



JULIANA DE ANDRADE

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Chenopodium
ambrosioides* L. E *Philodendron bipinnatifidum*
Schott: IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO
QUÍMICA, BIOATIVIDADE E
CARACTERIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS
SECRETORAS**

**LAVRAS – MG
2013**

JULIANA DE ANDRADE

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Chenopodium ambrosioides* E *Philodendron
bipinnatifidum* Schott: IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO QUÍMICA,
BIOATIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS
SECRETORAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora
Dra. Maria das Graças Cardoso

Coorientador
Dr. Jair Campos de Moraes

**LAVRAS – MG
2013**

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Divisão de Processos Técnicos da
Biblioteca da UFLA**

Andrade, Juliana de.

Óleos essenciais de *Chenopodium ambrosioides* e *Philodendron bipinnatifidum* Schott : identificação e quantificação química, bioatividade e caracterização das estruturas secretoras / Juliana de Andrade. – Lavras : UFLA, 2013.

131 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Produtos naturais. 2. Potencialidades biológicas. 3. Cavidades secretoras. 4. Tricomas glandulares. 5. Atividade antibacteriana. 6. Atividade antioxidante. 7. Atividade inseticida. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 547.71

JULIANA DE ANDRADE

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Chenopodium ambrosioides* E *Philodendron
bipinnatifidum* Schott: IDENTIFICAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO QUÍMICA,
BIOATIVIDADE E CARACTERIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS
SECRETORAS**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, área de concentração em Agroquímica e Agrobioquímica, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 26 de fevereiro de 2013.

Dra. Maria das Graças Cardoso	UFLA
Dra. Ana Cristina da Silva Figueiredo	UL
Dr. Evaristo Mauro de Castro	UFLA
Dr. Luiz Gustavo de Lima Guimarães	UFT

Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

LAVRAS – MG

2013

*A Deus, pelo dom da vida, por iluminar meu caminho e me dar forças para
sempre seguir em frente.*

*Aos meus pais, José Antonio e Ana Maria, pelo amor incondicional, pelo
exemplo de vida e pela dedicação em proporcionar-me as condições necessárias
para a realização de mais uma conquista.*

*Ao meu noivo, Wilder, pelo amor, pela presença constante, pelo estímulo,
amizade, auxílio, carinho e paciência.*

Aos meus irmãos, Euler e Glauco, pelo carinho, incentivo e apoio.

A vocês, o meu respeito, amor, afeto e eterna gratidão!

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora por iluminarem meus passos, me ampararem nos momentos difíceis, darem força interior para superar as dificuldades, mostrar-me os caminhos nas horas incertas e por me concederem tantas graças!

Aos meus pais e irmãos pelo exemplo, amor incondicional, apoio e orações.

Ao meu noivo, Wilder, pelo amor, carinho, paciência, companheirismo, sempre apoiando-me e ajudando-me nos momentos em que mais precisei.

À professora Dra. Maria das Graças Cardoso, a quem agradeço, em especial pela valiosa orientação, verdadeira amizade, pela confiança em mim depositada e pelos ensinamentos pessoais e profissionais.

Ao professor Dr. Jair Campos de Moraes pela coorientação, prestabilidade e disponibilidade em contribuir com o trabalho.

À professora Dra. Ana Cristina da Silva Figueiredo pelas análises cromatográficas dos óleos essenciais.

Ao professor Dr. Evaristo Mauro de Castro pela concessão do Laboratório de Anatomia Vegetal para a realização dos testes anatômicos e histoquímicos e às discentes Marinês e Maíra pelo auxílio e prestabilidade.

À professora Dra. Mariana Mansanares, coordenadora do Herbário ESAL, ao discente Daniel Quedes e à funcionária Kelly, pela atenção e presteza na identificação das espécies em estudo.

À professora Dra. Josefina Aparecida de Souza pelo carinho, amizade e disponibilidade.

Ao pessoal do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Estrutural Ultra-estrutural, em nome de seu coordenador prof. Dr. Eduardo Alves.

Aos amigos do laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais e de Análise de Qualidade de Aguardente, Maria Luisa, Milene, Marcos, Cíntia, Lucilene, Juliana Valério, Leonardo, Felipe, João, Lidy, Christiane, Bruna, Rafaela e Karen, pelo companheirismo, amizade, auxílio na condução do experimento e pelo prazer da convivência diária.

Ao pessoal do laboratório de Resistência de Plantas a Insetos, em especial à Fran e Irene pela amizade e ajuda imprescindível.

A todos meus familiares, pelo amor, carinho, apoio e orações.

Aos professores do programa de pós-graduação em Agroquímica, pelos ensinamentos.

Aos meus colegas de mestrado, pela amizade e harmônica convivência.

Aos funcionários do Departamento de Química, por toda a atenção e auxílio prestados.

Às minhas queridas amigas, em especial, Natália, Flávia, Juliana Pedroso, Karen e Luana, agradeço pelos momentos compartilhados, pela convivência harmônica e por estarem sempre presentes, alegrando os meus dias mais cinzentos.

À minha sobrinha, Giovanna, que por sua inocência e alegria me ajuda a conduzir a vida com um sorriso.

À família Emaús pelas orações, amizade e convivência.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, que me permitiram realizar este trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a concretização desse trabalho e me incentivaram a sempre seguir em frente.

“O correr da vida embrulha tudo. A vida é assim, esquenta e esfria, aperta e depois afrouxa, aquieta e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. O que Deus quer é ver a gente aprendendo a ser capaz de ficar alegre e amar no meio da alegria, e ainda mais no meio da tristeza. Todo o caminho da gente é resvaloso, mas cair não prejudica demais, a gente levanta, a gente sobe, a gente volta”

João Guimarães Rosa

RESUMO

Nos últimos anos, a pesquisa por produtos naturais como alternativa no controle de micro-organismos e da oxidação lipídica dos alimentos tem-se intensificado. Objetivou-se neste trabalho caracterizar quimicamente os óleos essenciais das espécies *Chenopodium ambrosioides* L. e *Philodendron bipinnatifidum* Schott, avaliar as potencialidades biológicas e determinar suas estruturas secretoras. A extração dos óleos essenciais foi realizada pelo método de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger modificado com duração de 2 horas, sendo, posteriormente, caracterizado quimicamente por CG-DIC e CG/EM. A atividade antioxidante foi determinada monitorando-se a redução do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) e utilizando o ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico. A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada por meio da técnica difusão cavidade em ágar, utilizando os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* e *Salmonella Cholerasuis*. A atividade inseticida sobre *Diabrotica speciosa* foi realizada utilizando testes sem e com chance de escolha. A caracterização das estruturas secretoras foi feita por MEV e pelos testes histoquímicos com os reagentes de Nadi, Sudan IV e cloreto férrico. A análise cromatográfica permitiu identificar como compostos majoritários do óleo essencial de *C. ambrosioides* L. o α -terpineno (40,73%), ρ -cimeno (21,81%) e trans-ascaridol (12,48%); e para *P. bipinnatifidum* Schott, os compostos β -bisaboleno (65,26%), o trans- α -bergamoteno (9,97%), α -copaeno (3,33%), δ -cadineno (2,83%) e ar-curcumeno (1,99%). A atividade antioxidante foi mais bem evidenciada pelo teste β -caroteno/ácido linoleico para o óleo essencial de *C. ambrosioides* L., com CI_{50} 455,7 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esse também apresentou atividade antibacteriana tanto para bactérias Gram-negativas como para Gram-positivas, sendo o óleo essencial de *P. bipinnatifidum* Schott eficiente somente para *Staphylococcus aureus*. Ambos os óleos apresentaram atividade inseticida; os níveis de mortalidade variaram em função das concentrações testadas. Na espécie *C. ambrosioides* L., evidenciou-se a presença de compostos terpênicos nos tricomas glandulares e, na espécie *P. bipinnatifidum* Schott, esses compostos foram encontrados em cavidades secretoras.

Palavras-chave: Óleos essenciais. Potencialidades biológicas. Cavidades secretoras. Tricomas glandulares.

ABSTRACT

In recent years, the search for alternative and natural products for the control of micro-organisms and lipid oxidation of food has been developed. The aim of this study was to chemically characterize the essential oils from *Chenopodium ambrosioides* L. and *Philodendron bipinnatifidum* Schott, to evaluate the potential biological and to determine the structures that secrete them. The extraction of the essential oil was performed by hydrodistillation using a modified Clevenger apparatus, with a duration of 2 hours. The oils were chemically characterized by GC-FID and GC/MS. The antioxidant activity was determined by monitoring the reduction in free radical DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil) and by using the β -caroteno/linoleic acid oxidation test system. The evaluation of the antibacterial activity was performed by the agar well diffusion technique using *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* and *Salmonella choleraesuis*. The insecticidal activity against *Diabrotica speciosa* was performed using tests with and without free choice. The characterization of the secretory structures was performed by SEM and by histochemical tests with Nadi, Sudan IV and ferric chloride reagents. α -Terpinene (40.73%), p -cymene (21.81%) and *trans*-ascaridol (12.48%) were identified as the major compounds in the essential oil from *C. ambrosioides* L., and β -bisabolene (65.26%), *trans*- α -bergamotene (9.97%), α -copaene (3.33%), δ -cadinene (2.83%) and α -curcumene (1.99%) from *P. bipinnatifidum* Schott. The antioxidant activity was best demonstrated by the β -caroteno/linoleic acid test for the essential oil from *C. ambrosioides* L. (IC_{50} 455.7 mg mL⁻¹). This oil also showed antibacterial activity against both Gram-negative and Gram-positive bacteria. The essential oil from *P. bipinnatifidum* Schott was efficient only against *Staphylococcus aureus*. Both oils showed insecticidal activity, and mortality levels varied depending on the concentration. In *C. ambrosioides* L. species, terpene compounds were found in glandular trichomes and in *P. bipinnatifidum* Schott species, these compounds were found in secretory cavities.

Keywords: Essential oils. Biological potential. Cavities structures. Glandular trichomes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo bioossintético dos metabólitos secundários.....	23
Figura 2	Mecanismo de formação das unidades isoprênica ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) pela via do mevalonato.....	27
Figura 3	Biossíntese de terpenos pela via da 1-deoxi-D-xilulose -5- P-mevalonato.....	29
Figura 4	Mecanismo de formação da estrutura básica dos fenilpropanoídes a partir do ácido chiquímico.....	30
Figura 5	Aspecto geral de uma planta.....	33
Figura 6	Aspecto geral de tricomas glandulares	35
Figura 7	Estruturas químicas dos principais antioxidantes sintéticos.....	38
Figura 8	Aspecto visual da espécie <i>Diabrotica speciosa</i>	49
Figura 9	Aspecto geral da espécie <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.....	51
Figura 10	Aspecto geral da espécie <i>Philodendron bipinnatifidum</i> Schott.....	53
Figura 11	Exsicatas das plantas coletadas a) <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. b) <i>Philodendron bipinnatifidum</i> Schott.....	55
Figura 12	Processo de extração de óleo essencial (hidrodestilação).....	56
Figura 13	Sistema para determinação da umidade.....	57
Figura 14	Reação de compostos fenólicos com cloreto férrico.....	62
Figura 15	Reação de formação do reagente Nadi.....	63
Figura 16	Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de <i>C. ambrosioides</i> L.....	72
Figura 17	Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo	

	essencial de <i>P. bipinnatifidum</i> Schott.....	75
Figura 18	Visão frontal das faces adaxial e abaxial da superfície foliar de <i>C. ambrosioides</i> L. e eletromicrografias de MEV. A – Tricomas glandulares e não glandulares presentes na superfície abaxial. B – Tricoma glandular do tipo vesiculoso presente na face inferior. C – Tricomas tectores presentes na superfície adaxial.....	78
Figura 19	Caracterização anatômica (seção paradérmica) de <i>C. ambrosioides</i> L. A – Face abaxial. B – Face adaxial.....	79
Figura 20	Anatomia foliar de <i>C. ambrosioides</i> L. e caracterização histoquímica da espécie <i>C. ambrosioides</i> L. Reação positiva para o teste com cloreto férrico, evidenciando a presença de compostos fenólicos.....	80
Figura 21	Caracterização histoquímica da substância presente nos tricomas glandulares vesiculosos (seção transversal do limbo foliar de <i>C. ambrosioides</i> L.). A – tricoma glandular com reação positiva (coloração vermelha) para o reagente Sudan IV, caracterizando a presença de lipídeos. B – Tricoma glandular com reação positiva (coloração azul) para o reagente Nadi, evidenciando a presença de terpenos (óleo essencial).....	81
Figura 22	Caracterização anatômica espécie <i>Philodendron bipinnatifidum</i> A – Seção paradérmica. B – Seção transversal.....	82
Figura 23	Eletromicrografias de varredura da espécie <i>Philodendron bipinnatifidum</i> Schott.....	83
Figura 24	Caracterização histoquímica da substância presente nas cavidades secretoras (seção transversal de <i>Philodendron</i>	

	<i>imbe</i>). A – Reação positiva (coloração vermelha) para o reagente Sudan IV, caracterizando a presença de lipídeos. B – Reação positiva (coloração azul) para o reagente Nadi, evidenciando a presença de terpenos (óleo essencial).....	84
Figura 25	Caracterização histoquímica da espécie <i>Philodendron bipinnatifidum</i> Schott. Reação positiva para o teste cloreto férrico evidenciando a presença de compostos fenólicos.....	85
Figura 26	Reação de oxidação do sistema β - caroteno/ácido linoleico...	90
Figura 27	Mecanismo de ação provável entre o radical DPPH com estruturas fenólicas, sendo a) dimerização e b) estabilização do radical.....	92
Figura 28	Mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana.....	96
Figura 29	Porcentagem de injúria foliar causada por <i>D. speciosa</i> em feijoeiro tratado com diferentes concentrações (%) dos óleos essenciais de <i>C. ambrosioides</i> e <i>P. bipinnatifidum</i>	98
Figura 30	Área foliar consumida (cm ²) por <i>D. speciosa</i> em feijoeiro tratado com diferentes concentrações (%) dos óleos essenciais de <i>C. ambrosioides</i> e <i>P. bipinnatifidum</i>	99
Figura 31	Equações de regressão para porcentagem de injúria foliar causada por <i>D. speciosa</i> em feijoeiro tratado com diferentes concentrações (%) dos óleos essenciais de <i>C. ambrosioides</i> e <i>P. bipinnatifidum</i>	100
Figura 32	Equações de regressão para área foliar consumida (cm ²) por <i>D. speciosa</i> em feijoeiro tratado com diferentes concentrações (%) dos óleos essenciais de <i>C. ambrosioides</i> e <i>P. bipinnatifidum</i>	101

Figura 33 Equações de regressão para porcentagem de mortalidade de *D. speciosa* em feijoeiro tratado com diferentes concentrações (%) dos óleos essenciais de *C. ambrosioides* e *P. bipinnatifidum*. 102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição química do óleo essencial de <i>C. ambrosioides</i> L.....	71
Tabela 2	Composição química do óleo essencial de <i>P. bipinnatifidum</i> Schott.....	73
Tabela 3	Valores da porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais/padrão perante o método β -caroteno/ácido linoleico.....	86
Tabela 4	Valores da porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais/padrão perante o método de sequestro de radicais DPPH.....	87
Tabela 5	Valores de CI_{50} para a porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais/padrão pelos dois métodos empregados.....	89
Tabela 6	Concentração mínima inibitória dos óleos essenciais de <i>Chenopodium ambrosioides</i> L. e <i>Philodendron bipinnatifidum</i> Schott encontrada para os microorganismos <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Salmonella Cholerasuis</i>	93
Tabela 7	Índice de preferência alimentar dos insetos após aplicação dos óleos essenciais.....	103

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

BHA	Butilhidroxianisol
BHI	Caldo-infusão de cérebro e coração
BHT	Butilhidroxitolueno
BLU	Base livre de umidade
CGL	Cromatografia Gás-Líquido
CGL/EM	Cromatografia Gás-Líquido/Espectrometria de Massas
CL	Cloranfenicol
CMI	Concentração inibitória mínima
DAEC	Difusamente aderente
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalila ou dimetilalildifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DXPS	1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato
FPP	Farnesil difosfato
GAP	D-gliceraldeído-3-fosfato
GP	Galato de propila
GPP	<i>trans</i> -geranilpirofosfato
GGPP	Geranilgeranil difosfato
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril-CoA
IP	Índice de preferência
IPP	Pirofosfato de isopentila
IR	Índice de retenção
ISO	International Organization for Standardization
LPP	Linalil pirofosfato
MEP	2C-metil-D-eritritol 4-fosfato
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MVA	Mevalonato
NPK	Nitrogênio-fósforo-potássio
NPP	Neril pirofosfato
OE	Óleo essencial
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAL	Fenilalanina amonialiase
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBHQ	tert-butilhidroxiquinona
TSA	Triptona Soja Ágar
TSB	Caldo de soja triptica
UFC	Unidades formadoras de colônias
cm	Centímetro
ha	Hectare

L	Litros
m	Metros
μ L	Microlitro
mL	Militro
nm	Nanômetro
R	Rendimento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	19
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1	Metabolismo secundário.....	21
2.2	Óleos essenciais.....	23
2.2.1	Biossíntese de terpenoides.....	25
2.2.2	Biossíntese de fenilpropanoides.....	29
2.2.3	Mercado nacional e internacional dos óleos essenciais.....	31
2.3	Glândulas secretoras e acúmulo de óleos essenciais.....	32
2.4	Potencial antioxidante.....	36
2.5	Atividade antibacteriana.....	40
2.5.1	<i>Escherichia coli</i>	42
2.5.2	<i>Listeria monocytogenes</i>	43
2.5.3	<i>Salmonella Choleraesuis</i>	44
2.5.4	<i>Staphylococcus aureus</i>	45
2.6	Atividade inseticida dos óleos essenciais.....	46
2.6.1	<i>Diabrotica speciosa</i>	48
2.7	<i>Chenopodium ambrosioides</i> L.....	50
2.8	<i>Philodendron bipinnatifidum</i> Schott.....	51
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	54
3.1	Coleta e preparação do material vegetal.....	54
3.2	Extração dos óleos essenciais.....	55
3.3	Determinação da umidade.....	57
3.4	Caracterização química dos óleos essenciais.....	58
3.4.1	Identificação dos constituintes dos óleos essenciais.....	58
3.4.2	Quantificação dos constituintes dos óleos essenciais.....	58
3.5	Análises morfológicas.....	59
3.6	Análises anatômicas e histoquímicas.....	60
3.6.1	Anatomia vegetal.....	60
3.6.2	Estudos histoquímicos.....	61
3.6.2.1	Análise qualitativa para detecção de compostos fenólicos.....	61
3.6.2.2	Análise de lipídeos.....	62
3.6.2.3	Detecção de terpenoides.....	62
3.7	Atividades antioxidantes.....	63
3.7.1	Oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	63
3.7.2	Ensaio com DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil).....	64
3.7.3	Avaliação dos dados e análise estatística.....	65
3.8	Atividade antibacteriana.....	66
3.8.1	Ativação e manutenção das culturas bacterianas.....	66
3.8.2	Teste de Difusão Cavidade em Ágar.....	66

3.8.3	Análise estatística.....	68
3.9	Atividade inseticida.....	68
3.9.1	Análise estatística.....	69
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	70
4.1	Rendimento e caracterização química dos óleos essenciais....	70
4.2	Estudo anatômico e histoquímico.....	76
4.3	Atividade antioxidante.....	85
4.4	Atividade antibacteriana.....	93
4.5	Atividade inseticida.....	97
5	CONCLUSÃO	105
	REFERÊNCIAS	106
	APÊNDICE	119

1 INTRODUÇÃO

Os óleos essenciais são misturas complexas de metabólitos secundários de origem química diversa, destacando-se dos metabólitos secundários devido à sua aplicabilidade como matéria-prima para a indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética (SIMÕES et al., 2007).

O interesse pelo estudo dos óleos essenciais está baseado, não somente na possibilidade de obtenção de compostos aromáticos (odor agradável), mas também daqueles que apresentem potencialidades biológicas promissoras ou, ainda, de compostos precursores de substâncias de elevado valor agregado.

Muitos óleos essenciais possuem importantes atividades biológicas, fazendo-se deles, objetos de estudos, principalmente pela indústria de agroquímicos, objetivando-se encontrar substâncias naturais inseticidas. Entretanto, apesar do avanço no conhecimento das potencialidades biológicas e farmacológicas desses óleos, poucos estudos são descritos na literatura sobre a morfologia das estruturas celulares ou órgãos envolvidos na produção de óleos essenciais nos vegetais.

Na indústria alimentícia, os óleos essenciais, além de conferirem aroma e sabor, possuem importantes atividades antioxidantes e antibacterianas, que podem potencializar o seu uso. Assim, para promover a conservação dos alimentos, a utilização dos óleos essenciais vem sendo estudada, propiciando o desenvolvimento de técnicas que procuram minimizar os efeitos negativos de oxidantes, radicais e micro-organismos patogênicos (PEREIRA et al, 2008).

Devido à importância dos óleos essenciais no mercado mundial e à diversidade de plantas existentes, ainda inexploradas ou pouco estudadas, são necessárias pesquisas que viabilizem o uso dessas plantas. Sendo assim, visando a preencher a lacuna existente no conhecimento das espécies vegetais e fornecer dados que sirvam para auxílio à taxonomia, contribuindo para a padronização de

produtos de origem vegetal, ressalta-se a importância do estudo das espécies *Chenopodium ambrosioides* L. e *Philodendron bipinnatifidum* Schott.

Objetivou-se neste trabalho caracterizar os constituintes químicos dos óleos essenciais das espécies *Chenopodium ambrosioides* L. e *Philodendron bipinnatifidum* Schott, determinar as estruturas secretoras e avaliar as potencialidades biológicas como antioxidante, bactericida e inseticida.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Metabolismo secundário

A presença de atividade metabólica constitui uma das características dos seres vivos. No caso das células vegetais, o metabolismo pode ser dividido em primário e secundário (SIMÕES et al., 2007).

O metabolismo primário é responsável pela síntese de celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias importantes para a realização das funções vitais das plantas. Por outro lado, os vegetais produzem uma grande variedade de compostos orgânicos conhecidos como metabólitos secundários, cuja denominação pode ser atribuída ao fisiologista vegetal, Albrecht Kossel, que foi o primeiro a definir esses metabólitos em oposição aos metabólitos primários (BOURGAUD et al., 2001).

Durante muito tempo, os metabólitos secundários foram considerados como produtos de excreção do vegetal, com estruturas químicas e, algumas vezes, propriedades biológicas interessantes. Embora a presença desses metabólitos nem sempre seja necessária para que uma planta complete seu ciclo de vida, eles desempenham um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente (SIMÕES et al., 2007).

A variedade de moléculas originadas do metabolismo secundário das plantas teria sido resultado de milhões de anos de evolução, como forma de proteção contra o ataque de patógenos, atração de organismos benéficos como polinizadores, dispersores de semente e organismos simbiotes, adaptações ao estresse ambiental ou defesa química contra micro-organismos (PIMENTEL et al., 2010; ZACARONI et al., 2009), insetos (LIMA et al., 2010), herbívoros e outras plantas (BAKKALI et al., 2008). Contudo, produtos secundários também possuem ação protetora em relação a estresses abióticos, como aqueles

associados a mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição à radiação UV e deficiência de nutrientes minerais (SIMÕES et al., 2007). Além disso, esses compostos determinam aspectos de qualidade dos alimentos, como o gosto, o sabor, o cheiro e a cor de muitas plantas e flores ornamentais, tendo neste último aspecto importância na biodiversidade (VERPOORTE; MEMELINK, 2002).

Entre os metabólitos secundários, os principais grupos de compostos encontrados com maior atividade biológica são os alcaloides, flavonoides, cumarinas, taninos, quinonas e óleos essenciais. Esses são agrupados em três grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados, todos eles originados do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetil-Coa, conforme demonstrado na Figura 1.

O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos precursores da maioria dos metabólitos secundários aromáticos, como taninos hidrolisáveis, cumarinas, alcaloides e fenilpropanoides, compostos que têm em comum a presença de um anel aromático ligado a uma cadeia carbônica de três átomos de carbono na sua composição. O acetil-CoA fornece as unidades acetila, que compõem o intermediário reativo, acetil-tio-coenzima A (acetil-CoA), o verdadeiro precursor de vários grupos de substâncias, tais como os aminoácidos alifáticos, terpenoides, esteróis, ácidos graxos e triglicérides. Os aminoácidos alifáticos originam-se do ciclo do ácido cítrico, ao passo que os demais metabólitos derivam do mevalonato ou da condensação de unidades de acetato. Alguns metabólitos secundários derivam não apenas de um desses intermediários, mas são resultantes da combinação de uma unidade do ácido chiquímico e uma ou mais unidades do acetato ou derivados deste, como é o caso das antraquinonas, dos flavonoides e dos taninos condensados (SIMÕES et al., 2007).

