

RICARDO MARQUES MONTANARI

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS
DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DE
ANACARDIACEAE, SIPARUNACEAE E VERBENACEAE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

**VIÇOSA
MINAS GERAIS – BRASIL
2010**

RICARDO MARQUES MONTANARI

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DE
ANACARDIACEAE, SIPARUNACEAE E VERBENACEAE**

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do programa de Pós Graduação em Agroquímica, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Aprovada: 20 de dezembro de 2010

Prof.^a. Dr.^a. Vanderlúcia Fonseca de Paula

Prof. Dr. Nélio José de Andrade

Prof. Dr. Antônio Jacinto Demuner
(Co-orientador)

Prof. Dr. Antônio Lelis Pinheiro
(Co-orientador)

Prof. Dr. Luiz Cláudio de Almeida Barbosa
(Orientador)

*“O terrível instante
Antes de escrever, eu olho, assustado, para
a página branca de susto.”*

(Mário Quintana)

*Dedico aos meus maiores Mestres,
Maria José e Sebastião,
e ao meu companheiro de aprendizado
Rodrigo.*

AGRADECIMENTOS

Enquanto instituição, agradeço à Universidade Federal de Viçosa, e ao Departamento de Química, pela oportunidade de realização do curso. Personificando-os em seus funcionários e professores, agradeço a todos pela oportunidade de realização de um sonho! Obrigado pelos ensinamentos e por todos os anos de boa convivência.

Agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudo. Em nome do grupo, obrigado também ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) que sempre fomentaram as pesquisas do LASA. Obrigado especial aos professores Luiz Claudio, Demuner e Célia, pela constante dedicação em angariar estes recursos indispensáveis para a boa formação dos alunos.

Ainda ao professor Luiz Claudio de Almeida Barbosa, pela orientação, dedicação e compreensão durante este período, e por seu exemplo de profissionalismo e competência.

Aos Professores Antonio Jacinto Demuner e Antonio Lelis Pinheiro, pelo aconselhamento e pela ajuda indispensáveis e fundamentais para a realização desse trabalho.

Aos professores Nélio José de Andrade e Vanderlúcia Fonseca de Paula, além da comissão orientadora, pela participação amistosa na banca de defesa e por suas críticas, sugestões e correções de enorme contribuição para a melhoria do texto e de meu aprendizado.

Obrigado também professor Nélio pela confiança em permitir o uso de seu laboratório. A ajuda de todos do Laboratório de Higiene Industrial, em especial Larissa, Iara, Roberta e Junia, foi essencial para que grande parte do trabalho fosse realizada.

Aos professores Marco Aurélio Pedron e Silva, José Cambraia e Geraldo Luiz Gonçalves Soares, pela confiança em minha capacidade e pelo apoio e incentivo de minha busca por meu ideal.

Aos professores César Reis, Márcio, e Sergio, pela gentil permissão do uso de equipamentos e empréstimo de reagentes.

Novamente, agradeço a todos os funcionários, sem os quais nada seria realizado. Em especial, ao mestre José Luiz, pela extraordinária demonstração de boa vontade e pela ajuda imprescindível. Também a outros mestres da boa vontade, Sr. Leacir e D. Onesina, que nunca me negaram uma ajuda, um reagente, ou pelo menos um sorriso para fazer meu dia mais alegre.

Obrigado a todos os amigos e companheiros de bancada que compartilharam os dias, noites e madrugadas de trabalho. Em especial, às jovens mentes dispostas a aprender, Aline, Carlos Henrique, Silvana e Breno, que deram cada um a sua ajudinha rápida, porém de excelente qualidade.

Obrigado aos amigos Guilherme, Viviane, Tiago, Claudia, Eder, Luciana, Leandro, Leticia, Léo Chinês, Juliana Oliveira, Flaviane, Vânia Lacerda, Flaviano, Formigão, Leonel, Fred, Ulisses, Fabrício, Cleiton, Róbson, Vânia Valente, Lucas, Paula, Tiago, Ricardo Natalino, Rui, Juliana Lanna, Cassiano, Nega, Elba, Marcão, Jorge, Maria Miranda e vários outros, pelos momentos de descontração e boa convivência e, principalmente, pela amizade gratuita.

Abraço especial para amiga Katalin, pela parceria, e para seu digníssimo, Firmino, pela amizade.

Ao amigo Cleber José da Silva, cuja maestria na regência de suas relações contagia com harmonia a vida de todos que ele toca o coração.

Pensando na pérola rara que encontrei em minha vida, o título dessa seção se torna, no mínimo, humilde em significado. Lilian Berlini, gratidão é uma n -nésima fração do que sinto por você. Quando inventarem palavras para o que sinto, te conto baixinho ao pé do ouvido.

Além de um agradecimento especial, reforço a dedicatória ao meu irmão, que foi sempre uma peça fundamental para direcionar todo esse quebra-cabeça do meu aprendizado de vida.

Uma menção especial deve ser dada às duas pessoas espetaculares responsáveis pela minha existência física, moral e espiritual. Pai e Mãe, esse parágrafo vai pontuado por várias lágrimas de felicidade

Em fim, agradeço a todos que tiveram paciência comigo ao longo dessa jornada, que por vezes é estressante em seu percurso, porém é tão gratificante ao seu final.

Divido esse prazer que sinto agora com todos vocês!

CONTEÚDO

RESUMO	ix
ABSTRACT	xxii
INTRODUÇÃO GERAL	1
Referências	7
Capítulo 1	10
Óleos Essenciais	
RESUMO	10
ABSTRACT	12
1.1 Aspectos Históricos dos Óleos Essenciais	13
1.2 Composição Química dos Óleos Essenciais	15
1.2.1 Terpenóides	15
1.2.2 Fenilpropanóides	17
1.3 Origem Metabólica dos Óleos Essenciais	17
1.3.1 Biossíntese de Terpenóides	19
1.3.2 Biossíntese de Fenilpropanóides	22
1.4 Local de Produção dos Óleos Essenciais nos Vegetais	24
1.4.1 Estruturas Secretoras Externas	26
1.4.2 Estruturas Secretoras Internas	27
1.4.3 Importância do Estudo Anatômico das Plantas Aromáticas	28
1.5 Importância Ecológica dos Óleos Essenciais	29
1.6 Importância Econômica e Aplicações dos Óleos Essenciais	31
1.7 Óleos Essenciais na Agroquímica	33
1.8 Metodologias de Extração e Análise Química de Óleos Essenciais	34
1.9 Bactérias	35
1.10 Referências	39
2 Capítulo 2	43
COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE VERBENACEAE: FONTES ALTERNATIVAS DE (E)-CARIOFILENO E GERMACRENO-D	
RESUMO	43
ABSTRACT	45
2.1 Família Verbenaceae	46

2.2	Química e Etnofarmacologia de Verbenaceae	46
2.3	Experimental	53
2.3.1	Material Vegetal.....	53
2.3.2	Extração de Óleos Essenciais.....	54
2.3.3	Cromatografia em Fase Gasosa (CG)	54
2.3.4	Avaliação da Atividade Antibacteriana	55
2.4	Resultados e Discussão.....	57
2.4.1	Composição química dos óleos essenciais de Verbenaceae.	57
2.4.2	Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de Verbenaceae.....	65
2.5	Conclusões.....	68
2.6	Referências	69
3	Capítulo 3.....	75
	COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS	
	ÓLEOS ESSENCIAIS DE ANACARDIACEAE: PEROXIDAÇÃO DE	
	LIPÍDEOS EM CÉLULAS BACTERIANAS	
	RESUMO	75
	ABSTRACT.....	76
3.1	Família Anacardiaceae	77
3.2	Fitoquímica de Anacardiaceae	78
3.3	Atividade Antimicrobiana de Anacardiaceae.....	80
3.4	Experimental	82
3.4.1	Material Vegetal.....	82
3.4.2	Extração de Óleos Essenciais.....	82
3.4.3	Cromatografia em Fase Gasosa (CG)	83
3.4.4	Atividade Antibacteriana	84
3.5	Resultados e Discussão.....	86
3.5.1	Composição Química dos Óleos Essenciais de Anacardiaceae.....	86
3.5.2	Atividade Antibacteriana dos Óleos Essenciais de Anacardiaceae.....	88
3.6	Conclusões.....	94
3.7	Referências	95
4	Capítulo 4.....	100
	COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS	
	ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Siparuna guianensis</i> Aubl.: FONTES	
	ALTERNATIVAS DE α-BISABOLOL E α-TERPINOLENO	
	RESUMO	100
	ABSTRACT.....	101

4.1	Família Siparunaceae.....	102
4.2	Fitoquímica e Etnofarmacologia de Siparunaceae	103
4.3	Experimental	105
4.3.1	Material Vegetal.....	105
4.3.2	Extração de Óleos Essenciais.....	105
4.3.3	Cromatografia em Fase Gasosa (CG)	106
4.3.4	Avaliação da Atividade Antibacteriana	107
4.3.5	Avaliação da Atividade Antifúngica - CIM.....	109
4.4	Resultados e Discussão.....	111
4.4.1	Composição química dos óleos essenciais de <i>S. guianensis</i>	111
4.4.2	Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de <i>S. guianensis</i>	115
4.4.3	Atividade antifúngica do óleo essencial de <i>S. guianensis</i>	117
4.5	Conclusões.....	119
4.6	Referências	120
5	Capítulo 5.....	124
	ATIVIDADE FITOTÓXICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ANACARDIACEAE: PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS EM RADÍCULAS DE PEPINO E CEBOLA	
	RESUMO	124
	ABSTRACT.....	124
5.1	Atividade Fitotóxica de Óleos Essenciais	126
5.2	Atividade Fitotóxica de Anacardiaceae.....	127
5.3	Experimental	128
5.3.1	Óleos Essenciais.....	128
5.3.2	Avaliação da Atividade Fitotóxica.....	128
5.3.3	Peroxidação de Lipídeos em Radículas.....	130
5.4	Resultados e Discussão.....	131
5.4.1	Crescimento Inicial das Radículas	131
5.4.2	Peroxidação de Lipídeos em Radículas.....	137
5.5	Conclusões.....	140
5.6	Referências	141
	Conclusões Gerais.....	143
	Apêndice	144

RESUMO

MONTANARI, Ricardo Marques, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, dezembro de 2010. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae.** Orientador: Luiz Cláudio de Almeida Barbosa. Co-orientadores: Antônio Jacinto Demuner e Antônio Lelis Pinheiro.

Determinou-se a composição química dos óleos essenciais das Verbenaceae: *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers., *Lippia brasiliensis* (Link) T. Silva, *Lippia* sp., *Lantana camara* L., *Lantana trifolia* L. e *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger e suas constituições químicas foram determinadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Foi avaliada a atividade antimicrobiana desses os óleos. Observou-se que os óleos essenciais das espécies *Aloysia virgata*, *Lippia brasiliensis*, *Lippia* sp., *Lantana camara*, *Lantana trifolia* e *Lantana montevidensis*, coletadas em Minas Gerais, possuem constituição química variada e compostas em grande parte por substâncias sesquiterpênicas. É possível observar um padrão referente às concentrações relativas dos constituintes majoritários em relação aos gêneros das plantas estudadas. As plantas do gênero *Lippia* apresentam maior concentração de (*E*)-cariofileno que de germacreno-D, enquanto as plantas dos gêneros *Lantana* e *Aloysia* apresentam maior concentração de germacreno-D em relação ao (*E*)-cariofileno. Observa-se também que o óleo da espécie *Lippia brasiliensis* possui ligeira alteração de constituição ao longo das estações, apresentando maiores concentrações de constituintes oxigenados durante o período frio e seco do ano. Para as espécies *Lippia brasiliensis*, *Lantana camara* e *Lantana trifolia*, os óleos extraídos das flores apresentam maiores concentrações de constituintes monoterpênicos que os óleos extraídos das folhas. O óleo extraído das folhas da espécie *Lantana camara* não apresentou atividade contra as bactérias estudadas. Os óleos extraídos das folhas das espécies *Aloysia virgata*, *Lippia brasiliensis*, *Lantana trifolia* e *Lantana montevidensis* apresentaram atividade moderada contra as cepas de bactérias Gram-positivas *B. cereus* e *S. aureus*. Apenas o óleo extraído das folhas da espécie *A. virgata* foi ativo contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*. Para os óleos extraídos das Anacardiaceae *Anacardium humile* Engl., *Anacardium occidentale* L., *Astronium fraxinifolium* Schott ex Spreng.,

Myracrodruon urundeuva Allemão, e *Schinus terebinthifolius* Raddi, observou-se que as constituições químicas foram bastante distintas. Os óleos das espécies *A. humile* e *A. occidentale* não apresentaram atividade contra as bactérias estudadas. Os óleos das espécies *A. fraxinifolium*, *M. urundeuva* e *S. terebinthifolius* apresentaram atividades moderadas contra as cepas de bactérias utilizadas. A época de coleta da espécie *S. terebinthifolius* altera a atividade antibacteriana do óleo essencial extraído de suas folhas. Os óleos das espécies *A. fraxinifolium*, *M. urundeuva* e *S. terebinthifolius*, e o monoterpeneo δ -3-careno provocam aumento na peroxidação de lipídeos em células de bactérias. A atividade antibacteriana do óleo de *M. urundeuva* pode estar relacionada com a alta concentração do monoterpeneo δ -3-careno. Os teores obtidos no período de maio de 2009 a maio de 2010 para o óleo essencial de *Siparuna guianensis* permaneceram entre 4,5 e 7,0%. O período de menor rendimento do óleo, setembro a novembro, é coincidente com o período fenológico em que as plantas passam por uma desfolha natural drástica. Dois constituintes, o monoterpeneo α -terpinoleno e o álcool sesquiterpênico α -bisabolol, representaram, em conjunto, cerca de 80% do óleo durante todo o ano. Em geral, o composto α -bisabolol promoveu maiores zonas de inibição das bactérias *E. coli*, *B. cereus* e *S. aureus*, que o óleo essencial. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) demonstram que o óleo de *S. guianensis* e o padrão comercial de α -bisabolol inibiram o crescimento das cepas de bactérias testadas em concentrações expressivamente baixas (8 – 63 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O acúmulo de aldeído malônico (MDA) indica que os danos pró-oxidantes, que resultam na peroxidação de lipídeos, estão provavelmente relacionados como os mecanismos de ação antibacteriana destes óleos essenciais. A CIM contra os fungos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trychophyton rubrum* e *Aspergillus fumigatus* indicam que o óleo de *S. guianensis* inibiu o crescimento das cepas de fungos em concentrações reduzidas, principalmente para o fungo *Cryptococcus neoformans* (16 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os óleos das espécies *A. fraxinifolium*, *M. urundeuva* e *S. terebinthifolius* apresentaram atividades fitotóxica contra o crescimento inicial das radículas de sorgo e pepino. A ação fitotóxica do óleo de *M. urundeuva* pode estar relacionada com a alta concentração do monoterpeneo δ -3-careno. O acúmulo de aldeído malônico (MDA) nas radículas de pepino e cebola indicam que os óleos e o monoterpeneo δ -3-careno promoveram aumento da peroxidação de lipídeos. Os níveis de peroxidação foram semelhantes

para os óleos e o padrão de δ -3-careno nas radículas de pepino, porém, para radículas de cebola, os óleos essenciais apresentaram efeito superior ao monoterpeno.

ABSTRACT

MONTANARI, Ricardo Marques, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, December, 2010. **Chemical composition and biological activities of the essential oils from Anacardiaceae, Siparunaceae and Verbenaceae species.** Adviser: Luiz Claudio de Almeida Barbosa. Co-advisers: Antônio Jacinto Demuner and Antônio Lelis Pinheiro.

Chemical Composition and Antibacterial activity of Verbenaceae Essential Oils: Alternative sources of (E)-Caryophyllene and Germacrene-D. Essential oils from the leaves of Verbenaceae species *Aloysia virgata*, *Lantana camara*, *Lantana trifolia*, *Lantana montevidensis*, *Lippia brasiliensis* and *Lippia* spp., were investigated for its chemical composition and antibacterial activity. The volatile oils were characterized by a high content of sesquiterpenes of which (*E*)-caryophyllene (10-35%), germacrene-D (5-46%) and bicyclogermacrene (7-17%) were the major components for all studied species. For the flowers, a higher concentration of monoterpenes was observed for the species *L. camara*, *L. trifolia* and *L. brasiliensis*, probably working as attractive to specific pollinators. The oil from *A. virgata* was the most active, exhibiting high antimicrobial activity against the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *Chemical Composition and Antibacterial Activity of Anacardiaceae Essential Oils: Lipid Peroxidation on Bacterial Cell.* The chemical composition and the antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative foodborne bacteria were assessed for the essential oils from five Anacardiaceae species. The major constituents in *Anacardium humile* leaves oil are (*E*)-caryophyllene (31%), α -pinene (22%) and bicyclogermacrene (7.6%). The major compounds identified for the *Anacardium occidentale* oil were (*E*)-caryophyllene (15.4%), germacrene-D (11.5%) and α -copaene (10.3%). *A. fraxinifolium* leaves essential oil presented (*E*)- β -ocimene (44.1%), α -terpinolene (15.2%) and viridiflorene (9.0%) as major constituents. *Myracrodruon urundeuva* presented δ -3-carene at 78.8%. *S. terebinthifolius* leaves oil collected in March and July presented different chemical composition. The oil of all tested species, except *A. occidentale*, exhibited varying levels of antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *S. terebinthifolius* oil extracted in July

was more active against all bacterial strains than the oil extracted in March. *M. urundeuva* oil showed great antibacterial activity and it may be related to the high concentration of δ -3-carene. The amounts of malondialdehyde (MDA) in bacterial cells indicate that essential oils promote lipid peroxidation. The results suggest that prooxidant damages on cell membrane should play important role in the mechanism of antibacterial action of these natural compounds. The study of its mechanism of action becomes an outstanding issue for further studies. The levels obtained during the period May 2009 to May 2010 for the essential oil *Siparuna guianensis* remained between 4.5 and 7.0%. The period of lower oil yield, from September to November, is coincident with the phenological period in which the plants undergo a dramatic natural defoliation. Two components, the monoterpene α -terpinolene and α -bisabolol, bisabolol alcohol, together accounted about 80% of the oil throughout the year. In general, the compound α -bisabolol promoted larger zones of inhibition of the bacteria *E. coli*, *B. cereus* and *S. aureus*, the essential oil. The minimum inhibitory concentrations (MIC) show that the oil of *S. guianensis* and trade pattern of α -bisabolol inhibited the growth of bacterial strains tested at concentrations significantly lower (8-63 mg mL⁻¹). The accumulation of malondialdehyde (MDA) shows that the damage pro-oxidants, which result in lipid peroxidation, are probably related to the mechanisms of antibacterial action of essential oils. The MIC against fungi *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* *Trychophyton rubrum* and indicate that the oil of *S. guianensis* inhibit the growth of fungal strains in low concentrations, especially for the fungus *Cryptococcus neoformans* (16 mg mL⁻¹). The essential oils from *A. fraxinifolium*, *M. urundeuva* e *S. terebinthifolius* showed phytotoxic activity against the initial growth of radicles of cucumber and sorghum. The phytotoxic action of the oil of *M. urundeuva* may be related to the high concentration of monoterpene δ -3-carene. The accumulation of malondialdehyde (MDA) in radicles of cucumber and onion oils indicate that monoterpene and δ -3-carene promoted increased lipid peroxidation. Peroxidation levels were similar for the oils and the pattern of δ -3-carene in the radicles of cucumber, but for onion root tips, essential oils showed a superior effect to monoterpene.

INTRODUÇÃO GERAL

Desde que deixamos de ser nômades caçadores e coletores, há mais de dez mil anos, e passamos a fixar residência nas proximidades de plantações rudimentares de cereais, como trigo e cevada, a necessidade de otimização da eficiência agrícola se tornou uma característica ubíqua da humanidade. Ao longo desses milhares de anos, o aprimoramento das técnicas culturais e o melhoramento genético das plantas cultivadas possibilitaram a expansão demográfica devido ao fornecimento de alimento à população mundial constantemente em crescimento.

A partir de meados do século passado, a utilização de agroquímicos nas lavouras se tornou um dos meios mais eficazes para minimizar as perdas decorrentes do ataque de diversas pragas e doenças. Este fato é ratificado pela ampla variedade de formulações químicas que foram desenvolvidas e comercializadas pelas companhias agroquímicas desde a introdução do ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (**Figura 1**), em 1946, pelo grupo de pesquisadores da Rothamsted Experimental Station, na Inglaterra (Tomlin, 1994; Böger *et al.*, 2002).

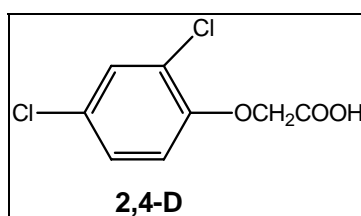


Figura 1 – Estrutura do Ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D)

Desde então, avanços importantes foram conseguidos no controle químico de pragas e doenças. Entretanto, a pressão seletiva imposta pela aplicação contínua e indiscriminada de produtos com o mesmo mecanismo de ação tem favorecido a emergência de insetos, microrganismos e plantas daninhas resistentes às formulações comerciais existentes (Devine e Shukla, 2000; Preston, 2004; Owen e Zelaya, 2005). Portanto, a descoberta de novos agentes de proteção para culturas e produtos armazenados é altamente desejável, principalmente de compostos que possuam mecanismos de ação distintos daqueles das substâncias comercialmente disponíveis.

Em adição, a preocupação com os impactos ambientais das práticas agrícolas e com a conservação de alimentos e produtos industrializados tem pressionado as pesquisas, tanto privadas quanto acadêmicas, para o desenvolvimento de agentes químicos mais seguros ambientalmente. Neste sentido, baixa toxicidade, alta especificidade, eficiência em baixa dosagem e baixa persistência no ambiente são, portanto, características importantes para serem consideradas no desenvolvimento de novos agentes agroquímicos.

As estratégias atualmente empregadas para a identificação de novos agentes agroquímicos são semelhantes àquelas utilizadas no âmbito farmacêutico para produção de novos fármacos (Short, 2005). Distinguem-se três abordagens principais. Uma delas se processa pela avaliação sistemática de inúmeras substâncias aleatoriamente sintetizadas, visando à seleção de algumas substâncias com a atividade desejada. Em seguida, os pesquisadores procuram aperfeiçoar as estruturas químicas dessas substâncias no sentido de obterem compostos mais seletivos e ativos em menores concentrações. Esta tem sido a estratégia mais utilizada pelas companhias agroquímicas e farmacêuticas (Kropff e Walter, 2000).

Outra estratégia é a modelagem racional, baseada em dados teóricos e empíricos, de inibidores específicos para processos metabólicos chaves (Lein *et al.*, 2004). Entretanto, tal abordagem não tem demonstrado muitos êxitos.

Uma terceira estratégia está associada com a aplicação de produtos naturais como agentes de proteção, ou sua utilização como modelos para o desenvolvimento de novos produtos (Godfrey, 1994; Copping, 1996; Duke *et al.*, 2000; Duke *et al.*, 2002). Com efeito, um número crescente de produtos naturais tem sido descrito e revisado na literatura como modelos potenciais para o desenvolvimento de agroquímicos, incluindo terpenóides, flavonóides, alcalóides e outras classes de compostos secundários (Barbosa *et al.*, 2008; Isman, 2000; Macías *et al.*, 1999; Macías *et al.*, 2000; Macías *et al.*, 2007; Viegas-Júnior, 2003; Vyvyan, 2002).

Alguns princípios ativos de agroquímicos comerciais foram descobertos e desenvolvidos segundo esta última abordagem. O herbicida organofosforado bialafos (L-fosfínotricil-L-alanil-L-alanina) (**Figura 2**) foi originalmente isolado dos actinomicetos *Streptomyces viridochromogenes* e *S. hygroscopicus* (Saxena e Pandey, 2001) e atualmente é comercializado no Japão com o nome Herbiace[®]. Bialafos corresponde a um pró-herbicida que é convertido nas plantas daninhas para

o ingrediente ativo fosfotricina após a remoção dos resíduos de alanina por peptidases. A fosfotricina é um análogo do glutamato que atua como inibidor irreversível da enzima glutamina sintetase, levando a um acúmulo de amônia e à intoxicação da célula (Stalker, 1991). O sal racêmico de amônio deste composto é conhecido como glifosinato e constitui o princípio ativo de vários produtos comerciais como Liberty[®], Basta[®], Ignite[®] e Challenge[®]. Outro composto estruturalmente muito semelhante a estes é o glifosato, ingrediente ativo do produto Roundup[®] comercializado pela Companhia Monsanto. Este produto é provavelmente o herbicida mais comercializado no mundo atualmente.

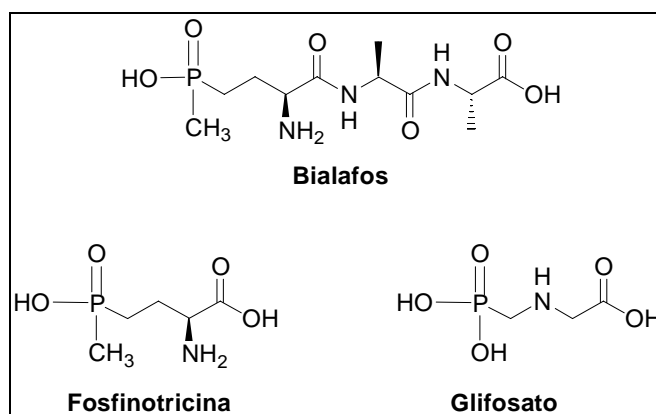


Figura 2 – Exemplos de agroquímicos comerciais derivados de produtos naturais

Terpenóides com atividades inseticidas também são bons exemplos da aplicação de produtos naturais como modelos para agroquímicos. Economicamente, o grupo mais importante de inseticidas naturais é o das piretrinas, representado por seis ésteres com estruturas químicas semelhantes que são extraídos das flores de crisântemo, ou piretro, *Chrysanthemum cinerariaefolium* (Asteraceae). O piretro era utilizado desde o século XVIII, na Pérsia e na antiga Iugoslávia, e a partir de 1828 passou a ser processado comercialmente para controle de insetos. Em 1939, os Estados Unidos chegaram a importar cerca de sete mil toneladas desta planta. O uso deste produto natural, entretanto, declinou na década de 1950 em consequência dos avanços na síntese de análogos de piretróides, como as aletrinas, que são mais estáveis e efetivos (Viegas-Júnior, 2003).

Tais exemplos ratificam a assertiva de que a riqueza e a complexidade estrutural dos produtos naturais oferecem um substrato inesgotável para a busca de substâncias bioativas, especialmente de interesse agrônomo. Os metabólitos especiais biossintetizados pelas plantas desempenham papéis importantes como mediadores moleculares de interações ecológicas. As diferentes pressões seletivas, impostas por diferentes cenários evolutivos, levaram à produção da fantástica variabilidade e complexidade estrutural destas substâncias. Uma grande parcela desses compostos adquiriu funções protetoras, como resultado de milhões de anos de co-evolução das plantas com inúmeros microrganismos patogênicos, insetos fitófagos e outros animais herbívoros, bem como outras plantas competidoras por recursos. Desta forma, existe grande probabilidade de se encontrar atividades biológicas de interesse agrônomo, como inseticida, antimicrobiana e herbicida, em produtos naturais racionalmente isolados.

Nas últimas décadas, o desenvolvimento de ensaios biológicos rápidos e confiáveis permitiu o estudo de inúmeras atividades biológicas dos extratos e compostos naturais isolados. A aplicação destes ensaios alavancou as pesquisas em Química de Produtos Naturais, fornecendo novas ferramentas para a racionalização e direcionamento das metodologias de extração e isolamento de substâncias bioativas de interesse.

Neste contexto, a flora brasileira se apresenta como uma fonte extremamente fecunda de tais substâncias, devido à exuberância de sua biodiversidade. O Brasil está incluído entre os 17 países com maior índice de biodiversidade do planeta, denominados “Países Megadiversos afins”, que, em conjunto, são responsáveis por 70% da biodiversidade do mundo, conforme a “Declaração de Cancun”, de 18 de fevereiro de 2002 (Peixoto e Morin, 2003). Os 8,5 milhões de km² brasileiros abrigam mais de 55 mil espécies de plantas superiores catalogadas, com uma riqueza inimaginável de substâncias praticamente desconhecidas do ponto de vista químico (Gottlieb e Borin, 1997).

As plantas produtoras de óleos essenciais figuram com destaque na paisagem da biodiversidade inexplorada do Brasil e do mundo. Segundo Bakkali *et al.* (2008), aproximadamente três mil óleos essenciais são bem conhecidos atualmente. Destes, apenas cerca de 300 são de grande importância comercial, especialmente para as indústrias farmacêutica, agrônoma, alimentícia, sanitária e cosmética. Óleos

essenciais, notadamente das famílias Myrtaceae e Lamiaceae, mas também de outras famílias, têm sido tradicionalmente utilizados como protetores na cultura e estocagem de grãos e hortifrutícolas (Isman, 2000).

Na natureza, os óleos essenciais desempenham papéis ecológicos importantes na proteção das plantas, por atuarem como antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra herbívoros, pois podem reduzir a palatabilidade das plantas que os produzem. Devido a essas propriedades, principalmente a antimicrobiana, o uso dos óleos essenciais nas indústrias farmacêutica, cosmética e alimentícia está se difundindo cada vez mais como alternativa aos produtos sintéticos.

Em adição, nas décadas recentes, os antimicrobianos de origem natural têm ganhado atenção especial devido à resistência aos antibióticos usuais que alguns microrganismos têm adquirido (Essaw e Srour, 2000). Como consequência, as pesquisas para identificação e avaliação de produtos naturais antimicrobianos se tornaram objetos de relevância acadêmica e industrial em todo globo.

Acoplado a esse paradigma está o crescente emprego dos óleos essenciais como alternativas aos produtos bactericidas e fungicidas sintéticos. Além de suas propriedades antimicrobianas, a ampla utilização dos óleos voláteis na indústria farmacêutica e alimentícia reflete a importância das pesquisas básica e aplicada sobre este grupo de metabólitos especiais dos vegetais.

Com este enfoque, realizou-se uma investigação sistemática da literatura científica a respeito da etnofarmacologia e fitoquímica de algumas famílias ocorrentes em Minas Gerais. Os dados obtidos constituíram indicativos pertinentes para a eleição das famílias Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae como fontes promissoras de produtos naturais para a avaliação do potencial de aplicação agroquímica.

A família Anacardiaceae é amplamente representada no Brasil por várias espécies de importância econômica produtoras de frutos e óleos essenciais. Vários estudos fitoquímicos e relatos de atividades de interesse como antimicrobiana e fitotóxica existem. Porém, menos de 7% das espécies conhecidas desta família possuem estudos fitoquímicos e de atividades biológicas (Correia *et al.*, 2006).

A família Siparunaceae ocorre em toda América do Sul, porém é um grupo taxonômico peculiar composto por apenas dois gêneros. Uma de suas principais

espécies, *Siparuna guianensis* Aubl., possui uma vasta indicação etnobotânica e etnofarmacológica, e tem sido apontada como uma das espécies prioritárias de conservação para a região do cerrado brasileiro (Vieira e Alves, 2003).

A família Verbenaceae se destaca pela ampla distribuição no Brasil, sendo que a Cadeia do Espinhaço, nos Estados de Minas Gerais e Goiás, representa um dos maiores centros de diversidade dos seus principais gêneros (Salimena, 2000). Nesta região se encontram várias espécies endêmicas para as quais existe pouco ou nenhum estudo fitoquímico até o momento, além de estarem em risco de extinção, devido à vulnerabilidade do local (Viccini *et al.*, 2006).

Enfim, em adição a este tipo de abordagem racional para a busca de compostos naturais bioativos, o conhecimento das espécies destas famílias ocorrentes em Minas Gerais e a avaliação de atividades biológicas de seus compostos fornecem subsídios fundamentais para a valorização destes recursos naturais. Tal valorização, focada na aplicação farmacobiológica dos metabólitos secundários, é um elemento fundamental para a conservação dos recursos genéticos dos diversos biomas ocorrentes em Minas Gerais e no Brasil.

Portanto, o presente trabalho teve como objetivos principais realizar a extração, determinar a composição química e avaliar atividades biológicas de interesse agroquímico dos óleos essenciais de espécies das famílias Verbenaceae, Anacardiaceae e Siparunaceae coletadas em diferentes regiões de Minas Gerais.

Referências

- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.* 46, 446-475.
- Barbosa, L. C. A., Teixeira, R. R., Montanari, R. M. (2008). **Phytotoxic natural products as models for the development of crop protection agents.** *In:* Epifano, F. (Org.). *Current Trends in Phytochemistry*. Kerala: Research Singpost, v. 1, 21-59.
- Böger, P., Wakabayashi, K., Hirai, K. (2002). *Herbicide Classes in Development. Mode of Action, Targets, Genetic Engineering, Chemistry*. Berlin: Springer-Verlag.
- Copping, L.G. (1996). *Crop Protection Agents from Nature*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Correia, S. J., David, J. P., David, J. M. (2006). Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. *Quim. Nova.* 29(6), 1287-1300.
- Devine, M., Shukla, A. (2000). Altered target sites as a mechanism of herbicide resistance. *Crop Protection.* 19, 881-889.
- Duke, S. O., Dayan, F. E., Rimando, A. M., Schrader, K. K., Aliotta, G., Oliva, A., Romagni, J. G. (2002). *Weed Sci.* 50, 138-151.
- Duke, S. O., Dayan, F. E., Romagni, J. G., Rimando, A. M. (2000). *Weed Res.*, 40, 99-111.
- Essawi, T. e Srour, M., (2000). Screening of some Palestinian medicinal plants for antibacterial activity. *J. Ethnopharmacol.* 70, 343.
- Godfrey, C. R. A. (1994). *Agrochemicals from Natural products*. New York: Marcel Dekker.
- Gottlieb, O. R. e Borin, M. R. M. B. (1997). Natural products research in Brazil. *Ciência & Cultura.* 49, 315-320.
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection.* 19, 603-608.

- Kropff, M. J., Walter, H. (2000). EWRS and the challenges for weed research at the start of a new millennium. *Weed Res.* 40, 7-10.
- Lein, W., Börnke, F., Reindl, A., Ehrhardt, T., Stitt, M., Sonnewald, U. (2004). Target-based discovery of novel herbicides. *Curr. Opin. Plant Biol.* 7, 219-225.
- Macías, F. A., Galindo, J. C. G., Castellano, D., Velasco, R. F. (1999). Sesquiterpene lactones with potential use as natural herbicide models (I): *trans,trans*-germacranolides. *J. Agric. Food. Chem.*, 47, 4407-4414.
- Macías, F. A., Galindo, J. C. G., Castellano, D., Velasco, R. F. (2000). Sesquiterpene Lactones with Potential Use as Natural Herbicide Models (II): Guaianolides. *J. Agric. Food Chem.*, 48, 5288-5296.
- Macías, F. A., Molinillo, J. M. G., Varela, R. M., Galindo, J. C. G. (2007). Allelopathy – A natural alternative for weed Control. *Pest Manag. Sci.*, 63, 327-348.
- Owen, M. D. K., Zelaya, I. A. (2005). Herbicide-resistant crops and weed resistance to herbicides. *Pest. Manag. Sci.* 61, 301-311.
- Peixoto, A. L., Morim, M. P. (2003). Coleções botânicas: documentação da biodiversidade brasileira. *Cienc. Cult.* 55 (3), 21-24.
- Preston, C. (2004). Herbicide resistance in weeds endowed by enhanced detoxification: complications for management. *Weed Sci.* 52, 448-453.
- Salimena, F. R. G. (2000). *Revisão taxonômica de Lippia L. sect. Rhodolippia Schauer (Verbenaceae)*. São Paulo: Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo.
- Saxena, S., Pandey, A. K. (2001). Microbial metabolites as eco-friendly agrochemicals for the next millennium. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 55, 395-403.
- Short, P. L. (2005). Growing agrochemical research and development. *Chem. Eng. News.* 83, 19-22.
- Stalker, D. M. In: Plant Genetic Engineering, Ed.: Grierson, D. Blackie pp.82-104, 1991.

- Tomlin, C. (Ed.). (1994). *The Pesticide Manual*. Cambridge: Royal Society of Chemistry.
- Viccini, L. F., Pierre, P. M. O., Praça, M. M., Costa, D. C. S., Romanel, E. C., Sousa, S. M., Peixoto, P. H. P., Salimena, F. R. G. (2006). Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). *Plant Systematics and Evolution*. 256, 171-178.
- Viegas-Júnior, C. (2003). Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. *Quim. Nova*. 26(3), 390-400.
- Vieira, F. R.; Alves, R. B. N. (2003). **Desafios para a conservação de recursos genéticos de plantas medicinais e aromáticas no Brasil**. In: Coelho, M. F. B. et al. (Eds.). *Diversos olhares em etnobiologia, etnoecologia e plantas medicinais*. Cuiabá: UNICEN Publicações.
- Vyvyan, J. R. (2002). Allelochemicals as leads for new herbicides and agrochemicals *Tetrahedron*, 58, 1631-1646.

Capítulo 1

Óleos Essenciais

RESUMO

Os óleos essenciais são misturas de metabólitos secundários voláteis responsáveis pelo aroma das plantas aromáticas. Eles podem ser elaborados nos diversos órgãos das plantas e, apesar do caráter lipofílico que possuem, são quimicamente diferentes dos óleos fixos constituídos principalmente por triacilglicerídeos.

Quimicamente, em sua maioria são constituídos de substâncias terpênicas, acrescidos de moléculas menores, como alcoóis, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curta. O perfil terpênico apresenta normalmente substâncias constituídas de moléculas de dez e de quinze carbonos, monoterpenos e sesquiterpenos, respectivamente. Os terpenos são biossintetizados a partir da condensação de unidades de cinco carbonos, o difosfato de isopentenila (IPP) e o difosfato de dimetilalila (DMAPP), derivadas, em grande parte, da rota biossintética do ácido mevalônico. Posteriormente as estruturas básicas dos terpenos podem ser modificadas por reduções, oxidações e ciclizações.

Estão associados a várias funções necessárias à sobrevivência do vegetal em seu ecossistema, exercendo papel fundamental na defesa contra microorganismos e predadores, e também na atração de insetos e outros agentes polinizadores.

De acordo com o grupo taxonômico ao qual pertencem, as diversas espécies de plantas acumulam esses elementos voláteis em órgãos anatômicos específicos, como, por exemplo, tricomas glandulares e cavidades secretoras.

Entre os principais métodos de extração de óleos essenciais estão a hidrodestilação, a destilação por arraste de vapor d'água e a extração com CO₂ supercrítico. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas constitui atualmente umas das técnicas mais utilizadas para a identificação dos constituintes dos óleos essenciais.

Do ponto de vista econômico, os óleos essenciais de plantas são fonte de substâncias de usos variados nas indústrias farmacêutica, alimentícia, de cosméticos, para produção de sabões, perfumes, desinfetantes, artigos de toalete, dentre outros. Essas aplicações se devem aos seus odores e sabores característicos, bem como às suas variadas atividades biológicas como bactericida, fungicida, inseticida e outras.

ABSTRACT

Essential oils are mixtures of volatile secondary metabolites responsible for the aroma of herbs. They can be produced in various organs of plants and, although the lipophilic character they possess, are chemically different from fixed oils consist mainly of triglycerides.

Chemically, most of them consist of substances terpenic plus smaller molecules such as alcohols, esters, aldehydes and ketones short chain. The profile normally has terpene substances consisting of molecules of ten to fifteen carbons, monoterpenes and sesquiterpenes, respectively. The terpenes are biosynthesized from the condensing units of five carbons, isopentenyl diphosphate (IPP) and dimethylallyl diphosphate (DMAPP), stemming in large part from the mevalonic acid biosynthetic pathway. Subsequently, the basic structures of the terpenes can be modified by reduction, oxidation and cyclization.

It are associated with various functions necessary for survival of the plant in its ecosystem, playing a key role in defense against microorganisms and pests, and also in attracting insects and other pollinators.

According to the taxonomic group to which they belong, all species of plants accumulate these volatile elements in specific anatomical organs, for example, glandular and secretory cavities.

Among the main methods of extracting essential oils are steam distillation, the hauling of water vapor and extraction with supercritical CO₂. The gas chromatography/mass spectrometry is currently one of the most widely used techniques for the identification of constituents of essential oils.

From an economic standpoint, the essential oils of plants are a source of substances of varied uses in the pharmaceutical, food, cosmetics, for production of soaps, perfumes, disinfectants, toiletries, among others. These applications are due to their characteristic odors and flavors, as well as their various biological activities such as bactericidal, fungicidal, insecticidal and others.

1.1 Aspectos Históricos dos Óleos Essenciais

Desde os tempos remotos o homem demonstrou grande interesse pelas fragrâncias emitidas pelas plantas, que mais tarde seriam denominadas óleos essenciais. Possivelmente se observara que o aquecimento durante o processamento da planta causava a evaporação dos princípios odoríferos, que após resfriamento e condensação formava uma mistura de duas fases compostas pelo óleo e água.

As bases da indústria de óleos essenciais foram concebidas e desenvolvidas no Oriente, especialmente no Egito, Pérsia e Índia e no Ocidente alcançou seu pleno desenvolvimento.

Em seu compêndio de história natural “*De Materia Medica*”, datado de cerca de 450 a.C. e que dominou a medicina por mais de 1500 anos, Dioscorides já menciona o uso da turpentina (óleo essencial da planta de mesmo nome) e fornece informações parciais sobre os métodos utilizados em sua produção.

O primeiro relato autêntico de destilação para obtenção de óleos essenciais foi feito pelo físico catalão Arnald de Villanova (1253-1311) que descreve a destilação do óleo de turpentina, dentre outros produtos.

Entre 1500 e 1507, em Strassburg, surgem dois volumes do famoso livro de destilação “*Hieronymus Brunschwig’s: Liber De Arte Distillandi*” no qual se mencionam apenas quatro óleos essenciais, os de turpentina, caule de juníparo, alecrim e cravo. Em 1546, Valerius Cordus publicou o “*Dispensatorium Pharmacopolarum*” onde três óleos essenciais foram descritos, de turpentina, lavanda e juníparo. Todavia, em sua 2ª edição em 1592, o autor lista 61 óleos essenciais, ilustrando o rápido desenvolvimento do conhecimento destas misturas e sua aceitação oficial.

Relatos de métodos, objetivos e resultados de destilação em tempos remotos são escassos e extremamente vagos. Todavia, para os tempos mais recentes, um excelente histórico do desenvolvimento científico e industrial em relação aos óleos essenciais foi sintetizado por Kubeczka (2010). Algumas destas informações estão sumarizadas adiante.

Fundamentadas inicialmente pelos estudiosos franceses, as investigações sistemáticas dos óleos essenciais surgiram somente a partir do século XIX. A

primeira delas é atribuída a M. J. Dumas (1800–1884) que em 1833 publicou o primeiro tratado dedicado aos óleos essenciais, denominado “*Liebig’s Annalen der Pharmacie*”.

Os estudos mais antigos e de extrema relevância acerca da química destes compostos foram, em grande parte, realizados no laboratório de Kekulé (1829-1896). A este pesquisador se atribui a criação do termo **terpeno**, em alusão ao óleo de turpentina, que inicialmente designava os compostos de fórmula geral $C_{10}H_{16}$ presentes nos óleos essenciais.

Ao lado de outros discípulos deste pesquisador, Otto Wallach realizou uma importante investigação, utilizando destilação fracionada para isolar os constituintes dos óleos. Por meio de reações simples, principalmente com ácido clorídrico e bromo, estes pesquisadores geralmente obtinham produtos cristalinos, que lhes permitiram descrever, já em 1891, as características básicas dos terpenos pineno, canfeno, limoneno, dipenteno, felandreno, terpinoleno e fencheno. O empenho deste grupo de pesquisa contribuiu notavelmente para o conhecimento científico produzindo cerca de 180 artigos sumarizados no livro “*Terpene und Campher*” (Wallach, 1914). Em 1887, Wallach sugeriu que os terpenos poderiam ser construídos a partir de unidades de isopreno. Pelo conjunto da obra, Wallach foi agraciado em 1910 com o Prêmio Nobel em Química “em reconhecimento a sua excepcional pesquisa em química e especialmente no campo dos compostos alicíclicos”. Também honrado com o Prêmio Nobel em Química em 1939, L. Ruzicka fundamentou a “regra do isopreno” na química dos terpenos.

Com base numa grande coleção de dados empíricos, na segunda metade do século passado, R. B. Woodward desenvolveu as chamadas “regras de Woodward”, que aplicam a espectroscopia no ultravioleta para determinar estruturas de terpenos.

Destes tempos até os dias atuais, a utilização de técnicas de separações cromatográficas e da espectroscopia de ressonância magnética nuclear permitiu o crescimento exponencial do conhecimento acerca dos óleos essenciais e seus constituintes.


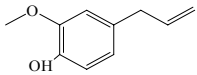

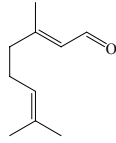

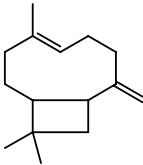
1.2 *Composição Química dos Óleos Essenciais*

Óleos essenciais são misturas complexas, às vezes contendo mais de 100 substâncias. Muitos óleos possuem um ou dois componentes majoritários que lhes conferem seus sabores e odores característicos, porém podem estar presentes muitos outros compostos minoritários. Os constituintes dos óleos essenciais pertencem quase que exclusivamente a duas classes de compostos, os terpenos e os fenilpropanóides. Destes, os terpenos são expressivamente os mais abundantes, e os fenilpropanóides, quando ocorrem, são geralmente os principais responsáveis pelo odor e sabor (Lobo e Lourenço, 2007). Exemplos destes compostos e suas plantas produtoras são apresentados na **Tabela 1.1**.

1.2.1 **Terpenóides**

Representam o maior e mais diversificado grupo de compostos naturais de plantas, ocorrendo em quase todas elas. São formados por unidades isoprênicas e classificam-se de acordo com o número destas unidades que compõem sua estrutura. Assim temos: hemiterpenos, com cinco carbonos; monoterpenos, com 10 carbonos; sesquiterpenos, com 15 carbonos; diterpenos, com 20 carbonos; triterpenos, com 30 carbonos; tetraterpenos, com 40 carbonos; e politerpenos ou poli-isoprenóides, com inúmeras unidades de cinco carbonos. Os monoterpenos e sesquiterpenos são os mais frequentemente encontrados nos óleos voláteis. Podem apresentar estruturas cíclicas, alifáticas e aromáticas, bem como a adição de átomos de oxigênio formando alcoóis, cetonas, aldeídos e ésteres. Quanto maior o número de carbonos, maior o potencial para diversidade estrutural e estereoquímica destes compostos.

