



LÍVIA GONTIJO LOURA

**VARIAÇÃO SAZONAL, HORÁRIO DE
COLETA E POTENCIAL
ANTIMICROBIANO DO ÓLEO
ESSENCIAL DE
Cinnamodendron dinisii Swacke**

**LAVRAS - MG
2015**

LÍVIA GONTIJO LOURA

**VARIAÇÃO SAZONAL, HORÁRIO DE COLETA E POTENCIAL
ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Cinnamodendron dinisii Swacke**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares do Departamento de Agricultura, área de concentração Bioatividade de Plantas Medicinais, para a obtenção do título de Mestre.

Orientadora

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci

**LAVRAS - MG
2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pela própria autora.

Loura, Lívia Gontijo.

Variação sazonal, horário de coleta e potencial antimicrobiano
do óleo essencial de *Cinnamodendron dinisii* Swacke / Lívia
Gontijo Loura. – Lavras: UFLA, 2015.

64 p.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de
Lavras, 2015.

Orientadora: Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Bibliografia.

1. *Cinnanodendron dinisii*. 2. Bactéria. 3. Sazonalidade. 4.
Atividade antimicrobiana. I. Universidade Federal de Lavras. II.
Título.

LÍVIA GONTIJO LOURA

**VARIAÇÃO SAZONAL, HORÁRIO DE COLETA E POTENCIAL
ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Cinnamodendron dinisii Swacke**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Plantas Mediciniais, Aromáticas e Condimentares, área de concentração Bioatividade de Plantas Mediciniais, para a obtenção do título de Mestre.

APROVADA em 07 de agosto de 2015

Dr. Smail Aazza
Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

Universidade do Algarve-Portugal
UFLA

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Orientadora

**LAVRAS – MG
2015**

*Aos meus pais Marcelino Rocha Loura e Tânia Mara Fonseca Gontijo
Loura;
Aos meus irmãos Marcelo Gontijo Loura e Clarissa Gontijo Loura*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus pelo Dom da Vida e a Santa Terezinha por alimentar a minha fé e a paz no meu coração.

Aos meus pais Tania e Marcelino por todo o apoio e incentivo, emocional e financeiro, nesta jornada. Meus exemplos de vida, meus companheiros e acima de tudo meus amigos. Obrigada por acreditar, por apoiar, por torcer, por sofrer e por sorrir junto comigo, sempre. Amo vocês!

À minha irmã Clarissa, primeiramente pela acolhida, e por todo amor e carinho que sempre me dedicou.

Ao meu irmão Marcelo por todo o apoio e torcida pelo meu desenvolvimento.

Ao amigo Filipe pela amizade, companheirismo e ajuda estatística.

Às amigas do mestrado, Giselly, Nelma, Alline, Lucinda e Cinara pela amizade, pela ajuda no meu trabalho, por terem sofrido e comemorado junto comigo. Vocês foram essenciais nesta caminhada.

A minha orientadora Suzan Kelly Vilela Bertolucci pela orientação.

Aos funcionários do Laboratório de Fitoquímica do DAG, Vanderleia, Paulinho, Dico e especialmente ao Luizinho e a Annete por toda ajuda e por ter proporcionado a realização deste trabalho.

Aos todos meus familiares e amigos pela torcida e apoio incondicional.

A todos os amigos do programa de pós-graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares.

À Dra. Andréia Fonseca Silva, curadora do Herbário PAMG, pela identificação botânica da espécie e gentil colaboração neste trabalho.

À professora Dra. Ana Gabriela Reis Solano pela gentileza, dedicação e disponibilidade, sendo imprescindível para a realização deste trabalho.

À Universidade Federal de Lavras, Programa de Pós-Graduação em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares e aos professores pela oportunidade.

Meus sinceros agradecimentos!!!

