



MILENE APARECIDA ANDRADE

**ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cinnamodendron dinisii*
Schwacke E *Siparuna guianensis* Aublet:
COMPOSIÇÃO QUÍMICA, CARACTERIZAÇÃO
DAS ESTRUTURAS SECRETORAS E
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO**

LAVRAS-MG

2013

MILENE APARECIDA ANDRADE

ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cinnamodendron dinisii* Schwacke E *Siparuna guianensis* Aublet: COMPOSIÇÃO QUÍMICA, CARACTERIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS SECRETORAS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Doutor.

Orientadora
Dra. Maria das Graças Cardoso

Co-orientador
Dr. Luís Roberto Batista

**LAVRAS-MG
2013**

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

Andrade, Milene Aparecida.

Óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke e *Siparuna guianensis* Aublet: composição química, caracterização das estruturas secretoras e avaliação do potencial biológico / Milene Aparecida Andrade. – Lavras: UFLA, 2013.

226 p.: il.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2013.

Orientador: Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Pimenteira. 2. Negramina. 3. Antioxidante. 4. Citotóxica. 5. Antimicrobiana. 6. Genotóxica. 7. Cavidades secretoras. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

CDD – 547.71

MILENE APARECIDA ANDRADE

ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cinnamodendron dinisii* Schwacke E *Siparuna guianensis* Aublet: COMPOSIÇÃO QUÍMICA, CARACTERIZAÇÃO DAS ESTRUTURAS SECRETORAS E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 27 de fevereiro de 2013.

Dra. Ana Cristina da Silva Figueiredo	FCUL
Dr. Evaristo Mauro de Castro	UFLA
Dr. Paulo Sérgio Castilho Preté	UFLA
Dra. Silvana Marcussi	UFLA

Dra. Maria das Graças Cardoso
Orientadora

Dr. Luís Roberto Batista
Co-orientador

**LAVRAS - MG
2013**

*Às mais belas flores do meu jardim... Às minhas mães, **Onilda e Marica**, que
junto de Deus, florescem nos jardins do céu.*

*Ao meu grande amor, **Otávio**, pelo carinho, cumplicidade, incentivo,
serenidade, alegria e, principalmente, por ser capaz de me amar até nos
momentos em que eu não mereci.*

*Aos meus **amigos**... Porque quem tem amigos, tem tudo!*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ser infinitamente bom e justo.

À minha família, que mesmo não entendendo bem o que faço, sempre me apoiou e pela qual serei eternamente grata.

À minha orientadora, Profa. Maria das Graças Cardoso, pelo apoio, ensinamentos, dedicação, por seu exemplo de profissionalismo e competência, e principalmente pela amizade.

À Profa. Ana Cristina da Silva Figueiredo, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (Portugal), pela gentil permissão do uso de equipamentos e de reagentes, durante as análises cromatográficas.

Ao Prof. Maurílio José Soares, do Instituto Carlos Chagas - Fiocruz, por nos receber em seu laboratório (Laboratório de Biologia Celular) e por todos os ensinamentos.

À Profa. Silvana Marcussi, pela confiança, pelos conhecimentos transmitidos a mim, pela valorosa contribuição para esse trabalho.

Ao Prof. Luís Roberto Batista, pelos anos de convivência, pela confiança em mim depositada nesse período e disposição em ajudar-me sempre.

Ao Prof. Paulo S. C. Preté, pelos ensinamentos, pela ajuda e amizade.

Ao Prof. Evaristo Mauro de Castro, por abrir as portas do seu laboratório para a realização das análises histoquímicas.

À Profa. Mariana Massaranes, pela ajuda imprescindível no preparo das excisatas, identificação, registro das plantas e pela atenção dispensada.

À Profa. Josefina Aparecida Souza, pelo carinho e amizade.

À Profa. Lisete Chamma Davide, por permitir o uso do microscópio de epifluorescência, e a pós-doutoranda Rose, por me auxiliar sempre.

Aos meus amigos e companheiros de bancada do Laboratório de Química Orgânica - Óleos essenciais e Laboratório de Qualidade de Aguardente

do DQI, Marcos, Cíntia, Felipe, Lucilene, Juliana Andrade, Wilder, Maria Luisa, Christiane, Bruna, Rafaela, Karen, Juliana Valério, Leonardo, João e Lidiany, pela ajuda indispensável nos experimentos, pela convivência, doação de sangue e pelos momentos de descontração. Obrigada por tornarem meus dias mais felizes; sem vocês eu não teria conseguido!

Ainda aos amigos Marcos e sua namorada Ana Clara, pela agradável companhia nas viagens (Curitiba e Ouro Preto) e ajuda no decorrer dos experimentos, ao Leonardo e à Juliana Valério, pela ajuda nas análises microbiológicas, à Juliana Andrade e Maria Luisa, pelo auxílio nas análises histoquímicas, à Cíntia e Lucilene, pela ajuda nos testes citogenéticos e ao Felipe, por me salvar nos momentos de aperto... É bom saber que posso contar com vocês!

Ao pessoal do Laboratório de Biologia Celular (FIOCRUZ/Curitiba), Camila, Cláudia, Lígia, Cassiano, Luan, Vanessa, Iriane, Sandryeli, pela afetuosa acolhida. Em especial a Camila, pela paciência de nos ensinar os testes. Muito obrigada!

Aos meus amigos do Laboratório de Micologia, pela disponibilidade, atenção, paciência e compreensão em dividir os equipamentos.

Ao pessoal do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Ultraestrutural, em nome de seu coordenador, Prof. Eduardo Alves.

Ao pessoal do Horto de Plantas Medicinais da UFLA, por permitir a coleta do material vegetal.

Aos meus amigos do Laboratório de Bioquímica, Vinícius, Anderson (Bijú), Cláudia, Mariene, Rafaella Zambaldi, Ana Paula, Pricila, Juliana Arriel, Raphaela Baracho, Lucas, Tamara, Denise, Jéssica e Sâmela, pelos momentos de descontração e boa convivência e, principalmente, pela amizade gratuita.

Aos alunos de Iniciação Científica da Profa. Silvana, pela colaboração nos experimentos, em especial ao Marcus e a Amanda, pela amizade.

À doutoranda Marinês Pires, pela ajuda nas análises histoquímicas.

Ao André Alvarenga, por me receber tão bem em sua casa em Curitiba, e principalmente pela amizade que se formou. E à família Alvarenga, por me mostrar a beleza de uma família unida.

À Silvia Perini, pelos momentos de diversão e a toda família Perini, por se tornarem minha família lavrense.

À Thiza, pela amizade e pela ajuda nas coletas do material vegetal.

Ao Prof. Paulo Roberto Clemente, pelo carinho que dispensou a mim em todos esses anos que estou na UFLA.

Às amigas da república, Deise e Kamilla, por me aguentarem esse tempo, e por todo o tempo de convivência.

Aos funcionários do Laboratório de Análises Clínicas da UFLA, por sempre estarem disponíveis para as coletas de sangue.

Aos secretários (as) e técnicos (as) que sempre me auxiliaram em tudo que foi necessário: Xulita, Eloísa (MEV), Cleusa, Shirley, Ana Cristina, Bruna e Lidiany.

A todos os professores do Departamento de Química, pela dedicação, empenho e conhecimentos transmitidos.

Aos colegas e amigos do curso de Agroquímica, pela amizade e convivência ao longo do curso.

Um agradecimento especial, reforçando a dedicatória, ao meu noivo, Otávio, a joia mais rara que encontrei em minha vida. Gratidão é uma parte muito pequena de tudo que sinto por você...

À Universidade Federal de Lavras, ao Departamento de Química, pela oportunidade, e à Capes (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), pela concessão da bolsa de estudo.

Enfim, agradeço a todos que compartilharam comigo essa jornada e a tornaram mais leve.

“Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para o seu próprio prazer pessoal e para o proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer”.

(Albert Einstein)

RESUMO

Objetivou-se neste estudo determinar a composição química dos óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke (pimenteira) e *Siparuna guianensis* Aublet (negramina), as suas atividades antioxidante, antibacteriana, antifúngica, tripanocida, citotóxica, hemolítica e avaliar a capacidade de causarem danos no DNA de linfócitos humanos, além de caracterizar suas estruturas secretoras. A obtenção dos óleos essenciais foi realizada pela técnica de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger modificado, e a identificação e quantificação dos constituintes, pelas análises em CG/EM e CG-DIC. A atividade antioxidante foi avaliada utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e o método de sequestro de radicais DPPH. A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada por meio da técnica de difusão cavidade em ágar, e a atividade antifúngica, pela técnica de difusão em disco. A atividade tripanocida foi avaliada sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* e a citotóxica sobre células Vero; ambas foram determinadas pelo método do MTT. A atividade hemolítica foi avaliada por medidas espectrofotométricas da liberação de hemoglobina de eritrócitos. Os danos causados no DNA de células de linfócitos foram avaliados pelo ensaio do cometa e a caracterização das estruturas secretoras foi feita por MEV e por testes histoquímicos com os reagentes de Nadi, Sudan IV e cloreto férrico. Os rendimentos dos óleos essenciais foram de 2,03% e 0,31% e o teor de umidade foram 60,67% e 64,67% para as folhas frescas de *C. dinisii* e *S. guianensis*, respectivamente. Nas análises cromatográficas, os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de *C. dinisii* foram o α -pineno (35,41%), β -pineno (17,81%), sabineno (12,01%) e o biciclogermacreno (7,59%). No óleo essencial de *S. guianensis*, foram identificados como constituintes majoritários o β -mirceno (13,14%), germacreno-D (8,68%) e o biciclogermacreno (16,71%). A atividade antioxidante apresentou-se baixa pelo teste β -caroteno/ácido linoleico e não foi evidenciada pelo teste do DPPH, para ambos os óleos avaliados. A atividade tripanocida obtida foi de $CI_{50} = 282,93 \mu\text{g mL}^{-1}$ para óleo de *C. dinisii* e $124,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. guianensis*, valores considerados elevados. Os dois óleos essenciais apresentaram pequeno efeito inibitório sobre bactérias, apresentando altos valores de CMI e efeito inibitório satisfatório sobre os fungos avaliados, com baixos valores de CMI. A atividade citotóxica para células Vero encontrada foi elevada ($CC_{50} = 35,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ para óleo de *C. dinisii* e $38,01 \mu\text{g mL}^{-1}$, para *S. guianensis*). Os óleos essenciais em estudo apresentaram o efeito hemolítico elevado em todas as concentrações de hematócritos (Ht) avaliadas. Pelo ensaio do cometa, observou-se que os óleos causaram danos significativos ao DNA dos linfócitos, sendo o óleo essencial de *C. dinisii* o maior causador de danos. A caracterização das estruturas secretoras dos óleos essenciais revelou a presença de células internas de secreção (cavidades secretoras) em ambas as espécies avaliadas.

Palavras-chave: Antioxidantes. Antimicrobianos. Toxicidade. Cavidades Secretoras.

ABSTRACT

The aims of this study were to determine the chemical composition of essential oils of *Cinnamodendron dinisii* Schwacke (pimenteira) and *Siparuna guianensis* Aublet (negramina), their antioxidant, antibacterial, antifungal, trypanocidal, cytotoxic and hemolytic activity and to evaluate their capacity to cause damage in human lymphocyte DNA, besides characterizing their secretory structures. The obtaining of the essential oils was conducted by the hydrodistillation technique using a modified Clevenger apparatus, and the identification and quantification of constituents, by GC/MS and GC-FID analyses. The antioxidant activity was evaluated using the β -carotene/linoleic acid system and the DPPH radical sequestering method. The evaluation of the antibacterial activity was conducted through the agar well diffusion technique, and the antifungal activity, by the disk diffusion technique. The trypanocidal activity was evaluated on *Trypanosoma cruzi* epimastigote forms and the cytotoxic on Vero cells; both were determined by the MTT method. The hemolytic activity was evaluated by spectrophotometric measurements of the hemoglobin (Hb) released of from the erythrocytes. The damage caused in lymphocyte cell DNA was appraised by the comet assay and the characterization of the secretory structures was made by SEM and through histochemical tests with the Nadi reagents, Sudan III and ferric chloride. The yields of the essential oils were 2.03% and 0.31% and the moisture contents were 60.67% and 64.67% for the fresh leaves of *C. dinisii* and *S. guianensis*, respectively. In the chromatographic analyses, the majority constituents found in the essential oil of *C. dinisii* were the α -pinene (35.41%) β -pinene (17.81%), sabinene (12.01%) and the bicyclogermacrene (7.59%). In the essential oil of *S. guianensis*, were identified as majority constituents the β -myrcene (13.14%), germacrene D (8.68%) and the bicyclogermacrene (16.71%). The antioxidant activity by the β -carotene/linoleic acid test was low and was not evidenced by the DPPH test, for both appraised oils. The trypanocidal activity obtained was $IC_{50} = 282.93 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *C. dinisii* oil and $124.00 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *S. guianensis*, values considered high. The two essential oils presented little inhibitory effect on bacteria, presenting high MIC values and satisfactory inhibitory effect on the fungi appraised, with low MIC values. The cytotoxic activity for Vero cells found was high ($CC_{50} = 35.72 \mu\text{g mL}^{-1}$ for *C. dinisii* oil and $38.01 \mu\text{g mL}^{-1}$, for *S. guianensis*). The essential oils under study presented a elevated hemolytic effect in all of the hematocrit concentrations (Ht) appraised. Through the comet assay, it was observed that the oils caused significant damage to lymphocyte DNA, and the essential oil of *C. dinisii* caused the higher damage. The characterization of the secretory structures of the essential oils revealed the presence of internal secretion cells (secretor cavities) in both appraised species.

Key words: Antioxidants. Antimicrobials. Toxicity. Secretor Cavities.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Capítulo 1

Figura 1	Biossíntese de terpenoides via mevalonato.....	28
Figura 2	Biossíntese de terpenoides via DXPS.....	29
Figura 3	Biossíntese de fenilpropanoides.....	31
Figura 4	Fotografias em microscopia eletrônica de varredura mostrando diversos tipos morfológicos de tricomas glandulares em Lamiaceae.....	35
Figura 5	Fotografias em microscopia eletrônica de varredura das folhas de <i>Ocotea odorifera</i>	36
Figura 6	Estruturas químicas dos principais antioxidantes utilizados na indústria (a) α - Tocoferol, (b) BHT, (c) BHA, (d) PG e (e) TBHQ.....	39
Figura 7	Esquema geral do processo de peroxidação lipídica.....	41
Figura 8	Esquema geral da redução do DPPH.....	42
Figura 9	Moléculas de carvacrol e timol, respectivamente, atacadas por um radical livre (R^{\bullet}).....	44
Figura 10	Ciclo de vida do <i>Trypanosoma cruzi</i>	58
Figura 11	Reação de redução do MTT.....	64
Figura 12	Aspecto geral de <i>Cinnamodendron dinisii</i> Schwacke (Pimenteira).....	71
Figura 13	Aspecto geral de <i>Siparuna guianensis</i> Aublet (Negramina)..	73

Capítulo 2

Figura 1	Estruturas químicas dos compostos majoritários do óleo essencial das folhas frescas de <i>Cinnamodendron dinisii</i>	105
----------	--	-----

Figura 2	Estruturas químicas dos compostos majoritários do óleo essencial das folhas frescas de <i>Siparuna guianensis</i>	108
----------	---	-----

Capítulo 4

Figura 1	Classificação das imagens em forma de cometa, conforme padrão migratório dos fragmentos, caracterizando os níveis de danos.....	160
Figura 2	Porcentagem de hemólise ocasionada pelos óleos essenciais de <i>C. dinisii</i> e <i>S. guianensis</i> no hematócrito 0,15%.....	166
Figura 3	Porcentagem de hemólise ocasionada pelos óleos essenciais de <i>C. dinisii</i> e <i>S. guianensis</i> no hematócrito 10%.....	167
Figura 4	Oxidação da hemoglobina ocasionada pelos óleos essenciais de <i>S. guianensis</i> (N) e de <i>C. dinisii</i> (P).....	169
Figura 5	Frequência de nucleoides com cometa provocado pelo óleo essencial de <i>S. guianensis</i> (N) no DNA dos linfócitos humanos.....	172
Figura 6	Frequência de nucleoides com cometa provocado pelo óleo essencial de <i>C. dinisii</i> (P) no DNA dos linfócitos humanos...	175

Capítulo 5

Figura 1	Micrografia de MEV e caracterização histoquímica da substância presente nas células secretoras (seção transversal do limbo foliar de <i>S. guianensis</i>).....	190
Figura 2	Micrografia de MEV e caracterização histoquímica da substância presente nas células secretoras (seção transversal do limbo foliar de <i>C. dinisii</i>).....	191

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2

Tabela 1	Teor de umidade das folhas e rendimentos dos óleos essenciais de <i>Siparuna guianensis</i> e <i>Cinnamodendron dinisii</i>	101
Tabela 2	Composição química do óleo essencial das folhas frescas de <i>Cinnamodendron dinisii</i>	103
Tabela 3	Composição química do óleo essencial das folhas frescas de <i>Siparuna guianensis</i>	107
Tabela 4	Atividade antioxidante dos óleos essenciais de <i>S. guianensis</i> e <i>C. dinisii</i> e dos padrões Timol, BHT e Ácido ascórbico pelo teste β -caroteno/ácido linoleico e pelo método de sequestro de radicais DPPH.....	112

Capítulo 3

Tabela 1	Atividade tripanocida dos óleos essenciais de <i>S. guianensis</i> e <i>C. dinisii</i> sobre as formas epimastigotas.....	131
Tabela 2	Concentração mínima inibitória (CMI) e diâmetros dos halos de inibição causados pelos óleos essenciais de <i>S. guianensis</i> (SG) e <i>C. dinisii</i> (CD) e pelo cloranfenicol (CL) à $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ para as bactérias avaliadas.....	133
Tabela 3	Concentração mínima inibitória (CMI) e diâmetros dos halos de inibição causados pelos óleos essenciais de <i>S. guianensis</i> (SG) e de <i>C. dinisii</i> (CD) e pelo hipoclorito de sódio (HP) à $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os fungos avaliados.....	138

Capítulo 4

Tabela 1	Atividade citotóxica dos óleos essenciais de <i>S. guianensis</i> e <i>C. dinisii</i> sobre células Vero.....	162
Tabela 2	Distribuição de classes de cometa e unidades arbitrárias obtidas após tratamento de linfócitos de sangue periférico humano com as diferentes concentrações do óleo essencial (5, 25 e 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$) de <i>S. guianensis</i> (N) e com o agente antitumoral doxorrubicina (C^+)*.....	171
Tabela 3	Distribuição de classes de cometa e unidades arbitrárias obtidas após tratamento de linfócitos de sangue periférico humano com as diferentes concentrações do óleo essencial (5, 25 e 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$) de <i>C. dinisii</i> (P) e com o agente antitumoral doxorrubicina (C^+)*.....	174

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ATCC	American Type Culture Collection
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHI	Brain Heart Infusion
BHT	2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno
BLU	Base Livre de Umidade
CG/EM	Cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas
CG-DIC	Cromatografia em fase gasosa com detector de ionização de chama
CC₅₀	Concentração citotóxica para 50% das células
CI₅₀	Concentração Inibitória de 50%
CMI	Concentração Inibitória Mínima
CoA	Coenzima A
COEP	Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos da Universidade Federal de Lavras
DMAPP	Dimetilalil difosfato
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
DTAs	Doenças transmitidas por alimentos
DXP	1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FAL	Fenilalanina amonialiase
FDA	Food and Drug Administration
FBS	Fetal Bovine Serum
GPP	<i>trans</i> -geranilpirofosfato
HMG-CoA	3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA
Ht	Hematócrito
IARC	International Agency for Research on Cancer
IPP	Isopentenil difosfato
IRc	Índice de retenção calculado
ISO	International Standard Organization
LIT	Liver Infuse Tryptose
LC₅₀	Concentração que causa lise em 50% das hemácias
LMP	Low Metting Point (Agarose de baixa temperatura de fusão)
MEA	Malt Extract Agar (Ágar extrato de malte)
MET	Microscopia Eletrônica de Transmissão
MEV	Microscopia Eletrônica de Varredura
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]
NCCLS	National Committe for Clinical Laboratory Standards
NI	Não apresentou inibição na faixa das concentrações avaliadas
NMP	Normal Metting Point (Agarose de temperatura de fusão normal)

OTA	Ocratoxina A
PBS	Phosphate buffered saline (tampão fosfato)
PG	Propyl gallate (galato de propila)
SDS	Sodium dodecil sulfate (dodecilsulfato de sódio)
TBHQ	Tert-butil-hidroquinona
TR	Tempo de retenção
TSA	Tryptic soy agar (ágar de soja triptica)
TSB	Tryptic soy broth (caldo de soja triptica)
UA	Unidade arbitrária
UFC	Unidade Formadora de Colônia
Vero	Fibroblastos de rim de macaco verde africano (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
%AA	Porcentagem de inibição de degradação do β -caroteno
%I	Porcentagem de inibição do radical DPPH
%IE	Porcentagem de células epimastigotas

SUMÁRIO

	CAPÍTULO 1: Introdução geral.....	21
1	INTRODUÇÃO.....	21
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	24
2.1	Óleos essenciais.....	24
2.1.1	Biossíntese dos terpenoides.....	26
2.1.2	Biossíntese dos fenilpropanoides.....	30
2.2	Importância econômica e aplicações dos óleos essenciais.....	31
2.3	Estruturas secretoras.....	33
2.3.1	Estruturas secretoras externas.....	34
2.3.2	Estruturas secretoras internas.....	36
2.4	Antioxidantes.....	37
2.4.1	Ensaio de oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico.....	40
2.4.2	Ensaio de redução do radical estável 2,2-difenil-1- picrilhidrazila (DPPH).....	42
2.4.3	Atividade antioxidante dos óleos essenciais.....	43
2.5	Doenças transmitidas por alimentos (DTAs).....	45
2.5.1	Bactérias.....	46
2.5.1.1	<i>Staphylococcus aureus</i>	46
2.5.1.2	<i>Escherichia coli</i>	47
2.5.1.3	<i>Listeria monocytogenes</i>	48
2.5.1.4	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	49
2.5.1.5	<i>Salmonella Choleraesuis</i>	50
2.5.2	Fungos.....	51
2.5.2.1	<i>Aspergillus flavus</i> e <i>Aspergillus parasiticus</i>	52
2.5.2.2	<i>Aspergillus carbonarius</i> e <i>Aspergillus niger</i>	53
2.5.2.3	<i>Penicillium commune</i>	53
2.5.3	Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais.....	54
2.6	Doença de Chagas.....	55
2.6.1	<i>Trypanosoma cruzi</i>	57
2.6.2	Atividade tripanocida dos óleos essenciais.....	59
2.7	Aspectos toxicológicos de produtos naturais.....	61
2.7.1	Teste de citotoxicidade.....	63
2.7.2	Atividade Hemolítica.....	65
2.7.3	Ensaio do cometa.....	67
2.8	Plantas em estudo.....	70
2.8.1	<i>Cinnamodendron dinisii</i> Schwacke (Pimenteira).....	70
2.8.2	<i>Siparuna guianensis</i> Aublet (Negramina).....	72

	REFERÊNCIAS.....	75
	CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Cinnamodendron dinisii</i> Schwacke e <i>Siparuna guianensis</i> Aublet.....	90
1	INTRODUÇÃO.....	92
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	95
2.1	Óleos essenciais.....	95
2.1.1	Obtenção do material vegetal.....	95
2.1.2	Extração do óleo essencial.....	96
2.1.3	Determinação da umidade.....	96
2.1.4	Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais.....	96
2.2	Determinação da atividade antioxidante.....	98
2.2.1	Método de sequestro de radicais DPPH.....	98
2.2.2	Sistema β-caroteno/ácido linoleico.....	99
2.2.3	Análise estatística.....	100
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	101
3.1	Rendimento e umidade.....	101
3.2	Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais.....	103
3.2.1	<i>Cinnamodendron dinisii</i> Schwacke.....	103
3.2.2	<i>Siparuna guianensis</i> Aublet.....	107
3.3	Atividade antioxidante dos óleos essenciais.....	111
4	CONCLUSÃO.....	115
	REFERÊNCIAS.....	116
	CAPÍTULO 3: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, ANTIBACTERIANA E TRIPANOCIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Cinnamodendron dinisii</i> Schwacke E <i>Siparuna guianensis</i> Aublet.....	120
1	INTRODUÇÃO.....	122
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	124
2.1	Óleos essenciais.....	124
2.1.1	Obtenção do material vegetal.....	124
2.1.2	Extração do óleo essencial.....	125
2.2	Avaliação da atividade tripanocida <i>in vitro</i>.....	125
2.2.1	Análise estatística.....	126
2.3	Avaliação da atividade antibacteriana <i>in vitro</i>.....	127
2.3.1	Teste de Difusão em Cavidade em Ágar.....	127
2.3.2	Análise estatística.....	128
2.4	Avaliação da atividade antifúngica <i>in vitro</i>.....	129
2.4.1	Teste de Difusão em Disco.....	129

2.4.2	Análise estatística.....	130
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	131
3.1	Atividade tripanocida dos óleos essenciais.....	131
3.2	Atividade antibacteriana dos óleos essenciais.....	133
3.3	Atividade antifúngica dos óleos essenciais.....	137
4	CONCLUSÃO.....	141
	REFERÊNCIAS.....	142
	CAPÍTULO 4: ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Cinnamodendron dinisii</i> Schwacke E <i>Siparuna guianensis</i> Aublet.....	148
1	INTRODUÇÃO.....	150
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	152
2.1	Óleos essenciais.....	152
2.1.1	Obtenção do material vegetal.....	152
2.1.2	Extração do óleo essencial.....	153
2.2	Atividade citotóxica <i>in vitro</i>	153
2.2.1	Análise estatística.....	154
2.3	Atividade hemolítica.....	155
2.3.1	Preparo da suspensão de eritrócitos.....	155
2.3.2	Teste hemolítico em meio isotônico.....	156
2.3.3	Avaliação da oxidação da hemoglobina.....	157
2.3.4	Análise estatística.....	157
2.4	Teste do Cometa.....	157
2.4.1	Preparação dos nucleoides e teste do cometa.....	158
2.4.2	Eletroforese.....	159
2.4.3	Coloração e análises.....	159
2.4.4	Análise estatística.....	161
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	162
3.1	Atividade citotóxica dos óleos essenciais.....	162
3.2	Atividade hemolítica dos óleos essenciais.....	165
3.3	Teste do cometa dos óleos essenciais.....	171
4	CONCLUSÃO.....	178
	REFERÊNCIAS.....	179
	CAPÍTULO 5: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DAS ESTRUTURAS SECRETORAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE <i>Cinnamodendron dinisii</i> Schwacke E <i>Siparuna guianensis</i> Aublet.....	183
1	INTRODUÇÃO.....	185
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	187
2.1	Obtenção do material vegetal.....	187
2.2	Análises morfológicas.....	187

2.3	Análises histoquímicas.....	188
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	190
4	CONCLUSÃO.....	194
	REFERÊNCIAS.....	195
	APÊNDICE.....	197

CAPÍTULO 1: Introdução geral

1 INTRODUÇÃO

Tem-se observado um crescente interesse na investigação de plantas como fonte de compostos capazes de diminuir os efeitos negativos de substâncias oxidantes, radicais livres e micro-organismos (como bactérias, fungos, vírus e parasitas) que causam prejuízos tanto para a indústria alimentícia e a agricultura, como para a saúde humana.

Entre os compostos de origem vegetal, destacam-se os óleos essenciais, produtos voláteis do metabolismo secundário das plantas, extraídos por meio das técnicas de hidrodestilação e prensagem dos pericarpos de frutos cítricos, sendo a síntese e o acúmulo desses óleos essenciais geralmente associados à presença de estruturas especializadas, e influenciados por fatores bióticos e abióticos aos quais o organismo produtor é submetido. São compostos responsáveis pelo aroma de muitas plantas e têm se mostrado promissores na busca por novas substâncias com diferentes atividades biológicas (SIMÕES et al., 2007).

Os óleos essenciais vêm apresentando ação similar aos antioxidantes sintéticos comumente utilizados pela indústria alimentícia no controle de radicais livres e substâncias oxidantes. Além disso, os óleos essenciais têm a vantagem de, geralmente, não possuírem os efeitos nocivos à saúde associados aos antioxidantes sintéticos. Assim, os óleos voláteis podem ser empregados em alimentos como antioxidantes, para prolongar a vida útil desses alimentos durante o armazenamento, retardando a degradação de compostos essenciais, como algumas vitaminas e determinados ácidos graxos (RUBERTO; BARATTA, 2000).

Bactérias patogênicas, juntamente com fungos deteriorantes e micotoxigênicos, são os principais agentes de enfermidades causadas pela

ingestão de água e alimentos contaminados, conhecidas como doenças transmitidas por alimentos (DTAs), que vêm aumentando de modo significativo em nível mundial e se tornando a principal preocupação, do ponto de vista de segurança alimentar, entre consumidores e agências reguladoras. Devido à capacidade de os micro-organismos desenvolverem resistência aos antibióticos convencionais, os óleos essenciais podem constituir uma alternativa no controle de micro-organismos que causam a deterioração alimentar e toxinfecções em mamíferos, pois atuam de forma efetiva na inibição do seu crescimento.

Tem se observado também grande atividade antiparasitária dos óleos voláteis em testes *in vitro*, tornando-os potenciais substâncias para o desenvolvimento de novas drogas antiparasitárias, o que é de grande relevância, já que as doenças infecciosas parasitárias afetam milhões de pessoas nas regiões geográficas mais pobres do planeta e continuam sendo um obstáculo para o desenvolvimento social e econômico dessas regiões, deixando evidente a necessidade de novas alternativas terapêuticas.

Entre as doenças infecciosas parasitárias, encontra-se a doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, transmitido por triatomíneos (barbeiros), caracterizada por ser uma doença endêmica em países tropicais e subtropicais da América Latina, incluída no grupo das chamadas “doenças negligenciadas”, que afeta cerca de 10 milhões de pessoas em todo o mundo; aproximadamente 25-100 milhões de pessoas vivem em zonas de risco de infecção. Um fator agravante para essa doença é que a quimioterapia disponível não é totalmente eficiente, uma vez que o nifurtimox e o benznidazol, medicamentos disponíveis para o tratamento, atuam somente na fase aguda da doença e apresentam sérios efeitos colaterais (SALOMON, 2012).

Apesar da ampla utilização dos óleos essenciais, alguns de seus constituintes foram descritos como possuidores de propriedades citotóxicas, hepatotóxicas (pulegona), genotóxicas e carcinogênicas (safrol), o que torna

importante sua ampla caracterização, visando a uma melhor compreensão da sua ação em diferentes sistemas biológicos, possibilitando a indicação de aplicações seguras tanto na saúde quanto na alimentação humana (BAKKALI et al., 2008).

Considerando a diversidade vegetal do Brasil e a pequena porcentagem de espécies de plantas investigadas tanto do ponto de vista fitoquímico como farmacológico e toxicológico, o estudo de plantas de ocorrência natural em nosso país, como a “pimenteira” (*Cinnamodendron dinisii* Schwacke) e a “negramina” (*Siparuna guianensis* Aublet), torna-se de grande importância.

A espécie *C. dinisii* pertence à família Canellaceae, que ocorre no Brasil desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul no Planalto Meridional e Serra da Mantiqueira. É uma árvore de 10-20 metros de altura, e a casca do tronco, de sabor picante como a pimenta verdadeira, possui propriedades medicinais e é levemente entorpecente (LORENZI, 2002; PEIXOTO; BARROS, 2010).

A espécie *S. guianensis* pertence à família Siparunaceae, é utilizada como recurso medicinal pela população matogrossense, onde o decocto de suas folhas é empregado no combate aos sintomas de sinusite, febre, reumatismo, enxaqueca, gripe, dores no corpo e “malina” (VALENTINI; RODRIGUEZ-ORTIZ; COELHO, 2010).

Assim, objetivou-se neste estudo determinar a composição química dos óleos essenciais de *C. dinisii* e *S. guianensis*, as suas atividades antioxidante, antibacteriana, antifúngica, tripanocida, citotóxica, hemolítica e avaliar a capacidade de causarem danos no DNA de linfócitos humanos, além de caracterizar as suas estruturas secretoras.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Óleos essenciais

As macromoléculas, como carboidratos, proteínas, lipídios e ácidos nucleicos, são produzidas, degradadas ou transformadas em um conjunto de processos bioquímicos denominado metabolismo primário. As substâncias originadas desse metabolismo são conhecidas como metabólitos primários, que são compostos que participam da nutrição e dos processos metabólicos essenciais à manutenção da vida do organismo produtor (SIMÕES et al., 2007).

Vegetais e alguns micro-organismos também são capazes de produzir, transformar e acumular substâncias que não estão necessariamente relacionadas com a manutenção da vida do organismo produtor; elas são denominadas metabólitos secundários e são originadas por um conjunto de reações químicas conhecido como metabolismo secundário. Esses metabólitos estão envolvidos nas interações ecológicas entre o organismo produtor e o ambiente, garantindo vantagens para sua sobrevivência e para a perpetuação de sua espécie, em seu ecossistema (TAIZ; ZEIGER, 2004; SIMÕES et al., 2007).

Entre as substâncias sintetizadas pelas plantas como metabólitos secundários, encontram-se os constituintes dos óleos essenciais que são caracterizados por serem uma mistura complexa desses metabólitos, por apresentarem alta volatilidade e odor forte. São límpidos, raramente coloridos, lipossolúveis e solúveis em solventes orgânicos, com densidade geralmente mais baixa que a da água. Podem ser sintetizados em todos os órgãos do vegetal, e são armazenados em células secretoras especializadas, como os tricomas glandulares, as cavidades e os canais secretores (BAKKALI et al., 2008; BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Os óleos essenciais apresentam como propriedades físico-químicas 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. Dada a sua complexa composição, apresentam alta probabilidade de sofrerem modificações físico-químicas devido às reações entre seus próprios constituintes ou entre eles e o meio (BANDONI; CZEPAK, 2008; ASTANI; REICHLING; SCHNITZLER, 2009).

Na natureza, os óleos essenciais desempenham um papel importante na proteção das plantas, podendo atuar como agentes antibacterianos, antivirais, antifúngicos, inseticidas e também contra o ataque de herbívoros. Eles também podem atrair alguns insetos que realizam a dispersão do pólen e sementes, ou repelir outros indesejáveis, além de atuarem como inibidores de germinação (alelopatia), no controle de perda de água e do aumento de temperatura (PICHERSKY; GANG, 2000).

As técnicas que podem ser utilizadas para a obtenção de óleos essenciais são hidrodestilação, destilação por arraste de vapor e prensagem (ou expressão) de pericarpos de frutos cítricos; de acordo com o tipo de extração, o perfil químico dos óleos essenciais pode diferir não só no número de moléculas, mas também na estereoquímica e nos tipos de moléculas extraídas (SIMÕES et al., 2007; BANDONI; CZEPAK, 2008).

A composição dos óleos essenciais está constantemente em transformação, mudando as proporções de seus constituintes ou transformando uns constituintes em outros, conforme a parte da planta, o estágio do seu desenvolvimento ou o momento do dia, podendo também ser determinada geneticamente, variando de acordo com a origem botânica, o quimiotipo, fatores ambientais e procedimento de cultivo das plantas. A composição varia também de acordo com a origem geográfica, forma de secagem, época de colheita, tipo

de adubação, entre outros. Portanto, para se obter óleos essenciais de composição padronizada, eles devem ser extraídos sob as mesmas condições, do mesmo órgão da planta, que tenha crescido no mesmo solo, sob o mesmo clima e colhido na mesma estação (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; SIMÕES et al., 2007; BAKKALI et al., 2008).

Os óleos essenciais são constituídos de substâncias terpênicas, acrescidos de moléculas menores, de funções orgânicas distintas, como álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, e raramente compostos com enxofre ou nitrogênio. Geralmente, contém cerca de 20-60 componentes em concentrações variáveis e são caracterizados por apresentarem dois ou três componentes em concentrações bastante elevadas (20-70%), quando comparadas com a dos demais presentes. Aqueles que se apresentam em maior concentração são denominados compostos majoritários (DELAMARE et al., 2007; BAKKALI et al., 2008).

Os componentes dos óleos essenciais, apesar de serem muitos, são derivados do metabolismo secundário das plantas, a partir da glicose, e são divididos em apenas dois grupos de origem biossintética distinta: o grupo dos terpenoides e dos fenilpropanoides, todos caracterizados pelo baixo peso molecular (BAKKALI et al., 2008).

2.1.1 Biossíntese dos terpenoides

Os terpenoides constituem uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo o termo empregado para designar todas as substâncias cuja origem biossintética é o isopreno (2-metil-1,3-butadieno), em que as moléculas bioquimicamente ativas desse composto são definidas como ésteres difosfato (ou pirofosfato), o dimetilalil difosfato (DMAPP) e o isopentenil difosfato (IPP). Posteriormente, as estruturas básicas dos terpenos podem ser modificadas por

reduções, oxidações e ciclizações para a biossíntese dos mais diversos terpenoides. Os compostos terpênicos mais frequentes nos óleos essenciais são os monoterpenos, contendo 10 átomos de carbono, (90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos, com 15 átomos de carbono (HARTMANN, 2007; SIMÕES et al., 2007).

Os terpenoides são sintetizados via mevalonato no citoplasma. Esse é formado por condensação de uma unidade da acetoacetil-Coenzima A (acetoacetil-CoA) com a acetil-CoA, seguida de uma hidrólise, formando o 3-hidroxi-3-metilglutaril-CoA (HMG-CoA). Em seguida, o HMG-CoA é reduzido por um processo que depende de NADPH e é catalisado pela HMG-CoA-redutase a mevalonato que, por sua vez, mediante reações de fosforilação e descarboxilação, é convertido em isopentenil-pirofosfato e seu isômero dimetilalilpirofosfato (Figura 1) (DEWICK, 2002; BARTRAM et al., 2006).

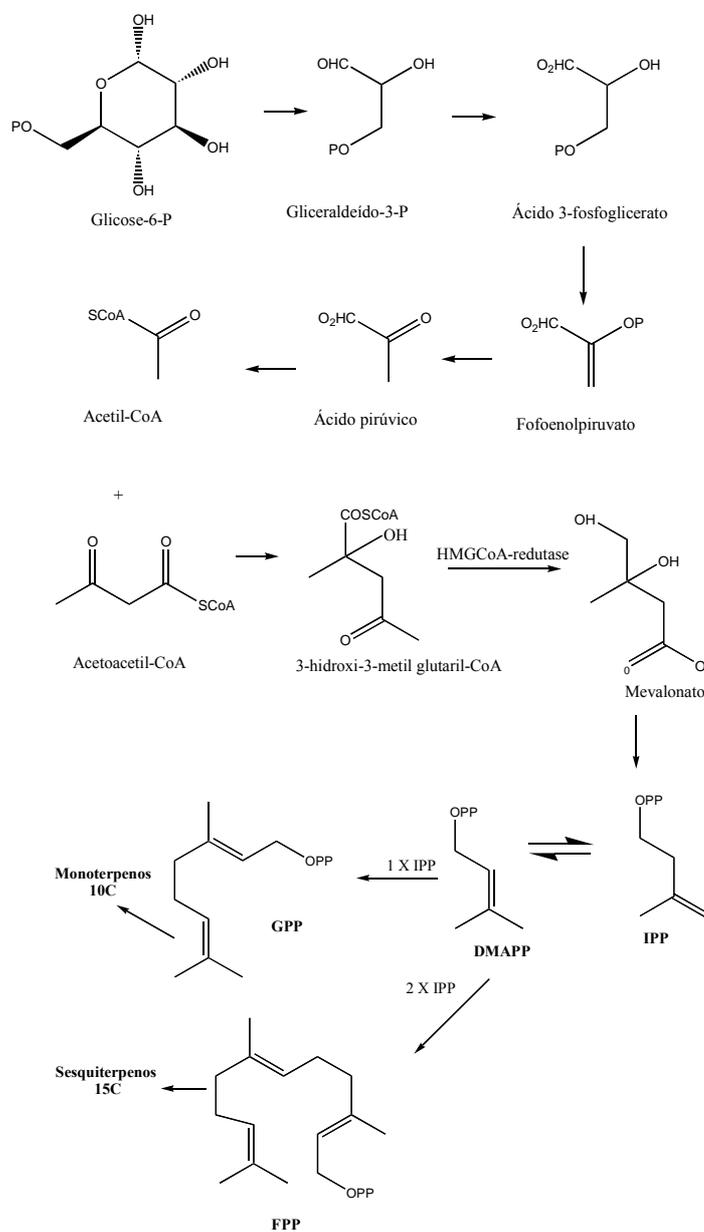


Figura 1 Biossíntese de terpenos via mevalonato
 Fonte: Adaptada de Simões et al. (2007)

A produção do IPP pode ocorrer também nos cloroplastos, pela via 1-deoxi-D-xilulose conhecida como via DXPS, nos quais ocorre a condensação de uma molécula de piruvato e outra de D-gliceraldeído-3-fosfato, formando a 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato; após reações sucessivas, origina-se a molécula de IPP e de DMAPP (Figura 2) (EISENREICH; ROHDICH; BACHER, 2001).

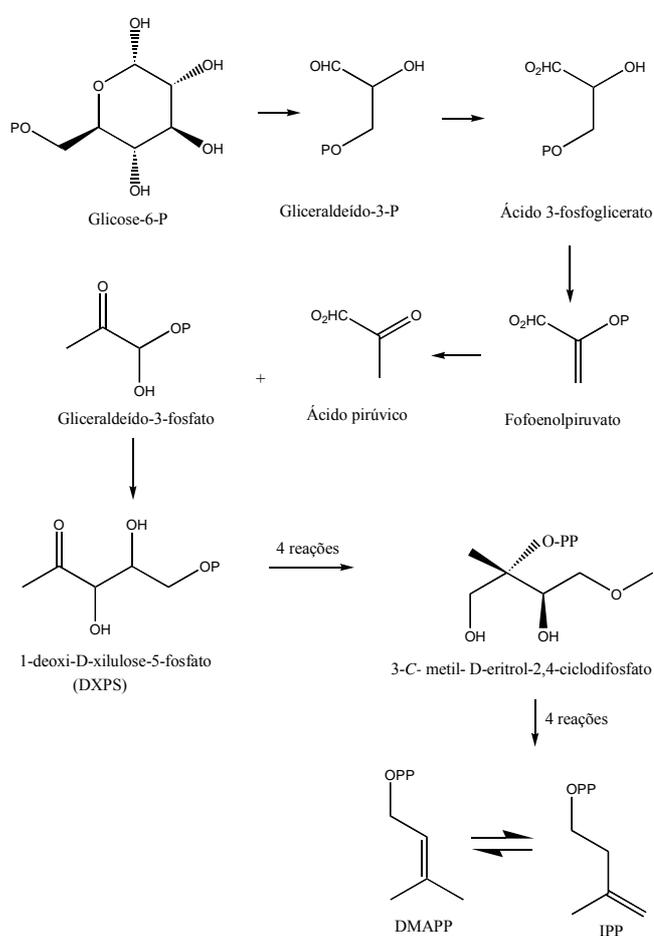


Figura 2 Biossíntese de terpenos via DXPS
 Fonte: Adaptada de Dewick (2002)

As moléculas de IPP e DMAPP formadas em ambas as vias condensam-se e originam o *trans*-geranilpirofosfato (GPP), que é convertido nos diferentes monoterpenos (10 carbonos). Devido à polimerização do *trans*-geranilpirofosfato com IPP, são formadas cadeias crescentes de cinco em cinco átomos de carbono, que dará origem aos sesquiterpenos (15 carbonos), aos diterpenos (20 carbonos) e assim por diante; quanto maior o número de carbonos, maior o potencial para diversidade estrutural e estereoquímica destes compostos (DEWICK, 2002; BARTRAM et al., 2006).

2.1.2 Biossíntese dos fenilpropanoides

Os fenilpropanoides são compostos aromáticos que derivam da rota que se inicia com a formação do ácido chiquímico e são menos abundantes do que os terpenoides. Caracterizam-se por possuírem em suas estruturas um anel benzênico com uma cadeia lateral composta de três carbonos, que apresenta uma dupla ligação, podendo ter um grupo funcional com oxigênio.