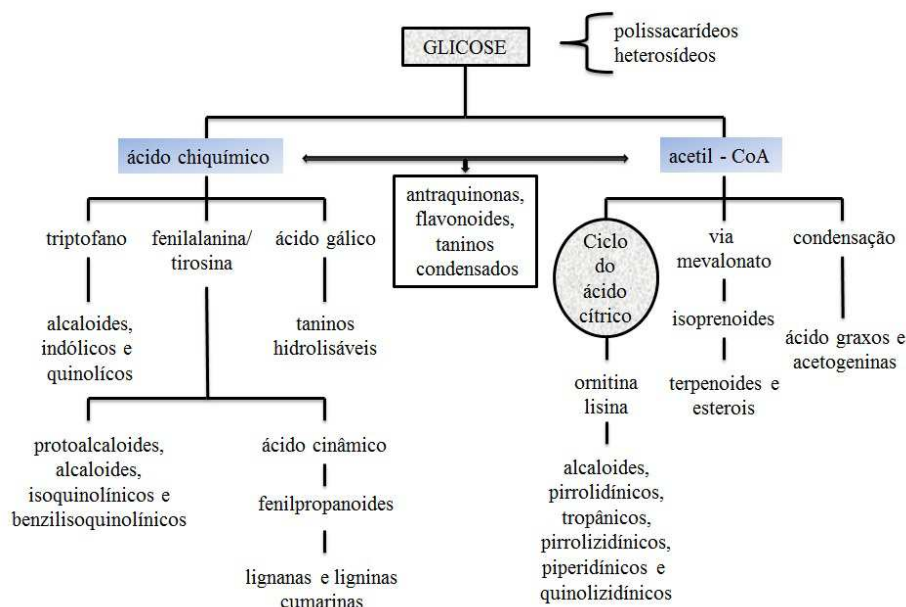


Figura 1 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários
(Adaptado de Simões et al., 2007)

2.2 Óleos essenciais

O termo óleo essencial deriva da nomenclatura alquímica do século XVI *Quinta essentia* e foi proposto pelo reformador da medicina Paracelsus von Hohenheim (BURT, 2004).

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário das plantas, definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, variando em intensidade e composição, de acordo com a espécie, variabilidade genética e fatores ambientais, sendo geralmente característicos para determinados órgãos e para o estágio de desenvolvimento da planta. De acordo com a ISO (International Organization for Standardization), são definidos como “um produto obtido por destilação em

água ou vapor ou por expressão de pericarpos de frutos cítricos (Rutaceae)” (SIMÕES et al., 2007).

São também denominados de essências, óleos etéreos ou óleos voláteis. Biologicamente são mediadores de polinização, tendo função atrativa em determinadas espécies vegetais. Quando recentemente extraídos, são incolores ou ligeiramente amarelados; porém, alguns podem apresentar coloração intensa. Apresentam-se à temperatura ambiente como líquidos oleosos de alta volatilidade, o que os diferenciam dos óleos fixos, misturas de substâncias lipídicas obtidas, geralmente, de sementes. De uma maneira geral são instáveis, especialmente na presença de luz, calor, umidade, ar e metais. Podem ser consideradas moléculas lipofílicas de baixo peso molecular, constituídas de uma ou mais insaturações, instáveis à temperatura e à luz, podendo ser degradadas, ou sofrerem polimerização (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais podem conter em sua constituição cerca de 20 a 60 componentes em concentrações distintas. Na maioria das vezes, são caracterizados por dois ou três componentes em concentrações elevadas (20 - 70%), ou seja, compostos majoritários em comparação com os outros componentes presentes em pequenas quantidades (BAKKALI et al., 2008). Sua constituição química pode incluir hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenois, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e cumarinas, até compostos com enxofre (SIMÕES et al., 2007).

A seguir estão citadas as vias de biossíntese dos terpenoides e fenilpropanoides, ainda que outros tipos de compostos, menos frequentes, estejam presentes nos óleos essenciais.

2.2.1 Biossíntese de terpenoides

O termo “terpeno” deriva do nome da resina terebintina ou aguarrás, de onde foram isolados pela primeira vez (CROTEAU et al. 2000).

Os terpenos são também denominados terpenoides quando possuem elementos adicionais, como o oxigênio. Constituem um largo grupo de metabólitos naturais, sendo conhecidos mais de 36.000 diferentes terpenoides, cuja grande diversidade deve-se à variabilidade das suas estruturas e dos grupos funcionais (LUCKER, 2002).

São biossintetizados a partir do pirofosfato de isopentila (IPP) e seu isômero alílico, pirofosfato de dimetilalila (DMAPP). São originados vários compostos derivados da junção dessas unidades, possuindo um esqueleto carbônico básico de fórmula $(C_5H_8)_n$. As moléculas formadas a partir de uma unidade em C5 são denominadas hemiterpenos (C_5H_8), sendo o isopreno considerado o único hemiterpeno. Entretanto, seus derivados que contêm oxigênio, como o prenol ou o ácido isovalérico, são denominados hemiterpenoides. As moléculas formadas por duas unidades em C5 são denominadas por monoterpenos ($C_{10}H_{16}$), os quais representam 90% da composição dos óleos essenciais. São altamente hidrofóbicos e seus efeitos biológicos estão relacionados com interações com a membrana dos microorganismos. Os sesquiterpenos são compostos formados por três unidades em C5 e têm a fórmula $C_{15}H_{24}$. Os diterpenos são formados por quatro unidades em C5 e possuem a fórmula $C_{20}H_{32}$ (BASER e DEMIRCI, 2007; BAKKALI et al., 2008; TURINA et al, 2006).

A biossíntese dos terpenoides pode ser dividida em 4 etapas: síntese do precursor fundamental, IPP; adições repetitivas do IPP para formação de uma série de homólogos prenil difosfato; ação de enzimas específicas na produção dos esqueletos terpênicos; modificações enzimáticas secundárias dos esqueletos

para originar funcionalidade e uma grande diversidade de compostos (CROTEAU et al, 2000).

Existem, pelo menos, duas vias envolvidas na biossíntese dos terpenoides, uma via citosólica ou rota do mevalonato (MVA) e outra plastidial ou rota do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS). Ambas conduzem à produção de isômeros do isopreno, o difosfato de isopentenila (IPP) e o pirofosfato de dimetilalila (DMAPP), os quais constituem os monômeros a partir dos quais originarão os diferentes terpenoides (DEWICK, 2009).

A via clássica do ácido mevalônico (Figura 2) envolve dois passos de condensação de três moléculas de acetil-CoA pelas enzimas acetil-CoA aciltransferases e hidroximetilglutaril-CoA sintase (HMG-CoA) para produzir HMG-CoA. Em seguida, o HMG-CoA é reduzido pela HMG-CoA redutase para ácido (3R)-mevalônico (mevalonato) que, por sua vez, é convertido a IPP, por meio de duas fosforilações e uma descarboxilação. A IPP isomerase catalisa a conversão de parte do IPP para dimetilalildifosfato (DMAPP) (LÜCKER, 2002).

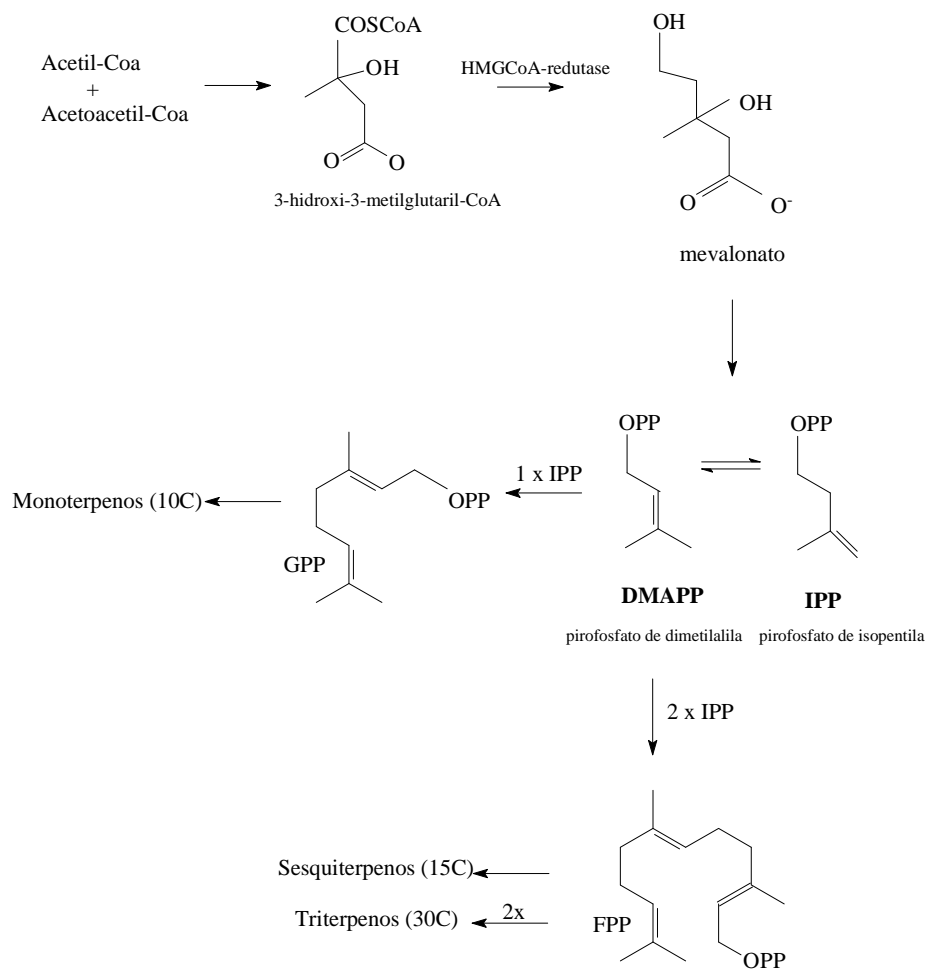


Figura 2 Mecanismo de formação das unidades isoprênica ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) pela via do mevalonato (Adaptada de Dewick, 2009)

A via do 5-fosfato de 1-deoxi-D-xilulose (DXPS) ou via independente do mevalonato (Figura 3) foi encontrada em bactérias, algas verdes e nos plastos das plantas superiores. Essa via tem como precursor do IPP, o composto 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DOXP), formado pela condensação de uma molécula de piruvato com o D-gliceraldeído-3-fosfato (GAP). Foi denominada por via MEP (2C-metil-D-eritritol 4-fosfato), formada pela DOXP-redutoisomerase (DXR) a partir do DOXP. Em seguida, após sucessivas reações, o MEP é convertido no seu último intermediário, que é convertido em IPP e DMAPP. As moléculas de IPP e DMAPP dão origem ao *trans*-geranilpirofosfato (GPP), o qual é convertido nos diferentes monoterpênos. O GPP pode, então, ligar-se a outra molécula de IPP, formando um composto de 15 carbonos, farnesil difosfato (FPP), precursor da maioria dos sesquiterpênos. A adição de outra molécula de IPP forma o geranylgeranyl difosfato (GGPP), composto de 20 carbonos precursor dos diterpênos. Finalmente, FPP e GGPP podem dimerizar para formar triterpênos (C30) e tetraterpênos (C40), respectivamente. A formação de neril pirofosfato (NPP) a partir de GPP origina um grande número de esqueletos acíclicos, cíclicos, bicíclicos e tricíclicos. Outros dois isômeros formados a partir do GPP são o linalil pirofosfato (LPP) e o *cis*-nerilpirofosfato (NPP) (formando um esteroisômero *cis*). Esses compostos originam vários monoterpênos acíclicos (DEWICK, 2009).

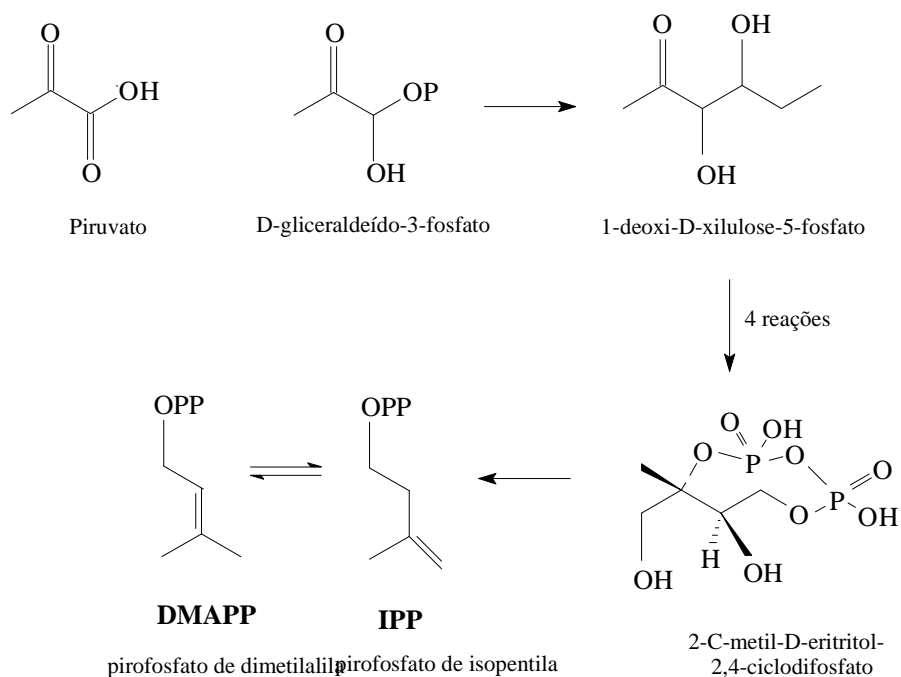


Figura 3 Biossíntese de terpenos pela via da 1-deoxi-D-xilulose-5-P mevalonato (Adaptada de Dewick, 2009)

2.2.2 Biossíntese de fenilpropanoides

Além dos terpenoides, os óleos essenciais contêm os fenilpropanoides, compostos aromatizantes que possuem, como precursor, o ácido chiquímico, o qual é formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose: o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato. Pela junção do ácido chiquímico e de uma molécula de fosfoenolpiruvato, ocorre a formação do ácido corísmico (PERES, 2004). O ácido corísmico é responsável por gerar aminoácidos aromáticos, como a fenilalanina e a tirosina que, por sua vez, com a ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL), perde uma molécula de amônia, resultando na formação dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico (Figura 4). Esses

últimos, por meio de reduções enzimáticas, originam propenilbenzenos e/ou alilbenzenos, que por meio de reações de oxidação com degradação das cadeias laterais, geram diversos compostos presentes na constituição de muitos óleos essenciais (SIMÕES et al., 2007).

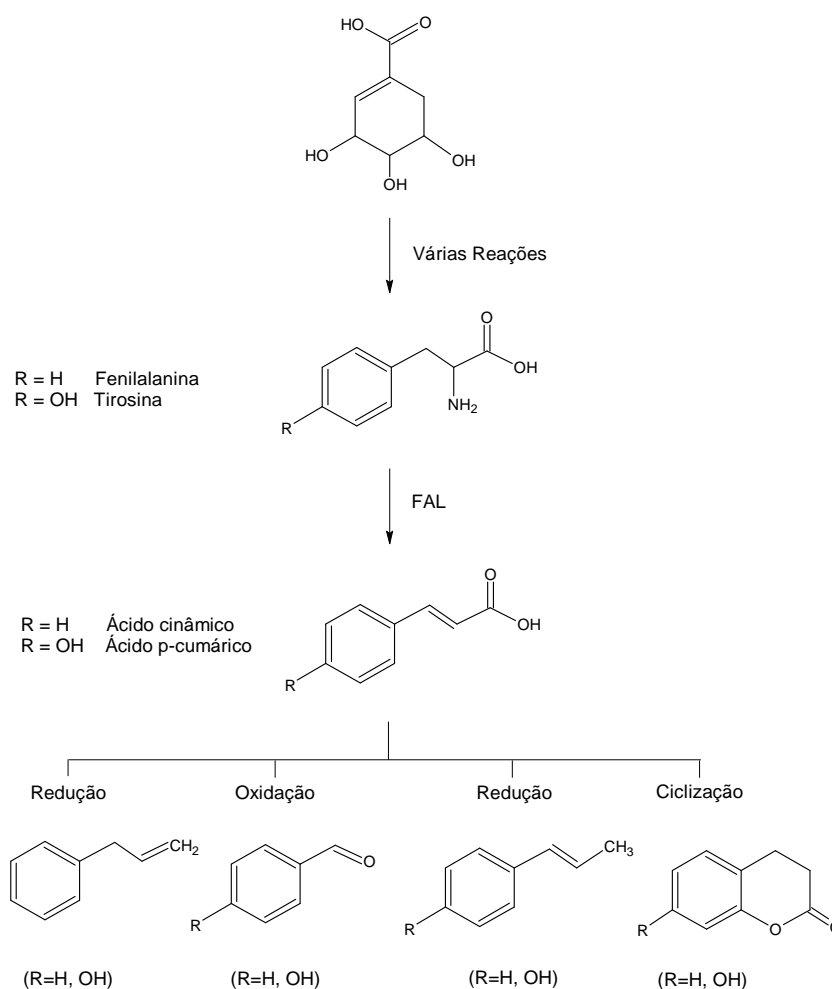


Figura 4 Mecanismo de formação da estrutura básica dos fenilpropanoides a partir do ácido chiquímico (Adaptado de Simões et al., 2007)

2.2.3 Mercado nacional e internacional dos óleos essenciais

O mercado de óleos essenciais é promissor para países que possuem uma grande biodiversidade, como o Brasil, e dispõem de condições para agregar valor às suas matérias-primas, transformando-as em produtos beneficiados. Os óleos essenciais possuem grande aplicação na indústria farmacêutica, alimentícia e cosmética. De maneira geral, atuam como coadjuvantes em medicamentos, são utilizados como aditivos alimentares para eliminar agentes patogênicos alimentares ou intensificadores de sabor e empregados como conservantes, devido às suas propriedades antioxidantes. São empregados principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias em composições farmacêuticas e orais, sendo comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, fornecendo substâncias purificadas como o limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (BIZZO et al., 2009).

Devido à escassez de matérias-primas, durante e após a Segunda Guerra Mundial, o desenvolvimento da indústria de óleos essenciais foi impulsionado. Já na segunda metade dos anos 50 e início da década de 60, diversas empresas e indústrias alimentícias instalaram-se no Brasil, aumentando a demanda interna por óleos essenciais. E, como o país passava por um processo de industrialização, algumas empresas produtoras de óleo essencial tiveram a iniciativa de introduzir espécies aromáticas no país (BIZZO et al., 2009).

Ao lado da China, Índia e Indonésia, o Brasil ocupa lugar de destaque na produção de óleos essenciais, devendo essa posição aos óleos extraídos de cítricos, que são subprodutos da indústria de sucos. Entretanto, no passado, o Brasil destacou-se também na produção de óleos essenciais de pau-rosa (*Aniba roseodora* var *amazonica* Ducke), sassafrás (*Sassafras albidum* (Nutt) Nees) e menta (*Mentha arvensis*), sendo atualmente importador dos dois últimos, pois no caso específico do pau-rosa, a disponibilidade de linalol sintético, a preços muito

baixos, limitou o mercado deste óleo à perfumaria fina, cuja demanda é reduzida (BIZZO et al., 2009).

De acordo com Bizzo et al. (2009), em relação à balança comercial brasileira, em 2008 foram exportados US\$ 309,5 milhões em óleos essenciais, versus US\$ 171,2 milhões importados, sendo 93% do valor obtido com as exportações oriundos de óleos essenciais de frutas cítricas. Evidencia-se, portanto, o domínio dos óleos cítricos no mercado brasileiro, cujos principais responsáveis pelo aroma e qualidade desse óleo essencial são o limoneno e o citral (LADANIYA, 2008).

2.3 Glândulas secretoras e acúmulo de óleos essenciais

Dependendo da espécie vegetal, os óleos essenciais podem estar presentes em diferentes partes da planta (Figura 5), como folhas, flores, madeira, ramos, galhos, frutos, rizomas e raízes. Após sua biossíntese, são armazenados em células e locais especiais como cavidades, canais e bolsas secretoras, além de tricomas e glândulas. Todos os órgãos de determinadas espécies podem conter óleo essencial, mas sua composição pode variar de acordo com a sua localização (SIMÕES, 2007). Ressalta-se que o desenvolvimento dessas estruturas especializadas pode estar relacionado com a fitotoxicidade de alguns terpenos, que, em elevadas concentrações, podem apresentar uma ação lesiva para as estruturas biológicas (LÜCKER, 2002).

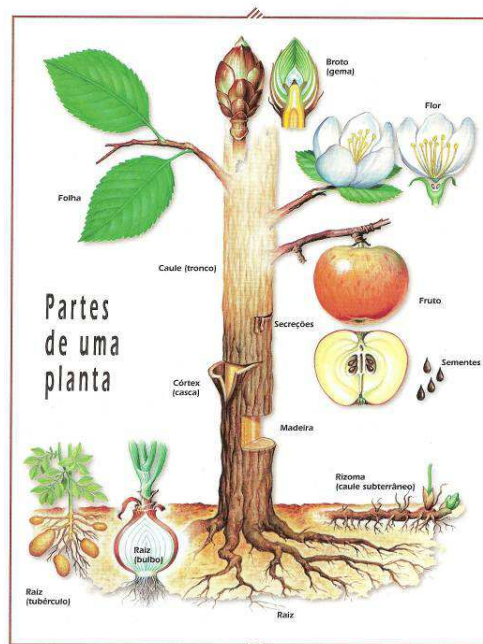


Figura 5 Aspecto geral de uma planta
 Fonte: ROGER, 1998

Essas estruturas histológicas podem ser divididas em dois tipos: aquelas que ocorrem na superfície da planta e secretam substâncias diretamente fora dela, como os pelos e os tricomas glandulares e, aquelas que ocorrem no interior do corpo da planta e secretam substâncias nos espaços intercelulares, como as cavidades secretoras, ductos secretores, células secretoras e bolsas lisógenas ou esquizógenas. As estruturas anatômicas nas quais os óleos essenciais são depositados evoluíram de células oleíferas, cavidades e canais secretores a tricomas glandulares, cujas estruturas caracterizam linhagens evolutivas de Angiospermas (GOTTLIEB e SALATINO, 1987; SVOBODA e GREENAWAY, 2003).

As cavidades secretoras são estruturas mais ou menos esféricas que podem ser formadas de duas maneiras: pela separação de uma das outras células parenquimáticas formando espaços intercelulares; ou pela modificação de uma célula formando uma cavidade com epiderme. Esses espaços são limitados por células secretoras que são responsáveis pela produção do óleo essencial. Os principais exemplos de óleos armazenados nesse tipo de estrutura são os óleos essenciais de espécies cítricas. Por outro lado, os ductos secretores são cavidades alongadas, resultantes da junção de várias cavidades secretoras, são revestidos por várias células adjacentes, estando entre essas células secretoras e células epiteliais; este tipo de estrutura pode ser encontrada em toda a família das Apiaceae (GOTTLIEB e SALATINO, 1987; SVOBODA e GREENAWAY, 2003).

Os tricomas (Figura 6) são apêndices epidérmicos muito variáveis em estrutura e de valor diagnóstico em taxonomia. Essas estruturas podem ser denominadas tricomas tectores ou não glandulares e tricomas glandulares. Os primeiros podem ser unicelulares e multicelulares. Os tricomas glandulares secretam substâncias de natureza lipofílica, geralmente óleos essenciais ricos em terpenoides. Muitas são as formas desses tricomas; normalmente são pequenos com o ápice multicelular arredondado ou achatado, composto de células cujo citoplasma é denso. Frequentemente, as secreções enchem um espaço subcuticular entre as células glandulares e a cutícula distendida. Usualmente compreendem o pedicelo ou pedúnculo, que pode ser uni ou multicelular, uni ou multisseriado; e a glândula, também uni ou multicelular, quando subdividida por paredes horizontais e verticais. A secreção pode permanecer no protoplasto ou acumular-se entre a cutícula e as paredes externas delgadas. Esses tricomas glandulares podem ser encontrados nas folhas, caules e até mesmo em determinadas partes das flores (APPEZZATO-DA-GLÓRIA e CARMELLO-GUERREIRO, 2006).

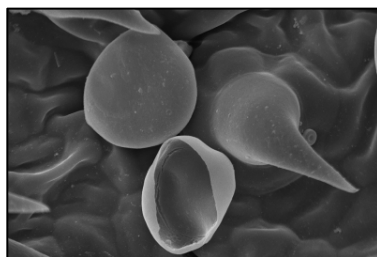


Figura 6 Aspecto geral de tricomas glandulares e de cobertura

A principal característica frequentemente utilizada para distinguir os tricomas glandulares é o tipo de produtos secretados ou absorvidos, que podem ser identificados *in situ* por meio de testes histoquímicos. O uso de parâmetros quantitativos simples pode possibilitar a distinção segura entre tricomas capitados e peltados (ASCENSÃO, 2007). Segundo Abu-Asab e Cantino (1987), tricoma capitado é aquele com comprimento do pedúnculo maior que metade da altura da cabeça.

Em processos de extração do óleo essencial de plantas frescas ou secas, o material vegetal é contactado com vapor (destilação a vapor) ou água em ebulição (método de hidrodestilação), o que resulta na ruptura dos tricomas glandulares e, conseqüentemente, na liberação das substâncias voláteis nele contidas (GASPAR, 2001), ou ainda, terminada a fase de secreção, as células glandulares sofrem, de um modo geral, degenerescência celular, o que leva ao colapso da cabeça glandular do tricoma e à sua perda de funcionalidade (ASCENSÃO, 2007).

2.4 Potencial antioxidante

O estresse redox é definido como um desequilíbrio dinâmico entre a produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio ou enxofre e a defesa do organismo por compostos antioxidantes, o que resulta na indução de danos celulares (OLIVEIRA et al., 2009).

Há diversos fatores associados ao estresse redox, como hábitos de vida inapropriados, condições ambientais inadequadas, envelhecimento, estados psicológicos que provoquem estresse emocional, patologias crônicas e degenerativas (OLIVEIRA et al., 2009).

