voláteis, que ainda também fazem parte da composição química do óleo essencial. Onde o citral e o Neral, e o epoxilinalool são os compostos com maior percentagem em cada fração, o epoxi linalol e o seu isómero não se fizeram presente na fração MNC2L1 - 9, na fração C2L1 - 6 apareceu o 1-acetil-2-metil-1-ciclohexanol com 4,90 % da sua abundância, o fitol apareceu na fração C2L1 - 9 com 6,76 %, e o elemol na fração C2L1 -9, com 3,79 %.

Olhando para os compostos que saíram nas diferentes frações do extrato de hexano desta recolha, podemos concluir que no extrato de hexano também contém compostos voláteis ou que formam parte dos óleos essenciais.

3.3.2. Análise de das frações do extrato de n-hexano a quente de recolha 3 (C1L2)

Para esta cromatografia apenas a fração C1L2 - 2, que parecia ser limpa, foi injetada no GC - MS, para sua verificação, daí, identificou-se apenas dois compostos e como composto principal desta fração o 2-hidroxibezoato de metilo ou salicilato de metilo com 88,84%, seguida da cetona artemisia com 11, 16%, que são também componentes dos óleos essenciais.

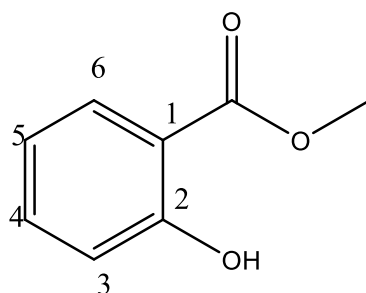


Figura 23 : 2-hidroxibezoato de metilo ou salicilato de metilo, composto maioritário

3.3.3. Análise e Identificação espectroscópica das frações cromatográfica da recolha 5 (C3L5)

3.3.3.1. Análise e Identificação espectroscópica das frações cromatográfica C3L5 - 3

Depois da Cromatografia em coluna flash (em gel de sílica) do extrato de hexano, utilizando um gradiente de eluição de hexano: acetato de etilo como fase móvel produziu uma fração esverdeada, a qual foi analisado por espectroscopia de infravermelho (IV), de massa (MS), e de ressonância magnética nuclear (RMN) de protão e de carbono 13, e os bidimensionais COSY, HSQC, HMBC.

O espectro de massa revelou o pico do ião molecular em m/z 150 uma indicou a presença de uma substância com uma fórmula molecular provável C₁₀H₁₄O.

bandas dos grupos funcionais do composto 1 no IV.

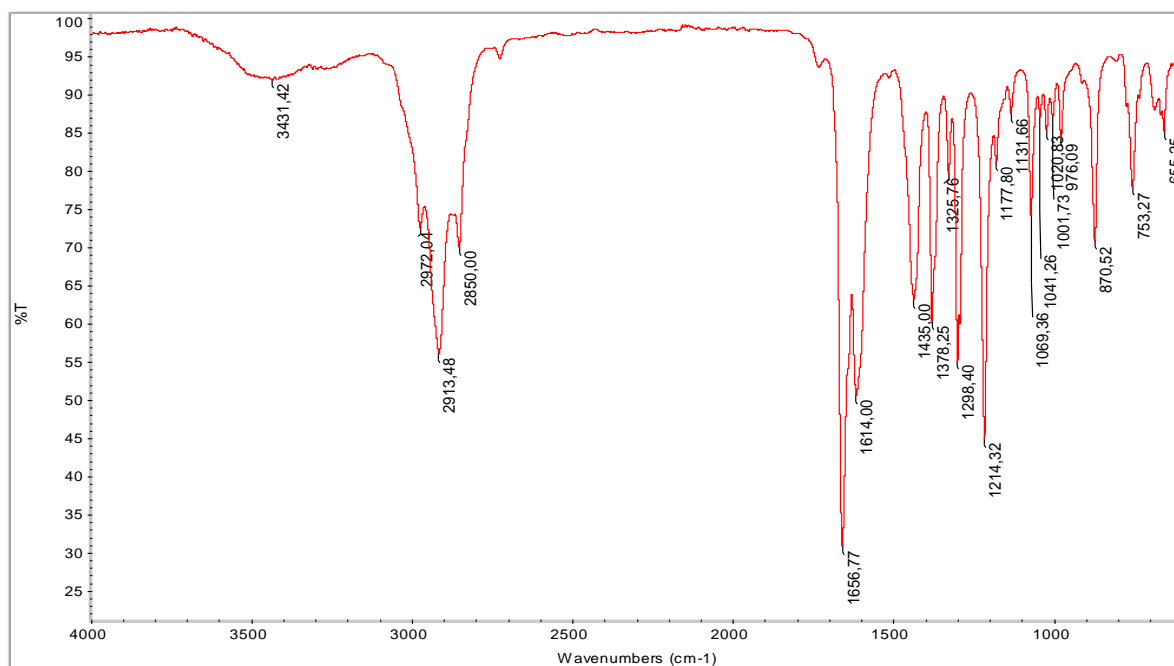


Figura 24: Espectro de infravermelho da fração C3L5- 3

Analisando o espectro de infravermelho do composto purificado, vimos que na região de região 3.080 cm^{-1} temos uma banda característica de uma ligação carbono da dupla ligação (Csp^2) com hidrogénio.

A $2913,48\text{ cm}^{-1}$ temos uma banda alongamento de uma ligação carbono tetraédrico (CH_3 e $\text{CH}_2\text{ sp}^3$) com hidrogénio, temos uma banda a $1656,8\text{ cm}^{-1}$ característica de um carbonilo (C=O) de uma cetona e por fim a 1614 cm^{-1} temos uma banda característica de ligação dupla carbono - carbono (C=C).

Tabela 13: Desvios químicos dos hidrogénios, Multiplicidade e J em Hz e dos carbono no RMN da fração C3L5 - 3

Posição	RMN de ¹ H (δH em ppm, J em Hz)	RMN de ¹³ C (δC em ppm)	Correlações HSQC	Correlações HMBC	Correlações COSY
1	-----	190,5	-----	-----	
2	5,38 (q, J =1,5, 1H)	128,4	H(5,38 ppm)-C 2	H(5,38 ppm): C-4 C-6 ? C-10	
3	-----	159,0	-----	-----	
4	1,84 (t, J =6,5, 2H)	31,3	H(1,84 ppm) - C4	H(1,84 ppm): C-3 C-5 C-6 C-10 ?	H-4 - H-5
5	2,19 (t, J =6,5, 2H)	27,5	H(2,19 ppm) - C5	H(2,19 ppm): C-1 C-3 C-4 C-6 C-7	H-5 , H- 4
6	-----	128,3	-----	-----	
7	-----	141,6	-----	-----	
8	1,62 (s, 3H)	22,3	H(1,62 ppm) - C8	H(1,62 ppm) : C-6 C-7 C-9	
9	1,40 (s, 3H)	22,0	H(1,40 ppm) - C9	H(1,40 ppm): C-6 C-7 C-8	
10	1,46 (s, 3H)	23,2	H(1,46 ppm)-C10	H (1,46 ppm): C-2 C-3 C-4 ?	

No Espectro de RMN de ¹H mostrou no total seis sinais dos quais: três sinais de metilo a 1,62 ppm correspondente três hidrogênio da posição 8(H-8) , a 1,40 ppm temos um singlete correspondente três hidrogénios da posição 9 (H-9) e a 1,46 ppm também um singlete correspondente a três hidrogénios da posição 10 (H-10), dois sinais de metileno, um tripleto a 1,84 ppm correspondentes a dois hidrogénios da posição 4 (H-4) e outro tripleto 2,19 ppm correspondente aos dois hidrogénios da posição 5 (H-5), e um quarteto corresponde o hidrogénio da posição 2(H-2) a 5,38 ppm o mais desblindado por influencia de electrões π da dupla ligação.

No espectro de RMN de ^{13}C temos os DEPTs 90 e 135 e o espectro de carbono total, analisando o DEPT 135, observamos 6 sinais, dos quais quatro sinais positivos e dois sinais negativos. Sendo 3 sinais mais blindados correspondentes aos três carbonos metílicos (CH_3), ordenados da seguinte maneira a 22,3 ppm temos um sinal que corresponde ao C-8, a 22,0 temos um sinal que corresponde ao C-9 e a 23,2 ppm temos um sinal que corresponde ao C-10, um sinal a 128,44 ppm, sinal este que corresponde a um grupo metino (CH), do C-2, em que este foi o único sinal observado no DEPT 90, sendo nele aparece apenas os carbonos do metinos, os dois sinais negativos, observados no DEPT 135, correspondem aos carbonos metilénicos (CH_2), a 27,52 ppm temos o sinal correspondente ao C-5 e a 31,33 ppm temos o sinal correspondente ao C-4.

Os carbonos quaternários não aparecem nos DEPT 135 e 90, aparecem apenas no espectro de carbono total. Analizando o espectro de carbono total observamos quatro carbonos quaternários a 128,35 ppm temos sinal correspondente ao C-6, a 141,63 ppm temos um sinal correspondente ao C-7, a 159,04 temos um sinal que corresponde ao carbono da posição 3 e a 190,47 ppm temos um sinal de um grupo carbonilo característico de uma cetona (C-1).

Vendo e analisando as correlações nos espectros bidimensionais (COSY, HSQC e HMBC), vimos que:

o espectro de HSQC permite-nos analisar a correlação direta entre os prótons e os carbonos dentro da molécula, permitindo a atribuição dos prótons aos carbonos a que pertencem. Com a análise deste espectro, concluímos que, o próton 2 a 5,38 ppm pertence ao carbono 2, os prótons 4 a 1,84 ppm pertencem ao carbono 4, os prótons 5 a 2,19 ppm pertencem ao carbono 5 da molécula, os prótons situados 8 a 1,62 ppm pertencem ao carbono 8, e os prótons 9 situados a 1,40 ppm pertencem ao carbono 9 e por fim os prótons 10 situado a 1,46 ppm pertencem ao carbono 10 a molécula dados apresentados na tabela 13.

No espectro de correlação HMBC permite analisar as correlações dos prótons com os carbonos localizados a duas e três ligações.

Analisando o espectro de HMBC, vimos que o próton 2 a 5,38 ppm correlaciona-se com C-4, C-6 e C-10 da molécula, os prótons 4 a 1,84 ppm correlacionam-se com C-3, C-5, C-6 e C-10 da molécula, os prótons 5 a 2,19 ppm estão em correlação com C-1, C-3, C-4, C-6 e C-7, os prótons 8 a 1,62 ppm correlacionam-se com C-6, C-7 e C-9, os prótons 9 a 1,40 ppm correlacionam-se com C-6, C-7 e C-8 e por fim os prótons 10 a 1,46 ppm correlacionam-se com C-2, C-3, C-4 e com carbono 3. A tabela 13 permite visualizar de uma forma resumida os dados de RMN de próton, de Carbono - 13 e as correlações HSQC e HMBC do composto. Analisando o espectro de COSY, sendo este que ilustra o acoplamento direto Próton - próton, vimos, os H-4 desdobram-se com os H-5, e os H-5 na sua vez também se desdobram com os H-4.