Tabela 1.1 – Exemplos de constituintes dos óleos essenciais e suas plantas produtoras

Planta produtora	Componente principal	Referência
 <p><i>Syzygium aromaticum</i> (Myrtaceae) Cravo-da-Índia</p>	 <p>Eugenol (Fenilpropanóide)</p>	<p>Cai e Wu (1996)</p>
 <p><i>Lippia alba</i> (Verbenaceae) Erva-cidreira</p>	 <p>Geranial (Monoterpeno)</p>	<p>Barbosa <i>et al.</i> (2006)</p>
 <p><i>Cannabis sativa</i> (Cannabaceae) Maconha</p>	 <p>(<i>E</i>)-β-cariofileno (Sesquiterpeno)</p>	<p>Gertsch, <i>et al.</i> (2008)</p>

Figuras: cravo-da-Índia: <http://www.boticaraizes.com.br/chasemfolhas.htm> e http://www.vidaslusofonas.pt/garcia_da_orta.htm;
Lippia Alba: arquivo pessoal e http://portal.ics.trieste.it/maps/MedicinalPlants_Plant_ImageExplained.aspx?id=1154;
Cannabis: <http://www.thegooddrugsguide.com/gallery/cannabis/other-cannabis/cannabis-sativa-leaves.htm> e
<http://quiprona.wordpress.com/2010/05/11/caminho-para-a-modernidade/>

1.2.2 Fenilpropanóides

Os esqueletos dos fenilpropanóides consistem de um anel aromático de seis carbonos com uma cadeia lateral de três carbonos. Esta cadeia lateral sempre contém uma dupla ligação, mas apenas ocasionalmente um grupo funcional oxigenado. O anel aromático pode se apresentar substituído.

1.3 *Origem Metabólica dos Óleos Essenciais*

A magnífica proeza chamada fotossíntese realizada pelos vegetais é responsável pela manutenção de quase toda a vida existente no planeta. As substâncias produzidas neste processo são as precursoras primárias para todos os blocos constituintes do corpo da planta e todos os organismos heterotróficos. Estes blocos estruturais são representados por quatro grupos de macromoléculas essenciais e presentes em todos os seres vivos, as proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e carboidratos.

O conjunto de processos bioquímicos que produzem e degradam estas macromoléculas é conhecido como metabolismo primário e estas substâncias denominadas metabólitos primários (Von-Poser e Mentz, 2003). Por analogia, as micromoléculas, que apresentam distribuição mais restrita entre os grupos vegetais, passaram, historicamente, a serem chamadas de metabólitos secundários. Porém, uma definição mais aprimorada é dada por Buchanan et al. (2000), distinguindo os metabólitos primários como os compostos que participam da nutrição e dos processos metabólicos essenciais, e os metabólitos especiais (ou produtos naturais) que influenciam as interações ecológicas entre a planta e o ambiente.

É evidente que há interconexão entre os produtos do metabolismo primário e secundário, pois a partir de um número muito limitado de precursores se origina grande quantidade de compostos (**Figura 1.1**). Três principais rotas biossintéticas produzem a maior parte de todos os metabólitos secundários (Ruiz 2002). A via do acetato se caracteriza pela utilização do acetil coenzima-A para a derivação de uma série de compostos. Em resumo, a coenzima-A atua como excelente grupo

abandonador para produção dos policetídeos pela condensação dos grupos acetatos. Estes, por sua vez, originam ácidos graxos por redução, antraquinonas por ciclização e outros compostos que se situam na interface entre o metabolismo primário e secundário. Pela via do chiquimato, o ácido chiquímico é o ponto de partida para formação de compostos aromáticos como ácidos cinâmicos, cumarinas, ligninas e aminoácidos aromáticos que são precursores diretos dos alcalóides e fenilpropanóides. Finalmente, o ácido mevalônico, formado a partir de três moléculas de acetil coenzima-A, nomeia a via do mevalonato que origina uma série de compostos diferentes aos da via do acetato, como os terpenos (principais componentes dos óleos essenciais) e esteróides. Contudo, ainda podem haver vias mistas como a produção de flavonóides a partir de um policetídeo (via do acetato) e ácido cinâmico (via do chiquimato).

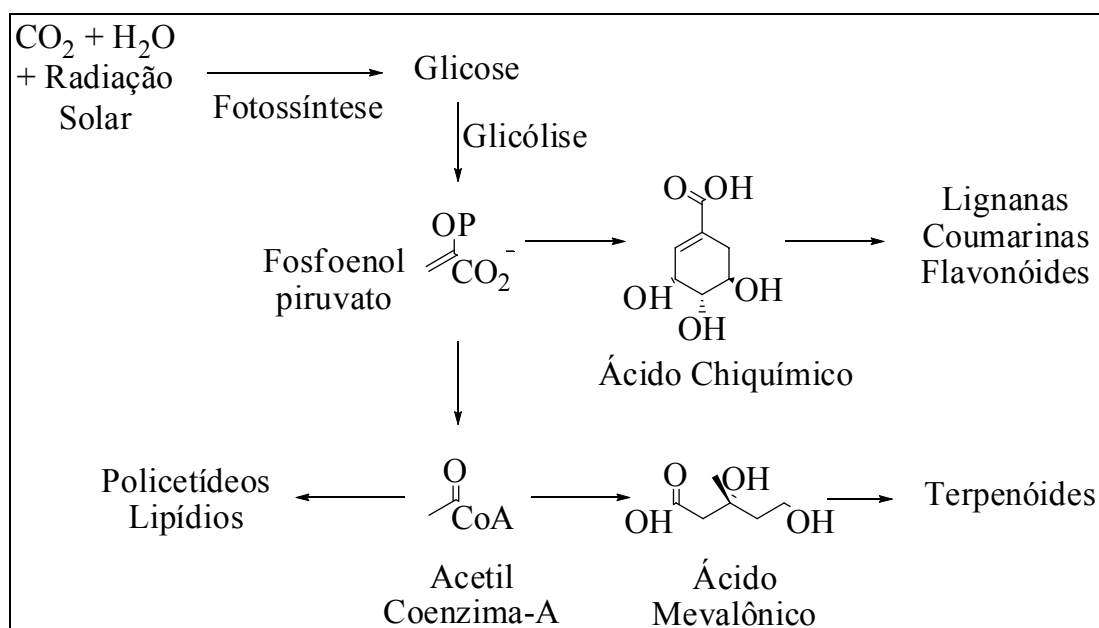


Figura 1.1 – Principais rotas biossintéticas de alguns metabólitos primários e secundários. Adaptado de Lobo e Lourenço (2007)

1.3.1 Biossíntese de Terpenóides

Embora Ruzicka tenha consagrado a regra do isopreno para os compostos terpênicos, atualmente sabe-se que os precursores biológicos para a sua síntese são o difosfato de 3,3'-dimetilalila (DMAP) e o difosfato de 3-isopentenila (IPP). Existem duas vias biossintéticas possíveis para a formação do DMAP e IPP, a via do mevalonato e a via do fosfato de desoxixilulose, esta descoberta recentemente e parece ser conspícua nos vegetais (Lobo e Lourenço, 2007).

A rota do mevalonato é iniciada pela combinação de três acetatos produzindo o ácido mevalônico e também parece ser um processo universal nas plantas superiores (**Figura 1.2**). É responsável pela produção de compostos vitais para os processos celulares, como os esteróides.

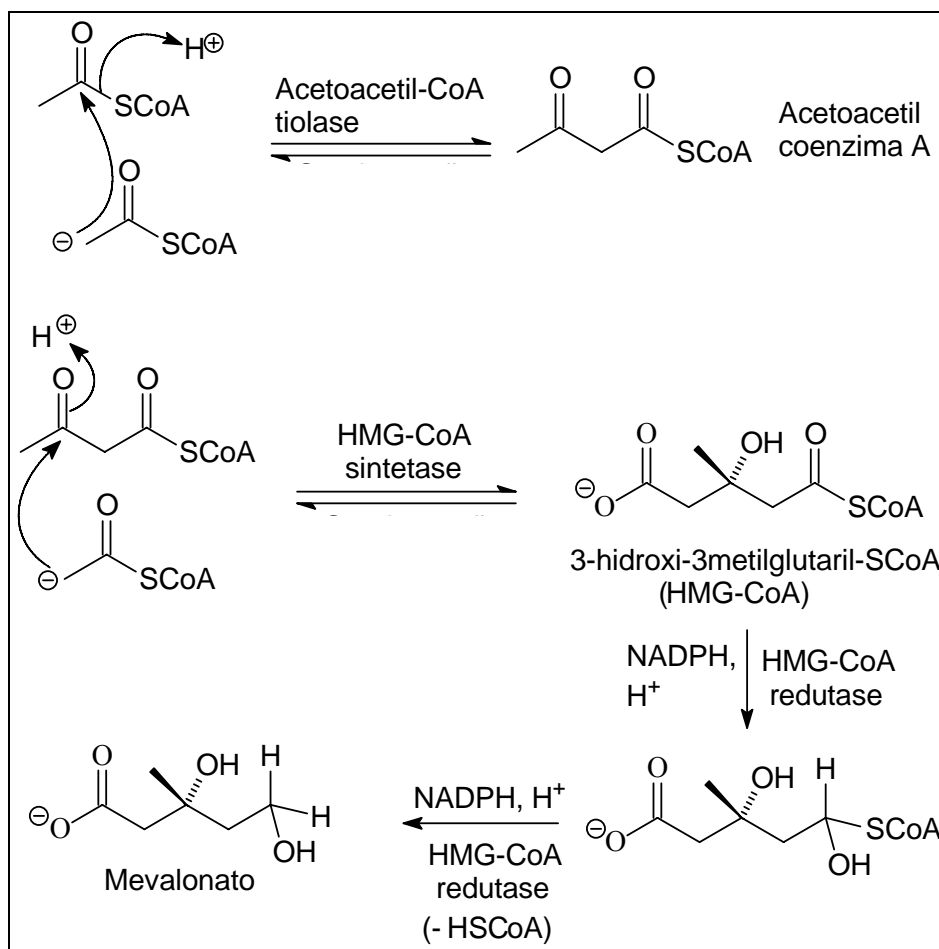


Figura 1.2 - Biossíntese do mevalonato. Adaptado de Lobo e Lourenço (2007)

A modificação inicial do ácido mevalônico o converte a uma estrutura de cinco átomos de carbono, com arranjo semelhante ao isopreno que é típico de monoterpenos e sesquiterpenos (**Figura 1.3**). De fato, duas formas deste intermediário de cinco carbonos são produzidas, IPP e DMAP. IPP é o produto inicial formado a partir do mevalonato e é então convertido em DMAP pela ação da enzima isopentenil pirofosfato isomerase (Gershenzon e Croteau, 1990).

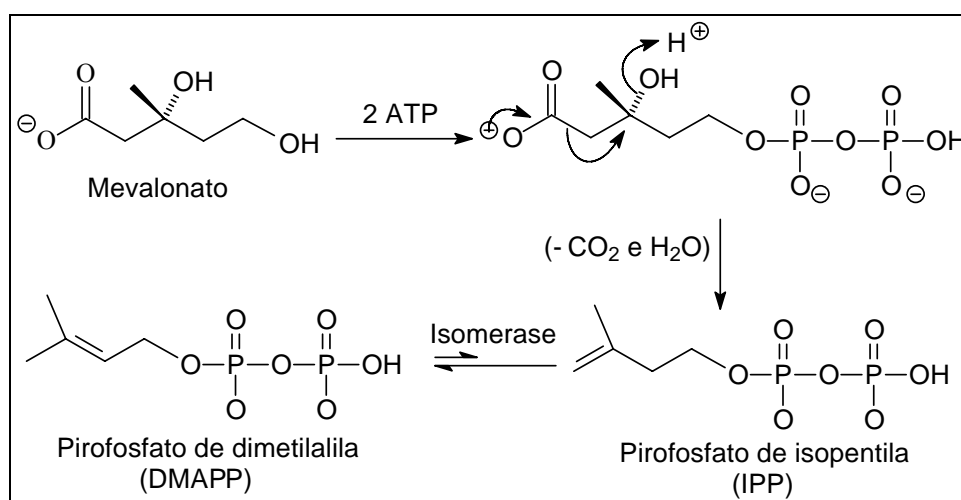


Figura 1.3 – Biossíntese de difosfato de 3,3'-dimetilalila (DMAP) e o difosfato de 3-isopentenila (IPP) a partir do mevalonato. Adaptado de Lobo e Lourenço (2007)

Na via da 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP), este composto é formado a partir de dois produtos da glicólise, o ácido pirúvico e o D-gliceraldeído, num processo mediado pela coenzima tiamina difosfato (TPP). Por meio de um rearranjo tipo pinacólico seguido de redução, a DXP é convertida em 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato, o qual origina o IPP por uma sequência de reações ainda não elucidadas (**Figura 1.4**).

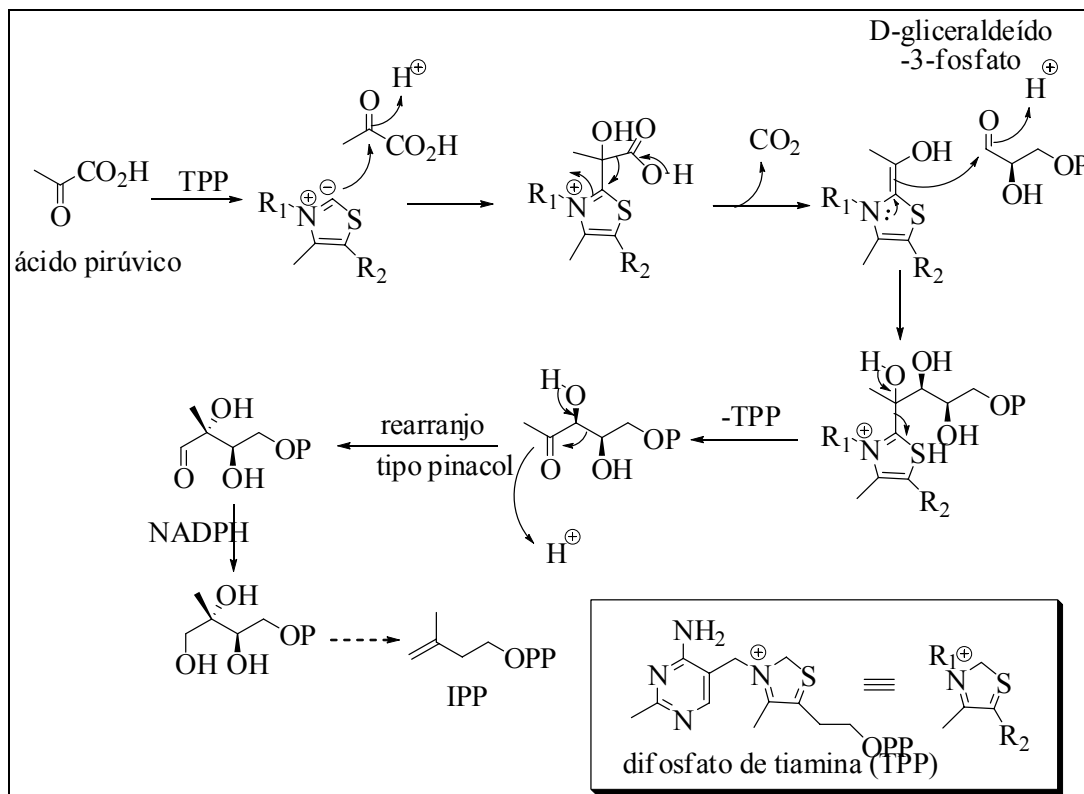


Figura 1.4 – Biossíntese de difosfato de 3,3'-dimetilalila (DMAP) e o difosfato de 3-isopentenila (IPP) a partir da 1-desoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP). Adaptado de Lobo e Lourenço (2007)

Independente de sua origem, uma molécula de IPP e uma de DMAP são combinadas pela ação de outra enzima, geranyl pirofosfato sintase, produzindo o geranyl pirofosfato (GPP), o primeiro intermediário de monoterpene detectável (**Figura 1.5**). Este processo pode ser continuado pela adição de outro IPP ao GPP, resultando na formação do primeiro sesquiterpene com 15 carbonos, o farnesil pirofosfato (FPP). A adição de novas unidades de cinco carbonos pode se estender dando origem aos diterpenos com 20 carbonos. A formação dos terpenos com 30 carbonos (triterpenos) ocorre pela combinação de duas moléculas de sesquiterpenos e dos terpenos com 40 carbonos (tetraterpenos) pela combinação de duas moléculas de diterpenos.

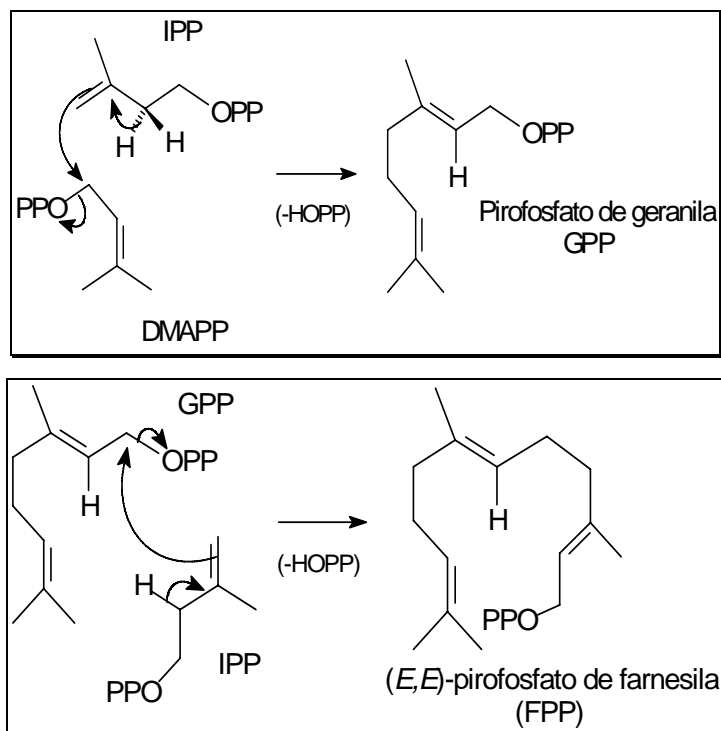


Figura 1.5 – Combinação de unidades de IPP e DMAP. Adaptado de Lobo e Lourenço (2007)

1.3.2 Biossíntese de Fenilpropanóides

Os fenilpropanóides são formados principalmente a partir de aminoácidos aromáticos derivados da rota do chiquimato. O ácido chiquímico é produzido pela adição de uma molécula de fosfoenol piruvato a um açúcar, a eritrose-4-fosfato, que origina um ácido de sete carbonos (**Figura 1.6**). Essa reação de aldol é seguida pela eliminação do fosfato e adição da carbonila produzindo o hidroquinato. A atuação de uma enzima garante a eliminação estereoespecífica de um próton proquiral e, finalmente, a redução da carbonila a álcool produz o chiquimato.

A rota do chiquimato dá origem a fenilalanina que é precursor da maioria dos fenilpropanóides (**Figura 1.7**).

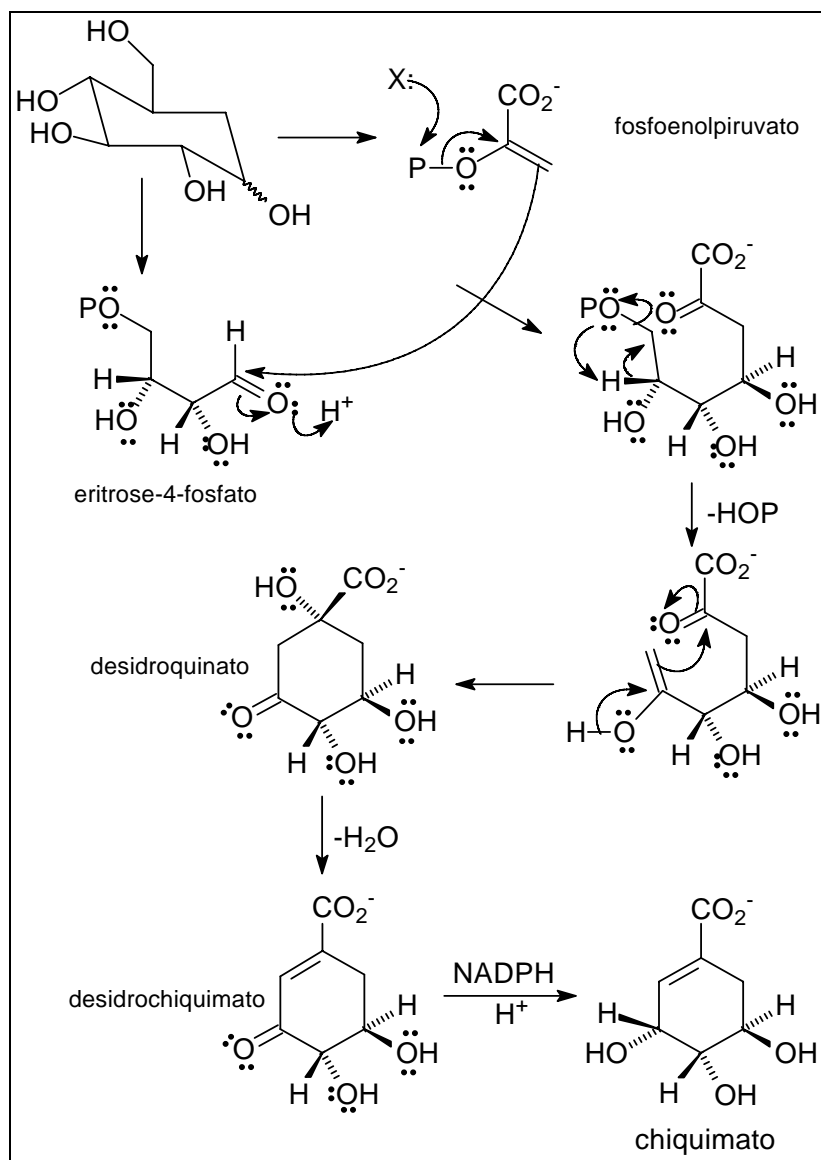


Figura 1.6 – Formação do chiquimato a partir da eritrose-4fosfato e fosfoenol piruvato. Adaptado de Lobo e Lourenço (2007)

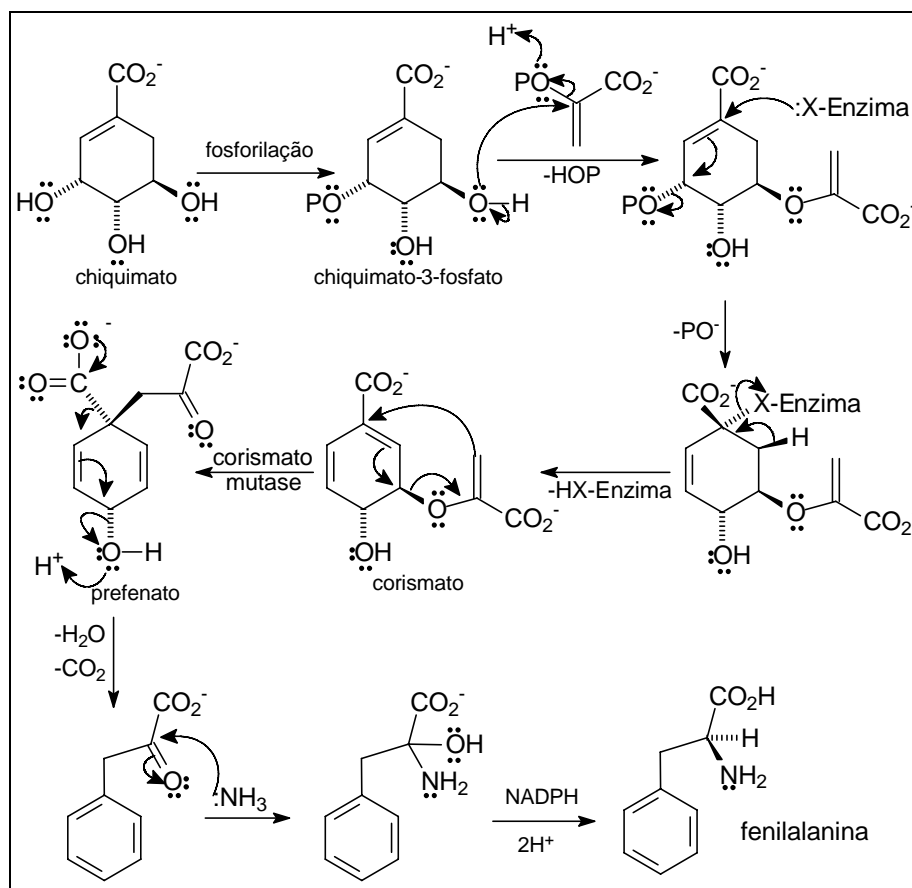


Figura 1.7 – Biossíntese da fenilalanina. Adaptado de Lobo e Lourenço (2007)

1.4 *Local de Produção dos Óleos Essenciais nos Vegetais*

As rotas biossintéticas descritas acima ocorrem por meio de um intercâmbio bioquímico de produtos e precursores entre os diversos compartimentos celulares, como plastídios, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e citosol (**Figura 1.8**).

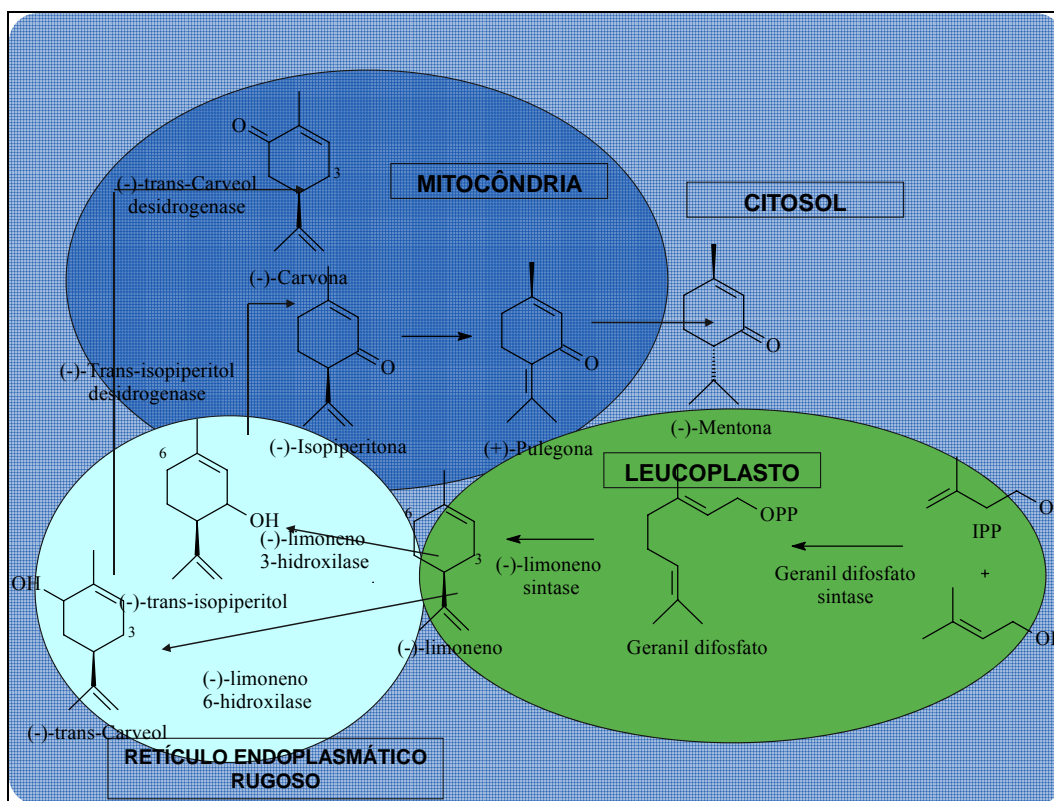


Figura 1.8 – Biossíntese de terpenos em diferentes compartimentos das células secretoras

Embora uma rede de compartimentos trabalhe em conjunto neste processo de biossíntese, apenas algumas células ontogeneticamente diferenciadas para a função secretora possuem a maquinaria enzimática adequada para levar a cabo a produção dos óleos essenciais. Estas células especiais se localizam em estruturas bem definidas anatomicamente que podem estar presentes em qualquer órgão dos vegetais. Podem ser estruturas externas, como os tricomas secretores, ou internas, como os ductos e cavidades secretores.

1.4.1 Estruturas Secretoras Externas

Os tricomas secretores representam as estruturas vegetais externas produtoras de óleos essenciais. Eles estão entre as primeiras estruturas vegetais reconhecidas e descritas pelos pioneiros da microscopia no século XVII, Hooke (1665), Grew (1682) e Malpighi (1686). Desde então, tricomas têm sido estudados intensivamente, principalmente devido a sua ubiquidade entre os vegetais superiores, suas diferentes funções e da extrema variação morfológica tanto dos tricomas individualmente como da composição geral do indumento da planta. Tricomas secretores ou glandulares estão envolvidos na secreção de substâncias de naturezas diversas como soluções salinas, soluções de açúcares, mucilagens e materiais lipofílicos (Fahn, 1979). Porém, os terpenóides são claramente os compostos mais comuns e estruturalmente mais diversos encontrados em tricomas glandulares (Kelsey *et al.*, 1984).

Tricomas secretores de óleo essencial ocorrem em diversas famílias. Dentre estas, a família Lamiaceae tem sido uma das mais estudadas em termos químicos e anatômicos, em vista da grande importância econômica dos óleos essenciais produzidos em seus tricomas glandulares. *Menta piperita*, por exemplo, acumula grandes quantidades de monoterpenos em tricomas glandulares peltados que consistem de uma célula basal, uma célula da coluna, oito células secretoras e uma cavidade subcuticular de estocagem de óleos essenciais (**Figura 1.9**). O estudo destes tricomas revelou serem as células secretoras o local da síntese dos monoterpenos nesta espécie. A biossíntese se inicia com a ciclização do geranyl difosfato, derivado do isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetil alil pirofosfato (DMAP) originados dos plastídios. Os demais passos da biossíntese dos terpenos estão representados na **Figura 1.8** e envolvem os plastídios, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e o citosol.

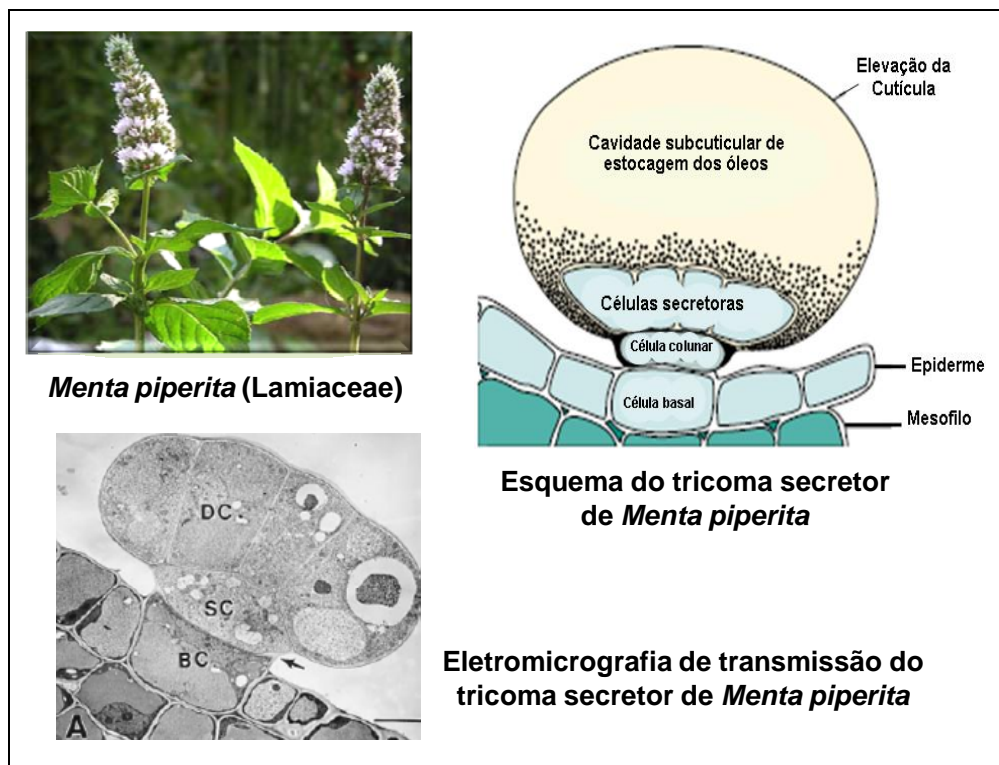


Figura 1.9 – Representação esquemática do tricoma secretor de *Mentha piperita* (adaptado de Kutchan, 2005) e eletromicrografia de varredura deste tricoma (Turner *et al.*, 2000)

1.4.2 Estruturas Secretoras Internas

As estruturas internas são representadas pelos ductos e cavidades secretoras. As células secretoras destas estruturas liberam o óleo essencial em um espaço interno, o lume, que é isodiamétrico nas cavidades e alongado em um único plano nos ductos (Appezato-da-Glória e Carmello-Guerreiro, 2006). Estas estruturas são as principais responsáveis pela grande produção de óleos essenciais extraídos de plantas como as da família Myrtaceae (**Figura 1.10**).

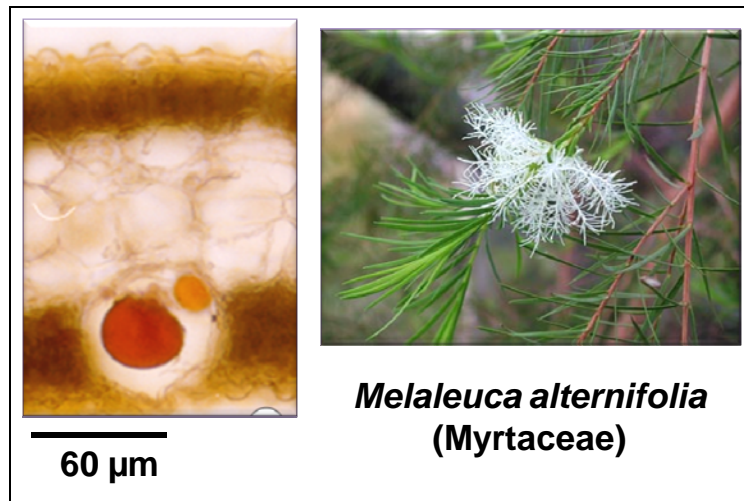


Figura 1.10 – Cavidade secretora preenchida por óleo essencial em corte transversal de folhas de *Melaleuca alternifolia* (Silva, 2007)

1.4.3 Importância do Estudo Anatômico das Plantas Aromáticas

Quanto à função, as estruturas secretoras estão relacionadas à adaptação da planta às condições edáficas, climáticas e de defesa contra herbivoria e ataque de patógenos, bem como atração de polinizadores e dispersores de sementes (Fahn, 1979; Bentley e Elias, 1983; Roshina e Roshina, 1983). Desta forma, a função das estruturas secretoras está diretamente relacionada à função dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas.

Estruturas secretoras estão presentes em diversas famílias de plantas. O conhecimento de sua morfologia, anatomia e ultraestrutura são essenciais para se compreender sua função na planta (Fahn, 1979), bem como para a escolha adequada da parte do corpo da planta a ser extraído e os métodos adequados de coleta e secagem do material vegetal. Por exemplo, plantas onde os óleos essenciais são sintetizados e acumulados em tricomas, como em muitas espécies das famílias Asteraceae, Lamiaceae e Verbenaceae se submetidas a processos drásticos de secagem, podem perder grande parte dos tricomas comprometendo o rendimento do óleo essencial.

1.5 Importância Ecológica dos Óleos Essenciais

Holopainen (2004) divide as funções dos compostos voláteis induzidos por herbivoria em quatro níveis, celular, superfície da planta, ecossistema e atmosfera.

Ao nível celular, eles podem atuar na proteção contra danos provocados por oxidação. Por exemplo, o ácido jasmônico e o jasmonato de metila são liberados pelos tecidos lesados de algumas plantas, imediatamente após um estresse biótico ou abiótico (**Figura 1.11**). Estudos em *Arabidopsis* expostas a danos por O₃ evidenciaram a redução da concentração de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e ácido salicílico, evitando a morte celular. Isto sugere que a resistência da planta a O₃ está ligada à produção do ácido jasmônico e à possível produção de compostos voláteis que neutralizam o O₃. Isopreno e alguns monoterpenos ao neutralizar o O₃, reduzem a produção de espécies reativas de oxigênio bem como peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e radicais hidroxilas (HO·) no apoplasto.

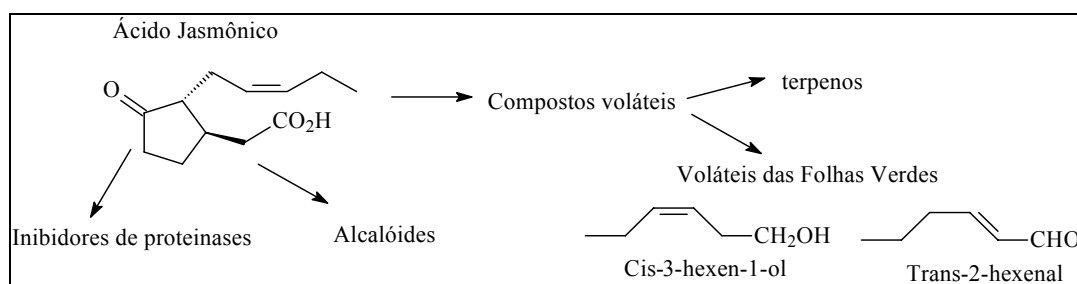


Figura 1.11 – Ácido Jasmônico como indutor de defesa frente à herbivoria (Ruiz, 2002)

Ao nível da superfície foliar, atuam na proteção contra patógenos e também contra a oxidação. A camada que limita a superfície foliar (aproximadamente 5 mm de espessura) apresenta um microclima com maior umidade, favorecendo o desenvolvimento de pequenos herbívoros, bactérias e hifas de fungo. A produção de voláteis com atividades antimicrobianas é fundamental para a proteção da planta. Esta concentração de terpenos ao redor da superfície foliar se deve às emissões que atravessam a cutícula mesmo quando os estômatos se encontram fechados. Isoprenos e monoterpenos reagem com O₃ reduzindo o estresse oxidativo provocado, especialmente na atmosfera úmida. Quando a síntese destes monoterpenos é

bloqueada, espécies reativas de oxigênio como H_2O_2 , rapidamente se acumulam na folha. Também as flores liberam voláteis, que além do papel de atrair polinizadores, sugere-se que outro importante papel seria proteger os órgãos reprodutivos e suas células germinativas de patógenos ou danos provocados por O_3 .

Num sentido mais amplo, as plantas se encontram sésseis (imóveis) em seu habitat e se servem da produção, acúmulo e emissão de micromoléculas como veículos de comunicação com seus pares ecológicos. A função mais bem compreendida dos voláteis produzidos pelas plantas é seu papel semioquímico. O termo semioquímico se refere aos compostos químicos responsáveis pela comunicação entre organismos, ou seja, moléculas encarregadas de levar mensagens entre membros de uma mesma espécie ou espécies diferentes. Componentes como a volicitina presente na saliva dos herbívoros e em regurgitados de insetos são indutores da produção de voláteis. Quando o inseto ataca a planta, produz-se interação entre suas secreções orais e os tecidos lesados da plantas, que por hidrólise lipídica, liberam ácidos que provocam a acumulação de ácido jasmônico no local da lesão (Ruiz, 2002). Como discutido anteriormente, o ácido jasmônico atua como potente sinal para induzir a síntese de metabólitos secundários. Assim se ativam várias rotas metabólicas que produzem proteinases para tornar os tecidos da planta menos digeríveis para o inseto, aumento do teor de toxinas, alcalóides ou compostos voláteis que atraem os inimigos naturais do herbívoro (predador ou parasita).

Finalmente, ao nível da atmosfera, os voláteis das plantas podem atuar no controle da temperatura, umidade e níveis de irradiação. Proteção contra radiações nocivas UV-B é um forte fator de seleção na evolução das plantas terrestres. Evolutivamente, o oxigênio liberado por algas e cianobactérias no Período Cambriano e Ordoviciano (590-438 milhões de anos atrás) alcançaram taxas de 2% há 410 milhões de anos. Estima-se que nesta época oxigênio começou a filtrar os raios UV pela formação da camada de ozônio. A emissão de compostos voláteis ocorre tanto em angiospermas como em musgos e samambaias que emitem isopreno e gimnospermas como as coníferas que emitem grande quantidade de monoterpenos. Segundo Holopainen (2004), os voláteis teriam um papel substancial nos processos que ocorrem na troposfera, já que aproximadamente 80% dos voláteis são quimicamente reativos, podendo regular a capacidade oxidativa da troposfera, bem como do monóxido de carbono e ozônio. Na presença de luz solar, com altas

concentrações de óxido de nitrogênio (NO), provenientes da ação antrópica, alguns compostos voláteis participariam da formação de O₃ fitotóxico, que embora desvantajoso para planta, levaria à precipitação de nitrogênio, o que compensaria o dano causado por O₃ nos tecidos. Por outro lado, quando os níveis de NO na atmosfera são baixos, a oxidação de voláteis remove o O₃ da troposfera e produz partículas de aerossol móveis que seriam uma efetiva proteção contra excesso de radiação UV-B. Porém todos estes processos ainda são pouco conhecidos. Há evidências de que as plantas promoveriam a formação de aerossóis para proteção contra radiação UV-B porque a emissão de monoterpenos aumenta em plantas submetidas a emissões crescentes de UV-B bem como se observa a ativação de genes relacionados à síntese de ácido jasmônico. Ainda, estas partículas de aerossol dispersas na atmosfera podem atuar como núcleos de condensação para o vapor d'água, tendo assim influência sobre a precipitação de chuvas.

1.6 Importância Econômica e Aplicações dos Óleos Essenciais

Do ponto de vista econômico, os óleos essenciais de plantas são fonte de substâncias de usos variados nas indústrias. Seu uso vem ganhando impulso, tanto devido ao interesse crescente de consumidores em ingredientes de fontes naturais como também devido à crescente preocupação relacionada ao uso de substâncias potencialmente prejudiciais como aditivos sintéticos na alimentação (Reische et al., 1998).

Estudos confirmam a atividade antimicrobiana de várias espécies de plantas produtoras de óleos essenciais que revelam desde atividade inseticida, antibacteriana, antifúngica, antiplasmodial e vários outros usos medicinais (Bakkali *et al.*, 2008). Os óleos essenciais e seus constituintes têm sido amplamente utilizados como flavorizantes, e agentes antibacterianos também na indústria alimentícia. Fatores como estrutura, grupo funcional e composição do óleo essencial determinam sua atividade biológica e suas propriedades físico-químicas, determinando sua aplicação comercial.

Segundo Dorman e Deans, (2000), óleos essenciais com elevado teor de compostos fenólicos apresentam maior atividade. Entre estes, os óleos de cravo-da-índia, orégano, alecrim, tomilho e salvia são apontados por seu efeito contra microorganismos. Eles têm ação mais efetiva contra bactérias gram-positivas (Marino et al., 2001). Os óleos essenciais com alto nível de eugenol e cinamaldeído bem como citral exibem forte atividade antimicrobiana (Lis-Balchin et al., 1998). Nesta última década, tem-se destacando como alternativa no tratamento de microorganismos resistentes a antibióticos. O aparecimento da resistência aos antibióticos mais comuns tem-se revelado um problema crescente a nível mundial (Essawi e Srour, 2000).

Após a análise sistemática e cuidadosa de 12.995 documentos de patentes depositadas nos Estados Unidos entre 1980 até 2003 para o tema dos óleos essenciais, Silva-Santos et. al. (2006) sumarizaram informações interessantes a respeito destas substâncias. Os depósitos de patentes envolvendo compostos terpênicos e terpenóides nas áreas de preparações medicinais contabilizaram 13,95%; para manipulação genética de plantas superiores e microorganismos para síntese de terpenos, 8,37%; para tensoativos, 4,04%; para polímeros, 3,32% e para cosméticos, 3,10%. A Companhia norte-americana Procter e Gamble possui 2,01% das patentes listadas na pesquisa seguida por Colgate-Palmolive (1,38%) e a empresa francesa L'oreal (2,01%) e a alemã Hoescht (1,09%). O que demonstra, ao nível global, uma crescente busca por novas tecnologias para áreas de tensoativos, compostos farmacêuticos e polímeros utilizando-se óleos essenciais, compostos terpênicos e terpenóides.

Neste contexto, os estudos das plantas aromáticas produtoras de óleos essenciais são promissores, pois possibilitam identificar quimiótipos distintos adequados às diferentes condições ambientais, em especial para as espécies que são cultivadas para produção de óleos essenciais de elevado valor comercial.

1.7 Óleos Essenciais na Agroquímica

Como dito, alguns princípios ativos de produtos agroquímicos comerciais foram idealizados e desenvolvidos seguindo modelos de metabólitos secundários. Exemplo desta aplicação pode ser dado pelo desenvolvimento dos herbicidas Callisto[®], comercializado pela Syngenta, e Mikado[®], vendido pela Bayer CropScience. Estes produtos foram inspirados na estrutura da leptospermona (**Figura 1.12**), um dos componentes majoritários do óleo essencial de *Leptospermum scoparium* J. R. & G. Forst (Myrtaceae) (Klink *et al.*, 1999). Este constituinte também é secretado pelas raízes de *Callistemon citrinus*, que nomeou o produto Callisto[®], cuja substância ativa, mesotriona, foi produzida por meio de modificações estruturais da leptospermona (Mitchell *et al.*, 2001). A sulcotriona é o ingrediente ativo de Mikado[®] (Chaabaiane *et al.*, 2005). O herbicida comercial cinmetilina, também é outro exemplo. É composto por um éter derivado do monoterpênóide natural 1,4-cineol (Romagni *et al.*, 2000a, b; Duke e Oliva, 2004), que foi desenvolvido para o controle de gramíneas anuais e é vendido pela Sigma Aldrich.