RESUMO

Cinnamodendron dinisii é uma espécie vegetal brasileira, popularmente conhecida como “pimenteira” e “para tudo”. Esta espécie é utilizada na medicina popular como “panacéia”, porém são escassos os estudos a seu respeito. É rica em óleos essenciais, compostos principalmente por monoterpenos, dos quais muitos possuem ação antimicrobiana. Sabe-se que o teor e a composição química dos óleos essenciais estão sujeitos às variações provocadas pelas condições climáticas e estádios vegetativos. Devido a estas variações é importante determinar as melhores condições de horário de coleta e época do ano. Neste estudo, objetivou-se avaliar a influência das variações sazonais e do horário de colheita sobre o teor de óleo essencial extraído de folhas frescas de *C. dinisii*, bem como o seu potencial antimicrobiano. Foram estudadas as variações do teor e da composição do óleo essencial extraído das folhas frescas da pimenteira coletadas nas 4 estações do ano em 4 horários distintos (8, 11, 14 e 17 h). O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação e os teores ($\text{g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$ de folhas frescas) foram determinados e a composição química analisada por CG-DIC e CG-EM. Para as determinações das Concentrações Inibitória Mínima (CIM), Mínima Bactericida (CMB) e Fungicida Mínima (CFM) foi empregada a técnica de microdiluição. Os microrganismos avaliados foram *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella* Typhimurium e *Candida albicans* ATCC 10231. Não foram observadas diferenças significativas nos teores de óleo essencial de *C. dinisii* nos diferentes horários de coletas, porém nas estações do inverno ($0,30\text{-}0,37\text{ g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) e primavera ($0,31\text{-}0,36\text{ g}\cdot 100\text{ g}^{-1}$) o teor do óleo foi máximo. Os principais constituintes identificados foram o α -pineno, β -pineno, 1,8-cineol, terpinen-4-ol, biciclogermacreno, espatulenol e óxido de cariofileno. O óleo essencial de *C. dinisii* apresentou atividade antibacteriana, porém demonstrou maior atividade anti-*Candida*, com CIM e CFM de $0,56\text{ }\mu\text{g/ml}$ de óleo essencial para a levedura.

Palavras-chave: *Cinnamodendron dinisii*. Sazonalidade. *Candida albicans*. Atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Cinnamodendron dinisii is a Brazilian plant species, popularly known as "pepper" and "for all". This species is used in folk medicine as a "panacea", but are a few studies about it. It is rich in essential oils, mainly composed by monoterpenes, many of which have antimicrobial activities. It is known that content and chemical composition of essentials oils are subject to variations caused by climate conditions and vegetative stages. Because of these variations is important to determine the best harvest and period conditions. This study aimed to evaluate the influence of seasonal variations and harvesting time on the content of essential oil extracted from fresh leaves of *C. dinisii* and its antimicrobial potential. We studied the changes in the content and composition of the oil extracted from fresh leaves of pepper collected in four seasons at four different times (8, 11, 14 and 17h). We studied changes in the content and composition of the oil extracted from fresh leaves of pepper collected in four seasons at four different times (8, 11, 14 and 17 h). The essential oil was extracted by hydrodistillation and its contents (g.100 g⁻¹ of fresh leaves) determined and chemical composition analyzed by GC-FID and GC-MS. Minimum Inhibitory Concentrations (MIC), Minimum bactericidal (CMB) and fungicidal Minimum (CFM) were evaluated by microdilution technique. Target microorganisms were *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella* Typhimurium and *Candida albicans* ATCC 10231. No significant differences were observed in the essential oil content of *C. dinisii* at different harvest times, but in the winter (0, 30 to 0.37 g.100 g⁻¹) and spring (from 0.31 to 0.36 g.100 g⁻¹) seasons the oil content were maximum. The main identified constituents were α -pinene, β -pinene, 1,8-cineole, terpinen-4-ol, bicyclogermacrene, spathulenol, and caryophyllene oxide. The essential oil of *C. dinisii* presented antibacterial activity, but showed greater anti-*Candida* activity with MIC and MFC of 0,56 μ g / ml of essential oil to the yeast.

Key words: *Cinnanodendron dinisii*. Bacteria. Seasonality. Antimicrobial activity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Ilustração dos possíveis mecanismos de ação antimicrobiana dos óleos essenciais	18
Figura 2 Hábito da planta <i>Cinnamodendron dinisii</i> . Espécie pertencente ao Horto de Plantas Medicinais do DAG/UFLA, Lavras, 2014.	23
Figura 3 (1) -Limoneno, (2) - α -terpineol, (3) – borneol, (4) - α -pineno, (5) -drimenol	25
Figura 4 (6) β -pineno, (7) sabineno, (8) biciclogermacreno.	25
Figura 5 (9) Cinamodia, (10) 6 β -acetoxisodrimenina: 6 β -OAcugandensolídeo: 6 β -OAc, 7 α -OHfutronolídeo: 7 β -OH, (11) Capsicodendrina, (12) cinamosmolídeo.	26
Figura 6 (13) poligodial, (14) isopoligodial, (15) mukaadial, (16) poligonona.....	27
Figura 7 Teores dos óleos essenciais das folhas frescas de <i>Cinnamodendron dinisii</i> em função da variação sazonal e horário de colheita.....	47
Figura 8 Variações na porcentagem dos componentes majoritários presentes no óleo essencial das folhas de <i>C. dinisii</i> em função da sazonalidade e horário de coleta	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Dados climatológicos de temperatura, precipitação, umidade relativa do ar e radiação na cidade de Lavras-MG, entre os meses de Março de 2014 e Fevereiro de 2015. UFLA, 2015	41
Tabela 2 Composição química dos óleos essenciais de folhas frescas de <i>Cinnamodendron dinisii</i> coletadas em diferentes estações e horários ...	50
Tabela 3 Resultados do teste de microdiluição do óleo de <i>C. dinisii</i> frente a alguns microrganismos.	57