O ácido chiquímico é formado pela condensação aldólica de dois metabólitos da glicose: o fosfoenolpiruvato e a eritrose-4-fosfato, e posteriormente, por várias reações é convertido nos aminoácidos fenilalanina e tirosina. Estes pela ação da enzima fenilalanina amonialiase (FAL) (enzima que é ponto de ramificação entre o metabolismo primário e o metabolismo secundário), perdem uma molécula de amônia, resultando na formação dos ácidos cinâmico e *p*-cumárico, que apresentam em sua estrutura uma cadeia lateral contendo três átomos de carbono ligados ao anel aromático. Os fenilpropanoides simples são produzidos por meio de uma série de oxidações, reduções, ciclizações e reações de desidratação do ácido cinâmico ou *p*-cumárico (Figura 3) (SIMÕES et al., 2007).

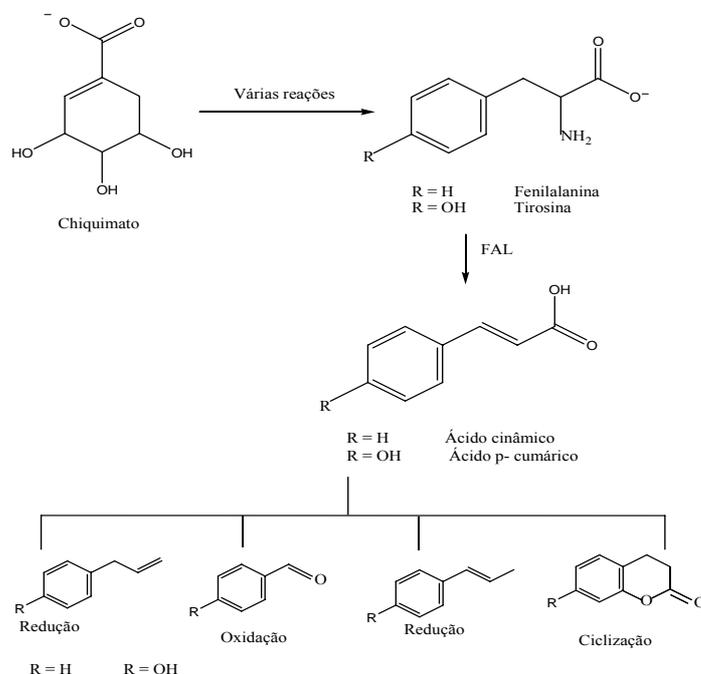


Figura 3 Biossíntese de fenilpropanoides

Fonte: Adaptada de Simões et al. (2007)

2.2 Importância econômica e aplicações dos óleos essenciais

Os óleos essenciais possuem grande aplicação na indústria de higiene pessoal, perfumaria, cosmética, alimentos, além de serem coadjuvantes em medicamentos. São empregados principalmente como aromas, fragrâncias, fixadores de fragrâncias, em composições farmacêuticas, além de serem comercializados na sua forma bruta ou beneficiada, como as substâncias purificadas limoneno, citral, citronelal, eugenol, mentol e safrol (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Os odores e sabores característicos dos óleos essenciais são os responsáveis pelas suas aplicações, assim como pelas suas variadas atividades biológicas, como antibacteriana, antifúngica, antioxidante e outras. Essas atividades, atribuídas a esses compostos, representam, de certo modo, uma extensão do papel ecológico que eles exercem nas plantas, defendendo-as das bactérias, vírus e fungos fitopatogênicos (BAKKALI et al., 2008). Porém, a aplicação comercial do óleo essencial é determinada pela estrutura, grupo funcional e composição, uma vez que essas características são responsáveis por sua atividade biológica e suas propriedades físico-químicas.

Até 2003, as patentes depositadas envolvendo compostos terpênicos e terpenoides e óleos essenciais nas áreas de preparações medicinais somaram 13,95%; para a manipulação genética de plantas superiores e micro-organismos para síntese de terpenos somaram 8,37%; para tensoativos, 4,04%; para polímeros, 3,32% e para cosméticos, 3,10%. A Companhia norte-americana Procter e Gamble possui 2,01% das patentes listadas na pesquisa, seguida por Colgate-Palmolive (1,38%), a empresa francesa L'OREAL (2,01%) e a alemã Hoescht (1,09%), o que demonstra uma crescente busca por novas tecnologias para áreas de tensoativos, compostos farmacêuticos e polímeros utilizando óleos essenciais, compostos terpênicos e terpenoides (SILVA-SANTOS et al., 2006; MONTANARI, 2010).

De acordo com Bizzo; Hovell; Rezende (2009), existem 300 óleos essenciais de importância comercial no mundo. Nesse contexto, o Brasil encontra-se entre os grandes exportadores internacionais, que juntamente com a Índia, China e Indonésia, compõem o grupo dos quatro maiores produtores mundiais de óleos essenciais. O Brasil destaca-se principalmente pela produção de óleos essenciais proveniente da prensagem de pericarpos de frutos cítricos (subprodutos da indústria de sucos); entre 2004 e 2007, os óleos essenciais extraídos de produtos cítricos contribuíram com 5% do total de óleos importados

pela União Europeia e 2% do total importado pelos Estados Unidos. Apesar de se destacar no mercado internacional de óleos essenciais, o Brasil sofre de problemas crônicos, como falta de manutenção do padrão de qualidade dos óleos, representatividade nacional e baixos investimentos governamentais no setor, que levam ao quadro estacionário observado.

2.3 Estruturas secretoras

A biossíntese dos óleos essenciais ocorre por meio de um intercâmbio bioquímico de produtos e precursores entre os diversos compartimentos celulares, como plastídios, retículo endoplasmático rugoso, mitocôndrias e citosol. Vários desses compartimentos celulares trabalham em conjunto para a biossíntese; porém, apenas algumas células diferenciadas para a função secretora possuem as enzimas adequadas para a produção dos óleos essenciais. Essas células especiais localizam-se em estruturas bem definidas anatomicamente, que podem estar presentes em qualquer órgão dos vegetais (MONTANARI, 2010).

A presença das estruturas secretoras está relacionada à interação da planta com o meio ambiente em que está inserida; assim, a função das estruturas secretoras está diretamente relacionada ao papel ecológico dos metabólitos secundários produzidos pelas plantas (FAHN, 1979).

Dependendo da família taxonômica em estudo, o óleo essencial pode ser encontrado em diversas estruturas de armazenamento, podendo essas ser externas, quando ocorrem na superfície da planta e secretam substâncias diretamente fora da planta, como os tricomas secretores (Lamiaceae), ou estruturas internas, quando ocorrem no interior da planta e secretam substâncias nos espaços intercelulares, como os ductos oleíferos (Apiaceae) ou cavidades secretoras (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae) (SIMÕES et al., 2007).

O conhecimento morfológico, anatômico e ultraestrutural dessas estruturas histológicas é essencial, pois podem auxiliar na identificação da espécie, auxiliar na compreensão da sua função na planta, e proporcionar o melhor aproveitamento do material vegetal, tratamento adequado das plantas na colheita, na secagem e no armazenamento, para otimizar o processo de obtenção dos óleos essenciais (SVOBODA; GREENAWAY, 2003; SIMÕES et al., 2007).

2.3.1 Estruturas secretoras externas

As estruturas vegetais externas secretoras de óleos essenciais são representadas pelos tricomas glandulares, que são intensivamente estudados graças à sua ampla distribuição entre as plantas superiores, suas diversas funções e à sua grande variação morfológica tanto do tricoma individualmente como da composição geral do revestimento da planta.

Morfológicamente, os tricomas glandulares são pêlos epidérmicos modificados e podem ser encontrados em diversas partes das plantas, como folhas, caules e até flores. São divididos em dois grupos, os capitados e os peltados; porém, ambos apresentam como característica comum a morfologia básica, caracterizada pela presença de uma região basal, um pedúnculo e uma cabeça (COMBRINCK et al., 2007).

O tricoma peltado se caracteriza pela presença de uma célula basal, pedúnculo curto constituído de apenas uma célula e cabeça multicelular (com mais de duas células). Já um tricoma capitado apresenta uma célula basal, um pedúnculo unicelular e duas células na cabeça; ou pode apresentar uma célula basal, pedúnculo multicelular e uma pequena cabeça esférica unicelular. Os tricomas capitados são classificados em tipo I, quando apresentam cabeças unicelulares arredondadas e cabeças bicelulares, e tipo II, quando possuem cabeça unicelular em forma de pera (Figura 4) (BISIO et al., 1999; SVOBODA;

HAMPSON; HUNTER,1999; COMBRINCK et al., 2007; GUIMARÃES, 2010).

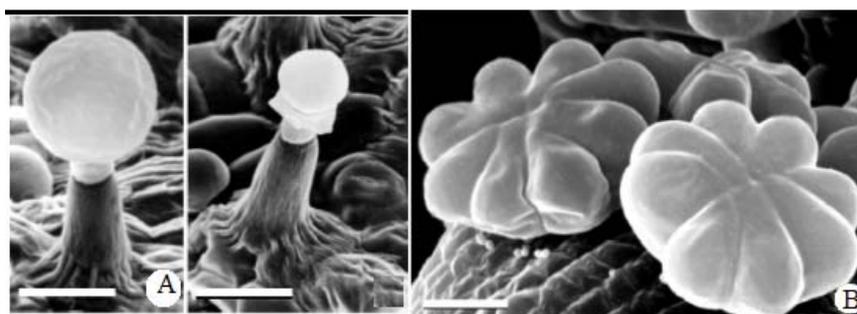


Figura 4 Fotografias em microscopia eletrônica de varredura mostrando tipos morfológicos de tricomas glandulares em Lamiaceae. A) Tricomas capitados de pedúnculo longo, respectivamente em fase secretora e pós-secretora. B) Tricomas peltados

Fonte: Adaptado de Ascensão (2007)

As funções dos tricomas envolvem proteção das plantas contra herbívoros, calor e luz solar, podendo controlar a temperatura das folhas tão bem como a perda de água (KOLB; MULLER, 2004). Em muitas plantas, os tricomas glandulares também são os responsáveis pela biossíntese e armazenamento de óleos essenciais, sendo, muitas vezes, chamados de glândulas de óleo essencial. *Menta piperita*, por exemplo, acumula grandes quantidades de monoterpenos em tricomas glandulares peltados. O estudo desses tricomas revelou serem as células secretoras o local da síntese dos monoterpenos nessa espécie (MONTANARI, 2010).

2.3.2 Estruturas secretoras internas

As estruturas internas são representadas pelas cavidades e canais secretores. As cavidades secretoras são formadas pela diferenciação de uma célula, dando origem a uma cavidade com epiderme, ou pela formação de espaços intercelulares entre células parenquimáticas. São caracterizadas por serem estruturas arredondadas, assumindo formas esféricas. Os ductos secretores são formados pela união de diversas cavidades secretoras, revestidos por várias células adjacentes, situando-se entre essas células secretoras e as células epiteliais, apresentando-se como cavidades alongadas (Figura 5). Essas estruturas são as principais responsáveis pela grande produção de óleos essenciais extraídos de plantas, como as pertencentes à família Myrtaceae (SVOBODA; HAMPSON; HUNTER, 1999; GUIMARÃES, 2010).

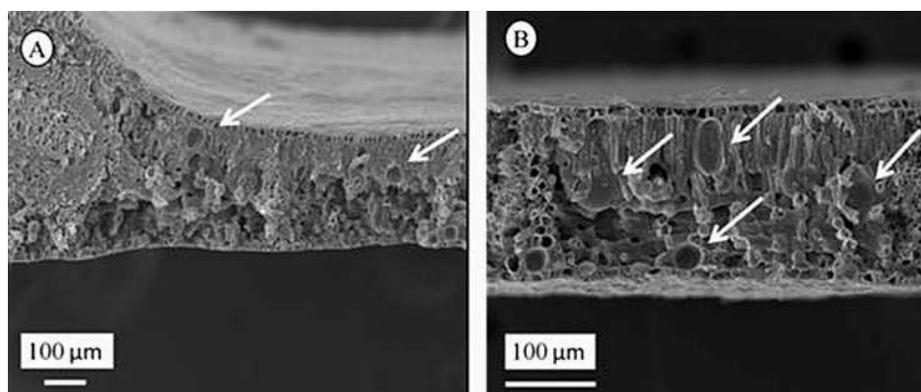


Figura 5 Fotografias em microscopia eletrônica de varredura das folhas de *Ocotea odorifera*. A) Células secretoras espalhadas por todo o mesofilo. B) Células secretoras de formato elíptico e esférico
Fonte: Adaptado de Guimarães (2010)

2.4 Antioxidantes

Substâncias antioxidantes são aquelas que inibem e/ou diminuem os efeitos desencadeados pelos radicais livres e compostos oxidantes em substratos oxidáveis. Essas substâncias podem ser enzimáticas, como as superóxido dismutases, catalase, e glutathione peroxidase, ou não enzimáticas, como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C) e os compostos fenólicos (FRANKEL; FINLEY, 2008).

No organismo humano, a atividade metabólica normal produz compostos que contêm um ou mais elétrons não pareados, conhecidos como radicais livres (R^{\cdot}). Radical livre é o termo utilizado para designar qualquer átomo ou molécula, com existência independente, apresentando em sua estrutura atômica um ou mais elétrons desemparelhados no seu orbital mais externo, conferindo maior reatividade em relação às espécies não radicalares. Essas moléculas são produzidas em situações fisiológicas ou patológicas por mecanismos diferentes, como na respiração celular, e reações de oxidação, podendo ser danosas às células, quando produzidas em excesso (GUTIERREZ, 2002).

Os radicais apresentam-se altamente reativos, embora sua reatividade varie ao longo de um amplo espectro, devido à presença de elétrons desemparelhados. São exemplos desses radicais substâncias que podem apresentar o elétron livre centrado em átomos de oxigênio, nitrogênio, hidrogênio, carbono ou enxofre, além de átomos de metais de transição. Entre as principais espécies de radicais livres, espécies reativas de oxigênio (ERO) ou nitrogênio (ERN), encontram-se o 1O_2 (oxigênio singlete), $O_2^{\cdot-}$ (radical superóxido), OH^{\cdot} (radical hidroxila), NO^{\cdot} (óxido nítrico), $ONOO^{\cdot-}$ (peroxinitrito) e Q^{\cdot} (radical semiquinona) (OLIVEIRA et al., 2009).

Esses radicais são tão ativos que, uma vez formados, ligam-se a diferentes compostos em frações de segundo. Ao fazê-lo, eles podem transferir seu elétron não pareado ou capturar um elétron de outra molécula, a fim de se estabilizar, formando um par de elétrons para uma nova ligação covalente. De uma forma ou de outra, os radicais acabam ficando estáveis, mas a molécula atacada, em si, transforma-se em um radical. Isso inicia uma reação em cadeia que pode agir destrutivamente sobre um tecido (LIMA; ABDALLA, 2001; SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2005).

Radicais livres desempenham papel fundamental no metabolismo celular, como, por exemplo, participação na produção de ATP, fagocitose, regulação do crescimento celular, entre outros. No entanto, o desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes gera o estresse oxidativo, levando os radicais livres em excesso a atacar e danificar praticamente qualquer molécula encontrada no organismo, por meio da peroxidação lipídica das membranas, modificações oxidativas das proteínas, lesões no ácido desoxirribonucleico (DNA) e lesão de reperfusão, e provocando, assim, alterações teciduais responsáveis por diversas patologias, incluindo o câncer, aterosclerose e cardiopatias, entre outras (SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2005; ABRAHÃO et al., 2010).

Para ajudar o organismo a combater o excesso de radicais livres, é necessária a ingestão de elementos antioxidantes que são encontrados naturalmente em alguns alimentos e bebidas. Vários compostos presentes em frutas e vegetais possuem essa atividade, como as vitaminas (α -tocoferol, β -caroteno, ácido ascórbico), clorofilina, curcumina, flavonoides e também alguns óleos essenciais (RUBERTO; BARATTA, 2000; OLIVEIRA et al., 2009).

Nos alimentos, o aparecimento de sabores e odores desagradáveis, que os tornam impróprios para o consumo, e de outras alterações que podem afetar tanto a qualidade nutricional, a integridade e segurança desses, é causado pela

ação dos radicais livres por meio da peroxidação lipídica, que leva à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais presentes nos alimentos (RAMALHO; JORGE, 2006).

Nas indústrias de alimentos, substâncias antioxidantes são empregadas no controle dos radicais livres que provocam a oxidação lipídica de óleos e gorduras. Entre essas substâncias, as mais utilizadas são as sintéticas butil-hidroxi-anisol (BHA), 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT), tert-butil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG) (Figura 6); porém, estudos relacionados com a toxicologia desses compostos têm demonstrado a possibilidade de eles apresentarem efeito carcinogênico em experimentos com animais; por isso, o uso de antioxidantes sintéticos é restrito em vários países. No Brasil, o uso dessas substâncias é controlado pela Anvisa (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), por meio da RDC Nº 64, de 16 de setembro de 2008, limitando as concentrações máximas de uso para $0,02\text{g } 100\text{g}^{-1}$ para TBHQ, BHA, BHT e PG e $0,15\text{g } 100\text{g}^{-1}$ para α -tocoferol (RAMALHO; JORGE, 2006; BRASIL, 2008).

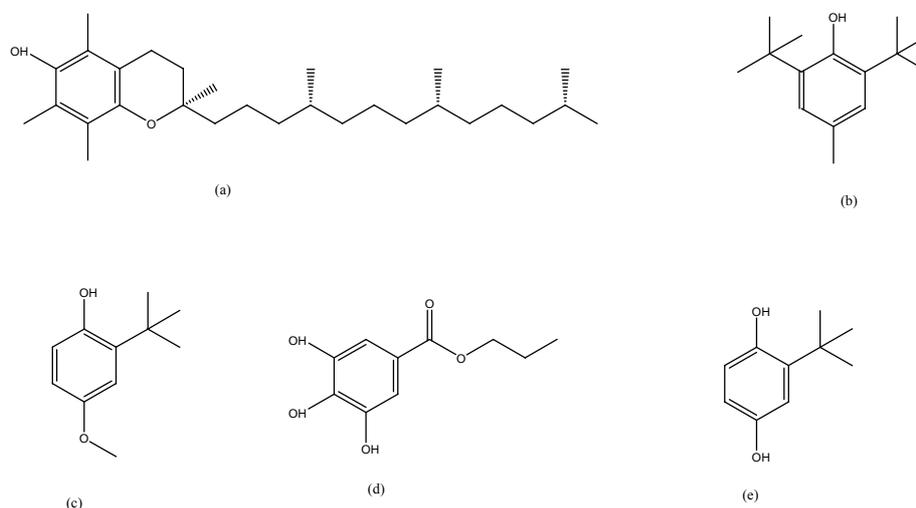


Figura 6 Estruturas químicas dos principais antioxidantes utilizados na indústria (a) α -Tocoferol, (b) BHT, (c) BHA, (d) PG e (e) TBHQ

Diante dos possíveis problemas causados pelos antioxidantes sintéticos, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas com o intuito de encontrar produtos naturais com atividade antioxidante, que permitirão a substituição dos sintéticos ou fazer associações entre eles, com a finalidade de diminuir sua quantidade nos alimentos.

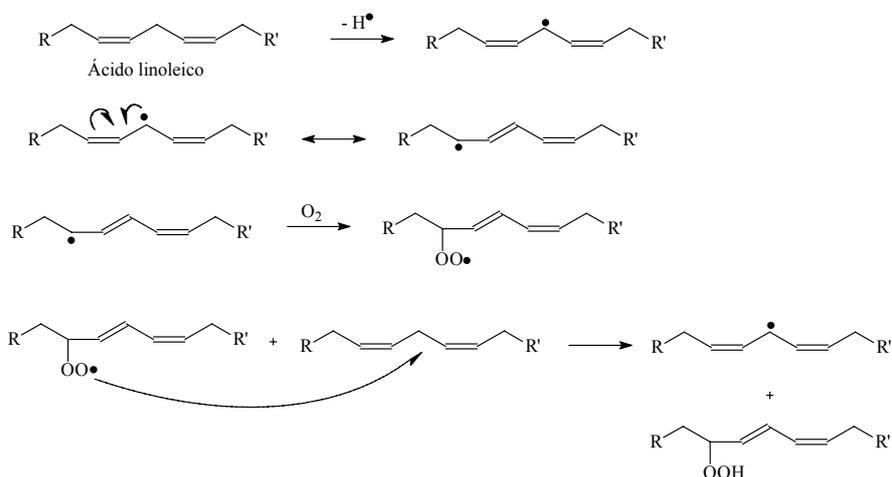
Para selecionar de forma rápida as substâncias e compostos com potencial antioxidante, que possam ser utilizadas na conservação de alimentos e na prevenção de doenças crônico-degenerativas, são empregados vários métodos *in vitro*, que avaliam esse potencial. Atualmente, esses métodos podem ser classificados em duas categorias: os métodos diretos, baseados na transferência direta de hidrogênio, e os métodos indiretos, baseados na transferência de elétrons. Entre os principais métodos que ocorrem via transferência direta de hidrogênio, encontra-se o ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico e entre aqueles que estão baseados na transferência de elétrons, o principal ensaio é o que avalia a redução do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH) (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

2.4.1 Ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

O ensaio da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico é baseado na abstração de uma molécula de hidrogênio da molécula insaturada do β -caroteno, por um radical livre gerado pela oxidação do ácido linoleico, após ter submetido o sistema modelo a condições de oxidação. Como resultado da oxidação do β -caroteno na ausência de antioxidantes, o sistema perde a sua coloração alaranjada característica, que é monitorada espectrofotometricamente, de modo a possibilitar a quantificação do grau de inibição da oxidação pelo antioxidante a ser testado (Figura 7) (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; JAYAPRAKASHA et al., 2007).

Esse método simula a oxidação dos componentes da membrana lipídica na presença de antioxidantes no interior das células, e assim como a capacidade de inibir a formação de dienos conjugados de hidroperóxido resultantes da oxidação do ácido linoleico. Assim, o sistema β -caroteno/ácido linoleico avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico, ou seja, a capacidade de uma amostra ou composto em proteger um substrato lipídico da oxidação (TEPE et al., 2005).

1) Formação dos radicais a partir do ácido linoleico



2) Ataque dos radicais ao beta-caroteno

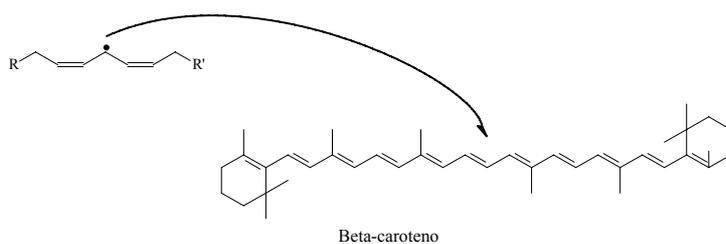


Figura 7 Esquema geral do processo de peroxidação lipídica
Fonte: Adaptada de Lima e Abdalla (2001)

2.4.2 Ensaio de redução do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH)

O método de redução do radical estável DPPH baseia-se na reação dos compostos antioxidantes com radicais estáveis DPPH, de cor violeta. Quando esses são adicionados a substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio ao DPPH, ele é convertido em 1,1-difenil-2-picrilhidrazina (DPPHH), ocorrendo à perda da coloração do meio reacional (Figura 8). Assim, quanto maior o grau de descoloração do DPPH maior o potencial do composto de reduzir o radical DPPH e, conseqüentemente, alta atividade antioxidante (HUANG; OU; PRIOR, 2005; TEPE et al., 2005; JAYAPRAKASHA et al., 2007). Essa redução do DPPH também pode ocorrer por meio de um mecanismo de transferência de elétrons por parte do composto antioxidante (EBRAHIMABADI et al., 2010).

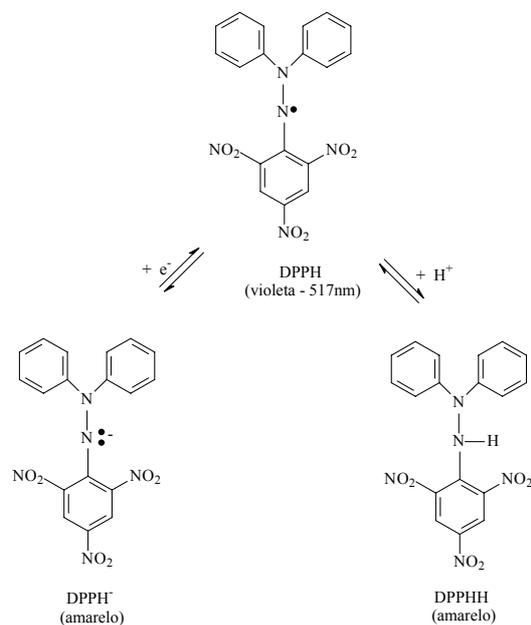


Figura 8 Esquema geral da redução do DPPH

2.4.3 Atividade antioxidante dos óleos essenciais

Muitos óleos essenciais têm apresentado resultados que indicam uma ação similar aos compostos sintéticos no controle de radicais livres ou substâncias oxidantes (RUBERTO; BARATTA, 2000; LIMA et al., 2012; ANDRADE et al., 2012).

Na maioria dos trabalhos, os compostos responsáveis pela atividade antioxidante conferida a alguns óleos essenciais são principalmente os fenilpropanoides. Esses podem apresentar em sua estrutura um ou mais grupos hidroxila (OH), ou metoxila (CH_3O) ligados ao anel aromático, instaurações e elétrons disponíveis para serem doados. O timol e o carvacrol, encontrados como componentes de óleos essenciais de várias plantas, são exemplos de substâncias presentes nos óleos essenciais com ação antioxidante. Esses compostos apresentam caráter ácido, e são, portanto, capazes de doar átomos de hidrogênio com um elétron desemparelhado (H^\bullet), em que o radical formado é estabilizado pelas estruturas de ressonância resultante da deslocalização dos elétrons na molécula (Figura 9).

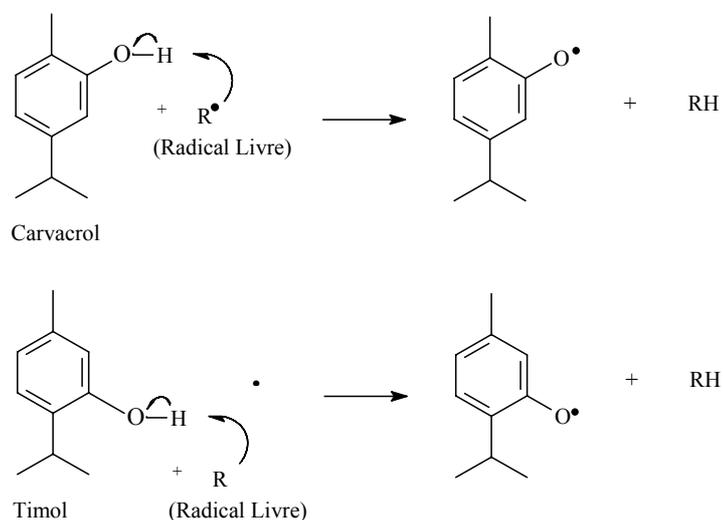


Figura 9 Moléculas de carvacrol e timol, respectivamente, atacadas por um radical livre (R[•])
 Fonte: Adaptada de Lima (2008)

Ruberto e Baratta (2000), avaliando a atividade antioxidante de aproximadamente 100 compostos encontrados nos óleos essenciais, verificaram que, de um modo geral, hidrocarbonetos mono e sesquiterpênicos apresentam um baixo, ou nenhum, efeito antioxidante; porém, são capazes de aumentar a atividade ao agir sinergicamente com outros compostos.

Apesar de muitos estudos sugerirem que a maioria dos componentes dos óleos essenciais possuem atividade antioxidante, Bakkali et al. (2008) citam que alguns desses compostos possuem atividade pró-oxidante, afetando, assim, as membranas das células e organelas internas, e que dependendo do tipo e concentração, eles apresentam efeitos citotóxicos em células vivas, mas geralmente são não-genotóxicos. Diante disso, tornam-se necessários mais estudos referentes ao potencial antioxidante dos óleos essenciais e o seu modo de ação nos diferentes tipos de células.

2.5 Doenças transmitidas por alimentos (DTAs)

Doenças transmitidas por alimentos (DTAs) são normalmente causadas por micro-organismos ou suas toxinas, e na maioria das vezes, se manifestam por meio de doenças gastrointestinais, que podem variar acentuadamente em gravidade e duração. As DTAs são definidas pelo Ministério da Saúde, na RDC nº12/2001, como uma síndrome originada pela ingestão de alimentos e/ou de água que contêm agentes etiológicos (biológicos, toxinas, físicos ou substâncias químicas) em quantidades tais que afetem a saúde do consumidor em nível individual ou grupo de população (BRASIL, 2001; PIGOTT, 2008).

As DTAs vêm aumentando de modo significativo em nível mundial e se tornando a principal preocupação, do ponto de vista de segurança alimentar, entre consumidores e agências reguladoras. Muito embora a maioria dos casos sejam considerados como leves e moderados, algumas infecções mais graves podem causar sequelas e até mesmo óbitos, além dos gastos hospitalares e do afastamento de atividades profissionais e escolares (RIDEL, 2005).

Os micro-organismos causadores de DTAs são divididos em dois tipos: infecciosos e intoxicantes. O primeiro grupo compreende aqueles que se multiplicam no trato intestinal humano, enquanto o segundo grupo é formado por aqueles que produzem toxinas, tanto nos alimentos como durante a sua passagem no intestino. Assim, para que uma infecção de origem alimentar ocorra, é necessário que o micro-organismo esteja viável para provocar a doença. Em contrapartida, em toxinoses de origem alimentar, a presença do micro-organismo viável não é estritamente necessária, pois a toxina pode ser pré-formada no alimento. Para a ocorrência de toxinfecções, é necessária a ingestão de alimentos com certa quantidade de micro-organismos viáveis causadores de doenças, os quais são capazes de produzir ou liberar toxinas após serem ingeridos (FORSYTHE, 2005; JAY, 2005).

As doenças de origem alimentar podem ser provocadas por diversos grupos de micro-organismos, incluindo bactérias, fungos, protozoários e vírus.

2.5.1 Bactérias

As bactérias são os principais micro-organismos envolvidos nos processos de contaminações de alimentos, pela sua diversidade e patogenicidade, e por atuarem sob numerosos tipos de substratos, sob diferentes faixas de temperatura e de pH, bem como diversas condições do meio ambiente. Elas são agentes importantes na etiologia das DTAs de origem microbiana, sendo responsáveis pelo maior número de surtos e de mortes, seja como causadoras de infecções, seja de intoxicações ou toxinfecções (SOUSA, 2003; JAY, 2005).

Entre as bactérias patogênicas que podem vir a ocasionar DTAs, citam-se a *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa* e algumas espécies do gênero *Salmonella* (FORSYTHE, 2005; JAY, 2005).

2.5.1.1 *Staphylococcus aureus*

O *S. aureus* é um organismo que se apresenta em forma de cocos Gram-positivo. Possui como características ser oxidase negativo, coagulase positivo e aeróbico facultativo; pode crescer em uma ampla margem de temperaturas, tendo como limite mínimo e máximo 7°C e 49°C, respectivamente, e a produção de toxinas ocorre na faixa de 10°C - 48°C, mas sua faixa ótima de produção é de 40°C - 45°C (FORSYTHE, 2005; JAY, 2005).

S. aureus é o patógeno humano mais importante entre os estafilococos. É encontrado no ambiente externo e nas narinas de 20-40% dos adultos, ao passo que 60% dos humanos podem ser colonizados temporariamente, o que aumenta

os riscos de contaminação dos alimentos manipulados, sendo os produtos lácteos os principais substratos alimentícios para esse micro-organismo (BANIA et al., 2006).

A intoxicação alimentar estafilocócica é atribuída à ingestão de toxinas produzidas e liberadas pela bactéria durante sua multiplicação no alimento, representando um risco para a saúde pública. As enterotoxinas são termoestáveis, podendo permanecer no alimento mesmo após o cozimento, favorecendo a ocorrência da intoxicação. O período de incubação da doença pode variar de 30 minutos até 8 horas; porém, na maioria dos casos, os sintomas aparecem entre 2 e 4 horas após a ingestão do alimento contaminado (STAMFORD et al., 2006; FISHER et al., 2007).

Devido à sua capacidade de produzir infecções em diversos tecidos do corpo humano, essa bactéria está associada a altas taxas de mortalidade e morbidade. É capaz de adquirir resistência a antibióticos e de sobreviver em diferentes condições ambientais, o que a torna 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; SANTANA et al., 2010).

2.5.1.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli apresenta-se na forma de 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. São imóveis; porém, alguns têm a capacidade de mobilidade, pois possuem flagelos peritricos. Podem crescer em pH entre 4,4 e 9, mas são conhecidas pela sua capacidade de tolerar ambientes ácidos, que lhes permite sobreviver no trato intestinal (ICMSF, 2000; JAY, 2005).

A *E. coli* inclui cepas não patogênicas que têm como habitat o trato entérico de humanos e animais sadios, e cepas altamente patogênicas, responsáveis por provocarem surtos de doenças em humanos e animais com considerável taxa de mortalidade. A presença de cepas não patogênicas em alimentos e água indica contaminação direta ou indireta de origem fecal, sendo considerado o indicador clássico da possível presença de micro-organismos patogênicos (ICMSF, 2000; JAY, 2005).

Os patótipos de *E. coli* têm sido classificados como patogênicos de origem entérico e patogênicos extraintestinais. O primeiro grupo é causador de diarreias em humanos e animais e o segundo causa infecções do trato urinário e inflamação generalizada causada por infecção e meningites (KUHNERT BOERLIN; FREY, 2000).

Pelo fato de bovinos apresentarem-se como portadores assintomáticos de *E. coli* patogênica, pode-se explicar a incidência desse micro-organismo em alimentos elaborados à base de carne, leite não pasteurizado e derivados, e em vegetais crus e produtos minimamente processados. O leite e derivados podem sofrer contaminação direta ou indireta por esse micro-organismo (HEUVELINK et al., 1998; ISLAM et al., 2005).

2.5.1.3 *Listeria monocytogenes*

Listeria monocytogenes apresenta-se na forma de bastonetes curtos, flagelados, Gram-positivos, sendo não formadores de esporos, móveis, catalase positiva, oxidase negativa, halotolerantes, desprovida de cápsula. É amplamente distribuída na natureza, podendo ser isolada do solo e fezes de humanos e de outros animais (FORSYTHE, 2005; JAY, 2005).

Apesar de ser frequentemente encontrada em alimentos crus de origem vegetal e animal, *L. monocytogenes* também pode ser isolada de alimentos

cozidos devido à contaminação durante o processo industrial. Possui a capacidade de se multiplicar durante a estocagem sob refrigeração. Entre os principais alimentos associados à listeriose de origem alimentar, estão o leite cru ou pasteurizado, queijos, sorvetes, vegetais crus, carnes e derivados, aves, peixes e frutos do mar (FARBER; PETERKIN, 1991).

A listeriose é uma doença de origem alimentar atípica, devido à alta gravidade, de natureza não entérica e longo período de duração. Adquirida pela ingestão de alimentos contaminados, pode afetar principalmente indivíduos imunodeprimidos, gestantes e recém-nascidos. Manifesta-se por gastroenterites, meningites, encefalites, infecções transmitidas da gestante para o feto e septicemias, resultando na morte de 20 a 30% dos casos (ZUNABOVIC; DOMIG; KNEIFEL, 2011).

2.5.1.4 *Pseudomonas aeruginosa*

P. aeruginosa é uma bactéria Gram-negativa, reta ou ligeiramente curva, não fermentadora, obrigatoriamente aeróbica e móvel por flagelos polares, oxidase e catalase positivas, que crescem de 37°C a 42°C, possuem metabolismo oxidativo, tolera valores de pH relativamente altos e são capazes de sobreviver em substratos com pequenas quantidades de nutrientes. É uma bactéria que pode ser isolada do solo, água, plantas e mesmo animais, incluindo os seres humanos (GALES et al., 2001).

A espécie *P. aeruginosa* é o mais importante patógeno humano no gênero *Pseudomonas*. Considerando que a *P. aeruginosa* é uma bactéria amplamente distribuída no meio ambiente e faz parte da microbiota humana, ela raramente se torna a causa de infecções comunitárias em indivíduos saudáveis. No entanto, em ambientes hospitalares, essa bactéria torna-se um agente infeccioso importante, principalmente em pacientes predispostos, que

apresentam quebra de barreiras físicas e imunossupressão (PAVIANI; STADNIK; HEINEK, 2004).

2.5.1.5 *Salmonella Choleraesuis*

O gênero *Salmonella* pertence à família Enterobacteriaceae e se apresenta na forma de bacilos, medindo de 0,7-1,5 x 2,0-5µm, Gram negativos, não produtores de esporos, anaeróbios facultativos, oxidase negativa e catalase positiva. O organismo apresenta crescimento ótimo a 37°C, mas já foram observados crescimentos em temperaturas entre 5 e 45°C, com pH ideal de 7, variando entre 4 e 9, produz gás a partir de glicose (exceto *S. Typhi*), sendo capaz de utilizar o citrato como única fonte de carbono. A maioria das cepas é móvel, apresentando na sua estrutura flagelos peritríquios, com exceção para a *S. pullorum* e a *S. gallinarum*, que são imóveis (FRANCO; LANDGRAF, 2001).

De acordo com o Centro de Colaboração para Referência e Pesquisa sobre *Salmonella*, da Organização Mundial da Saúde (Instituto Pasteur, Paris), o gênero apresenta duas espécies: *S. enterica* e *S. bongori*, que incluem atualmente 2.519 e 22 sorotipos, respectivamente (POPOFF; BOCKEMÜHL; GHEESLING, 2004).

A *Salmonella enterica* causa gastrinterite, diarreia, dores abdominais, náuseas, febre, calafrios e dores de cabeça. A febre tifoide é a mais grave de todas as doenças causadas por salmonelas, incluindo a *S. Typhi* e a *S. Paratyphi A e C*; contudo, *Salmonella bongori* e as outras subespécies de *Salmonella enterica* são raramente isoladas de humanos, sendo geralmente isoladas de animais de sangue frio e do ambiente (CHIU; SU; CHU, 2004; JAY, 2005).

A *Salmonella Choleraesuis* é uma *Salmonella enterica* sorotipo Choleraesuis, que faz parte dos sorotipos adaptados ao hospedeiro, nesse caso, a suínos, provocando a febre paratífóide suína. É altamente patogênica para o

homem, geralmente invadindo a corrente sanguínea (bacteremia), causando febre alta e persistente, dor no tórax, calafrios, sudorese e vômito, o estado pode ser passageiro ou crônico. Esse quadro torna a *S. Choleraesuis* uma preocupação, não só devido ao seu potencial causador de doença em suínos jovens, mas também por causa de suas implicações na saúde pública para os seres humanos (CHIU; SU; CHU, 2004).

2.5.2 Fungos

Os fungos também são micro-organismos responsáveis pela ocorrência de doenças de origem alimentar; porém, em proporções bem menores que as causadas por bactérias. Em alimentos submetidos a condições de conservação e armazenamento inadequadas, pode ocorrer a contaminação desses por fungos que causam a deterioração e/ou que produzem micotoxinas.

As micotoxinas são substâncias tóxicas resultantes do metabolismo secundário de diversas linhagens toxigênicas de fungos filamentosos, de baixo peso molecular, termoestáveis, geralmente tóxicas em baixas concentrações. A maioria das micotoxinas afeta órgãos e tecidos, induzindo várias patologias, tais como neoplasia, mutagênese, teratogênese, imunossupressão, entre outras (LAVOR; SOUSA, 2008).

As micotoxinas podem entrar na cadeia alimentar humana e animal por meio de contaminação indireta ou direta. A contaminação indireta de alimentos e rações ocorre quando um ingrediente qualquer foi previamente contaminado por um fungo toxigênico, e mesmo que o fungo tenha sido eliminado durante o processamento, as micotoxinas ainda permanecerão no produto final. A contaminação direta, por outro lado, ocorre quando o produto, o alimento ou a ração se tornam contaminados por um fungo toxigênico, com posterior formação de micotoxinas (FREIRE et al., 2007).

Os fungos toxigênicos pertencem basicamente aos gêneros *Aspergillus*, *Penicillium* e *Fusarium*, os quais são responsáveis pela produção da maioria das micotoxinas até hoje conhecidas e estudadas. Os dois primeiros gêneros são normalmente encontrados como contaminantes presentes em alimentos durante a secagem e estocagem, ao passo que o último é, principalmente, patógeno de plantas (RUPOLLO et al., 2006).

2.5.2.1 *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*

As espécies *A. flavus* e *A. parasiticus* são capazes de produzir metabólitos secundários tóxicos, “as aflatoxinas”, além de alterar as condições físicas dos produtos, reduzirem o valor nutritivo, alterar o aspecto externo, e favorecer a ação de outros agentes de deterioração, como leveduras, bactérias e insetos. As contaminações ocorrem com maior intensidade em nozes, amendoins e outras sementes oleaginosas, incluindo o milho e sementes de algodão (ATANDA; AKPAN; OLUWAFEMI, 2007).

As principais aflatoxinas são designadas de B1, B2, G1 e G2 e são geralmente encontradas em vários alimentos, principalmente grãos e rações, em diferentes proporções; a aflatoxina B1 é a mais importante devido à sua elevada toxicidade e maiores concentrações nos substratos. A espécie *A. parasiticus* produz mais aflatoxinas do que *A. flavus*; todas as linhagens de *A. parasiticus* conhecidas são produtoras das quatro aflatoxinas (B1, B2, G1 e G2), ao passo que as linhagens de *A. flavus*, na maioria das vezes, produzem somente duas aflatoxinas B1 e B2 (TANIWAKI; FONSECA; PIZZIRANI-KLEINER, 1993; PIMENTEL et al., 2010).

Aflatoxicose é uma intoxicação resultante da ingestão da aflatoxina em alimentos e rações contaminadas. Os seres humanos e vários animais são sensíveis aos seus efeitos tóxicos que podem ser agrupados como agudos,

alergênicos, mutagênicos, neoplásicos e teratogênicos (RASOOLI; OWLIA, 2005).

2.5.2.2 *Aspergillus carbonarius* e *Aspergillus niger*

A. carbonarius e *A. niger* são os principais contaminantes fúngicos de alimentos. Além de sua capacidade de causar podridão-negra, eles podem produzir, através do seu metabolismo secundário, a ocratoxina A (OTA), que tem sido detectada em uma grande variedade de alimentos e grãos, principalmente em cereais, café, feijão, cacau, especiarias, frutas secas, uvas, passas, vinhos e produtos derivados desses (GARCIA et al., 2011; DE CURTIS et al., 2012).

A ocratoxina A é um derivado da isocumarina, muito estável, e tem atraído cada vez mais atenção em todo o mundo, devido ao seu alto potencial de toxicidade, com ação nefrotóxica, teratogênica, carcinogênica, imunossupressora, para animais e, possivelmente, para humanos. Segundo a Agência Internacional de Pesquisa sobre o Câncer (IARC), a OTA é classificada no grupo 2B como um possível carcinógeno para humanos (IARC, 1993; DE CURTIS et al., 2012).

2.5.2.3 *Penicillium commune*

Penicillium commune é um importante fungo deteriorador de alimentos, principalmente queijos, incluindo queijos embalados a vácuo. O crescimento de *P. commune* em queijos resulta na descoloração da superfície e produção de um sabor desagradável (KURE et al., 2002).

Por suportar ambientes a vácuo, sugere-se que esse micro-organismo possui habilidade de crescer em atmosferas com baixa concentração de O₂, alta

concentração de CO₂ ou ambos. Produz várias micotoxinas, incluindo ácido ciclopiazônico, ácido ciclopaldico e rugulovasinas (TANIWAKI; SILVA, 2001).

O ácido ciclopiazônico pode ser também produzido por fungos do gênero *Aspergillus*, além de *Penicillium*. Estudos toxicológicos, efetuados em animais, revelaram maior predisposição à ação tóxica do ácido ciclopiazônico em órgãos vitais, como fígado, rins, sistema digestivo e sistema neurológico, acentuando danos causados pela aflatoxinas (OLIVEIRA et al., 2006).

2.5.3 Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais

Uma das aplicações dos óleos essenciais ocorre como agentes antimicrobianos. Essa capacidade, presente na maioria desses compostos, de certa maneira representa uma extensão do próprio papel que exercem nas plantas, defendendo-as das bactérias e fungos fitopatogênicos (BAKKALI et al., 2008).

