



**DANÚBIA APARECIDA DE CARVALHO SELVATI
REZENDE**

**ESTUDO ETNOBOTÂNICO DE PLANTAS
MEDICINAIS DE LAVRAS E REGIÃO:
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E
POTENCIALIDADES BIOLÓGICAS DOS
ÓLEOS ESSENCIAIS**

**LAVRAS-MG
2016**

DANUBIA APARECIDA DE CARVALHO SELVATI REZENDE

**ESTUDO ETNOBOTÂNICO DE PLANTAS MEDICINAIS DE LAVRAS
E REGIÃO: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E POTENCIALIDADES
BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS**

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

**LAVRAS – MG
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da
Biblioteca Universitária da UFLA

Rezende, Danubia Aparecida de Carvalho Selvati.

Estudo etnobotânico de plantas medicinais de Lavras e região:
caracterização química e potencialidades biológicas dos óleos
essenciais / Danubia Aparecida de Carvalho Selvati Rezende. –
Lavras : UFLA, 2016.

117 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2016.

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Plantas medicinais. 2. Óleos essenciais. 3. Atividade
antioxidante. 4. Atividade antibacteriana. 5. Atividade hemolítica e
fosfolipásica. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

DANÚBIA APARECIDA DE CARVALHO SELVATI REZENDE

**ESTUDO ETNOBOTÂNICO DE PLANTAS MEDICINAIS DE LAVRAS
E REGIÃO: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E POTENCIALIDADES
BIOLÓGICAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS**

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 29 de fevereiro de 2016.

Dra. Maria das Graças Cardoso	UFLA
Dra. Silvana Marcussi	UFLA
Dr. Luís Roberto Batista	UFLA
Dr. Luiz Gustavo de Lima Guimarães	UFSJ

Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

LAVRAS – MG
2016

Aos meus pais, Denize e Valdoil, por não deixar que eu desistisse dos meus sonhos, por me darem forças para aguentar dias de desespero, por viverem comigo cada dor que eu sentia, cada humilhação vivida!

Ao meu irmão Delúbio, pelos abraços nos momentos que eu achava que não era possível um carinho!

Ao meu marido, Anderson, e a minha filha, Alice, por estarem comigo mesmo quando eu não queria companhia!

A Deus, por ter me dado a vida!

À professora Graça, por ter acreditado em mim quando ninguém mais acreditou!

Dedico

Agradecimentos

À minha mãe, Denize, e meu pai, Valdoil, por me ensinarem esse amor incondicional, a humildade, o respeito, a paciência, a honestidade e a fé, dizendo que a fé é o que nos sustenta, quando todos tentam nos derrubar. Por me protegerem nos temporais da vida com orações. Por me ensinarem também que o mais valioso que temos é a sabedoria, o conhecimento, pois isso ninguém nos tira. Agradeço por serem os meus pais... eu amo vocês!

A Deus, à Nossa Senhora Aparecida, à Santa Terezinha e a Santo Antônio, por me iluminarem sempre, por não deixar em que eu desviasse um só minuto desse caminho árduo.

À Universidade Federal de Lavras e ao Departamento de Química, pela oportunidade de realização do mestrado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes), pela bolsa concedida, ao CNPq e Fapemig, pelo suporte financeiro.

Um agradecimento incondicional tenho pela Professora Graça, por acreditar em mim, por me erguer quando o mundo me derrubava, por me estender a mão quando nenhuma outra pessoa o fez. Por me transformar, por me ensinar os valores da vida. Pelos ensinamentos e orientação. Pela amizade, por ser carinhosa sempre. Por ser não só uma orientadora, mas também uma amiga.

À Professora Silvana Marcussi, pela enorme paciência e disponibilidade para todas as minhas dúvidas, pela orientação, pelo carinho.

Ao Professor Luís Roberto Batista, pela disponibilidade, paciência, por ter aberto as portas do seu laboratório para a realização deste trabalho.

Ao meu irmão, Delúbio, pelas palavras de conforto em momentos difíceis, pelo imenso carinho e respeito que temos um pelo outro; agradeço por você existir.

Ao meu marido, Anderson, pela imensa compreensão e paciência, pelo companheirismo, pelo carinho. Por me erguer em dias sombrios,

dizendo palavras doces e me mostrando que um Deus zela por nós. Agradeço por não deixar que minha fé se enfraquecesse.

À minha filha, Alice, por tornar meus dias mais felizes, agradeço pelos sorrisos inocentes demonstrados naquelas horas que eu achava que não era possível sorrir! Obrigada, Alice, Eu te Amo...

Ao meu pai, pelos cuidados com a Alice na minha ausência, agradeço pela dedicação e carinho com ela.

À minha sogra, Elaine e meu sogro, Carlos, pelos cuidados dedicados à Alice, pelas refeições oferecidas para que eu não me ocupasse preparando-as e pudesse dedicar mais tempo em minha formação.

À Gih, Juliana, Déborah e “Sô Tião”, pela amizade, pelo carinho, pelos cuidados e pelas doces palavras.

Aos amigos Aparecida e Otaviano, pelas orações que me mantiveram de pé em momentos muito difíceis.

Às amigas do Laboratório de Química Orgânica – Óleos essenciais Maria Luisa, Rafaela Vieira, Thaís, Karen, Juliana, Mariana, Anni, Luana, Lucilene, Rafaela Brandão, pela amizade, pela agradável e divertida convivência.

Aos amigos do Laboratório de Análises de Qualidade de Aguardente, Cleusa, Allan, Wilder, Bruno, Alex, Gustavo, Francielli, Richard e Léo, pela amizade e convivência.

Agradeço em especial a amizade e o carinho das amigas Maria Luisa, Karen, Thaís, Rafaela Vieira, Juliana e do amigo Allan.

À Professora Josefina, pela amizade e convivência.

Ao pessoal do Laboratório de Bioquímica do DQI, Carlos, Pedro, Flávia, Gustavo, Lucas, pela ajuda nas horas de correria.

Ao pessoal do Laboratório de Micotoxinas e Micologia de Alimentos do DCA, Sirley, Natasha, Suemis, Michele, Fabi, Thayana, Wesley, Luisa.

*“Não consigo ir além do teu olhar
Tudo o que eu consigo é imaginar
A riqueza que existe dentro de você*

*O ouro eu consigo só admirar
Mas te olhando eu posso a Deus adorar
Sua alma é um bem que nunca envelhecerá*

*O pecado não consegue esconder
A marca de Jesus que existe em você
O que você fez ou deixou de fazer
Não mudou o início, Deus escolheu você
Sua raridade não está naquilo que você possui
Ou que sabe fazer
Isso é mistério de Deus com Você*

*Você é um espelho que reflete a imagem do Senhor
Não chore se o mundo ainda não notou
Já é o bastante Deus reconhecer o seu valor
Você é precioso, mais raro que o ouro puro de ofir
Se você desistiu, Deus não vai desistir
Ele está aqui pra te levantar se o mundo te fizer cair”*

Anderson Freire

RESUMO

A utilização das plantas como medicamento é comum nas comunidades e vem ganhando espaço nos dias atuais. Estudos etnobotânicos são promissores, pois apresentam informações valiosas a respeito de plantas medicinais; são conhecimentos transmitidos por sucessivas gerações. Os objetivos deste trabalho foram fazer um levantamento, por meio de um questionário das cinco plantas mais utilizadas pelos moradores de Lavras e região, extrair e caracterizar quimicamente os óleos essenciais dessas plantas, além de determinar as atividades antioxidante, antibacteriana, bem como sua ação indutora e/ou inibidora sobre as atividades hemolítica e fosfolipásica. Os óleos essenciais foram extraídos pela técnica de hidrodestilação, utilizando um aparelho de Clevenger modificado, durante 2 horas. Posteriormente, os óleos obtidos foram caracterizados e quantificados quimicamente por CG/EM e CG-DIC. A atividade antioxidante foi determinada empregando-se o método de sequestro de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), o ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, o método de captura do radical ABTS, hidroxil, poder redutor e a redução do molibdênio. A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada por meio da técnica de difusão cavidade em ágar, sobre os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella Choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa*. As atividades hemolítica e fosfolipásica foram realizadas utilizando placas de Petri contendo um gel elaborado com Agar e eritrócitos sanguíneos humanos; para atividade fosfolipásica, substituíram-se os eritrócitos por gema de ovo. A análise cromatográfica permitiu identificar como compostos majoritários do óleo essencial de *Mentha piperita* a carvona (84,3%) e o limoneno (10,9%); de *Cymbopogon citratus*, o geranial (47,7%), o neral (35,4%) e o mirceno (8,5%); de *Rosmarinus officinalis*, o 1,8-cineol (62,3%), a cânfora (17,3%) e o α -pineno (9,1%); de *Peumus boldus*, o formato de α -terpinila (61,99%), o *p*-cimeno (15,5%), o 1,8-cineol (10,6%), o ascaridol (2,7%) e o terpinen-4-ol (2,03%); de *Foeniculum vulgare* o metil chavicol (89,5%), o limoneno (6,15%) e a fenchona (3,80%). Foi observada maior atividade antioxidante quando avaliada pelo teste hidroxil para todos os óleos essenciais. Apenas os óleos essenciais de *C. citratus* e *P. boldus* apresentaram atividade considerável frente ao método da redução do molibdênio. Nos demais métodos, nenhum óleo essencial apresentou atividade antioxidante significativa. O óleo essencial de *C. citratus* foi o que apresentou menor concentração mínima inibitória (CMI) contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. O óleo essencial de *R. officinalis* atuou inibindo proteases e parcialmente fosfolipases A₂; os óleos de *M. piperita* e *F. vulgare* inibiram apenas as proteases na atividade hemolítica; já o óleo de *C. citratus* induziu hemólise, sendo o óleo essencial de *P. boldus* indutor de hemólise e potencializador de proteases.

Palavras-chave: estudo etnobotânico, óleo essencial, plantas medicinais, atividades biológicas.

ABSTRACT

The use of plants for medicine is common in Brazilian communities and has currently been gaining ground. Ethnobotanical studies show promise because they furnish valuable information about medicinal plants. Knowledge is transmitted by successive generations. The objectives of this study were to survey five plants most used by residents of Lavras and the region using a questionnaire, to extract and chemically characterize the essential oils of these plants and to determine the antioxidant and antibacterial activities, as well as their catalytic action, inhibitory activity against phospholipase and hemolytic activities. Essential oils were extracted by hydrodistillation using a modified Clevenger apparatus over a two-hour period. The oils were characterized chemically and quantified by GC-MS and GC-FID. The antioxidant activity was determined using the method of capture of the DPPH (2,2-diphenyl-1-picryl-hidrazila) radical, the oxidation of the β -carotene/linoleic acid system, the capture of the ABTS radical, the hydroxyl method, determination of reducing power and by reduction of molybdenum. Evaluation of antibacterial activity was performed by well diffusion in agar using *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella Choleraesuis* and *Pseudomonas aeruginosa*. The hemolytic phospholipase activities and were performed using Petri dishes containing agar gel and prepared human blood erythrocytes. To determine the phospholipase activity, the erythrocytes were replaced by egg yolk. The principal compounds in the essential oil from *Mentha piperita* were determined by gas chromatography to be carvone (84.3%) and limonene (10.9%); from *Cymbopogon citratus*, geranial (47.7%), neral (35.4%) and myrcene (8.5%); from *Rosmarinus officinalis*, 1,8-cineole (62.3%), camphor (17.3%) and α -pinene (9.1%); from *Peumus boldus*, α -terpinila (61.99%), *p*-cymene (15.5%), 1,8-cineole (10.6%), ascaridol (2.7%) and terpinen-4-ol (2.03%); from *Foeniculum vulgare*, methyl chavicol (89.5%), limonene (6.15%) and fenchone (3.80%). The highest antioxidant activity when evaluated by the hydroxyl test for all the essential oils. Only the essential oils from *C. citratus* and *P. boldus* presented significant activity in the molybdenum reduction method. In other methods, no significant antioxidant activity was observed for any of the essential oils. The lowest minimum inhibitory concentration (MIC) against Gram-negative and Gram-positive bacteria was observed for the essential oil from *C. citratus*. Inhibition of protease activity and partial inhibition of phospholipase A₂ were observed for the essential oil from *R. officinalis*. The oils from *M. piperita* and *F. vulgare* only inhibited proteases in the hemolytic activity test. *C. citratus* oil induced hemolysis, and the essential oil from *P. boldus* induced hemolysis and potentiated proteases.

Keywords: ethnobotanical study, essential oil, medicinal plants, biological activities

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	17
2. REFERENCIAL TEÓRICO	18
2.1 Estudo etnobotânico de plantas medicinais.....	18
2.2 <i>Mentha piperita</i> (hortelã).....	19
2.3 <i>Cymbopogon citratus</i> (capim-cidreira)	21
2.4 <i>Rosmarinus officinalis</i> (alecrim)	22
2.5 <i>Peumus boldus</i> (boldo).....	24
2.6 <i>Foeniculum vulgare</i> (erva-doce).....	25
2.7 Metabólitos secundários de plantas.....	26
2.8 Óleos essenciais	28
2.9 Atividade antioxidante dos óleos essenciais.....	35
2.10 Atividade antibacteriana <i>in vitro</i> dos óleos essenciais.....	37
2.11 Patógenos de origem alimentar - Doenças Transmitidas por Alimentos.....	39
2.11.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	40
2.11.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	41
2.11.3 <i>Salmonella Choleraesuis</i>	42
2.11.4 <i>Escherichia coli</i>	43
2.11.5 <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	44
2.12 Atividades hemolítica e fosfolipásica (<i>in vitro</i>)	45
2.13 Composição das peçonhas botrópicas	47
2.13.1 Fosfolipases (PLA ₂).....	48
2.13.2 Proteases	49

2.13.2.1	Metaloproteases.....	49
2.13.2.2	Serinoproteases	50
3.	MATERIAL E MÉTODOS	50
3.1	Aplicação do formulário.....	51
3.2	Óleos essenciais – material vegetal	51
3.2.1	Extração do óleo essencial	51
3.2.2	Identificação e quantificação química dos óleos essenciais.....	52
3.3	Atividades antioxidantes	53
3.3.1	Método de sequestro de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)	53
3.3.2	Oxidação sistema β -caroteno/ácido linoleico	54
3.3.3	ABTS (Neutralização do radical ABTS)	55
3.3.4	Hidroxil	55
3.3.5	Poder redutor	56
3.3.6	Redução do Molibdênio.....	56
3.4	Avaliação da atividade antibacteriana – Teste de difusão em ágar.....	57
3.5	Avaliação das atividades hemolítica (em meio sólido) e fosfolipásica	58
3.5.1	Atividade hemolítica	58
3.5.2	Atividade fosfolipásica.....	59
3.6	Análise estatística.....	60
4.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	60
4.1	Resultados da aplicação do formulário.....	60
4.2	Composição química dos óleos essenciais	62

4.3	Atividade antioxidante	70
4.4	Atividade antibacteriana	87
4.5	Atividade hemolítica em meio sólido.....	93
4.6	Atividade fosfolipásica.....	97
5.	CONCLUSÕES.....	99
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	100
7.	REFERÊNCIAS.....	102
8.	ANEXOS.....	115

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Aspecto geral da <i>Mentha piperita</i>	21
Figura 2 Aspecto geral de <i>Cymbopogon citratus</i>	22
Figura 3 Aspecto geral de <i>Rosmarinus officinalis</i>	23
Figura 4 Aspecto geral de <i>Peumus boldus</i>	25
Figura 5 Aspecto geral de <i>Foeniculum vulgare</i>	26
Figura 6 Rotas da biossíntese de metabólitos secundários. DXPS: 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato.....	27
Figura 7 Estrutura básica do fenilpropanoide	29
Figura 8 Biossíntese dos fenilpropanoides	30
Figura 9 Estrutura química do isopreno.....	31
Figura 10 Biossíntese de terpenos – Via Mevalonato.....	32
Figura 11 Biossíntese de terpenos – Via DXPS (1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato).....	34
Figura 12 Idade e sexo da população entrevistada de Lavras e região que consome plantas medicinais.....	61
Figura 13 Plantas medicinais mais consumidas pela população entrevistada de Lavras e região	62
Figura 14 Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de <i>Mentha piperita</i> ; (A) carvona (B) limoneno.....	63
Figura 15 Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i> ; (A) geranial (B) neral (C) mirceno.....	65
Figura 16 Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i> ; (A) 1,8-cineol (B) cânfora (C) α -pineno	66

Figura 17 Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de <i>Peumus boldus</i> ; (A) formato de α -terpinila (B) <i>p</i> -cimeno (C) 1,8-cineol (D) ascaridol (E) terpinen-4-ol	68
Figura 18 Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de <i>Foeniculum vulgare</i> ; (A) metil chavicol (B) limoneno (C) fenchona.....	69
Figura 19 Mecanismo geral da redução do DPPH.....	72
Figura 20 Provável mecanismo que explica a redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e a estabilização por ressonância do radical formado	73
Figura 21 Reação de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico	78
Figura 22 Provável mecanismo que explica a redução do radical ABTS e estabilização por ressonância do radical formado	81
Figura 23 Provável mecanismo da degradação oxidativa da desoxirribose por um radical hidroxil formado através da reação de Fenton e formação do cromógeno a partir do malonaldeído e ácido tiobarbitúrico	83
Figura 24 Provável mecanismo da proteção da desoxirribose por uma substância antioxidante	84
Figura 25 Provável mecanismo da redução do molibdênio	86
Figura 26 Reação da provável redução do íon ferricianeto a ferrocianeto ...	87
Figura 27 Atividade hemolítica em meio sólido dos óleos essenciais de <i>M. piperita</i> , <i>C. citratus</i> , <i>R. officinalis</i> , <i>P. boldus</i> e <i>F. vulgare</i> e do controle positivo contendo apenas peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i> .*Difere do controle positivo pelo teste Skott knott a 95% de significância.	94
Figura 28 Efeito dos óleos essenciais de <i>M. piperita</i> , <i>C. citratus</i> , <i>R. officinalis</i> , <i>P. boldus</i> e <i>F. vulgare</i> sobre a atividade hemolítica induzida pela peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i> (10 μ g), após incubação a 37°C por 30 minutos.*Difere do controle positivo pelo teste Skott knott a 95% de significância.	95
Figura 29 Efeito dos óleos essenciais de <i>M. piperita</i> , <i>C. citratus</i> , <i>R. officinalis</i> , <i>P. boldus</i> e <i>F. vulgare</i> sobre a atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i> (10 μ g) após incubação a 37°C por 30 minutos.*Difere do controle positivo pelo teste Skott knott a 95% de significância.	97

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Composição química do óleo essencial de <i>Mentha piperita</i>	63
Tabela 2 Composição química do óleo essencial de <i>Cymbopogon citratus</i>	64
Tabela 3 Composição química do óleo essencial de <i>Rosmarinus officinalis</i>	66
Tabela 4 Composição química do óleo essencial de <i>Peumus boldus</i>	68
Tabela 5 Composição química do óleo essencial de <i>Foeniculum vulgare</i>	69
Tabela 6 Valores da porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais e do padrão pelo método de sequestro de radicais DPPH.	71
Tabela 7 Valores da porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais e do padrão pelo método β -caroteno/ácido linoleico.	76
Tabela 8 Valores da porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais e do padrão pelo método ABTS.	78
Tabela 9 Valores da porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais e do padrão pelo método Hidroxil.	82
Tabela 10 Atividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método da Redução do fosfomolibênio.	85
Tabela 11 Concentração mínima inibitória dos óleos essenciais de <i>M.</i> <i>piperita</i> , <i>C. citratus</i> , <i>R. officinalis</i> , <i>P. boldus</i> e <i>F. vulgare</i> determinada para os micro-organismos <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Salmonella Choleraesuis</i> , <i>Escherichia coli</i> e <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	88

1. INTRODUÇÃO

O Brasil é um dos maiores centros de biodiversidade vegetal do planeta, com diversos ambientes e floras específicas abrigando centenas de grupos étnicos que introduziram na cultura popular a utilização de muitas espécies vegetais para os mais diversos fins, entre eles o uso medicinal. Além da assimilação dos conhecimentos indígenas, as contribuições trazidas pelos escravos e imigrantes representaram papel importante para o surgimento de uma medicina popular rica. Entre as plantas medicinais que tiveram origem na cultura dos diversos grupos indígenas, destacam-se a ipeca, o jaborandi, a carqueja, o guaraná, o taiuiá e a erva-de-bugre. Muitas outras foram trazidas pelos europeus, como a hortelã, a camomila, a malva, o funcho e, pelos africanos, a erva-guiné e o melão-de-são-caetano (COSTA; MAYWORM, 2011; SIMÕES et al., 2007).

É de extrema importância estudos etnobotânicos, pois visam a obter informações populares sobre o uso das plantas, dados bastante úteis para resgatar e valorizar conhecimentos relacionados à utilização de plantas como recurso terapêutico (SILVA; FARIA, 2014).

Nos últimos anos, a utilização de plantas com potenciais medicinais têm aumentado consideravelmente, com a finalidade de tratar, prevenir e curar doenças. Isso estimula a realização de estudos que busquem a caracterização, identificação e isolamento de novos compostos vegetais com propriedades medicinais. Entre esses compostos, destacam-se os óleos essenciais, considerados como aroma ou essência, sendo utilizados desde a antiguidade, devido às suas propriedades medicinais e sua importância em indústrias de cosméticos e alimentos. Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis extraídas dos vegetais por diferentes técnicas, despertando interesse devido às suas diversas propriedades como antissépticos, antimicrobianos, antifúngicos, anti-inflamatórios, repelentes, entre outras (SIMÕES et al., 2007).

Devido ao aumento do consumo de plantas medicinais e de medicamentos derivados dessas plantas, o mercado torna-se bastante promissor. Tem-se uma estimativa de que 5,5% dos medicamentos vendidos em farmácias de todo o Brasil. Sejam produtos contendo exclusivamente princípio ativo de origem vegetal. O baixo custo de produtos à base de plantas com fins medicinais é a principal razão da substituição do uso de produtos sintéticos por produtos naturais; no entanto, seu uso deve ser feito com cautela, pois as plantas são compostas de inúmeras substâncias, em sua maioria desconhecidas, muitas delas capazes de exercer ação tóxica sobre o organismo (BADKE et al., 2012; LUIZ-FERREIRA et al., 2008).

Os objetivos deste trabalho foram fazer um levantamento, por meio de um questionário, das cinco plantas mais utilizadas pelos moradores de Lavras e região, extrair e caracterizar quimicamente os óleos essenciais dessas plantas, além de determinar as suas atividades antioxidante, antibacteriana, hemolítica e fosfolipásica, bem como a ação inibitória dos óleos sobre as duas últimas atividades mencionadas.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Estudo etnobotânico de plantas medicinais

O termo “etnobotânica” surgiu em 1895, sendo criado pelo botânico norte-americano John William Harshberger, e descreve estudos sobre plantas utilizadas pelos povos primitivos e aborígenes. A partir daí, a etnobotânica compreende a ciência que estuda as relações entre o homem e as plantas em toda sua complexidade, e o uso que uma sociedade faz das plantas, incluindo as crenças e práticas culturais (BALICK; COX, 1996; COSTA; MAYWORM, 2011).

Civilizações primitivas perceberam a existência de plantas comestíveis e com elevada toxicidade que, ao serem utilizadas no combate

às doenças, revelaram um grande potencial curativo, assim como poderiam ser empregadas na caça e pesca. O homem sempre esteve ligado e dependente do universo vegetal, fazendo o uso de plantas tanto para finalidades medicinais quanto para seu próprio sustento. Antigos conhecimentos em relação às plantas foram repassados oralmente através de sucessivas gerações. Muitos povos ou civilizações ao longo dos anos foram armazenando um amplo conhecimento sobre o uso de várias plantas, das mais diferentes espécies e, com isso, aprenderam a usar e manipular plantas que possuem poderes curativos, muitas delas desempenhando um papel importante no desenvolvimento de novas drogas ao longo dos séculos (FIGUEIREDO et al., 2007; LORENZI; MATOS, 2008).

Apesar de as plantas medicinais já fazerem parte da cultura popular, nas últimas décadas, o interesse pela fitoterapia teve um aumento considerável entre usuários, pesquisadores e serviços de saúde. Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostram que 80% da população mundial fazem uso de plantas medicinais para a amenização ou cura de doenças. Desde então, a OMS tem expressado a sua posição a respeito da necessidade de valorizar a utilização de plantas medicinais no âmbito sanitário e na atenção básica à saúde (ROSA; CÂMARA; BÉRIA, 2011).

A utilização de plantas medicinais na cura ou alívio de doenças, que para muitos poderia parecer misticismo, feitiçaria ou folclore, atualmente é objeto de pesquisas científicas com validade comprovada diante da fitoquímica e da farmacologia (MARTINS et al., 2005).

2.2 *Mentha piperita* (hortelã)

Mentha piperita (Figura 1) é uma espécie também conhecida como hortelã ou hortelã-pimenta, pertencente à família Lamiaceae, estando entre os ingredientes mais utilizados na culinária e chás. Popularmente é utilizada no tratamento de distúrbios biliares, dispepsia, enterite, flatulência, gastrite e cólicas gastrointestinais, (MCKAY; BLUMBERG, 2006).

Seu óleo essencial tem propriedades antiespasmódica, anti-inflamatória, antiúlcera, antiviral e analgésica, sendo de grande importância econômica devido ao seu aroma e propriedades em geral (MCKAY; BLUMBERG, 2006).

