



JULIANA MARIA VALÉRIO RESENDE

ÓLEO ESSENCIAL DE *Lychnophora pinaster*

**Mart.: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA,
ATIVIDADE ANTIBACTERIANA, ANTIFÚNGICA,
ANTIOCRATOXIGÊNICA E HEMOLÍTICA**

**LAVRAS – MG
2013**

JULIANA MARIA VALÉRIO RESENDE

ÓLEO ESSENCIAL DE *Lychnophora pinaster* Mart.:
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA,
ANTIFÚNGICA, ANTIOCRATOXIGÊNICA E HEMOLÍTICA

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

Orientadora
Dra. Maria das Graças Cardoso

Coorientador
Dr. Luís Roberto Batista

LAVRAS – MG
2013

**Ficha Catalográfica Elaborada pela Coordenadoria de Produtos e Serviços
da Biblioteca Universitária da UFLA**

Resende, Juliana Maria Valério.

Óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart. : caracterização química, atividade antibacteriana, antifúngica, antiocratogênica e hemolítica / Juliana Maria Valério Resende. – Lavras : UFLA, 2013.
116 p. : il.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.
Orientador: Maria das Graças Cardoso.
Bibliografia.

1. Produtos naturais. 2. Bactérias. 3. Fungos. 4. Ocratoxina A. 5. Hemólise I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 547.71

JULIANA MARIA VALÉRIO RESENDE

ÓLEO ESSENCIAL DE *Lychnophora pinaster* Mart.:
CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA,
ANTIFÚNGICA, ANTIOCRATOXIGÊNICA E HEMOLÍTICA

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

APROVADA em 12 de julho de 2013.

Dra. Márcia Ortiz Mayo Marques UNESP

Dr. Paulo Sérgio Castilho Preté UFLA

Orientadora
Dra. Maria das Graças Cardoso

Coorientador
Dr. Luís Roberto Batista

LAVRAS – MG
2013

DEDICO E OFEREÇO

Àqueles que considero pedaços de mim...

Meus pais, Severo e Maria do Rosário, e meus irmãos, Tião, Max e Fred, pelo exemplo de determinação, pelo carinho, preocupação e apoio incondicional. Às minhas cunhadas e sobrinhos, pela amizade e alegria que me proporcionam todos os dias.

Ao meu marido, Luis Gustavo, pelo incentivo, cumplicidade, companheirismo e amor.

Sem vocês, o sol não seria tão irradiante, o dia não teria tantas cores, o mundo não teria graça e a vida não seria tão feliz!

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora Aparecida, por guiarem meus passos, protegendo-me e amparando-me em todos os momentos.

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

Às minhas cunhadas e sobrinhos, pela amizade e carinho, por alegrarem meus dias.

Ao meu marido, Luis Gustavo, pelo amor, carinho, paciência, companheirismo, sempre me apoiando e me ajudando nos momentos em que mais precisei.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso, pela confiança, ao permitir a mim fazer parte de seu grupo. Pelo convívio durante esses dois anos, foram dias de constante aprendizado! Meus mais sinceros agradecimentos pelos ensinamentos, dedicação e apoio nos momentos mais difíceis. A você, externo minha admiração!

Ao Professor Dr. Luís Roberto Batista, pela orientação, disposição e prontidão em atender-me, mesmo estando tão distante e ocupado, pela confiança, permitindo-me realizar as atividades em seu laboratório, mesmo na sua ausência. Sua colaboração foi essencial para a realização deste trabalho!

À professora Dra. Ana Cristina da Silva Figueiredo, pela colaboração.

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

Ao pessoal do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Estrutural Ultraestrutural.

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

Aos amigos do Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais e de Análise de Qualidade de Aguardente, Cleusa, Maria Luisa, Cíntia, Lucilene, Felipe, João, Christiane, Rafaela de Paula, Karen, Danúbia, Alex e Bruno, pela amizade e pelo prazer da convivência diária. Em especial, agradeço à Milene, Leonardo, Marcos, Rafaela Brandão, Juliana Andrade e Wilder, pelo companheirismo, amizade, dedicação e auxílio na condução do experimento.

Às colegas do Laboratório de Micologia e Micotoxinas do DCA, Fabi Passamani, Noelly, Nathacha, Dani, Abiah, Michelle, Priscila, Gislaíne, Thaiana, Fabiana Couto, Vanessa, Luísa, Thamara e Camila.

Aos amigos que caminharam comigo e de forma decisiva contribuíram para que este sonho se tornasse real, Édson Pablo, Brígida, Raimundo, Ana Paula e Ivone. A vocês, minha eterna gratidão!

Aos professores, funcionários e alunos da Escola Estadual Dom Delfim, pela parceria, carinho e apoio.

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

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

Aos professores do programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, pelos ensinamentos.

Aos professores e funcionários dos Departamentos de Ciência dos Alimentos e Química, por toda a atenção e auxílio prestados.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Ciência dos Alimentos (DCA), pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

E a todos que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste trabalho.

A capacidade de sonhar sempre foi o grande segredo daqueles que mudaram o mundo. Os sonhos alimentam a alma e dão asas à inteligência. É no solo fértil da memória onde semeamos os sonhos que farão grande diferença em nossa existência. Os sonhadores mudaram a história da humanidade. Eles fizeram da derrota o pódio para a vitória; das críticas, o palco, de onde receberam os aplausos. “Sonhos perseguidos com perseverança sempre acabam em realidade”.

(Augusto Cury)

RESUMO GERAL

Atualmente, as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais têm sido consideradas uma ferramenta de várias aplicações, incluindo preservação de alimentos e produção de fármacos alternativos. A busca por produtos naturais com propriedades antimicrobianas tem se tornado crescente, em decorrência de os antimicrobianos sintéticos apresentarem toxicidade ao consumidor. Neste estudo, objetivou-se caracterizar quimicamente e avaliar as atividades antibacteriana, antifúngica, antiocratóxicas e hemolítica do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart. A extração do óleo essencial foi realizada pelo método de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger modificado com duração de 2 horas, sendo, posteriormente, caracterizado quimicamente por CG-DIC e CG/EM. A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pela técnica de difusão em cavidade em ágar, utilizando os micro-organismos *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Cholerasuis*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. A avaliação do efeito inibitório do óleo essencial em fungos filamentosos foi testada sobre as espécies *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus carbonarius*. A atividade antiocratóxica do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart. foi avaliada por meio da inibição da produção de OTA pelo fungo *Aspergillus carbonarius* em meio de cultura adicionado de diferentes concentrações do óleo essencial. A avaliação da atividade hemolítica (hematócrito 0,20%) foi determinada medindo-se a concentração de hemoglobina presente no sangue submetido a diferentes concentrações do óleo essencial. Adicionalmente ao teste hemolítico, foram realizadas varreduras nos comprimentos de onda de 500 a 700 nm, para avaliar se houve oxidação da hemoglobina. Os compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *L. pinaster* Mart. foram o *trans*-cinamato de metila (62,1%), *trans*-cariofileno (21,1%) e α -humuleno (6,2%). A atividade antibacteriana do óleo essencial foi observada apenas para a bactéria *Salmonella Cholerasuis*. A atividade antifúngica do óleo essencial foi observada para todos os fungos testados. A atividade antiocratóxica do óleo essencial sobre a espécie *A. carbonarius* foi evidenciada, visto que o óleo essencial ocasionou a diminuição da produção de OTA em todas as concentrações testadas. O óleo essencial de *L. pinaster* Mart. não apresentou efeito hemolítico sobre os eritrócitos em baixas concentrações (até 20 $\mu\text{L mL}^{-1}$). O efeito hemolítico elevou-se nas concentrações acima de 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Os óleos essenciais não apresentaram efeito oxidante em hemoglobina isolada em nenhuma das concentrações utilizadas.

Palavras-chave: Óleo essencial. Arnica. Atividades microbiológicas. Atividade antiocratóxica.

ABSTRACT

Currently, the antimicrobial properties of essential oils have been considered a tool for various applications including food preservation and production of alternative drugs. The search for natural products with antimicrobial properties has become increasing as a result of synthetic antimicrobials present toxicity to the consumer. The objectives of this study were chemically characterize and evaluate the antibacterial, antifungal, hemolytic and antiocratoxigênica essential oil *Lychnophora pinaster* Mart. The essential oil extraction was performed by hydrodistillation using Clevenger apparatus modified duration of 2 hours, and subsequently chemically characterized by GC-FID and GC / MS. Evaluation of antibacterial activity was carried out using the technique cavity agar diffusion, using micro-organisms *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella Cholerasuis*, *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. The evaluation of inhibitory effect of essential oil was tested in filamentous fungi of the species *Aspergillus niger*, *Aspergillus carbonarius* and *Aspergillus flavus*. The activity of the essential oil antiocratoxigênica *Lychnophora pinaster* Mart. was evaluated by inhibition of the fungus *Aspergillus carbonarius* OTA in culture medium supplemented with different concentrations of the essential oil. The evaluation of the hemolytic activity (2,0% hematocrit) was determined by measuring the hemoglobin concentration in the blood subjected to different concentrations of the essential oil. In addition to the hemolytic test scans were performed at a wavelength of 500 to 700 nm to assess whether there was hemoglobin oxidation. The major compounds found in the essential oil of *L. pinaster* Mart. were *trans*-methyl cinnamate (62.1%), *trans*-caryophyllene (21.1%) and α -humulene (6.2%). The antibacterial activity of the essential oil was observed only for the bacterium *Salmonella Cholerasuis*. The antifungal activity of the essential oil was observed for all fungi tested. Antiocratoxigênica activity of the essential oil on the species *A. carbonarius* was evident, given that the essential oil led to decreased production of OTA at all concentrations tested. The essential oil of *L. pinaster* Mart. had no effect on the hemolytic heritrócitos in low concentrations (up to 20 $\mu\text{L mL}^{-1}$). The hemolytic effect increased concentrations above 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$. The essential oils showed no oxidative effect in isolated hemoglobin in any of the concentrations used.

Keywords: Essential oil. Arnica. Microbiological activities. Activity antiocratoxigênica.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	22
Figura 2	Mecanismo de formação das unidades isoprênica ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) pela via do mevalonato.....	23
Figura 3	Mecanismo de formação das unidades isoprênica ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) pela via da 1-deoxi-D-xilulose -5- P mevalonato.....	25
Figura 4	Esquema das vias de biossíntese responsáveis pela produção de isoprenoides em plantas.....	27
Figura 5	Mecanismo de formação da estrutura básica dos fenilpropanoides a partir do ácido chiquímico.....	29
Figura 6	Agentes etiológicos identificados por surtos no Brasil entre os anos de 2000 e 2011.....	35
Figura 7	Estrutura química da ocratoxina A.....	46
Figura 8	Aspecto geral da espécie <i>Lychnophora pinaster</i> Mart.....	49
Figura 9	Exsicata da planta coletada – <i>Lychnophora pinaster</i> Mart.....	52
Figura 10	Processo de extração do óleo essencial (hidrodestilação).....	53
Figura 11	Sistema para determinação da umidade.....	54
Figura 12	Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de <i>L. pinaster</i> Mart.; (a) <i>trans</i> -cinamato de metila, (b) <i>trans</i> -cariofileno, (c) α -humuleno, (d) óxido de cariofileno, (e) α -pineno e (f) β -pineno.....	69
Figura 13	Mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana.....	75
Figura 14	Estrutura química do ergosterol.....	79
Figura 15	Efeito das concentrações do óleo essencial de <i>Lychnophora</i>	

	<i>pinaster</i> Mart. sobre a produção de OTA pelo fungo <i>A. carbonarius</i>	80
Figura 16	Cromatograma do padrão da OTA.....	81
Figura 17	Equações de regressão para porcentagem de hemólise promovida por diferentes concentrações do óleo essencial de <i>L. pinaster</i> Mart. sobre eritrócitos íntegros (Ht 2,0%), incubados em solução isotônica (PBS, pH 7,4) a 37 °C	84
Figura 18	Espectros de absorção (500-700 nm) de hemoglobina purificada (20 µM) ante as diferentes concentrações do óleo essencial de <i>L. pinaster</i> Mart. em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 a 37°C.....	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição química do óleo essencial <i>L. pinaster</i> Mart.....	68
Tabela 2	Concentração mínima inibitória do óleo essencial de <i>Lychnophora pinaster</i> Mart. encontrada para os micro-organismos <i>Escherichia coli</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> e <i>Salmonella Choleraesuis</i>	73
Tabela 3	Concentração mínima inibitória do óleo essencial de <i>Lychnophora pinaster</i> Mart. ante os micro-organismos <i>Aspergillus niger</i> , <i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus carbonarius</i>	77

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

BHI	Caldo-infusão de cérebro e coração
BLU	Base livre de umidade
CGL	Cromatografia Gás-Líquido
CGL/EM	Cromatografia Gás-Líquido/Espectrometria de Massas
CL	Cloranfenicol
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CMI	Concentração inibitória mínima
DMAPP	Pirofosfato de dimetilalila ou dimetilalildifosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
DTA	Doenças Transmitidas por Alimentos
DXPS	1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato
FPP	Farnesil difosfato
GAP	D-gliceraldeído-3-fosfato
GP	Galato de propila
GPP	<i>trans</i> -geranilpirofosfato
GGPP	Geranilgeranil difosfato
HMG-CoA	Hidroximetilglutaril-CoA
IP	Índice de preferência
IPP	Pirofosfato de isopentila
IR	Índice de retenção
ISSO	International Organization for Standardization
LPP	Linalil pirofosfato
MEP	2C-metil-D-eritritol 4-fosfato
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MVA	Mevalonato
NPK	Nitrogênio-fósforo-potássio
NPP	Neril pirofosfato
OE	Óleo essencial
OMS	Organização Mundial de Saúde
OTA	Ocratoxina A
PAL	Fenilalanina amonialiase
pH	Potencial hidrogeniônico
TBARS	Espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico
TBHQ	tert-butilhidroxiquinona
TSA	Triptona Soja Ágar
TSB	Caldo de soja triptica
UFC	Unidades formadoras de colônias
a_w	Atividade de água
Cm	Centímetro

G	Gramma
Kg	Quilograma
°C	Graus Celsius
Há	Hectare
L	Litros
M	Metros
µL	Microlitro
µg	Micrograma
mL	Mililitro
Nm	Nanômetro
µm	Micrômetro
R	Rendimento

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	17
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	19
2.1	Óleos essenciais.....	19
2.1.1	Origem metabólica dos óleos essenciais.....	21
2.1.1.1	Biossíntese dos terpenos.....	23
2.1.1.2	Biossíntese dos fenilpropanoides.....	28
2.1.2	Propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais.....	29
2.1.3	Toxicidade dos óleos essenciais.....	32
2.2	Contaminação de alimentos.....	33
2.3	Principais patógenos de origem alimentar.....	35
2.3.1	<i>Salmonella ssp.</i>	36
2.3.2	<i>Staphylococcus aureus</i>	36
2.3.3	<i>Escherichia coli</i>	37
2.3.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	38
2.3.5	<i>Listeria monocytogenes</i>	39
2.4	Contaminação de alimentos por fungos filamentosos.....	40
2.4.1	O gênero <i>Aspergillus</i>	41
2.4.1.1	<i>Aspergillus niger</i>	42
2.4.1.2	<i>Aspergillus flavus</i>	42
2.4.1.3	<i>Aspergillus carbonarius</i>	43
2.4.2	Micotoxinas	43
2.4.2.1	Ocratoxina A (OTA).....	45
2.5	<i>Lychnophora pinaster</i> Mart.	48
3	MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.1	Obtenção do material vegetal.....	52
3.2	Extração do óleo essencial.....	53
3.3	Determinação da umidade e do rendimento do óleo essencial.....	54
3.4	Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais.....	55
3.4.1	Identificação dos constituintes dos óleos essenciais.....	55
3.4.2	Quantificação dos constituintes dos óleos essenciais.....	56
3.5	Atividades microbiológicas do óleo essencial.....	57
3.5.1	Manutenção e ativação das culturas bacterianas.....	57
3.5.1.1	Teste de Difusão Cavidade em Ágar.....	58
3.5.2	Avaliação do efeito inibitório do óleo essencial de <i>Lychnophora pinaster</i> Mart. sobre fungos filamentosos.....	59
3.5.3	Avaliação dos dados e análise estatística.....	60
3.5.4	Atividade antiocrotogênica.....	60

3.5.4.1	Extração da OTA das amostras.....	61
3.5.4.2	Condições cromatográficas utilizadas na quantificação da OTA por HPLC.....	61
3.5.4.3	Determinação da concentração da solução estoque e preparo da curva padrão para a OTA.....	62
3.5.4.4	Quantificação da OTA por HPLC.....	62
3.5.4.5	Avaliação dos dados e análise estatística.....	63
3.6	Atividade hemolítica.....	63
3.6.1	Teste hemolítico em meio isotônico.....	64
3.6.1.1	Avaliação dos dados e análise estatística.....	65
3.6.2	Avaliação da oxidação da hemoglobina.....	65
3.6.2.1	Avaliação dos dados e análise estatística.....	65
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4.1	Rendimento e caracterização química do óleo essencial.....	66
4.2	Atividades microbiológicas do óleo essencial.....	72
4.2.1	Atividade antibacteriana.....	72
4.2.2	Efeito inibitório do óleo essencial sobre fungos filamentosos	77
4.3	Atividade antiocrotogênica.....	80
4.4	Atividade hemolítica e avaliação da oxidação da hemoglobina.....	83
5	CONCLUSÕES.....	88
	REFERÊNCIAS	89
	APÊNDICES.....	101

1 INTRODUÇÃO

Atualmente a preocupação com a qualidade dos alimentos não está mais voltada apenas ao valor nutricional e às características sensoriais, mas principalmente a possíveis contaminações microbiológicas. A contaminação microbiológica, ocasionada por bactérias patogênicas, parasitas, vírus e fungos toxigênicos, é classificada como o principal problema para a saúde pública. (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A contaminação microbiológica dos alimentos pode promover alterações nos produtos, acarretando características sensoriais inadequadas, tais como odores desagradáveis e alterações na cor e textura. Entre os vários problemas ocasionados pela contaminação microbiológica dos alimentos, destaca-se a contaminação por micro-organismos toxigênicos, tendo em vista que a exposição humana a micotoxinas pelo consumo de alimento contaminado pode levar a diversas patologias e, em casos mais graves, até à morte.

Vários são os meios de combate aos agentes microbianos, destacando-se a eficiente ação de aditivos químicos; porém, sabe-se que o uso constante desses produtos podem proporcionar uma resistência ao micro-organismo, tornando mais difícil sua eliminação, além de apresentarem-se, na maioria das vezes, como agentes tóxicos, tendo seu uso restringido pela própria legislação. Por essa razão, tem se tornado cada vez maior o interesse por novos produtos que possuam propriedades antimicrobianas.

Os óleos essenciais, misturas complexas de metabólitos secundários de origem química diversa, têm despertado o interesse nas indústrias alimentícias, por apresentarem importantes atividades biológicas, tornando o estudo do efeito inibitório desses óleos em micro-organismos uma alternativa para a redução do uso de aditivos químicos em alimentos. Vários estudos demonstram o potencial efeito de óleos essenciais como agentes antimicrobianos.

Há uma diversidade de plantas utilizadas na medicina popular, produtoras de óleos essenciais, porém, muitas dessas espécies são pouco estudadas, sendo necessárias pesquisas que viabilizem o uso dessas plantas, e que nos assegure quanto à sua toxicidade. A espécie *Lychnophora pinaster* Mart., destaca-se pelas suas propriedades antiinflamatória, anestésica e cicatrizante, apresentando um potencial uso farmacológico.

Diante do exposto, objetivou-se neste trabalho caracterizar os constituintes químicos do óleo essencial da espécie *Lychnophora pinaster* Mart., avaliar as potencialidades biológicas como, bactericida, fungicida e ocratoxigênica, e avaliar a atividade hemolítica e o perfil de oxidação da hemoglobina.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Óleos essenciais

Conforme a International Standard Organization (ISO), descrito por SIMÕES et al. (2007), os óleos essenciais são produtos dos metabolismos secundários das plantas definidos como misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. São definidos como “um produto obtido por destilação em água ou vapor ou por expressão de pericarpos de frutos cítricos (Rutaceae)”.

Apresentam como características volatilidade, instabilidade na presença de luz, oxigênio, substâncias oxidantes, redutoras, meios com pH extremos, ou meios com traços de metais que podem catalisar reações de decomposição e transformação, uma vez que dada a sua complexa composição, apresentam alta probabilidade de sofrer modificações físico-químicas devido às reações entre seus próprios constituintes ou entre eles e o meio (BANDONI; CZEPAK, 2008).

Os óleos essenciais são produzidos e armazenados pelas plantas em estruturas especializadas, como idioblastos, cavidades, canais e tricomas glandulares. As plantas podem produzir óleos essenciais em várias regiões em quantidades e composições diferentes. Entre as partes das plantas nas quais se podem encontrar óleos essenciais, citam-se as pétalas, cascas, rizomas, raízes, folhas, galhos, pequenos frutos, cascas e lenho (SIMÕES, 2007).

Em processos de extração do óleo essencial de plantas frescas ou secas, o material vegetal é contactado com vapor (destilação a vapor) ou água em ebulição (hidrodestilação), resultando na ruptura dos tricomas glandulares e, conseqüentemente, na liberação das substâncias voláteis nele contidas, ou ainda, terminada a fase de secreção, as células glandulares sofrem, de um modo geral,

degenerescência celular, o que leva ao colapso da cabeça glandular do tricoma e à perda de sua funcionalidade (ASCENSÃO, 2007).

A ocorrência de óleos essenciais em angiospermas monocotiledôneas e gimnospermas é relativamente rara, ao passo que plantas ricas em óleos essenciais são abundantes em angiospermas dicotiledôneas, tais como nas famílias Asteraceae, Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Myristicaceae, Piperaceae e Rutaceae, entre outras (SIMÕES et al., 2007).