Os antioxidantes são compostos químicos que possuem a capacidade de reagir com os radicais livres, minimizando seus efeitos maléficos no organismo. Podem ter origem endógena, sendo provenientes da dieta alimentar ou de outras fontes (SOUSA et al., 2007). Eles retardam a velocidade de oxidação por meio de um ou mais mecanismos, como inibição de radicais livres e complexação de metais (DUARTE –ALMEIDA et al, 2006).

O processo de oxidação dos lipídeos presentes nos alimentos ocorre durante o processamento e estocagem, devido à ocorrência de transformações químicas, como a hidrólise e a oxidação (BOBBIO; BOBBIO, 2001). Esse processo, denominado peroxidação lipídica, é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis nos alimentos, tornando-os impróprios para o consumo, além de provocar outras alterações que podem afetar a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, como também comprometer a integridade e segurança dos alimentos (RAMALHO e JORGE, 2006).

O surgimento de compostos indesejáveis, oriundos da oxidação lipídica, é um problema que deve ser solucionado para se obter um prolongamento da vida útil dos alimentos. Como consequência disso, tem-se desenvolvido uma

série de estudos para avaliar o potencial antioxidante de vários compostos, conhecer a concentração adequada, a influência do sistema lipídico e da temperatura, bem como possibilitar a substituição dos antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais (RAMALHO e JORGE, 2006).

Os compostos BHT (butilhidroxitolueno), BHA (butilhidroxianisol), GP (galato de propila) e TBHQ (tertbutilhidroxiquinona) são antioxidantes sintéticos utilizados em alimentos para inibir a oxidação química de seus componentes. A estrutura fenólica desses compostos (Figura 7) possibilita a doação de um próton para o radical livre, interrompendo o mecanismo de oxidação. Os derivados fenólicos tornam-se novos radicais, mas podem se estabilizar por meio da ressonância resultante da deslocalização dos elétrons na molécula, sem promover ou propagar reações de oxidação. Embora sejam muito utilizados na indústria, estudos toxicológicos têm demonstrado o potencial carcinogênico desses antioxidantes sintéticos em experimentos com animais. Em outros estudos, o BHA mostrou induzir hiperplasia gastrointestinal em roedores por um mecanismo desconhecido; em humanos, a relevância dessa observação não está clara. O TBHQ promoveu a redução do nível de hemoglobina e a hiperplasia de células basais (RAMALHO e JORGE, 2006).

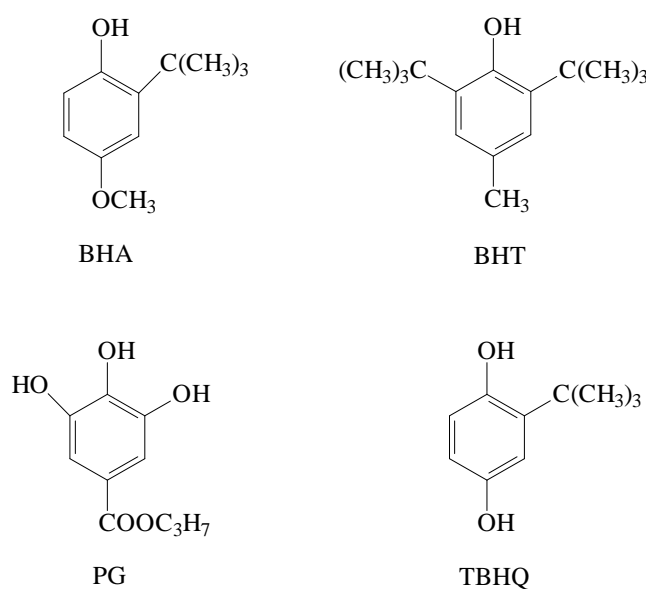


Figura 7 Estruturas químicas dos principais antioxidantes sintéticos

Nesse contexto, nota-se que os produtos naturais, em especial os óleos essenciais, são cada vez mais estudados como agentes antioxidantes, na tentativa de promover a substituição dos sintéticos ou fazer associações entre eles e propiciar o desenvolvimento de técnicas que reduzam os efeitos negativos de substâncias sintéticas consideradas malélicas à saúde.

Os compostos responsáveis pela atividade antioxidante atribuída a alguns óleos essenciais são aqueles que possuem em sua estrutura um ou mais grupos hidroxila (OH) ou grupos metoxila (CH₃O) ligados ao anel aromático, insaturações ou elétrons disponíveis para serem doados (CARVALHO, 2004). Aqueles que possuem hidroxila ligada ao anel aromático apresentam caráter ácido, sendo assim, capazes de doar átomos de hidrogênio, cujo radical formado é estabilizado por estruturas de ressonância. O grupo metóxi é um forte grupo

doador de elétron, o que aumenta a estabilidade do anel benzênico, resultando em aumento da atividade sequestradora de radicais livres (ZHANG et al., 2006).

Os ensaios antioxidantes utilizados podem ser classificados em duas categorias; aqueles que se baseiam na transferência direta de hidrogênio (métodos diretos); e ensaios baseados na transferência de elétrons (métodos indiretos). Diferentes metodologias têm sido desenvolvidas para obter medições qualitativas ou quantitativas da capacidade antioxidante dos compostos, utilizando testes químicos. Entre os principais testes existentes, nas análises representantes dos métodos diretos, encontram-se os ensaios de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico e de formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS). Entre os representantes dos métodos indiretos, cita-se aquele que monitora o consumo do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) pelas amostras analisadas (HUANG et al., 2005).

Guimarães et al. (2011), avaliando a atividade antioxidante do óleo essencial do capim-limão e do seu composto majoritário, citral, não observaram atividade perante metodologia que avalia a redução do radical estável DPPH. No entanto, utilizando a metodologia que emprega o sistema emulsificado β -caroteno/ácido linoleico, tanto o óleo essencial quanto o citral demonstraram atividades antioxidantes significativas, apresentando 46,45% e 38,0% de atividade na concentração de $100\mu\text{g L}^{-1}$ para o óleo essencial e para o citral, respectivamente.

Piaru et al. (2012) estudaram a atividade antioxidante do óleo essencial de *Myristica fragrans* e *Morinda citrifolia* utilizando o ensaio β -caroteno/ácido linoleico e encontraram valores de 88,68% e 69,44% de atividade para as espécies, respectivamente.

Lima et al. (2012), analisando os óleos essenciais de *Myristica fragrans* e *Salvia microphylla*, não observaram atividade antioxidante pela metodologia DPPH, mas a atividade foi evidenciada pelo teste ensaio β -caroteno/ácido

linoleico para o óleo de *M. fragrans*, com CI_{50} 976 $\mu\text{g mL}^{-1}$, e para o óleo de *S. microphylla*, com CI_{50} 976 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Ressalta-se, porém, que um composto para ser utilizado como antioxidante deve apresentar eficácia em baixas concentrações, não causar efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características dos alimentos. Deve ser compatível com o alimento e de fácil aplicação, além de ser estável nas condições de processo e armazenamento (RAMALHO e JORGE, 2006). Deve-se também levar em consideração a matriz alimentícia que os óleos essenciais serão inseridos, uma vez que são compostos instáveis, podem ocorrer reações de oxidação, polimerização ou outro tipo de alteração estrutural (BAKKALI et al, 2008).

2.5 Atividade antibacteriana

Atualmente, a alimentação tem sido motivo de preocupação, especialmente no que diz respeito à contaminação de alimentos por bactérias patogênicas. A OMS (Organização Mundial de Saúde) tem alertado para a necessidade de diminuir a contaminação de alimentos por agentes biológicos com potencial para causar danos à saúde.

Por possuírem um papel importante na economia mundial, os alimentos devem ser elaborados conforme os padrões sanitários, que apresentem boa qualidade e segurança física, química, e biológica, uma vez que são excelentes substratos que podem propiciar o desenvolvimento de numerosas espécies e variedades de micro-organismos (FORSYTHE, 2005).

A resistência bacteriana aos antibióticos está se tornando cada vez mais frequente, limitando as opções terapêuticas dos processos infecciosos (CUNICO et al., 2004). Esse fato é decorrente de uma evolução natural devido ao uso intenso de fármacos, o que representa um grande problema com relação aos

tratamentos existentes no mercado. Há a preocupação de não haver classes de antibióticos que possuam efeito contra populações resistentes de bactérias (COELHO et al., 2004). Assim, ressalta-se a importância da descoberta de novos compostos ativos com atividade antimicrobiana.

Nesse contexto, destacam-se os estudos com óleos essenciais, uma vez que possuem propriedades antibacterianas interessantes. A atividade de alguns óleos essenciais ainda não é reconhecida, embora muitos estudos *in vitro* vêm sendo realizados e relatam a eficácia dos óleos essenciais sobre bactérias patogênicas. Millezi et al. (2012) pesquisaram a atividade e composição química dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* (tomilho), *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e *Laurus nobilis* (louro) sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella enterica* Enteritidis e *Pseudomonas aeruginosa*. O óleo essencial de *C. citratus* demonstrou atividade bacteriana em todas as concentrações testadas e sobre todas as bactérias, sendo seu constituinte majoritário o citral, uma mistura isomérica de geranial e neral. O constituinte majoritário de *T. vulgaris* foi 1,8-cineol e do óleo essencial de *L. nobilis*, que apresentou menor atividade antibacteriana, foi o linalol, seguido pelo 1,8-cineol. As bactérias Gram-negativas demonstraram maior resistência com o uso dos óleos essenciais testados neste estudo. A *E. coli* foi a menos sensível, sendo inibida apenas pelos óleos de *C. citratus* e *L. nobilis*.

Andrade et al. (2012) testaram o efeito dos óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon nardus*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e gengibre (*Zingiber officinale*) sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella Cholerasuis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Constataram que os óleos essenciais apresentaram atividade antibacteriana tanto para bactérias Gram-negativas como para bactérias Gram-positivas, sendo o óleo

essencial de *C. zeylanicum* o mais eficiente, apresentando como componentes majortitários o (E)- cinamaldeído, acetato de (E)-cinamila e 1,8-cineol.

Recentemente, tem sido desenvolvidas pesquisas sobre a atividade antimicrobiana *in vivo*, demonstrando uma possível utilização de óleos essenciais como conservantes naturais em alimentos e como soluções sanificantes na remoção de biofilmes bacterianos. Oliveira et al. (2011) estudaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Satureja montana* L. contra *Clostridium perfringens* tipo A inoculado em mortadelas formuladas com diferentes níveis de nitrato de sódio (NaNO₂). Pelos resultados obtidos, infere-se que o uso potencial combinado de óleo essencial e quantidades mínimas do aditivo sintético, NaNO₂, controla *C. perfringens* usualmente presente em mortadelas.

Oliveira et al. (2012) avaliaram a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Cinnamomum cassia* e do composto cinamaldeído em biofilme formado por *Listeria monocytogenes* e *Escherichia coli* em superfície de aço inoxidável. A atividade do óleo essencial e do cinamaldeído foi, na maioria dos casos, equivalente ou superior à dos desinfetantes químicos testados. Assim, ambos demonstraram ser alternativas eficientes para higienizadores químicos comerciais na redução ou eliminação de células de bactérias sésseis.

2.5.1 *Escherichia coli*

A bactéria *Escherichia coli* foi isolada pela primeira vez em 1885, pelo bacteriologista alemão Theodor Escherich e denominada de “*Bacterium coli* comune”, ganhando posteriormente o nome do seu descobridor (KONEMAN et al., 2001).

Escherichia coli é uma bactéria Gram-negativa, possui forma bacilar, pertence à família Enterobacteriaceae, caracterizando-se por apresentar

metabolismo anaeróbio facultativo, podendo ser móvel ou imóvel (ANDREATTI FILHO, 2007). Essa espécie inclui cepas não patogênicas, que são comensais inofensivos presentes na microbiota do trato intestinal de humanos e animais e, cepas altamente patogênicas, que são produtoras de toxinas, responsáveis por provocar surtos de doenças em humanos e animais com considerável taxa de mortalidade. A presença de cepas não patogênicas em alimentos e na água indica contaminação direta ou indireta de origem fecal, e em função disso, é utilizada como indicador clássico da possível presença de micro-organismos patogênicos (TORTORA, 2000).

De modo geral, as *E. coli* podem ser classificadas como diarreio gênicas, que tem seu mecanismo de patogenicidade estabelecido no intestino ou como patogênicas extraintestinais, com capacidade de colonização e disseminação para outros sítios orgânicos, ocasionando infecções do trato urinário, inflamação generalizada e meningite (JOHNSON; RUSSO, 2005; WILES; KULESUS; MULVEY, 2008).

Além disso, entre as *E. coli* que ocasionam diarreias, a combinação de fatores de virulência possibilita a classificação das cepas em ETEC (enterotoxigênica), EPEC (enteropatogênica), EHEC (enterohemorrágica), VTEC (produtora de verotoxina), EIEC (enteroinvasiva), EAaggEC ou EAEC (enteroagregativa), DAEC (difusamente aderente) (NATARO e KAPER, 1998).

2.5.2 *Listeria monocytogenes*

O gênero *Listeria* possui seis espécies descritas: *L. monocytogenes*, *L. ivanovii*; *L. innocua*; *L. seeligeri*, *L. welshimeri* e *L. grayi*, sendo a espécie *Listeria monocytogenes* uma espécie patogênica aos seres humanos, e que causa grande preocupação no que diz respeito às enfermidades causadas por alimentos (PINHO; DEGENHARDT; SMÂNIA JÚNIOR, 2006).

A *L. monocytogenes* apresenta-se na forma de bastonetes curtos Gram-positivos de 0,4 a 0,5 μm de diâmetro e 0,5 a 2,0 μm de comprimento, com extremidades arredondadas que podem ou não apresentar forma filamentosa, desenvolvendo em uma faixa ampla de 0 a 42°C. Encontra-se amplamente difundida em plantas, em alimentos, como legumes e frutas, tanto crus como processados, queijos e leite, carnes e também frutos do mar (FORSYTHE, 2005).

A listeriose é uma doença causada pela bactéria *L. monocytogenes*. Efetivamente, sua origem foi comprovada em 1981, sugerindo que a contaminação de alimentos fosse a principal fonte do micro-organismo (GUERRA; BERNARDO, 2004). Em humanos, é vista como uma doença invasiva em grupos de risco bem definidos, afetando, principalmente, indivíduos imunodeprimidos, gestantes e idosos. Manifesta-se por gastroenterites, meningites, encefalites, infecções transmitidas da gestante para o feto e septicemias, resultando na morte de 25 a 30% dos casos (LOGUERCIO et al., 2001; KHELEF et al., 2005).

2.5.3 *Salmonella Choleraesuis*

O gênero *Salmonella* é pertencente à família Enterobacteriaceae e apresenta-se na forma de bacilos Gram-negativos, não esporulados, anaeróbios facultativos e geralmente móveis, com presença de flagelos peritríquios, não capsulados, oxidase negativa e catalase positiva. Está amplamente distribuído na natureza; já foi isolado dos vertebrados, sendo o homem e os animais seus reservatórios primários (GRIMONT et al., 2000; CAMPOS, 2005).

Ao longo dos anos, a classificação taxonômica do gênero *Salmonella* sofreu várias modificações e ainda não está totalmente definida. Pode ser dividido em três espécies: *Salmonella enterica*, *S. bongori* e *S. subterranea*. A

espécie *Salmonella enterica*, por sua vez, é dividida em seis subespécies: *enterica*, *salamae*, *arizonae*, *diarizonae*, *houtenae* e *indica* (REEVES et al., 1989).

A espécie *Salmonella enterica* subsp. *enterica* apresenta mais de 2.500 sorovares classificados conforme sua fórmula antigênica. A denominação dos sorovares é, muitas vezes, derivada da localização geográfica do primeiro relato de isolamento (GRIMONT, et al., 2000).

A *Salmonella Cholerasuis* é uma *Salmonella enterica* sorovar Cholerasuis. Constitui-se como patógeno intracelular facultativo de suínos, o que resulta, na maioria das vezes, em graves infecções invasivas em humanos (CHIU; SU; CHU, 2004). Essa espécie tem propensão de invadir a corrente sanguínea e ocasionar febre, diarreia, letargia e problemas respiratórios (SCHWARTZ, 1999). Pode causar infecções sistêmicas em humanos. Os avanços nas técnicas de diagnóstico, cuidados cirúrgicos e terapias antimicrobianas têm melhorado a qualidade de vida dos pacientes acometidos pela infecção.

2.5.4 *Staphylococcus aureus*

A espécie *Staphylococcus aureus* é muito conhecida devido à sua patogenicidade frente ao homem e animais. Foi estudada pela primeira vez por Denys em 1894 e, posteriormente, por Barber, em 1914, mas, somente em 1930, foi definitivamente reconhecida a importância dos estafilococos na intoxicação alimentar (JAY, 2000).

O gênero *Staphylococcus* apresenta cerca de 30 espécies, das quais 17 podem ser isoladas de amostras biológicas humanas, sendo as espécies mais comuns *Staphylococcus epidermidis*, *Staphylococcus saprophyticus* e *Staphylococcus aureus* (KONEMAN et al., 2001).

As bactérias do gênero *Staphylococcus* são cocos Gram-positivos, pertencentes à família Micrococcaceae. São facultativos anaeróbios, com maior crescimento sob condições aeróbias, quando, então, produzem a enzima catalase.

A bactéria *Staphylococcus aureus* é um dos agentes patogênicos mais comuns. Está amplamente distribuída na natureza e os humanos e animais são seus principais reservatórios (IARIA et al., 1980).

As infecções causadas por *S. aureus* são de extrema relevância pela capacidade das cepas desenvolverem resistência à oxacilina, um antibiótico pertencente ao grupo das penicilinas resistentes à betalactamase e penicilinase estafilocócica. Esses organismos resistentes podem ser encontrados colonizando as vias nasais e garganta (BROOKS, 2000; HARDY et al., 2004).

A disseminação de *S. aureus* pode ser prevenida pela higienização e assepsia rigorosa das mãos, principalmente dos profissionais da saúde que são o veículo mais comum para a transmissão de MRSA (*S. aureus* resistente à meticilina) (HARDY, 2004).

2.6 Atividade inseticida dos óleos essenciais

As monoculturas ocupam vastas áreas do planeta. Essas culturas, muitas vezes, são atacadas por insetos herbívoros, cujas populações ocasionam danos econômicos, tornando-se pragas. O principal método de controle às pragas consiste na utilização de produtos sintéticos, o que ocasiona, em geral, contaminação do ambiente, redução de inimigos naturais, intoxicações do produtor rural e do consumidor (ALTIERI et al., 2003).

Sabe-se atualmente que o conhecimento dos danos causados pelo uso indiscriminado de produtos sintéticos, associado à preocupação dos consumidores quanto à qualidade dos alimentos, tem motivado estudos relacionados a novas técnicas de controle de pragas.

O uso de produtos naturais como matéria-prima para a síntese de substâncias bioativas tem sido amplamente relatado, destacando-se os produtos de origem botânica, cuja diversidade de estruturas químicas permite sua utilização como importantes fontes de recursos para a produção de novos agentes inseticidas.

Os inseticidas naturais são cada vez mais requisitados, uma vez que apresentam vantagens quando comparados ao emprego de inseticidas sintéticos. São obtidos de recursos renováveis e rapidamente degradados, não deixando resíduos em alimentos e no meio ambiente. O desenvolvimento desses compostos requer tempo e também um estudo sistematizado que preencha vários requisitos, tais como seletividade contra inimigos naturais, baixa toxicidade em mamíferos e biodegradabilidade, além dos requisitos econômicos para que sua produção em alta escala seja viável (VIEIRA et al., 2001). Dessa maneira, alguns estudos com óleos essenciais promissores com atividade inseticida vêm sendo realizados.

Soares et al. (2012) pesquisaram a atividade inseticida dos óleos essenciais dos frutos de anis-estrelado, *Illicium verum*, e de pimenta-longa, *Piper hispidinervum*, sobre o pulgão, *Macrosiphum euphorbiae*. Os óleos essenciais estudados demonstraram atividade inseticida; porém, a mortalidade dos pulgões variou significativamente para cada óleo, sendo o óleo essencial de anis-estrelado mais eficaz que o de pimenta-longa.

Lima et al. (2010) avaliaram a toxicidade do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* nas concentrações de 0,1; 0,5; 1; 2 e 3% para a lagarta-do-cartucho de milho *Spodoptera frugiperda*. No teste de ingestão de seções de folha de milho tratadas, o óleo essencial apresentou atividade inseticida para a lagarta, causando mortalidade acima de 70%, a partir da concentração de 0,5%.

Lima et al. (2009) realizaram testes de ingestão do óleo essencial de pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) e contato tópico em lagartas-do-

cartucho do milho no 1° e 3° ínstar. Os bioensaios demonstraram sua atividade inseticida para *S. frugiperda*, causando mortalidade e redução alimentar pelo teste de ingestão e toxicidade aguda pelo teste de aplicação tópica. Observaram-se também sintomas de neurotoxicidade, como agitação, hiperatividade e o efeito knock-down, em que as lagartas ficaram imóveis por aproximadamente oito horas e, em seguida, voltaram à sua atividade normal.

Castro et al. (2006) verificaram a ocorrência de não preferência para a alimentação de *Spodoptera frugiperda* na presença dos óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. (mil-folhas) e *Thymus vulgaris* L. (tomilho). Observaram também que o óleo essencial de mil-folhas foi altamente atrativo à *Spodoptera frugiperda*, apesar de não ter estimulado a alimentação. Por outro lado, o óleo essencial de tomilho apresentou efeito repelente.

2.6.1 *Diabrotica speciosa*

Diabrotica speciosa (Figura 8) é a principal espécie praga do feijoeiro e de algumas olerícolas, sendo disseminada em todos os estados brasileiros e outros países da América do Sul. Segundo Milanez (1987), *D. speciosa* pode provocar perdas totais nas lavouras de feijão, particularmente nos cultivos de safrinha. No Brasil, além do feijoeiro, esse inseto-praga tem sido registrado causando danos em lavouras de milho, soja, amendoim, batata e cucurbitáceas (MILANEZ; PARRA, 2000).

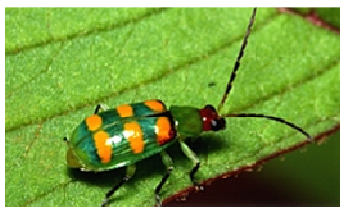


Figura 8 Aspecto visual da espécie *Diabrotica speciosa*

A espécie *Diabrotica speciosa* (Coleoptera: Chrysomelidae) é um besouro que, na fase adulta, é conhecido popularmente como vaquinha, patriota ou brasileirinho, devido à coloração de seu corpo. A larva é denominada de larva alfinete, por apresentar o corpo alongado e fino. Apresenta ciclo biológico de dois meses e fecundidade superior a 400 ovos por fêmea. As fêmeas depositam seus ovos próximos da base das plantas hospedeiras, cujas raízes são consumidas pelo inseto em sua fase larval (GASSEN, 1996).

Hohmann e Carvalho (1989) afirmam que o consumo médio de folhas de feijão por *D. speciosa* é de 0,70 cm² por dia. Dados evidenciam que, na fase inicial da cultura (uma semana após a emergência), dois insetos por planta já podem provocar desfolha de até 16% em 24 horas de alimentação (SILVA et al., 2003).

As leguminosas, incluindo o feijoeiro, e as cucurbitáceas, estão entre as espécies mais atrativas para os adultos de *D. speciosa*, principalmente na fase de germinação e desenvolvimento inicial. Em infestações severas, esse inseto pode causar a morte das plantas (QUINTELA, 2004). Além do dano causado pelo consumo alimentar, *D. speciosa* é conhecida como vetor de viroses para diversas espécies de plantas, incluindo o mosaico-virótico dos feijões e doenças bacterianas (WALSH, 2003).

O controle desse inseto é realizado basicamente por meio de frequentes pulverizações com inseticidas sintéticos. Entretanto, ressalta-se a importância de se estudar inseticidas naturais, pois já são conhecidos compostos que apresentam impacto ambiental reduzido, ausência de resíduos nos alimentos, ausência de efeitos prejudiciais sobre organismos benéficos e que não estão relacionados ao aparecimento de resistência (VENDRAMIM; CASTIGLIONI, 2000).

2.7 *Chenopodium ambrosioides* L.

Entre as espécies vegetais promissoras para utilização no controle de pragas, destaca-se a espécie *Chenopodium ambrosioides* L. (Figura 9) (TAVARES; VENDRAMIM, 2005).

O gênero *Chenopodium* é considerado cosmopolita, provavelmente originário do México, cultivado e encontrado em beira de estradas e em terrenos abandonados.

A espécie *Chenopodium ambrosioides* L. é uma planta da família das Chenopodiaceas e é conhecida popularmente no Brasil como erva-de-santa maria, mentruz, anserina vermífuga, ambrósia, erva-lombrigueira, chá-do-México e quenopódio, sendo seu uso largamente difundido em todo o país (DI STASI et al., 1989).

Essa espécie vegetal apresenta hábito herbáceo, com até um metro de altura, caule piloso e sulcado, folhas inteiras e simples; as superiores são sésseis e as inferiores pecioladas, com dimensões variadas e providas de pelos (PACIORNIK, 1990).

Mazzonetto e Vendramin (2003) estudaram o potencial de 18 espécies vegetais na sobrevivência de *Acanthoscelides obtectusdentre*, entre elas a espécie *Chenopodium ambrosioides*. Foram colocados casais de insetos em algumas caixas contendo 0,3 g de pó de partes aéreas de cada espécie vegetal,

por um período de cinco dias, observando sua toxicidade. A espécie *C. ambrosioides* foi a mais efetiva, provocando repelência, mortalidade total dos adultos e nenhuma oviposição.