As propriedades antibacterianas e antifúngicas dos óleos essenciais têm sido extensivamente estudadas, devido a crescente necessidade de alternativas no tratamento contra micro-organismos resistentes a antibióticos. Geralmente, os óleos essenciais estudados apresentam propriedade antimicrobiana, sendo que alguns com maior e outros com menor grau de efeito (BURT, 2004; LIMA et al., 2012; FREIRE et al.; 2011a; 2011b; ANDRADE et al., 2011; SEIXAS et al., 2011; ANDRADE et al., 2012).

Outros estudos propõem o desenvolvimento de produtos contendo óleos essenciais como, o trabalho realizado por Giviziez (2010), que desenvolveu um antisséptico com princípio ativo de óleo essencial de *Syzygium aromaticum*. Esse avaliou o perfil de sensibilidade do mesmo, frente a bactérias patogênicas e fungos *in vitro* e na redução da contaminação bacteriana natural das mãos, demonstrando que o antisséptico a base desse óleo essencial mostrou-se eficaz

contra todos os micro-organismos testados. Outro exemplo, são os estudos de Bussata et al. (2007) que avaliando a ação antimicrobiana do óleo essencial de *Origanum vulgare* em linguiça fresca, verificaram que a adição desse à linguiça pode ser uma alternativa promissora, pois observaram efeitos bacteriostáticos do óleo diante de *Escherichia coli* em concentrações inferiores a concentração mínima inibitória (CMI).

Devido à composição complexa dos óleos essenciais, o seu modo de ação, que provoca a inibição e/morte dos micro-organismos, envolve diferentes mecanismos, onde todos os componentes da célula tornam-se possíveis alvos de atuação desses óleos e em geral, depende dos componentes majoritários do mesmo. Porém uma das mais importantes características dos óleos essenciais é a lipofilicidade, o que permite que os componentes dos óleos passem através da membrana citoplasmática, rompendo a estrutura de diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidios e, assim, alterando a permeabilidade de organelas celulares, o que permite a saída de íons e do conteúdo celular, modificando o equilíbrio celular, provocando a liberação de macromoléculas, coagulação do citoplasma e a lise celular (CARSON; RILEY, 2003; BURT, 2004; BAKKALI et al., 2008; SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

2.6 Doença de Chagas

A doença de Chagas, também conhecida como tripanossomíase americana, está incluída no grupo das chamadas "doenças negligenciadas". É uma doença endêmica parasitária em países tropicais e subtropicais da América Latina, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que afeta cerca de 10 milhões de pessoas em todo o mundo, e cerca de 25-100 milhões de pessoas vivem em zonas de risco de infecção (SALOMON, 2012; WHO, 2010).

As formas habituais de transmissão da doença de Chagas humana reconhecidas são aquelas ligadas diretamente às fezes do vetor (triatomíneos, insetos hematófagos conhecidos como barbeiros), à transfusão de sangue, à via congênita, e mais recentemente, às que ocorrem via oral, pela ingestão de alimentos contaminados por urina ou fezes de hospedeiros silvestres e/ou de vetores infectados. Atualmente, a principal forma de transmissão da doença de Chagas em áreas urbanas é por meio de transfusão de sangue contaminado ou por ingestão de alimentos contaminados (SHIKANAI-YASUDA; CARVALHO, 2012).

A infecção pelo parasita consiste de uma fase aguda, em que esses são relativamente abundantes tanto no sangue periférico quanto em tecidos, seguida de uma fase crônica caracterizada pela presença dos parasitas, principalmente em tecidos, tais como coração, esôfago, cólon e no sistema nervoso periférico (HOTEZ et al., 2008).

Após a infecção do hospedeiro pelo parasita, na fase aguda da doença, podem surgir alguns sintomas, como febre, mal-estar, falta de apetite, dor ganglionar, inchaço ocular e aumento do fígado e baço, embora existam casos em que a doença se apresenta de forma assintomática. Já na fase crônica, a doença de Chagas pode destruir a musculatura dos órgãos atingidos (principalmente a do coração e do cérebro), provocando o aumento destes, de forma irreversível. Em muitos casos, somente essa fase é percebida pelo paciente, e ela pode se manifestar décadas depois do indivíduo ter sido infectado pelo parasita (MARIN-NETO et al., 2007; MATSUDA; MILLER; EVORA, 2009).

No que diz respeito à quimioterapia preventiva, nenhuma vacina foi descoberta e os tratamentos atuais utilizam o nifurtimox e benznidazol; porém, essas drogas são muitas vezes mal toleradas e apresentam sérios efeitos colaterais. Esses compostos são utilizados apenas na fase aguda da doença, mas

podem ser ineficazes devido às diferenças de susceptibilidade das culturas de *T. cruzi* às drogas, eles são inúteis na fase crônica da doença. Além disso, têm sido detectados alguns casos de resistência do parasita ao nifurtimox e ao benznidazol (SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007; CAMPOS et al., 2009; DÍAZ-CHIGUER et al., 2012).

2.6.1 *Trypanosoma cruzi*

Trypanosoma cruzi é um protozoário flagelado causador da doença de Chagas, que possui um ciclo de vida complexo, que é realizado no hospedeiro vertebrado (mamíferos) e no invertebrado (triatomíneos).

Parte do complexo ciclo de vida de *T. cruzi* envolve a passagem do parasita ao longo do trato digestivo do hospedeiro invertebrado. No tubo digestivo do inseto–vetor, é encontrada a forma replicativa do parasita, denominada epimastigota, sendo ela não infecciosa para o homem. Ao passar pelo trato digestivo do inseto, quando chegam à porção terminal do intestino (reto), são eliminados, em suas fezes e urina, parasitas em sua forma alongada, não replicativa e infectante, denominada tripomastigotas metacíclicos. Durante esse processo de diferenciação (denominado metaciclogênese), o parasita sofre complexas alterações morfológicas e bioquímicas que lhe permitem efetivamente invadir e sobreviver no ambiente hostil do hospedeiro vertebrado (Figura 10) (OSORIO et al., 2012).

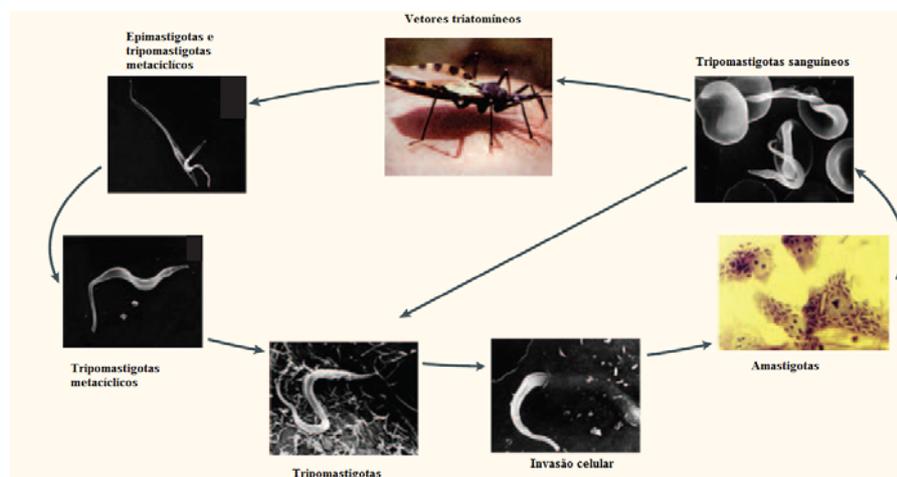


Figura 10 Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi*
 Fonte: Adaptada de Andrade e Andrews (2005)

Os tripomastigotas metacíclicos excretados pelo inseto atingem a corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado através de mucosas ou por ferimentos na pele. Uma vez dentro do corpo, os tripanossomas invadem diferentes tipos de células, incluindo macrófagos, fibroblastos e células do músculo liso e esquelético; diferenciam-se de tripomastigotas para amastigotas, sofrendo vários ciclos de divisão binária, transformando em tripomastigotas sanguíneos, que são liberados pela célula hospedeira. Posteriormente, formas infecciosas atingem a corrente sanguínea e continuam a invadir outras células nucleadas, podendo, nessa fase, ser absorvidos pelo inseto vetor (ANDRADE; ANDREWS, 2005; OSORIO et al., 2012).

2.6.2 Atividade tripanocida dos óleos essenciais

Muitos produtos de origem natural têm apresentado grande atividade antiparasitária em testes *in vitro* (KAYSER; KIDERLEN; CROFT, 2003; MÄSER et al., 2012). Sendo assim, compostos de origem vegetal surgem como potenciais substâncias para o desenvolvimento de novas drogas antiparasitárias, que apresentem menos efeitos colaterais e maior eficácia para a quimioprofilaxia e quimioterapia da doença de Chagas.

Estudos desenvolvidos por Santoro et al. (2007a), avaliando o efeito dos óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. (mil-folhas), *Syzygium aromaticum* L. (cravo da índia) e *Ocimum basilicum* L. (manjeriço) e os seus componentes majoritários linalol e eugenol sobre as formas epimastigotas e tripomastigotas de *T. cruzi*, demonstraram que os óleos e os constituintes estudados inibiram o crescimento do parasita. Os menores valores de CI_{50} (concentração que inibe o crescimento dos parasitas em 50%) foram obtidos com o óleo essencial de cravo da índia ($99,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para epimastigotas e $57,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ para tripomastigotas), além de serem observadas alterações ultra-estruturais principalmente no núcleo do parasita.

Em outro estudo, Santoro et al. (2007b) avaliaram o efeito dos óleos essenciais de *Origanum vulgare* L. (orégano), *Thymus vulgaris* L. (tomilho) e do timol no crescimento das diversas formas evolutivas de *T. cruzi*. O óleo essencial de orégano inibiu o crescimento da forma epimastigota ($CI_{50} = 175 \mu\text{g mL}^{-1}$) e também induziu a lise da forma tripomastigota ($CI_{50} = 115 \mu\text{g mL}^{-1}$). O óleo essencial de tomilho apresentou menores valores de CI_{50} ($77 \mu\text{g mL}^{-1}$ para epimastigotas e $38 \mu\text{g mL}^{-1}$) para tripomastigotas, enquanto o tratamento com timol resultou em uma CI_{50} de $62 \mu\text{g mL}^{-1}$ para epimastigotas e $53 \mu\text{g mL}^{-1}$ para tripomastigotas. A análise por microscopia eletrônica de varredura (MEV) evidenciou poucas alterações morfológicas na membrana plasmática. Já a

observação por microscopia eletrônica de transmissão (MET) mostrou inchaço citoplasmático, com ocasionais alterações morfológicas na membrana plasmática e flagelar, sugerindo que os óleos essenciais de orégano e tomilho são eficazes contra o *T. cruzi*. O óleo essencial de tomilho apresentou maior atividade, podendo ser devido à presença do componente principal, o timol.

O efeito antiproliferativo do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (DC) Stapf) e seu principal constituinte (citrál) também foi investigado em todas as formas evolutivas de *T. cruzi* (SANTORO et al., 2007c). O tratamento com o óleo essencial resultou na inibição do crescimento da forma epimastigota com $CI_{50} = 126,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, ao passo que a CI_{50} para lise de formas tripomastigotas foi de $15,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. O $CI_{50}/48\text{h}$ para as forma amastigotas foi de $5,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, com forte inibição da proliferação da forma amastigota intracelular. A análise ultraestrutural demonstrou saída dos conteúdos citoplasmáticos e nucleares, enquanto que a membrana plasmática permaneceu morfológicamente preservada. Esses dados mostram que o óleo essencial de capim-limão é bastante eficaz contra as formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, e que o seu componente principal, citrál, é responsável pela atividade tripanocida.

Recentemente, Borges et al. (2012), estudando a atividade tripanocida *in vitro* de óleos essenciais extraídos de plantas medicinais tradicionais da Região Nordeste do Brasil, como *Lippia sidoides*, *Lippia organoides*, *Chenopodium ambrosioides*, *Ocimum gratissimum*, *Justicia peitorais* e *Vitex agnus-castus*, observaram que todos os óleos essenciais testados apresentaram um efeito inibitório sobre o crescimento e na sobrevivência do parasita. Os óleos essenciais de *L. sidoides* e *L. organoides* foram os mais eficazes contra formas amastigotas e tripomastigotas, respectivamente, o que possivelmente se deve ao fato de os óleos essenciais provenientes dessas plantas possuírem como componentes majoritários os fenilpropanoides carvacrol e timol.

Esses resultados indicam que óleos essenciais e seus constituintes são promissores agentes contra o *Trypanosoma cruzi*, abrindo perspectivas para descoberta de drogas mais eficazes de origem vegetal para o tratamento de doenças parasitárias.

2.7 Aspectos toxicológicos de produtos naturais

Diante do grande número de pesquisas que confirmam diversas atividades biológicas associadas aos óleos essenciais e que propõem a aplicação deles, principalmente em alimentos e como substâncias desinfetantes, tornam-se cada vez mais necessários estudos que avaliem a citotoxicidade e a genotoxicidade dessas substâncias, uma vez que estudos com essas informações ainda são escassos.

Estima-se que mais de 80% da população mundial utilizam plantas como fonte primária de diversos agentes medicinais. Entretanto, os compostos derivados de plantas podem conter constituintes que exercem efeitos colaterais indesejáveis (LEITE et al., 2006).

Existem vários relatos de substâncias presentes em plantas com efeitos tóxicos. Entre esses, destacam-se a hepatotoxicidade do apiol, safrol, lignanas e alcaloides pirrolizidínicos, e a ação nefrotóxica ocasionada por espécies vegetais que contêm terpenos e saponinas, e alguns tipos de irritações de pele, causadas por espécies ricas em lactonas sesquiterpênicas e furanocumarinas. Componentes tóxicos ou antinutricionais, como o ácido oxálico, ácido erúxico e os nitratos, estão presentes em muitas plantas de consumo comercial, além de diversas substâncias isoladas de vegetais, considerados medicinais, que possuem atividades citotóxica e/ou genotóxica mostrando relação com a incidência de tumores (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005; BAKKALI et al., 2008; PITA, 2010).

Os testes de toxicidade são elaborados com os objetivos de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade relativa das substâncias. De acordo com o Órgão Internacional de Padronização (International Standard Organization), ISO 10993-5, o ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material ou substância para seu uso e depois de comprovada a sua não toxicidade, é que o estudo da biocompatibilidade do produto pode ter continuidade, realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório (ROGERO et al., 2003).

Um dos modelos experimentais utilizados para a avaliação da toxicidade *in vitro* é o ensaio de hemólise com uso de eritrócitos de animais ou humanos. A membrana eritrocitária é uma estrutura delicada que pode ser significativamente alterada por interações com drogas. O teste hemolítico *in vitro* é empregado com o objetivo de estimar os danos que diferentes compostos poderiam induzir *in vivo* (APARICIO et al., 2005).

Informações primárias fundamentais acerca do potencial mutagênico e antimutagênico de agentes químicos e físicos, bem como de muitos compostos naturais, têm sido fornecidas por testes citogenéticos *in vitro* e *in vivo*, juntamente com os testes de mutação gênica em bactérias (teste de Ames) e em células de mamíferos. O estudo de danos no DNA em nível cromossômico é uma parte essencial da Genética Toxicológica, uma vez que a mutação cromossômica é um evento importante na carcinogênese (ALBERTINI et al., 2000). Há várias técnicas que avaliam o potencial genotóxico de substâncias, porém, o teste do micronúcleo e o teste do cometa são os métodos mais empregados, para esse tipo de avaliação (PERÉS et al., 2009; MAISTRO et al., 2010; COSTA et al., 2011; CAVALCANTI et al., 2012; LIJU; JEENA; KUTTAN, 2013).

2.7.1 Teste de citotoxicidade

Testes de citotoxicidade são aplicados como uma forma de pré-seleção para avaliar se substâncias com potenciais aplicações como medicamentos, como aditivos em alimentos, cosméticos e outros produtos, são seguras para o consumo humano. Diversas técnicas *in vitro* são utilizadas para observar possíveis efeitos adversos que as substâncias possam acarretar às células, de maneira a torná-las impróprias para uso. Para serem consideradas seguras, as substâncias não devem causar a morte das células (lise celular) e nem afetar suas funções celulares nos testes de citotoxicidade *in vitro* (MALMONGE et al., 1999).

De acordo com a ISO 10993-5, as linhagens celulares mais recomendadas para testes de citotoxicidade são a NTC clone 929 (células de tecido conjuntivo de camundongo), a Balb/3T3 clone A31 (fibroblastos provenientes de camundongos Balb/3T3), a MRC-5 (fibroblastos normais de pulmão), a WI-38 (células diploides humanas), a VERO (fibroblastos de rim de macaco verde africano - *Cercopithecus aethiops*), a BHK-21 (rim de filhote de hamster) e a V-79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês). Além destas, outras linhagens podem ser utilizadas possibilitando demonstrar se os efeitos obtidos são semelhantes ou não (MALMONGE et al., 1999).

A avaliação da citotoxicidade pode ser feita por meio de análise da morfologia celular, da integridade da membrana celular (pela utilização de métodos com corantes indicativos de viabilidade), da proliferação celular ou da atividade biossintética (MALMONGE et al., 1999).

Um exemplo de teste de citotoxicidade é o ensaio colorimétrico com MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazólio], em que a ação citotóxica de uma substância pode ser investigada utilizando-se o sal de tetrazólio. Esse teste visa quantificar as células viáveis (da linhagem celular

escolhida) que são capazes de metabolizar o MTT a um composto denominado formazan, pela ação das desidrogenases mitocondriais. Esse composto é solubilizado em DMSO (dimetilsulfoxido), adquire uma coloração violeta (Figura 11) e, assim, torna possível a quantificação espectrofotométrica da citotoxicidade induzida pela substância avaliada, por meio da quantificação das células viáveis e não viáveis (TAKEUCHI; BABA; SHIGETA, 1991; SIEUWERTS et al., 1995).

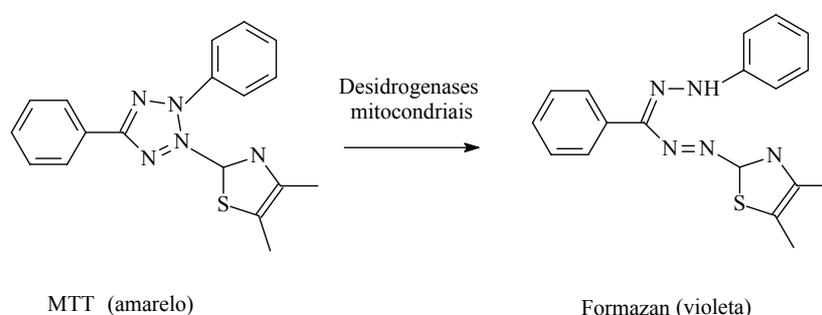


Figura 11 Reação de redução do MTT
Fonte: Adaptado de Mosmann (1983)

Vários estudos estão sendo desenvolvidos para avaliar a atividade citotóxica de óleos essenciais. Borges et al. (2012), que avaliaram o potencial citotóxico de óleos essenciais extraídos de *Lippia sidoides*, *Lippia organoides*, *Chenopodium ambrosioides*, *Ocimum gratissimum*, *Justicia peitorais* e *Vitex agnus-castus*, observaram que todos os óleos essenciais testados não apresentaram efeitos citotóxicos significativos sobre macrófagos peritoneais de rato.

Porém, esses estudos têm mostrado que existe diferença no grau de citotoxicidade apresentado pelos óleos essenciais. A exemplo, Gonçalves et al.

(2010), avaliando a atividade citotóxica do óleo essencial de *Thymus zygis* subsp. *sylvestris* sobre células dendríticas de pele, verificaram a ausência de efeito citotóxico, em concentrações que variaram entre 0,08 a 0,16 $\mu\text{L mL}^{-1}$ após 24h de contato. Já Perés et al. (2009) verificaram que os efeitos citotóxicos observados em células V79 tratadas com óleo essencial de *Piper gaudichaudianum*, usando sobrevivência clonal, que se baseia no cultivo posterior de células que cresceram durante tratamento dessas com o óleo essencial, ensaio de redução de brometo de tetrazólio (MTT) e ensaio de exclusão com azul de tripan (TB), foram dose-dependentes e que houve uma diminuição significativa na sobrevivência em concentrações igual ou superiores a 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.7.2 Atividade hemolítica

O efeito da maioria das drogas sobre o organismo resulta de suas interações com macromoléculas, muitas das quais são componentes da membrana plasmática. A capacidade de um composto químico interagir com as membranas biológicas é determinante para sua absorção, distribuição, biotransformação e excreção, bem como para o estabelecimento de sua atividade. As membranas eritrocitárias são muito úteis no estudo da interação de fármacos, cosméticos e outras substâncias com ação sobre sistemas biológicos. (BENET et al., 1996; MALHEIROS et al., 2000; PRETÉ et al., 2011).

Os eritrócitos, também conhecidos como hemácias ou glóbulos vermelhos, são células anucleadas com forma discoide bicôncava que contém hemoglobina em concentração elevada, cerca de 5 mM/célula. Para cumprir a função de transportar a hemoglobina e levar oxigênio a todas as células, o eritrócito percorre todos os vasos sanguíneos do organismo aproximadamente

500.000 vezes, durante sua vida média de 120 dias (BULL; BRETON-GORIUS; BEUTLER, 1990).

A membrana do eritrócito, devido à sua facilidade de obtenção e isolamento tem sido extensivamente estudada e suas características principais são bastante conhecidas, sendo, portanto um ótimo modelo para o estudo de membranas mais complexas, e de outros tipos de células. A proporção, em peso, de proteínas: lipídios: carboidratos é 49: 43: 8 nessas membranas (MONTGOMERY, 1994).

A principal classe de lipídios da membrana eritrocitária, bem como na maior parte das membranas biológicas, é a dos fosfolípidios. A composição lipídica da membrana eritrocitária é constituída de fosfolípidios (47,5%), colesterol (25%), esfingomielina (17,5%) e glicolipídios (10%). Os fosfolípidios estão distribuídos assimetricamente entre as monocamadas interna e externa da membrana eritrocitária (STORCH; KLEINFELD, 1985).

O monitoramento da integridade dos eritrócitos pode ser feito com relativa facilidade, detectando-se fotometricamente a hemoglobina liberada em solução ou, potenciometricamente, o potássio liberado no meio extracelular, sugerindo que a lise ocorra em função da formação de pequenos poros na membrana. Testes hemolíticos permitem avaliar quantitativamente o rompimento das células vermelhas, causado pela interação de componentes químicos com membranas, em que a hidrofobicidade e a presença de grupos ionizáveis são fatores determinantes. O teste hemolítico é atualmente considerado um importante método na avaliação de toxicidade de novos compostos (MALHEIROS et al., 2000).

Há alguns estudos envolvendo a atividade hemolítica de substâncias extraídas de diversas partes de plantas, como o descrito por Silva et al. (2008), que avaliaram a atividade do óleo essencial obtido da “guaçatonga” (*Casearia sylvestris*) e observaram a indução de hemólise em sete diferentes tipos de

eritrócitos, indicando a necessidade de cautela e moderação no uso de preparações elaboradas com essa planta. Posteriormente, Tariku et al. (2010) observaram que os óleos essenciais de *Artemisia abyssinica* e *Satureja punctata* ssp. *punctata* causaram danos nos eritrócitos, com 50% de lise (LC₅₀) nas concentrações de 0,35 e 1,52 μL mL⁻¹, respectivamente. Tariku et al. (2011), estudaram o efeito hemolítico dos óleos essenciais de *Artemisia absinthium* e *Echinops kebericho*, obtendo valores de LC₅₀ de 1,52 e 2,62 μL mL⁻¹, respectivamente, indicando a necessidade de moderação na utilização de óleos essenciais.

2.7.3 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa corresponde a um ensaio citogenético que detecta quebras no DNA ocasionadas por agentes químicos e físicos, caracterizando-se pela simplicidade da técnica e por apresentar vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. As vantagens dessa técnica incluem a sensibilidade na detecção de dano no DNA, a coleta de dados em nível de célula individual, o uso de um número pequeno de células para a análise e a possibilidade de aplicação em qualquer população de células eucarióticas e principalmente a rapidez de obtenção de resultados (importante para diagnósticos clínicos) (BURLINSON et al., 2007).

O ensaio do cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo ensaio cometa são passíveis de correção. Assim, o ensaio pode ser também utilizado para estudos de reparo do DNA, embora não possibilite inferir a fidedignidade do processo de reparo (ALBERTINI et al., 2000).

A técnica consiste em obter, a partir de células individualizadas, colocadas em agarose, lisadas, submetidas à eletroforese e coradas, uma matriz com nucleoides fluorescentes, formados por DNA não danificado (que não migraram ao longo do gel). Células com DNA danificado formam um cometa, consistindo de uma cabeça (matriz nuclear) e uma cauda (DNA quebrado). Esses danos podem ser devido à presença de quebras simples, sítios lábeis alcalinos e “crosslinks”, resultantes da ação de compostos genotóxicos, que alteram a estrutura do DNA das células, que normalmente está superenrolado e fortemente compactado, causando relaxamento em partes da molécula que migram em direção ao anodo. A extensão do DNA que migrou, distância de migração e intensidade da fluorescência, está correlacionada com os danos ocorridos (SINGH et al., 1988; TICE et al., 2000). O ensaio cometa é atualmente usado em diferentes áreas das ciências biológicas para detectar danos no DNA, e pode ser aplicado em vários tipos de células eucarióticas nucleadas, entre elas linfócitos do sangue periférico humano.

Os linfócitos são células do sistema imunológico, fundamentais dentro de um organismo, responsáveis pela defesa, inativação e retirada de agentes agressores do sistema. São um tipo de leucócito, ou glóbulo branco, presente no sangue, contribuindo para a formação de 20 a 30% dos leucócitos. Por sua aparência ao microscópio, há duas categorias de linfócitos: os grandes (12-16 μm) e os pequenos (10-12 μm). A maioria, mas não todos, dos linfócitos grandes granulares são as chamadas Natural Killer (células NK ou exterminadoras naturais). Os linfócitos pequenos podem ser linfócitos T ou linfócitos B, sendo esses presentes no sangue periférico (GOLDSBY et al., 2003; COELHO NETO et al., 2009). São formados exclusivamente na medula, como os demais leucócitos presentes no sangue. Sua formação ocorre, durante todo o tempo, em diversos órgãos ou estruturas do corpo humano que apresentam os denominados

tecidos linfoides: gânglios linfáticos, amígdalas, adenoides, timo, baço, placas de Peyer (TIZARD, 1998).

Entre estudos que avaliaram o potencial de os óleos essenciais causarem danos no DNA, citam-se as pesquisas de Perés et al. (2009). Esses, empregando o ensaio do cometa, verificaram que o óleo essencial de *Piper gaudichaudianum* causou quebras no DNA de células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês) em concentrações de até 2 mg mL⁻¹. Catanzaro et al. (2012) avaliando a instabilidade genômica induzida por α -pineno em células de hamster, observaram que o monoterpene causou lesões ao DNA de forma dependente da concentração. Neste mesmo ano, Cavalcanti et al. (2012) verificaram que o óleo essencial das folhas de *Alpinia zerumbet* não apresentou toxicidade e não induziu genotoxicidade em leucócitos humanos nas concentrações de 50-300 μ g mL⁻¹, porém na concentração de 500 μ g mL⁻¹ causou uma redução na proliferação celular e da viabilidade, e um aumento de dano no DNA. Sinha, Biswas e Mukherjee (2011) observaram que os óleos essenciais de *Cymbopogon martinii* e *C. winterianus* não apresentaram efeitos genotóxicos sobre linfócitos humanos, nas concentrações de 50, 100 e 200 μ g mL⁻¹. De acordo com Maistro et al. (2010), o óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* apresentou, pelo teste do cometa, efeitos genotóxicos em todas as três doses utilizadas (300, 1000 e 2000 mg kg⁻¹) em células do sangue periférico e do fígado de ratos. Piculo et al. (2011), avaliando a capacidade do nerolidol em induzir danos no DNA do sangue periférico e células de fígado de ratos, observaram que o nerolidol induziu danos fracos no DNA dependente das doses utilizadas em ambos os tipos de células analisadas. Costa et al. (2011) investigaram a toxicidade e genotoxicidade do óleo essencial de *C. citratus* em camundongos e observaram que, de acordo com os dados do ensaio cometa em células de sangue periférico, o óleo essencial não mostrou nenhum efeito genotóxico, sugerindo a segurança do consumo dessa planta. Liju; Jeena; Kuttan (2013) avaliaram a genotoxicidade

do óleo essencial de *Curcuma longa* L. e verificaram que ele não produziu qualquer dano no DNA de células da medula óssea, baço e células do intestino delgado de ratos, após 14 dias de tratamento, com a dose de 1 g kg⁻¹ de peso do rato, confirmando a não genotoxicidade do óleo essencial em estudo.

2.8 Plantas em estudo

Considerando a diversidade vegetal do Brasil e a pequena porcentagem de espécies de plantas investigada tanto do ponto de vista fitoquímico como farmacológico e toxicológico, o reino vegetal representa um enorme reservatório de moléculas biologicamente ativas e, de conseqüente importância comercial, a serem descobertas. Assim, o estudo de plantas de ocorrência natural em nosso país, como a pimenteira (*Cinnamodendron dinisii* Schwacke) e a negramina (*Siparuna guianensis* Aublet) torna-se grande de importância.

2.8.1 *Cinnamodendron dinisii* Schwacke (Pimenteira)

Cinnamodendron dinisii Schwacke, vulgarmente conhecida como “pimenteira” ou “pau-para-tudo” (em Santa Catarina), pertence à família Canellaceae, que contém apenas 5 gêneros e cerca de 9 espécies, distribuindo-se nas regiões tropicais da África Oriental, Madagascar e América do Sul. No Brasil, ocorre apenas o gênero *Cinnamodendron*, com três espécies, *C. axillare*, *C. sampaiouanum* e *C. dinisii*. As duas primeiras são encontradas na Amazônia e a última é encontrada desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul no Planalto Meridional e Serra da Mantiqueira (PEIXOTO; BARROS, 2010).

É uma árvore pioneira, característica e exclusiva dos capões da região de campos e da Floresta Ombrófila Mista do Planalto Meridional do sul do Brasil. Atingem 10-20 metros de altura, dotada de copa ovalada, densa com

folhagem reluzente (Figura 12). A casca, de sabor picante como a pimenta verdadeira, possui propriedades medicinais e é levemente entorpecente. O nome popular "pau-para-tudo", sugere amplas utilidades medicinais sendo considerado remédio para todos os males (panacéia) (LORENZI, 2002).



Figura 12 Aspecto geral de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke (Pimenteira)
Fonte: GIEHL (2012)

Apesar de ser muito utilizada popularmente, são poucos os estudos relacionados ao emprego dessa planta na forma de extratos ou referente ao seu óleo essencial. Torres, Wisniewski Jr. e Simionatto (2010) avaliaram a composição química dos componentes voláteis presentes nas cascas de *Capsicodendron dinisii* Schwancke, sinonímia botânica de *Cinnamodendron*

dinisii Schwacke, e verificaram a presença de 23 compostos (90% da composição total de óleo), sendo o composto majoritário encontrado o limoneno (68,5%). A estereoquímica do limoneno foi determinada e verificou-se que a presença do limoneno é representada por (+)-limoneno (94%) e (-)-limoneno (6%). Observaram também a presença de drimenol (0,7%), característico da família Canellaceae. Pesquisas referentes à composição do óleo essencial das folhas e às suas propriedades biológicas não são relatadas.

2.8.2 *Siparuna guianensis* Aublet (Negramina)

A espécie *Siparuna guianensis*, conhecida popularmente como “negramina”, pertencente à família Siparunaceae, é caracterizada por arbustos monóicos, 5-15 metros altura, de casca cinza e lisa (Figura 13) (RENNER; HAUSNER, 2005).

O uso dessa espécie como recurso medicinal é bem difundido entre a população matogrossense, a qual utiliza o decocto de suas folhas principalmente na forma de banho tópico para sintomas de sinusite, febre, reumatismo, enxaqueca, gripe, dores no corpo e “malina”, que é descrita como uma dor de cabeça causada pela exposição demasiada ao sol, provocando corrimento de sangue nasal. Com relação à composição química do óleo essencial, estudos têm mostrado que a composição dos óleos de folhas frescas e secas, assim como do caule e frutos se altera em diferentes países, até mesmo entre diferentes regiões geográficas no mesmo país, e dentro da mesma região de acordo com as estações do ano (VALENTINI; RODRIGUEZ-ORTIZ; COELHO, 2010).



Figura13 Aspecto geral de *Siparuna guianensis* Aublet (Negramina)

Viana et al. (2002) analisaram o óleo essencial de folhas e caule, cascas do tronco, raízes e frutos de *S. guianensis* coletadas em diversos locais da região Amazônica. Na maioria das plantas, foram identificados monoterpenos, sesquiterpenos, álcoois sesquiterpenos e duas cetonas alifáticas, 2-undecanona e 2-tridecanona. O α -pineno, mirceno, γ -cadineno, *epi*- α -cadinol estavam presentes em todas as amostras, mas o *epi*- α -cadinol (11,9 - 39,9%) foi sempre o maior componente, exceto para óleos das cascas e frutos, cujos maiores componentes foram respectivamente terpinoleno (33,4%) e 2-undecanona (52,7%).

A ocorrência de variabilidade de produção de óleos essenciais da *S. guianensis*, visando ao manejo sustentável da espécie, bem como ao controle da matéria-prima, foi também estudada por meio de análises da produção de óleo

essencial em função das partes vegetais (folhas e galhos) e da época de colheita (primavera, verão, outono e inverno) por Castellani et al. (2006). Os resultados mostraram que a espécie apresentou pequena variação, em razão da sazonalidade na produção de óleo essencial. Contudo, houve diferença significativa entre as partes vegetais analisadas; nas folhas, ocorreu sempre maior produção de óleos essenciais. Os autores observaram que, no outono, ocorreu aumento de óleo essencial tanto nas folhas como nos galhos, estação em que a espécie começou a emitir botões florais, e, na primavera, fase de frutificação e brotação, os valores de rendimento de óleo essencial foram menores.

Apesar de muitos trabalhos relatarem a composição química do óleo essencial extraído de diversas partes dessa planta, relatos visando à avaliação de atividades biológicas desses óleos são escassos na literatura. Montanari (2010) avaliou a atividade do óleo essencial de *S. guianensis* sobre as bactérias *S. aureus*, *Bacillus cereus* e *E. coli*, e sobre os fungos *Cryptococcus neoformans*, *Trychophyton rubrum*, *Aspergillus fumigatus* e *Candida albicans*, empregando concentrações de 8 a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Nesse estudo, constatou-se uma inibição do crescimento micelial dos fungos em concentrações reduzidas, principalmente para o fungo *C. neoformans* (16 $\mu\text{g mL}^{-1}$), e para as bactérias observou-se valores de CMI (Concentração mínima inibitória) na faixa de 8 – 63 $\mu\text{g mL}^{-1}$, concentrações relativamente baixas.

REFERÊNCIAS

- ABRAHÃO, S. A. et al. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 34, n. 2, p. 414-420, mar./abr. 2010.
- ALBERTINI, R. J. et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, Lyon, v. 463, n. 2, p. 111-172, Aug. 2000.
- ANDRADE, L. O.; ANDREWS, N. W. The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, n. 10, p. 819–823, 2005.
- ANDRADE, M. A. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil of *Pelargonium odoratissimum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 47-52, 2011.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- APARICIO, R. M. et al. *In vitro* studies of the hemolytic activity of microemulsions in human erythrocytes. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 39, n. 4, p. 1063-1067, Oct. 2005.
- ASCENSÃO, L. Estruturas secretoras em plantas: uma abordagem morfo-anatômica. In: FIGUEIREDO, A. C. S.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G. (Ed.). **Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais**. 3. ed. Lisboa: Universidade de Lisboa/Faculdade de Ciências/Centro de Biotecnologia Vegetal, 2007. (Curso Teórico-Prático).
- ASTANI, A.; REICHLING, J.; SCHNITZLER, P. Screening for antiviral activities of isolated compounds from essential oils. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, n. 3, p. 1-8, Oct. 2009.
- ATANDA, O. O.; AKPAN, I.; OLUWAFEMI, F..The potential of some spice essential oils in the control of *A. parasiticus* CFR 223 and aflatoxin production. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 601–607, May 2007.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, Ankeny, 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. 624 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.
- BARTRAM, S. et al. Dynamic pathway allocation in early terpenoid biosynthesis of stress-induced lima bean leaves. **Phytochemistry**, London, v. 67, n. 15, p. 1661-1672, Aug. 2006.
- BENET, L. Z. et al. Farmacocinética: a dinâmica da absorção, da distribuição e eliminação das drogas. In: HARDMAN, J. G. et al. (Ed.). **As bases farmacológicas da terapêutica.** 9. ed. México: McGraw-Hill Interamericana, 1996.
- BISIO, A. et al. Glandular hairs and secreted material in *Salvia blephrophylla* brandegeei ex epling grown in Italy. **Annals of Botany**, London, v. 83, n. 4, p. 441-452, Apr. 1999.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BORGES, A. R. et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 123-128, Oct. 2012.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, 10 jan. 2001.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 64, de 16 de setembro de 2008. Aprova Regulamento Técnico sobre Atribuição de aditivos e seus limites máximos para alimentos. 2008. **Diário Oficial [da] União**, Poder Executivo, Brasília, 16 set. 2008.
- BULL, B. S.; BRETON-GORIUS, J.; BEUTLER, E. Morphology of the erythron. In: _____. **Hematology.** 4th ed. New York: Mc Graq-Hill, 1990. p. 297-316.

BURLINSON, B. et al. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* comet assay workgroup. **Mutation Research**, Lyon, v. 627, n. 1, p. 31-35, Feb. 2007.

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

BUSATTA, C. et al. Evaluation of *Origanum vulgare* essential oil as antimicrobial agent in sausage. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 38, n. 4, p. 610-616, Oct./Dec. 2007.

CAMPOS, F. M. F. et al. Characterization of a gene encoding alcohol dehydrogenase in benzimidazole-susceptible and -resistant populations of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 111, n. 1, p. 56–63, July 2009.

CARSON, C. F.; RILEY, T. V. Non-antibiotic therapies for infectious diseases. **Communicable Diseases Intelligence**, Canberra, v. 27, p. 143-146, 2003. Suplemento 144.

CASTELLANI, D. C. et al. Produção do óleo essencial em catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss) e negramina (*Siparuna guianensis* Aubl.) em função da época de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 8, p. 62-65, 2006.

CATANZARO, I. et al. Genomic instability induced by α -pinene in Chinese hamster cell line. **Mutagenesis**, v. 27, n. 4, p. 463–469, Feb. 2012.

CAVALCANTI, B. C. et al. Genetic toxicology evaluation of essential oil of *Alpinia zerumbet* and its chemoprotective effects against H₂O₂-induced DNA damage in cultured human leukocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n.11, p. 4051–4061, Nov. 2012.

CHIU, C. H.; SU, L. H.; CHU, C. *Salmonella enterica* Serotype Choleraesuis: Epidemiology, Pathogenesis, Clinical Disease, and Treatment. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 17, n. 2, p. 311–322, Apr. 2004.

COELHO NETO, E. et al. Linfócitos. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, Garça, v. 6, n. 12, P. 1-8, jan./jun. 2009.

COMBRINCK, S. et al. Morphology and histochemistry of glandular trichomes of *Lippia scaberrima* (Verbenaceae). **Annals of Botany**, London, v. 99, n. 6, p. 1111-1119, Apr. 2007.

COSTA, C. A. et al. Cholesterol reduction and lack of genotoxic or toxic effects in mice after repeated 21-day oral intake of lemongrass (*Cymbopogon citratus*) essential oil. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 9, p. 2268–2272, Sept. 2011.

DE CURTIS, F. et al. Castoria Environmental factors affect the activity of biocontrol agents against ochratoxigenic *Aspergillus carbonarius* on wine grape. **International Journal of Food Microbiology**, v. 159, n. 1, p. 17-24, Sept. 2012.

DELAMARE, A. P. L. et al. Antibacterial activity of the essential oils of *Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L. cultivated in south Brazil. **Food Chemistry**, Princeton, v. 100, n. 2, p. 603-608, 2007.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3th ed. Chichester: J. Wiley, 2002. 520 p.

DÍAZ-CHIGUER, D. L. et al. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of some benzimidazole derivatives against two strains of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 122, n. 1, p. 108-112, Apr. 2012.

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

EBRAHIMABADI, A. H. et al. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. **Food Chemistry**, London, v. 119, n. 2, p. 452-458, Mar. 2010.

EISENREICH, W.; ROHDICH, F.; BACHER, A. Deoxyxylulose phosphate pathway to terpenoids. **Trends in Plant Science**, London, v. 6, n. 2, p. 78-84, Feb. 2001.

FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic, 1979. 302 p.

FARBER, J. M.; PETERKIN, P. I. *Listeria monocytogenes*, a food-borne pathogen. **Microbiological Reviews**, Washington, v. 55, n. 3, p. 476-511, Sept. 1991.

FISCHER, A. et al. A quantitative real-time immuno-PCR approach for detection of staphylococcal enterotoxins. **Journal of Molecular Medicine**, Berlin, v. 85, n. 5, p. 461-469, May 2007.

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

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Ateneu, 2001. 182 p.

FRANKEL, E. N.; FINLEY, J. W. How to standardize the multiplicity of methods to evaluate natural antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Califórnia, v. 13, n. 56, p. 4901-4908, July 2008.

FREIRE, F. das C. O. et al. **Micotoxinas**: importância na alimentação e na saúde humana e animal. Fortaleza: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, 2007. 48 p. (Documentos, 110).

FREIRE, J. M. et al. Controle microbiológico de alimentos utilizando óleo essencial de *Pimpinella anisum* (erva doce). **Higiene Alimentar**, v. 25, n. 196/197, p. 154-158, 2011a.

FREIRE, J. M. et al. Essential oil of *Origanum majorana* L., *Illicium verum* Hook. f. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume: chemical and antimicrobial characterization. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 209-214, 2011b.

GALES, A. C. et al. Characterization of *Pseudomonas aeruginosa* isolates: occurrence rates, antimicrobial susceptibility patterns, and molecular typing in the global sentry antimicrobial surveillance program, 1997-1999. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 32, n. 2, p. 146-155, May 2001.

GARCIA, D. et al. Is intraspecific variability of growth and mycotoxin production dependent on environmental conditions? A study with *Aspergillus carbonarius* isolates. **International Journal of Food Microbiology**, v. 144, n. 3- 5, p. 432-439, Jan. 2011.

GIEHL, E. L. H. (Cord.). **Flora digital do Rio Grande do Sul e de Santa Catarina**. UFRGS/UFSC, 2012. Disponível em:
<<http://www.ufrgs.br/fitoecologia/florars/>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

GIVIZIEZ, C. R. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de *Piper aduncum*, *Piper hispidinervum* e *Syzygium aromaticum* e desenvolvimento de um antisséptico com princípio ativo natural**. 2010. 124 p. Dissertação (Mestrado em Ciências dos Alimentos)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

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

GOLDSBY, R. A. et al. **Immunology**. 5th ed. New York: W. H. Freeman, 2003. p. 276-298.

GONÇALVES, M. J. et al. Chemical, antifungal and cytotoxic evaluation of the essential oil of *Thymus zygis* subsp. *sylvestris*. **Industrial Crops and Products**, v. 32, n. 1, p. 70–75, July 2010.

GUIMARÃES, L. G. de L. **Óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Mikania glauca* Mart. e *Cordia verbenacea* D.C.: identificação e quantificação química, caracterização das estruturas secretoras, atividades antioxidante e antibacteriana**. 2010. 225 p. Tese (Doutorado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

GUTIERREZ, J. R. V. Dano oxidativo, radicales libres y antioxidantes. **Revista Cubana de Medicina Militar**, Havana, v. 31, n. 2, p. 126-133, abr./jun. 2002.

HARTMANN, T. From waste products to ecochemicals□: Fifty years research of plant secondary metabolism. **Phytochemistry**, London, v. 68, n. 22-24, p. 2831-2846, Nov./Dec. 2007.

HEUVELINK, A. E. et al. Occurrence of verotoxin- producing *Escherichia coli* O157 on Dutch dairy farms. **Journal of Clinical Microbiology**, Washington, v. 36, n. 12, p. 3480-3487, Dec. 1998.