De acordo com Simões et al. (2007), diversas funções biológicas da planta são atribuídas aos óleos voláteis, como a atração de polinizadores, defesa contra o ataque de predadores, proteção contra perda de água e aumento de temperatura e a inibição de germinação.

A constituição dos óleos essenciais varia desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e compostos com enxofre. Na mistura, tais compostos estão presentes em diferentes concentrações, normalmente variando de acordo com as características de cada planta (SIMÕES et al., 2007).

A composição dos óleos essenciais se transforma constantemente, mudando as proporções de seus constituintes ou transformando-se uns constituintes em outros, segundo a parte da planta, o momento do seu desenvolvimento ou o momento do dia, podendo também ser determinada geneticamente, variando de acordo com a origem botânica, o quimiotipo, fatores da natureza e o procedimento de cultivo das plantas e de obtenção. Ela varia conforme a origem geográfica, secagem, época de colheita, tipo de adubação, mas os principais constituintes responsáveis pelo aroma parecem permanecer constantes (GOBBO-NETO; LOPES; PEPORINE, 2007).

2.1.1 Origem metabólica dos óleos essenciais

A fotossíntese realizada pelos vegetais é responsável pela manutenção de quase toda a vida existente no planeta. As substâncias produzidas neste processo são as precursoras primárias para todos os blocos constituintes do corpo da planta e todos os organismos heterotróficos. Esses blocos estruturais são representados por quatro grupos de macromoléculas essenciais e presentes em todos os seres vivos, as proteínas, lipídeos, ácidos nucleicos e carboidratos. O conjunto de processos bioquímicos que produzem e degradam essas macromoléculas é conhecido como metabolismo primário e essas substâncias, denominadas metabólitos primários (SIMÕES, 2007).

Os metabólitos secundários, originados do metabolismo secundário, são substâncias de baixo peso molecular, geralmente produzidas em pequenas quantidades, que possuem características químicas muito variadas e, às vezes, bem complexas, sendo responsáveis por funções nem sempre bem definidas, mas nem por isso menos importante (DEWICK, 2009).

Por não ser necessário para todas as plantas, o metabolismo secundário origina compostos que não possuem uma distribuição universal; por isso, esses compostos podem ser utilizados em estudos taxonômicos. Apesar de nem sempre ser necessário para que uma planta complete seu ciclo de vida, o metabolismo secundário desempenha um papel importante na interação das plantas com o meio ambiente. Uma das principais funções dos compostos gerados são os mecanismos de defesa das plantas. Assim, produtos secundários agem como defesa contra herbívoros, ataque de patógenos, competição entre plantas e atração de organismos benéficos, como polinizadores, dispersores de semente e micro-organismos simbiotes. Possuem também ação protetora em relação a mudanças de temperatura, conteúdo de água, níveis de luz, exposição

aos raios ultravioleta (UV) e deficiência de nutrientes minerais (SIMÕES et al., 2007).

Os metabólitos secundários dividem-se em três grandes grupos, os terpenos, os compostos fenólicos e os compostos nitrogenados; porém, todos eles originam-se do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o chiquimato e o acetato, conforme demonstrado na Figura 1.

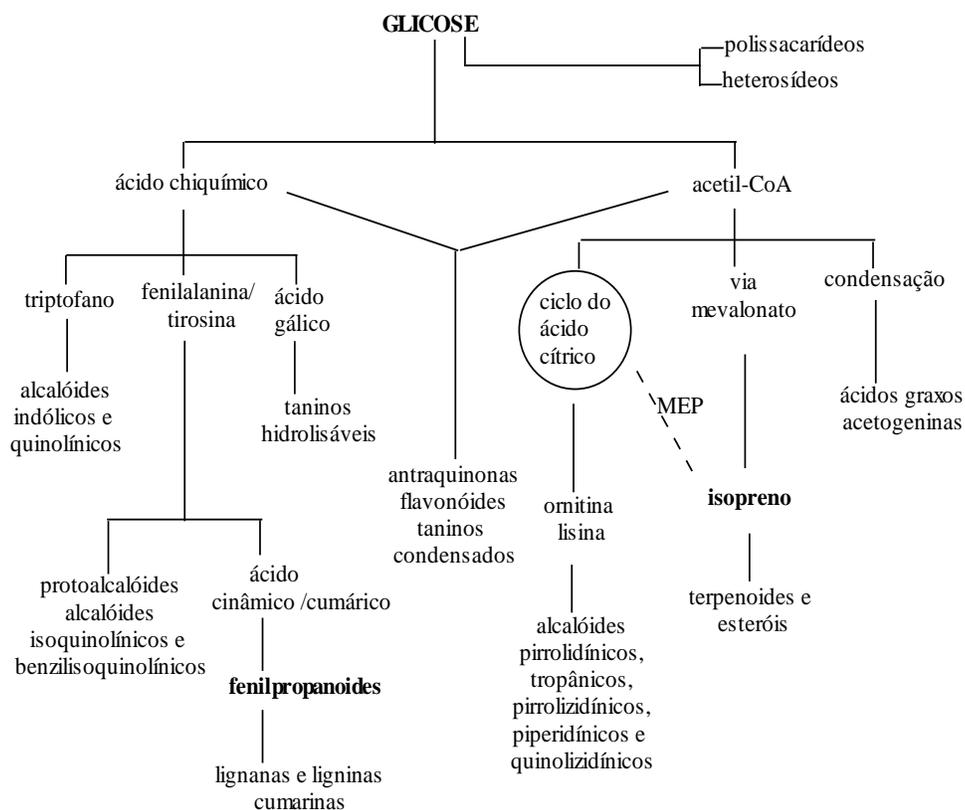


Figura 1 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários
Fonte: Adaptado de Simões et al. (2007)

2.1.1.1 Biossíntese dos terpenos

Os constituintes dos óleos essenciais, compostos terpenoides ou fenilpropanoides, são formados pela via do acetato ou pela via do chiquimato. Partindo-se do acetato, pode-se observar duas rotas metabólicas, a do mevalonato e a do 1-desoxi-D-Xilulose-5-fosfato (Figura 2).

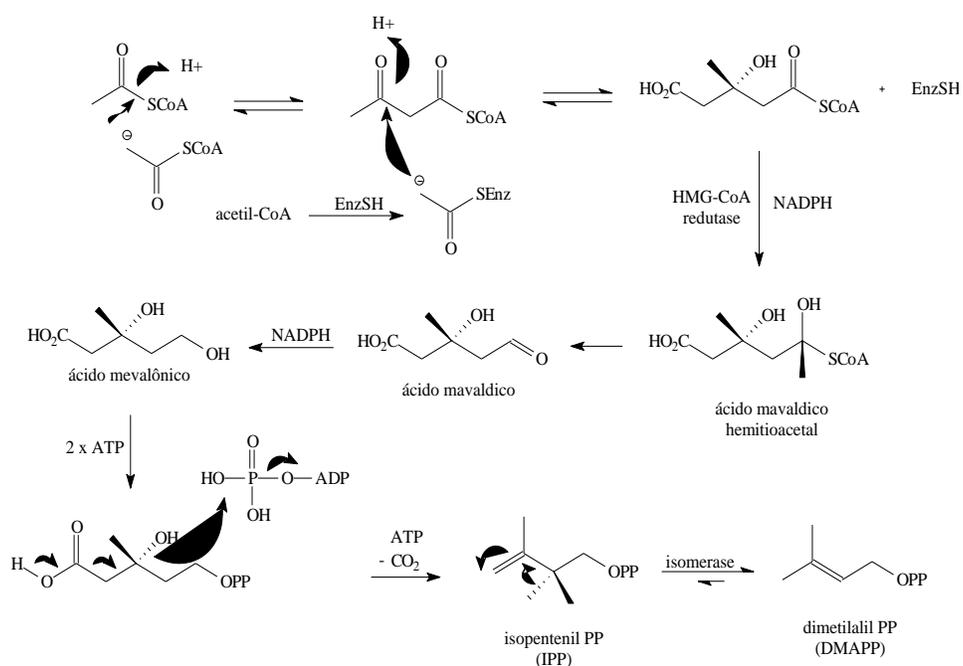


Figura 2 Mecanismo de formação das unidades isoprênica ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) pela via do mevalonato

Fonte: Adaptada de Dewick (2009)

Pela primeira rota, três moléculas de acetil CoA são ligadas, a partir de uma série de etapas, para formar o ácido mevalônico. Esse importante intermediário de seis carbonos é, então, pirofosforilado, descarboxilado e desidratado para produzir o isopentenil difosfato (IPP), que é a unidade básica na formação dos terpenos (SIMÕES et al., 2007).

O IPP também pode ser formado a partir de intermediário da glicose ou do ciclo de redução fotossintética do carbono (Ciclo de Krebs), por meio de um conjunto de reações denominado de rota do metileritritol fosfato (MEP), que ocorre nos cloroplastos e outros plastídeos. O gliceraldeído-3-fosfato e dois átomos de carbono derivados do piruvato se combinam para formar um intermediário, que é convertido em IPP (SIMÕES et al., 2007) (Figura 3).

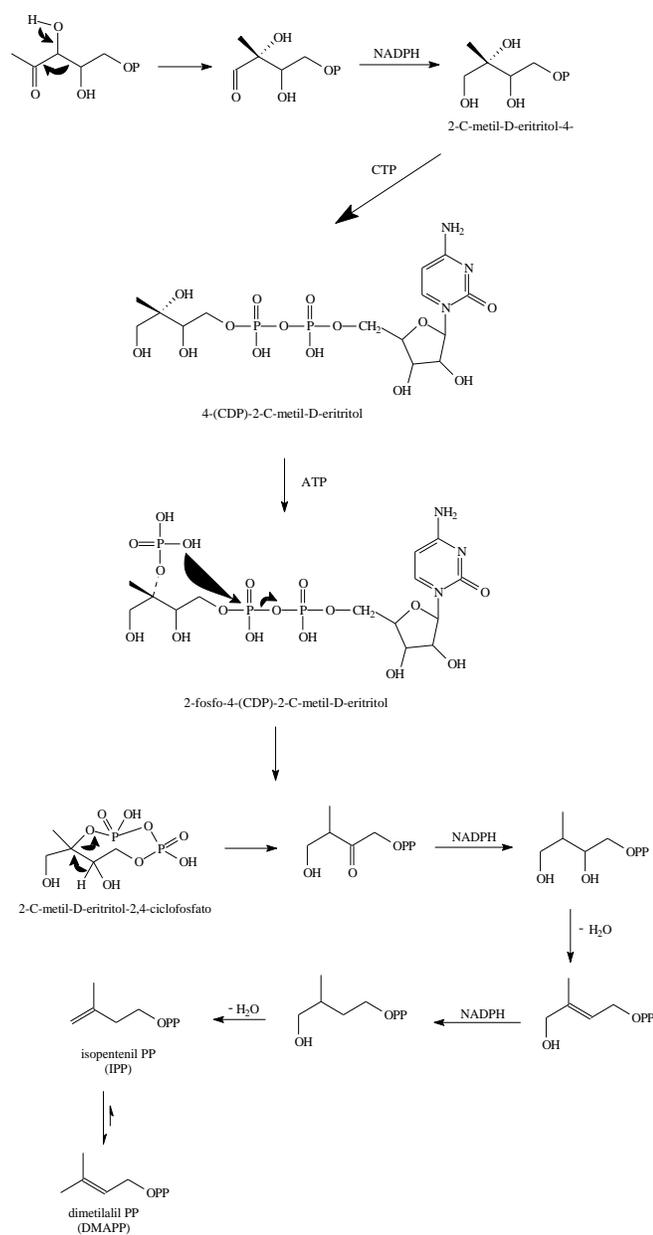


Figura 3 Mecanismo de formação das unidades isoprênica ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) pela via da 1-deoxi-D-xilulose -5- P mevalonato

Fonte: Adaptada de Dewick (2009)

O isopentenil difosfato e seu isômero, o dimetilalil difosfato (DMAPP), são as unidades pentacarbonadas ativas na biossíntese dos terpenos, que se unem para formar moléculas maiores. Inicialmente, o IPP e o DMAPP reagem e formam o geranyl difosfato (GPP), uma molécula de 10 carbonos, a partir da qual são formados os monoterpenos. O GPP pode, então, ligar-se a outra molécula de IPP, formando um composto de 15 carbonos, o farnesil difosfato (FPP), precursor da maioria dos sesquiterpenos. A adição de outra molécula de IPP forma o geranylgeranyl difosfato (GGPP), composto de 20 carbonos, precursor dos diterpenos. Finalmente, FPP e GGPP podem dimerizar para formar triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀), respectivamente (Figura 4) (SIMÕES et al., 2007).

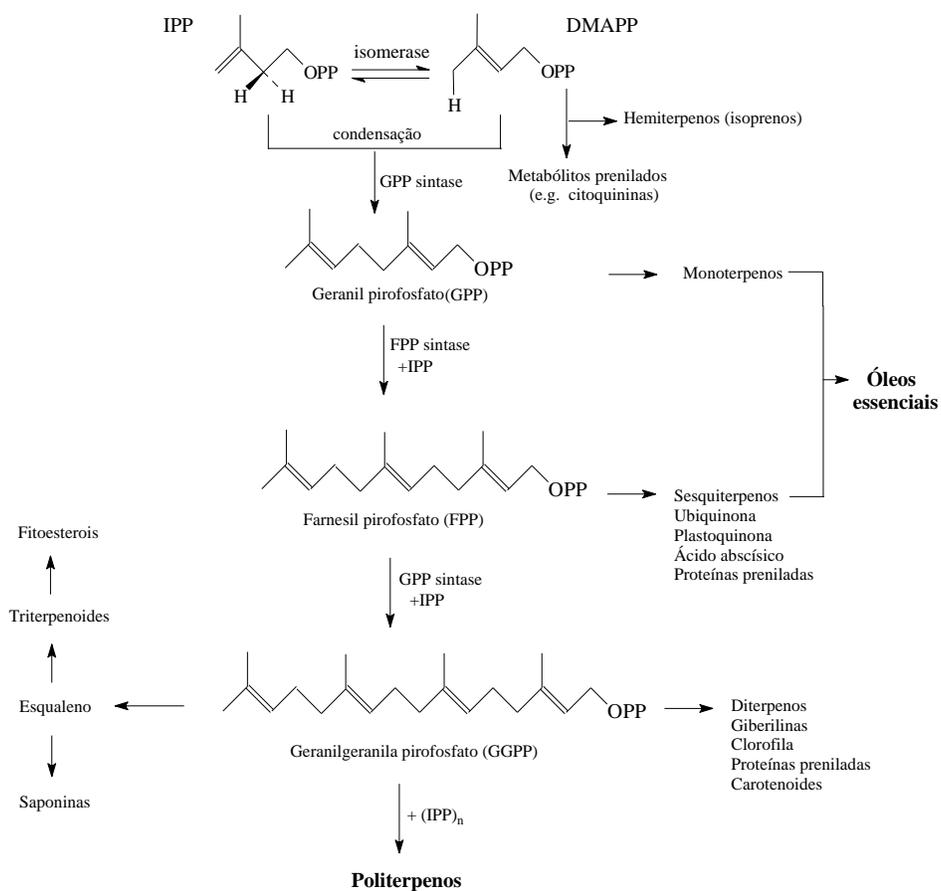


Figura 4 Esquema das vias de biossíntese de isoprenoides em plantas, a partir da formação dos blocos de isoprenóides isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilalil pirofosfato (DMAPP)

Fonte: Adaptada de Dewick (2009)

No geral, os terpenoides são os constituintes predominantes dos óleos essenciais das plantas, mas muitos dos óleos essenciais também podem apresentar em sua estrutura derivados dos fenilpropanoides (SIMÕES et al., 2007).

Os terpenos são compostos que ocorrem em todas as plantas e compreendem uma classe de metabólitos secundários com uma grande variedade estrutural. Eles apresentam funções variadas nos vegetais, atuando na atração de polinizadores, funções protetoras contra fungos e bactérias e dão origem aos hormônios de crescimento vegetal. Muitos têm funções de proteção contra herbívoros, alguns são antimitóticos, e outros atuam na germinação das sementes e na inibição do crescimento da raiz (RAVEN; EVERT; EICHHORN, 2001). Constituem um largo grupo de metabólitos naturais, sendo conhecidos mais de 36.000 diferentes terpenoides, cuja grande diversidade se deve à variabilidade das suas estruturas e dos grupos funcionais. O termo “terpeno” deriva do nome da resina terebintina ou aguarrás, de onde foram isolados pela primeira vez essas substâncias (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2000; LUCKER, 2002).

2.1.1.2 Biossíntese dos fenilpropanoides

Os fenilpropanoides são substâncias naturais amplamente distribuídas nos vegetais e constituídas por um anel aromático unido a uma cadeia de três carbonos e derivadas biossinteticamente do ácido chiquímico, como mostra a Figura 5. O ácido chiquímico é formado pelo metabolismo da glicose, a partir do fosfoenolpiruvato e da eritrose-4-fostato. Mediante a junção do ácido chiquímico e de uma molécula de fosfoenolpiruvato, ocorre a formação do ácido corísmico (PERES, 2004).

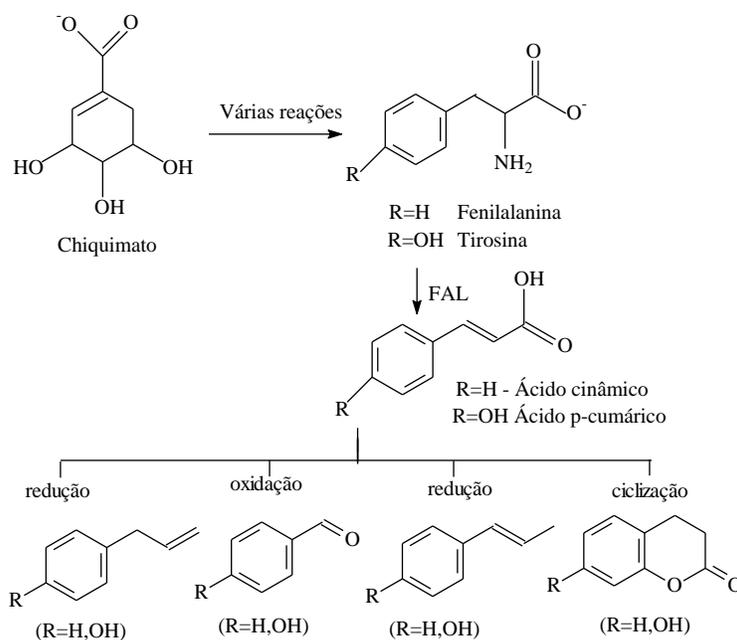


Figura 5 Mecanismo de formação da estrutura básica dos fenilpropanoides a partir do ácido chiquímico

Fonte: Simões et al. (2007)

A partir do ácido cinâmico ou do ácido p-cumárico, são formados compostos fenólicos simples denominados fenilpropanoides, conforme mostra a figura 4. Esses compostos costumam ser voláteis, sendo considerados, juntamente com os monoterpenos, os constituintes dos óleos essenciais (PERES, 2004).

2.1.2 Propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais

Atualmente, as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais têm sido consideradas uma ferramenta em várias aplicações, incluindo preservação

de alimentos e produção de fármacos alternativos. Esse aspecto assume uma relevância particular devido ao aumento da resistência de algumas bactérias aos antibióticos mais comuns e aos agentes microbianos utilizados na preservação de alimentos (CANSIAN et al., 2010).

Os óleos essenciais presentes em diversas plantas servem como uma fonte alternativa de agentes antimicrobianos contra patógenos causadores de doenças alimentares ou deteriorantes de alimentos, sendo esses causadores de diversos prejuízos para as indústrias alimentícias. Recentemente, é crescente o interesse de alguns consumidores, por produtos naturais, em decorrência de os antimicrobianos sintéticos apresentarem toxicidade ao consumidor (KOTZEKIDOU; GIANNAKIDIS; BOULMATIS, 2007).

A eficácia na inibição do desenvolvimento de bactérias de Gram negativo e de Gram positivo, de leveduras e fungos filamentosos, mesmo de estirpes usualmente resistentes aos antibióticos convencionais, tem motivado o interesse para a avaliação e caracterização da atividade antibacteriana de óleos essenciais sobre diversos micro-organismos (CAVALEIRO et al., 2006).

A atividade antimicrobiana está, em geral, associada à presença de compostos oxigenados com reduzido volume molecular, sendo capazes de estabelecer ligações de hidrogênio e que tem hidrossolubilidade razoável. São exemplos o timol, o carvacrol, o eugenol, o linalol, o geraniol, o aldeído cinâmico, o neral ou o geranial. O modo de ação que provoca a inibição de micro-organismos por óleos essenciais e seus constituintes químicos envolve diferentes mecanismos, dependendo dos componentes majoritários do óleo essencial. A ação desses compostos sobre os micro-organismos está relacionada à hidrofobicidade, que permite quebrar os lipídeos da membrana celular e da mitocôndria, alterando as estruturas e tornando-as mais permeáveis, acarretando no vazamento de íons e outros conteúdos celulares, além da inativação das

enzimas extracelulares e diminuição de ATP intracelular (CARSON; MEE; RILEY, 2002; BURT, 2004).

Entretanto, além de se conhecer a ação dos componentes majoritários dos óleos essenciais isoladamente, deve-se considerar a ação sinérgica das moléculas que os compõem, pois é possível que a atividade atribuída aos componentes majoritários seja modulada pelos minoritários presentes no óleo, que atuam na penetração, na distribuição celular e na fixação deles nas paredes e membranas (LIOLIOS et al., 2009).