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	11
1 INTRODUÇÃO.....	11
2 REFERENCIAL TEÓRICO.....	13
2.1 Óleos essenciais.....	13
2.2 Influência da variação sazonal e horário de coleta no teor e composição química de óleos essenciais	14
2.3 Óleos essenciais na busca de novos agentes antimicrobianos	15
2.4 Microorganismos estudados.....	19
2.4.1 Bactérias	19
2.4.2 Fungos.....	21
2.5 Espécie vegetal em estudo: <i>Cinnamodendron dinisii</i>	22
2.5.1 Composição química de <i>Cinnamodendron dinisii</i>	24
2.5.2 Propriedades biológicas da espécie <i>Cinnamodendron dinisii</i>	27
REFERÊNCIAS.....	29
CAPÍTULO 2	37
RESUMO	38
ABSTRACT	39
1 INTRODUÇÃO.....	40
2 MATERIAIS E MÉTODOS	41
2.1 Material vegetal.....	41
2.2 Variação sazonal e horário de coleta	42
2.3 Análise Cromatográfica do óleo de <i>Cinnamodendron dinisii</i>	43
2.4 Ensaio da atividade antimicrobiana <i>in vitro</i>	44
2.4.1 Extração e análise do óleo essencial	44
2.4.2 Microrganismos estudados.....	45
2.4.3 Ensaio antimicrobiano.....	45
3 RESULTADOS E DISCUSSÃO	46
3.1 Avaliação sazonal e horário de coleta	46
3.2 Análises Cromatográficas	48
3.3 Atividade antimicrobiana.....	56
4 CONCLUSÃO.....	59
REFERÊNCIAS.....	61

CAPÍTULO 1

1 INTRODUÇÃO

Plantas medicinais são utilizadas por grande parte da população mundial, como recurso para o tratamento, prevenção e cura de diversas enfermidades (CARNEIRO et al., 2014). O reino vegetal, devido sua enorme diversidade, possui uma infinidade de moléculas biologicamente ativas que podem promover a descoberta de fármacos. Assim, cada vez mais tem se intensificado os estudos em torno das plantas com potencial medicinal.

Óleos essenciais e extratos de plantas são usados na medicina popular para várias finalidades (NASCIMENTO et al., 2007). Os derivados das plantas podem indicar novas substâncias capazes de combater diversos microrganismos. Estas novas substâncias podem representar um tratamento menos tóxico e mais eficaz contra a resistência microbiana (PUPO et al., 2007).

Dentre os derivados vegetais utilizados e estudados pela sua ação antimicrobiana destacamos os óleos essenciais. Óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário das plantas, cuja produção sofre influência de fatores externos, como temperatura, pluviosidade, altitude e época estacional (PINTO; BERTOLUCCI, 2002). Fatores ambientais e genéticos influenciam no teor e na composição química dos óleos essenciais extraídos (GOBBO NETO; LOPES, 2007).

O Brasil possui uma das maiores diversidade vegetal do mundo, que representa um extenso campo de estudo de plantas com propriedades medicinais. A *Cinnamodendron dinsiii* Schwacke é uma espécie vegetal brasileira, pertencente à família *Canellaceae*, que ocorre entre os estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul (LORENZI, 2009). Esta espécie é popularmente conhecida

como “pimenteira” devido o sabor picante de suas cascas e como “pau para tudo” devido suas propriedades medicinais. Na medicina popular *C. dinisii* é utilizada como uma panacéia (REITZ, 1988), porém ainda são escassos os estudos em torno das suas propriedades medicinais. A pimenteira, assim como outras espécies da família Canellaceae é uma planta rica em óleos essenciais.