HOTEZ, P. J. et al. The neglected tropical diseases of Latin America and the Caribbean: a review of disease burden and distribution and a roadmap for control and elimination. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 9, p. 300, Sept. 2008.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. L. The chemistry behind antioxidant capacity Assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, Mar. 2005.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Some naturally occurring substances, food items and constituents, heterocyclic aromatic amines and mycotoxins**. Lyon: World Health Organization, 1993. v. 56, 489 p.

INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATIONS FOR FOODS. **Microorganismos de los alimentos I: significado e métodos de enumeración**. 2. ed. Zaragoza: Acribia, 2000. v. 1, 439 p.

ISLAM, M. et al. Survival of *Escherichia coli* O157:H7 in soil and on carrots and onions grown in fields treated with contaminated manure composts or irrigation water. **Food Microbiology**, London, v. 22, n. 1, p. 63-70, Jan. 2005.

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

JAYAPRAKASHA, G. K. et al. Antioxidant and antimutagenic activities of *Cinnamomum zeylanicum* fruit extracts. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 20, n. 3/4, p. 330-336, May 2007.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A. F.; CROFT, S. L. Natural products as antiparasitic drugs. **Parasitology Research**, v. 90, s. 2, p. S55-S62, 2003.

KOLB, D.; MULLER, M. Light, conventional and environmental scanning electron microscopy of the trichomes of *Cucurbita pepo* subsp. *Pepo* var. *stryriaca* and histochemistry of glandular secretory products. **Annals of Botany**, London, v. 93, n. 5, p. 515-526, May 2004.

KUHNERT, P.; BOERLIN, P.; FREY, J. Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 107, 711, Jan. 2000.

KURE, C. F. et al. Differentiation of *Penicillium commune* and *Penicillium palitans* isolates from cheese and indoor environments of cheese factories using M13 fingerprinting. **Food Microbiology**, v. 19, n. 2-3, p. 151-157, Apr. 2002.

LAVOR, C. T. B.; SOUSA, F. M. de. Micotoxicose em avestruz *Struthio camelus*: relato de caso. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 39, n. 2, p. 348-352, abr./ jun. 2008.

LEITE, K. R. et al. Avaliação da atividade mutagênica e genotóxica de *Ginkgo biloba* L. pelo teste do microcronúcleo em camundongos. **Revista de Biologia Neotropical**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 157-162, jul./ dez. 2006.

LIJU, V. B.; JEENA, K.; KUTTAN, R. Acute and subchronic toxicity as well as mutagenic evaluation of essential oil from turmeric (*Curcuma longa* L). **Food and Chemical Toxicology**, v. 53, p. 52-61, Mar. 2013.

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 293-303, set./dez. 2001.

LIMA, R. K. et al. Bactericidal and Antioxidant Activity of Essential Oils from *Myristica fragrans* Houtt and *Salvia microphylla* H.B.K. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 89, n. 3, p. 523-528, 2012.

LIMA, R. K. **Óleos essenciais de *Myristica fragrans* Houtt e de *Salvia microphylla* H. B. K.:** caracterização química, atividade biológica e antioxidante. 2008. 160 p. Tese (Doutorado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil, 4. ed. São Paulo: Nova Odessa, 2002. v. 2.

MALHEIROS, S. V. P. et al. Pathways involved in trifluoperazine, dibucaine and praziquantel induced hemolysis. **Biophysical Chemistry**, v. 83, n. 2, p. 89-100, Jan. 2000.

MALMONGE, S. M. et al. Avaliação da citotoxicidade de hidrogéis de poliHEMA: um estudo *in vitro*. **Revista Brasileira de Engenharia Biomédica**, v. 15, n. 1-2, p. 49-54, jan./ago. 1999.

MAISTRO, E. L. et al. Genotoxicity and mutagenicity of *Rosmarinus officinalis* (Labiatae) essential oil in mammalian cells *in vivo*. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 4, p. 2113-2122, 2010.

MARIN-NETO, et al. Pathogenesis of chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, n. , p.1109-1123, 2007.

MÄSER, P. et al. Antiparasitic agents: new drugs on the horizon. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 12, n. 5, p. 562-566, Oct. 2012.

MATSUDA, N. M.; MILLER, S. M.; EVORA, P. R. B. The chronic gastrointestinal manifestations of Chagas disease. **Clinics**, v. 64, n. 12, p. 1219-1224, 2009.

MONTANARI, R. M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae**. 2010. 159 p. Tese (Doutorado em Agroquímica)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

MONTGOMERY, R. **Bioquímica** - uma abordagem dirigida por casos. 5. ed. São Paulo, 1994. 277 p.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

OLIVEIRA, A. C. D. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, C. A. F. et al. Ocorrência simultânea de aflatoxinas e ácido ciclopiazônico em rações para vacas leiteiras. **Revista Analytica**, n. 24, p. 88-92, ago./set. 2006.

OSORIO, L. et al. Virulence factors of *Trypanosoma cruzi*: who is who? **Microbes and Infection**, v. 14, n. 15, p. 1390-1402, Dec. 2012.

PAVIANI, E. R.; STADNIK, C. B.; HEINEK, I. Estudo da epidemiologia e perfil de sensibilidade da *Pseudomonas aeruginosa*. **Infarma**, v. 15, n. 11-12, p. 66-70, jan. 2004.

PEIXOTO, A. L.; BARROS, F. de. Canellaceae. In: JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO. **Lista de espécies da flora do Brasil**. 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB111724>>. Acesso em: 12 out. 2011.

PÉRES, V. F. et al. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 9, p. 2389–2395, Sept. 2009.

PICHERSKY, E.; GANG, D. R. Genetics and biochemistry of secondary metabolites in plants: an evolutionary perspective. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 5, n. 10, p. 439-45, Oct. 2000.

PICULO, F. et al. *In vivo* genotoxicity assessment of nerolidol. **Journal of Applied Toxicology**, v. 31, n. 7, p. 633-639, Oct. 2011.

PIGOTT, D. C. Foodborne Illness. **Emergency Medicine Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 475-497, May 2008.

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

PITA, J. C. L. R. **Avaliação da atividade antitumoral e toxicidade do Trachylobano-360 de *Xylopija langsdorffiana* St. Hil. & Tul. (Annonaceae)**. 2010.103 p. Dissertação (Mestrado em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos)-Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

POPOFF, M. Y.; BOCKEMÜHL, J.; GHEESLING, L. L. Supplement 2002 (n° 46) to the Kauffman-White scheme. **Research in Microbiology**, Paris, n. 155, n. 7, p. 568-570, Sept. 2004.

PRETÉ, P. S.C. et al. Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction - a spin label study. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Frankfurt, v. 1808, n. 1, p.164–170, Jan. 2011.

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

RASOOLI, I.; OWLIA, P. Chemoprevention by thyme oils of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxin production. **Phytochemistry**, v. 66, n. 24, p. 2851–285, 2005.

RENNER, S. S.; G. HAUSNER. **Monograph of Siparunaceae**. New York: The New York Botanical Garden, 2005. 256 p.

RIEDEL, G. **Controle sanitário dos alimentos**. Rio de Janeiro: Atheneu, 2005. 455 p.

ROGERO, S. O. et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, São Carlos, v. 6, n. 3, Apr./June 2003.

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

RUPOLLO, G. et al. Efeito da umidade e do período de armazenamento hermético na contaminação natural por fungos e a produção de micotoxinas em grãos de aveia. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 1, jan./fev. 2006.

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.

SALOMON C. J. First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 3, p. 888-894, 2012.

SANTANA, E. H. W. de et al. Estafilococos em alimentos. **Arquivos do Instituto Biológico**, São Paulo, v. 77, n. 3, p. 545-554, jul./set. 2010.

SANTORO, G. F. et al. *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 283-290, July 2007a.

SANTORO, G. F. et al. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitology Research**, v. 100, n. 4, p. 783-90, Mar. 2007b.

SANTORO, G. F. et al. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology**, v.134, n. 11, p.1649-1656, 2007c.

SAUDE-GUIMARAES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 3, p. 455-465, set. 2007.

SEIXAS, P. T. L. et al. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, 2011. Edição Especial.

SHIKANAI-YASUDA, M. A.; CARVALHO, N. B. Oral transmission of Chagas disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p. 845-852, 2012.

SIEUWERTS, A. et al. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC₅₀ – values and cell survival. **European Journal of Clinical Chemistry and Clinical Biochemistry**, v. 33, p. 813-823, 1995.

SILVA-SANTOS, A. et al. A proteção patentária na utilização de óleos essenciais e compostos terpênicos para o desenvolvimento tecnológico e industrial. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 14-22, 2006.

SILVA, S. L. da. et al. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 1, p. 107-112, 2008.

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

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, Stockholm, v. 175, n. 1, p. 184–191, Mar. 1988.

SINHA, S.; BISWAS, D.; MUKHERJEE, A. Antigenotoxic and antioxidant activities of palmarosa and citronella essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1521–1527, Oct. 2011.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, São Paulo, v. 41, n. 1, Jan./Mar. 2005.

- SOLÓRZANO-SANTOS, F.; MIRANDA-NOVALES, M. G. Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 136-141, Apr. 2012.
- SOUSA, C. P. Pathogenicity mechanisms of prokaryotic cells: an evolutionary view. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 7, n. 1, p. 23-31, Feb. 2003.
- STAMFORD, T. L. M. et al. Enterotoxigenicidade de *Staphylococcus* spp: isolados de leite *in natura*. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 1, p. 41-45, jan./mar. 2006.
- STORCH, J.; KLEINFELD, A. M. The lipid structure of biological membranes. **Trends in Biochemical Sciences**, v.10, n. 11, p. 418–421, Nov. 1985.
- SVOBODA, K. P.; GREENAWAY, R. I. Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L. (summer savory) and phytochemical comparison of different. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 4562, n. 3, p. 196-202, Jan. 2003.
- SVOBODA, K.; HAMPSON, J.; HUNTER, T. Secretory tissues: storage and chemical variation of essential oils in secretory tissues of higher plants and their bioactivity. **The International Journal of Aromatherapy**, Amsterdam, v. 9, n. 3, p. 124-131, Mar. 1999.
- TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. 719 p.
- TAKEUCHI, H.; BABA M.; SHIGETA, S. An application of tetrazolium (MTT) colorimetric assay for the screening of anti-herpes simplex vírus compounds. **Journal of Virological Methods**, v. 33, n. 1-2, p. 61-71, June 1991.
- TANIWAKI, M. H.; FONSECA, H.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Aflatoxin production variability by *Aspergillus flavus* strains after different storage times. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 50, n. 1, Feb./May 1993.
- TANIWAKI, M. H.; SILVA, N. **Fungos em alimentos – ocorrência e detecção**. Campinas: ITAL/Núcleo de Microbiologia, 2001. 82 p.

TARIKU, Y. et al. Essential-oil composition, antileishmanial, and toxicity study of *Artemisia abyssinica* and *Satureja punctata* ssp. *punctata* from Ethiopia. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 4, p. 1009-1018, Apr. 2010.

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, n. 4, p. 614-623, Apr. 2011.

TEPE, B. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chemistry**, Princeton, v. 90, n. 3, p. 333-340, May 2005.

TICE, R. R. et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 35, n. 3, p. 306-221, 2000.

TIZARD, I. R. **Imunologia veterinária**: uma introdução. 5. ed. São Paulo : Roca, 1998. p. 98-111.

TORRES, E.; WISNIEWSKI JR., A.; SIMIONATTO, E. L. Composição química dos componentes voláteis de *Capsicodendron dinisii* Schwancke (Canellaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 130-132, 2010.

VALENTINI, C. M. A; RODRIGUEZ-ORTIZ, C. E; COELHO, M.F.B. *Siparuna guianensis* Aublet (negramina): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, Botucatu, v. 12, n. 1, mar. 2010.

VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: safe cure? **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, jun. 2005.

VIANA, F. A. et al. Essential oil of *Siparuna guianensis* Aublet from the Amazon Region of Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, Oxford, v. 14, p. 60-62, Jan./Feb. 2002.

ZUNABOVIC, M.; DOMIG, K. J.; KNEIFEL, W. Practical relevance of methodologies for detecting and tracing of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods and manufacture environments. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 351-362, Mar. 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2010. (Fact Sheet, 340).Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>>. Acesso em: 5 mar. 2013.

CAPÍTULO 2: CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cinnamodendron dinisii* Schwacke E *Siparuna guianensis* Aublet

RESUMO

Tem-se observado uma crescente busca por produtos naturais para serem utilizados em alimentos, cosméticos, produtos farmacêuticos, e até mesmo em agroquímicos. Essa busca ocorre na tentativa de substituir substâncias sintéticas, já utilizadas pra tais fins, que têm sido descritas como causadoras de danos tanto à saúde de mamíferos, como ao meio ambiente. Entre os produtos de origem vegetal, os óleos essenciais, pertencentes à classe dos metabólitos secundários, vêm se destacando por suas atividades biológicas. Nesse contexto, objetivou-se neste estudo caracterizar quimicamente e avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke (pimenteira) e *Siparuna guianensis* Aublet (negramina). A obtenção do óleo essencial foi realizada pela técnica de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger modificado, e a identificação e quantificação dos constituintes, pelas análises em CG/EM e CG-DIC. A atividade antioxidante foi avaliada utilizando sistema β -caroteno/ácido linoleico e o método de sequestro de radicais DPPH. Os rendimentos dos óleos essenciais foram de 2,03% BLU para as folhas frescas de pimenteira e 0,31% BLU para as folhas frescas de negramina; o teor de umidade encontrado para as folhas frescas de *C. dinisii* foi de 60,67% e para as folhas frescas de *S. guianensis* foi 64,67%. Nas análises cromatográficas, os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial de *C. dinisii* foram os monoterpenos bicíclicos, α -pineno (35,41%), β -pineno (17,81%), sabineno (12,01%) e o sesquiterpeno, biciclogermacreno (7,59%). No óleo essencial das folhas frescas de *Siparuna guianensis* Aublet, foram identificados o monoterpeno acíclico, β -mirceno (13,14%), e os sesquiterpenos, germacreno-D (8,68%) e biciclogermacreno (16,71%). A atividade antioxidante apresentou-se baixa pelo teste β -caroteno/ácido linoleico e não foi evidenciada pelo teste do DPPH, para ambos os óleos avaliados.

Palavras-chave: Óleos voláteis. Composição química. Antioxidante.

ABSTRACT

A increasing search has been observed for natural products for use in foods, cosmetics, pharmaceuticals, and even in agrochemicals. This search occurs in attempting to replace synthetic substances, already used for such purposes, they have been described as causers of damage to both the health of mammals, and for the environment. Among the products of plant origin, the essential oils, belonging to the class of secondary metabolites, stand out for their biological activity. In that context, the objectives in this study were to characterize chemically and to evaluate the antioxidant activity of essential oils of *Cinnamodendron dinisii* Schwacke (pimenteira) and *Siparuna guianensis* Aublet (negramina). The obtaining of the essential oil was conducted by the hydrodistillation technique using a modified Clevenger apparatus, and the identification and quantification of the constituents, by analyses in GC/MS and GC-FID. The antioxidant activity was evaluated using the β -carotene/linoleic acid system and the DPPH radical sequestering method. The yield of the essential oils was 2.03% MFB for the fresh leaves of pepper and 0.31% MFB for the fresh leaves of negramina; the moisture content found for the fresh leaves of *C.dinisii* was 60.67% and for the fresh leaves of *S. guianensis*, 64.67%. In the chromatographic analyses, the majority constituents found in the essential oil of *C.dinisii* were bicyclic monoterpenes, α -pinene (35.41%) β -pinene (17.81%), sabinene (12.01%) and the sesquiterpene, bicyclogermacrene (7.59%). In the essential oil of the *Siparuna guianensis* Aublet fresh leaves, acyclic monoterpene, β -myrcene (13.14%), and the sesquiterpenes, germacrene-D (8.68%) and bicyclogermacrene (16.71%) were identified. The antioxidant activity was low by the β -carotene/linoleic acid test and was not in evidence by the DPPH test, for both appraised oils.

Key words: Volatile Oils. Chemical composition. Antioxidant.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas medicinais por seres humanos data de milhares de anos devido às suas propriedades medicinais e nutricionais. Muitos compostos naturais extraídos de plantas apresentam importantes atividades biológicas. Entre esses compostos, destacam-se os óleos essenciais, que estão atraindo cada vez mais a atenção dos diversos segmentos da indústria devido às suas múltiplas funções, em especial atividades antioxidante e antimicrobiana.

Os óleos essenciais são definidos pela ISO como sendo os produtos obtidos de diferentes partes das plantas por meio das técnicas de destilação por arraste com vapor d'água, hidrodestilação e prensagem dos pericarpos de frutos cítricos. São misturas complexas de substâncias voláteis e lipofílicas, formadas pelo metabolismo secundário das plantas, caracterizados pelo odor agradável apresentado por grande parte deles (SIMÕES et al., 2007; BANDONI; CZEPAK, 2008).

Os óleos volatéis são compostos de constituição complexa e podem conter mais de cem substâncias; no entanto, geralmente apresentam um ou mais constituintes em maiores teores, sendo denominados de componentes majoritários. A intensidade e a composição química dos óleos essenciais podem variar de acordo com a espécie, fatores ambientais como o clima e composição do solo, órgão da planta, idade e estágio vegetativo (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os óleos essenciais são comercializados por diversas empresas como matéria-prima para diversos produtos, com aplicações na perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos, entre outras. Existem aproximadamente 300 óleos essenciais de importância comercial no mundo. Na indústria alimentícia, os óleos essenciais, além de conferirem aroma e sabor aos alimentos, possuem importante atividade antioxidante, propriedade que

incentiva ainda mais a sua utilização (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Nos alimentos, a peroxidação lipídica é responsável pelo desenvolvimento de sabores e odores desagradáveis, tornando-os impróprios para o consumo, além de provocar outras alterações que podem afetar a qualidade nutricional, devido à degradação de vitaminas lipossolúveis e de ácidos graxos essenciais, como também afetar a integridade e segurança dos alimentos. Já nos sistemas biológicos, a peroxidação lipídica sobre os lipídeos insaturados das membranas celulares causa danos às membranas, interrompendo os mecanismos de troca de metabólitos, podendo causar até a morte celular, tornando-se a grande responsável pelo envelhecimento precoce e pelas doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune, disfunções cerebrais, entre outras (RAMALHO; JORGE, 2006; LIMA; ABDALLA, 2001).

Para evitar a peroxidação lipídica dos alimentos, os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria são o BHA, BHT, PG e o TBHQ. Porém, estudos avaliando a toxicologia desses compostos demonstraram o seu potencial carcinogênico sobre animais. Tendo em vista os indícios de problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, pesquisas têm surgido com o objetivo de encontrar produtos naturais com potencial antioxidante, que sejam uma alternativa de substituição dos compostos sintéticos ou até mesmo promover uma associação entre eles, com o intuito de diminuir sua quantidade nos alimentos. Uma das vantagens dos antioxidantes naturais frente aos sintéticos é que a legislação é mais flexível em relação a eles, porém os antioxidantes naturais, na maioria das vezes, apresentam capacidades antioxidantes menores que as dos compostos sintéticos (RAMALHO; JORGE, 2006; OLIVEIRA et al., 2009).

A espécie *C. dinisii* é uma árvore de 10-20 metros de altura, pertence à família Canellaceae, vulgarmente conhecida como “pimenteira” ou “pau-para-tudo”, a casca do tronco, de sabor picante como a pimenta verdadeira, possui

propriedades medicinais e é levemente entorpecente (LORENZI, 2002; PEIXOTO; BARROS, 2010).

A espécie *S. guianensis* é utilizada como recurso medicinal entre a população matogrossense, que utiliza o decocto de suas folhas no combate de sintomas de sinusite, febre, reumatismo, enxaqueca, gripe, dores no corpo e “malina”. É conhecida popularmente como “negramina” e pertence à família Siparunaceae (VALENTINI; RODRIGUEZ-ORTIZ; COELHO, 2010).

Em razão da importância crescente dos óleos essenciais no mercado mundial, do seu potencial biológico e da diversidade de espécies existentes e ainda inexploradas, são necessários mais estudos que viabilizem o seu uso. Assim, objetivou-se neste trabalho caracterizar quimicamente e avaliar a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke (pimenteira) e *Siparuna guianensis* Aublet (negramina).

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Óleos essenciais

As extrações dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais da Universidade Federal de Lavras.

2.1.1 Obtenção do material vegetal

As folhas de *Cinnamodendron dinisii* e de *Siparuna guianensis* foram coletadas no mês de fevereiro de 2011, no período da manhã, no Horto de Plantas Medicinais da UFLA e nas dependências do *campus* da UFLA, respectivamente. O local de coleta de *C. dinisii* possui as seguintes coordenadas: -21° 13' 49.0476" latitude, -44° 58' 27.4764" longitude e 933m de altitude, e o local de coleta de *S. guianensis*: -21° 13' 41.9952" latitude, -44° 58' 9.0048" longitude e 951m de altitude.

O material coletado foi encaminhado para o Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA) Lavras/MG, onde foram selecionadas folhas adultas, sadias com ausência de injúrias e manchas provocadas por fitopatógenos, insetos ou insolação. O material vegetal foi devidamente acondicionado e mantido sobre refrigeração ($\approx 7\text{ }^{\circ}\text{C}$), até a extração dos óleos essenciais.

As espécies foram devidamente identificadas pela Profa. Dra. Mariana Esteves Mansanares (Departamento de Biologia/UFLA), e uma exsicata de cada espécie encontra-se registrada no Herbário ESAL, localizado no Departamento de Biologia da UFLA, com os seguintes números de registros: 26.285 (*Cinnamodendron dinisii* Schwacke) e 26.623 (*Siparuna guianensis* Aublet).

2.1.2 Extração do óleo essencial

O método de extração foi o de hidrodestilação, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000).

Foram feitas três repetições da extração de cada planta, utilizando 300g de folhas frescas e picadas para cada repetição, destilando-se por 2 horas. Decorrido esse tempo, o óleo foi separado do hidrolato por centrifugação, utilizando uma centrífuga de bancada de cruzeta horizontal (Fanem Baby®I Modelo 206 BL) a 1100 g por 5 min. O óleo foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, acondicionado em frasco de vidro e armazenado sob refrigeração (4 °C) e ao abrigo da luz (GUIMARÃES et al., 2008).

2.1.3 Determinação da umidade

Paralelamente às extrações, realizou-se o teste de umidade, de acordo com Pimentel et al. (2006). Utilizaram-se 5g de material vegetal imersos em 80 mL de ciclohexano em balão volumétrico com capacidade de 250 mL, o qual foi acoplado ao aparelho de Dean-Stark modificado. Após 2 horas, o volume de água presente no material vegetal foi quantificado. O rendimento do óleo essencial foi calculado e expresso em peso de óleo por peso de material com Base Livre de Umidade (% p/p BLU).

2.1.4 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

A análise química dos óleos essenciais foi realizada no Departamento de Biologia Vegetal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa-Portugal, sob a orientação da Profa. Dra. Ana Cristina da Silva Figueiredo.

A identificação dos constituintes dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia gás-líquido acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), na

qual utilizou-se um 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.) ligado a um Perkin-Elmer Turbomass. A temperatura do forno foi programada de 45 a 175°C, com incrementos de 3°C/min, e subsequentemente a 15°C/min até 300°C. Atingidos os 300°C, a temperatura foi mantida isotérmica durante 10 min; temperatura da linha de transferência, 280°C; temperatura da câmara de ionização, 220°C; gás de arrastamento, hélio, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s; relação de divisão de fluxo, 1:40; energia de ionização, 70 eV; corrente de ionização, 60 μA ; gama de massas, 40-300 u; tempo de varrimento, 1 s. Os compostos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção, em relação aos dos *n*-alcanos C₈-C₂₅ e por comparação com uma biblioteca de espectros de massa desenvolvida no laboratório do Centro de Biotecnologia Vegetal, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (MOURA, 2011).

O teor de cada constituinte foi determinado por cromatografia gás-líquido (CG-DIC) em um 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: DB-1 de sílica fundida, de fase imobilizada de metilsilicone, (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 μm ; J & W Scientific Inc.) e DB-17HT de sílica fundida (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 μm ; J & W Scientific Inc.). A temperatura do forno foi programada de 45°C a 175°C, com incrementos de 3°C/min, e subsequentemente a 15°C/min até 300°C. Atingidos os 300°C a temperatura foi mantida isotérmica durante 10 min. Temperatura do injetor e dos detectores, 290°C e 280°C, respectivamente. Foi utilizado hidrogênio como gás de arraste, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s. Relação de divisão de fluxo de 1:50. A percentagem dos constituintes dos óleos foi determinada pela integração das áreas dos picos sem utilização de fatores de correção. Os

valores apresentados correspondem ao valor médio de duas injeções (MOURA, 2011).

2.2 Determinação da atividade antioxidante

Foi realizada no Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais da Universidade Federal de Lavras.

2.2.1 Método de redução do radical estável DPPH

Foi preparada uma solução metanólica de DPPH na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para a avaliação, foram adicionados em um tubo de ensaio 2,7 mL da solução-estoque de DPPH, seguidos da adição de 0,3 mL de cada diluição do óleo em metanol (300; 250; 200; 150; 100; 50; 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Paralelamente, preparou-se o controle, contendo todos os reagentes, com exceção do óleo essencial. Após 60 minutos, foram realizadas leituras em espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1PC) no comprimento de onda de 517 nm (TEPE et al., 2005). A atividade antioxidante foi calculada como porcentagem de inibição do radical DPPH, empregando a equação a seguir:

$$\%I = 100 - [(DPPH_{am}/DPPH_{bran})/100]$$

Em que:

%I: Porcentagem de inibição do radical DPPH

DPPH_{am}: absorbância do DPPH com a amostra;

DPPH_{bran}: absorbância do DPPH sem amostra (branco).

Para fins de comparação, foram avaliadas as atividades dos padrões BHT, timol e ácido ascórbico.

2.2.2 Ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 60 μ L de ácido linoleico, 600 mg de Tween 20, 6 mg de β -caroteno e 30 mL de clorofórmio. Removeu-se todo cloróformio utilizando rota-evaporador, com banho-maria à 50°C (Büchi Rotavapor R 114). Em seguida, o resíduo foi dissolvido com 150 mL de água destilada saturada de oxigênio, sob vigorosa agitação. Em tubos de ensaio, 2,7 mL dessa solução foram adicionados a 0,3 mL de cada solução do óleo (300; 250; 200; 150; 100; 50; 25 μ g mL⁻¹), sendo o controle composto apenas de metanol. A absorbância foi medida imediatamente em espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1PC) a 470 nm (LOPES-LUTZ et al., 2008).

Após a leitura das absorbâncias iniciais, os tubos foram incubados em banho-maria a 50 °C para a reação de oxidação, sendo realizada uma segunda leitura após 60 minutos de incubação. Todas as leituras foram realizadas em triplicata.

De acordo com Wang et al. (2008), a atividade antioxidante foi expressa como porcentagem de inibição após 60 minutos de incubação, utilizando a equação a seguir:

$$\%AA = 100. (Drc - Drs)/Drc$$

Em que:

%AA : Porcentagem de inibição de degradação do β -caroteno;

Drc : Razão de degradação do controle $[(\ln(a/b))/60]$;

Drs : Razão de degradação na presença da amostra $[(\ln(a/b))/60]$;

a: Absorbância no tempo zero;

b : Absorbância no tempo 60 minutos.

Para fins de comparação, foram avaliadas as atividades dos padrões BHT, timol e ácido ascórbico.

2.2.3 Análise estatística

Para ambos os testes, foi utilizado o delineamento inteiramente casualizado (DIC) com 7 concentrações e 3 repetições para cada amostra (ou padrão). O programa estatístico utilizado foi o SISVAR (FERREIRA, 2008). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias obtidas foram submetidas à regressão ao nível de 5% de probabilidade.

As equações ajustadas foram utilizadas para calcular a CI_{50} e foram plotados gráficos com os valores de %I, do ensaio do DPPH, ou %AA, para o Sistema β -caroteno/ácido linoleico, *versus* as concentrações analisadas empregando o software Origin 6.0.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Rendimento e umidade

Os valores dos rendimentos dos óleos essenciais e teor de umidade das folhas frescas das espécies estudadas estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Teor de umidade das folhas e rendimentos dos óleos essenciais de *Siparuna guianensis* e *Cinnamodendron dinisii*.

Planta	Massa (g)	Umidade (%)	Óleo essencial (% p/p*)
<i>C.dinisii</i> (Pimenteira)	300,00	60,67	2,03
<i>S. guianensis</i> (Negramina)	300,00	64,67	0,31

* BLU – Base livre de umidade.

Pelos dados da Tabela 1, observa-se que os rendimentos dos óleos essenciais foram de 2,03% BLU para as folhas frescas de pimenteira e 0,31% BLU para as folhas frescas de negramina, o teor de umidade encontrado para as folhas frescas de *C.dinisii* foi de 60,67% e para as folhas frescas de *S. guianensis* foi 64,67%.

O valor de rendimento encontrado neste estudo para o óleo essencial de negramina está em acordo com aos valores encontrados em pesquisas realizadas por Valentini et al. (2010). Estes observaram que a porcentagem total de óleo essencial ficou na faixa de 0,10-0,61% (p/p), sendo que a maior quantidade da composição volátil da *S. guianensis* ocorreu nos períodos reprodutivos, quando a planta estava florescendo e frutificando, enquanto que no período vegetativo esta ocorreu em menor quantidade. No mesmo ano, Montanari (2010) encontrou valores que variaram de 4,5% (p/p BLU) (em épocas caracterizadas por clima

quente e úmido) a 7,0% (p/p BLU) (em épocas caracterizadas por clima frio e seco), resultados expressivamente maiores aos encontrados neste estudo e naqueles observados por Valentini et al. (2010). Anteriormente Castelani et al. (2006) estudando a produção de óleo essencial em negramina em função da época de colheita, observaram que o rendimento máximo foi no mês de outubro de 0,18% (p/p BLU), valor inferior ao encontrado nesse estudo.

Mancini (1996), citado por Torres; Wisniewski Jr. e Simionatto (2010), avaliando o óleo essencial de *C. dinisii* (pimenteira), verificaram rendimento médio de 0,7% para o óleo extraído das folhas e de 0,2% para o óleo extraído dos ramos e, posteriormente, pesquisas de Torres, Wisniewski Jr. e Simionatto (2010) demonstraram rendimento médio de 0,17% (p/p) para o óleo essencial extraído das cascas do tronco; os valores de rendimento encontrados nas pesquisas citadas foram inferiores aos encontrados neste estudo.

As variações dos resultados de rendimento médio observados neste estudo com as pesquisas citadas podem ser explicadas pelo fato de que a produção de óleo essencial está relacionada com as interações planta-meio, animal-planta, planta-micro-organismos e planta-planta, com a finalidade de sobrevivência e/ou manutenção da planta, conferindo a ela capacidade de adaptação às condições do meio em que vive (SIMÕES et al., 2007). Assim, mudanças sazonais, diferenças de época de colheita, tipo de solo, clima da região, tempo de secagem e umidade relativa do ar no dia da colheita, podem afetar significativamente o metabolismo de síntese desses compostos que conseqüentemente apresentam efeito sobre o rendimento dos óleos essenciais (BLANK et al., 2007; GOBBO-NETO; LOPES, 2007; VALENTINI et al., 2010).

3.2 Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

3.2.1 *Cinnamodendron dinisii* Schwacke

Foram identificados 39 constituintes presentes no óleo essencial de *C. dinisii*, apresentados na Tabela 2. Observa-se que o óleo essencial apresenta em quase sua totalidade monoterpenos hidrocarbônicos (76,20%), apresentando como componentes majoritários os monoterpenos bicíclicos, α -pineno (35,41%), β -pineno (17,81%), sabineno (12,01%) e o sesquiterpeno, biciclogermacreno (7,59%) (Figura 1). Também foi observada a presença do sesquiterpeno drimânico, drimenol (0,20%), presente na composição de várias espécies da família Canellaceae.

Tabela 2 Composição química do óleo essencial das folhas frescas de *Cinnamodendron dinisii*.

Pico	TR*	IRc**	Composto	%I***
1	5,629	924	α -Tujeno	1,06
2	5,798	930	α-Pineno	35,41
3	6,116	938	Canfeno	0,71
4	6,861	958	Sabineno	12,01
5	6,945	963	β-Pineno	17,81
6	7,537	975	β -Mirceno	1,46
7	8,349	1002	α -Terpineno	0,24
8	8,434	1003	<i>p</i> -Cimeno	1,21
9	8,653	1005	1,8-Cineol	4,37
10	8,761	1009	Limoneno	1,54
11	9,155	1017	<i>cis</i> - β -Ocimeno	1,99
12	9,554	1027	<i>trans</i> - β -Ocimeno	1,82
13	9,870	1035	γ -Terpineno	0,75
14	10,055	1037	<i>trans</i> -Sabineno hidratado	0,15
15	11,073	1064	Terpinoleno	0,17
16	11,222	1066	<i>cis</i> -Sabineno hidratado	0,15
17	11,440	1074	Linalol	0,65
18	12,233	1099	<i>trans</i> - <i>p</i> -2-Menthen-1-ol	0,09
19	12,735	1106	<i>trans</i> -Pinocarveol	0,11

Tabela 2, continua

Tabela 2, continuação

Pico	TR*	IRc**	Composto	%I***
20	12,965	1110	<i>allo</i> -Ocimeno	0,03
21	13,104	1114	<i>trans</i> -Verbenol	0,03
22	13,816	1134	Borneol	0,36
23	14,394	1148	Terpinen-4-ol	2,50
24	15,038	1159	α -Terpineol	0,11
25	15,282	1168	Mirtenol	0,05
26	19,197	1265	Acetato de Bornila	0,10
27	21,903	1332	δ -Elemeno	0,32
28	22,063	1334	Acetato de α -Terpenila	0,32
29	23,595	1375	α -Copaeno	0,11
30	24,223	1388	β -Elemeno	0,21
31	25,209	1414	β -Cariofileno	1,88
32	26,056	1428	Aromandreno	0,23
33	27,139	1455	<i>trans</i> - β -farneseno	0,20
31	28,364	1487	Biclogermacreno	7,59
32	28,784	1500	(<i>trans, trans</i>) α -Farneseno	0,09
33	29,519	1505	δ -Cadineno	0,14
34	30,850	1549	<i>trans</i> -Nerolidol	0,05
35	31,187	1551	Espatulenol	1,88
36	31,354	1561	Óxido de β -Cariofileno	0,42
37	31,570	1566	Globulol	0,32
38	31,833	1569	Viridiflorol	0,16
39	37,881	1764	Drimenol	0,20
Total identificado				99,00
Componentes agrupados				
Monoterpenos hidrocarbônicos				76,20
Monoterpenos oxigenados				9,00
Sesquiterpenos hidrocarbônicos				10,80
Sesquiterpenos oxigenados				3,00

*TR= tempo de retenção (minutos), **IRc = índice de retenção calculado, ***% =concentração em porcentagem

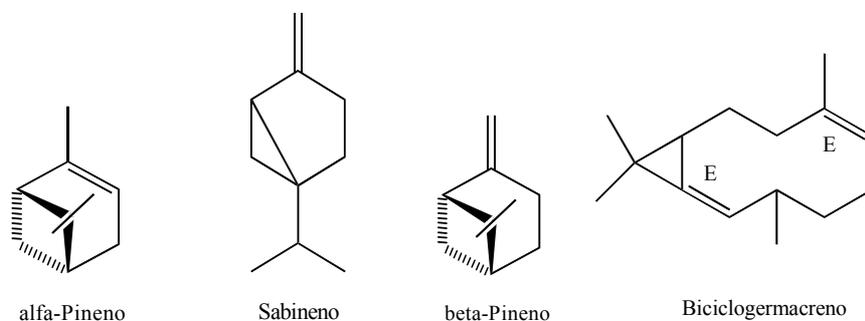


Figura 1 Estruturas químicas dos compostos majoritários do óleo essencial das folhas frescas de *Cinnamodendron dinisii*

Torres, Wisniewski Jr. e Simionatto (2010) avaliaram a composição química dos componentes voláteis presentes nas cascas de *Capsicodendron dinisii* Schwancke, sinonímia botânica de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke, e verificaram a presença de 23 compostos, (90% da composição total de óleo), sendo 86,8% desses monoterpenos, e o composto majoritário encontrado foi o limoneno (68,5%). Resultado similar foi observado nesta pesquisa quanto à classe de compostos presentes em maior porcentagem, uma vez que foi encontrado 76,20% de monoterpenos no óleo em estudo, porém foi diferente quanto ao componente majoritário, o limoneno, que nesse trabalho apresentou-se na porcentagem de 1,54%.

É possível observar como nesse estudo, que as demais pesquisas descritas que avaliaram a composição química dos óleos essenciais de espécies presentes em quatro dos cinco gêneros da família Canellaceae (*Cinnamodendron*, *Canella*, *Cinnamosma*, *Warburgia* e *Pleodendron*), apresentaram como característica comum que todos os componentes são de origem terpênica sendo em sua maioria os monoterpenos e sesquiterpenos.

Estudos de Adams e Zanoni (1989) avaliando a composição química do óleo essencial obtido da madeira de *Cinnamodendron ekamani*, espécie da

mesma família da *C. dinisii*, verificaram a presença de 1,8-cineol (35,9%), α -humuleno (9,1%), β -cariofileno (6,5%), 4-terpineol (5,0%), germacreno-D (4,9%), β -elemeno (4,8%), α -pineno (3,6%) e α -terpineol (3,0%). Posteriormente Tucker et al. (2008), observaram a presença de 1,8-cineol (51,0%) e sabineno (10,6%) na composição química de um óleo essencial comercial de Madagascar, nomeado como mandravarotrota (*Cinnamosma fragrans* Baill., Canellaceae).

O óleo essencial das folhas de *Canella winterana* (L.) Gaertn. (Canellaceae), proveniente das ilhas de Abaco (Bahamas), apresentou um total de 19 compostos (100% da composição total), sendo os componentes majoritários o mirceno (32,4%), (E)-cariofileno (18,8%), (Z e E)- β -ocimeno (15,9% e 14,0%, respectivamente) (SETZER, 2007). A análise preliminar dos óleos essenciais de folhas e cascas de *Pleodendron costaricense* indicou que as composições dos óleos essenciais das duas partes analisadas da planta foram muito semelhantes, mostrando elevados teores de β -pineno, α -pineno, β -mirceno, β -tujeno, e β -cariofileno com uma menor quantidade de linalol. A principal diferença entre a composição volátil das duas partes da planta foi o conteúdo de β -cariofileno, que foi o segundo componente mais abundante nas folhas, mas quase ausente na casca (AMIGUET et al., 2006).

É necessário, porém, considerar que o ambiente no qual a planta se desenvolve exerce grande influência na composição química e produção dos óleos essenciais. Para Gobbo-Neto e Lopes (2007) os fatores bióticos (como insetos, fungos e herbívoros) e abióticos (como luminosidade e temperatura) também são os responsáveis pela variação, além da forma de obtenção e da parte da planta utilizada para a extração.

3.2.2 *Siparuna guianensis* Aublet

No óleo essencial das folhas frescas de *Siparuna guianensis* Aublet, foram identificados 41 constituintes (Tabela 3), sendo esse composto principalmente por sesquiterpenos hidrocarbônicos (41,50%), sesquiterpenos oxigenados (19,40%) e monoterpenos hidrocarbônicos (17,90%), respectivamente. Como majoritários foram identificados o monoterpeno acíclico, β -mirceno (13,14%) e os sesquiterpenos germacreno-D (8,68%) e biciclogermacreno (16,71%) (Figura 2).

Tabela 3 Composição química do óleo essencial das folhas frescas de *Siparuna guianensis*.

Pico	TR*	IRc**	Composto	%***
1	5,880	930	α -Pineno	1,83
2	6,218	938	Canfeno	0,04
3	7,042	963	β -Pineno	0,86
4	7,697	975	β-Mirceno	13,14
5	8,003	995	α -Felandreno	0,03
6	8,266	1000	δ -3-Careno	0,72
7	8,798	1005	β -Felandreno	0,06
8	8,887	1009	Limoneno	1,23
9	9,294	1017	cis- β -Ocimeno	0,03
10	19,874	1275	2-Undecanona	1,69
11	22,115	1332	δ -Elemeno	0,58
12	22,760	1345	α -Cubeno	0,04
13	23,804	1375	α -Copaeno	0,27
14	24,067	1379	β -Bourboneno	0,31
15	24,354	1385	β -Cubebeno (v)	0,18
16	24,459	1388	β -Elemeno	2,08
17	24,454	1414	β -Cariofileno	1,12
18	25,890	1426	γ -Elemeno	0,05
19	26,021	1428	β -Copaeno	0,04
20	26,496	1430	Aromadendreno	0,04
21	26,846	1447	α -Humuleno	2,07
22	27,118	1456	<i>allo</i> -Aromadendreno	0,05
23	28,055	1474	Germacreno-D	8,68

Tabela 3, continua...

Tabela 3, continuação

Pico	TR*	IRc**	Composto	%***
24	28,314	1476	β -Selineno	0,20
25	28,484	-	Curzereno	2,15
26	28,638	1487	Biclogermacreno	16,71
27	28,790	1494	α -Muuroleno	1,17
28	29,348	1500	γ -Cadineno	2,13
29	29,501	1505	<i>trans</i> -Calameno	0,29
30	29,780	1505	δ -cadineno	1,04
31	30,975	1533	Germacreno-B	2,34
32	31,353	1551	Espatuleno	4,16
33	32,868	1561	Óxido β -Cariofileno	0,45
34	32,035	1566	Globulol	0,40
35	32,263	1569	Viridiflorol	3,00
36	32,534	-	Epóxido de Humuleno II	0,63
37	33,333	1600	1-epi-Cubenol	0,15
38	34,089	1616	T-Cadinol	4,14
39	34,277	1620	β -Eudesmol	1,02
40	34,416	1626	α -Cadinol	1,95
41	35,840	1656	α -Bisabolol	3,53
Total identificado				80,48
Componentes agrupados				
Monoterpenos hidrocarbônicos				17,90
Monoterpenos oxigenados				0,00
Sesquiterpenos hidrocarbônicos				41,50
Sesquiterpenos oxigenados				19,40
Outros				1,70

*TR= tempo de retenção (minutos), **IRc = índice de retenção calculado, ***% =concentração em porcentagem, v = vestígios

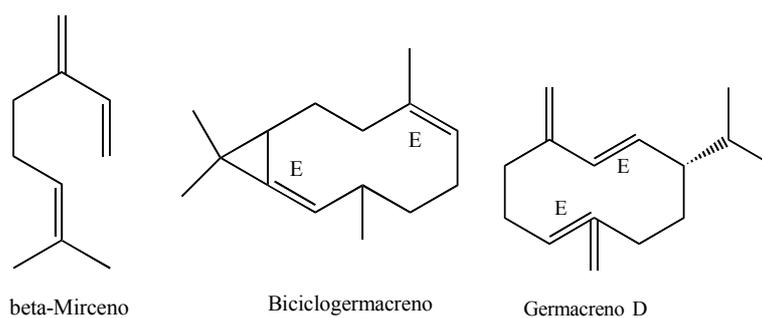


Figura 2 Estruturas químicas dos compostos majoritários presentes no óleo essencial das folhas frescas de *Siparuna guianensis*

Esses resultados corroboram com os resultados encontrados por Valentini et al. (2010), que quantificaram e identificaram os principais compostos químicos da composição volátil extraídos de folhas de *S. guianensis* numa área de Cerrado em Mato Grosso, durante doze meses. Verificaram que em relação à variabilidade das classes de compostos em questão, 70% dos compostos identificados eram sesquiterpenos e que os sesquiterpenos hidrocarbônicos apareceram no período chuvoso e de transição chuvoso-seco, com maior produção em fevereiro de 2008, mesmo mês de obtenção do óleo desse estudo.

Antônio et al. (1984) encontraram em folhas de *S. guianensis* do Panamá, curzeronona (25,64%), derivados de sua degradação (42,31%) e miristicina (7,93%). Nesse mesmo período, Rebouças et al. (1984), estudando o óleo essencial de *S. guianensis* de plantas coletadas em Rio Branco, Acre, observaram que os componentes majoritários do óleo essencial foram γ -cadineno (21,8%), bergamoteno (14,2%) e (E)- β -cariofileno (15,1%).

Posteriormente, Montanari (2010) observou que no óleo essencial de plantas coletadas no município de Tocantins (MG), dois constituintes, o monoterpeneo α -terpinoleno e o álcool sesquiterpênico α -bisabolol, representaram, em conjunto, cerca de 80% da composição do óleo durante todo o ano, resultados que divergem daqueles encontrados nesse trabalho onde apenas o α -bisabolol foi encontrado, porém em quantidades menores.