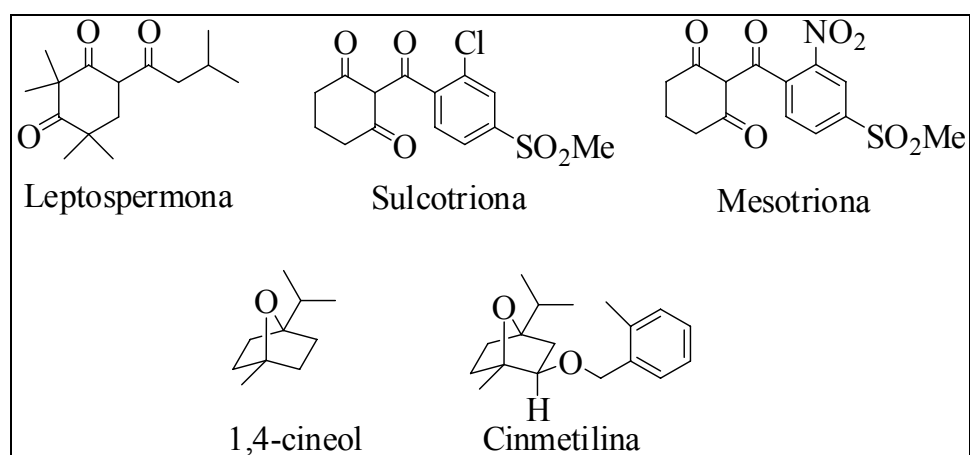


Figura 1.12 – Exemplos de herbicidas comerciais (sulcotriona, mesotriona e cinmetilina) derivados de substâncias fitotóxicas de óleos essenciais (leptospermona e 1,4-cineol)

As substâncias dos óleos essenciais, sem alterações químicas, também são utilizadas diretamente como agentes protetores de culturas e produtos estocados. Nos Estados Unidos, a Mycotech Corporation comercializa os produtos Cinnamite[®] e Valero[®], utilizados na horticultura, vinicultura e citricultura devido a suas ações inseticida, acaricida e fungicida. Ambos têm como princípio ativo o cinamaldeído, um dos constituintes majoritários do óleo essencial de canela, *Cinnamomum* spp. (Lauraceae).

1.8 Metodologias de Extração e Análise Química de Óleos Essenciais

Os óleos essenciais podem ser extraídos por diversos métodos: utilizando-se CO₂ líquido, forno de microondas, arraste de vapor ou hidrodestilação, dentre outros. O método de extração pode variar de acordo com a destinação do uso do óleo. Para produção de perfumes, por exemplo, a extração com solventes lipofílicos e às vezes com CO₂ supercrítico é preferida. O produto extraído pode variar em quantidade, qualidade e composição, de acordo com o clima, solo, órgão da planta, idade e estágio do ciclo vegetativo (Masotti et al., 2003; Angioni et al., 2006). Assim, para se obter um óleo essencial com composição constante, deve-se realizar a extração sob as mesmas condições, a partir dos mesmos órgãos vegetais cultivados no mesmo solo e mesmas condições climáticas.

Também é imperativo ressaltar que o material vegetal a ser utilizado para extração do óleo essencial seja identificado, herborizado e incorporado ao acervo de um Herbário listado no *Index Herbariorum*.

A maioria dos óleos essenciais comercializados é analisada quimicamente por separação por cromatografia gasosa e sua composição química acessada por meio da espectrometria de massas. A identificação dos compostos é feita por meio da comparação dos espectros de massas da amostra, com os existentes no banco de dados do aparelho e também pelos índices de retenção relativos (Adams, 1995).

1.9 Bactérias

Bactérias são organismos unicelulares procariontes com diâmetro de aproximadamente 2 μm (Daves *et al.*, 1990). Ao microscópio óptico, com poder de resolução de 0,2 μm , podem ser distinguidas em suas formas básicas: esféricas, os cocos; forma de bastões, bacilos; e as formas curvas, vibriões e espirilos (**Figura 1.13**).

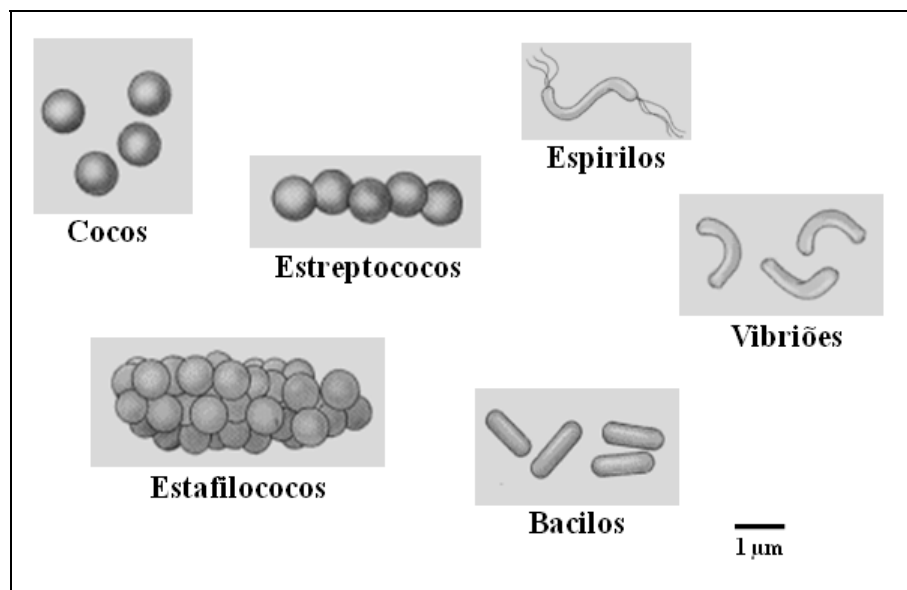


Figura 1.13 – Formas básicas de bactérias: esféricas, os cocos; forma de bastões, bacilos; e as curvas, vibriões e espirilos

(Fonte: <http://www.sobiologia.com.br/conteudos/Reinos/monera.php>)

Ao microscópio eletrônico revelam uma arquitetura distintiva dos procariotos, com uma estrutura interna muito mais simples que as células eucarióticas (**Figura 1.14**). As principais estruturas visíveis no citoplasma são o nucleóide e muitos ribossomos. Em contraste ao interior, o envelope celular em volta do citoplasma das bactérias é mais complexo que das células eucariotas. Além de uma membrana citoplasmática, possuem uma parede celular rígida.

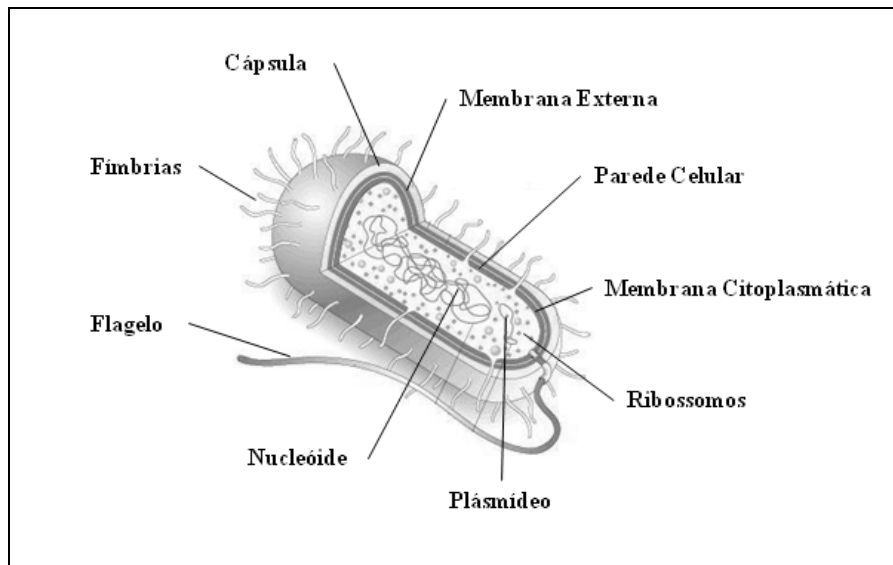


Figura 1.14 – Estrutura geral de uma célula bacteriana

(Fonte: http://biosalecionario.blogspot.com/2010_04_01_archive.html)

Nos organismos Gram-negativos existe uma membrana externa adicional. A parede celular das bactérias Gram-negativas é mais fina que das Gram-positivas. A parede celular espessa das bactérias Gram-positivas pode ser revestida por uma cápsula de proteínas ou polissacarídeos (**Figura 1.15**).

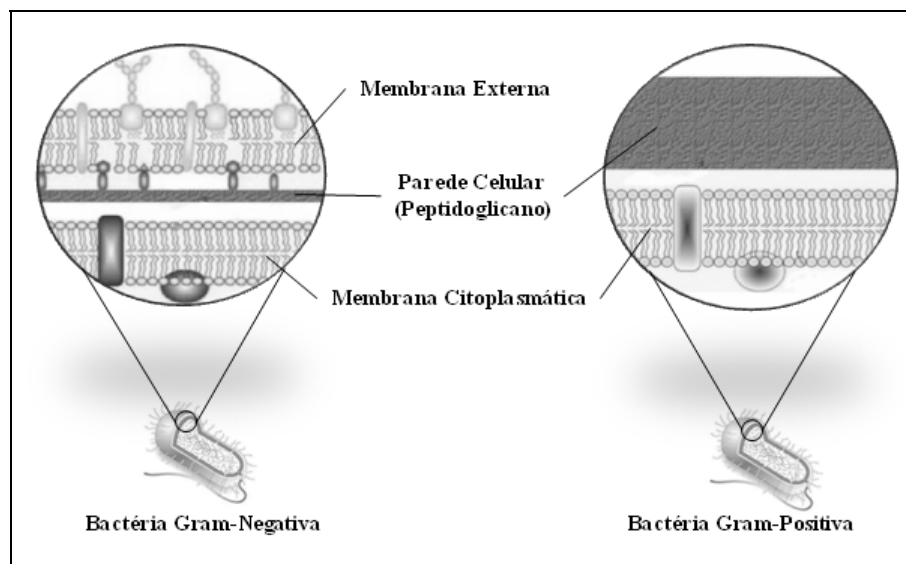


Figura 1.15 – Envoltório celular de bactérias Gram negativas e positivas

(Fonte: http://biosalecionario.blogspot.com/2010_04_01_archive.html e <http://www.prof2000.pt/users/biologia/tcolgram.htm>)

Várias bactérias são responsáveis pela contaminação de produtos estocados e alimentos industrializados, causando sérios problemas de saúde pública. Entre elas, são exemplos as bactérias Gram-positivas *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*, e a Gram-negativa *Escherichia coli*.

Bacillus cereus é uma bactéria aeróbia facultativa, formadora de esporos, comumente encontradas em solos, vegetais e em vários alimentos processados e crus, como leite e derivados. Este microrganismo é capaz de produzir toxinas, incluindo enterotoxinas, uma potente toxina emética, fosfolipases, proteases e hemolisinas (Finlay et al., 2002). O consumo de alimentos que contenham uma concentração superior a 10^6 *B. cereus*/g pode resultar em intoxicação alimentar. Esta espécie está entre as predominantes em surtos de intoxicação alimentar, causando diarreia e sendo estas alterações atribuídas à ação das enterotoxinas e da potente toxina emética (Agata et al., 2002; Radhika et al., 2002).

Surtos relacionados à *Bacillus cereus* já foram relatados nos EUA, Reino Unido, Canadá, Holanda, Escandinávia e outros países, envolvendo diversos alimentos como fonte de veiculação, dentre eles produtos cárneos, laticínios, condimentos e arroz oriental. O “British Columbia Center for Disease Control” (2002) relatou a ocorrência de dois surtos de doença transmitida por alimentos no Canadá, envolvendo mais de 100 pessoas devido à contaminação de leite por *B. cereus*. No Estado de São Paulo, *B. cereus* foi identificado como agente etiológico de 45 (4,8%) dos 932 casos de doenças transmitidas por alimentos notificados à vigilância epidemiológica em 2002.

Staphylococcus aureus é uma bactéria resistente a uma variedade de agentes antimicrobianos, sendo esta resistência frequentemente codificada por genes plasmidiais adquiridos via transdução. Seu habitat natural são as mucosas e a pele do homem e de animais homeotérmicos, podendo contaminar alimentos em diversas etapas do seu processamento, principalmente através do manipulador. É responsável por grande parte das intoxicações causadas pela ingestão de alimentos contaminados. A sua importância, dentre outras espécies, como agente patogênico vem aumentando com as infecções oportunistas, principalmente nos imunocomprometidos (Germano e Germano, 2003).

A intoxicação causada por alimentos contendo enterotoxinas de *S. aureus* é um dos tipos mais comuns de doenças de origem alimentar. De acordo com os dados

da Fundação Ezequiel Dias, no estado de Minas Gerais entre 1995 e 2001 ocorreram 23 surtos, 660 casos e um óbito, devido ao consumo de queijos contaminados por toxinas estafilocócicas (Carmo, 2004). Entre 2001 e 2003, no município de São José de Rio Preto foram notificados quatro surtos e 52 casos de intoxicação alimentar causada por *S. aureus* (Peresi et al., 2004).

E. coli é um membro da família Enterobacteriaceae, que reúne as bactérias Gram-negativas anaeróbias facultativas e oxidase negativas. Está presente no trato intestinal dos animais (inclusive do homem) e exerce um efeito benéfico sobre o organismo, suprimindo a multiplicação de bactérias prejudiciais e sintetizando uma considerável quantidade de vitaminas. Dentre as cepas de *E. coli*, entretanto, há um grupo patogênico para o ser humano. Atualmente há seis grupos de *E. coli* patogênicos reconhecidos: 1) *E. coli* enteropatogênica (EPEC), 2) *E. coli* enterotoxigenica (ETEC), 3) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), 4) *E. coli* enteroagregativa (EAaggEC ou EAEC), 5) *E. coli* de aderência difusa (DAEC) e 6) *E. coli* Shiga Toxigênica (STEC) (Desmachelier e Grau, 1997). Estas cepas ocupam hoje o segundo lugar entre os principais agentes de doença alimentar nos Estados Unidos, onde responderam por 7,4% dos surtos e 28,6% das mortes provocadas por bactérias naquele país no período de 1993-1997 (Olsen et al., 2000). *E. coli* é também responsável por um terço dos casos de meningite neonatal, com a incidência de 0,1 por 1000 nascidos vivos e é a causa mais comum de septicemias adquiridas na comunidade ou no ambiente hospitalar.

1.10 Referências

- Adams, R. P., (1995). **Identification of Essential Oils by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. Carol Stream, IL: Allured Publi.
- Agata, N.; Ohta, M. e Yokoyama, K. (2002). Production of *Bacillus cereus* emetic toxin (cereude) in various foods. *International Journal at Food Microbiology*.v.73, p. 23-27.
- Angioni A, Barra A, Coroneo V, Dessi S, Cabras P. 2006. Chemical composition, seasonal variability, and antifungal activity of *Lavandula stoechas* L. ssp. *stoechas* essential oils from stem/leaves and flowers. *J. Agric. Food Chem.* 54: 4364-4370.
- Appezato-da-Glória, B., e Carmello-Guerreiro, S. M. (Eds). (2006). **Anatomia Vegetal**. Viçosa: Editora UFV.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*.46, 446-475.
- Barbosa, F. F., Barbosa, L. C. A., Melo, E. C., Botelho, F. M., Santos, R. H. S. (2006). Influência da temperatura do ar de secagem sobre o teor e a composição química do óleo essencial de *Lippia alba* (Mill) N. E. Brown. *Quim. Nova.* 29, 1221-1225.
- Bentley, B. e Elias, T. (1983). *The biology of nectaries*. New York. Columbia University Press.
- Buchanan, B. B.; Grisse, W. & Jones, R. L. (Eds). (2000). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, Rockville: ASPP.
- Cai, L e Wu, CD. 1996. Compounds from *Syzygium aromaticum* Possessing Growth Inhibitory Activity Against Oral Pathogens. *J. Nat. Prod.* 59, 987-990.
- Carmo, L.S.; Dias, R.S.; Linard, V.R.; Sena, M.J.; Santos, D.A.; Faria, M.E.; Pena, E.C.; Jett, M.; Heneine, L.G. Food poisoning due to enterotoxigenic strains of *Staphylococcus* present in Minas cheese and raw milk in Brazil. *Food Microbiology*, v. 19, n. 1, p. 9-14, 2002.

- Chaabaiane, H., Cooper, J. F., Azouzi, L., and Coste, C. M. 2005, Influence of soil properties on the adsorption-desorption of sulcotrione and its hydrolysis metabolites on various soils. *J. Agric. Food Chem.*, 53, 4091-4095.
- Daves, B. D., Dulbecco, R., Eisen, H. N., Ginsberg, H. S. 1990. *Microbiology*. 4th ed. J. B. Lippincott Company. Philadelphia.
- DESMARCHELIER, P.M.; GRAU, F.H. *Escherichia coli*. In: HOCKING, A. D.; ARNOLD, G.; JNSON, I. et al. (Ed.). *Foodborne microorganisms of public health significance*. Sydney: Australian Institute of Food Science and Technology Inc., 1997. Cap. 7, p. 231-264.
- Dorman, H.J.D., e Deans, S.G. (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 308–316.
- Duke, S.O., Oliva, A. 2004. Mode of action of phytotoxic terpenoids. In: Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Molinillo, J.M.G., Cutler, H.G. (Eds.). *Allelopathy - Chemistry and mode of action of allelochemicals*, CRC Press, Boca Raton, 201-216.
- Essawi, T., Srour, M., 2000. *J. Ethnopharmacol.* 70, 343.
- Fahn, A. (1979). *Secretory Tissues in Plants*. London: Academic Press. 302 p.
- Finlay, W. J. J.; Logan, N. A. e Sutherland, A. D. *Bacillus cereus* emetic toxin production in relation to dissolved oxygen tension and sporulation. *Food Microbiology*.V.19, p.423–430,2002.
- Germano, P. M. L.; e Germano, M. I. S. *Higiene e vigilância sanitária de alimentos*. São Paulo: Varela, 2003.
- Gershenzon, J., Croteau, R. (1990). Regulation of monoterpene biosynthesis in higher plants. In. G. Towers, H. Stafford (Eds.). *Biochemistry of the mevalonic acid pathway to terpenoids*. New York: Plenum Press.
- Gertsch, J., Leonti, M., Raduner, S., Racz, I., Chen, J. Z., Xie, X. Q., Altmann, K. H., Karsak, M. e Zimmer, A. (2008). Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*. 105, 9099-9104.
- Holopainen, J. K. (2004). Multiple functions of inducible plant volatiles. *Trends in Plant Science*. 9,

- Hooke, R. *Micrographia or some physiological description of minute bodies made by magnifying glasses with observations and inquiries thereupon*. London. 1665.
- Kelsey, R. G.; Reynolds, G. W. & Rodriguez, E. The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. In: Rodriguez, E.; Healey, P., L. & Meth, I. *Biology and Chemistry of Plant Trichomes*. New York and London: Plenum Press. 187-241.
- Klink, J.V., Brophy, J.J., Perry, N.B., Weavers, R.T. 1999. *J. Nat. Prod.*, 62, 487-489.
- Kubeczka, K. H. 2010. History and Sources of Essential Oil Research. In: Baser, K. H. C. e Buchbauer, G. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology and Applications*. Boca Raton, London and New York: CRC Press.
- Lobo, AM e Lourenço, AM. (Eds). 2007. *Biossíntese de produtos naturais*. Lisboa: IST Press, 272.
- Malpighi, M. *Opera omnia*. Leiden. 1686.
- Marino, M., Bersani, C., e Comi, G. (2001). Impedance measurement to study antimicrobial activity of essential oils from Lamiaceae and Compositae. *Int. J. Food Microbiol.* 67, 187-195.
- Masotti V, Juteau F, Bessiere JM, Viano J. 2003. Seasonal and phenological variations of the essential oil from the narrow endemic species *Artemisia molinieri* and its biological activities. *J. Agric. Food Chem.* 51: 7115-7121.
- Mitchell, G., Bartlett, D.W., Fraser, T.E.M., Hawkes, T.R., Holt, D.C., Townson, J.K., Wichert, R.A. 2001. *Pest Manag. Sci.* 57, 120-128.
- Olsen, S.J.; Mackinon, L.C.; Goulding, J.S.; Bean, N.H.; Slutsker, L. Surveillance for foodborne disease outbreaks. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 49, n. SS01, p. 1-51, Mar. 2000.
- Peresi, J. T. M. Surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos Contaminados por *Staphylococcus aureus*, Ocorridos no Período de Dezembro de 2001 a Abril de 2003, na Região de São José do Rio Preto – SP. *Revista Instituto Adolfo Lutz*, São Paulo, v. 63, n.º. 2, p. 232 – 236, 2004.

- Reische, D. W., Lillard, D. A., e Eitenmiller, R. R. (1998). Antioxidants in food lipids. In: Ahoh, C. C. e Min, B. D. (Eds.), Chemistry, nutrition and biotechnology. New York: Marcel Dekker.
- Romagni, J. G., Duke, S. O., and Dayan, F. E. 2000b, *Plant Physiol.*, 123, 725-732.
- Romagni, J.G., Allen, S.N., Dayan, F.E. 2000a. *J. Chem. Ecol.*, 26, 303-313.
- Roshina, V. V., Roshina, V. D. (1993). The secretory function of higher plants. Srpinger-Verlag, New York.
- Ruiz, P. G. (2002). Productos naturales. Univerdidad Pública de Navarra.
- Silva, C. J. (2007). Morfoantomia foliar e composição química dos óleos essenciais de sete espécies de *Melaleuca L.* Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Viçosa – UFV. Viçosa, MG.
- Silva-Santos, A., Bizzo, H. R., Antunes, A. M., e D’Avila, I. A. (2006). A proteção patentária na utilização de óleos essenciais e compostos terpênicos para o desenvolvimento tecnológico e industrial. *Rev. Bras. Pl. Med.* 8, 14-22.
- Turner, G. W.; Gershenzon, J. & Croteau, R. B. (2000). Development of peltate glandular trichomes of Peppermint. *Plant Physiology*. 124, 665-679.
- Von-Poser, G. L., Mentz, L. A. (2003). Diversidade biológica e sistemas de classificação. In: Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R. (Eds.). *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. – Porto Alegre; Florianópolis: Ed. Universidade UFRGS; Ed. UFSC; 833 p.

2 Capítulo 2

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE VERBENACEAE: FONTES ALTERNATIVAS DE (*E*)-CARIOFILENO E GERMACRENO-D

RESUMO

Determinou-se a composição química dos óleos essenciais das Verbenaceae: *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers., *Lippia brasiliensis* (Link) T. Silva, *Lippia* sp., *Lantana camara* L., *Lantana trifolia* L. e *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger e suas constituições químicas foram determinadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. Foi avaliada a atividade antimicrobiana desses os óleos. Observou-se que os óleos essenciais das espécies *Aloysia virgata*, *Lippia brasiliensis*, *Lippia* sp., *Lantana camara*, *Lantana trifolia* e *Lantana montevidensis*, coletadas em Minas Gerais, possuem constituição química variada e compostas em grande parte por substâncias sesquiterpênicas. É possível observar um padrão referente às concentrações relativas dos constituintes majoritários em relação aos gêneros das plantas estudadas. As plantas do gênero *Lippia* apresentam maior concentração de (*E*)-cariofileno que de germacreno-D, enquanto as plantas dos gêneros *Lantana* e *Aloysia* apresentam maior concentração de germacreno-D em relação ao (*E*)-cariofileno. Observa-se também que o óleo da espécie *Lippia brasiliensis* possui ligeira alteração de constituição ao longo das estações, apresentando maiores concentrações de constituintes oxigenados durante o período frio e seco do ano. Para as espécies *Lippia brasiliensis*, *Lantana camara* e *Lantana*

trifolia, os óleos extraídos das flores apresentam maiores concentrações de constituintes monoterpênicos que os óleos extraídos das folhas. O óleo extraído das folhas da espécie *Lantana camara* não apresentou atividade contra as bactérias estudadas. Os óleos extraídos das folhas das espécies *Aloysia virgata*, *Lippia brasiliensis*, *Lantana trifolia* e *Lantana montevidensis* apresentaram atividade moderada contra as cepas de bactérias Gram-positivas *B. cereus* e *S. aureus*. Apenas o óleo extraído das folhas da espécie *A. virgata* foi ativo contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*.

ABSTRACT

Chemical Composition and Antibacterial activity of Verbenaceae Essential Oils: Alternative sources of (E)-Caryophyllene and Germacrene-D. Essential oils from the leaves of Verbenaceae species *Aloysia virgata*, *Lantana camara*, *Lantana trifolia*, *Lantana montevidensis*, *Lippia brasiliensis* and *Lippia* spp., were investigated for its chemical composition and antibacterial activity. The volatile oils were characterized by a high content of sesquiterpenes of which (*E*)-caryophyllene (10-35%), germacrene-D (5-46%) and bicyclogermacrene (7-17%) were the major components for all studied species. For the flowers, a higher concentration of monoterpenes was observed for the species *L. camara*, *L. trifolia* and *L. brasiliensis*, probably working as attractive to specific pollinators. The oil from *A. virgata* was the most active, exhibiting high antimicrobial activity against the bacteria *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*.

2.1 *Família Verbenaceae*

A família Verbenaceae, representada no Brasil por 17 gêneros e cerca de 250 espécies, se destaca em função de vários exemplos de aplicações medicinais e ornamentais, principalmente nos gêneros *Aloysia*, *Lantana*, *Stachytarpheta* e *Lippia* (Salimena-Pires, 1991; Salimena, 2000). Verbenaceae está incluída na subclasse Asteridae e ordem Lamiales (Judd *et al.*, 1999). Ocorre praticamente em todos os ecossistemas terrestres, sendo uma das cinco famílias mais importantes entre as dicotiledôneas dos campos rupestres (Giulietti *et al.*, 1987).

Em todo o mundo, a família inclui, segundo Cronquist (1988), aproximadamente 2600 espécies reunidas em 100 gêneros com distribuição pantropical e um limitado número de espécies que ocorre em regiões temperadas. Estão incluídas espécies ornamentais comumente cultivadas, como *Petrea volubilis* L. (flor-de-são-miguel), *Duranta repens* L. (pingo-de-ouro), pequena cerca viva muito comum, com folhas jovens douradas, e *Lantana camara* L. (cambará), com pequenas flores ornamentais de cores variadas, muito atrativas às borboletas. Esta última espécie comporta-se frequentemente como invasora de culturas, assim como espécies dos gêneros *Verbena* e *Stachytarpheta*. Nos cerrados e campos rupestres brasileiros são bastante comuns espécies de *Lippia* e *Stachytarpheta*. A tamanqueira (*Citharexylum myrianthum* Cham.) é uma árvore relativamente comum em matas ciliares e estacionais.

2.2 *Química e Etnofarmacologia de Verbenaceae*

De todos os gêneros de Verbenaceae, *Lippia* L. é certamente o mais estudado quimicamente, devido à importância econômica decorrente das diferentes aplicações dos óleos essenciais, sendo muitas espécies consideradas medicinais (Salimena, 2000). Este gênero inclui aproximadamente 200 espécies de ervas, arbustos e pequenas árvores. O maior número de espécies se encontra no Brasil, com ocorrência especialmente nos campos rupestres e cerrados.

Neste gênero, os metabólitos especiais que mais se destacam são os voláteis, principalmente monoterpênóides e sesquiterpenóides. A **Tabela 2.1** apresenta um sumário da composição química de algumas espécies de *Lippia* (Pascual, *et al.* 2001), distribuídas nas Américas Central e Sul e regiões tropicais da África.

Atividades biológicas de interesse também têm sido relatadas na literatura etnofarmacológica para os óleos voláteis de Verbenaceae, principalmente atividades antimicrobianas. Relatos compilados da literatura (Pascual *et al.*, 2001) são apresentados na **Tabela 2.2**, referentes a espécies de *Lippia*.

Além dos indicativos etnofarmacológicos, pesquisas recentes confirmam experimentalmente várias atividades biológicas de metabólitos secundários de Verbenaceae. Oliveira *et al.* (2006) verificaram a atividade do óleo essencial de *L. sidoides* Cham. contra *Staphylococcus aureus*. Na medicina tradicional, *L. sidoides* tem sido indicada como anti-séptico no combate a inflamação de boca e garganta, lavagens de pele, couro cabeludo e mucosas (Lorenzi e Matos, 2008).

Carvalho *et al.* (2003) observaram atividade inseticida do óleo essencial de *Lippia sidoides* Cham. contra larvas de *Aedes aegypti*, o vetor biológico da dengue. Posteriormente, essa mesma atividade foi observada para o óleo essencial de *Lippia gracilis* HBK (Silva *et al.*, 2008). Timol e carvacrol, os principais constituintes do óleo dessas plantas, podem estar relacionados com a atividade inseticida encontrada (Carvalho *et al.*, 2003; Silva *et al.*, 2008).

Tabela 2.1 – Principais constituintes do óleo essencial de espécies de *Lippia*

Espécie	Monoterpenos	Sesquiterpenos
<i>L. affinis aristata</i> Schau.	Sabineno, limoneno, <i>p</i> -cimeno, δ -3-careno, α -pineno, γ -terpineno α -tujeno,	β -Cariofileno, γ -cadineno, γ -elemeno
<i>L. affinis sidoides</i> Cham	Timol, α -felandreno, <i>p</i> -cimeno, mirceno, carvacrol, γ -terpineno	β -Cariofileno
<i>L. adoensis</i> Hochst.	α -Terpineol, β -pineno, γ -terpineno, carvona, 1,8-cineol, <i>p</i> -cimeno, limoneno, linalol, piperitona, timol	δ -Cadineno, β -cariofileno, copaeno, germacreno D, nerolidol
<i>L. alba</i> (Mill.) N.E. Brown	Borneol, cânfora, 1,8-cineol, citronelol, geranial, linalol	α -Muuroleno, β -cariofileno, β -cubebeno, β -eleneno, γ -cadineno
<i>L. alnifolia</i> Schau.	Carvacrol, <i>p</i> -cimeno, metiltimol, timol, γ -terpineno	β -Cariofileno, α -humuleno, alo-aromadendrene
<i>L. americana</i> L.	-	cadinenol
<i>L. aristata</i> Schau.	Sabineno, limoneno, δ -3-careno, α -pineno, linalol	β -Cariofileno, γ -elemeno, γ -cadineno, α -humuleno, α -copaeno
<i>L. carviiodora</i> Meikle	Limoneno	β -Cubebeno, β -eleneno, α -humuleno, γ -muuroleno
<i>L. chamaedrifolia</i> Steud.	1,8-Cineol, linalol, acetato de sabinila, sabineno, limoneno	Globulol, espatulenol, β -cariofileno, γ -elemeno, β -cubebeno
<i>L. hastulata</i> (Griseb.) Hieron.	α -tujona, álcool tujílico	-
<i>L. integrifolia</i> (Griseb.) Hieron.	Cânfora, limoneno, canfeno, metileugenol.	Lippifoli-1(6)-ene-5-onae, δ -8-africaneno, biciclogermacreno, germacreno D, α -humuleno, derivados de asteriscanos
<i>L. javanica</i> (N.L. Burm.) Spreng.	Mirceno, mircenona, ocimeno, (<i>E</i>)-tagetenona, (<i>Z</i>)-tagetenona, <i>cis</i> -tagetona	β -Cariofileno
<i>L. junelliana</i> (Moldenke) Tronc.	Cis-dihidrocarvona, mircenona, cânfora, limoneno, mirceno, (<i>E</i>)-tagetenona	β -Cariofileno, espatulenol

Tabela 2.1 – Continuação – Principais constituintes do óleo essencial de espécies de *Lippia*

Espécie	Monoterpenos	Sesquiterpenos
<i>L. ligustrina</i> (Lag.) Britton	1,8-cineol, α -pineno, vanilina	-
<i>L. lycoides</i> (Cham.) Steud.	α -pineno, canfora, carvona, 1,8-cineol, citral, <i>p</i> -cimeno, geraniol, limoneno, mentona	-
<i>L. microphylla</i> Cham.	1,8-cineol, α -terpineol, terpinen-4-ol, metiltimol, sabineno, α -terpineno, timol	β -Cariofileno, α -humuleno
<i>L. multiflora</i> Moldenke	Linalol, 1,8-cineol	Nerolidol, β -farneseno,
<i>L. nodiflora</i> (L.) Greene	álcool 2-fenetílico, oct-1-en-3-ol, linalol, 2,6-dimetiloctansalicilato de metila, <i>p</i> -cimen-8-ol	α -Copaeno, α -bergamotena, delta-cadinene, β -bisaboleno
<i>L. origanoides</i> H.B.K.	α -Terpineno, γ -terpineno, 1,8-cineol, <i>p</i> -cimeno, timol, acetato de timila	β -Cariofileno, umbelulona
<i>L. polystachia</i> Griseb.	α -tujona, carvona, limoneno, sabineno	β -Cariofileno, lippifoli-1(6)-en-5-ona,
<i>L. sellowii</i> Briq.	-	1,6-germacradien-5-ol
<i>L. seriphioides</i> A. Gray	Carvacrol, citral, <i>p</i> -cimeno, geranial, piperitona, timol	-
<i>L. sidoides</i> Cham.	Carvacrol, <i>p</i> -cimeno, α -terpineno, timol	β -Cariofileno, α -copaeno, α -humuleno
<i>L. somalensis</i> Vatke	1,8-cineol, δ -3-careno, mirceno, limoneno	-
<i>L. stoechadifolia</i> H.B.K.	Óxido de pulegona	-
<i>L. thymoides</i> Mart. & Schau.	Metiltimol	
<i>L. turbinata</i> Griseb.	α -Tujona, carvona, limoneno, acetato de bornila, canfora	Óxido de β -cariofileno, espatulenol, β -cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno
<i>L. ukambensis</i> Vatke	α -Terpineol, δ -3-careno, canfeno, cânfor, 1,8-cineol, <i>p</i> -cimeno, trans-sabineno hidratado, terpinen-4-ol	β -Cubebeno

Fonte: Pascual *et al.*, 2001.

Tabela 2.2 – Uso tradicional e atividade farmacológica de espécies de *Lippia* L.
(Verbenaceae)

Espécie	Uso Tradicional*	Atividade Farmacológica
<i>L. affinis sidoides</i> Cham	-	O
<i>L. alba</i> (Mill.)	A,B,C,D,E,F,G,H, K,Q,R,S.	A,B,D,M,N,T, V
<i>L. geminata</i> H.B.K.	A, B, D, G, K, Q, S	A
<i>L. aristata</i> Schau	-	O
<i>L. chamissonis</i> D. Dietr.	-	Q, J
<i>L. chevalieri</i>	B, P, R, S,	P
<i>L. citriodora</i> (Ort.)	A, B, C, G, I, Q	A, B, Y
<i>L. dauensis</i> (Chiov.)	-	L
<i>L. dulcis</i> Trevir.	A, C, D, G, I, K, R, W	C, M
<i>L. formosa</i> T. S.	-	M
<i>L. gracilis</i> H.B.K	E	M
<i>L. greifolia</i>	-	L, M
<i>L. grata</i> Schau.	-	Q
<i>L. graveolens</i> H.B.K.	A, C, D, K, Q, R, U, W	-
<i>L. javanica</i> (N.L. Burm.) Spreng.	A, Q, R-	L, M
<i>L. micromera</i> Schau	-	C, G, I, R,
<i>L. microphylla</i> Cham.	R	M
<i>L. multiflora</i> Moldenke	H, J, P, R	F, J, N, P
<i>L. nodiflora</i> (L.) Michx.	A, I, K, M, P, R, Q,S	M
<i>L. organoides</i> H.B.K.	C, G, R	-
<i>L. palmeri</i> S. Wats. var. <i>palmeri</i>	-	F, M
<i>L. reptans</i> H.B.K.	D, G	-
<i>L. sidoides</i> Cham.	-	B, F, J, M, Q, Z
<i>L. somalensis</i> Vatke	-	L
<i>L. ukambensis</i> Vatke	-	L, M
<i>L. wilmsii</i> H. H. W. Pearson	-	L

* A: analgésico/anti-inflamatório/antipirético; B: sedativo; C: uso na culinária; D: remédio para diarreia e disenteria; E: doenças cutâneas; F: antifúngico; G: remédio para distúrbios gastrointestinais; H: tratamento de doenças hepáticas/cóleras/vesícula; I: diurético; J: anti-hipertensivo; K: distúrbios menstruais; L: larvicida/repelente; M: ação antimicrobiana; N: ação antiviral; O: moluscicida; P: antimalarial; Q: antispasmodico; R: tratamento de doenças respiratórias; S: tratamento de sífilis e gonorréia; T: citostática; U: tratamento de diabetes; V: anticonvulsivo; W: abortivo; X: estimulante, Y: pro-convulsivo; Z: anestésico local.

Fonte: Pascual *et al.*, 2001.

O óleo essencial de *L. multiflora* foi mais ativo que o óleo de *L. chevalieri* contra várias espécies de bactérias, sendo que as Gram-negativas foram mais afetadas que as Gram-positivas (Bassole *et al.*, 2003). Posteriormente, Mevy *et al.* (2007) corroboraram a atividade bactericida e fungicida de *L. chevalieri*. A infusão das folhas de *L. javanica* é comumente usada como um descongestionante para resfriados e tosses (Viljoen *et al.*, 2005), seu óleo essencial também é de comprovada atividade antimicrobiana (Manenzhe *et al.*, 2004).

Verbena littorales HBK é utilizada na medicina popular das Américas Central e do Sul contra diarreia, febre, distúrbios gastrointestinais, e algumas doenças sexualmente transmissíveis (Lorenzi e Matos 2008). Informações preliminares etnobotânicas e fitoquímicas sobre esta planta foram publicadas e vários constituintes foram identificados (Umaña e Castro, 1990a, b; Li *et al.*, 2001). Mais recentemente, Castro-Gamboa e Castro (2004) isolaram dois novos iridóides de *Verbena littorales* que demonstraram atividades antioxidantes e ação peristáltica intestinal bem como atividade moderada contra bactérias Gram positivas e negativas.

Analisando a atividade antimicrobiana de diferentes extratos de *Lippia adoensis*, Tadeg *et al.* (2005) puderam observar que os extratos menos polares exibiram maior efeito inibitório sobre o crescimento de bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, e do fungo *Trichophyton mentagrophytes*. Duarte *et al.* (2005) estudaram a atividade contra *Candida albicans* de 35 plantas medicinais comumente utilizadas no Brasil e constataram a atividade antifúngica do óleo essencial de 13 espécies, incluindo as Verbenáceas *Aloysia triphylla* e *Lippia alba*.

Jiménez-Arellanes e colaboradores (2003) observaram a atividade antimicobacteriana do extrato hexânico das partes aéreas de *Lantana hispida*, posteriormente, Jiménez-Arellanes *et al.* (2007) elucidaram a estrutura de três novos triterpenóides pentacíclicos com núcleos oleananos, isolados do extrato hexânico de *Lantana hispida*, que apresentaram atividade contra *Mycobacterium tuberculosis*. Segundo Kunle *et al.* (2003), apenas o extrato hexânico das folhas de *Lippia multiflora* foi ativo contra várias espécies de bactérias e contra o fungo *Candida albicans*.

Esses poucos dados apresentados constituem uma pequena parte da ampla literatura referente à etnofarmacologia e à composição química de Verbenaceae. Mas não conflitante, a rica biodiversidade desta família ainda fornece um vasto campo para a pesquisa e desenvolvimento (bio)tecnológico.

Portanto, o presente capítulo descreve a composição química do óleo essencial das folhas das espécies *Aloysia virgata* (Ruiz & Pav.) Pers., *Lippia brasiliensis* (Link) T. Silva, *Lippia* sp., *Lantana camara* L., *Lantana trifolia* L. e *Lantana montevidensis* (Spreng.) Briq. coletadas em vários fragmentos de Mata Atlântica de Minas Gerais. Também apresenta o estudo da atividade antimicrobiana dos óleos de cinco destas espécies.

2.3 Experimental

2.3.1 Material Vegetal

Expedições de campo foram realizadas no estado de Minas Gerais para o mapeamento da ocorrência das espécies. Amostras das populações selecionadas foram coletadas, armazenadas em caixas térmicas com gelo e transportadas para o Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), do Departamento de Química (DEQ) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde se realizaram as extrações dos óleos essenciais. Espécimes-testemunhas foram herborizados e incorporados ao acervo do Herbário VIC do Departamento de Biologia Vegetal (DBV), da mesma Universidade. As espécies e os detalhes de coleta estão sumarizados na **Tabela 2.3**.

Tabela 2.3 – Espécies, locais, meses de coleta e número de registro no Herbário VIC – DBV/UFV

Famílias e Espécies	Local	Meses	Nº Registro
Verbenaceae			
<i>Aloysia virgata</i>	Viçosa, MG – UFV	Abril/2008	VIC 24567
<i>Lippia</i> sp.	Ouro Branco, MG	Março/2008	VIC 20673
<i>Lantana camara</i>	Tocantins, MG – Antiga Estação	Julho/2008	VIC 21549
<i>Lantana trifolia</i>	Tocantins, MG – Santa Isabel	Março/2008	VIC 21550
<i>Lantana montevidensis</i>	Viçosa, MG – Mata do Paraíso	Março/2008	VIC 21551
<i>Lippia brasiliensis</i>	Viçosa, MG – Mata do Paraíso	Março/2008 Maio/2008 Julho/2008 Setembro/2008 Novembro/2008 Janeiro/2009	VIC 21548

2.3.2 Extração de Óleos Essenciais

Folhas completamente expandidas e inflorescências completamente desenvolvidas foram coletadas separadamente, em triplicata e de modo randômico entre os indivíduos das populações estudadas. Cada amostra foi triturada e submetida a três horas de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger. Os óleos obtidos foram recolhidos juntamente com o hidrolato e extraídos com pentano (3 x 20 mL) em funil de separação. As fases orgânicas foram secadas com sulfato de magnésio anidro e o solvente removido sob baixa pressão, a 40 °C, em evaporador rotativo. Os óleos foram acondicionados em frascos de vidro, sob atmosfera de nitrogênio, e mantidos sob refrigeração à temperatura de aproximadamente -4 °C, até o momento das análises químicas e ensaios de atividade biológica.

A massa de cada óleo foi mensurada em balança analítica e os rendimentos expressos em relação à massa de matéria seca do vegetal. A matéria seca foi determinada pela secagem de três alíquotas de aproximadamente 2 g, de cada amostra, em estufa a 103 ± 2 °C até massa constante (ASAE, 2000).

2.3.3 Cromatografia em Fase Gasosa (CG)

Utilizou-se cromatógrafo a gás Shimadzu GC-17A equipado com detector de ionização em chama (DIC) e coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m × 0,32 mm, espessura do filme de 0,25 µm) com as seguintes condições cromatográficas: gás de arraste N₂ sob fluxo de 1,8 mL min⁻¹; temperatura do injetor 220 °C, temperatura do detector 240 °C; temperatura inicial da coluna 40 °C, isoterma por 2 min., seguido de aquecimento a 3 °C min⁻¹ até 240 °C, mais isoterma por 15 min; volume de injeção 1,0 µL (1% p/v em CH₂Cl₂); razão de split 1:10; pressão da coluna 115 kPa.

As análises foram realizadas em triplicata e a concentração de cada constituinte foi calculada pela porcentagem da área do pico correspondente em relação à área total do cromatograma.

Utilizou-se aparelho Shimadzu GCMS-QP5050A, equipado com coluna de sílica fundida DB-5 (30 m × 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 µm) e acoplado a detector de ionização. Gás de arraste He sob fluxo de 1,8 mL min⁻¹; temperatura do injetor 220 °C, temperatura inicial da coluna 40 °C, isoterma por 2 min., seguido de aquecimento a 3 °C min⁻¹ até 240 °C, mais isoterma por 15 min; volume de injeção 1,0 µL (1% p/v em CH₂Cl₂); razão de split 1:5; pressão da coluna 100 kPa; temperatura da interface 240 °C; ionização por impacto de elétrons (70 eV); amplitude de varredura de 30 a 600 u.

As identificações dos componentes foram realizadas pela comparação de seus tempos de retenção, relativos à série de alcanos (C₉ – C₂₇), e pela comparação dos espectros de massas com o banco de dados da biblioteca Wiley (Wiley 330.000) ou com a literatura (Adams, 1995).

2.3.4 Avaliação da Atividade Antibacteriana

As cepas de bactérias foram obtidas junto ao Departamento de Microbiologia (DMB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os microrganismos estudados foram as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus cereus*, Ribotipo 1 222-173-S4 isolado de superfícies de equipamentos de pós-pasteurização (Salustiano *et al.*, 2009); e Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 11229).

2.3.4.1 Estudo da Atividade Antibacteriana por Disco-Difusão

A atividade dos óleos essenciais contra as cepas de bactérias estudadas foi avaliada pelo método de disco-difusão em meio sólido de acordo com as normas do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003a), atualmente nomeado *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Placas de Petri contendo ágar Müeller-Hinton foram inoculadas com suspensões dos microrganismos testados (2 x 10⁸ UFC mL⁻¹). Discos de papel de

filtro (6 mm de diâmetro) foram embebidos com 5 µL de óleo essencial e posicionados sobre superfície do ágar das placas inoculadas. As placas foram incubadas por 48 horas a 35 °C. O diâmetro das zonas de inibição foram medidos com paquímetro e expressados em milímetros. O antibiótico Cloranfenicol (30 µg) foi utilizado como controle positivo e água esterilizada como controle negativo. Cada óleo foi testado em triplicata e repetido três vezes, totalizando nove repetições. Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado e os resultados foram analisados pela ANOVA e teste de Scott-Knott a $P \leq 0.05$, utilizando o programa computacional GENES (*Genetics and Statistical Analysis* Versão 2007.0.0 – Universidade Federal de Viçosa).

2.3.4.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O método de microdiluição em caldo nutritivo foi utilizado para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), para alguns óleos selecionados no teste de disco-difusão, de acordo com as normas do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003b).