A investigação sobre a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais tem se tornado crescente nos últimos anos. Muitos estudos *in vitro* vêm sendo realizados e relatam a eficácia dos óleos essenciais sobre micro-organismos. Andrade et al. (2012), ao testarem o efeito dos óleos essenciais de citronela (*Cymbopogon nardus*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) e gengibre (*Zingiber officinale*) sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Salmonella Choleraesuis* e *Pseudomonas aeruginosa*, constataram que os óleos essenciais apresentaram atividade antibacteriana tanto para bactérias Gram-negativas como para bactérias Gram-positivas, sendo o óleo essencial de *C. zeylanicum* o mais eficiente, apresentando como componentes majoritários o (*E*)- cinamaldeído, acetato de (*E*)-cinamila e 1,8-cineol.

Lima et al. (2012) avaliaram os óleos essenciais de *Myristica fragrans* e *Salvia microphylla*, contra as bactérias Gram-negativas (*Aeromonas hydrophila*, *E. coli*, *P. aeruginosa* e *S. choleraesuis*) e Gram-positivas (*S. aureus*, *L. monocytogenes* e *Listeria innocua*). Os autores concluíram que os óleos essenciais mostraram atividade antibacteriana, inibindo o crescimento de todas as espécies de bactérias em estudo, exceto para a *E. coli*.

No que diz respeito à atividade antifúngica, Silva e Bastos (2007) avaliaram a ação fungitóxica de óleos essenciais extraídos de folhas de espécies 10 espécies de *Piper*, coletadas na região amazônica, sobre o crescimento

micelial e a germinação de basidiósporos de *Crinipellis perniciosa* e sobre o crescimento micelial de *Phytophthora palmivora* e *P. capsici*. As espécies de *Piper* usadas foram *Piper dilatatum* Rich., *P. cyrtopodon* (Miq.) C. DC., *P. hostmannianum* (Miq.) C. DC., *P. callosum* Ruiz & Pav., *P. tuberculatum* Jacq., *P. divaricatum* G. Mey, *P. nigrispicum* C. DC e *P. hispidum* Sw. Os óleos mais efetivos que inibiram em 100% o crescimento dos três fungos foram os de *P. callosum*, *P. marginatum* var. *anisatum* e *P. enckea*, nas concentrações de 0,75 e 1 $\mu\text{L mL}^{-1}$. Quanto à germinação de basidiósporos de *C. perniciosa*, o óleo de *P. dilatatum* foi o mais eficiente a 0,4 $\mu\text{L mL}^{-1}$, seguido pelos óleos de *P. callosum* e *P. marginatum* var. *anisatum* a 0,5 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

Guimarães et al. (2011), avaliando a atividade fungitóxica do óleo essencial de *C. citratus* e do seu constituinte majoritário citral sobre os fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides* e *Rhizoctonia solani*, constataram que a atividade foi exercida pelo componente citral.

As descobertas de novos compostos com propriedades antimicrobianas, por meio das pesquisas de fontes naturais, vêm se mostrando viável e de extrema importância, haja vista a comprovação do vasto potencial contra microorganismos que os óleos essenciais extraídos de diversas plantas têm demonstrado.

2.1.3 Toxicidade dos óleos essenciais

A elucidação dos componentes ativos presentes nas plantas, bem como seus mecanismos de ação, vem sendo um dos maiores desafios para a química farmacêutica, bioquímica e a farmacologia. O grande número de trabalhos publicados apresentando as diversas atividades biológicas relacionadas aos óleos essenciais intensifica a importância de se verificar também se esses compostos

apresentam algum risco para o organismo humano. Alguns testes de citotoxicidade *in vitro* estão sendo realizados e estes ensaios são essenciais para averiguar a toxicidade dessas substâncias nos seres humanos (ROGERO et al., 2003).

Devido à natureza lipofílica dos componentes dos óleos essenciais, quando aplicados topicamente, verifica-se que são capazes de agir na membrana celular das células da epiderme e da derme. Por esse mecanismo, ocorre a penetração dos componentes do óleo essencial para o interior da célula através da membrana celular. Uma vez no citoplasma, os componentes dos óleos essenciais têm a capacidade de atuarem tanto no metabolismo das organelas celulares, quanto de alcançar a corrente sanguínea dos capilares da derme profunda, atuando, então, em células de órgãos-alvo mais distantes (WOLFFENBÜTTEL, 2010).

2.2 Contaminação de alimentos

Nos últimos anos, têm-se mostrado cada vez mais comum, em vários países, casos de doenças veiculadas por alimentos de etiologias variadas, muitas vezes por contaminação da matéria-prima ou do produto pronto para consumo (FORSYTHE, 2010).

A contaminação dos alimentos pode ser classificada em três tipos, químico, físico e biológico. A primeira consiste na presença de metais pesados, pesticidas, detergentes, toxinas de plantas e de animais e antibióticos; a segunda caracteriza-se pela presença de partículas metálicas, fragmentos de insetos, pedaços de vidro, poeira e outras sujidades; e a terceira é ocasionada por bactérias patogênicas, parasitas, vírus e fungos toxigênicos, sendo essa última classificada como a principal para a saúde pública. (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Síndromes resultantes da ingestão de alimentos contaminados por micro-organismos são conhecidas como Doenças Transmitidas por Alimentos (DTA). Esse termo é usado para definir uma síndrome que se caracteriza por apresentar sintomas, como anorexia, vômitos e/ou diarreia, acompanhada ou não de febre, atribuída à ingestão de alimentos ou água contaminados. Além desses sintomas, ainda podem ocorrer afecções extraintestinais, em diferentes órgãos e sistemas, como meninges, rins, fígado, sistema nervoso central, terminações nervosas periféricas e outros, de acordo com o agente envolvido (BUZBY; ROBERTS, 2009; BRASIL, 2010).

Dados do CDC (2009) mostram que, a cada ano, 76 milhões de americanos são acometidos por doenças veiculadas por alimentos, ocorrendo 325 mil hospitalizações e 5.200 mortes. Desse total, os micro-organismos foram responsáveis por cerca de 14 milhões de toxinfecções, 60 mil hospitalizações e 1.800 mortes.

De acordo com Forsythe (2010), a maioria dos surtos provocados por DTA tem sido relacionada à ingestão de alimentos com boa aparência, sabor e odor normais, sem qualquer alteração organoléptica visível. Isso ocorre porque a dose infectante de patógenos alimentares geralmente é menor que a quantidade de micro-organismos necessária para degradar os alimentos. Problemas como esses dificultam a rastreabilidade dos alimentos causadores de surtos, tendo em vista que, na maior parte dos casos, os consumidores afetados dificilmente conseguem identificar os alimentos fonte da DTA. Alimentos com características organolépticas alteradas dificilmente causam surtos alimentares, pois normalmente são rejeitados devido à sensação repulsiva que causam aos consumidores. Nessas condições, a contaminação microbiana é elevada, podendo ultrapassar números da ordem de 10^8 UFC/g de alimento.

2.3 Principais patógenos de origem alimentar

As bactérias são os principais micro-organismos envolvidos nos processos de contaminações de alimentos. Elas são agentes importantes na etiologia das DTA de origem microbiana, sendo responsáveis pelo maior número de surtos e de mortes, seja como causadoras de infecções ou toxinoses (JAY, 2005).

Dados da ANVISA (BRASIL, 2011) mostram que os agentes etiológicos de maior ocorrência em surtos alimentares registrados no Brasil, entre os anos de 2000 e 2011, foram *Salmonella ssp*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Escherichia coli* (Figura 6).

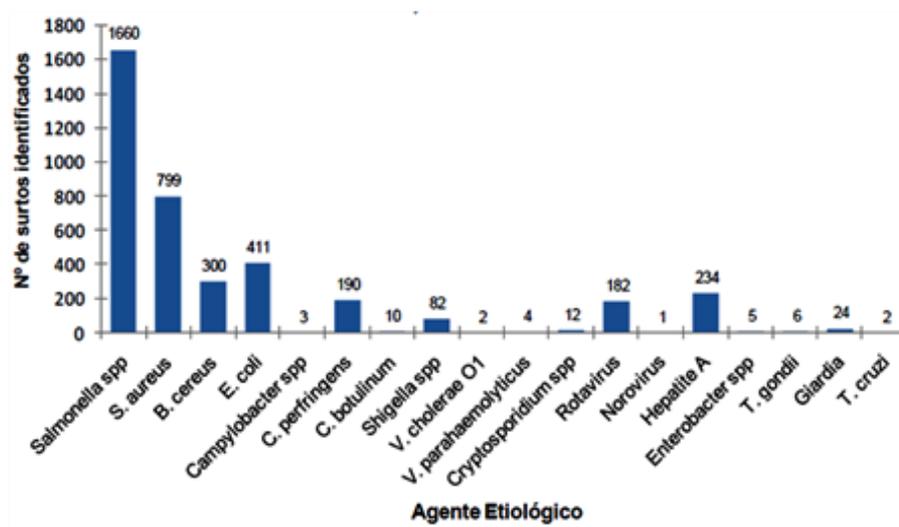


Figura 6 Agentes etiológicos identificados por surtos no Brasil entre os anos de 2000 e 2011

Fonte: Brasil (2011)

2.3.1 *Salmonella ssp*

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e se apresenta na forma de bacilos, medindo de 0,7-1,5 x 2,0-5µm. São microorganismos Gram negativos, não produtores de esporos, anaeróbios facultativos, oxidase negativa e catalase positiva. Apresentam crescimento ótimo a 37 °C. A maioria das cepas são móveis, apresentando na sua estrutura flagelos peritríquios (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Salmonella ssp é uma bactéria que causa doenças em humanos e animais, pelo consumo e ingestão de alimentos contaminados. As espécies desse gênero atravessam a camada epitelial intestinal, alcançam a lâmina própria (camada na qual as células epiteliais estão ancoradas), onde proliferam. O sorotipo predominante causador de infecções alimentares mudou nas últimas décadas de *S. agona*, *S. hadar* e *S. typhimurium* para *S. enteritidis*, sendo a *S. enteritidis* a causa predominante de salmoneloses em diversos países (SURESH; HATHA; SCREENIVASA, 2006).

As salmonelas podem causar um amplo espectro de doenças em humanos, variando de febre tifoide, bacteremia, gastroenterites e infecções fecais. É uma das principais causas de gastroenterites veiculadas por alimentos em todo o mundo, e um importante problema de saúde pública, tanto em países industrializados como naqueles em desenvolvimento (PAYMENT; RILEY, 2002).

2.3.2 *Staphylococcus aureus*

O gênero *Staphylococcus* pertence à família Micrococcaceae, apresentam-se em forma de cocos Gram-positivos, com 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, isoladas ou agrupadas em cachos. São imóveis, anaeróbias

facultativas, não esporuladas e suas colônias são relativamente grandes, com 1 a 2 mm de diâmetro. As colônias são opacas, convexas, cremosas e suas cores variam do branco a vários tons de amarelo, dependendo da espécie (JAY, 2005).

Os estafilococos são micro-organismos mesófilos com temperatura de crescimento entre 7 e 47 °C e podem produzir enterotoxinas termorresistentes a temperaturas entre 10 e 46 °C, com temperatura ótima entre 40 e 45 °C. O pH ideal para seu desenvolvimento varia entre 7 a 7,5, mas é possível a multiplicação em alimentos com pH variando entre 4,2 e 9,3 (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

S. aureus é o patógeno humano mais importante entre os estafilococos. É encontrado no ambiente externo e em narinas de 20-40% dos adultos, ao passo que 60% dos humanos podem ser colonizados temporariamente. (FRANCO; LANDGRAF, 2008; BANIA et al., 2006). Devido à capacidade de produzir infecções em diversos tecidos do corpo humano, esse micro-organismo está associado a altas taxas de mortalidade e morbidade. É capaz de adquirir resistência a antibióticos e de sobreviver em diferentes condições ambientais, tornando um perigoso agente infeccioso no ambiente hospitalar. Considerando o cenário epidemiológico mundial, esse micro-organismo é considerado a terceira causa mais relevante de DTAs. (SAGINUR; SUH, 2008).

2.3.3 *Escherichia coli*

Escherichia coli é o organismo facultativo predominante da microbiota do cólon humano. São bacilos Gram-negativos com diâmetro de 1,1 a 1,5 x 2,0 a 6 µm, pertencentes à família *Enterobacteriaceae*, não esporulados, aeróbicos ou anaeróbicos facultativos, capazes de fermentar a glicose, produzindo ácido e gás (JAY, 2005).

A água contaminada com despejos de esgoto é uma das mais importantes vias de transmissão do agente na natureza. Por outro lado, qualquer alimento exposto à contaminação fecal, seja pelo preparo, seja pelos manipuladores infectados, pode veicular a *E. coli*. A infecção enteropatogênica tem período médio de incubação de 36 horas e caracteriza-se por diarreia aquosa com muco, náuseas, dores abdominais, vômitos e febre. Na forma eteroinvasora, o período de incubação é de apenas 11 horas e os sintomas são diarreia profusa e disenteria, cólicas, febre e mialgia. Na forma enterotoxigênica, o período de incubação varia de 8 a 44 horas, com média de 26 horas, e os principais sintomas são diarreia aquosa, febrícula, cólica, mal-estar e náuseas. Nas infecções eteroemorrágicas, as manifestações dos primeiros sintomas ocorrem, em geral, 4 dias após a ingestão do alimento contaminado, e caracteriza-se por diarreia sanguinolenta profusa, dor abdominal intensa e vômitos na ausência de quadro febril (GERMANO; GERMANO, 2003).

2.3.4 *Pseudomonas aeruginosa*

O gênero *Pseudomonas* está amplamente difundido na água e no solo, compreendendo mais de 100 espécies, sendo a de maior importância a *Pseudomonas aeruginosa*, por se tratar de um patógeno secundário e oportunista, com grande capacidade invasiva e toxigênica, podendo causar várias doenças (TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

P. aeruginosa pertence à família Pseudomonadaceae. Trata-se de bacilos Gram negativos, aeróbios obrigatórios, móveis por um simples flagelo polar, não esporulado. São oxidase e catalase positiva que crescem a 37 °C e a 42 °C, possui o metabolismo oxidativo, tolera valores de pH relativamente altos e é capaz de sobreviver em substratos com pequenas quantidades de nutrientes. Esse micro-organismo permanece como um dos mais prevalentes agentes em

infecções hospitalares em todo o mundo. É capaz de crescer em ambientes simples e causar infecções crônicas por biofilmes em indivíduos imunocomprometidos. A importância clínica da infecção por *P. aeruginosa* está baseada na difícil erradicação da infecção e contínuos fracassos terapêuticos, consequência direta da ampla expressão de fatores de virulência, assim como resistência natural e adquirida a muitos antibióticos e desinfetantes (MASSAGUER, 2005; TRABULSI; ALTERTHUM, 2008).

2.3.5 *Listeria monocytogenes*

A listeriose, doença causada pela bactéria *L. monocytogenes*, é vista em humanos como uma doença invasiva em grupos de risco bem definidos, afetando, principalmente, indivíduos imunodeprimidos, gestantes e idosos. Manifesta-se por gastroenterites, meningites, encefalites, infecções transmitidas da gestante para o feto e septicemias, resultando na morte de 25 a 30% dos casos (GUERRA; BERNARDO, 2004; KHELEF et al., 2005).

A espécie *Listeria monocytogenes* apresenta-se na forma de bastonetes curtos Gram-positivos, de 0,4 a 0,5 µm de diâmetro e 0,5 a 2,0 µm de comprimento, com extremidades arredondadas que podem ou não apresentar forma filamentosa. Não produtoras de esporos, são móveis (com flagelos peritríquios), catalase positiva, oxidase negativa, halotolerantes e desprovida de cápsula (ADAMS; MOSS, 2004; JAY, 2005).

Encontra-se amplamente difundida em plantas, em alimentos, como legumes e frutas, tanto crus como processados, queijos e leite, carnes e também frutos do mar. Pode ser isolada do solo e fezes de humanos e de outros animais. Crescem em temperatura de 1 a 45 °C, sendo a faixa ótima de 30 a 37 °C, embora existam relatos sobre o crescimento a 0 °C. Suportam repetidos

congelamentos e descongelamentos (JAY, 2005; FRANCO; LANDGRAF, 2008; MANTILLA et al., 2007).

2.4 Contaminação de alimentos por fungos filamentosos

Os fungos são micro-organismos eucarióticos largamente distribuídos no meio ambiente, incluindo o ar, a água e o solo. Como consequência, os alimentos podem se tornar contaminados com uma ampla variedade de espécies fúngicas originárias de fontes ambientais e que, sob condições favoráveis, podem multiplicar-se nos alimentos, provocando sua deterioração (TANIWAK; SILVA, 2001).

A estrutura básica dos fungos é formada por filamentos denominados hifas, que, em conjunto, formam o micélio. O micélio pode ter duas funções distintas: promover a fixação do bolor no substrato (micélio vegetativo) e promover a reprodução, pela produção de esporos (micélio reprodutivo). O micélio dos fungos é responsável pelo aspecto característico das colônias que formam, podendo ser cotonosos, úmidos e gelatinosos (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

Os fungos apresentam uma grande versatilidade para crescer em substratos e condições que outros micro-organismos não são capazes de utilizar, como o crescimento em condições de atividade de água (a_w) reduzida, dentro do limite de 0,65 até 0,99; crescimento em condições de pH reduzido; crescimento em uma ampla faixa de temperatura, variando de 0 °C a 40 °C; utilização de uma grande versatilidade de substrato como fontes de carbono, nitrogênio e energia; capacidade de esporulação e disseminação em diferentes condições. Esses atributos tornam os fungos potencialmente capazes de causar deterioração em alimentos com diferentes níveis de umidade e em condições climáticas que vão desde o subártico até o tropical (MEDINA et al., 2006).

Segundo Quillien (2002), determinados fungos são componentes altamente desejados e favoráveis em certos alimentos, como na produção de queijo ou no processo de fermentação das cervejas e vinhos, enquanto outros são usados na obtenção de antibióticos valiosos, como a penicilina. Porém, em geral, a presença de fungos nos alimentos causam mudanças indesejáveis, tanto na composição química quanto na estrutura e aparência. Dessa forma, o alimento passa a ser rejeitado, o que representa perda econômica e/ou desperdício de matéria-prima. Outro problema grave associado à contaminação de alimentos por fungos é que esses micro-organismos podem produzir toxinas que representam sério risco para a saúde humana e animal, podendo provocar doenças que, em casos mais graves, levam à morte. A detecção e quantificação de fungos são uma análise essencial na caracterização microbiológica dos alimentos, sendo a população fúngica um parâmetro importante no julgamento das condições de higiene e das práticas de controle durante a sua manufatura e distribuição.

2.4.1 O gênero *Aspergillus*

O gênero *Aspergillus* pertence ao grupo dos Hyphomycetos, que se caracteriza pela formação de conidióforos, ou seja, hifas especializadas e produtoras de conídeos com formas e arquitetura variáveis. Esse gênero é de particular importância por conter muitas espécies capazes de crescer em condições de baixa atividade de água, sendo então associados com a deterioração de alimentos que são muito secos para serem atacados por outros micro-organismos (MOSS, 2002).

As espécies de *Aspergillus* crescem rapidamente, produzindo hifas aéreas que exibem estruturas características de conídeos: longos conidióforos com vesículas terminais sobre os quais as filíades produzem cadeias basipedais

de conídeos. São identificados de acordo com as diferenças morfológicas observadas nessas estruturas, incluindo tamanho, forma, textura e cor dos conídeos (BROOKS; BUTEL; MORSE, 2000).

Segundo Samson (2000), entre os principais gêneros toxígenos, o *Aspergillus* possui espécies de ocorrência mais frequente e comum nos trópicos, dentre as quais destacam-se *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus carbonarius*.

2.4.1.1 *Aspergillus niger*

A. niger pode ser encontrado em vários alimentos, principalmente em alimentos secos e especiarias. Essa é uma espécie amplamente utilizada em processos biotecnológicos. É considerado um fungo xerofílico, tendo descrita a germinação em atividade de água de 0,77 a 35 °C e limite de crescimento e temperatura variando entre 6 a 47 °C, respectivamente (JAY, 2005).

Algumas espécies destacam-se pela produção de micotoxinas. A principal micotoxina relacionada a essas espécies é a ocratoxina A (OTA) (ABARCA et al., 2004).

2.4.1.2 *Aspergillus flavus*

Aspergillus flavus é uma espécie de fungo que pode ser encontrado em diversos alimentos, como nozes, temperos, sementes oleaginosas, cereais, rações animais e, ocasionalmente, em frutas secas. Essa espécie é capaz de causar doenças em culturas economicamente importantes, como milho e amendoim. É capaz de produzir micotoxinas potentes, como as aflatoxinas B₁ e B₂ e é considerado o segundo maior causador de aspergilose invasiva e não invasiva (HEDAYATI et al., 2007).

A atividade de água requerida para o crescimento do fungo é de 0,80 a > 0,99 (ótimo 0,98). De acordo com a temperatura, os limites de crescimento variam de 10 a 43 °C e a temperatura considerada ótima é de 33 °C. Para a produção da aflatoxina, os valores de atividade de água requerida são de 0,82 a 0,99, sendo a atividade de água mais favorável de 0,95 a 0,99. No que diz respeito à temperatura, a maior produção ocorre entre 13 a 37 °C (JAY, 2005).

2.4.1.3 *Aspergillus carbonarius*

Aspergillus carbonarius (BRAIN) Thom pertence ao subgênero *Circundatti*, seção Nigri, sendo reportado inicialmente como isolado a partir do solo e águas poluídas. Atualmente tem sido encontrado em alimentos de origem vegetal, com importância para a produção de OTA (ABARCA et al., 2004).

Geralmente, *A. carbonarius* tem um crescimento ótimo a 30-35 °C e não cresce a temperaturas inferiores a 25 °C. O ótimo de atividade de água para o crescimento varia de 0,93 a 0,98, dependendo da cepa, com uma maior tolerância a 25-30 °C (MITCHEL et al., 2004).