Desta forma este trabalho objetivou avaliar a influência da variação sazonal e do horário de colheita sobre teor e a composição química do óleo essencial extraído de folhas frescas de *Cinnamodendron dinisii*, bem como avaliar o potencial antimicrobiano deste óleo.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Óleos essenciais

Os óleos essenciais, também conhecidos como óleos voláteis, óleos etéreos ou essências, são definidos segundo a ISO (International Standard Organization) como produtos obtidos de partes de plantas, através da destilação por arraste a vapor d'água, ou pela expressão de pericarpo ou de frutos cítricos. Em geral são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas.

A denominação dada a estes óleos se deve as suas características físico químicas. São considerados óleos por serem, geralmente, líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente. Conhecidos como óleos voláteis devido sua volatilidade, chamados de essência devido seu odor forte e muitas vezes agradável e considerados óleos etéreos por serem solúveis em solventes orgânicos como o éter (SIMÕES et al., 2001).

Esta classe de compostos químicos são produzidos por diversas estruturas especializadas das plantas, tais como glândulas, pelos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas, canais oleíferos ou bolsas lisígenas ou esquizolisígenas, dependendo da família a que pertence à espécie em questão (OLIVEIRA; AKISSUE, 2009). Os óleos essenciais podem estar presentes em diferentes órgãos da planta, como nas folhas, flores, frutos, cascas dos caules, brotos, rizomas ou ainda nas sementes. Porém, os óleos essenciais obtidos de diferentes órgãos de uma mesma planta podem apresentar composição química, características físico-químicas e odores diferentes (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Os óleos essenciais são derivados do metabolismo secundário das plantas e possuem composição química complexa, podendo seus constituintes químicos serem agrupados em duas grandes classes: (1) derivados de

terpenóides, formados através da rota do acetato-ácido mevalônico ou da via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) e (2) compostos aromáticos formados através da rota do ácido chiquímico, os fenilpropanoídes (DESCHAMPS et al., 2003; ROBBERS; SPEEDIE; TYLER, 1997). Estes compostos ocorrem em diferentes concentrações em um óleo essencial, sendo que, geralmente, um deles é o composto majoritário, chegando a representar 80% ou mais da composição do óleo essencial, outros em menores teores e alguns aparecendo como quantidades traço (SIMÕES; SPITZER, 2007).

Estes óleos estão relacionados especialmente com a proteção das plantas exercendo atividade inseticida e antimicrobiana. Devido a essas propriedades os óleos essenciais são cada vez mais empregados na farmacologia. Vários estudos têm apontado propriedades terapêuticas dos óleos, como as atividades: antiviral, antiespasmódica, analgésica, antimicrobiana, cicatrizante, expectorante, relaxante, antisséptica das vias respiratórias, larvicida, vermífuga e antiinflamatória (SIQUI, 2000).

2.2 Influência da variação sazonal e horário de coleta no teor e composição química de óleos essenciais

A produção dos metabólitos secundários, incluindo os óleos essenciais, representa uma resposta da planta às condições ambientais e genéticas a que está exposta (GOBBO NETO; LOPES, 2007).

A produção dos metabólitos secundários, quando submetida a estímulos ambientais está sob o controle simultâneo de dois padrões de resposta. Um de maior dimensão e mais lento provocado pelas variações climáticas sazonais, e outro de menor alteração, porém mais rápido influenciado pelas flutuações climáticas diárias (LUZ; EHLERT; INNECCO, 2009). Fatores externos, como

temperatura, pluviosidade, altitude e época estacional, interferem, de forma significativa na elaboração desses compostos (PINTO; BERTOLUCCI, 2002).

A época do ano e o horário de coleta do material vegetal influenciam no teor de óleo essencial extraído. Segundo Gobbo Neto e Lopes (2007), a época do ano e o horário de coleta da planta podem influenciar no rendimento e na composição química do seu óleo essencial.

Em estudos com a *Hyptis marrubioides*, Botrel et al. (2010) observaram maiores teores de óleo extraído das folhas da planta no verão comparado as outras demais estações. Também foram observadas diferenças quantitativas na composição química deste óleo nas diferentes estações do ano.

A influência do horário de coleta do material vegetal sobre o rendimento do óleo essencial foi demonstrado em estudos com *Melissa officinalis*. Segundo Blank et al. (2005), o horário de colheita das folhas de *M. officinalis* influenciou na composição química e no rendimento do seu óleo essencial. O maior teor desse óleo foi observado na extração do mesmo das folhas frescas de *M. officinalis*, que foram cultivadas em seu habitat natural, ou seja, no campo e colhidas às 17 horas.