Realizou-se a diluição seriada, de razão 2, dos óleos essenciais em placas de microtitulação de 96 poços, cobrindo a faixa de concentração de 2,0 a 0,0156 % (v/v). Utilizou-se o meio líquido *Brain Heart Infusion Broth* (Himedia) suplementado com Tween[®] 80 (Merck, Germany) a 0,5% (v/v), para solubilização dos óleos. Inóculos das bactérias testadas foram adicionados para se obter a concentração final de 5×10^5 UFC mL⁻¹. As placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C. O crescimento bacteriano foi avaliado pela turbidez, mensurada em espectrofotômetro a 625 nm, e a CIM foi definida como a menor concentração de óleo essencial na qual o microrganismo testado não apresentou crescimento visível.

2.4 *Resultados e Discussão*

2.4.1 **Composição química dos óleos essenciais de Verbenaceae.**

Os rendimentos dos óleos essenciais, com base na massa de matéria seca, extraídos por hidrodestilação de folhas e flores das espécies de Verbenaceae estão apresentados nas **Tabelas 2.4 e 2.5**. Para as folhas de *Aloysia virgata* obteve-se um rendimento de 0,4%, inferior ao encontrado para planta do mesmo gênero *A. triphylla* (1,6%) (Duarte *et al.*, 2007). As flores de *Lantana camara* (0,6%) e *Lantana trifolia* (0,7%) apresentaram maior rendimento de óleo essencial que suas folhas (0,3 e 0,2%, respectivamente). Para as folhas de *Lantana montevidensis* obteve-se 0,3% de rendimento. Esses valores estão de acordo com os encontrados para plantas do gênero *Lantana*, conforme revisado por Ghisalbert (2000). As folhas de *Lippia* sp. apresentaram o menor rendimento (0,04%) dentre as plantas estudadas e a espécie *Lippia brasiliensis* apresentou de 0,3 a 0,5% de óleo para folhas e 0,6% para flores (Tabela 1.5), valores também consoantes com os observados para plantas desse gênero (Pascual *et al.*, 2001).

Também nas **Tabelas 2.4 e 2.5**, encontram-se os constituintes identificados nos óleos essenciais das espécies estudadas. Numa primeira análise, nota-se que os óleos essenciais extraídos das folhas das Verbenaceae estudadas apresentaram constituições semelhantes. A baixa concentração de compostos monoterpênicos foi comum para todas as espécies estudadas, sendo esta classe de compostos mais evidente nos óleos extraídos das flores. Dentre os sesquiterpenos, os constituintes oxigenados apresentaram contribuições discretas, ligeiramente mais elevadas para os óleos das espécies *Aloysia virgata*, *Lippia brasiliensis* e *Lantana montevidensis*. Os constituintes majoritários para todas as espécies foram os sesquiterpenos (*E*)-cariofileno (10 – 35%), germacreno D (5 – 46%) e biciclogermacreno (7 – 17%).

Tabela 2.4 – Constituintes e rendimento dos óleos essenciais (%) das espécies *Aloysia virgata* (ALVG), *Lippia* sp. (LPSP), *Lantana camara* (LTCM), *Lantana trifolia* (LTTF) e *Lantana montevidensis* (LTMT)

Constituintes	IRR	ALVG	LPSP	LTCM		LTTF		LTMT
		Folhas	Folhas	Folhas	Flores	Folhas	Flores	Folhas
Monoterpenos Hidrocarbonetos		8,8	0,5	-	17,8	-	12,3	-
α -tujeno	931	-	-	-	0,5 \pm 0,1	-	-	-
α -pineno	939	1,2 \pm 0,0	-	-	1,5 \pm 0,2	-	-	-
sabinene	976	0,4 \pm 0,1	-	-	2,2 \pm 0,3	-	7,9 \pm 0,6	-
β -pineno	980	-	-	-	1,4 \pm 0,2	-	0,2 \pm 0,0	-
ρ -cimeno	1026	-	-	-	0,3 \pm 0,0	-	-	-
Limoneno	1031	1,4 \pm 0,1	-	-	7,8 \pm 0,4	-	2,8 \pm 0,2	-
(Z)- β -ocimeno	1040	0,8 \pm 0,2	-	-	-	-	1,4 \pm 0,1	-
(E)- β -ocimeno	1050	5,0 \pm 0,5	0,5 \pm 0,2	-	0,9 \pm 0,1	-	-	-
γ -terpineno	1062	-	-	-	3,2 \pm 0,2	-	-	-
Monoterpenos Oxigenados		-	2,9	-	1,8	-	1,4	-
Linalol	1098	-	1,4 \pm 0,3	-	1,8 \pm 0,1	-	0,8 \pm 0,0	-
Terpinen-4-ol	1177	-	-	-	-	-	0,6 \pm 0,1	-
piperitona	1252	-	0,4 \pm 0,2	-	-	-	-	-
acetato de bornila	1285	-	1,1 \pm 0,3	-	-	-	-	-
Sesquiterpenos Hidrocarbonetos		81,4	48,3	91,0	73,0	64,3	79,9	80,7
δ -elemeno	1339	0,7 \pm 0,1	0,6 \pm 0,1	1,5 \pm 0,2	1,8 \pm 0,2	-	-	-
α -cubebeno	1351	-	0,2 \pm 0,1	-	-	-	-	-
α -copaeno	1376	0,4 \pm 0,0	0,6 \pm 0,2	3,3 \pm 0,1	4,7 \pm 0,3	3,8 \pm 0,3	3,0 \pm 0,2	1,3 \pm 0,2
β -bourboneno	1384	-	-	1,1 \pm 0,2	0,3 \pm 0,1	-	-	0,8 \pm 0,1
β -cubebeno	1390	-	0,3 \pm 0,2	-	-	-	-	-
β -elemeno	1391	1,8 \pm 0,1	1,3 \pm 0,6	-	0,8 \pm 0,2	1,4 \pm 0,1	2,9 \pm 0,2	1,8 \pm 0,3
α -gurjuneno	1409	-	-	-	-	-	-	-
(E)-cariofileno	1418	8,9 \pm 0,8	16,8 \pm 1,2	17,0 \pm 1,1	13,6 \pm 0,9	10,2 \pm 1,2	16,1 \pm 0,7	9,2 \pm 1,2
Aromadendreno	1439	-	1,0 \pm 0,5	-	-	-	-	-
α -guaiano	1439	-	1,5 \pm 0,3	-	-	-	-	-
α -humuleno	1454	1,6 \pm 0,1	-	1,7 \pm 0,2	1,6 \pm 0,2	-	1,5 \pm 0,1	1,3 \pm 0,1
(E)- β -farneseno	1458	-	-	-	0,5 \pm 0,1	-	-	-
Alo-aromadendreno	1461	0,2 \pm 0,1	-	2,3 \pm 0,3	1,9 \pm 0,2	2,4 \pm 0,2	1,9 \pm 0,2	2,1 \pm 0,5
Germacreno D	1480	46,3 \pm 1,1	4,6 \pm 0,7	46,1 \pm 1,4	32,4 \pm 1,6	29,5 \pm 1,4	38,1 \pm 1,2	42,7 \pm 1,2
β -selineno	1485	-	0,8 \pm 0,4	-	-	-	-	-
valeceno	1491	-	-	-	-	-	-	0,7 \pm 0,1
Biciclogermacreno	1494	17,4 \pm 1,0	7,1 \pm 1,5	8,5 \pm 0,7	5,8 \pm 0,6	9,1 \pm 0,3	11,0 \pm 0,6	16,1 \pm 0,9
α -muuroloeno	1499	-	0,5 \pm 0,3	-	0,4 \pm 0,1	2,5 \pm 0,1	1,0 \pm 0,1	1,0 \pm 0,2
germacreno A	1503	1,1 \pm 0,3	2,9 \pm 0,6	-	0,5 \pm 0,2	1,8 \pm 0,1	2,5 \pm 0,2	1,7 \pm 0,3
γ -cadineno	1513	0,5 \pm 0,1	0,4 \pm 0,2	1,7 \pm 0,2	0,4 \pm 0,0	-	-	-
(Z)-calameneno	1521	-	-	-	-	-	-	-
δ -cadineno	1524	1,3 \pm 0,3	2,8 \pm 0,9	3,6 \pm 0,3	3,3 \pm 0,1	3,6 \pm 0,2	1,9 \pm 0,1	2,0 \pm 0,2
germacreno B	1556	1,2 \pm 0,2	6,9 \pm 1,1	4,2 \pm 0,5	5,0 \pm 0,4	-	-	-
Sesquiterpenos Oxigenados		6,8	32,9	1,5	1,3	8,7	2,8	14,3
(E)- β -damascenona	1380	-	0,3 \pm 0,1	-	-	-	-	-
geranil-acetona	1453	-	5,0 \pm 1,3	-	-	-	-	-
Elemol	1549	0,7 \pm 0,1	-	-	-	-	-	-
(E)-nerolidol	1564	-	0,4 \pm 0,2	-	-	5,3 \pm 0,4	-	6,1 \pm 0,5
germacrena D-4-ol	1574	1,2 \pm 0,2	-	0,7 \pm 0,1	0,5 \pm 0,1	-	0,6 \pm 0,1	-
Espatuleno	1576	-	6,4 \pm 0,7	-	-	-	0,9 \pm 0,0	3,2 \pm 0,4
óxido de β -cariofileno	1581	-	8,1 \pm 0,7	0,8 \pm 0,1	-	2,3 \pm 0,1	-	1,7 \pm 0,3
Viridiflorol	1590	4,2 \pm 0,3	1,4 \pm 0,2	-	-	-	-	-
α -muurolool	1645	-	5,3 \pm 0,5	-	-	-	-	1,8 \pm 0,1
α -cadinol	1653	0,7 \pm 0,1	2,9 \pm 0,9	-	0,8 \pm 0,2	1,1 \pm 0,0	1,3 \pm 0,3	1,5 \pm 0,1
α -bisabolol	1653	-	3,1 \pm 0,2	-	-	-	-	-

Tabela 2.4 – Constituintes e rendimento dos óleos essenciais (%) das espécies *Aloysia virgata* (ALVG), *Lippia* sp. (LPSP), *Lantana camara* (LTCM), *Lantana trifolia* (LTF) e *Lantana montevidensis* (LTMT), continuação

Constituintes	IRR	ALVG	LPSP	LTCM		LTF	LTMT	
		Folhas	Folhas	Folhas	Flores	Folhas	Flores	Folhas
Outros		-	10,5	-	1,6	19,3	1,8	2,4
nonano	899	-	1,1±0,2	-	1,6±0,2	-	-	-
decano	999	-	0,5±0,1	-	-	-	-	-
dodecano	1199	-	1,0±0,2	-	-	2,1±0,1	-	-
tetradecano	1399	-	6,3±0,4	-	-	17,5±1,3	1,8±0,1	2,4±0,4
hexadecano	1599	-	1,6±0,3	-	-	1,8±0,1	-	-
Total		97,0	95,1	92,5	95,5	92,3	98,2	97,4
Rendimento (%)		0,4±0,0	0,04±0,0	0,3±0,1	0,6±0,1	0,2±0,0	0,7±0,1	0,3±0,1

Tabela 2.5 – Constituintes e rendimento dos óleos essenciais (%) da espécie *Lippia brasiliensis* (LPBR).

Constituintes	IRR	Março	Mai	Julho		Setembro	Novembro	Janeiro
		Folhas	Folhas	Folhas	Flores	Folhas	Folhas	Folhas
Monoterpenos Hidrocarbonetos		2,8	-	-	9,9	-	2,6	6,1
α -pineno	939	-	-	-	3,1±0,0	-	-	-
sabinene	976	1,4±0,1	-	-	2,6±0,1	-	1,7±0,1	4,1±0,2
Limoneno	1031	1,4±0,0	-	-	4,2±0,1	-	0,9±0,0	2,0±0,1
Monoterpenos Oxigenados		-	-	-	5,8	-	-	-
Linalol	1098	-	-	-	3,4±0,2	-	-	-
Terpinen-4-ol	1177	-	-	-	2,4±0,1	-	-	-
Sesquiterpenos Hidrocarbonetos		84,5	82,7	78,7	59,2	81,0	82,8	82,0
δ -elemeno	1339	4,8±0,1	4,9±0,1	3,6±0,0	2,0±0,0	5,3±0,1	4,6±0,2	4,1±0,1
α -cubebeno	1351	2,5±0,1	1,1±0,0	1,4±0,0	0,8±0,0	1,1±0,1	1,1±0,1	0,9±0,0
α -copaeno	1376	5,9±0,1	2,1±0,1	2,7±0,1	1,3±0,0	2,3±0,2	2,3±0,2	1,8±0,1
β -bourboneno	1384	-	0,5±0,0	0,5±0,0	-	0,7±0,0	0,8±0,0	1,4±0,1
β -cubebeno	1390	3,2±0,1	1,6±0,1	1,7±0,1	0,8±0,0	1,8±0,1	1,8±0,1	-
β -elemeno	1391	-	0,6±0,0	0,8±0,0	1,1±0,0	0,5±0,0	0,7±0,0	0,7±0,0
α -gurjuneno	1409	1,1±0,0	0,4±0,0	0,7±0,0	-	0,5±0,0	0,6±0,0	0,4±0,0
(E)-cariofileno	1418	33,2±1,8	31,4±2,2	30,7±1,3	24,3±2,1	29,1±2,4	34,4±2,1	35,6±1,8
α -humuleno	1454	2,0±0,1	2,7±0,1	2,8±0,1	2,5±0,1	2,8±0,2	2,4±0,1	2,8±0,2
Alo-aromadendreno	1461	2,4±0,1	1,8±0,0	1,7±0,1	1,2±0,1	1,7±0,1	-	1,6±0,1
Germacreno D	1480	16,4±0,8	15,5±0,9	13,9±0,8	11,9±0,6	16,1±0,9	16,5±0,7	19,3±0,9
Biciclogermacreno	1494	2,0±0,1	6,8±0,1	4,2±0,1	3,2±0,1	7,1±0,4	4,1±0,1	2,4±0,1
α -muuroloeno	1499	2,8±0,1	1,6±0,1	0,5±0,0	-	0,5±0,0	1,1±0,1	1,8±0,1
α -farneseno	-	-	0,3±0,0	-	-	-	0,2±0,0	0,2±0,0
γ -cadineno	1513	0,8±0,0	1,1±0,0	1,1±0,0	0,5±0,0	1,1±0,2	1,0±0,0	0,7±0,0
(Z)-calameneno	1521	4,3±0,1	4,0±0,1	6,1±0,1	5,6±0,1	3,4±0,3	4,3±0,3	4,1±0,3
δ -cadineno	1524	-	1,1±0,1	1,0±0,0	-	1,0±0,1	1,5±0,1	1,0±0,1
1,2,3,4,4 α ,7-hexahidro-4-isopropil-1,6-dimetil naftaleno	1532	3,1±0,1	4,2±0,1	4,1±0,1	3,1±0,1	5,0±0,3	4,3±0,2	3,2±0,2
germacreno B	1556	-	1,0±0,0	1,2±0,1	0,9±0,0	1,0±0,1	1,1±0,1	-
Sesquiterpenos Oxigenados		3,5	8,6	13,6	12,0	7,3	4,4	4,3
óxido de β -cariofileno	1581	1,4±0,1	1,3±0,1	1,2±0,0	0,9±0,0	1,1±0,0	1,4±0,2	1,3±0,1
Viridiflorol	1590	0,9±0,0	1,1±0,0	2,6±0,1	2,1±0,1	1,4±0,1	1,1±0,0	1,3±0,0
α -muurolol	1645	0,6±0,0	2,5±0,1	3,9±0,1	3,4±0,2	2,2±0,2	1,1±0,1	1,1±0,1
α -cadinol	1653	0,6±0,0	3,7±0,1	5,9±0,4	5,6±0,3	2,6±0,1	0,8±0,0	0,6±0,0
Outros		6,8	7,5	5,8	9,5	7,2	7,7	5,9
oct-1-en-3-ol	978	-	-	-	2,1±0,1	-	-	-
ni*	1454	6,8±0,2	7,5±0,5	5,8±0,2	7,4±0,3	7,2±0,6	7,7±0,3	5,9±0,4
Total		97,6	98,8	98,1	96,4	95,5	97,5	98,3
Rendimento (%)		0,4±0,0	0,5±0,1	0,3±0,1	0,7±0,1	0,5±0,1	0,3±0,0	0,4±0,1

*ni: não identificado.

Entretanto, quanto à concentração relativa destes constituintes majoritários, é interessante perceber um comportamento diferenciado entre os gêneros das plantas estudadas. As espécies do gênero *Lippia* apresentam uma razão (*E*)-cariofileno/germacreno D maior que um, indicando a preferência biossintética do primeiro em detrimento do segundo. Para as plantas dos gêneros *Lantana* e *Aloysia* observa-se o inverso, maior concentração de germacreno D em relação ao (*E*)-cariofileno.

Estes resultados estão consistentes com a literatura onde se encontram elevadas concentrações de (*E*)-cariofileno para plantas do gênero *Lippia*, como *L. adoensis* Hochst., *L. alba* (Mill.) N.E. Brown, *L. alnifolia* Schau., *L. aristata* Schau., *L. javanica* (N.L. Burm.) Spreng., *L. junelliana* (Moldenke) Tronc. e *L. microphylla* Cham. entre outras (Pascual *et al.*, 2001).

Os sesquiterpenos (*E*)-cariofileno e germacreno D podem ser biossinteticamente relacionados como representado na **Figura 2.1**. A ionização do difosfato de farnesila (FPP) leva a formação do cátion farnesílico, que pode sofrer uma série de ciclizações (Degenhardt *et al.*, 2009). A ciclização entre C11 e C1 leva à formação do cátion humulílico, e sua desprotonação seguida do fechamento do anel ciclobutano dá origem ao sesquiterpeno (*E*)-cariofileno. De outra maneira, a ciclização entre C10 e C1 origina o cátion germacrílico, que pode ser convertido a germacreno. Desta forma, o fluxo de precursores em direção à biossíntese de um desses componentes pode levar a redução da concentração do outro.

A relação biossintética entre os constituintes dos óleos essenciais está intimamente associada à presença de diferentes enzimas que catalisam reações específicas. A proliferação e seleção natural destas enzimas, ao longo do processo evolutivo das plantas, resultam na presença e atividades diferentes destas enzimas em grupos taxonômicos distintos. Desta forma, a análise dos padrões dos óleos essenciais pode ser uma ferramenta útil para a resolução de problemas taxonômicos. Como exemplo, Petrakis *et al.* (2005) estudaram a constituição química dos óleos essenciais de cinco espécies de *Hypericum* (Clusiaceae) nativas da Grécia, e propuseram uma reconstrução filogenética que confirma as divisões taxonômicas existentes para este gênero.

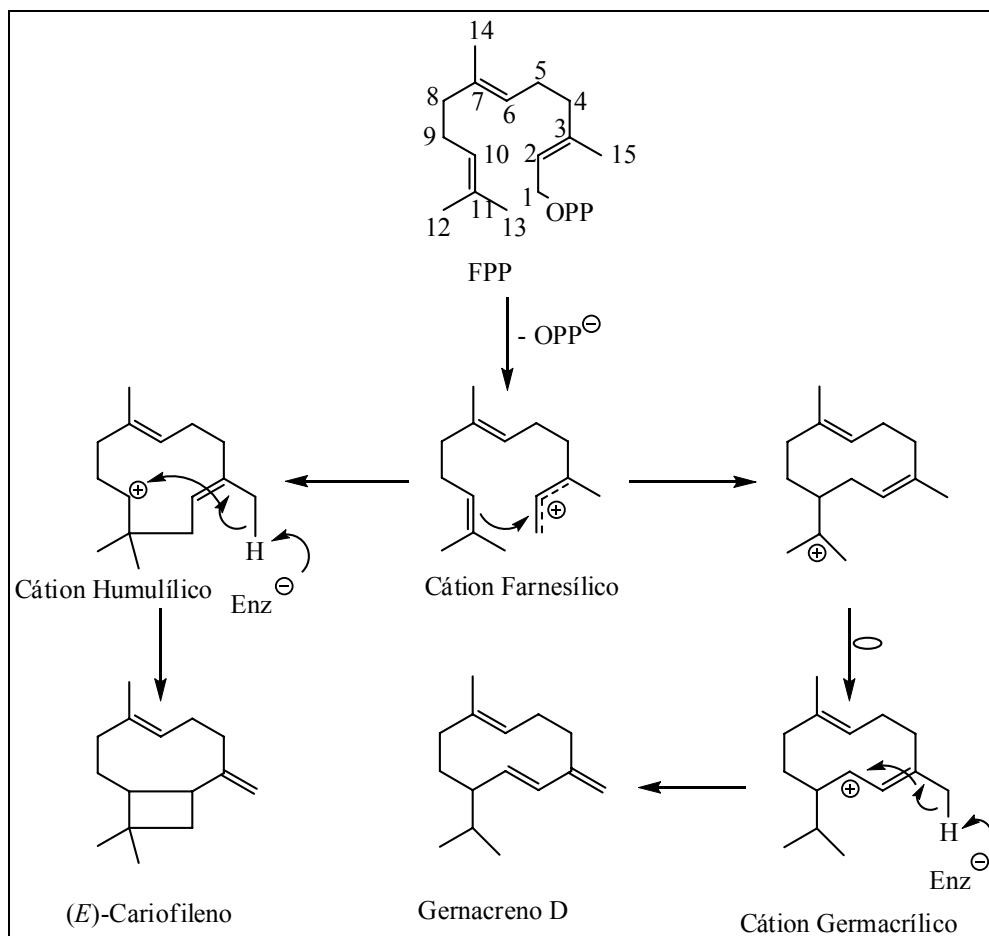


Figura 2.1 – Possível rota biossintética para os sesquiterpenos (*E*)-cariofileno, germacreno D e α -humuleno.

A taxonomia de família Verbenaceae tem se mostrado bastante confusa seguindo princípios distintos baseados, sobretudo, em caracteres morfológicos (Salimena, 2000). Portanto, os resultados observados neste trabalho podem ser utilizados em ferramentas quimiossistêmicas e contribuir para a taxonomia desta família.

Existe pouca literatura a respeito dos óleos essenciais do gênero *Lantana*, quando comparado com outros gêneros de Verbenaceae como *Lippia* e *Verbena* (Deena e Thoppil, 2000; Ghisalbert, 2000; Pascual *et al.*, 2001). Para *Lantana trifolia* existe um único relato da constituição química do óleo essencial (Muhayimana *et al.*,

1998). Esses autores também observaram os sesquiterpenos (*E*)-cariofileno e germacreno D como os constituintes majoritários no óleo desta planta. *Lantana trifolia* é um pequeno arbusto que ocorre em todas as regiões do Brasil. É uma planta usada extensivamente na medicina popular, na forma de infusões e xaropes, para o tratamento de doenças respiratórias (Lorenzi e Matos, 2008). Poucos estudos são encontrados em relação a sua química e farmacologia (Achola e Munenge, 1996; Silva *et al.*, 2005; Katuura *et al.*, 2007). Recentemente, Julião *et al.* (2009) observaram o efeito sedativo para os extratos etanólico e de acetato de etila das folhas de *Lantana trifolia*. Destes extratos, os autores também isolaram e caracterizaram diferentes flavonóides e fenilpropanóides.

Embora o gênero *Lippia* seja amplamente estudado, principalmente nas regiões mais quentes do globo (Pascual *et al.*, 2001), o presente trabalho faz o primeiro relato sobre a constituição química do óleo essencial da espécie *Lippia brasiliensis*. Realizou-se também, para esta espécie, a coleta e extração do óleo essencial ao longo do ano para o estudo de possíveis variações sazonais (Tabela 1.5). A constituição do óleo desta espécie se mostrou relativamente invariável ao longo das estações do ano, quanto aos constituintes majoritários. Observou-se a abundância de componentes sesquiterpênicos em detrimento dos monoterpênicos. Os constituintes majoritários foram (*E*)-cariofileno e germacreno D, variando em torno de 25 – 35% e 12 – 19%, respectivamente.

Todavia, em relação às diferentes classes de sesquiterpenos, é possível observar, para esta espécie, aumento na concentração de compostos oxigenados nos meses da estação fria e seca (maio – setembro). Resultados semelhantes foram encontrados para a espécie *Lippia alba* cultivada em São Luiz Gonzaga, RS (Barros *et al.*, 2009). Os autores relatam o aumento de monoterpenóides e sesquiterpenóides oxigenados durante o outono (abril) e inverno (julho) e concluem que a sazonalidade afeta de maneira distinta a biossíntese das diferentes classes de terpenos nesta planta. *Lippia alba* é uma planta medicinal nativa da América do Sul, conhecida popularmente como erva-cidreira ou falsa-melissa. Suas folhas são empregadas na medicina popular como banhos e infusões para o tratamento de distúrbios estomacais, problemas respiratórios, hipertensão e como sedativo.

Com efeito, a influência de fatores abióticos como luz, temperatura, disponibilidade hídrica, altitude e qualidade do solo sobre a biossíntese de vários

metabólitos secundários vegetais, especialmente os terpenóides, tem sido observada para inúmeras espécies (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). Embora exista um controle genético sobre a biossíntese, a interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos pode levar a variações temporais e espaciais no conteúdo e constituição dos metabólitos secundários. De fato, estas substâncias representam uma interface química entre as plantas e o ambiente circundante e, portanto, sua síntese é frequentemente afetada pelas variadas condições ambientais e pela interação com outros organismos do meio.

Segundo Tavares *et al.* (2005), os teores e a constituição do óleo essencial em *Lippia alba* variaram em função do seu ciclo fenológico, apresentando maior produção de óleo fora do período de floração. Coincidentemente, Barros *et al.* (2009) observaram que a estação em que ocorre a maior diversidade química no óleo essencial (primavera) também corresponde ao período de maior floração observado para esta espécie. No presente trabalho, a época de maior floração para a espécie *Lippia brasiliensis* ocorreu durante o inverno (Tabela 1.5). Para o óleo extraído das folhas nesta época não se observou aumento do número de constituintes. Entretanto, o óleo extraído das flores (inflorescências) separadamente revelou uma maior diversidade de componentes, refletida principalmente na presença de monoterpenóides.

Nota-se que nas folhas de todas as espécies estudadas existe uma predominância de compostos sesquiterpênicos em relação aos monoterpênicos. Contudo, além da espécie *Lippia brasiliensis*, maiores concentrações de substâncias monoterpênicas também podem ser observadas para os óleos extraídos das flores das espécies *Lantana camara* e *Lantana trifolia*. Tal fato não causa surpresa quando considerado o importante papel ecológico dos voláteis sintetizados pelas plantas. Para as plantas enraizadas em um mesmo lugar, a liberação de compostos voláteis provê um mecanismo eficiente de comunicação com organismos distantes. De modo geral, observa-se que os voláteis florais servem como atrativos para polinizadores específicos, enquanto que os voláteis emitidos pelas partes vegetativas, principalmente aqueles liberados após herbivoria, parecem proteger as plantas pela inibição de herbívoros e pela atração de inimigos naturais dos herbívoros (Pichersky e Gershenzon, 2002).

O rápido progresso na elucidação das rotas biossintéticas, das enzimas e dos genes envolvidos na formação dos voláteis pelas plantas tem permitido que sua fisiologia e função sejam rigorosamente investigadas em nível molecular e bioquímico. Os terpenos estão implicados em várias funções ecológicas e fisiológicas com base na regulação diferencial da expressão dos diversos genes de terpeno-sintases ao longo do desenvolvimento da planta e em resposta a fatores ambientais bióticos e abióticos (Tholl, 2006). Neste contexto, encontram-se relatos a respeito da síntese e emissão de terpenos voláteis por tecidos florais particulares em tempos específicos para a atração de polinizadores. Dudareva *et al.* (2003) demonstraram que a biossíntese e emissão dos monoterpênicos (*E*)- β -ocimeno e mirceno em flores de *Antirrhinum majus* (boca-de-leão) (Plantaginaceae) se correlacionam com os padrões de expressão dos genes monoterpêno-sintases correspondentes. Esses genes são expressos respectivamente nos lobos superior e inferior das pétalas durante o desenvolvimento floral, com os níveis mais elevados de transcritos detectados quatro dias após a antese.

Portanto, a composição diferenciada dos óleos essenciais extraídos das flores destas espécies pode estar relacionada com determinadas interações ecológicas, como a atração de polinizadores específicos para cada espécie.

O sesquiterpeno (*E*)-cariofileno tem sido utilizado como componente de fragâncias desde a década de 1930 (Opdyke, 1973). É utilizado como aditivo em sabões, detergentes, cremes e loções, e em uma variedade de produtos alimentícios e bebidas (Skold *et al.*, 2006). (*E*)-Cariofileno é também reconhecido por apresentar atividades antiinflamatória e anestésica local (Ghelardini *et al.*, 2001). Recentemente, Gertsch *et al.* (2008) observaram que esse composto é capaz de se ligar seletivamente aos receptores canabinóides do Tipo 2 (CB2), porém não aos do Tipo 1 (CB1). A estimulação dos receptores CB2 promove a ativação de respostas antiinflamatórias nas células. Embora a estimulação dos receptores CB1 seja responsável pelos efeitos psicomodulatórios dos agonistas canabinóides, a ativação dos receptores CB2 parece ser uma estratégia terapêutica potencial para o tratamento de inflamações, dores, aterosclerose e osteoporose. Portanto, os óleos das Verbenaceae investigadas representam fontes potenciais deste composto.

2.4.2 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de Verbenaceae

O estudo da atividade antibacteriana pelo método de disco-difusão em Agar mostrou que os óleos essenciais extraídos das espécies *Lippia brasiliensis*, *Aloysia virgata*, *Lantana camara*, *Lantana trifolia* e *Lantana montevidensis* apresentaram diferentes níveis de atividade para cada cepa de microrganismo estudado (**Tabela 2.6**). A espécie *Lippia* sp. não apresentou rendimento de óleo suficiente para a realização dos ensaios antibacterianos.

Embora tenha sido observado que as zonas de inibição para os óleos das plantas avaliadas foram menores que para o cloranfenicol (controle positivo), todas as espécies, exceto *Lantana camara*, apresentaram atividade moderada contra as cepas de bactérias Gram-positivas (*B. cereus* e *S. aureus*). Apenas o óleo extraído das folhas da espécie *A. virgata* foi ativo contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*.

Tabela 2.6 – Diâmetro das zonas de inibição do crescimento bacteriano para os óleos essenciais extraídos das folhas das espécies *Lippia brasiliensis*, *Aloysia virgata*, *Lantana camara*, *Lantana trifolia* e *Lantana montevidensis*.

Óleos Essenciais	Diâmetro da zona de inibição (mm)*		
	Gram-negativa	Gram-positivas	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Lippia brasiliensis</i>	6 C c	19 A b	15 B b
<i>Aloysia virgata</i>	11 B b	16 A b	16 A b
<i>Lantana camara</i>	6 A c	8 A d	6 A d
<i>Lantana trifolia</i>	6 C c	13 A c	10 B c
<i>Lantana montevidensis</i>	6 C c	18 A b	13 B b
Controle (H ₂ O)	6 A c	6 A d	6 A d
Cloranfenicol 30 µg	29 B a	29 B a	32 A a

* Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas, e minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Deena e Thoppil (2000) observaram atividade antibacteriana para o óleo essencial de *Lantana camara* coletada em Calicut, Índia. Os constituintes majoritários encontrados por estes autores foram (*E*)-cariofileno (35%), acetato de geranila (22%), acetato de terpenila (6%) e acetato de bornila (4%). No presente trabalho, não foram observados estes compostos oxigenados para o óleo de *L.*

camara, o que pode estar relacionado com a ausência de atividade antibacteriana para a planta coletada no Brasil.

Das folhas da espécie *Lantana trifolia* foi isolada a umuhengerina, uma pentametoxiflavona que apresentou atividade antibacteriana e antifúngica (Rwangabo *et al.*, 1988). Recentemente, Silva *et al.* (2005) observaram ação antiinflamatória e antinociceptiva para extratos de diferentes polaridades das folhas de *L. trifolia*. Todavia, relatos sobre atividades biológicas do óleo essencial desta espécie não foram encontrados na literatura. Os resultados obtidos no presente trabalho indicam uma baixa atividade para o óleo essencial de *L. trifolia* contra as bactérias estudadas.

Para a espécie *Lantana achyranthifolia*, coletada no México, Hernández *et al.* (2005) observaram atividade antibacteriana moderada do óleo essencial, com valores de CIM entre 1,0 e 0,25 mg L⁻¹. O óleo desta espécie apresentou como componentes principais carvacrol (31%), α -bisabolol (11%) e 1,8-cineol (5%) (Hernández *et al.*, 2005), todos com reconhecida atividade antimicrobiana (Kim *et al.*, 1995). Adicionalmente, Ultee *et al.* (2002) demonstraram que a presença da hidroxila fenólica no carvacrol é essencial para sua atividade contra *B. cereus*. Portanto, a baixa concentração de componentes oxigenados, principalmente fenóis, observada para os óleos das plantas do gênero *Lantana* estudadas no presente trabalho pode estar relacionada com as baixas atividades antibacterianas encontradas.

Realizou-se a determinação da concentração inibitória mínima para os óleos das espécies *Lippia brasiliensis* e *Aloysia virgata* (Tabela 2.7). Os resultados confirmam que o óleo da espécie *L. brasiliensis* não apresenta atividade contra a bactéria Gram-negativa *E. coli* nas concentrações avaliadas (2,0 a 0,0156 %). Também é possível observar que o óleo da espécie *A. virgata* inibe o crescimento desta bactéria a uma concentração de 0,125%. Para as bactérias Gram-positivas *B. cereus* e *S. aureus* os óleos de ambas as espécies de plantas apresentaram o mesmo valor de CIM, 0,125%.

Tabela 2.7 – Concentração inibitória mínima (CIM) do crescimento bacteriano para os óleos essenciais extraídos das folhas das espécies *Lippia brasiliensis* e *Aloysia virgata*.

Óleos Essenciais	Concentração inibitória mínima (%)		
	G (-)		G (+)
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Lippia brasiliensis</i>	0,250	0,125	0,125
<i>Aloysia virgata</i>	0,125	0,125	0,125

Analisando o mecanismo de ação do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* (Myrtaceae), Cox *et al.* (2000) demonstraram que os principais efeitos sobre bactérias e fungos foram a inibição da respiração e aumento da permeabilidade da membrana celular. O efeito sobre a membrana leva à ruptura de sua integridade, causando extravasamento de íons K^+ e consequente perda do controle quimiosmótico celular (Cox *et al.*, 2000; Hada *et al.*, 2003). Cox *et al.* (2000) também observam que o óleo de *Melaleuca alternifolia* é muito rico em terpenos oxigenados e concluem que o efeito deletério destes compostos sobre a membrana celular seja o principal mecanismo de ação antimicrobiana deste óleo.

2.5 Conclusões

Conclui-se que os óleos essenciais das espécies *Aloysia virgata*, *Lippia brasiliensis*, *Lippia* sp., *Lantana camara*, *Lantana trifolia* e *Lantana montevidensis*, coletadas em Minas Gerais, possuem constituição química variada e predominada por compostos sesquiterpênicos. É possível observar um padrão referente às concentrações relativas dos constituintes majoritários em relação aos gêneros das plantas estudadas. As plantas do gênero *Lippia* apresentam maior concentração de (*E*)-cariofileno que de germacreno, enquanto as plantas dos gêneros *Lantana* e *Aloysia* apresentam maior concentração de germacreno D em relação ao (*E*)-cariofileno.

Observa-se também que o óleo da espécie *Lippia brasiliensis* possui ligeira alteração de constituição ao longo das estações, apresentando maiores concentrações de constituintes oxigenados durante o período frio e seco do ano. Para as espécies *Lippia brasiliensis*, *Lantana camara* e *Lantana trifolia*, os óleos extraídos das flores apresentam maiores concentrações de constituintes monoterpênicos que os óleos extraídos das folhas.

O óleo extraído das folhas da espécie *Lantana camara* não apresentou atividade contra as bactérias estudadas. Os óleos extraídos das folhas das espécies *Aloysia virgata*, *Lippia brasiliensis*, *Lantana trifolia* e *Lantana montevidensis* apresentaram atividade moderada contra as cepas de bactérias Gram-positivas *B. cereus* e *S. aureus*. Apenas o óleo extraído das folhas da espécie *A. virgata* foi ativo contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*.

2.6 Referências

- Achola, K.J., Munenge, R.W. 1996. Pharmacological activities of *Lantana trifolia* on isolated guinea pig trachea and rat phrenic nerve diaphragm. *Int. J. Pharmacogn.* 34, 273–276.
- Adams, R. P., (1995). *Identification of Essential Oils by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. Carol Stream, IL: Allured Publi.
- ASAE, 2000. American Society of Agricultural Engineers; Standards Engineering Practices Data, Moisture Measurement ASAE S358.2 DEC99, Forages.
- Barros, F.M.C., Zambarda, E.O., Heinzmann, B.M., Mallmann, C.A. 2009. Variabilidade sazonal e biossíntese de terpenóides presentes no óleo essencial de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Verbenaceae). *Quim. Nova.* 32 (4), 861-867.
- Bassole, I.H.N., Ouattara, A.S., Nebie, R., Ouattara C.A.T., Kabore, Z.I., Traore, A.S. 2003. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. *Phytochemistry.* 62, 209-212.
- Carvalho, A.F.U., Melo, V.M.M., Craveiro, A.A., Machado, M.I.L., Bantim, M.B., Babelo, E.F. 2003. Larvicidal activity of the essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Against *Aedes Aegypti* linn. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98(4), 569-571.
- Castro-Gamboa, I., Castro, O. 2004. Iridoids from the aerial parts of *Verbena littoralis* (Verbenaceae). *Phytochemistry.* 65, 2369-23-72.
- Cox, S.D., Mann, C.M., Karkham, J.L., Bell, H.C., Gustafson, J.E., Warmington, J.R., Wyllie, S.G. 2000. The mode of antimicrobial action of the essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). *J. Appl. Microbiol.* 88, 170-175.
- Cronquist, A. 1988. *The evolution and classification of flowering plants*. 2nd ed. The New York Botanical Garden. New York.
- Deena, M.J., Thoppil J.E. 2000. Antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana camara*. *Fitoterapia.* 71, 453-455.

- Degenhardt, J., Köllner, T. G. e Gershenzon, J. (2009). Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. *Phytochemistry*. 70, 1621-1637.
- Duarte, M.C.T. Figueira, G.M., Sartoratto, A., Rehder, V.L.G., Delarmelina, C. 2005. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 97, 305-311.
- Duarte, M.C.T., Leme, E.E., Delarmelina, C., Soares, A.A., Figueira, G.M., Sartoratto, A. 2007. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. *J. Ethnopharmacol.* 111, 197-201.
- Dudareva, N., Martin, D., Kish, C.M., Kolosova, N., Gorenstein, N., Fäldt, J., Miller, B., Bohlmann, J. 2003. (E)-beta-ocimene and myrcene synthase genes of floral scent biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily. *Plant Cell*. 15, 1227-1241.
- Gertsch, J., Leonti, M., Raduner, S., Racz, I., Chen, JZ., Xie, C.Q., Altmann, K.H., Karsak, M., Zimmer, A., 2008. Beta-caryophyllene is a dietary cannabinoid. *P. Natl. Acad. Sci.* 105, 9099-9104.
- Ghelardini, C., Galeotti, N., Di Cesare, M.-L., Mazzanti, G., Bartolini, A., 2001. Local anesthetic activity of b-caryophyllene. *Farmaco*. 56, 387-389.
- Ghisalbert, E.L., 2000. *Lantana camara* L (Verbenaceae). *Fitoterapia*. 71, 467-486.
- Giulietti, A.M., Menezes, N.L., Pirani, J.R., Meguro, M., Wanderley, M.L. 1987. Flora da Serra do Cipó, MG: caracterização e lista das espécies. *Bol. Bot. Univ. São Paulo*. 9, 1-15.
- Gobbo-Neto, L., Lopes, N. P. 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quim. Nova*. 30(2), 374-381.
- Hada, T., Inoue, Y., Shiraishi, A., Hamashima H. 2003. Leakage of K⁺ ions from *Staphylococcus aureus* in response to tea tree oil. *J. Microbiol Meth.* 53, 309-312.
- Hernández, T., Canales, M., Avila, J.G., García, A.M., Martínez, A., Caballero, J., Vivar, A.R., Lira, R. 2005. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae). *J. ethnopharmacol.* 96, 551-554.

- Jiménez-Arellanes, A., Meckes, M., Torres, J., Luna-Herrera, J. 2007. Antimycobacterial triterpenoids from *Lantana hispida* (Verbenaceae). *J. Ethnopharmacol.* 111, 202-205.
- Jiménez-Arellanes, A.M., Meckes, M., Ramírez, R., Torres, J., Luna-Herrera, J. 2003. Activity against multidrug-resistant *Mycobacterium tuberculosis* in Mexican plants used to treat respiratory diseases. *Phytotherapy Research.* 17, 903-908.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F. 1999. *Plant systematics. A phylogenetic approach.* Sinauer Associates, Inc. 419.
- Julião, L.S., Leitão, S.G., Lotti, C., Picinelli, A.L., Rastrelli, L., Fernandes, P.D., Noël, F., Thibaut, J.P.B., Leitão, G.G. 2009. Flavones and phenylpropanoids from a sedative extract of *Lantana trifolia* L. *Phytochemistry.* In press.
- Katuura, E., Waako, P., Tabuti, J.R.S., Bukenya-Ziraba, R., Ogwal-Okeng, J. 2007. Antiplasmodial activity of extracts of selected medicinal plants used by local communities in western Uganda for treatment of malaria. *African J. Ecol.* 45 (Suppl. 3), 94-98.
- Kim, J., Marshall, M.R., Wei, C. 1995. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *J. Agric. Food Chem.* 43, 2839-2845.
- 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.
- Li, Y.S., Matsunaga, K., Ishibashi, M., Ohizumi, Y. 2001. Littoralisone a novel neuritogenic iridolactone having an unprecedented heptacyclic skeleton including four- and nine-membered rings consisting of glucose from *Verbena littoralis*. *J. Organic Chem.* 66, 2165-2167.
- Lorenzi, H., Matos, F.J.A. 2008. *Plantas medicinais no Brasil – nativas e exóticas.* 2ª Ed. Instituto Plantarum, Nova Odessa.

- Manenzhe, N.J., Potgieter, N., Ree, R. 2004. Composition and antimicrobial activities of volatile components of *Lippia javanica*. *Phytochemistry*. 65, 2333-2336.
- Mevy, J.P. Bessiere, J.M., Dherbomez, M., Millogo, J., Viano, J. 2007. Chemical composition and some biological activities of the volatile oils of a chemotype of *Lippia chevalieri* Moldenke. *Food Chem.* 101, 682-685.
- Muhayimana, A., Chalchat, J.C., Garry, R.P. 1998. Chemical composition of essential oils of *Lantana trifolia* L. from Rwanda. *J. Essent. Oil Res.* 10, 547-549.
- NCCLS - National Committee for Clinical and Laboratory Standards. (2003a). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- NCCLS - National Committee for Clinical and Laboratory Standards. (2003b). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- Oliveira, F.P.O., Lima, E.O., Siqueira-Júnior, J.P., Souza, E.L., Santos, B.H.C., Barreto, H.M. 2006. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*. 16(4), 510-516.
- Opdyke, D.L.J., 1973. Monographs on fragrance raw materials - Caryophyllene. *Food and Cosmetics Toxicol.* 11, 1059-1060.
- Pascual, M.E., Slowing, K., Carretero, E., Sánchez-Mata, D., Villar, A. 2001. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. *J. Ethnopharmacol.* 76, 201-214.
- Petrakis, V.P., Couladis, M., Roussis, V. 2005. A method for detecting the biosystematic significance of the essential oil composition: The case of five Hellenic *Hypericum* L. Species. *Biochemical Systematics and Ecology*. 33, 873-898.

- Pichersky, E., Gershenzon, J. 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. *Current Opinion in Plant Biology*. 5, 237-243.
- Rwangabo, P.C., Claeys, M., Pieters, L., Corthout, J., Vanden-Berghe, D.A., Vlietinck, A.J., 1988. Umuhengerin, a new antimicrobially active flavonoid from *Lantana trifolia*. *J. Nat. Prod.* 51, 66-968.
- Salimena, F.R.G. Revisão taxonômica de *Lippia* L. sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae). São Paulo: Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2000.
- Salimena-Pires, F.R. Verbenaceae da Serra do Cipó, Minas Gerais, Brasil. São Paulo, SP: USP, 1991. 302p. Dissertação (Mestrado em Botânica). Univesidade de São Paulo, 1991.
- Salustiano, V. C., Andrade, N. J., Soares, N. F. F., Lima, J. C., Bernardes, P. C., Luiz, L. M. P., & Fernandes, P. E. (2009). Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. *Food Control*. 20, 439-442.
- Silva, G.N., Martins, F.R., Matheus, M.E. Leitão, S.G., Fernandes, P.D. 2005. Investigation of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Lantana trifolia*. *J. Ethnopharmacol.* 100, 254-259.
- Silva, W.J., Dória, G.A.A., Maia, R.T., Nunes, R.S., Carvalho, G.A., Blank, P.B., Marçal, R.M., Cavalcante, S.C.H. 2008. Effects of essential oils on *Aedes aegypti* larvae: Alternatives to environmental safe insecticides. *Bioresource Technology*. 99, 3251-3255.
- Tadeg, H., Mohammed, E., Asres, K., Gebre-Mariam, T. 2005. Antimicrobial activities of some selected traditional Ethiopian medicinal plants used in the treatment of skin disorders. *J. Ethnopharmacol.* 100, 168-175.
- Tavares, E.S., Julião, L.S., Lopes, D., Bizzo, H.R., Lage, C.L.S., Leitão, S.G. 2005. *Rev. Bras. Farmacogn.* 15, 1.
- Tholl, D. 2006. Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism. *Current Opinion in Plant Biology*. 9,297-304.

- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4), 1561-1568.
- Umaña, R.E., Castro, O. 1990a. Preliminar phytochemical study of *Verbena littoralis* HBK. *International Journal of Crude Drug Research.* 2, 175-177.
- Umaña, R.E., Castro, O. 1990b. Chemical constituents of the aerial part of *Verbena littoralis* HBK. *Quim. Nova.* 13, 310-312.
- Viljoen, A.M., Subramoney, S., Vuuren, S.F.V., Baser, K.H.C., Demirci, B. 2005. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. *J. Ethnopharmacol.* 96, 271-277.