Sartoratto et al. (2004), estudando o óleo essencial de *Mentha piperita*, encontraram como componentes majoritários o linalol (50%), carvona (23%), 3-octanol (10%) e terpin-4-ol (8%). Observaram que a concentração mínima inibitória do óleo essencial capaz de inibir o crescimento da levedura *Candida albicans* foi 0,74 mg mL⁻¹, seguido da inibição moderada de *Salmonella Choleraesuis* (0,60 mg mL⁻¹), e *Staphylococcus aureus* (1,00 mg mL⁻¹) e da forte inibição de *Enterococcus faecium* (0,15 mg mL⁻¹), evidenciando, assim, a potencialidade do óleo essencial.

McKay e Blumberg (2006), em uma revisão sobre *Mentha piperita* L., observaram a presença de fenólicos, incluindo ácido rosmarínico e vários flavonoides em suas folhas, e no óleo essencial verificaram o mentol e mentona como principais constituintes.

Estudos realizados por Santos et al. (2012) revelaram que o óleo essencial de plantas do gênero *Mentha* apresentam um alto valor comercial, pois um de seus constituintes, o mentol, é largamente utilizado em indústrias cosméticas, farmacêuticas, alimentícias e de higiene pessoal.

Ferreira et al. (2014) mostraram que o óleo essencial de *Mentha piperita* causa fragmentação da mitocôndria e condensação da cromatina, sem causar danos à membrana plasmática, induzindo apoptoses em células de roedores.



Figura 1 Aspecto geral da *Mentha piperita*

2.3 *Cymbopogon citratus* (capim-cidreira)

Cymbopogon citratus (Figura 2) é uma planta aromática pertencente à família Poaceae. No Brasil, é também conhecida como capim-cidreira, erva-cidreira, capim-santo, capim-de-cheiro, citronela, capim-catinga, patchuli, capim-marinho, capim-membeca, palha-de-camelos, capim-ciri, capim-citronela e esquenanto (LORENZI; MATOS, 2008).

O chá é a forma mais comum de consumo pela população, sendo utilizado como calmante, sudorífero, carminativo, diurético, também em casos de disenteria, problemas digestivos, cólica uterina e intestinal, dores diversas (dor de cabeça, abdominais e reumáticas) (COSTA et al., 2005).

Oliveira et al. (2010), estudando a composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *C. citratus*, encontraram como principais compostos o mirceno a 15,48%; o linalol a 1,51%; o neral 30,90% e o geranial 42,91%.

Segundo Burt (2004), o citral (mistura dos isômeros geranial e neral) possui a capacidade de aumentar a permeabilidade da membrana celular

devido à hidrofobicidade, permitida a lise da membrana celular bacteriana, provocando a morte celular, o que justifica a sensibilidade de micro-organismo da espécie *S. aureus* frente ao óleo essencial de *C. citratus*.



Figura 2 Aspecto geral de *Cymbopogon citratus*

2.4 *Rosmarinus officinalis* (alecrim)

Rosmarinus officinalis L. (Figura 3) é uma espécie da família Lamiaceae, conhecida popularmente como alecrim. Essa espécie tornou-se alvo de muitos estudos, por possuir propriedades carminativas, espasmolíticas, antioxidantes e, principalmente, antimicrobianas, as quais podem ser atribuídas aos variados constituintes presentes em seu óleo essencial (FERRARI et al., 2011).

Dentre os constituintes químicos do alecrim, destacam-se os flavonoides e os ácidos fenólicos. Essas substâncias são importantes devido a suas propriedades antioxidante, anti-inflamatória, antitumoral e estrogênica, o que sugere a atuação de alguns compostos fenólicos na prevenção de doenças coronárias e câncer (CUNHA et al., 2012).

Aumeeruddy-Elalfi, Gurib-Fakim e Mahomoodally (2016) identificaram como constituintes majoritários do óleo essencial de *R. officinalis*; o 1,8-cineol (47,5%), α -pineno (15,4%), terpinen-4-ol (7,22%) e linalol (4,54%).

Dados da Brasil (2010) mostram que os extratos de folhas de alecrim podem ser utilizados no combate a distúrbios circulatórios, sendo recomendado também como antisséptico e cicatrizante.

Estudos feito por Cleff et al. (2012) comprovam a atividade fungicida e fungistática do óleo essencial de alecrim frente a leveduras do gênero *Candida*. Analisando quimicamente o óleo essencial de *R. officinalis*, encontraram como constituintes majoritários a cânfora (56%), 1,8-cineol (16%), verbenona (7,8%) e mirceno (4%).



Figura 3 Aspecto geral de *Rosmarinus officinalis*

2.5 *Peumus boldus* (boldo)

Peumus boldus (Figura 4), pertencente à família Monimiaceae, é originária de regiões montanhosas do Chile, conhecida popularmente como boldo ou boldo-do-chile. Suas folhas são utilizadas sob a forma de chás e infusões na medicina popular para tratamento de problemas digestivos e hepáticos, como analgésico, laxante, tratamento da dor de cabeça, dor de ouvido, congestão nasal, dor de garganta, sedativo e hipnótico (SCHWANZ et al., 2008; SPEISKY; CASSELS, 1994) .

Ochoa et al. (2008), analisando o efeito causado pelo paracetamol em fígados de ratas, observou um potencial protetor hepático do boldo. Segundo os autores, o boldo tem sido utilizado como um importante auxiliar na digestão e no tratamento de doenças hepáticas. Seu efeito antioxidante é possivelmente o mais importante para aliviar tais sintomas. No extrato alcoólico dessa planta, foram encontrados flavonoides e alcaloides.

Segundo O'Brien, Carrasco-Pozo e Speisky (2006), a planta *Peumus boldus* contém entre 0,4 e 0,5% de alcaloides pertencentes à classe dos benzoquinolínicos, encontrando como principal alcaloide a boldina, representando cerca de 12 a 19% do conteúdo total de alcaloides.

Martínez et al. (1992) observaram que alguns alcaloides benzilisoquinolínicos fenólicos inibiram a peroxidação lipídica induzida por Fe^{2+} /cisteína de membranas microssomais de fígados de ratos.



Figura 4 Aspecto geral de *Peumus boldus*

2.6 *Foeniculum vulgare* (erva-doce)

Foeniculum vulgare (Figura 5) é uma planta conhecida como funcho, e suas sementes como erva-doce. Pertence à família Apiaceae, cujos frutos secos são destinados principalmente à elaboração de chás e condimentos. Seu óleo essencial é muito utilizado na fabricação de sabonetes e cosméticos (AZEVEDO et al., 2012).

A erva-doce é uma planta conhecida por suas propriedades terapêuticas, como expectorante, diurética, digestiva e condimentar (preparo de pães, bolos, biscoitos, licores e saladas), cosméticas e ornamentais, cultivada em hortas e jardins, além de ser utilizada na confecção de arranjos florais e o aspecto geral da planta erva-doce pode ser visto na Figura 5 (WANDERLEY; WANDERLEY; RAMOS, 2008).



Figura 5 Aspecto geral de *Foeniculum vulgare*

2.7 Metabólitos secundários de plantas

Metabolismo é um conjunto de reações químicas que ocorrem ininterruptamente em cada célula. Essas reações são direcionadas por enzimas específicas, sendo esses processos conhecidos como rotas metabólicas.

Células vegetais sintetizam compostos que são divididos em metabólitos primários e secundários, sendo o metabolismo primário responsável pela síntese de macromoléculas, como a celulose, lignina, proteínas, lipídeos, açúcares e outras substâncias fundamentais para a realização das funções vitais das plantas. Por outro lado, os compostos envolvidos na síntese do metabolismo secundário são produtos não necessariamente essenciais para o organismo produtor, mas garantem vantagens para a sobrevivência de sua espécie em seu habitat (OOTANI et al., 2013; SIMÕES et al., 2007).

Os metabólitos desempenham um importante papel na interação das plantas com o meio ambiente, como proteção, atração de polinizadores, adaptações ao estresse ambiental ou mesmo para sua defesa contra micro-

organismos, insetos, herbívoros, etc. (LIMA; MAGALHÃES; SANTOS, 2011; SIMÕES et al., 2007).

Esses metabólitos produzidos pelas plantas são divididos em: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados, todos eles originados de dois metabólitos intermediários, que são derivados da glicose: o ácido chiquímico e o acetil-CoA, como mostrado na Figura 6.

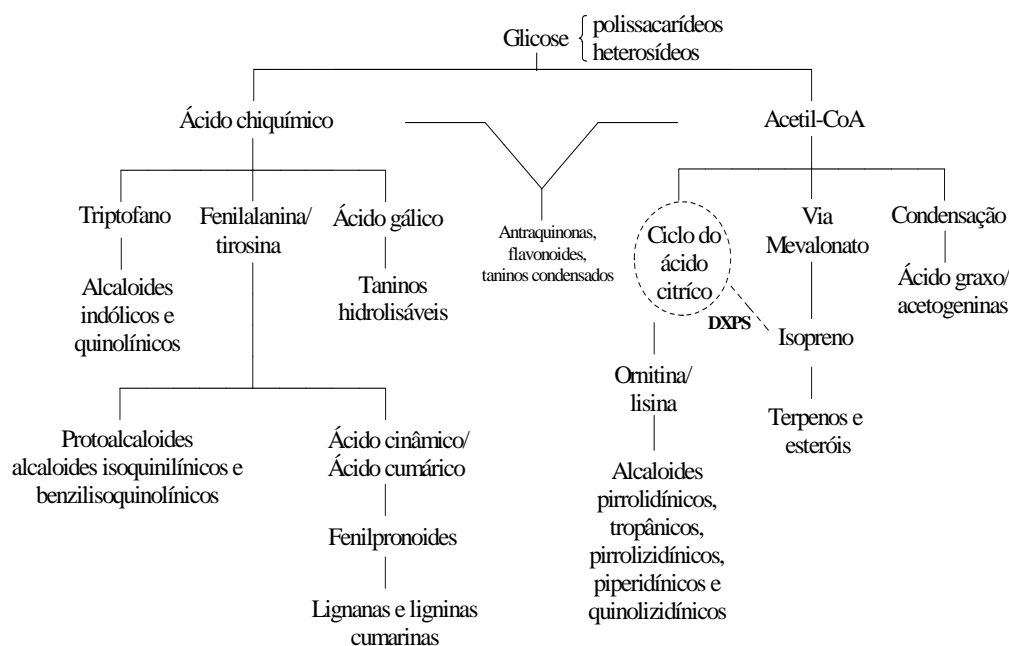


Figura 6 Rotas da biossíntese de metabólitos secundários. DXPS: 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato.

Fonte: Simões et al. (2007).

O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, como fenilalanina e tirosina, que, por sua vez, antecede a síntese da maioria dos metabólitos secundários aromáticos, como taninos hidrolisáveis e condensados, cumarinas, alcaloides e fenilpropanoides, compostos que têm em comum a presença de um anel aromático em sua composição. O acetil-CoA é precursor da síntese dos aminoácidos alifáticos, terpenoides, esteróis e ácidos graxos, fornecendo grupos acetila. Os aminoácidos alifáticos são

provenientes do ciclo do ácido cítrico, ao passo que os terpenoides resultam da via do mevalonato e os ácidos graxos da condensação do acetil-CoA. A combinação do ácido chiquímico e acetil-CoA resulta em antraquinonas, flavonoides e taninos condensados (SIMÕES et al., 2007).

2.8 Óleos essenciais

Óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis, líquidos e menos densos que a água à temperatura ambiente, são incolores ou ligeiramente amarelados e geralmente apresentam características odoríferas, podendo ser extraídos a partir de uma grande variedade de plantas, sendo normalmente encontrados, em pequenas quantidades, em glândulas específicas denominadas tricomas. Podem ser obtidos por diferentes técnicas, como destilação por arraste a vapor d'água, pressão dos pericarpos de frutos cítricos e hidrodestilação. Eles são de suma importância para indústrias de perfumaria, de cosméticos, agroalimentícias e farmacêuticas devido às suas propriedades terapêuticas, de proteção contra os processos de oxidação e deterioração por micro-organismos, e, por isso, estão sendo amplamente estudados (BAKKALI et al., 2008).

Alguns óleos essenciais podem apresentar coloração azulada, como é o caso de óleos extraídos de camomila, mil-folhas e arnicão, pois apresentam alto teor de azulenos, constituinte que caracteriza essa cor (SIMÕES et al., 2007)

Dependendo da família, os óleos essenciais podem ser encontrados em diferentes órgãos da planta, como nas raízes, rizomas, folhas, flores, sementes, entre outros; são encontrados também em diferentes estruturas secretoras, como em canais oleíferos, pelos glandulares, bolsas lisígenas e células parenquimáticas diferenciadas (SIMÕES et al., 2007).

Segundo Bakkali et al. (2008), os óleos essenciais são conhecidos por suas diversas propriedades, como antimicrobianas, analgésicas, sedativas, anti inflamatórias, anestésica local e suas fragrâncias. Por essas

ricas propriedades, eles atraíram a atenção de várias indústrias, promovendo a sua utilização na perfumaria, na preservação de alimentos e na elaboração de remédios.

Os óleos essenciais possuem vários constituintes em sua composição, entre eles os hidrocarbonetos terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos com enxofre. A composição do óleo essencial varia consideravelmente em função do clima, idade da planta, solo, altitude, sazonalidade, período (noite ou dia), etc. Apresentam diferentes concentrações dos seus constituintes; alguns são encontrados em maiores proporção, os chamados componentes majoritários, e outros, em menores, conhecidos como componentes minoritários. Apesar da complexidade de sua composição, os óleos essenciais são formados por fenilpropanoides e/ou terpenoides (DEWICK, 2009; GOBBO NETO; LOPES, 2007).

Os fenilpropanoides são caracterizados por apresentarem em sua estrutura um anel benzênico com uma cadeia lateral de três carbonos (Figura 7).

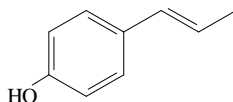


Figura 7 Estrutura básica do fenilpropanoide

Fenilpropanoides são compostos aromatizantes que possuem como precursor o ácido chiquímico, que é formado pela condensação de dois metabólitos da glicose: o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fostato. A junção de uma molécula do ácido chiquímico e de uma fosfoenolpiruvato dá origem ao ácido corísmico, responsável por gerar aminoácidos aromáticos, a fenilalanina e a tirosina, que com a ação da enzima fenilalanina amonialiase (FAL), resulta na formação dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico. Assim, pelas

reações de redução, oxidação e ciclização desses ácidos, os fenilpropanoides são formados (Figura 8) (SIMÕES et al., 2007).

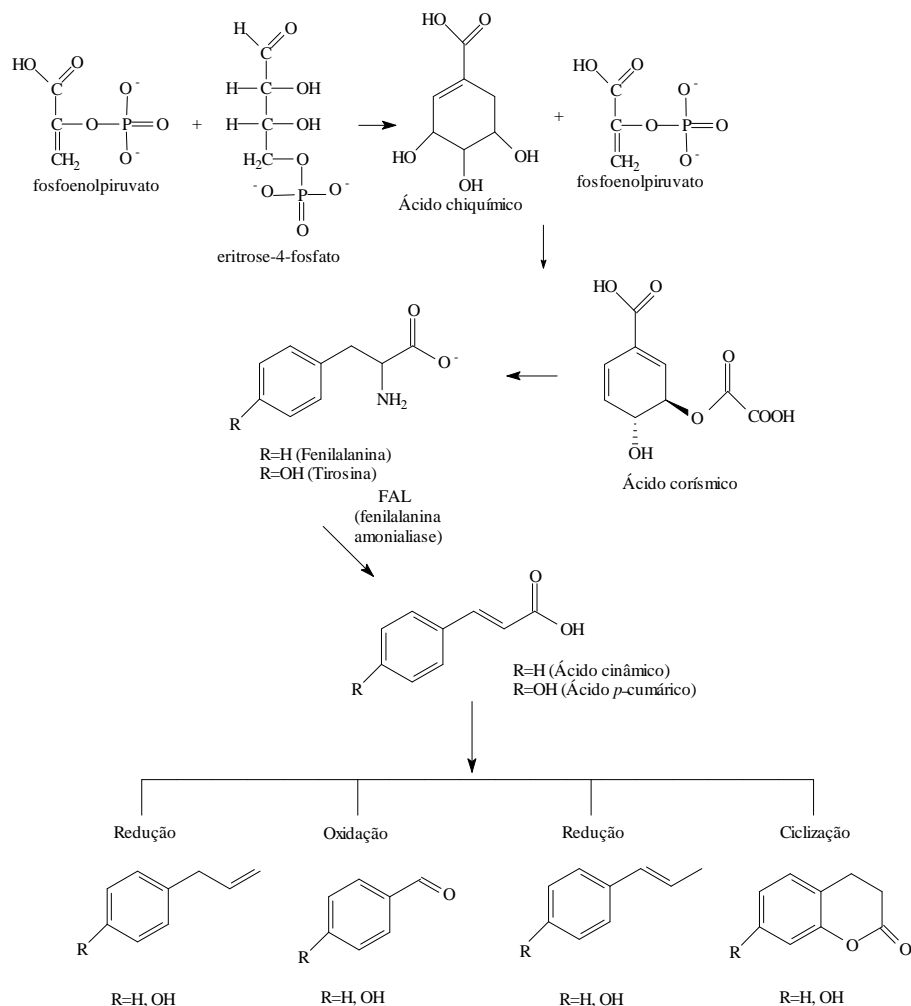


Figura 8 Biossíntese dos fenilpropanoides

Fonte: Simões et al. (2007).

De acordo com Simões et al. (2007), a biossíntese dos terpenos ocorre por duas vias: via do mevalonato, no citosol (Figura 10) e via DXPS (1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato) nos plátídios (Figura 11). As duas vias originam diferentes terpenoides, que são constituídos de duas ou mais unidades de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) (Figura 9).

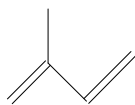


Figura 9 Estrutura química do isopreno

A classificação dos terpenos ocorre de acordo com o número de unidades isoprênicas. Moléculas com 10 átomos de carbono (duas unidades isoprênicas) são denominadas monoterpenos, os quais representam 90% da composição dos óleos essenciais, com 15 átomos de carbono, (três unidades isoprênicas) são os sesquiterpenos e com 20 átomos de carbono (4 unidades isoprênicas) são os diterpenos e assim sucessivamente (BAKKALI et al., 2008; SIMOES et al., 2007).

Terpenoides são terpenos que apresentam outro elemento, como o oxigênio. Compõem um grande grupo de metabólitos naturais, em que são conhecidos mais de 36.000 diferentes terpenoides, cuja grande diversidade deve-se à variabilidade das suas estruturas e dos grupos funcionais (LÜCKER, 2002).

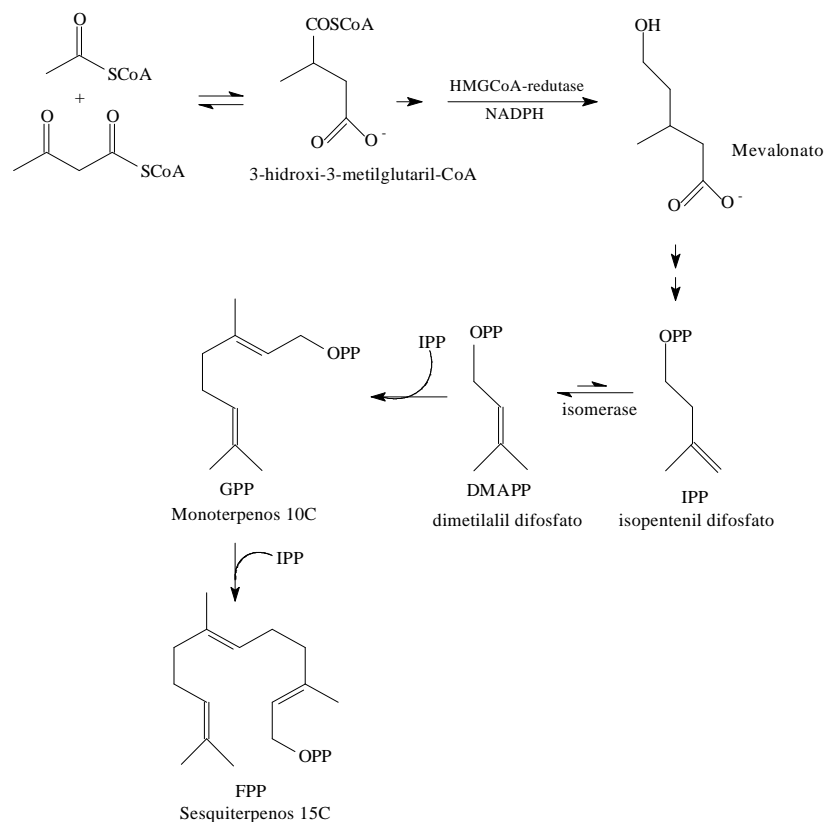


Figura 10 Biossíntese de terpenos – Via Mevalonato
 Fonte: Adaptado de Dewick (2009).

Pela via do mevalonato, três moléculas de acetil-CoA são ligadas por uma série de reações, formando o ácido mevalônico, um intermediário importante, que posteriormente será pirofosforilado, descaboxilado e desidratado para produzir o isopentenil difosfato (IPP), que é a unidade básica para a formação dos terpenos e, uma vez sofrendo reações de isomerização, se transforma em dimetilalil difosfato (DMAPP) (SIMÕES et al., 2007).

Ocorre a formação do IPP também via DXPS, em que ocorrem várias reações oriundas da rota do metileritritol fosfato (MEP), que ocorre nos plastídeos. O composto 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS) é formado a partir do gliceraldeído-3-fosfato e derivados do piruvato, que, após várias reações, resulta na formação do 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato. Então,

sucessivas reações acontecem para a formação do isopentenil difosfato (IPP) e dimetilalil difosfato (DMAPP) (DEWICK, 2009).

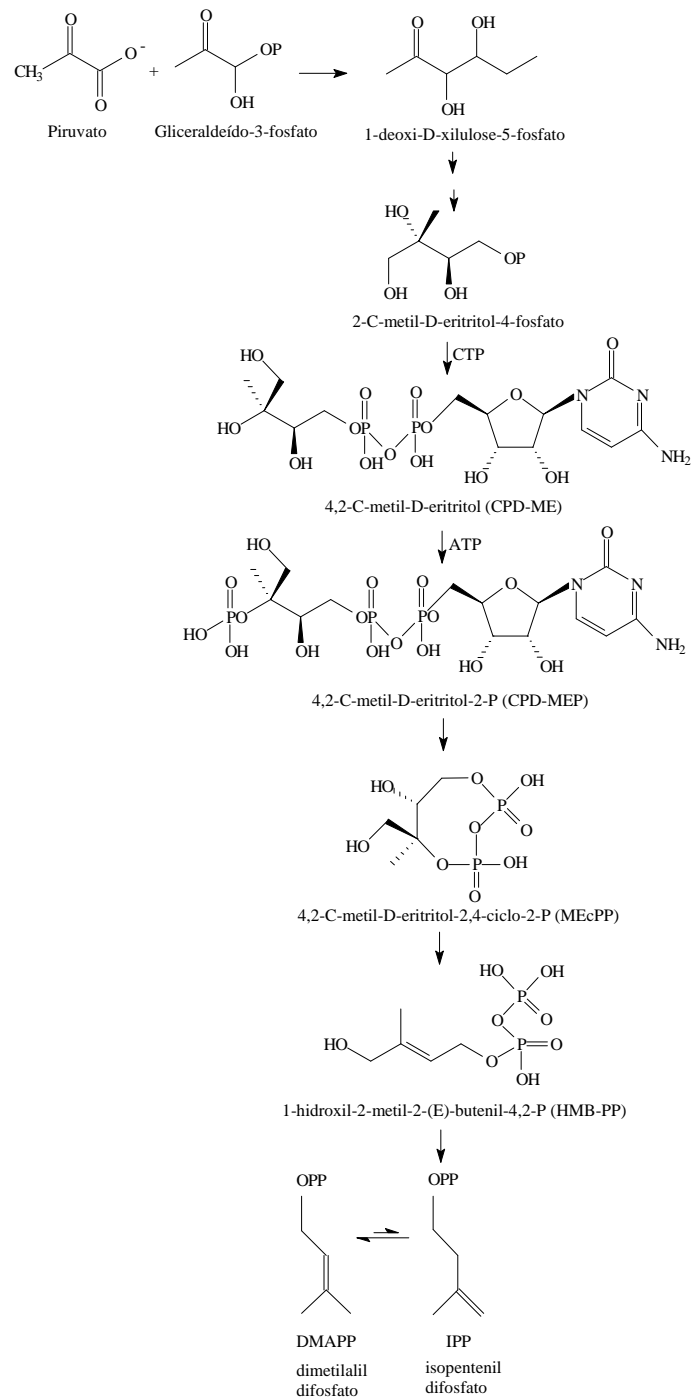


Figura 11 Biossíntese de terpenos – Via DXPS (1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato)

Fonte: Adaptado de Dewick (2009).