2.4.2 Micotoxinas

As micotoxinas são metabólitos secundários produzidos por algumas espécies de fungos filamentosos, que podem ser produzidas em alimentos, como resultado do crescimento do fungo. A estrutura química das micotoxinas varia consideravelmente, sendo compostos biológicos naturais de baixo peso molecular, normalmente tóxicos, produzidos pelo metabolismo secundário de fungos, nomeadamente e mais frequentemente pelos gêneros *Aspergillus*, *Fusarium* e *Penicillium* (MOSS, 2002).

Nem todos os fungos produzem toxinas, de forma que a simples presença de fungos em um alimento não implica que toxinas tenham sido ou venham a ser produzidas. Por outro lado, a simples ausência de sinais visíveis de emboloramento também não pode ser interpretada como ausência de toxinas, pois as toxinas podem permanecer em um alimento mesmo depois que o fungo que a produziu tenha desaparecido do produto processado. Isso porque a maioria das micotoxinas são termoestáveis, resistindo a determinados tratamentos térmicos ou processos de desidratação que são suficientes para destruir o micélio vegetativo dos fungos que as produziram (NOGUEIRA, 2009).

A ingestão de alimentos que contêm micotoxinas pode causar graves efeitos sobre a saúde animal e humana. Tais efeitos são conhecidos como micotóxicoses, cuja gravidade depende da toxicidade da micotoxina, grau de exposição, idade e estado nutricional do indivíduo, e dos possíveis efeitos sinérgicos de outros agentes químicos aos quais está exposto. Sua entrada no organismo comumente se dá pela via digestiva e sua absorção geralmente causa reações sob a forma de hemorragias, ou mesmo, necroses. Muitas dessas toxinas têm afinidade por determinado órgão ou tecido, sendo o fígado, os rins e o sistema nervoso frequentemente os mais atingidos (BHATNAGAR; YU; EHRLICH, 2002; SHEPHARD, 2008).

O efeito de uma micotoxina depende da dose e da frequência com que é ingerida e pode ser agudo (letal ou não) ou subagudo. O efeito agudo é de manifestação e percepção rápidas, podendo levar à morte, porque causa alterações irreversíveis, e é resultante da ingestão de doses geralmente elevadas. O efeito subagudo é o resultado de doses menores, que provocam distúrbios e alterações nos órgãos dos humanos e dos animais (SHEPHARD, 2008).

2.4.2.1 Ocratoxina A (OTA)

A ocratoxina A foi inicialmente descoberta em 1965 como um metabólito de *Aspergillus ochraceus* durante estudos por meio dos quais objetivavam-se descobrir novas moléculas de micotoxinas. Nem todos os isolados de *Aspergillus ochraceus* são capazes de produzir OTA. Além dessa espécie, também *Aspergillus alliaceus*, *Aspergillus auricomus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus glaucus*, *Aspergillus meleus* e *Aspergillus niger*, além de *Penicillium nordicum* e *Penicillium verrucosum* são produtores de OTA (BAYMAN et al., 2002; RINGOT et al., 2006).

A OTA ou 7-(L-β-fenilalanilcarbonil)-carboxil-5-cloro-8-hidroxi-3,4-dihidro-3R-metilisocumarina é um derivado de uma dihidro-isocumarina unida pelo carbono 7 carboxílico a uma L-β-fenilalanina, por meio de uma ligação amídica (Figura 7). Sua fórmula química é $C_{20}H_{18}O_6NCl$ e seu peso molecular 403,82 g mol⁻¹. A OTA apresenta-se como um composto cristalino altamente solúvel em solventes orgânicos polares, pouco solúvel em água e solúvel em carbonato de sódio de meio aquoso. Sua temperatura de fusão é de 169 °C (FURLANI; SOARES, 1999). Possui absorção no comprimento de onda 333 nm (λ) e emissão no comprimento de onda entre 440-475 nm, com coeficiente de absorção molar de 5440 m²/mol, quando solubilizada em solução de tolueno-ácido acético 99:1 (v/v) (RINGOT; CHANGO, 2006; VALERO, 2008).

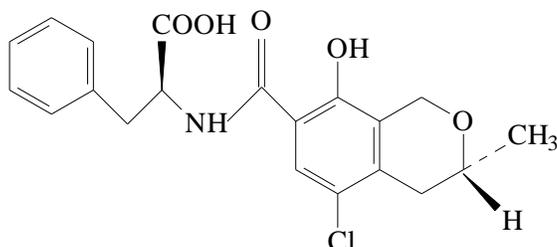


Figura 7 Estrutura química da ocratoxina A

OTA está associada a nefropatias em todos os animais estudados até o momento. É no ser humano, entretanto, que essa substância tem a mais longa meia-vida para sua eliminação. Além de ser reconhecidamente nefrotóxica, a OTA comporta-se, também, como hepatóxica, imunossupressora, teratogênica e cancerígena. A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer classificou a OTA como um possível cancerígeno humano (categoria 2B) (CREPPY, 2004).

Estudos realizados na Europa apontam efeitos carcinogênicos e hepatotóxicos em animais não ruminantes, principalmente em aves e suínos. Nas regiões de criação, os sintomas mais aparentes são o de nefropatia com atrofia tubular e fibrose intersticial nos animais. Um dos relatos mais conhecidos da toxicidade da OTA para humanos foi a Nefropatia Endêmica dos Balcãs (NEB), onde diversos casos de câncer do trato urinário foram associados à presença da OTA, quando comparados a outras regiões onde a micotoxina não está presente com tanta frequência (RINGOT; CHANGO, 2006).

A OTA é facilmente absorvida pelo sistema gastrointestinal e sua toxicidade pode variar conforme a concentração e o organismo. Uma vez ingerida e absorvida pelo trato intestinal, a OTA se distribui rapidamente pelo organismo por formar adutos com proteínas sanguíneas e, posteriormente, ligar-

se com os tecidos. Essa ligação é reversível e ocorre em sítios que podem competir com alguns fármacos comumente utilizados. Os grupamentos carboxílicos e fenólicos em sua estrutura química fazem o maior papel na absorção, uma vez que a OTA age como um ácido fraco e passa através das membranas celulares por difusão simples (TURNER; SUBRAHMANYAMB; PILETSKIB, 2009).

A OTA pode ser encontrada em diversos alimentos, incluindo nozes, amendoins secos, feijão, temperos, grãos de café e frutas secas, como também em carne processada, cereais, sementes oleaginosas, uvas, vinho, uvas passas e café (KAPETANAKOU, 2009). Aproximadamente 50% das amostras de arroz, feijão, milho e trigo analisadas no Brasil apresentaram níveis detectáveis de OTA, além de ter sua presença também confirmada em café torrado e moído, e em café solúvel (PRADO et al., 2000; CALDAS; SILVA; OLIVEIRA, 2002).

Em uma pesquisa realizada no Rio de Janeiro, Rosa et al. (2002) detectaram a presença de OTA em vinhos brasileiros. Os vinhos brasileiros apresentaram 30% de contaminação em tintos, 20% em brancos e 20% em rosé. A concentração de OTA foi a mais alta para os vinhos tintos (máximo de 0,0424 µg/L), seguida de vinhos brancos (0,0354 µg/L) e de vinho rosé (0,0282 µg/L).

A avaliação de risco da Ocratoxina A em alimentos ocorre oficialmente por uma junta de especialistas da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e Organização Mundial da Saúde (OMS), que se reúnem regularmente para as reavaliações pertinentes. Desde 1970 os contaminantes de alimentos têm sido avaliados pelos comitês dos órgãos mundiais, entre eles o *Codex Alimentarius*. São as resoluções tomadas à partir desses encontros que estabelecem os níveis a serem seguidos pela comunidade internacional para o comércio dos seus produtos (WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO, 2008).

Desde 2005, os países da Comunidade Europeia estabeleceram limites para micotoxinas em diversos produtos. As autoridades da União fixaram um limite de tolerância para a presença de OTA em vinhos, sucos de uva, concentrados e néctar de uvas em 2 µg/kg e 10 µg/kg para uvas passas e sultanas, estabelecido na EC Nº 123 de janeiro de 2005 (EC 123/2005) (EUROPEAN COMMISSION, 2005). Os produtos importados também devem seguir essa legislação e caso não estejam de acordo com as normas fixadas pela União, os produtos serão bloqueados para o comércio na Europa (DUARTE; PENA; LINO, 2010).

No Brasil, devido a vários fatores, como crescimento da área e práticas vitivinícolas, exigência de alguns países para exportação, e aos vários efeitos tóxicos da Ocratoxina A à saúde humana, foi aprovada em 2011 a Legislação Nacional (Resolução RDC nº 7 de 18 de fevereiro de 2011), que fixa os Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos, ficando estabelecido o Limite Máximo de 2 µg/kg para suco de uva, polpa de uva, vinho e seus derivados e 10 µg/kg para frutas secas e desidratadas (BRASIL, 2011).

2.5 *Lychnophora pinaster* Mart

Lychnophora pinaster Mart. (Figura 8) é uma angiosperma pertencente à família Asteraceae, do gênero *Lychnophora* (SEMIR, 1991). Considerada uma planta medicinal, possui alto espectro farmacológico, apresentando atividades anestésica, antimicrobiana, antirreumática, cicatrizante e anti-inflamatória, além do uso em casos de contusões, inchaços, hematomas, traumatismos e varizes (SILVEIRA et al., 2005). Suas folhas e flores aromáticas são bastante utilizadas na medicina popular, sob a forma de extrato alcoólico, como anti-inflamatório, anestésico e cicatrizante, em ferimentos, contusões ou hematomas, em picadas de insetos, além de pomadas para os mesmos sintomas (SOUZA, 2003).



Figura 8 Aspecto geral da espécie *Lychnophora pinaster* Mart

Popularmente, a planta recebe nomenclatura vulgar variada, como arnica-mineira, candeia, arnica-da-serra ou, simplesmente, arnica. Essa espécie apresenta sinonímia botânica extensa: *Vernonia trichocarpa* Spreng., *Piptocoma lychnophorioides* Less., *Lychnophora trichocarpa* (Spreng.) Spreng., *Lichnophora affinis* Gardh., *Lychnophora brunioides* var. *affinis* (Gargh) Baker., *Lychnophora rosmarinus* Pohl. Ex Schultz-Bip, *Lychnophora rosmarinus* var. *eurosmarinus* Schults-Bip, *Lychnophora rosmarinus* var. *normalis* Schults-Bip, *Lychnophora brunioides* var. *pinifolia* Baker., *Lychnophora pumilio* Pohl. e *Lychnophora piptocoma* Schults- Bip. (SEMIR, 1991).

A espécie *Lychnophora pinaster* Mart. é encontrada em campos rupestres, campos sujos e campos limpos de altitudes elevadas na região de cerrado do Alto Rio Grande em Minas Gerais, podendo também ser encontrada em campos de canga, como os existentes na Serra do Rola Moça, na Serra Moeda e na Serra do Curral, em Minas Gerais, e crescendo entre blocos de rochas ou no alto de pequenos morros, como nas Serra do Cipó, Serra do Caraça

e Serra de Lavras, na Serra da Bocaina/Morro Janela em Carrancas, na Cachoeira da Fumaça e na Serra de Carrancas (RODRIGUES, 1988; SEMIR, 1991; HABER, 2009).

Semir (1991) descreve a espécie *Lychnophora pinaster* Mart. como plantas que variam de subarbustos eretos bem ramificados a pequenos arbustos ericoides e, raramente, a arbustos mais altos, variando entre 0,4 a 2,4 m e mais raramente até 3,6 m. Suas folhas podem apresentar variações, sendo muito imbricadas e ascendentes na parte superior dos ramos e mais patentes até pouco reflexas abaixo, geralmente lineares, linearoblôngas, rosmarinioides e ericoides. Suas inflorescências são em formato de glomérulos simples folhosos, com folhas esparsas entre eles, com 1,0 a 1,5 cm de comprimento e 2,0 a 3,0 cm de diâmetro, em ramos folhosos com até 10,0 cm de comprimento e até 0,3 cm, raramente 1,0 cm de diâmetro. Seus capítulos são campanulados a cilíndricos com 3 a 5 flores, com 6,5 a 8,0 cm de comprimento e 3,0 a 5,0 mm de diâmetro.

Em vários estudos, descrevem-se o isolamento e testes de atividade farmacológica de vários constituintes de *L. pinaster*. A ação tripanomicida de isolados de extratos da parte aérea de *Lychnophora passerina*, *Lychnophora pinaster* e *Lychnophora trichocarpha* foi observada por Oliveira et al. (1996). A partir dos extratos de *L. pinaster* Mart, foi isolado o ácido licnofoico, que inibiu 50% do crescimento dos tripomastigotas de *T. cruzi*, na concentração de 12 µg/mL.

Vários constituintes isolados de extratos de *L. pinaster* foram descritos na literatura como lactona sesquiterpênica 15-desoxigoiazenólídeo, triterpenos lupeol, misturas de α - e β -amirina e friedelina, flavonoide quercetina, ácido isoclorogênico, ácido cafeico, isovitexina e vitexina (GRAEL et al., 2000; GRAEL; ALBUQUERQUE; LOPES, 2005; TAKEARA et al., 2003; SILVEIRA et al., 2005; FERREIRA et al., 2005).

Grande parte dos trabalhos científicos encontrados traz informações a respeito da composição química de *L. pinaster*, e fazem menção à caracterização das substâncias presentes em diferentes extratos e suas ações (HABER, 2008). Apesar de ser uma espécie muito estudada, ainda há poucos relatos na literatura referentes às atividades biológicas do óleo essencial de *L. pinaster*.

3 MATERIAL E MÉTODOS

Vários genótipos do material vegetal foram coletados na região denominada Serra do Sofá, localizada no município de Itumirim, Minas Gerais (Brasil), 21° 21' 28.7"S, longitude 45° 51' 30.9"W Gr. entre 919 m e 967 m de altitude.

3.1 Obtenção do material vegetal

A coleta do material vegetal foi realizada em janeiro de 2012, no período da manhã, em um dia ameno e sem precipitação. As folhas foram selecionados de acordo com um grau de homogeneidade e quanto à sua sanidade.

A ratificação taxonômica da espécie em estudo (Figura 9) foi realizada no Herbário ESAL, Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, Lavras - MG. Uma exsicata foi incorporada ao acervo do referido herbário, com um número de registro ESAL 27125.



Figura 9 Exsicata da planta coletada – *Lychnophora pinaster* Mart

3.2 Extração do óleo essencial

A extração do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais do DQI/UFLA. Inicialmente as folhas da planta foram previamente selecionadas, limpas e separadas dos caules e das inflorescências.

A extração do óleo essencial foi realizada pelo método de hidrodestilação, utilizando um aparelho de Clevenger modificado, acoplado a um balão de fundo redondo com capacidade de 5L (Figura 10). A extração foi realizada em triplicata por um período de 2 horas. Decorrido esse tempo, o óleo foi separado do hidrolato por centrifugação, utilizando uma centrífuga de cruzeta horizontal (Fanem Baby@I Modelo 206 BL), a 1100 x g por 15 minutos. O óleo foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, acondicionado em frasco de vidro, envolto com papel-alumínio e armazenado sob refrigeração (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2000).



Figura 10 Processo de extração do óleo essencial (hidrodestilação)

3.3 Determinação da umidade e do rendimento do óleo essencial

A determinação da umidade foi realizada paralelamente à extração do óleo essencial, segundo metodologia descrita por Pimentel et al. (2006). Em um balão de fundo redondo e boca esmerilhada acoplado com um condensador de refluxo e um coletor de vidro tipo Dean Stark (Figura 11), foram colocados 5 g do material vegetal imersos com 70 mL de cicloexano. Após 2 horas, o volume de água presente no material vegetal foi quantificado. A umidade foi calculada, extrapolando o teor de água para 100 g da amostra.



Figura 11 Sistema para determinação da umidade

O rendimento da extração do óleo essencial foi determinado em percentagem peso/peso (%p/p) em base livre de umidade (BLU), utilizando a seguinte equação:

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

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

3.4 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

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

3.4.1 Identificação dos constituintes dos óleos essenciais

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

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

3.4.2 Quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

Os óleos essenciais foram analisados por Cromatografia Gás-Líquido (CGL), num cromatógrafo Perkin Elmer 8700 equipado com dois detectores de ionização de chama (DIC), um sistema de tratamento de dados e um injetor, no qual foram instaladas duas colunas de polaridade diferente, com as seguintes características:

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

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

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

3.5 Atividades microbiológicas do óleo essencial

As atividades antibacteriana, antifúngica e antiocrotóxica do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart. foram avaliadas no Laboratório de Micotoxina e Micologia do DCA/UFLA.

Para a realização da atividade antibacteriana do óleo essencial, foram utilizadas cepas puras de *Escherichia coli* ATCC 11229, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Salmonella Choleraesuis* ATCC 6539, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442.

A avaliação do efeito inibitório do óleo essencial em fungos filamentosos foi testada sobre três espécies pertencentes ao gênero *Aspergillus* (*A. niger*, *A. flavus* e *A. carbonarius*). As espécies utilizadas foram adquiridas da Coleção de Cultura do Laboratório de Micotoxina e Micologia do DCA/UFLA.

3.5.1 Manutenção e ativação das culturas bacterianas

As cepas-padrões ATCC utilizadas para a realização da avaliação da atividade antibacteriana foram purificadas em meios de identificação específicos, sendo, posteriormente, mantidas em eppendorfs contendo meio de congelamento [glicerol (150 mL), peptona (5 g), extrato de levedura (3g), NaCl (5 g), água (1000 mL), pH 7,2 ± 7,4], sob refrigeração a - 4 °C (ANDRADE, 2012).

Para a ativação das culturas, as cepas foram repicadas em BHI (caldo-infusão de cérebro e coração), com posterior incubação em BOD 37 °C, por 24 horas (GUERRINI et al., 2009).

3.5.1.1 Teste de difusão cavidade em ágar

Após ativação das bactérias em caldo BHI, 300 μL desse meio foram transferidos para um tubo com 5 mL de caldo de soja tríptica (TSB). Os tubos foram incubados a 37 °C, e após 30 minutos foi realizada a leitura de turbidez utilizando espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1 PC), no comprimento de onda de 625 nm, de acordo com as normas instituídas pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards, até que se obtivesse a turbidez de uma solução-padrão McFarland de 0,5, resultando em uma suspensão contendo 10^8 UFC mL^{-1} (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, NCCLS, 2003).

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

Foram realizadas três repetições para cada tratamento, uma testemunha relativa com a aplicação de 10 μL de DMSO e como padrão de comparação, utilizou-se uma solução de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ do antibiótico cloranfenicol (CL) (OGUNWANDE et al., 2005).

As placas foram incubadas invertidas em BOD 37 °C por 24 horas, e, posteriormente, foram realizadas medições diametralmente opostas dos halos de inibição formados.

A partir dos diâmetros obtidos, pôde-se avaliar o perfil de susceptibilidade das bactérias nas diferentes concentrações do óleo essencial. O teste foi realizado em triplicata. Definiu-se a concentração inibitória mínima (CMI) como a menor concentração de óleo essencial em que ocorreu a presença de halo de inibição.

3.5.2 Avaliação do efeito inibitório do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart. sobre fungos filamentosos

A análise do efeito inibitório do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart. sobre fungos filamentosos foi realizada utilizando o teste de difusão em disco aceito pelo Food and Drug Administration (FDA) e estabelecido como padrão pelo NCCLS (2003). Foi utilizado um inóculo na concentração de 10^6 esporos/mL, com contagem em câmara de Neubauer. Posteriormente, esse inóculo foi transferido para a placa contendo meio *extract malt Agar* (MEA) pela técnica de espalhamento em superfície. Discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro embebidos com 10 μ L dos óleos nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81; 3,90 e 0 μ g mL⁻¹ foram colocados sobre o meio de cultura, como sugerido por Karaman et al. (2003).

Como testemunha relativa, foi utilizado disco de papel de filtro de 6 mm de diâmetro embebido com 10 μ L de DMSO, e como padrão de comparação, utilizou uma solução de hipoclorito de sódio 2%. As placas foram incubadas invertidas em BOD 25 °C por 72 horas, sendo, então, realizadas medições diametralmente opostas dos halos de inibição formados.

A partir dos diâmetros obtidos, pôde-se avaliar o perfil de susceptibilidade dos fungos filamentosos nas diferentes concentrações do óleo essencial. O teste foi realizado em triplicata. Definiu-se a concentração inibitória mínima (CMI) como a menor concentração de óleo essencial em que ocorreu a presença de halo de inibição.

3.5.3 Avaliação dos dados e análise estatística

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

3.5.4 Atividade antiocratoxigênica

A atividade antiocratoxigênica do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart. foi avaliada pela inibição da produção de ocratoxina A, como descrito por Wang et al. (2012), fungo *Aspergillus carbonarius* em meio de cultura. Para a obtenção do inóculo, esse isolado foi transferido para placas contendo o meio de cultura Ágar Czapeck e incubados a 25 °C por 7 dias. Após esse período, foi preparada a suspensão de esporos em água destilada estéril contendo 0,5% de Tween 80. A câmara de Neubauer foi utilizada para a determinação da concentração final de esporos (10^7 esporos/mL).

O plaqueamento foi realizado inoculando-se 10 µL da suspensão de esporos no centro da placa contendo o meio Ágar Czapeck (CYA) com diferentes concentrações do óleo essencial diluído em DMSO. As concentrações testadas foram de 0,05; 0,04; 0,03; 0,02; 0,01 e 0,001 %, que correspondem a 0,5; 0,4; 0,3; 0,2; 0,1 e 0,01 µg mL⁻¹, respectivamente (JHAM et al., 2005; WANG; CHEN; CHANG, 2005; VIEGAS et al., 2005).

Como padrão de comparação, 10 µL da suspensão de esporos foram adicionados à placa contendo apenas o meio Ágar Czapeck (CYA). Todas as placas foram incubadas em BOD a 25 °C, no escuro. Essas análises foram realizadas em triplicata.