Paulus et al. (2013) estudaram a influencia sazonal e o horário de coleta sobre o óleo essencial de *Aloysia triphylla*. Estes autores demonstraram maior rendimento do óleo no mês de fevereiro em coletas as 16 e 18 h se comparados a todos os outros meses do ano e horários de coletas estudados (8, 11 e 14h).

2.3 Óleos essenciais na busca de novos agentes antimicrobianos

Óleos essenciais e extratos de plantas há muito tempo têm sido usados na medicina popular com diversas finalidades entre elas, como antissépticos (NASCIMENTO et al., 2007). Estudos já comprovaram que os óleos essenciais

são eficientes no controle do crescimento de vários microrganismos, incluindo bactérias, fungos filamentosos e leveduras (SANTOS, 2011).

Segundo Almeida et al. (2013) o óleo essencial extraído de folhas de *Cymbopogon citratus* apresentou atividade microbiostática e microbicida sobre cepas de *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* e *Candida* spp. Millezi et al. (2012) também demonstraram a atividade antimicrobiana do óleo extraído das folhas desta mesma espécie. Neste estudo, o óleo do *C. citratus* apresentou atividade antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella* Enteritides S64 e *Pseudomonas aeruginosa*. Santurio et al. (2011) demonstrou a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* sobre a *E. coli* e *S. aureus*. Geromini et al. (2012) verificaram que os óleos essenciais extraídos de *Lippia alba* e *Ocimum gratissimum* possuem potencial inibitório sobre *E. coli*, *Candida albicans* e *S. aureus*. Gazim et al. (2010) demonstraram a sensibilidade de *S. aureus*, *Bacillus subtilis* e *C. albicans* frente ao óleo essencial de *Tetradenia riparia*.

Diversos mecanismos são considerados para explicar a ação antimicrobiana dos óleos essenciais. Esta atividade está relacionada à característica química e as quantidades dos componentes deste óleo (NAZZARO et al., 2013).

A atividade antimicrobiana exercida pelos óleos essenciais por estar relacionada ao dano causado à integridade da membrana celular pelos componentes lipofílicos do óleo essencial (COWAN, 1999). Em se tratando de bactérias, as Gram-negativas são mais resistentes aos óleos essenciais do que as Gram-positivas (TROMBETTA et al., 2005), devido às diferenças estruturais das paredes celulares (NAZZARO et al., 2013).

O controle da permeabilidade exercido por membranas celulares é indispensável para muitas funções das células, incluindo a manutenção do estado

de energia da célula, o transporte de solutos e a regulação metabólica (NAZZARO et al., 2013). Assim, a alteração da permeabilidade da membrana provoca perda de íons, redução do potencial da membrana, (DI PASQUA et al., 2006; ULTEE; BENNINK; MOEZELAAR, 2002) e perda do conteúdo intracelular, o que altera o equilíbrio celular, podendo levar à liberação de macromoléculas e à lise celular (COX et al., 2000; LAMBERT et al., 2001; NAZZARO et al., 2013; OUSSALAH et al., 2006).

Os óleos essenciais ainda são capazes de causar coagulação do citoplasma, danificar lipídios e proteínas e afetar a atividade geral da célula, como controle da pressão de turgor, transporte de solutos e regulação do metabolismo, como síntese de RNA, DNA, proteínas e polissacarídeos (ULTEE; BENNINK; MOEZELAAR, 2002).

A figura 1 ilustra alguns dos mecanismos de ação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Estes mecanismos, na maioria das vezes não atuam isoladamente e sim em conjunto (NAZZARO et al., 2013).

Rahman e Kang (2009) relataram que o risco de que microrganismos patogênicos desenvolvam resistência aos óleos essenciais e extratos vegetais são muito baixos, uma vez que estes produtos contêm uma mistura de substâncias antimicrobianas que atuam por meio de diversos mecanismos. Sendo uma característica benéfica e vantajosa dos produtos derivados de plantas sobre outros agentes antimicrobianos. Dois fatos relevantes têm alavancado as pesquisas em buscas de novos agentes antimicrobianos, especialmente aqueles derivados de plantas: a crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos presentes no mercado e as dificuldades impostas pelo tratamento com medicamentos antifúngicos atuais (CLEFF et., 2012).