A estrutura correspondente aos dados espectroscópicos acima comentados é:

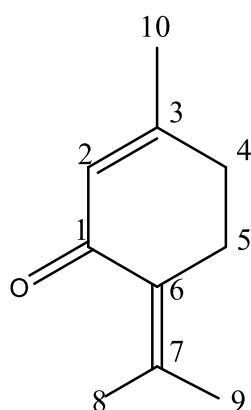


Figura 25: Estrutura da 3-metil-6-(propan-2-iliden)ciclohex-2-en-1-ona

Através desses dados espectroscópicos foi possível determinar a estrutura do composto, também é de salientar que este composto, existe noutras espécies de *Lippia*, como na *Lippia javanica* (Manenzhe, Potgieter, & Ree, 2004), mas segundo a literatura consultada durante a elaboração deste trabalho este composto nunca foi isolado na *Lippia multiflora* Moldenke esta é a primeira vez que este composto é isolado da *Lippia multiflora*.

3.3.3.2. Análise e Identificação espectroscópica das frações da cromatografia C3L5 -9

Na fração (C3L5 - 9) também fo isolado o composto a baixo representado, baseando -se nos seus espectros de IV e de RMN de ^1H e de ^{13}C .

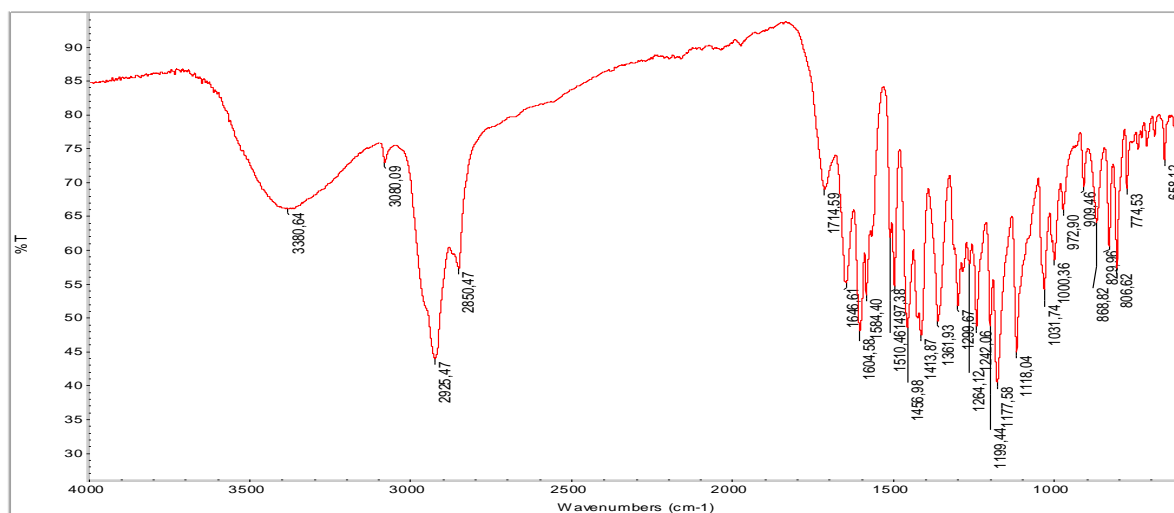


Figura 26: Espectro de infravermelho de fração C3L5 - 9

Analisando o espectro de infravermelho (IV) verificamos que na região de $3380,64\text{ cm}^{-1}$ uma banda que corresponde a um grupo OH ligado por ponte de hidrogénio, na região entre $3080,09\text{ cm}^{-1}$ uma banda característica de uma ligação dos carbono sp^2 - hidrogénio, na região de $2925,47\text{ cm}^{-1}$ uma banda característica de uma ligação carbono sp^3 - hidrogénio, entre

1714,59 cm^{-1} uma banda correspondente a carbonilo da cetona (C= O), na região 1646,61 e 1604, 58 cm^{-1} temos uma banda correspondente a uma ligação dupla carbono - carbono (C=C) e por fim entre 1290 à 1264 cm^{-1} bandas corespondentes às ligações carbono - oxigénio (C-O-) dos alquil éteres.

Tabela 14: Desvios químicos dos protões e de carbonos no RMN da fração C3L5 - 9

Posição	RMN de ^1H (δH em ppm e J em Hz)	RMN de ^{13}C (δC em ppm)
1	-----	-----
2	-----	164,1
3	6, 53 (s, 1H)	104,0
4	-----	182,7
5	-----	153,0
6	-----	132,0
7	-----	158,7
8	6,48 (s, 1H)	90,6
9	-----	153,2
10	-----	106,3
1'	-----	123,5
2' e 6'	7,78 (d, J= 9,0Hz, 1H)	128,0
3' e 5'	6,95 (d, J = 9,0Hz, 1H)	143,5
4'	-----	162,6
6- OCH_3	3,92(s, 3H)	60,8
7- OCH_3	3,96(s, 3H)	56,3
4' - OCH_3	3,82(s, 3H)	55,4

O espectro de RMN de ^1H , exibiu no total 7 sinais dos protões nos quais: três sinais entre 3,82,3,92 e 3,96 ppm, três singletos correspondentes aos três grupos metoxilos ligados aos anéis, aromáticos que são 9 protões sendo a 3,82 ppm um singlete correspondente ao protões 4' - OCH_3 a 3,92 ppm outro singlete, que correspondem aos protões 6- OCH_3 , e a 3,96 ppm temos outro singlete correspondente a um 7- OCH_3 , entre 6,48 ppm, temos um singletos correspondente a um protão, a 6,53 ppm temos um singlete, de um protão H-3, a 6,95 ppm temos um dubleto correspondente aos protões equivalentes H-3' e H-5', por fim a 7,78 ppm um outro dubleto correpondente aos dois protões equivalentes, os protões H-2' e H-6',

No espectro de RMN de ^{13}C temos os DEPTs 90 e DEPT 135 e o espectro de carbono total, Analizando o DEPT 135, obeservamos 7 sinais, dos quais todos positivos. Sendo todos sinais um pouco desblindados correspondentes aos três carbonos metílicos(CH_3) dos grupos metoxilos ligados aos carbonos do grupos aromaticos., ordenados da seguinte maneira a 55,4 ppm temos um sinal que corresponde ao Carbono 4' - OCH_3 , a 56,30 ppm temos um sinal que corresponde ao Carbono do grupo metoxilo ligado ao carbono 7 (7- OCH_3) e a 60,88 ppm temos um sinal que corresponde ao Carbono do grupo metoxilo ligado ao carbono 6 (4' - OCH_3

Je quatro sinais correspondentes a 6 carbonos terciários (CH), a 128,04 ppm, sinal este que corresponde a dois carbonos metino(CH) nomeadamente os carbonos equivalentes 2' e 6', em seguida temos a 143,5 ppm também dois carbonos metínicos correspondentes aos carbonos equivalentes 3' e 5', a 104,08 ppm, também um um carbono terciário correspondente ao carbono 3, carbono da dupla ligação, que não dos anel aromático, a 90,61 ppm o último carbono terciário correspondente ao carbono 8, todos carbonos terciários foram confirmados no DEPT 90, sendo nele aparecem apenas os carbonos dos metinos ou seja os carbonos terciários.

Os carbonos quaternários não aparecem nos DEPT 135 nem no DEPT 90, apenas aparecem no espectro de carbono total. Analizando o espectro de ^{13}C total observamos nove sinais de carbonos quaternários, ordenados nas seguintes zonas: a 106,31 ppm temos sinal de um carbono correspondente ao carbono 10, a 123,52 ppm temos um sinal de um carbono correspondente ao carbono 1', a 132,06 ppm temos um sinal que corresponde ao carbono 6, que é um dos átomos ligado com oxigénio do grupo metoxilo, a 153,03 ppm temos um sinal de um carbonilo correspondente ao carbono 5, carbono este ligado ao grupo hidróxilo, o carbono com desvio químico 153,26 ppm, corresponde ao carbono 9, um carbono além de fazer parte do núcleo aromático, mas também a sua desblindagem provem pelo fato de estar ligado diretamente ao oxigénio, a 158,77 ppm, temos um sinal correspondente ao um carbono ligado ao grupo metoxilo e este carbono é carbono 7, na zona de 162,64 ppm temos um carbono de um núcleo aromático, e que o mesmo está ligado ao outro grupo metóxilo, este carbono é o carbono 4', a 164,10 ppm temos um sinal de um carbono mais desblindada pelo efeito da eletronegatividade do átomo com o que está ligado, este desvio químico corresponde ao átomo de carbono 2 da molécula e por fim temos o átomo de carbono mais desblindada também pelo efeito de eletronegatividade do oxigénio situado a 182,70 ppm, este carbono está situado numa zona dos carbonos característicos dos carbonilos das cetonas, este carbono é o carbono 4 da molécula.

Basseando - se nos dados espectroscópicos concluímos que a estrutura química correspondente aos dados analisados é que está representado na figura 27:

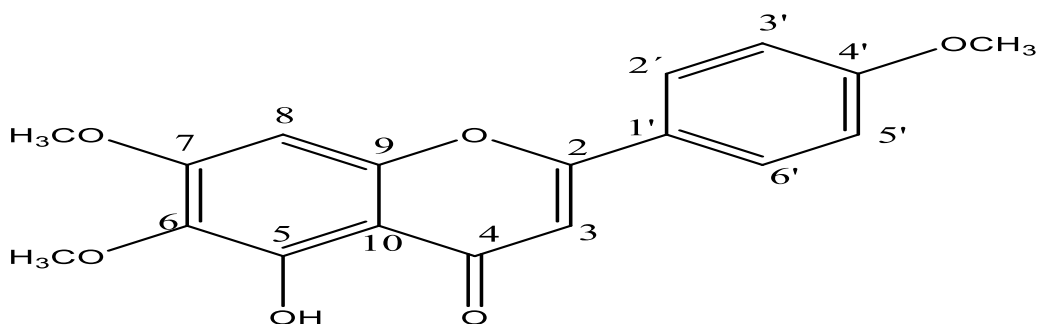


Figura 27: 5-hidroxi-6,7-dimetoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona ou 5-hidroxi 6,7,4' Trimetoxiflovona (salvigenina)

É de realçar que, este composto isolado e identificado não é novo, já foi identificado e os dados espectroscópicos foram confirmados pelo (Alwahsh, Khairuddean, & Chong , 2015) e também este flavonoide já foi identificado na *Lippia multiflora* (Kanko, *et al.*, 2004)

3.4. Determinação dos fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais é relevante, uma vez que os antioxidantes isolados das plantas são na sua maioria compostos polifenólicos, sendo este grupo determinante para a atividade antioxidante do extrato. A capacidade antioxidante desta classe de compostos deve-se, principalmente, às suas propriedades redox, o que os leva a atuar como agentes redutores ou como doadores de átomos de hidrogénio (Tawaha, Alali, Gharaibeh, Mohammad , & El-Elimat, 2007)

A quantidade de fenóis totais foi determinada pelo método de Folin - Ciocalteu e os mesmos medidos por espectroscopia UV, baseado na reação colorimétrica redox e a sua quantificação foi feita através da linha de calibração (figura 15). Os teores de fenóis presentes no extrato aquoso de cada recolha encontram-se na tabela 15.

Tabela 15: Teores de fenóis presentes em extrato aquoso de cada recolha.

Amostra	Fenóis totais mg EAG/g matéria seca)
R4	262,384 ± 2,128
R5	120,162 ± 1,948
R6	88,040 ± 1,852
R7	131,879 ± 1,818
R8 folhas	163,798± 2,449
R8 flores	94,101 ± 1,948
R9 folhas	168,848± 3,030
R9 flores	151,070± 2,44

Analisando os resultados apresentados na tabela 15, pode-se concluir que é o extrato da recolha 4 (R4) a que superou a todos os extratos em compostos fenólicos tendo assim 262,384 Equivalentes de ácido gálico (mg/g matéria seca), comparando os extratos das amostras recolhidas antes e em plena floração, vimos que para os extratos das amostras recolhidas no Wolongo, no caso de R4 e R8 flores e folhas vimos que a amostra recolhida antes da floração tem mais teor fenólico em relação a amostra recolhida em plena floração que é o R8. Nas amostras recolhidas no Tomboco, é o contrário, porque a amostra recolhida em plena floração tem mais fenóis que a recolhida antes da floração como ilustra a tabela 16.