Borges et al. (2012), realizando ensaios biológicos *in vitro*, apontaram uma relevante atividade tripanocida do óleo essencial de *C. ambrosioides*, extraído de plantas provenientes do Nordeste brasileiro.



Figura 9 Aspecto geral da espécie *Chenopodium ambrosioides* L.

2.8 *Philodendron bipinnatifidum* Schott

A família Araceae é constituída por 108 gêneros e por aproximadamente 3700 espécies monocotiledôneas herbáceas e trepadeiras, que, em sua maioria, são de ocorrência tropical ou subtropical (CORRÊA et al., 2005). É representada por plantas terrestres, epífitas, hemiepífitas ou aquáticas flutuantes. Possuem caule muito curto ou longo, aéreo, ereto, reptante ou subterrâneo do tipo rizoma ou tubérculo. Caracteriza-se pelo dimorfismo radicular, ou seja, apresentam raízes curtas grampiformes que se aderem intimamente ao substrato, ou raízes

longas, alimentadoras, que descem ao solo com a finalidade de absorver água e nutrientes (COELHO, 2000; SAKURAGUI et al., 2007).

O gênero *Philodendron* Schott é um dos mais importantes da família Araceae, não apenas em termos de representatividade, mas também pela sua importância para a floricultura como planta ornamental e pela beleza de suas folhagens. A origem do nome *Philodendron* significa amante (*philo*) das árvores (*dendron*), com base em seu hábito epifítico. Engloba aproximadamente 700 espécies formalmente reconhecidas, constituindo-se, assim, o segundo maior gênero da família depois de *Anthurium* Schott (BLANCO; VALVERDE, 2004).

A espécie *Philodendron bipinnatifidum* Schott (Figura 10) é amplamente distribuída no Brasil. Possui raízes escoras, pelas quais se apoiam em um suporte, e raízes de absorção (VIANNA et al, 2001). É uma planta moderadamente tóxica (principalmente as folhas), mas apesar disso, seu fruto é saboroso. Entre os nativos e remanescentes do meio rural brasileiro, o extrato é utilizado na pesca, uma vez que as folhas maceradas, quando jogadas nas águas, provocava o entorpecimento dos peixes que, assim, flutuavam na superfície, facilitando a pesca. De suas raízes também é comum o uso para a confecção de cestos, barbantes, entre outros, mas, atualmente, seu uso restringe-se à ornamentação e jardinagem.

Entre as espécies do gênero *Philodendron*, encontram-se registrados constituintes químicos, como miristoleato de etila, α -bisabolol, isopalmitato de etila, 3-octadecenilfenol e palmitato de etila para a espécie *Philodendron imbe* Schott, além de outros constituintes, como alguns limonoides com atividade bactericida, encontrados na espécie *Philodendron amurense*. Existem estudos descritos na literatura sobre atividades antiprotozoárias de extratos de várias espécies, com destaque para a espécie *Philodendron bipinnatifidum* Schott, contra *Trypanosoma cruzi* e *Trichomonas vaginalis* (FEITOSA et al., 2007). Entretanto, são escassos na literatura trabalhos sobre a composição química e

potencialidades biológicas dos óleos essenciais do gênero *Philodendron*, em especial da espécie *Philodendron bipinnatifidum* Schott.



Figura 10 Aspecto geral da espécie *Philodendron bipinnatifidum* Schott

3 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Lavras (UFLA), no Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais, do Departamento de Química (DQI); Laboratório de Micologia, do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA); Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos, do Departamento de Entomologia (DEN); Laboratório de Anatomia Vegetal, do Departamento de Biologia (DBI); Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural, do Departamento de Fitopatologia (DFP); em parceria com o Departamento de Biologia Vegetal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa- Portugal.

3.1 Coleta e preparação do material vegetal

As folhas da planta *Chenopodium ambrosioides* L. foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras. A cidade de Lavras localiza-se no sul do estado de Minas Gerais (Brasil), 21°14'S, longitude 45°00'W Gr. e 918 m de altitude.

As raízes da espécie *Philodendron bipinnatifidum* Schott foram coletadas em uma propriedade rural, no município de Pains-MG. A cidade de Pains localiza-se no Centro-Oeste do estado de Minas Gerais (Brasil), 20°22'13''S, longitude 45°65'71''W Gr. e 923 m de altitude.

Os materiais vegetais foram coletados em um dia ameno e sem precipitação e foram selecionados de acordo com um grau de homogeneidade e quanto à sua sanidade. As folhas foram picadas e as raízes foram cortadas em pedaços pequenos e uniformes, de modo a aumentar a superfície de contato durante o processo de extração. Em seguida, o material foi pesado para o cálculo do rendimento.

A ratificação taxonômica das espécies em estudo (Figura 11) foi realizada no Herbário ESAL (Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras-MG). Uma exsicata de cada espécie foi incorporada ao acervo do referido herbário com um número de registro ESAL 26769 para a espécie *Chenopodium ambrosioides* L. e registro ESAL 27111 para a espécie *Philodendron bipinnatifidum* Schott.



Figura 11 Exsicatas das plantas coletadas a) *Chenopodium ambrosioides* L; b) *Philodendron bipinnatifidum* Schott

3.2 Extração dos óleos essenciais

O processo de extração dos óleos essenciais foi realizado no Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais (DQI) da UFLA. O método utilizado foi o de hidrodestilação, utilizando um aparelho de Clevenger modificado, acoplado a um balão de fundo redondo com capacidade de 5L (Figura 12). A extração foi realizada em triplicata por um período de 2 horas. Após esse

período, coletou-se o hidrolato, que foi centrifugado em centrífuga de cruzeta horizontal a 1100 x g por 5 minutos. O óleo essencial foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e acondicionado em um frasco de vidro, o qual foi envolto com papel-alumínio e armazenado sob refrigeração (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2000).

O rendimento da extração dos óleos essenciais foi determinado em porcentagem peso/peso (%p/p) em base livre de umidade (BLU), utilizando a seguinte equação:

$$\%R = \frac{100 \times \text{peso do óleo}}{\{[\text{peso da amostra} - (\text{peso da amostra} \times \text{umidade})] / 5\}}$$

Em que: R= rendimento do óleo essencial (base livre de umidade)



Figura 12 Processo de extração do óleo essencial (hidrodestilação)

3.3 Determinação da umidade

Para a determinação da umidade das folhas e das raízes, utilizaram-se 5 g de cada amostra em triplicata, emergidas em um balão de fundo redondo (250 mL) contendo 70 mL de cicloexano. Após o processo de destilação, realizado por 2 horas, quantificou-se o volume de água presente no material vegetal, por meio de um coletor de vidro tipo Dean Stark (trap para destilação) (Figura 13). A umidade foi calculada extrapolando o teor de água para 100 g da amostra (PIMENTEL et al., 2006).



Figura 13 Sistema para determinação da umidade

3.4 Caracterização química dos óleos essenciais

As análises cromatográficas para identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais foram realizadas no Departamento de Biologia Vegetal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa- Portugal.

3.4.1 Identificação dos constituintes dos óleos essenciais

Nas análises de Cromatografia Gás-Líquido/Espectrometria de Massas (CGL/EM), foi utilizado um cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem XL, equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1(30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc.) acoplado a um espectrômetro de massas Perkin Elmer Turbomass (versão do software 4.1). A temperatura do forno foi programada de 45 a 175°C, aumentando 3°C/min, e subsequentemente 15°C/min até 300°C. Atingidos 300°C, a temperatura foi mantida constante durante 10 min; temperatura da linha de transferência, 280°C; temperatura da câmara de ionização, 220°C; gás de arraste, hélio, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s e relação de repartição de fluxo, 1:40.

Os compostos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção em relação aos dos n-alcanos C₈-C₂₅ e espectros de massa e por comparação com uma biblioteca de espectros de massa desenvolvida no laboratório do Centro de Biotecnologia Vegetal, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (MOURA, 2011).

3.4.2 Quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram analisados por Cromatografia Gás-Líquido (CGL), num cromatógrafo Perkin Elmer 8700 equipado com dois detectores de

ionização de chama (DIC), um sistema de tratamento de dados e um injetor, no qual foram instaladas duas colunas de polaridade diferente com as seguintes características:

- DB-1 de sílica fundida, de fase imobilizada em metilsilicone (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 μm ; J & W Scientific Inc.);
- DB-17HT de fase imobilizada em fenilmetilsilicone (30 m x 0,25 mm d.i.).

A temperatura do forno foi programada de 45°C a 175°C, aumentando 3°C/min, e subsequentemente 15°C/min até 300°C. Atingidos 300°C a temperatura foi mantida constante durante 10 min. A temperatura do injetor e dos detectores foram de 290°C e 280°C, respectivamente. Utilizou-se hidrogênio como gás de arraste, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s e a relação de repartição de fluxo foi de 1:50.

A composição percentual dos óleos essenciais foi determinada usando o método da normalização, pela integração das áreas dos picos sem utilização de fatores de correção. Os valores apresentados correspondem ao valor médio de duas injeções (MOURA, 2011).

3.5 Análises morfológicas

As análises morfológicas foram feitas por meio de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), realizadas no Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural do DFP/UFLA, utilizando um microscópio eletrônico de varredura LEO EVO 40.

Para as análises, foram utilizadas folhas frescas do quarto nó da planta *C. ambrosioides* L. e raízes frescas da espécie *P. bipinnatifidum*, as quais foram lavadas em água corrente e cortadas em dimensões aproximadas 0,5 x 0,5 cm. Os materiais foram imersos em solução fixativa Karnovsky modificado (glutaraldeído 2,5%, formaldeído 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,05M e

CaCl₂ 0,001M) (KARNOVSKY, 1965), pH 7,2, por um período de 24 horas. Após esse período, os materiais foram lavados três vezes em tampão cacodilato 0,05M, sendo de 10 minutos o tempo para cada lavagem. Em seguida, foram transferidos para uma solução de tetróxido de ósmio (OsO₄) 1,0% em água por um período de 1 hora.

Posteriormente, lavaram-se os materiais em água destilada por três vezes e com soluções aquosas de acetona nas concentrações de 25%, 50%, 75% e 90% (uma vez cada uma), 100% (três vezes), permanecendo 10 minutos em cada tratamento. Após a desidratação, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico Balzers CPD 030 para substituição da acetona por CO₂ e complementação da secagem (ROBARDS, 1978). Os espécimes obtidos foram montados em stubs com fita de carbono sobre uma película de papel alumínio e cobertos com ouro no evaporador Balzers SCD 050, sendo posteriormente, observados em Microscópio Eletrônico de Varredura.

3.6 Análises anatômicas e histoquímicas

Os estudos anatômicos e histoquímicos das folhas frescas do quarto nó da espécie *C. ambrosioides* L. e das raízes da espécie *Philodendron bipinnatifidum* Schott foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal do DBI/ UFLA, utilizando microscópio fotônico.

3.6.1 Anatomia vegetal

Os materiais vegetais foram coletados e, em seguida, armazenados em solução de etanol 70%. Foram feitas seções transversais e paradérmicas. As seções paradérmicas das faces abaxial e adaxial da epiderme foliar (espécie *C. ambrosioides* L.) e as seções paradérmicas das raízes (espécie *P. bipinnatifidum*

Schott) foram obtidas utilizando lâminas de aço. Em seguida, foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio 50%, lavadas em água destilada e coradas com solução de safranina 1% (JOHANSEN, 1940). As seções transversais das folhas, retiradas da região mediana contendo a nervura central, e as seções transversais das raízes, foram obtidas com auxílio de micrótomo de mesa modelo LPC. Posteriormente, as seções foram clarificadas em solução de hipoclorito de sódio 50%, lavadas em água destilada e coradas com solução de safrablau (safranina 1,0% e azul de Astra 0,1%, na proporção de 7:3 (BURGER e RICHTER, 1991 e BUKATSCH, 1972). Em ambos os casos, as seções coradas foram montadas com lâmina e lamínula em gelatina glicerinada, sendo as lâminas fotografadas em câmera Moticam 2500 acoplada ao microscópio modelo Olympus CX31.

3.6.2 Estudos histoquímicos

Os materiais vegetais frescos foram submetidos às secções transversais com auxílio de micrótomo de mesa modelo LPC, sendo as observações realizadas em um microscópio fotônico (modelo Olympus CX31) com câmera fotográfica acoplada (Moticam 2500).

3.6.2.1 Análise qualitativa para detecção de compostos fenólicos

As seções transversais obtidas foram transferidas para a lâmina e coradas com cloreto férrico III (10%). Em seguida, adicionou-se a lamínula e as lâminas foram imediatamente fotografadas (JOAHANSEN, 1940).

Os compostos fenólicos complexam o Fe^{3+} formando precipitados, cuja coloração pode variar do verde intenso, púrpura, azul a negro (Figura 14) (FIGUEIREDO et al., 2007).

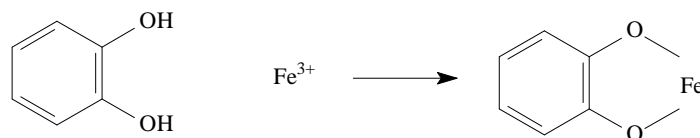


Figura 14 Reação de compostos fenólicos com cloreto férrico
(Adaptado Figueiredo et al., 2007)

3.6.2.2 Análise de lipídeos

As seções transversais foram transferidas para solução de etanol 70% e, em seguida, corados com Sudan IV. As seções foram, então, lavadas em etanol 70% e montadas entre lâmina e lamínula com glicerina 50% (GERLACH, 1984). As lâminas foram imediatamente fotografadas. Os lipídeos coram de vermelho.

3.6.2.3 Detecção de terpenoides

As seções foram transferidas para o reagente recém-preparado de NADI por um período de 1 hora, à temperatura ambiente, no escuro. Em seguida, o material foi lavado em tampão fosfato de sódio 0,1M, pH 7,2, durante 2 min (DAVID e CARDE, 1964). Posteriormente, os cortes foram montados em lâminas semi-permanentes com água glicerinizada. Em seguida, realizaram-se as observações no microscópio fotônico.

O reagente NADI consiste em uma mistura de dois componentes, α -naftol e cloridrato de dimetil- ρ -fenilenodiamina, o que resulta por oxidação, no composto azul de indofenol. Os compostos terpênicos coram de azul e as resinas coram de vermelho-escuro (Figura 15) (FIGUEIREDO et al, 2007).

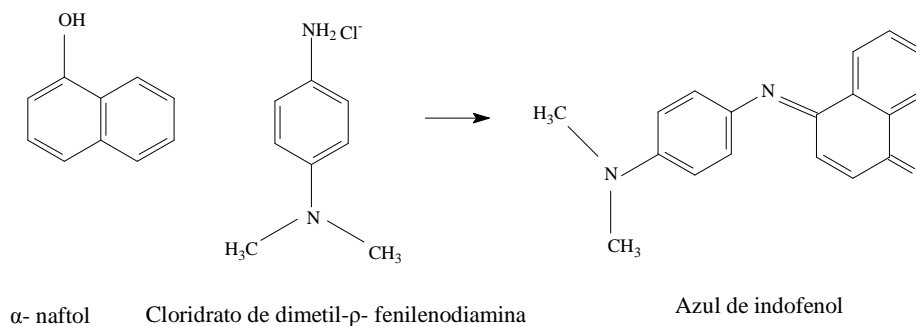


Figura 15 Reação de formação do reagente NADI
(Figueiredo et al., 2007)

3.7 Atividades antioxidantes

A avaliação das atividades antioxidantes do óleo essencial extraído das folhas frescas (espécie *C. ambrosioides* L.) e das raízes (espécie *P. bipinnatifidum* Schott.) foi realizada no Laboratório de Química Orgânica- Óleos Essenciais do DQI/UFLA.

3.7.1 Oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

Foi realizada de acordo com a metodologia apresentada por Wang et al. (2008) e Lopes-Lutz et al. (2008), com pequenas modificações. Inicialmente, preparou-se uma solução de β -caroteno em clorofórmio (na concentração de 2,0 mg mL⁻¹); adicionaram-se a essa solução 60 μ L de ácido linoléico, 600 mg de Tween 20 e 1,5 mL de clorofórmio, sendo o clorofórmio evaporado em evaporador rotatório a vácuo (Bücher Rotavapor R 114). Posteriormente, adicionaram-se à mistura 150 mL de água destilada, a qual foi previamente saturada com oxigênio (emulsão A); em seguida 2,8 mL da emulsão A foram

adicionados em tubos de ensaio e sob essa foram acrescidos 200 μL das soluções metanólicas dos compostos em estudos nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Paralelamente, foram preparadas duas soluções; o branco foi composto pela emulsão A sem a adição de β -caroteno; e o controle, por 2,8 mL da emulsão A e 0,2 mL de metanol.

Após a adição das soluções dos compostos em estudos sobre a emulsão A, foram realizadas leituras em espectrofotômetro (Shimatzu UV-160 1PC) no comprimento de onda de 470 nm. Em seguida, os tubos foram incubados a 50 °C para a reação de oxidação e a leitura da absorbância foi medida após um intervalo de 60 minutos.

A porcentagem de inibição (porcentagem de atividade antioxidante AA%) foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\text{AA\%} = 100 \times (\text{DC} - \text{DA})/\text{DC},$$

em que AA (atividade antioxidante); DC (grau de degradação do controle = $[\ln(a/b)/60]$); DA (grau de degradação na presença da amostra = $[\ln(a/b)/60]$); a (absorbância no tempo 0); b (absorbância final, 60 minutos após a incubação).

Para termos de comparação, foi utilizado o antioxidante sintético BHT nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

3.7.2 Ensaio com DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)

Utilizou-se o método DPPH seguindo a metodologia descrita por Sousa et al (2007).

O método consiste no monitoramento do consumo do radical DPPH pelas amostras por meio da medida do decréscimo da absorbância.

Foi preparada uma solução metanólica de DPPH (solução-estoque de DPPH) na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os óleos essenciais foram diluídos em metanol nas concentrações 25, 50, 100, 150, 200, 250, 300 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Foram adicionados em um tudo de ensaio 2,7 mL da solução-estoque de DPPH, seguidos da adição de 0,3 mL das diluições do óleo essencial. Paralelamente, foi preparado o branco e o controle. O primeiro contendo 2,7 mL de metanol e 0,3 mL da diluição mais concentrada do óleo essencial, e o segundo contendo 2,7 mL da solução-estoque de DPPH e 0,3 mL de metanol. As análises foram realizadas com quatro repetições e, após 60 minutos (tubos acondicionados na ausência de luz) em espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1 PC) no comprimento de onda de 515 nm (LOPES-LUTZ et al., 2008).

A porcentagem da atividade antioxidante foi calculada de acordo com a seguinte equação:

$$AA\% = [1 - (A_{\text{amostra}}/A_{\text{controle}})] \times 100,$$

em que A_{amostra} é a absorbância da solução contendo todos os reagentes e A_{controle} é a absorbância da solução-controle (solução contendo todos os reagentes menos os compostos avaliados).

Para termos de comparação, foi utilizado o antioxidante sintético BHT nas concentrações de 25,0; 50,0; 100,0; 150; 200; 250 e $300 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.7.3 Avaliação dos dados e análise estatística

Para cada uma das metodologias empregadas, os valores de IC_{50} (concentração que apresenta 50% de atividade antioxidante) dos óleos essenciais e composto antioxidante utilizado como referência (BHT) foram calculados pela análise de regressão, entre a concentração e a atividade antioxidante obtida,

sendo calculada apenas para os óleos essenciais ou para o composto que apresentou atividade superior a 50% nas concentrações utilizadas em cada metodologia.

Foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial de 2 x 7 (óleos essenciais x concentrações), com quatro repetições. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR (FERREIRA, 2011). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas por Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.8 Atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Micologia do DCA/UFLA.

Foram utilizadas cepas puras de *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella Cholerasuis* ATCC 6539.

3.8.1 Manutenção das culturas bacterianas

Durante o período de realização do experimento, os micro-organismos foram mantidos em eppendorfs contendo meio de congelamento e sob refrigeração (4°C) (TEBALDI, 2008).

3.8.2 Teste de Difusão Cavidade em Ágar

As bactérias foram repicadas em caldo BHI, ficando incubadas a 37°C por 24 horas. Posteriormente, alíquotas desse meio foram transferidas para um tubo com 5 mL de caldo de soja triptica (TSB). Os tubos foram incubados a

37°C, até alcançar a turbidez de uma solução-padrão McFarland de 0,5, resultando em uma suspensão contendo 10^8 UFC mL⁻¹. As leituras de turbidez foram realizadas utilizando espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1 PC), no comprimento de onda de 625 nm (National Committee For Clinical Laboratory Standards, 2003).

A concentração de inóculo, obtida pela escala McFarland de 0,5 (10^8 UFC mL⁻¹) foi diluída até atingir a concentração de 10^6 UFC.mL⁻¹, sendo, em seguida, transferida para o meio de cultura TSA, para as espécies *Listeria monocytogenes*, e para as demais espécies, transferida para o Ágar Mueller-Hinton. O ágar no qual foi inoculada a cultura bacteriana foi depositado sobre uma camada do mesmo ágar, no qual foram adicionados pérolas de vidro (estéreis) com 4 mm de diâmetro para a formação de poços no meio de cultura. Esses poços foram preenchidos com 10 µL dos controles e dos óleos essenciais diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) nas concentrações de 0; 3,90; 7,81; 15,62; 31,25; 62,5; 125,0; 250 e 500 µg mL⁻¹.

Foram realizadas três repetições para cada tratamento, uma testemunha relativa com a aplicação de 10 µL de DMSO e como padrão de comparação, utilizou-se uma solução de 100 µg mL⁻¹ do antibiótico Cloranfenicol (CL) (OGUNWANDE et al., 2005).

Posteriormente, as placas foram incubadas em BOD 37°C por 24 horas, sendo, então, realizadas medições diametralmente opostas dos halos de inibição formados.

A partir dos diâmetros obtidos, pôde-se avaliar o perfil de susceptibilidade das bactérias nas diferentes concentrações dos óleos essenciais.

Definiu-se a concentração inibitória mínima (CMI) como a menor concentração de óleo essencial em que ocorreu a presença de halo de inibição.

3.8.3 Análise estatística

Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados (DBC), com três repetições. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR (FERREIRA, 2011). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

3.9 Atividade inseticida

O experimento foi conduzido no Laboratório de Resistência de Plantas a Insetos do DEN/UFLA.

O plantio dos feijoeiros foi realizado em vasos com capacidade para 3 Kg, utilizando como substrato solo do horizonte C (Latosolo Vermelho Escuro) adubado com 3 g do adubo NPK (8-28-16) por vaso, equivalente a 450 Kg ha⁻¹ e quatro sementes de feijão tipo carioca/vaso. Os vasos foram mantidos sobre bancadas no interior de uma casa de vegetação. Após 20 dias do plantio, foram realizados os desbastes, deixando-se três plantas/vaso.

A coleta dos adultos não sexados de *Diabrotica speciosa* foi realizada a campo em culturas de milho, com auxílio de um sugador de plástico acoplado a recipiente de vidro. Posteriormente, esses coleópteros foram levados para o laboratório, onde foram mantidos por 24 horas em gaiola de acrílico (30 x 30 x 80 cm) e alimentados com plantas de feijoeiro cultivadas em vasos.

As plantas de feijão foram borrifadas com as soluções dos óleos essenciais nas concentrações 0 (água + tween); 0,5; 1,0; 1,5 e 2,0%, utilizando um borrifador manual de plástico com capacidade para 10 mL. A solução foi aspergida até escorrer pelas folhas e hastes das plantas.

No teste sem chance de escolha, os vasos foram individualizados aleatoriamente em bancadas no interior de uma câmara climatizada (com

temperatura de 30° C durante o dia e 25° C à noite, umidade relativa de 70±10% e fotofase de 12 horas) e cobertos com tecido organza apoiado em duas hastes de ferro fixadas no substrato do vaso, formando uma gaiola de aproximadamente 20 cm de diâmetro e 60 cm de altura. Foram liberados 10 adultos/gaiola logo após a aplicação dos tratamentos (ASSIS et al., 2011). Decorridos sete dias da aplicação, foram avaliadas as porcentagem de folíolos com injúrias, a área foliar consumida, utilizando-se o medidor portátil (AM-300) e a mortalidade dos insetos.

No teste com chance de escolha, logo após a aplicação dos tratamentos, foram liberados 200 adultos de *D. speciosa* no interior da sala climatizada. Decorridos sete dias da liberação, foram avaliadas a porcentagem de folíolos com injúrias e a área foliar consumida.

Para ambos os testes, calculou-se o Índice de Preferência (IP), segundo Seffrin et al. (2008), utilizando a seguinte fórmula:

$$IP = A/(A + M)$$

em que A= área foliar consumida (plantas com aplicação dos óleos essenciais); M= área foliar consumida (planta-testemunha); IP=1(neutro); IP < 1 (fagodeterrente); IP > 1 (fagoestimulante).

3.9.1 Análise estatística

Adotou-se o delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial 2 x 5 (óleos essenciais x concentrações), com 4 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância, sendo as variáveis avaliadas submetidas à análise de regressão ou as médias comparadas utilizando o teste Tukey (FERREIRA, 2011).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento e caracterização química dos óleos essenciais

Os valores médios dos teores de rendimento obtidos para as plantas da espécie *Chenopodium ambrosioides* L. e *Philodendron bipinnatifidum* Schott. foram de 1,7 e 0,1% (BLU), respectivamente.