Os óleos essenciais de folhas e frutos de *S. guianensis* coletadas no cerrado do Sudeste brasileiro apresentaram como principais constituintes no óleo das folhas o ácido decanóico (46,6%) e 2-undecanona (31,7%), no óleo dos frutos foram encontrados principalmente a 2-undecanona (32,5%), β -pineno (19,6%) e limoneno (13,6%), resultados que diferem dos resultados encontrados nesse estudo (FISCHER et al., 2005).

Os óleos essenciais de *S. guianensis* obtidos de plantas coletadas em diferentes lugares da Amazônia apresentaram diferenças em sua constituição. No óleo essencial da amostra recolhida no Moju (PA), os principais constituintes foram o *epi- α* -bisabolol (25,1%) e espatulenol (15,7%), o óleo essencial da amostra recolhida no Rio Branco (AC) apresentou como majoritários o espatulenol (22,0%), selin-11-en-4 α -ol (19,4%), β -eudesmol (10,0%) e elemol (10,0%), já no óleo da amostra recolhida em Belém (PA) verificaram a presença de germacrona (23,2%), germacreno-D (10,9%), biciclogermacreno (8,6%), germacreno-B (8,0%) e atractilona (31,4%) como compostos majoritários (ZOGHBI et al., 1998). A composição química do óleo essencial avaliado nesse estudo apresentou semelhanças com o óleo da planta coletada em Belém (PA) quanto à presença dos majoritários germacreno-D e biciclogermacreno.

Machado et al. (1998) verificaram o (E)-nerolidol como composto majoritário do óleo essencial das folhas de *S. guianensis* coletadas em junho, durante a floração. Os autores observaram que o óleo essencial apresentou grande variação sazonal para o teor desse composto (9,9-30%) em relação aos meses do ano. Posteriormente, Viana et al. (2002), investigando os óleos essenciais obtidos das folhas, casca do caule, madeira do caule, casca da raiz, madeira de raiz e frutos de *S. guianensis*, encontraram a presença de α -pineno, mirceno, γ -cadineno, *epi- α* -cadinol em todas as amostras, observando que o componente majoritário era o *epi- α* -cadinol (11,9 - 39,9%) para todas as amostras, exceto para óleos das cascas e frutos, cujos maiores componentes foram o terpinoleno (33,4%) e 2-undecanona (52,7%), respectivamente. Não houve uma relação entre a composição química obtida no presente trabalho com a composição química das pesquisas apresentadas acima, destacando apenas a presença do mirceno que, no estudo de Viana et al. (2002), foi encontrado como um dos minoritários (1,47%).

Diferenças no teor e na composição química de óleos essenciais extraído de uma mesma espécie ocorrem frequentemente, uma vez que a produção de metabólitos secundários, entre eles os óleos essenciais, é fortemente influenciada pelo ambiente ao qual o organismo produtor está inserido, sendo os fatores responsáveis por tais variações a sazonalidade, ritmo circadiano, idade e o desenvolvimento da planta, bem como os diferentes órgãos vegetais, temperatura, disponibilidade hídrica, nutrientes, altitude, composição atmosférica e ataque de patógenos e herbívoros (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; BAKKALI et al., 2008).

3.3 Atividade antioxidante dos óleos essenciais

Pelo método β -caroteno/ácido linoleico, os óleos essenciais em estudo apresentaram pequena atividade antioxidante; porém, não forneceram valores de CI_{50} ($>300 \mu\text{g mL}^{-1}$) na faixa das concentrações avaliadas. Entre os padrões testados, o BHT ($CI_{50} > 25 \mu\text{g mL}^{-1}$) mostrou-se mais eficiente, seguido do timol ($CI_{50} 105,82 \mu\text{g mL}^{-1}$) e do ácido ascórbico ($CI_{50} 118,15 \mu\text{g mL}^{-1}$), respectivamente (Tabela 4).

Empregando a técnica do DPPH, não foi observada atividade antioxidante para os óleos essenciais em estudo, porém entre os padrões avaliados, o ácido ascórbico ($CI_{50} 44,36 \mu\text{g mL}^{-1}$) mostrou-se mais eficiente que o BHT ($CI_{50} 48,84 \mu\text{g mL}^{-1}$), seguido do timol ($CI_{50} > 300,00 \mu\text{g mL}^{-1}$) (Tabela 4).

Tabela 4 Atividade antioxidante dos óleos essenciais de *S. guianensis* e *C. dinisii* e dos padrões Timol, BHT e Ácido ascórbico pelo teste β -caroteno/ácido linoleico e pelo método de sequestro de radicais DPPH.

Métodos	β -caroteno/ácido linoleico	DPPH
Componentes	CI ₅₀ * ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CI ₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>C. dinisii</i>	> 300,00	NI**
<i>S. guianensis</i>	> 300,00	NI
BHT	< 25,00	48,84
Timol	105,82	> 300,00
Ácido Ascórbico	118,15	44,36

*CI₅₀ = Concentração de inibição de 50% **NI = não apresentou inibição na faixa das concentrações avaliadas

De acordo com os resultados apresentados, pode-se afirmar que os óleos essenciais ricos em terpenos apresentaram melhores valores para a atividade antioxidante perante o ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, uma vez que o método β -caroteno/ácido linoleico pode ser especialmente útil para as investigações de antioxidantes lipofílicos e é apropriado para a investigação da atividade antioxidante de óleos essenciais. Por outro lado, se compostos polares, como o ácido ascórbico, fossem testados apenas por ele, seriam considerados como antioxidantes fracos (KULISIC et al., 2004). Esse fato explica a menor eficiência do ácido ascórbico, quando comparado com o timol.

De acordo com Ruberto e Baratta (2000), em sistemas lipídicos, compostos fenólicos, são antioxidantes eficientes, assim, as moléculas de timol e carvacrol são, de fato, responsáveis pela atividade antioxidante de muitos óleos essenciais que os contêm e uma escassa atividade antioxidante é conferida para monoterpenos e sesquiterpenos hidrocarbônicos. Apenas três componentes monocíclicos, terpinoleno, α -terpineno e γ -terpineno, e em menor grau, sabineno (um bicíclico), mostram uma atividade considerável. A presença nestas

moléculas de grupos metileno fortemente ativado, segundo os autores, é, provavelmente, a razão para este comportamento.

Os resultados de Ruberto e Baratta (2000) possivelmente explicam a baixa atividade antioxidante dos óleos essenciais tanto de *C. dinisii*, por serem compostos por 87% de monoterpenos e sesquiterpenos hidrocarbônicos, como de *S. guianensis*, composto por 58,40% desse grupo de substâncias.

De acordo com Mata et al. (2007), a ausência de atividade antioxidante observada pelos compostos terpênicos no ensaio de redução do DPPH pode ser explicada pelo fato de eles não serem capazes de doar um átomo de hidrogênio, além da baixa solubilidade apresentada por esses compostos no meio reacional do ensaio, uma vez que esse teste utiliza o metanol ou o etanol como solvente. Assim, pode-se explicar o fato de os óleos essenciais deste estudo não apresentarem atividade antioxidante significativa, pois ambos os óleos são compostos em quase sua totalidade por monoterpenos e sesquiterpenos hidrocarbônicos. Para Viuda-Martos et al. (2009), os fatores citados podem ser considerados como a principal limitação desse ensaio para avaliar a atividade antioxidante de amostras lipofílicas, como muitos óleos essenciais.

Os valores maiores encontrados para os antioxidantes, ácido ascórbico e BHT, e para o padrão timol diante o ensaio de redução do DPPH, podem estar relacionados com o maior número de hidroxilas presentes em suas estruturas, uma vez que quanto maior o número delas na estrutura do composto antioxidante, mais moléculas de DPPH podem ser reduzidas e conseqüentemente ocorre um aumento da atividade antioxidante.

Apesar de os óleos essenciais avaliados nesta pesquisa não terem apresentado atividade antioxidante significativa, muitos óleos essenciais têm-se mostrado potencial antioxidante. A exemplo têm-se as pesquisas realizadas por Guimarães (2010), que investigando a atividade antioxidante dos óleos essenciais de *Lippia sidoides*, *Alomia fastigiata*, *Ocotea odorifera*, *Mikania*

glauca e *Cordia verbenacea*, e de seus constituintes majoritários, pelos métodos da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico; a formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e a redução do radical estável DPPH, verificou que o óleo essencial de *L. sidoides* mostrou maior atividade antioxidante, apresentando os menores valores de CI_{50} em todos os ensaios, sendo que a atividade antioxidante apresentada pelo óleo essencial de *L. sidoides* foi atribuída ao seu constituinte majoritário carvacrol, que também apresentou elevada atividade antioxidante, quando avaliado isoladamente. Foi observado também que há influência da metodologia utilizada sobre a atividade antioxidante apresentada para os diferentes óleos essenciais e compostos avaliados, evidenciando a importância da metodologia para a determinação desta atividade. Lima et al. (2012) observaram que os óleos essenciais de *Myristica fragrans* e *Salvia microphylla*, apresentaram potencial antioxidante pelo teste β -caroteno/ácido linoleico, com valores de CI_{50} 976 e 770 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Neste mesmo ano Andrade et al. (2012) verificaram que os óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale* apresentaram atividade antioxidante, pelo método β -caroteno/ácido linoleico, sendo que o óleo essencial de *C. nardus* (CI_{50} 20,65 $\mu\text{g mL}^{-1}$) apresentou-se mais eficiente, seguido de *Z. officinale* (CI_{50} 60,32 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e *C. zeylanicum* (CI_{50} 303,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$) respectivamente. Pelo teste do DPPH, foi observada atividade antioxidante apenas para *C. nardus* (CI_{50} 517,40 $\mu\text{g mL}^{-1}$), o que leva a sugerir que os constituintes responsáveis pelo maior efeito antioxidante dos óleos essenciais das espécies avaliadas apresentam caráter polar.

4 CONCLUSÃO

Os rendimentos dos óleos essenciais foram de 2,03% BLU para as folhas frescas de *C. dinisii* e 0,31% BLU para as folhas frescas de *S. guianensis*; o teor de umidade encontrado para as folhas frescas de *C. dinisii* foi de 60,67% e para as folhas frescas de *S. guianensis* foi 64,67%.

Os constituintes majoritários encontrados no óleo essencial das folhas frescas de *C. dinisii* foram o α -pineno (35,41%), β -pineno (17,81%), sabineno (12,01%) e biciclogermacreno (7,59%). No óleo essencial das folhas frescas de *S. guianensis*, foram identificados β -mirceno (13,14%), germacreno-D (8,68%) e biciclogermacreno (16,71%).

A atividade antioxidante apresentou-se baixa pelo teste β -caroteno/ácido linoleico e não foi evidenciada pelo teste do DPPH para ambos os óleos avaliados.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P.; ZANONI, T. A. Essential oil of plants from Hispaniola: 1- the volatile wood oil of *Cinnamodendron ekamani* (Canellaceae). **Moscoso**, 5, p. 154-158, 1989.
- AMIGUET, V. T. et al. Phytochemistry and antifungal properties of the newly discovered tree *Pleodendron costaricense*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 7, p. 1005-1009, July 2006.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- ANTÔNIO, T. M. et al. Composition of essential oil from the leaves of *Siparuna guianensis* (Monimiaceae). **Chemical Industries**, v. 14, p. 514-5, 1984.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, Ankeny, 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. 624 p.
- BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BLANK, A. F. et al. Influence of season, harvest time and drying on Java citronella (*Cymbopogon winterianus* Jowitt) volatile oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 557-64, out./dez. 2007.
- CASTELLANI, D.C. et al. Produção do óleo essencial em catuaba (*Trichilia catigua* A. Juss) e negramina (*Siparuna guianensis* Aubl.) em função da época de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, p. 62-65, 2006.
- FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Ateneu, 2000. Parte I, p. 2-7.

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 36-41, jul./dez. 2008.

FISCHER, D. C. H. et al. Essential oils from fruits and leaves of *Siparuna guianensis* (Aubl.) Tulasne from southeastern Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, v. 17, n. 1, p.101-102, Jan./Feb. 2005.

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

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, 2008.

GUIMARÃES, L. G. de L. **Óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Mikania glauca* Mart. e *Cordia verbenacea* D.C.:** identificação e quantificação química, caracterização das estruturas secretoras, atividades antioxidante e antibacteriana. 2010. 225 p. Tese (Doutorado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

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

LIMA, E. S.; ABDALLA, D. S. P. Peroxidação lipídica: mecanismos e avaliação em amostras biológicas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 37, n. 3, p. 293-303, jul./set. 2001.

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

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

LORENZI, H. **Árvores brasileiras:** manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 4. ed. Nova Odessa: São Paulo, 2002. v. 2.

MACHADO, S. M. F. et al. Seasonal variation of (E) Nerolidol in *Siparuna guianensis* Aublt. and ¹³C-NMR Spectral Assignments of (E)- and (Z)-Nerolidol. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. 6, p. 708-710, Nov./Dec. 1998.

MATA, A. T. et al. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as portuguese food spices. **Food Chemistry**, Oxford, v. 103, n. 3, p. 778-786, 2007.

MONTANARI, R. M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae**. 2010. 159 p. Tese (Doutorado em Agroquímica)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

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

OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

PEIXOTO, A. L.; BARROS, F. de. Canellaceae. In: JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO **Lista de espécies da flora do Brasil**. 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB111724>>. Acesso em: 12 out. 2011.

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, 2006.

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

REBOUÇAS, L.M.C. **Terpenos de *Siparuna guianensis*: aldeídos via epoxidação de duplas terminais**. 1984. 116p. Dissertação (Mestrado em Química)- Universidade Federal do Ceará. Faculdade de Química, Fortaleza, 1984.

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

SETZER, W. N. Chemical composition of the leaf essential oil of *Canella winterana* from Abaco Island, Bahamas, **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 10, n. 6, p. 475-479, Nov./Dec. 2007.

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

TEPE, B. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chemistry**, Princeton, v. 90, n. 3, p. 333-340, May 2005.

TORRES, E.; WISNIEWSKI, JR., A.; SIMIONATTO, E. L. Composição química dos componentes voláteis de *Capsicodendron dinisii* Schwancke (Canellaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 130-132, 2010.

TUCKER, A. O. et al. A commercial essential oil of *Mandravasarotra (Cinnamosma fragrans* Baill., Canellaceae) from Madagascar. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 20, n. 3, p. 259-260, 2008.

VALENTINI, C. M. A. et al. Variação anual do rendimento e composição química dos componentes voláteis da *Siparuna guianensis* Aublet. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 7, p. 1506-1509, 2010.

VALENTINI, C. M. A.; RODRIGUEZ-ORTIZ, C. E.; COELHO, M. F. B. *Siparuna guianensis* Aublet (negramina): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 12, n. 1, mar. 2010.

VIANA, F. A. et al. Essential oil of *Siparuna guianensis* Aublet from the Amazon Region of Brazil. **Journal of Essential Oil Research**, Oxford, v. 14, p. 60-62, Jan./Feb. 2002.

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

ZOGHBI, M. G. B. et al. Essential oils of *Siparuna guianensis* Aubl. **Journal of Essential Oil Research**, v. 10, n. 5, p. 543-6, Sep./Oct. 1998.

WANG, W. et al. Antioxidative activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to its main components. **Food Chemistry**, Princeton, v. 108, n. 3, p. 1019-1022, June 2008.

**CAPÍTULO 3: ATIVIDADE ANTIFÚNGICA, ANTIBACTERIANA E
TRIPANOCIDA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cinnamodendron dinisii*
Schwacke E *Siparuna guianensis* Aublet**

RESUMO

Os óleos essenciais têm apresentado atividade biológica e servem como uma fonte alternativa de agentes antimicrobianos e antiparasitários, uma vez que algumas drogas, atualmente empregadas para essa finalidade, têm promovido o surgimento de resistência por parte dos micro-organismos, apresentando vários efeitos colaterais ou eficácia limitada. Nesse contexto, este estudo foi realizado com o objetivo de determinar a atividade antibacteriana, antifúngica e tripanocida dos óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke e *Siparuna guianensis* Aublet. A obtenção do óleo essencial foi realizada a partir de folhas frescas, pela técnica de hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger modificado. A avaliação da atividade antibacteriana sobre bactérias patogênicas *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella Choleraesuis* e *Staphylococcus aureus* foi realizada pela técnica de difusão em cavidade em ágar e a atividade antifúngica sobre fungos filamentosos, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. carbonarius* e *Penicillium commune*, pela técnica de difusão em disco. A atividade tripanocida foi avaliada sobre formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, utilizando o método do MTT. Os dois óleos essenciais apresentaram pequeno efeito inibitório para bactérias, apresentando altos valores de CMI (125 – 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sendo as bactérias Gram negativas mais resistentes e efeito inibitório satisfatório para os fungos avaliados, com baixos valores de CMI (7,81 – 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A atividade tripanocida obtida foi de $\text{CI}_{50} = 282,93 \mu\text{g mL}^{-1}$, para óleo de *C. dinisii* e 209,30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para *S. guianensis*, valores elevados, não sendo consideradas substâncias promissoras no combate ao *T. cruzi*.

Palavras-chave: Óleos voláteis. Concentração Mínima Inibitória. Epimastigotas.

ABSTRACT

Essential oils have shown biological activity and serve as an alternative source of antimicrobials and antiparasitic, since some drugs currently used for this purpose, has promoted the emergence of resistance by microorganisms, with many side effects or limited efficacy. In that context, this study was conducted with the objective of determining the antibacterial, antifungal and trypanocidal activity of the essential oils of *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. The essential oil was obtained from fresh leaves, by the hydrodistillation technique using a modified Clevenger apparatus. The evaluation of the antibacterial activity against pathogenic bacteria *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella choleraesuis* and *Staphylococcus aureus* was conducted by the agar well diffusion technique and the antifungal activity on filamentous fungi, *Aspergillus flavus*, *A. niger*, *A. carbonarius* *Penicillium commune*, by the disk diffusion technique. The trypanocidal activity was evaluated on epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*, through the MTT method. The two essential oils presented little inhibitory effect for bacteria, presenting high MIC values (125-500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), the gram negative bacteria being more resistant and the inhibitory effect was satisfactory for the appraised fungi, with low MIC values (7.81-250 $\mu\text{g mL}^{-1}$). The trypanocidal activity obtained was $\text{IC}_{50} = 282.93 \mu\text{g mL}^{-1}$, for the *C. dinisii* oil and 209.30 $\mu\text{g mL}^{-1}$, for oil of *S. guianensis*, values high, not considered promising substances to combat *T. cruzi*.

Key words: Volatile oils. Minimum Inhibitory Concentration. Epimastigote.

1 INTRODUÇÃO

Pesquisas evidenciam cada vez mais a potencialidade de constituintes vegetais como agentes antimicrobianos capazes de serem aproveitados como fonte de compostos alternativos, eficientes e viáveis, para o alcance do controle do crescimento e da sobrevivência de micro-organismos nas mais variadas áreas, como na agricultura, na saúde humana, na alimentação, na cosmetologia, entre outras.

Entre os compostos que apresentam esse potencial antimicrobiano encontram-se os óleos essenciais, produtos voláteis sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas a partir da glicose, caracterizados pelo forte odor e por apresentarem composição complexa, podendo ser obtidos de diversas partes de plantas por meio de hidrostilação, arraste a vapor ou prensagem de pericarpos de frutos cítricos (DEWICK, 2002).

As bactérias são os principais micro-organismos envolvidos nos processos de contaminações de alimentos, pela sua diversidade e patogenicidade, e por atuarem sob numerosos tipos de substratos, sob diferentes faixas de temperatura e de pH, bem como de condições do meio ambiente, sendo responsáveis pelo maior número de surtos e de mortes, seja como causadoras de infecções, toxinoses ou toxinfecções. Em menores proporções os fungos também são micro-organismos responsáveis pelas DTAs, atuam em alimentos submetidos a condições de conservação e armazenamento inadequadas, produzindo micotoxinas e/ou causando deteriorações (SOUSA, 2003; JAY, 2005).

O uso indiscriminado de antibióticos para o controle desses micro-organismos tem levado ao surgimento de cepas resistentes a essas drogas; essa resistência vem se tornando cada vez mais grave, devido às dificuldades para se descobrirem e lançarem novos antimicrobianos, o que tem estimulado o

desenvolvimento de pesquisas em busca de novos compostos antimicrobianos sintéticos e/ou naturais, principalmente de origem vegetal (COWAN, 1999).

Outra doença que atualmente tem despertado grande interesse de muitos pesquisadores é a doença de Chagas, caracterizada por ser uma doença endêmica parasitária em países tropicais e subtropicais da América Latina, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, que afeta cerca de 10 milhões de pessoas em todo o mundo, sendo que cerca de 25-100 milhões de pessoas vivem em zonas de risco de infecção (SALOMON, 2012; WHO, 2010).

Com relação ao tratamento da doença de Chagas, nenhuma vacina foi descoberta e os tratamentos atuais utilizam o nifurtimox e benznidazol; porém, essas drogas são muitas vezes mal toleradas e apresentam sérios efeitos colaterais. Sendo utilizadas apenas na fase aguda da doença, podem ser ineficazes devido às diferenças de susceptibilidade das culturas de *T. cruzi* às drogas, e são inúteis na fase crônica da doença (SAÚDE-GUIMARÃES; FARIA, 2007; CAMPOS et al., 2009; DÍAZ-CHIGUER et al., 2012).

Assim, os óleos essenciais servem como uma fonte alternativa de agentes antimicrobianos contra patógenos causadores de doenças de origem alimentar ou micro-organismos deterioradores, e também surgem como promissores agentes anti-*T. cruzi*, abrindo perspectivas para a descoberta de drogas mais eficazes, de origem vegetal, para o tratamento de doenças parasitárias. Diante do exposto os objetivos desse estudo foram determinar a atividade antibacteriana, antifúngica e tripanocida dos óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke e *Siparuna guianensis* Aublet.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Óleos essenciais

As extrações dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais da Universidade Federal de Lavras.

2.1.1 Obtenção do material vegetal

As folhas de *Cinnamodendron dinisii* e de *Siparuna guianensis* foram coletadas no mês de fevereiro de 2011, no período da manhã, no Horto de Plantas Medicinais da UFLA e nas dependências do *campus* da UFLA, respectivamente. O local de coleta de *C. dinisii* possui as seguintes coordenadas: -21° 13' 49.0476" latitude, -44° 58' 27.4764" longitude e 933m de altitude, e o local de coleta de *S. guianensis*: -21° 13' 41.9952" latitude, -44° 58' 9.0048" longitude e 951m de altitude.

O material coletado foi encaminhado para o Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA) Lavras/MG, onde foram selecionadas folhas adultas, sadias com ausência de injúrias e manchas provocadas por fitopatógenos, insetos ou insolação. O material vegetal foi devidamente acondicionado e mantido sobre refrigeração ($\approx 7^\circ\text{C}$), até a extração dos óleos essenciais.

As espécies foram devidamente identificadas pela Profª. Dra. Mariana Esteves Mansanares (Departamento de Biologia/UFLA), e uma exsicata de cada espécie encontra-se registrada no Herbário ESAL, localizado no Departamento de Biologia da UFLA, com os seguintes números de registros: 26.285 (*Cinnamodendron dinisii* Schwacke) e 26.623 (*Siparuna guianensis* Aublet).

2.1.2 Extração do óleo essencial

O método de extração foi o de hidrodestilação, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000).

Foram feitas três repetições da extração de cada planta, utilizando 300 gramas de folhas frescas e picadas para cada repetição, destilando-se por 2 horas. Decorrido esse tempo, o óleo foi separado do hidrolato por centrifugação utilizando uma centrífuga de bancada de cruzeta horizontal (Fanem Baby®I Modelo 206 BL) a 1100 g por 5 min. O óleo foi retirado com o auxílio de uma pipeta de Pasteur, acondicionado em frasco de vidro e armazenado sob refrigeração (4 °C) e ao abrigo da luz (GUIMARÃES et al., 2008).

2.2 Avaliação da atividade tripanocida *in vitro*

Esse teste foi realizado no Instituto Carlos Chagas (Fiocruz) - Curitiba. Inicialmente os óleos essenciais foram diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), e posteriormente, em meio Liver Infuse Tryptose (LIT). Fez-se diluição seriada com LIT, em uma placa para microtitulação tipo ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) de 96 poços, a partir da maior concentração, diluindo 1:1 nos demais poços atingindo volume final de 20 µL para cada poço e concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,90 µg mL⁻¹. Realizada a diluição, foi adicionado 180 µL de cultura (epimastigotas) a uma concentração de 2 x 10⁶ parasita mL⁻¹ (com contagem em câmara de Neubauer), em cada poço. Nos poços controle foram adicionados 20 µL de meio de cultura sem compostos. A placa foi incubada por 24 horas a 28 °C.

Após o período de incubação, foram acrescentados 50 µL de MTT [(solubilizado a 10 µg mL⁻¹ em PBS (tampão fosfato)] em todos os poços

(concentração final: $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ por poço). A placa, envolvida em papel-alumínio, foi incubada por 3 horas a 37°C (MOSMANN, 1983).

Após a segunda incubação, adicionaram-se em cada poço $50 \mu\text{L}$ de paraformaldeído 4% em PBS pH 7,2. Posteriormente, a placa foi centrifugada a 2100g por 10 min. Após a centrifugação o meio foi removido por inversão brusca da placa e os parasitas foram ressuspensos. Acrescentaram-se $20 \mu\text{L}$ de dodecilsulfato de sódio (SDS) 10% em HCl $0,01 \text{ M}$ e incubou-se a placa a 37°C por 1h, ou até observação de lise de todos os parasitas. Após, a adição de $80 \mu\text{L}$ de dimetilsulfóxido (DMSO) puro em todos os poços para solubilização dos cristais de formazan, as placas foram incubadas à 37°C por 30 minutos, seguida de agitação até solubilização completa dos cristais. A leitura foi efetuada a 550 nm em leitor de ELISA. A porcentagem de células epimastigotas inviáveis foi determinada pela equação:

$$\%IE = [100 (A_c - A_a)]/A_c$$

Em que:

%IE: Porcentagem de células epimastigotas inviáveis;

A_c : absorvância do controle;

A_a : absorvância da amostra analisada.

2.2.1 Análise estatística

Foi utilizado o delineamento DIC, com 8 concentrações e 3 repetições para cada óleo. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR (FERREIRA, 2008). Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias obtidas foram submetidas à regressão e também foram comparadas pelo teste Scott-Knott, ambos a 5% de probabilidade.

As equações ajustadas foram utilizadas para calcular a CI_{50} e foram plotados gráficos com os valores de %IE *versus* as concentrações analisadas, empregando o software Origin 6.0.

2.3 Avaliação da atividade antibacteriana *in vitro*

A avaliação da atividade antibacteriana dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Micologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

As bactérias utilizadas foram *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Escherichia coli* ATCC 11229, *Salmonella Cholerasuis* ATCC 6539 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 15442.

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

2.3.1 Teste de Difusão em Cavidade em Ágar

As bactérias foram repicadas em caldo BHI (Brain Heart Infusion), e ficaram incubadas a 37 °C por 24 horas. Posteriormente, alíquotas desse meio foram transferidas para um tubo com 5 mL de caldo de soja triptica (TSB). Os tubos foram incubados a 37 °C, até alcançar a turbidez de uma solução-padrão McFarland de 0,5, resultando em uma suspensão contendo 10^8 UFC mL⁻¹. As leituras de turbidez foram realizadas utilizando espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1 PC), no comprimento de onda de 625 nm (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 ágar de soja triptica (TSA), para

Listeria monocytogenes, e para as demais bactérias, foi utilizado o Ágar Mueller - Hinton. O ágar no qual foi inoculada a cultura bacteriana foi depositado sobre uma camada do mesmo ágar, previamente solidificado, onde foram feitos os poços de deposição do óleo (4 mm de diâmetro) com o auxílio de pérolas de vidro. Esses foram preenchidos com 10 µL das concentrações (500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,90 µg mL⁻¹) do óleo essencial diluídos em DMSO. As placas foram incubadas em BOD 37°C por 24 horas e medidos os diâmetros dos halos de inibição formados. Foram realizadas três repetições para cada tratamento e uma testemunha relativa com a aplicação de 10 µL de DMSO (LIMA et al., 2012). Utilizou-se uma solução de 100 µg mL⁻¹ do antibiótico cloranfenicol (CL), como padrão para avaliar a sensibilidade das bactérias.

O halo de inibição de crescimento foi medido partindo-se da circunferência do poço, até a margem onde houve crescimento de micro-organismos. A partir dos diâmetros obtidos, que evidenciaram a sensibilidade do micro-organismo, pode-se avaliar o perfil de sensibilidade das bactérias em diferentes concentrações dos óleos essenciais. A concentração mínima inibitória (CMI) foi definida como a menor concentração de óleo essencial em que ocorreu à presença de halo de inibição.

2.3.2 Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata, obtendo os valores médios dos halos de inibição em cada concentração. O delineamento empregado foi o DIC, para cada bactéria, com 8 concentrações e 3 repetições, por óleo, sendo os diâmetros dos halos de inibição submetidos à análise de variância, e as médias, comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o Programa SISVAR (FERREIRA, 2008).

2.4 Avaliação da atividade antifúngica *in vitro*

A avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais foi realizada no Laboratório de Micologia de Alimentos do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras.

Os fungos utilizados foram *Aspergillus flavus*, *Aspergillus carbonarius*, *Aspergillus niger* e *Penicillium comune*.

Durante o experimento, as culturas foram mantidas em tubos contendo meio Agar Czapek Dox à temperatura de 28 °C. Após a cultura atingir toda a extensão do meio, foi coberta com óleo mineral esterilizado e o frasco foi tampado com uma tampa de borracha. As culturas foram conservadas à temperatura ambiente e foram repicadas em meio de Czapeck Dox, 7 dias antes de serem utilizadas (TANIWAKI; FONSECA; PIZZIRANI-KLEINER, 1993).

2.4.1 Teste de difusão em disco

Para o efeito inibitório de fungos filamentosos, foi utilizado o teste de difusão em disco, aceito pelo Food and Drug Administration (FDA) e estabelecido como padrão pelo National Committee for Clinical Laboratory Standards (NCCLS) (BARRY; THORNSBERRY, 1991). Para tal, foi utilizado um inóculo na concentração de 10^6 esporos mL^{-1} , com contagem em câmara de Neubauer. Posteriormente, esse inóculo foi transferido para a placa contendo meio Malt Extract Agar (MEA) pela técnica de espalhamento em superfície. Discos de papel de filtro de 4 mm de diâmetro embebidos com 10 μL dos óleos nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,90 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram colocados sobre o meio de cultura. O controle negativo foi realizado por meio de discos impregnados com 10 μL de DMSO. Utilizou-se uma solução de 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de hipoclorito de sódio, como padrão para avaliar a sensibilidade dos

fungos. As placas foram incubadas em BOD a 25 °C, por um período de 72 horas.

O halo de inibição de crescimento foi medido partindo-se da circunferência do disco, até a margem onde houve crescimento de microorganismos. Realizaram-se medições ortogonais do diâmetro, tendo cada medição correspondido à média de duas medidas diametralmente opostas (ZACARONI et al., 2009). A CMI foi definida como a menor concentração de óleo essencial, na qual se identificou a presença de halo de inibição.

2.4.2 Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata, obtendo os valores médios dos halos de inibição em cada concentração. O delineamento empregado foi o DIC, para cada fungo, com 8 concentrações e 3 repetições, por óleo, sendo, os diâmetros dos halos de inibição submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o Programa SISVAR (FERREIRA, 2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade tripanocida dos óleos essenciais

Observa-se que os óleos essenciais apresentaram efeito inibitório sobre *T. cruzi*, pois ocorreu um aumento da inviabilidade das células epimastigotas com o aumento da concentração de ambos os óleos essenciais avaliados, após 24 horas de tratamento (Tabela 1), sendo uma melhor atividade obtida com *S. guianensis* (CI₅₀ 209,30 µg mL⁻¹), seguido de *C. dinisii* (CI₅₀ 283,93 µg mL⁻¹), uma vez que quanto menor o valor de CI₅₀ mais ativo é o composto frente ao parasita.

Tabela 1 Atividade tripanocida dos óleos essenciais de *S. guianensis* e *C. dinisii* sobre a forma epimastigota.

Concentração (µg mL ⁻¹)	Células epimastigotas inviáveis (%)	
	<i>S. guianensis</i>	<i>C. dinisii</i>
3,53	0,36 a	3,37 a
7,81	2,10 a	8,39 b
15,62	9,50 b	10,57 c
31,25	21,73 c	13,22 c
62,50	25,34 c	15,04 c
125,00	45,80 d	24,78 d
250,00	84,28 e	36,89 e
500,00	86,81 e	87,96 f
CI₅₀ (µg mL⁻¹)*	209,30	282,93

* CI₅₀ = Concentração que causa lise ou morte de 50% dos *T. cruzi* na forma epimastigota. **Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra são iguais entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Relatos da atividade tripanocida do óleo essencial extraído das folhas de *C. dinisii* e *S. guianensis* não foram obtidos após revisão da literatura. O extrato de diclorometano da casca de *Warburgia salutaris*, espécie pertencente à mesma família de *C. dinisii*, exibiu boa atividade antitripanosomal, com um valor de CI_{50} de $10,68 \mu\text{g mL}^{-1}$ (NIBRET et al., 2010), valor esse 20 vezes menor que o encontrado nesse estudo para o óleo essencial de *C. dinisii*. Tempone et al. (2005), avaliaram a atividade tripanocida dos extratos etanólicos das folhas de *S. guianensis* e observaram 100% de mortalidade de tripomastigotas a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$, valor não condizente com o encontrado nessa pesquisa, mostrando que o óleo essencial foi pouco eficiente contra *T. cruzi*.

Óleos essenciais, bem como os seus componentes têm sido descritos como possuidores de um amplo espectro de efeitos farmacológicos, e também se destacam por apresentarem importantes atividades biológicas contra tripanosomatídeos como *Trypanosoma brucei* (OTOGURO et al., 2011), a *Leishmania* (OLIVEIRA et al., 2009) e *T. cruzi* (SANTORO et al., 2007a; b; c; BORGES et al., 2012).

A atividade tripanocida contra *T. cruzi* foi atribuída, por Santoro et al. (2007c), ao terpeno oxigenado, citral (mistura isomérica de geranial e neral), do óleo volátil de *Cymbopogum citratus*. Os autores afirmam que essa atividade é causada por um processo de ruptura da parede da célula, com o extravasamento do citoplasma e do núcleo do parasita. Apesar de serem encontrados em menor proporção no óleo de *C. dinisii* (12% de mono e sesquiterpenos oxigenados) e *S. guianensis* (19,40% de sesquiterpenos oxigenados) é provável que esses compostos estejam relacionados com a atividade desses óleos essenciais, em um comportamento sinérgico.

De acordo com Borges et al. (2012) a atividade contra tripanosomatídeos se dá principalmente devido a composição terpênica dos óleos essenciais, que é a responsável pelo caráter hidrofóbico desses compostos,

tornando possível a penetração desses nas membranas celulares do parasita, afetando as vias metabólicas ou organelas citoplasmáticas. Além disso, óleos essenciais também podem interagir com a membrana do parasita e causar drásticas alterações fisiológicas que conduzem à perda da permeabilidade da membrana que em última instância conduzem à morte celular (BAKKALI et al., 2008). Porém, devido ao grande número de componentes e as interações sinérgicas ou antagonistas existentes entre eles, é provável que os óleos essenciais tenham outros alvos celulares além das membranas celulares.

3.2 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais

Os valores das concentrações mínimas inibitórias (CMI) dos óleos essenciais obtidos para as bactérias em estudo estão expressos na Tabela 2.

Tabela 2 Concentração mínima inibitória (CMI) e diâmetros dos halos de inibição causados pelos óleos essenciais de *S. guianensis* (SG) e *C. dinisii* (CD) e pelo cloranfenicol (CL) à 100 µg mL⁻¹ para as bactérias avaliadas.

Bactéria	Gram	CMI (µg mL ⁻¹)		Halo de inibição (mm)		
		SG	CD	SG	CD	CL
<i>S. aureus</i>	+	125,00	250,00	5,30	5,30	25,20
<i>L. monocytogenes</i>	+	250,00	500,00	6,00	5,60	23,50
<i>E. coli</i>	-	500,00	NI	5,30	-	14,80
<i>P. aeruginosa</i>	-	NI*	500,00	-	6,00	20,00
<i>S. Cholerasuis</i>	-	NI	NI	-	-	18,90

*NI: não ocorreu inibição.

Verifica-se que os óleos essenciais estudados apresentaram pequeno efeito inibitório (125,00 – 500,00 $\mu\text{g mL}^{-1}$), apresentando altos valores de CMI, para bactérias Gram-positivas e negativas, ou nenhuma inibição para bactérias Gram-negativas. É possível observar que os micro-organismos testados foram menos sensíveis ao óleo essencial de *C. dinisii* nas concentrações avaliadas, que as bactérias Gram-positivas foram mais susceptíveis aos óleos essenciais, e que, todas as bactérias avaliadas foram sensíveis ao cloranfenicol 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

A maior susceptibilidade das bactérias Gram-positivas frente aos óleos essenciais do que as bactérias Gram-negativas tem sido observada em vários estudos, como os desenvolvidos por Tepe et al. (2005). Esses, avaliando a atividade antibacteriana do óleo essencial de *Salvia tomentosa*, observaram a ausência de atividade desse óleo sobre os micro-organismos Gram-negativos estudados, *E. coli*, *Proteus mirabilis* e *P. aeruginosa*. A bactéria Gram-negativa *E. coli*, foi o micro-organismo mais resistente à ação desses óleos essenciais. Guimarães (2010), avaliando a atividade bacteriana de 5 óleos essenciais sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, observou que a bactéria Gram-positiva *Clavibacter michiganensis* foi a mais sensível perante a ação deles. Posteriormente, Lima et al. (2012) avaliando o efeito inibitório dos óleos essenciais de *Myristica fragrans* e *Salvia microphylla* sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, também observaram maiores efeitos dos mesmos sobre as bactérias Gram-positivas. Andrade et al. (2012) investigando a atividade bacteriana do óleo essencial de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale* sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, encontraram maior atividade sobre bactérias Gram-positivas, sendo necessárias doses mais elevadas para causar efeito sobre as bactérias Gram-negativas.

De acordo com Burt (2004), bactérias Gram-negativas possuem uma membrana externa, a qual faz com que elas tenham uma superfície hidrofílica

devido à presença de moléculas de lipopolissacarídeos. 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.

Porém, pequenos solutos hidrofílicos são capazes de passar por essa membrana externa, por meio de poros hidrofílicos formados por canais de proteínas de membranas, justificando a atividade antibacteriana sobre bactérias Gram-negativas apresentadas por compostos, como o carvacrol (HELANDER et al., 1998).

O gênero *Siparuna* e a espécie *S. guianensis* são amplamente citados na literatura etnofarmacológica por suas diversas aplicações medicinais (VALENTINI; RODRIGUEZ-ORTIZ; COELHO, 2010), porém, apenas as atividades antiplasmodial e leishmanicida de extratos das folhas de *S. aspera* e *S. radiata* (CÉLINE et al., 2009), *S. andina*, *S. pauciflora* e *S. tonduzian* (JENETT-SIEMS et al., 1999) foram experimentalmente verificadas. Montanari (2010) avaliou a atividade do óleo essencial de *S. guianensis* sobre as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, e *Escherichia coli*. O autor observou que o óleo essencial inibiu o crescimento das bactérias testadas em concentrações relativamente baixas (8 – 63 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Esses resultados estão de acordo com aqueles obtidos nesse estudo uma vez que também foi verificada atividade inibitória para *S. aureus*, e *E. coli*, porém em concentrações maiores.

Para espécies da família Canellaceae, são citadas as atividades citotóxicas de extratos de *Warburgia salutaris* (GREEN et al., 2010), antifúngicas do óleo essencial de *Pleodendron costaricense* (AMIGUET et al., 2006); atividade antiplasmodica, citotóxica, antibacteriana e antifúngica de extratos de *Warburgia ugandensis* (OPIYO et al., 2011; LACROIX et al., 2011); a atividade citotóxica contra o carcinoma Eagle's 9KB e frente à cultura celular

de carcinoma de nasofaringe do extrato clorofórmico de *C. dinisii* (MAHMOUD et al., 1980 citado por TORRES; WISNIEWSKI JR; SIMIONATTO, 2010).

Os sesquiterpenos drimânicos, característicos da família Canellaceae, são uma classe de hidrocarbonetos saturados derivados do álcool sesquiterpênico drimenol. Jansen e Groot (2004) mostraram que diversas atividades biológicas como bactericida, antifúngica, controlador do crescimento de plantas, citotóxica, fitotóxica e efeito piscicida podem ser atribuídas aos sesquiterpenos drimânicos. Nesse trabalho apenas o drimenol foi encontrado no óleo essencial com um teor de 0,20%, que é um valor baixo para provocar alguma atividade. Moorey e Canillac (2002) avaliaram a atividade bacteriostática e bactericida dos monoterpenos α e β -pineno, (R e S)-limoneno, 1,8-cineol e borneol frente à *Listeria monocytogenes*. Observaram que α -pineno foi o componente mais ativo com uma CMI de 0,019% sobre esse micro-organismo. Possivelmente a atividade antibacteriana do óleo de *C. dinisii* frente à *L. monocytogenes* pode estar relacionada com a presença do α -pineno em alto teor (35,41%) no óleo essencial em estudo.

Os óleos essenciais de *C. dinisii* e *S. guianensis* mostraram-se ricos em hidrocarbonetos monoterpênicos e sesquiterpênicos. Como eles são hidrofóbicos, segundo Burt (2004), esses compostos provavelmente deslocam-se da fase aquosa em direção às estruturas da membrana, causando efeitos tóxicos à estrutura e à função da membrana celular. De acordo com Sikkema, Bont e Poolman (1994), devido às características lipofílicas, os monoterpenos e sesquiterpenos possuem maior afinidade com a parte interna das membranas do que com a fase aquosa que as envolve, explicando, assim, a maior afinidade desses compostos pelo interior das membranas celulares resultando na expansão dessas, aumentando a sua fluidez e alterando a atividade de proteínas que as compõem.

Os óleos essenciais tornam as membranas celulares permeáveis a compostos que normalmente não são capazes de passar por membranas normais, promovem a perda de material eletro-denso pela membrana, alteração na densidade citoplasmática e coagulação de alguns constituintes do citoplasma. Esses danos levam ao comprometimento das suas funções, o que pode ocasionar a morte da célula bacteriana (GUSTAFSON et al., 1998; COX; MANN; MARKHAM, 2001).

A técnica de difusão em ágar é a mais utilizada entre as várias técnicas de determinação de atividade antimicrobiana de óleos essenciais. Por meio dela 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 (MONDELLO et al., 2003; KALEMBA; KUNICKA, 2003).

Apesar de os óleos essenciais apresentarem dificuldade de 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 (LAMBERT et al., 2001; INOUYE et al., 2006).

3.3 Atividade antifúngica dos óleos essenciais

Na Tabela 3 estão expressos os valores das concentrações mínimas inibitórias (CMI) dos óleos essenciais obtidos para os fungos em estudo.

Tabela 3 Concentração mínima inibitória (CMI) e diâmetros dos halos de inibição causados pelos óleos essenciais de *S. guianensis* (SG) e *C. dinisii* (CD) e pelo hipoclorito de sódio (HP) à 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os fungos avaliados.