3.5.4.1 Extração da ocratoxina A das amostras

A extração da OTA foi realizada no 10º dia do período de incubação dos esporos fúngicos, de acordo com a metodologia descrita por Bragulat, Abarca e Cabanes (2001), com algumas modificações.

Para a realização do procedimento, três pedaços do micélio do fungo com agar foram removidos da área interna, meio e externa de cada uma das placas. Para a remoção dos plugs, foram feitos cortes circulares de aproximadamente 10 mm de diâmetro, com auxílio de ponteiras estéreis de 100 µL. Esses pedaços foram pesados e colocados em tubos de ensaio envolvidos por papel-alumínio, para evitar a degradação da OTA. Foi adicionado 1 mL de metanol nos tubos de ensaio, os quais foram, então, homogeneizados por 5 segundos e incubados a 25 °C por 60 minutos. Os extratos foram filtrados em unidades filtrantes de PTFE (0.22 µm) e, então, analisados por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), de forma a quantificar a OTA presente.

3.5.4.2 Condições cromatográficas utilizadas na quantificação da OTA por CLAE

Utilizou-se um cromatógrafo líquido de alta eficiência (CLAE), em HPLC Shimadzu, equipado com duas bombas de alta pressão, modelo SPD-M20A, degaseificador modelo DGU 20A₃, interface modelo CBM-20A, injetor automático modelo SIL-10AF e detector de fluorescência RF-10 A_{XL}. A coluna usada foi a Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 x 250 mm, 5 µm) conectada a uma pré-coluna Agilent-Zorbax Eclipse XDB-C18 4-Pack (4,6 x 12,5mm, 5µm).

Foram seguidas as condições cromatográficas de comprimentos de onda; excitação de 332 nm e emissão de 476 nm. O fluxo utilizado em toda a análise foi de 0,8 mL min⁻¹ e o volume injetado das amostras e do padrão foi de 20 µL. A eluição foi realizada em sistema isocrático de 35:35:29:1 (metanol :

acetonitrila : água : ácido acético). O tempo de retenção médio obtido para OTA foi de $11 \pm 0,1$ min.

3.5.4.3 Determinação da concentração da solução-estoque e preparo da curva analítica para a OTA

A curva analítica foi preparada baseando-se no método descrito pelo comitê de normalização para a análise de OTA em vinho e cerveja (COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION, CEN, 2003). Utilizou-se uma solução-estoque previamente preparada, dissolvendo-se o padrão comercial de OTA (O1877, Sigma) em tolueno/ácido acético (99:1, v/v). A concentração da solução-estoque foi determinada por medição da absorbância UV a 333 nm e calculada segundo ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS, AOAC (2002) em 136% de OTA.

Após a determinação da concentração da solução-estoque, foram preparadas, por diluição, soluções-padrão com concentrações de 0,001; 0,01; 0,025; 0,1 e 0,15 $\mu\text{g/g}$, que foram analisadas por CLAE em simultâneo com as amostras. Regularmente, novos padrões foram preparados e injetados, de forma a verificar e ajustar a curva analítica.

3.5.4.4 Quantificação da OTA por CLAE

A quantificação da OTA nas amostras foi realizada pela construção de uma curva analítica obtida por regressão linear, correlacionando a área do pico versus a concentração da respectiva solução-padrão. Durante a realização dos testes, outras curvas foram feitas para a verificação do coeficiente de correlação (r^2) aceitável de 0,99, recomendados pela ANVISA (BRASIL, 2003).

Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) foram estimados por meio dos parâmetros obtidos para a curva analítica construída, sendo calculados

pelas respectivas relações matemáticas: $LD = 3DP/m$ e $LQ = 10DP/m$ (em que, DP = estimativa do desvio-padrão da linha de regressão e m = coeficiente angular da linha de calibração) (HARRIS, 2008).

3.5.4.5 Avaliação dos dados e análise estatística

Os resultados foram plotados em gráficos de barras, expressos na forma de média \pm desvio-padrão, com os valores da concentração de OTA, em relação às concentrações analisadas, empregando o software Graph Pad Prism versão 5.01, sendo utilizadas três repetições.

Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias, comparadas pelo teste de Tukey ao nível de 5% de probabilidade. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR (FERREIRA, 2011).

3.6 Atividade hemolítica

A avaliação da atividade hemolítica do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart. foi realizada no Laboratório de Bioquímica do DQI/UFLA. Para a realização do experimento, utilizou-se o sangue do próprio autor do trabalho, que foi coletado no Laboratório de Análises Clínicas da UFLA, em tubos Vacutainer® com capacidade de 10 mL contendo heparina sódica.

A suspensão de eritrócitos foi preparada utilizando-se 10 mL de sangue, com 3 repetições. Posteriormente, essa alíquota foi centrifugada por 5 minutos a 900 g, em uma centrífuga de bancada de cruzeta horizontal (Fanem Baby®I Modelo 206 BL). O plasma, contendo plaquetas, células brancas e lipídios, foi removido por aspiração. As células vermelhas foram ressuspensas em tampão fosfato (PBS) 5 mM, pH 7,4, tampão de osmolaridade e pH fisiológicos, sendo novamente centrifugadas nas mesmas condições. Após três repetições

consecutivas desse processo, obteve-se um concentrado de hemácias, que foi mantido sob refrigeração (4 °C). Esse concentrado de hemácias, com concentração de 100% [100% de hematócrito (Ht)], foi diluído para hematócritos diferentes com o mesmo tampão: Ht 2,0% (13µM de lipídios) (PRETÉ et al., 2011).

3.6.1 Teste hemolítico em meio isotônico

A determinação da resistência à hemólise foi acompanhada pela incubação das suspensões de eritrócitos (Ht-2,0%) em solução isotônica (PBS) com diferentes concentrações do óleo essencial (2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 40,0 µL mL⁻¹), sendo o teste realizado em triplicata.

Após incubação (60 minutos a 37 °C), as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 g (Fanem Baby®I Modelo 206 BL) e a concentração de hemoglobina no sobrenadante, determinada espectrofotometricamente a 412 nm (Shimadzu UV-160 1 PC). Foram realizadas medidas em triplicatas para cada concentração do óleo essencial e também para os seguintes controles: no primeiro (c1), foram utilizados eritrócitos em PBS (controle de hemólise mecânica) e, no segundo (c2), foram utilizados eritrócitos em água destilada (controle de hemólise total) (PRETÉ et al., 2011).

O efeito hemolítico (% de hemólise) foi acompanhado medindo-se a concentração de hemoglobina no sobrenadante, de acordo com a equação abaixo:

$$\% \text{ hemólise} = \frac{A_a - A_{c1}}{A_{c2} - A_{c1}} \times 100$$

Em que A_a , A_{c1} e A_{c2} , são, respectivamente, as absorvâncias da amostra, dos controles c1 e c2, em 412 nm.

3.6.1.1 Avaliação dos dados e análise estatística

A porcentagem de hemólise em relação às concentrações analisadas foi estimada pela equação de regressão analisada, empregando o software Origin 8, sendo utilizadas três repetições.

3.6.2 Avaliação da oxidação da hemoglobina

Adicionalmente ao teste hemolítico em meio isotônico, foram realizadas varreduras nos comprimentos de onda de 500 a 700 nm, para avaliar se houve a oxidação da hemoglobina (PRETÉ et al., 2011).

A hemoglobina purificada na mesma concentração do Ht 2,0% foi incubada com diferentes concentrações dos óleos essenciais (2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 40,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Após incubação de 60 minutos a 37 °C, as amostras foram centrifugadas por 5 minutos a 1500 g (Fanem Baby®I Modelo 206 BL) e a absorvância da hemoglobina presente no sobrenadante, determinada espectrofotometricamente nos comprimentos de onda de 500 a 700 nm (Shimadzu UV-160 1 PC). O teste foi realizado em triplicata.

3.6.2.1 Avaliação dos dados e análise estatística

Os resultados foram plotados em gráficos bidimensionais, empregando o software Origin 8, sendo no eixo y a absorvância das amostras e no eixo x os comprimentos de 500 a 700 nm, sendo utilizadas três repetições.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento e caracterização química do óleo essencial

O valor médio do teor de rendimento obtido neste estudo para a espécie *Lychnophora pinaster* Mart. foi de 0,25% (BLU).

Reis et al. (2010), estudando a variação da composição química do óleo essencial da espécie de *L. pinaster* Mart. cultivada na cidade de Lavras-MG, colhida em diferentes estações do ano, obtiveram um rendimento de 0,29% na mesma época do presente estudo, e 0,57% no inverno (BLU), sendo o primeiro valor próximo ao encontrado neste estudo.

Valores superiores ao encontrado neste trabalho foram relatados por Isobe (2012), em que o rendimento médio de óleo essencial obtido na população denominada Poço Bonito, localizada em Lavras (MG), foi de 1,11% no inverno e 0,92% no verão; na população denominada Areia Branca, em Carrancas (MG), o rendimento foi de 0,5% no inverno e 0,43% no verão; para a população Serra do Sofá, em Itumirim (MG), os valores obtidos foram de 0,83% no inverno e 1,15% no verão. Ao comparar o rendimento do óleo essencial de *L. pinaster* Mart. obtido neste estudo com os dados descritos por Isobe (2012), observa-se uma diferença significativa no teor de rendimento do óleo essencial. Ressalta-se que a população denominada Serra do Sofá é a mesma utilizada pela autora.

As variações observadas no rendimento dos óleos essenciais justificam-se pelo fato de as colheitas terem sido realizadas em diferentes épocas. Burt (2004) atribui essas variações a fatores como: tipo de solo e clima da região, tempo de secagem e umidade relativa do ar no dia da colheita.

A análise por cromatografia em fase gasosa acoplada ao espectrômetro de massas identificou 21 constituintes presentes no óleo essencial de *L. pinaster* Mart., totalizando 99,6% da sua composição. Os resultados obtidos para a

caracterização química do óleo essencial estão apresentados na Tabela 1 e o cromatograma correspondente encontra-se em anexo (Figura 1A, APÊNDICE A).

Pelos dados apresentados na Tabela 1, observa-se que o componente majoritário do óleo essencial de *L. pinaster* Mart. foi o *trans*-cinamato de metila (62,1%). Outros constituintes encontrados foram os sesquiterpenos *trans*-cariofileno (21,1%), α -humuleno (6,2%) e óxido de cariofileno (2,2%), e os monoterpenos α e β -pineno (3,1 e 4,6%, respectivamente) (Figura 12). Os demais constituintes identificados foram encontrados em valores inferiores a 0,5%. Constatou-se a predominância do fenilpropanoide (62,1%), seguido de hidrocarbonetos sesquiterpênicos (27,7%), hidrocarbonetos monoterpênicos (7,7%) e sesquiterpenos oxigenados (2,6%).

Tabela 1 Composição química do óleo essencial *L. pinaster* Mart.

Pico	IR	Composto	%
1	921	Triciclano	V
2	930	α -pineno	3,1
3	958	Sabineno	V
4	963	β -pineno	4,6
5	975	β -mirceno	V
6	1002	α -terpineno	V
7	1003	<i>p</i> -cimeno	V
8	1005	β -felandreno	V
9	1009	Limoneno	V
10	1017	<i>cis</i> - β -ocimeno	V
11	1035	γ -terpineno	V
12	1148	terpinen-4-ol	V
13	1159	α -terpineol	V
14	-	<i>cis</i> -cinamato de metila	V
15	1346	<i>trans</i> -cinamato de metila	62,1
16	1414	<i>trans</i> -cariofileno	21,1
17	1447	α -humuleno	6,2
18	1561	óxido de cariofileno	2,2
19	-	epóxido de humuleno II	V
20	1611	cariofila-4(14),8(15)-dien-5- α -ol	0,4
21	-	cariofila-4(14),8(15)-dien-5- β -ol*	V
Total identificado			99,6%
Componentes agrupados			
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos			27,2%
Hidrocarbonetos monoterpênicos			7,7%
Monoterpenos contendo oxigênio			V
Sesquiterpenos contendo oxigênio			2,6%
Fenilpropanoides			62,1%

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

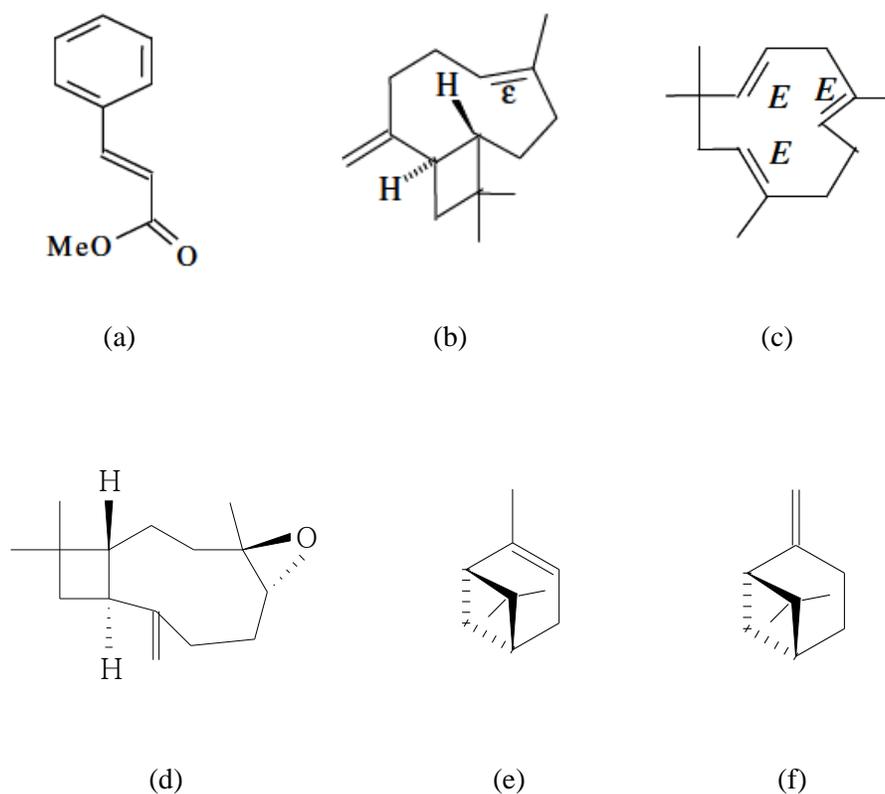


Figura 12 Estruturas químicas dos componentes majoritários do óleo essencial de *L. pinaster* Mart.; (a) *trans*-cinamato de metila, (b) *trans*-cariofileno, (c) α-humuleno, (d) óxido de cariofileno, (e) α-pineno e (f) β-pineno

Isobe (2012), avaliando o efeito da sazonalidade sobre a variação da composição química do óleo essencial de *L. pinaster* Mart., encontrou como componente majoritário o *trans*-cinamato de metila, tendo observado variações de 61,27% (População Areia Branca, Carrancas-MG, coleta de inverno) a 80,86% (População Poço Bonito, Lavras-MG, coleta de verão). Na população denominada Serra do Sofá (Itumirim-MG), a mesma utilizada neste trabalho,

observou-se que as porcentagens do *trans*-cinamato de metila variaram entre 63,19% no inverno e 73,03% no verão. Os constituintes minoritários encontrados pela autora também foram identificados no óleo essencial utilizado neste estudo, corroborando com os resultados obtidos.

Anteriormente, Reis et al. (2010), avaliando o efeito da sazonalidade sobre a variação da composição química do óleo essencial de *L. pinaster* Mart., observou que a menor proporção relativa do constituinte majoritário, *trans*-cinamato de metila, foi obtida no período da primavera (86,3 %), e a maior, no verão (93%).

Haber (2009), realizando estudos sobre a variabilidade genética e química de populações nativas e cultivadas de *L. pinaster* Mart., encontrou variações na composição química dos óleos essenciais. O constituinte majoritário presente no óleo essencial extraído da espécie coletada na região denominada População Estrada Real (Carrancas-MG) foi o *trans*-cinamato de metila (61,07%). Na população Antena (Lavras-MG), o composto encontrado em maior proporção foi o cedr-8(15)-en-9-alfa-ol (25,22%). Para as populações Estrada Real 1 (Carrancas-MG) e Poço Bonito (Lavras-MG), o constituinte majoritário encontrado foi o *trans*-cinamato de metila, perfazendo um total de 75% e 82%, respectivamente. Nas espécies cultivadas, foram detectados como componentes majoritários o *trans*-cinamato de metila e o *trans*-cariofileno para todas as colheitas (verão, outono e inverno), tendo observado diferenças somente em relação à proporção relativa dos componentes dos óleos essenciais.

Com base nos dados obtidos nos estudos mencionados, observa-se que, assim como neste estudo, o constituinte majoritário encontrado para os óleos essenciais das populações de *L. pinaster* Mart., com exceção da população de Antena, foi o *trans*-cinamato de metila, um fenilpropanoide biossintetizado pela via chiquimato; porém, pôde-se observar variações na proporção relativa dessa substância no que concerne às diferentes populações e épocas de colheita.

Os dados obtidos por Haber (2009) corroboram parcialmente com os encontrados neste estudo, visto que não foi observada a presença do sesquiterpeno cedr-8-(15)-en-9-alfa-ol, como descrito pelo autor para a mesma espécie, além de ter sido constatada a presença de constituintes minoritários diferentes dos encontrados para a população utilizada neste estudo.

As variações quantitativas e qualitativas na composição química e nos teores de rendimento do óleo essencial podem ser atribuídas a diversos fatores, como a qualidade dos solos, umidade do ar, temperatura, precipitação, métodos de extração e tempo de destilação do óleo essencial, idade da planta, eventos fenológicos, além da diversidade genética da espécie, herbivoria, injúria física e outras formas de estresse (SILVA et al., 2006).

De acordo com Gobbo-Neto; Albuquerque e Lopes (2007), a época de colheita é um dos fatores mais importantes no que concerne a variações na composição química dos constituintes dos óleos essenciais, haja vista que variações na quantidade e até mesmo na natureza dos constituintes ativos de algumas espécies vegetais não são constantes durante o ano. Reis et al. (2010) e Isobe (2012) relatam variações sazonais na maioria dos constituintes dos óleos essenciais.

Alterações na composição química dos fenilpropanoides podem ser promovidas durante a sua biossíntese nos óleos essenciais. A biossíntese desses metabólitos ocorre através da via chiquimato, sendo regulada por vários grupos de reações enzimáticas promovidas por enzimas ligadas às membranas celulares (DIXON et al., 1992).

A principal enzima da via do ácido chiquímico é a fenilalanina amônio liase (PAL). Essa enzima retira uma amônia da fenilalanina, formando o ácido cinâmico. Ela é considerada o ponto intermediário entre o metabolismo primário e secundário (para a rota metabólica dos fenilpropanoides). A PAL é regulada por fatores ambientais, como o nível nutricional, a luz (pelo efeito do

fitocromo), infecção por fungos, idade da planta, fatores de crescimento, herbivoria, danos ao tecido vegetal, ataque de patógenos, irradiação UV e baixa temperatura; porém, ainda é difícil determinar a influência exata na quantificação da expressão gênica dessa enzima (ZIAEI et al., 2012).

Segundo Wang et al. (2012), as variações na composição química dos terpenos presentes nos óleos essenciais podem ser decorrentes das condições do ambiente e do desenvolvimento da planta, o que dificulta a criação de modelos de produção desses compostos, sob as mais variadas condições ambientais.

4.2 Atividades microbiológicas do óleo essencial

4.2.1 Atividade antibacteriana

Os valores referentes às concentrações mínimas inibitórias (CMIs) do óleo essencial obtidas no experimento para as bactérias em estudo estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 Concentração mínima inibitória do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart. encontrada para os micro-organismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella Choleraesuis*.

Bactéria	Gram	CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
		<i>Lychnophora pinaster</i>	DMSO	CL
<i>S. aureus</i> ATCC 13565	+	NI	NI	100
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117	+	NI	NI	100
<i>E. coli</i> ATCC 11229	-	NI	NI	100
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 15442	-	NI	NI	100
<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 6539	-	31,25	NI	100

*NI: não ocorreu inibição, CL: Cloranfenicol, DMSO: dimetilsulfóxido.

O óleo essencial de *L. pinaster* Mart. apresentou atividade somente sobre a bactéria Gram-positiva *Salmonella Choleraesuis*, na concentração de $31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 1B, Apêndice B). De acordo com Aligianis (2001), é possível classificar a atividade antibacteriana de produtos vegetais com base nos valores da CMI, sendo a CMI até $500 \mu\text{g/mL}$ considerada forte inibição; entre 600 e $1500 \mu\text{g/mL}$, considera-se inibição moderada; acima de $1600 \mu\text{g/mL}$, a inibição é considerada fraca. Com base nessa referência, o óleo essencial de *L. pinaster* Mart. pode ser considerado um forte inibidor da *Salmonella Choleraesuis*, uma vez que a CMI encontrada para o micro-organismo foi menor que $500 \mu\text{g/mL}$, como descrito na Tabela 2.

O resultado obtido neste estudo difere da maioria dos estudos, nos quais se relatam que bactérias Gram-positivas são mais sensíveis a óleos essenciais do

que as Gram-negativas. Essa característica está associada à estrutura desses micro-organismos, constituída de uma membrana externa que encobre a parede celular, restringindo a difusão de compostos hidrofílicos através da camada lipossacarídica. Contudo, pequenos solutos hidrofílicos são capazes de passar por essa membrana externa por meio de poros hidrofílicos formados por canais de proteínas de membranas. Dessa maneira, considera-se que a membrana externa sirva como uma barreira de penetração para macromoléculas e compostos hidrofóbicos, e é por essa razão que bactérias Gram-negativas são relativamente resistentes a antibióticos e outras drogas hidrofóbicas, assim como os óleos essenciais (MANN; COX; MARKHAM, 2000; DORMAN; DEANS, 2000; BURT, 2004).