2.9 Atividade antioxidante dos óleos essenciais

Antioxidantes são definidos como sendo substâncias que, quando presentes mesmo em pequenas concentrações, impedem ou retardam a velocidade da oxidação, por meio de um ou mais mecanismos, inibem e/ou diminuem os efeitos desencadeados pelos radicais livres e compostos oxidantes em substratos oxidáveis. Essas substâncias podem ser enzimáticas, como a catalase e as glutationas peroxidases, encarregadas de reduzir peróxidos geradores de radicais $\bullet\text{OH}$ e $\bullet\text{OR}$. Destacam-se também as superóxido dismutases, consideradas como a linha de frente de defesa antioxidante. Entre as não enzimáticas, citam-se o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C), os compostos fenólicos e os óleos essenciais (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Muitos componentes produzidos por plantas têm sido objeto de pesquisas em relação ao potencial antioxidante, demonstrando resultados promissores. Dentre eles, destacam-se os óleos essenciais, que podem ser substitutos ou associados a produtos sintéticos, aumentando, assim, a aceitação dos produtos pelos consumidores, podendo também ser utilizados como matéria-prima em indústrias alimentícias, farmacêuticas, cosméticas, etc. (ANDRADE et al., 2013; MIRANDA et al., 2014a).

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados para controlar a oxidação lipídica são os compostos fenólicos butil-hidroxil-anisol (BHA), 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT), tert-butil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG). O uso de antioxidantes sintético é limitado em vários países, pois apresenta um alto efeito carcinogênico, fato demonstrado em experimentos com animais (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

A oxidação de compostos nada mais é que a perda de um ou mais elétrons para outra substância e o procedimento inverso pode ser considerado como redução. Essa transferência de elétrons é fundamental para a sobrevivência das células. Mas esse processo químico resulta na indesejável formação de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio

que podem causar oxidação. Radicais livres são átomos ou moléculas produzidos de modo contínuo durante os processos metabólicos, operando como mediadores, transferindo elétrons em várias reações bioquímicas, exercendo funções indispensáveis ao metabolismo (ALVES; DAVID, 2010).

Os radicais livres são fundamentais na produção de energia, na regulação do crescimento celular, na síntese de substâncias biológicas, etc. Mas, em excesso, podem causar várias alterações na estrutura e funções celulares, e são precursores de diversas doenças, como câncer, envelhecimento precoce, catarata, doenças cardiovasculares, degenerativas e neurológicas. Para o combate a esses radicais, os organismos vivos são capazes de produzir substâncias com capacidade de regeneração e/ou prevenção aos danos oxidativos, sendo essas substâncias conhecidas como antioxidantes, possuindo habilidade em sequestrar radicais livres e podem ser obtidas de fontes externas, como alimentos e bebidas (ALVES; DAVID, 2010).

Radicais livres também causam efeitos destrutivos em alimentos e plantas. Nesse caso, a peroxidação lipídica é a principal causa da deterioração dos ácidos graxos, sendo responsável pela modificação nas propriedades organolépticas dos alimentos.

Estudos realizados por Teixeira et al. (2014) com os óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e *Mentha spicata* L. revelaram que o óleo essencial de *Lippia origanoides* Kunth. apresentou alta atividade antioxidante na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente aos métodos testados; sequestro de radicais DPPH e oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, cerca de 50,9% e 52,3%, respectivamente; ao passo que o óleo essencial de *Mentha spicata* L. se mostrou muito ineficaz frente aos métodos testados, apresentando uma atividade de 13,8% para sequestro de radicais DPPH e 25,4% para o sistema β -caroteno/ácido linoleico.

Miranda et al. (2014a), correlacionando a composição química e a eficácia antioxidante de óleos essenciais de plantas condimentares, observaram que a capacidade dos óleos essenciais de *Thymus vulgaris* L. e

Ocimum basilicum L. em reduzir os radicais DPPH foi maior quando comparada aos antioxidantes sintéticos, sendo o timol, composto com maior atividade antioxidante em relação ao óleo essencial de *T. vulgaris* L., e o linalol, composto com menor atividade, quando comparado ao óleo essencial de *O. basilicum* L. Entretanto, os mesmos óleos apresentaram baixa eficiência no combate à oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico. Para o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e o composto citral, essa atividade não foi observada em nenhum dos métodos utilizados. Já o óleo de *O. gratissimum* L. e o padrão eugenol tiveram relevante atividade antioxidante sequestradora de radicais DPPH, e o mesmo ocorreu na oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, em que apresentaram potenciais próximos aos dos antioxidantes comerciais.

A explicação das diferenças obtidas nas atividades antioxidantes está diretamente relacionada com os constituintes dos óleos essenciais e suas classes. Conforme citado por Ruberto e Baratta (2000), os responsáveis pela atividade antioxidante frente a métodos de sequestro de radicais, como no caso dos trabalhos descritos por diversos autores, são os constituintes oriundos da classe dos fenilpropanoides, que apresentam grupos hidroxílicos onde há átomos de hidrogênio disponíveis provenientes das moléculas fenólicas que representam barreiras contra o processo de oxidação. Mas em outros métodos, como no sistema β -caroteno/ácido linoleico, a classe de fenilpropanoides não se mostra tão eficiente, pois pode ser influenciada pela polaridade do substrato, em que substâncias polares são menos efetivas na proteção do ácido linoleico, pois permanecem mais diluídas na fase aquosa da emulsão (KULISIC et al., 2004).

2.10 Atividade antibacteriana *in vitro* dos óleos essenciais

Propriedades antimicrobianas de óleos essenciais têm se tornado cada vez mais uma valiosa ferramenta de pesquisa, como na preservação de alimentos, bem como na produção de fármacos alternativos. Por outro lado,

os micro-organismos que causam prejuízos à saúde humana estão se mostrando mais resistentes à maioria dos antimicrobianos conhecidos como β -lactâmicos, que são os mais utilizados, e aos agentes microbianos utilizados na preservação de alimentos, o que incentiva ainda mais a procura por antibióticos de ocorrência natural (CANSIAN et al., 2010).

Há uma elevada tendência do consumidor em substituir produtos sintéticos por produtos naturais; em razão disso, diversos estudos têm sido realizados mostrando a eficácia dos óleos essenciais em inibir bactérias Gram-negativas, Gram-positivas, leveduras e fungos filamentosos, mesmo de linhagens resistentes aos antibióticos convencionais (CAVALEIRO et al., 2006). A atividade antimicrobiana está, em geral, associada à presença de compostos oxigenados de pequeno peso molecular, que são capazes de formar ligações de hidrogênio e que tem razoável solubilidade em água, tendo o timol, carvacrol, eugenol, linalol, geraniol, aldeído cinâmico, neral ou geranial como exemplos. O modo de ação que provoca a inibição de micro-organismos envolve diferentes mecanismos; isso ocorre devido aos diferentes constituintes presentes nos óleos essenciais. Essa ação está relacionada com a hidrofobicidade, fazendo com que ocorra a quebra dos lipídeos da membrana celular, alterando a estrutura da membrana, tornando-a mais permeável, resultando em inativação de enzimas intracelulares e diminuição de ATP, bem como vazamentos de conteúdos celulares (BURT, 2004; CARSON; MEE; RILEY, 2002).

Outro fato a considerar é a ação sinérgica dos constituintes presentes nos óleos essenciais, pois é possível que as atividades dos constituintes majoritários estejam fortemente ligadas aos constituintes minoritários. A constituição diferenciada dos óleos essenciais também tendem a influenciar a atividade antimicrobiana; isso se dá em função de fatores como: propriedades geneticamente determinadas, idade da planta, sazonalidade, disponibilidade hídrica, temperatura do ambiente onde a planta se desenvolveu, nutrientes disponíveis no solo altitude e radiação UV (GOBBO-NETO; LOPEZ, 2007; LIOLIOS et al., 2009).

2.11 Patógenos de origem alimentar - Doenças Transmitidas por Alimentos

As bactérias patogênicas têm causado grandes problemas resultantes da proliferação de micro-organismos resistentes, especialmente no que diz respeito à contaminação de alimentos. A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem alertado para a necessidade de diminuir a contaminação de alimentos por agentes biológicos, uma vez que eles são responsáveis pelo maior número de surtos e mortes de intoxicação alimentar (JAY, 2005).

Surtos de intoxicação alimentar estão aumentando cada vez mais, e, por isso, se fazem necessários estudos sobre substâncias para o controle de linhagens bacterianas resistentes a antibióticos. Como exemplo de bactérias multirresistentes à droga, têm-se *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase-negativo*, *Enterococcus* sp., e *Pseudomonas aeruginosa* (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

Os óleos essenciais, por apresentarem propriedades biológicas, vêm se destacando como compostos promissores no controle de bactérias. 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 antibacteriana 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 frente ao uso dos óleos essenciais testados neste estudo. A bactéria *E. coli* foi a menos sensível, sendo inibida apenas pelos óleos de *C. citratus* e *L. nobilis*.

Andrade et al. (2015), avaliando a atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* e *Siparuna guianensis*, sendo o óleo de *C. dinisii* constituído de 35,41% de α -pineno, 17,81% de β -pineno, 12,01% de sabineno e 7,59% de biciclogermacreno; e o óleo essencial de *S. guianensis* composto de 13,14% de β -mirceno, 8,68% de germacreno-D e 16,71% de biciclogermacreno, observaram uma atividade promissora deles frente às bactérias testadas, sendo elas *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *P. aeruginosa*, *E.coli* e *S. Choleraesuis*, com CMI determinada a 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo de *S. guianensis*, frente a *S. aureus* e 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo essencial de *C. dinisii* sobre *S. aureus*.

Segundo Gomes et al. (2014) os óleos essenciais de *Citrus* (*aurantifolia* e *limon*) apresentaram uma CMI de 3,91 $\mu\text{g mL}^{-1}$ sobre *S. aureus*, ao passo que o óleo de *Citrus sinensis* não inibiu nenhum dos micro-organismos testados, sendo o limoneno o constituinte majoritário para as três espécies em estudo.

2.11.1 *Staphylococcus aureus*

Entre os diversos tipos de micro-organismos, destaca-se o *Staphylococcus aureus*, que quando contamina o alimento, pode provocar intoxicações ao consumidor se alguns fatores externos contribuírem para formação de toxinas. Alimentos com excesso de manipulações durante o preparo e/ou os que permanecem à temperatura ambiente depois da preparação são os de maior risco (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SILVA et al., 2010).

Staphylococcus pertence à família Micrococcaceae, apresenta-se como cocos Gram-positivos, sem formação de esporos, anaeróbio facultativo, mas com maior crescimento sob condições aeróbias, e produtor da enzima catalase. Esse gênero compreende micro-organismos mesófilos com temperatura de crescimento entre 7 e 47°C, que podem produzir toxinas termorresistentes entre 10 e 46°C, com temperatura ótima entre 35 a 40°C.

O pH ideal para seu crescimento varia entre 7 e 7,5, mas é possível seu desenvolvimento em alimentos com pH variando entre 4,2 e 9,3 (FRANCO; LANDGRAF, 2008; SILVA et al., 2010).

De acordo com Santos et al. (2007), esses micro-organismos causam tanto infecções simples (espinhas e furúnculos), quanto infecções graves (pneumonia, meningite, síndrome do choque tóxico, etc). O hábitat principal da bactéria *Staphylococcus aureus* é em humanos e animais de sangue quente, ocorrendo na vias nasais, garganta, pele e cabelos de 50% ou mais indivíduos humanos saudáveis (SILVA et al., 2010).

Devido à capacidade de produzir contaminações em diversos tecidos do corpo humano, esse micro-organismo está associado a altas taxas de mortalidade e morbidade. De acordo com dados do Ministério da Saúde, trata-se de uma bactéria que se tornou resistente a vários antibióticos, como penicilina e metilicina. Considerando o cenário epidemiológico mundial, esse micro-organismo é considerado a terceira causa mais relevante de Doenças Transmitidas por Alimentos (DTAs) (MENEGOTTO; PICOLI, 2007; SAGINUR; SUH, 2008).

2.11.2 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes pertence à família Listeriaceae, apresenta-se na forma de bastonetes curtos Gram-positivos, sem produção de esporos, móveis (com flagelos peritríquios), catalase positiva, oxidase negativa, fermenta a glicose (e outros carboidratos) com produção de ácido, mas sem produção de gás. É amplamente distribuída na natureza, podendo ser isolada do solo e fezes de humanos e animais. Desenvolvem-se entre 1 e 45°C, apesar de existirem relatos sobre o crescimento a 0°C, apresenta uma temperatura ótima entre 30 e 37°C. São classificadas como psicrotolerantes, em função da capacidade de se multiplicar em temperaturas de refrigeração. Suportam repetidos congelamentos e descongelamentos (RYSER; DONNELLY, 2001; SILVA et al., 2010).

As espécies de *Listeria* são largamente encontradas na natureza, podendo contaminar alimentos como leite cru ou pasteurizado, queijos, sorvetes, vegetais crus, carnes, aves, peixes e frutos do mar; no entanto, somente a *L. monocytogenes* é patogênica ao homem, tornando-se um dos principais patógenos no que diz respeito às doenças transmitidas pelos alimentos (TAEGER, 1999).

A contaminação causada por *L. monocytogenes* é conhecida como listeriose, que incluem septicemias, encefalites, meningite e infecção cervical ou intrauterina em gestantes, que podem provocar aborto ou nascimento prematuro. São também responsáveis por sintomas gastrointestinais, como náusea, vômitos e diarreia, que podem preceder ou acompanhar as manifestações mais graves da doença. A taxa de letalidade em recém-nascidos é de 30%; em adultos é de 35% (sendo de 11% para menores de 40 anos e 63% para maiores de 60 anos). Quando ocorre septicemia, a taxa de letalidade é de 50% e, com meningite, pode chegar a 70%. Nos seres humanos, é vista como uma doença invasiva de grupos de risco bem definidos, afetando, principalmente, indivíduos imunodeprimidos, gestantes, recém-nascidos e idosos (SILVA et al., 2010).

Os mecanismos que causam a listeriose ainda não estão bem definidos. Entretanto, sabe-se que a bactéria produz algumas toxinas, destacando-se as toxinas hemolíticas (hemolisinas) e as toxinas lipolíticas, que são responsáveis pelo aumento na produção de monócitos e pela depressão na atividade de linfócitos (MANTILLA et al., 2007).

2.11.3 *Salmonella Choleraesuis*

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e se apresenta na forma de bastonetes Gram-negativos não esporogênicos, anaeróbios facultativos, oxidase negativos, apresentando crescimento ótimo a 37°C, sendo o pH 7 ideal, mas pode se desenvolver em pH variando entre 4 e 9 (SILVA; JUNQUEIRA, 2007).

De acordo com a ANVISA, é o principal micro-organismo envolvendo surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil.

A incidência de salmonelose humana vem aumentando consideravelmente no mundo inteiro, mesmo com modernas tecnologias e medidas de higiene. Esse problema pode ser controlado pelo tratamento dos efluentes e dos dejetos de origem animal, bem como higiene no abate de animais, pasteurização do leite, manipulação adequada e higiênica, conservação e cocção em temperaturas corretas, tratamento dos animais enfermos, prescrição cuidadosa de antibióticos nos casos humanos (e animais), visando a reduzir o número de cepas resistentes (GERMANO; GERMANO, 2003).

A salmonelose humana é causada pela ingestão de alimentos contaminados. Geralmente os sintomas causados são febre, dor abdominal, náuseas, vômitos, por um período de incubação de 12-36 horas, podem causar também infecções, levando alguns pacientes à morte. A *Salmonella* é encontrada no trato intestinal de vários animais domésticos e selvagens, podendo a contaminação ser direta ou indireta (SHINOHARA et al., 2008).

Silva et al. (2015) mostraram que os óleos essenciais de *Mentha viridis* L. e *Mentha pulegim* L. tiveram efeitos satisfatórios contra *Salmonella Choleraesuis*, apresentando uma CMI de 31,3 $\mu\text{L mL}^{-1}$. O óleo essencial de *M. viridis* é composto principalmente de linalo (40,7%), carvona (13,52%) e α -pineno (8,56%); já o óleo essencial de *M. pulegim* apresenta em sua composição a pulegona (50,01%), mentol (31,90 %) e mentona (16,56%).

2.11.4 *Escherichia coli*

Escherichia coli é uma bactéria pertencente à família Enterobacteriaceae, Gram-negativa, de forma bacilar, caracteriza-se por apresentar metabolismo aeróbio ou anaeróbio facultativo, não é produtora de esporos, sendo capaz de fermentar a glicose, fazendo com que ocorra

produção de ácido e gás em 24 a 48 horas entre 44 e 45°C. É considerada patogênica oportunista importante, sendo encontrada na flora intestinal, capaz de causar cistite, pneumonia, meningite e várias infecções intra-abdominais em seres humanos e animais (NORDMANN; NAAS; POIREL, 2011).

A presença de *E. coli* em alimentos e água indica contaminação direta ou indireta de origem fecal, podendo ser indicador da possível presença de outros micro-organismos patogênicos. Com isso, contagens elevadas de *E. coli* estão relacionadas com a falta de higiene e falhas no processamento de alimentos. Tem-se como exemplo o leite, carne e seus derivados, que podem sofrer contaminação direta ou indireta por esse micro-organismo (JAY, 2005; KARPER; NATARRO; MOBLEY, 2004).

Segundo Germano e Germano (2003), a infecção por *E. coli* tem período médio de incubação de 36 horas e é caracterizada por diarreia aquosa com muco, náuseas, dores abdominais, vômitos e febre. Na forma enteroinvasora, o período de incubação é de apenas 11 a 21 horas e os sintomas são diarreia, disenteria, cólicas, febre e mialgia.

Millezi et al. (2013), avaliando a CMI dos óleos essenciais de *Satureja montana* L., *Cymbopogon nardus* L. e *Citrus limonia* Osbeck sobre *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, observaram que o óleo essencial de *C. limonia* foi mais ativo para *S. aureus*; já a bactéria *E. coli* foi mais sensível ao óleo de *S. montana*. Os óleos apresentaram como componentes majoritários o timol (15,47%), *p*-cimeno (11,5%) e carvacrol (9,81%); para o óleo essencial de *C. nardus*, foram encontrados o citronelal (30,48%), citronelol (14,32%) e geraniol (17,12%); já o óleo de *C. limonia* apresentou como compostos majoritários o limoneno (33,67%) e o *p*-cimeno (14,16%).

2.11.5 *Pseudomonas aeruginosa*

Pseudomonas aeruginosa é uma bactéria pertencente à família Pseudomonadaceae; trata-se de bastonetes retos ou ligeiramente curvos,

Gram-negativos, aeróbia obrigatória, não forma esporos e algumas espécies de *Pseudomonas* apresentam uma temperatura ótima de 28°C e outras de 45°C, e várias crescem a 4°C (psicrotróficas), são catalase positivas e oxidase positivas ou negativas, crescem entre 37°C e 42°C, não toleram valores de pH menor ou igual a 4,5. Desenvolvem-se em ambientes simples e causam infecções crônicas por biofilmes em indivíduos imunocomprometidos (MASSAGUER, 2005; SILVA et al., 2010).

Em virtude da riqueza de suas vias metabólicas, *Pseudomonas* é resistente a vários antibióticos e antissépticos, o que explica sua frequente presença em ambiente hospitalar, podendo ser encontradas colonizando equipamentos de terapia respiratória, desinfetantes, pias, água destilada, cateteres venosos centrais e cateter urinário (DUNN; WUNDERINK, 1995).

A ocorrência de *Pseudomonas* em alimentos é bem comum, associadas com a deterioração de carne e derivados, leite e derivados, peixes e frutos-do-mar, ovos e vegetais (SILVA et al., 2010).

Essa espécie, *Pseudomonas aeruginosa*, tem sido a responsável pela maioria dos casos de infecção no homem, como pneumonias, meningites, endocardites, infecções urinárias e respiratórias, e diversas outras formas de infecção, especialmente em indivíduos imunossuprimidos, idosos e crianças (MALLET et al., 2007).

2.12 Atividades hemolítica e fosfolipásica (*in vitro*)

A hemólise é um processo de destruição das hemácias (glóbulos vermelhos) em que ocorre o rompimento da membrana plasmática, resultando na liberação da hemoglobina, acarretando sérios danos aos órgãos vitais como fígado, rins e coração. A hemólise é causada não só por compostos químicos, como a penicilina, metildopa, alguns tipos de antibióticos e anti-inflamatórios, mas também por compostos naturais, como peçonhas animais e substâncias vegetais. Vários fatores contribuem para a ocorrência de hemólise, como pH, temperatura, concentração de eritrócitos e

natureza dos íons presentes (CARVALHO et al., 2007; DOMINGUES et al., 2007).

Estudos mostram que substâncias hidrofílicas e lipofílicas podem, muitas vezes, induzir hemólise, pois são substâncias capazes de desestabilizar as bicamadas lipídicas presentes em membranas celulares, causando a liberação dos glóbulos vermelhos, aumentando, assim, o nível de hemoglobina no plasma; isso pode resultar em diversas complicações, como trombose, anemia hemolítica, falência múltipla dos órgãos e até a morte (KINI, 2003).

A busca por substâncias naturais com propriedades de redução da fluidez da membrana de eritrócitos, reduzindo processos hemolíticos que culminam em diminuição da viscosidade sanguínea, tem aumentado constantemente. Estudos revelam efeitos hemolíticos e fosfolipásicos de substâncias naturais, que podem ser acompanhados de efeitos genotóxicos e citotóxicos, tornando cada vez mais necessária a verificação dessas atividades em óleos e extratos de plantas (AJDZÀNOVIC et al., 2012).

Os fosfolipídios que constituem a bicamada de membranas podem ser degradados por inúmeras substâncias, incluindo substâncias naturais. Essas substâncias podem também atuar inibindo a ação das fosfolipases provenientes de várias fontes, de origem animal, bem como presentes em humanos. Para a determinação da atividade fosfolipásica, a gema de ovo, rica em lecitinas, é utilizada como fonte de fosfolipídios devido ao baixo custo (CARVALHO et al., 2013).

Habermann e Hardt (1972) desenvolveram uma técnica simples e altamente sensível para quantificar a atividade de fosfolipases A₂, baseada na medição dos halos hemolíticos induzidas por peçonhas de serpentes em géis de agarose contendo gema de ovo.

2.13 Composição das peçonhas botrópicas

Relatos indicam que existem no mundo cerca de 2.900 espécies de serpentes catalogadas, das quais 410 espécies são venenosas, sendo 69 localizadas no Brasil, e dessas 69 espécies venenosas, 32 espécies especificamente são serpentes do gênero *Bothrops* e são encontradas no cerrado da região central e em florestas tropicais do Sudeste (PINHO; PEREIRA, 2001).

Envenenamentos ofídicos têm sido de grande preocupação para a saúde pública, principalmente em países tropicais e neotropicais, tanto pela incidência, quanto pela atuação das peçonhas nos organismos vivos (PINHO; PEREIRA, 2001).

Peçonhas são misturas de substâncias tóxicas que, em geral, apresentam composições bem variadas e complexas, sendo comum a presença de proteínas que possuem diversas atividades biológicas, como, por exemplo, atividades enzimáticas e efeitos tóxicos e farmacológicos importantes. Como exemplo de proteínas com atividades enzimáticas, têm-se as fosfolipases A₂, (miotóxicas, cardiotoxícas, citotóxicas), proteases (metaloproteases e serinoprotease), entre outras (JIANG et al., 2009).

Cerca de 90 a 95% do peso seco das peçonhas são compostos por proteínas com ou sem ação enzimática. As frações não proteicas são compostas por cátions metálicos, carboidratos, nucleosídeos, aminas biogênicas e níveis menores de aminoácidos livres e lipídios (ANGULO; LOMONTE, 2009; LEMOS et al., 2009).

Fosfolipases A₂ (PLA₂) e proteases (metaloprotease e serinoprotease) são toxinas com atividades enzimática em sua maioria, presentes em peçonhas do gênero *Bothrops*. São responsáveis pelos processos inflamatórios e podem agir diretamente sobre eritrócitos, miócitos, fatores da cascata de coagulação sanguínea, além de células epiteliais e do endotélio vascular, causando grave desorganização fisiológica, resultando em coagulação ou hemólise intravascular, predisposição para contrair

doenças e/ou destruição de tecido muscular. As toxinas podem agir induzindo agravos em quaisquer estruturas renais através da diminuição do fluxo sanguíneo, coagulação intravascular disseminada e toxicidade vascular (SITPRIJA, 2008).

2.13.1 Fosfolipases (PLA₂)

Em geral, as fosfolipases são enzimas lipofílicas comumente encontradas, e de extrema importância na remoção de fosfolipídios, gerando lisofosfolipídios.

Mais especificamente, as fosfolipases A₂ presentes em peçonhas de serpente apresentam diversos efeitos farmacológicos dependentes ou não de sua atividade enzimática, como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, hemorragia interna, efeitos sobre plaquetas, indução de edema, atividade anticoagulante e inflamatória. As fosfolipases A₂ hidrolisam a ligação 2-acil éster de fosfolipídios, liberando como produtos os lisofosfolipídios e ácidos graxos livres. O ácido graxo liberado é o ácido araquidônico (precursor de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos), iniciando uma série de eventos relacionados à inflamação e coagulação sanguínea (CUNHA; MARTINS, 2012).

A procura por novos inibidores de PLA₂ tem aumentado consideravelmente nos últimos anos, devido à sua importância para o desenvolvimento de novos anti-inflamatórios ou como auxiliares no tratamento de vítimas do ofidismo.

Estudos realizados com serpentes por Alvarenga et al. (2011) mostraram que lactonas sesquiterpênicas sintetizadas inibiram vários efeitos biológicos provocados pelas fosfolipases de *Bothrops jararacussu*, apresentando uma inibição de 85% da miotoxicidade e 70% do edema.