Fungos	CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		Halo de inibição (mm)		
	SG	CD	SG	CD	HP
<i>A. Flavus</i>	7,81	125,00	6,70	6,30	25,70
<i>A. carbonarius</i>	125,00	250,00	7,00	6,30	17,20
<i>A. niger</i>	31,25	62,50	6,00	6,00	19,20
<i>P. comune</i>	31,25	31,25	7,00	6,70	31,00

É possível observar que os óleos foram ativos para todos os fungos avaliados apresentando efeito inibitório satisfatório (7,81 -250 $\mu\text{g mL}^{-1}$), sendo que o óleo essencial de *S. guianensis* mostrou-se mais eficiente, apresentando menores valores de CMI. A espécie *A. flavus* apresentou maior sensibilidade frente ao óleo de *S. guianensis* e o *P. comune* frente ao óleo de *C. dinisii*, enquanto *A. carbonarius* foi à espécie fúngica mais resistente frente a ambos os óleos avaliados. Todos os micro-organismos apresentam sensibilidade frente ao hipoclorito de sódio 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Não há consenso sobre o nível de inibição aceitável para produtos naturais. Aligianis et al. (2001), estabeleceram uma classificação para esses produtos, com base nos resultados de CMI; inibição forte (CMI até 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$), inibição moderada (CMI entre 600 e 1.500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e inibição fraca (CMI acima de 1.600 $\mu\text{g mL}^{-1}$). De acordo com os resultados da Tabela 3, os dois óleos avaliados podem ser considerados fortes inibidores, uma vez que apresentaram ação inibitória em todos os micro-organismos testados, com valores abaixo de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Montanari (2010) demonstrou que o óleo de *S. guianensis* inibiu o crescimento de *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans*, *Trychophyton*

rubrum e *Aspergillus fumigatus* em concentrações reduzidas, principalmente para o fungo *C. neoformans* ($16 \mu\text{g mL}^{-1}$). Amiguet et al. (2006) avaliando propriedades antifúngicas do óleo essencial de *Pleodendron costaricense* (Canellaceae), que apresenta como compostos majoritários o α -pineno, β -pineno, β -mirceno, β -tujeno, e β -cariofileno, observaram uma elevada atividade contra *Alternaria alternata*, *Candida albicans* e *Wangiella dermatitidis*. Opiyo et al. (2011) observaram atividade antifúngica dos extratos de *Warburgia ugandenses* (Canellaceae), sendo que a CMI para os fungos variou entre $12,5$ e $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, com os menores valores de CMI para *Fusarium solani* e *Aspergillus niger*. Apesar de serem outras espécies fúngicas, e no caso de *C. dinisii* outras plantas pertencentes à mesma família (Canellaceae), os resultados das pesquisas apresentadas acima corroboram com os resultados obtidos nesse estudo, no que diz respeito ao potencial antifúngico satisfatório para ambas as espécies estudadas.

A atividade antifúngica dos óleos essenciais são muito documentadas, como descrito nas pesquisas de Guimarães et al. (2011). Os autores verificaram que o óleo essencial de *C. citratus* e seu constituinte majoritário, o citral, apresentaram uma maior atividade sobre o fitopatógeno *Alternaria alternata*. Andrade et al. (2011), observaram efeito inibitório satisfatório do óleo essencial de *Pelargonium odoratissimum* sobre o crescimento de *Aspergillus flavus*, *A. carbonarius* e *A. parasiticus*. No mesmo ano, Freire et al. (2011), avaliando a atividade antifúngica de *Origanum majorana*, *Illicium verum* e *C. zeylanicum* sobre os mesmos fungos, também verificaram efeito inibitório satisfatório na inibição do crescimento micelial desses micro-organismos. Posteriormente Vieira et al. (2012) avaliaram o efeito fungitóxico do óleo essencial das folhas e do caule do mentrasto sobre os fitopatógenos *A. alternata*, *Colletotrichum gloesporioides*, *Fusarium oxysporum cubense*, *Bipolaris sorokoniana* e *Rizoctonia solani*. Os resultados mostraram que o óleo essencial inibiu

completamente o fitopatógeno *Rizoctonia solani* e o *Bipolaris sorokoniana* nas concentrações de 0,09 e 0,10 mg mL⁻¹, respectivamente, enquanto que para os demais fungos ocorreu inibição completa do crescimento micelial em concentrações superiores.

O mecanismo de ação inibitória dos óleos essenciais sobre fungos, assim como sobre bactérias, está baseado na sua lipofilicidade, uma vez que qualquer ação que interfira na composição ou arranjo tridimensional na membrana plasmática celular microbiana estará tornando-a desprovida de uma estrutura essencial ao equilíbrio homeostático, condição fundamental para o seu ótimo funcionamento fisiológico. Assim, qualquer alteração na estrutura celular pode vir a tornar o ambiente microbiano intracelular incompatível com a sua sobrevivência (SOUZA; LIMA; NARAIN, 2003).

Além disso, nas membranas dos fungos está presente o ergosterol, que se apresenta como modulador de fluidez da membrana fúngica. Quimicamente, classifica-se como um esteroide de membrana, é altamente lipofílico, e qualquer ação sobre esse elemento por parte dos óleos essenciais desencadeia um desequilíbrio na fluidez da membrana plasmática dos fungos, levando a alterações na homeostase intracelular (SOUZA; LIMA; NARAIN, 2003).

4 CONCLUSÃO

A atividade tripanocida para formas epimastigotas obtida foi de $CI_{50} = 282,93 \mu\text{g mL}^{-1}$ para óleo de *C. dinisii* e $209,30 \mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. guianensis*, valores considerados elevados.

Os óleos essenciais de *C. dinisii* e *S. guianensis* apresentaram pequeno efeito inibitório para as bactérias, apresentando altos valores de CMI ($125 - 500 \mu\text{g mL}^{-1}$), ou nenhuma inibição, principalmente para Gram-negativas. Os micro-organismos testados foram menos sensíveis ao óleo essencial de *C. dinisii* nas concentrações avaliadas.

Os óleos essenciais de *C. dinisii* e *S. guianensis* apresentaram efeito inibitório satisfatório para os fungos avaliados, com baixos valores de CMI ($7,81 - 250 \mu\text{g mL}^{-1}$). Nas concentrações avaliadas, os micro-organismos testados foram menos sensíveis ao óleo essencial de *C. dinisii*.

REFERÊNCIAS

- 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.
- AMIGUET, V. T. et al. Phytochemistry and antifungal properties of the newly discovered tree *Pleodendron costaricense*. **Journal of Natural Products**, v. 69, n. 7, p. 1005-1009, July 2006.
- ANDRADE, M. A. et al. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oil of *Pelargonium odoratissimum*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Curitiba, v. 21, n. 1, p. 47-52, 2011.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, Ankeny, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.
- BARRY, A. L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: diffusion test procedures. In: BALOWS, A. et al. **Manual of clinical microbiology**. 5. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. p. 1117-1125.
- BORGES, A. R. et al. Trypanocidal and cytotoxic activities of essential oils from medicinal plants of Northeast of Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 2, p. 123-128, July 2012.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods — a review. **International Journal of Food Microbiology**, Torino, v. 94, n. 3, p. 223-253, Aug. 2004.
- CAMPOS, F. M. F. et al. Characterization of a gene encoding alcohol dehydrogenase in benzimidazole-susceptible and -resistant populations of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 111, n. 1, p. 56–63, July 2009.
- CÉLINE, V. et al. Medicinal plants from the Yanesha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 123, n. 3, p. 413-422, 2009.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiological Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 564-82, Oct. 1999.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L. Interactions between components of the essential oil of *Melaleuca alternifolia*. **Journal of Applied Microbiology**, New York, v. 91, n. 3, p. 492- 497, Sept. 2001.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 3th ed. Chichester: J. Wiley, 2002. 520 p.

DÍAZ-CHIGUER, D. L. et al. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of some benzimidazole derivatives against two strains of *Trypanosoma cruzi*. **Acta Tropica**, v. 122, n. 1, p. 108-112, Apr. 2012.

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

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 36-41, jul./dez. 2008.

FREIRE, J. M. et al. Essential oil of *Origanum majorana* L., *Illicium verum* Hook. f. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume: chemical and antimicrobial characterization. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 209-214, 2011.

GREEN, E. et al. Inhibitory properties of selected South African medicinal plants against *Mycobacterium tuberculosis*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 130, n. 1, p. 151-157, July 2010.

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

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, 2008.

GUIMARÃES, L. G. L. **Óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Mikania glauca* Mart. e *Cordia verbenacea* D.C.:** identificação e quantificação química, caracterização das estruturas secretoras, atividades antioxidante e antibacteriana. 2010. 225 p. Tese (Doutorado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras 2010.

GUSTAFSON, J. E. et al. Effects of tea tree oil on *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology*, Oxford, v. 26, n. 3, p. 194-198, Mar. 1998.

HELANDER, I. K. et al. Characterization of the action of selected essential oil components on gram-negative bacteria. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Dublin, v. 46, n. 11, p. 3590-3595, Nov. 1998.

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.

JANSEN, B. J. M.; GROOT, A. de. Occurrence, biological activity and synthesis of drimane sesquiterpenoids. **Natural Products Reports**, v. 21, p. 449-477, 2004.

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

JENETT-SIEMS, K. T. et al. *In vitro* antiplasmodial activity of Central American medicinal plants. **Tropical Medicine and International Health**, v. 4, n. 9, 611-615, 1999.

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

LACROIX, D. et al. Antiplasmodial and cytotoxic activities of medicinal plants traditionally used in the village of Kiohima, Uganda. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, n. 2, p. 850-855, Jan. 2011.

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

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

MONDELLO, F. et al. *In vitro* and *in vivo* activity of tea tree oil against azolesusceptible and resistant human pathogenic yeasts. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 51, n. 5, p. 1223-1229, Mar. 2003.

MONTANARI, R. M. **Composição química e atividades biológicas dos óleos essenciais de espécies de Anacardiaceae, Siparunaceae e Verbenaceae**. 2010. 159 p. Tese (Doutorado em Agroquímica)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2010.

MOOREY, A.; CANILLAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control**, Guildford, v. 13, n. 4/5, p. 289-292, May 2002.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

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

NIBRET, E. et al. Screening of some tanzanian medicinal plants for their trypanocidal and cytotoxic activities, **Phytotherapy Research**, v. 24, n. 6, p. 945-947, June 2010.

OLIVEIRA, V. C. et al. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham. and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitology Research**, v. 104, n. 5, p. 1053-1059, 2009.

OPIYO, S. A. et al. 7 α -Acetylugandensolide and antimicrobial properties of *Warburgia ugandensis* extracts and isolates against sweet potato pathogens. **Phytochemistry Letters**, v. 4, n. 2, p. 161-165, June 2011.

OTOGURO, K. et al. *In vitro* antitrypanosomal activity of plant terpenes against *Trypanosoma brucei*. **Phytochemistry**, v. 72, n. 16, p. 2024-2030, 2011.

SALOMON, C. J. First century of Chagas' disease: an overview on novel approaches to nifurtimox and benznidazole delivery systems. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 101, n. 3, p. 888-894, 2012.

SANTORO, G. F. et al. *Trypanosoma cruzi*: Activity of essential oils from *Achillea millefolium* L., *Syzygium aromaticum* L. and *Ocimum basilicum* L. on epimastigotes and trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 3, p. 283-290, July 2007a.

SANTORO G. F. et al. Effect of oregano (*Origanum vulgare* L.) and thyme (*Thymus vulgaris* L.) essential oils on *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida) growth and ultrastructure. **Parasitology Research**, v. 100, n. 4, p.783-90, Mar. 2007b.

SANTORO G. F. et al. Anti-proliferative effect of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemongrass) on intracellular amastigotes, bloodstream trypomastigotes and culture epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* (Protozoa: Kinetoplastida). **Parasitology**, v.134, n. 11, p.1649-1656, 2007c.

SAUDE-GUIMARAES, D. A.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 17, n. 3, p. 455-465, Sept. 2007.

SIKKEMA, J.; DE BONT, J. A. M.; POOLMAN, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 269, n. 11, p. 8022-8028, Mar. 1994.

SOUSA, C. P. Pathogenicity mechanisms of prokaryotic cells: an evolutionary view. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 7, n. 1, p. 23-31, Feb. 2003.

SOUZA, E. L.; LIMA, E. O.; NARAIN, N. Especiarias: uma alternativa para o controle da qualidade sanitária e de vida útil de alimentos, frente às novas perspectivas da indústria alimentícia. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 113, p. 38-42, out. 2003.

TANIWAKI, M. H.; FONSECA, H.; PIZZIRANI-KLEINER, A. A. Aflatoxin production variability by *Aspergillus flavus* strains after different storage times. **Scientia Agricola**, Piracicaba, v. 50, n. 1, 1993.

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

TEMPONE, A. G. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 382-390, May 2005.

TEPE, B. et al. Antimicrobial and antioxidant activities of the essential oil and various extracts of *Salvia tomentosa* Miller (Lamiaceae). **Food Chemistry**, Princeton, v. 90, n. 3, p. 333-340, May 2005.

TORRES, E.; WISNIEWSKI JR, A.; SIMIONATTO, E. L. Composição química dos componentes voláteis de *Capsicodendron dinisii* Schwancke (Canellaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 130-132, 2010.

VALENTINI, C. M. A.; RODRIGUEZ-ORTIZ, C. E.; COELHO, M. F. B. *Siparuna guianensis* Aublet (negramina): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, Botucatu, v. 12, n. 1, mar. 2010.

VIEIRA, S. S. et al. Composição química e atividade fungitóxica do óleo essencial de *Ageratum conyzoides* L. (Mentrasto). **Magistra**, Cruz das Almas, v. 24, n. 1, p. 55-62, jan./mar. 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease (American trypanosomiasis)**. 2010. (Fact Sheet, 340). Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/index.html>>. Acesso em: 10 dez. 2012.

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

CAPÍTULO 4: ASPECTOS TOXICOLÓGICOS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cinnamodendron dinisii* Schwacke E *Siparuna guianensis* Aublet

RESUMO

O reino vegetal representa um enorme reservatório de moléculas farmacologicamente ativas a serem descobertas; assim, torna-se de fundamental importância estudos tanto do ponto de vista fitoquímico como farmacológico e toxicológico. Nesse contexto, objetivou-se neste estudo determinar a atividade citotóxica, hemolítica, além avaliar a capacidade dos óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke e *Siparuna guianensis* Aublet causarem danos no DNA de linfócitos humanos. A obtenção dos óleos essenciais foi realizada pela técnica de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger modificado. A atividade citotóxica foi avaliada sobre células Vero e determinada pelo método do MTT. A atividade hemolítica foi avaliada por medidas espectrofotométricas a 412 nm pela liberação de hemoglobina (Hb) do eritrócito. Os danos causados no DNA de linfócitos foram avaliados pelo ensaio do cometa. A atividade citotóxica dos óleos essenciais para células Vero encontrada foi elevada, com os valores de $CC_{50} = 35,72 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo essencial de *C. dinisii* e $38,01 \mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo essencial de *S. guianensis*. Os óleos essenciais em estudo apresentaram o efeito hemolítico em todos os hematócitos (Ht) avaliados e promoveram a oxidação da hemoglobina, sendo que o efeito oxidativo foi mais acentuado para o óleo de *C. dinisii*. Os óleos essenciais em estudo foram capazes de provocar danos ao DNA de linfócitos humanos e essa capacidade foi dependente da concentração sendo que, o óleo de *C. dinisii* na concentração de $50 \mu\text{L mL}^{-1}$ causou mais danos que o controle positivo, doxorubicina 5mg mL^{-1} . Os óleos essenciais de *S. guianensis* e *C. dinisii* possuem um potencial tóxico, sugerindo uma atenção especial na aplicação desses óleos para as atividades promotoras da saúde; porém, ainda são necessários estudos adicionais que avaliem a toxicidade dessas substâncias.

Palavras-chave: Óleos voláteis. Hemácias. Células Vero. Linfócitos.

ABSTRACT

The plant kingdom represents an enormous reservoir of pharmacologically active molecules to be discovered, thus phytochemical studies as well as pharmacological and toxicological becoming of fundamental importance. In that context, the objective of this study was to determine the cytotoxic and hemolytic activity, beyond to evaluate the capacity of the essential oils of *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet damage cause human lymphocyte DNA. The essential oils were obtained via the hydrodistillation technique using a modified Clevenger apparatus. The cytotoxic activity was evaluated on Vero cells and determined by the MTT method. The hemolytic activity was evaluated by spectrophotometric measurements at 412 nm, of the hemoglobin released (Hb) from the erythrocyte. The lymphocyte DNA damage caused was appraised by the Comet Assay. The cytotoxic activity found of the essential oils for Vero cells was high, with values of $CC_{50} = 35.72 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the essential oil of *C. dinisii* and $38.01 \mu\text{g mL}^{-1}$ for the essential oil of *S. guianensis*. The essential oils in study presented hemolytic effect in all of the hematocrits (Ht) appraised and they promoted the hemoglobin oxidation, the oxidative effect was more accentuated for the *C. dinisii* oil. The oils in study were capable of provoking damage to DNA of human lymphocytes and that capacity was dependent on the concentration, the *C. dinisii* oil in the concentration of $50 \mu\text{L mL}^{-1}$ caused more damage than positive control, doxorubicin 5mg mL^{-1} . The essential oils of *S. guianensis* and *C. dinisii* possess toxic potential, suggesting an attention special in the application of those oils for health promotion activities; however, additional studies that evaluate the toxicity of those substances are still necessary.

Key words: Volatile oils. Erythrocytes. Vero Cells. Lymphocytes.

1 INTRODUÇÃO

As plantas são utilizadas para o tratamento de diversas doenças, sem o conhecimento científico dos seus riscos e benefícios. É estimado que mais de 80% da população mundial utilizam plantas como fonte primária de diversos agentes medicinais, sendo que a grande maioria desse uso geralmente é baseada na sabedoria popular.

A toxicidade de fitoterápicos e plantas medicinais pode parecer trivial quando comparada com a dos medicamentos convencionais, porém, representa um problema sério de saúde pública, uma vez que, é comum a ocorrência de efeitos adversos dos fitomedicamentos, possíveis adulterações e toxidez, bem como a interação com outras drogas (VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005).

Relatos da toxicidade de substâncias oriundas de produtos vegetais são encontrados na literatura; um exemplo são os efeitos tóxicos ocasionados pelo uso de cápsulas de têucríio (*Teucrium chamaedrys* L.), que causou uma epidemia de hepatite na França, devido a diterpenos do tipo neoclerodano, que são transformados pelo citocromo P450 em metabólitos hepatotóxicos (LOEPER et al., 1994; VEIGA-JUNIOR; PINTO; MACIEL, 2005). Outro relato importante é o do confrei (*Symphytum officinale* L.) que é utilizado na medicina tradicional como cicatrizante devido à presença da alantoína, mas também possui alcaloides pirrolizidínicos, os quais são comprovadamente hepatotóxicos e carcinogênicos (BUCKEL, 1998). Diante desses e outros relatos encontrados na literatura, estudos que visem à determinação dos aspectos toxicológicos de produtos de origem vegetal são de fundamental importância, para que, além da comprovação da sua eficácia, possam ser também, comprovadamente seguros.

Os testes de toxicidade são elaborados com os objetivos de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos e dimensionar a toxicidade

relativa das substâncias. O ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro teste para avaliar a biocompatibilidade de qualquer material ou substância para seu uso e, depois de comprovada a sua não toxicidade, é que a avaliação do produto pode ter continuidade realizando-se os ensaios necessários em animais de laboratório (ROGERO et al., 2003).

Os produtos de origem natural também são capazes de se interagir com o DNA produzindo alterações em sua estrutura ou função, sendo que essas modificações podem desencadear processos degenerativos, provocando doenças como câncer. O estudo dos danos causados no DNA pode ser realizado por meio de várias técnicas, como o teste do micronúcleo e o teste do cometa, que são métodos muito empregados, para esse tipo de avaliação (ALBERTINI et al., 2000).

Tendo em vista os inúmeros estudos que confirmam as propriedades biológicas dos óleos essenciais e que propõem a sua aplicação, são necessários estudos dos aspectos toxicológicos e farmacológicos pré-clínicos e clínicos indispensáveis para a proteção à saúde da população, bem como para comprovar cientificamente a eficácia terapêutica desses produtos.

Assim, objetivou-se neste estudo determinar a atividade citotóxica e hemolítica, além de avaliar a capacidade dos óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke e *Siparuna guianensis* Aublet de causarem danos no DNA de linfócitos humanos.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Óleos essenciais

As extrações dos óleos essenciais foram realizadas no Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais da Universidade Federal de Lavras.

2.1.1 Obtenção do material vegetal

As folhas de *Cinnamodendron dinisii* e de *Siparuna guianensis* foram coletadas no mês de fevereiro de 2011, no período da manhã, no Horto de Plantas Medicinais da UFLA e nas dependências do *campus* da UFLA, respectivamente. O local de coleta de *C. dinisii* possui as seguintes coordenadas: -21° 13' 49.0476" latitude, -44° 58' 27.4764" longitude e 933m de altitude, e o local de coleta de *S. guianensis*: -21° 13' 41.9952" latitude, -44° 58' 9.0048" longitude e 951m de altitude.

O material coletado foi encaminhado para o Laboratório de Química Orgânica – Óleos Essenciais do Departamento de Química da Universidade Federal de Lavras (UFLA) Lavras/MG, onde foram selecionadas folhas adultas, sadias com ausência de injúrias e manchas provocadas por fitopatógenos, insetos ou insolação. O material vegetal foi devidamente acondicionado e mantido sobre refrigeração ($\approx 7^\circ\text{C}$), até a extração dos óleos essenciais.

As espécies foram devidamente identificadas pela Profa. Dra. Mariana Esteves Mansanares (Departamento de Biologia/UFLA), e uma exsicata de cada espécie encontra-se registrada no Herbário ESAL, localizado no Departamento de Biologia da UFLA, com os seguintes números de registros: 26.285 (*Cinnamodendron dinisii* Schwacke) e 26.623 (*Siparuna guianensis* Aublet).

2.1.2 Extração do óleo essencial

O método de extração foi o de hidrodestilação, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado (FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 2000).

Foram feitas três repetições da extração de cada planta, utilizando 300g de folhas frescas e picadas para cada repetição, destilando-se por 2 horas. Decorrido esse tempo, o óleo foi separado do hidrolato por centrifugação utilizando uma centrífuga de bancada de cruzeta horizontal (Fanem Baby®I Modelo 206 BL) a 965,36 g por 5 min. O óleo foi retirado com o auxílio de uma pipeta Pasteur, acondicionado em frasco de vidro e armazenado sob refrigeração (4 °C) e ao abrigo da luz (GUIMARÃES et al., 2008).

2.2 Atividade citotóxica *in vitro*

Foi realizada no Instituto Carlos Chagas (Fiocruz) - Curitiba, seguindo a metodologia descrita por Mosmann (1983).

Os óleos foram testados sobre células Vero, utilizando o ensaio colorimétrico do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio]).

As células foram tratadas com concentrações de óleo essencial variando de 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Inicialmente, os óleos essenciais foram diluídos em DMSO (dimetilsulfóxido) e, em seguida, submetidos à diluição seriada no meio de DMEM (DULBECCO MEM) suplementado com 2,5% de Fetal Bovine Serum (FBS), penicilina e estreptomicina a 2mM. A concentração final de DMSO no meio de ensaio foi de 1% (v/v). Cada concentração foi testada em triplicata em conjunto com o controle.

A suspensão celular de 1×10^6 células mL^{-1} foi distribuída em placas de 96 poços, com 200 μL por poço. As placas foram incubadas a 37 °C em incubadora a 5% de CO_2 por 24h. Em seguida, o meio foi retirado e as células lavadas com tampão PBS (Phosphate Buffered Saline) pH 7,2. Em seguida, adicionaram-se em cada poço 180 μL de meio de cultura e 20 μL de solução de diluição dos óleos essenciais, incubando-se novamente as placas a 37 °C em incubadora a 5% de CO_2 por 24h. Decorrido esse período, o meio foi retirado cuidadosamente, sendo adicionado em seguida 50 μL de MTT (5 mg mL^{-1}) em cada poço. Envolveu-se a placa em papel alumínio e incubou-se novamente por 3h. Posteriormente, retirou-se o MTT dos poços e foram adicionados 100 μL de DMSO em cada poço para solubilização dos cristais de formazana (MOSMANN, 1983). As placas foram agitadas durante 5 minutos e a absorbância correspondente a cada amostra foi aferida no leitor de ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) a 550 nm. A absorbância obtida das células controle, não-tratadas, foi considerada como 100% de viabilidade celular.

A porcentagem de células inviáveis foi determinada pela equação:

$$\%I = [100 (A_c - A_a)] / A_c$$

Em que:

%I: Porcentagem de células inviáveis;

A_c : absorbância do controle;

A_a : absorbância da amostra analisada.

2.2.1 Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicatas, obtendo os valores de porcentagem de células inviáveis em cada concentração. O delineamento empregado foi o DIC, com 8 concentrações e 3 repetições por óleo, sendo a

porcentagem de células inviáveis submetida à análise de variância, e as médias obtidas foram submetidas à regressão e também foram comparadas pelo teste Scott-Knott, ambos ao nível de 5% de probabilidade, utilizando o Programa SISVAR (FERREIRA, 2008).

As equações ajustadas foram utilizadas para calcular a concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) e foram plotados gráficos com os valores de %I *versus* as concentrações analisadas empregando o software Origin 6.

2.3 Atividade hemolítica

Foi realizada no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Lavras.

Para a realização dos experimentos de avaliações da atividade hemolítica o projeto foi previamente submetido à aprovação do Comitê de Ética em Pesquisas com Seres Humanos (COEP) da Universidade Federal de Lavras, sendo aprovado com o número CAAE: 04638712.6.0000.5148.

O sangue utilizado nos experimentos foi coletado no Laboratório de Análises Clínicas da UFLA, em tubos Vacutainer® com capacidade de 10 mL contendo heparina sódica, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).

2.3.1 Preparo da suspensão de eritrócitos

Foram obtidos 10 mL de sangue de cada voluntário, utilizando um total de 4 voluntários. Posteriormente, esta alíquota foi centrifugada por 5 minutos a 900 g, utilizando 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 0,15% (13µM de lipídios) e Ht 10% (8,7mM de lipídios) (MALHEIROS et al., 1998; PRETÉ et al., 2011).

2.3.2 Teste hemolítico em meio isotônico

A determinação da resistência à hemólise foi acompanhada pela incubação das suspensões de eritrócitos (Ht 0,15 e Ht 10%) em solução isotônica (PBS) com diferentes concentrações dos óleos essenciais (5,0; 10,0; 25,0 e 50,0 µL 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 concentração de hemoglobina no sobrenadante determinada espectrofotometricamente a 412 nm (Shimadzu UV-160 1 PC). Foram realizadas medidas em triplicatas para cada concentração dos óleos 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 a concentração de hemoglobina no sobrenadante, de acordo com a equação abaixo:

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

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

2.3.3 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, 2000).

O Ht 0,15% totalmente hemolisado em água foi incubado com diferentes concentrações dos óleos essenciais (5,0; 10,0; 25,0 e 50,0 $\mu\text{L mL}^{-1}$). 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 absorbância das hemoglobinas presentes no sobrenadante, determinada espectrofotometricamente nos comprimentos de onda de 500 a 700 nm (Shimadzu UV-160 1 PC).

2.3.4 Análise estatística

Foi utilizado o delineamento em blocos casualizados (DBC) com 4 blocos (indivíduos), 4 concentrações com 3 repetições por bloco, para cada amostra. O programa estatístico utilizado foi o SISVAR (FERREIRA, 2008), em que os dados foram submetidos à análise de variância e as médias comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Foram plotados gráficos de barras com os valores de % de hemólise em relação às concentrações analisadas empregando o software Origin 6.

2.4 Teste do cometa

Esse experimento foi realizado no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de Lavras, sobre a aprovação do COEP com o número CAAE: 04638712.6.0000.5148, e os procedimentos de coleta de sangue seguiram-se conforme descrito no item 2.3.

Os voluntários convidados foram alunos de idade entre 18 e 35 anos (homens e mulheres), que não faziam uso contínuo de medicamentos (ex: pessoas com hipertensão ou diabetes), não fossem fumantes, não trabalhassem em condições de risco químico ou biológico e possuísem um histórico de boas condições de saúde para os últimos 3 meses; os potenciais voluntários também não poderiam ter sido submetidos a qualquer procedimento cirúrgico e/ou administração de medicamentos de tarja preta (ex: quimioterápicos e antibióticos) ou outras drogas que poderiam causar alterações nas células sanguíneas invalidando os experimentos do projeto proposto.

2.4.1 Preparação dos nucleoides e teste do cometa

Para o teste do cometa, foi utilizada a metodologia de Singh et al. (1988), conforme descrita a seguir. Os testes foram realizados a partir de sangue total com posterior análise apenas dos linfócitos isolados durante o tratamento das lâminas. Foram coletadas alíquotas de 10 mL de sangue de cada voluntário, sendo utilizados 5 voluntários.

As células permaneceram na presença dos tratamentos (as amostras de óleos essenciais, nos volumes de 50; 25 e 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$) por período de 3 horas. Foi necessária uma suspensão celular com aproximadamente 10^6 células mL^{-1} para trabalhar com 5 a 10 mil células por lâmina, embora tenham sido avaliados apenas 300 nucleoides por tratamento, 100 nucleoides/lâmina.

A solução de lise (NaCl 0,25 M; EDTA 100mM; Tris 10 mM; pH 10 ajustado com NaOH 10M; 1% Triton X-100; 10% DMSO) foi preparada e mantida a 4 °C. A agarose de baixa temperatura de fusão (LMP) 0,5% em PBS foi derretida em micro-ondas e transferida para banho-maria a 37 °C. As luzes do laboratório permaneceram apagadas durante os passos seguintes, em que 10 μL de cada solução de incubação foram transferidos para microtubos contendo

100 μL de agarose LMP. A mistura foi homogeneizada e colocada sobre as lâminas previamente cobertas com agarose de temperatura de fusão normal (NMP) 1,5% em PBS, sendo esta coberta com lamínula. As lâminas permaneceram na geladeira por 10 minutos, as lamínulas foram então retiradas e as lâminas mergulhadas na solução de lise recém-preparada, permanecendo nesta solução por no mínimo 2 horas. Como controle positivo (C+) foi utilizada a doxorubicina ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$). Segundo Barcelos et al. (2009) a doxorubicina é um antitumoral da família das antraciclina, capaz de causar danos ao DNA e, portanto, amplamente empregada como controle no teste do cometa uma vez que sabidamente induz danos de nível 3 e 4 em DNA de células animais.

2.4.2 Eletroforese

As lâminas foram removidas da solução de lise e mantidas em solução de eletroforese (EDTA 1 mM; NaOH 300 mM; pH 13) por 20 min a 4°C antes de serem transferidas para o recipiente apropriado para a corrida eletroforética, para o relaxamento das moléculas de DNA e exposição dos sítios alcali-lábeis. Essa foi programada em 25 V e 300 mA, e o tempo de corrida foi fixado em 35 min. Após a corrida, as lâminas foram colocadas em uma solução de neutralização (Tris-HCl 0,4 M; pH 7,4) por 25 min. O DNA contido nas lâminas foi precipitado com etanol 100% por 5 min, e seco à temperatura ambiente.

2.4.3 Coloração e análises

A coloração foi feita com iodeto de propídio a $2 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para isso, 30 μL dessa solução foram colocados em cada lâmina, protegidas da luz, cobertas com lamínulas e imediatamente analisadas por microscopia de epifluorescência, em aumento de 400X (Nikon ECLIPSE E400). Os padrões do cometa foram

analisados por escores visuais. De acordo com Collins et al. (1997) e adaptações de Marcussi et al. (2011), os nucleoides analisados foram classificados quanto a extensão da lesão no DNA em cinco categorias: dano 0 (sem danos - danos < 5%), dano 1 (baixo nível de danos, em torno de 5-20%), dano 2 (médio nível de danos, em torno de 20-40%), dano 3 (alto nível de danos, em torno de 40-95%) e dano 4 (totalmente danificado, com nível de danos > 95%), conforme Figura 1.

A frequência média de danos foi calculada pelo somatório das porcentagens dos danos 1, 2, 3 e 4. Foram plotados gráficos de barras com os valores de % de frequência de danos em relação às concentrações analisadas empregando o software Prisma Graphic®.

As unidades arbitrárias (0-400; sendo 0 = sem dano e 400 = 100% de dano) foram calculadas conforme descrito por Collins (2004).

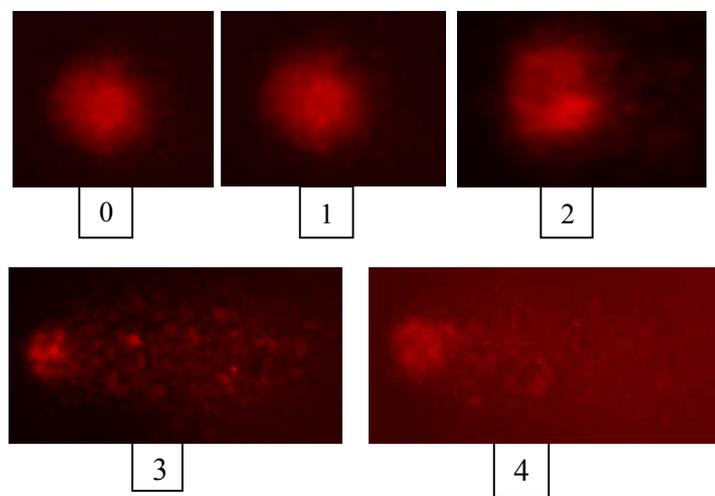


Figura 1 Classificação das imagens em forma de cometa conforme padrão migratório dos fragmentos caracterizando os níveis de danos

2.4.4 Análise estatística

As análises foram realizadas em triplicata, obtendo a porcentagem média de cada dano em cada concentração. O delineamento empregado foi o delineamento em blocos casualizados (DBC), para cada óleo, com 5 blocos (indivíduos), 3 concentrações e 3 repetições, sendo os dados submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste Scott-Knott a 5% de probabilidade, utilizando o Programa SISVAR (FERREIRA, 2008).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Atividade citotóxica dos óleos essenciais

Ocorreu um decréscimo da viabilidade celular com o aumento da concentração de ambos os óleos essenciais avaliados, após 24 horas de tratamento, sendo esse decréscimo mais expressivo a partir da concentração de 62,50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Tabela 1). Os dois óleos apresentaram baixos valores de CC_{50} (35, 72 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *C. dinisii* e 38,01 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. guianensis*) no teste de citotoxicidade (Tabela 1), sendo então, considerados citotóxicos, já que quanto menor o valor de CC_{50} mais citotóxico é o composto frente à linhagem celular utilizada.

Tabela 1 Atividade citotóxica dos óleos essenciais de *S. guianensis* e *C. dinisii* frente às células Vero.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Células inviáveis (%)	
	<i>C. dinisii</i>	<i>S. guianensis</i>
7,81	16,78 a	3,89 a
15,62	19,71 b	19,27 b
31,25	29,50 c	40,52 c
62,50	92,61 d	92,68 d
125,00	93,69 d	93,75 d
250,00	93,24 d	93,37 d
500,00	93,24 d	92,86 d
1000,00	93,81 d	93,56 d
CC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	35,72	38,01

* CC_{50} = Concentração que causa lise ou morte de 50% das células Vero. **Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra são iguais entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

Alguns estudos são desenvolvidos na tentativa de determinar a citotoxicidade de vários tipos de compostos, entre eles substâncias extraídas de plantas, como os estudos com o óleo essencial de *Minthostachys verticillata* (peperina). Esses mostraram que o óleo essencial não induziu efeitos citotóxicos, como indicado pela exclusão do corante azul de tripan e ensaios NRU (absorção do vermelho neutro) em células Vero, e células mononucleares do sangue periférico humano, sugerindo a seguridade desse óleo essencial como um agente terapêutico (ESCOBAR et al., 2012). Pesquisas de Zapata et al. (2010), indicaram que os óleos essenciais de *Achyrocline alata* e *Baccharis latifolia* não apresentaram efeitos citotóxicos para células Vero. O óleo essencial de *Chrysanthemum trifurcatum* apresentou CC_{50} de $735,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ para células Vero, e conseqüentemente uma atividade citotóxica baixa (SASSI et al., 2008). Pelo ensaio MTT o óleo essencial de *Piper hispidinervum* não foi citotóxico para células VERO até a concentração de $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ (SAUTER et al., 2012). O óleo essencial de *Cedrus libani* apresentou ação citotóxica frente à células Vero com CC_{50} de $440 \mu\text{g mL}^{-1}$ (LOIZZO et al., 2008). Gonçalves et al. (2012) observaram que o óleo essencial de *Seseli tortuosum* apresentou propriedades citotóxicas para queratinócitos humanos (HaCaT), quando utilizado em concentrações superiores a $0,64 \mu\text{L mL}^{-1}$ e Beattie et al. (2011) estudando o óleo essencial de diversas partes de *Eremophila mitchellii* observaram que esses apresentaram efeitos citotóxicos frente à células linfoblásticas de rato (ATCC: CCL-46), resultados que nos permite observar a variação da citotoxicidade dos óleos essenciais.

A atividade citotóxica do óleo essencial obtido das folhas de *C. dinisii* e *S. guianensis* não foi descrita em estudos anteriores. Pesquisas foram realizadas por Mahmoud et al. (1980), citado por Torres, Wisniewski Jr. e Simionatto (2010), com extrato clorofórmico obtido de folhas, cascas e raízes de *C. dinisii*. Estes autores, verificaram atividade citotóxica, e que essa atividade estava

relacionada com a presença das substâncias cinamosmolídeo, capsicodendrina e cinamodial. O óleo essencial das folhas de *Siparuna grandiflora*, contendo os componentes majoritários germacrona (66,9%), germacreno B (8,2%), β -cadineno (2,5%), trans- β -elemenona (2,2%) e β -elemeno (2,1%), apresentou notável atividade citotóxica *in vitro* em células MCF-7 (câncer de mama humano) (SETZER et al., 2008); Ocorrendo o mesmo com o óleo essencial de *S. guianensis*, planta do mesmo gênero da planta do estudo acima citado. Tempone et al. (2005), avaliaram a atividade citotóxica dos extratos etanólicos das folhas de *S. guianensis* e observaram CC_{50} de 54, 79 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em células RAW 264.7 (macrófagos de rato). Comparando esses resultados com os obtidos nessa pesquisa temos que este óleo essencial se apresentou mais citotóxico, possivelmente devido à presença de outros constituintes ou do sinergismo entre eles.

De acordo com Gonçalves et al. (2012), os efeitos citotóxicos do óleo essencial de *S. tortuosum* estão diretamente relacionados com a presença dos compostos majoritários α e β -pineno. Anteriormente, Beattie et al. (2011) já haviam descrito sobre a presença desses compostos como responsáveis pela citotoxicidade causada pelos óleos essenciais estudados. Essas pesquisas podem explicar a citotoxicidade apresentada pelo óleo essencial de *C. dinisii*, pois este apresenta 35,41% de α -pineno e 17,81% β -pineno.

Perés et al. (2009) verificaram que o óleo essencial de *P. gaudichaudianum* apresentou 87,6% de sesquiterpenos em sua composição e os efeitos citotóxicos observados em células V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês) tratadas esse óleo essencial foram dose-dependentes, ocorrendo uma diminuição significativa na sobrevivência em concentrações igual ou superiores a 0,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Esses resultados corroboram com os obtidos para o óleo essencial de *S. guianensis*, pois este é composto por 60,9% de sesquiterpenos apresentando também atividade citotóxica elevada.

De acordo com diversas pesquisas, a citotoxicidade dos óleos essenciais em células de mamíferos é causada pela indução de apoptose e necrose. Os óleos voláteis possuem um grande número de componentes, assim possuem simultaneamente vários alvos celulares específicos. Como são compostos basicamente lipofílicos podem passar através da membrana citoplasmática, alterando a estrutura das suas diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e os fosfolipídios, afetando a fluidez das membranas tornam-as anormalmente permeáveis resultando em vazamento de radicais, citocromo C, íons cálcio e proteínas. A permeabilização das membranas externa e interna mitocondrial leva à morte celular por apoptose e necrose. Em células eucarióticas, os óleos essenciais também podem provocar a despolarização das membranas mitocondriais, diminuindo o potencial de membrana, afetando a entrada e saída de Ca^{2+} e outros íons devido à alterações na funcionalidade de canais iônicos e além de reduzir o gradiente de pH, o que afeta a bomba de prótons e a síntese e acúmulo de ATP (VERCESI et al., 1997; CARSON; MEE; RILEY, 2002; ARMSTRONG, 2006; BAKKALI et al., 2008).

3.2 Atividade hemolítica dos óleos essenciais

Os óleos essenciais em estudo apresentaram efeito hemolítico, em condições isotônicas, de osmolaridade e pH fisiológicos (PBS e pH 7,4) em todos hematócitos (Ht) avaliados.

No Ht 0,15% o óleo essencial de *S. guianensis* apresentou atividade hemolítica alta, acima de 78%, sendo que essa atividade não diferiu estatisticamente entre as concentrações, enquanto o óleo essencial de *C. dinisii* aparentemente apresentou um efeito hemolítico menor com o aumento da concentração do óleo (Figura 2). Acredita-se que esse efeito não seja verdadeiro, uma vez que hemoglobina liberada pelo contato do óleo essencial com os

eritrócitos tinha coloração diferente (mais escura), possivelmente resultado da sua oxidação (Figura 4), alterando assim sua absorção no comprimento de onda de avaliação (412nm) e conseqüentemente, afetando o cálculo da atividade hemolítica. Como a hemólise é medida pela absorbância da hemoglobina em solução, as leituras baixas (no sobrenadante) são erroneamente interpretadas como indicativas de pouca hemólise.

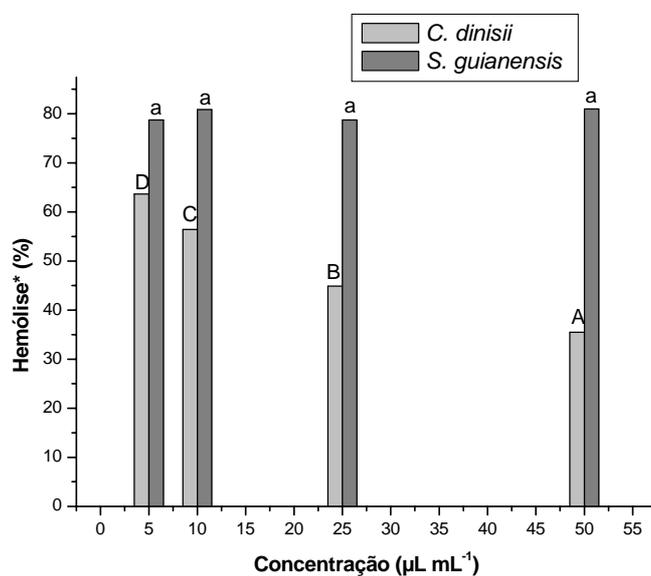


Figura 2 Porcentagem de hemólise ocasionada pelos óleos essenciais de *C. dinisii* e *S. guianensis* no hematócrito 0,15%. *Médias seguidas pela mesma letra maiúscula, para *C. dinisii* ou minúscula para *S. guianensis*, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p = 0,05$)

No Ht 10%, a atividade hemolítica do óleo de *S. guianensis* foi baixa, variando de 17,31% à 25%, assim como no Ht 0,15%, a atividade não diferiu estatisticamente entre as concentrações; porém, o óleo de *C. dinisii* apresentou efeito hemolítico maior (acima de 43,33%), sendo que esse efeito foi ainda maior para as concentrações mais elevadas (25 e 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$). Para o óleo essencial de *C. dinisii*, da mesma forma que para o Ht 0,15%, também foi observada a mudança da coloração da hemoglobina, sugerindo a oxidação da mesma, o que pode ter interferido na determinação da atividade hemolítica desse óleo (Figura 3).

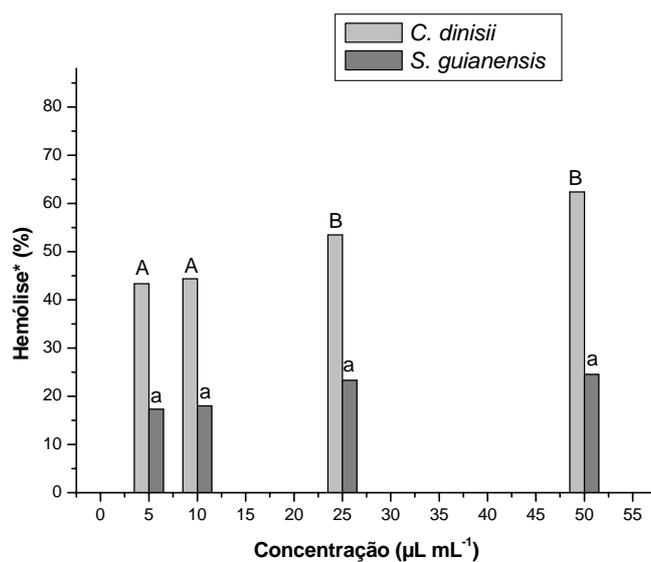


Figura 3 Porcentagem de hemólise ocasionada pelos óleos essenciais de *C. dinisii* e *S. guianensis* no hematócrito 10%. *Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula para *C. dinisii* ou minúscula para *S. guianensis*, não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ($p = 0,05$)

A atividade hemolítica menor do óleo essencial de *S. guianensis* no Ht 10%, comparada com a atividade no Ht 0,15%, pode ser explicada pelo fato de se ter uma maior oferta de membranas eritrocitárias para a interação do óleo essencial, promovendo assim um menor rompimento dessas e conseqüentemente uma menor liberação de hemoglobina. O efeito hemolítico superior do óleo essencial de *C. dinisii* no Ht 10% pode ser explicado pelo fato de ter ocorrido menor oxidação nesse Ht, quando comparada à oxidação da hemoglobina no Ht 0,15%, deixando assim, de mascarar a atividade hemolítica do óleo essencial para o Ht maior.