3 Capítulo 3

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ANACARDIACEAE: PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS EM CÉLULAS BACTERIANAS

RESUMO

Para os óleos extraídos das Anacardiaceae *Anacardium humile* Engl., *Anacardium occidentale* L., *Astronium fraxinifolium* Schott ex Spreng., *Myracrodruon urundeuva* Allemão, e *Schinus terebinthifolius* Raddi, observou-se que as constituições químicas foram bastante distintas. Os óleos das espécies *A. humile* e *A. occidentale* não apresentaram atividade contra as bactérias estudadas. Os óleos das espécies *A. fraxinifolium*, *M. urundeuva* e *S. terebinthifolius* apresentaram atividades moderadas contra as cepas de bactérias utilizadas. A época de coleta da espécie *S. terebinthifolius* altera a atividade antibacteriana do óleo essencial extraído de suas folhas. Os óleos das espécies *A. fraxinifolium*, *M. urundeuva* e *S. terebinthifolius*, e o monoterpeneo δ -3-careno provocam aumento na peroxidação de lipídeos em células de bactérias. A atividade antibacteriana do óleo de *M. urundeuva* pode estar relacionada com a alta concentração do monoterpeneo δ -3-careno.

ABSTRACT

Chemical Composition and Antibacterial Activity of Anacardiaceae Essential Oils: Lipid Peroxidation on Bacterial Cell. The chemical composition and the antibacterial activity against Gram-positive and Gram-negative foodborne bacteria were assessed for the essential oils from five Anacardiaceae species. The major constituents in *Anacardium humile* leaves oil are (*E*)-caryophyllene (31%), α -pinene (22%) and bicyclogermacrene (7.6%). The major compounds identified for the *Anacardium occidentale* oil were (*E*)-caryophyllene (15.4%), germacrene-D (11.5%) and α -copaene (10.3%). *A. fraxinifolium* leaves essential oil presented (*E*)- β -ocimene (44.1%), α -terpinolene (15.2%) and viridiflorene (9.0%) as major constituents. *Myracrodruon urundeuva* presented δ -3-carene at 78.8%. *S. terebinthifolius* leaves oil collected in March and July presented different chemical composition. The oil of all tested species, except *A. occidentale*, exhibited varying levels of antibacterial activity against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* and *Escherichia coli*. *S. terebinthifolius* oil extracted in July was more active against all bacterial strains than the oil extracted in March. *M. urundeuva* oil showed great antibacterial activity and it may be related to the high concentration of δ -3-carene. The amounts of malondialdehyde (MDA) in bacterial cells indicate that essential oils promote lipid peroxidation. The results suggest that prooxidant damages on cell membrane should play important role in the mechanism of antibacterial action of these natural compounds. The study of its mechanism of action becomes an outstanding issue for further studies.

3.1 Família Anacardiaceae

Anacardiaceae é uma família constituída por cerca de 70 gêneros e 700 espécies com distribuição tropical e subtropical. Seus gêneros são subdivididos em cinco tribos: Anacardieae, Dobineae, Rhoeae, Semecarpeae e Spondiadeae. Cerca de 25% dos gêneros dessa família são conhecidos como tóxicos e causadores de dermatite de contato severa. De modo geral, as espécies venenosas desta família estão restritas às tribos Anacardieae, Rhoeae e Semecarpeae (Correia *et al.*, 2006).

No Brasil ocorrem 15 gêneros e cerca de 70 espécies (Souza e Lorenzi, 2005). Diversas anacardiáceas apresentam frutos e pseudofrutos comestíveis. Este é o caso do cajueiro (*Anacardium occidentale* L.) cujo fruto produz a castanha-de-caju, mundialmente conhecida. O caju propriamente dito é um pseudofruto originado do desenvolvimento do pedicelo e é comercializado *in natura* ou na forma de doces e sucos.

Outras frutas incluem a manga (*Mangifera indica* L.), os cajás (*Spondias* spp.), o umbu (*Spondias tuberosa* Arruda), a siriguela (*Spondias purpurea* L.). Pertence ainda a essa família o pistache (*Pistacia vera* L.), e diversas espécies que produzem madeira de boa qualidade, incluindo o gonçalo-alves (*Astronium fraxinifolium* Schott ex Spreng.), a aroeira-do-sertão (*Myracrodruon urundeuva* Allemão), a aroeira-branca (*Lithraea molleoides* Engl.) e a braúna (*Schinopsis brasiliensis* Engl.).

Algumas espécies são utilizadas na ornamentação de ruas e praças, como a aroeira-vermelha ou pimenta-rosa (*Schinus terebinthifolius* Raddi), o charão (*Rhus succedanea* L.) e a aroeira-salsa (*Schinus molle* L.). O peito de pombo (*Tapirira guianensis* Aubl.) é certamente a espécie nativa de Anacardiaceae mais comum, ocorrendo em quase todas as formações florestais do Brasil.

3.2 Fitoquímica de Anacardiaceae

Do ponto de vista químico, os gêneros mais estudados nesta família são *Mangifera*, *Rhus* (*Toxicodendron*), *Anacardium*, *Spondias*, *Lanea*, *Semecarpus*, *Schinus*, *Pistacia*, *Lithraea*, *Tapirira* e *Melanorrhoea*. Os gêneros *Mangifera*, *Rhus* e *Anacardium* destacam-se pelo número de investigações relativas à composição química de suas espécies e atividades biológicas de seus extratos e metabólitos. Os estudos destas espécies possibilitaram verificar a ocorrência de flavonóides, terpenos, esteróides, xantonas e, principalmente, de fenólicos com cadeia alifática longa e seus derivados. Entre os flavonóides, os biflavonóides são os mais freqüentes (Correia *et al.*, 2006).

Estudos realizados com extratos aquosos das cascas de uma variedade de *M. indica* (manga) resultaram em uma formulação farmacêutica com nome fantasia de Vimang[®]. O principal componente deste extrato é a mangiferina (**Figura 3.1**). Porém, além desta substância, o extrato contém também uma mistura de componentes polifenólicos, terpenóides, esteróides, ácidos graxos e microelementos (Garrido *et al.*, 2004). O extrato Vimang[®] apresenta atividades imunoestimulante (Makare *et al.*, 2001), antiinflamatória (Garrido *et al.*, 2004), antioxidante (Sanchez *et al.*, 2000; Muruganandan *et al.*, 2002; Selles *et al.*, 2002), citotóxica e antineoplásica (Beltrán *et al.*, 2004).

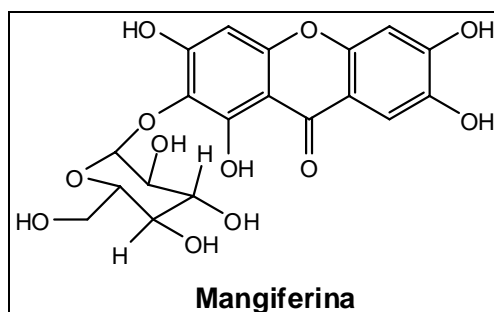


Figura 3.1 – Estrutura da mangiferina, principal constituinte do fitofármaco Vimang[®].

O gênero *Rhus* é o maior da família, com cerca de 200 espécies ricas em flavonóides, principalmente biflavonóides (Correia *et al.*, 2006). Os biflavonóides hinokiflavona, agathisflavona e robustaflavona (**Figura 3.2**), isolados de *Rhus succedanea*, inibem a replicação do vírus HIV pela inibição da enzima transcriptase reversa HIV-1-RT (Lin *et al.*, 1997)

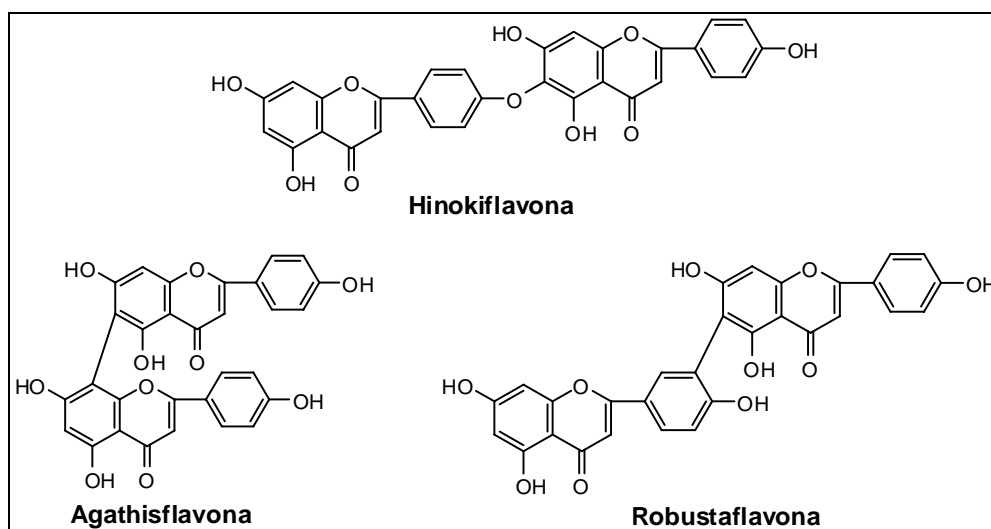


Figura 3.2 – Estruturas dos biflavonóides antivirais hinokiflavona, agathisflavona e robustaflavona, isolados de *Rhus succedanea*.

Espécies deste gênero são conhecidas por provocarem dermatite alérgica de contato muito severa, contraída por manuseio ou ingestão de partes das plantas. Estas espécies possuem oleoresina conhecida no ocidente como urushiol, e no Japão como *kiurushi*. Tais resinas são formadas por mistura de alquilcatecóis com cadeia lateral de 15 e 17 carbonos. Porém, Goetz *et al.* (1999) mostraram que os verdadeiros antígenos envolvidos na dermatite alérgica são quinonas produzidas a partir da oxidação dos alquilcatecóis. Tais quinonas são reativas frente aos centros nucleofílicos das proteínas.

O gênero *Anacardium* possui 11 espécies descritas e o caju, *A. occidentale*, é seu representante mais conhecido. É uma cultura de grande importância sócio-econômica para o Brasil. Além da exploração dos pseudofrutos, na forma de sucos e doces, a amêndoa e o líquido extraído da casca da castanha de caju (CNSL – Cashew Nut Shell Liquid) são produtos de exportação (Santos e Magalhães, 1999).

Os ácidos anacárdicos, juntamente com os alquilresorcinóis, constituem cerca de 90% da composição do CNSL e apresentam propriedades tóxicas e irritantes. Os ácidos anacárdicos são misturas de ácidos 6-alkilsalicílicos, onde os grupos alquílicos variam tanto no comprimento da cadeia como no grau de insaturação das mesmas, sendo mais freqüentes cadeias mono, di ou triinsaturadas (Correia *et al.*, 2006). Devido à termolabilidade do grupo carboxílico eles são prontamente descarboxilados durante o processamento e, assim, tendem a se converter em cardanol, de forma que o principal componente do CNSL é o cardol (mistura dos homólogos insaturados do 5-pentadecil resorcinol) (Shobha *et al.*, 1992).

3.3 Atividade Antimicrobiana de Anacardiaceae

Os ácidos constituintes do CNSL possuem atividades antibacteriana (Kubo *et al.*, 1993) e antifúngica (Prithiviraj *et al.*, 1997). Deve-se destacar que o comprimento das cadeias alquílicas destes ácidos influi na atividade. Este fato foi confirmado a partir da comparação da atividade destas substâncias com a do ácido salicílico. Apesar dos ácidos anacárdicos exibirem um espectro de atividade limitado contra bactérias, as atividades foram consideravelmente maiores que as apresentadas pelo ácido salicílico.

O exemplo que reflete a importância da cadeia lateral dos ácidos anacárdicos para atividade foi dada pelo ácido 6-[-pentadeca-8-(Z)-11-(Z)-14-trienil]salicílico. Quando avaliado contra *Staphylococcus mutans* e *S. aureus*, mostrou-se 2048 e 64 vezes, respectivamente, mais efetivo que o ácido salicílico. Isto sugere que a cadeia alquílica realmente exerce papel importante na atividade antibacteriana (Kubo *et al.*, 1993).

A amarula (*Sclerocarya birrea* (A. Rich.) é uma árvore nativa do sudeste da África e amplamente utilizada pelos povos locais contra doenças relacionadas a bactérias. Eloff (2001) verificou que os extratos em acetona das folhas e do caule desta planta realmente possuem atividade contra bactérias Gram negativas e positivas.

Atividades antimicrobianas para os óleos essenciais e extratos de baixa polaridade de plantas da família Anacardiaceae são relatadas na literatura. *Lithraea molleoides*, conhecida como aroeirinha, é uma árvore encontrada na América do Sul, principalmente no Brasil. O óleo essencial extraído de seus frutos maduros apresentou atividade contra fungos e bactéria Gram-positivas (Shimizu *et al.*, 2006). Entretanto esses autores relatam que não foi possível detectar óleo essencial nas folhas desta espécie.

Extratos em hexano das folhas, madeira, casca do tronco e diferentes partes dos frutos de *Pistacia vera* apresentaram atividade moderada contra bactérias e fungos (Özçelik *et al.*, 2005). *Pistacia vera*, uma espécie nativa da Ásia, foi amplamente distribuída em regiões mediterrâneas e nos Estados Unidos e a comercialização de seus frutos, o pistache, tem importância econômica mundial. Tassou e Nychas (1995) observaram que o óleo essencial da espécie *Pistacia lentiscus* foi mais ativo contra bactérias Gram-positivas do que Gram-negativas.

As espécies de Anacardiaceae mais estudadas do ponto de vista químico têm sido *Mangifera indica*, *Anacardium occidentale* e algumas espécies de *Rhus*, provavelmente devido à sua importância econômica e toxicidade. Deve-se salientar, entretanto, que estes estudos com as espécies citadas representam menos de 10% das espécies descritas para estes gêneros. Mesmo do ponto de vista geral, menos de 7% das espécies conhecidas da família tiveram estudos fitoquímicos e de atividades biológicas já realizados (Correia *et al.*, 2006).

Paralelamente, a família Anacardiaceae possui ampla distribuição no Brasil, portanto, este trabalho também descreve a composição química do óleo essencial das folhas das espécies *Anacardium humile* Engl., *Anacardium occidentale* L., *Astronium fraxinifolium* Schott ex Spreng., *Myracrodruon urundeuva* Allemão, e *Schinus terebinthifolius* Raddi e o estudo das atividades antimicrobiana e fitotóxica dos óleos de algumas destas espécies.

3.4 *Experimental*

3.4.1 **Material Vegetal**

Expedições de campo foram realizadas no estado de Minas Gerais para o mapeamento da ocorrência das espécies. Amostras das populações selecionadas foram coletadas, armazenadas em caixas térmicas com gelo e transportadas para o Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), do Departamento de Química (DEQ) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde se realizaram as extrações dos óleos essenciais. Espécimes-testemunhas foram herborizados e incorporados ao acervo do Herbário VIC do Departamento de Biologia Vegetal (DBV), da mesma Universidade. As espécies e os detalhes de coleta estão sumarizados na **Tabela 3.1**.

3.4.2 **Extração de Óleos Essenciais**

Folhas completamente expandidas e inflorescências completamente desenvolvidas foram coletadas separadamente, em triplicata e de modo randômico entre os indivíduos das populações estudadas. Cada amostra foi triturada e submetida a três horas de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger. Os óleos obtidos foram recolhidos juntamente com o hidrolato e extraídos com pentano (3 x 20 mL) em funil de separação. As fases orgânicas foram secadas com sulfato de magnésio anidro e o solvente removido sob baixa pressão, a 40 °C, em evaporador rotativo. Os óleos foram acondicionados em frascos de vidro, sob atmosfera de nitrogênio, e mantidos sob refrigeração à temperatura de aproximadamente -4 °C, até o momento das análises químicas e ensaios de atividade biológica.

A massa de cada óleo foi mensurada em balança analítica e os rendimentos expressos em relação à massa de matéria seca do vegetal. A matéria seca foi determinada pela secagem de três alíquotas de aproximadamente 2 g, de cada amostra, em estufa a 103 ± 2 °C até massa constante (ASAE, 2000).

Tabela 3.1 – Espécies, locais, meses de coleta e número de registro no Herbário VIC – DBV/UFV

Famílias e Espécies	Local	Meses	Nº Registro
<i>Anacardium humile</i>	Japonvar, MG	Dezembro/2008	VIC 26662
<i>Anacardium occidentale</i>	Januária, MG	Dezembro/2008	VIC 26663
<i>Astronium fraxinifolium</i>	Januária, MG	Dezembro/2008	VIC 26664
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	Januária, MG	Dezembro/2008	VIC 26665
<i>Schinus terebinthifolius</i>	Viçosa, MG	Março/2008 Julho/2008	VIC 30839

3.4.3 Cromatografia em Fase Gasosa (CG)

Utilizou-se cromatógrafo a gás Shimadzu GC-17A equipado com detector de ionização em chama (DIC) e coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m × 0,32 mm, espessura do filme de 0,25 µm) com as seguintes condições cromatográficas: gás de arraste N₂ sob fluxo de 1,8 mL min⁻¹; temperatura do injetor 220 °C, temperatura do detector 240 °C; temperatura inicial da coluna 40 °C, isoterma por 2 min., seguido de aquecimento a 3 °C min⁻¹ até 240 °C, mais isoterma por 15 min; volume de injeção 1,0 µL (1% p/v em CH₂Cl₂); razão de split 1:10; pressão da coluna 115 kPa.

As análises foram realizadas em triplicata e a concentração de cada constituinte foi calculada pela porcentagem da área do pico correspondente em relação à área total do cromatograma.

Utilizou-se aparelho Shimadzu GCMS-QP5050A, equipado com coluna de sílica fundida DB-5 (30 m × 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 µm) e acoplado a detector de ionização. Gás de arraste He sob fluxo de 1,8 mL min⁻¹; temperatura do injetor 220 °C, temperatura inicial da coluna 40 °C, isoterma por 2 min., seguido de aquecimento a 3 °C min⁻¹ até 240 °C, mais isoterma por 15 min; volume de injeção 1,0 µL (1% p/v em CH₂Cl₂); razão de split 1:5; pressão da coluna 100 kPa; temperatura da interface 240 °C; ionização por impacto de elétrons (70 eV); amplitude de varredura de 30 a 600 u.

As identificações dos componentes foram realizadas pela comparação de seus tempos de retenção, relativos à série de alcanos (C₉ – C₂₇), e pela comparação dos espectros de massas com o banco de dados da biblioteca Wiley (Wiley 330.000) ou com a literatura (Adams, 1995).

3.4.4 Atividade Antibacteriana

As cepas de bactérias foram obtidas junto ao Departamento de Microbiologia (DMB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os microrganismos estudados foram as bactérias Gram (+) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus cereus*, Ribotipo 1 222-173-S4 isolado de superfícies de equipamentos de pós-pasteurização (Salustiano *et al.*, 2009); e Gram (-) *Escherichia coli* (ATCC 11229).

3.4.4.1 Ensaios de Disco-Difusão

A atividade dos óleos essenciais contra as cepas de bactérias estudadas foi avaliada pelo método de disco-difusão em meio sólido de acordo com as normas do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003a), atualmente nomeado *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Placas de Petri contendo ágar Müeller-Hinton foram inoculadas com suspensões dos microrganismos testados (2×10^8 UFC mL⁻¹). Discos de papel de filtro (6 mm de diâmetro) foram embebidos com 5 µL de óleo essencial e posicionados sobre superfície do ágar das placas inoculadas. As placas foram incubadas por 48 horas a 35 °C. O diâmetro das zonas de inibição foram medidos com paquímetro e expressados em milímetros. O antibiótico Cloranfenicol (30 µg) foi utilizado como controle positivo e água esterilizada como controle negativo. Cada óleo foi testado em triplicata e repetido três vezes, totalizando nove repetições. Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado e os resultados foram analisados pela ANOVA e teste de Scott-Knott a $P \leq 0.05$, utilizando o programa computacional GENES (*Genetics and Statistical Analysis* Versão 2007.0.0 – Universidade Federal de Viçosa).

3.4.4.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O método de microdiluição em caldo nutritivo foi utilizado para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), para alguns óleos selecionados no teste de disco-difusão, de acordo com as normas do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003b).

Realizou-se a diluição seriada, de razão 2, dos óleos essenciais em placas de microtitulação de 96 poços, cobrindo a faixa de concentração de 2,0 a 0,0156 % (v/v). Utilizou-se o meio líquido *Brain Heart Infusion Broth* (Himedia) suplementado com Tween[®] 80 (Merck, Germany) a 0,5% (v/v), para solubilização dos óleos. Inóculos das bactérias testadas foram adicionados para se obter a concentração final de 5×10^5 UFC mL⁻¹. As placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C. O crescimento bacteriano foi avaliado pela turbidez, mensurada em espectrofotômetro a 625 nm, e a CIM foi definida como a menor concentração de óleo essencial na qual o microrganismo testado não apresentou crescimento visível.

3.4.4.3 Peroxidação de Lipídeos

Tubos com 10 mL de meio BHI (Brain Heart Infusion Broth – Himedia), suplementados com Tween 80 (Merck, Germany) 0,1%, foram incubados com 2×10^5 CFU/mL das linhagens de bactérias. Para os tratamentos, o meio foi também suplementado com a CIM para cada óleo. Após 24 horas, as células bacterianas foram coletadas por centrifugação a 10.000 x g por 10 min. As células foram lavadas uma vez com 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7,5, e ressuspensas em 2 mL deste tampão (Yoon *et al.*, 2002). A peroxidação de lipídeos foi detectada pelo ensaio de derivatização com ácido 3-tiobarbitúrico (TBA), que forma um aduto com o aldeído malônico (MDA) (Yoon *et al.*, 2002). Os teores de MDA foram expressos em relação ao conteúdo de proteínas das bactérias. O teor de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976).

3.5 Resultados e Discussão

3.5.1 Composição Química dos Óleos Essenciais de Anacardiaceae

A hidrodestilação de folhas das espécies de Anacardiaceae resultou nos seguintes rendimentos, com base na massa de matéria seca: *Anacardium humile* 0,3%, *Anacardium occidentale* 0,3%, *Astronium fraxinifolium* 0,7%, *Myracrodruon urundeuva* 0,6%, e *Schinus terebinthifolius* 0,6% (**Tabela 3.2**).

Nesta mesma tabela se encontram os constituintes identificados nos óleos essenciais destas espécies. Nota-se que houve diferença pronunciada nas constituições químicas dos óleos analisados, principalmente para plantas pertencentes a gêneros distintos. Para as espécies do gênero *Anacardium*, (*E*)-cariofileno e germacreno D foram encontrados, respectivamente, nas concentrações de 31% e 6% para *A. humile*, e 15% e 11% para *A. occidentale*. Entretanto, observa-se baixa porcentagem de compostos monoterpênicos em *A. occidentale* e uma concentração elevada de α -pineno (22%) em *A. humile*. Ainda para o óleo de *A. occidentale*, observou-se cerca de 10% de α -copaeno, constituinte que também foi observado em aproximadamente 14% no óleo das folhas desta espécie por Maia *et al.* (2000). Porém, esses autores encontraram cerca de 29% de (*E*)- β -ocimeno no óleo de *A. occidentale*, mas no presente trabalho este constituinte não foi observado para esta espécie. Todavia, diferenças na composição química de óleos essenciais extraídos de plantas da mesma espécie, mas coletadas em locais distintos, é um fato corriqueiramente observado na literatura. Fatores como variações geográficas (latitude, longitude e altitude), variações genéticas intraespecíficas, clima, tipo de solo, época de coleta, forma de plantio, adubação, irrigação, idade da planta, processamento pós-colheita do material vegetal, bem como a técnica de extração podem afetar a composição química dos óleos essenciais (Sefidkon *et al.*, 2007; Apel *et al.*, 2006; Asekun *et al.*, 2006; Potzernheim *et al.*, 2006; Viljoen *et al.*, 2005; Bassole *et al.*, 2003).

A espécie *Astronium fraxinifolium* apresentou como constituintes majoritários de seu óleo os monoterpenos (*E*)- β -ocimeno (44%) e α -terpinoleno (15%). Os sesquiterpenos hidrocarbonetos representam cerca de 20% e os oxigenados cerca de

10%. O óleo extraído das folhas da espécie *Myracrodruon urundeuva* apresentou o monoterpeneo δ -3-careno com aproximadamente 80%.

Tabela 3.2 – Constituintes e rendimento dos óleos essenciais (%) das espécies *Anacardium humile* (ANHM), *Anacardium occidentale* (ANOC), *Astronium fraxinifolium* (ASFR), *Myracrodruon urundeuva* (MYUR) e *Schinus terebinthifolius* (SCTB)

Constituintes	IRR	ANHM	ANOC	ASFR	MYUR	SCTB	
						Março	Julho
Monoterpenos		29,9	4,7	67,0	91,0	30,9	46,6
Hidrocarbonetos							
α -pineno	939	22,0 \pm 0,9	-	0,7 \pm 0,0	-	1,2 \pm 0,1	4,2 \pm 0,1
β -pineno	980	6,6 \pm 1,3	-	-	-	-	0,8 \pm 0,0
mirreno	991	-	-	1,9 \pm 0,1	4,2 \pm 0,3	15,4 \pm 0,9	0,8 \pm 0,0
δ -2-careno	1001	-	-	3,6 \pm 0,1	-	-	-
α -felandreno	1004	-	-	-	-	-	18,2 \pm 1,2
δ -3-careno	1011	-	-	-	78,8 \pm 1,7	-	-
ρ -cimeno	1026	-	-	-	-	-	3,3 \pm 0,2
Limoneno	1031	1,3 \pm 0,1	4,7 \pm 0,3	0,4 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0	12,0 \pm 0,6	16,7 \pm 1,1
β -felandreno	1032	-	-	-	3,0 \pm 0,2	-	-
(Z)- β -ocimeno	1040	-	-	1,1 \pm 0,1	-	-	-
(E)- β -ocimeno	1050	-	-	44,1 \pm 0,8	-	2,3 \pm 0,2	2,6 \pm 0,1
α -terpinoleno	1089	-	-	15,2 \pm 0,9	4,8 \pm 0,6	-	-
Sesquiterpenos		60,9	80,7	19,0	8,1	59,4	35,4
Hidrocarbonetos							
δ -elemeno	1339	-	-	-	-	2,4 \pm 0,1	2,0 \pm 0,0
α -copaeno	1376	2,5 \pm 0,3	10,3 \pm 0,9	0,4 \pm 0,0	-	1,7 \pm 0,1	0,6 \pm 0,0
β -elemeno	1391	-	-	-	0,7 \pm 0,1	4,8 \pm 0,3	2,1 \pm 0,1
α -gurjuneno	1409	1,0 \pm 0,2	-	-	-	-	-
(E)-cariofileno	1418	31,0 \pm 1,8	15,4 \pm 1,5	-	1,1 \pm 0,1	14,7 \pm 0,8	2,7 \pm 0,2
Aromadendreno	1439	1,1 \pm 0,4	1,1 \pm 0,2	5,6 \pm 0,2	-	-	-
α -humuleno	1454	2,9 \pm 0,3	1,5 \pm 0,1	-	-	2,5 \pm 0,1	0,9 \pm 0,0
Aloaromadendreno	1461	1,4 \pm 0,2	2,5 \pm 0,7	0,5 \pm 0,0	-	-	-
β -camigreno	1475	-	1,0 \pm 0,2	-	0,5 \pm 0,0	7,5 \pm 1,0	-
Germacreno D	1480	5,9 \pm 1,7	11,5 \pm 1,2	1,4 \pm 0,1	-	8,8 \pm 0,3	21,0 \pm 1,2
β -selineno	1485	0,7 \pm 0,0	1,9 \pm 0,3	-	2,5 \pm 0,2	4,3 \pm 0,1	-
α -amorfenno	1485	-	3,0 \pm 0,2	0,5 \pm 0,1	-	-	-
viridifloreno	1493	-	-	9,0 \pm 0,4	3,0 \pm 0,2	-	-
Biciclogermacreno	1494	7,6 \pm 1,2	8,2 \pm 0,5	-	-	-	-
δ -selineno	1495	-	1,7 \pm 0,2	-	-	-	-
α -muuroloeno	1499	1,2 \pm 0,4	2,3 \pm 0,1	-	-	2,6 \pm 0,1	0,9 \pm 0,0
germacreno A	1503	0,6 \pm 0,1	-	-	0,3 \pm 0,0	2,1 \pm 0,0	1,3 \pm 0,0
(E,E)- α -farneseno	1508	-	-	0,8 \pm 0,1	-	-	-
γ -cadineno	1513	0,9 \pm 0,2	2,0 \pm 0,1	0,8 \pm 0,0	-	2,3 \pm 0,1	0,7 \pm 0,0
δ -cadineno	1524	4,1 \pm 0,2	9,3 \pm 0,7	-	-	3,6 \pm 0,1	1,6 \pm 0,1
germacreno B	1556	-	7,3 \pm 1,1	-	-	2,1 \pm 0,1	1,6 \pm 0,0
Sesquiterpenos		6,3	3,8	11,6	-	5,8	15,5
Oxigenados							
Ledol	1565	-	-	0,5 \pm 0,0	-	-	-
espatulenol	1576	-	-	5,7 \pm 0,3	-	1,1 \pm 0,0	2,1 \pm 0,1
óxido de β -cariofileno	1581	0,6 \pm 0,0	-	-	-	0,8 \pm 0,0	2,6 \pm 0,1
Globulol	1583	1,4 \pm 0,4	-	3,2 \pm 0,1	-	-	-
Epiglobulol	1588	1,8 \pm 0,2	-	-	-	-	-
Viridiflorol	1590	1,4 \pm 0,3	-	2,2 \pm 0,1	-	-	2,5 \pm 0,2
δ -cadinol	1636	-	1,5 \pm 0,1	-	-	1,3 \pm 0,1	2,4 \pm 0,1
α -muurolol	1645	-	-	-	-	1,2 \pm 0,1	2,8 \pm 0,1
α -cadinol	1653	1,1 \pm 0,2	2,3 \pm 0,2	-	-	1,4 \pm 0,0	3,1 \pm 0,1
Outros		-	7,2	-	-	-	-
tetradecano	1399	-	1,7 \pm 0,1	-	-	-	-
ácido hexadecanóico	1984	-	7,2 \pm 1,3	-	-	-	-
Total		97,7	96,3	97,9	99,1	96,1	97,5
Rendimento (%)		0,3\pm0,0	0,3\pm0,0	0,7\pm0,1	0,6\pm0,0	0,6\pm0,1	0,7\pm0,1

A análise dos óleos essenciais das folhas da espécie *Schinus terebinthifolius* nas duas épocas de coleta (março e julho) confirmou resultados anteriores que mostram a variação sazonal do óleo desta espécie (Barbosa *et al.*, 2007). Observa-se aumento da concentração de (*E*)-cariofileno (15%) e diminuição de germacreno D (9%) no mês de março, enquanto que o oposto se observa no mês de julho, (*E*)-cariofileno (3%) e germacreno D (21%). Também se observa alto teor de mirceno (15%) e ausência de α -felandreno no óleo extraído em março. Já no óleo extraído em julho nota-se a redução do teor de mirceno (1%) e aparecimento de α -felandreno em nível elevado (18%). Tanto mirceno (20%) como α -felandreno (17%) foram os constituintes majoritários do óleo essencial extraído dos frutos da espécie *Schinus molle* (Bernhard *et al.*, 1983). Outra diferença perceptível entre os óleos das duas épocas é a maior concentração de compostos oxigenados no óleo extraído em julho.

3.5.2 Atividade Antibacteriana dos Óleos Essenciais de Anacardiaceae

O estudo da atividade antibacteriana pelo método de disco-difusão em Agar mostrou que os óleos essenciais extraídos das espécies *Anacardium humile*, *Anacardium occidentale*, *Astronium fraxinifolium*, *Myracrodruon urundeuva* e *Schinus terebinthifolius* apresentaram diferentes níveis de atividade para cada cepa de microrganismo estudado (**Tabela 3.3**). De acordo com este método de análise, todas as espécies, exceto *A. occidentale*, apresentaram atividade moderada contra as cepas de bactérias Gram-positivas, *B. cereus* e *S. aureus*. Os óleos extraídos das folhas das espécies *A. fraxinifolium*, *M. urundeuva* e *S. terebinthifolius* (coletada em julho) apresentaram atividade contra a bactéria Gram-negativa, *E. coli*.

Tabela 3.3 – Diâmetro das zonas de inibição do crescimento bacteriano para os óleos essenciais extraídos das folhas das espécies *Anacardium humile*, *Anacardium occidentale*, *Astronium fraxinifolium*, *Myracrodruon urundeuva* e *Schinus terebinthifolius*.

Óleos Essenciais	Diâmetro da zona de inibição (mm)*		
	Gram-negativa	Gram-positivas	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>A. humile</i>	7 B c	14 A c	10 B d
<i>A. occidentale</i>	8 A c	7 A d	8 A d
<i>A. fraxinifolium</i>	11 B b	23 A b	13 B c
<i>M. urundeuva</i>	14 B b	22 A b	22 A b
<i>S. terebinthifolius</i> (março)	6 B c	15 A c	14 A c
<i>S. terebinthifolius</i> (julho)	14 B b	25 A b	20 A b
Controle (H ₂ O)	6 A c	6 A d	6 A d
Cloranfenicol 30 µg	29 B a	29 B a	32 A a

* Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas, e minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De modo geral, as atividades dos óleos foram maiores para as bactérias Gram-positivas. Estudando o óleo da espécie *Pistacia lentiscus* (Anacardiaceae), Tassou e Nychas (1995) também observaram maior efeito sobre bactérias Gram-positivas do que em Gram-negativas. Todavia, esses autores não descrevem a constituição química do óleo por eles analisado. Resultados semelhantes foram observados por Shimizu *et al.* (2006) para o óleo dos frutos de *Lithraea molleoides*. Este óleo, que apresentou em sua constituição 89% de limoneno, 3,5% de α -pineno e 2,6% de β -pineno, não teve efeito sobre as bactérias Gram-negativas estudadas por esses autores, mas inibiram o crescimento da bactéria Gram-positiva *S. aureus*.

A **Tabela 3.4** traz os valores encontrados para as concentrações inibitórias mínimas dos óleos das espécies *A. fraxinifolium*, *M. urundeuva* e *S. terebinthifolius*. É interessante notar que não existe relação entre os diâmetros das zonas de inibição, obtidos pelo método de disco-difusão (**Tabela 3.3**), e os valores de CIM encontrados (**Tabela 3.4**). Porém, deve-se lembrar que no método de disco-difusão o diâmetro da zona de inibição não depende somente da atividade antibacteriana do óleo. Devido a características inerentes ao método, os coeficientes de difusão dos diferentes

constituintes encontrados nos óleos essenciais podem influenciar os resultados. A facilidade que cada constituinte do óleo possui para migrar pelo meio Agar pode alterar o tamanho da zona de inibição. Embora esses testes de avaliação antimicrobiana sejam padronizados pela NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), os mesmos foram desenvolvidos para análise de agentes antimicrobianos convencionais como os antibióticos. Essas drogas apresentam natureza hidrofílica e se difundem mais facilmente no Agar, ao contrário dos óleos essenciais que são voláteis, insolúveis em água, viscosos e de natureza complexa. Normalmente na literatura referente ao teste de halo de inibição, as zonas de inibição formadas pelos óleos são comparadas com aquelas obtidas pelos antibióticos, no entanto, esses resultados não devem ser simplesmente comparados, pois as particularidades apresentadas pelos óleos devem ser levadas em consideração (Duarte *et al.*, 2005; Nostro *et al.*, 2004). Desta forma, o teste antimicrobiano utilizando o método da microdiluição deve sempre ser realizado.

Tabela 3.4 – Concentração inibitória mínima (CIM) do crescimento bacteriano para os óleos essenciais extraídos das folhas das espécies *Astronium fraxinifolium*, *Myracrodruon urundeuva* e *Schinus terebinthifolius*.

Óleos Essenciais	Concentração inibitória mínima (%)		
	Gram-negativa		Gram-positivas
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>A. fraxinifolium</i>	0,031	0,125	0,031
<i>M. urundeuva</i>	0,031	0,063	0,031
<i>S. terebinthifolius</i> (março)	0,063	0,250	0,125
<i>S. terebinthifolius</i> (julho)	0,016	0,125	0,031

O constituinte limoneno foi encontrado em concentrações semelhantes nos óleos das folhas de *S. terebinthifolius* em ambas as épocas de coleta (Tabela 3.2), logo, não parece estar relacionado com a diferença de atividade antibacteriana encontrada para as duas épocas de coleta desta planta (Tabela 3.3 e 3.4). O óleo extraído desta espécie em julho foi mais ativo para todas as bactérias estudadas que o óleo extraído em março. Em 1999, foi lançado no Brasil um gel para tratamento de

vaginose bacteriana contendo extrato hidro-etanólico de *S. terebinthifolius* (Amorim e Santos, 2003). Em ensaio clínico, estes autores relatam que a taxa de cura foi de 84% no grupo tratado com o gel e 47,8% no grupo tratado com placebo e concluem que este produto foi efetivo e seguro para o tratamento da vaginose bacteriana. Todavia, pelo observado no presente trabalho, é possível que a época de coleta do material vegetal influencie nas propriedades farmacológicas de seus extratos e constituintes.

Assim como a época de coleta, o local de coleta das plantas também pode influenciar em sua constituição química. As peculiaridades genéticas de cada população e as características ambientais de cada região podem levar à produção de diferentes constituintes por uma mesma espécie vegetal. Erazo *et al.* (2006) observaram que o componente majoritário do óleo extraído da espécie *Schinus polygamus* coletada no Chile foi o β -pineno, e este óleo foi ativo tanto para bactérias Gram-positivas quanto Gram-negativas. Porém, para o óleo da mesma espécie coletada na Argentina, os constituintes majoritários foram limoneno e α -felandreno e este óleo foi ativo apenas para a bactéria Gram-positiva *B. cereus*.

É interessante notar que, para o mês de julho, o óleo de *S. terebinthifolius* apresentou uma maior concentração de sesquiterpenos oxigenados (15,5%) que para o óleo extraído em março (5,8%). A relação entre a presença de funções oxigenadas nos constituintes com a maior atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tem sido demonstrada na literatura. Por exemplo, Ultee *et al.* (2002) demonstraram que a presença da hidroxila fenólica no carvacrol é essencial para sua atividade contra *B. cereus*. Portanto, a maior concentração de componentes oxigenados observada para o óleo extraído em julho pode estar relacionada com sua maior atividade antibacteriana encontrada.

Maior concentração de compostos oxigenados também pode ser observada para o óleo extraído das folhas da espécie *Astronium fraxinifolium* (**Tabela 3.2**), que apresentou alta atividade antibacteriana (**Tabelas 3.3 e 3.4**). Entretanto, para o óleo extraído das folhas da espécie *Myracrodruon urundeuva* não se observa a presença de compostos oxigenados, mas sua atividade antibacteriana foi comparável aos demais óleos estudados. O óleo desta espécie foi caracterizado por uma alta concentração de δ -3-careno (80%). Alguns estudos relatam o efeito deste constituinte sobre os tecidos e células do aparelho respiratório. Efeitos como bronquioconstrição,

irritação da mucosa (Lastbom *et al.*, 1998; 2000 e 2003) e toxicidade aos macrófagos alveolares (Johansson e Lundborg, 1997) foram observados. Entretanto, estudos sobre a ação antibacteriana do δ -3-careno não foram encontrados na literatura, portanto, o estudo de seu mecanismo de ação se torna um foco interessante para estudos posteriores.

3.5.2.1 Peroxidação de Lipídeos em Células Bacterianas

Os resultados apresentados na **Tabela 3.5** indicam que os óleos essenciais promoveram acúmulo de aldeído malônico (MDA) nas células bacterianas, indicando aumento da peroxidação de lipídeos. Os maiores níveis de peroxidação foram observados para as bactérias tratadas com os óleos de *S. terebinthifolius* (coletado em julho) and *M. urundeuva* (MDA-TBA₂ = 2,14 a 3,34 nmol mg⁻¹ Proteína). O monoterpeno δ -3-careno promoveu o menor efeito observado.

Em membranas biológicas, com constituição basicamente fosfolipídica, a peroxidação de lipídeos é uma consequência frequente do ataque de radicais e gera uma complexa variedade de produtos, muitos dos quais são eletrófilos reativos. O aldeído malônico (MDA) é o principal e mais bem estudado destes produtos (Del Rio et al 2005). MDA é formado pela β -cisão de ácidos graxos poliinsaturados peroxidados e é comumente quantificado pela derivatização com ácido 3-tiobarbitúrico (TBA). Este aldeído é altamente tóxico para a célula e pode interagir com DNA e proteínas, sendo, portanto um mutagênico potencial (Marnett 1999).

Efeitos tais como os danos peroxidativos são mostrados para alguns agentes antimicrobianos (Lyon *et al.*, 2008; Yoon et al., 2002). Entretanto, até o presente momento, não se encontrou relatos na literatura acerca da peroxidação de lipídeos em membranas bacterianas em resposta a exposição a óleos essenciais. De acordo com Davidson (1993), o modo de ação de quase todos os agentes antimicrobianos pode ser classificado em um ou mais dos seguintes grupos: (a) reações com a membrana celular, (b) inativação de enzimas essenciais, e (c) destruição ou inativação do material genético. Até o momento, os mecanismos descritos para os

óleos essenciais possuem exemplos em todos esses grupos, principalmente reações e danos à membrana celular (Bakkali et al., 2008; Burt, 2004).

Table 3.5 – Teores de MDA-TBA₂ em células de bactérias cultivadas em meio de cultura suplementado com a MIC de cada óleo essencial das espécies *Astronium fraxinifolium*, *Myracrodruon urundeuva* e *Schinus terebinthifolius* e o monoterpeneo δ -3-careno

Óleos essenciais	Concentração de MDA-TBA ₂ (nmol mg ⁻¹ Proteína)		
	Gram-negativa	Gram-positivas	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>S. terebinthifolius</i> (março)	2,16 A b	1,85 B b	1,67 B b
<i>S. terebinthifolius</i> (julho)	3,34 A a	2,14 B b	2,22 B b
<i>A. fraxinifolium</i>	2,46 A b	1,51 B b	1,84 B b
<i>M. urundeuva</i>	2,74 A b	2,97 A a	3,21 A a
δ -3-Caren	1,33 B c	1,92 A b	1,71 A b
Controle	0,69 A d	0,95 A c	0,73 A c

* Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas e minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott a p 5%

Ademais, considerando o grande número de compostos presentes nos óleos essenciais, é muito provável que a atividade antibacteriana não seja atribuída a um único mecanismo de ação específico, mas sim que existam vários alvos de atuação na célula (Carson et al., 2002; Burt 2004; Bakkali et al., 2008). Portanto, os resultados indicam que a peroxidação de lipídeos é provavelmente um dos mecanismos de ação antibacteriana destes óleos essenciais.

3.6 Conclusões

Conclui-se que os óleos essenciais das espécies *Anacardium humile*, *Anacardium occidentale*, *Astronium fraxinifolium*, *Myracrodruon urundeuva* e *Schinus terebinthifolius* possuem constituições químicas bastante distintas.

Os óleos das espécies *A. humile* e *A. occidentale* não apresentaram atividade contra as bactérias estudadas. Os óleos das espécies *A. fraxinifolium*, *M. urundeuva* e *S. terebinthifolius* apresentaram atividades moderadas contra as cepas de bactérias utilizadas. A época de coleta da espécie *S. terebinthifolius* altera a atividade antibacteriana do óleo essencial extraído de suas folhas.

Estes óleos apresentam características promissoras para a utilização como alternativas a desinfetantes e preservativos contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Em adição, os danos pró-oxidantes sobre as membranas das células bacterianas se apresentam como efeitos da exposição aos óleos essenciais e parecem desempenhar um papel importante no mecanismo de ação antibacteriana destes produtos naturais.

3.7 Referências

- Adams, R. P., (1995). *Identification of Essential Oils by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. Carol Stream, IL: Allured Publi.
- Amorim, M.M.R., Santos, L.C., 2003. Tratamento da vaginose bacteriana com gel de Aroeira (*Schinus terebinthifolius* Raddi): Ensaio Clínico Randomizado. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**. 25 (2), 95-102.
- Apel, M.A., Sobral, M., Henriques, A.T. 2006. Composição química do óleo volátil de *Myrcianthes* nativas da região sul do Brasil. **Rev. Bras. Farmacogn.** 16, 402-407.
- ASAE, 2000. American Society of Agricultural Engineers; *Standards Engineering Practices Data, Moisture Measurement ASAE S358.2 DEC99*, Forages.
- Asekun, O.T., Grierson, D.S. Afolayan, A.J. 2006. Effects of drying methods on the quality and quantity of the essential oil of *Mentha longifolia* L. subsp. *capensis*. **Food. Chem.** 101, 995-998.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., & Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food Chem. Toxicol.*46, 446-475.
- Barbosa, L . C. A., Demuner, A. J, Clemente, A. D., Paula, V. F., & Ismail, F. M. D. (2007). Composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. *Quim. Nova.* 30 (8), 1959-1965.
- Bassole, I.H.N., Ouattara, A.S., Nebie, R., Ouattara C.A.T., Kabore, Z.I., Traore, A.S. 2003. Chemical composition and antibacterial activities of the essential oils of *Lippia chevalieri* and *Lippia multiflora* from Burkina Faso. **Phytochemistry**. 62, 209-212.
- Beltrán, A.E., Alvarez, Y., Xavier, F.E., Herranz, R., Rodríguez, J., Núñez, A.J., Alonso, M.J., Salaices, M. Vascular effects of the *Mangifera indica* L. extract (Vimang). **Eur. J. Pharmacol.** 499, 297-305.
- Bernhard, R.A., Shibamoto, T., Yamaguchi, K., White, E. 1983. The volatile constituents of *Schinus molle* L. **J. Agric. Food Chem.** 31 (2), 463-466.

- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochem.* 72, 248-254.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223- 253.
- Carson, C .F., Mee, B. J., & Riley, T. V. (2002). Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. *Antimicrob. Agents Chemother.* 46, 1914-1920.
- Correia, S.J., David, J.P., David. J.M. 2006. Metabólitos secundários de espécies de Anacardiaceae. **Quim. Nova.** 29(6), 1287-1300.
- Davidson, P. M., & Branen, A. L. (1993). *Antimicrobials in Food.* (Eds.) second ed., New York: Marcel Dekker.
- Del Rio, D., Stewart, A. J. & Pellegriniet, N. (2005). A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. *Nutr. Metabol. Cardiovasc. Dis.* (2005) 15, 316e328
- Duarte, M.C.T. Figueira, G.M., Sartoratto, A., Rehder, V.L.G., Delarmelina, C. 2005. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.** 97, 305-311.
- Eloff, J.N. 2001. Antibacterial activity of Marula (*Sclerocarya birrea* (A. rich.) Hochst. subsp. *caffra* (Sond.) Kokwaro) (Anacardiaceae) bark and leaves. **J. Ethnopharmacol.** 76 (2001), 305-308.
- Erazo, S., Delporte, C., Negrete, R., García, R., Zaldívar, M., Iturra, G., Caballero, E., López, J.L., Backhouse, N. 2006. Constituents and biological activities of *Schinus polygamus*. **J. Ethnopharmacol.** 107, 395-400.
- Garrido, G., González, D., Lemus, Y., García, D., Lodeiro, L., Quintero, G., Delporte, C., Nunes-Sellés, A.J., Delgado, R. 2004. In vivo and in vitro anti-inflammatory activity of *Mangifera indica* L. extract (VIMANG[®]). **Pharmacol. Res.** 50, 143-149.
- Goetz, G.M., Lepoittevin, J.P. 1999. **Bioorg. Med. Chem. Lett.** 9, 1141.

- Johansson, A., & Lundborg, M. (1997). Effects of low concentrations of 3-carene on alveolar macrophages in vitro. *Toxicology*. 120, 99-104.
- Kubo, I., Muroi, H., Himejima, M. (1993). Structure-antibacterial activity relationships of anacardic acids. **J. Agric. Food Chem.** 41, 1016-1019.
- Lastbom, A., Boman, A., Johnsson, S., Camner, P., & Ryrfeldt, A. (2003). Increased airway responsiveness of a common fragrance component, 3-carene, after skin sensitization – a study in isolated guinea pig lungs. *Toxicol. Lett.* 145, 189-196.
- Lastbom, L., Boman, A., Camner, P., & Ryrfeldt, A. (1998). Does airway responsiveness increase after skin sensitisation to 3-carene: a study in isolated guinea pig lungs. *Toxicology*. 125, 59-66.
- Lastbom, L., Boman, A., Camner, P., & Ryrfeldt, A. (2000). Increased airway responsiveness after skin sensitization to 3-carene, studied in isolated guinea pig lungs. *Toxicology*. 147, 209-214.
- Lin, Y.M., Anderson, H., Flavin, M.T., Pai, Y.H.S. 1997. **J. Nat. Prod.** 60, 884.
- Lyon, D. Y., & Alvarez, P. J. J. (2008). Fullerene Water Suspension (nC₆₀) Exerts Antibacterial Effects via ROS-Independent Protein Oxidation. *Environ. Sci. Technol.* 42, 8127-8132.
- Maia, J. G. S., Andrade, E. H. A., & Zoghbi, M. G. B. (2000). Volatile Constituents of the Leaves, Fruits and Flowers of Cashew (*Anacardium occidentale* L.). *J. Food Compos. Anal.* 13, 227-232.
- Makare, N., Bodhankar, S., Rangari, V. 2001. Immunomodulatory activity of alcoholic extract of *Mangifera indica* L. in mice. **J. Ethnopharmacol.** 78, 133-137.
- Marnett, L. J. (1999). Lipid peroxidation – DNA damage by malondialdehyde. *Mutat. Res. Fundam. Mol. Mech. Mutagen.* 424, 83-95.
- Muruganandan, S., Gupta, S., Kataria, M., Lal, J., Gupta, P.K. 2002. **Toxicology.** 176, 165
- NCCLS - National Committee for Clinical and Laboratory Standards. (2003a). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6].

NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

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

Nostro, A., Roccaro, A.S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M.A., Pizzimenti, F.C., Cioni, P.L., Procopio, F., Blanco, A.R. (2004). Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **J. Medical Microbiol.** 56, 519-523.

Özçelik, B., Aslan, M., Orhan, I., Karaoglu, T. 2005. Antibacterial, antifungal, and antiviral activities of the lipophylic extracts of *Pistacia vera*. **Microbiol. Res.** 160, 159-164.

Potzernheim, M.C.L., Bizzo, H.R., Vieira, R.F. 2006. Análise dos óleos essenciais de três espécies de *Piper* coletadas na região do Distrito Federal (Cerrado) e comparação com óleos de plantas procedentes da região de Paraty, RJ (Mata Atlântica). **Rev Bras Farmacogn.** 16, 246- 251.

Prithiviraj, B., Manickam, M., Singh, U.P., Ray, A.B. 1997. **Can. J. Bot.** 75, 207.

Salustiano, V. C., Andrade, N. J., Soares, N. F. F., Lima, J. C., Bernardes, P. C., Luiz, L. M. P., & Fernandes, P. E. (2009). Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. *Food Control.* 20, 439-442.

Sanchez, G.M., Re, L.A., Giuliani, A., Núñez-Sellés, J., Davison, G.P., León-Fernández, O.S. 2000. **Pharmacol. Res.** 42, 6.

Santos, M.L., Magalhães, G.C. 1999. **J. Braz. Chem. Soc.** 10, 13.

Sefidkon, F., Abbasi, K., Jamzad, Z., Ahmadi, S. 2007. The effect of distillation methods an stage of plant growth on the essential oil content and comoposition of *Satureja rechingeri* Jamzad. **Food Chem.** 100, 1054-1058.

- Selles, A.J. N., Castro, H.T., Aguëro-Aguëro, V.J., González-González, J., Naddeo, F., De-Simone, F., Rastrelli, L. 2002. **J. Agric. Food Chem.** 50, 762.
- Shimizu, M. T., Bueno, L. J. F., Rodrigues, R. F. O., Sallowicz, F. A., Sawaya, A. C. H. F., & Marques, M. O. M. (2006). Essential oil of *Lithraea molleoides* (vell.): chemical composition and Antimicrobial activity. *Braz. J. Microbiol.* 37, 556-560.
- Shobha, P.R., Krishnaswamy, B., Ravindranath, S.V. 1992. Phenolic lipid composition during development of cashew. **Phytochemistry.** 31, 2295-2297.
- Souza, V. C. e Lorenzi, H. 2005. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, Instituto Plantarum.
- Tassou, C.C., & Nychas, G.J.E. (1995). Antimicrobial Activity of the Essential Oil of Mastic Gum (*Pistacia Zentiscus* var. *chia*) on Gram Positive and Gram Negative Bacteria in Broth and in Model Food System. *Int. Biodeterioration & Biodegradation.* 36, 411-420.
- Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The Phenolic Hydroxyl Group of Carvacrol Is Essential for Action against the Food-Borne Pathogen *Bacillus cereus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68(4), 1561-1568.
- Viljoen, A.M., Subramoney, S., Vuuren, S.F.V., Baser, K.H.C., Demirci, B. 2005. The composition, geographical variation and antimicrobial activity of *Lippia javanica* (Verbenaceae) leaf essential oils. **J. Ethnopharmacol.** 96, 271-277.
- Yoon, S. J., Park, J. E., Yang, J. H., & Park, J. W. (2002). *OxyR* Regulon Controls Lipid Peroxidation-mediated Oxidative Stress in *Escherichia coli*. *J. Biochem.Mol. Biol.* 35, 297-301.

4 Capítulo 4

COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Siparuna guianensis* Aubl.: FONTES ALTERNATIVAS DE α -BISABOLOL E α -TERPINOLENO

RESUMO

Os teores obtidos no período de maio de 2009 a maio de 2010 para o óleo essencial de *Siparuna guianensis* permaneceram entre 4,5 e 7,0%. O período de menor rendimento do óleo, setembro a novembro, é coincidente com o período fenológico em que as plantas passam por uma desfolha natural drástica. Dois constituintes, o monoterpeno α -terpinoleno e o álcool sesquiterpênico α -bisabolol, representaram, em conjunto, cerca de 80% do óleo durante todo o ano.

Em geral, o composto α -bisabolol promoveu maiores zonas de inibição das bactérias *E. coli*, *B. cereus* e *S. aureus*, que o óleo essencial. As concentrações inibitórias mínimas (CIM) demonstram que o óleo de *S. guianensis* e o padrão comercial de α -bisabolol inibiram o crescimento das cepas de bactérias testadas em concentrações expressivamente baixas (8 – 63 $\mu\text{g mL}^{-1}$). O acúmulo de aldeído malônico (MDA) indica que os danos pró-oxidantes, que resultam na peroxidação de lipídeos, estão provavelmente relacionados como os mecanismos de ação antibacteriana destes óleos essenciais.

A CIM contra os fungos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trychophyton rubrum* e *Aspergillus fumigatus* indicam que o óleo de *S. guianensis* inibe o crescimento das cepas de fungos em concentrações reduzidas, principalmente para o fungo *Cryptococcus neoformans* (16 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

ABSTRACT

The levels obtained during the period May 2009 to May 2010 for the essential oil *Siparuna guianensis* remained between 4.5 and 7.0%. The period of lower oil yield, from September to November, is coincident with the phenological period in which the plants undergo a dramatic natural defoliation. Two components, the monoterpene α -terpinolene and α -bisabolol, bisabolol alcohol, together accounted about 80% of the oil throughout the year.

In general, the compound α -bisabolol promoted larger zones of inhibition of the bacteria *E. coli*, *B. cereus* and *S. aureus*, the essential oil. The minimum inhibitory concentrations (MIC) show that the oil of *S. guianensis* and trade pattern of α -bisabolol inhibited the growth of bacterial strains tested at concentrations significantly lower (8-63 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The accumulation of malondialdehyde (MDA) shows that the damage pro-oxidants, which result in lipid peroxidation, are probably related to the mechanisms of antibacterial action of essential oils.

The MIC against fungi *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Aspergillus fumigatus* and *Trichophyton rubrum* indicate that the oil of *S. guianensis* inhibit the growth of fungal strains in low concentrations, especially for the fungus *Cryptococcus neoformans* (16 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

4.1 Família Siparunaceae

A família Siparunaceae é composta por apenas dois gêneros, *Glossocalyx*, que é nativo do oeste da África, e *Siparuna*, que é nativo da América do Sul. Possui cerca de 75 espécies, quase todas pertencentes a *Siparuna*, pois *Glossocalyx* é monoespecífico (Souza e Lorenzi, 2005).

No Brasil ocorrem aproximadamente 40 espécies de *Siparuna*, a maioria proveniente da Amazônia e relativamente comuns em bordas de florestas. Muitas espécies também são comuns ao longo do Brasil Central e Região Sudestes.

Tradicionalmente estes dois gêneros de Siparunaceae estiveram incluídos entre as Monimiaceae. Entretanto, estas famílias podem ser diferenciadas pela placentação, que é ereta em Siparunaceae e pêndula em Monimiaceae. Os estudos em filogenia sustentam a distinção entre estas duas famílias e indicam que Siparunaceae estaria mais associada às Gomortegaceae e Atherospermataceae (ambas ocorrentes no Chile) que a Monimiaceae (Renner, 1999).

Uma espécie muito importante é *Siparuna guianensis* Aubl., também conhecida como captitiú e negramina. É um arbusto ereto de três a cinco metros de altura, aromática, com ramos jovens rufo-pubescentes, nativa em quase todo Brasil em sub-bosques de matas secundárias e capoeiras, porém com maior frequência na região Amazônica. Possui folhas simples, membranáceas, de margens lisas, de nove a 16 cm de comprimento por quatro a sete cm de largura. Flores unissexuadas, de coloração amarelo-esverdeada, dispostas em pequenas inflorescências hermafroditas axilares. Os frutos são cápsulas elipsóides deiscentes, de cor verde quando jovens e vinho quando maduros, que se abrem expondo o interior róseo-avermelhado com as sementes.

4.2 *Fitoquímica e Etnofarmacologia de Siparunaceae*

A química e a etnobiologia de Siparunaceae se resumem praticamente a poucos relatos sobre o gênero *Siparuna*. Plantas deste gênero são amplamente utilizadas na medicina tradicional das Américas Central e Sul. Nas Guianas, o decocto das folhas de *Siparuna guianensis* Aubl. e *Siparuna pachyantha* A.C. Sm. são utilizadas pelos crioulos e pelos índios Wayãpi contra malária, febres, e como banho antibiótico na hora do parto (Grenand et al., 2004). No Panamá, extratos são usados como inseticidas e cataplasmas são aplicados contra edemas e como antiinflamatórios (Renner e Hausner, 2005).

No Brasil, *S. guianensis* é empregada na medicina popular principalmente na região norte do país. Folhas e flores são consideradas carminativas, aromáticas, estimulantes, febrífugas, antidiarréicas e diuréticas. Externamente, são utilizadas na forma de banhos contra espasmos musculares, dores de cabeça, febres e gripes, e na hora do parto. Como seu próprio nome demonstra, esta planta é muito comum nas Guianas onde é um dos remédios tradicionais mais apreciados. O chá das folhas é considerado abortivo, febrífugo e estimulante, o extrato etanólico é empregado contra edemas e como antiinflamatório.

Os índios Yanomami, que vivem numa área de floresta tropical na região da fronteira Brasil e Venezuela, esfregam as folhas amassadas desta espécie na cabeça e corpo para vertigem e na Colômbia o chá de folhas é recomendado para reumatismo. No Equador, os Quéchuas tratam herpes aplicando a casca aquecida nas áreas infeccionadas, enquanto as folhas aromáticas são esfregadas na testa e fortemente inaladas para tratar dor de cabeça. (Milliken & Albert, 1996).

Na região do Alto do Rio Grande, em Minas Gerais, faz-se uso do decocto ou infuso de toda a planta como antiinflamatório, carminativo, estimulante, nas cefalalgias, nas gripes e resfriados. O cataplasma, a compressa ou o banho são usados para reumatismo (Rodrigues e Carvalho, 2001).

Em Nova Xavantina, o sumo das folhas com mastruz, *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae), é relatado como medicinal para pós-operatório e as folhas são utilizadas como repelentes, nos galinheiros, para piolho de galinha (Duarte, 2001).

Recentemente, Céline *et al.* (2009) verificaram a atividade antiplasmodial e leishmanicida de extratos das folhas de *S. aspera* e *S. radiata* coletadas no Peru. Porém, os autores comentam que a atividade antimalárica dos extratos de *S. guianensis* foi perdida durante o processo de fracionamento bioguiado. Atividade antiplasmodial foi verificada para as espécies *S. andina* (Tul.) A. DC., *S. pauciflora* (Beurl.) A. DC. e *S. tonduzian* Perkins, todas da América Central (Jenett-Siems *et al.*, 1999). Posteriormente os autores isolaram alguns sesquiterpenos e derivados isoquinolínicos de *S. pauciflora* (Jenett-Siems *et al.*, 2003) e um butenolídeo com novo tipo de esqueleto carbônico, chamado sipandinolide, de *S. andina* (Jenett-Siems *et al.*, 2000).

Para os óleos essenciais de *S. guianensis*, Antônio *et al.* (1984) encontraram em folhas de plantas do Panamá, curzeronona (25,64%), derivados de sua degradação (42,31%) e miristicina (7,93%). Plantas coletadas em Rio Branco, Acre, apresentaram os componentes majoritários γ -cadineno (21,8%), bergamotenal (14,2%) e (*E*)- β -cariofileno (15,1%) (Rebouças, 1984). Em amostras coletadas no Pará, Zoghbi *et al.* (1998) observaram altas concentrações de epi- α -bisabolol (25,1%) e espatulenol (15,7%). Além de monoterpenos e sesquiterpenos, Viana *et al.* (2002) também observaram alcoóis sesquiterpênicos e cetonas alifáticas nos óleos de plantas da Amazônia.

4.3 *Experimental*

4.3.1 **Material Vegetal**

A espécie *Siparuna guianensis* Aubl. foi coletada em um fragmento de Mata Atlântica na cidade de Tocantins, Minas Gerais. Amostras das partes aéreas foram coletadas, armazenadas em caixas térmicas com gelo e transportadas para o Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos (LASA), do Departamento de Química (DEQ) da Universidade Federal de Viçosa (UFV), onde se realizaram as extrações dos óleos essenciais. Espécimes-testemunhas foram herborizados e incorporados ao acervo do Herbário VIC do Departamento de Biologia Vegetal (DBV), com número de registro VIC 34160.

4.3.2 **Extração de Óleos Essenciais**

Folhas completamente expandidas foram coletadas separadamente, em triplicata e de modo randômico entre os indivíduos das populações estudadas. Cada amostra foi triturada e submetida a três horas de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger. Os óleos obtidos foram recolhidos juntamente com o hidrolato e extraídos com pentano (3 x 20 mL) em funil de separação. As fases orgânicas foram secadas com sulfato de magnésio anidro e o solvente removido sob baixa pressão, a 40 °C, em evaporador rotativo. Os óleos foram acondicionados em frascos de vidro, sob atmosfera de nitrogênio, e mantidos sob refrigeração à temperatura de aproximadamente -4 °C, até o momento das análises químicas e ensaios de atividade biológica.

A massa de cada óleo foi mensurada em balança analítica e os rendimentos expressos em relação à massa de matéria seca do vegetal. A matéria seca foi determinada pela secagem de três alíquotas de aproximadamente 2 g, de cada amostra, em estufa a 103 ± 2 °C até massa constante (ASAE, 2000).

4.3.3 Cromatografia em Fase Gasosa (CG)

Utilizou-se cromatógrafo a gás Shimadzu GC-17A equipado com detector de ionização em chama (DIC) e coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m × 0,32 mm, espessura do filme de 0,25 µm) com as seguintes condições cromatográficas: gás de arraste N₂ sob fluxo de 1,8 mL min⁻¹; temperatura do injetor 220 °C, temperatura do detector 240 °C; temperatura inicial da coluna 40 °C, isoterma por 2 min., seguido de aquecimento a 3 °C min⁻¹ até 240 °C, mais isoterma por 15 min; volume de injeção 1,0 µL (1% p/v em CH₂Cl₂); razão de split 1:10; pressão da coluna 115 kPa.

As análises foram realizadas em triplicata e a concentração de cada constituinte foi calculada pela porcentagem da área do pico correspondente em relação à área total do cromatograma.

Utilizou-se aparelho Shimadzu GCMS-QP5050A, equipado com coluna de sílica fundida DB-5 (30 m × 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 µm) e acoplado a detector de ionização. Gás de arraste He sob fluxo de 1,8 mL min⁻¹; temperatura do injetor 220 °C, temperatura inicial da coluna 40 °C, isoterma por 2 min., seguido de aquecimento a 3 °C min⁻¹ até 240 °C, mais isoterma por 15 min; volume de injeção 1,0 µL (1% p/v em CH₂Cl₂); razão de split 1:5; pressão da coluna 100 kPa; temperatura da interface 240 °C; ionização por impacto de elétrons (70 eV); amplitude de varredura de 30 a 600 u.

As identificações dos componentes foram realizadas pela comparação de seus tempos de retenção, relativos à série de alcanos (C₉ – C₂₇), e pela comparação dos espectros de massas com o banco de dados da biblioteca Wiley (Wiley 330.000) ou com a literatura (Adams, 1995).

4.3.4 Avaliação da Atividade Antibacteriana

As cepas de bactérias foram obtidas junto ao Departamento de Microbiologia (DMB) da Universidade Federal de Viçosa (UFV). Os microrganismos estudados foram as bactérias Gram (+) *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) e *Bacillus cereus*, Ribotipo 1 222-173-S4 isolado de superfícies de equipamentos de pós-pasteurização (Salustiano *et al.*, 2009); e Gram (-) *Escherichia coli* (ATCC 11229).

4.3.4.1 Estudo da Atividade Antibacteriana por Disco-Difusão

A atividade dos óleos essenciais contra as cepas de bactérias estudadas foi avaliada pelo método de disco-difusão em meio sólido de acordo com as normas do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003a), atualmente nomeado *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI).

Placas de Petri contendo ágar Müeller-Hinton foram inoculadas com suspensões dos microrganismos testados (2×10^8 UFC mL⁻¹). Discos de papel de filtro (6 mm de diâmetro) foram embebidos com 5 µL de óleo essencial e posicionados sobre superfície do ágar das placas inoculadas. As placas foram incubadas por 48 horas a 35 °C. O diâmetro das zonas de inibição foram medidos com paquímetro e expressados em milímetros. O antibiótico Cloranfenicol (30 µg) foi utilizado como controle positivo e água esterilizada como controle negativo. Cada óleo foi testado em triplicata e repetido três vezes, totalizando nove repetições. Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado e os resultados foram analisados pela ANOVA e teste de Scott-Knott a $P \leq 0.05$, utilizando o programa computacional GENES (*Genetics and Statistical Analysis* Versão 2007.0.0 – Universidade Federal de Viçosa).

4.3.4.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

O método de microdiluição em caldo nutritivo foi utilizado para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), para alguns óleos selecionados no teste de disco-difusão, de acordo com as normas do *National Committee for Clinical Laboratory Standards* (NCCLS, 2003b).

Realizou-se a diluição seriada, de razão 2, dos óleos essenciais em placas de microtitulação de 96 poços, cobrindo a faixa de concentração de 2,0 a 0,0156 % (v/v). Utilizou-se o meio líquido *Brain Heart Infusion Broth* (Himedia) suplementado com Tween[®] 80 (Merck, Germany) a 0,5% (v/v), para solubilização dos óleos. Inóculos das bactérias testadas foram adicionados para se obter a concentração final de 5×10^5 UFC mL⁻¹. As placas foram incubadas por 24 horas a 35 °C. O crescimento bacteriano foi avaliado pela turbidez, mensurada em espectrofotômetro a 625 nm, e a CIM foi definida como a menor concentração de óleo essencial na qual o microrganismo testado não apresentou crescimento visível.

4.3.4.3 Peroxidação de Lipídeos

Tubos com 10 mL de meio BHI (Brain Heart Infusion Broth – Himedia), suplementados com Tween 80 (Merck, Germany) 0,1%, foram incubados com 2×10^5 CFU/mL das linhagens de bactérias. Para os tratamentos, o meio foi também suplementado com a CIM para cada óleo. Após 24 horas, as células bacterianas foram coletadas por centrifugação a $10.000 \times g$ por 10 min. as células foram lavadas uma vez com 2 mL de tampão fosfato de potássio 50 mM pH 7.5, e ressuspensas em 2 mL deste tampão (Yoon *et al.*, 2002). A peroxidação de lipídeos foi detectada pelo ensaio de derivatização com ácido 3-tiobarbitúrico (TBA), que forma um aduto com o aldeído malônico (MDA) (Yoon *et al.*, 2002). Os teores de MDA foram expressos em relação ao conteúdo de proteínas das bactérias. O teor de proteínas foi determinado pelo método de Bradford (1976).

4.3.5 Avaliação da Atividade Antifúngica - CIM

A atividade antifúngica do óleo essencial de *S. guianensis* foi verificada pela determinação da CIM em suspensões de *Candida albicans* ATCC 3680/IOC 3704, *Criptococcus neoformans* ATCC 90112, *Trychophyton rubrum* IOC 4527, *Aspergillus fumigatus* IOC 4526, preparadas com base no Manual “*Clinical and Laboratory Standards Institute*” (CLSI, 2002a, b). Colônias dos fungos cultivados em meio de cultura Batata Dextrose Agar (BDA) a 28°C foram transferidas para tubo de ensaio de 15 mL contendo 5 mL de solução salina e a suspensão foi homogeneizada por agitação. A concentração de Unidades Formadoras de Colônias (UFC mL⁻¹) presentes nas suspensões foi ajustada em meio de cultura RPMI 1640 de forma a se obter 0,5-2,5x10³ e 0,4-5x10⁴ UFC mL⁻¹ para leveduras (*C. albicans* e *C. neoformans*) e fungos filamentosos (*T. rubrum* e *A. fumigatus*), respectivamente. A concentração de UFC foi determinada por absorbâncias a 530 nm.

O óleo essencial de *S. guianensis* foi solubilizado em dimetilsulfóxido e 100 µL foram serialmente diluídos em uma placa de 96 cavidades resultando nas concentrações de 8 a 1.000 µg mL⁻¹. A cada cavidade da placa foram adicionados 100 µL das suspensões de *C. albicans*, *C. neoformans*, *T. rubrum* ou *A. fumigatus* em meio de cultura RPMI 1640. A placa foi incubada a 30-32°C e tempo adequados a cada patógeno variando de 24 a 72 horas (CLSI, 2002a, b). O controle positivo foi uma suspensão de fungos livre de antibióticos e o controle negativo, uma suspensão de fungos contendo anfotericina B em concentrações inferiores a 16 µg/mL. A concentração de DMSO presente nos ensaios foi inferior a 1%.

Para indicação da presença ou ausência de crescimento fúngico, 24 horas antes do término do ensaio, 25 µL do corante Rezazurin a 0,02% foi adicionado a cada cavidade da placa (Palomino et al., 2002; De Souza et al., 2005). Nos ensaios com *C. albicans*, o corante foi adicionado antes da adição da suspensão deste patógeno (tempo zero).

A leitura das CIM foi efetuada por observação macroscópica da cor do rezaurin que em azul ou rosa indica a ausência ou presença de crescimento microbiano, respectivamente. As CIM foram definidas como a menor concentração das amostras capaz de impedir a alteração da cor azul para rosa e indicam a inibição do crescimento de pelo menos 90% dos patógenos. Os resultados representam a média de 2 ou 3 ensaios independentes.

4.4 Resultados e Discussão

4.4.1 Composição química dos óleos essenciais de *S. guianensis*

Os teores obtidos no período de maio de 2009 a maio de 2010 para o óleo essencial de *Siparuna guianensis* estão representados na **Figura 4.1**. É interessante notar que no período de clima mais quente e úmido (setembro a janeiro) ocorre uma redução do rendimento do óleo (4,5 a 5,0%). Durante a estação fria e seca os rendimentos aumentam atingindo valores expressivos como 6,8%. Estes resultados são condizentes com o observado por Castellani *et al.* (2006) em um fragmento de Mata Atlântica situado no Campus da Universidade Federal de Viçosa, Viçosa – MG. Durante o período de 1999 a 2000, estes autores observaram maior rendimento do óleo de *S. guianensis* no outono. Todavia, os teores de óleo obtidos em maio de 2010 foram consideravelmente superiores àqueles obtidos em maio de 2009, sugerindo que as diferenças climáticas ao longo dos anos também podem influenciar a produtividade de óleo.

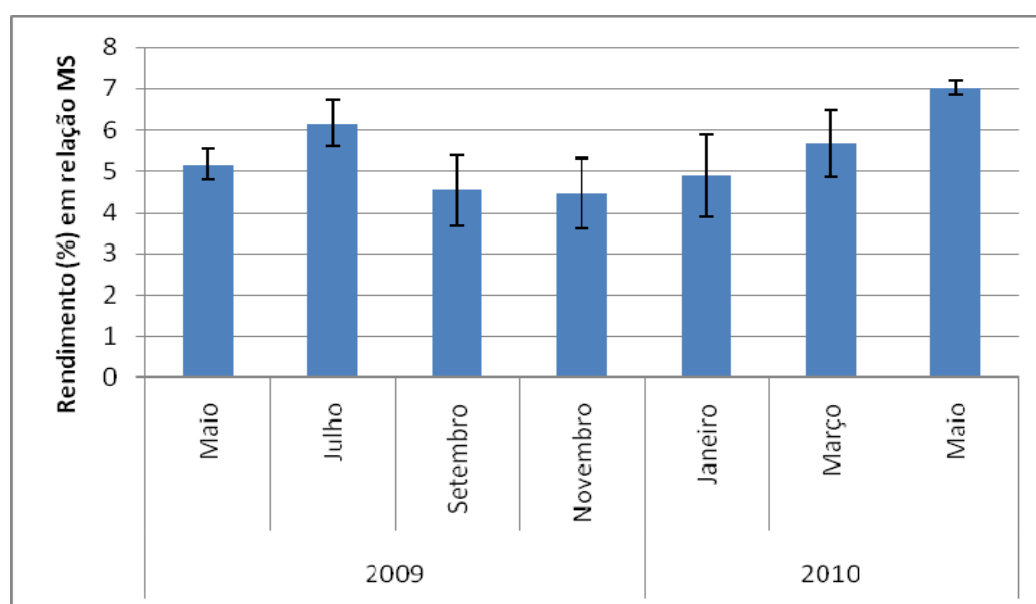


Figura 4.1 – Rendimento do óleo essencial das folhas de *S. guianensis*

Embora a **Figura 4.1** indique um excelente rendimento de óleo ao longo de todo ano, vale a pena comentar que as condições observadas para as plantas em campo podem ter implicações diferentes no caso de possíveis aplicações desta planta (**Figura 4.2**). O período de menor rendimento do óleo, setembro a novembro, é coincidente com o período fenológico em que as plantas passam por uma desfolha natural drástica. Portanto, mesmo que os teores de óleo nas folhas remanescentes sejam elevados (de 4 a 5%), a produtividade geral das plantas pode ser fortemente comprometida. Este período coincide também com o início da floração e emissão de novos ramos, logo, coletas massivas nesta época poderiam prejudicar o ciclo fenológico das plantas. Este mesmo padrão de comportamento fenológico foi observado por Castellani *et al.* (2006) em Viçosa – MG e por Valentini *et al.* (2010a) para plantas coletadas em Cuiabá – MT, entretanto, estes dois grupos de pesquisa obtiveram rendimentos expressivamente inferiores (cerca de 5 vezes menores) aos observados no presente trabalho.

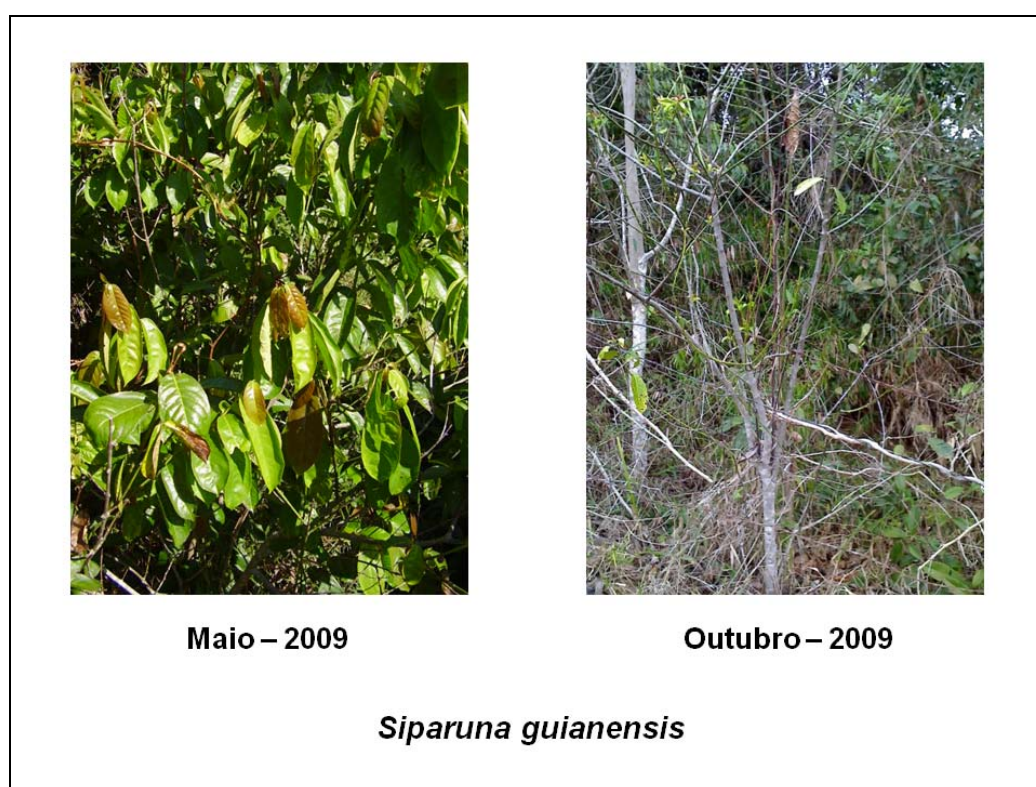


Figura 4.2 – Aspecto geral do mesmo indivíduo de *S. guianensis* observado em Tocantins – MG em maio e outubro de 2009.

Na **Tabela 4.1** estão sumarizadas as constituições químicas dos óleos essenciais de *S. guianensis* obtidos nas diferentes épocas do ano. Observa-se que dois constituintes, o monoterpeno α -terpinoleno e o álcool sesquiterpênico α -bisabolol, representaram, em conjunto, cerca de 80% do óleo durante todo o ano. Os resultados são muito interessantes devido à grande aplicação destes compostos. α -Terpinoleno é utilizado na indústria química, principalmente como agente de secagem para resinas epóxi, e α -bisabolol é muito aplicado nas indústrias farmacêutica e de cosmética, devido à sua excelente atividade antimicrobiana. Cabe ressaltar também que a diferença de temperatura de ebulição destas substâncias provavelmente permite sua separação por destilação fracionada, assim como é realizado comercialmente para a purificação do α -bisabolol obtido do óleo essencial da madeira de candeia.

Tabela 4.1 – Constituintes e rendimento dos óleos essenciais (%) da espécie *Siparuna guianensis* ao longo do ano.

Constituintes	IRR	2009				2010		
		Maio	Julho	Setembro	Novembro	Janeiro	Março	Maio
Monoterpenos Hidrocarbonetos		38.78	39.36	39.52	32.13	27.55	32.50	32.46
α -Pinenoleno	932	0.3±0.0	0.2±0.1	0.3±0.0	0.2±0.1	0.3±0.1	0.3±0.1	0.1±0.0
β -Miraceno	987	1.0±0.0	0.9±0.0	1.2±0.0	0.9±0.0	1.0±0.0	0.9±0.0	0.7±0.0
α -Felandreno	1001	1.9±0.0	1.7±0.0	1.9±0.0	1.6±0.0	1.3±0.0	1.5±0.0	1.4±0.0
δ -3-Careno	1009	1.3±0.0	1.2±0.0	1.3±0.0	1.2±0.0	1.1±0.0	1.1±0.0	0.9±0.0
α -Terpineno	1013	1.3±0.0	1.3±0.2	1.4±0.0	1.2±0.1	0.9±0.1	1.0±0.1	1.0±0.0
<i>p</i> -cimeno	1021	0.9±0.0	0.3±0.1	0.1±0.1	0.2±0.1	0.9±0.1	0.4±0.1	0.1±0.0
Limoneno	1027	0.9±0.9	1.3±0.1	1.3±0.0	1.1±0.5	0.9±0.3	1.3±0.3	0.8±0.0
γ -Terpineno	1058	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0	0.2±0.0
α-Terpinoleno	1064	30.8±0.4	32.0±0.1	31.6±0.1	25.6±0.2	20.8±0.2	25.5±0.2	27.2±0.8
<i>p</i> -menta-1,5,8-trieno	1115	0.1±0.2	0.2±0.1	0.1±0.0	-	0.2±0.1	0.2±0.1	-
Monoterpenos Oxigenados		0.70	0.96	0.43	0.68	2.14	1.27	0.44
<i>p</i> -Cimen-8-ol	1178	0.4±0.1	0.6±0.1	0.2±0.1	0.4±0.1	1.8±0.1	0.9±0.1	0.2±0.0
Safrol	1279	0.3±0.0	0.4±0.0	0.3±0.3	0.3±0.0	0.3±0.0	0.3±0.1	0.3±0.0
Sesquiterpenos Hidrocarbonetos		15.73	13.48	12.73	14.13	12.83	10.95	11.14
α -Cubebeno	1355	0.1±0.1	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0
(<i>Z</i>)-Cariofileno	1403	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.1	-	0.1±0.0	-
β -Gurjuneno	1427	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.0	0.1±0.1	0.1±0.0	0.1±0.0
β -Farneseno	1441	0.8±0.2	0.6±0.1	0.7±0.0	0.7±0.1	0.7±0.1	0.6±0.1	0.7±0.0
Germacreno D	1478	1.1±0.0	0.9±0.0	0.8±0.0	0.9±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0	0.8±0.0
Biciclogermacreno	1491	1.9±0.0	1.7±0.0	1.7±0.0	1.8±0.0	1.5±0.0	1.2±0.0	2.1±0.5
α -Muurolo	1495	1.1±0.2	1.0±0.2	0.8±0.0	1.2±0.2	1.0±0.2	0.8±0.1	1.6±0.0
α-Bisaboleno	1499	1.1±0.1	0.8±0.3	1.0±0.0	1.0±0.2	1.0±0.2	0.7±0.2	0.2±0.0
β-Bisaboleno	1502	4.5±0.0	3.9±0.3	3.6±0.1	4.0±0.2	3.8±0.2	3.2±0.2	2.4±0.4
γ-Bisaboleno	1529	4.9±0.0	4.3±0.2	3.9±0.1	4.3±0.1	3.8±0.2	3.4±0.1	3.2±0.0
Sesquiterpenos Oxigenados		42.49	43.15	44.64	49.94	54.30	51.19	53.63
(<i>Z</i>)-Nerolidol	1533	0.2±0.4	0.1±0.0	0.1±0.0	0.2±0.2	0.2±0.1	0.1±0.1	0.2±0.0
Espatuleno	1570	0.3±0.3	0.3±0.3	0.4±0.0	0.4±0.3	0.4±0.3	0.4±0.3	0.7±0.6
α -Muurolo	1642	0.5±0.1	0.6±0.2	0.5±0.0	0.6±0.1	0.6±0.2	0.6±0.1	0.8±0.4
α-Bisabolol	1682	41.5±0.2	42.1±0.5	43.6±0.1	48.8±0.3	53.1±0.4	50.1±0.3	52.0±0.2
Total		97,7	97,0	97,3	96,9	96,8	95,9	97,7
Rendimento (%)		5,2±0,4	6,2±0,6	4,5±0,8	4,5±0,8	4,9±1,0	5,7±0,8	7,0±0,2

Valentini *et al.* (2010a) também observaram a predominância de sesquiterpenos oxigenados durante todo o período de coleta (2007 – 2008) para plantas coletadas em Cuiabá – MT, entretanto o principal constituinte identificado pelos autores foi a siparunona (30 – 50%). Em amostras coletadas no Pará, Zoghbi *et al.* (1998) observaram altas concentrações de α -bisabolol (25,1%) e espatulenol (15,7%) (**Figura 4.3**). Além de monoterpenos e sesquiterpenos, Viana *et al.* (2002) também observaram alcoóis sesquiterpênicos e cetonas alifáticas nos óleos de plantas da Amazônia.

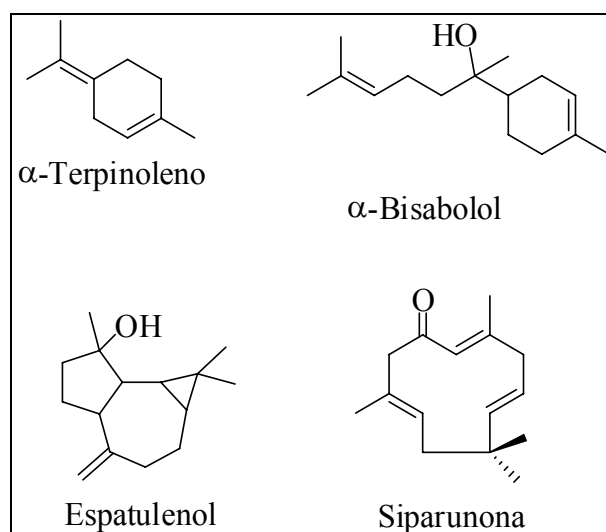


Figura 4.3 – Principais constituintes identificados no óleo essencial de *S. guianensis*: α -terpinoleno (20 – 30%) e α -bisabolol (40 – 50%) (este trabalho); α -bisabolol (25%) e espatulenol (16%) (Zoghbi *et al.*, 1998); e siparunona (30 – 50%) (Valentini *et al.*, 2010a)

Os resultados indicam que a espécie *Siparuna guianensis* apresenta variação do rendimento do óleo essencial em função da sua fenologia e das variações sazonais. Ainda, a comparação com outros estudos revela que a composição química pode variar dependendo do local de coleta. As diferenças e as interações entre os fatores genéticos, edáficos e climáticos podem ser responsáveis pela variada composição química observada. Portanto, estudos referentes à domesticação e estabelecimento dos tratos culturais, bem como a seleção de variedades adequadas a cada região constituem pontos prioritários para estudos da viabilidade de utilização desta espécie como produtora de óleo essencial.

4.4.2 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *S. guianensis*

Os valores dos halos de inibição das bactérias *E. coli*, *B. cereus* e *S. aureus*, pelo método de disco-difusão em Agar, para o óleo de *S. guianensis* e para o álcool sesquiterpênico α -bisabolol estão representados na **Tabela 4.2**. As zonas de inibição causadas tanto pelo óleo essencial quanto pelo sesquiterpeno foram superiores àquelas produzidas pelo antibiótico comercial cloranfenicol para todas as cepas de bactérias analisadas. Em geral, o composto α -bisabolol promoveu maiores zonas de inibição que o óleo essencial. Contudo, como já mencionado (**Cáp. 3**), as características físico-químicas que influenciam a difusão de cada substância podem influenciar também o tamanho das zonas de inibição (Duarte *et al.*, 2005; Nostro *et al.*, 2004).

Tabela 4.2 – Diâmetro das zonas de inibição do crescimento bacteriano para os óleos essenciais extraídos das folhas de *Siparuna guianensis* e α -bisabolol

Óleo Essencial / Constituinte	Diâmetro da zona de inibição (mm)*		
	Gram-negativa	Gram-positivas	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Siparuna guianensis</i>	42 B b	51 A a	45 B b
α -Bisabolol	52 A a	58 A a	52 A a
Controle (H ₂ O)	6 A d	6 A c	6 A d
Cloranfenicol 30 μ g	29 B c	29 B b	32 A c

* Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula nas linhas, e minúsculas nas colunas, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Embora o gênero *Siparuna* e a espécie *S. guianensis* sejam amplamente citados na literatura etnofarmacológica por suas diversas aplicações medicinais (Valentini *et al.*, 2010a, b), apenas as atividades antiplasmodial e leishmanicida de extratos das folhas de *S. aspera* e *S. radiata* (Céline *et al.*, 2009), e *S. andina*, *S. pauciflora* e *S. tonduzian* (Jenett-Siems *et al.*, 1999) foram experimentalmente verificadas, inclusive possibilitando o isolamento de alguns princípios ativos (Jenett-Siems *et al.*, 2000; Jenett-Siems *et al.*, 2003). Em relação à atividade antibacteriana, o presente trabalho possivelmente faz o primeiro relato da comprovação experimental deste efeito para os componentes de *S. guianensis*, o que dá sustentação científica a algumas aplicações etnofarmacológicas apontadas na literatura.

A atividade antibacteriana pode ser melhor visualizada na **Tabela 4.3**, onde os valores determinados para as concentrações inibitórias mínimas (CIM) estão representados. Os resultados demonstram que o óleo de *S. guianensis* e o padrão comercial de α -bisabolol inibiram o crescimento das cepas de bactérias testadas em concentrações expressivamente baixas (8 – 63 $\mu\text{g mL}^{-1}$), aproximadamente dez vezes menores que os óleos de Anacardiaceae e Verbenaceae. Os valores de CIM para o α -bisabolol foram superiores (2x) aos do óleo de *S. guianensis*, para as bactérias *E. coli* e *S. aureus*. Considerando que esse sesquiterpenóide seja o principal responsável pela atividade antibacteriana do óleo, estes resultados são coerentes com o fato de que o padrão comercial possui uma pureza de 96%, enquanto que a concentração de α -bisabolol no óleo testado é de 50% (março de 2010) (**Tabela 4.1**). Porém, para *B. cereus*, as CIM foram iguais, sugerindo a existência de algum tipo de interação sinérgica entre os componentes do óleo para essa bactéria. Portanto, a contribuição do α -terpinoleno (25%) e dos outros componentes minoritários presentes no óleo deve ser considerada. Entretanto, as contribuições relativas, bem como os mecanismos de ação de cada constituinte precisam ser experimentalmente avaliadas para que as discussões referentes aos efeitos sinérgicos possam ser melhor fundamentadas.

Tabela 4.3 – Concentração inibitória mínima (CIM) do crescimento bacteriano para o óleo essencial de *S. guianensis* e α -bisabolol

Óleo Essencial / Constituinte	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	Gram-negativa	Gram-positivas	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Siparuna guianensis</i>	63	8	31
α -Bisabolol	31	8	16

4.4.2.1 Peroxidação de Lipídeos em Células Bacterianas

Os resultados apresentados na **Tabela 4.4** indicam que o óleo e o sesquiterpeno α -bisabolol promoveram acúmulo de aldeído malônico (MDA) nas células bacterianas, indicando aumento da peroxidação de lipídeos. Os níveis de peroxidação foram semelhantes para o óleo e padrão de α -bisabolol, diferentes dos

observados para o óleo de *M. urundeuva* e o padrão de seu constituinte majoritário, δ -3-careno (**Cap. 3**). Enquanto δ -3-careno parece contribuir menos para a peroxidação causada pelo óleo de *M. urundeuva*, α -bisbolol parece promover uma grande parcela de todo o efeito pró-oxidante causado pelo óleo de *S. guianensis*.

Novamente, os resultados indicam que os danos pró-oxidantes que resultam na peroxidação de lipídeos estão provavelmente relacionados como os mecanismos de ação antibacteriana destes óleos essenciais.