Navaei e Mirza (2004), estudando o óleo essencial de *C. ambrosioides* extraído de plantas localizadas no Irã, obtiveram um rendimento de 1,8% (em BLU), valor próximo ao encontrado neste estudo. Já Alitonou e colaboradores (2012), avaliando o rendimento do óleo essencial dessa espécie em diferentes épocas do ano e em diferentes localidades, observaram uma variação de 0,3 a 1,2% (p/p).

Os resultados obtidos para caracterização química do óleo essencial de *C. ambrosioides* L. estão apresentados na Tabela 1 e o cromatograma correspondente encontra-se em anexo (Figura 1A, APÊNDICE A).

Pelos dados apresentados na Tabela 1, observa-se que o componente majoritário do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. foi o α -terpineno (40,73%), seguido do *p*-cimeno (21,81%) e *trans*-ascaridol (12,48%) (Figura 16), ao passo que os demais constituintes identificados foram encontrados em valores inferiores a 0,5%. Constatou-se a predominância de hidrocarbonetos monoterpênicos (62,75%), seguidos de monoterpênicos oxigenados (13,20%).

Tabela 1 Composição química do óleo essencial de *C. ambrosioides* L.

Pico	IR	Composto	%
1	927	benzaldeído	v
2	930	α -pineno	v
3	973	n-octanal	v
4	975	β -mirceno	v
5	1002	α -terpineno	40,73
6	1003	ρ -cimeno	21,81
7	1005	β -felandreno	v
8	1009	limoneno	0,24
9	1027	<i>trans</i> - β -ocimeno	v
10	1035	γ -terpineno	v
11	1045	n-octanol	v
12	1059	dimetil-estireno	v
13	1073	n-nonanal	v
14	1211	<i>cis</i> -epóxido de piperitona	0,34
15		<i>trans</i> - epóxido de piperitona	0,35
16		<i>trans</i> -ascaridol	12,48
Total identificado			75,95%
Componentes agrupados			
Hidrocarbonetos monoterpênicos			62,75%
Monoterpenos oxigenados			13,20%
Outros			v

IR = Índice de retenção. % = porcentagem de cada componente presente no óleo essencial. v= vestígio

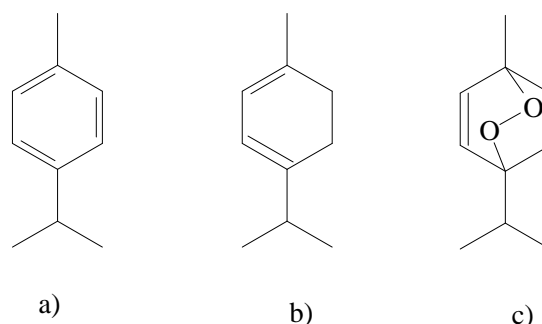


Figura 16 Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de *C. ambrosioides* L.; (a) α -terpineno (b) *p*-cimeno (c) *trans*-ascaridol

Borges et al (2012), analisando a composição química do óleo essencial de *C. ambrosioides* coletada no Horto de Plantas Medicinais e Aromáticas da Universidade Federal do Piauí (Teresina), constataram a presença dos compostos terpinoleno (69,9%) e ascaridol (17,1%). Chekem e colaboradores (2010) coletaram essa espécie no câmpus da Universidade de Dschang (Camarões) e identificaram 14 compostos, sendo os compostos majoritários α -terpineno (51,3%), *p*-cimeno (23,4%) e *p*-menta-1,8-dieno (15,3%); os dados corroboram parcialmente os encontrados neste estudo.

Em concordância com os dados obtidos, Monzote et al. (2011) identificaram como componentes principais o α -terpineno, *p*-cimeno e ascaridol, apresentando uma variação na constituição química do óleo essencial de 17,0 a 20,7%, 20,2 a 21,1% e 30,5 a 47,1%, respectivamente.

De acordo com os dados descritos na Tabela 2 e com o cromatograma em anexo (Figura 2A, APÊNDICE A), o óleo essencial de *Philodendron bipinnatifidum* Schott apresentou como constituintes majoritários o β -bisaboleno (65,26%), *trans*- α -bergamoteno (9,97%), α -copaeno (3,33%), δ -cadineno (2,83%) e ar-curcumeno (1,99%) (Figura 17), sendo constituído em maior parte

por compostos hidrocarbonetos sesquiterpênicos (91,6%) e hidrocarbonetos monoterpênicos (3,7%).

Tabela 2 Composição química do óleo essencial *P. bipinnatifidum* Schott.

Pico	IR	Composto	%
1	930	α -pineno	1,48
2	938	canfeno	0,12
3	958	sabineno	0,17
4	963	β -pineno	0,18
5	975	β -mirceno	1,16
6	995	α -felandreno	v
7	1002	α -terpineno	v
8	1003	p-cimeno	v
9	1005	β -felandreno	v
10	1009	limoneno	0,57
11	1017	cis- β -ocimeno	v
12	1027	<i>trans</i> - β -ocimeno	v
13	1035	γ -terpineno	v
14	1345	α -cubebeno	0,20
15	1363	ciclosativeno	0,16
16	1371	α -ylangeno	0,03
17	1375	α -copaeno	3,33
18	1396	7-epi- α -cedreno	0,23
19	1400	α -cedreno	0,12
20	1414	β -cariofileno	0,95
21	14,34	<i>trans</i> - α -bergamoteno	9,97
22	1441	α -himachaleno	0,16
23	1447	α -humuleno	0,20
24	1455	<i>trans</i> - β -farneseno	2,30
25		β -santaleno	1,25
26	1469	<i>trans</i> -cadin-1(6),4-dieno	0,27
27		γ -muuroleno	0,54

Tabela 2, continuação

28	1475	ar-curcumeno	1,99
29	1476	β -selineno	0,73
30	1478	cis- β -guaieno	0,05
31	1484	valenceno	0,07
32	1494	α -muuroleno	0,45
33	1500	β -bisaboleno	65,26
34	1505	<i>trans</i> -calameneno	v
35	1505	δ -cadineno	2,83
36	1525	α -calacoreno	0,28
37	1533	germacreno B	0,12
38	1536	<i>trans</i> - α -bisaboleno	0,14
39	1549	<i>trans</i> -nerolidol	v
40	1561	óxido de α -cariofileno	0,05
41	1600	1-epi-cubenol	0,17
42	1616	epi- α -cadinol	v
43		β -bisabolol	0,19
44	1656	α -bisabolol	0,03
45	1658	epi- α -bisabolol	0,06
Total identificado			95,81%
Componentes agrupados			
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos			91,6%
Hidrocarbonetos monoterpênicos			3,7%
Sesquiterpenos contendo oxigênio			0,5%

IR = Índice de retenção. % = porcentagem de cada componente presente no óleo essencial. v= vestígio

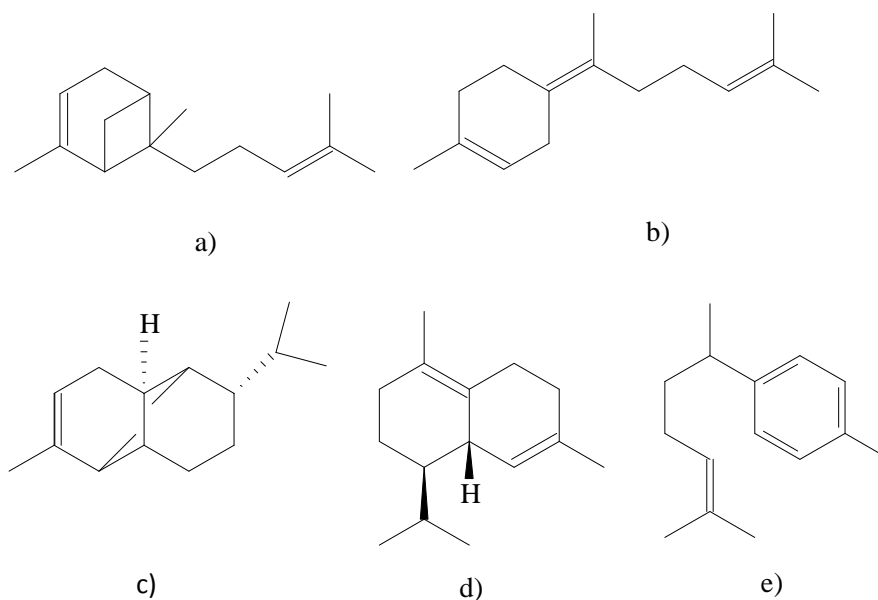


Figura 17 Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de *P. bipinnatifidum* Schott; (a) trans- α -bergamoteno (b) β -bisaboleno (c) α -copaeno (d) δ -cadineno e) ar-curcumeno

Ressalta-se que na literatura são escassos os trabalhos sobre o rendimento e composição química do óleo essencial das raízes de *Philodendron bipinnatifidum*.

Bezerra et al. (2002), avaliando a composição química do óleo essencial de espécies do gênero *Philodendron*, observaram a presença dos compostos α -pineno (13,3%), β -pineno (15,8%), limoneno (15,5%), espatulenol (14,2%) e óxido de cariofileno (10,3%), resultados divergentes dos encontrados neste estudo, uma vez que as espécies estudadas são distintas, sendo semelhantes apenas em gênero.

Salienta-se que as variações quantitativas e qualitativas na composição química e nos teores de rendimento dos óleos essenciais em estudo, quando

comparadas com os dados descritos na literatura, podem ser atribuídas a vários fatores. Esses incluem a qualidade dos solos, umidade do ar, temperatura, precipitação, métodos de extração e tempo de destilação do óleo essencial, idade da planta, eventos fenológicos, além da diversidade genética da espécie, herbivoria, injúria física e outras formas de estresse. Além disso, as espécies vegetais estudadas neste trabalho foram cultivadas em regiões geograficamente diferentes daquelas descritas na literatura, possuindo, assim, fatores edafoclimáticos distintos (LIMA et al., 2003; SILVA et al., 2006).

Por outro lado, a época de coleta é um dos fatores mais importantes, visto que a quantidade e até mesmo a natureza dos constituintes ativos de algumas espécies vegetais não é constante durante o ano. Contudo, são relatadas variações sazonais no conteúdo de praticamente todas as classes de metabólitos secundários, incluindo os óleos essenciais. Em alguns casos, os efeitos da sazonalidade podem ser confundidos com alterações metabólicas sob controle do processo de desenvolvimento internamente (processos hormonais) controlado pela planta (GOBBO-NETO e LOPES, 2007).

4.2 Estudo anatômico e histoquímico

Em relação à arquitetura foliar da espécie *C. ambrosioides* L. (Figura 18A), observa-se que o eixo básico de orientação da folha é apical. A lâmina foliar apresenta forma simétrica e ovada estreita (mais larga perto da base), com ápice e base agudos, sendo a base decorrente. A margem da folha é revoluta (é curvada e está voltada para a face abaxial da folha), apresenta serrações convexas e alas no pecíolo. A nervação ou venação da lâmina foliar é pinada (nervura principal origina as demais), com padrão craspedódromo simples, ou seja, as nervuras secundárias terminam na margem. A nervura primária segue um curso reto, ao passo que as nervuras secundárias têm ângulo de divergência

agudo moderado, curso uniformemente curvado e possuem ramificações de ordem secundária (COSTA e TAVARES, 2006).

Nas imagens das superfícies foliares obtidas por MEV (Figura 18B, C), observou-se a presença de tricomas tectores e tricomas glandulares vesiculosos, os quais estão restritos à face abaxial e localizados em depressões da lâmina foliar.

Os tricomas tectores (Figura 18D) possuem uma estrutura afilada e estão presentes em ambas as superfícies, adaxial e abaxial. Entretanto, a distribuição desses tricomas mostrou-se variável, pois a face adaxial apresenta tricomas tectores em maior número que o observado na face abaxial. Formam, geralmente, uma densa cobertura, podendo servir de barreira mecânica contra vários fatores externos, como herbívoros e patógenos. Também protegem a superfície foliar da radiação ultravioleta, do calor extremo e da perda excessiva de água (VALKAMA et al., 2003).

Costa e Tavares (2006), estudando a anatomia foliar de *Chenopodium ambrosioides* L., constataram a presença de tricomas tectores e tricomas glandulares vesiculosos. Os tricomas tectores são multicelulares unisseriados, sendo a célula da base arredondada e a terminal alongada, com a forma de uma foice e ocorrem nas duas faces. Os tricomas glandulares vesiculosos estão presentes somente na face abaxial. São compostos por uma célula basal elíptica, duas ou mais células intermediárias achatadas no sentido periclinal e uma cabeça glandular. Ressalta-se que nesses tricomas foram detectadas substâncias de natureza lipídica e fenólica.

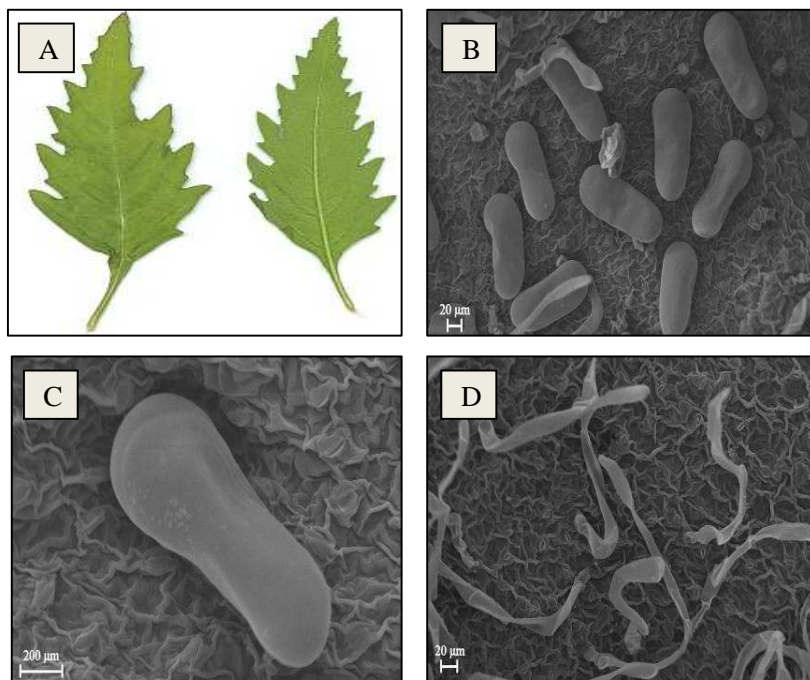


Figura 18 Visão frontal das faces adaxial e abaxial da superfície foliar de *C. ambrosioides* L. e eletromicrografias de varredura. B – Tricomas glandulares e não glandulares presentes na superfície abaxial. C – Tricoma glandular do tipo vesiculoso presente na face abaxial. D – Tricomas tectores presentes na superfície adaxial

Por meio dos cortes anatômicos paradérmicos (Figura 19), nota-se a presença dos estômatos nas duas faces da lâmina foliar, sendo, assim, classificada como anfiestomática. Os estômatos são do tipo anomocítico, circundados por um número variável de células. Foram evidenciados tricomas secretores na face abaxial e tricomas tectores em ambas as faces (ESAU, 1974).

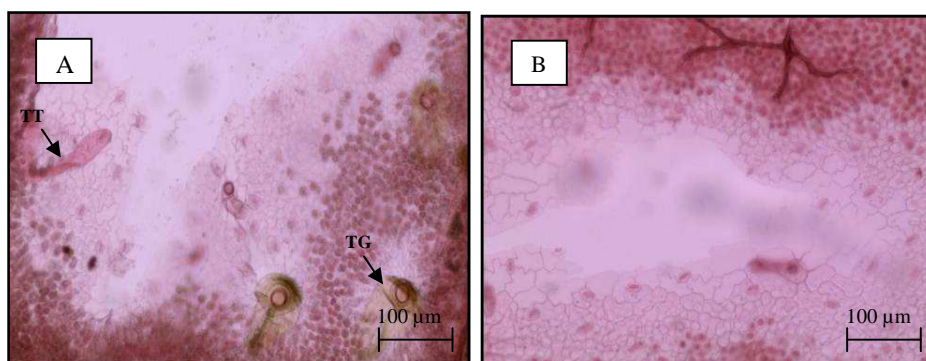


Figura 19 Caracterização anatômica (seção paradérmica) de *C. ambrosioides* L.
A Face abaxial. B – Face adaxial. TT= tricoma tector; TG= tricoma glandular

De acordo com a fotomicrografia referente à anatomia foliar de *C. ambrosioides* L. (seção transversal) (Figura 20A), observa-se a nervura central com xilema e floema, envolta por células de parênquima. Na lâmina foliar, observam-se tricomas glandulares e tectores, colênquima, parênquima e feixes vasculares. O sistema vascular da nervura principal está organizado em forma de arco.

Os compostos fenólicos, ao reagirem com cloreto férrico (FeCl_3), formam complexos coloridos, resultando em uma coloração que pode variar de verde intenso a preto. Dessa forma, evidenciou-se, por meio da reação positiva com cloreto férrico, a presença de compostos fenólicos nas folhas da espécie *C. ambrosioides* L. (Figura 20B). Entretanto, esses compostos não foram encontrados nos tricomas glandulares.

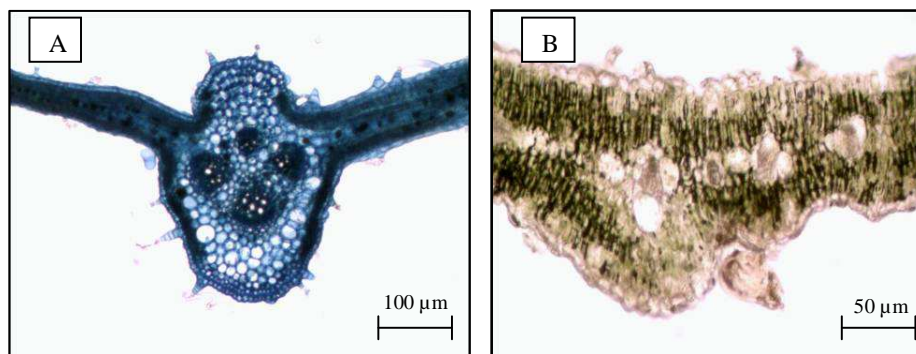


Figura 20 Anatomia foliar de *C. ambrosioides* L. (seção transversal) e caracterização histoquímica da espécie *C. ambrosioides* L. Reação positiva para o teste com cloreto férrico, evidenciando a presença de compostos fenólicos

As análises histoquímicas dos cortes transversais do limbo foliar revelaram a presença de substâncias lipídicas no interior das células dos tricomas glandulares por meio de reações positivas com os reagentes Sudan IV (coloração vermelha) e Nadi (coloração azul), evidenciando a presença de terpenos (Figura 21). Infere-se, portanto, que as estruturas celulares secretoras responsáveis pelo armazenamento do óleo essencial em *C. ambrosioides* L. são os tricomas glandulares.

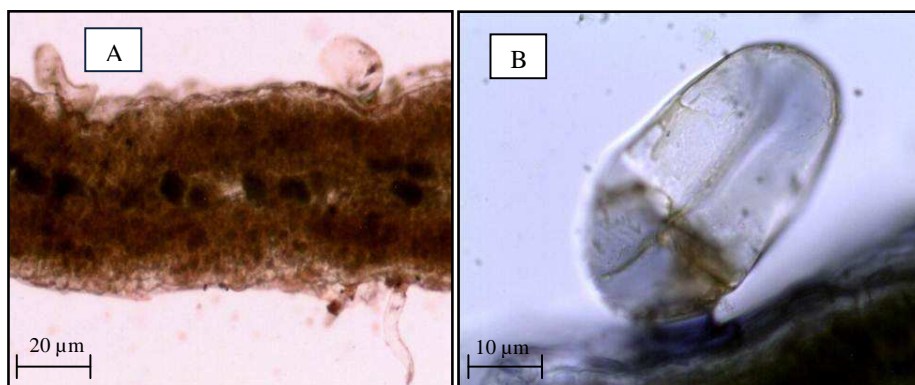


Figura 21 Caracterização histoquímica da substância presente nos tricomas glandulares vesiculosos (seção transversal do limbo foliar de *C. ambrosioides* L.). A – tricoma glandular com reação positiva (coloração vermelha) para o reagente Sudan IV, caracterizando a presença de lipídeos. B – Tricoma glandular com reação positiva (coloração azul) para o reagente Nadi, evidenciando a presença de terpenos (óleo essencial)

A raiz da espécie *Philodendron bipinnatifidum* Schott apresenta medula constituída por fibras e uma organização exarca, protoxilema (xilema primário formado em primeiro lugar) voltado para fora; metaxilema (xilema primário formado secundariamente) voltado para dentro (ESAU, 1974). Na Figura 22A, observam-se células epidérmicas alongadas dispostas paralelamente, com parede delgada, sem a presença de tricomas.

Na Figura 22B, observam-se células do parênquima cortical, endoderme (última camada de células do córtex), feixes vasculares (xilema e floema), periciclo (constitui a primeira camada do cilindro vascular), notando-se a presença de cavidades secretoras no cilindro vascular.

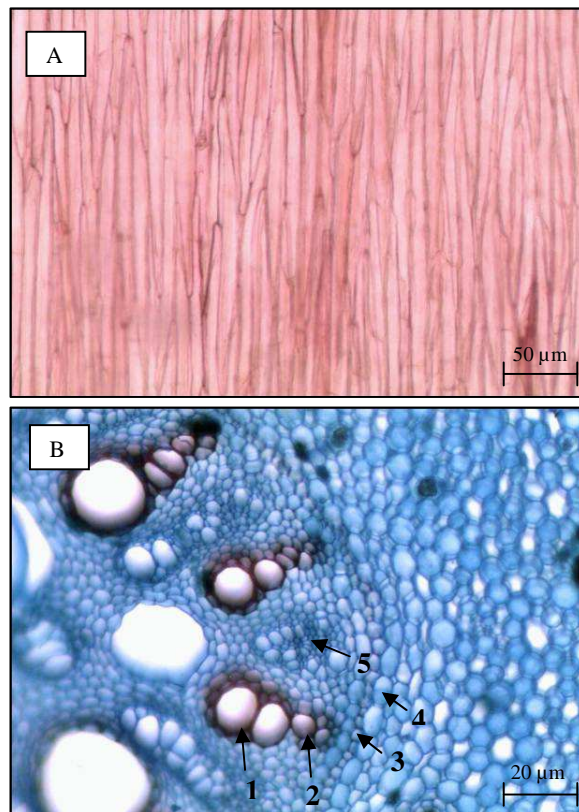


Figura 22 Caracterização anatômica espécie *Philodendron bipinnatifidum* Schott. A – Seção paradérmica. B – Seção transversal; 1. Metaxilema; 2. Protoxilema; 3. Periciclo; 4. Endoderme; 5. Floema

As eletromicrografias de varredura obtidas para a espécie *Philodendron bipinnatifidum* Schott estão apresentadas na Figura 23. Na Figura 24, pode-se observar que as raízes não apresentam tricomas glandulares, sugerindo a presença de estruturas internas responsáveis por armazenar o óleo essencial dessa espécie.

A presença do óleo essencial no interior das cavidades foi confirmada pelas análises histoquímicas (Figura 24), que revelaram reações positivas para as substâncias presentes no interior das cavidades com o reagente Sudan IV (resultando em uma coloração vermelha) e com o reagente Nadi (resultando em uma coloração azulada), confirmando, assim, a presença de substâncias lipídicas e terpênicas, respectivamente.

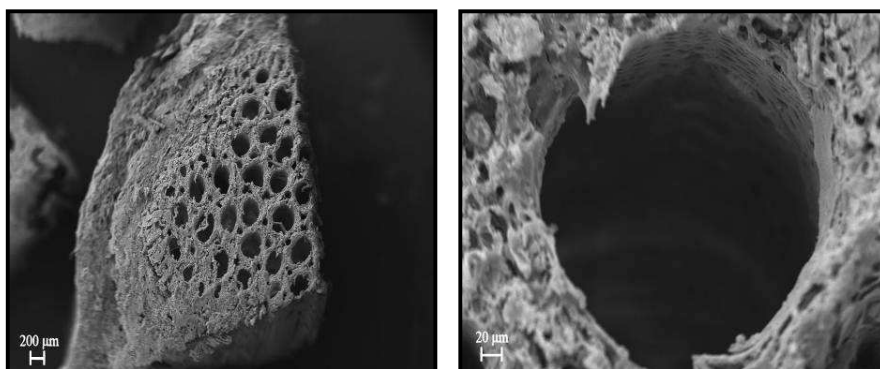


Figura 23 Eletromicrografias de varredura da seção transversal da raiz de *Philodendron bipinnatifidum* Schott

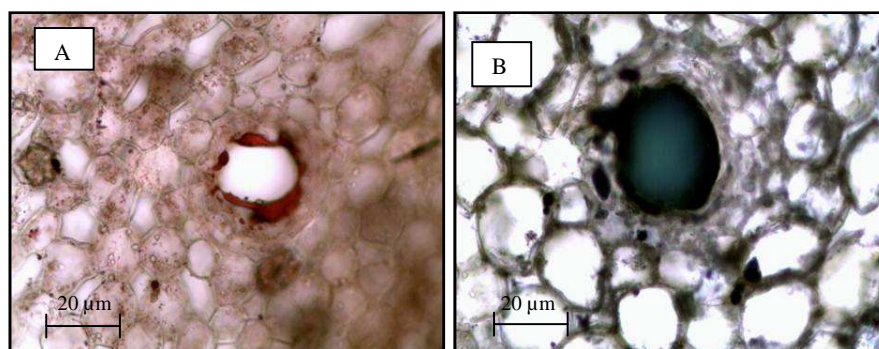


Figura 24 Caracterização histoquímica das cavidades secretoras (seção transversal da raiz de *Philodendron bipinnatifidum* Schott). A – Reação positiva (coloração vermelha) para o reagente Sudan IV, caracterizando a presença de lipídeos. B – Reação positiva (coloração azul) para o reagente Nadi, evidenciando a presença de terpenos (óleo essencial)

Foi evidenciada (Figura 25) a presença de compostos fenólicos para a espécie *Philodendron bipinnatifidum* Schott, uma vez que ocorreu reação positiva para o teste com cloreto férrico. Isso foi verificado em células do parênquima, periciclo, endoderme e floema. Entretanto, não se observou reação positiva nas cavidades secretoras, uma vez que o óleo essencial não é constituído por substâncias fenólicas.