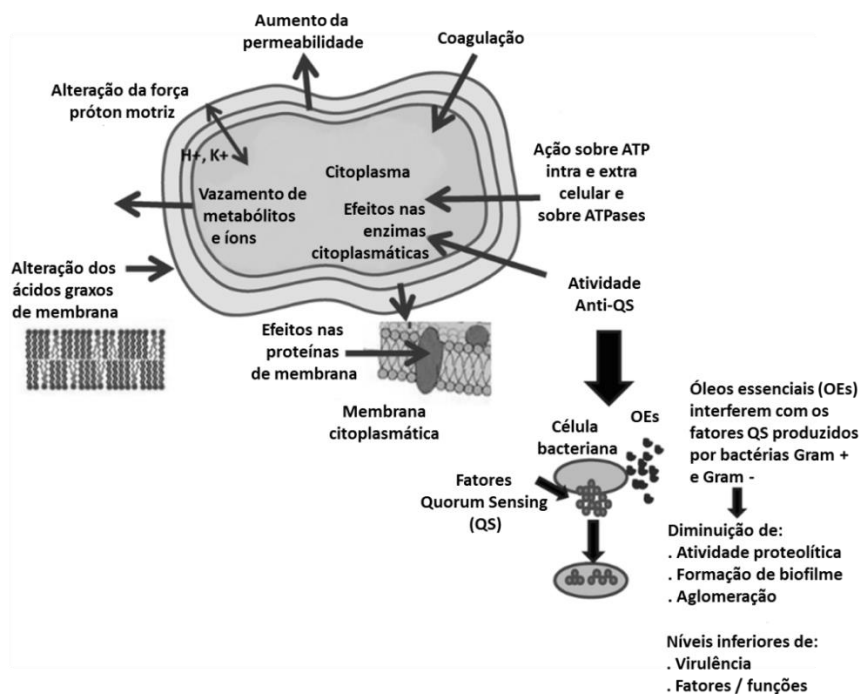


Figura 1 Ilustração dos possíveis mecanismos de ação antimicrobiana dos óleos essenciais. Fonte: Traduzido de Nazzaro et al. (2013)

Apesar do crescente número de novos e mais potentes antibióticos no mercado, a resistência microbiana a essas substâncias também aumentou consideravelmente nos últimos anos. As bactérias adquirem e transferem genes de resistência a antibióticos, propagando esta resistência e dificultando o combate às mesmas (SILVA, 2010).

As infecções fúngicas também têm representado um sério problema de saúde, sendo os fungos dermatófitos e a levedura *Candida* spp os patógenos mais frequentes (DUARTE, 2006). Com frequência, as infecções fúngicas são de difícil tratamento, uma vez que já se observa resistência dos agentes etiológicos à ação de antifúngicos (LIMA et al., 2006).

Diante deste quadro, aumentou-se o interesse no uso de derivados vegetais no combate destes microrganismos (RIBEIRO et al., 2012). Estes compostos podem representar a solução para o tratamento das infecções resistentes.

2.4 Microorganismos estudados

Dentre os microrganismos de interesse para a saúde pública, destacamos as espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e a *Salmonella*, importantes agentes causadores de enfermidades em seres humanos, como as gastroenterites e toxinfecções alimentares (JAY, 2005; MEIRA et al., 2012; PEREIRA et al., 2014). Além destes microrganismos destacam-se a *Candida albicans*, uma levedura de difícil tratamento que tem se tornado cada vez mais frequente na população.

2.4.1 Bactérias

Staphylococcus aureus é uma bactéria que se apresenta na forma de cocos Gram-positivos, catalase-positiva, de aproximadamente de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro. São encontrados no ambiente de circulação do ser humano, sendo o homem e os animais seus principais reservatórios. É um microrganismo mesófilo, entretanto, estudos comprovam que pode crescer em ampla margem de temperaturas, tendo como limite mínimo e máximo 6,5°C e 48,5°C. Seu pH ótimo para crescimento varia de 6 a 7, podendo crescer entre valores de 4 a 10 (JAY, 2005).

Esta bactéria faz parte da microbiota humana, porém pode provocar diversas patologias como infecções simples, acnes e furúnculos, e até mesmo infecções graves, como pneumonia, meningite, endocardite e septicemia. *S.*

aureus era facilmente combatido por antibióticos, porém devido a sua capacidade de aquisição gênica tornou-se uma das espécies de maior importância no quadro das infecções hospitalares e comunitárias (SANTOS et al., 2007).