Fazendo a mesma comparação nas folhas e nas flores das duas amostras recolhidas em plena floração pode-se concluir que nas duas amostras as folhas apresentaram mais fenóis totais que nas flores como ilustra tabela 16.

Segundo a literatura consultada não existe uma publicação onde foi feita a determinação de componente fenólicos totais nos extratos aquosos das folhas de *Lippia multiflora* Moldenke.

3.5. Determinação dos flavonoides totais

Tendo em conta que os flavonoides são uma das classes de compostos polifenólicos naturais mais diferenciados e difundidos no reino vegetal, a determinação do seu teor assume um papel importante e pertinente. Os flavonoides são responsáveis por diversas atividades biológicas e químicas, como a atividade antioxidante por eliminação de radicais livres, atividades como antibacteriana, anticarcinogênica, anti-inflamatória, anti-viral, anti-alérgico, estrogênico (Tawaha, Alali, Gharaibeh, Mohammad, & El-Elimat, 2007, Lucas, 2017). Portanto, nem todos os flavonoides possuem iguais propriedades antioxidantes, isto é, a capacidade antioxidante de um flavonoide é influenciada pela posição do substituinte hidroxilo e a própria estrutura da molécula. Estes compostos podem quelar ou interferir no processo de eliminação de radicais livres, contribuindo para a sua supressão (Tawaha, Alali, Gharaibeh, Mohammad, & El-Elimat, 2007, Lucas, 2017).

Os flavonoides foram determinados utilizando o método de cloreto de alumínio, e a sua quantificação foi feita através da linha de calibração (figura 16), os ensaios foram feitos em triplicados. Os teores de flavonoides obtidos em cada os extratos estão apresentados na tabela a baixo.

Tabela 16: Teores de flavonoides presentes em extrato aquoso de cada recolha.

Amostra	Flavonóides totais (mg EQ/g matéria seca)
R4	56,820 ± 0,450
R5	31,054 ± 0,785
R6	29,162 ± 0,450
R7	32,015 ± 0,550
R8 folhas	51,024 ± 1,397
R8 flores	36,189 ± 1,212
R9 folhas	65,198 ± 1,271
R9 flores	71,054 ± 1,299

Com o dados encontrados na tabela 16 acima, podemos concluir que as flores e as folhas dos extratos aquosos da recolha 9 (R9), são os que apresentaram mais flavonoides de todos extratos, seguida do R4 e as folhas do R(8). Também como se refeiru na quantficação dos

fenóis totais, a quantificação dos flavonoides nos extratos aquosos das folhas e flores da *Lippia multiflora* Moldenke, segundo a literatura consultada nunca ainda foi feita pelos outros autores, ou seja não se encontrou um publicação onde se tratou da determinação dos flavonoides totais dos extratos aquosos das folhas de *Lippia multiflora* Moldenke

3.6. Atividades Biológicas dos óleos essenciais e dos extratos aquosos das folhas e flores da *Lippia multiflora* Moldenke de Angola

3.6.1. Atividade antioxidante dos extratos aquoso - Método DPPH

Foram calculados parâmetros da atividade antioxidante nomeadamente o IC₅₀ e AAI, para o extrato aquoso da recolha 4 (R4) as folhas de *Lippia multiflora* Moldenke que serve de exemplo para as outras extrações e que serve de modelo para o que foi calculado nos outros extrato aquosos.

Depois da leitura das absorvâncias das amostras, calculou-se a % I. Com estes valores criou-se uma reta, necessária para o cálculo do IC₅₀. Os parâmetros da atividade antioxidante encontram-se nas tabelas 17, 18 e 19 mais em diante como os gráficos criados, da percentagem de inibição no eixo das ordenadas pela concentração de extrato na célula de leitura das abcissas.

Os resultados de AAI e IC₅₀ globais estão representados na tabela 21

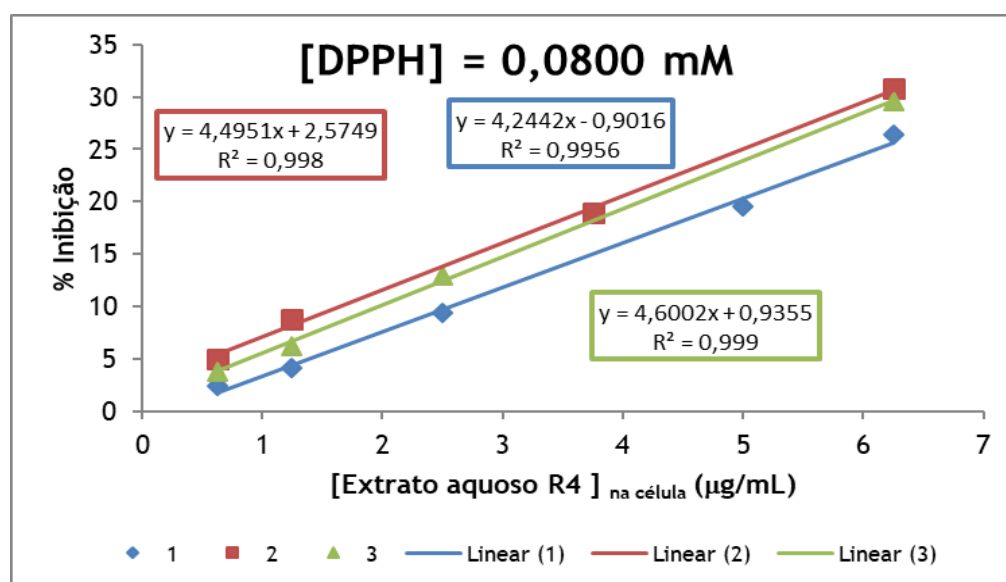


Figura 28: Representação gráfica da % I em função da concentração do extrato aquoso da R4 na célula espectrofotométrica, para a concentração de DPPH de 0,0800 mM.

Tabela17: Parâmetros IC₅₀ e AAI do extrato aquoso da R4, para a concentração de DPPH de 0,0800 mM.

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 2	Médias ± Desvio padrão
IC ₅₀ /(µg/mL)	11,99	10,55	10,66	11,06 ± 0,8
AAI	2,43	2,86	2,83	2,71 ± 0,2

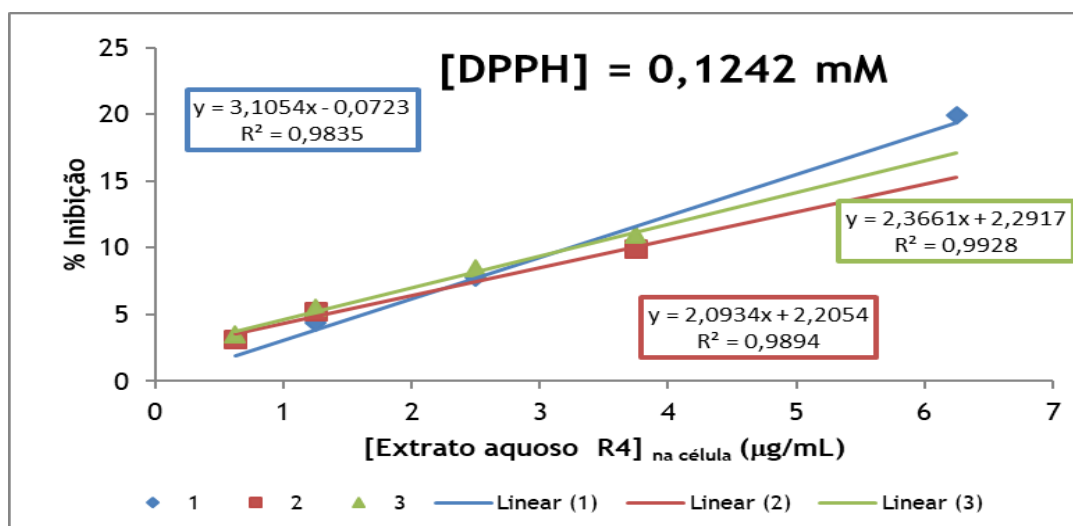


Figura 29: Representação gráfica da % I em função da concentração do extrato aquoso da R4 na célula espectrofotométrica, para a concentração de DPPH de 0,1214 mM.

Tabela 18: Parâmetros IC₅₀ e AAI do extrato aquoso da R4, para a concentração de DPPH de 0,124mM

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 2	Médias ± Desvio padrão
IC ₅₀ /(µg/mL)	16,12	22,83	20,16	19,70 ± 3,37
AAI	2,94	2,07	2,36	2,46 ± 0,44

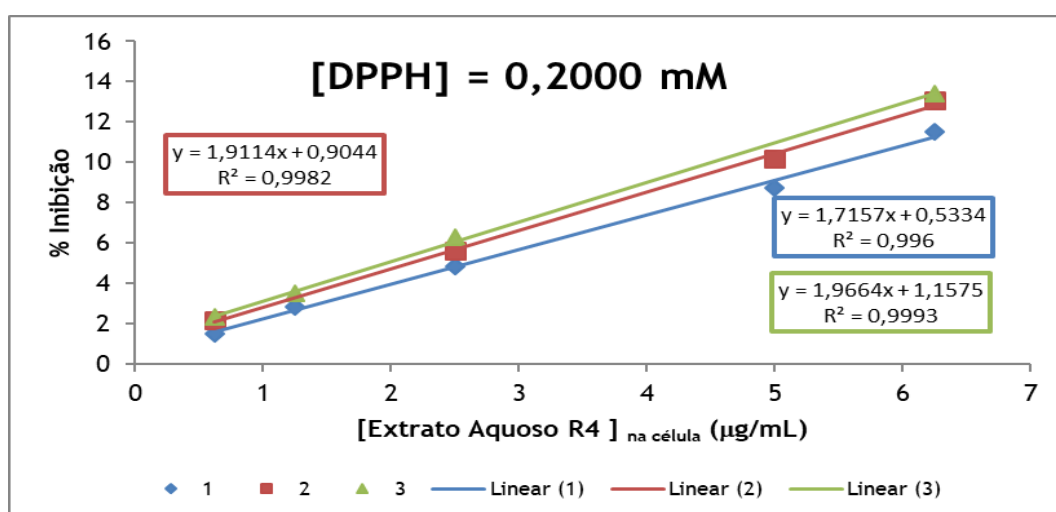


Figura 30: Representação gráfica da % I em função da concentração do extrato aquoso da R4 na célula espectrofotométrica, para a concentração de DPPH de 0,2000 mM.

Tabela 19: Parâmetros IC₅₀ e AAI do extrato aquoso da R4 , para a concentração de DPPH de 0,2000 mM

	Ensaio 1	Ensaio 2	Ensaio 2	Médias ± Desvio padrão
IC ₅₀ / (µg/mL)	28,83	25,68	24,83	26,45 ±2,10
AAI	2,61	2,97	3,06	2,88 ± 0,23

Tabela 20. Resumo dos parâmetros da atividade antioxidante IC₅₀ e AAI (média ± desvio médio) para a amostra do extrato Aquoso da R4 e classificação em relação aos padrões, trolox, ácido gálico e rutina.