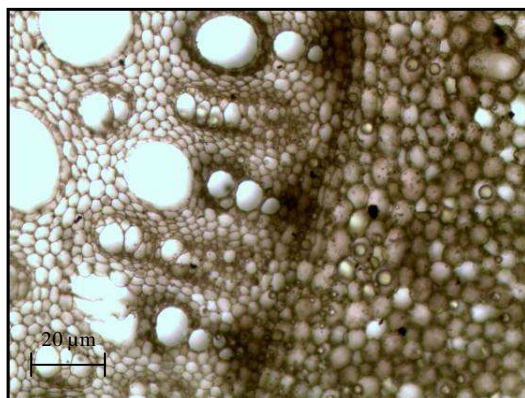


Figura 25 Caracterização histoquímica da espécie *Philodendron bipinnatifidum* Schott. Reação positiva para o teste com cloreto férrico, evidenciando a presença de compostos fenólicos na seção transversal da raiz

Vianna e colaboradores (2001) realizaram um estudo da raiz escora de *Philodendron bipinnatifidum* Schott e constataram a presença de ductos de resina, os quais se diferenciavam entre as células do meristema fundamental. Observaram que o cilindro vascular apresentava-se lobado e o cilindro central possuía organização estelar “anômala” e desprovida de medula. Na raiz escora adulta, a epiderme era substituída pelo súber estratificado, o parênquima cortical possuía várias camadas de células, entre as quais ocorriam ductos resiníferos e idioblastos secretores. Os ductos são de origem esquizógena, tendo em vista que o lume é formado pela separação das células que constituem a camada epitelial.

4.3 Atividade antioxidante

Os resultados obtidos na determinação da atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Chenopodium ambrosioides* L., *Philodendron bipinnatifidum*

Schott e do padrão BHT avaliados pelos ensaios de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico e redução do radical estável DPPH, apresentaram efeito significativo dos fatores concentração, óleos/padrão e também da interação desses fatores sobre as atividades antioxidantes.

Os valores da atividade antioxidante dos óleos essenciais e do composto BHT em relação às suas concentrações, avaliadas pelo ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 Valores da porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais/padrão perante o método β -caroteno/ácido linoleico.

Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Óleos essenciais/Padrão		
	<i>Philodendron bipinnatifidum Schott</i>	<i>C. ambrosioides L.</i>	BHT
25	3,57 cdC	6,02 fB	64,33 dA
50	3,12 cC	11,16 eB	73,12 cA
100	6,16 bcC	20,74 dB	77,75 bA
150	6,73 bC	20,76 dB	77,49 bA
200	12,01 aC	32,95 cB	80,28 abA
250	13,13 aC	37,69 bB	81,11 aA
300	14,22 aC	40,17 bB	80,74 aA
500	14,62 aC	51,23 aB	83,17 aA

As médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e da mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 5% de probabilidade.

Para o óleo essencial de *P. bipinnatifidum* Schott e para o BHT, as maiores porcentagens de atividade antioxidante encontradas pelo método β -caroteno/ácido linoleico foram observadas com as concentrações a partir de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, quando comparados com as demais concentrações. Para o óleo essencial de *C. ambrosioides* L., observou-se maior atividade antioxidante na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, entretanto, os óleos essenciais e o padrão apresentaram menor potencial antioxidante na concentração de 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Em todas as concentrações testadas, o óleo essencial de *C. ambrosioides* L. apresentou maior atividade antioxidante que o óleo essencial de *P. bipinnatifidum* Schott, mas ambos apresentaram menor atividade antioxidante do que o padrão BHT.

Os valores referentes à atividade antioxidante dos óleos essenciais e do composto BHT para o ensaio que avalia a atividade antioxidante, de acordo com a redução do radical estável DPPH, estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 Valores da porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais/padrão pelo método de sequestro de radicais DPPH.

Concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Óleos essenciais/Padrão		
	<i>Philodendron bipinnatifidum</i> Schott	<i>C. ambrosioides</i> L.	BHT
25	1,74 bB	3,37 bB	27,94 eA
50	1,84 bB	4,06 bB	51,42 dA
100	1,67 bB	4,59 bB	59,32 cA
150	1,84 bB	4,71 bB	86,81 bA
200	2,03 bB	4,73 bB	90,18 abA
250	2,52 bB	4,98 bB	91,08 aA
300	2,95 bC	11,94 aB	91,59 aA
500	6,96 aC	15,79 aB	91,92 aA

As médias seguidas da mesma letra minúscula nas colunas e da mesma letra maiúscula nas linhas não diferem entre si pelo Teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade.

Para o óleo essencial de *P. bipinnatifidum* Schott, foi observada maior atividade antioxidante com a concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, já para o óleo essencial de *C. ambrosioides* L., as maiores porcentagens de sequestro do DPPH foram obtidas com concentrações de 300 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, não havendo diferença significativa entre as demais concentrações. Para o antioxidante BHT, observou-se maior atividade a partir de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Com relação às concentrações utilizadas, o BHT apresentou maior potencial antioxidante, quando comparado com os óleos essenciais, não havendo diferença significativa entre eles.

De maneira geral, observou-se um aumento da atividade antioxidante de acordo com o aumento da concentração, revelando uma relação dose-dependente sobre a atividade antioxidante dos óleos essenciais e do padrão utilizado.

Para ambos os testes utilizados, as análises de regressão de primeira e segunda ordem foram significativas (APÊNDICE B); no entanto, os coeficientes de correlação apresentados pelas equações de regressão de segunda ordem demonstraram que essa se ajustava melhor ao comportamento da relação dose-dependência entre a concentração e a atividade antioxidante. Sendo assim, por meio das equações de segundo grau dos compostos avaliados, foram calculados os valores de IC_{50} apresentados nos dois ensaios, os quais se encontram apresentados na Tabela 5.

Tabela 5 Valores de CI_{50} para a porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais/padrão pelos dois métodos empregados.

Óleos essenciais/Padrão	Método Antioxidante	
	β -caroteno/ácido linoleico CI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	DPPH CI_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>Philodendron</i> <i>bipinnatifidum</i> Schott	-	-
<i>C. ambrosioides</i> L.	455,7	-
BHT	< 25,0	62,0

A reação referente ao ensaio β -caroteno/ácido linoleico, que avalia a capacidade dos compostos antioxidantes em inibir os radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico, está apresentada na Figura 26. Muitas vezes, diante da complexa composição química dos óleos essenciais, é difícil estabelecer uma relação entre a estrutura dos compostos e sua atividade antioxidante. Algumas reações de produtos resultantes do meio reacional do ensaio podem ocorrer com um outro composto presente no ensaio, além da possível ocorrência de sinergismo, antagonismo e aditividade entre os componentes minoritários. Outros fatores também podem influenciar o ensaio antioxidante utilizado, tais como concentração, temperatura, luz, tipo de substrato e estado físico do sistema (TOMAINO, 2005; VIUDA-MARTOS, et al., 2009).

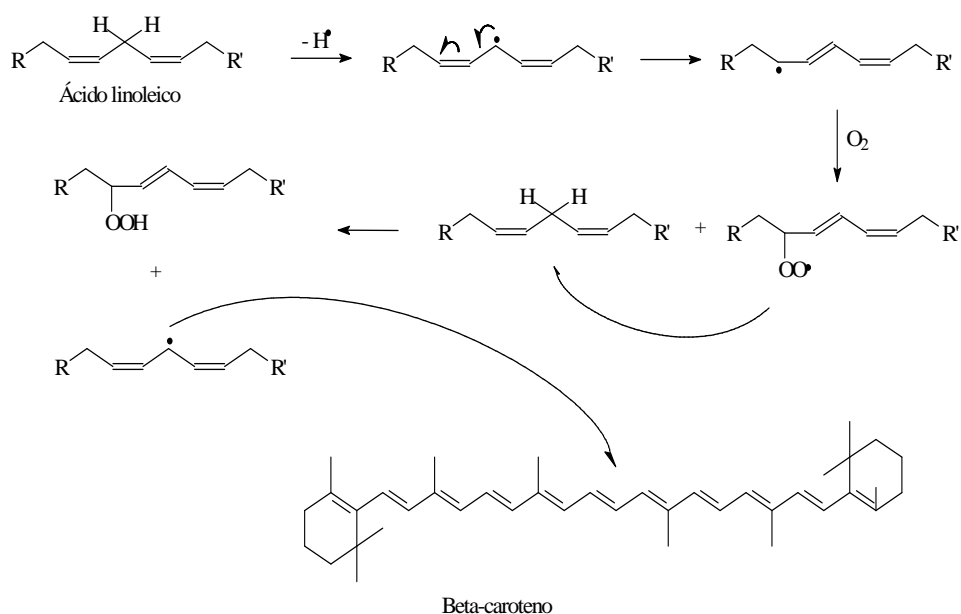


Figura 26 Reação de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

Os altos valores de atividades antioxidantes apresentados pelo padrão BHT e os baixos valores apresentados pelos óleos essenciais podem ser explicados pelo fato da redução do DPPH ocorrer via transferência de um átomo de hidrogênio ou por um mecanismo de transferência de elétrons por parte do composto antioxidante. De maneira geral, os constituintes dos óleos essenciais não se assemelham à estrutura fenólica do BHT, o qual pode doar o átomo de hidrogênio da hidroxila fenólica, formando um radical fenólico, que pode ser estabilizado pela ressonância com as duplas ligações do anel aromático (HIDALGO et al., 2009).

Sugere-se que a determinação da atividade antioxidante pelo método de sequestro de radicais livres (DPPH) baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, o DPPH, que, ao se reduzir, perde

sua coloração púrpura. Inicialmente, a transferência do elétron ocorre rapidamente, e a subsequente transferência de hidrogênio ocorre mais lentamente e depende da ligação de hidrogênio com o solvente. Ao utilizar solventes como metanol e etanol, compostos que apresentam interações do tipo ligação de hidrogênio, a reação de abstração do hidrogênio ocorre lentamente. De modo semelhante, os ácidos ou as bases presentes nos solvente podem influenciar o equilíbrio de ionização dos fenóis. Assim, supõem-se que estes aspectos afetam a reação que envolve a transferência de elétrons ou transferência de átomo de hidrogênio (FOTI et al, 2004).

Pelo fato do método de sequestro de radicais livres (DPPH) basear-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um radical livre, avalia-se apenas o poder redutor do antioxidante, que ao doar um elétron se oxida, e por este motivo, não detecta substâncias pró-oxidantes (DUARTE-ALMEIDA et al, 2006).

Na reação de determinados compostos com o DPPH, como os compostos fenólicos (Figura 27), observa-se que a redução do número de moléculas de DPPH pode estar associada ao número de hidroxilas disponíveis na amostra (BRAND-WILLIANS; CUVELIER; BERSSET, 1995).

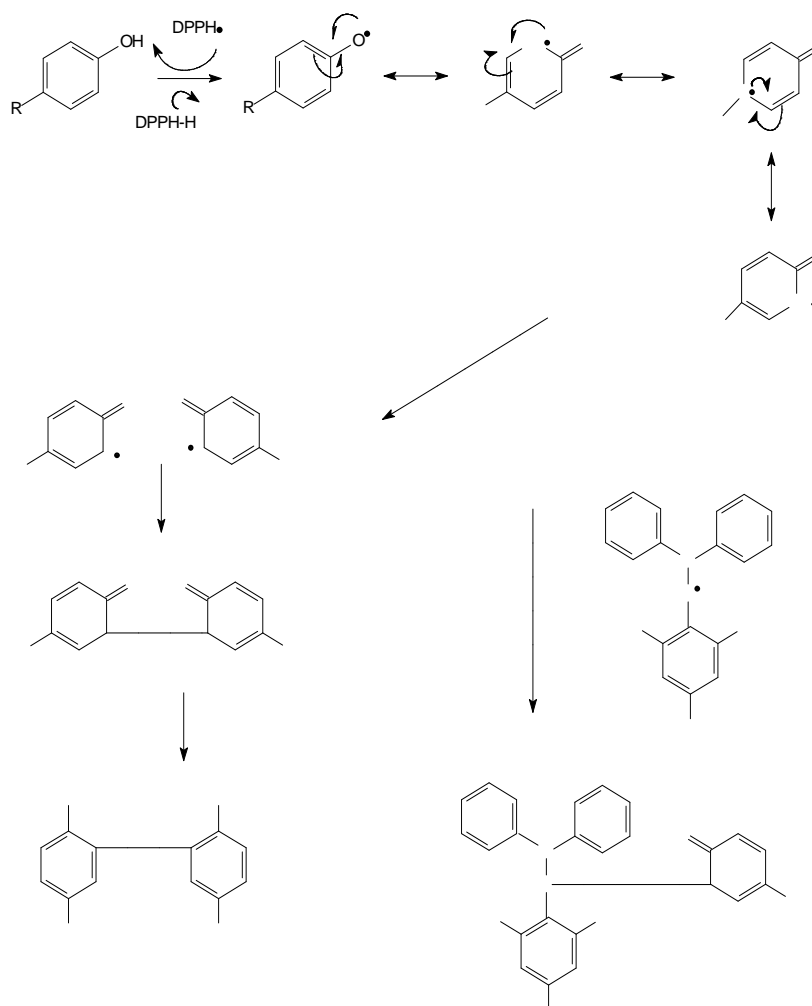


Figura 27 Mecanismo de ação provável entre o radical DPPH com estruturas fenólicas, sendo a) dimerização e b) a estabilização do radical
 Fonte: adaptado de BRAND-WILLIANS, CUVELIER e BERSET (1995)

Jaramillo et al. (2012) avaliaram a composição química e a atividade antioxidante do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* proveniente da Colômbia. Os constituintes majoritários encontrados foram α -terpineno, seguido de p -cimeno, 4-careno e *trans*-ascaridol e, entre outros, o estragol, timol e carvacrol, presentes em pequenas quantidades. O óleo essencial apresentou atividade antioxidante com porcentagem de inibição do radical DPPH de 84,89%. Essa atividade foi atribuída, entre outras razões, à presença de compostos fenólicos como o estragol, timol e carvacrol.

4.4 Atividade antibacteriana

Os valores referentes às concentrações mínimas inibitórias (CMI) dos óleos essenciais obtidas no experimento para as bactérias em estudo encontram-se descritos na Tabela 6

Tabela 6 Concentração mínima inibitória dos óleos essenciais de *Chenopodium ambrosioides* L. e *Philodendron bipinnatifidum* Schott encontrada para os micro-organismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Cholerasuis*.

Bactérias	Gram	CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		DMSO	CF
		<i>C.</i> <i>ambrosioides</i>	<i>P.</i> <i>bipinnatifidum</i>		
<i>S. aureus</i> ATCC 13565	+	62,5	125	NI	100
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117	+	250	NI	NI	100
<i>E. coli</i> ATCC 11229	-	125	NI	NI	100
<i>S. Cholerasuis</i> ATCC 6539	-	125	NI	NI	100

NI= não inibiu

O óleo essencial de *C. ambrosioides* L. apresentou atividade antibacteriana nas concentrações avaliadas, inibindo bactérias Gram-positivas e Gram negativas, mas o óleo essencial de *Philodendron bipinnatifidum* Schott apresentou atividade somente sobre a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Em geral, as bactérias Gram-negativas são menos susceptíveis à ação dos óleos essenciais do que as bactérias Gram-positivas, uma vez que a membrana adicional que encobre a parede celular restringe a difusão de compostos hidrofílicos através da camada lipossacarídica dessas bactérias. Assim, os constituintes dos óleos essenciais exibem diferentes atividades frente a micro-organismos Gram-positivos e Gram-negativos (DORMAN; DEANS, 2000; BURT, 2004).

Verifica-se que o óleo essencial de *C. ambrosioides* L. apresentou maior valor de CMI para a bactéria *Listeria monocytogenes* (Gram-positiva) em relação às demais bactérias. Esse fato difere da maioria dos estudos que relatam que bactérias Gram-positivas são mais sensíveis a óleos essenciais do que as Gram-negativas (BURT, 2004).

De acordo com Valeriano et al. (2012), uma moderada atividade antibacteriana obtida pelo método de difusão em ágar pode ser atribuída à baixa afinidade entre componentes do óleo essencial menos polares e o substrato polar (ágar). Por outro lado, apesar de os óleos essenciais apresentarem dificuldade de se difundirem uniformemente pelo meio de cultura, a sua volatilidade contribui para a formação de halos de inibição, tornando a referida técnica um método válido na determinação da atividade antimicrobiana (LAMBERT et al., 2001; INOUE et al., 2006).

Owolabi et al. (2009) avaliaram a atividade antibacteriana do óleo essencial da espécie *C. ambrosioides* cultivada na Nigéria. Esse não apresentou atividade antibacteriana contra bactérias Gram-positivas, como *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus* e contra bactérias Gram-negativas, como *Escherichia*

coli. Ressalta-se que uma diferença apresentada na constituição ou na concentração dos constituintes do óleo essencial pode influenciar diretamente a atividade antimicrobiana.

Pandey et al. (2012), estudando os óleos essenciais obtidos de 53 plantas aromáticas provenientes da Índia, avaliaram a atividade desses óleos sobre as bactérias *Erwinia herbicola* e *Pseudomonas putida*. Entre as plantas estudadas, destacou-se a espécie *Chenopodium ambrosioides* por apresentar valores referentes às concentrações mínimas inibitórias equivalentes a 0,25 e 0,12 $\mu\text{L mL}^{-1}$ para *E. herbicola* e *P. putida*, respectivamente. Segundo os autores, o óleo essencial pode ser considerado como um agente antibacteriano a ser utilizado na gestão de doenças pós-colheita de frutos e vegetais.

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais, devido à sua complexa constituição, não pode ser explicada por um único mecanismo de ação, uma vez que todos os componentes da célula bacteriana tornam-se possíveis alvos de atuação desses óleos (Figura 28) (CARSON et al., 2002). Dessa forma, os óleos essenciais podem ocasionar degradação da parede celular, danos à membrana citoplasmática e às proteínas da membrana, vazamento do conteúdo celular, coagulação do citoplasma e diminuição da força próton motiva (BURT, 2004).

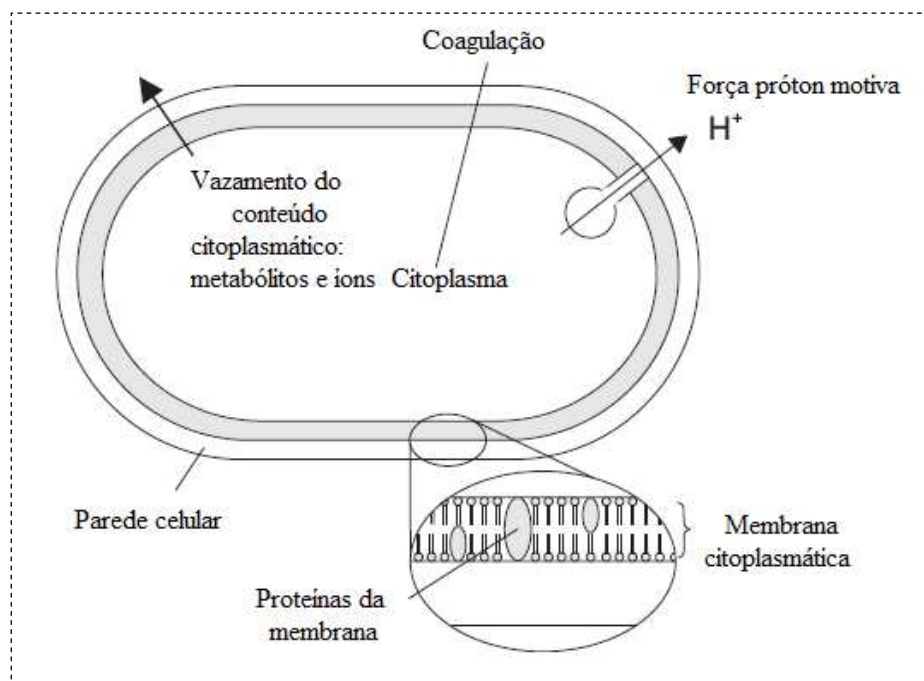


Figura 28 Mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana
 Fonte: adaptado de Burt (2004)

Com relação aos óleos essenciais estudados, os constituintes majoritários encontrados foram monoterpenos e sesquiterpenos. A ação antimicrobiana dos monoterpenos, por exemplo, pode ser explicada pelo efeito tóxico sobre a estrutura e função da membrana celular. Como resultado do caráter lipofílico, os monoterpenos irão preferencialmente, se deslocar da fase aquosa em direção às estruturas da membrana rompendo as camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, quebrando-os e, assim, alterando a permeabilidade dessas organelas (SIKKEMA, 1995). Assim, os danos estruturais à membrana citoplasmática induzem ao comprometimento das suas funções. Segundo Burt (2004) e Bakkali et al. (2008), o mecanismo de ação dos

terpenos ainda não é completamente esclarecido; sabe-se que está relacionado com a ruptura da membrana plasmática, devido ao caráter lipofílico dos mesmos.

Por outro lado, estudos de Velluti et al. (2003) indicam que a atividade antibacteriana de compostos hidroxilados presentes nos óleos essenciais pode estar relacionada com as ligações de hidrogênio, que possivelmente interagem com sítios ativos das enzimas bacterianas.

Analisando a composição química dos óleos essenciais, ressalta-se que, além da relação com as classes que os constituintes pertencem, outros fatores devem ser levados em consideração para se atribuir à atividade antibacteriana, como o isomerismo e o sinergismo entre os componentes.

4.5 Atividade inseticida

Os resultados das porcentagens de injúrias foliares causadas pelos adultos de *Diabrotica speciosa* no teste com chance de escolha estão apresentados na Figura 29. Verificou-se que não houve diferença significativa entre as concentrações utilizadas e entre os tratamentos. Entretanto, observou-se que houve menor injúria foliar perante o tratamento com o óleo essencial de *Philodendron bipinnatifidum* Schott na concentração de 1,5%, quando comparado com o óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* na mesma concentração.

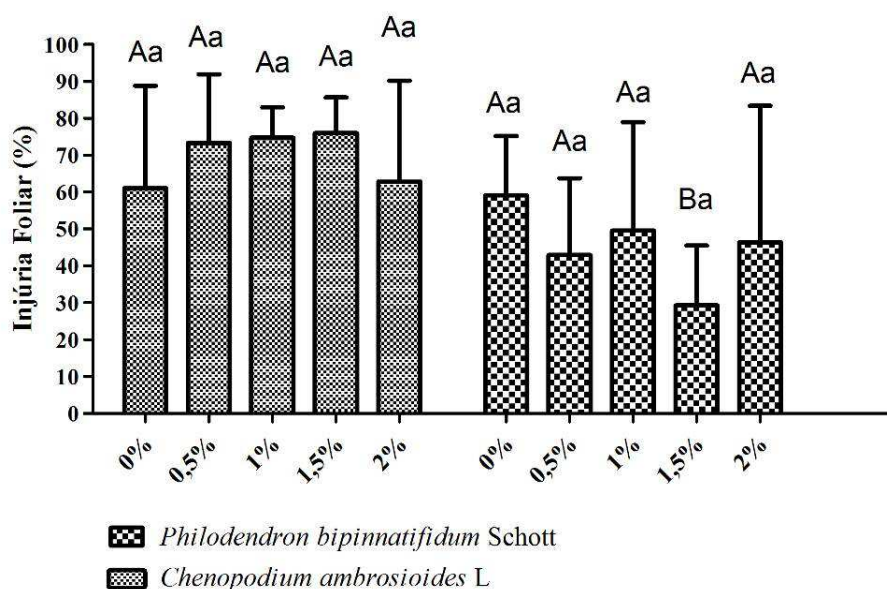


Figura 29 Porcentagem de injúria foliar causada por *D. speciosa* em feijoeiro tratado com diferentes concentrações (%) dos óleos essenciais de *C. ambrosioides* e *P. bipinnatifidum*. *Médias seguidas da mesma letra entre as concentrações de cada óleo essencial (letras minúsculas) e seguidas da mesma letra entre os óleos essenciais (letras maiúsculas) não se diferem pelo teste Tukey ($P < 0,05$)

Referindo-se à porcentagem de área foliar consumida pelos insetos (Figura 30), observa-se que não houve diferença significativa entre as concentrações do óleo essencial de *C. ambrosioides* L. No entanto, o óleo de *P. bipinnatifidum* Schott, quando comparado à testemunha, apresentou influência sobre a porcentagem de área foliar consumida. Verificam-se também diferenças significativas entre o óleo essencial de *C. ambrosioides* L. e o óleo essencial de *P. bipinnatifidum* Schott, nas concentrações de 0,5 e 2,0%. O fato de o óleo essencial de *P. bipinnatifidum* Schott, na concentração de 0,5%, ter apresentado maior efeito sobre a alimentação dos insetos (menor quantidade de área

consumida) pode ter ocorrido pela volatilização ou degradação do óleo essencial, ocasionando baixa persistência na referida concentração.