2.13.2 Proteases

As proteases estão presentes em peçonhas de serpentes e atuam hidrolisando hemoglobina, colágeno, fibronectina, fibrina, elastina, fibrinogênio, insulina, glucagon, etc. Pela quebra de ligações peptídicas, é um processo comum na ativação ou inativação de enzimas, envolvendo principalmente a digestão e coagulação sanguínea (MAZZI et al., 2004).

Metaloproteases e serinoproteases são exemplos de proteases existentes em peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*.

2.13.2.1 Metaloproteases

As metaloproteases são hidrolases dependentes da ligação com um metal, geralmente o zinco. São responsáveis por efeitos como hemorragia, mionecrose no local da picada e reações inflamatórias causadas pelas peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* e *Crotalus* (CUNHA; MARTINS, 2012).

Essas enzimas podem ser classificadas de acordo com a massa molecular, o domínio estrutural e a intensidade hemorrágica resultante de sua ação, sendo divididas em quatro grupos: P-I, P-II, P-III e P-IV. O grupo P-I apresenta apenas o domínio metaloprotease; o grupo P-II apresenta, além do domínio metaloprotease, o domínio desintegrina; o grupo P-III soma, além dos dois domínios anteriores, um terceiro domínio rico em cisteína. O grupo P-IV, além dos domínios metaloprotease, tipo desintegrina e rico em cisteína, também apresenta um domínio adicional do tipo lectina, unido por ligações dissulfeto (CUNHA; MARTINS, 2012).

As metaloproteases do tipo P-I induzem pouca ou nenhuma atividade hemorrágica, mas apresentam atividade fibrinolítica, inflamatória, mionecrótica, proteolítica e apoptótica. As do tipo P-II, além de induzir atividade hemorrágica, apresentam também atividade proteolítica e inibem a agregação plaquetária. Algumas metaloprotease pertencentes ao grupo P-III

são hemorrágicas, apoptóticas, inibidoras de agregação plaquetária, ativadoras de fagocitose, da protrombina e do fator X da coagulação; e as P-IV ativam o fator X, sendo atuantes na coagulação sanguínea (FOX; SERRANO, 2005).

Estudos realizados por Matsui e Hamako (2005) apontam que metaloproteases com atividade fibrinogenolítica podem ser aplicáveis no tratamento de trombozes, por acarretar a diminuição do nível plasmático do fibrinogênio ou solubilizar os coágulos de fibrina.

2.13.2.2 Serinoproteases

As serinoproteases presentes em peçonhas botrópicas são conhecidas por apresentar atividade do tipo trombina, que, de maneira geral, afetam a cascata de coagulação pela ativação do fibrinogênio, fibrinólise e agregação plaquetária e também pela degradação proteolítica das células, causando um desequilíbrio no sistema hemostático da vítima; no entanto, as serinoproteases sozinhas não são letais, mas contribuem para o efeito tóxico quando associadas a outras proteínas da peçonha (BRAUD; BOM; WISNER, 2000; CUNHA; MARTINS, 2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi desenvolvido na Universidade Federal de Lavras (UFLA), nos Laboratórios de Química Orgânica - Óleos Essenciais; de Bioquímica, ambos do Departamento de Química (DQI); e no Laboratório de Micotoxina e Micologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA).

3.1 Aplicação do formulário

Um formulário foi elaborado com finalidade de obter informações acerca dos conhecimentos populares sobre o uso e classificação de plantas medicinais. Foram selecionados aleatoriamente 100 moradores de Lavras e região, com idade igual ou superior a 25 anos, para realização da entrevista. Posteriormente, as cinco plantas mais citadas foram selecionadas para realização do experimento. As plantas mais citadas foram hortelã, capim-cidreira, alecrim, boldo e erva-doce.

3.2 Óleos essenciais – material vegetal

Para realização do trabalho, utilizou-se apenas material seco. Sendo adquirido aproximadamente 1000 g desse material vegetal no Mercado Municipal de Belo Horizonte, Minas Gerais.

3.2.1 Extração do óleo essencial

Os óleos essenciais das plantas medicinais selecionadas foram extraídos no Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras. O método de extração empregado foi o de hidrodestilação, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado, acoplado a um balão de 5 L (BRASIL, 2010). Foram pesados 300 gramas do material vegetal seco e esse submetido ao processo de hidrodestilação por 2 horas. Após a extração, o óleo essencial foi separado do hidrolato por centrifugação, utilizando uma centrífuga de bancada de cruzeta horizontal (Fanem Baby®I Modelo 206 BL) a 965,36 x g por 5 min. Decorrido esse tempo, o óleo essencial foi transferido para um recipiente ao abrigo de luz com auxílio de uma pipeta de Pasteur, posteriormente armazenado sob refrigeração.

3.2.2 Identificação e quantificação química dos óleos essenciais

As análises químicas dos óleos essenciais foram realizadas no Departamento de Química da Universidade Federal de Sergipe, sob orientação da Professora Dra. Samísia Maria Fernandes Machado.

A identificação dos constituintes presentes nos óleos essenciais foi realizada em um cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massa CG-EM (Shimadzu, modelo QP 5050A), equipado com coluna capilar de sílica fundida J&W Scientific (5%-fenil-95%-dimetilpolissiloxano) de 30 m x 0,25 mm i.d., 0,25 µm de filme, usando He como gás de arraste, com fluxo de 1,2 mL/min. A temperatura foi mantida a 50°C por 2 min, depois aumentada 4°C/min, até atingir 200°C. Em seguida, aumentada 15°C/min, até atingir 300°C, mantendo-se essa temperatura constante por 15 min. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 250 e 280°C, respectivamente. Foi injetado um volume de 0,5 µL da amostra dissolvida em acetato de etila. As condições do espectrômetro de massa (EM) foram: detector de captura iônica operando por impacto eletrônico e energia de impacto de 70 eV; velocidade de varredura 1.000; intervalo de varredura de 0,50 fragmento e fragmentos detectados na faixa de 40 a 500 Da. Para fins de comparação dos índices de retenção dos constituintes, foram empregados dados da literatura (ADAMS, 2007). O índice de retenção foi calculado utilizando-se a equação de Van den Dool e Kratz (1963) em relação a uma série homóloga de n-alcenos (nC₉-nC₁₈). Também foram utilizadas duas bibliotecas NIST107 e NIST21, para comparação dos espectros.

As análises quantitativas foram realizadas em um cromatógrafo gasoso equipado com Detector de Ionização de Chamas (DIC) Shimadzu CG-17A, utilizando uma coluna capilar de sílica fundida ZB-5MS (5%-fenil-95%-dimetilpolissiloxano) com 30 m x 0,25 mm i.d. x 0,25 µm de filme, usando He como gás de arraste com fluxo de 1,2 mL/min. As condições de análise foram as mesmas utilizadas para CG-EM e a quantificação de cada constituinte foi obtida por meio da normalização de áreas (%).

3.3 Atividades antioxidantes

A avaliação das atividades antioxidantes dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras.

3.3.1 Método de sequestro de radicais DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila)

Este método avalia a capacidade dos óleos essenciais em neutralizar os radicais 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), conforme metodologia descrita por Lima et al. (2012). Uma solução etanólica de DPPH (solução estoque) foi preparada na concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em tubos de ensaio, foram adicionados 2,7 mL da solução-estoque de DPPH, seguido da adição de 0,3 mL do óleo essencial diluído em etanol nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Paralelamente, foi preparado o controle, contendo todos os reagentes, exceto o óleo essencial. Posteriormente, foram realizadas leituras após 60 minutos em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 515 nm. A porcentagem de atividade antioxidante foi calculada, empregando a equação abaixo:

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

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 comparação, foi utilizado o antioxidante sintético BHT (butil-hidroxitolueno) nas concentrações de 25; 50; 100; 150; 200; 250 e $500 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.3.2 Oxidação sistema β -caroteno/ácido linoleico

A avaliação da atividade antioxidante pela metodologia da inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico foi realizada conforme metodologia descrita por Lopes-Lutz et al. (2008).

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 60 μg de ácido linoleico, 600 mg de Tween 20, 6 mg de β -caroteno e 30 mL de clorofórmio que, posteriormente, foi retirado utilizando rota-evaporador a 50°C. Após a remoção completa do clorofórmio, o resíduo foi dissolvido com 150 mL de água destilada oxigenada sob vigorosa agitação. Em tubos de ensaio, 2700 μL dessa solução foram adicionados a 300 μL do óleo essencial nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, diluídos em etanol, sendo o controle composto apenas de etanol. A absorvância foi aferida imediatamente em espectrofotômetro a 470 nm.

Os tubos foram incubados a 50°C para a reação de oxidação e a leitura da absorvância foi realizada em um intervalo de 60 minutos. Todas as concentrações dos óleos essenciais foram avaliadas em triplicata. A porcentagem de atividade antioxidante (AA%) foi calculada utilizando a equação abaixo:

$$AA \% = 100 \times [1 - (A_0 - A_t/A_{00} - A_{0t})]$$

em que A_0 é a absorvância no início da incubação e A_t é a absorvância depois de 60 minutos (ambos com amostra); A_{00} é a absorvância do controle no início da incubação e A_{0t} é a absorvância depois de 60 minutos.

As amostras foram lidas frente a um branco, que foi preparado da mesma forma que a emulsão, exceto pelo β -caroteno, que não foi adicionado.

Para termos de comparação, foi utilizado o antioxidante sintético BHT (butil-hidroxitolueno) nas mesmas concentrações.

3.3.3 ABTS (Neutralização do radical ABTS)

A atividade antioxidante pelo método ABTS [2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)] foi realizada conforme a metodologia descrita por Guerreiro et al. (2013). O radical ABTS^{*} foi formado pela reação da solução ABTS com perssulfato de potássio 2,45 mM, incubados à temperatura de 25°C durante 12-16 h, ao abrigo de luz. Uma vez formado, o radical foi diluído com etanol P.A., até a obtenção do valor de absorvância entre 0,7 - 0,72, utilizando um comprimento de onda de 734 nm (Shimadzu UV-1601PC). Em ambiente escuro, transferiram-se 1900 µL do radical ABTS^{*} para tubos de ensaio; em seguida, adicionaram-se 100 µL da amostra, nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 µg mL⁻¹. Para comparação, foi utilizado o antioxidante sintético BHT (butil-hidroxitolueno) nas mesmas concentrações das amostras.

3.3.4 Hidroxil

A avaliação da atividade antioxidante pelo método de captura do radical hidroxil ^{*}OH foi baseada na metodologia descrita por Boulanouar et al. (2013). Em tubos de ensa, foram adicionados 100 µL da amostra nas concentrações de 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 µg mL⁻¹, diluídos em água, 100 µL da mistura de FeSO₄/EDTA, 100 µL de desoxirribose, 700 µL de tampão fosfato 0,1 M (pH=7,4) e 100 µL de H₂O₂. Em seguida, os tubos foram levados para o banho-maria a 50°C, onde permaneceram por 60 min. Posteriormente, foram adicionados 500 µL de TCA (ácido tricloroacético) e 500 µL de TBA (ácido tiobarbitúrico). Após a adição dos ácidos, os tubos foram fervidos por 10 min. A leitura foi realizada em um comprimento de onda de 532 nm imediatamente após o resfriamento dos tubos, em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1601PC). A atividade antioxidante (AA%) foi calculada utilizando a equação a seguir:

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

Em que A_{controle} representa a absorbância do controle negativo (sem amostra) e A_{amostra} é a absorbância das amostras. O padrão utilizado para fins de comparação foi o manitol.

3.3.5 Poder redutor

Na avaliação da atividade antioxidante pelo método do poder redutor, 50 μL das amostras nas seguintes concentrações 25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram adicionados a 500 μL do tampão fosfato 200 mM, pH=6 e 500 μL de hexacianoferrato III de potássio 1%. A mistura foi agitada e incubada a 50°C por 20 min. Posteriormente, foram adicionados 500 μL de TCA 10% (ácido tricloroacético), 1500 μL de água destilada e 300 μL de FeCl_3 0,1%. Em seguida, a leitura foi feita utilizando um espectrofotômetro (Shimadzu UV-1601PC) em um comprimento de onda de 700 nm. Para a determinação da atividade antioxidante, foi construída uma curva da absorbância *versus* concentração da amostra.

O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo e as análises realizadas em triplicata com os resultados apresentados pela média (KANATT; CHANDER; SHARMA, 2007).

3.3.6 Redução do Molibdênio

Em tubos de ensaio, adicionaram-se 50 μL das soluções dos óleos essenciais nas diferentes concentrações (25, 50, 100, 150, 200, 250 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, diluídos em etanol), 2000 μL da solução do complexo de fosfomolibdato de amônio (ácido sulfúrico 10%, fosfato de sódio 28 mM e molibdato de amônia 4 mM). Os tubos foram agitados e aquecidos em banho-maria a 95°C por 60 min. Após o resfriamento, realizou-se a leitura em espectrofotômetro (Shimadzu UV-1601PC) a 695 nm.

O padrão utilizado para fins de comparação foi o ácido ascórbico (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

3.4 Avaliação da atividade antibacteriana – Teste de difusão em ágar

A análise da atividade antibacteriana foi realizada no Laboratório de Micotoxina e Micologia do Departamento de Ciências dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

As culturas utilizadas (*Staphylococcus aureus* ATCC 13565, *Listeria monocytogens* ATCC19117, *Salmonella Choleraesuis* ATCC 6539, *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442) foram ativadas em caldo infusão de cérebro e coração (BHI) e incubadas a 37°C por 24 horas.

Após a ativação, foram realizados os plaqueamentos em Ágar Mueller-Hinton para *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Choleraesuis* e em Ágar Casoy (TSA) enriquecido com Yeast Extract para *Listeria monocytogens* (GUERRINI et al., 2009).

Em seguida, as culturas ativadas foram transferidas para um tubo com 5 mL de caldo de soja triptica (TSB) e incubados a 37°C até alcançar a turbidez de uma solução padrão McFarland de 0,5, resultando em uma concentração de 10^8 unidades formadoras de colônia (UFC) mL⁻¹. As leituras de turbidez foram realizadas utilizando espectrofotômetro, no comprimento de onda de 625 nm (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, NCCLS, 2003).

Posteriormente, verteu-se em placas de Petri uma camada fina de Ágar Mueller-Hinton puro (20 mL), e sobre essa camada foram colocadas pérolas de vidro esterilizadas. Em seguida, sobre a camada de ágar e as pérolas, colocou-se uma segunda camada do ágar contendo os microorganismos inoculados. Após a solidificação, as pérolas de vidro foram retiradas, e em cada poço foram depositados 10 µL das concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62 µg mL⁻¹ do óleo essencial diluído em

dimetilsulfóxido (DMSO). Após esse procedimento, as placas foram incubadas em BOD 37°C por 24 horas, e então, foram medidos os diâmetros dos halos de inibição formados, tendo como concentração mínima inibitória (CMI) a menor concentração capaz de inibir o crescimento do micro-organismo. O experimento foi realizado em triplicata, utilizando-se como controle positivo o cloranfenicol, e, como controle negativo, o DMSO (OGUNWANDE et al., 2005).

3.5 Avaliação das atividades hemolítica (em meio sólido) e fosfolipásica

O presente trabalho foi submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (COEP) da Universidade Federal de Lavras. A análise envolvendo sangue foi aprovada pelo COEP, com o número de registro 48793115.0.0000.5148.

A avaliação das atividades hemolítica e fosfolipásica dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Bioquímica do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras.

3.5.1 Atividade hemolítica

A suspensão de eritrócitos foi preparada utilizando-se 10 mL de sangue coletado em tubos contendo citrato de sódio, que foi centrifugado por 10 min a 4°C em 2500 g. Após a centrifugação, o plasma foi removido com uma pipeta de Pasteur descartável. As células vermelhas foram ressuspensas salina tamponada em fosfato (PBS) (pH=7,2-7,4), sendo novamente centrifugadas nas mesmas condições. Repetiu-se o procedimento 3 vezes. Posteriormente, obtiveram-se os eritrócitos para formulação do gel.

A análise da atividade hemolítica dos óleos essenciais foi realizada baseando-se na metodologia de Price, Wilkinson e Gentry (1982), com modificações. Foram dissolvidos 6,94 g de ágar em 675 mL de PBS, aquecendo-se até a obtenção de uma solução transparente. Essa solução foi

resfriada até atingir a temperatura de 75°C, acrescentando-se 6,25 mL de cloreto de cálcio 0,01 M. Quando a solução atingiu 60°C, foi adicionado 0,1 g de azida de sódio, e em seguida, a temperatura foi ajustada a 50°C, sendo adicionados 8,2 mL de eritrócitos sanguíneos. Após a adição dos eritrócitos, o meio foi vertido nas placas de Petri, e após solidificação, orifícios de 3 a 4 mm de diâmetro foram feitos no meio. As amostras de óleos essenciais nos volumes de 0,6; 1,2 e 1,8 µL foram adicionadas aos mesmos, e as placas foram levadas à estufa a 37°C, por 12 horas.

Com a finalidade de avaliar uma possível ação inibidora exercida pelos óleos sobre a hemólise induzida pela peçonha, os mesmos foram incubados com peçonha de *B. jararacus* em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Posteriormente, 30 µL dos incubados (0,6; 1,2 e 1,8 µL) foram adicionados aos orifícios das placas com meio de cultura. Os géis contendo as amostras foram incubados por 12 horas a 37°C. A formação de um halo límpido ao redor do orifício no gel é o indicativo de atividade, em que os halos foram medidos em milímetros para a quantificação da atividade hemolítica.

3.5.2 Atividade fosfolipásica

A atividade fosfolipásica foi realizada em placas de Petri de acordo com o método descrito por Gutiérrez et al. (1988). O método consiste na elaboração de um gel, onde foram dissolvidos 6,94 g de ágar em 675 mL de PBS, aquecendo-se até a obtenção de uma solução transparente. Essa solução foi resfriada até atingir a temperatura de 75°C, acrescentando-se 6,25 mL de cloreto de cálcio 0,01 M. Quando a solução atingiu 60°C, foi adicionado 0,1 g de azida de sódio, e, em seguida, à temperatura de 50°C, foram adicionados 8,2 mL de gema de ovo. Posteriormente, o meio foi vertido em placas de Petri, e após solidificação, orifícios de 3 a 4 mm de diâmetro foram feitos no meio. Os óleos essenciais foram incubados com peçonha de *B. jararacus* em banho-maria a 37°C por uma hora.

Posteriormente, 30 µL dos incubados (0,6; 1,2 e 1,8 µL) foram adicionados aos orifícios das placas com meio, no intuito de avaliar uma possível ação inibidora exercida pelos óleos sobre a atividade de fosfolipases A₂ presentes na peçonha. Os géis contendo as amostras foram incubados por 12 horas a 37°C. A formação de um halo límpido ao redor do orifício no gel é o indicativo de atividade, em que os halos foram medidos em milímetros para a quantificação da atividade fosfolipásica.

3.6 Análise estatística

Os dados resultantes das atividades antioxidantes foram submetidos ao teste estatístico, sendo utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com um esquema fatorial de 5 x 7 (óleos essenciais x concentrações). Para as atividades hemolíticas e fosfolipásicas, foi realizado o teste de comparação de médias uma a uma (cada volume foi comparado com o controle separadamente). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR (FERREIRA, 2011).

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados da aplicação dos formulários

A Figura 12 mostra a idade e o sexo das pessoas entrevistadas em relação ao consumo de plantas medicinais.

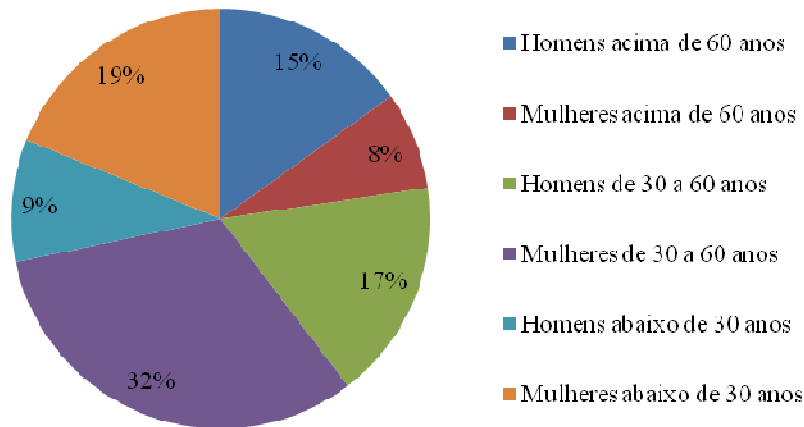


Figura 12 Idade e sexo da população entrevistada de Lavras e região que consome plantas medicinais

Observou-se que a maioria dos entrevistados foram mulheres, das quais 32% correspondem à faixa etária de 30 a 60 anos, havendo também um número significativo de homens que utilizam plantas com fins medicinais.

Grande parte dos entrevistados afirmou fazer uso de plantas medicinais com frequência, pois acreditam que produtos naturais não fazem mal à saúde, uma vez que coletam as plantas em hortas e compram somente quando precisam. Muitos relataram que tais conhecimentos foram adquiridos com seus antepassados e que as folhas é a parte da planta mais utilizada para a elaboração de chás. No entanto, a forma de preparo correto das plantas medicinais deve ser levado em consideração devido aos diferentes constituintes voláteis presentes nas folhas, flores e outros órgãos da planta (ALMASSY JÚNIOR et al., 2005).

Na Figura 13 pode ser observada a relação de plantas mais utilizadas pela população entrevistada, destacando-se as plantas utilizadas neste trabalho.

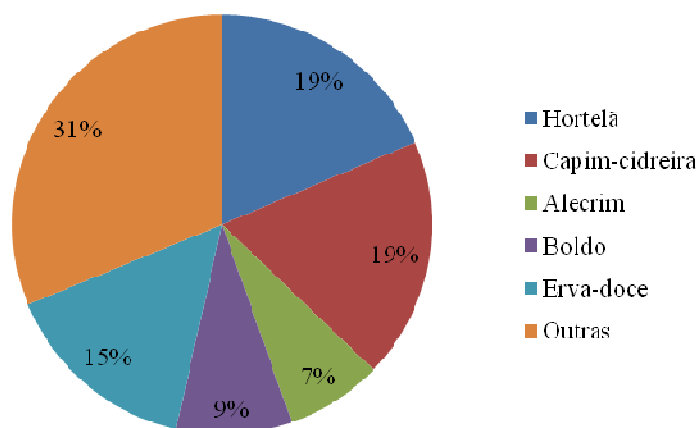


Figura 13 Plantas medicinais mais consumidas pela população entrevistada de Lavras e região

As plantas mais citadas pelos moradores de Lavras e região foram hortelã (*Mentha piperita*), capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*), alecrim (*Rosmarinus officinalis*), boldo (*Peumus boldus*) e erva-doce (*Foeniculum vulgare*). Muitos dos entrevistados utilizam essas plantas frequentemente, pelo menos uma vez ao dia, com objetivos diferenciados, ou seja, diferentes pessoas usam a mesma planta para finalidades distintas.

4.2 Composição química dos óleos essenciais

A composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* (hortelã) está apresentada na Tabela 1, na qual se observa a carvona (84,34%), seguida do limoneno (10,97%) como componentes majoritários presentes nesse óleo essencial (Figura 14).

Tabela 1 Composição química do óleo essencial de *Mentha piperita*.

Pico	IR	Composto	%
1	980	mirreno	0,55
2	1022	limoneno	10,97
3	1246	carvona	84,34
4	1383	β -bourbuneno	0,46
5	1419	<i>E</i> -cariofileno	0,75
6	1428	β -copaeno	0,09
7	1454	α -humuleno	0,11
8	1462	<i>cis</i> -muurolo-4(14),5-dieno	0,22
9	1616	1,10-di- <i>epi</i> -cubenol	0,17
10	1655	α -cadinol	0,18
Total identificado			97,84
Componentes			
Monoterpenos			11,74
Monoterpenos oxigenados			84,51
Sesquiterpenos			0,95
Sesquiterpenos oxigenados			0,18
Outros			0,46

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

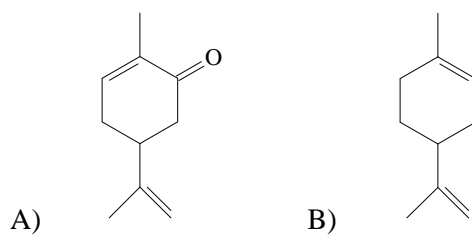


Figura 14 Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de *Mentha piperita*; (A) carvona (B) limoneno

Evrendilek (2015), estudando a composição química do óleo essencial de *Mentha piperita*, verificou a presença de 18 compostos, encontrando como componentes majoritários a pulegona (45%), seguida do

iso-mentol (12,8%), piperitanona (9,1%), mentona (8,0%), piperitona (7,4%) e óxido piperitanona (6,9%).

Anteriormente, Valeriano et al. (2012) estudaram o óleo essencial de *M. piperita* coletada no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (UFLA) e encontraram como constituintes majoritários o mentol (32,33%), *neoiso*-mentol (28,12%), mentona (20,95%) acetato de metila (6,65%) e *iso*-mentona (4,82%). Tanto os dados de Evrendilek (2015) quanto os de Valeriano et al. (2012) são divergentes daqueles encontrados neste trabalho. Essa diferença pode ser explicada por dados edafoclimáticos, como diferença dos locais e horários da coleta, tipo de solo, nutrientes, entre outros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

A constituição química do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (capim-cidreira) está descrita na Tabela 2. Observa-se que o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* apresentou como constituintes majoritários o geranial (47,74%), neral (35,43%) e mirceno (8,46%) (Figura 15).