	IC ₅₀ (µg/mL)	AAI	Atividade antioxidante
Extrato R4	19,07 ± 5,33	2,68 ± 0,15	Muito forte
Trolox	7,8 ± 2,4	6,3 ± 0,2	Muito forte
Ácido gálico	2,0 ± 0,6	23,9 ±1,4	Muito forte
Rutina	8,1 ± 2,1	6,0 ± 0,4	Muito forte

Baseando-se no valor de IC₅₀ para extrato aquoso das folhas de *Lippia multiflora* Moldenke, é necessário uma concentração de 19,07 µg/mL, para inibir 50 % da atividade de DPPH e através do valor final de AAI conclui-se que o extrato aquoso da R4 das folhas de *Lippia multiflora* Moldenke tem uma atividade antioxidante muito forte.

Na tabela a seguir estão listados os valores de IC₅₀ e AAI de todos os extratos aquosos das folhas de *Lippia multiflora* Moldenke.

Tabela 21: Parâmetros IC₅₀ e AAI dos extratos aquosos de todas as amostras e as suas atividades antioxidantes

	Recolha	IC ₅₀	AAI	Atividade antioxidante
Extratos Aquosos	R4	19,07 ± 5,33	2,68 ± 0,15	Muito forte
	R5	30,66 ± 9,82	1,62 ± 0,11	Forte
	R6	41, 21 ± 12,60	1,15 ± 0,11	Forte
	R7	26,75 ± 8,27	1,79 ± 0,14	Forte
	R8 folhas	23,73 ± 2,64	2,12 ± 0,03	Muito forte
	R8 flores	38,53 ± 10,29	1,30 ± 0,11	Forte
	R9 folhas	21,27± 7,25	2,38 ± 0,035	Muito Forte
	R9 flores	26,44 ± 9,48	1,92 ± 0,06	Forte

Com os dados apresentados na tabela 21 pode concluir-se que o extrato aquoso da recolha 4 (R4) é que apresentou o menor IC₅₀ e um AAI maior, isto é, uma atividade antioxidante muito forte em relação aos outros extratos, razão esta que pode ser justificada pela presença de um teor maior de fenóis e flavonóides no mesmo extrato em relação aos outros. Comparando as amostras recolhidas antes da floração e depois da floração, vimos que, nas amostras recolhida

3.6.2. Atividades antibacterianas dos óleos essenciais da *Lippia multiflora* Moldenke

Depois dos testes atividades antibacterianas dos óleos e do composto isolados, feito pelo método de difusão em placas de agar, quer por método de cavidades cilíndricas (poços) com uma altura de 4 mm e diâmetro de 5 mm, quer pelo método do efeito de vapor, usando os micro organismos *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923/Lote 902840), a *Escherichia coli* (ATCC 25922/Lote 931370) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853/Lote 931372), utilizando como controlos positivos, os antibióticos penicilina na concentração de 0,05 mg/ml (acção contra Gram-positivos) e gentamicina na concentração de 10 mg/ml (acção de largo espectro) e o controlo negativo foi utilizado o DMSO.

Para método de cavidades cilíndricas (poços), Vimos que, os óleos essenciais da recolha R3, R4, a piperitenona, R9 Flores e R5 são os que mostraram uma forte atividade, face ao *Staphylococcus aureus* ilustrados na tabela 22 em cor verde, e os óleos das recolhas R6, R7, R8 flore e R9 folha, mostraram uma atividade diante da *Staphylococcus aureus*. Factos conferidos pelos seus holos de inibição ilustrados na tabela 22 em cor amarela.

Para a *Escherichia coli*, o R3, R4, R9 flore, composto isolado piperitenona (C3L5-3) e R8 folha são os mostraram uma média atividade para esta bateria, ilustrados na tabela 22 em cor amarela, os demais exibiram uma fraca ou ainda alguns não mostraram um poder de inibição diante da *Escherichia coli* resultados ilustrados na tabela 22 em cor branca.

Para *Pseudomonas Aeruginosa* nenhum óleo mostrou uma forte inibição ou seja uma forte atividade nesta bactéria, apenas 5 amostras nomeadamente R3, R4, piperitenona, R9 flores e R5 são as que apresentaram uma inibição moderada ou seja uma atividade média perante esta bactéria, também os resultados encontram - se apresentados na tabela 22 com a cor amarela. Os restantes óleos diante desta bactéria apresentaram uma fraca inibição e alguns com nenhuma inibição, fato este que justificou a sua fraca ou ausência da atividade para este micrororganismo

Quanto ao método do efeito de vapor, os R3, R4, a piperitenona, R9 Flores, R8 flores e R8 folha, apresentaram uma forte atividade ou uma forte inibição perante *Staphylococcus aureus*, halos de inibição apresentados na tabela a seguir, o R5 apresentou uma moderada atividade para *Staphylococcus aureus*, neste método, os demais óleos não apresentaram atividade ou eles têm uma nula inibição

Na *Escherichia coli* apenas o R4 apresentou uma forte inibição, com um halo de inibição de 26 mm e o R3 e R9 flores apresentaram um fraco halo de inibição, os restos não apresentaram inibição na *Escherichia coli*.

Para *Pseudomonas aeruginosa* o R4 e R5, apresentaram uma forte inibição com um halo de inibição de 26 mm e 19 mm respetivamente, o R3 apresentou um halo de inibição fraco e os de mais óleos não apresentaram inibição neta bactéria

A tabela 22, apresenta por completo, os diâmetros de inibição em mm dos óleos essenciais da *Lippia multiflora* Moldenke recolhida em Angola para cada um dos micro organismo usando os dois métodos nomeadamente método de cavidades cilíndricas (poços) e método do efeito de vapor em relação aos controlos.

Tabela 22. Halos de inibição dos óleos essenciais da *Lippia multiflora* Moldenke de recolhida em Angola

Óleo	Diluições	S.Aureus				E. coli				P. Aeruginosa			
		1º ensaio	2º ensaio	média	Ensaio Vapor (mm)	1º ensaio	2º ensaio	média	Ensaio Vapor (mm)	1º ensaio	2º ensaio	média	Ensaio Vapor (mm)
R3	Bruto(mm)	25	20	22,5	25	11	12	11,5	13	11	11	11	9
	1:2(mm)	25	26	25,5		11	12	11,5		16	15	15,5	
	1:10(mm)	14	11	12,5		0	0	0		0	0	0	
R4	Bruto(mm)	21	22	21,5	30	14	15	14,5	26	12	12	12	26
	1:2(mm)	27	26	26,5		11	13	12		18	19	18,5	
	1:10(mm)	26	16	21		0	0	0		11	12	11,5	
Piperitenona	Bruto(mm)	20	22	21	15	16	14	15	0	12	19	15,5	0
	1:2(mm)	18	19	18,5		14	13	13,5		15	15	15	
	1:10(mm)	15	16	15,5		12	12	12		15	13	14	
R9 flores	Bruto(mm)	24	22	23	21	Furou	Furou	0	9	17	14	15,5	0
	1:2(mm)	26	21	23,5		12	11	11,5		16	Furou	16	
	1:10(mm)	18	12	15		12	11	11,5		12	8	10	
R5	Bruto(mm)	17	18	17,5	10	Óleo insuficiente para ensaio			X	11	11	11	19
	1:2(mm)	20	20	20		14	14	14					
	1:10(mm)	12	10	11		12	9	10,5					
R6	Bruto(mm)	Furou	Furou	Ind.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1:2(mm)	25	23	24		0	0	0		21	15	18	
	1:10(mm)	0	0	0		0	0	0		0	0	0	
R7	Bruto(mm)	Furou	12	Ind.	0	0	0	0	0	0	0	0	0
	1:2(mm)	13	12	12,5		0	0	0		0	0	0	

	1:10(mm)	13	12	12,5		0	0	0		0	0	0	
R8 flores	Bruto(mm)	16	18	17	17	Furou	Furou	0	0	0	0	0	0
	1:2(mm)	18	16	17		11	12	11,5		0			
	1:10(mm)	12	10	11		11	13	12		0			
R8 folhas	Bruto(mm)	18	16	17	20	0	0	0	0	Ind.	Ind.	Ind.	0
	1:2(mm)	17	14	15,5		0	0	0		12	15	13,5	
	1:10(mm)	12	0	6		0	0	0		Ind.	Ind.	Ind.	

NOTAS:

A verde os ensaios mais promissores com uma forte inibição

Não esquecer que o diametro do poço é de 6 mm, logo o minimo possivel de se medir quando existe inibição é 7 mm

A amarelo os ensaios com inibição média e os brancos são os ensaios muito pouco satisfatórios ou seja que tem uma fraca ou nenhuma inibição

O ensaio a vapor é sempre realizado com oleo em bruto

Faltou oleo para alguns ensaios, estão identificados

A legenda que diz "Ind." Quer dizer indiferenciado. Significa que se nota alguma inibição, menos densidade de crescimento, mas não se formou um halo com um diametro que se pudesse medir

Tabela 23: Tabela dos controlos utilizados para a medição da atividades anti bacteriana dos óleos essenciais

Controlos	Penincilin (0.05mg/ml) (mm)	Gentamicin (10mg/ml)(mm)	DMSO(mm)
Staphylococcus Aureus	47	45	0
Escherichia coli	0	42	0
Pseudomonas Aeruginosas	0	50	0

Capítulo IV: Conclusões e perspectivas futuras

4.1. Conclusões

O estudo de plantas aromáticas para fins medicinais e industriais, provém desde os tempos remotos, sendo este atribuído muitas das vezes aos óleos por estes apresentarem muitas utilidades industriais e muitas atividades biológicas justificadas pela complexidade da sua constituição química.

A *Lippia multiflora* Moldenke já vem sendo estudada por muitos autores e muitas das suas atividades foram comprovadas pelos mesmos. O óleo essencial da *Lippia multiflora* Moldenke pelos os estudos feitos é na sua maioria constituído por monoterpenos, como, o 1,8- cineol, timol, tagetona, p- cimeno, linalool, Geraniol, compostos estes que são responsáveis pelas atividades como atividade anti microbiana, anti inflamatória, analgésicas e muito mais verificadas nos óleos desta planta.

O nosso trabalho teve como objetivo de estudar a composição química dos óleos essenciais e atividades biológicas da *Lippia multiflora* Moldenke de Angola como as atividades antibacterianas dos óleos essenciais e a atividade antioxidante dos extratos aquosos de cada recolha. Também fez - se a extração com n - hexano e que depois da cromatografias as frações obtidas foram analisadas por técnicas espectroscópicas.

Depois da realização de todo trabalho obtivemos as seguintes conclusões:

A análise dos óleos extraídas nas folhas e flores obtido por hidrodestilação, foi feita por meio de GC - MS e os compostos foram identificados através do programa AMDIS em comparação com a biblioteca Wiley

Com esta análise concluímos que o limoneno, neral, citral, p - cimeno, elemol epoxineral, germacreno D e o γ - terpineol, são os principais constituintes da *Lippia multiflora* Moldenke recolhida em Ndalatandu na província do Cuanza Norte R1 e R2.

Na *Lippia multiflora* recolhida na província do Zaire (no Wolongo e no Tomboco), os compostos maioritários foram, o limoneno, a piperitenona, a ipsenona, cis e trans tagetona, o mircenos, Ocimenona.

Comparando com as três fases em que se recolheu as amostras podemos concluir que a percentagem de compostos variam de uma fase para outras, como no caso das amostras recolhidas no wolongo que antes da floração, tem um teor de compostos ligeiramente inferior que na recolhida em plena floração. O limoneno apareceu em todas amostras recolhidas em Angola.

A *Lippia multiflora* Moldenke de Angola apresentou a piperitenona que nunca tinha sido verificado na composição química das *Lippia multiflora* Moldenke, apesar do mesmo fazer parte da composição de outras subespécies da *Lippia*.