Tabela 4.4 – Teores de MDA-TBA₂ em células bacterianas cultivadas em meio suplementado com a CIM para o óleo essencial de *S. guianensis* e α -bisabolol

Óleo Essencial / Constituinte	Concentração de MDA-TBA ₂ (nmol mg ⁻¹ Proteína)*		
	Gram-negativa	Gram-positivas	
	<i>Escherichia coli</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>
<i>Siparuna guianensis</i>	3,96 B a	4,12 B a	4,68 A a
α -bisabolol	4,83 A a	4,99 A a	5,13 A a
Controle	0,79 A b	1,11 A b	0,82 A b

* Médias seguidas pelas mesmas letras, maiúsculas nas linhas e minúsculas nas colunas, não são diferentes a 5% de probabilidade pelo teste de Scott-Knott

4.4.3 Atividade antifúngica do óleo essencial de *S. guianensis*

A atividade antifúngica foi determinada como a concentração inibitórias mínima (CIM) para os fungos *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trychophyton rubrum* e *Aspergillus fumigatus* e os valores obtidos estão representados na **Tabela 4.5**. Os resultados demonstram que o óleo de *S. guianensis* inibiu o crescimento das cepas de fungos estudados em concentrações reduzidas, principalmente para o fungo *Cryptococcus neoformans* (16 μ g mL⁻¹). Igualmente comentado para a atividade antimicrobiana (**p. 116**), a contribuição do α -terpinoleno (25%) e dos outros componentes minoritários presentes no óleo deve ser considerada. Da mesma forma, este é provavelmente o primeiro relato da atividade antifúngica experimentalmente comprovada para o óleo essencial de *S. guianensis*.

Todos estes fungos fitopatogênicos e responsáveis por grandes perdas em culturas e produtos armazenados, portanto os resultados também indicam o óleo essencial de *S. guianensis* como candidato interessante para avaliação de seu potencial como agroquímico natural.

Tabela 4.5 – Concentração inibitória mínima (CIM) do crescimento de fungos para o óleo essencial de *S. guianensis*

Óleo Essencial / Antifúngico	Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$)			
	<i>Candida albicans</i>	<i>Cryptococcus neoformans</i>	<i>Trychophyton rubrum</i>	<i>Aspergillus fumigatus</i>
<i>Siparuna guianensis</i>	250	16	125	125
Anfotericina – B	< 8	< 8	< 8	< 8

4.5 Conclusões

Conclui-se que o óleo essencial da espécie *Siparuna guianensis*, coletada em Tocantins – MG, apresenta constituição química bastante estável ao longo do ano. O mesmo pode ser concluído para o rendimento do óleo. Todavia, em função de sua fenologia, durante a época que precede a floração as plantas passam por uma desfolha natural drástica.

Além da atividade antimicrobiana observada para os fungos e bactérias estudados, o alto rendimento de óleo e o alto teor dos dois principais constituintes, α -terpinoleno e α -bisabolol, são fatores que candidatam esta espécie como uma promissora produtora de óleos essenciais de alto valor agregado no mercado.

4.6 Referências

- Adams, R. P., (1995). *Identification of Essential Oils by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy*. Carol Stream, IL: Allured Publi.
- Antônio, T.M. et al. Composition of essential oil from the leaves of *Siparuna guianensis* (Monimiaceae). **Chemical Industries**, v.14, p.514-5, 1984.
- ASAE, 2000. American Society of Agricultural Engineers; *Standards Engineering Practices Data, Moisture Measurement ASAE S358.2 DEC99*, Forages.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Analytical Biochem.* 72, 248-254.
- Castellani, D.C. Casali, V. W. D.; Souza, A. L.; Cecon, P. R.; Cardoso, C. A.; Marques, V. B. (2006). Produção do óleo essencial em catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss) e negramina (*Siparuna guianensis* Aubl.) em função da época de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.8, p.62-5, 2006.
- Céline, V; Pabon Adriana, Deharo Eric, Albán–Castillo Joaquina, Estevez Yannick, Lores Fransis Augusto, Rojas Rosario, Gamboa Dionicia, Sauvain Michel, Castillo Denis, Bourdy Geneviève. Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. *Journal of Ethnopharmacology* 123 (2009) 413–422
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Norma M 38-A. Método de referencia para testes de diluição em caldo para determinação da sensibilidade a terapia antifúngica dos fungos filamentosos: Norma aprovada. 2. ed. Pennsylvania/EUA. Edição Wayne, vol. 22, Nº. 16, 57 p. 2002a.
- CLSI - Clinical and Laboratory Standards Institute. Norma M27-A2. Método de referencia para testes de diluição em caldo para a determinação da sensibilidade de leveduras a terapia antifúngica: Norma aprovada. 2. ed. Pennsylvania/Estados Unidos: Edição Wayne, vol. 22, Nº. 15, 55 p. 2002b.
- De Souza, A.O; Pedrosa, M.T.; Alderete, J.B.; Cruz, A.F.; Prado, M.A.; Alves, R.B.; Silva, C.L. Cytotoxicity, antitumoral and antimycobacterial activity of tetrazole and oxadiazole derivatives. *Pharmazie*, **60**: 396-397. 2005.

- Duarte, M.C.T. Figueira, G.M., Sartoratto, A., Rehder, V.L.G., Delarmelina, C. 2005. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **J. Ethnopharmacol.** 97, 305-311.
- Duarte, T.G. **Um estudo etnoecológico sobre o uso de recursos vegetais em Nova Xavantina, Mato Grosso.** 2001. 135p. Dissertação (Mestrado - Área de Concentração Ecologia e Conservação da Biodiversidade) - Departamento de Botânica e Ecologia, Universidade Federal de Mato Grosso, Cuiabá.
- Grenand, P., Moretti C., Jacquemin, H., Prévost, M.F., 2004. Pharmacopées traditionnelles en Guyane. Créoles, Palikur, Wayãpi. Paris, IRD Editions. 816 pp.
- Jenett-Siems, K., Kraft, C., Siems, K., Jakupovic, J., Solis, P.N., Gupta, M.P., Bienzle, U., Sipaucins, A.C., 2003. Sesquiterpenoids from *Siparuna pauciflora*. *Phytochemistry* 63, 377–381.
- Jenett-Siems, K., Siems, K., Jakupovic, J., Solis, P.N., Gupta, M.P., Mockenhaupt, F.P., Bienzle, U., Eich, E., 2000. Sipandinolide: a butenolide including a novel type of carbon skeleton from *Siparuna andina*. *Planta Medica* 66, 384–385.
- Jenett-Siems, K.T., Mockenhaupt, F.P., Bienzle, U., Gupta, M.P., Eich, E., 1999. *In vitro* antiplasmodial activity of Central American medicinal plants. *Tropical Medicine and International Health* 4, 611–615.
- Milliken, W.; Albert, B. The use of medicinal plants by the Yanomamy Indians of Brazil. **Economic Botany**, v.50, n.1, p.10-25, 1996.
- NCCLS - National Committee for Clinical and Laboratory Standards. (2003a). Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard – Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- NCCLS - National Committee for Clinical and Laboratory Standards. (2003b). Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 [ISBN 1-56238-486-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.

- Nostro, A., Roccaro, A.S., Bisignano, G., Marino, A., Cannatelli, M.A., Pizzimenti, F.C., Cioni, P.L., Procopio, F., Blanco, A.R. (2004). Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms. **J. Medical Microbiol.** 56, 519-523.
- Palomino, J.C.; Martin, A.; Camacho, M.; Guerra, H.; Swings, J.; Portaels, F. Resazurin microtiter assay plate: simple and inexpensive method for detection of drug resistance in *Mycobacterium tuberculosis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **46**:2720-2722. 2002.
- Rebouças, L.M.C. **Terpenos de *Siparuna guianensis*: aldeídos via epoxidação de duplas terminais.** 1984. 116p. Dissertação (Mestrado em Química) – Faculdade de Química, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza.
- Renner, S.S.; Hausner, G. **Monograph of Siparunaceae:** Flora Neotropica 95. New York: New York Botanical Garden, 2005. 256p.
- Renner, SS, 1999. Circumscription and phylogeny of the Laurales: Evidence from molecular and morphological data. *Amer. J. Bot.* 86: 1301-1315.
- Rodrigues, V.E.G.; Carvalho, D.A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, v.25, n.1, p.102-23, 2001.
- Salustiano, V.C., Andrade, N.J., Soares, N.F.F., Lima, J.C., Bernardes, P.C., Luiz, L.M.P., Fernandes, P.E. 2009. Contamination of milk with *Bacillus cereus* by post-pasteurization surface exposure as evaluated by automated ribotyping. **Food Control.** 20, 439-442.
- Souza, V. C. e Lorenzi, H. 2005. Botânica Sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, Instituto Plantarum.
- Valentini, C. M. A., Silva, L. E., Maciel, E. N., Franceschini, E., Sousa Jr., P. T. e Dall'Oglio, E. L. (2010). Variação anual do rendimento e composição química dos componentes voláteis da *Siparuna guianensis* Aublet. *Quim. Nova.* 33, 1506-1509.

- Valentini, C.M.A. Rodríguez-Ortíz, C.E. e Coelho, M.F.B. *Siparuna guianensis* Aublet (negramina): uma revisão. *Rev. Bras. Pl. Med.* 12, 96-104.
- Viana, F.A. et al. Essential oil of *Siparuna guianensis* Aublet from the Amazon Region of Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v.14, p.60-2, 2002.
- Yoon, S. J., Park, J. E., Yang, J. H., & Park, J. W. (2002). *OxyR* Regulon Controls Lipid Peroxidation-mediated Oxidative Stress in *Escherichia coli*. *J. Biochem.Mol. Biol.* 35, 297-301.
- Zoghbi, M.G.B. et al. Essential Oils of *Siparuna guianensis* Aubl. **Journal of Essential Oil Research**, v.10, p.543-6, 1998.

5 Capítulo 5

ATIVIDADE FITOTÓXICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ANACARDIACEAE: PEROXIDAÇÃO DE LIPÍDEOS EM RADÍCULAS DE PEPINO E CEBOLA

RESUMO

Os óleos das espécies *A. fraxinifolium*, *M. urundeuva* e *S. terebinthifolius* apresentaram atividades fitotóxicas contra o crescimento inicial das radículas de sorgo e pepino. A ação fitotóxica do óleo de *M. urundeuva* pode estar relacionada com a alta concentração do monoterpeno δ -3-careno.

O acúmulo de aldeído malônico (MDA) nas radículas de pepino e cebola indicam que os óleos e o monoterpeno δ -3-careno promoveram aumento da peroxidação de lipídeos. Os níveis de peroxidação foram semelhantes para os óleos e o padrão de δ -3-careno nas radículas de pepino, porém, para radículas de cebola, os óleos essenciais apresentaram efeito superior ao monoterpeno.

ABSTRACT

The essential oils from *A. fraxinifolium*, *M. urundeuva* e *S. terebinthifolius* showed phytotoxic activity against the initial growth of radicles of cucumber and sorghum. The phytotoxic action of the oil of *M. urundeuva* may be related to the high concentration of monoterpene δ -3-carene.

The accumulation of malondialdehyde (MDA) in radicles of cucumber and onion oils indicate that monoterpene and δ -3-carene promoted increased lipid peroxidation. Peroxidation levels were similar for the oils and the pattern of δ -3-carene in the radicles of cucumber, but for onion root tips, essential oils showed a superior effect to monoterpene.

5.1 Atividade Fitotóxica de Óleos Essenciais

Como já mencionado, alguns óleos essenciais possuem a capacidade de inibir o crescimento de certas plantas e alguns de seus compostos foram, inclusive, modelos para produção de agroquímicos comerciais (**Cap. 1**) (Klink *et al.*, 1999; Mitchell *et al.*, 2001; Chaabaiane *et al.*, 2005; Romagni *et al.*, 2000a, b; Duke e Oliva, 2004). Componentes dos óleos essenciais como 1,8-cineol, α -terpineol e borneol são potentes inibidores de germinação e crescimento radicular em milho, soja, trigo, alfafa e pepino, causando a redução da atividade mitótica nestas plantas (Fischer, *et al.* 1994; Vaughn e Spencer, 1993).

Compostos derivados do cadineno apresentaram efeito inibidor da germinação e crescimento radicular em *Allium cepa*, *Raphanus sativus* e *Cucumis sativus* (Baruah *et al.*, 1994). Segundo Einhellig (1986), terpenos oxigenados apresentaram maior atividade inibidora do crescimento radicular que terpenos não oxigenados, e concluem que este fato pode estar relacionado à maior solubilidade dos primeiros em água.

Um ótimo trabalho foi realizado por Vokou *et al.* (2003), que avaliaram o efeito de 47 monoterpenos pertencentes a diversas classes sobre a germinação e crescimento de alface (*Latuca sativa*). Destes compostos, 24 monoterpenos oxigenados foram fortemente ativos, inibindo cerca de 85% do crescimento das radículas. Todavia, dentre os não oxigenados, o composto δ -3-careno foi o único ativo. Como exposto no **Capítulo 3**, este monoterpeno foi o principal constituinte identificado para o óleo essencial de *Myracrodruon urundeuva*, o que constitui uma das justificativas para o estudo da Fitotoxicidade dos óleos da família Anacardiaceae.

5.2 Atividade Fitotóxica de Anacardiaceae

Muitas espécies da família Anacardiaceae são consideradas invasoras de campos cultivados e pastagens, como por exemplo, a espécie *Schinus terebinthifolius* (Wheeler *et al.*, 2001). Esta planta é nativa da América do Sul e foi introduzida nos Estados Unidos por volta do ano de 1900, principalmente com fins ornamentais (Ewe e Sternberg, 2003). Devido a sua excelente capacidade de adaptação em algumas regiões, esta espécie se tornou predominante em extensas áreas de florestas, comprometendo as plantas locais. No sul da Flórida, por exemplo, em menos de 100 anos percorridos de sua introdução, *Schinus terebinthifolius* já ocupava uma área de aproximadamente 4.000 Km² (Medal *et al.*, 1999).

A atividade fitotóxica foi verificada para esta espécie contra plantas de pepino e alface (Barbosa *et al.*, 2007). Para a espécie *Schinus areira*, Scrivanti *et al.* (2003) observaram que seu óleo essencial e seu constituinte majoritário, α -pineno, foram ativos inibindo o crescimento de plântulas de milho.

Portanto, objetivou-se verificar a atividade fitotóxica dos óleos essenciais das Anacardiaceae *Astronium fraxinifolium* Schott ex Spreng., *Myracrodruon urundeuva* Allemão, e *Schinus terebinthifolius* Raddi e seus efeitos sobre a peroxidação de lipídeos em radículas de pepino e cebola.

5.3 *Experimental*

5.3.1 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais de *Astronium fraxinifolium* Schott ex Spreng., *Myracrodruon urundeuva* Allemão, e *Schinus terebinthifolius* Raddi, obtidos e analisados conforme detalhado no **Capítulo 3**, foram utilizados para os ensaios de fitotoxicidade e peroxidação de lipídeos como exposto adiante.

5.3.2 Avaliação da Atividade Fitotóxica

As atividades fitotóxicas dos óleos essenciais foram avaliadas pelas alterações no crescimento das radículas de pepino (*Cucumis sativus*) e cebola (*Allium cepa*) cultivadas em placas de Petri em câmara de germinação Marconi – MA 402, sob as seguintes condições: temperatura de $25 \pm 0,2$ °C; fotoperíodo de 24 h de luz; 20 sementes por placa; dois discos de papel de germinação por placa; volume final de solução de 4,0 mL.

Em um primeiro experimento, duas maneiras de aplicação dos óleos foram utilizadas. Uma delas consistiu da solubilização do cada óleo com o solvente diclorometano (DCM), nas concentrações adequadas, seguido de sua aplicação sobre os discos de papel de germinação. Após a completa evaporação do solvente, as placas receberam as sementes e 4,0 mL da solução de germinação, constituída de tampão MES (Merck) $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ a pH 6,5.

Outra maneira foi a formulação por meio da emulsificação com o surfactante Tween 80[®], sempre utilizando a solução de germinação (tampão MES $0,1 \text{ mol L}^{-1}$ pH 6,5). Para este procedimento, primeiramente foi determinada a menor concentração de surfactante necessária para total emulsificação dos óleos essenciais, numa concentração duas vezes maior que a utilizada nos tratamentos, na solução de germinação (**Tabela 5.1**). A influência das concentrações de 0,0; 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ de Tween 80[®] sobre o crescimento das radículas foi analisada (**Figura**

5.1). A concentração de 0,2 mg mL⁻¹ do surfactante Tween 80[®] foi selecionada para aplicação nos bioensaios.

Destas duas formas então, os óleos essenciais e o padrão comercial de α -bisabolol foram aplicados nas concentrações finais de 0,1 e 1,0 mg mL⁻¹. As plântulas de pepino foram cultivadas por 4 dias e as de cebola por 7 dias. Os comprimentos das radículas foram medidos e a diferença de crescimento de cada tratamento em relação ao controle foi expressa em porcentagem (DC%), calculada pela seguinte equação:

Eq. (1)

$$DC\% = \left(\frac{T - C}{C} \right) 100$$

onde T é o comprimento médio das radículas no tratamento e C é o comprimento médio das radículas no controle.

Em um segundo experimento, a influência do surfactante sobre o efeito fitotóxico do óleo essencial de *M. urundeuva* e de δ -3-careno foi analisada. As concentrações de 0,2; 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg mL⁻¹ de Tween 80[®] foram utilizadas, acrescidas de 1,0 mg mL⁻¹ do óleo e do monoterpeneo.

Os experimentos foram montados em delineamento inteiramente casualizado, com cinco repetições, e os resultados foram analisados pela ANAVA e teste de Scott-Knott a $P \leq 0,05$, utilizando o programa computacional GENES (*Genetics and Statistical Analysis* Versão 2007.0.0 – Universidade Federal de Viçosa).

5.3.3 Peroxidação de Lipídeos em Radículas

As radículas das plântulas cultivadas com os óleos e o α -bisabolol (a 0,1 e 1,0 mg mL⁻¹) emulsificados em Tween 80[®] foram utilizadas para a determinação da peroxidação de lipídeos, que foi detectada pelo ensaio de derivatização com ácido 3-tiobarbitúrico (TBA), o qual forma um aduto com o aldeído malônico (MDA).

Tecidos radiculares (0,2 g) foram homogeneizados em almofariz de porcelana com 2 mL de ácido tricloroacético (TCA) 1% e o material foi centrifugado a 12.000 g, por 15 min. Em seguida, alíquotas de 0,5 mL dos sobrenadantes foram adicionadas a tubos contendo 1,5 mL de solução de TBA 0,5%, preparado em TCA 10%. As amostras e o branco foram incubados a 90 °C, por 3 horas, com agitação ocasional. Logo após, os tubos foram transferidos para banho de gelo, por 5 minutos, seguindo-se de centrifugação a 12.000 g, por 10 min e a medida da absorbância do sobrenadante a 532 nm. A estimativa da quantidade do aduto MDA-TBA₂ foi obtida utilizando-se o coeficiente de absorvidade de 155 mM⁻¹ cm⁻¹. Os teores de MDA foram expressos em relação à massa de matéria fresca de material vegetal utilizado.

5.4 Resultados e Discussão

5.4.1 Crescimento Inicial das Radículas

A **Tabela 5.1** mostra que a concentração de 0,2 mg mL⁻¹ de Tween 80[®] foi adequada para emulsificar completamente os óleos essenciais estudados a uma concentração de 2,0 mg mL⁻¹. Para a realização dos experimentos, a maior concentração dos óleos utilizada foi de 1,0 mg mL⁻¹.

Tabela 5.1 – Concentrações de surfactante Tween 80[®] testadas para emulsificar os óleos essenciais de *Astronium fraxinifolium*, *Myracrodruon urundeuva* e *Schinus terebinthifolius* e o monoterpeneo δ-3-careno

Óleos Essenciais	Concentração de Tween 80 [®] (mg mL ⁻¹)*		
	0,1	0,2	0,3
<i>S. terebinthifolius</i>	+	+	+
<i>A. fraxinifolium</i>	-	+	+
<i>M. urundeuva</i>	-	+	+
δ-3-Careno	-	+	+

* + suficiente para emulsificar completamente o óleo a 2,0 mg mL⁻¹

* - insuficiente para emulsificar completamente o óleo a 2,0 mg mL⁻¹

Os resultados da influência da concentração de Tween 80[®] sobre as radículas estão representado na **Figura 5.1**. Embora apenas a concentração de 1,0 mg mL⁻¹ tenha sido estatisticamente diferente do controle para pepino e cebola, os dados sugerem que o aumento da concentração de surfactante, como era de se esperar, pode atingir níveis prejudiciais para o crescimento das plântulas, principalmente para cebola.

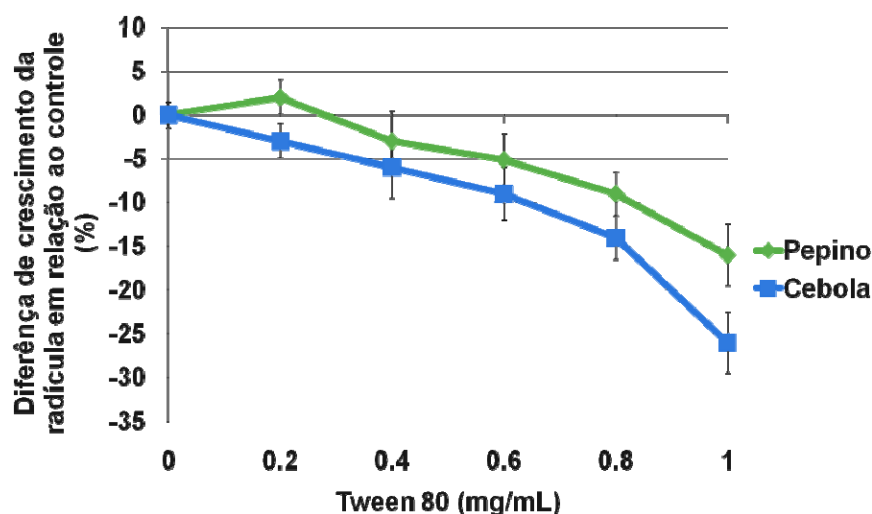


Figura 5.1 – Influência de concentrações crescentes de Tween 80[®] sobre o crescimento inicial das radículas de pepino e cebola

Os efeitos dos óleos essenciais sobre o crescimento inicial das radículas de pepino e cebola estão representados na **Tabela 5.2** e **Figura 5.2**. Observa-se que os óleos, aplicados sob ambas as maneiras, tiveram maior efeito sobre o crescimento das radículas de cebola que de pepino, dando indícios de uma maior seletividade contra monocotiledôneas. Observa-se também que a emulsificação com o surfactante promoveu aumento dos efeitos em relação á aplicação com o solvente evaporado, principalmente para a concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$.

A literatura traz relatos do efeito fitotóxico para óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, como *S. terebinthifolius* (Barbosa *et al.*, 2007). Em radículas de alface e pepino, os autores observaram de 20 – 30% de inibição para o óleo na concentração de $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$. O modo de aplicação utilizado pelos autores foi o de solubilização em diclorometano seguido de sua evaporação e os resultados foram comparáveis aos observados no presente trabalho. Pelo menos duas ponderações podem ser feitas em relação a este método. Primeira, durante a evaporação do solvente parte do óleo pode evaporar também, diminuindo sua concentração final e seu efeito. Segunda, o óleo hidrofóbico retido no papel de germinação, após a evaporação do solvente, estaria menos biodisponível no meio aquoso para afetar as radículas.

Tabela 5.2 – Comprimento médio (mm) das radículas de pepino e cebola após o cultivo com óleos essenciais das espécies *S. terebinthifolius*, *A. fraxinifolium* e *M. urundeuva* e δ -3-careno, aplicados com diclorometano (DCM) ou Tween 80[®]

Óleos / Planta Testada	Concentração do óleo (mg mL ⁻¹) e modo de aplicação*			
	DCM		Tween 80 [®]	
	0,1	1,0	0,1	1,0
Pepino				
<i>Schinus terebinthifolius</i>	26,4 B	24,7 B	24,9 B	19,3 D
<i>Astronium fraxinifolium</i>	25,8 B	23,5 B	25,1 B	21,3 C
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	27,1 A	24,3 B	27,5 A	22,5 C
δ -3-careno	24,1 B	24,5 B	24,1 B	24,8 B
Controle	29,6 A	29,6 A	30,8 A	30,8 A
Cebola				
<i>Schinus terebinthifolius</i>	25,2 c	23,3 c	23,0 c	11,9 e
<i>Astronium fraxinifolium</i>	27,1 b	22,8 c	26,2 b	15,8 d
<i>Myracrodruon urundeuva</i>	24,6 c	22,6 c	22,6 c	8,2 f
δ -3-careno	26,7 b	26,3 b	26,3 b	22,7 c
Controle	31,2 a	31,2 a	31,8 a	31,8 a

* DCM – solubilização em diclorometano, seguido de sua evaporação mais a adição de 4 mL de solução de germinação (Tampão MES 0,1 mol L⁻¹ pH 6,5)

* Tween – emulsificação com Tween 80[®] 0,2 mg mL⁻¹ em solução de germinação

* Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula para pepino e minúsculas para cebola, não diferem entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De modo geral, o óleo da espécie *A. fraxinifolium*, que apresentou como constituintes majoritários os monoterpenos hidrocarbonetos (*E*)- β -ocimeno (44%) e α -terpinoleno (15%), além de cerca de 6% do álcool tricíclico espatulenol (**Tabela 5.3**) foi o menos ativo para ambas as plantas (13 – 49% de inibição) (**Figura 5.2**). O óleo extraído da espécie *M. urundeuva*, que se caracterizou por uma alta concentração do monoterpeno δ -3-careno foi altamente ativo contra o crescimento da radícula de cebola (74% de inibição). Entretanto, a atividade do padrão comercial de δ -3-careno aplicado separadamente foi responsável por apenas uma parcela deste efeito (27% de inibição), indicando o possível sinergismo com os constituintes minoritários do óleo. Relembrando, o efeito fitotóxico deste constituinte foi observado por Vokou et al. (2003) para plântulas de alface. Dos 47 monoterpenos avaliados por estes autores, dentre os hidrocarbonetos, apenas o composto δ -3-careno foi ativo. Porém, até o momento, não se encontrou na literatura trabalhos acerca do

modo de ação desta substância como agente fitotóxico. Portanto, o estudo de seu mecanismo de ação se torna um foco interessante para estudos posteriores.

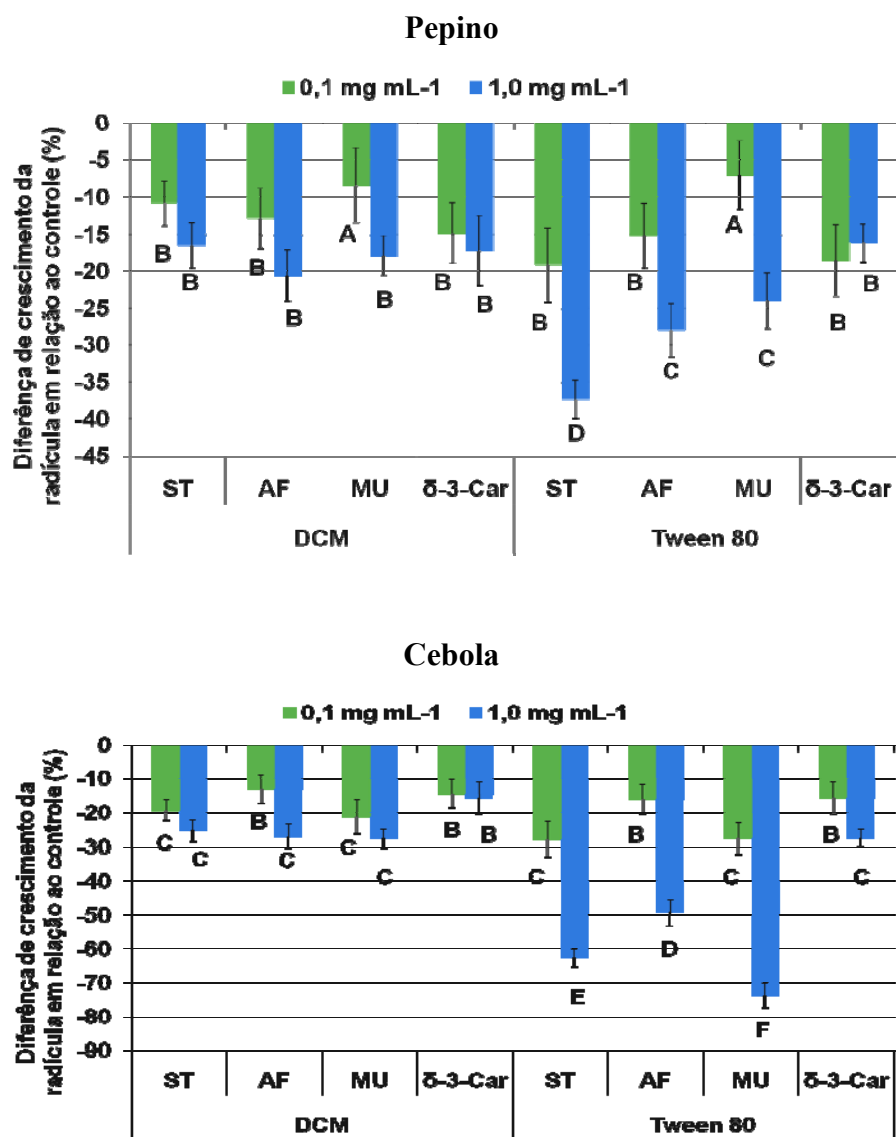


Figura 5.2 – Porcentagem da diferença de crescimento da radícula de pepino e cebola, em relação ao controle, cultivadas na presença dos óleos essenciais das folhas de *Schinus terebinthifolius* (ST), *Astronium fraxinifolium* (AF) e *Myracrodruon urundeuva* (MU) e o terpeno δ-3-cereno, solubilizados em solução de Tween 80[®] 0,2 mg mL⁻¹, ou em diclorometano (DCM) seguido da evaporação deste. Letras que rotulam as colunas referem-se ao teste de Scott-Knott expresso na **Tabela 5.2**

Tabela 5.3 – Constituintes e rendimento dos óleos essenciais (%) das espécies *Astronium fraxinifolium* (ASFR), *Myracrodruon urundeuva* (MYUR) e *Schinus terebinthifolius* (SCTB)

CONSTITUENT	IRR	SCTB	ASFR	MYUR
Monoterpenos Hidrocarbonetos		46,6	67,0	91,0
α -pineno	939	4,2 \pm 0,1	0,7 \pm 0,0	-
β -pineno	980	0,8 \pm 0,0	-	-
mirreno	991	0,8 \pm 0,0	1,9 \pm 0,1	4,2 \pm 0,3
δ -2-careno	1001	-	3,6 \pm 0,1	-
α -felandreno	1004	18,2 \pm 1,2	-	-
δ -3-careno	1011	-	-	78,8 \pm 1,7
ρ -cimeno	1026	3,3 \pm 0,2	-	-
Limoneno	1031	16,7 \pm 1,1	0,4 \pm 0,0	0,2 \pm 0,0
β -felandreno	1032	-	-	3,0 \pm 0,2
(Z)- β -ocimeno	1040	-	1,1 \pm 0,1	-
(E)- β -ocimeno	1050	2,6 \pm 0,1	44,1 \pm 0,8	-
α -terpinoleno	1089	-	15,2 \pm 0,9	4,8 \pm 0,6
Sesquiterpenos Hidrocarbonetos		35,4	19,0	8,1
δ -elemeno	1339	2,0 \pm 0,0	-	-
α -copaeno	1376	0,6 \pm 0,0	0,4 \pm 0,0	-
β -elemeno	1391	2,1 \pm 0,1	-	0,7 \pm 0,1
(E)-cariofileno	1418	2,7 \pm 0,2	-	1,1 \pm 0,1
Aromadendreno	1439	-	5,6 \pm 0,2	-
α -humuleno	1454	0,9 \pm 0,0	-	-
Aloaromadendreno	1461	-	0,5 \pm 0,0	-
β -camigreno	1475	-	-	0,5 \pm 0,0
Germacreno D	1480	21,0 \pm 1,2	1,4 \pm 0,1	-
β -selineno	1485	-	-	2,5 \pm 0,2
α -amorfenó	1485	-	0,5 \pm 0,1	-
viridifloreno	1493	-	9,0 \pm 0,4	3,0 \pm 0,2
α -muurolo	1499	0,9 \pm 0,0	-	-
germacreno A	1503	1,3 \pm 0,0	-	0,3 \pm 0,0
(E,E)- α -farneseno	1508	-	0,8 \pm 0,1	-
γ -cadineno	1513	0,7 \pm 0,0	0,8 \pm 0,0	-
δ -cadineno	1524	1,6 \pm 0,1	-	-
germacreno B	1556	1,6 \pm 0,0	-	-
Sesquiterpenos Oxigenados		15,5	11,6	-
Ledol	1565	-	0,5 \pm 0,0	-
espatulenol	1576	2,1 \pm 0,1	5,7 \pm 0,3	-
óxido de β -cariofileno	1581	2,6 \pm 0,1	-	-
Globulol	1583	-	3,2 \pm 0,1	-
Epiglobulol	1588	-	-	-
Viridiflorol	1590	2,5 \pm 0,2	2,2 \pm 0,1	-
δ -cadinol	1636	2,4 \pm 0,1	-	-
α -muurolol	1645	2,8 \pm 0,1	-	-
α -cadinol	1653	3,1 \pm 0,1	-	-
Outros		-	-	-
tetradecano	1399	-	-	-
ácido hexadecanóico	1984	-	-	-
Total		97,5	97,9	99,1
Rendimento (%)		0,7\pm0,1	0,7\pm0,1	0,6\pm0,0

Pela **Figura 5.3**, constata-se também que a concentração de surfactante pode ter efeito aditivo sobre a inibição causada pelos óleos, novamente, principalmente para cebola.

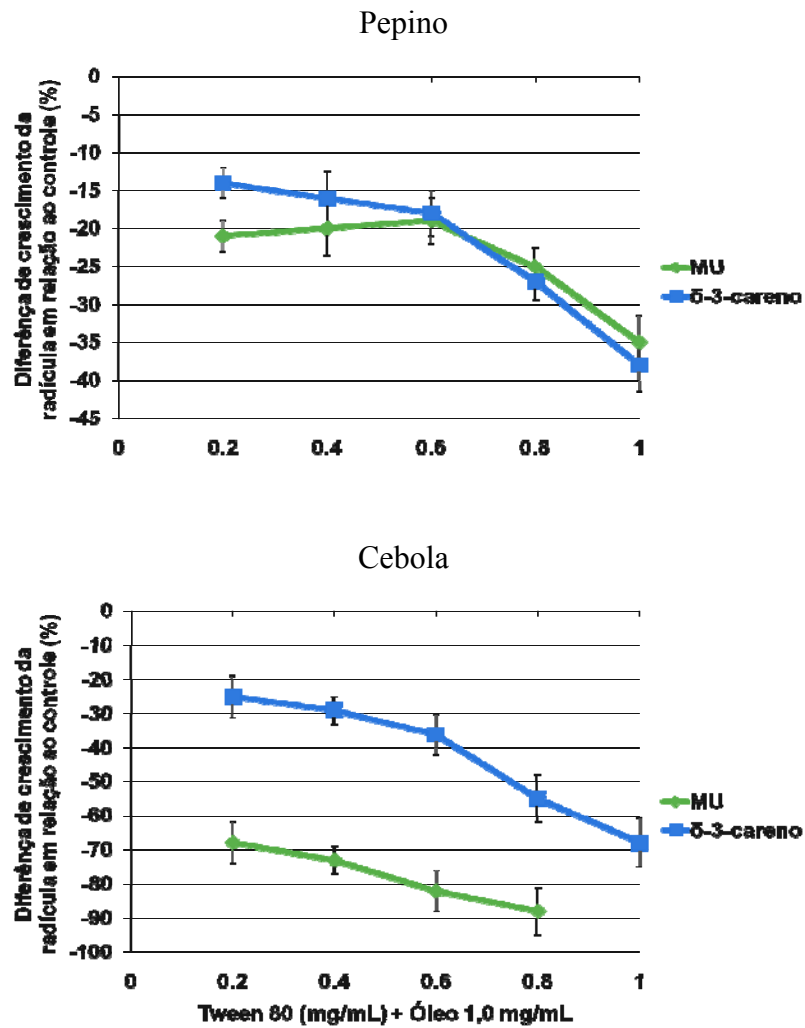


Figura 5.3 – Influência de concentrações crescentes de Tween 80[®] sobre o efeito fitotóxico do óleo essencial de *M. urundeuva* e δ -3-careno em radículas de pepino e cebola

Estes resultados não são surpreendentes, porém, fornecem pontos interessantes para ponderações referentes aos ensaios para triagem de compostos bioativos, principalmente compostos hidrofóbicos como terpenos. A solubilização com solvente orgânico, seguida se sua evaporação, pode resultar em dados subestimados, aumentando a probabilidade de resultados falso-negativos. Entretanto, a formulação das substâncias deve ser realizada com rigor e bom senso científico, pois os componentes da formulação podem influenciar positiva ou negativamente seus efeitos.

Especificamente para o presente caso, a presença de Tween 80[®], até a concentração de 0,6 mg mL⁻¹, não prejudica o crescimento das plântulas e a emulsificação dos óleos com este surfactante a 0,2 mg mL⁻¹ se mostrou adequada para a realização dos ensaios.

5.4.2 Peroxidação de Lipídeos em Radículas

A produção de aldeído malônico (MDA), em decorrência da peroxidação de lipídeos, tem sido utilizada como indicativo dos danos oxidativos sofridos pelos tecidos vegetais (Gutteridge & Halliwell, 1990). Os resultados apresentados na **Figura 5.4** indicam que os óleos e o monoterpene δ -3-careno promoveram acúmulo de aldeído malônico (MDA) nas radículas de pepino e cebola, indicando aumento da peroxidação de lipídeos. Os níveis de peroxidação foram semelhantes para os óleos e o padrão de δ -3-careno nas radículas de pepino, porém, para radículas de cebola, os óleos essenciais apresentaram efeito superior ao monoterpene. Todavia, os efeitos de todos os tratamentos foram mais expressivos para cebola que pepino, o que é condizente com os resultados observados para a inibição de crescimento.

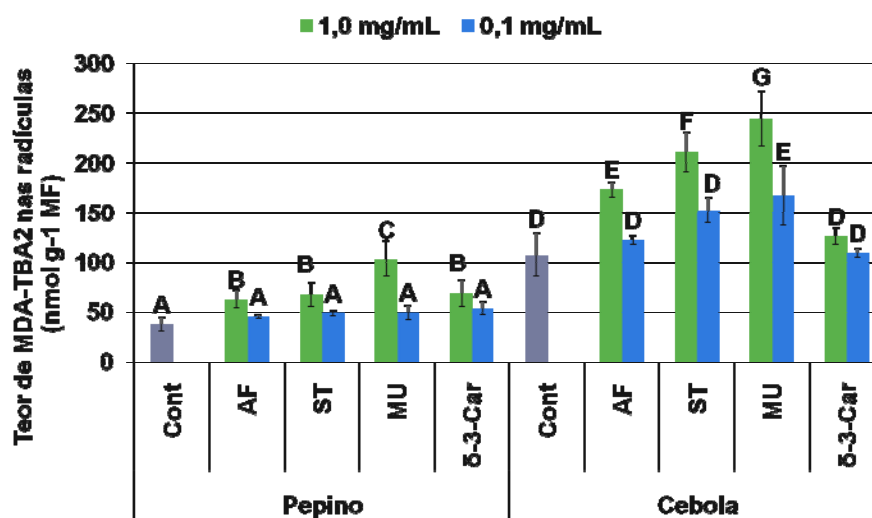


Figura 5.4 – Peroxidação de lipídeos em radículas de pepino e cebola cultivadas com os óleos essenciais de *A. fraxinifolium*, *S. terebinthifolius* e *M. urundeuva* e o monoterpene δ -3-careno

Scrivanti *et al.* (2003) observaram a atividade tóxica do óleo essencial da espécie *S. areira* sobre raízes de milho. Esses autores verificaram que o componente principal deste óleo, α -pineno, foi capaz de causar danos semelhantes ao óleo essencial. Também observaram uma correlação positiva entre a inibição do crescimento radicular e o nível de peroxidação de lipídeos nas raízes, indicando que o efeito tóxico pode estar relacionado aos danos oxidativos causados pelos componentes do óleo às membranas celulares.

δ -3-Careno e α -pineno possuem esqueletos carbônicos muito semelhantes, ambos derivados de uma segunda ciclização no esqueleto mentano (**Figura 5.5**). Esta ciclização, quando envolve quatro membros leva ao esqueleto pinano e com três membros leva ao esqueleto careno. É plausível de se especular que a presença dos anéis tensionados, bem como das insaturações, esteja relacionada com a reatividade e consequente atividade destes compostos.

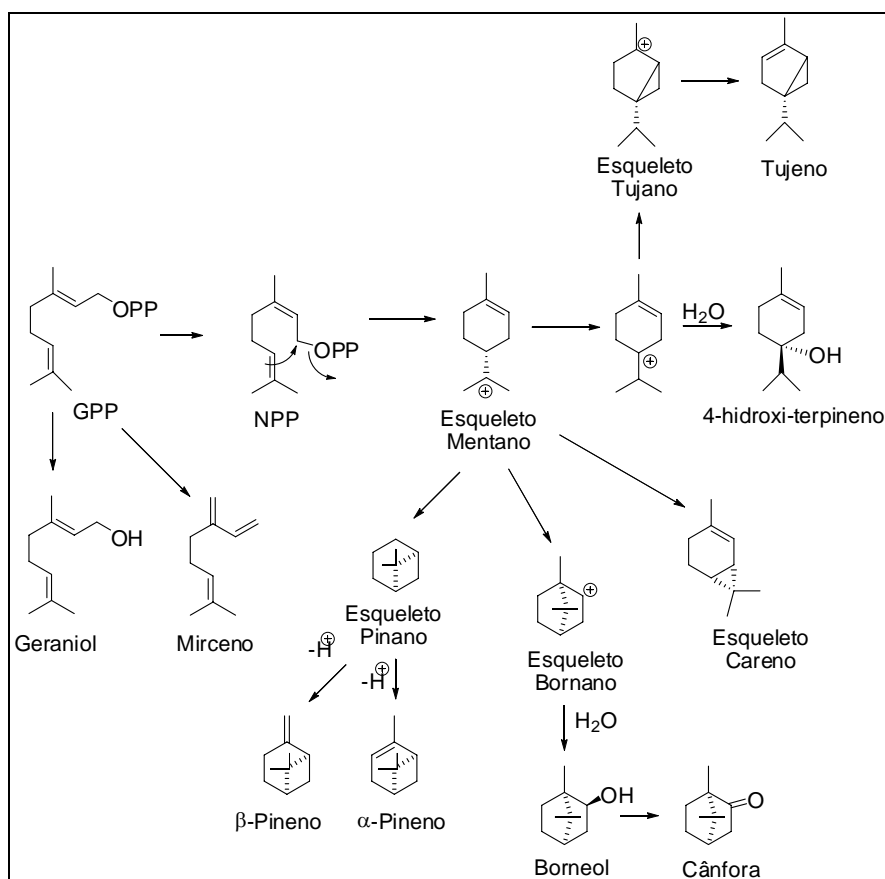


Figura 5.5 – Rotas biossintéticas dos principais esqueletos de monoterpênos (adaptado de Lobo e Lourenço, 2007)

Novamente, os resultados indicam que os danos pró-oxidantes que resultam na peroxidação de lipídeos estão provavelmente relacionados como os efeitos fitotóxicos destes óleos essenciais.

5.5 Conclusões

Os óleos essenciais de *Astronium fraxinifolium*, *Myracrodruon urundeuva* e *Schinus terebinthifolius* apresentam atividades fitotóxicas e constituem materiais interessantes para a pesquisa de modelos para agroquímicos.

Em adição, os danos pró-oxidantes causados nas radículas parece ser consequências das exposição aos óleos e pode desempenhar um papel importante no mecanismo de ação fitotóxica destes compostos naturais.

5.6 Referências

- Barbosa, L.C.A., Demuner, A.J., Clemente, A. D., Paula, V.F., Ismail, F.M.D. 2007. Seasonal variation in the composition of volatile oils from *schinus terebinthifolius* Raddi. **Quim. Nova.** 30 (8), 1959-1965.
- Baruah, N. C., Sarma, J. B., Sarma, S., Sharma R. P. Seed Germination and growth inhibitory cadinenes from *Eupatorium adenophorum* Spreng. Journal of Chemical Ecology, v. 20, n. 8, 1994.
- Chaabaiane, H., Cooper, J. F., Azouzi, L., and Coste, C. M. 2005, Influence of soil properties on the adsorption-desorption of sulcotrione and its hydrolysis metabolites on various soils. **J. Agric. Food Chem.**, 53, 4091-4095.
- Duke, S.O., Oliva, A. 2004. Mode of action of phytotoxic terpenoids. In: Macías, F.A., Galindo, J.C.G., Molinillo, J.M.G., Cutler, H.G. (Eds.). **Allelopathy - Chemistry and mode of action of allelochemicals**, CRC Press, Boca Raton, 201-216.
- Einhellig, F. A.; Schon, M. K.; Rasmussen, J. A. Synergistic effects of four cinnamic acid compounds on grain sorghum. Journal Plant Growth Regulators, 1 (4), P. 251 – 258, 1983.
- Ewe S. M. L. & Sternberg, L. de S. L., Seasonal gas exchange characteristics of *Schinus terebinthifolius* in a native and disturbed upland community in Everglades National Park, Florida. Forest Ecology and Management, 179, 27-36, 2003.
- Fischer, N. H., Williamson, G. B., Weidenhamer, J. D., Richardson, D. R. In search Vaughn, S. F., e Spencer, G. F. Volatile Monoterpenes as Potential Parent Structures for New Herbicides. Weed Science, v. 41, p. 114-119, 1993.
- Gutteridge, J. M. C. & Halliwell, B. The measurement and mechanism of lipid peroxidation in biological systems. **Trends in Biochemical Science.** 15, 129-135 p. 1990.
- Klink, J.V., Brophy, J.J., Perry, N.B., Weavers, R.T. 1999. **J. Nat. Prod.**, 62, 487-489.