Tabela 2 Composição química do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*.

Pico	IR	Composto	%
1	980	mirceno	8,46
2	1089	linalol	2,46
3	1236	neral	35,43
4	1245	geraniol	2,16
5	1266	geranial	47,74
6	1281	2-undecanona	1,68
7	1372	acetato de geranila	0,20
Total identificado			98,13
Componentes			
Monoterpenos			91,63
Monoterpenos oxigenados			4,82
Outros			1,68

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

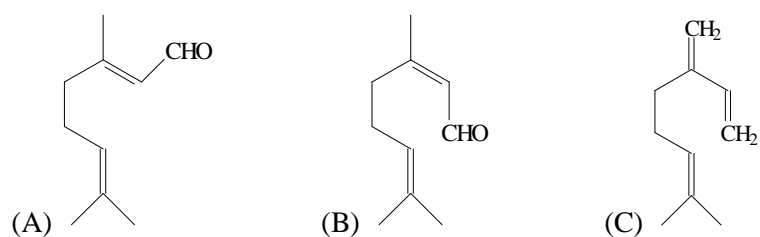


Figura 15 Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*; (A) geranial (B) neral (C) mirceno

Guimarães et al. (2011) coletaram a espécie *Cymbopogon citratus* na Empresa de Produção de Sementes de Hortaliças “HORTIAGRO”, localizada no município de Ijací – MG, e analisando sua composição, encontraram como constituintes majoritários geranial (37,42%), neral (31,89%) e mirceno (23,77%), sendo o geranial e neral estereoisômeros que constituem o citral. Esses dados corroboram com aqueles encontrados neste trabalho, mas divergem daqueles citados por Valeriano et al. (2012), que encontraram como constituintes majoritários no óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (planta coletada no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras) o geranial (38,43%) e neral (31,12%), linalol (4,21%) e mirceno (2,53%).

Os dados do presente trabalho condizem parcialmente com os encontrados por Miranda et al. (2015), que estudaram o óleo essencial de *C. citratus*, espécie coletada no município de Lavras/MG. Os autores encontraram geranial (41,61%), neral (29,78%) e mirceno (2,07%) como constituintes majoritários. Esses constituintes também foram encontrados neste trabalho, mas em proporções diferenciadas. Segundo Gobbo-Neto; Lopes (2007), as diferenças nas proporções dos constituintes dos óleos essenciais deve-se a diversos fatores, como índice pluviométrico, clima, temperatura, horário e época da coleta, entre outros fatores.

Observando-se os dados descritos para o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) (Tabela 3), nota-se que seus constituintes

majoritários são 1,8-cineol (62,26%), cânfora (17,34%) e α -pineno (9,07%) (Figura 16).

Tabela 3 Composição química do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*.

Pico	IR	Composto	%
1	927	α-pineno	9,07
2	942	canfeno	2,55
3	970	β -pineno	1,41
4	1028	1,8-cineol	62,26
5	1143	cânfora	17,34
6	1162	isoborneol	3,77
7	1185	α -terpineol	2,77
Total identificado			99,17
Componentes			
Monoterpenos			13,03
Monoterpenos oxigenados			86,14

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

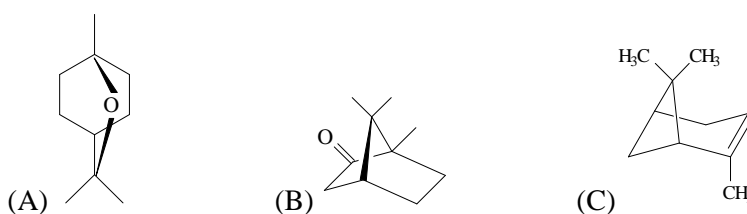


Figura 16 Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis*; (A) 1,8-cineol (B) cânfora (C) α -pineno

Zandi-Sohani; Ramezani (2015) coletaram *Rosmarinus officinalis* em Khuzestan (província do Irã) e encontraram como componentes majoritários do óleo essencial o borneol (21,17%), α -pineno (15,17%), *p*-cimeno (6,49%) e β -pineno (5,97%). Todos os constituintes encontrados pelos autores, exceto o *p*-cimeno, também foram encontrados neste estudo, porém em quantidades diferenciadas.

Olmedo, Asensio e Grosso (2015), analisando a composição química dessa espécie coletada na estação experimental da Faculdade de Ciências Agropecuárias, Universidade Nacional de Córdoba (Argentina), encontraram como constituintes majoritários o 1,8-cineol (22,2%), β -mirceno (21,5%) e α -pineno (11,0%). Os autores identificaram o mesmo componente majoritário encontrado neste trabalho, o 1,8-cineol.

Lemos et al. (2015) encontraram como componentes majoritários do óleo essencial de *R. officinalis* os mesmos constituintes encontrados neste trabalho, mas em quantidades bem diferentes, como pode ser visto na Tabela 3. Os autores encontraram maior porcentagem de cânfora (24,38%), seguida de 1,8-cineol (19,74%) e α -pineno (15,18%).

De acordo com os dados descritos na Tabela 4, o óleo essencial de *Peumus boldus* (boldo-do-chile) apresenta como compostos majoritários o formato de α -terpinila (61,99%), o *p*-cimeno (15,45%), 1,8-cineol (10,59%), ascaridol (2,73%), terpinen-4-ol (2,03%) (Figura 17).

Tabela 4 Composição química do óleo essencial de *Peumus boldus*.

Pico	IR	Composto	%
1	924	α -pineno	0,92
2	963	sabineno	0,59
3	968	β -pineno	0,34
4	1015	<i>p</i>-cimeno	15,45
5	1023	1,8-cineol	10,59
6	1079	fenchona	0,17
7	1155	pinocarvona	0,45
8	1169	terpinen-4-ol	2,03
9	1231	ascaridol	2,73
10	1247	<i>cis</i> -epoxido-piperitona	0,43
11	1305	formato de α-terpinila	61,99
12	1607	β -oplopenona	0,14
Total identificado			95,83
Componentes			
Monoterpenos			17,30
Monoterpenos oxigenados			78,39
Sesquiterpenos oxigenados			0,14

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

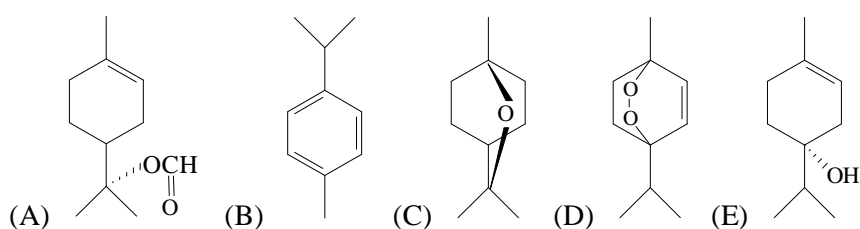


Figura 17 Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de *Peumus boldus*; (A) formato de α -terpinila (B) *p*-cimeno (C) 1,8-cineol (D) ascaridol (E) terpinen-4-ol

Relatos apontam ascaridol como o principal componente do óleo essencial dessa espécie (VOGEL et al., 1999), ao passo que Vila et al. (1999) obtiveram um óleo essencial contendo limoneno (17,0%), *p*-cimeno (13,6%) e 1,8-cineol (11,8%), sendo 90,5% monoterpenos, enquanto o ascaridol

correspondeu apenas a 1% do total de terpenoides. Os autores atribuem essa alteração à existência de diferentes variedades de *Peumus boldus*.

Para Ochoa et al. (2008), o óleo essencial de *Peumus boldus* apresenta quantidade elevada de *p*-cimeno, α -pineno, que são hidrocarbonetos monoterpênicos, e ascaridol, 1,8-cineol, linalol, sendo esses monoterpênicos oxigenados, dados que divergem parcialmente dos encontrados neste trabalho, uma vez que o ascaridol não foi encontrado em grande quantidade.

Pelos dados apresentados na Tabela 5, pode-se observar que o componente majoritário do óleo essencial de *Foeniculum vulgare* foi o metil chavicol (estragol) (89,48%), seguido do limoneno (6,15%) e fenchona (3,80%) (Figura 18).

Tabela 5 Composição química do óleo essencial de *Foeniculum vulgare*.

Pico	IR	Composto	%
1	1022	limoneno	6,15
2	1082	fenchona	3,80
3	1200	metil chavicol	89,48
Total identificado			99,43
Componentes			
Monoterpenos			6,15
Monoterpenos oxigenados			3,80
Fenilpropanoides			89,48

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

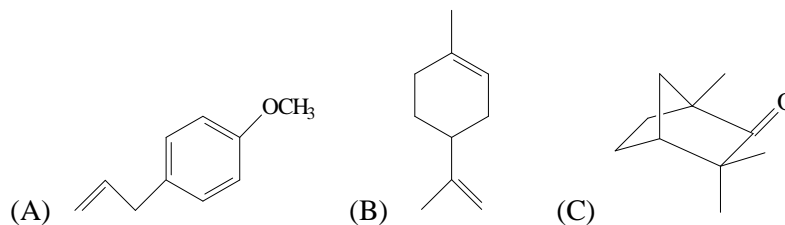


Figura 18 Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de *Foeniculum vulgare*; (A) metil chavicol (B) limoneno (C) fenchona

Evrendilek (2015), analisando a composição química do óleo essencial de *Foeniculum vulgare* extraído das sementes de funcho adquiridas nos mercados de Hatay (Turquia), identificou 7 compostos, sendo majoritário o *trans*-anetol (80,4%), dados divergentes daqueles encontrados neste trabalho, no qual não foi encontrado o *trans*-anetol.

Zoubiri et al. (2014), avaliando a composição química do óleo essencial das sementes de erva-doce, encontraram como componentes majoritários o *trans*-anetol (76%), fenchona (11,13%), limoneno (5,82%) e estragol (4,75%). Dados que corroboram totalmente com aqueles encontrados por Evrendilek (2015) e parcialmente com os obtidos neste trabalho, uma vez que o *trans*-anetol não foi identificado.

Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), a variação na composição química de óleos essenciais deve-se a diversos fatores, como locais e horários da coleta, tipo de solo, nutrientes e a época de coleta, uma vez que a planta pode apresentar variações de seus metabólitos secundários no verão, primavera, outono e inverno, ou seja, durante todo o ano. A idade da planta, sazonalidade, temperatura e outros fatores também influenciam praticamente todas as classes de metabólitos secundários, incluindo os óleos essenciais.

De uma maneira geral, os óleos essenciais apresentaram em sua composição uma maior quantidade de monoterpenos (oxigenados ou não) e sesquiterpenos (oxigenados ou não), mas apenas o óleo essencial de erva-doce apresentou em sua composição um fenilpropanoide. Contudo, foram realizadas diferentes atividades no intuito de observar seus potenciais.

4.3 Atividade antioxidante

Na Tabela 6 estão descritas as porcentagens de atividade antioxidante dos óleos essenciais e do padrão BHT pelo método de sequestro de radicais DPPH. De acordo com os resultados obtidos, observa-se que os óleos essenciais apresentaram uma fraca atividade antioxidante. Comparando o padrão BHT com os óleos essenciais nas mesmas

concentrações, observa-se que o padrão apresentou uma maior atividade antioxidante em relação aos óleos essenciais, ao passo que as concentrações do óleo essencial de *M. piperita* não diferiram significativamente do padrão, seguido do óleo essencial de *C. citratus* e *R. officinalis*. Já entre as concentrações do óleo essencial de *P. boldus*, a maior atividade antioxidante foi observada na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, ocorrendo o mesmo para o óleo de *F. vulgare*.

Tabela 6 Valores da porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais e do padrão pelo método de sequestro de radicais DPPH.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Amostras					
	BHT	<i>M.</i> <i>piperita</i>	<i>C.</i> <i>citratus</i>	<i>R.</i> <i>officinalis</i>	<i>P.</i> <i>boldus</i>	<i>F.</i> <i>vulgare</i>
25	13,9gA	0,39aB	0,00aB	0,11aB	0,25cB	0,05bB
50	22,8fA	0,54aB	0,20aB	0,01aB	0,18cB	0,00bB
100	38,5eA	0,66aB	0,20aB	0,00aB	0,00cB	0,00bB
150	44,6dA	0,51aB	0,19aB	0,01aB	1,25bB	0,69aB
200	52,5cA	0,52aD	0,34aD	0,06aD	2,32aB	1,36aC
250	59,7bA	0,38aC	0,15aC	0,00aC	1,91aB	1,12aB
500	72,7aA	1,32aC	0,56aD	0,43aD	2,40aB	1,34aC

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e mesma letra maiúscula nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Scott-knott ($p \leq 0,05$).

M. piperita (*Mentha piperita*), *C. citratus* (*Cymbopogon citratus*), *R. officinalis* (*Rosmarinus officinalis*), *P. boldus* (*Peumus boldus*) e *F. vulgare* (*Foeniculum vulgare*).

Essa baixa atividade antioxidante dos óleos essenciais está relacionada com os compostos presentes neles, uma vez que não foi detectado nenhum composto que tenha facilidade de doação de um átomo de hidrogênio para estabilizar o radical DPPH, ou composto que tenha ligação dupla conjugada, em que essa estabilização também poderia ocorrer.

Entre os constituintes da espécie *P. boldus*, observa-se que o terpinen-4-ol apresenta um grupo hidroxil (-OH), mas ao doar o próton, o mesmo não é estabilizado por estruturas de ressonância, apresentando por tanto um baixo valor para o teste DPPH.

A Figura 19 mostra as possíveis formas de redução do DPPH, em que o radical DPPH pode ser estabilizado por um átomo de hidrogênio ou por um elétron.

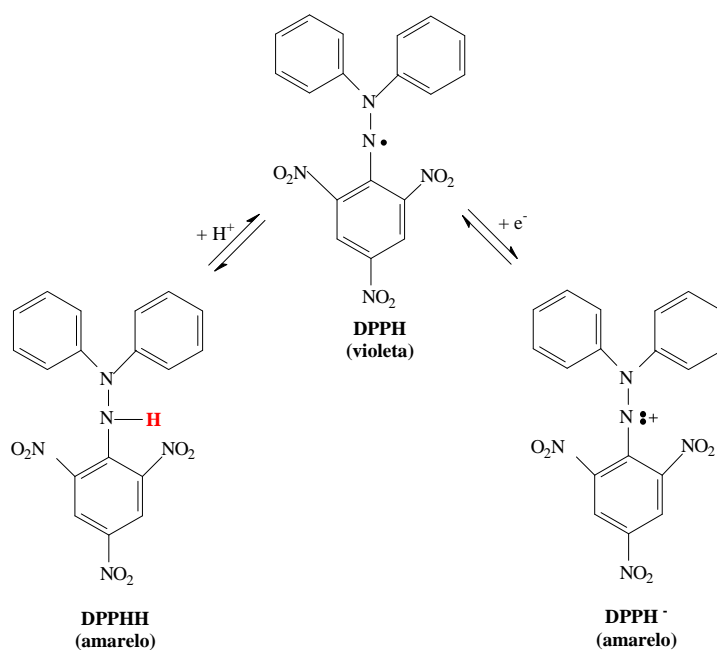


Figura 19 Mecanismo geral da redução do DPPH

A Figura 20 mostra a reação entre o 2,2-difenil-1-picril-hidrazil e o BHT, padrão utilizado no método de sequestro de radicais DPPH.

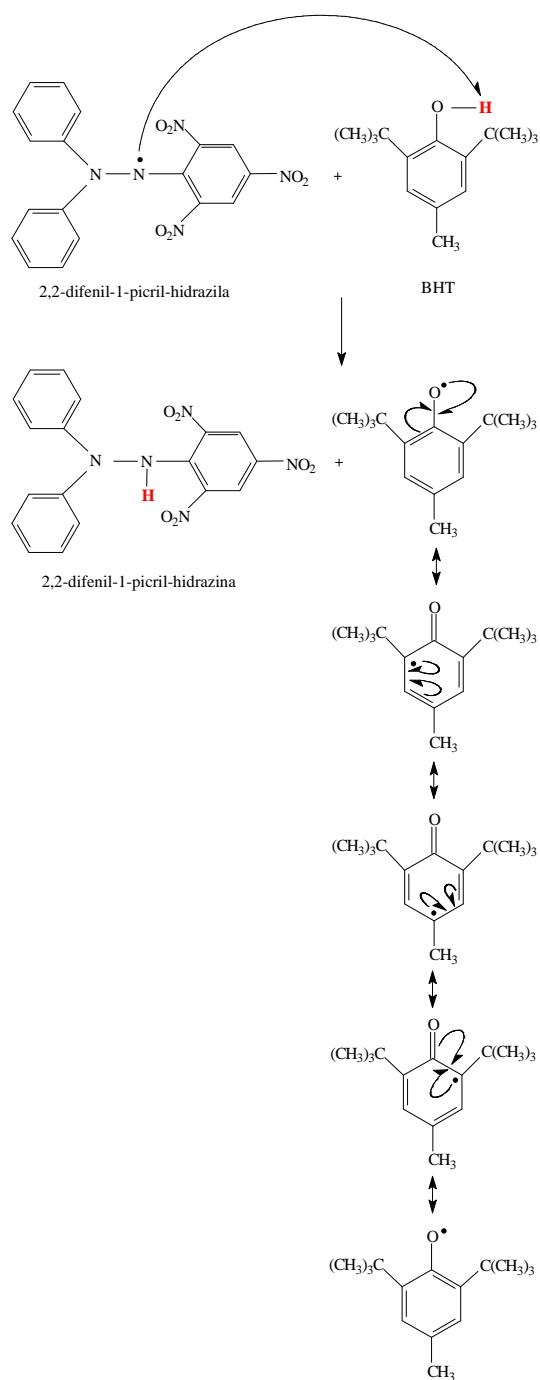


Figura 20 Provável mecanismo que explica a redução do radical DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) e a estabilização por ressonância do radical formado

Teixeira et al. (2013), avaliando a atividade antioxidante do óleo essencial de *R. officinalis*, por meio do método de redução do radical DPPH, encontraram menos eficácia para as amostras, quando comparadas com o padrão, uma vez que os compostos majoritários identificados foram cânfora (35,5%), 1,8-cineol (18,2%) e acetato de bornila (13,4%). Segundo os autores, essa baixa atividade do óleo essencial de *R. officinalis* é devida aos constituintes presentes na composição do óleo, que não apresentaram estruturas suscetíveis de oxidação.

Os autores atribuíram a baixa atividade do óleo essencial aos constituintes presentes na sua composição.

De acordo com Roby et al. (2013), as sementes de *Foeniculum vulgare* apresentaram uma elevada atividade antioxidante frente ao método DPPH. Os autores encontraram na composição óleo essencial *trans*-anetol (56,4%), fenchona (8,26%), estragol (5,2%).

Senatore et al. (2013), estudando a composição química e atividade antioxidante do óleo essencial de *F. vulgare* de seis cultivares diferentes, relataram uma fraca capacidade das amostras em estabilizar o radical livre DPPH. A cultivar 6 apresentou maior teor de anetol, proporcionando então uma atividade mais acentuada. Os autores encontraram na composição química do óleo essencial de *F. vulgare* o *trans*-anetol (59,8-90,4%), limoneno (0,1-21,5%), neofitadieno (0-10,6%), fenchona (0,1-3,1%) e estragol (0,1-2,5%). Os dados encontrados pelos autores condizem parcialmente com os encontrados neste trabalho, mas totalmente com os dizeres de Gobbo-Neto e Lopes (2007), que afirmam que o tipo de solo, nutrientes, região da coleta, índice pluviométrico interferem na produção de metabólitos secundários. Essa diferença na constituição dos óleos essenciais também pode ser explicada segundo estudos realizados por Bakkali et al. (2008), que sugerem que as plantas apresentam diferentes quimiotipos em função da sua adaptação ao meio.

Guimarães et al. (2011), estudando a atividade antioxidante do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* e de seu constituinte majoritário, o citral,

empregando o método de sequestro do radical estável DPPH, constataram a baixa atividade antioxidante de ambos. Segundo os autores, tal fato pode ser justificado devido à não facilidade de doação de um átomo de hidrogênio por parte dos constituintes para estabilizar o radical DPPH, resultados que condizem com os encontrados neste trabalho.

Yadegarinia et al. (2006), avaliando a atividade antioxidante do óleo essencial de *M. piperita* utilizando o método DPPH, observaram uma atividade de 69%. Segundo os autores, o óleo apresenta como composto majoritário o α -terpineno (19,7%), óxido de pipertitina (19,3%), *trans*-carveol (14,5%) e isomentona (10,3%), dados que não condizem com os encontrados no presente trabalho.

Os dados da literatura condizem em parte com os encontrados neste trabalho, uma vez que nenhum óleo essencial mostrou-se eficiente para estabilização de radicais DPPH, ou seja, não apresentaram em sua composição nenhum constituinte com estrutura capaz de doar um átomo de hidrogênio ou um elétron.

Na Tabela 7, podem ser vistos os resultados obtidos para avaliação da atividade antioxidante dos óleos essenciais e do padrão BHT, pelo método β -caroteno/ácido linoleico. O óleo essencial que apresentou maior atividade antioxidante foi o de *C. citratus* (5,81%), valor obtido na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, seguido de *F. vulgare*, *P. boldus* e *M. piperita*, diferindo-se estatisticamente do controle, mas apresentando baixa atividade.

Tabela 7 Valores da porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais e do padrão pelo método β -caroteno/ácido linoleico.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Amostras					
	BHT	<i>M. piperita</i>	<i>C. citratus</i>	<i>R. officinalis</i>	<i>P. boldus</i>	<i>F. vulgare</i>
25	63,4eA	0,28bC	1,81cB	0,00bC	0,28cC	0,16bC
50	74,0dA	0,76bB	1,72cB	0,00bB	0,75cB	0,88bB
100	81,3cA	1,09bC	3,83bB	0,40bC	1,36cC	0,09bC
150	81,9cA	2,12aC	4,56bB	0,99aC	1,67bC	0,92bC
200	85,5bA	2,26aC	4,12bB	1,26aC	1,84bC	1,25bC
250	86,6bA	2,03aC	4,16bB	1,92aC	2,08bC	2,95aC
500	91,0aA	3,11aC	5,81aB	1,64aD	3,37aC	3,96aC

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e mesma letra maiúscula nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Scott-knott ($p \leq 0,05$).

M. piperita (*Mentha piperita*), *C. citratus* (*Cymbopogon citratus*), *R. officinalis* (*Rosmarinus officinalis*), *P. boldus* (*Peumus boldus*) e *F. vulgare* (*Foeniculum vulgare*).

Os óleos essenciais de *M. piperita* e *R. officinalis* apresentaram maior atividade antioxidante a partir da concentração de $150 \mu\text{g mL}^{-1}$, ao passo que o óleo essencial de *F. vulgare* apresentou maior atividade antioxidante nas duas maiores concentrações, as quais se diferiram das demais estatisticamente. No óleo essencial de *C. citratus*, observou-se maior atividade antioxidante na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, como já mencionado. O óleo essencial de *P. boldus* apresentou um aumento na atividade antioxidante, de acordo com o aumento da concentração, sendo a maior atividade observada na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Guimarães et al. (2011), analisando a atividade antioxidante do óleo essencial de *C. citratus* e do seu constituinte majoritário (cital), pelo sistema emulsificado β -caroteno/ácido linoleico, observaram que esses compostos apresentaram atividades antioxidantes de 46,45% e de 38,00% na concentração de $100 \mu\text{g L}^{-1}$ para o óleo essencial e seu constituinte majoritário (cital), respectivamente; dados que não corroboram com os encontrados no presente trabalho. Os autores, ao compararem a atividade antioxidante do óleo essencial e do cital (constituinte majoritário), observaram uma maior atividade para o óleo essencial em relação ao cital;

isso comprova que nem sempre o constituinte majoritário é o responsável pela atividade estudada, e, sim, todos os componentes agindo simultaneamente.

Gachkar et al. (2007), avaliando a atividade antioxidante do óleo essencial de *R. officinalis*, encontraram como constituintes majoritários piperitona (23,7%), α -pineno (14,9%), linalol (14,9%) e 1,8-cineol (7,43%). Observaram aproximadamente 60 % de atividade antioxidante, e concluíram que o mesmo pode ser usado na conservação de alimentos, evitando a degradação e oxidação. Esses resultados são diferentes dos encontrados neste trabalho, no qual o óleo essencial de *R. officinalis* apresentou 1,64% de atividade antioxidante.

Yadegarinia et al. (2006), analisando a atividade antioxidante do óleo essencial de *M. piperita* L., encontraram uma atividade de 50,17% frente ao método β -caroteno/ácido linoleico. Esses dados não corroboram com os encontrados neste trabalho, uma vez que os constituintes majoritários identificados pelo autor (α -terpineno, óxido de piperitona, *trans*-carveol, isomentona e β -cariofileno) foram diferentes dos encontrados no presente trabalho (carvona e limoneno).

Constituintes que apresentam estrutura com certa polaridade, como, por exemplo, o grupo aldólico (-CHO), oferecem certa hidrofobicidade, proporcionando valores consideráveis de atividades antioxidantes diante o sistema β -caroteno/ácido linoleico, pois esses constituintes ficarão menos diluídos na fase aquosa da emulsão, concentrando-se então na fase lipídica; sendo assim, mais efetivos na proteção do ácido linoleico (KULISIC et al., 2004).