Nos extratos de n-hexano foram confirmado também a presença de compostos voláteis, que fazem parte dos óleos essenciais, como o salcilito de metila identificado na fração C1L2-2 da recolha 3.

Conseguiu-se isolar e purificar através da cromatografia da fração C3L5 - 3 e C3L5 - 9 da recolha 5 da *Lippia multiflora* Moldenke de Angola e identificado através dos dados espectroscópicos (RMN, IV e MS) a piperitenona que é um dos compostos maioritário da *Lippia multiflora* Moldenke de Angola este nunca tinha sido isolado na *Lippia multiflora* Moldenke e a salvigenina que é um flavonóide que já foi identificado na *Lippia multiflora*.

De uma forma geral podemos concluir que a composição química dos óleos essenciais da *Lippia multiflora* Moldenke de Angola difere muito da composição química da *Lippia multiflora* Moldenke descrita na literatura consultada.

Quanto a identificação do conteúdo total fenólico e de flavonoides totais dos extrato aquoso concluímos que o extrato da recolha 4 (R4) é que apresentou mais conteúdo fenólico total 262mg EAG/mg de matéria seca, seguido por R9 folhas, R8 folhas e R9 flores respetivamente e o R6 e R8 flores contêm menos fenóis de todos extratos, dados apresentados na tabela 15. E para os flavonoides concluímos que o extrato aquoso R9 flores que apresentou mais flavonoides totais contendo 71,054 mg EQ/mg de matéria seca, seguido por R9 folhas, R4 e R8 folhas respetivamente, dados apresentados na tabela 16.

No que refere as atividades biológicas, foram determinadas as atividades antioxidante pelo método de DPPH de todos extratos aquosos e atividades antimicrobiana de alguns óleos essenciais e do composto isolado.

Quanto as atividades antioxidante, o extrato aquoso da recolha 4 ou seja o R4 é que apresentou maior atividade antioxidante com um IC₅₀ de 19,07 µg/mL, e com base ao seu índice de atividade antioxidante (AAI), igual a 2,68 o R4 foi categorizado como muito forte relativamente a atividade antioxidante, razão este que pode ser confirmada pelo elevado conteúdos fenólicos que o mesmo apresentou, sendo os polifenólicos estão relacionados com a atividade antioxidante.

Relativamente as atividades antibacterianas, concluímos que a maioria dos óleos essenciais, apresentaram uma atividade contra *Staphylococcus Aureus*, com diâmetros de halo de inibição mostrados na tabela 22, para a *Escherichia coli*, o R3,R4,R9 flores, composto isolado piperitenona (C3L5-3) e R8 folha são os mostraram uma média atividade para esta bactéria, os restos apresentaram uma fraca ou ainda nenhuma inibição, e por fim para *Pseudomonas aeruginosa*, apenas houve uma inibição moderada, para os R4, piperitenona, R9 flores e R5, os de mais apresentaram inibição fraca e nula, com se ve na tabela 22.

De uma forma geral podemos concluir que a atividade antibacterianas verificadas aos óleos essenciais da *Lippia multiflora* Moldenke, justificou - se pela presença do limoneno e da piperitenona, podendo ser os responsáveis das mesmas atividades, sendo compostos maioritários, na composição química desses óleos.

4.2. Perspectivas futuras

Um trabalho de investigação nunca chega até ao seu fim, por isso deve haver sempre um continuidade, tendo em conta, a importância que os produtos naturais têm na descoberta de novas entidades química.

Pela constituição que os óleos desta *Lippia multiflora* Moldenke recolhida em Angola apresentou seria muito interessante futuramente que se avaliasse outras atividades biológicas, como, atividade anti- inflamatória, atividade antitumorais, determinação da citotoxicidade dos óleos e muito mais.

Não foram estudadas muitos extratos desta plantas como os de acetona e extrato etanólico, tendo em conta que não existe um estudo detalhado desta planta recolhida em Angola seria tão importante a continuidade de estudo para os extrato de acetona e de etanol.

Sendo o muitos dos compostos não são identificáveis no aparelho de GC - MS, sugere - se a purificação por cromatografia em coluna dos óleos essenciais para sua identificação completa usando a espectroscopia de ressonância magnética nuclear(RMN).

Bibliografia

- Abena, A. A., Ngondzo-Kombeti, G., & Bioka, D. (1998). Psychopharmacologic properties of *Lippia multiflora*. *Encephale* 24, 449-54.
- Abena, A., Atipo-Ebata, J., Hondi Assah, T., & Diatewa, M. (2001). Psychopharmacological properties of crude extract and essential oil of *Lippia multiflora*. *Encephale* 27(4), :360-4.
- Abena, A., Diatewa, M., Gakosso, G., Gabeassor, M., Hondi-Assah, T., & Ouamba, J. (2003). Analgesic, antipyretic and anti-inflammatory effects of essential oil of *Lippia multiflora*. *Fitoterapia* 74, 231-236.
- Abena, A., Ossibi, A. E., Tsiba, G., Andissa, N., & Ouamba, J. (2017). Étude monographique de *Lippia multiflora* Moldenke (Verbenaceae). *Phytothérapie* 15, 27-32.
- Adwan, G., Abu-Shanab, B., & Adwan, K. (2009). In vitro Interaction of Certain Antimicrobial Agents in Combination with Plant Extracts Against Multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa* Strains. *Middle-East Journal of Scientific Research* 4 (3), 158-162.
- Agnaniet, H., Makani, T., Akagah, A., Menut, C., & Bessière, J. (2005). Volatile constituents and antioxidant activity of essential oils from *Lippia multiflora* Mold. growing in Gabon. *Flavour Fragr. J.* 20, 34-38.
- Ajaiyeoba, E., Abiodun, O., Falade, M., Ogbale, N., Ashidi, J., Happi, C., & Akinboye, D. (2006). In vitro cytotoxicity studies of 20 plants used in Nigerian antimalarial ethnomedicine. *Phytomedicine* 13, 295-298.
- Alves, E. S., Santos, M., Aquije, G. M., Fernandes, A., Santos, R. B., Ventura, J., . . . Garcia, R. (2008). Antimicrobial Activity and Potential use of Monoterpenes as Tropical Fruits Preservatives. *Brazilian Journal of Microbiology* 39:, 163-168, ISSN 1517-8382.
- Alwahsh, M. A., Khairuddean, M., & Chong, W. K. (2015). Chemical Constituents and Antioxidant Activity of *Teucrium barbeyanum* Aschers. *Rec. Nat. Prod.* 9:1, 59-163.
- Amaral, J. F., Silva, M. I., Neto, M. R., Neto, P. F., Moura, B. A., Melo, C. T., . . . Sousa, F. C. (2007). Antinociceptive Effect of the Monoterpene R-(+)-Limonene in Mice. *Biol. Pharm. Bull.* 30 (7), 1217 - 1220.
- Amenu, D. (2014). Antimicrobial Activity of Medicinal Plant Extracts and Their Synergistic Effect on Some Selected Pathogens. *American Journal of Ethnomedicine*, Vol. 1, No. 1, 018-029.
- Avlessi, F., Alitonou, G., Sohounhloue, D., Menut, C., & Bessiere, J. M. (2005). Aromatic Plants of Tropical West Africa. Part XIV Chemical and Biological Investigation of *Lippia multiflora* Mold. Essential Oil from Benin. *J. Essent. Oil Res.*, 17, 405-407.

- Bagora, B. (2014). *Etude des propriétés anti-oxydantes, anti-inflammatoires, anti-prolifératives et anti-migratoires des huiles essentielles de quelques plantes médicinales du Burkina Faso sur des lignées cellulaires du cancer de la prostate et de glioblastomes*. Sciences agricoles. Université Blaise Pascal - Clermont-Ferrand II 2014 NNT : 2014CLF22502.
- Balunas, M. J., & Kinghorn, A. D. (2005). Drug discovery from medicinal plants: Minireview. *Life Sciences* 78 , 431 - 441.
- Barani, K., Manipal, S., Prabu, D., Ahmed, A., Adusumilli, P., & Jeevika, C. (2014). Anti-fungal activity of *Morinda citrifolia* (noni) extracts against *Candida albicans*: An in vitro study. *Indian Journal of Dental Research Vol 25, Issu 2*, 188 - 190.
- Barata, A. M., Rocha, F., Lopes, V. R., & Bettencourt, E. (2014). Medicinal and Aromatic Plants - Portugal. *researchgate*, 1- 46. Fonte: www.researchgate.net/publication/259772948.
- Baser, K. H., & Buchbauer, G. (2016). *Handbook of Essential Oils Science, Technology, and Applications*. Boca Raton London New York: Taylor & Francis Group, an informa business.
- Bassolé, I. H., Lamien-Meda , A., Bayala, B., Tirogo, S., Franz, C., Novak, J., . . . Dicko, M. H. (2010). Composition and Antimicrobial Activities of *Lippia multiflora* Moldenke, *Mentha x piperita* L. and *Ocimum basilicum* L. Essential Oils and Their Major Monoterpene Alcohols Alone and in Combination. *Molecules* 15, 7825-7839.
- Bassole, I., Ouattara, A., Nebie, R., Ouattara, C., Kabore, Z., & Traore, S. (2003). Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry* 62, 209 - 212.
- Benoit-Vical, F., Valentin, A., Pelissier, Y., Marion, C., Castel, D., Milhau, M., . . . Yapo, A. (1996). Confirmation, In Vitro, de l'Activité antimalarique de certaines Plantes d'Origine Africaine utilisées en médecine traditionnelle. *Médecine d'Afrique Noire* 43, 393 - 400.
- Cooper, R., & Nicola, G. (2015). *Natural Products Chemistry: Sources, Separations, and Structures*. New York: Taylor & Francis Group, LLC.
- Crowell, P. .. (1997). Monoterpenes in breast cancer chemoprevention. *breast cancer chemoprevention and treatment* 46, 191 - 197.
- Cunha, A. D., Teixeira, F., Silva, A. P., & Roque, O. R. (2007). Plantas na terapêutica Farmacologia e ensaios clínicoS. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian.
- Cunha, A. P., Cavaleiro, C., & Salgueiro, L. (2005). Em *Farmacognosia e Fitoquímica* (pp. 339 - 400). Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkain.
- Etou-Ossibi, A.-W., Nzonzi, J., Mombouli, J., Nsondé-Ntandou, G., Ouamba, J.-M., & Abena, A. (2005). Screening chimique et effets de l'extrait aqueux du *Lippia multiflora* Moldenke sur le cœur isolé du crapaud. *Phytothérapie Numéro 5*, 193-199.