Andrade (2013) observou que o óleo essencial de *Philodendron bipinnatifidum* Schott apresentou atividade somente sobre a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*. Nesse mesmo estudo, o autor observou que o óleo essencial de *C. ambrosioides* L. apresentou maior valor de CMI para a bactéria *Listeria monocytogenes* (Gram-positiva).

Apesar de os óleos essenciais apresentarem dificuldade de se difundir uniformemente pelo meio de cultura devido à sua natureza hidrofóbica, a sua alta volatilidade contribui para a formação de halos de inibição, tornando a técnica de difusão em ágar um método válido na determinação da atividade antimicrobiana (INOUE et al., 2006).

A técnica de difusão em ágar é a mais utilizada entre as várias técnicas de determinação de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, pois por meio dessa técnica, é possível avaliar o grau de inibição do crescimento microbiano. A eficiência do óleo é determinada pelo tamanho da zona de inibição formada na superfície em volta da cavidade ou disco (KALEMBA; KUNICKA, 2003).

De acordo com Bakkali et al. (2008), as propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais devem-se principalmente à característica hidrofóbica dos

constituintes químicos da sua composição. A lipofilicidade do óleo essencial permite uma interação entre os constituintes dos óleos essenciais e os lipídeos da membrana celular, interferindo na sua permeabilidade e causando alterações em sua estrutura (COSTA et al., 2011); porém, a atividade antibacteriana dos óleos essenciais, devido à sua complexa constituição, não pode ser explicada por um único mecanismo de ação, uma vez que todos os componentes da célula bacteriana tornam-se possíveis alvos de atuação desses óleos, conforme Figura 12 (CARSON; MEE; RILEY, 2002).

Segundo Burt (2004), os óleos essenciais podem ocasionar degradação da parede celular, danos à membrana citoplasmática e às proteínas da membrana, vazamento do conteúdo celular, coagulação do citoplasma e diminuição da força próton motiva (Figura 13).

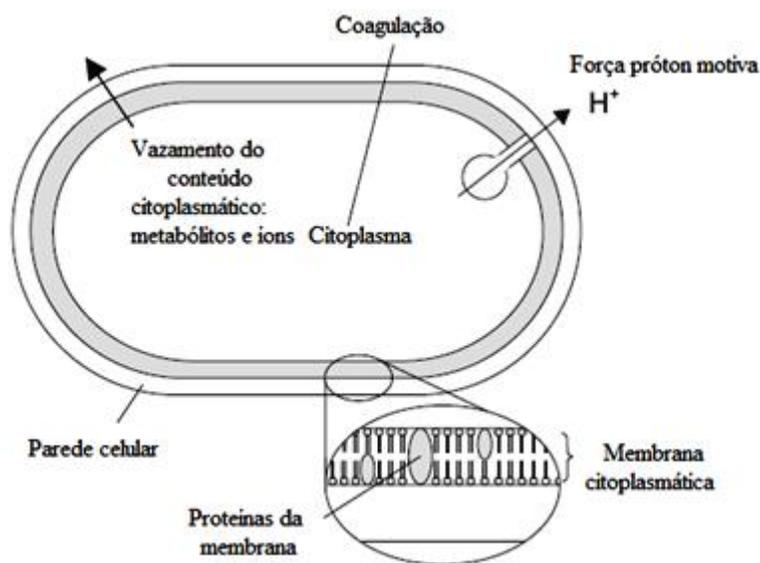


Figura 13 Mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula bacteriana
Fonte: Adaptado de Burt (2004)

A atividade antimicrobiana exercida por terpenos e derivados tem sido descrita em pesquisas que envolvem diversas espécies de plantas e microorganismos testados. Segundo Greay e Hammer (2011), os monoterpênicos interferem na integridade e funcionamento da membrana celular, pela mudança de potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória. A exposição a terpenos pode interferir na expressão de genes codificadores de fatores de virulência, como quando consideradas linhagens de *S. aureus* produtoras de enterotoxinas, e na expressão de proteínas citoplasmáticas e de membrana em *Salmonella* enterica (DI PASQUA et al., 2010). Ao investigar a atividade antimicrobiana de sesqui e diterpenos isolados da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) sobre bactérias cariogênicas, Souza et al. (2011) descreveram uma maior eficiência para os compostos com apenas um grupo hidrofílico, comparativamente aos que apresentaram dois grupos.

O *trans*-cinamato de metila, constituinte majoritário presente no óleo essencial de *L. pinaster* Mart., é capaz de inibir a atividade da tirosinase, que causa o escurecimento por oxidação enzimática, podendo ser aplicado em frutas e vegetais para impedir a perda da qualidade desses alimentos. Essa ação foi confirmada por Huang et al. (2009), além de constatarem a atividade antimicrobiana do *trans*-cinamato de metila contra *E. coli*, *B. subtilis*, *St. aureus* e *C. albicans*.

Os constituintes pertencentes à classe dos sesquiterpenos, como o *trans*-cariofileno encontrado no óleo essencial em estudo, têm mostrado notável atividade antibacteriana (OZÜRK et al., 2009).

O α -humuleno, um dos constituintes presentes no óleo essencial em estudo, também apresenta atividade antibacteriana e antifúngica, além de atividades anti-inflamatória e antitumoral. O uso mais reconhecido dessa substância, associada ao *trans*-cariofileno, é como princípio ativo do fitomedicamento, que tem em sua constituição o óleo essencial de *Cordia*

verbenácea, utilizado no tratamento de afecções cujo processo inflamatório esteja presente (SCHMIDT; LIANZA, 2010).

Apesar de pesquisadores comprovarem a ação isolada de vários constituintes presentes na composição química do óleo essencial de *L. pinaster* Mart. como antibacterianos, outros fatores devem ser levados em consideração para se atribuir a atividade antibacteriana a um óleo essencial, como o sinergismo entre os componentes. Esse fato pode ser utilizado para justificar a ineficiência do óleo utilizado neste estudo, diante dos outros micro-organismos testados.

4.2.2 Efeito inibitório do óleo essencial sobre fungos filamentosos

Os valores referentes às concentrações mínimas inibitórias (CMIs) obtidos para a avaliação da atividade antifúngica sobre os fungos *A. niger*, *A. flavus* e *A. carbonarius*, utilizando a metodologia de difusão em disco, estão expressos na Tabela 3.

Tabela 3 Concentração mínima inibitória do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart. sobre aos micro-organismos *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus* e *Aspergillus carbonarius*.

Fungo	CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	<i>Lychnophora pinaster</i> Mart.	DMSO	HP
<i>A. niger</i>	31,25	NI	100
<i>A. flavus</i>	31,25	NI	100
<i>A. carbonarius</i>	62,50	NI	100

*NI: não ocorreu inibição, HP: hipoclorito de sódio, DMSO: dimetilsulfóxido.

Os valores da CMI indicam que os fungos *A. níger* e *A. flavus* apresentaram sensibilidade em uma concentração $\leq 31,25 \mu\text{g mL}^{-1}$, sendo o *A. carbonarius* menos sensível, com a CMI de $62,50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Figura 1C, Apêndice C).

Rasooli et al. (2006) observaram que o óleo essencial de *A. conyzoides* apresentou atividade antifúngica contra *A. flavus*, acarretando alterações morfológicas deletérias na estrutura dos fungos.

Nogueira (2009), avaliando a interferência do óleo essencial de mentrasto no crescimento do *A. flavus*, observou que diferentes concentrações do óleo essencial atravessa não só a parede celular, mas também a membrana plasmática, interagindo em seguida, com as estruturas membranosas citoplasmáticas das organelas.

Trombeta et al. (2005) atribuíram a eficiência da ação dos óleos essenciais aos monoterpenos. De acordo com os autores, muitos terpenos são conhecidos por serem ativos contra uma ampla variedade de micro-organismos, incluindo os fungos. Essas substâncias desencadeiam efeitos tóxicos na estrutura e na função das membranas das células dos micro-organismos, como, por exemplo, alterações na fluidez e permeabilidade e interação com componentes internos da célula, ações essas explicadas principalmente pelo caráter lipofílico dessas substâncias.

Segundo Thevissen et al. (2003), a membrana dos fungos é formada por vários constituintes, entre eles o esteroide ergosterol (Figura 14). Esse composto desempenha um papel fundamental na sobrevivência do micro-organismo, uma vez que se apresenta como modulador de fluidez da membrana fúngica; qualquer ação sobre esse elemento desencadeia um desequilíbrio na fluidez da membrana plasmática dos fungos, promovendo alterações na homeostase intracelular.

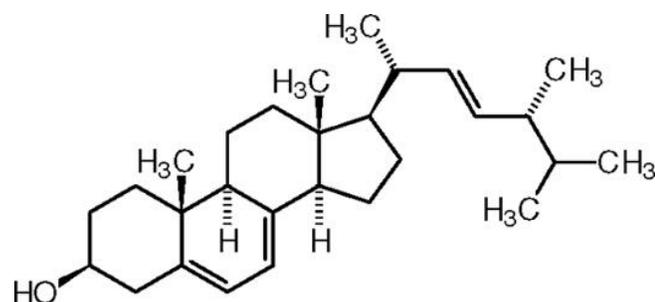


Figura 14 Estrutura química do ergosterol

De forma geral, qualquer alteração que interfira na composição da membrana plasmática celular microbiana estará tornando-a desprovida de uma organela essencial ao equilíbrio homeostático, condição fundamental para o seu ótimo funcionamento fisiológico. Assim, uma alteração nessa estrutura celular pode vir a tornar o ambiente microbiano intracelular incompatível com a sua sobrevivência (SOUZA et al., 2011)

Abyaneh et al. (2008) constataram que alterações na permeabilidade da célula fúngica, ocasionadas pelas alterações da membrana plasmática, resultaram na diminuição dos micélios e formação de vesículas nas membranas vinculadas no interior das células. Além disso, foi observada a alteração nas membranas de organelas, principalmente das mitocôndrias, além de ruptura nas membranas do núcleo e retículo endoplasmático. Alterações na membrana plasmática e nas mitocôndrias também foram relatados por Rasooli, Rezaei e Allameh (2006) que, neste caso, investigaram a ação do óleo essencial de duas espécies de *Thymus* sobre o fungo *A. niger*.

4.3 Atividade antiocratogênica

A quantificação da ocratoxina A (OTA) nas amostras foi realizada por meio da construção de uma curva analítica obtida por regressão linear, sendo 0,9999 o coeficiente de determinação (r^2) obtido. Os limites de detecção (LD) e quantificação (LQ) estimados foram de 0,0004 e 0,0016 $\mu\text{g/g}$, respectivamente.

O efeito de diferentes concentrações do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart. sobre a produção de OTA está apresentado na Figura 15, o cromatograma correspondente ao padrão de OTA está representado na Figura 16, e os cromatogramas correspondentes encontram-se em anexo (Figura 1D, APÊNDICE D). A análise de variância mostrou que houve diferença significativa entre as concentrações de OTA produzidas (Tabela 1D, APÊNDICE D).

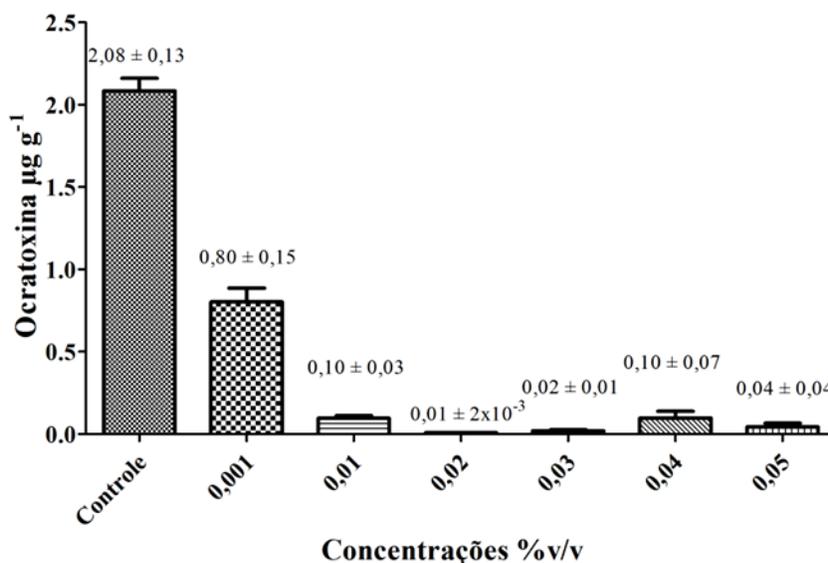


Figura 15 Efeito das concentrações do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart. sobre a produção de OTA pelo fungo *A. carbonarius*

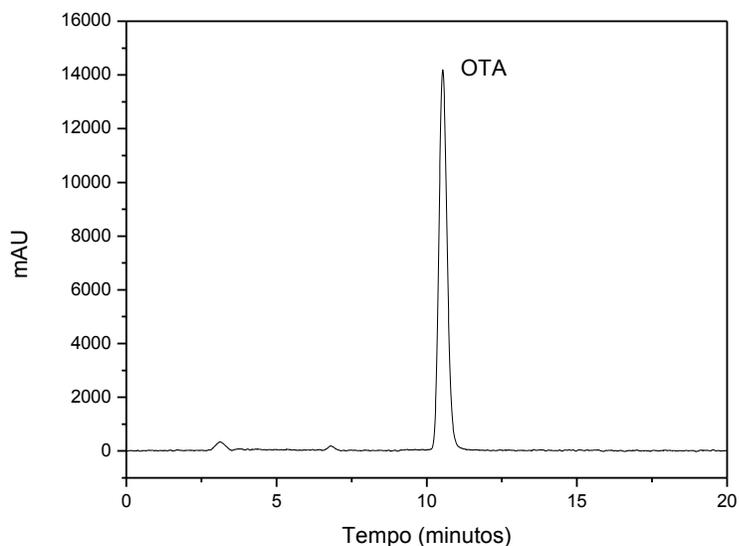


Figura 16 Cromatograma do padrão da OTA (0,1 µg/g)

Pelos dados da Figura 15, observa-se que a concentração de OTA produzida pelo *A. carbonarius* foi inversamente proporcional à concentração do óleo essencial de *L. pinaster* Mart., ou seja, o aumento na concentração do óleo essencial ocasionou a diminuição da produção de OTA. Verificou-se que todas as concentrações do óleo essencial testadas apresentaram diferença significativa na produção da OTA, quando comparadas ao controle (meio de cultura insento de óleo essencial).

Grande parte das micotoxinas representa um grave risco para a saúde pública, pelo fato de serem ubíquas em uma grande variedade de produtos agroalimentares. Embora existam inúmeros trabalhos relacionados à atividade de extratos e óleos essenciais sobre a produção de aflatoxinas, não se encontram na literatura trabalhos que relatem a influência de óleos essenciais e extratos na produção de ocratoxina A (OTA). Vários autores relatam o controle da OTA

mediante a degradação promovida por micro-organismos ou pela ação enzimática.

Sabe-se que a produção de micotoxinas ocorre via metabolismo secundário dos fungos, à medida que atinge a maturidade. Vários autores relatam que a produção da OTA pelo fungo ocorre mediante condições adequadas de temperatura, pH e atividade de água. Mitchell et al. (2004) descrevem que as condições ótimas para a produção de OTA por *A. carbonarius* são de 15-20 °C e de 0,95-0,98 a_w. Contudo, também encontram-se na literatura estudos relatando maiores produções de OTA como resultado do estresse ao qual o fungo pode ser submetido durante seu ciclo de vida, como variações bruscas das condições ambientais favoráveis ao seu desenvolvimento.

Observou-se que a presença do óleo essencial de *L. pinaster* Mart. influenciou significativamente o crescimento do fungo, constatando-se a ação do óleo essencial sobre o micro-organismo. Como descrito anteriormente, de acordo com Thevissen et al. (2003), a estrutura lipoproteica da membrana fúngica é uma barreira efetiva para muitos tipos de moléculas, que a atravessam por difusão ou transporte ativo. O componente lipídico fúngico é o ergosterol, responsável por inúmeras características físicas importantes das membranas, tais como estrutura, permeabilidade e modulação da fluidez. Sua ausência causa alterações na permeabilidade da membrana plasmática e inibição do crescimento. Esse fenômeno pode ser favorecido pela natureza dos constituintes do óleo essencial, pois sabe-se que o ergosterol é um esteroide apolar; dessa forma, a presença de constituintes apolares favorecem a interação do óleo com a membrana.

Nogueira (2009), analisando a influência do óleo essencial de folhas e flores de mentrasto sobre o *Aspergillus flavus*, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, observou que a ação do óleo essencial na parede celular e nas organelas membranosas promoveu alterações na permeabilidade da

célula, devido às alterações da membrana plasmática, o que resultou na diminuição dos micélios e na formação de vesículas nas membranas vinculadas no interior das células. Esses resultados corroboram com os obtidos por Abyaneh et al. (2008). Também foi observada alteração nas membranas de organelas, principalmente das mitocôndrias, assim como a deleção e destruição dos grânulos elétrons densos.

Os resultados obtidos por Nogueira (2009) nos permitem inferir que a diminuição da produção da OTA pelo *A. carbonarius* verificada neste estudo pode estar diretamente associada às modificações observadas no desenvolvimento do fungo, promovidas pela ação do óleo essencial de *L. pinaster* Mart. Tais modificações podem estar diretamente associadas à alterações em estruturas, como as mitocôndrias, responsáveis pela maior parte da síntese de ATP em condições aeróbicas. Outro fator observado por Nogueira (2009), de fundamental relevância na elucidação da interferência do óleo essencial na produção de micotoxinas, foi a diminuição do número de micélios, visto que, segundo Hussein e Brasel (2001), as micotoxinas são produzidas principalmente pela estrutura micelial dos fungos filamentosos.

4.4 Atividade hemolítica e avaliação da oxidação da hemoglobina

Na Figura 17 apresenta-se o efeito do óleo essencial de *L. pinaster* Mart. em diferentes concentrações (2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 40,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$) em eritrócitos, em condições de osmolaridade e pH fisiológicos (PBS e pH 7,4). Neste ensaio, fixou-se a concentração de eritrócitos (Ht-2,0%) e detectou-se que apenas na concentração mais elevada o óleo essencial apresentou um efeito hemolítico próximo a 100%.

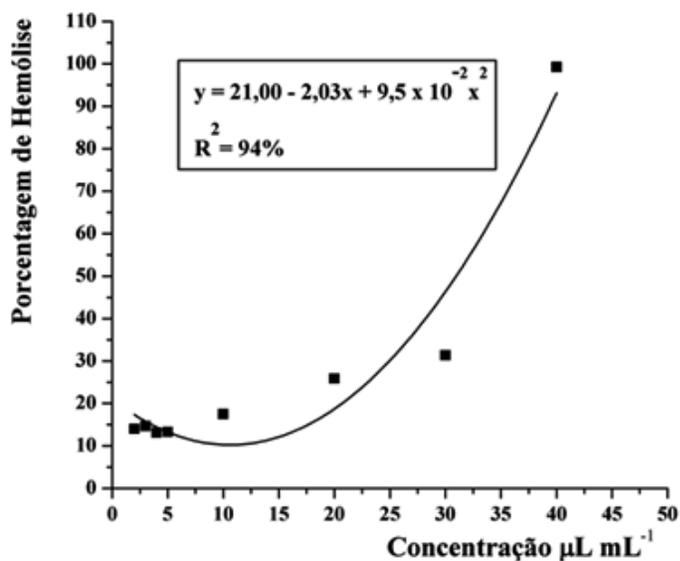


Figura 17 Equações de regressão para porcentagem de hemólise promovida por diferentes concentrações do óleo essencial de *L. pinaster* Mart. sobre eritrócitos íntegros (Ht 2,0%), incubados em solução isotônica (PBS, pH 7,4) a 37 °C

Verificou-se que, com o aumento das concentrações do óleo essencial, houve um aumento na porcentagem de hemólise, observando-se um comportamento linear para o óleo essencial de *L. pinaster* Mart.

Pelos dados obtidos, observou-se que, em menores concentrações, o efeito hemolítico do óleo essencial de *L. pinaster* Mart. foi fraco, pois este apresentou lise em menos de 40% das células eritrocitárias, nas concentrações de 2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 10,0; 20,0 e 30,0 μL mL⁻¹, indicando que a membrana eritrocitária foi capaz de absorver uma quantidade dos óleos essenciais, sem que a lise ocorresse. Somente a 40,0 μL mL⁻¹, observou-se a lise em 100% das células eritrocitárias.

Bakkali et al. (2008) relatam que essa forte ação hemolítica ocorre em decorrência da lipofilicidade dos constituintes químicos dos óleos essenciais.

Esses compostos podem reagir com as partes lipídicas das membranas celulares, tornando-as mais permeáveis, culminando, assim, na lise celular.

Klenicy et al. (2013) avaliaram o potencial hemolítico do óleo essencial extraído das folhas e dos galhos de *Endlicheria citriodora*. As concentrações estudadas variaram entre 1,22 – 625 $\mu\text{g mL}^{-1}$, nas quais não foi observada hemólise, demonstrando que esses óleos possuem baixa toxicidade, sugerindo que os compostos presentes no óleo não possuem atividade hemolítica e não causam danos às membranas.

Silva et al. (2008) avaliaram o potencial hemolítico do óleo essencial extraído das folhas da *Casearia sylvestris* em suspensões de eritrócitos 2,0% de sete tipos de hemácias diferentes (carneiro, boi, cavalo, rato, coelho, galinha e humano). Os autores encontraram resultados que indicam que essa planta tem que ser usada com cautela, pois é utilizada por povos indígenas da América do Sul no tratamento de muitas doenças, incluindo o câncer.