- Lobo, A.M., Lourenço, A.M. (eds). 2007. **Biossístese de produtos naturais**. IST press, Lisboa, 272p.
- Medal, J. C., Vitorino, M. D., Habeck, D. H., Gilmore, J. L., Pedrosa, J. H. & Sousa, L. P., Host Specificity of *Heteroperreya hubrichi* Malaise (Hymenoptera: Pergidae), a Potential Biological Control Agent of Brazilian Peppertree (*Schinus terebinthifolius* Raddi). *Biological Control*, 14, 60-65, 1999.
- Mitchell, G., Bartlett, D.W., Fraser, T.E.M., Hawkes, T.R., Holt, D.C., Townson, J.K., Wichert, R.A. 2001. **Pest Manag. Sci.** 57, 120-128.
- Romagni, J. G., Duke, S. O., and Dayan, F. E. 2000b, *Plant Physiol.*, 123, 725-732.
- Romagni, J.G., Allen, S.N., Dayan, F.E. 2000a. **J. Chem. Ecol.**, 26, 303-313.
- Scrivanti, L.R., Zunino, M.P., Zygadlo, J.A. 2003. *Tagetes minuta* and *Schinus areira* essential oils as allelopathic agents. **Biochemical Systematics and Ecology**. 31, 563-572.
- Vokou, D., Douvli, P., Blionis, G.J., Halley, J.M. 2003. effects of monoterpenoids, acting alone or in pairs, on seed germination and subsequent seedling growth. **J. Chem. Ecol.** 29(10), 2281-2301.
- Wheeler, G. S., Massey L. M. & Endries, M., The Brazilian Peppertree Drupe Feeder *Megastigmus transvaalensis* (Hymenoptera: Torymidae): Florida Distribution and Impact. *Biological Control*, 22, 139-148, 2001.

Conclusões Gerais

Conclui-se que os óleos essenciais das espécies *Aloysia virgata*, *Lippia brasiliensis*, *Lippia* sp., *Lantana camara*, *Lantana trifolia* e *Lantana montevidensis*, coletadas em Minas Gerais, possuem constituição química variada e predominada por compostos sesquiterpênicos e apresentam atividades moderadas contra as bactérias Gram-positivas *B. cereus* e *S. aureus*. Apenas o óleo extraído das folhas da espécie *A. virgata* foi ativo contra a bactéria Gram-negativa *E. coli*.

Os óleos das espécies *A. humile* e *A. occidentale* não apresentaram atividade contra as bactérias estudadas. Os óleos das espécies *A. fraxinifolium*, *M. urundeuva* e *S. terebinthifolius* apresentaram atividades moderadas contra as cepas de bactérias utilizadas. Os óleos essenciais de *Astronium fraxinifolium*, *Myracrodruon urundeuva* e *Schinus terebinthifolius* apresentam atividades fitotóxicas, inibindo o crescimento inicial das radículas de pepino e cebola.

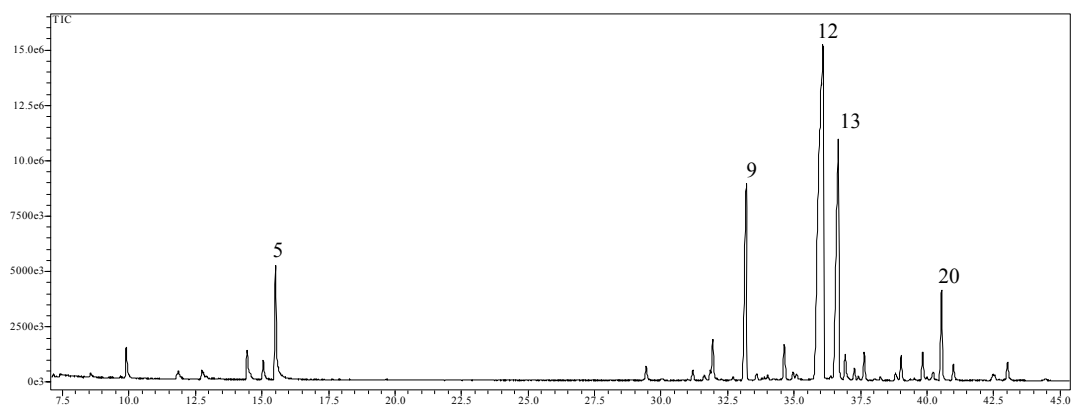
O óleo essencial da espécie *Siparuna guianensis*, coletada em Tocantins – MG, apresenta constituição química bastante estável ao longo do ano, sendo os constituintes α -terpinoleno e α -bisabolol os majoritários. O óleo essencial e o padrão comercial de α -bisabolol apresentam atividade contra as bactérias e fungos analisados em baixas concentrações.

Em adição, os danos pró-oxidantes causados nas células bacterianas e nas radículas testadas parecem ser consequências da exposição aos óleos e pode desempenhar um papel importante no mecanismo de ação antibacteriana e fitotóxica destes compostos naturais.

Os resultados indicam que os óleos da maioria dessas espécies apresentam características promissoras para a utilização como alternativas a desinfetantes e preservativos contra bactérias, ou como modelos para o desenvolvimento de agroquímicos, candidatando essas espécies como fontes promissoras de óleos essenciais de alto valor agregado no mercado.

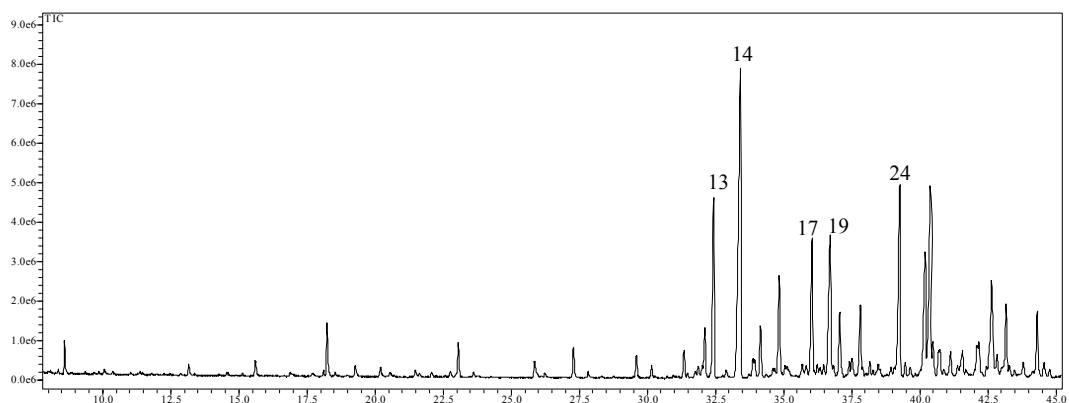
Apêndice

A.1 - Cromatograma do Óleo Essencial das Folhas de *Aloysia virgata*.



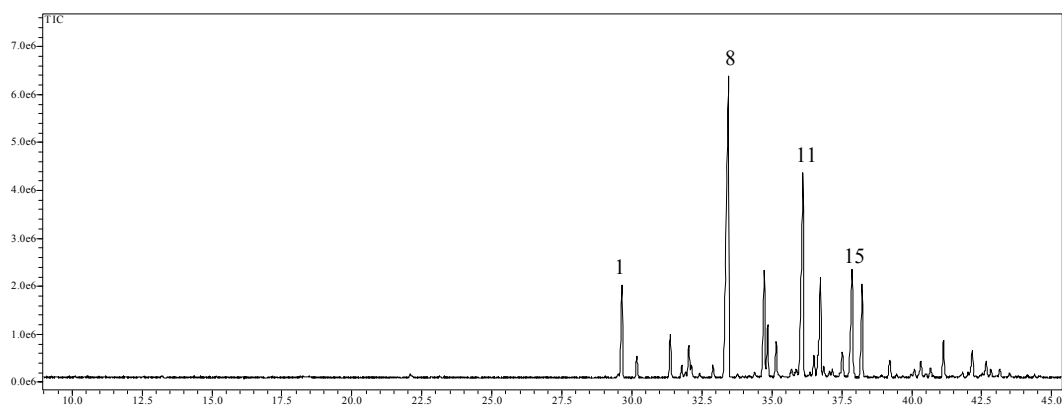
Constituintes	IRR	ALVG
1. α -pineno	939	1,2 \pm 0,0
2. sabinene	976	0,4 \pm 0,1
3. Limoneno	1031	1,4 \pm 0,1
4. (<i>Z</i>)- β -ocimeno	1040	0,8 \pm 0,2
5. (<i>E</i>)- β -ocimeno	1050	5,0 \pm 0,5
6. δ -elemeno	1339	0,7 \pm 0,1
7. α -copaeno	1376	0,4 \pm 0,0
8. β -elemeno	1391	1,8 \pm 0,1
9. (<i>E</i>)-cariofileno	1418	8,9 \pm 0,8
10. α -humuleno	1454	1,6 \pm 0,1
11. Alo-aromadendreno	1461	0,2 \pm 0,1
12. Germacreno D	1480	46,3 \pm 1,1
13. Bicyclogermacreno	1494	17,4 \pm 1,0
14. germacreno A	1503	1,1 \pm 0,3
15. γ -cadineno	1513	0,5 \pm 0,1
16. δ -cadineno	1524	1,3 \pm 0,3
17. germacreno B	1556	1,2 \pm 0,2
18. Elemol	1549	0,7 \pm 0,1
19. germacrena D-4-ol	1574	1,2 \pm 0,2
20. Viridiflorol	1590	4,2 \pm 0,3
21. α -cadinol	1653	0,7 \pm 0,1
Total		97,0
Rendimento (%)		0,4\pm0,0

A.2 - Cromatograma do Óleo Essencial das Folhas de *Lippia* sp.



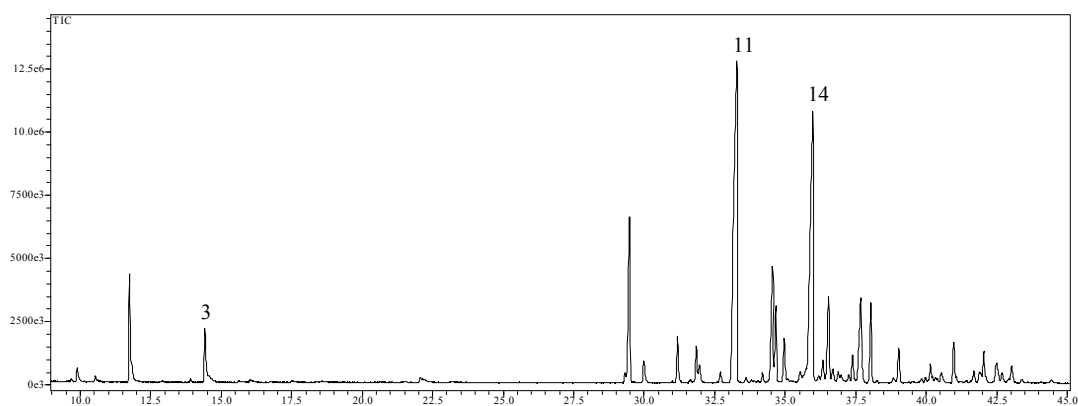
	Constituintes	IRR	LPSP
1.	nonano	899	1,1±0,2
2.	decano	999	0,5±0,1
3.	(<i>E</i>)-β-ocimeno	1050	0,5±0,2
4.	Linalol	1098	1,4±0,3
5.	dodecano	1199	1,0±0,2
6.	piperitona	1252	0,4±0,2
7.	acetato de bornila	1285	1,1±0,3
8.	δ-elemeno	1339	0,6±0,1
9.	α-cubebeno	1351	0,2±0,1
10.	α-copaeno	1376	0,6±0,2
11.	β-cubebeno	1390	0,3±0,2
12.	β-elemeno	1391	1,3±0,6
13.	tetradecano	1399	6,3±0,4
14.	(<i>E</i>)-cariofileno	1418	16,8±1,2
15.	Aromadendreno	1439	1,0±0,5
16.	α-guaieno	1439	1,5±0,3
17.	Germacreno D	1480	4,6±0,7
18.	β-selineno	1485	0,8±0,4
19.	Biciclogermacreno	1494	7,1±1,5
20.	α-muuroleno	1499	0,5±0,3
21.	germacreno A	1503	2,9±0,6
22.	γ-cadineno	1513	0,4±0,2
23.	δ-cadineno	1524	2,8±0,9
24.	germacreno B	1556	6,9±1,1
25.	(<i>E</i>)-β-damascenona	1380	0,3±0,1
26.	geranil-acetona	1453	5,0±1,3
27.	(<i>E</i>)-nerolidol	1564	0,4±0,2
28.	Espatulenol	1576	6,4±0,7
29.	óxido de β-cariofileno	1581	8,1±0,7
30.	Viridiflorol	1590	1,4±0,2
31.	hexadecano	1599	1,6±0,3
32.	α-muurolol	1645	5,3±0,5
33.	α-cadinol	1653	2,9±0,9
34.	α-bisabolol	1653	3,1±0,2
	Total		95,1
	Rendimento (%)		0,04±0,0

A.3 - Cromatograma do Óleo Essencial das Folhas de *Lippia brasiliensis*.



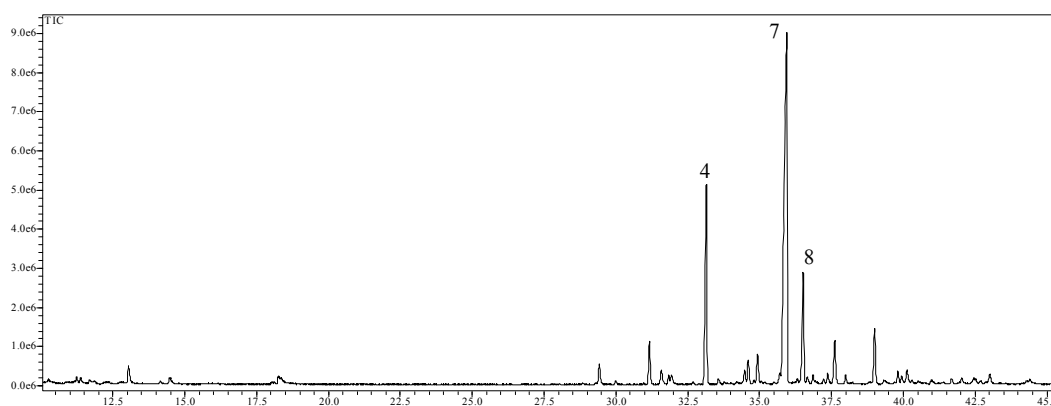
Constituintes	IRR	Folhas
1. δ -elemeno	1339	3,6 \pm 0,0
2. α -cubebeno	1351	1,4 \pm 0,0
3. α -copaeno	1376	2,7 \pm 0,1
4. β -bourboneno	1384	0,5 \pm 0,0
5. β -cubebeno	1390	1,7 \pm 0,1
6. β -elemeno	1391	0,8 \pm 0,0
7. α -gurjuneno	1409	0,7 \pm 0,0
8. (<i>E</i>)-cariofileno	1418	30,7 \pm 1,3
9. α -humuleno	1454	2,8 \pm 0,1
10. Alo-aromadendreno	1461	1,7 \pm 0,1
11. Germacreno D	1480	13,9 \pm 0,8
12. Bicyclgermacreno	1494	4,2 \pm 0,1
13. α -muuroleno	1499	0,5 \pm 0,0
14. γ -cadineno	1513	1,1 \pm 0,0
15. (<i>Z</i>)-calameneno	1521	6,1 \pm 0,1
16. δ -cadineno	1524	1,0 \pm 0,0
17. 1,2,3,4,4 α ,7-hexahidro-4-isopropil-1,6-dimetil naftaleno	1532	4,1 \pm 0,1
18. germacreno B	1556	1,2 \pm 0,1
19. óxido de β -cariofileno	1581	1,2 \pm 0,0
20. Viridiflorol	1590	2,6 \pm 0,1
21. α -muurolol	1645	3,9 \pm 0,1
22. α -cadinol	1653	5,9 \pm 0,4
23. ni*	1454	5,8 \pm 0,2
Total		98,1
Rendimento (%)		0,3\pm0,1

A.4 - Cromatograma do Óleo Essencial das Flores de *Lippia brasiliensis*.



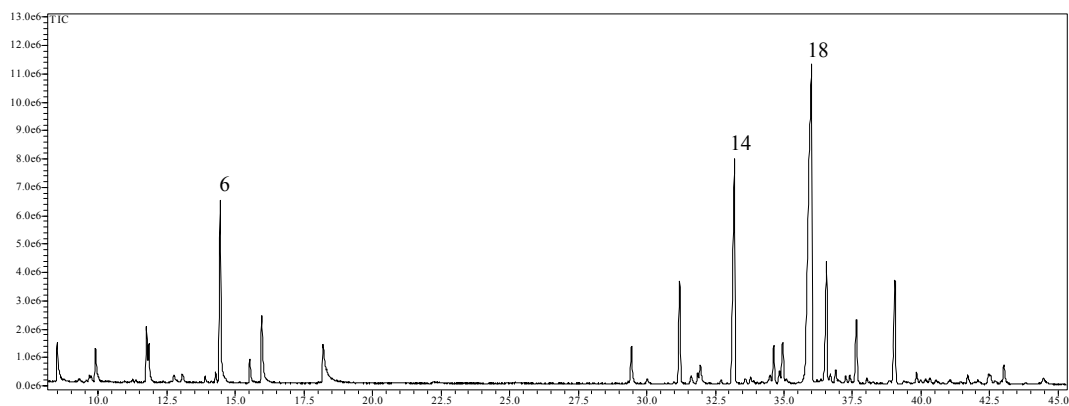
Constituintes		IRR	Flores
1.	α -pineno	939	3,1 \pm 0,0
2.	sabinene	976	2,6 \pm 0,1
3.	Limoneno	1031	4,2 \pm 0,1
4.	Linalol	1098	3,4 \pm 0,2
5.	Terpinen-4-ol	1177	2,4 \pm 0,1
6.	δ -elemeno	1339	2,0 \pm 0,0
7.	α -cubebeno	1351	0,8 \pm 0,0
8.	α -copaeno	1376	1,3 \pm 0,0
9.	β -cubebeno	1390	0,8 \pm 0,0
10.	β -elemeno	1391	1,1 \pm 0,0
11.	(<i>E</i>)-cariofileno	1418	24,3 \pm 2,1
12.	α -humuleno	1454	2,5 \pm 0,1
13.	Alo-aromadendreno	1461	1,2 \pm 0,1
14.	Germacreno D	1480	11,9 \pm 0,6
15.	Biciclogermacreno	1494	3,2 \pm 0,1
16.	γ -cadineno	1513	0,5 \pm 0,0
17.	(<i>Z</i>)-calameneno	1521	5,6 \pm 0,1
18.	1,2,3,4,4 α ,7-hexahidro-4-isopropil-1,6-dimetil naftaleno	1532	3,1 \pm 0,1
19.	germacreno B	1556	0,9 \pm 0,0
20.	óxido de β -cariofileno	1581	0,9 \pm 0,0
21.	Viridiflorol	1590	2,1 \pm 0,1
22.	α -muurolol	1645	3,4 \pm 0,2
23.	α -cadinol	1653	5,6 \pm 0,3
24.	oct-1-en-3-ol	978	2,1 \pm 0,1
25.	ni*	1454	7,4 \pm 0,3
Total			96,4
Rendimento (%)			0,7\pm0,1

A.5 - Cromatograma do Óleo Essencial das Folhas de *Lantana camara*.



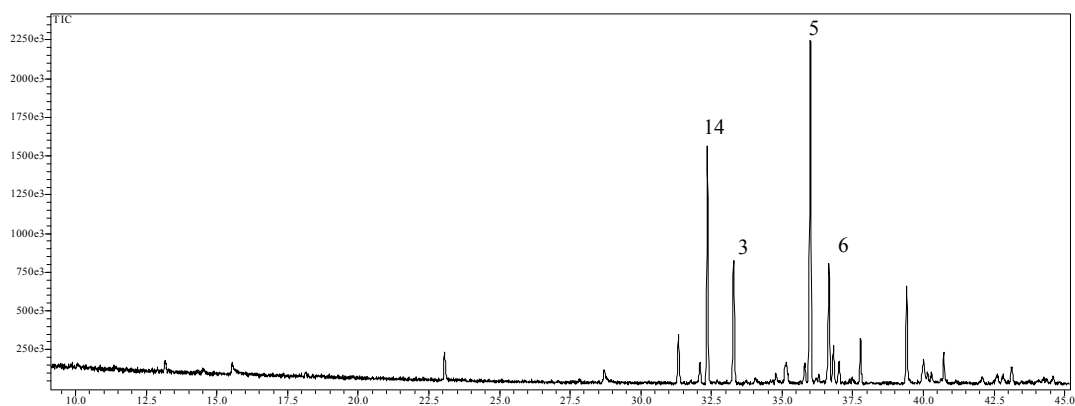
Constituintes	IRR	Folhas
1. δ -elemeno	1339	1,5 \pm 0,2
2. α -copaeno	1376	3,3 \pm 0,1
3. β -bourboneno	1384	1,1 \pm 0,2
4. (<i>E</i>)-cariofileno	1418	17,0 \pm 1,1
5. α -humuleno	1454	1,7 \pm 0,2
6. Alo-aromadendreno	1461	2,3 \pm 0,3
7. Germacreno D	1480	46,1 \pm 1,4
8. Bicyclgermacreno	1494	8,5 \pm 0,7
9. γ -cadineno	1513	1,7 \pm 0,2
10. δ -cadineno	1524	3,6 \pm 0,3
11. germacreno B	1556	4,2 \pm 0,5
12. germacrena D-4-ol	1574	0,7 \pm 0,1
13. óxido de β -cariofileno	1581	0,8 \pm 0,1
Total		92,5
Rendimento (%)		0,3\pm0,1

A.6 - Cromatograma do Óleo Essencial das Flores de *Lantana camara*.



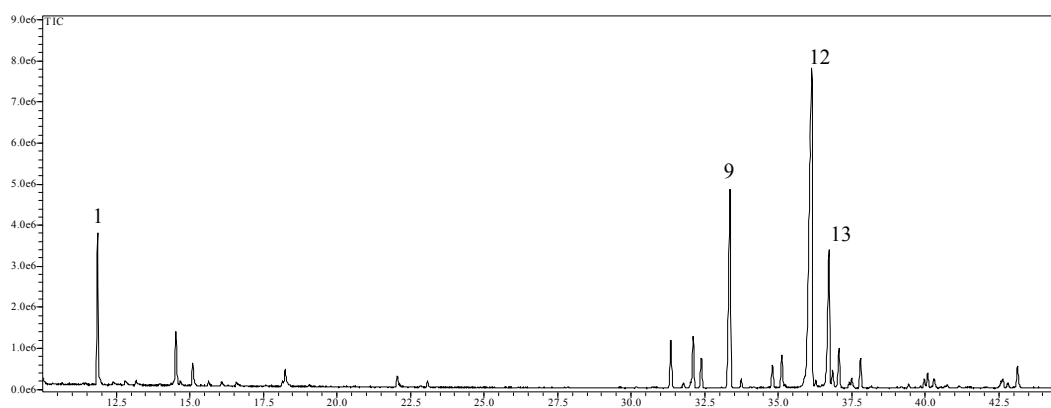
Constituintes	IRR	Flores
1. α -tujeno	931	0,5 \pm 0,1
2. α -pineno	939	1,5 \pm 0,2
3. sabinene	976	2,2 \pm 0,3
4. β -pineno	980	1,4 \pm 0,2
5. ρ -cimeno	1026	0,3 \pm 0,0
6. Limoneno	1031	7,8 \pm 0,4
7. (<i>E</i>)- β -ocimeno	1050	0,9 \pm 0,1
8. γ -terpineno	1062	3,2 \pm 0,2
9. Linalol	1098	1,8 \pm 0,1
10. δ -elemeno	1339	1,8 \pm 0,2
11. α -copaeno	1376	4,7 \pm 0,3
12. β -bourboneno	1384	0,3 \pm 0,1
13. β -elemeno	1391	0,8 \pm 0,2
14. (<i>E</i>)-cariofileno	1418	13,6 \pm 0,9
15. α -humuleno	1454	1,6 \pm 0,2
16. (<i>E</i>)- β -farneseno	1458	0,5 \pm 0,1
17. Alo-aromadendreno	1461	1,9 \pm 0,2
18. Germacreno D	1480	32,4 \pm 1,6
19. Biciclogermacreno	1494	5,8 \pm 0,6
20. α -muurolo	1499	0,4 \pm 0,1
21. germacreno A	1503	0,5 \pm 0,2
22. γ -cadineno	1513	0,4 \pm 0,0
23. δ -cadineno	1524	3,3 \pm 0,1
24. germacreno B	1556	5,0 \pm 0,4
25. germacrena D-4-ol	1574	0,5 \pm 0,1
26. α -cadinol	1653	0,8 \pm 0,2
27. nonano	899	1,6 \pm 0,2
Total		95,5
Rendimento (%)		0,6\pm0,1

A.7 - Cromatograma do Óleo Essencial das Folhas de *Lantana trifolia*.



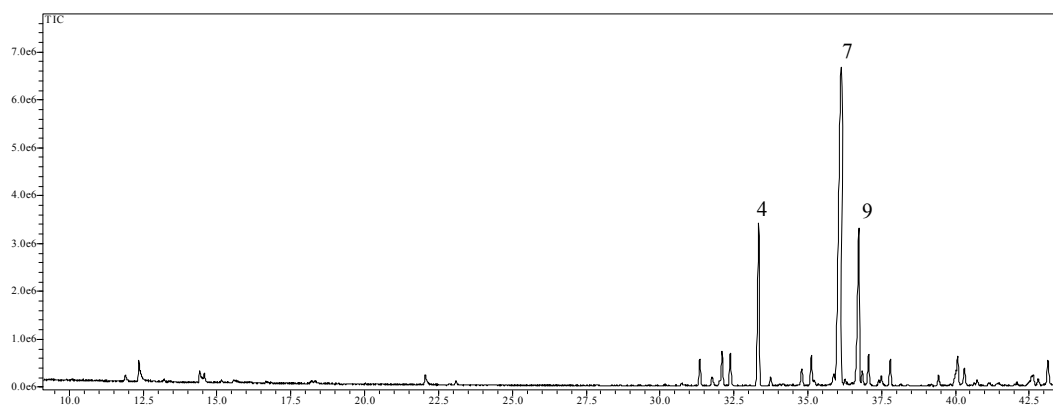
Constituintes	IRR	Folhas
1. α -copaeno	1376	3,8 \pm 0,3
2. β -elemeno	1391	1,4 \pm 0,1
3. (<i>E</i>)-cariofileno	1418	10,2 \pm 1,2
4. Alo-aromadendreno	1461	2,4 \pm 0,2
5. Germacreno D	1480	29,5 \pm 1,4
6. Bicyclogermacreno	1494	9,1 \pm 0,3
7. α -muuroleno	1499	2,5 \pm 0,1
8. germacreno A	1503	1,8 \pm 0,1
9. δ -cadineno	1524	3,6 \pm 0,2
10. (<i>E</i>)-nerolidol	1564	5,3 \pm 0,4
11. óxido de β -cariofileno	1581	2,3 \pm 0,1
12. α -cadinol	1653	1,1 \pm 0,0
13. dodecano	1199	2,1 \pm 0,1
14. tetradecano	1399	17,5 \pm 1,3
15. hexadecano	1599	1,8 \pm 0,1
Total		92,3
Rendimento (%)		0,2\pm0,0

A.8- Cromatograma do Óleo Essencial das Flores de *Lantana trifolia*.



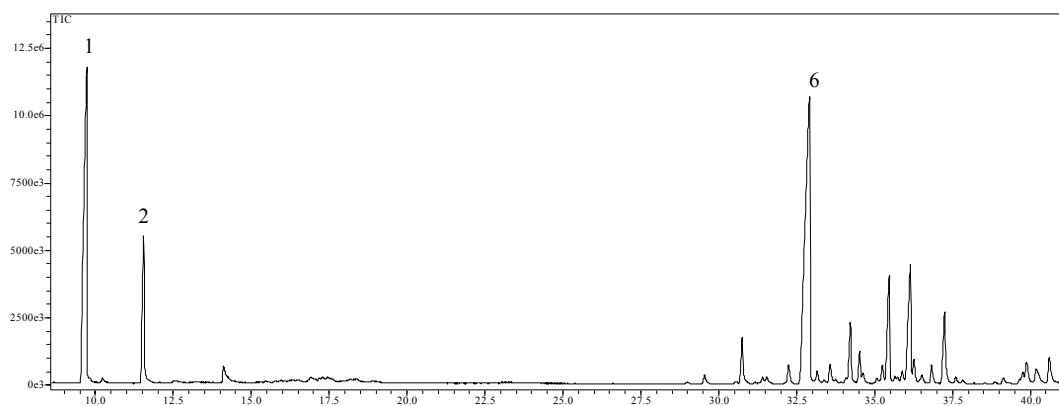
Constituintes		IRR	LTMT Flores
1.	sabinene	976	7,9±0,6
2.	β-pineno	980	0,2±0,0
3.	Limoneno	1031	2,8±0,2
4.	(Z)-β-ocimeno	1040	1,4±0,1
5.	Linalol	1098	0,8±0,0
6.	Terpinen-4-ol	1177	0,6±0,1
7.	α-copaeno	1376	3,0±0,2
8.	β-elemeno	1391	2,9±0,2
9.	(E)-cariofileno	1418	16,1±0,7
10.	α-humuleno	1454	1,5±0,1
11.	Alo-aromadendreno	1461	1,9±0,2
12.	Germacreno D	1480	38,1±1,2
13.	Biciclogermacreno	1494	11,0±0,6
14.	α-muuroлено	1499	1,0±0,1
15.	germacreno A	1503	2,5±0,2
16.	δ-cadineno	1524	1,9±0,1
17.	germacrena D-4-ol	1574	0,6±0,1
18.	Espatuleno	1576	0,9±0,0
19.	α-cadinol	1653	1,3±0,3
20.	tetradecano	1399	1,8±0,1
Total			98,2
Rendimento (%)			0,7±0,1

A.9- Cromatograma do Óleo Essencial das Folhas de *Lantana montevidensis*.



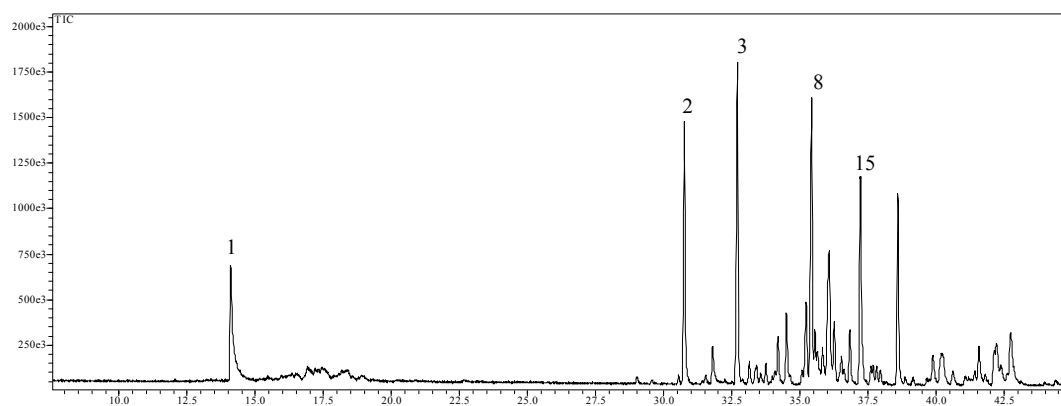
Constituintes	IRR	LTMT
		Folhas
1. α -copaeno	1376	1,3 \pm 0,2
2. β -bourboneno	1384	0,8 \pm 0,1
3. β -elemeno	1391	1,8 \pm 0,3
4. (<i>E</i>)-cariofileno	1418	9,2 \pm 1,2
5. α -humuleno	1454	1,3 \pm 0,1
6. Alo-aromadendreno	1461	2,1 \pm 0,5
7. Germacreno D	1480	42,7 \pm 1,2
8. valeceno	1491	0,7 \pm 0,1
9. Bicyclgermacreno	1494	16,1 \pm 0,9
10. α -muuroleno	1499	1,0 \pm 0,2
11. germacreno A	1503	1,7 \pm 0,3
12. δ -cadineno	1524	2,0 \pm 0,2
13. (<i>E</i>)-nerolidol	1564	6,1 \pm 0,5
14. Espatulenol	1576	3,2 \pm 0,4
15. óxido de β -cariofileno	1581	1,7 \pm 0,3
16. α -muurolol	1645	1,8 \pm 0,1
17. α -cadinol	1653	1,5 \pm 0,1
18. tetradecano	1399	2,4 \pm 0,4
Total		97,4
Rendimento (%)		0,3\pm0,1

A.10- Cromatograma do Óleo Essencial das Folhas de *Anacardium humile*.



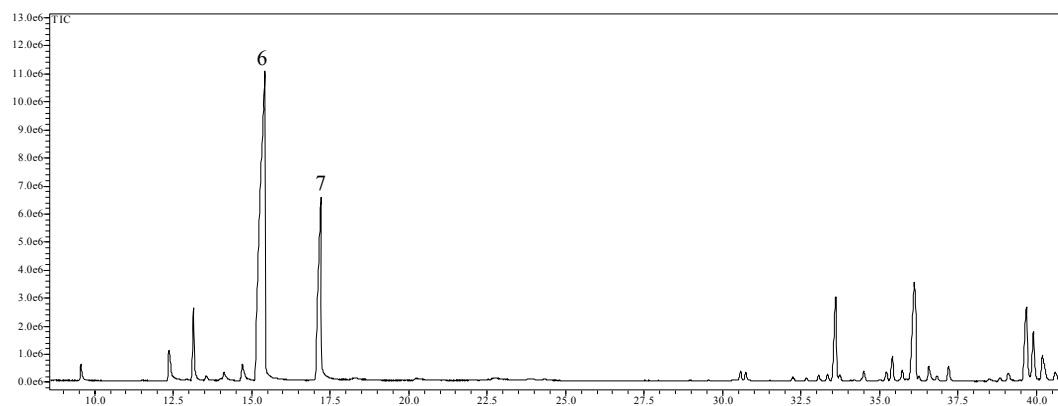
	Constituintes	IRR	ANHM
1.	α -pineno	939	22,0 \pm 0,9
2.	β -pineno	980	6,6 \pm 1,3
3.	Limoneno	1031	1,3 \pm 0,1
4.	α -copaeno	1376	2,5 \pm 0,3
5.	α -gurjuneno	1409	1,0 \pm 0,2
6.	(<i>E</i>)-cariofileno	1418	31,0 \pm 1,8
7.	Aromadendreno	1439	1,1 \pm 0,4
8.	α -humuleno	1454	2,9 \pm 0,3
9.	Aloaromadendreno	1461	1,4 \pm 0,2
10.	Germacreno D	1480	5,9 \pm 1,7
11.	β -selineno	1485	0,7 \pm 0,0
12.	Biciclogermacreno	1494	7,6 \pm 1,2
13.	α -muuroleno	1499	1,2 \pm 0,4
14.	germacreno A	1503	0,6 \pm 0,1
15.	γ -cadineno	1513	0,9 \pm 0,2
16.	δ -cadineno	1524	4,1 \pm 0,2
17.	óxido de β -cariofileno	1581	0,6 \pm 0,0
18.	Globulol	1583	1,4 \pm 0,4
19.	Epiglobulol	1588	1,8 \pm 0,2
20.	Viridiflorol	1590	1,4 \pm 0,3
21.	α -cadinol	1653	1,1 \pm 0,2
	Total		97,7
	Rendimento (%)		0,3\pm0,0

A.11 – Cromatograma do Óleo Essencial das Folhas de *Anacardium occidentale*.



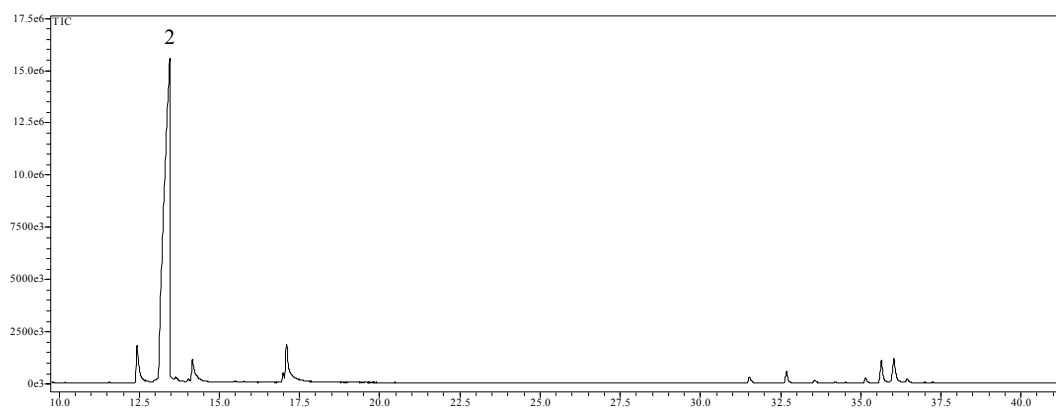
Constituintes	IRR	ANOC
1. Limoneno	1031	4,7±0,3
2. α -copaeno	1376	10,3±0,9
3. (<i>E</i>)-cariofileno	1418	15,4±1,5
4. Aromadendreno	1439	1,1±0,2
5. α -humuleno	1454	1,5±0,1
6. Aloaromadendreno	1461	2,5±0,7
7. β -camigreno	1475	1,0±0,2
8. Germacreno D	1480	11,5±1,2
9. β -selineno	1485	1,9±0,3
10. α -amorfeno	1485	3,0±0,2
11. Bicyclogermacreno	1494	8,2±0,5
12. δ -selineno	1495	1,7±0,2
13. α -muuroleno	1499	2,3±0,1
14. γ -cadineno	1513	2,0±0,1
15. δ -cadineno	1524	9,3±0,7
16. germacreno B	1556	7,3±1,1
17. δ -cadinol	1636	1,5±0,1
18. α -cadinol	1653	2,3±0,2
19. tetradecano	1399	1,7±0,1
20. ácido hexadecanóico	1984	7,2±1,3
Total		96,3
Rendimento (%)		0,3±0,0

A.12 – Cromatograma do Óleo Essencial das Folhas de *Astronium fraxinifolium*.



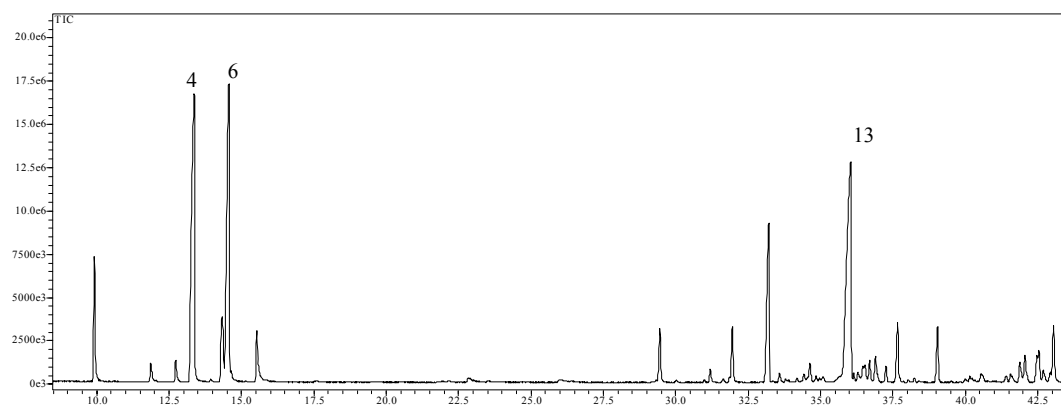
	Constituintes	IRR	ASFR
1.	α -pineno	939	0,7 \pm 0,0
2.	mirreno	991	1,9 \pm 0,1
3.	δ -2-careno	1001	3,6 \pm 0,1
4.	Limoneno	1031	0,4 \pm 0,0
5.	(Z)- β -ocimeno	1040	1,1 \pm 0,1
6.	(E)- β -ocimeno	1050	44,1 \pm 0,8
7.	α -terpinoleno	1089	15,2 \pm 0,9
8.	α -copaeno	1376	0,4 \pm 0,0
9.	Aromadendreno	1439	5,6 \pm 0,2
10.	Aloaromadendreno	1461	0,5 \pm 0,0
11.	Germacreno D	1480	1,4 \pm 0,1
12.	α -amorfeno	1485	0,5 \pm 0,1
13.	viridifloreno	1493	9,0 \pm 0,4
14.	(E,E)- α -farneseno	1508	0,8 \pm 0,1
15.	γ -cadineno	1513	0,8 \pm 0,0
16.	Ledol	1565	0,5 \pm 0,0
17.	espatulenol	1576	5,7 \pm 0,3
18.	Globulol	1583	3,2 \pm 0,1
19.	Viridiflorol	1590	2,2 \pm 0,1
	Total		97,9
	Rendimento (%)		0,7\pm0,1

A.13 – Cromatograma do Óleo Essencial das Folhas de *Myracrodruon urundeuva*.



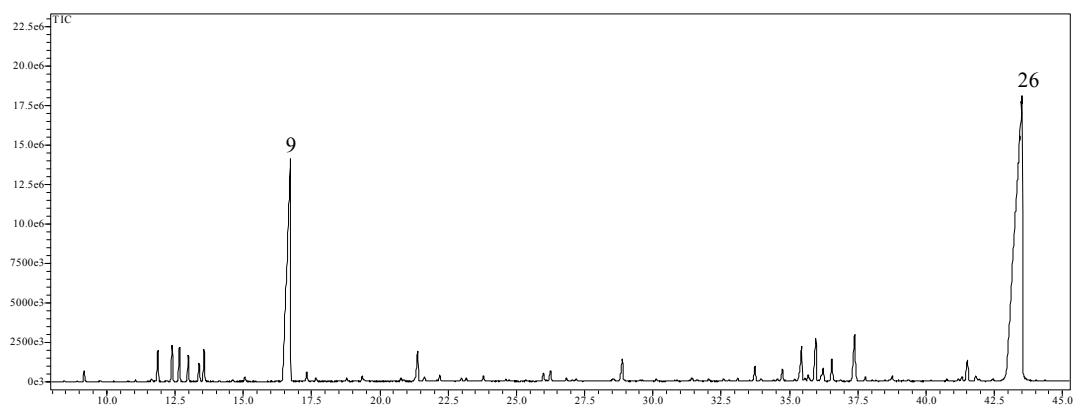
Constituintes	IRR	MYUR
1. mirceno	991	4,2±0,3
2. δ-3-careno	1011	78,8±1,7
3. Limoneno	1031	0,2±0,0
4. β-felandreno	1032	3,0±0,2
5. α-terpinoleno	1089	4,8±0,6
6. β-elemeno	1391	0,7±0,1
7. (E)-cariofileno	1418	1,1±0,1
8. β-camigreno	1475	0,5±0,0
9. β-selineno	1485	2,5±0,2
10. viridifloreno	1493	3,0±0,2
11. germacreno A	1503	0,3±0,0
Total		99,1
Rendimento (%)		0,6±0,0

A.14 – Cromatograma do Óleo Essencial das Folhas de *Schinus terebinthifolius*.



Constituintes		IRR	Julho
1.	α -pineno	939	4,2 \pm 0,1
2.	β -pineno	980	0,8 \pm 0,0
3.	mirreno	991	0,8 \pm 0,0
4.	α -felandreno	1004	18,2 \pm 1,2
5.	p -cimeno	1026	3,3 \pm 0,2
6.	Limoneno	1031	16,7 \pm 1,1
7.	(<i>E</i>)- β -ocimeno	1050	2,6 \pm 0,1
8.	δ -elemeno	1339	2,0 \pm 0,0
9.	α -copaeno	1376	0,6 \pm 0,0
10.	β -elemeno	1391	2,1 \pm 0,1
11.	(<i>E</i>)-cariofileno	1418	2,7 \pm 0,2
12.	α -humuleno	1454	0,9 \pm 0,0
13.	Germacreno D	1480	21,0 \pm 1,2
14.	α -muuroloeno	1499	0,9 \pm 0,0
15.	germacreno A	1503	1,3 \pm 0,0
16.	γ -cadineno	1513	0,7 \pm 0,0
17.	δ -cadineno	1524	1,6 \pm 0,1
18.	germacreno B	1556	1,6 \pm 0,0
19.	espatulenol	1576	2,1 \pm 0,1
20.	óxido de β -cariofileno	1581	2,6 \pm 0,1
21.	Viridiflorol	1590	2,5 \pm 0,2
22.	δ -cadinol	1636	2,4 \pm 0,1
23.	α -muurolol	1645	2,8 \pm 0,1
24.	α -cadinol	1653	3,1 \pm 0,1
Total			97,5
Rendimento (%)			0,7\pm0,1

A.14 – Cromatograma do Óleo Essencial das Folhas de *Siparuna guianensis*.



Constituintes		IRR	Março
1.	α -Pino	932	0.3 \pm 0.1
2.	β -Mirreno	987	0.9 \pm 0.0
3.	α -Felandreno	1001	1.5 \pm 0.0
4.	δ -3-Careno	1009	1.1 \pm 0.0
5.	α -Terpineno	1013	1.0 \pm 0.1
6.	<i>p</i> -cimeno	1021	0.4 \pm 0.1
7.	Limoneno	1027	1.3 \pm 0.3
8.	γ -Terpineno	1058	0.2 \pm 0.0
9.	α-Terpinoleno	1064	25.5\pm0.2
10.	<i>p</i> -menta-1,5,8-trieno	1115	0.2 \pm 0.1
11.	<i>p</i> -Cimen-8-ol	1178	0.9 \pm 0.1
12.	Safrol	1279	0.3 \pm 0.1
13.	α -Cubebeno	1355	0.1 \pm 0.0
14.	(<i>Z</i>)-Cariofileno	1403	0.1 \pm 0.0
15.	β -Gurjuneno	1427	0.1 \pm 0.0
16.	β -Farneseno	1441	0.6 \pm 0.1
17.	Germacreno D	1478	0.8 \pm 0.0
18.	Biciclogermacreno	1491	1.2 \pm 0.0
19.	α -Muurolo	1495	0.8 \pm 0.1
20.	α-Bisaboleno	1499	0.7\pm0.2
21.	β-Bisaboleno	1502	3.2\pm0.2
22.	γ-Bisaboleno	1529	3.4\pm0.1
23.	(<i>Z</i>)-Nerolidol	1533	0.1 \pm 0.1
24.	Espatuleno	1570	0.4 \pm 0.3
25.	α -Muurolo	1642	0.6 \pm 0.1
26.	α-Bisabolol	1682	50.1\pm0.3
Total			95,9
Rendimento (%)			5,7\pm0,8