- Fekih, N. (2014). *Proprietes chimiques et biologiques des Huiles essentielles de trois especes du Genre Pinus poussant en Algerie:Thèse En vue de l'obtention du diplôme de Doctorat universite abou bekr belkaid - tle Es-Sciences en Chimie Option : Chimie Organique Appliquée*. Faculté des Sciences - Département de Chimie Laboratoire des Substances Naturelles & Bioactives (LASNABIO).
- Ferreira, F. V., Angonese, P. M., Friedrich, H. C., Weiss, R. D., Friedrich, R. S., & Praetzel, J. R. (2010). Antimicrobial action of root canal filling pastes used in deciduous teeth. *Rev. odonto ciênc.* 25(1), 65-68.
- Filho, V. C., & Yunes, R. (1998). Estrategies for obtaining pharmacologically active compounds from medicinal plants. Concepts about structural modification for improve the activity. *Química Nova*, 21,, 99 - 105.
- Franchomme, P., Jollois, R., & Péroël, D. (2001). *l'aromathérapie exactement: Encyclopédie de l'utilisation thérapeutique des huiles essentielles*. Editions Roger Jollois.
- Handa, S. S., Khanuja, S. P., Longo, G., & Rakesh, D. D. (2008). *Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants*. Trieste, Italy: ICS-UNIDO.
- Hassan, B. A. (2012). Medicinal Plants (Importance and Uses). *Pharmaceut Anal Acta*, 3:10.
- Hirota, R., Roge, N. N., Nakamura, H., Song, H.-S., Sawamura, M., & Sugamuna, N. (2010). Anti-inflammatory Effects of Limonene from Yuzu (*Citrus junos* Tanaka) Essential Oil on Eosinophils. *Journal of Food Science*, v. 75, (03), 87 - 92.
- Jigam, A. A., Akanya, H., Ogbadoyi, E., Dauda, B., & Evans, E. (2009). In vivo antiplasmodial, analgesic and anti-inflammatory activities of the leaf extract of *Lippia multiflora* mold. *Journal of Medicinal Plants Research Vol. 3(3)*, 148-154.
- Joy, P. P., Thoma, J., Mathew, S., Jose, G., & Joseph, J. (2014). Aromatic Plants. *Aromatic and Medicinal Plants Research Station, Odakkali Asamannoor - 683 549, Kerala, India*, 1-75.
- Kala, C. P. (2015). Medicinal and aromatic plants: Boon for enterprise development Review. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants 2* , 134-139.
- Kanko, C., Koukoua, G., N'Guessan, Y. T., Fournier, J., Pradère, J.-P., & Toupet, L. (2004). Contribution à l'étude phytochimique de *Lippia multiflora* (Verbenaceae). *Comptes Rendus Chimie Volume 7, Issues 10-11*, 1029-1032.
- Kanko, C., Sawaliho, B. E.-H., Kone, S., Koukoua, G., & N'Guessan, Y. T. (2004). Étude des propriétés physico-chimiques des huiles essentielles de *Lippia multiflora*, *Cymbopogon citratus*, *Cymbopogon nardus* *Cymbopogon giganteus*. *C. R. Chimie 7* , 1039-1042.
- Kunle, O. F., & Egharevba, H. O. (2012). Essential oil of *Lippia multiflora* Moldenke: A review. *Journal of Applied Pharmaceutical Science 02 (01)*, 15-23.

- Kunle, O., Okogun, J., Egamana, E., Emojevwe, E., & Shok, M. (2003). Antimicrobial activity of various extracts and carvacrol from *Lippia multiflora* leaf extract. *Phytomedicine* 10: , 59-61 .
- Lahlou, M. (2013). The Success of Natural Products in Drug Discovery . *Pharmacology & Pharmacy* , 17-31 .
- Lucas, M. F. (2017). Caracterização fitoquímica e determinação da atividade biológica de extratos de cascas de *Salix salviifolia* Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Química Medicinal . 101.
- Maciel, M. A., Pinto, A., Veiga Jr, V., Grynberg , N., & Echevarria, A. (2002). Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. *Quim. Nova*, Vol. 25 No. 3, 429-438.
- Mahomoodally, M. F. (2013). Traditional Medicines in Africa: An Appraisal of Ten Potent African Medicinal Plants Review Article. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 1 - 14.
- Maiti, S., & Geetha , K. (2007). Medicinal and Aromatic Plants in India. *Ornamental, Medicinal & Aromatic Crops*, 1 - 27.
- Manenzhe, N. J., Potgieter, N., & Ree, T. V. (2004). Composition and antimicrobial activities of volatile components of *Lippia javanica* . *Phytochemistry* 65, 2333 - 2336.
- Miliauskas, G., Venskutonis, P. R., & van Beek, T. A. (2004). Screening of radical scavenging activity of some medicinal and aromatic plant extracts. *Food Chemistry* 85, 231-237.
- Moharram, H., & Youssef, M. (2014). Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. *Alex. J. Fd. Sci. & Technol.* Vol. 11, No. 1, 31-42, .
- Motaleb, M. A., Hossain, M. K., Sobham, I., Alam, M. K., Khan, N. A., & Feroz, R. (2011). *Selected Medicinal plants of Chittagong hill tracts IUCN (International Union for Conservation of Nature)*. Dhak , Bangladesh: Progressive printers, Pvt, Ltd.
- Murali, R., & Saravanan, R. (2012). Antidiabetic effect of d-limonene, a monoterpene in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomedicine & Preventive Nutrition* 2 , 269-275.
- Nascimento, D. S., Vale, A., Tomás, A. M., Zou, J., Secombes, C. J., & Santos, N. M. (2007). Cloning, promoter analysis and expression in response to bacterial exposure of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) interleukin-12 p40 and p35 subunits. *Molecular Immunology* 44 , 2277-2291.
- Newman, D. J., & Cragg, G. (2013). Natural products: A continuing source of novel drug leads. *Biochimica et Biophysica Acta* 1830, 3670-3695.
- Newman, D. J., Cragg, G., & Snader, K. (2000). The influence of natural products upon drug discovery. *Nat. Prod. Rep.*, 17, 215 - 234.

- Oladimeji, F., Orafidiya, O., Ogunniyi, T., & Adewunmi, T. (2000). Pediculocidal and scabidicidal properties of *Lippia multiflora* essential oil. *Journal of Ethnopharmacology* 72, 305-311.
- Ostrosky, E. A., Mizumoto, M. K., Lima, M. E., Kaneko, T. M., Nishikawa, S. O., & Freitas, B. R. (2008). Methods for evaluation of antimicrobial activity and determination of minimum inhibitory concentration (MIC) of medicinal plants. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 18(2), 301-307.
- Owolabi, M. S., Ogundajo, A., Lajide, L., Oladimeji, M. O., Setzer, W. N., & Palazzo, M. C. (2009). Chemical Composition and Antibacterial Activity of the Essential Oil of *Lippia multiflora* Moldenke from Nigeria. *Rec. Nat. Prod.* 3:4 , 170-177 .
- Pascual, M., Slowing, K., Carretero, E., Mata, D., & Villar, A. (2001). Lippia: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *Journal of Ethnopharmacology* 76 , 201-214.
- Pèlissier, Y., Marion, C., Casadebaig, J., Milhau, M., Kone, D., Loukou, G., . . . Bessibre, J.-M. (1994). A Chemical, Bacteriological, Toxicological and Clinical Study of the Essential Oil of *Lippia multijlora* Mold. (Verbenaceae). *J. Essent. Oil Res.*, 6,, 623-630.
- Phillipson, J. D. (2001). Phytochemistry and medicinal plants. *Phytochemistry* 56 , 237±243.
- Pisoschi, A. M., & Negulescu, G. P. (2011). Methods for Total Antioxidant Activity Determination. A Review . *Biochemistry and Analytical Biochemistry* , 1 - 10, DOI: 10.4172/2161-1009.1000106.
- Pourmorad, F., Hosseinimehr, S. J., & Shahabimajd, N. (2006). Antioxidant activity, phenol and flavonoid contents of some selected Iranian medicinal plants. *African Journal of Biotechnology* Vol. 5 (11), 1142-1145,
- Rassem, H. H., Nour, A., & Yunus, R. (2016). Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A Review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 10(16) , 117-127.
- Rassem, H. H., Nour, A., & Yunus, R. (2016). Techniques For Extraction of Essential Oils From Plants: A Review. *Australian Journal of Basic and Applied Sciences*, 10(16) , 117-127.
- Rukangira, E. (S/D). Medicinal Plants and Traditional Medicine in Africa Constraints and Challenges. *Conserve Africa International, Nairobi, Kenya*, 179 -184.
- Salim., A., Chin, .-W., & Kinghorn, A. (2008). Drug Discovery from Plants. Em *Boactive molecules and Medicinal plants* (p. 379). Hardcover: Mérillon J-M.
- Salimena, F. R. (2010). Uma nova espécie de *Lippia* L. (Verbenaceae) do cerrado brasileiro. *Acta bot. bras.* 24(1), 232-234.
- Sarker, S. D., & Nahar, L. (2007). *Chemistry for Pharmacy Students General, Organic and Natural Product Chemistry*. England: John Wiley & Sons Ltd,.

- Scherer, R., & Godoy, H. T. (2009). Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry* 112, 654 - 658 .
- Schiller, C., & Schiller, D. (2008). *Aromatherapy Encyclopedia. A consise guide to over 385 plant oils*. E.U.A: Karen Aspach.
- Schiller, C., & Schiller, D. (2008). *Aromatherapy Encyclopedia. A consise guide to over 385 plant oils*. E.U.A: Karen Aspach.
- Silva, F. S. (2012). Estudo fitoquímico e farmacológico de *Lippia thymoides* MART. & SCHAUER (VERBENACEAE) Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Bi. Feira de Santana, BA.
- Simon, J. E., Juliani, H., Quansah, C., Asare, E., Akromah, R., Acquaye, D., . . . Mensah, A. (2008). Chemical Diversity of *Lippia multiflora* Essential Oils from West Africa. *Journal of Essential Oil Research/49 Vol. 20* , 49 - 55 .
- Singh, D., Katiyar, A., & Mishra, B. (2010). Essential oil : economic and herbal importance in Aromatherapy. *elcitrahraeserInternational Journal of Plant Sciences Vol. 5 Issi 2* , 431 - 435.
- Solomou, A. D., Martinos, K., Skoufogiann, E., & Danalato, N. (2016). Medicinal and Aromatic Plants Diversity in Greece and Their Future Prospects: A Review. *Agricultural Science Volume 4, Issue 1* , 9-20.
- Soro, L. C., Munier, S., Atchibri, A. O.-A., Grosmaire, L., Menut, C., Malan, K. A., & Pelissier, Y. (2015). Chemical Composition of Leaf Essential Oils of *Lippia multiflora* Mold. Grown in Savannah and Forest Area in the Ivory Coast. *Journal of Essential Oil Bearing Plants TEOP 18 (1)* , 154 - 160.
- Soro, L. C., Munier, S., Pelissier, Y., Grosmaire, L., Yada, R., Kitts, D., . . . Pouchere, P. (2016). Influence of geography, seasons and pedology on chemical composition and anti-inflammatory activities of essential oils from *Lippia multiflora* Mold leaves. *Journal of Ethnopharmacology 194*, 587-594.
- Tawaha, K., Alali, F., Gharaibeh, M., Mohammad, M., & El-Elimat, T. (2007). Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. *Food Chemistry 104*, 4, 1372-1378.
- Tia, E. V., Adima, A., Niamké, S., Jean, G., Martin, T., Lozano, P., & Menut, C. (2011). Chemical Composition and Insecticidal Activity of Essential oils of two Aromatic plants from Ivory Coast against *Bemisia tabaci* G. (Hemiptera: Aleyrodidae). *Natural Product Communications Vol. 6* , 1183-1188. .
- Tortora, G. J., Funke, B., & Case, C. (2010). *Microbiology: an introduction*. New York : Benjamin Cummings Pearson.

Valentin, A., Pelissier, Y., Benoit, F., Marion, C., Kone, D., Mallie, M., . . . Bessièr, J.-M. (1995). Composition and antimalarial activity in vitro of volatile components of *Lippia multiflora*. *Phytochemistry*, Vol. 40, No. 5, 1439 - 1442.

Vasisht, K., & Kumar, V. (2004). Em Compendium of Medicinal and Aromatic Plants *AFRICA Vol I* (p. 129). Trieste, Italy: Earth, Environmental and Marine Sciences and Technologies.