Losqui et al. (2009) citam que a utilização indiscriminada de produtos naturais sem testes experimentais é preocupante, pois as plantas possuem grupos de compostos farmacologicamente ativos que atuam nos organismos vivos, sendo necessário o conhecimento deles para avaliação de suas potencialidades terapêuticas e tóxicas

Tariku et al. (2011), pesquisando o potencial hemolítico dos óleos essenciais extraídos das cascas de *Artemisia absinthium* L. e tubérculos de *Echinops kebericho* Mesfin, observaram um forte efeito, pois apresentaram lise em 50% das células eritrocitárias, nas concentrações de 1,52 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 2,62 $\mu\text{L L}^{-1}$. Esses autores encontraram, da mesma forma, para os óleos essenciais extraídos das folhas de *Artemisia abyssinica* e *Satureja punctata* ssp., altas atividades hemolíticas 0,35 $\mu\text{L L}^{-1}$ e 1,52 $\mu\text{L L}^{-1}$ respectivamente.

Na Figura 18 observa-se o controle do dano oxidativo da hemoglobina, em que se utilizaram as mesmas concentrações do óleo essencial utilizadas no teste hemolítico (2,0; 3,0; 4,0; 5,0; 10,0; 20,0; 30,0 e 40,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$).

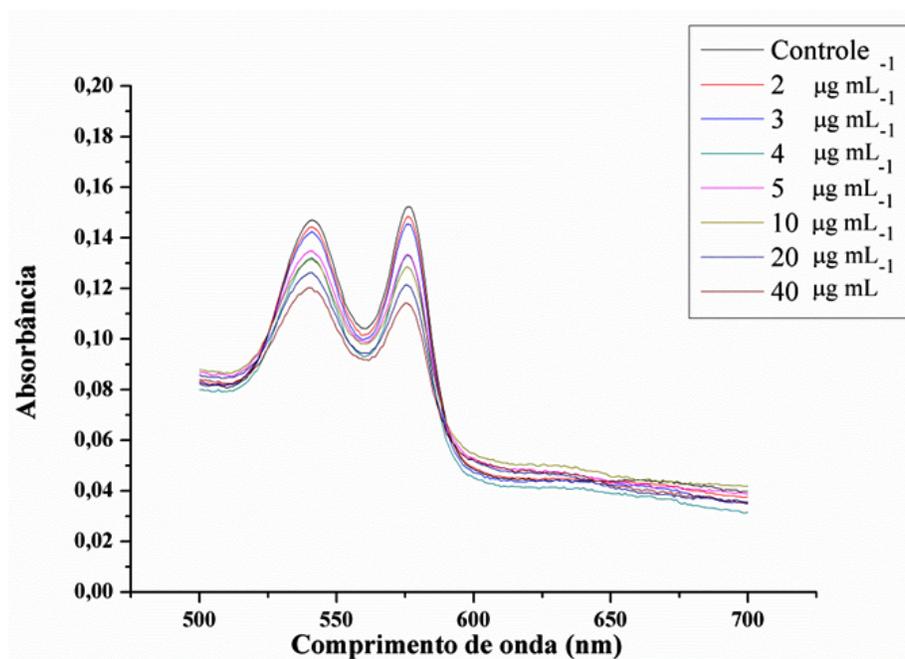


Figura 18 Espectros de absorção (500-700 nm) de hemoglobina purificada (20 μM) frente às diferentes concentrações do óleo essencial de *L. pinaster* Mart. em tampão Tris-HCl 0,1 M, pH 7,4 a 37°C

A hemoglobina como molécula “marcadora” é liberada em solução devido à saturação da membrana e, como consequência, à sua ruptura. Entretanto, a medida de lise eritrocitária pode ser afetada, pelo fato de a hemoglobina ser oxidada pela substância utilizada, alterando suas propriedades ópticas. Esse fenômeno pode ser observado diante da ocorrência de uma intensificação na coloração da hemoglobina, promovendo seu escurecimento, havendo uma cossedimentação desta, o que indica uma desnaturação proteica. Apesar de não ter sido visivelmente observada, investigou-se a oxidação da hemoglobina por ação das diferentes concentrações dos tratamentos utilizados.

Na Figura 18 verifica-se que não houve alteração espectral da Hb, não tendo sido observada perda de absorbância nos picos de 540 e 576 nm, nem o aparecimento de um pico em 630 nm.

A hemoglobina oxidada deve formar hemicromos (precursores dos corpúsculos de Heiss) (PLATT; FALCONE, 1995), que são insolúveis e formam os “botões”. Isso pode ser observado nos precipitados das amostras submetidas a altas concentrações dos tratamentos. Como a hemólise é medida pela absorbância da hemoglobina em solução, as leituras mais baixas são erroneamente interpretadas como indicativas de menos hemólise. A observação visual de “botões” e a coloração diferenciada da hemoglobina (mais escura) foi o primeiro indicativo de oxidação. Assim, fica evidente o efeito oxidante das concentrações mais elevadas dos tratamentos sobre a hemoglobina.

5 CONCLUSÃO

Os compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *L. pinaster* Mart. foram o *trans*-cinamato de metila (62,1%), *trans*-cariofileno (21,1%) e α -humuleno (6,2%).

A atividade antibacteriana do óleo essencial foi observada apenas para a bactéria *Salmonella Cholerasuis* na CMI de 31,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

A atividade antifúngica do óleo essencial foi observada para todos os fungos testados, visto que a inibição do crescimento dos fungos *A. niger* e *A. flavus* ocorreu na concentração de 31,25 $\mu\text{L mL}^{-1}$. O *A. carbonarius* foi mais resistente, com a CMI de 62,50 $\mu\text{L mL}^{-1}$.

A ação do óleo essencial de *L. pinaster* Mart. ocasionou alterações no desenvolvimento do *A. carbonarius*, acarretando a redução do número de micélios e, conseqüentemente, a diminuição da produção de OTA.

Pelos resultados obtidos, infere-se que o óleo essencial de *L. pinaster* Mart. apresentou baixa toxicidade a eritrócitos, sendo incapaz de promover a oxidação da hemoglobina nas concentrações testadas; porém, deve-se ressaltar que a concentração de eritrócitos utilizada neste trabalho (Ht 2,0%) é relativamente inferior à concentração de eritrócitos no sangue humano, correspondente a aproximadamente 40%, sendo assim, este um excelente resultado.

REFERÊNCIAS

ABARCA, L. et al. *Aspergillus carbonarius* as the main source of ochratoxin A contamination in dried vine fruits from the Spanish market. **Journal of food Protection**, Des Moines, v. 66, n. 3, p. 504-506, 2004.

ABYANEH, M. R. et al. Inhibitory effects of *Satureja hortensis* L. essential oil on growth and aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. **International Journal of Food Microbiology**, Grugliasco, v. 123, p. 228–233, 2008.

ADAMS, M. R.; MOSS, M. D. **Food microbiology**. 2nd ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2004. 479 p.

ALIGIANIS, N. et al. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 49, n. 9, p. 4168-4170, Aug. 2001.

ANDRADE, J. **Óleos essenciais de *Chenopodium ambrosioides* e *Philodendron bipinnatifidum* Schott: identificação e quantificação química, bioatividade e caracterização das estruturas secretoras**. 2013. 131 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 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, abr./jun. 2012.

ASCENSÃO, L. Estruturas secretoras em plantas: uma abordagem morfo-anatômica. In: FIGUEIREDO, A. C. S. et al. **Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais**. 3. ed. Lisboa: Universidade de Lisboa. Faculdade de Ciências da Portugal. Centro de Biotecnologia Vegetal, 2007. (Curso Teórico-Prático).

ASSOCIATION OF OFFICIAL AGRICULTURAL CHEMISTS. **Official methods on analysis of AOAC International**. Official Method 973.37. Thin-Layer Chromatographic Method, IUPAC-AOAC Method. Gaithersburg, 2002.

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

BANDONI, A. L.; CZEPAK, M. P. **Os recursos vegetais aromáticos no Brasil**: seu aproveitamento industrial para a produção de aromas e sabores. Vitória: EDUFES, 2008. 623 p.

BANIA, J. et al. The profiles of enterotoxin genes in *Staphylococcus aureus* from nasal carriers. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 42, n. 4, p. 315-320, Mar. 2006.

BAYMAN, P. et al. Ochratoxin production by the *Aspergillus ochraceus* group and *Aspergillus alliaceus*. **Applied Environmental Microbiology**, v. 68, p. 2.326-2.329, 2002.

BHATNAGAR, D.; YU, J.; EHRLICH, K. C. Toxins of filamentous fungi. **Chemical Immunology**, Basel, v. 81, p. 167-206, 2002.

BRAGULAT, M. R.; ABARCA, M. L.; CABANES, F. J. An easy screening method for fungi producing ochratoxin A in purê culture. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 71, n. 2/3, p. 139-144, Dec. 2001.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução – RDC Nº 7**. 18 de fevereiro de 2011. Dispõe sobre Limites Máximos Tolerados (LMT) para micotoxinas em alimentos. Disponível em:
<[HTTP://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d91966804745973d9f9bdf3fbc4c6735/RDC_07_2011.pdf?MOD=AJPERES](http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d91966804745973d9f9bdf3fbc4c6735/RDC_07_2011.pdf?MOD=AJPERES)> Acesso em: 1 jun. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **RE nº 899**. 23 de maio de 2003. Guia para validação de métodos analíticos e bioanalíticos. Disponível em:
<http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/4983b0004745975da005f43fbc4c6735/RE_899_2003_Determina+a+publica%C3%A7%C3%A3o+do+Guia+para+valida%C3%A7%C3%A3o+de+m%C3%A9todos+anal%C3%ADticos+e+bioanal%C3%ADticos.pdf?MOD=AJPERES> Acesso em: 5 maio 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília, 2010. 158 p. (Serie A. Normas e Manuais Técnicos). Disponível em:
<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/manual_doencas_transmitidas_por_alimentos_pdf.pdf> Acesso em: 5 maio 2013.

BROOKS, G. F.; BUTEL, J. S.; MORSE, S. A. **Microbiologia médica**. 21. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

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

BUZBY J. C.; ROBERTS T. The economics of enteric infections: human foodborne disease costs. **Gastroenterology**, Philadelphia, v. 136, n. 6, p. 1851–1862, maio 2009.

CALDAS, E. D.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J. N. Aflatoxinas e ochratoxina A em alimentos e riscos para a saúde humana. **Revista de Saúde Pública**, São Paulo, v. 36, n. 3, p. 319-323, 2002.

CANSIAN, R. L. et al. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essência 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.

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

COMITÉ EUROPÉEN DE NORMALISATION. **Foodstuffs-determination of ochratoxin A in wine and beer- HPLC method with immunoaffinity column clean-up**. EN 14133:2003. Brussels, 2003.

COSTA, A. R. T. et al. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 240-245, 2011.

CREPPY, E. E. et al. Synergistic effects of fumonisin B1 and ochratoxin A: are in vitro cytotoxicity data predictive of in vivo acute toxicity? **Toxicology**, v. 201, p. 115-123, 2004.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. (Ed.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. Rockville: American Society of Plant Physiologists, 2000. p. 1250-1311.

CDC. **National Center for Health Statistics**. Health, United States, 2009: With Special Feature on Medical Technology. Hyattsville, MD. 2010.

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

DI PASQUA, R. et al. Changes in the proteome of *Salmonella enterica* serovar Thompson as stress adaptation to sublethal concentrations of thymol. **Proteomics**, v.10, n.5, p. 1040-9, 2010.

DIXON, R. A. et al. Molecular biology of stress induced phenylpropanoid and isoflavonoid biosynthesis in alfalfa. **Phenolic Metabolism in Plants**, Fort Collins, v. 26, p. 91-138, 1992.

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

DUARTE, S. C.; PENA, A.; LINO, C. M. A review on ochratoxin A occurrence and effects of processing of cereal and cereal derived food products. **Food Microbiology**, London, v. 27, p. 187-198, 2010.

EUROPEAN COMMISSION. Commission Regulation (EC), N° 123/2005 of 26 January 2005. Amending Regulation (EC) N° 466/2001, as regards ochratoxin A. **Official Journal of the European Union**, 2005. Disponível em: <<http://eur-lex.europa.eu/LexUriServ/LexUriServ.do?uri=OJ:L:2005:025:0003:0005:EN:PDF>>. Acesso em: 10 fev. 2013.

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

FERREIRA, A. A. et al. Constituents of *Lychnophora pinaster* hydroalcoholic extract. **Chemistry of Natural Compounds**, New York, v. 41, n. 4, p. 466, 2005.

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

FORSYTHE, S. J. **Microbiology of safe food**. 2. ed. Oxford: Blackwell, 2010.

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

- FURLANI, R. P. Z.; SOARES, L. M. V. Revisão: Ocratoxina A em café. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 2, n.1-2, p. 1-6, 1999.
- GERMANO, P. M. L.; GERMANO, M. I. S. **Higiene e vigilância sanitária de alimentos**. São Paulo: Varela, 2003. 655 p.
- GOBBO-NETO, L.; LOPES, PEPORINE, N. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 374-381, 2007.
- GRAEL, C. F. F.; ALBUQUERQUE, S.; LOPES, J. L. C. Chemical constituents of *Lychnophora pohlii* and trypanocidal activity of crude plant extracts and isolated compounds. **Fitoterapia**, Milano, v. 76, p. 73-82, 2005.
- GRAEL, C. F. F. et al. A study of the trypanocidal and analgesic properties from *Lychnophora granmongolense* (Duarte) Semir & Leitão Filho. **Phytotherapy Research**, London, v. 14, p. 203-206, 2000.
- GREAY, S. J.; HAMMER, K. A. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, Apr. 2011. Disponível em: <<http://www.springerlink.com/content/g3125722r4132346/>>. Acesso em: 17 jan. 2013.
- GUERRA, M. F.; BERNARDO, F. A. O risco da listeriose e a identificação do perigo-revisão. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**, Lisboa, v. 99, p. 69-76, 2004.
- 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.
- GUIMARAES, L. G. 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, 2011.
- HABER, L. L. et al. Development and characterization of microsatellites markers for *Lychnophora pinaster*: a study for conservation of a native medicinal plant. **Molecular Ecology Resources**, Oxford, v. 9, n. 3, p. 811-814, May 2009.

HARRIS, D. C. **Análise química quantitativa**. 7nd ed. Tradução de Jairo Bordinhão et al. Rio de Janeiro: LTC, 2008.

HEDAYATI, M. T. et al. *Aspergillus flavus*: human pathogen, allergen and mycotoxin producer. **Microbiology**, Reading, v. 153, n. 6, p. 1677-1692, June 2007.

HUANG, Q. et al. Inhibitory effects of methyl *trans*-cinnamate on mushroom tyrosinase and its antimicrobial activities. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, p. 2565-2569, 2009.

HUSSEIN, H. S.; BRASEL, J. M. Review: toxicity, metabolism, and impact of mycotoxins on humans and animals. **Toxicology**, v. 167, n. 2, p. 101-134, 2001.

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

ISOBE, M. T. C. **Anatomia foliar e influência da sazonalidade no óleo essencial de populações de *Lychnophora pinaster* Mart.** 2012. 104 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia- Horticultura)-Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2012.

JAY, J. M. **Microbiologia de alimentos**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. 711 p.

JHAM, G. N. et al. Identification on the major fungitoxic component of *Cinnamon bark* oil. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 30, p. 404-408, 2005.

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

KAPETANAKOU, A. E. et al. Evaluating the combined effect of water activity, pH and temperature on ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* and *Aspergillus carbonarius* on culture medium and Corinth raisins. **Food Control**, Guildford, v. 20, p. 725-732, 2009.

KARAMAN, Í. et al. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, Lousanne, v. 85, n. 1/2, p. 231-235, Apr. 2003.

KHELEF, N. et al. **The prokaryotes**: an evolving electronic resource for the microbiological community. 3rd ed. New York: Springer, 2005. 959 p.

KLENICY, K. L. et al. Atividades biológicas dos óleos essenciais de *Endlicheria citriodora*, uma Lauraceae rica em geraniol e metilacetato. **Química Nova**, São Paulo, v. 36, n. 5, p. 1-5, 2013.

KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULMATIS, A. Antimicrobial activity of some plant extract and essential oil against foodborne pathogens in vitro and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **Food Science and Technology**, London, v. 41, n. 1, p. 119-127, Jan. 2007.

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

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.

LOSQUI, Y. R. et al. Atividade de *Baccharis trimera* (Less.) DC., (Asteraceae) sobre cultura de células *in vitro*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 4, p. 931-936, out./dez. 2009.

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

MANN, C. M.; COX, S. D.; MARKHAM, S. L. The outer membrane of *Pseudomonas aeruginosa* NCTC 6749 contributes to its tolerance to the essential oil *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 30, n. 2, p. 294-297, Aug. 2000.

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

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

MEDINA, A. et al. Study of Spanish grape mycobiota and ochratoxin A production by isolates of *Aspergillus tubingensis* and other members of *Aspergillus* section *Nigri*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 71 n. 8, p. 4696-4702, 2006.

MENDES, M. D. et al. ISSR molecular characterization and leaf volatiles analysis of *Pittosporum undulatum* Vent. naturalized in the Azores archipelago (Portugal). **Industrial Crops and Products**, v. 33, p. 710-719, 2011.

MITCHELL, D. et al. Water and temperature relations of growth and ochratoxin A production by *Aspergillus carbonarius* strains from grapes in Europe and Israel. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 2, p. 439-445, 2004.

MOSS, M. O. Mycotoxin review – 1. *Aspergillus* and *Penicillium*. **The Mycologist**, Cambridge, v. 16, p. 116-119, 2002.

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

NOGUEIRA, J. H. de C. **Quimioprevenção pelo óleo essencial de mentrasto (*Ageratum conyzoides*) no crescimento de *Aspergillus flavus* e da produção de aflatoxina**. 2009. 73 p. Dissertação (Mestrado em Sanidade, Segurança Alimentar e Ambiental no Agronegócio)- Agência Paulista de Tecnologia dos Agronegócios, São Paulo, 2009.

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

OLIVEIRA, A. B. et al. Trypanocidal sesquiterpenes from *Lychnophora* species. **Phytotherapy Research**, London, v. 10, p. 292-293, 1996.

OZÜRK, M. et al. CG-MS analysis and antimicrobial activity of essential oil of *Stachys cretica* subsp. *smyrnaea*. **Natural Products Communication**, v. 4, p. 109-114, 2009.

PAYMENT, P.; RILEY, M. S. Resolving the global burden of gastrointestinal illness: a call for action. **American Academy of Microbiology**, Washington, 2002. Disponível em: <<http://www.asm.org>>. Acesso em: 5 jan. 2013.

PERES, L. E. P. **Metabolismo secundário**. Piracicaba: USP. Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, 2004. p. 1-10.

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

PLATT, O. S.; FALCONE, J. F. Membrane-protein interactions in sickle red-blood-cells - evidence of abnormal protein-3 function. **Blood**, v. 86, n. 5, p. 1992-1998, Sept. 1995.

PRADO, G. et al. Incidência de ochratoxina A em café torrado e moído e em café solúvel consumido na cidade de Belo Horizonte, MG. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 20, n. 2, p. 192-196, 2000.

PRETÉ, P. S. C. et al. Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction-A spin label study. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1808, p. 164-170, 2011.

QUILLIEN, J. F. **Mycotoxins**. INRA. SME, n.º 3. Project nº QLK1-CT - 2000 – 00040. 2002. Disponível em:
<<http://www.nutrition.org.uk/upload/FF4%20mycotoxins.pdf>> Acesso em: 28 maio 2013.

RASOOLI, I.; REZAEI, M. B.; ALLAMEH, A. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. **Food Control**, Guildiford, v. 17, p. 359-364, 2006.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia vegetal**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan, 2001. 906 p.

REIS, E. S. et al. Seasonal variation in essential oils of *Lychnophora pinaster* Mart. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 22, p. 147-149, 2010.

RINGOT, D. et al. Toxicokinetics and toxicodynamics of ochratoxin A, an update. **Chemico-Biological Interactions**, Limerick, v. 159, n. 1, p. 18-46, 2006.

RODRIGUES, V. E. G. **Levantamento florístico e etnobotânico de plantas medicinais dos cerrados na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais**. 1988. 235 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 1988.

- ROGERO, S. O. et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materiais Research**, São Carlos, v. 6, n. 3, p. 317-320, jun. 2003.
- ROSA, C. A. R. et al. Potential ochratoxin A producers from wine grapes in Argentina and Brazil. **Food Additives and Contaminants**, v. 19, n. 4, p. 408-414, 2002.
- 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.
- SAMSON, R. A. List of names of *Trichomaceae* published between 192 and 1999. In: SAMSON, R. A.; PITT, J. I. (Ed.). **Integration of modern taxonomic methods for *Penicillium* and *Aspergillus* classification**. Amsterdam: Harwood Academic, 2000. p. 73-81.
- SCHMIDT, K. B.; LIANZA, S. Teste de condução de ondas ultrassônicas pelo fitomedicamento creme de *Cordia verbenacea*. **Revista Medicina de Reabilitação**, São Paulo, v. 29, n. 3, p. 65-68, 2010.
- SEMIR, J. **Revisão taxonômica de *Lychnophora* Mart. (Vernoniaceae: Compositae)**. 1991. 515 p. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal)-Universidade de Campinas, Campinas, 1991.
- SHEPHARD, G. S. Impact of mycotoxins on human health in developing countries. **Food Additives & Contaminantes**, London, v. 25, n. 2, p. 146-151, 2008.
- SILVA, D. M. H.; BASTOS, C. N. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. **Fitopatologia Brasileira**, Brasília, v. 32, p. 143-145, 2007.
- SILVA, N. A. et al. Caracterização química do óleo essencial da erva cidreira (*Lippia alba* (Mill. N.E.BR.) cultivada em Ilhéus na Bahia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 8, p. 52-55, 2006.
- SILVA, S. L. et al. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 38, n. 1, p. 107-112, 2008.