Na Figura 21, pode ser vista a reação de oxidação do β -caroteno, em que é avaliada a capacidade dos constituintes dos óleos essenciais em retardar ou inibir a formação de radicais livres gerados na peroxidação do ácido linoleico.

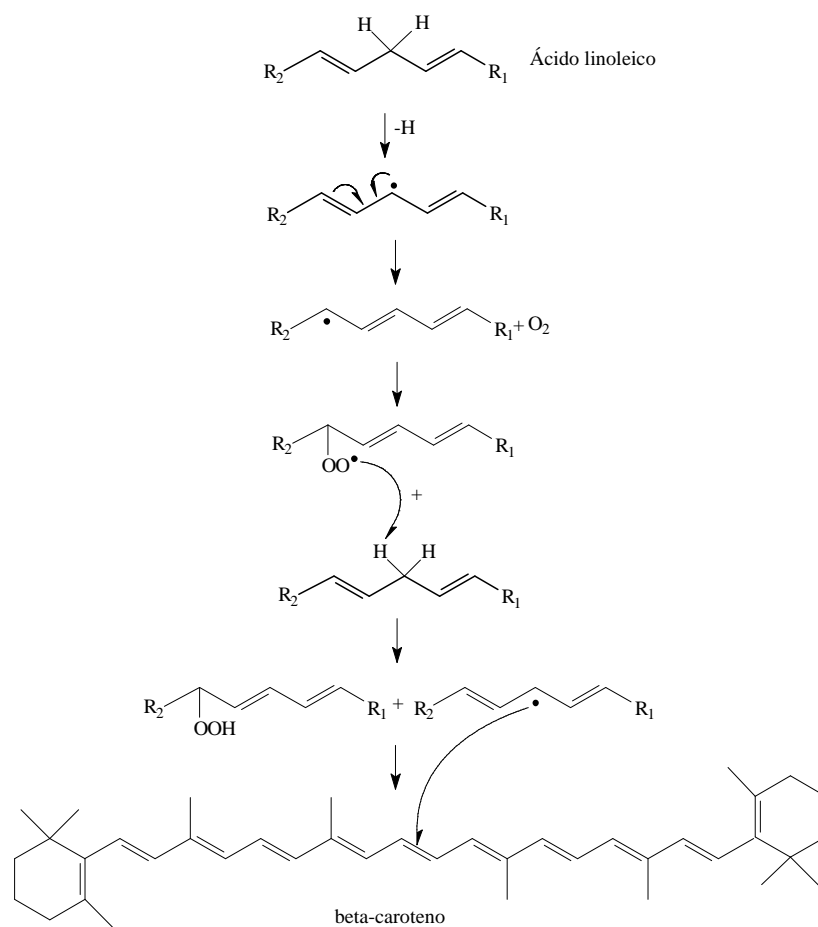


Figura 21 Reação de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

De acordo com os dados descritos na Tabela 8, foi observada uma diferença significativa na atividade antioxidante, empregando o método ABTS dos óleos essenciais em relação ao controle em todas as concentrações, sendo o controle mais eficaz. Os óleos essenciais de *M. piperita*, *R. officinalis* e *P. boldus* apresentaram diferença significativa apenas na concentração de $500 \mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto os óleos de *C. citratus* e *F. vulgare* não apresentaram diferença estatística entre as concentrações.

Tabela 8 Valores da porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais e do padrão pelo método ABTS.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Amostras					
	BHT	<i>M.</i> <i>piperita</i>	<i>C.</i> <i>citratu</i> s	<i>R.</i> <i>officinalis</i>	<i>P.</i> <i>boldus</i>	<i>F.</i> <i>vulgare</i>
25	16,0gA	1,29bB	0,16aB	0,64bB	0,22bB	0,00aB
50	30,1fA	0,68bB	0,90aB	0,53bB	0,61bB	0,00aB
100	50,6eA	1,25bB	0,77aB	0,43bB	0,78bB	0,00aB
150	64,8dA	0,11bB	0,43aB	0,83bB	0,85bB	0,00aB
200	72,2cA	0,96bB	0,35aB	1,63bB	0,91bB	0,00aB
250	81,0bA	1,13bB	0,00aC	1,68bB	1,18bB	0,00aC
500	93,6aA	2,83aC	1,56aD	4,55aB	4,57aB	0,00aE

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e mesma letra maiúscula nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Scott-knott ($p \leq 0,05$).

M. piperita (*Mentha piperita*), *C. citratu*s (*Cymbopogon citratu*s), *R. officinalis* (*Rosmarinus officinalis*), *P. boldus* (*Peumus boldus*) e *F. vulgare* (*Foeniculum vulgare*).

Segundo Singh, Shushni e Belkheir (2015), o óleo essencial de *M. piperita* demonstrou eficaz atividade antioxidante frente ao método ABTS, apresentando aproximadamente 90% de atividade. Segundo os autores, o óleo essencial de *M. piperita* é composto de mentol, mentona, mentofurano e acetato de mentila. Os autores enfatizam a importância de produtos naturais com potencial antioxidante, para indústrias alimentícias, cosméticas e farmacêuticas, na possível substituição de produtos sintéticos, pois os óleos essenciais podem evitar a oxidação de alimentos, serem utilizados na produção de fármacos e cosméticos que combatem radicais livres presentes em nosso organismo.

Jordán et al. (2013) afirmaram que o óleo essencial de *R. officinalis* apresenta um potencial antioxidante significativo frente a métodos de captura de radicais, como o método ABTS. Os autores relatam que óleos essenciais com teores consideráveis de γ -terpineno, α -terpineno, terpinoleno e óxido de cariofileno apresentam atividade significativa. De acordo com os autores, os constituintes γ -terpineno, α -terpineno, terpinoleno e óxido de cariofileno não foram identificados como majoritários, mas em quantidades capazes de capturar radicais, ao passo que, no presente trabalho, esses componentes não foram identificados; isso explica a baixa atividade do mesmo, uma vez que seus constituintes majoritários (1,8-cineol, cânfora e α -

pineno) não são capazes de doar átomos de hidrogênio para a estabilização do radical ABTS.

A Figura 22 mostra a possível estabilização do radical ABTS quando alguma estrutura é doadora de átomos de hidrogênio, como no caso do padrão BHT.

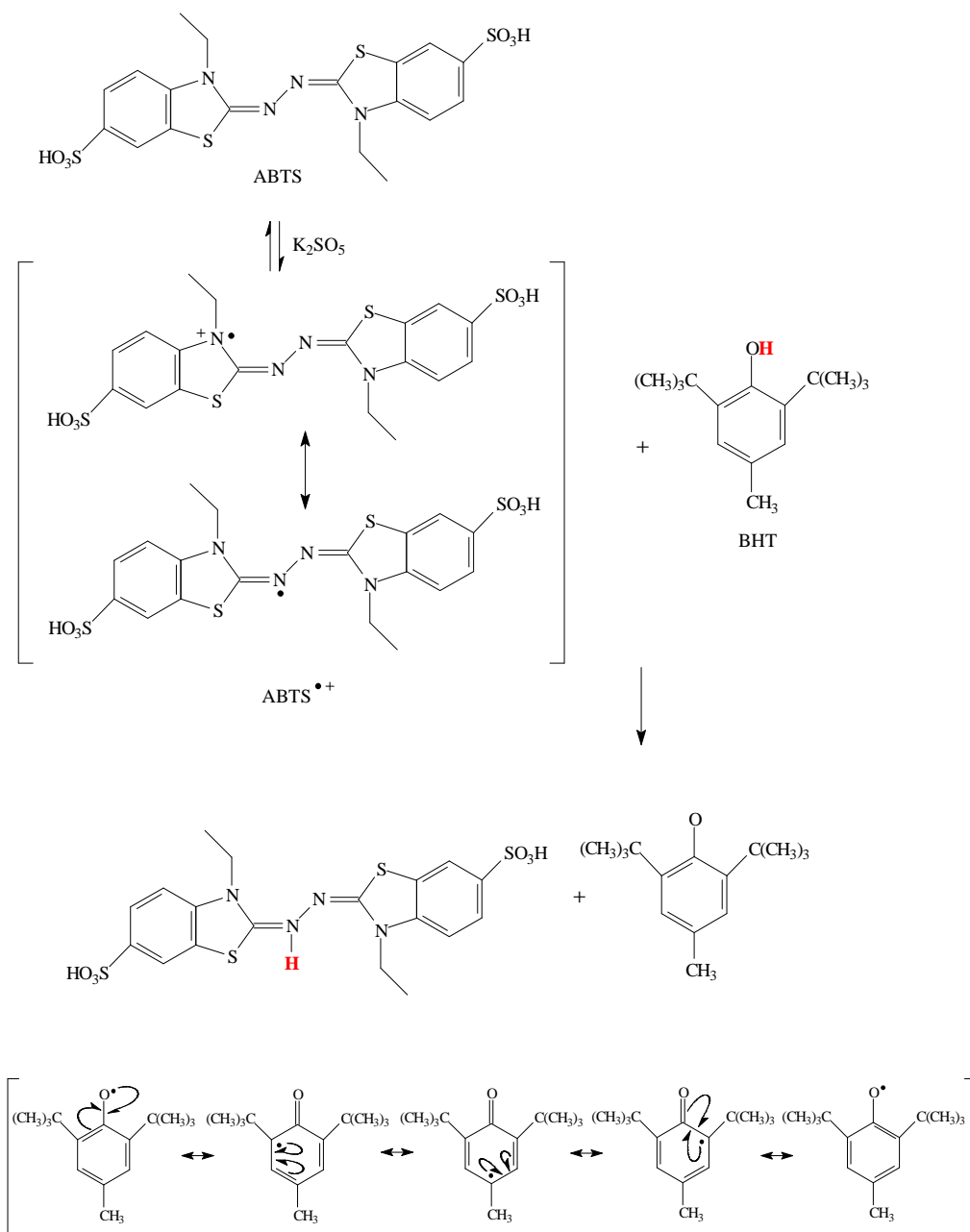


Figura 22 Provável mecanismo que explica a redução do radical ABTS e estabilização por ressonância do radical formado

Na Tabela 9, estão descritas as porcentagens de atividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método hidroxil. O óleo essencial de

M. piperita foi o que apresentou maior atividade, frente ao método testado, aproximadamente 63%, seguido de *R. officinalis* (46%), *C. citratus* (42%), *F. vulgare* (31%) e *P. boldus* (26%). Conforme descrito na literatura, o padrão utilizado foi o manitol (açúcar), tendo esse apresentado menor atividade em relação aos óleos essenciais, e essa atividade foi de aproximadamente 20%.

Tabela 9 Valores da porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais e do padrão pelo método Hidroxil.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Amostras					
	Manitol	<i>M.</i> <i>piperita</i>	<i>C.</i> <i>citratus</i>	<i>R.</i> <i>officinalis</i>	<i>P.</i> <i>boldus</i>	<i>F.</i> <i>vulgare</i>
25	0,00cD	28,7cA	22,4dB	10,3cC	0,00bD	0,75cD
50	0,00cC	40,7bA	11,7dB	13,6cB	0,00bC	0,00cC
100	0,00cC	42,9bA	11,3cB	12,3cB	0,00bC	0,00cC
150	1,52cC	26,6cA	16,6bB	16,2cB	2,92bC	3,41cC
200	3,76cC	31,0cA	19,9bB	27,2bA	3,00bC	4,15cC
250	9,44bD	42,1bA	24,4bC	31,2bB	6,11bD	10,8bD
500	19,7aE	62,8aA	42,2aB	46,2aB	25,8aD	31,3aC

Médias seguidas pela mesma letra minúscula nas colunas e mesma letra maiúscula nas linhas não diferem significativamente pelo teste de Scott-knott ($p \leq 0,05$).

M. piperita (*Mentha piperita*), *C. citratus* (*Cymbopogon citratus*), *R. officinalis* (*Rosmarinus officinalis*), *P. boldus* (*Peumus boldus*) e *F. vulgare* (*Foeniculum vulgare*).

Mimica-Dukic et al. (2003), estudando os óleos essenciais de *M. piperita*, *M. longifolia* e *M. aquatica*, observaram uma maior atividade para o óleo essencial de *M. piperita* (24%), sendo esse, composto de mentol (40%), acetato de metila (10%) e mentona (9%). Os constituintes identificados no presente trabalho não foram os mesmos encontrados por Mimica-Dukic et al. (2003), fato que pode explicar a diferença na atividade observada frente ao método hidroxil. Essa diferença na constituição dos óleos essenciais deve-se a diversos fatores e um deles é o quimiotipo das plantas, que podem apresentar a mesma aparência e características, mas apresentam estruturas químicas diferenciadas em função da sua adaptação ao meio (BAKKALI et al., 2008).

Estudos realizados por Ubeda et al. (1993) mostraram que alguns alcaloides impedem a degradação da desoxirribose induzida pelo complexo $\text{Fe}^{3+}/\text{EDTA}$ na presença do peróxido de hidrogênio.

Na Figura 23, pode ser observado o provável mecanismo da formação do radical hidroxil que irá atacar a desoxirribose degradando-a em diversos fragmentos, sendo um desses o malonaldeído, que é capaz de reagir com o TBA (ácido tiobarbitúrico), gerando um composto cromógeno que pode ser quantificado por espectrofotometria.

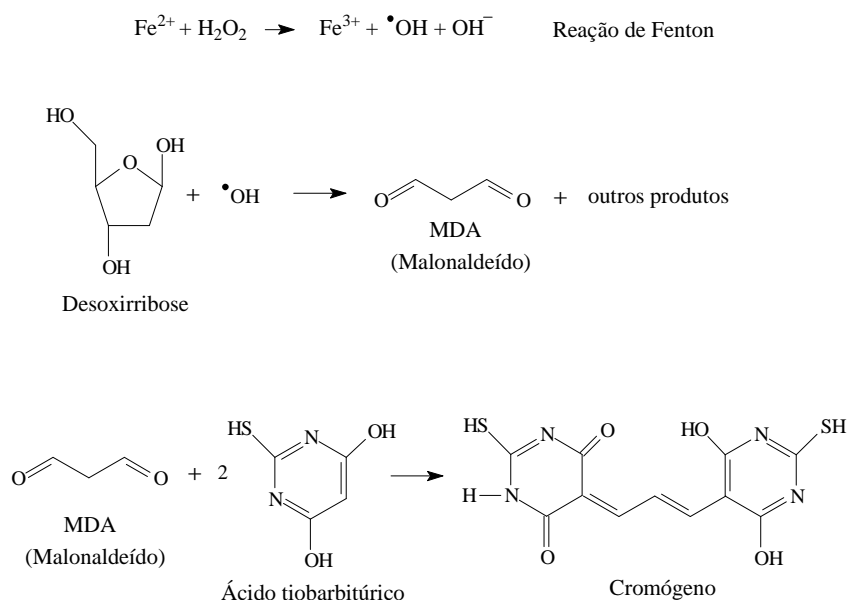


Figura 23 Provável mecanismo da degradação oxidativa da desoxirribose por um radical hidroxil formado através da reação de Fenton e formação do cromógeno a partir do malonaldeído e ácido tiobarbitúrico

Óleos essenciais que apresentam propriedades antioxidantes frente ao método hidroxil têm a função de proteger a desoxirribose, e podem competir com ela pelo radical hidroxil e, com isso, ocorre uma diminuição na intensidade da coloração, uma vez que não ocorre a formação do malonaldeído (Figura 24).

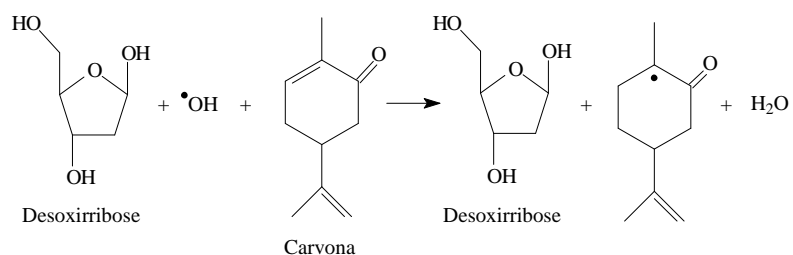


Figura 24 Provável mecanismo da proteção da desoxirribose por uma substância antioxidante

De acordo com os dados descritos na Tabela 10, os óleos essenciais que apresentaram maior atividade frente ao método de redução do molibdênio foram o óleo de *C. citratus* e *P. boldus*. Observa-se que 1,54 e 1,82 μg de óleo essencial de *C. citratus* e *P. boldus*, respectivamente, equivalem a 1 μg de ácido ascórbico, ao passo que são necessários 20 μg do óleo essencial de *F. vulgare* para uma atividade equivalente a 1 μg de ácido ascórbico. Essa diferença de atividade pode ser explicada pela diferente composição dos óleos essenciais, pois alguns constituintes favorecem a redução e outros não, apresentando, assim, atividade ou não frente ao método estudado.

Tabela 10 Atividade antioxidante dos óleos essenciais pelo método da Redução do fosfomolibdênio.

Plantas	Fosfomolibdênio
	µg de OE equivalente a µg ⁻¹ de ácido ascórbico
<i>M. piperita</i>	5,30
<i>C. citratus</i>	1,54
<i>R. officinalis</i>	5,57
<i>P. boldus</i>	1,82
<i>F. vulgare</i>	20,66

M. piperita (*Mentha piperita*), *C. citratus* (*Cymbopogon citratus*), *R. officinalis* (*Rosmarinus officinalis*), *P. boldus* (*Peumus boldus*) e *F. vulgare* (*Foeniculum vulgare*).

Silva et al. (2015), avaliando a atividade antioxidante do óleo essencial de plantas da família Lamiaceae (*Mentha pulegium* e *Mentha viridis*) pelo método de redução do molibdênio, verificaram que o óleo essencial de *M. pulegium* (apresentando 50,0% de pulegona, 31,9% de mentol e 16,6% mentona) proporcionou melhor atividade em relação ao padrão utilizado (BHT), seguido do óleo essencial de *M. viridis*, composto de 40,7% de linalol, 13,9% de carvona e 8,6% de α -terpineno. Dados que não corroboram com os encontrados no presente trabalho, uma vez que o óleo essencial de *M. piperita* não apresentou atividade significativa frente ao método de redução do molibdênio, pois a composição diferenciada do óleo essencial pode ter sido influenciado.

Neste método de complexação pelo fosfomolibdênio, no início, a solução apresenta coloração amarela, e vai se tornando verde à medida que a solução de fosfomolibdênio se reduz (doação de elétrons por parte do composto antioxidante). Sendo assim, nenhum óleo essencial proporcionou tal atividade, uma vez que seus constituintes não apresentam estrutura favorável para essa doação. Esse método avalia a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

A reação da possível redução do molibdênio pode ser observada na figura a seguir:

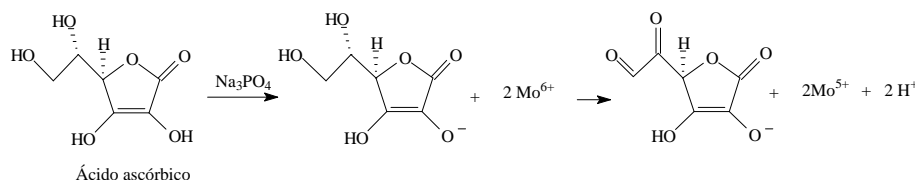


Figura 25 Provável mecanismo da redução do molibdênio

Os óleos essenciais de *M. piperita*, *C. citratus*, *R. officinalis*, *P. boldus* e *F. vulgare* utilizados neste estudo não apresentaram atividade antioxidante frente ao método do poder redutor, ou seja, não foram capazes de reduzir o íon ferro.

Silva et al. (2015), estudando a atividade antioxidante do óleo essencial de *Mentha pulegium* e *Mentha viridis*, observaram uma atividade limitante em reduzir o íon ferro para o óleo de *M. viridis*; no entanto, o óleo essencial de *M. pulegium*, nas concentrações de 0,78 a 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$, ultrapassou a atividade do padrão BHT. Apesar de os óleos essenciais serem de espécies vegetais pertencentes ao mesmo gênero e mesma família, apresentam constituintes diferentes e conseqüentemente atividades antioxidantes diferenciadas.

Teixeira et al. (2013), avaliando as propriedades antioxidantes do óleo essencial de *R. officinalis* pelo método do poder redutor, observaram uma baixa atividade para o óleo, um valor inferior a 5 μmol de ácido ascórbico por grama de óleo essencial, ao passo que, no presente estudo, o mesmo não apresentou atividade.

O método do poder redutor avalia a capacidade antioxidante do óleo essencial de acordo com a redução do íon ferricianeto a ferrocianeto. O óleo essencial que apresenta em sua composição constituintes com potencial

reductor irá reduzir o ferro III $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$ a ferro II $[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$ (Figura 24), a medida que a redução vai acontecendo a solução vai ficando mais verde.

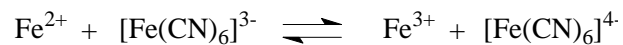


Figura 26 Reação da provável redução do íon ferricianeto a ferrocianeto

4.4 Atividade antibacteriana

As concentrações mínimas inibitórias (CMI) dos óleos essenciais obtidas sobre bactérias Gram-negativas e Gram-positivas estão descritas na Tabela 11.

Tabela 11 Concentração mínima inibitória dos óleos essenciais de *M. piperita*, *C. citratus*, *R. officinalis*, *P. boldus* e *F. vulgare* determinada para os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Choleraesuis*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Bactérias	Gram	DMSO	CF	CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
				<i>M. piperita</i>	<i>C. citratus</i>	<i>R. officinalis</i>	<i>P. boldus</i>	<i>F. vulgare</i>
<i>S. aureus</i> ATCC13565	+	NI	100	250	125	125	62,5	NI
<i>L. monocytogenes</i> ATCC19117	+	NI	100	62,5	15,63	500	250	125
<i>S. Choleraesuis</i> ATCC6539	-	NI	100	62,5	15,63	125	125	125
<i>E. coli</i> ATCC11229	-	NI	100	62,5	31,25	125	31,25	62,5
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	-	NI	100	NI	NI	NI	NI	NI

NI: não inibiu, DMSO: dimetilsulfóxido, CF: cloranfenicol (C+)

O óleo essencial de *M. piperita* apresentou atividade antibacteriana inibindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, exceto para *P. aeruginosa*, como mostra os dados da Tabela 11. Esse fato difere da maioria dos estudos em que é relatado que bactérias Gram-negativas são menos sensíveis a óleos essenciais, por possuírem uma membrana externa considerada uma barreira de proteção para macromoléculas e compostos hidrofóbicos. Devido a essa característica morfológica, bactérias Gram-negativas são relativamente resistentes a antibióticos e outras drogas hidrofóbicas, assim como os óleos essenciais (BURT, 2004).

Valeriano et al. (2012), analisando a atividade antibacteriana do óleo essencial de *M. piperita* frente às mesmas linhagens bacterianas avaliadas no presente trabalho, observaram que esta espécie apresentou maior atividade para *E. coli*, e baixa atividade para *L. monocytogenes*. De acordo com os autores foram indentificados o mentol, neoisomentol, mentona, acetato de metila e *iso*-mentona como componentes majoritários, enquanto que, no presente trabalho, o óleo essencial desta espécie apresentou atividade similar tanto para *E. coli* quanto para *L. monocytogenes*, apresentado como constituintes majoritários a carvona e o limoneno.

Iscan et al. (2002), estudando a atividade antibacteriana de óleos essenciais de *M. piperita* de diferentes países, encontraram como componentes majoritários o mentol (27,5-42,3%) e mentona (18,4-27,9%) e observaram uma inibição para *L. monocytogenes* com uma CMI de 156 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e uma inibição para *S. aureus* de 625 $\mu\text{g mL}^{-1}$, quantidades superiores às encontradas neste estudo, uma vez que este compostos não foram identificados neste trabalho.

Os autores relatam que a presença de mentol é ativa contra vários micro-organismos, incluindo *Pseudomonas aeruginosa*. Posteriormente, trabalhos realizados por Valeriano et al. (2012) mostraram que o mentol não é o único agente responsável pelas propriedades antimicrobianas de *M. piperita*. As observações feitas por Iscan et al. (2002) não condizem com os

resultados encontrados neste trabalho, uma vez que o óleo essencial de *M. piperita* não foi efetivo contra *P. aeruginosa*.

De acordo com dados descritos na Tabela 11, o óleo essencial de *C. citratus* se mostrou mais eficaz na inibição de *L. monocytogenes* (15,63 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *S. Choleraesuis* (15,63 $\mu\text{g mL}^{-1}$) seguida da bactéria *E. coli* (31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os valores 15,63 e 31,25 $\mu\text{g mL}^{-1}$ mostraram-se 6 vezes e 3,2 vezes, respectivamente menores que a CMI determinada para o cloranfenicol, droga controle, destacando a potencialidade deste óleo essencial para aplicação industrial como antimicrobiano. Esses dados corroboram parcialmente com resultados obtidos por Valeriano et al. (2012), onde observaram que o óleo essencial de *C. citratus* apresentou maior atividade antimicrobiana frente a *E. coli* e atividade moderada frente a *L. monocytogenes*.

Silva, F. et al. (2014), avaliando a atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. citratus*, observaram uma inibição do crescimento tanto para *S. aureus* (Gram-positiva) com uma CMI de 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$, quanto para *P. aeruginosa* e *E. coli* (Gram-negativas) com valor médio de 15,62 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os dados obtidos nesse trabalho corroboram parcialmente com Silva, F. et al. (2014), sendo a CMI do óleo essencial de *C. citratus* de 15,63 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *L. monocytogenes* e *E. coli*.