Yadav, A., Kumari, R., Yadav, A., Mishra, J., Srivatva, S., & Prabha, S. (2016). Antioxidants and its functions in human body - A Review. *Res. Environ. Life Sci.* 9(11), 1328-1331 .

Yan, Z., Li, T., Lv, P., Li, X., Zhou, C., & Yang, X. (2013). Sensitive and reliable multianalyte quantitation of herbal medicine in rat plasma using dynamic triggered multiple reaction monitoring. *Journal of Chromatography B* 928, 22 -31.

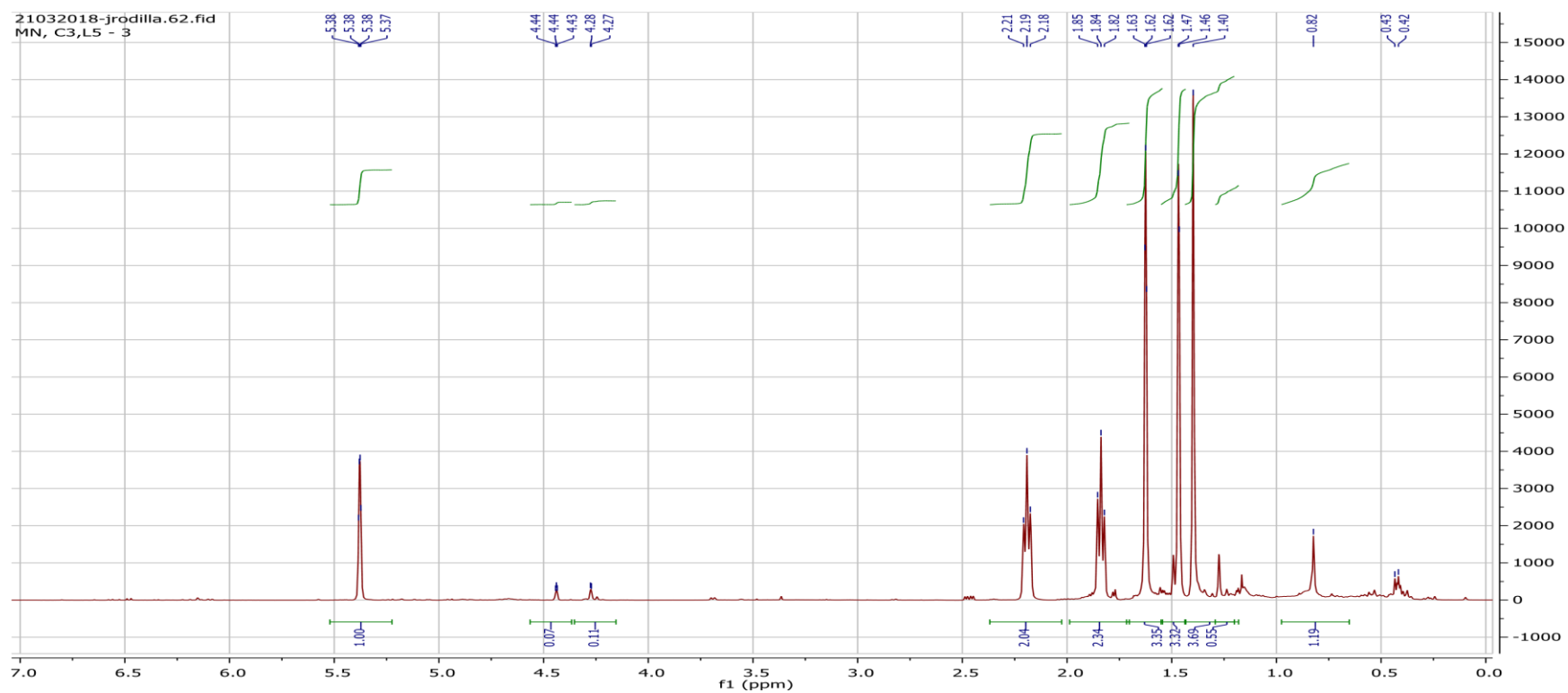
Zhenghao Xu, & Chang, L. (2017). Identification and Control of Common Weeds: Volume 3. Hangzhou: Zhejiang University Press , Control Number: 2017950669.

ANEXOS

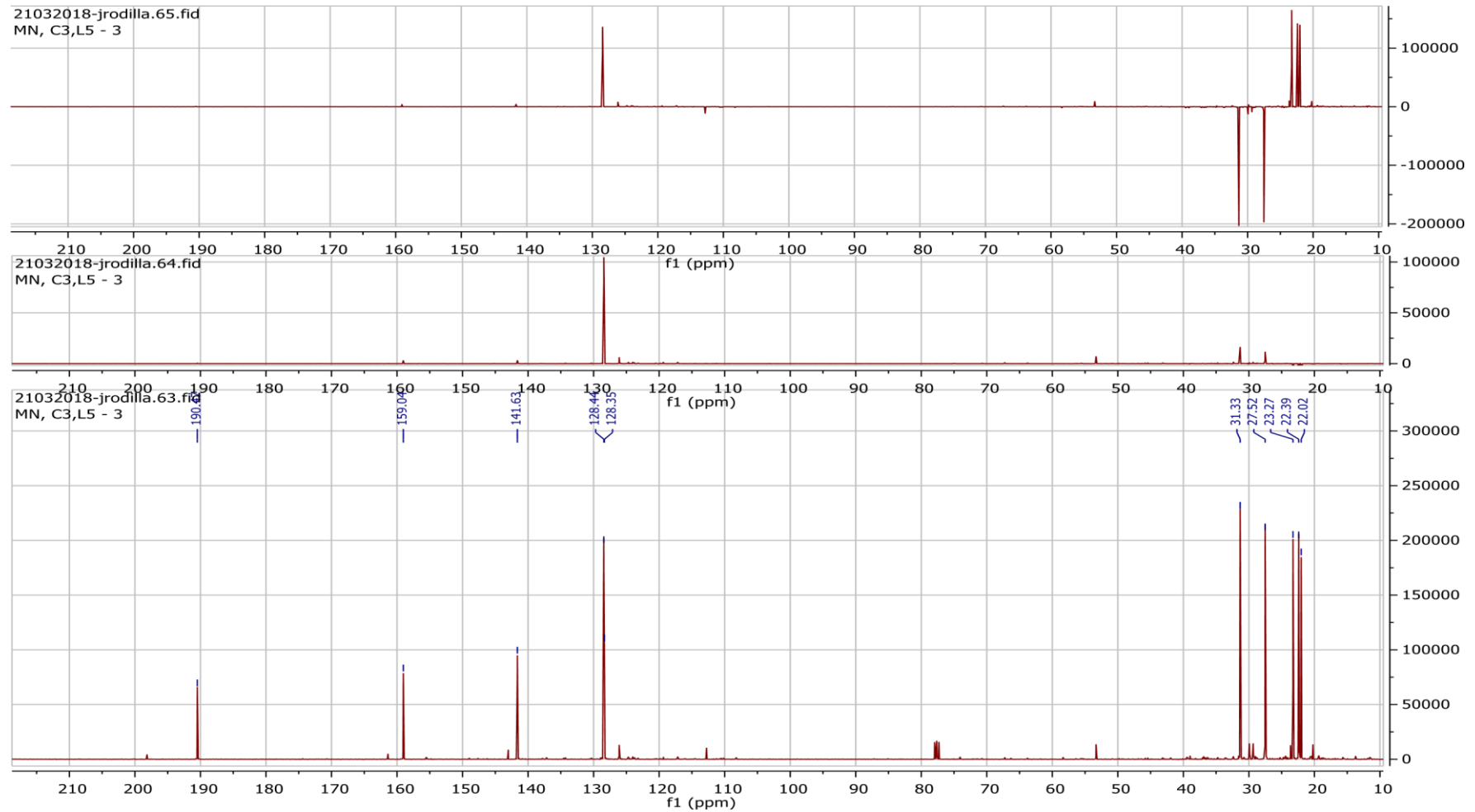
Espectros de RMN dos Compostos Isolados

1. Espectro de RMN DE ^1H e ^{13}C e as Correlações HSQC, HMBC e COSY de 3-metil-6-(propan-2-iliden)ciclohex-2-en-1-ona (Piperitenona)