A atividade hemolítica dos óleos essenciais pode estar relacionada principalmente à sua capacidade de interagir com as membranas devido as suas propriedades lipofílicas. Os componentes das membranas dos eritrócitos estão presentes na proporção, em peso, de 49:43:8 para proteínas:lipídios:carboidratos, sendo que a principal classe de lipídios da membrana eritrocitária, bem como da maior parte das membranas biológicas, é a dos fosfolipídios (distribuídos assimetricamente entre as monocamadas interna e externa da membrana eritrocitária). Uma composição lipídica elevada como essa permite a interação de compostos lipofílicos, como os óleos essenciais, com a membrana eritrocitária, alterando a sua permeabilidade e promovendo maior porcentagem de hemólise (MONTGOMERY, 1994; BAKKALI et al., 2008).

O efeito oxidativo dos óleos essenciais sobre a hemoglobina pode ser visto na Figura 4, na qual é possível observar a alteração espectral da hemoglobina, com a perda de picos nos comprimentos de onda 540 e 576 nm e um aparecimento sutil de um pico em 630 nm. Observa-se que essa alteração foi mais acentuada com o aumento da concentração dos óleos essenciais, e entre os óleos essenciais avaliados, o efeito oxidativo foi maior para *C. dinisii*.

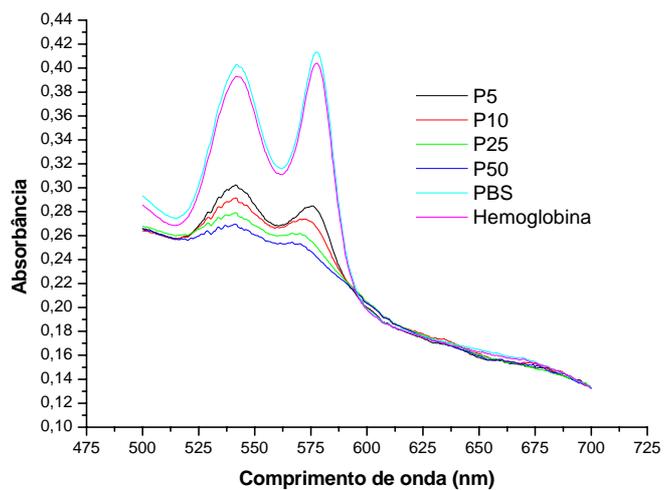
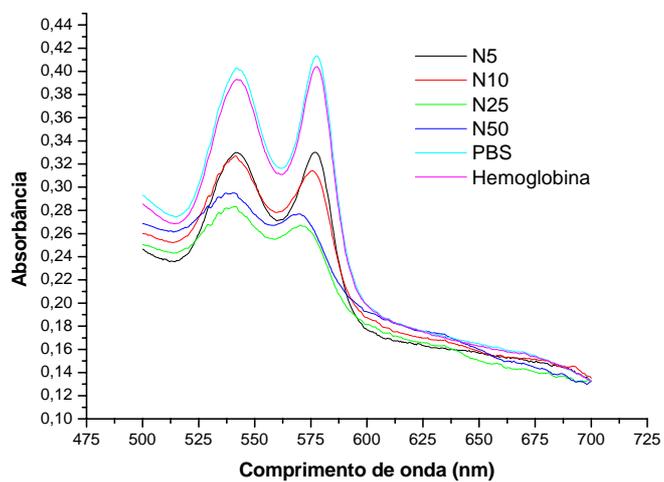


Figura 4 Oxidação da hemoglobina ocasionada pelo óleo essencial de *S. guianensis* (N) e pelo óleo essencial de *C. dinisii* (P)

A hemoglobina possui um átomo de ferro no estado de oxidação Fe^{2+} , que é fundamental para a realização do transporte de oxigênio. Quando a hemoglobina liga-se a um composto oxidante (no organismo é o O_2), um elétron é polarizado do ferro para o composto, formando momentaneamente a forma férrica (Fe^{3+}). Alguns resíduos invariáveis, de natureza hidrofóbica, são responsáveis pela manutenção do ambiente não polar em torno do sítio de ligação do oxigênio que é a base para a estabilidade do complexo ferro-oxigênio e qualquer alteração no ambiente do heme pode levar à formação de meta-Hb, alteração essa que pode ter sido ocasionada pelos óleos essenciais, principalmente pelo de *C. dinisii* (ANTONINI; BRUNORI, 1975).

Atualmente existem poucos estudos que avaliam a atividade hemolítica dos óleos essenciais. Pesquisas desenvolvidas por Silva et al. (2008) verificaram que o óleo essencial de *Casearia sylvestris* (guaçatonga) causou hemólise em sete diferentes tipos de eritrócitos. Tariku et al. (2010), observaram que os óleos essenciais de *Artemisia abyssinica* e *Satureja punctata* ssp. *punctata* da Etiópia causaram danos nos eritrócitos, com aproximadamente 50% de lise (LC_{50}) nas concentrações de 0,35 e 1,52 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente. Posteriormente, o efeito hemolítico dos óleos essenciais de *Artemisia absinthium* e *Echinops kebericho* foi investigado por Tariku et al. (2011). Foram observados os respectivos valores de LC_{50} de 1,52 e 2,62 $\mu\text{l ml}^{-1}$, indicando a necessidade de cautela para a utilização de óleos essenciais.

O teste hemolítico é um dos modelos experimentais mais utilizados para verificar a toxicidade *in vitro*, sendo capaz de avaliar a citotoxicidade de diferentes xenobióticos, uma vez que a membrana eritrocitária é muito sensível e a sua estrutura pode ser alterada significativamente pela interação com diferentes moléculas. Com isso, se faz possível estimarem os danos causados nos eritrócitos *in vivo*. Assim, com os resultados obtidos nesta pesquisa, é possível inferir que os óleos essenciais estudados apresentam alta toxicidade aos

eritrócitos, nas concentrações testadas, uma vez que valores de % de hemólise acima de 15% são considerados elevados, pois indicam a promoção de extensos danos às membranas eritrocitárias (PRETÉ et al., 2011).

3.3 Teste do cometa dos óleos essenciais

Os resultados baseados nas contagens dos nucleoides com danos ocasionados pelo óleo essencial de *S. guianensis* ao DNA, classificados visualmente, estão sumarizados na Tabela 2 e a frequência de danos representada na Figura 5.

Tabela 2 Distribuição de classes de cometa e unidades arbitrárias obtidas após tratamento de linfócitos humanos com as diferentes concentrações do óleo essencial (5, 25 e 50 μ L mL⁻¹) de *S. guianensis* (N) e com o agente antitumoral doxorubicina (C⁺)*.

Tratamento	UA (0-400)	Classe do Cometa (%)**				
		0	1	2	3	4
C-	58,27 a	45,93 c	50,20 b	3,53 a	0,33 a	0,00 a
C+	159,73 d	20,60 a	35,33 a	18,07 c	13,07c	12,27 c
N 5	58,07 a	45,40 c	51,80 b	2,47 a	0,27 a	0,13 a
N 25	80,77 b	34,67 b	55,33 b	8,33 b	2,30 a	0,47 a
N 50	106,60 c	30,20 b	45,47 b	14,60 b	6,47 b	3,13 b

*Os resultados representam a média de cada tratamento para 5 experimentos independentes, cada um correspondendo ao sangue de um voluntário. Um tubo foi preparado para cada tratamento/sangue de voluntário diferente, para a permanência das células em solução PBS (C⁻) e na presença dos tratamentos por período de 3 h a 37°C. Foram contados 100 nucleoides por lâmina, sendo montadas 3 lâminas por tratamento/sangue de cada voluntário, totalizando 300 nucleoides/tratamento/voluntário, para as diferentes doses testadas. Os escores foram definidos visualmente conforme descrito por Singh et al. (1988), sendo apenas um pesquisador responsável pela avaliação de todos os ensaios. Unidade arbitrária (UA 0-400), sendo 0 = sem dano e 400 = 100% de dano, calculadas conforme descrito por Collins (2004). ** Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott- Knott (5% de probabilidade).

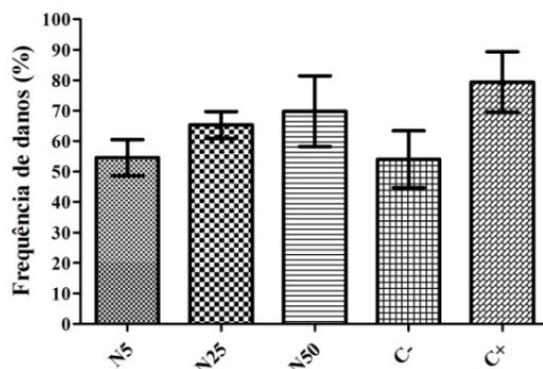


Figura 5 Frequência de nucleoides com cometa provocado pelo óleo essencial de *S. guianensis* (N) no DNA dos linfócitos humanos. *Para o cálculo da frequência de danos foi realizada a soma dos nucleoides classificados de 1 a 4, para cada tratamento

A concentração de $5 \mu\text{L mL}^{-1}$ do óleo essencial de *S. guianensis* apresentou quantidades estatisticamente iguais ao controle negativo de dano 0; já as concentrações de 25 e $50 \mu\text{L mL}^{-1}$ apresentaram menor porcentagem de dano 0 que esses, seguidas do controle positivo, com a menor porcentagem de dano 0 de todos os tratamentos. Todas as concentrações do óleo essencial de *S. guianensis* avaliadas apresentaram porcentagens de dano 1 estatisticamente iguais ao controle negativo, e todas foram superiores aos valores de controle positivo. Para o dano 2, o controle positivo apresentou maior porcentagem de danos, seguido das concentrações de 25 e $50 \mu\text{L mL}^{-1}$ de óleo essencial, tendo o controle negativo e a concentração de $5 \mu\text{L mL}^{-1}$ causado menor porcentagem de dano 2. Foi verificado que o controle negativo e as concentrações de 5 e $25 \mu\text{L mL}^{-1}$ forneceram porcentagens de danos estatisticamente iguais para as classes 3 e 4, seguidas da concentração de $50 \mu\text{L mL}^{-1}$; estes tratamentos apresentaram porcentagens inferiores, para as mesmas classes de danos, que as observadas para o controle positivo.

Pelo número absoluto de dano causado ao DNA calculado em unidade arbitrária (UA), foi possível verificar que o valor de UA aumentou com o aumento da concentração do óleo, e que estas são inferiores ao valor apresentado pelo controle positivo, indicando que a maior concentração e controle positivo possuem maiores porcentagens de danos, pois quanto mais próximo de 400 for o valor de UA (100% de danos) maior o número de danos (COLLINS, 2004).

Assim, pelos resultados expressos na Tabela 2, é possível observar que os efeitos do óleo essencial de *S. guianensis* sobre os linfócitos foram dependentes da concentração, ou seja, houve um aumento na migração de DNA em função da concentração, que corresponde a um maior número de fragmentos de DNA.

A relação de dependência entre danos causados e a concentração de óleo essencial utilizada pode ser visualizada também pela frequência de danos apresentada na Figura 5, onde se observa que a porcentagem da frequência de danos aumenta com o aumento da concentração do óleo essencial, porém as frequências de danos das concentrações avaliadas foram menores que as do controle positivo e maiores que as do controle negativo, exceto para a concentração de $5 \mu\text{L mL}^{-1}$ que apresentou a mesma frequência de danos que o controle negativo.

Na Tabela 3, estão representados os resultados obtidos nas contagens dos nucleoides e a classificação visual dos danos, ocasionados pelo óleo essencial de *C. dinisii* ao DNA de linfócitos humanos.

Tabela 3 Distribuição de classes de cometa e unidades arbitrárias obtidas após tratamento de linfócitos de sangue periférico humano com as diferentes concentrações do óleo essencial (5, 25 e 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$) de *C. dinisii* (P) e com o agente antitumoral doxorubicina (C⁺)*.

Tratamento	UA (0-400)	Classe do Cometa (%)**				
		0	1	2	3	4
C-	58,27 a	45,93 d	50,20 b	3,53 a	0,33 a	0,00 a
C+	159,73 b	20,60 b	35,33 a	18,07 b	13,07 b	12,27 b
P 5	90,80 a	32,93 c	47,67 b	16,00 b	2,46 a	0,93 a
P25	163,93 b	11,20 a	37,27 a	32,93 c	13,60 b	5,00 a
P50	215,80 c	7,93 a	27,47 a	23,87 c	22,33 c	18,40 c

* *Os resultados representam a média de cada tratamento para 5 experimentos independentes, cada um correspondendo ao sangue de um voluntário. Um tubo foi preparado para cada tratamento/sangue de voluntário diferente, para a permanência das células em solução PBS (C⁻) e na presença dos tratamentos por período de 3 h a 37°C. Foram contados 100 nucleoides por lâmina, sendo montadas 3 lâminas por tratamento/sangue de cada voluntário, totalizando 300 nucleoides/tratamento/voluntário, para as diferentes doses testadas. Os escores foram definidos visualmente conforme descrito por Singh et al. (1988), sendo apenas um pesquisador responsável pela avaliação de todos os ensaios. Unidade arbitrária (UA 0-400), sendo 0 = sem dano e 400 = 100% de dano, calculadas conforme descrito por Collins (2004). ** Médias seguidas de mesma letra na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Scott- Knott (5% de probabilidade).

A concentração de 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ foi estatisticamente igual ao controle negativo quanto à porcentagem de dano classe 0, seguidos de controle positivo e da concentração de 25 $\mu\text{L mL}^{-1}$. A concentração de 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$ apresentou menor porcentagem de dano classe 0. Para o dano 1, o controle negativo e a concentração de 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$ forneceram porcentagens de danos estatisticamente iguais ou superiores ao controle positivo, e às concentrações de 25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$. As concentrações de 25 $\mu\text{L mL}^{-1}$ e 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$ apresentaram maiores porcentagens de danos classificados como 2, seguidas do controle positivo e da concentração de 5 $\mu\text{L mL}^{-1}$, e finalmente pelo controle negativo. Para o dano 3 as maiores porcentagens foram encontradas para 50 $\mu\text{L mL}^{-1}$, seguidas do

tratamento com $25 \mu\text{L mL}^{-1}$ e do controle positivo, e por fim estão o controle negativo e a concentração de $5 \mu\text{L mL}^{-1}$. Em relação a danos de classe 4, o óleo essencial na concentração de $50 \mu\text{L mL}^{-1}$ forneceu maior porcentagem de danos, sendo essa porcentagem maior que a encontrada para o controle positivo. Esses tratamentos (controle positivo e $50 \mu\text{L mL}^{-1}$) causaram mais danos de classe 4 que o controle negativo, as concentrações de $5 \mu\text{L mL}^{-1}$ e de $25 \mu\text{L mL}^{-1}$.

As UAs expressas na Tabela 3 indicam que a concentração de $50 \mu\text{L mL}^{-1}$ provocou mais danos que o controle positivo e a concentração de $25 \mu\text{L mL}^{-1}$, e estes últimos foram superiores aos provocados pelo controle e a concentração de $5 \mu\text{L mL}^{-1}$. Esses resultados podem ser confirmados pelos resultados de frequência de danos expressos na Figura 6, onde se observa que há uma relação dose-dependente entre concentrações e danos causados ao DNA dos linfócitos, pois a porcentagem da frequência de danos aumenta com o aumento da concentração, sendo que a concentração de $25 \mu\text{L mL}^{-1}$ e de $50 \mu\text{L mL}^{-1}$ foram capazes de causar mais danos que o controle positivo.

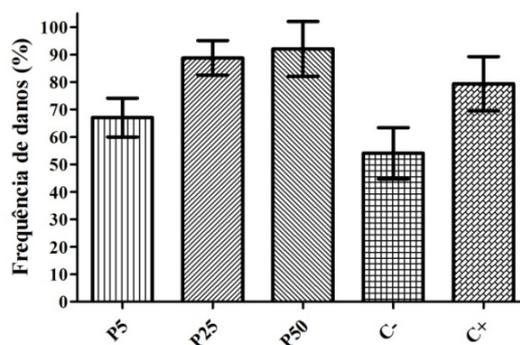


Figura 6 Frequência de nucleoides com cometa provocado pelo óleo essencial de *C. dinisii* (P) no DNA dos linfócitos humanos. *Para o cálculo da frequência de danos foi realizada a soma dos nucleoides classificados de 1 a 4, para cada tratamento.

Alguns estudos com óleos essenciais empregando o teste do Cometa têm sido desenvolvidos, na tentativa de verificar o potencial genotóxico desses metabólitos. Catanzaro et al. (2012), avaliando a instabilidade genômica induzida por α -pineno em células de hamster, observaram que o monoterpene causou lesões ao DNA de forma dependente da concentração. Esse estudo corrobora com os resultados obtidos em nossas pesquisas em relação ao óleo essencial de *C. dinisii*, pois este é rico em α -pineno e causou mais danos que o controle positivo, sugerindo que a atividade genotóxica do óleo de *C. dinisii* é causada pelo α -pineno. O óleo essencial das folhas de *Alpinia zerumbet*, composto por 98,3% de monoterpenos, não apresentou toxicidade e não induziu genotoxicidade em leucócitos humanos nas concentrações de 50-300 $\mu\text{g mL}^{-1}$, porém na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ causou uma redução na proliferação celular e da viabilidade, e um aumento de dano no DNA. Já, experimentos *in vivo* mostraram que o óleo essencial (400 mg Kg^{-1}) não exerceu mutagenicidade em células de sangue periférico e medula óssea em ratinhos (CAVALCANTI et al., 2012). Sinha, Biswas e Mukherjee (2011) observaram que os óleos essenciais de *Cymbopogon martinii* e *C. winterianus* não apresentaram efeitos genotóxicos nas concentrações de 50, 100 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* apresentou, pelo teste do cometa, efeitos genotóxicos em todas as três doses (300, 1000 e 2000 mg Kg^{-1}) de óleo avaliadas sobre células de ratos, indicando que o óleo essencial de alecrim provoca efeitos genotóxicos quando administrado por via oral (MAISTRO et al., 2010).

Piculo et al. (2011), avaliando a capacidade do nerolidol (sesquiterpeno) em induzir danos no DNA do sangue periférico e células de fígado de ratos, observaram que o nerolidol induziu fracos danos no DNA dependente das doses utilizadas, em ambos os tipos de células analisadas. O óleo essencial de *Piper gaudichaudianum*, composto por 87,6% de sesquiterpenos, apresentou efeitos dependentes da dose, causando quebras no DNA de células V79 em

concentrações até $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ (PERÉS et al., 2009). Resultados que corroboram com os dessa pesquisa para o óleo essencial de *S. guianensis*, uma vez que esse óleo é composto por 60,9% de sesquiterpenos e também apresentou genotoxicidade, indicando que essa atividade pode ser parcialmente resultante da ação dos sesquiterpenos.

O ensaio do cometa não é utilizado para detectar mutações, e sim, lesões genômicas, que após serem processadas podem ou não resultar em mutações (SINGH et al., 1988), assim os resultados obtidos nesse estudo sugerem um potencial genotóxico dos óleos essenciais de *S. guianensis* e, principalmente, do óleo de *C. dinisii*, nas concentrações avaliadas, porém são necessários estudos que avaliem se esses danos são passíveis de reparação ou não, avaliando o seu potencial mutagênico, e o efeito desses óleos em experimentos *in vivo*.

4 CONCLUSÃO

A atividade citotóxica dos óleos essenciais para células Vero encontrada foi elevada, com os valores de $CC_{50} = 35,72 \mu\text{g mL}^{-1}$, para o óleo essencial de *C. dinisii*, e $38,01 \mu\text{g mL}^{-1}$, para o óleo essencial de *S. guianensis*.

Os óleos essenciais em estudo apresentaram o efeito hemolítico em todos os hematócitos (Ht) avaliados e promoveram a oxidação da hemoglobina, sendo que o efeito oxidativo foi mais acentuado para o óleo de *C. dinisii*.

Os óleos essenciais foram capazes de provocar danos ao DNA de linfócitos humanos, sendo que essa capacidade foi dependente da concentração, sugerindo o potencial genotóxico dessas substâncias. Entre os óleos essenciais em estudo o óleo de *C. dinisii* na concentração de $50 \mu\text{L mL}^{-1}$ causou mais danos que o C+, doxorubicina 5mg mL^{-1} .

No presente estudo, foi demonstrado que os óleos essenciais de *S. guianensis* e *C. dinisii* possuem um potencial tóxico, sugerindo que deve ser dada atenção na aplicação do óleo para as atividades promotoras da saúde ou relacionados à alimentação humana, porém ainda são necessários estudos adicionais que avaliem a toxicidade dessas substâncias.

REFERÊNCIAS

ALBERTINI, R. J. et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutation Research**, Lyon, v. 463, n. 2, p.111-172, Aug. 2000.

ANTONINI, E.; BRUNORI, M. **The red blood cell. hemoglobin and methemoglobin**. London: Aca, 1975. p. 753-797.

ARMSTRONG, J. S. Mitochondrial membrane permeabilization: the sine qua non for cell death. **BioEssays**, v. 28, n. 3, p. 253–260, Mar. 2006.

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

BARCELOS, G. R. et al. Effect of annatto on micronuclei induction by direct and indirect mutagens in HepG2 cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 50, n. 9, p. 808-814, 2009.

BEATTIE, K. D. et al. Chemical composition and cytotoxicity of oils and eremophilanes derived from various parts of *Eremophila mitchellii* Benth. (Myoporaceae). **Phytochemistry**, v. 72, n. 4–5, p. 400–408, Apr. 2011.

BUCKEL, P. Toward a new natural medicine. **Naturwissenschaften**, v. 85, p. 155-163, 1998.

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**, Princeton, v. 46, n. 6, p. 1914-1920, June 2002.

CATANZARO, I. et al. Genomic instability induced by α -pinene in Chinese hamster cell line. **Mutagenesis**, v. 27 n. 4, p. 463–469, Feb. 2012.

CAVALCANTI, B. C. et al. Genetic toxicology evaluation of essential oil of *Alpinia zerumbet* and its chemoprotective effects against H₂O₂-induced DNA damage in cultured human leukocytes. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 11, p. 4051–4061, Nov. 2012.

COLLINS, A. et al. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 30, n. 2, p. 139-146, 1997.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair principles, applications, and limitations. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249-261, Mar. 2004.

ESCOBAR, F. M. et al. Lack of cytotoxic and genotoxic effects of *Minthostachys verticillata* essential oil: studies *in vitro* and *in vivo*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 50, n. 9, p. 3062-3067, Sept. 2012.

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

FERREIRA, D. F. SISVAR: um programa para análises e ensino de estatística. **Revista Científica Symposium**, Lavras, v. 6, n. 2, p. 36-41, jul./dez. 2008.

GONÇALVES, M. J. et al. Composition, antifungal activity and cytotoxicity of the essential oils of *Seseli tortuosum* L. and *Seseli montanum* subsp. *peixotoanum* (Samp.) M. Lainz from Portugal. **Industrial Crops and Products**, v. 39, p. 204-209, Sept. 2012.

GUIMARÃES, L. G. L. et al. Influência da luz e da temperatura sobre a oxidação do óleo essencial de capim-limão (*Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1476-1480, 2008.

LOEPER, J. et al. Hepatotoxicity of germander in mice. **Gastroenterology**, v. 106, p. 464-72, 1994.

LOIZZO, M. R. et al. Phytochemical analysis and *in vitro* evaluation of the biological activity against herpes simplex virus type 1 (HSV-1) of *Cedrus libani* A. Rich. **Phytomedicine**, v. 15, n.1-2, p. 79-83, Jan. 2008.

MAISTRO, E. L. et al. Genotoxicity and mutagenicity of *Rosmarinus officinalis* (Labiatae) essential oil in mammalian cells *in vivo*. **Genetics and Molecular Research**, v. 9, n. 4, p. 2113-2122, 2010.

MALHEIROS, S. V. P. et al. Contribution of trifluoperazine/lipid ratio and drug ionization to hemolysis. **Biochimica et Biophysica Acta**, Frankfurt, v. 1373, n. 2, p. 332-340, 1998.

MARCUSSI, S. et al. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins on human lymphocytes. **Mutation Research**, Lyon, v. 724, n. 1-2, p. 59-63, Sept. 2011.

MONTGOMERY, R. **Bioquímica** - uma abordagem dirigida por casos. 5. ed. São Paulo: 1994. 277 p.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

PÉRES, V. F. et al. Chemical composition and cytotoxic, mutagenic and genotoxic activities of the essential oil from *Piper gaudichaudianum* Kunth leaves. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 9, p. 2389–2395, Sept. 2009.

PICULO, F. et al. *In vivo* genotoxicity assessment of nerolidol. **Journal of Applied Toxicology**, v. 31, n. 7, p. 633-639, Oct. 2011.

PRETÉ, P. S. C. et al. Multiple stages of detergent-erythrocyte membrane interaction—A spin label study. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes**, Frankfurt, v. 1808, n. 1, p.164-170, Jan. 2011.

PRETÉ, P. S. C. **Solubilização de membranas de eritrócitos por surfactantes da série Tween**. 2000. 103 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica)- Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia, Campinas, 2000.

ROGERO, S. O. et al. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, São Carlos, v. 6, n. 3, 317-320 June 2003.

SASSI, A. B. et al. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oil of (Tunisian) *Chrysanthemum trifurcatum* (Desf.) Batt. and Trab. flowerheads. **Comptes Rendus Chimie**, v. 11, n. 3, p. 324-330, Mar. 2008.

SAUTER, I. P. et al. Chemical composition and amoebicidal activity of *Piper hispidinervum* (Piperaceae) essential oil. **Industrial Crops and Products**, v. 40, n. 3, p. 292-295, Nov. 2012.

SETZER, W. N. et al. Germacrone dominates the leaf oil of *Siparuna grandiflora* from Monteverde, Costa Rica. **Natural Product Communications**, v. 3, n. 2, p. 267-270, 2008.

- SILVA, S. L. da et al. Cytotoxic evaluation of essential oil from *Casearia sylvestris* Sw. on human cancer cells and erythrocytes. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 38, n. 1, p. 107-112, 2008.
- SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, Stockholm, v. 175, n.1, p. 184-191, Mar. 1988.
- SINHA, S.; BISWAS, D.; MUKHERJEE, A. Antigenotoxic and antioxidant activities of palmarosa and citronella essential oils. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 3, p. 1521-1527, Oct. 2011.
- TARIKU, Y. et al. Essential-Oil Composition, Antileishmanial, and Toxicity Study of *Artemisia abyssinica* and *Satureja punctata* ssp. *punctata* from Ethiopia. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, n. 4, p. 1009-1018, Apr. 2010.
- 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, n. 4, p. 614-623, Apr. 2011.
- TEMPONE, A. G. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 382-390, May 2005.
- TORRES, E.; WISNIEWSKI JR, A.; SIMIONATTO, E. L. Composição química dos componentes voláteis de *Capsicodendron dinisii* Schwancke (Canellaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 130-132, 2010.
- VEIGA-JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Medicinal plants: safe cure? **Química Nova**, São Paulo, v. 28, p. 519-528, 2005.
- VERCESI, A. E. et al. The role of reactive oxygen species in mitochondrial permeability transition. **Bioscience Reports**, v. 17, n.1, p. 43-52, 1997.
- ZAPATA, B. et al. Actividad antimicótica y citotóxica de aceites esenciales de plantas de la familia Asteraceae. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 27, n. 2, p. 101-103, Apr./June 2010.

CAPÍTULO 5: CARACTERIZAÇÃO MORFOLÓGICA E HISTOQUÍMICA DAS ESTRUTURAS SECRETORAS DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE *Cinnamodendron dinisii* Schwacke E *Siparuna guianensis* Aublet

RESUMO

Os óleos essenciais são metabólitos que podem ser produzidos e acumulados em todos os órgãos vegetais, sua presença geralmente está associada à presença de estruturas secretoras especializadas. Diante disso, objetivou-se neste estudo caracterizar morfológicamente e histoquimicamente as estruturas secretoras dos óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke e *Siparuna guianensis* Aublet. Folhas sadias do quarto nó das plantas estudadas foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais e no *campus* da UFLA, respectivamente. As análises morfológicas das superfícies externas e das estruturas internas foram feitas por meio de microscopia eletrônica de varredura (MEV). A visualização das estruturas internas foi realizada por meio de cortes transversais com o auxílio de nitrogênio líquido. Para as análises histoquímicas, foram utilizadas folhas frescas, seccionadas à mão livre com lâmina de aço, transversalmente na região da nervura central, sendo coradas com os reagentes Sudan IV (lipídios totais), o reagente de Nadi (terpenos) e Cloreto férrico 10% (compostos fenólicos). Em ambas as espécies, não foram observadas a presença de tricomas nas superfícies foliares e foi verificada a presença de cavidades de formato esférico, espalhadas por todo o mesofilo foliar. A presença de compostos lipídicos e terpênicos no interior dessas cavidades foi evidenciada pelas reações positivas nos testes histoquímicos (Reagente de Nadi e Sudan IV), inferindo a presença de óleos essenciais nesses locais.

Palavras-chave: Histoquímica. Morfologia. Cavidades Secretoras.

ABSTRACT

Essential oils are metabolites that can be produced and accumulated in all organs of plants, their presence is generally associated with the presence of specialized secretory structures. As such, the aim in this study were to morphologically and histochemically characterize the secretory structures of the essential oils of *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. Healthy leaves from the fourth node of the studied plants were collected in Medicinal Plant Nursery and on the campus of UFLA, respectively. The morphologic analyses of the external surfaces and the internal structures were done through scanning electronic microscopy (SEM). The visualization of the internal structures was conducted through transverse cuts with the aid of liquid nitrogen. For the histochemical analyses, fresh leaves were used, transversely sectioned in the area of the central rib freehand with a steel blade, stained with the reagents Sudan IV (total lipids), the Nadi reagent (terpenes) and 10% Ferric chloride (phenolic compounds). In both species, were not observed the presence of trichomes on leaf surfaces, revealing the presence of secretory cavities of spherical, scattered throughout the leaf mesophyll. The presence of lipid compounds and terpene inside these cavities was evidenced by positive reactions in histochemical tests (Nadi reagent and Sudan IV), inferring the presence of essential oils in these locations.

Key words: Histochemistry. Morphology. Secretor Cavities.

1 INTRODUÇÃO

Os metabólitos secundários são um tipo de secreção produzida pelos vegetais que expressam a individualidade química das plantas, e que diferem qualitativa e quantitativamente de espécie para espécie, ou até mesmo na mesma espécie, conforme fatores bióticos e condições ambientais. Entre esses metabólitos, estão os óleos essenciais que podem ser produzidos e acumulados em todos os órgãos vegetais, e a sua presença geralmente está associada com a presença de estruturas secretoras especializadas (SIMÕES et al., 2007).

As secreções vegetais são sintetizadas ou simplesmente acumuladas e eliminadas em células especializadas, que ocorrem isoladas (idioblastos secretores) ou que constituem estruturas glandulares altamente diferenciadas (tricomias, emergências, bolsas, canais e laticíferos). É extremamente vasta a diversidade morfológica de qualquer destas estruturas, não existindo geralmente nenhum tipo de relação entre a morfologia e a secreção produzida (FAHN, 1979, ASCENSÃO, 2007).

O tipo de produtos secretados ou absorvidos pelas estruturas secretoras podem ser identificados *in situ* por meio de testes histoquímicos, permitindo assim detectar a presença de óleos essenciais e outros metabólitos, nos diferentes órgãos das plantas analisadas, possibilitando a identificação das partes do vegetal mais promissoras para a pesquisa química, para o uso medicinal popular e para o desenvolvimento de tecnologias de propagação das plantas de interesse medicinal e econômico (ZANETTI; MANFRON; HOELZEL, 2004; ASCENSÃO, 2007; COLLARES; ARAMBARRI, 2008).

Considerando a diversidade vegetal do Brasil e a pequena porcentagem de espécies de plantas investigada, o estudo de plantas de ocorrência natural em nosso país, como a pimenteira (*Cinnamodendron dinisii* Schwacke) e a negramina (*Siparuna guianensis* Aublet), se torna de grande relevância.

A espécie *C. dinisii*, vulgarmente conhecida como “pimenteira”, pertence à família Canellaceae, é encontrada desde Minas Gerais até o Rio Grande do Sul. A casca, de sabor picante como a pimenta verdadeira, possui propriedades medicinais e é levemente entorpecente (LORENZI, 2002; PEIXOTO; BARROS, 2010).

A espécie *Siparuna guianensis*, conhecida popularmente como “negramina”, pertencente à família Siparunaceae, caracteriza-se por ser arbusto monóico, 5-15 metros de altura, de casca cinza e lisa. O uso dessa espécie como recurso medicinal é bem difundido entre a população matogrossense, onde utilizam-se o decocto de suas folhas para sintomas de sinusite, febre, reumatismo, enxaqueca, gripe, dores no corpo e “malina” (RENNER; HAUSNER, 2005; VALENTINI; RODRIGUEZ-ORTIZ; COELHO, 2010).

Assim, este estudo teve por objetivo avaliar morfológicamente e histoquimicamente as estruturas secretoras dos óleos essenciais de *C. dinisii* e *S. guianensis*.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

O material vegetal de *Cinnamodendron dinisii* e de *Siparuna guianensis*, foi coletado no mês de fevereiro de 2011, no período da manhã, no Horto de Plantas Medicinais da UFLA e nas dependências do *campus* da UFLA, respectivamente. O local de coleta de *C. dinisii* possui as seguintes coordenadas: -21° 13' 49.0476" latitude, -44° 58' 27.4764" longitude e 933m de altitude, e o local de coleta de *S. guianensis*: -21° 13' 41.9952" latitude, -44° 58' 9.0048" longitude e 951m de altitude.

As espécies foram devidamente identificadas, e uma exsiccata de cada espécie encontra-se registrada no Herbário ESAL, localizado no Departamento de Biologia da UFLA, com os seguintes números de registros: 26.285 (*Cinnamodendron dinisii* Schwacke) e 26.623 (*Siparuna guianensis* Aublet).

2.2 Análises morfológicas

As análises ultraestruturais foram realizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) de acordo com Alves (2004), no Laboratório de Microscopia Eletrônica (LME), Departamento de Fitopatologia, UFLA, utilizando um microscópio modelo LEO EVO 40.

Foram utilizadas folhas adultas e saudáveis, do quarto nó da planta, lavadas em água corrente, e cortadas em dimensões aproximadas de 0,5 x 0,5 cm na região contendo a nervura central. Para análise das estruturas externas o material foi imerso em solução fixadora de Karnovsky (KARNOVSKY, 1965), pH 7,2, por um período de 24 horas. Em seguida, os fragmentos foram lavados três vezes em tampão cacodilato 0,05 M, por 10 minutos, e as seções foram transferidas para uma solução de tetróxido de ósmio (OsO₄) 1,0% por 1 hora.

Posteriormente, o material foi lavado em água destilada por três vezes e desidratado em soluções aquosas de acetona nas concentrações de 25%, 50%, 75%, 90% e 100%. Após a desidratação, as amostras foram levadas para o aparelho de ponto crítico Balzers (CPD 030) para substituição da acetona por CO₂ e complementação da secagem (ROBARDS, 1978). As amostras obtidas foram montadas em suportes de alumínio stubs com fita de carbono sobre uma película de papel-alumínio e cobertas com ouro no evaporador (Balzers SCD 050), sendo, em seguida, observados em Microscópio Eletrônico de Varredura.

Para a visualização das estruturas internas, foram feitas secções transversais utilizando nitrogênio líquido. Após a fixação do material em solução de Karnovsky com pH 7,2, por um período de 24 horas, esse foi transferido para solução aquosa de glicerol 30%, permanecendo por 30 minutos. Em seguida, o material foi imerso em nitrogênio líquido e cortado sobre uma superfície metálica resfriada com nitrogênio líquido, sendo, posteriormente, colocado em solução de tetróxido de ósmio 1,0% em água por 1 hora. A partir desse ponto, foram seguidos os mesmos procedimentos feitos com o material preparado para a observação das estruturas externas.

2.3 Análises histoquímicas

Estudos anatômicos das estruturas secretoras por microscopia fotônica foram realizados no Laboratório de Anatomia Vegetal, Departamento de Biologia, UFLA.

Utilizaram-se folhas adultas e saudáveis, do quarto nó de cada planta, que foram seccionadas com lâmina de aço, em toda a região da nervura central, com auxílio de um micrótomo de mesa. Os cortes histológicos foram colocados em um vidro de relógio contendo água destilada. As secções foram selecionadas e, em seguida, divididas entre vidros de relógio contendo Sudan III para detectar a

presença de lipídios, cutina e suberina (KOLATTUKUDY, 1984), reagente Nadi (DAVID; CORDE, 1964) para a detecção de terpenos e Cloreto férrico 10%, para localização de compostos fenólicos (JOHANSEN, 1940). Os cortes corados com Sudan IV permaneceram imersos neste reagente por 15 minutos e foram lavados com água destilada. Os cortes corados com o reagente de Nadi foram imersos neste reagente por 60 minutos no escuro e, em seguida, lavados com tampão fosfato de sódio 0,1 M, pH 7,2, por cinco minutos. Os cortes corados com cloreto férrico 10% e gotas de carbonato de sódio 2% permaneceram imersos nestes reagentes por 5 minutos e em seguida foram lavados com água destilada. Após a coloração, os cortes foram montados em lâminas semipermanentes com água glicerinizada. As observações foram realizadas utilizando um microscópio fotônico (Leica DML), com uma câmera acoplada (Canon PowerShot S40).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Nas eletromicrografias obtidas por MEV das superfícies foliares de *C. dinisii* e de *S. guianensis*, não foi observada a presença de tricomas nas superfícies abaxial e adaxial das folhas. Pelas observações das secções transversais, obtidas por meio de cortes realizados na presença de nitrogênio líquido, identificou-se a presença de cavidades de formato esférico, distribuídas por todo o mesofilo foliar (Figuras 1 e 2).

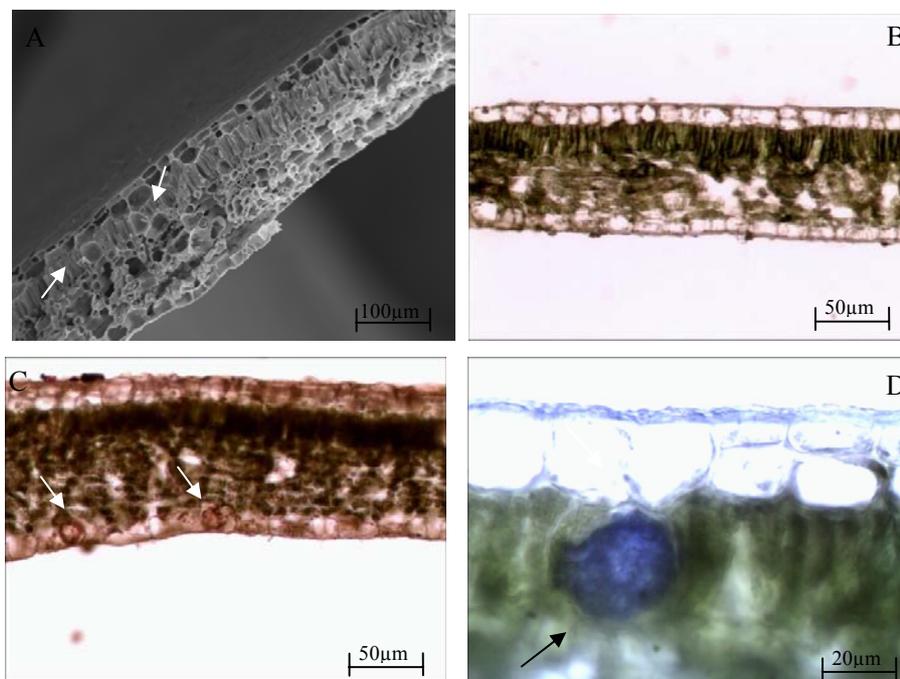


Figura 1 Eletromicrografia de varredura e secções transversais das folhas de *S. guianensis*. A) Pequenas cavidades de formato esférico espalhadas pelo mesofilo; B) Ausência de compostos fenólicos nas cavidades, devido à ausência de coloração característica de reação positiva com cloreto férrico. C) Presença de substâncias lipídicas no interior das cavidades, evidenciada pela reação positiva frente ao reagente Sudan IV. D) Presença de compostos terpênicos no interior das cavidades, revelada pela reação positiva com o reagente de Nadi

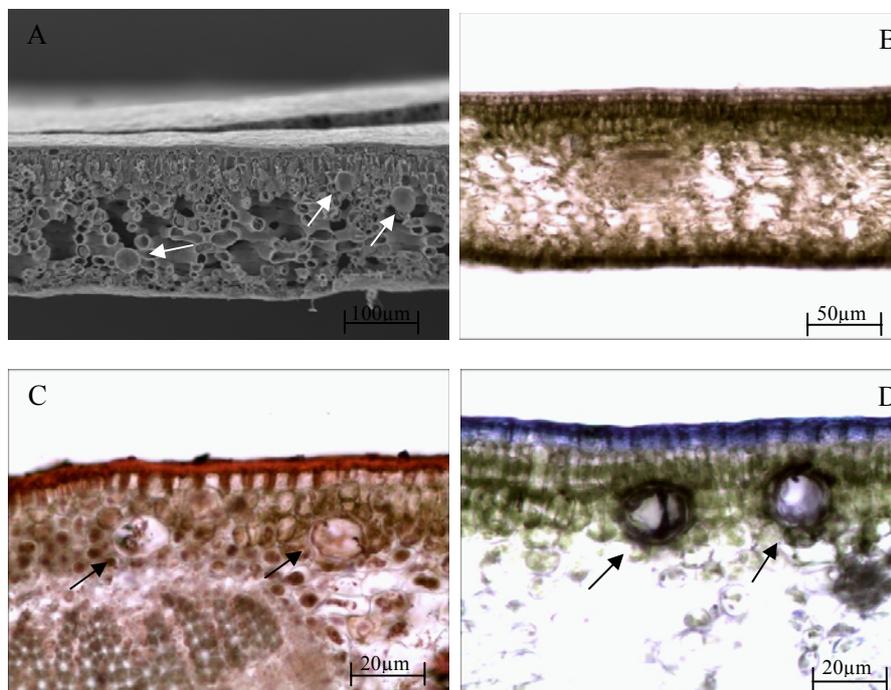


Figura 2 Eletromicrografia de varredura e secções transversais das folhas de *C. dinisii*. A) Pequenas cavidades de formato esférico espalhadas pelo mesofilo; B) Ausência de compostos fenólicos nas cavidades, devido à ausência de coloração característica de reação positiva com cloreto férrico. C) Presença de substâncias lipídicas no interior das cavidades, evidenciada pela reação positiva frente ao reagente Sudan IV. D) Presença de compostos terpênicos no interior das cavidades, revelada pela reação positiva com o reagente de Nadi

Na espécie *S. guianensis*, as cavidades apresentaram-se distribuídas principalmente no parênquima paliçádico, e também são encontradas na camada subepidérmica na região próxima à margem da face adaxial (Figura 1).

As cavidades secretoras da espécie *C. dinisii* encontram-se distribuídas principalmente na interface do parênquima paliçádico com o esponjoso, porém, algumas cavidades são encontradas apenas no parênquima esponjoso (Figura 2).