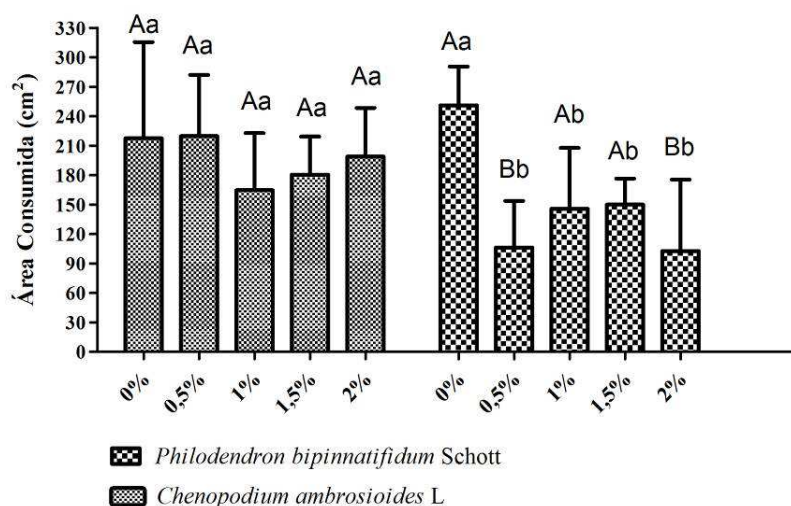


Figura 30 Área foliar consumida (cm²) por *D. speciosa* em feijoeiro tratado com diferentes concentrações (%) dos óleos essenciais de *C. ambrosioides* e *P. bipinnatifidum*. *Médias seguidas da mesma letra entre as concentrações de cada óleo essencial (letras minúsculas) e seguidas da mesma letra entre os óleos essenciais (letras maiúsculas) não se diferem pelo teste Tukey (P<0,05)

Para o teste sem chance de escolha, observa-se influência dos óleos essenciais com relação à injúria foliar causada pelos insetos nos feijoeiros (Figura 31). Para o óleo essencial de *C. ambrosioides* L., nota-se um comportamento linear, de forma que, com o aumento das concentrações do óleo essencial, diminuiu-se a injúria foliar. Já para o óleo essencial de *P. bipinnatifidum* Schott, verifica-se um comportamento quadrático; com o aumento das concentrações do óleo, houve um aumento da injúria foliar, ocorrendo um decréscimo da injúria na concentração de 2%, fato semelhante ao observado no teste com chance de escolha.

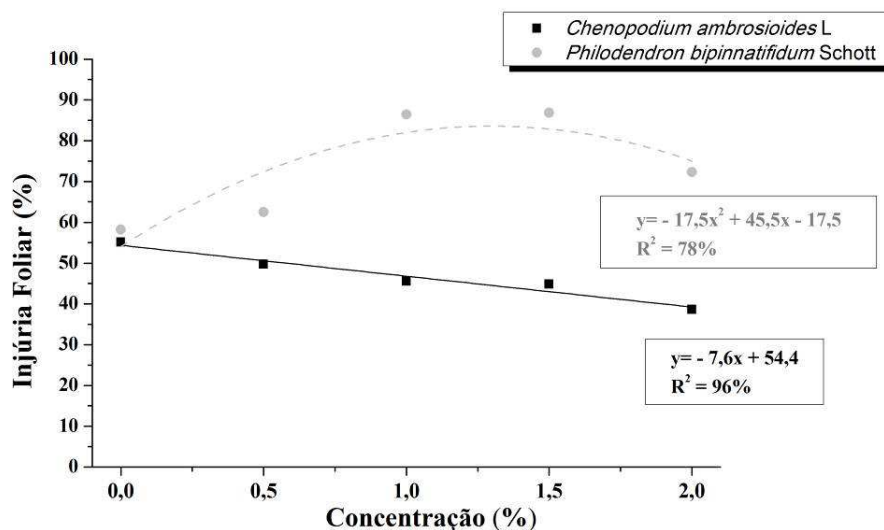


Figura 31 Equações de regressão para porcentagem de injúria foliar causada por *D. speciosa* em feijoeiro tratado com diferentes concentrações (%) dos óleos essenciais de *C. ambrosioides* e *P. bipinnatifidum*.

No que diz respeito à avaliação da atividade dos óleos essenciais com relação à área foliar consumida pelos insetos no teste sem chance de escolha (Figura 32), observa-se que ambos os óleos apresentaram influência sobre a alimentação do inseto-praga. Verificou-se que, com o aumento das concentrações dos óleos essenciais, houve uma diminuição do consumo foliar, observando-se um comportamento linear para o óleo essencial de *C. ambrosioides* L. e quadrático para *P. bipinnatifidum* Schott.

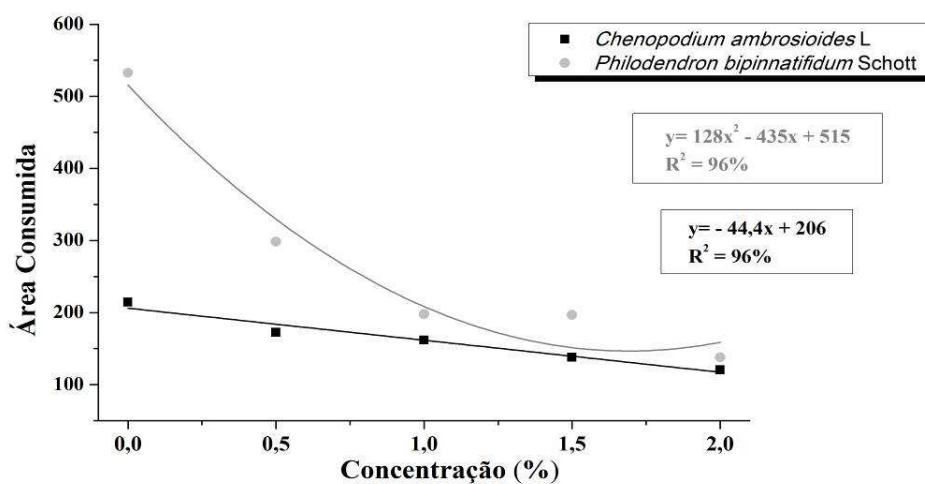


Figura 32 Equações de regressão para área foliar consumida (cm²) por *D. speciosa* em feijoeiro tratado com diferentes concentrações (%) dos óleos essenciais de *C. ambrosioides* e *P. bipinnatifidum*

Para o teste sem chance de escolha, que avaliou a mortalidade dos insetos adultos, observa-se que, de forma linear, com o aumento das concentrações dos óleos essenciais, houve um aumento da mortalidade (Figura 33).

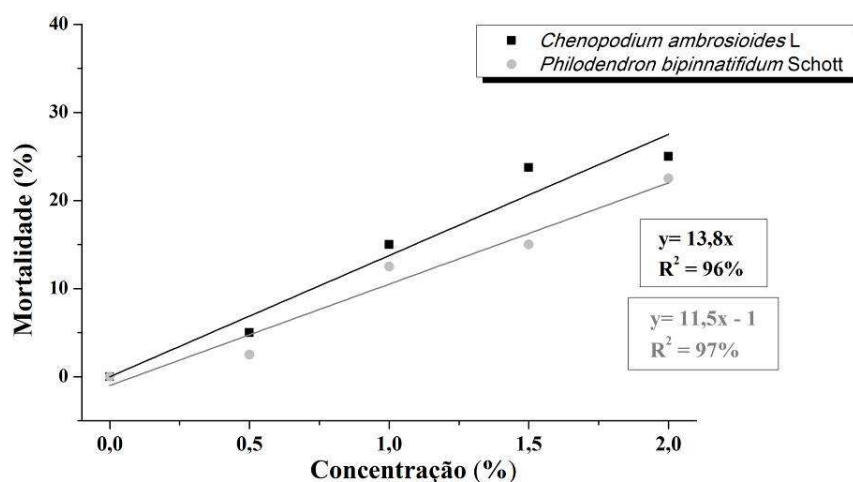


Figura 33 Equações de regressão para porcentagem de mortalidade de *D. speciosa* em feijoeiro tratado com diferentes concentrações (%) dos óleos essenciais de *C. ambrosioides* e *P. bipinnatifidum*.

Diante dos resultados obtidos, infere-se que a utilização dos óleos essenciais de *C. ambrosioides* L. e de *P. bipinnatifidum* Schott. pode ser considerada eficaz como inseticida no controle de *D. speciosa* utilizando concentrações superiores a 0,5% de ambas as espécies vegetais estudadas. No entanto, são necessários novos ensaios que viabilizem o uso desses no manejo integrado dessa praga.

O índice de preferência alimentar é eficiente em estudos de consumo foliar por insetos. Na Tabela 7, observa-se que os óleos essenciais, em todas as concentrações testadas, apresentaram efeito fagodeterrente (inibidor da alimentação) ($IP < 1$).

Tabela 7 Índice de preferência alimentar dos insetos frente aos óleos essenciais.

Concentrações	Índice de preferência			
	<i>C. ambrosioides</i> L.		<i>P. bipinnatifidum</i> Schott	
	Sem chance	Com chance	Sem chance	Com chance
Testemunha	1,000	1,000	1,000	1,000
0,5	,554	0,505	0,642	0,711
1,0	0,578	0,580	0,729	0,643
1,5	0,609	0,550	0,731	0,628
2,0	0,644	0,527	0,795	0,737

IP=1(neutro); IP < 1 (fagodeterrente); IP > 1 (fagoestimulante)

De acordo com Chu e colaboradores (2011), o óleo essencial de *C. ambrosioides* apresentou atividade sobre o gorgulho-do-milho (*Sitophilus zeamais*) e juntamente com seu componente (Z)-ascaridol, pode ser explorado como um potencial fumigante natural.

Nenaah e Ibrahim (2011) estudaram a composição química e a atividade inseticida de pós e óleos essenciais obtidos de partes aéreas de *Cinnamomum camphora*, *Ocimum basilicum*, *C. ambrosioides* e sementes de *Pimpinella anisum* sobre coleópteros (*Trogoderma granarium* e *Tribolium castaneum*). Os resultados mostraram que, após três dias de contato entre os insetos e os pós (extratos) ou com os óleos essenciais, houve tempo suficiente para atingir o ponto final de mortalidade de ambos os insetos.

Seffrin et al. (2008) avaliaram o comportamento alimentar de adultos de *Diabrotica speciosa* na presença de extratos aquosos de plantas da família Meliaceae e verificaram que os extratos aquosos das espécies *Cabralea canjerana*, *Cedrela fissilis*, *Melia azedarach* L. var. *azedarach*, *Trichilia catigua* e *Trichilia elegans* apresentaram efeito fagodeterrente pelo índice de preferência, não havendo diferenças significativas entre eles; os extratos de pecíolos e caules apresentaram maior efeito antialimentar sobre *D. speciosa*.

O comportamento alimentar dos insetos depende da integração do sistema nervoso central com os quimiorreceptores, localizados nos tarsos, nas peças bucais e na cavidade oral, e de substâncias encontradas nas plantas com poder de inseticidas, que podem agir sobre os quimiorreceptores, estimulando as células deterrentes ou bloqueando os fagoestimulantes, inibindo a alimentação (AZEVEDO et al., 2010).

A maioria dos trabalhos na literatura que se referem a terpenoides, fazem referência a observações de atividades como inibidores ou retardadores de crescimento, danos na maturação, redução da capacidade reprodutiva, supressores de apetite, podendo levar os insetos predadores à morte por inanição ou toxicidade direta (VIEGAS JUNIOR, 2003).

5 CONCLUSÃO

Os compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *C. ambrosioides* L. foram o α -terpineno (40,73%), p -cimeno (21,81%) e trans-ascaridol (12,48%) e para *P. bipinnatifidum* Schott, o β -bisaboleno (65,26%) e o trans- α -bergamoteno (9,97%), α -copaeno (3,33%), δ -cadineno (2,83%) e ar-curcumeno (1,99%).

Na espécie *C. ambrosioides* L., evidenciou-se a presença de compostos terpênicos nos tricomas glandulares e, na espécie *P. bipinnatifidum* Schott, esses compostos foram encontrados em cavidades secretoras.

A atividade antioxidante foi mais bem evidenciada pelo teste β -caroteno/ácido linoleico para o óleo essencial de *C. ambrosioides* L.

O óleo essencial de *C. ambrosioides* L. apresentou atividade antibacteriana tanto para bactérias Gram-negativas como para Gram-positivas; o óleo essencial de *P. bipinnatifidum* Schott foi eficiente somente para *Staphylococcus aureus*.

As espécies vegetais estudadas afetaram o comportamento de *D. speciosa*, reduzindo a alimentação e causando mortalidade do inseto-praga.

REFERÊNCIAS

- ABU-ASAB, M. S.; CANTINO, P. D. Phylogenetic implications on leaf anatomy in subtribe Melittidinae (Labiatae) and related taxa. **Journal of the Arnold Arboretum**, Cambridge, v. 68, n. 1, p. 1-34, 1987.
- ALITONOU, G. A. et al. Chemical composition and biological activities of essential oils of *Chenopodium ambrosioides* L. collected in two areas of Benin. **International Journal of Biosciences**, v. 2, n. 8, p. 58-66, 2012.
- ALTIERI, M. A.; SILVA, E. N.; NICHOLLS, C. I. **O papel da biodiversidade no manejo de pragas**. Ribeirão Preto: Holos, 2003. 226 p.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, 2012.
- ANDREATTI FILHO, L. R. **Saúde aviária e doenças**. São Paulo: Roca, 2007. v. 10, p. 112-117.
- APPEZATO-DA-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. **Anatomia vegetal**. 2. ed. Viçosa, MG: UFV, 2006.
- ASCENSÃO, L. Estruturas secretoras em plantas: uma abordagem morfo-anatômica. In: FIGUEIREDO, A. C. S. et al. **Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais**. 3. ed. Lisboa: Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências da Portugal. Centro de Biotecnologia Vegetal, 2007. (Curso Teórico-Prático).
- ASSIS, F. A. et al. Efeitos da terra diatomácea sobre *Diabrotica speciosa* (Germar, 1824) (Coleoptera: Chrysomelidae) em batata inglesa. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 3, p. 482-486, maio/jun. 2011.
- AZEVEDO, A. I. B. et al. Bioatividade do óleo de nim sobre *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) em sementes de amendoim. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, Campina Grande, v. 14, n. 3, p. 309-313, 2010.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

BAŞER, K. H. C.; DEMIRCI, F. Chemistry of essential oils. **Book Flavours and Fragrances**. Berlin Heidelberg: Springer, 2007. p. 43-86.

BEZERRA, M. Z. B. et al. The essential oil of *Philodendron imbe* Schott (Araceae). **The Journal of Essential Oil Research**, v. 14, p. 56-57, 2002.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BLANCO, M.; VALVERDE, R. Micropropagación de *Philodendron* sp probablemente *P. corcovadense*). **Agronomía Costarricense**, v. 28, p. 39- 46, 2004.

BOBBIO, P. A.; BOBBIO, F. O. **Química do processamento de alimentos**. 3. ed. São Paulo:Varela, 2001. 144 p.

BORGES, A. R. et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 132, p. 123-128, 2012.

BOURGAUD, F. et al. Production of plant secondary metabolites: a historical. **Plant Science**, v. 161, p. 839–851, 2001.

BROOKS, G. F. **Microbiologia médica**. 21. ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2000.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie: food science and technology**, London, v. 28, n. 5, p. 25-30, 1995.

BUKATSCH, F. Bemerkungen zur doppelfärbung astrablau-safranin. **Mikrokosmos**, Stuttgart, v. 61, n. 8, p. 255, 1972.

BURGER, L. M.; RICHTER, H. G. **Anatomia da madeira**. São Paulo: Nobel, 1991. 160 p.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

CAMPOS, L. C. Salmonella. In: TRABULSI, L. R. et al. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005. p. 229-238.

CARSON, C. F.; MEE, B. J.; RILEY, T. V. 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. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 46, n. 6, p.1914-1920, 2002.

CARVALHO, J. C. T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios**: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 480 p.

CASTRO, D. P. et al. Preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera: Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, p. 27-32, 2006.

CHEKEM, M. S. G. et al. Antifungal properties of *Chenopodium ambrosioides* essential oil against *Candida* Species. **Pharmaceuticals**, v. 3, n. 9, p. 2900-2909, 2010.

CHIU, C. H.; SU, L. H.; CHU, C. Salmonella enterica serotype Choleraesuis: epidemiology, pathogenesis, clinical disease, and treatment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, p. 311-322, 2004.

CHU, S. S.; FENG, H. J., LIU, Z. L. Composition of essential oil of Chinese *Chenopodium ambrosioides* and insecticidal activity against maize weevil, *Sitophilus zeamais*. **Pest Manag Science**, v. 67, n. 6, p. 714-718, 2011.

COELHO, M. A. N. *Philodendron schott* (Araceae): morfologia e taxonomia das espécies da reserva ecológica de Macaé de cima – Nova Friburgo, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 51, n.78/79, p. 21-68, 2000.

CORRÊA, M. G. S. et al. Meiose e viabilidade polínica na família Araceae. **Acta Botanica Brasilica**, v. 19, n. 2, p. 295-303, 2005.

COSTA, M. V. L.; TAVARES, E. S. Anatomia foliar de *Chenopodium ambrosioides* L. (Chenopodiaceae)- erva-de-Santa Maria. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 3, p. 63-71, 2006.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1311.

CUNICO, M. M. et al. Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico de raízes e partes aéreas de *Ottonia martiana* Miq. (Piperaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v 14, p. 97-103, 2004.

DAVID, R.; CARDE, J. P. Calorisation différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du *Pin maritimeau* moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Academie des Sciences**, Paris, v. 258, p. 1338-1340, 1964.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3rd ed. Chichester: J. Wiley, 2009. 539 p.

DI STASI, L. C. et al. **Plantas medicinais da Amazônia**. São Paulo: Editora UnESP, 1989. 194 p.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agentes from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

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

ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: E. Blücher, 1974. 293 p.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Ateneu, 2000. Parte I. p. 2-7.

FEITOSA, C. M. et al. Constituintes químicos de *Philodendron imbe* Schott. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 41-44, 2007.

FERREIRA, D. F. SISVAR: a computer statistical analysis system. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 35, n. 6, p. 1039-1042, 2011.

FIGUEIREDO, A. C. S. et al. **Histoquímica e citoquímica em plantas: princípios e protocolos**. 1. ed. Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências. Centro de Biotecnologia Vegetal, 2007. 68 p.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança alimentar**. Porto Alegre: Artmed, 2005. 424 p.

FOTI, M. C.; DAQUINO, C.; GERACI, C. Electron-transfer reaction of cinnamic acids and their methyl esters with the DPPH radical in alcoholic solutions. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 69, p. 2309–2314, 2004.

GASPAR, F.; SANTOS, R.; KING, M. B. Disruption of glandular trichomes with compressed CO₂: alternative matrix pre-treatment for CO₂ extraction of essential oils. **Journal of Supercritical Fluids**, v. 21, n. 1, p. 11–22, Sept. 2001.

GASSEN, D. N. **Manejo de pragas associadas à cultura do milho**. Passo Fundo: Aldeia Norte, 1996. 134 p.

GERLACH, D. **Plant histochemistry and cytochemistry**. New York: Academic, 1984. 301 p.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, PEPORINE, N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 374-381, 2007.

GOTTLIEB, O. R.; SALATINO, A. Função e evolução de óleos essenciais e de suas estruturas secretoras. **Ciência e Cultura**, v. 39, n. 8, p. 707-716, 1987.

GRIMONT et al. Taxonomy of the Genus Salmonella. In: WRAY, C.; WRAY, A. (Ed.). Salmonella in domestic animals. Londres: Cabi, 2000. p. 567-578.

GUERRA, M. F.; BERNARDO, F. A. O risco da listeriose e a identificação do perigo-revisão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 99, p. 69-76, 2004.

GUIMARAES, L. G. et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agrônômica**, v. 42, n. 2, p. 464-472, 2011.

HARDY, K. J.; HAWKEY, F. G.; OPPENHEIM, B. A. Methicillin resistance *Staphylococcus aureus* in the critically ill. **British Journal of Anaesthesia**, v. 92, p. 121-130, 2004.

HIDALGO, M. E. et al. Antioxidant capacity of eugenol derivatives. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1467-1470, 2009.

HOHMANN, C. L.; CARVALHO, S. M. Pragas e seu controle. In: INSTITUTO AGRONÔMICO DO PARANÁ. **O feijão no Paraná**. Londrina, 1989. p. 217-246.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 1841-1856, 2005.

IARIA, S. T. et al. Pesquisa de *Staphylococcus aureus* enterotoxigênico nas fossas nasais de manipuladores de alimentos em hospitais, São Paulo, 1976. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 14, p. 93-100, 1980.

INOUE, S. et al. A novel method to estimate the contribution of the vapor activity of essential oils in agar diffusion assay. **Japanese Journal of Medical Microbiology**, Tokyo, v. 27, n. 2, p. 91-98, 2006.

JARAMILLO C. et al. Bioactividad del aceite esencial de *Chenopodium ambrosioides* colombiano. **Revista Cubana de Plantas Medicinables**, v. 17, n. 1, p. 54-64, 2012.

JAY, J. M. **Modern food microbiology**. 6. ed. Gaithersburg: Aspen, 2000.

JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. 2nd ed. New York: Mc-Graw-Hill, 1940. 523 p.

JOHNSON, R. J.; RUSSO, A. T. Molecular epidemiology of extraintestinal pathogenic (uropathogenic) *Escherichia coli*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 295, p. 383-404, 2005.

KARNOVSKY, M. J.; A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 27, p. 137-138, 1965.

KHELEF, N. et al. **The prokaryotes**: an evolving electronic resource for the microbiological community. 3. ed. New York: Springer, 2005.

KONEMAN, E. W. et al. **Diagnóstico microbiológico: texto e atlas colorido**. 5. ed. Rio de Janeiro: Medsi, 2001.

LADANIYA, M. S. **Citrus fruit biology, technology and evaluation**. 1th ed. San Diego: Academic, 2008. 558 p.

LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, n. 3, p. 453-462, Sept. 2001.

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. **Revista Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 71-77, 2003.

LIMA, R. K. et al. Bactericidal and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla* H.B.K. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, p. 523–528, 2012.

LIMA, R. K. et al. Atividade inseticida do óleo essencial de pimenta-longa (*Piper hispidinervum* C. DC.) sobre lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Acta Amazonica**, v. 39, p. 377-382, 2009.

LIMA, R. K. et al. Caracterização química e atividade inseticida do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. sobre a lagarta-do-cartucho do milho *Spodoptera frugiperda* (Smith, 1797) (Lepidoptera: Noctuidae). **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 26, n. 1, p. 1-5, 2010.

LOGUERCIO, A. P. et al. *C. Listeria monocytogenes*: um importante patógeno de origem alimentar. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 15, n. 80/81, p. 39-48, 2001.

LOPES-LUTZ, D. et al. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, p. 1732-1738, 2008.

LÜCKER J. **Metabolic engineering of monoterpene biosynthesis in plants**. Proefschrift: Wageningen University, 2002.

MAZZONETTO, F.; VENDRAMIM, J. D. Efeito de pós de origem vegetal sobre *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) em feijão armazenado. **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 32, n. 1, Jan./Mar.2003.

MILANEZ, J. M. **Atratividade e controle de diabrotica speciosa pelo uso da raiz de tayuyá (Cayaponia spp) na cultura do feijoeiro**. Chapecó: EMPASC/CPPP, 1987. 7 p.

MILANEZ, J. M.; PARRA, J. R. P. Biologia e exigências térmicas de *Diabrotica speciosa* (Germar) (Coleoptera: Chrysomelidae) em laboratório. **Anais da Sociedade Entomológica Brasileira**, v. 29, n. 1, p. 23-29, 2000.

MILLEZI, A. F. et al. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils *Thymus vulgaris*, *Cymbopogon citratus* and *Laurus nobilis* against five important foodborne pathogens. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 32, n. 1, p. 167-172, 2012.

MONZOTE, L. et al. Comparative chemical, cytotoxicity and antileishmanial properties of essential oils from *Chenopodium ambrosioides*. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 2, p. 281-286, 2011.

MOURA, N. S. G. **Avaliação de usos e da composição química dos óleos essenciais de algumas plantas aromáticas e medicinais utilizadas em Lisboa e Bragança**. 2011. 52 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Biotecnologia)- Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências, Lisboa, 2011.

NATARO, J. B.; KAPER, J. B. Diarrheagenic *Escherichia coli*. **Clinical Microbiology Review**, v. 11, p. 142-201, 1998.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**: approved standard. 6. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003. v. 23. (Replaces M7-A6, 2).

NAVAEI, M. N.; MIRZA, M. Chemical composition of the oil of *Chenopodium ambrosioides* L. from Iran. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 3, p. 88-88, 2004. Supplement. 2.

NENAAH, G. E.; IBRAHIM, S. I. A. Chemical composition and the insecticidal activity of certain plants applied as powders and essential oils against two stored-products coleopteran beetles. **Journal of Pest Science**, v. 84, p. 393-402, 2011.