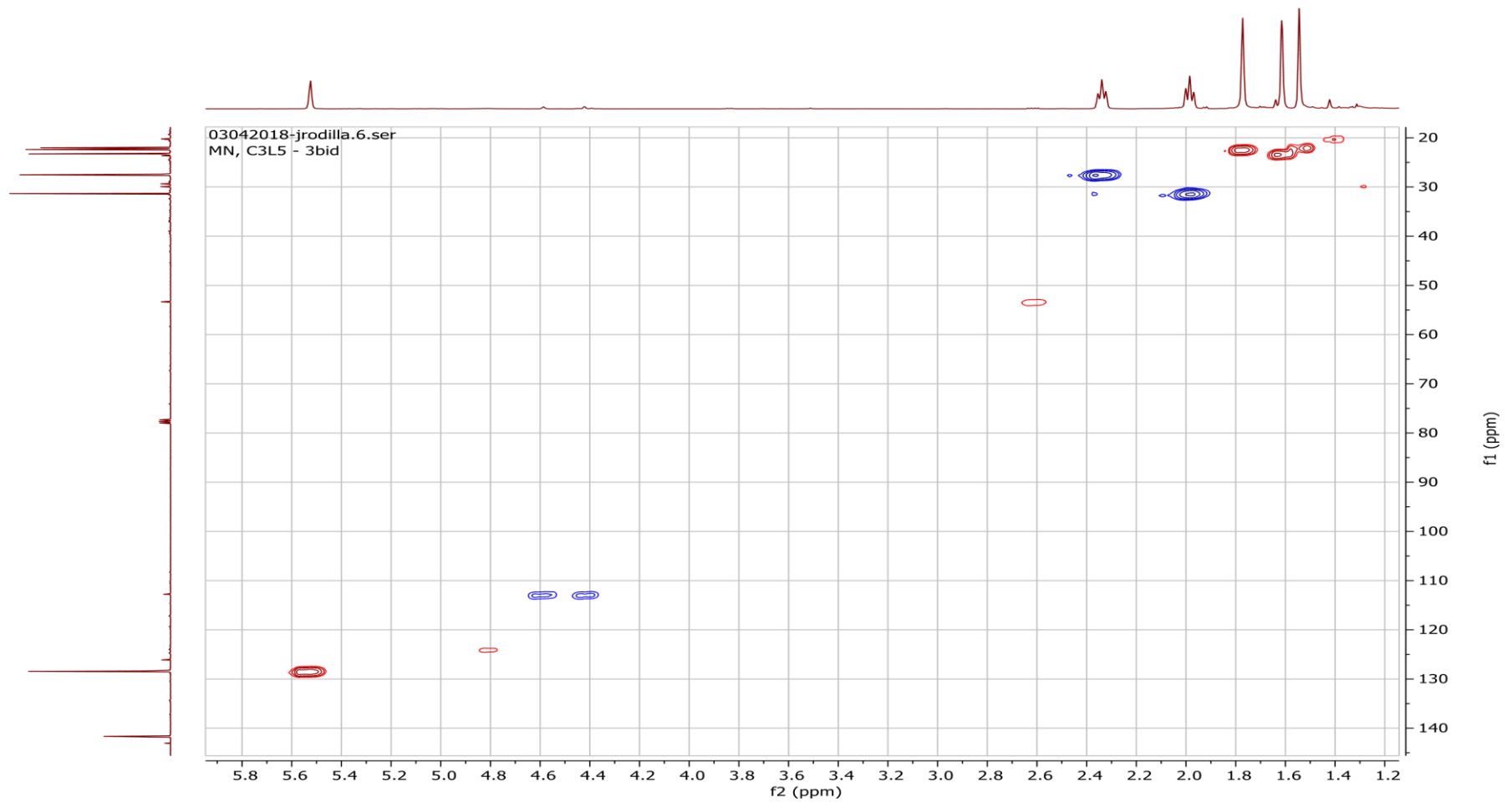
Espectro RMN DE ^1H



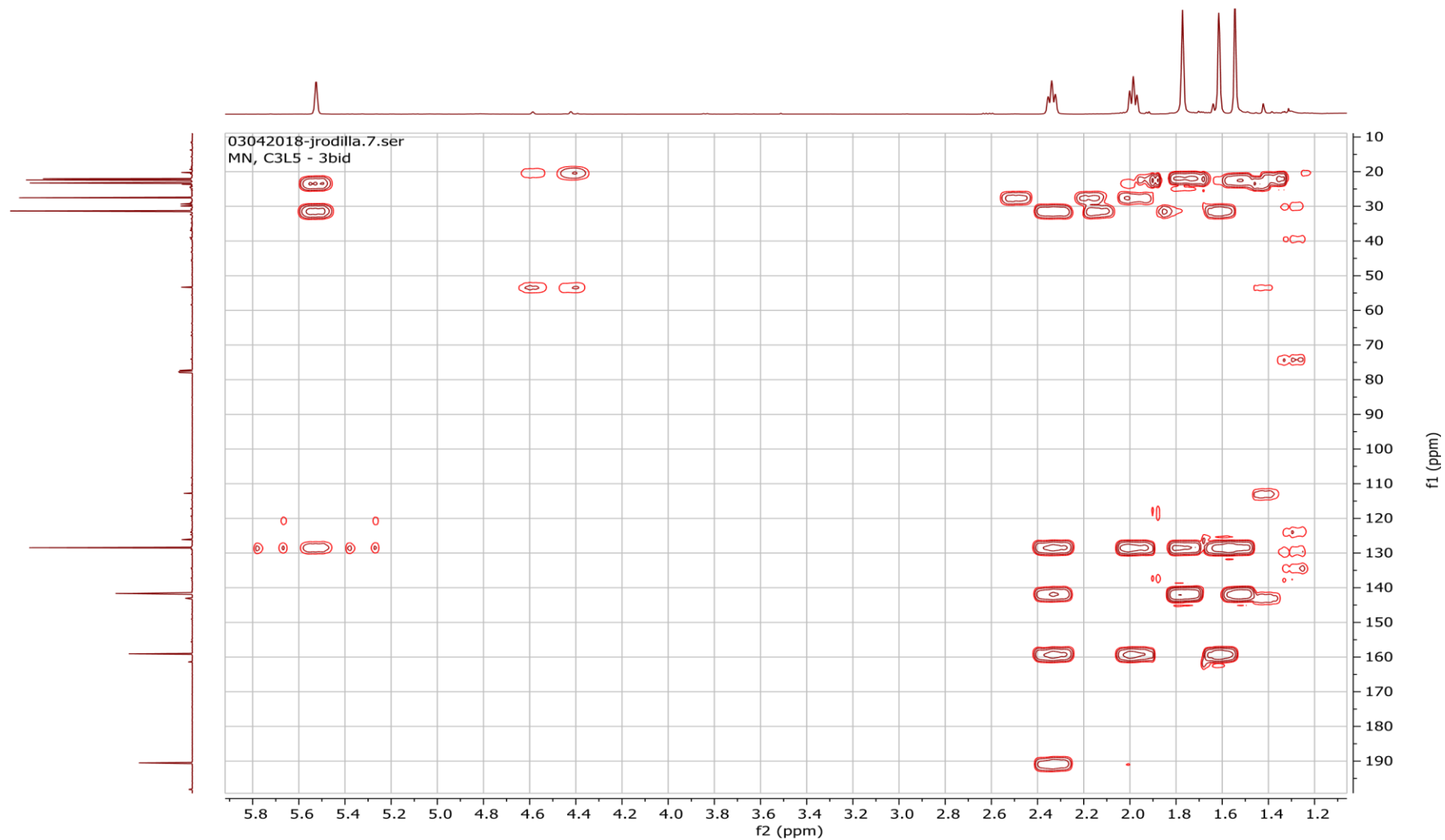
Espectro de RMN DE ^{13}C



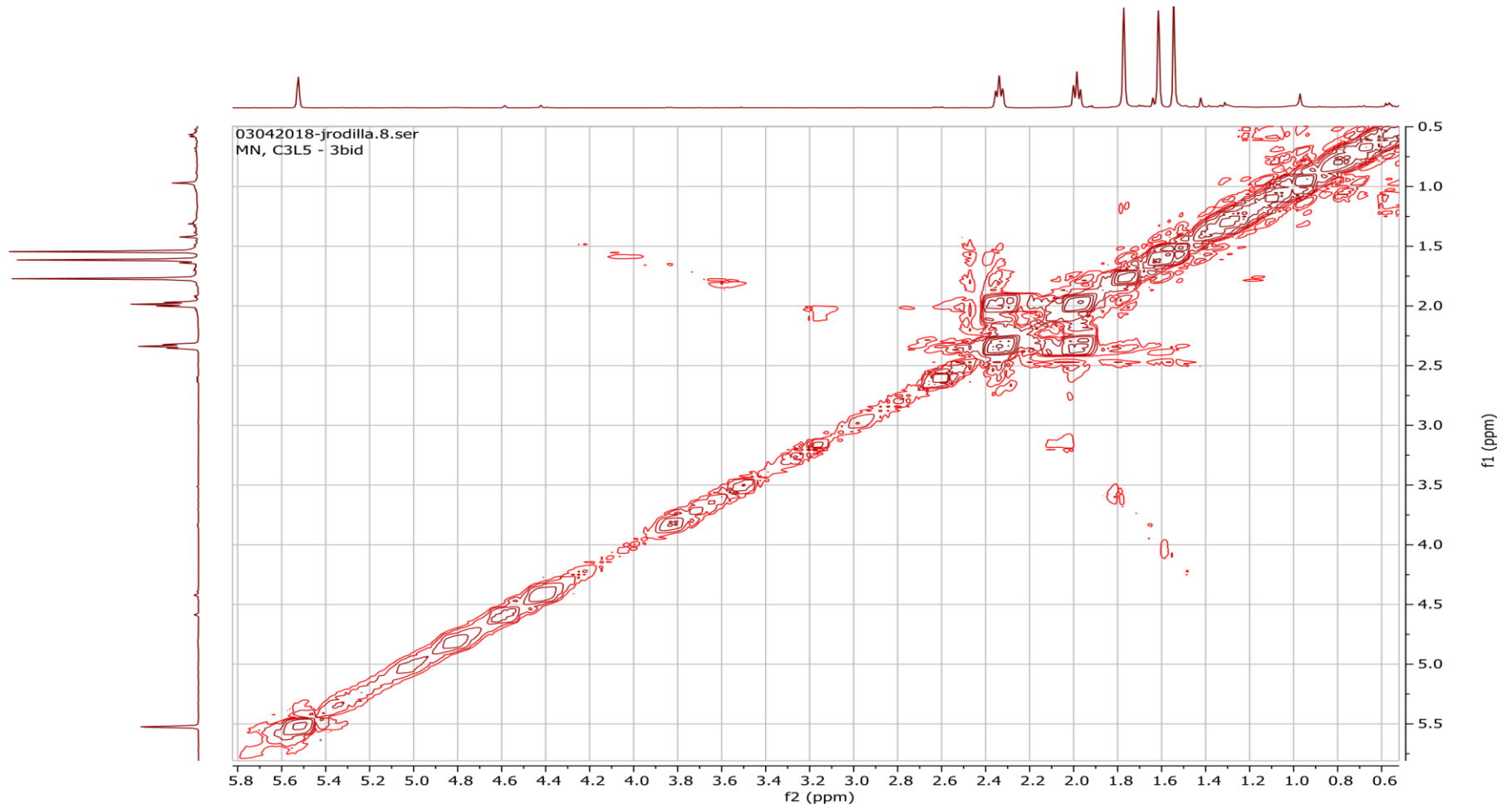
Correlações HSQC



Correlações HMBC

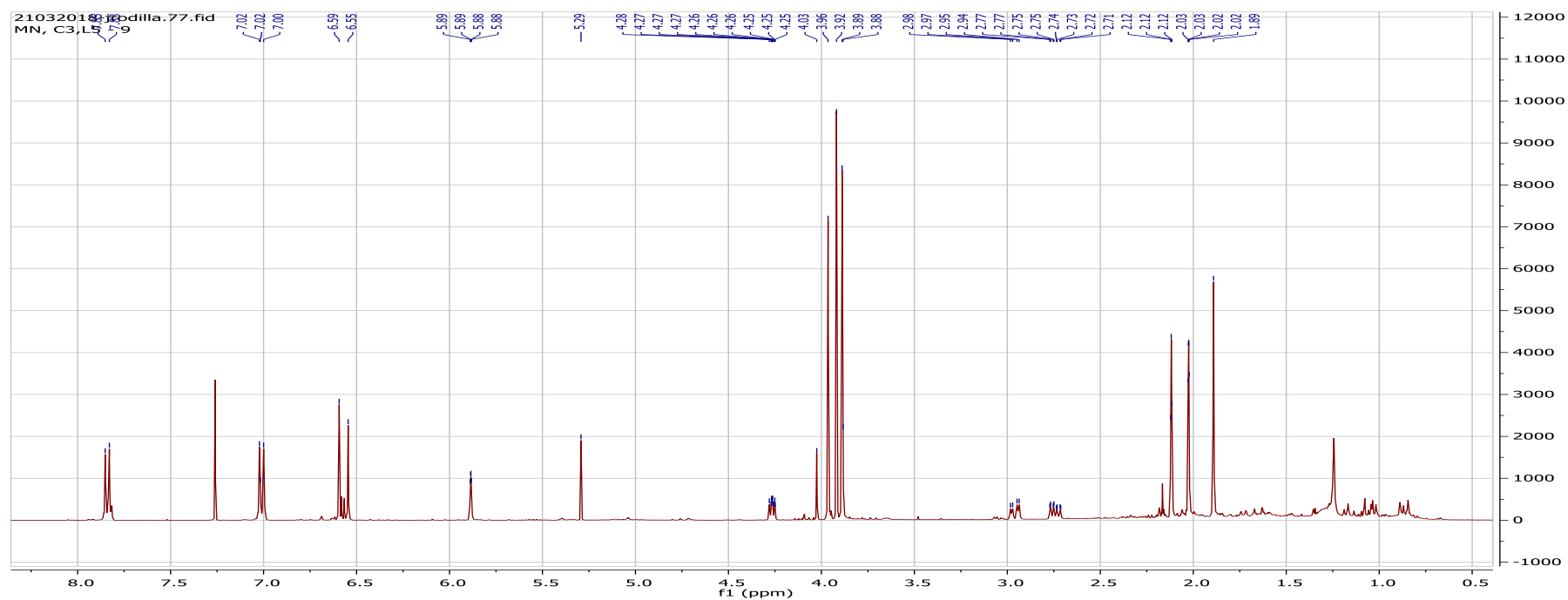


Correlações COSY



2. Espectro de RMN DE ^1H e ^{13}C de 5-hidroxi-6,7-dimetoxi-2-(4-metoxifenil)-4H-cromen-4-ona ou 5-hidroxi 6,7,4'-Trimetoxiflovona (salvigenina)

1. Espectro De RMN DE ^1H



Espectro de RMN de ^{13}C