De acordo com dados descritos na Tabela 11, as menores CMIs do óleo essencial de *R. officinalis* encontradas neste estudo foram para *S. aureus*, *S. Choleraesuis* e *E. coli*, apresentando um valor de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, seguidas da maior concentração sendo de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *L. monocytogenes*.

Rocha et al. (2014), avaliando a concentração mínima inibitória do óleo essencial de *R. officinalis* sobre *S. aureus*, *S. Choleraesuis*, *E. coli* e *P. aeruginosa*, verificaram que o crescimento de *S. aureus* foi inibido pela menor concentração do óleo essencial testado, sendo de 7,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Dados que corroboram parcialmente com os encontrados no presente trabalho, pois embora *R. officinalis* tenha induzido inibição, esta se mostrou menos eficaz, pois sua CMI foi de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Avaliando a capacidade antimicrobiana do 1,8-cineol e cânfora presentes nesta espécie, Bozin et al. (2007) constataram que esses componentes agiram contra *E. coli* L. Estes resultados corroboram em partes com o encontrado neste trabalho, um vez que, também foram identificados no óleo essencial desta espécie o 1,8-cineol e cânfora como componentes majoritários, e seu óleo apresentou uma inibição moderada para *E. coli*.

Estudos realizados por Jiang et al. (2011), com o óleo essencial de *R. officinalis* observaram que este apresentou uma maior atividade antimicrobiana sobre *E. coli*, *S. aureus* e *P. aeruginosa*, resultados parcialmente diferentes dos encontrados neste trabalho, pois o óleo essencial desta espécie não inibiu *P. aeruginosa*.

Conforme descrito na Tabela 11, a menor concentração mínima inibitória do óleo essencial de *P. boldus* foi sobre *E. coli* (31,25 µg mL⁻¹), seguida da CMI sobre *S. aureus* (62,5 µg mL⁻¹).

Além do boldo (*Peumus boldus*) ser empregado no tratamento de distúrbios hepáticos e digestivos, apresentando propriedades diuréticas, estomáquicas e antiinflamatórias (RUIZ et al., 2008), seu óleo essencial apresenta atividade inseticida e efeito repelente sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky, como descrito por Betancur et al. (2010).

Os dados descritos na Tabela 12 mostram os valores de inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas sobre o efeito do óleo essencial de *F. vulgare*. Não foi observada inibição para *S. aureus* e *P. aeruginosa*.

Roby et al. (2013), avaliando a atividade antibacteriana do óleo essencial de *F. vulgare* sobre duas espécies de bactérias Gram-negativas (*Escherichia coli* O157 ATCC 1659 e ATCC 13076 de *Salmonella typhi*) e duas espécies de Bactérias Gram-positivas (*Bacillus cereus* ATCC 11778 e *Staphylococcus aureus* ATCC 13565), uma espécie de levedura (*Candida albicans* ATCC 10231) e uma espécie de fungo (*Aspergillus flavus* ATCC 16875), observaram que os menores valores de CIM encontradas para o óleo

essenciais de *F. vulgare* foram de $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *A. flavus*, *C. albicans* e *S. aureus*.

Diao et al. (2014), estudando a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *F. vulgare* contra sete micro-organismos diferentes, sendo *S. aureus* ATCC 25923, *S. albus* ATCC 8799, *B. subtilis* ATCC 6051 (Gram-positivas) e *S. typhimurium* ATCC 19430, *P. aeruginosa* ATCC 9027, *S. dysenteriae* CMCC (B) 51252, e *E. coli* ATCC 25922 (Gram-negativas), observaram forte atividade contra todos os agentes patogênicos testados de origem alimentar, tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, mas o micro-organismo mais sensível foi *S. dysenteriae* mostrando maior inibição e menor valor CMI. O presente trabalho diferiu dos dois estudos acima, sendo encontrado o menor valor de CMI para *E. coli*, $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Pseudomonas aeruginosa é uma espécie patogênica produtora de exopolissacarídeos que podem permanecer ligados à parede celular (capsular) ou serem excretados na forma livre (muco), isso possivelmente explica a resistência da mesma em relação aos óleos essenciais testados, pois a produção de exopolissacarídeos é um problema que interfere em mecanismos imunológicos contra infecções bacterianas (VU et al., 2009).

Griffin et al. (1999) afirmaram que os terpenos de pequena massa molar capazes de doar ou aceitar elétrons em uma ligação de hidrogênio podem ser mais eficazes contra bactérias Gram-negativas. Esse fato pode estar relacionado com a membrana externa desses micro-organismos. Moléculas hidrofóbicas são forçadas a se difundir através de uma camada impermeável, enquanto que pequenos compostos hidrofílicos são capazes de passar mais facilmente através da membrana. Deste modo, pequenos terpenoides são capazes de formar ligações de hidrogênio e interagir significativamente com a água podendo então ser mais eficazes na travessia da membrana. Os autores observaram também a relação entre a estrutura e a atividade dos compostos presentes nos óleos essenciais, sendo a diferença estrutural um importante fator na inibição do micro-organismo. O citrionelol não foi ativo contra *E. coli* quando comparado com geraniol e nerol, essa

diferença pode estar relacionada com a única ligação dupla existente no citrionelol, ao passo que existem duas ligações duplas na estrutura do geraniol e nerol. Esta ligeira diferença na estrutura é, no entanto, suficiente para afetar parâmetros moleculares importantes, tais como a capacidade de ligação de hidrogênio e, portanto, exercendo atividade contra esses micro-organismos.

Além disso, Griffin et al. (1999) relatam que constituintes que apresentam uma ou mais hidroxilas alcoólicas são mais eficazes na inibição de diversos micro-organismos, incluindo *S. aureus* do que uma estrutura apresentando o grupo funcional aldeído, como é o caso do citrionelol e do citrionelal, sendo o citrionelol mais ativo do que o citrionelal. Outro exemplo, corresponde aos constituintes terpinen-4-ol e α -terpineol, sendo a única diferença entre eles, a posição da hidroxila alcoólica, e esta diferença pode afetar as propriedades da molécula, tais como a capacidade de realizar ligações de hidrogênio e, portanto, afetando sua atividade contra *P. aeruginosa*, sendo terpinen-4-ol ativo e α -terpineol inativo.

O óleo essencial de *C. Citratus*, composto basicamente de monoterpenos, foi o que apresentou maior eficiência na inibição de bactérias, podendo ser sugerido como componente em formulações de géis para uso tópico ou até mesmo em pomadas indicadas no tratamento de infecções da pele causadas por diferentes bactérias. Os óleos essenciais de *M. piperita*, *P. Boldus* e *F. vulgare* também obtiveram resultados promissores quanto a inibição de bactérias, sendo sugeridos para o tratamento de algumas infecções hepáticas ou intestinais, no entanto estudos aprofundados em relação a toxicidade desses óleos deverão ser realizados para futuras aplicações.

4.5 Atividade hemolítica em meio sólido

Analisando a Figura 27, observa-se que todos os óleos essenciais induziram hemólise em todos os volumes testados. Destacam-se os óleos

essenciais de *C. citratus* e *P. boldus*, que apresentaram halos de aproximadamente 9 mm (*C. citratus*) em todos os volumes analisados, sendo 13 e 15 mm (*P. boldus*) nos volumes de 1,2 e 1,8 μL , respectivamente. A análise estatística demonstrou que o halo de 15 mm, referente ao volume de 1,8 μL de óleo de *P. boldus*, não difere significativamente do controle contendo apenas peçonha. Já o óleo essencial de *R. officinalis* não apresentou atividade hemolítica, assim como os menores volumes de *M. piperita* e *F. vulgare*.

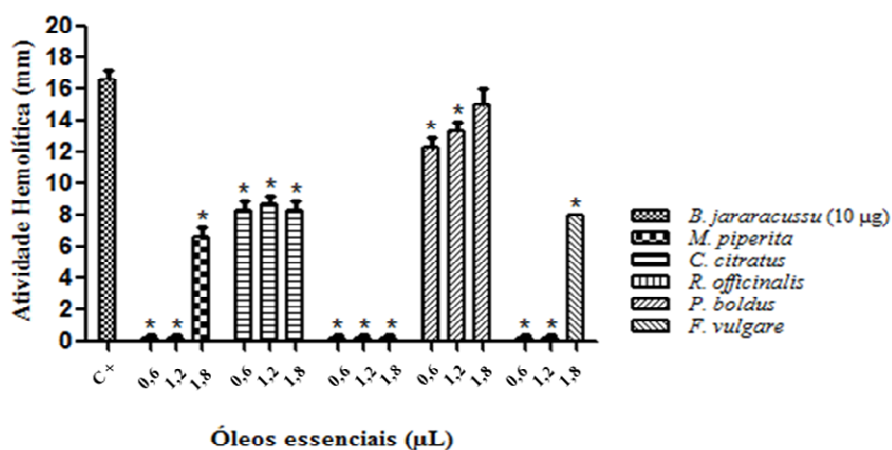


Figura 27 Atividade hemolítica em meio sólido dos óleos essenciais de *M. piperita*, *C. citratus*, *R. officinalis*, *P. boldus* e *F. vulgare* e do controle positivo contendo apenas peçonha de *Bothrops jararacussu*. *Difere do controle positivo pelo teste Skott knott a 95% de significância.

A Figura 28 apresenta as porcentagens de atividade hemolítica obtidas após incubação dos óleos essenciais com peçonha. Considerando os diâmetros dos halos resultantes da atividade da peçonha como 100%, nota-se que o óleo de *P. boldus* potencializou (aproximadamente 30%) a ação das enzimas presentes na composição da peçonha, em todos os volumes de óleos testados. Para o óleo essencial de *M. piperita* no volume de 0,6 μL ocorreu uma inibição de aproximadamente 45%, enquanto que os volumes de 1,2 e

1,8 µL potencializaram a ação das enzimas hemolíticas, proteases e fosfolipases A₂ em sua maioria. Já para o óleo essencial de *C. citratus* não foi observada atividade inibitória estatisticamente significativa, no entanto o óleo de *R. officinalis* potencializou a lise de eritrócitos induzida pela peçonha em aproximadamente 20% no menor volume (0,6 µL) avaliado e apresentou inibição de aproximadamente 35% nos volumes de 1,2 e 1,8 µL. Para o óleo essencial de *F. vulgare* foi observado 100% de inibição nos volumes 0,6 e 1,2 µL, enquanto que, o volume de 1,8 µL não induziu inibição significativa. Essas atividades diferenciadas para cada óleo essencial podem ser explicadas pela diferença na constituição destes.

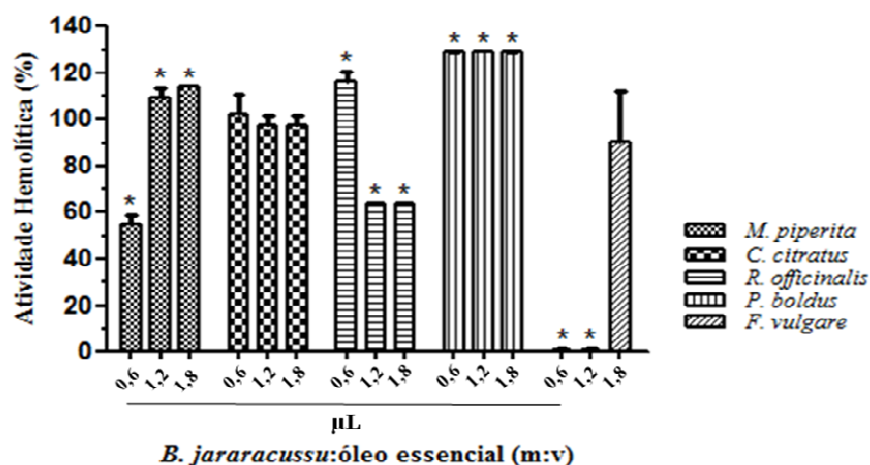


Figura 28 Efeito dos óleos essenciais de *M. piperita*, *C. citratus*, *R. officinalis*, *P. boldus* e *F. vulgare* sobre a atividade hemolítica induzida pela peçonha de *Bothrops jararacussu* (10 µg), após incubação à 37°C por 30 minutos.*Difere do controle positivo pelo teste Skott knott a 95% de significância.

Os constituintes dos óleos essenciais podem interagir com sítios hidrofóbicos presentes em algumas toxinas, assim como a ação inibitória pode também ser resultante de mecanismos antioxidantes, sendo esses mecanismos intimamente relacionados ao número de moléculas (enzimas e compostos ativos vegetais) presentes no ambiente reacional; justificando as

diferentes ações (inibidora, potencializadora ou sem efeito) observadas para os variados volumes de óleo analisados.

As enzimas presentes na composição de peçonha do gênero *Bothrops* podem ter suas atividades inibidas total ou parcialmente ou potencializadas por constituintes dos óleos essenciais. Alguns trabalhos têm descrito a ação de compostos vegetais sobre as diferentes classes de enzimas presentes nas peçonhas ofídicas.

Miranda et al. (2014b), avaliando o óleo essencial de *Hedychium coronarium* em atividades fibrinogénolítica e coagulante induzidas pelas peçonhas de *Bothrops* e *Lachesis*, observaram inibição significativa na coagulação induzida por ambas as peçonhas testadas, sugerindo a possível utilização do mesmo como uma alternativa de complemento à soroterapia, uma vez que os óleos essenciais não requerem formulações específicas e a sua utilização tópica pode ser realizada imediatamente após extração.

Yamaguchi e Veiga-Junior (2013), avaliando a capacidade hemolítica do óleo essencial de *Endlicheria citriodora* (galhos e folhas), não observaram danos à membrana; relatam ainda que tanto o óleo essencial dos galhos quanto o das folhas não apresentaram fenilpropanoides em sua composição; os mesmos são compostos basicamente de 95,15 e 93,75% de geranato de metila (éster monoterpênico) galhos e folhas, respectivamente, sugerindo que os compostos presentes nos óleos não são capazes de causar lise. Dados encontrados neste trabalho corroboram parcialmente com os obtidos pelo autor, pois o óleo essencial de *F. vulgare* (erva doce) não induziu hemólise em nenhum dos volumes testados, mas apresentou em sua composição o metil chavicol (estragol), que é um fenilpropanoide. Isso mostra que a diferença nos níveis de inibição não depende apenas da composição complexa dos óleos essenciais, mas também das estruturas diferenciadas das diversas classes de enzimas presentes nas peçonhas de serpente, pois variam dentro do gênero e em relação a caracteres de idade, sexo, alimentação e ambiente em que a espécie se encontra.

4.6 Atividade fosfolipásica

De acordo com a Figura 29, apenas os óleos essenciais de *M. piperita* e *F. vulgare* no volume 1,8 μL e *C. citratus* no volume de 0,6 μL potencializaram a ação das fosfolipases A_2 se diferenciando do controle contendo apenas peçonha. Já o óleo essencial de *R. officinalis* inibiu essa ação em 10% no menor volume avaliado (0,6 μL), enquanto que o óleo essencial de *P. boldus* não alterou a atividade induzida pela peçonha.

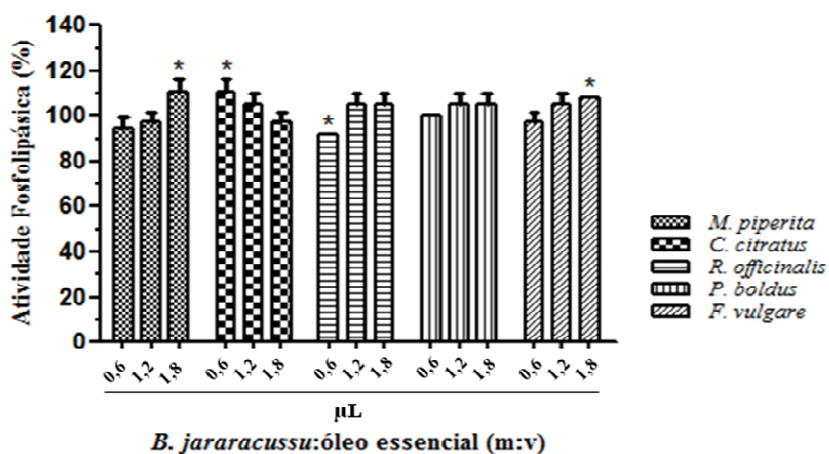


Figura 29 Efeito dos óleos essenciais de *M. piperita*, *C. citratus*, *R. officinalis*, *P. boldus* e *F. vulgare* sobre a atividade fosfolipásica induzida pela peçonha de *Bothrops jararacussu* (10 μg) após incubação à 37°C por 30 minutos.*Difere do controle positivo pelo teste Skott knott a 95% de significância.

As fosfolipases A_2 de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* são importantes em uma série de atividades celulares, uma delas é atuar na hidrólise de fosfolípidios de membrana, essa lise gera o ácido araquidônico que é precursor de prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e outros lípidios bioativos importantes em processos inflamatórios e no controle da homeostasia (CUNHA; MARTINS, 2012).

As diferentes toxinas de peçonhas podem ser inibidas por diversas moléculas, incluindo agentes quelantes, como a heparina, fatores plasmáticos de origem animal e extratos de plantas (TRENTO et al., 2001).

Estudos realizados por Silva, L. (2014) utilizando peçonha de *Bothrops* mostraram que tanto o óleo essencial de *Mentha pulegium* quanto o óleo de *Mentha viridis* apresentaram efeito inibidor sobre fosfolipases A₂ da ordem de 4,1% a partir da concentração de 14,6 µL mL⁻¹.

Segundo relatos de Borges et al. (2000), o extrato aquoso de *Casearia sylvestris* foi capaz de neutralizar a atividade hemorrágica causada pela peçonha de várias serpentes do gênero *Bothrops*.

O extrato aquoso de *Mandevilla velutina* foi um inibidor eficaz de fosfolipases A₂, inibindo também alguns de seus efeitos tóxicos, como a hemorragia (BIONDO et al., 2003).

Carvalho et al. (2013) relataram a impotência de espécies vegetais no tratamento de acidentes ofídicos principalmente em lugares que não se tem acesso ao tratamento soroterápico. As fosfolipases A₂ estando entre os principais constituintes de peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* podem ser inibidas por componentes destes vegetais, como compostos fenólicos, flavonóides, alcalóides, esteróides e terpenóides (mono, di e triterpenos), e polifenóis (taninos vegetais).

No presente trabalho, o óleo essencial que apresentou inibição de fosfolipases foi o óleo de *R. officinalis* (alecrim), com inibição aproximada de 10%, sendo constituído de terpenos, alcoóis e éteres, o que pode justificar essa inibição, corroborando com o trabalho realizado por Mors, Nascimento e Pereira (2000) que aponta vários triterpenos pentacíclicos, como o ácido oleanólico, lupeol, ácido ursólico, taraxerol, taraxasterol, α , β -amirina e friedeline eficazes contra peçonhas de serpentes.

Considerando que a atividade fosfolipásica é exercida apenas por PLA₂s e que a atividade hemolítica é exercida tanto por PLA₂s quanto por proteases, os resultados observados apontam a presença, nos óleos avaliados, de inibidores específicos de proteases, destacados em *M. piperita*, *R.*

officinalis e *F vulgare* cujos os óleos induziram inibições expressivas sobre a atividade hemolítica exercida pela peçonha de *B. jararacussu*.

5. CONCLUSÕES

Os constituintes majoritários presentes no óleo essencial de *Mentha piperita* (hortelã) foram carvona e limoneno. No óleo de *Cymbopogon citratus* (capim-cidreira) foram encontrados o geranial, neral e mirceno. O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* (alecrim) apresentou como componentes majoritários o 1,8-cineol, cânfora e α -pineno. Para o óleo essencial de *Peumus boldus* (boldo), foram encontrados o formato de α -terpinila, *p*-cimeno, 1,8-cineol, ascaridol e terpinen-4-ol e, para o óleo essencial de *Foeniculum vulgare* (erva-doce), o metil chavicol (estragol), limoneno e fenchona foram encontrados como componentes majoritários.

Os óleos essenciais apresentaram baixa ou nenhuma atividade antioxidante frente aos métodos de sequestro de radicais (DPPH e ABTS). Não foram eficazes na proteção do ácido linoleico contra a oxidação. Apresentam eficácia na proteção da desoxirribose, em que o óleo essencial de hortelã apresentou maior atividade antioxidante, observando-se uma maior atividade dos óleos em relação ao padrão utilizado (manitol). No método de redução do molibdênio, os óleos essenciais de *C. citratus* e *P. boldus* mostraram maior eficácia na redução do molibdênio em relação aos demais óleos, e no método do poder redutor, nenhum óleo essencial foi capaz de reduzir o ferro, portanto não apresentaram atividade antioxidante.

Na atividade antibacteriana, *S. aureus* foi mais sensível ao óleo de *P. boldus*. A *Listeria monocytogenes* e a *Salmonella Choleraesuis* apresentaram sensibilidade frente ao óleo essencial de *C. citratus*. *Escherichia coli* mostrou sensibilidade frente aos óleos essenciais de *C. citratus* e *P. boldus*, ao passo que *Pseudomonas aeruginosa* se mostrou resistente a todos os óleos testados.

O óleo essencial de *R. officinalis* foi capaz de inibir quase 40% das proteases e aproximadamente 10% das fosfolipases A₂, seguido dos óleos essenciais de *M. piperita* e *F. vulgare* que foram capazes de inibir a ação das proteases, mas não foram ativos na inibição de fosfolipases A₂. Já o óleo essencial de *C.citratus* foi indutor hemolítico e potencializou a atividade das fosfolipases A₂. O óleo essencial de *P. boldus* foi capaz de induzir hemólise e pontencializar a ação das proteases, mas se mostrou sem efeito sobre a atividade fosfolipásica.

De modo geral, este trabalho contribui para um melhor controle do uso medicinal dessas espécies pela comunidade, uma vez que as plantas produzem substâncias químicas que podem atuar benéficamente ou agirem de forma tóxica sobre outros organismos. Portanto, para que se possa fazer uso de uma espécie vegetal com segurança, é necessário que esta seja estudada sob o ponto de vista químico, farmacológico e toxicológico.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Assim como muitas pessoas, os moradores de Lavras e região utilizam plantas para diversas finalidades. De acordo com informações relatadas por moradores, a hortelã (*Mentha piperita*) é utilizada em problemas digestivos, contra vermes, combate cólicas menstruais e resfriados; o capim-cidreira (*Cymbopogon citratus*), por ser carminativo, é utilizado em casos de depressão, contra dores de cabeça e resfriados; já o alecrim (*Rosmarinus officinalis*) é utilizado apenas como condimento em receitas caseiras; o boldo (*Peumus boldus*) é utilizado contra má digestão e problemas relacionados ao fígado; e a erva-doce (*Foeniculum vulgare*) é usada como carminativo e contra gases. De acordo com informações acerca de fitoterápicos liberados pela ANVISA, o óleo essencial de *Mentha piperita* e o extrato de *Peumus boldus* são permitidos para uso medicinal (Instrução Normativa N°02, de 13 de maio de 2014) e *Foeniculum vulgare* é uma

palanta utilizada apenas como condimento e tempero (Resolução-CNNPA n°12, de 1978).

O uso de medicação natural (droga vegetal) não significa ausência de efeitos colaterais ou tóxicos; portanto, alguns cuidados em relação a sua ingestão devem ser tomados. Resultados obtidos neste trabalho mostram que o óleo essencial de hortelã, capim-cidreira, alecrim, boldo e erva-doce foram indutores de hemólise, ou seja, agem destruindo as hemácias causando a liberação da hemoglobina (*in vitro*). Mas, resultados também mostraram a eficiência dos óleos sobre bactérias patogênicas, e esses dados condizem com informações obtidas através dos questionários aplicados a população de Lavras e região, em que tais plantas são utilizadas no combate a dores de cabeça, enjôos, diarréias, vermes, dentre outros. Contudo os óleos essenciais utilizados neste trabalho podem ser sugeridos como fitoterápicos a serem utilizados em processos de inflamação, uma vez que são capazes de inibir a ação das fosfolipases A₂, sendo estas enzimas participantes da cascata de inflamação.

O próprio conceito de óleos essenciais caracteriza compostos voláteis que podem ser perdidos durante o preparo e antes da ingestão do infuso pela população; logo, o efeito do uso dessas plantas sobre o organismo pode ser justificado pela presença de outros metabólitos diferentes dos óleos essenciais, tais como alcaloides, flavonoides, ácidos fenólicos, taninos, etc.

7. REFERÊNCIAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscop.** 4. ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804 p.

AJZANOVIĆ, V. et al. Vitex agnus-castus l. Essential oil increases human erythrocyte membrane fluidity. **Journal of Medical Biochemistry**, Voždovac, v. 31, n. 3, p. 222-227, July 2012.

ALMASSY JÚNIOR, A. A. et al. **Folhas de chá:** plantas medicinais na terapêutica humana. Viçosa, MG: Editora da Universidade Federal de Viçosa, MG, 2005. 233 p.

ALVARENGA, E. S. et al. Synthesis and evaluation of sesquiterpene lactone inhibitors of phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, Elmsford, v. 57, n. 1, p. 100-108, Jan. 2011.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, out. 2010.

ANDRADE, M. A. et al. Biological activity of the essential oils from *Cinnamodendron dinisii* and *Siparuna guianensis*. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 46, n. 1, p. 189-194, Mar. 2015.