As doenças provocadas por *S. aureus* podem ser decorrentes da invasão direta dos tecidos, de bacteremia primária ou, exclusivamente, pela ingestão das toxinas que esta bactéria produz nos alimentos (SANTOS et al., 2007). *S. aureus* tem a capacidade de produzir enzimas extracelulares como coagulase, termonuclease e lipase, consideradas fatores de virulência, sendo também empregadas para a sua identificação entre outras espécies de estafilococos (JAY, 2005). As enterotoxinas estafilocócicas são um grupo heterogêneo de proteínas de cadeia simples, de baixo peso molecular (28.000 a 35.000 D), sendo estas classificadas de acordo com as suas propriedades antigênicas (FUEYO et al., 2001). Estas toxinas apresentam como propriedades a atividade emética, a resistência ao calor e à pepsina, a similaridade na estrutura terciária e a superantigenicidade (DINGES et al., 2000).

Escherichia coli é a principal bactéria representante das enterobactérias, caracterizada por ser um bacilo Gram-negativo, não esporulado, anaeróbico facultativo, catalase negativo, oxidase negativo, capaz de fermentar a glicose, com produção de ácido e gás. Esta espécie faz parte do grupo dos coliformes termotolerantes, que possuem a característica de resistirem a elevadas temperaturas e que ocorre em fezes de animais de sangue quente, como, por exemplo, o homem. A presença de cepas não patogênicas em alimentos indica contaminação direta ou indireta de origem fecal, uma vez que é transmitida via fecal-oral (CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA - CVE, 2002).

Escherichia coli se refere a um grupo de bactérias em constante evolução que incluem tanto cepas patogênicas quanto comensais. A diversidade

patogênica de *E. coli* é resultante da inserção e deleção de genes que determinam diferentes propriedades de virulência para cada isolado bacteriano, sendo que apenas as combinações mais bem sucedidas perduraram e se tornaram tipos específicos de *E. coli* (WILLIANS; TORRES; LLOYD, 2010).

Salmonella Typhimurium pertencente à família *Enterobacteriaceae*, é um bacilo Gram-negativo de 0,5 a 0,7µm de largura por 2,0 a 5,0µm de comprimento. Esta bactéria move-se com o auxílio de flagelos peritricos, é não esporulada anaeróbia facultativa com metabolismo respiratório e fermentativo (JAY, 2005). É uma bactéria que causa doenças em humanos e animais, através do consumo e da ingestão de alimentos contaminados. As espécies desse gênero atravessam a camada epitelial intestinal, onde se proliferam e causam a infecção (SHINORAH et al., 2008).

A salmonelose causada por *Salmonella* é uma zoonose de importância mundial que preocupa as autoridades sanitárias. A ampla distribuição de *Salmonella* entre os animais e sua capacidade de sobreviver por longos períodos no meio ambiente contribuem para seu destacado papel em saúde pública (SANTURIO et al., 2007).

2.4.2 Fungos

As infecções fúngicas têm acometido os homens com maior frequência nos últimos anos. As leveduras do gênero *Candida* representam a principal espécie causadora destas infecções (PEDROSO et al., 2014)

Espécies de *Candida* estão usualmente envolvidas na etiologia de infecções micóticas, sendo a candidose considerada a mais frequente das micoses invasivas, representando 80% das infecções hospitalares (SOUZA

MATTEI, 2013). A candidíase caracteriza-se como a infecção fúngica causada especialmente pela *C. albicans* (LIMA et al., 2006).

As infecções causadas por *C. albicans* podem ser facilitadas por vários processos fisiológicos, patológicos ou traumáticos, sendo os mais comuns a imunossupressão por várias causas, como neutropenia, desnutrição e quimioterapia antineoplásica (MALUCHE; SANTOS, 2008). Além disso, a dificuldade de tratamento da candidíase, causada pelas limitações de uso de antifúngicos sintéticos, evidenciadas pelo aumento da resistência pelos microrganismos frente aos antifúngicos sintéticos, bem como pelas reações indesejadas apresentadas pelos usuários, novos agentes são propostos na tentativa de se adequar o tratamento das infecções fúngicas (CASTRO; LIMA, 2011).

2.5 Espécie vegetal em estudo: *Cinnamodendron dinisii*

Canellaceae representa uma família de plantas tropicais constituída por 21 espécies distribuídas em 6 gêneros distintos. No Brasil, ocorre somente o gênero *Cinnamodendron*, o qual é representado por 4 espécies *C. axillare* Endlicherex Walpers, *C. Sampaio anum* Occhioni, *C. occhionianum* F. Barros & J. Salazar; e *C. dinisii* Schwacke (BARROS; SALAZAR, 2009).