OGUNWANDE, I. A. et al. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 15, n. 3, p. 147-152, 2005.

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Cinnamon essential oil and cinnamaldehyde in the control of bacterial biofilms formed on stainless steel surfaces. **European Food Research and Technology**, v. 234, p. 821-832, 2012.

OLIVEIRA, T. L. C. et al. Antimicrobial activity of *Satureja montana* L. essential oil against *Clostridium perfringens* type A inoculated in mortadella-type sausages formulated with different levels of sodium nitrite. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, p. 546-555, 2011.

OWOLABI, M. S. Volatile constituents and antibacterial screening of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* L. growing in Nigeria. **Natural Product Communications**, v. 4, n. 7, p. 989-992, 2009.

PACIORNIK, E. F. **A planta nossa de cada dia: plantas medicinais: descrição e uso**. Curitiba: Gráfica Copygraf, 1990. 92 p.

PANDEY, A. K. et al. In vitro antibacterial activities of the essential oils of aromatic plants against *Erwinia herbicola* (Lohnis) and *Pseudomonas putida* (Kris Hamilton). **Journal of the Serbian Chemical Society**, v. 77, n. 3, p. 313-323, 2012.

PEREIRA, A. A. et al. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, 2008.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. Piracicaba: USP/ESALQ, 2004. p. 1-10.

PIARU, S. P. et al. Antioxidant and antiangiogenic activities of the essential oils of *Myristica fragrans* and *Morinda citrifolia*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 4, p. 294-298, 2012.

PIMENTEL, F. A. et al. A convenient method for the determination of moisture in aromatic plants. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 373-375, mar./abr. 2006.

PIMENTEL, F. A. et al. Ação fungitóxica do óleo essencial de *Tanaecium nocturnum* (Barb. Rodr.) Bur. e K. Shum sobre o *Aspergillus flavus* isolado da castanha-do-Brasil (*Bertholletia excelsa*). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 40, n. 1, p. 213-220, 2010.

PINHO, M. A.; DEGENHARDT, R.; SMÂNIA JÚNIOR, A. Diversidade do gênero *Listeria* em uma planta de abate e industrialização de aves. **Biotemas**, v. 19, n. 4, p.7-12, dez. 2006.

QUINTELA, E. D. Manejo integrado dos insetos e outros invertebrados pragas do feijoeiro. **Informe Agropecuário**, v. 25, p. 113-136, 2004.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

REEVES, M. W. et al. Clonal nature of *Salmonella* Typhi and its genetic relatedness to other *Salmonellae* as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori*. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 27, n. 2, p. 313-320, 1989.

ROBARDS, A. W. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: HALL, J. L. **Electron microscopy and cytochemistry of plant cells**. New York: Elsevier, 1978. 444 p.

ROGER, J. D. P. **Plantas mágicas**: enciclopédia das plantas medicinais. São Paulo: Planeta, 1998.

SAKURAGUI, C. M. et al. Flora da Serra do Cipó, Minas Gerais: Araceae. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 25, n. 1, p. 87-94, 2007.

SCHWARTZ, K. J. Salmonellosis. In: STRAW, B. E. et al. (Ed.). **Disease of swine**. 8th ed. Iowa: Iowa State University, 1999. p. 535–551.

SEFFRIN, R. D. C. A. D. S. et al. Comportamento alimentar de adultos de *Diabrotica speciosa* na presença de extratos aquosos de Meliaceae. **Ciência Rural**, v. 38, p. 2115-2118, 2008.

SIKKEMA, J.; BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Mechanisms of membrane toxicity of hydrocarbons. **Microbiological Reviews**, v. 59, n. 2, p. 201-22, 1995.

SILVA, A. L. *et al.* Avaliação do efeito de desfolha na cultura do feijoeiro (*Phaseolus vulgaris* L.). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 33, n. 2, jul./dez. 2003.

SILVA, N. A. *et al.* Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill. N.E.BR.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 8, p. 52-55, 2006.

SIMÕES, C. M. O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFSC/UFRGS, 2007. 1104 p.

SOARES, C. S. A *et al.* Atividade inseticida de óleos essenciais sobre *Macrosiphum euphorbiae* (Hemiptera: Aphididae) em roseira. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 7, n. 1, p. 169-175, 2012.

SOUSA, C. M. M. *et al.* Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SVOBODA, K. P.; GREENAWAY, R.I. Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L. (summer savory) and phytochemical comparison of different varieties. **The International Journal of Aromatherapy**, v. 13, n. 4, p. 196-202, 2003.

TAVARES, M. A. G. C.; VENDRAMIM, J. D. Bioatividade da Erva-de-Santa-Maria, *Chenopodium ambrosioides* L., sobre *Sitophilus zeamais* Mots. (Coleoptera: Curculionidae). **Neotropical Entomology**, v. 34, p. 319-323, 2005.

TEBALDI, V. M. R. **Análise e potencial de uso de óleos essenciais no controle *pseudomonas* sp. e na formação de biofilmes por *pseudomonas aeruginosa***. 2008. 94 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos)- Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

TOMAINO, A. *et al.* Influence of heating on antioxidant activity and the chemical composition of some spice essential oils. **Food Chemistry**, v. 89, p. 549-554, 2005.

TORTORA, G. J. **Microbiologia**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2000.

TURINA, A. V. *et al.* Natural terpenes: self-assembly and membrane partitioning. **Biophys. Chem.**, v. 122, p. 101-113.2006.

VALERIANO, C. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 1, p. 57-67, 2012.

VALKAMA, E. et al. Comparative analysis of leaves trichome structure and composition of epicuticular flavonoids in Finnish Birch species. **Annals of Botany**, London, v. 91, n. 6, p. 643-655, 2003.

VELLUTI, A. et al. Inhibitory effect of cinnamon, clove, lemongrass, oregano and palmarose essential oils on growth and fumonisin B1 production by *Fusarium proliferatum* in maize grain. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 89, n. 2/3, p. 145-154, Dec. 2003.

VENDRAMIM, J. D.; CASTIGLIONI, E. Aleloquímicos, resistência de plantas e plantas inseticidas. In: GUEDES, J. C.; COSTA, I. D.; CASTIGLIONI, E. (Org.). **Bases e técnicas do manejo de insetos**. Santa Maria: Pallotti, 2000. p. 113-128.

VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite production in plants. **Plant Biotechnology**, v. 13, p. 181-187, 2002.

VIANNA, W. O.; SOARES, M. K. M.; APPEZZATO-DA-GLÓRIA, B. Anatomia da raiz escora de *Philodendron bipinnatifidum* Schott (Araceae). **Acta Botanica Brasilica**, v. 15, n. 3, p. 313-320, 2001.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle de insetos. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

VIEIRA, P. C.; MAFEZOLI, J.; BIAVATTI, M. W. Inseticidas de origem vegetal. In: FERREIRA, J. T. B.; CORRÊA, A. G.; VIEIRA, P. C. **Produtos naturais no controle de insetos**. São Carlos: UFSCar, 2001. 176 p.

VIUDA-MARTOS, M. et al. Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a mediterranean diet. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 25, n. 1, p. 13-19, Jan./Feb. 2009.

WALSH, G. C. Hosta range and reproductive traits of *Diabrotica speciosa* (Germar) and *Diabrotica viridula* (F.) (Coleoptera: Chrysomelidae), two species of south american pest tootworms, with notes on other species of Diabroticina. **Environmental Entomology**, Maryland, v. 32, n. 2, p. 276-285, 2003.

WANG, W. et al. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. **Food Chemistry**, v. 108, p. 1019-1022, 2008.

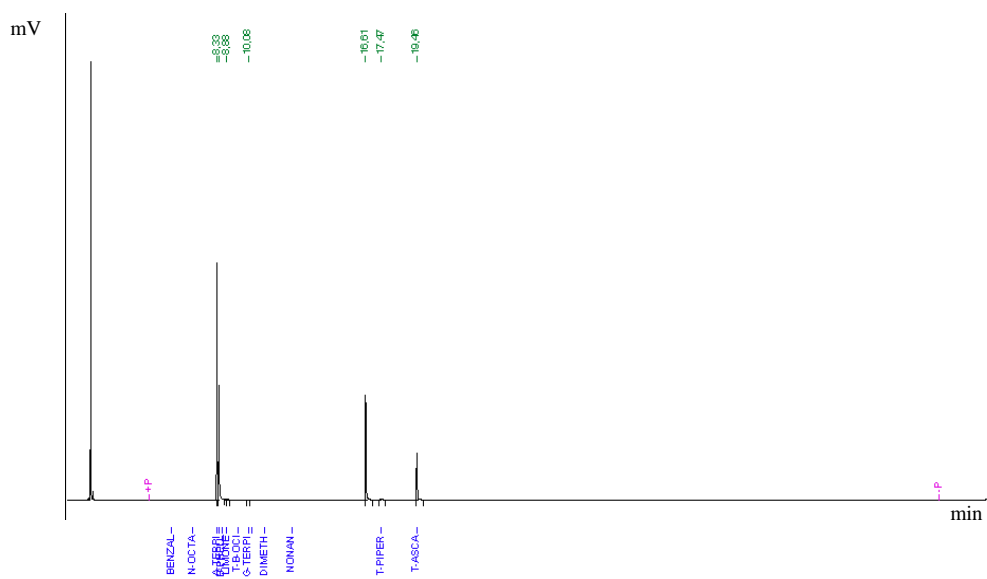
WILES, J. T.; KULESUS, R. R.; MULVEY, A. M. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 85, p. 11-19, 2008.

ZACARONI, L. M. et al. Potencial fungitóxico do óleo essencial de *Piper hispidinervum* (pimenta Longa) sobre os fungos fitopatogênicos *Bipolaris sorokiniana*, *Fusarium oxysporum* e *Colletotrichum gloesporioides*. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 39, n. 1, p. 193-198, 2009.

ZHANG, H. et al. Evaluation of antioxidant activity of parsley (*Petroselinum crispum*) essential oil and identification of its antioxidant constituents. **Food Research international**, v. 39, p. 833-839, 2006.

APÊNDICE

APÊNDICE A

Figura 1A Cromatograma do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L

APÊNDICE B

Tabelas de análises de variância e equações de regressão das atividades antioxidantes dos óleos essenciais de *Philodendron bipinnatifidum* Schott (óleo 1), *Chenopodium ambrosioides* L. (óleo 2), e o padrão butilhidroxitolueno.

Tabela 1B Análise de variância para a porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais/padrão pelo método β -caroteno/ácido linoleico.

FL	GL	SQ	QM	Fc	Valor p
Concentração	7	4600,81	657,26	500,66*	0,00
Óleos/padrão	2	59486,82	29743,41	22656,63*	0,00
Conc. x Óleos/padrão	14	1676,88	119,78	91,24*	0,00
Erro	48	63,01	1,31		
Total	71	65827,52			

CV= 3,0%

Tabela 2B Desdobramento da interação Concentração: Óleos/padrão.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Valor p
Conc.: Óleo 1	7	485,96	69,42	52,88*	0,00
Conc.: Óleo 2	7	5024,92	717,85	546,81*	0,00
Conc.: BHT	7	766,80	109,54	83,44*	0,00
Erro	48	63,01	1,31		

Tabela 3B Análise de regressão para a porcentagem de atividade antioxidante do óleo essencial de *P. bipinnatifidum* Schott pelo método β -caroteno/ácido linoleico.

FV	GL	SQ	QM	Fc	R ²
E. 1ºG	1	386,06	386,06	294,08*	79,4%
E. 2ºG	1	73,12	73,12	55,70*	94,5%
Desvio	5	26,78	5,35	4,08*	
Erro	48	63,01	1,31		

Tabela 4B Análise de regressão para a porcentagem de atividade antioxidante do óleo essencial de *C. ambrosioides* L. pelo método β -caroteno/ácido linoleico.

FV	GL	SQ	QM	Fc	R ²
E. 1ºG	1	4635,95	4635,95	3531,38*	92,3%
E. 2ºG	1	296,63	296,63	225,95*	98,2%
Desvio	5	92,33	18,46	14,07*	
Erro	48	63,01	1,31		

Tabela 5B Análise de regressão para a porcentagem de atividade antioxidante do padrão BHT pelo método β -caroteno/ácido linoleico.

FV	GL	SQ	QM	Fc	R ²
E. 1ºG	1	471,14	471,14	358,88*	61,4%
E. 2ºG	1	167,48	167,48	127,58*	83,3%
Desvio	5	128,18	25,63	19,53*	
Erro	48	63,01	1,31		

Tabela 6B Desdobramento da interação Óleos/padrão: Concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Valor p
Óleos/padrão: 25	2	7094,21	3547,11	2701,96*	0,00
Óleos/padrão: 50	2	8802,80	4401,40	3352,71*	0,00
Óleos/padrão: 100	2	8588,98	4294,49	3271,27*	0,00
Óleos/padrão: 150	2	8422,68	4211,34	3207,93*	0,00
Óleos/padrão: 200	2	7340,59	3670,30	2795,80*	0,00
Óleos/padrão: 250	2	7111,25	3555,63	2708,45*	0,00
Óleos/padrão: 300	2	6742,91	3371,45	2568,16*	0,00
Óleos/padrão: 500	2	7060,26	3530,12	2689,03*	0,00
Erro	48	63,01	1,31		

Tabela 7B Análise de variância para a porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais/padrão pelo método de sequestro de radicais DPPH.

FL	GL	SQ	QM	Fc	Valor p
Concentração	7	5554,42	793,49	333,06*	0,00
Óleos/padrão	2	76484,87	38242,43	16052,15*	0,00
Conc. x Óleo/padrão	14	7526,07	537,58	225,64*	0,00
Erro	48	114,35	2,38		
Total	71	89679,71			

CV= 5,6%

Tabela 8B Desdobramento da interação Concentração: Óleos/padrão.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Valor p
Conc.: Óleo 1	7	66,26	9,46	3,97	0,00
Conc.: Óleo 2	7	429,68	61,38	25,76	0,00
Conc.: BHT	7	12584,54	1797,79	754,62	0,00
Erro	48	114,35	2,38		

Tabela 9B Análise de regressão para a porcentagem de atividade antioxidante do óleo essencial de *Philodendron bipinnatifidum* Schott pelo método β -caroteno/ácido linoleico.

FV	GL	SQ	QM	Fc	R ²
E. 1ºG	1	53,67	53,67	22,53*	81,0%
E. 2ºG	1	12,49	12,49	5,24*	99,8%
Desvio	5	0,09	0,02	0,008	
Erro	48	114,35	2,38		

Tabela 10B Análise de regressão para a porcentagem de atividade antioxidante do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* L. pelo método β -caroteno/ácido linoleico.

FV	GL	SQ	QM	Fc	R ²
E. 1ºG	1	354,09	354,09	148,63*	82,4%
E. 2ºG	1	20,66	20,66	8,67*	87,2%
Desvio	5	54,92	10,98	4,61*	
Erro	48	114,35	2,38		

Tabela 11B Análise de regressão para a porcentagem de atividade antioxidante do padrão BHT pelo método β -caroteno/ácido linoleico.

FV	GL	SQ	QM	Fc	R ²
E. 1ºG	1	7326,72	7326,72	3075,37*	58,2%
E. 2ºG	1	4300,70	4300,70	1805,21*	92,4%
Desvio	5	957,12	191,42	80,35*	
Erro	48	114,35	2,38		

Tabela 12B Desdobramento da interação Óleos/padrão: Concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Valor p
Óleos/padrão: 25	2	1292,25	646,13	271,21*	0,00
Óleos/padrão: 50	2	4706,07	2353,04	987,68*	0,00
Óleos/padrão: 100	2	6325,92	3162,96	1327,64*	0,00
Óleos/padrão: 150	2	13968,49	6984,24	2931,62*	0,00
Óleos/padrão: 200	2	15080,57	7540,28	3165,01*	0,00
Óleos/padrão: 250	2	15262,13	7631,07	3203,12*	0,00
Óleos/padrão: 300	2	14282,46	7141,23	2997,51*	0,00
Óleos/padrão: 500	2	13093,02	6546,51	2747,88*	0,00
Erro	48	114,35	2,38		

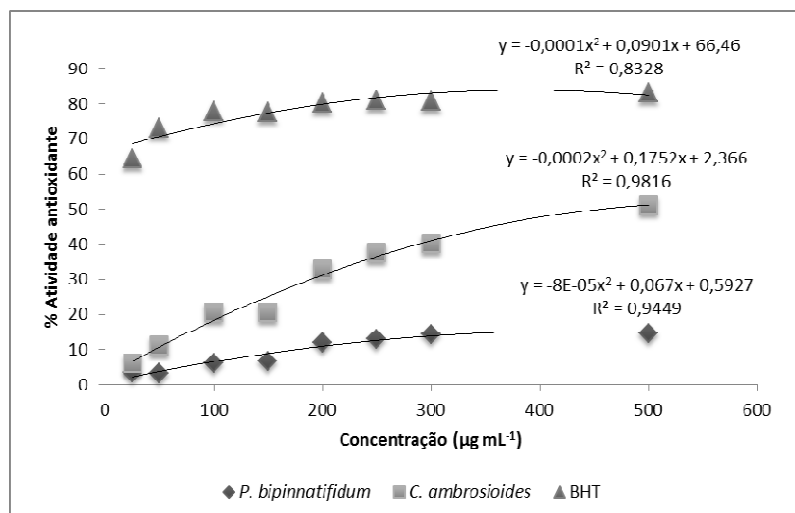


Figura 1B Equações de regressão para concentração e para a porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais/padrão pelo método β-caroteno/ácido linoleico

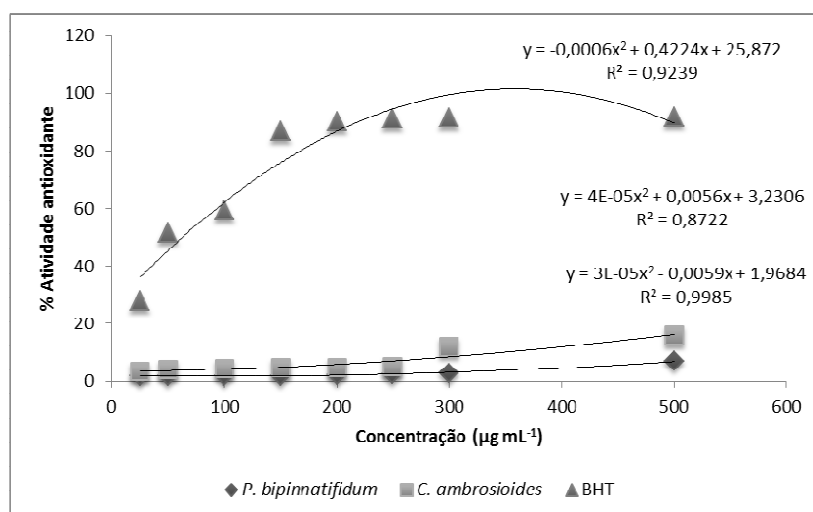


Figura 2B Equações de regressão para concentração e para a porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais/padrão pelo método de sequestro de radicais DPPH

APÊNDICE C

Tabela 1C Valores médios dos halos de inibição (cm) de *Escherichia coli* exposta às diferentes concentrações dos óleos essenciais de *Chenopodium ambrosioides* L. e *Philodendron bipinnatifidum* Schott.

Bactéria	Proporção (óleo essencial /DMSO)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halos de inibição (cm)	
			<i>Chenopodium.</i> <i>ambrosioides</i> L.	<i>Philodendron</i> <i>bipinnatifidum</i> Schott
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	Cloranfenicol	1 g L ⁻¹	2,92 a	2,75 a
	1:1	500	1,05 b	0 b
	1:2	250	0,83 c	0 b
	1:4	125	0,55 d	0 b
	1:8	62,50	0 e	0 b
	1:16	31,25	0 e	0 b
	1:32	15,62	0 e	0 b
	1:64	7,81	0 e	0 b
	1:128	3,90	0 e	0 b
	DMSO	0	0 e	0 b
CV (%)			6,6	20,7

Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Tabela 2C Valores médios dos halos de inibição (cm) de *Listeria monocytogenes* exposta às diferentes concentrações dos óleos essenciais *Chenopodium ambrosioides* L. e *Philodendron bipinnatifidum* Schott.

Bactéria	Proporção (óleo essencial /DMSO)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halos de inibição (cm)	
			<i>Chenopodium.</i> <i>ambrosioides</i> L.	<i>Philodendron</i> <i>bipinnatifidum</i> Schott
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 19117)	Cloranfenicol	1 g L ⁻¹	2,47 a	2,60 a
	1:1	500	1,50 b	0 b
	1:2	250	0 c	0 b
	1:4	125	0 c	0 b
	1:8	62,50	0 c	0 b
	1:16	31,25	0 c	0 b
	1:32	15,62	0 c	0 b
	1:64	7,81	0 c	0 b
	1:128	3,90	0 c	0 b
	DMSO	0	0 c	0 b
CV (%)			2,3	16,1

Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Tabela 3C Valores médios dos halos de inibição (cm) de *Salmonella Cholerasuis* exposta às diferentes concentrações dos óleos essenciais *Chenopodium ambrosioides* L. e *Philodendron bipinnatifidum* Schott.

Bactéria	Proporção (óleo essencial /DMSO)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halos de inibição (cm)	
			<i>Chenopodium.</i> <i>ambrosioides</i> L.	<i>Philodendron</i> <i>bipinnatifidum</i> Schott
<i>Salmonella Cholerasuis</i> (ATCC 11229)	Cloranfenicol	1 g L ⁻¹	2,98 a	3,03 a
	1:1	500	0,70 b	0 b
	1:2	250	0,58 c	0 b
	1:4	125	0,47 d	0 b
	1:8	62,50	0 e	0 b
	1:16	31,25	0 e	0 b
	1:32	15,62	0 e	0 b
	1:64	7,81	0 e	0 b
	1:128	3,90	0 e	0 b
	DMSO	0	0 e	0 b
CV (%)			7,5	13,1

Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

Tabela 4C Valores médios dos halos de inibição (cm) de *Staphylococcus aureus* exposta às diferentes concentrações dos óleos essenciais *Chenopodium ambrosioides* L. e *Philodendron bipinnatifidum* Schott.

Bactéria	Proporção (óleo essencial /DMSO)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halos de inibição (cm)	
			<i>Chenopodium.</i> <i>ambrosioides</i> L.	<i>Philodendron</i> <i>bipinnatifidum</i> Schott
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 13565)	Cloranfenicol	1 g L ⁻¹	2,20 a	2,37 a
	1:1	500	1,82 ab	1,10 b
	1:2	250	0,53 abc	0,58 c
	1:4	125	1,07 cd	0,48 c
	1:8	62,50	0,80 d	0 d
	1:16	31,25	0 e	0 d
	1:32	15,62	0 e	0 d
	1:64	7,81	0 e	0 d
	1:128	3,90	0 e	0 d
	DMSO	0	0 e	0 d
CV (%)			36,8	9,9

Médias seguidas da mesma letra nas colunas, não diferem significativamente entre si a 5% de probabilidade, pelo teste Tukey.

APÊNDICE D

Tabelas de análises de variância referentes à atividade inseticida dos óleos essenciais de *Philodendron bipinnatifidum* Schott (óleo 1) e *Chenopodium ambrosioides* L. (óleo 2).

Tabela 1D Análise de variância para área foliar consumida (cm²) no teste com chance escolha.

FL	GL	SQ	QM	Fc	Valor p
Amostras	1	20241,00	20241,00	5,86	0,02
Concentração	4	37779,61	9444,90	2,73	0,04
Conc. x Amostras	4	28765,45	7191,36	2,08	0,10
Erro	30	103471,93	3449,06		
Total	39	190258,00			

CV= 33,8%

Tabela 2D Análise de variância para a porcentagem de injria foliar causada pelos insetos no teste com chance de escolha.

FL	GL	SQ	QM	Fc	Valor p
Amostras	1	5820,88	5820,88	11,15	0,00
Concentração	4	482,56	120,64	0,23	0,91
Conc. x Amostras	4	2205,80	551,45	1,05	0,39
Erro	30	15649,49	521,64		
Total	39	24158,74			

CV= 39,7%

Tabela 3D Análise de variância para área foliar consumida (cm²) no teste sem chance escolha.

FL	GL	SQ	QM	Fc	Valor p
Amostras	1	123502,10	123502,10	47,09	0,00
Concentração	4	291102,48	72775,62	27,75	0,00
Conc. x Amostras	4	120768,36	30192,09	11,51	0,00
Erro	30	78674,54	2622,48		
Total	39	614047,49			

CV= 23,6%

Tabela 4D Análise de variância para a porcentagem de injuria foliar causada pelos insetos no teste sem chance de escolha.

FL	GL	SQ	QM	Fc	Valor p
Amostras	1	7005,02	7005,02	50,52	0,00
Concentração	4	935,56	233,89	1,68	0,17
Conc. x Amostras	4	2469,15	617,28	4,45	0,00
Erro	30	4159,77	138,65		
Total	39	14569,51			

CV= 19,6%

Tabela 5D Análise de variância para a porcentagem de mortalidade dos insetos frente aos óleos essenciais.

FL	GL	SQ	QM	Fc	Valor p
Amostras	1	105,62	105,62	0,85	0,36
Concentração	4	3260,00	815,00	6,61	0,00
Conc. x Amostras	4	85,00	21,25	0,17	0,95
Erro	30	3693,75	123,12		
Total	39	7144,37			

CV= 61,5%