As análises histoquímicas demonstraram a presença de compostos lipídicos no interior de cavidades, perante a reação positiva com o reagente Sudan IV. A presença de compostos terpênicos no interior das cavidades, espalhadas por todo o mesofilo foliar, pode ser observada pela reação positiva com o reagente de Nadi, sugerindo a presença de óleos essenciais no interior dessas cavidades. A reação com o cloreto férrico sugere que não há compostos fenólicos na composição do composto secretado nessas cavidades, pois não foi identificada coloração característica de reação positiva no seu interior, porém, o cloreto férrico demonstrou coloração variando de esverdeado à enegrecida na região do parênquima paliádico e na região da epiderme apenas para *C. dinisii*, indicando a presença de compostos fenólicos nessas estruturas (Figuras 1 e 2).

As células secretoras internas estão distribuídas nos diferentes tecidos das plantas em que ocorrem e podem estar presentes tanto em órgãos vegetativos quanto em órgãos reprodutivos. Estas se diferenciam das células vizinhas na morfologia e no metabolismo e são denominadas idioblastos secretores, sendo que um pequeno grupo de células secretoras formam as cavidades (bolsas) e os canais (ductos) secretores. Essas estruturas são formadas durante a ontogênese, onde o grupo de células delimita um espaço pela separação de suas células (esquinogênese), pela desintegração de algumas células (lisogênese) ou pela ocorrência dos dois processos (esquizolisogênese) (CASTRO; PEREIRA; PAIVA, 2009).

Muitas vezes, canais e cavidades podem ser confundidos, sendo que o óleo essencial é liberado em um espaço interno, o lume, que é mais ou menos isodiamétrico nas cavidades e alongado no plano longitudinal nos canais secretores (APPEZZATO-DA-GLÓRIA; CARMELLO-GUERREIRO, 2006).

De acordo com Esau (1993), várias famílias apresentam células secretoras com conteúdo oleoso; geralmente, esse tipo de células secretoras são células parenquimáticas ampliadas e que ocorrem nos tecidos vascular (xilema e

floema) e fundamental (parênquimas, colênquimas e esclerênquimas) do caule e da folha. A exemplo, Guimarães (2010) observou que o óleo essencial das folhas de *Ocotea odorifera* (Lauraceae) encontra-se armazenado em células secretoras e o de *Mikania glauca* (Asteraceae) em canais e cavidades oleíferas, e todos presentes no mesófilo foliar. Thadeo et al. (2009) pesquisando a anatomia e a histoquímica das estruturas secretoras da folha de *Casearia decandra* (Salicaceae) verificaram que o sistema secretor dessa planta é composto por ductos e cavidades dispersos pela lâmina foliar e pecíolo, e por idioblastos presentes nos tecidos vasculares, parênquima cortical da nervura mediana e no parênquima paliçádico, sendo que no mesófilo existem numerosas cavidades com localização subepidérmica ou distribuídas na interface do parênquima paliçádico com o esponjoso. Marques et al. (2008) descrevendo o estudo morfo-anatômico do fruto de *Hennecartia omphalandra* (Monimiaceae), planta pertencente a família botânica em que a espécie *S. guianensis* foi inicialmente atribuída, encontraram células oleíferas no mesocarpo. Esses estudos mostram o quanto é vasta a diversidade morfológica e a distribuição das estruturas secretoras nos de tecidos dos vegetais.

4 CONCLUSÃO

Os compostos terpênicos das espécies *S. guianensis* e *C. dinisii* foram identificados em cavidades inseridas em todo o mesofilo foliar, inferindo a presença de óleos essenciais nesses locais.

Não foi observada a presença de tricomas nas superfícies abaxial e adaxial das folhas.

REFERÊNCIAS

- ALVES, E. **Introdução à microscopia eletrônica de varredura**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2004. 43 p.
- APPEZZATO-da-GLÓRIA, B.; CARMELLO-GUERREIRO, S. M. (Ed.). **Anatomia vegetal**. Viçosa: Editora UFV, 2006. 438 p.
- ASCENSÃO, L. Estruturas secretoras em plantas: uma abordagem morfo-anatômica. In: FIGUEIREDO, A. C. S.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G. (Ed.). **Potencialidades e aplicações das plantas aromáticas e medicinais**. 3. ed. Lisboa: Universidade de Lisboa/Faculdade de Ciências/Centro de Biotecnologia Vegetal, 2007. (Curso Teórico-Prático).
- CASTRO, E. M.; PEREIRA, F. J.; PAIVA, R. **Histologia vegetal**: estrutura de função de órgãos vegetativos. Lavras: Editora UFLA, 2009. 234 p.
- COLLARES, M. N.; ARANBARRI, A. M. Ziziphus mistol (Rhamnaceae): morfo-anatomía y arquitectura foliar. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 27, n. 4, p. 568-77, July/Aug. 2008.
- DAVID, R.; CORDE, J. P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 258, p. 1338-1340, 1964.
- ESAU, K. **Anatomia das plantas com sementes**. São Paulo: E. Blücher, 1993. 293 p.
- FAHN, A. **Secretory tissues in plants**. London: Academic, 1979. 391 p.
- GUIMARÃES, L. G. de L. **Óleos essenciais de *Lippia sidoides* Cham., *Alomia fastigiata* (Gardner) Benth, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer, *Mikania glauca* Mart. e *Cordia verbenacea* D.C.**: identificação e quantificação química, caracterização das estruturas secretoras, atividades antioxidante e antibacteriana. 2010. 225 p. Tese (Doutorado em Agroquímica)-Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.
- JOHANSEN, D. A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill Book, 1940.

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

KOLATTUKUDY, P. E. Biochemistry and function of cutin and suberin. **Canadian Journal of Botany**, v. 62, n.12, p. 2918-2933, 1984.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil. 4. ed. São Paulo: Nova Odessa, 2002. v. 2.

MARQUES, C. A. et al. Considerações anatômicas e análise de óleo essencial do hipanto e do fruto de *Hennecartia omphalandra* J. Poisson (Monimiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 3, p. 415-429, 2008.

PEIXOTO, A. L.; BARROS, F. de. Canellaceae. In: **Lista de espécies da flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB111724>>. Acesso em: 12 out. 2011.

RENNER, S. S.; G. HAUSNER. **Monograph of siparunaceae**. New York: The New York Botanical Garden, 2005. 256 p.

ROBARDS, A. W. An introduction to techniques for scanning electron microscopy of plant cells. In: HALL, J. L. **Electron microscopy and cytochemistry of plant cells**. New York: Elsevier, 1978. p. 343-403.

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

THADEO, M. et al. Anatomia e histoquímica das estruturas secretoras da folha de *Casearia decandra* Jacq. (Salicaceae). **Revista Brasileira de Botânica**, v. 32, n. 2, p. 329-338, 2009.

VALENTINI, C. M. A.; RODRIGUEZ-ORTIZ, C. E.; COELHO, M. F. B. *Siparuna guianensis* Aublet (negramina): uma revisão. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, Botucatu, v. 12, n. 1, jan./mar. 2010.

ZANETTI, G. D.; MANFRON, M. P.; HOELZEL, S. C. S. Análise morfo-anatômica de *Tropaeolum majus* L. (Tropaeolaceae). **IHERINGIA, Série Botânica**, Porto Alegre, v. 59, n. 2, p. 173-178, jul./dez. 2004.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Tabelas de análises de variância das atividades antioxidantes

Tabela 1A Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados de atividade antioxidante do óleo essencial de *C. dinisii*, pelo ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	6	125,318	20,886	14,488	0,000
erro	14	20,182	1,442		
Total corrigido	20	145,501			
CV (%)	39,12				
Média geral	3,07				

Tabela 2A Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados de atividade antioxidante do óleo essencial de *S. guianensis*, pelo ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	6	850,942	141,824	120,897	0,000
erro	14	16,423	1,173		
Total corrigido	20	867,365			
CV (%)	10,40				
Média geral	10,42				

Tabela 3A Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados de atividade antioxidante do padrão timol, pelo ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	6	11425,158	1904,193	403,634	0,000
erro	14	66,047	4,718		
Total corrigido	20	11491,205			
CV (%)	4,00				
Média geral	54,33				

Tabela 4A Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados de atividade antioxidante do padrão BHT, pelo ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	6	798,845	133,141	36,773	0,000
erro	14	50,689	3,621		
Total corrigido	20	849,533			
CV (%)	2,08				
Média geral	91,54				

Tabela 5A Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados de atividade antioxidante do padrão Ácido ascórbico, pelo ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	6	31094,890	5182,482	1396,096	0,641
erro	14	51,970	3,712		
Total corrigido	20	31146,859			
CV (%)	3,57				
Média geral	54,01				

Tabela 6A Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados de atividade antioxidante do óleo essencial de *C. dinisii*, pela metodologia em que se avalia a capacidade de redução do radical estável DPPH em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	6	1,943	0,324	0,446	0,836
erro	14	10,160	0,726		
Total corrigido	20	12,102			
CV (%)	73,09				
Média geral	1,17				

Tabela 7A Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados de atividade antioxidante do óleo essencial de *S. guianensis*, pela metodologia em que se avalia a capacidade de redução do radical estável DPPH em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	6	3,921	0,653	0,720	0,000
erro	14	12,712	0,908		
Total corrigido	20	16,633			
CV (%)	82,48				
Média geral	1,16				

Tabela 8A Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados de atividade antioxidante do padrão timol, pela metodologia em que se avalia a capacidade de redução do radical estável DPPH em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	6	2705,648	450,941	227,095	0,000
erro	14	27,800	1,986		
Total corrigido	20	2733,447			
CV (%)	5,62				
Média geral	25,072				

Tabela 9A Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados de atividade antioxidante do padrão BHT, pela metodologia em que se avalia a capacidade de redução do radical estável DPPH em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	6	9072,466	1512,078	398,121	0,000
erro	14	53,172	3,798		
Total corrigido	20	9125,638			
CV (%)	2,60				
Média geral	75,00				

Tabela 10A Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados de atividade antioxidante do padrão Ácido ascórbico, pela metodologia em que se avalia a capacidade de redução do radical estável DPPH em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	6	13758,878	2293,146	974,163	0,000
erro	14	32,956	2,354		
Total corrigido	20	13791,834			
CV (%)	1,90				
Média geral	80,82				

APÊNDICE B – Gráficos da equação de regressão das atividades antioxidantes em relação à concentração dos compostos avaliados

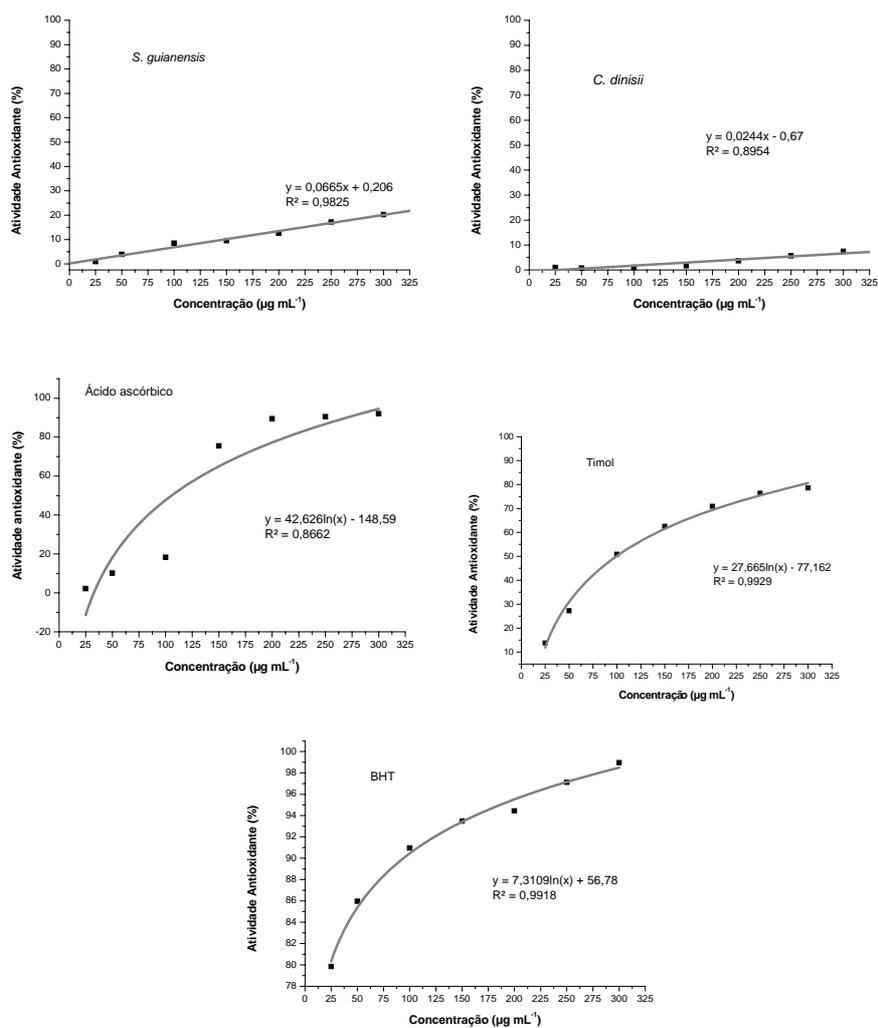


Figura 1B Gráficos de porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais e dos padrões em função das concentrações, pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico

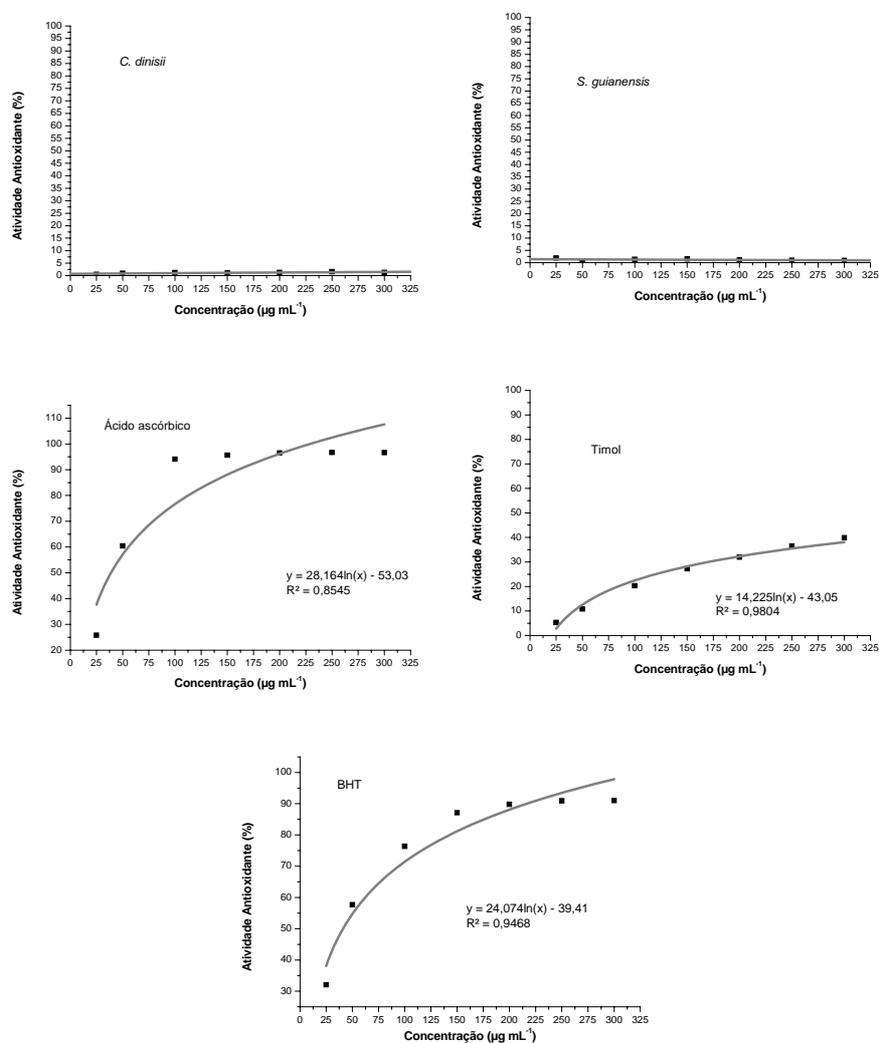


Figura 2B Gráficos de porcentagem de atividade antioxidante dos óleos essenciais e dos padrões em função das concentrações, pelo ensaio do DPPH

APÊNDICE C - Cromatogramas dos óleos essenciais das plantas estudadas

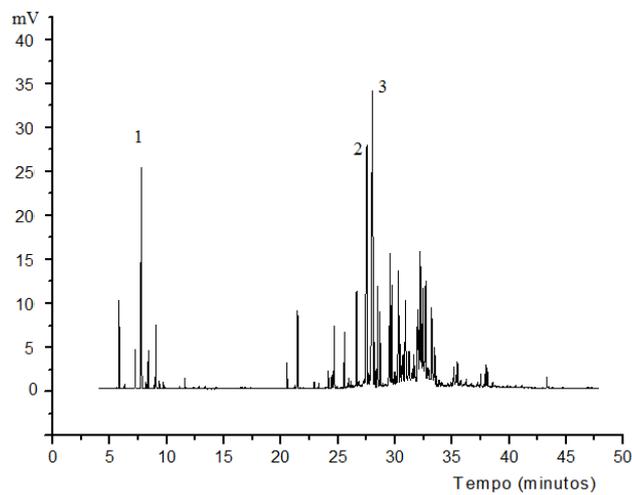


Figura 1C Cromatograma do óleo essencial das folhas frescas de *Siparuna guianensis*, (1) Mirceno; (2) Germancreno D; (3) Biciclogermancreno

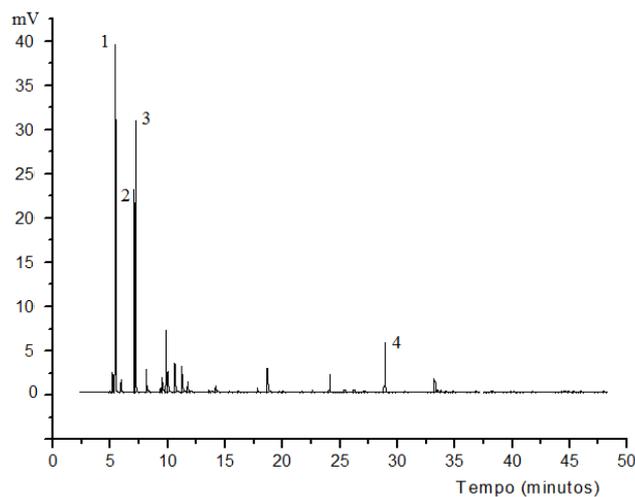


Figura 2C Cromatograma do óleo essencial das folhas frescas de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke, (1) α -Pino; (2) Sabineno; (3) β -Pino e (4) Biciclogermancreno

APÊNDICE D - Tabelas de análises de variância da atividade tripanocida dos óleos essenciais

Tabela 1D Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados de atividade tripanocida do óleo essencial de *C. dinisii* em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	7	15888,337	2269,762	345,658	0,000
erro	16	105,064	6,567		
Total corrigido	23	15993,401			
CV (%)	10,24				
Média geral	25,03				

Tabela 2D Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados de atividade tripanocida do óleo essencial de *S. guianensis* em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	7	25268,759	3609,821	772,016	0,000
erro	16	74,813	4,676		
Total corrigido	23	25343,563			
CV (%)	6,27				
Média geral	34,48				

APÊNDICE E - Gráficos da equação de regressão da atividade tripanocida dos óleos essenciais

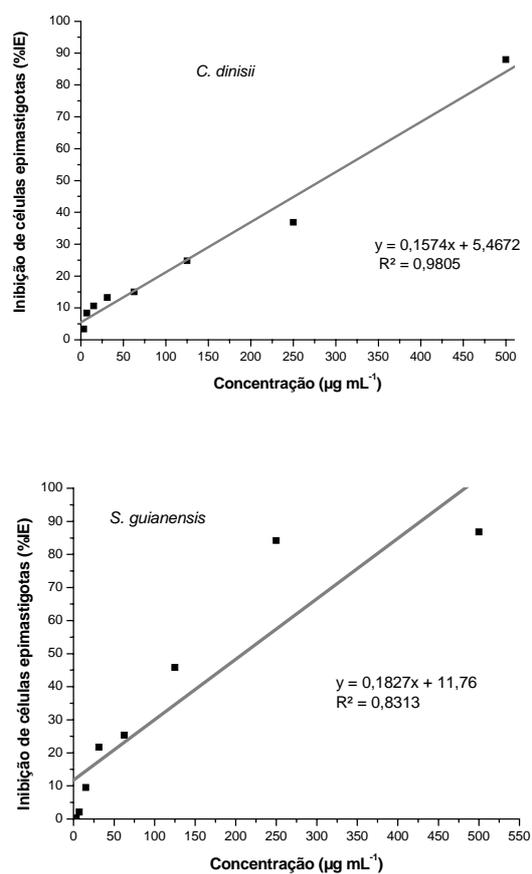


Figura 1 Equações de regressão para a porcentagem de inibição ocasionada pelos óleos essenciais de *C. dinisii* e de *S. guianensis* em função das concentrações

APÊNDICE F - Tabelas de análises de variância dos halos de inibição dos óleos essenciais sobre bactérias

Tabela 1F Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados dos halos de inibição do óleo essencial de *C. dinisii* sobre *L. monocytogenes* em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	7	0,843	0,120	289,000	0,000
erro	16	0,007	0,001		
Total corrigido	23	0,850			
CV (%)	28,82				
Média geral	0,07				

Tabela 2F Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados dos halos de inibição do óleo essencial de *C. dinisii* sobre *P. aeruginosa* em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	7	0,945	0,135	180,00	0,000
erro	16	0,020	0,001		
Total corrigido	23	0,965			
CV (%)	47,14				
Média geral	0,08				

Tabela 3F Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados dos halos de inibição do óleo essencial de *C. dinisii* sobre *S. aureus* em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	7	1,546	0,221	265,071	0,000
erro	16	0,013	0,001		
Total corrigido	23	1,560			
CV (%)	19,79				
Média geral	0,15				

Tabela 4F Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados dos halos de inibição do óleo essencial de *S. guianensis* sobre *E. coli* em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	7	0,747	0,107	256,000	0,000
erro	16	0,007	0,001		
Total corrigido	23	0,753			
CV (%)	30,62				
Média geral	0,07				

Tabela 5F Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados dos halos de inibição do óleo essencial de *S. guianensis* sobre *L. monocytogenes* em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	7	1,306	0,187	112,000	0,000
erro	16	0,027	0,002		
Total corrigido	23	1,333			
CV (%)	30,62				
Média geral	0,133				

Tabela 6F Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados dos halos de inibição do óleo essencial de *S. guianensis* sobre *S. aureus* em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	7	2,418	0,345	276,381	0,000
erro	16	0,020	0,001		
Total corrigido	23	2,438			
CV (%)	14,62				
Média geral	0,24				

APÊNDICE G - Tabelas de análises de variância dos halos de inibição dos óleos essenciais sobre fungos

Tabela 1G Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados dos halos de inibição do óleo essencial de *C. dinisii* sobre *A. flavus* em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	7	3,740	0,534	61,061	0,000
erro	16	0,14	0,009		
Total corrigido	23	3,88			
CV (%)	31,18				
Média geral	0,30				

Tabela 2G Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados dos halos de inibição do óleo essencial de *C. dinisii* sobre *A. carbonarius* em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	7	1,713	0,245	587,286	0,000
erro	16	0,007	0,001		
Total corrigido	23	1,720			
CV (%)	13,24				
Média geral	0,15				

Tabela 3G Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados dos halos de inibição do óleo essencial de *C. dinisii* sobre *A. niger* em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	7	3,066	0,438	210,257	0,000
erro	16	0,033	0,002		
Total corrigido	23	3,099			
CV (%)	12,89				
Média geral	0,35				

Tabela 4G Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados dos halos de inibição do óleo essencial de *C. dinisii* sobre *P. commune* em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	7	2,770	0,396	73,044	0,000
erro	16	0,087	0,005		
Total corrigido	23	2,856			
CV (%)	16,82				
Média geral	0,44				

Tabela 5G Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados dos halos de inibição do óleo essencial de *S. guianensis* sobre *A. flavus* em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	7	1,980	0,283	8,930	0,002
erro	16	0,507	0,032		
Total corrigido	23	2,486			
CV (%)	24,98				
Média geral	0,71				

Tabela 6G Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados dos halos de inibição do óleo essencial de *S. guianensis* sobre *A. carbonarius* em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	7	3,536	0,505	46,632	0,000
erro	16	0,173	0,011		
Total corrigido	23	3,710			
CV (%)	35,18				
Média geral	0,30				

Tabela 7G Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados dos halos de inibição do óleo essencial de *S. guianensis* sobre *A. niger* em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	7	2,912	0,416	62,393	0,000
erro	16	0,107	0,007		
Total corrigido	23	3,018			
CV (%)	18,49				
Média geral	0,44				

Tabela 8G Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados dos halos de inibição do óleo essencial de *S. guianensis* sobre *P. commune* em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	7	3,207	0,458	109,943	0,000
erro	16	0,067	0,004		
Total corrigido	23	3,733			
CV (%)	13,83				
Média geral	0,47				

APÊNDICE H – Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais sobre os micro-organismos estudados.

Tabela 1H Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de *C. dinisii* (CD) e *S. guianensis* (SG) sobre as bactérias avaliadas.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halo de inibição (mm)										
	<i>S. Cholerasuis</i>		<i>S. aureus</i>		<i>L. monocytogenes</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		
	CD	SG	CD	SG	CD	SG	CD	SG	CD	SG	
3,90	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
7,81	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
15,62	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
31,25	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
62,5	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
125	0,0 a	0,0 a	0,0 a	5,3 b	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
250	0,0 a	0,0 a	5,3 b	6,3 c	0,0 a	4,7 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
500	0,0 a	0,0 a	6,3 c	7,7 d	5,7 b	6,0 b	0,0 a	5,3 b	6,0 b	0,0 a	0,0 a
CL (100 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	30,6	32,0	24,3	26,0	30,6	16,3	13,3	16,3	20,0	17,7	

* Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra são iguais entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância, CL: cloranfenicol

Tabela 2H Valores médios dos halos de inibição dos óleos essenciais de *C. dinisii* (CD) e *S. guianensis* (SG) sobre os fungos avaliados.

Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halo de inibição (mm)								
	<i>A. niger</i>		<i>A. carbonarius</i>		<i>A. flavus</i>		<i>P. commune</i>		
	CD	SG	CD	SG	CD	SG	CD	SG	
3,90	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a
7,81	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	6,7 b	0,0 a	0,0 a
15,62	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	7,3 b	0,0 a	0,0 a
31,25	0,0 a	6,0 b	0,0 a	0,0 a	0,0 a	0,0 a	7,7 b	6,7 b	7,0 b
62,5	6,0 b	6,3 b	0,0 a	0,0 a	0,0 a	7,7 b	6,7 b	6,7 b	6,7 b
125	7,0 c	7,0 b	0,0 a	7,0 c	6,3 b	9,7 b	7,3 b	7,3 b	7,7 b
250	7,7 c	8,0 c	6,0 c	8,3 b	8,3 c	9,7 b	7,0 b	7,0 b	8,7 c
500	7,7 c	8,0 c	6,3 c	8,3 b	9,3 c	8,3 b	7,3 b	7,3 b	7,3 b
HP (20 $\mu\text{g mL}^{-1}$)	19	19,3	16,7	17,6	25,3	26	30,7	30,7	31,3

* Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra são iguais entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

APÊNDICE I - Tabelas de análises de variância das atividades citotóxicas.

Tabela 1I Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados de atividade citotóxica do óleo essencial de *C. dinisii*, pelo ensaio de MTT em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	6	26559,209	4426,535	5222,585	0,000
erro	14	11,866	0,848		
Total corrigido	20	26571,075			
CV (%)	1,46				
Média geral	62,85				

Tabela 2I Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados de atividade citotóxica do óleo essencial de *S. guianensis*, pelo ensaio de MTT em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	6	26363,587	4393,931	5101,830	0,000
erro	14	12,057	0,861		
Total corrigido	20	26375,644			
CV (%)	1,48				
Média geral	62,70				

APÊNDICE J - Gráficos da equação de regressão da atividade citotóxica dos óleos essenciais.

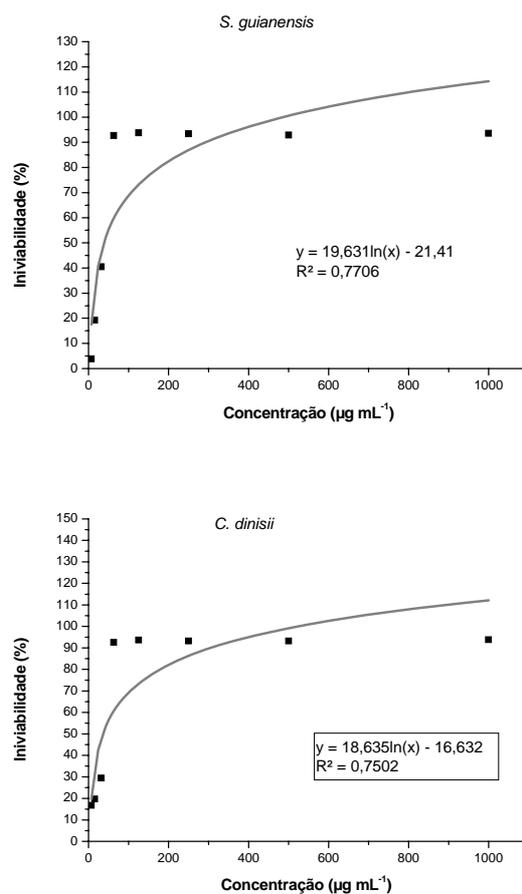


Figura 1J Equação de regressão para a porcentagem de inviabilidade de células VERO ocasionada pelo óleo essencial em função das concentrações

APÊNDICE K - Tabelas de análises de variância das atividades hemolíticas

Tabela 1K Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados de atividade hemolítica do óleo essencial de *C. dinisii*, para o hematócrito 10%, em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	3	2857,615	952,538	4,853	0,006
Blocos erro	3	7929,954	2643,318	13,466	0,000
	41	8047,826	196,288		
Total corrigido	47	18835,395			
CV (%)	27,54				
Média geral	50,88				

Tabela 2K Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados de atividade hemolítica do óleo essencial de *S. guianensis*, para o hematócrito 10%, em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	3	484,613	161,538	2,858	0,049
Blocos erro	3	2878,723	959,574	16,976	0,000
	41	2317,513	56,523		
Total corrigido	47	5680,850			
CV (%)	36,15				
Média geral	20,80				

Tabela 3K Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados de atividade hemolítica do óleo essencial de *C. dinisii*, para o hematócrito 0,15%, em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	3	54,662	18,221	0,743	0,533
Blocos erro	3	849,757	283,252	11,546	0,000
	41	1005,815	24,532		
Total corrigido	47				
CV (%)	6,20				
Média geral	79,84				

Tabela 4K Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores observados de atividade hemolítica do óleo essencial de *S. guianensis*, para o hematócrito 0,15%, em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	3	5572,291	1857,430	313,942	0,533
Blocos erro	3	3219,409	1073,136	181,381	0,000
	41	242,576	5,916		
Total corrigido	47	9034,276			
CV (%)	4,85				
Média geral	50,10				

APÊNDICE L – Valores médios da atividade hemolítica dos óleos essenciais.

Tabela 1L Atividade hemolítica dos óleos essenciais de *C. dinisii* e *S. guianensis*.

Concentração ($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	Hematócrito 10%		Hematócrito 0,15%	
	<i>C. dinisii</i>	<i>S. guianensis</i>	<i>C. dinisii</i>	<i>S. guianensis</i>
5	43,33 a	17,31 a	63,63 a	78,82 a
10	44,34 a	18,01 a	56,42 b	80,83 a
25	53,48 b	24,55 a	44,89 c	78,73 a
50	62,35 b	23,32 a	35,47 d	80,98 a

* Médias na mesma coluna seguidas de mesma letra são iguais entre si pelo teste de Scott-Knott a 5% de significância.

APÊNDICE M – Modelo do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para o consentimento das coletas de sangue.

Termo de Consentimento Livre e Esclarecido TCLE

(Capítulo IV, itens 1 a 3 da resolução 196/96 – Conselho Nacional de Saúde)

Nome: Milene Aparecida Andrade (Discente do Programa de Doutorado em Agroquímica - DQI).

I - TÍTULO DO TRABALHO EXPERIMENTAL: Óleos essenciais de *Cinnamodendron dinisii* Schwacke e *Siparuna guianensis* Aublet: composição química, caracterização das estruturas secretoras e potencial biológico.

Pesquisador(a) Responsável: Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso; (35) 3829-1202, e-mail: mcardoso@dqi.ufla.br

II - OBJETIVOS

Avaliar os efeitos de dois óleos essenciais, extraídos de plantas, sobre o DNA de células do sangue humano, cultivadas em laboratório, assim como avaliar o potencial destes óleos em romper as membranas de eritrócitos humanos (células sanguíneas sem núcleo), levando estas células à morte.

III- JUSTIFICATIVA

Óleos essenciais são amplamente utilizados pelo homem para diversos fins como, por exemplo, controle de bactérias, vírus, fungos, insetos e parasitas, e na composição de alimentos, medicamentos e cosméticos. Por meio deste trabalho será avaliado o potencial dos óleos essenciais em causar hemólise (lise de eritrócitos) e danos no DNA de células do sistema imunológico humano (linfócitos), na tentativa de compreender melhor a ação destes óleos sobre o organismo humano. Desta maneira, busca-se ampliar o entendimento sobre os efeitos destes óleos no organismo, visando propor formas de aplicação mais seguras para a saúde humana, agricultura e meio ambiente, uma vez que embora sejam amplamente utilizados, há relatos de constituintes de óleos essenciais indutores de hepatotoxicidade, genotoxicidade e carcinogênese.

IV - PROCEDIMENTOS DO EXPERIMENTO

AMOSTRA

Serão coletados **10 mL** (equivalente a uma xícara de café) **do seu sangue**, por profissional qualificado (Farmacêutico-Bioquímico, funcionário do ambulatório da UFLA e responsável pelas coletas de sangue em pacientes do referido ambulatório), através de punção na veia (no braço) realizada com coleta por vácuo (usando um Vacutainer), da mesma forma que se faz quando realizamos exames de sangue em clínicas especializadas e hospitais. Os materiais utilizados para a coleta do sangue serão todos estéreis, sendo devidamente descartados em lixo hospitalar após a coleta do sangue. O profissional responsável pela coleta do sangue usará equipamentos de proteção individual (avental, luvas e máscara) para minimizar o risco de contaminação

para você. Para participar da pesquisa você deve ter idade entre 18 e 35 anos, não fazer uso contínuo de medicamentos (ex: pessoas com hipertensão ou diabetes), não ser fumante, não trabalhar em condições de risco químico ou biológico e ter um histórico de boas condições de saúde para os últimos 3 meses, não tendo sido submetido a qualquer procedimento cirúrgico e/ou administração de medicamentos de tarja preta (ex: quimioterápicos e antibióticos) ou outras drogas que possam causar alterações nas células sanguíneas, invalidando os experimentos do projeto proposto. Caso consinta em participar da pesquisa seu sangue será coletado uma única vez, sendo utilizado para realizar todo o estudo mencionado acima com os óleos essenciais. Com isso encerra-se sua participação neste estudo. Você terá a garantia de receber uma cópia do TCLE e a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida a respeito do procedimento a que será submetido e de outras situações relacionadas com a pesquisa. Os resultados da pesquisa ficarão à sua disposição caso tenha interesse, e você poderá procurar os responsáveis pela pesquisa a qualquer momento e também lhe garantimos que seu nome será mentido em sigilo.

ANÁLISES

Teste hemolítico: Este teste avalia o potencial dos óleos em causar lesões à membrana plasmática celular, *in vitro*.

Teste do cometa: Este teste permitirá avaliar a presença ou não fragmentos de DNA resultantes de danos induzidos pelos óleos essenciais, *in vitro*.

Teste do micronúcleo: Este teste permitirá avaliar a presença ou ausência de danos induzidos pelos óleos essenciais no DNA de linfócitos humanos na primeira geração celular após o tratamento, *in vitro*.

V - RISCOS ESPERADOS

O procedimento de coleta de sangue será realizado de forma que você sinta o mínimo de desconforto possível durante e/ou após a coleta. A coleta de sangue poderá causar algumas pequenas manifestações no local da injeção, como um pequeno inchaço, vermelhidão ou formação de mancha roxa, ou seja, sinais comuns em coletas rotineiras de sangue e de baixo risco à saúde do doador. A aluna de pós-graduação responsável pela execução do projeto acompanhará você até o ambulatório para certificar-se de seu bem estar antes, durante e após a coleta, liberando-o somente após sua confirmação de estar apto a retomar a suas atividades pessoais. Caso você sinta mal estar (ex: devido à diminuição da pressão sanguínea arterial) antes, durante ou após a coleta do sangue, a aluna responsável pela pesquisa buscará auxílio médico para você.

VI – BENEFÍCIOS

A sua participação no estudo não acarretará em custos e não será disponibilizado para você qualquer compensação financeira adicional, exceto no caso de danos decorrentes da pesquisa. Com sua participação nesta pesquisa você estará contribuindo com a conclusão dos estudos referentes ao projeto de doutorado da aluna Milene Aparecida Andrade, no qual se pretende obter informações sobre a segurança do uso destes óleos essenciais para o consumo humano, uma vez que será possível avaliar durante os estudos, se os óleos essenciais são capazes de produzir algum dano no DNA de linfócitos ou nos eritrócitos de seu sangue.

VII - RETIRADA DO CONSENTIMENTO

Você tem a liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem precisar se justificar e sem qualquer prejuízo ao atendimento a que poderia ser submetido no ambulatório ou em qualquer departamento da UFLA. Você poderá também, após terem sido realizados os ensaios com seu sangue, retirar seu consentimento acerca da publicação dos resultados obtidos durante as análises com o mesmo.

VIII – CRITÉRIOS PARA SUSPENDER OU ENCERRAR A PESQUISA

A pesquisa com o sangue de qualquer voluntário somente será suspensa caso ele informe posteriormente à coleta do sangue ter se esquecido de comunicar alguma informação importante à equipe, como por exemplo, sua exposição prolongada a materiais tóxicos e/ou infecciosos, o consumo recente de medicamentos, álcool, cigarro ou outras drogas ou ainda qualquer outra ação que venha a interferir nos resultados das análises.

Tendo em vista os termos apresentados neste documento convidamos você a participar da pesquisa com a doação de uma pequena alíquota de sangue.

IX - CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO PACIENTE MAIOR DE IDADE

Eu _____
certifico que, tendo lido as informações acima e sido suficientemente esclarecido (a) de todos os itens, estou plenamente de acordo com a realização dos experimentos. Assim, declaro que concordo inteiramente com as condições que me foram apresentadas e que, livremente, manifesto a minha vontade de participar do estudo exposto acima, autorizando a coleta de uma alíquota de meu sangue para a execução do mesmo.

Lavras, _____ de _____ de 20 ____.

NOME

(legível) _____

RG _____

ASSINATURA _____

Telefone: _____

ATENÇÃO: A sua participação em qualquer tipo de pesquisa é voluntária. Em caso de dúvida quanto aos seus direitos, escreva para o Comitê de Ética em Pesquisa em seres humanos da UFLA. Endereço – Campus Universitário da UFLA, Pró-reitoria de Pesquisa, COEP, caixa postal 3037. Telefone: **3829-5182**, falar com Andréa.

No caso de qualquer emergência entrar em contato com a pesquisadora responsável no **Departamento de Química** da Universidade Federal de Lavras. Telefones de contato: **(35) 38291271** (secretaria do departamento) ou **(35) 38291202** (laboratório da pesquisadora responsável).

APÊNDICE N - Tabelas de análises de variância dos danos causados pelos óleos essenciais ao DNA de linfócitos humanos.

Tabela 1N Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores de porcentagem de dano 0 observado para o óleo essencial de *C. dinisii*, em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	4	4970,107	1242,527	21,950	0,000
Blocos	4	596,551	149,138	2,635	0,0729
erro	16	905,716	56,607		
Total corrigido	24	6472,374			
CV (%)	31,72				
Média geral	23,72				

Tabela 2N Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores de porcentagem de dano 1 observado para o óleo essencial de *C. dinisii*, em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	4	1741,485	435,372	3,168	0,043
Blocos	4	529,707	132,427	0,964	0,454
erro	16	2198,649	137,416		
Total corrigido	24	4469,840			
CV (%)	29,61				
Média geral	39,59				

Tabela 3N Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores de porcentagem de dano 2 observado para o óleo essencial de *C. dinisii*, em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	4	2334,195	583,549	9,415	0,001
Blocos	4	130,995	32,749	0,528	0,717
erro	16	991,671	61,979		
Total corrigido	24	3456,862			
CV (%)	41,70				
Média geral	18,88				

Tabela 4N Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores de porcentagem de dano 3 observado para o óleo essencial de *C. dinisii*, em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	4	1620,115	405,029	9,591	0,001
Blocos	4	733,538	183,384	4,343	0,015
erro	16	675,662	42,228		
Total corrigido	24	3029,315			
CV (%)	62,73				
Média geral	10,36				

Tabela 5N Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores de porcentagem de dano 4 observado para o óleo essencial de *C. dinisii*, em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	4	1234,951	308,738	20,584	0,000
Blocos	4	196,062	49,016	3,268	0,039
erro	16	239,982	14,999		
Total corrigido	24	1670,996			
CV (%)	52,91				
Média geral	7,32				

Tabela 6N Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores de porcentagem de dano 0 observado para o óleo essencial de *S. guianensis*, em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	4	2287,805	571,951	10,398	0,002
Blocos	4	618,738	154,685	2,812	0,061
erro	16	880,107	55,006		
Total corrigido	24	3786,650			
CV (%)	20,97				
Média geral	35,36				

Tabela 7N Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores de porcentagem de dano 1 observado para o óleo essencial de *S. guianensis*, em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	4	1196,116	299,029	3,941	0,021
Blocos	4	240,249	60,062	0,791	0,548
erro	16	1214,152	75,884		
Total corrigido	24	2650,516			
CV (%)	18,29				
Média geral	47,63				

Tabela 8N Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores de porcentagem de dano 2 observado para o óleo essencial de *S. guianensis*, em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	4	928,889	232,222	16,061	0,000
Blocos	4	184,667	46,1667	3,193	0,042
erro	16	231,333	14,4583		
Total corrigido	24	1344,889			
CV (%)	40,45				
Média geral	9,40				

Tabela 9N Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores de porcentagem de dano 3 observado para o óleo essencial de *S. guianensis*, em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	4	586,884	146,721	12,434	0,000
Blocos	4	69,307	17,327	1,468	0,258
erro	16	188,804	11,800		
Total corrigido	24	844,996			
CV (%)	76,56				
Média geral	4,487				

Tabela 10N Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores de porcentagem de dano 4 observado para o óleo essencial de *S. guianensis*, em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	4	546,622	136,656	40,894	0,000
Blocos	4	17,244	4,311	1,290	0,315
erro	16	53,467	3,342		
Total corrigido	24	617,333			
CV (%)	57,13				
Média geral	3,19				

APÊNDICE O - Tabelas de análises de variância das unidades arbitrárias (UAs) calculadas para óleos essenciais.

Tabela 1 O Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores de unidades arbitrárias (UAs) calculadas para o óleo essencial de *S. guianensis*, em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Concentração	4	36071,016	9017,754	25,082	0,000
Blocos	4	3903,040	975,760	2,714	0,067
erro	16	5752,404	359,525		
Total corrigido	24	45726,460			
CV (%)	20,46				
Média geral	92,69				

Tabela 2O Análise de variância com aplicação do teste F (5%) para os valores de unidades arbitrárias (UAs) calculadas para o óleo essencial de *C. dinisii*, em relação à sua concentração.

FV	GL	SQ	QM	Fc	Pr>Fc
Tratamentos	4	78912,642	19728,160	25,572	0,000
Blocos	4	15045,627	3761,407	4,876	0,009
erro	16	12343,796	771,487		
Total corrigido	24	106302,065			
CV (%)	20,17				
Média geral	137,71				

APÊNDICE P – Valores médios da frequência de danos ocasionados pelos dos óleos essenciais ao DNA de linfócitos.

Tabela 1P Frequência de danos ocasionada pelos óleos essenciais de *C. dinisii* e *S. guianensis*

Concentração ($\mu\text{L mL}^{-1}$)	Frequência de danos (%)	
	<i>C. dinisii</i>	<i>S. guianensis</i>
5	67,07	54,67
25	88,80	66,43
50	92,07	69,67
C-	54,67	54,67
C+	78,73	78,73