ANDRADE, M. A. et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. **Antioxidants**, Bethesda, v. 2, n. 4, p. 384-397, Nov. 2013.

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, p. 399-408, 2012.

ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, Elmsford, v. 54, n. 7, p. 949-957, Dec. 2008.

AUMEERUDDY-ELALFI, Z.; GURIB-FAKIM, A.; MAHOMOODALLY, M. F. Kinetic studies of tyrosinase inhibitory activity of 19 essential oils extracted from endemic and exotic medicinal plants. **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 103, p. 89-94, Mar. 2016.

- AZEVEDO, C. F. et al. Aspectos anatômicos de plântulas *Foeniculum vulgare* Mill. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, p. 197-204, 2012. (Número Especial).
- BADKE, M. R. et al. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto & Contexto - enfermagem**, Florianópolis, v. 21, n. 2, p. 363-370, abr./jun. 2012.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.
- BALICK, M. J.; COX, P. A. **Plants, people and culture: the science of ethnobotany**. Chicago: Science American Library, 1996. 228 p.
- BETANCUR, J. et al. Insecticidal activity of *Peumus boldus* Molina essential oil against *Sitophilus zeamais* Motschulsky. **Chilean Journal of Agricultural Research**, Santiago de Chile, v. 70, n. 3, p. 399-407, July 2010.
- BIONDO, R. et al. Inhibition of enzymatic and pharmacological activities of some snake venoms and toxins by *Mandevilla velutina* (Apocynaceae) aqueous extract. **Biochimie**, Paris, v. 85, n. 10, p. 1017-1025, Oct. 2003.
- BORGES, M. H. et al. Effects of aqueous extract of *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae) on actions of snake and bee venoms and on activity of phospholipases A2. **Comparative Biochemistry and Physiology B**, Oxford, v. 127, n. 1, p. 21-30, Sept. 2000.
- BOULANOUAR, B. et al. Antioxidant activities of eight algerian plant extracts and two essential oils. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 46, p. 85-96, Apr. 2013.
- BOZIN, B. et al. Antimicrobial and antioxidant properties of rosemary and sage (*Rosmarinus officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 55, n. 19, p. 7879-7885, Sept. 2007.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Farmacopéia brasileira**. 5. ed. Brasília, 2010. p. 198-199.
- BRAUD, S.; BOM, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, Paris, v. 82, n. 9-10, p. 851-859, Sept./Oct. 2000.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.

CANSIAN, R. L. et al. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. *Linaloolifera fujita*). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 30, n. 2, p. 378-384, abr./jun. 2010.

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, June 2002.

CARVALHO, B. M. A. et al. Snake venom PLA₂s inhibitors isolated from brazilian plants: synthetic and natural molecules. **BioMed Research International**, v. 2013, n. 2013, p. 1-8, 2013. (Article ID 153045).

CARVALHO, E. B. et al. Efeito da bomba de infusão de soluções sobre o grau de hemólise em concentrados de hemácias. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, Santos, v. 29, n. 2, p. 149-152, abr./jun. 2007.

CAVALEIRO, C. et al. Antifungal activity of *Juniperus* essential oils against dermatophytes, *Aspergillus* and *Candida* strains. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 100, n. 6, p. 1333-1338, June 2006.

CLEFF, M. B. et al. Perfil de suscetibilidade de leveduras do gênero *Candida* isoladas de animais ao óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 43-49, 2012.

COSTA, V. P.; MAYWORM, M. A. S. Plantas medicinais utilizadas pela comunidade do bairro dos Tenentes – município de Extrema, MG, Brasil. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 3, p. 282-292, 2011.

COSTA, L. C. B. et al. Secagem e fragmentação da matéria seca no rendimento e composição do óleo essencial de capim-limão. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, n. 4, p. 956-95, out./dez. 2005.

CUNHA, A. P.; SILVA, A. P.; ROQUE, O. R. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2012. 731 p.

CUNHA, E. M.; MARTINS, O. A. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *bothrops* e *crotalus* – uma revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência: REEC**, Avaré, v. 2, n. 2, p. 21-26, 2012.

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

DIAO, W. R. et al. Chemical composition, antibacterial activity and mechanism of action of essential oil from seeds of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.). **Food Control**, Guildford, v. 35, p. 109-116, 2014.

DOMINGUES, C. C. et al. Avaliação de detergentes na solubilização de proteínas de membrana eritrocitária humana em eletroforese bidimensional. **Anhanguera**, Santo André, v. 2, n. 2, p. 38-46, 2007.

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

DUNN, M.; WUNDERINK, R. G. Ventilator associated pneumonia caused by *Pseudomonas* infection. **Clinics in Chest Medicine**, Philadelphia, v. 16, n. 1, p. 95-109, Mar. 1995.

EVRENDILEK, G. A. Empirical prediction and validation of antibacterial inhibitory effects of various plant essential oils on common pathogenic bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 202, p. 35-41, June 2015.

FERRARI, G. N. et al. **Alecrim** (*Rosmarinus officinalis* L.). Piracicaba: ESALQ, 2011. 33 p. (Série Produtor Rural, 49).

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

FERREIRA, P. et al. *Mentha piperita* essential oil induces apoptosis in yeast associated with both cytosolic and mitochondrial ROS-mediated damage. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 14, n. 7, p. 1006-1007, Nov. 2014.

FIGUEIREDO, A. C. S. et al. **Histoquímica e citoquímica em plantas: princípios e protocolos**. 1. ed. Lisboa: Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências. Centro de Biotecnologia Vegetal, 2007. 68 p. Disponível em: <<http://cbv.fc.ul.pt/HistoquimicaPP.pdf>>. Acesso em: 10 dez. 2015.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, Elmsford, v. 45, n. 8, p. 969-985, June 2005.

FRANCO, B. D. G. de M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2008. 182 p.

GACHKAR, L. et al. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *Rosmarinus officinalis* essential oils. **Food Chemistry**, London, v. 102, n. 3, p. 898-904, Jan. 2007.

GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2003. 655 p.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOMES, M. S. et al. Use of essential oil of the genus *Citrus* as biological agents. **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 5, p. 299-305, Feb. 2014.

GRIFFIN, S. G. et al. The role of structure and molecular properties of terpenoids in determining their antimicrobial activity. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 14, n. 5, p. 322-332, Sept./Oct. 1999.

GUERREIRO, A. C. et al. The effect of temperature and film covers on the storage ability of *Arbutus unedo* L. fresh fruit. **Scientia Horticulturae**, Amsterdam, v. 159, p. 96-102, July 2013.

GUERRINI, A. et al. Bioactivities of *Piper aduncum* L. and *Piper obliquum* Ruiz & Pavon (Piperaceae) essential oils from Eastern Ecuador. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 27, n. 1, p. 39-48, Jan. 2009.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Antioxidant capacity of essential oils extracted from *Lippia sidoides*, *Ageratum fastigiatum*, *Ocotea odorifera*, *Mikania glauca* and their major components. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 8, n. 16, p. 632-639, Apr. 2014.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Atividades antioxidante e fungitóxica do óleo essencial de capim-limão e do citral. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 42, n. 2, p. 464-472, abr./jun. 2011.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. **Toxicon**, Elmsford, v. 26, n. 4, p. 411-13, 1988.

HABERMANN, E.; HARDT, K. L. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. **Analytical Biochemistry**, v. 50, p. 163-173, 1972.

ISCAN, G. et al. Antimicrobial screening of *Mentha piperita* essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 50, n. 14, p. 3943-3946, July 2002.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 668 p.

JIANG, Y. et al. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of Rosemary. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 63-68, July 2011.

JIANG, X.; XU, J.; YANG, Q. Soluble expression, purification, and characterization of *Gloydius shedaoensis* venom gloshedobin in *Escherichia coli* by using fusion partners. **Applied Microbiology and Biotechnology**, Berlin, v. 85, n. 3, p. 635-642, Jan. 2010.

JORDÁN, M. J. et al. Effect of the phenological stage on the chemical composition, and antimicrobial and antioxidant properties of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil and its polyphenolic extract. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 48, p. 144-152, June 2013.

KANATT, S. R.; CHANDER, R.; SHARMA, A. Antioxidant potential of mint (*Mentha spicata* L.) in radiation-processed lamb meat. **Food Chemistry**, London, v. 100, n. 2, p. 451-458, Dec. 2007.

KARPER, J. B.; NATARRO, J. P.; MOBLEY, H. L. T. Pathogenic *Escherichia coli*. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 2, n. 2, p. 123-140, Feb. 2004.

KINI, R. M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A₂ enzymes. **Toxicon**, Elmsford, v. 42, n. 8, p. 827-840, Dec. 2003.

KULISIC, T. et al. Use of different methods for testing activity of oregano essential oil. **Food Chemistry**, London, v. 85, n. 4, p. 633-640, May 2004.

LEMOS, M. F. et al. Seasonality modifies rosemary's composition and biological activity. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 70, p. 41-47, Feb. 2015.

LEMOS, J. C. et al. Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 50-59, Mar. 2009.

LIMA, R. K. et al. Bactericidal and antioxidant activity of essential oils from *Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla*. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Urbana, v. 89, n. 3, p. 523-528, Mar. 2012.

LIMA, R. A.; MAGALHÃES, S. A.; SANTOS, M. R. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais utilizadas na cidade de Vilhena, Rondônia. **Revista Pesquisa & Criação**, Porto Velho, v. 10, n. 2, p. 165-179, jul./dez. 2011.

LIOLIOS, C. C. et al. Liposomal incorporation of carvacrol and thymol isolated from the essential oil *Origanum dictamnus* L. and *in vitro* antimicrobial activity. **Food Chemistry**, London, v. 112, n. 1, p. 77-83, Jan. 2009.

LOPES-LUTZ, D. et al. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. **Phytochemistry**, London, v. 69, n. 8, p. 1732-1738, May 2008.

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

LÜCKER, J. Metabolic engineering of monoterpene biosynthesis in plants. Wageningen: Proefschrift Wageningen University, 2002. 158 p.

LUIZ-FERREIRA, A. et al. Should *Anacardium humile* St. Hil be used as an antiulcer agent? A scientific approach to the traditional knowledge. **Fitoterapia**: the journal for the study of medicinal plants, Amsterdam, v. 79, n. 3, p. 207-209, Apr. 2008.

MALLET, A. C. T. et al. Quantificação e identificação de *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Aeromonas hydrophila* de águas utilizadas em pequenas propriedades leiteiras. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, Juiz de Fora, v. 62, n. 4, p. 394-400, 2007.

MANTILLA, S. P. S. et al. Importância da *Listeria monocytogenes* em alimentos de origem animal. **Revista da FZVA**, Uruguaiana, v. 14, n. 1, p. 180-192, 2007.

MARTÍNEZ, L. A. et al. Inhibition of nonenzyme lipid peroxidation by benzylisoquinoline alkaloids. **Free Radical Biological Medical**, Amsterdam, v. 12, p. 287-292, 1992.

MARTINS, A. G. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais, alimentares e tóxicas da Ilha do Combu, Município de Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 86, n. 1, p. 21-30, 2005.

MASSAGUER, P. R. **Microbiologia dos processos alimentares**. São Paulo: Varela, 2005. 258 p.

MATSUI, T.; HAMAKO, J. Structure and function of snake venom toxins interacting with human von Willebrand factor. **Toxicon**, Elmsford, v. 45, n. 8, p. 1075-1087, June 2005.

MAZZI, M. V. et al. A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. **Toxicon**, Elmsford, v. 44, n. 2, p. 215-223, Aug. 2004.

MCKAY, D. L; BLUMBERG, J. B. A review of the bioactivity and potential health benefits of peppermint tea (*Mentha piperita* L.). **Phytotherapy Research**, London, v. 20, n. 8, p. 619-633, Aug. 2006.

MENEGOTTO, F. R.; PICOLI, S. U. *Staphylococcus aureus* resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 147-150, 2007.

MILLEZI, A. F. et al. Caracterização e atividade antibacteriana de óleos essenciais de plantas condimentares e medicinais contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 3, p. 373-379, 2013.

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

MIMICA-DUKIĆ, N. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of three *Mentha* species essential oil. **Plant Medica**, Stuttgart, v. 69, n. 5, p. 413-419, May 2003.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Atividade alelopática de óleos essenciais de plantas medicinais na germinação e vigor de aquênios de alface. **Semina: ciências agrárias**, Londrina, v. 36, n. 3, p. 1783-1798, 2015. (Suplemento, 1).

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Correlação entre composição química e eficácia antioxidante de óleos essenciais de plantas condimentares por Análise de Agrupamentos Hierárquicos (HCA). **E-xacta**, Belo Horizonte, v. 7, n. 1, p. 65-74, 2014a.

MIRANDA, C. A. S. F. et al. Preliminary assessment of *Hedychium coronarium* essential oil on fibrinogenolytic and coagulant activity induced by *Bothrops* and *Lachesis* snake venoms. **Journal of Venomous Animals**

and Toxins including Tropical Diseases, Botucatu, v. 20, n. 39, p. 1-8, Sept. 2014b.

MORS, W. B.; NASCIMENTO, M. C.; PEREIRA, N. A. Plant natural products active against snake bite: the molecular approach. **Phytochemistry**, London, v. 55, n. 6, p. 627-642, Nov. 2000.

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).

NORDMANN, P.; NAAS, T.; POIREL, L. Global spread of carbapenemase-producing enterobacteriaceae. **Emerging Infectious Diseases Journal**, Atlanta, v. 17, n. 10, p. 1791-1798, Oct. 2011.

O'BRIEN, P.; CARRASCO-POZO, C.; SPEISKY, H. Boldine and its antioxidant or health-promoting properties. **Chemistry Biology Interactions**, Amsterdam, v. 159, n. 1, p. 1-17, Jan. 2006.

OCHOA, C. et al. Efecto protector de *Peumus Boldus* en ratas con toxicidad hepática inducida por paracetamol. **CIMEL: ciencia e investigación médica estudiantil latino-americana**, Lima, v. 13, n. 1, p. 20-25, 2008.

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, Sept. 2005.

OLIVEIRA, M. M. M. et al. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, Guildford, v. 21, n. 4, p. 549-553, Apr. 2010.

OLMEDO, R. H.; ASENSIO, C. M.; GROSSO, N. R. Thermal stability and antioxidant activity of essential oils from aromatic plants farmed in Argentina. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 69, p. 21-28, Feb. 2015.

OOTANI, M. A. et al. Use of essential oils in agriculture. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, TO, v. 4, n. 2, p. 162-175, 2013.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, Gurupi, TO, v. 3, n. 4, p. 146-152, Nov. 2012.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

PRICE, M. F.; WILKINSON, I. D.; GENTRY, L. D. Plate method for detection the phospholipase activity in *Candida albicans*. **Sabouraudia**, Abingdon, v. 20, n. 1, p. 7-17, Mar. 1982.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E1. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 269, n. 2, p. 337-341, May 1999.

ROBY, M. H. H. et al. Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.). **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 44, p. 437-445, 2013.

ROCHA, C. R. et al. Óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. como sanitizante natural para controle de bactérias sésseis em superfície utilizada para corte de alimentos. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 73, n. 4, p. 338-44, 2014.

ROSA, C.; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciências & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 1, p. 311-318, Jan. 2011.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, London, v. 69, n. 2, 167-174, Apr. 2000.

RUIZ, A. L. T. G. et al. Farmacologia e toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Campinas, v. 18, n. 2, p. 295-300, abr./jun. 2008.

RYSER, E. T.; DONNELLY, C. W. Listeria. In: DOWNES, F. P.; KEITH, I. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. Washington: American Public Health Association, 2001. p. 343-356.

SAGINUR, R.; SUH, K. N. *Staphylococcus aureus* bacteraemia of unknown primary source: where do we stand? **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 32, n. 1, p. 21-25, Nov. 2008. (Suplemento 1:S21).

SANTOS, V. M. C. S. et al. Alternativas de propagação na produção de óleo essencial de *Mentha canadensis* L. no Litoral Norte Catarinense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 14, n. 1, p. 97-102, 2012.

SANTOS, A. L. et al. *Staphylococcus aureus*: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, p. 413-423, dez. 2007.

SARTORATTO, A. et al. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 35, n. 4, p. 273-280, Oct./Dec. 2004.

SCHWANZ, M. et al. Caracterização farmacobotânica de *Peumus boldus* (Monimiaceae) e avaliação de atividades biológicas do alcalóide boldina. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 27, n. 6, p. 871-879, 2008.

SENATORE, F. et al. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of anethole-rich oil from leaves of selected varieties of fennel [*Foeniculum vulgare* Mill. ssp. *vulgare* var. *azoricum* (Mill.) Thell]. **Fitoterapia: the journal for the study of medicinal plants**, Amsterdam, v. 90, p. 214-219, Oct. 2013.

SHINOHARA, N. K. S. et al. Salmonella spp., importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 5, p. 1675-1683, set./out. 2008.

SILVA, F. L. et al. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus*. **Arquivo de Ciências Veterinárias e Zoologia da UNIPAR**, Umuarama, v. 17, n. 3, p. 179-182, 2014.

SILVA, L. F. **Chemical *Mentha viridis* L. and *Mentha pulegium* L.: Caracterização química, atividade antibacteriana, antioxidante, fosfolipásica, hemolítica e genotóxica dos óleos essenciais**. 2014. 100 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

SILVA, L. F. et al. Chemical characterization, antibacterial and antioxidant activities of essential oils of *Mentha viridis* L. and *Mentha pulegium* L. (L). **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 6, p. 666-675, Mar. 2015.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos e água**. 4. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2010. 632 p.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2007. 552 p.

SILVA, R. M.; FARIA, M. T. Caracterização etnobotânica e histoquímica de plantas medicinais utilizadas pelos moradores do bairro Carrilho, Goianésia

(GO). **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, Goiânia, v. 10, n. 19, p. 2807, 2014.

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

SINGH, R.; SHUSHNI, M. A. M.; BELKHEIR, A. Antibacterial and antioxidant activities of *Mentha piperita* L. **Arabian Journal of Chemistry**, Amsterdam, v. 8, n. 3, p. 322-328, May 2015.

SITPRIJA, V. Animal toxins and the kidney. **Nature Clinical Practice Nephrology**, Bangkok, v. 4, n. 11, p. 616-627, Nov. 2008.

SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M.G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, Amsterdam, v. 23, n. 2, p. 136-141, Apr. 2012.

SPEISKY, H.; CASSELS, B. K. Boldo and boldine: an emerging case of natural drug development. **Pharmacological Research**, London, v. 29, n. 1, p. 1-12, Jan./Feb. 1994.

TAEGER, A. J. Listeriosis: recognizing it, treating it, preventing it. **Cleveland Clinic Journal of Medicine**, Cleveland, v. 66, n. 6, p. 375-380, June 1999.

TEIXEIRA, M. L. et al. Essential oils from *Lippia organoides* Kunth. and *Mentha spicata* L.: chemical composition, insecticidal and antioxidant activities. **American Journal of Plant Sciences**, Irvine, v. 5, n. 9, p. 1181-1190, Apr. 2014.

TEIXEIRA, B. et al. Chemical composition and antibacterial and antioxidant properties of commercial essential oils. **Industrial Crops and Products**, Amsterdam, v. 43, n. 1, p. 587-595, May 2013.

TRENTO, E. P. et al. Inhibitory properties of the anti-thrombotic complex from *Didelphis albiventris* serum on toxic and pharmacological actions of metalloproteases and myotoxins from *Bothrops asper* venom. **Biochemical Pharmacology**, v. 62, n. 11, p. 1521-1529, 2001.

UBEDA, A. et al. Iron-reducing and free-radical-scavenging properties of apomorphine and some related benzylisoquinolines. **Free Radical Biological Medical**, Amsterdam, v. 15, n. 2, p. 159-167, Aug. 1993.

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

VILA, R. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Peumus boldus* leaves. **Planta Médica**, Stuttgart, v. 65, n. 2, p. 178-179, Mar. 1999.

VOGEL, H. et al. Studies of genetic variation of essential oil and alkaloid content in Boldo (*Peumus boldus*). **Planta Médica**, Stuttgart, v. 65, n. 1, p. 90-91, Feb. 1999.

VU, B. et al. Bacterial extracellular polysaccharides involved in biofilm formation. **Molecules**, Basel, v. 14, n. 7, p. 2535-2554, July 2009.

WANDERLEY, P. A.; WANDERLEY, M. J. A.; RAMOS, A. G. A cadeia produtiva da erva-doce nas microrregiões de Brejo, Curimataú e Agreste paraibano; Aspectos botânicos, agronômicos e ecológicos da cultura da erva-doce. In: _____. **Otimização da cadeia produtiva da erva-doce (*foeniculum vulgare*) visando a agregação de valor aos produtos da agricultura familiar**. João Pessoa: Sal da Terra, 2008.

YADEGARINIA, D. et al. Biochemical activities of Iranian *Mentha piperita* L. and *Myrtus communis* L. essential oils. **Photochemistry**, London, v. 67, n. 12, p. 1249-1255, June 2006.

YAMAGUCHI, K. K. L.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Atividades biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma lauraceae rica em geranato de metila. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 6, p. 826-830, 2013.

ZANDI-SOHANI, N.; RAMEZANI, L. Evaluation of five essential oils as botanical acaricides against the strawberry spider mite *Tetranychus turkestanii* Ugarov and Nikolskii. **International Biodeterioration & Biodegradation**, Barking, v. 98, p. 101-106, Mar. 2015.

ZOUBIRI, S. et al. Chemical composition and larvicidal activity of Algerian *Foeniculum vulgare* seed essential oil. **Arabian Journal of Chemistry**, Amsterdam, v. 7, n. 4, p. 480-485, Sept. 2014.

8. ANEXOS

<p style="text-align: center;">Formulário</p> <p style="text-align: center;">Uso de plantas medicinais</p> <p style="text-align: center;">População</p> <p>Identificação da entrevista</p> <p>Codificação do informante: _____</p> <p>Zona urbana ou rural: _____</p> <p>Cidade: _____</p> <p>Data: _____</p> <p>Entrevistador: _____</p> <p>Variáveis socialógicas</p> <p>Nome: _____</p> <p>Naturalidade: _____</p> <p>Sexo: F____ M____</p> <p>Idade: _____</p> <p>Escolaridade: _____</p> <p>Percurso de vida:</p> <ul style="list-style-type: none">• Sempre viveu no local <input type="checkbox"/>• Vive há cinco anos ou menos <input type="checkbox"/>• Vive há 10 anos ou menos <input type="checkbox"/>• Vive há mais de 10 anos <input type="checkbox"/>• Viveu e trabalhou na cidade <input type="checkbox"/> <p>Profissão: _____</p>

Ficha das plantas

- 1- Cite 5 nomes de plantas mais utilizadas por você para fins medicinais.
- 2- Há outros nomes utilizados na identificação das plantas anteriormente citadas?
- 3- Reconhece a planta facilmente? Identifica por quais características?
- 4- Para preencher a tabela a seguir, siga as instruções descritas abaixo.

Plantas	Uso principal	Parte usada	Preparação
1.			
2.			
3.			
4.			
5.			

Instruções:

Indicações terapêuticas e usos medicinais:

Aparelho digestivo- DIG

Aparelho reprodutor- REP

Aparelho respiratório- RES

Aparelho urinário- URI

Circulação- CIR

Colesterol- COL

Dermatologia- DER

Diabetes- DIA

Diurético- DIU
Febre- FEB
Propriedade antioxidante- ANT
Propriedade antibacteriana- BAC
Reumatismo e artrite- REU
Sistema nervoso- NER
Hipertensão- HIP

Observação: Especificar também os usos, exemplos: bronquite, diarreia, menopausa, tosse, entre outros.

Parte usada:

Raiz, caule, gomos, folhas, flores inflorescência, frutos, sementes, casca do tronco, órgãos subterrâneos de reserva (bulbos, tubérculos, rizomas), outros.

Preparação: Consumo verde ou seco. Técnicas de secagem e/ou conservação.
Processamento: Infusão, decocção ou cozimento, aplicação direta ou tópica, maceração, emplastro, fricção, outra. Manuseio das plantas para os diferentes tipos de aplicação, tempo, modo e aditivos (mel, azeite, sebo, álcool, outro). Administração e dosagem.

5 - Recolhe no campo estas plantas? Sim ____ Não ____

6 - Se respondeu Sim passar para as questões 7,8 e 9. Se respondeu Não, passar a 10.

7 - Onde as recolhe?

No campo ____ Em qualquer lugar ____ Em locais específicos ____

8 - Quando as recolhe?

Em qualquer época do ano Mais na primavera

Mais no verão Mais no outono

De madrugada De manhã

Depois do almoço À tardinha

9 - Além de recolher no campo também as compra? Sim ____ Não ____

Por que? _____

10 - Com quem adquiriu conhecimentos sobre as plantas que mencionou?

- Com os antepassados
- Recentemente com a família
- Com vizinhos e amigos
- Através de livros
- Através de jornais, revistas, folhetos de divulgação
- Através da televisão
- Outro _____

11 - Com que frequência consome/usa preparados à base destas plantas medicinais?

- Uma vez por dia
- Mais do que uma vez por dia
- Semanalmente
- Quinzenalmente
- Mensalmente
- Poucas vezes
- Raras vezes
- Quando precisa, sem se preocupar com frequência

12 - Acha importante que sejam recolhidas informações sobre o uso das plantas e que essa informação seja transmitida para outras pessoas?

_____ Sim _____ Não

Por que?