SILVEIRA, D. et al. Lychnophoric acid from *Lychnophora pinaster*: a complete and unequivocal assignment by NMR spectroscopy. **Eclética Química**, São Paulo, v. 30, n. 1, p. 37-41, 2005.

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

SOUZA, A. B. et al. Antimicrobial activity of terpenoids from *Copaifera langsdorffii* Desf. against cariogenic bacteria. **Phytotherapy Research**, London, v. 25, n. 2, p. 215-20, 2011.

SOUZA, A. V. **Propagação in vitro e aspectos anatômicos de arnica (*Lychnophora pinaster*) MART**. 2003. 127 p. Dissertação (Mestrado em Agronomia)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2003.

SURESH, T.; HATHA, A. A. M.; SCREENIVASA, D. Prevalence and antimicrobial resistance of *Salmonella* enteritidis and other salmonellas in the eggs and eggstoring trays from retails markets of Coimbatore, south India. **Food Microbiology**, v. 23, n. 3, p. 294-299, 2006.

TAKEARA, R. et al. Trypanocidal activity of *Lychnophora staavioides* Mart. (Vernonieae, Asteraceae). **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 10, p. 490-493, 2003.

TANIWAKI, M.; SILVA, N. **Microbiologia**: fungos deteriorantes em alimentos. Campinas: Unicamp, 2001.

TARIKU, Y. et al. In vitro Evaluation of Antileishmanial Activity and Toxicity of Essential Oils of *Artemisia absinthium* and *Echinops kebericho*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 8, p. 614-623, 2011.

THEVISSSEN, K. et al. Interactions of antifungal plant defensins with fungal membrane components. **Peptides**, New York, v. 24, n. 11, p. 1705-1712, 2003.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, L. F. **Microbiologia**. 5. ed. São Paulo: Atheneu, 2008. 760 p.

TROMBETA, D. et al. Mechanisms of antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Bethesda, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005.

TURNER, N. W.; SUBRAHMANYAMB, S.; PILETSKIB, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: a review. **Analytica Chimica Acta**, v. 632, p. 168-180, 2009.

VALERO, A. et al. Survey: Ochratoxin a in European special wines. **Food Chemistry**, London, v. 108, p. 593–599, 2008.

VIEGAS, E. C. et al. Toxidade de óleos essenciais de alho e casca de canela contra fungos do grupo *Aspergillus flavus*. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 23, p. 915-919, 2005.

WANG, H. et al. Comparative seasonal variation and chemical composition of essential oils from the leaves and stems of *Schefflera heptaphylla* using microwave-assisted and conventional hydrodistillation. **Industrial Crops and Products**, Netherlands, v. 36, p. 229-237, 2012.

WANG, S. Y.; CHEN, P. F.; CHANG, S. T. Antifungal activities of essential oils their constituents from *indigenous cinnamom (Cinnamomum osmoplaloeum)* leaves against wood decay fungi. **Bioresource Technology**, v. 96, p. 813-818, 2005.

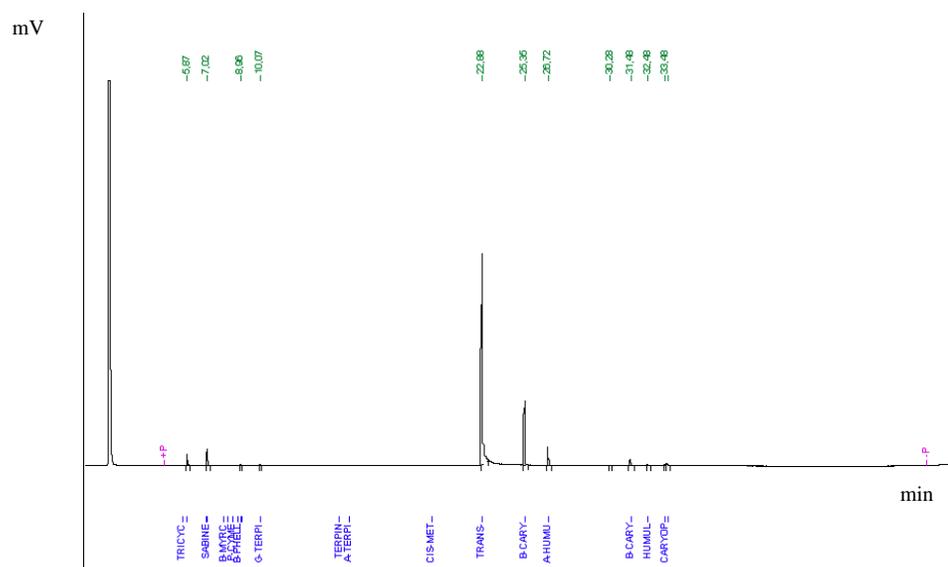
WOLFFENBÜTTEL, A. N. **Base da química dos óleos essenciais e aromaterapia**: abordagem técnica e científica. São Paulo: Roca, 2010. 292 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food safety and foodborne illness**. 2008. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs237/en/>>. Acesso em: 3 fev. 2012.

ZIAEI, M. et al. Gene expression and activity of phenyl alanine amonialyase and essential oil composition of *Ocimum basilicum* L. at different growth stages. **Iranian Journal of Biotechnology**, Tehran, v. 10, n. 1, p. 32-39, 2012.

APÊNDICE

Apêndice A

Figura 1A Cromatograma do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart.

Apêndice B

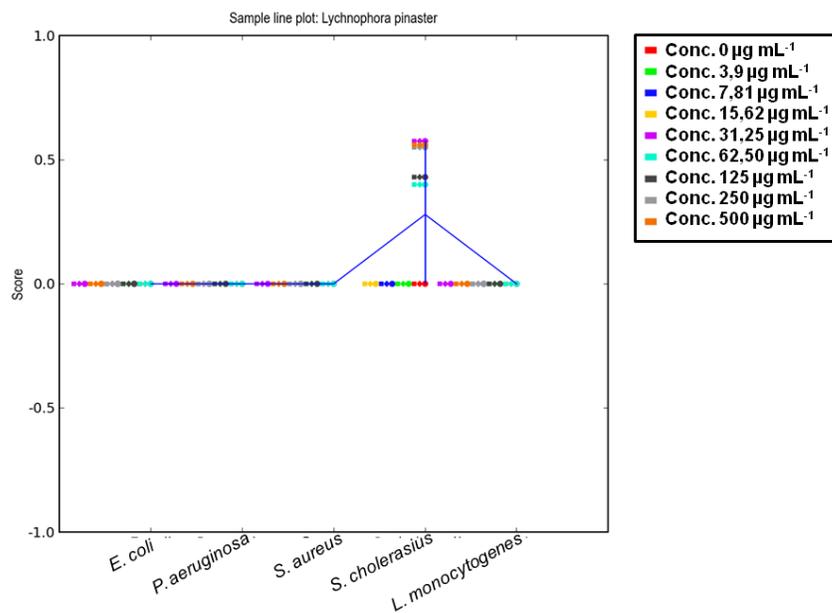


Figura 1B Efeito inibitório do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* sobre bactérias testadas por meio da análise univariada.

Tabela 1B Valores médios dos halos de inibição (cm) de *Escherichia coli* ATCC 11229 exposta às diferentes concentrações do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart.

Bactéria	Proporção (óleo essencial /DMSO)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halos de inibição (cm)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	Cloranfenicol	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	1,60 a
	1:1	500	0 b
	1:2	250	0 b
	1:4	125	0 b
	1:8	62,50	0 b
	1:16	31,25	0 b
	1:32	15,62	0 b
	1:64	7,81	0 b
	1:128	3,90	0 b
	DMSO	0	0 b
CV (%)			49,61

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

Tabela 2B Valores médios dos halos de inibição (cm) de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442 exposta às diferentes concentrações do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart.

Bactéria	Proporção (óleo essencial /DMSO)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halos de inibição (cm)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 15442)	Cloranfenicol	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	3,066 a
	1:1	500	0 b
	1:2	250	0 b
	1:4	125	0 b
	1:8	62,50	0 b
	1:16	31,25	0 b
	1:32	15,62	0 b
	1:64	7,81	0 b
	1:128	3,90	0 b
	DMSO	0	0 b
CV (%)			22,59

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

Tabela 3B Valores médios dos halos de inibição (cm) de *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 exposta às diferentes concentrações do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart.

Bactéria	Proporção (óleo essencial /DMSO)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halos de inibição (cm)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 13565)	Cloranfenicol	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2,36 a
	1:1	500	0 b
	1:2	250	0 b
	1:4	125	0 b
	1:8	62,50	0 b
	1:16	31,25	0 b
	1:32	15,62	0 b
	1:64	7,81	0 b
	1:128	3,90	0 b
	DMSO	0	0 b
CV (%)			7,32

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

Tabela 4B Valores médios dos halos de inibição (cm) de *Salmonella* Cholerasuis ATCC 6539 exposta às diferentes concentrações do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart.

Bactéria	Proporção (óleo essencial /DMSO)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halos de inibição (cm)
<i>Salmonella</i> Cholerasuis (ATCC 6539)	Cloranfenicol	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2,83 a
	1:1	500	0,56 b
	1:2	250	0,55 b
	1:4	125	0,43 b
	1:8	62,50	0,40 b
	1:16	31,25	0,55 b
	1:32	15,62	0 c
	1:64	7,81	0 c
	1:128	3,90	0 c
	DMSO	0	0 c
CV (%)			16,87

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

Tabela 5B Valores médios dos halos de inibição (cm) de *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 exposta às diferentes concentrações do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart.

Bactéria	Proporção (óleo essencial /DMSO)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halos de inibição (cm)
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 19117)	Cloranfenicol	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	3,06 a
	1:1	500	0,56 b
	1:2	250	0 c
	1:4	125	0 c
	1:8	62,50	0 c
	1:16	31,25	0 c
	1:32	15,62	0 c
	1:64	7,81	0 c
	1:128	3,90	0 c
	DMSO	0	0 c
CV (%)			19,66

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

Apêndice C

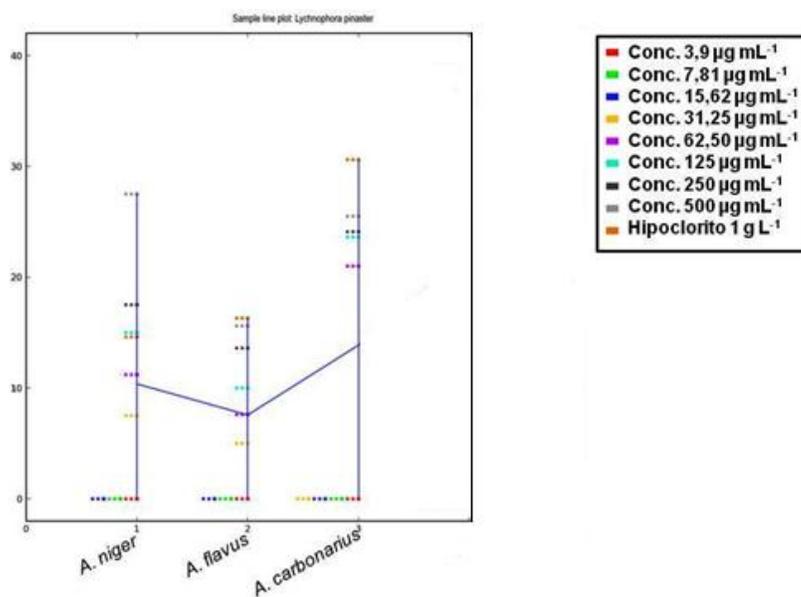


Figura 1C Efeito inibitório do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* sobre bactérias testadas por meio da análise univariada

Tabela 1C Valores médios dos halos de inibição (cm) de *Aspergillus niger* exposto às diferentes concentrações do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart.

Bactéria	Proporção (óleo essencial /DMSO)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halos de inibição (cm)
<i>Aspergillus niger</i>	Hipoclorito	2%	1,43 abc
	1:1	500	2,06 c
	1:2	250	1,7 bc
	1:4	125	1,5 bc
	1:8	62,50	1,1 ab
	1:16	31,25	0,76 a
	1:32	15,62	0
	1:64	7,81	0 e
	1:128	3,90	0 e
	DMSO	0	0 e
CV (%)			26,44

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

Tabela 2C Valores médios dos halos de inibição (cm) de *Aspergillus flavus* exposto às diferentes concentrações do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart.

Bactéria	Proporção (óleo essencial /DMSO)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halos de inibição (cm)
<i>Aspergillus flavus</i>	Hipoclorito	2%	1,63 a
	1:1	500	1,7 a
	1:2	250	1,36 ab
	1:4	125	1,03 bc
	1:8	62,50	0,73 cd
	1:16	31,25	0,56 d
	1:32	15,62	0 e
	1:64	7,81	0 e
	1:128	3,90	0 e
	DMSO	0	0 e
CV (%)			11,93

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

Tabela 3C Valores médios dos halos de inibição (cm) de *Aspergillus carbonarius* exposto às diferentes concentrações do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart.

Bactéria	Proporção (óleo essencial /DMSO)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halos de inibição (cm)
<i>Aspergillus carbonarius</i>	Hipoclorito	2%	3,0 a
	1:1	500	2,16 b
	1:2	250	2,53 ab
	1:4	125	2,30 ab
	1:8	62,50	2,0 b
	1:16	31,25	0 c
	1:32	15,62	0 c
	1:64	7,81	0 c
	1:128	3,90	0 c
	DMSO	0	0 c
CV (%)			19,63

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

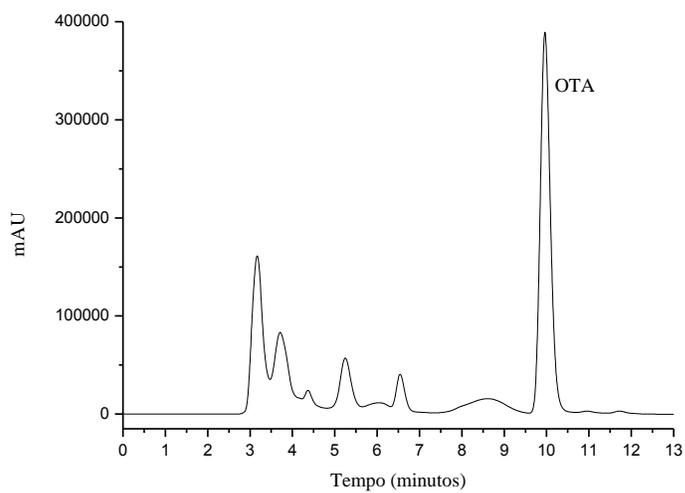
Apendice D

Figura 1D Cromatograma da OTA (controle)

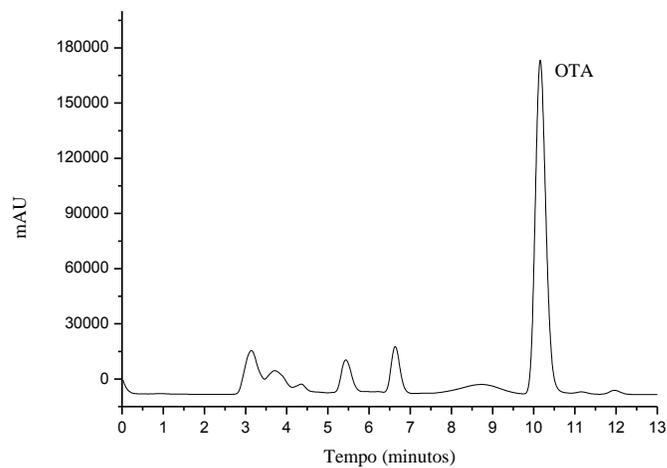


Figura 2D Cromatograma da OTA (0,001%)

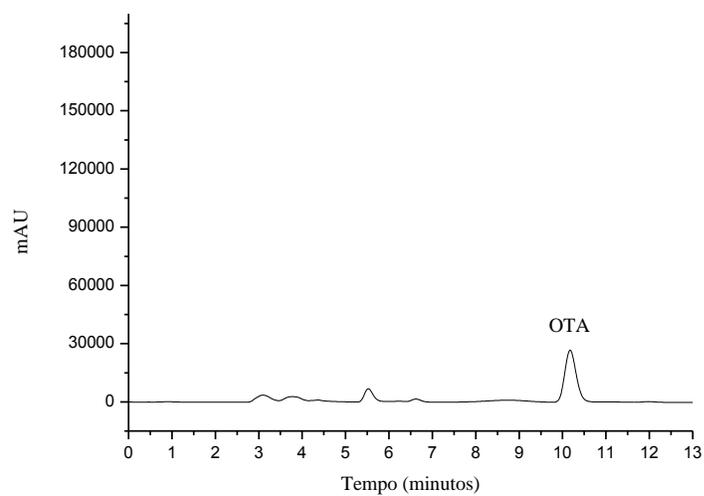


Figura 3D Cromatograma da OTA (0,01%)

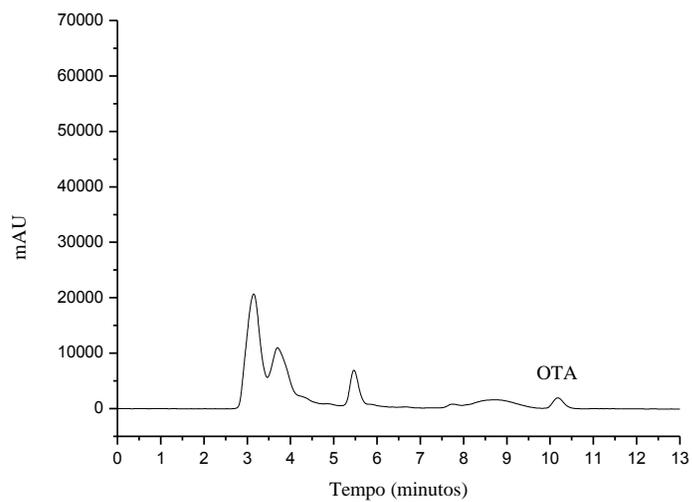


Figura 4D Cromatograma da OTA (0,02%)

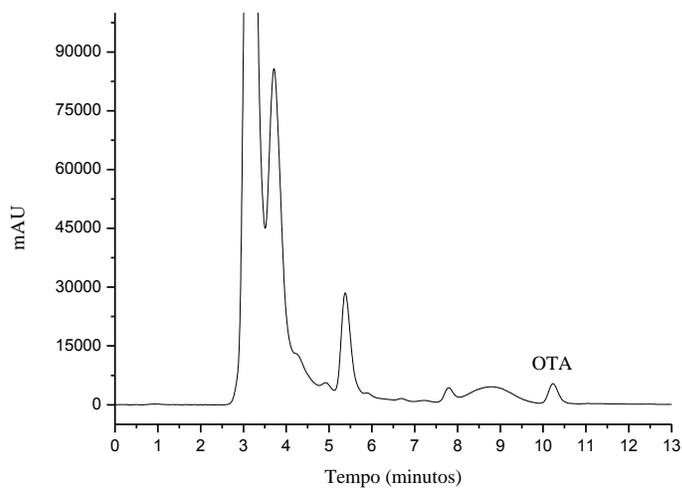


Figura 5D Cromatograma da OTA (0,03%)

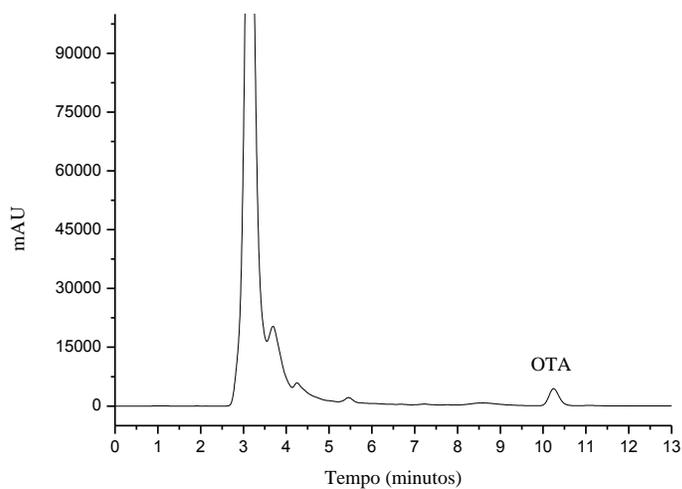


Figura 6D Cromatograma da OTA (0,04%)

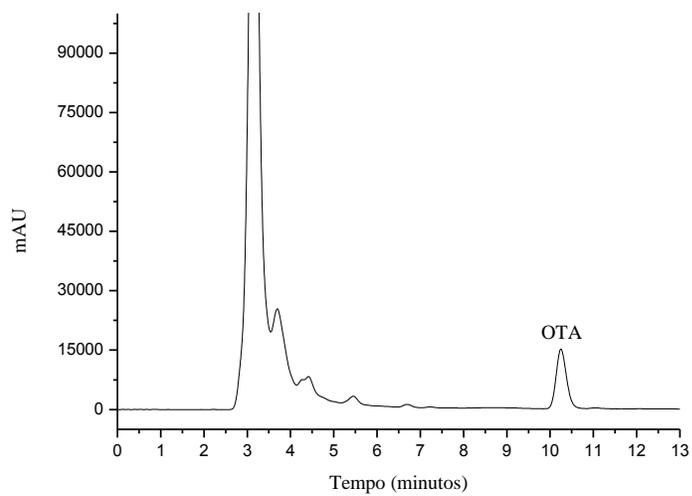


Figura 7D Cromatograma da OTA (0,05%)

Apendice E

Tabela 1E Análise de regressão para a porcentagem de atividade hemolítica mediante diferentes concentrações do óleo essencial de *Lychnophora pinaster* Mart.

FV	GL	SQ	QM	Fc	R ²
E. 1ºG	1	13435,61	13435,61	1190,60*	74,48%
E. 2ºG	1	3467,88	3467,88	307,30*	93,80%
Desvio	5	1136,87	227,37	20,149*	
Erro	16	180,55	11,28		