Cinnamodendron dinisii (Figura 2) popularmente conhecida como paratudo, pau-amargo, pau-para-tudo e pimenteira, possui a sinonímia botânica *Capsicodendron dinisii* Schwacke (LORENZI, 2009). Esta espécie é uma árvore de 10 a 23 m de altura, com copa oval-alongada, densa com folhas brilhantes. Possui tronco ereto, de 25 a 60 cm de diâmetro, com casca aromática, verrugosa e áspera. Esta árvore possui folhas simples, alternas, glabras, coriáceas, brilhantes, de margem levemente revoluta, de 3 a 8 cm de comprimento e 2 a 4 cm de largura, com pecíolo de 0,5 cm de comprimento. Suas flores são pequenas

e carnosas, de cor roxa, solitárias, ou raramente em grupos de duas ou três, sobre pedúnculos fasciculados axilares. Seu fruto é uma baga ovalada, glabra, brilhante, de 15 mm de comprimento, de cor vinho-escuro quando madura, com 2 a 4 sementes (CARVALHO, 2010; LORENZI, 2009).

A pimenteira é uma espécie perenifólia, que floresce de julho a novembro e frutifica de dezembro a março (CARVALHO, 2010). Sua casca tem sabor picante como a pimenta verdadeira, é levemente entorpecente e possui propriedades medicinais (LORENZI, 2009). Esta espécie é endêmica do Brasil, ocorre nos domínios fitogeográficos da Mata Atlântica, nas vegetações de Floresta Estacional Semidecidual, Floresta Ombrófila (Floresta Pluvial) e Floresta Ombrófila Mista, nos Estados de Minas Gerais, São Paulo Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina (LORENZI, 2009).



Figura 2 Hábito da planta *Cinnamodendron dinisii*. Espécie pertencente ao Horto de Plantas Medicinais do DAG/UFLA, Lavras, 2014.

2.5.1 Composição química de *Cinnamodendron dinisii*

Cascas e folhas de plantas da família Canellaceae, incluindo *C. dinisii*, possuem característico odor aromático e sabor apimentado (BARROS; SALAZAR, 2009). Seu aroma agradável é uma opção para a indústria de cosméticos e perfumaria (LORENZI, 2009).

Em estudos do óleo essencial extraído, por hidrodestilação, das cascas de *C. dinisii*, Torres, Wisniewski e Simionatto (2010) obtiveram o rendimento de 0,17%. Sua análise química demonstrou a presença de 23 constituintes químicos que representaram 90,3% da composição química total do óleo. O componente majoritário identificado foi o limoneno (68,5%). Os componentes voláteis distribuíram-se em compostos alifáticos, aromáticos, fenilpropanóides, monoterpenos e sesquiterpenos. Neste mesmo estudo foi identificado elevado teor de monoterpenos (86,8%), sendo destes 14,7% de monoterpenos oxigenados. Os monoterpenos cíclicos representaram a classe química predominante, encontrando-se ainda constituintes das classes dos álcoois, ésteres, cetonas e éteres. Os principais componentes monoterpênicos foram limoneno, α -terpineol, borneol e (-)- α -pineno. O drimenol, sesquiterpeno drimânico, foi identificado com 0,7%. De acordo com Jansen e Groot (2004) plantas da família Canellaceae são fonte rica de drimanos.

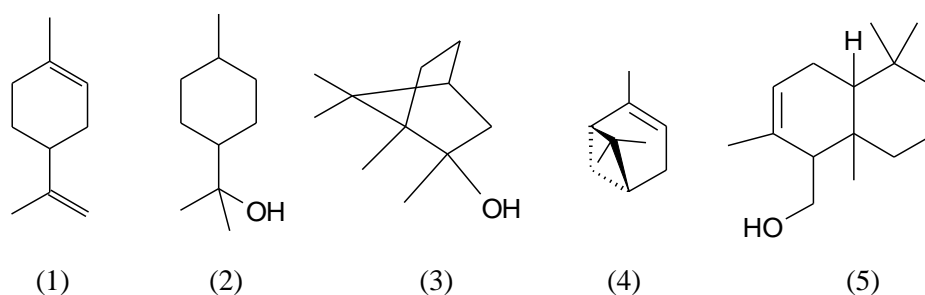


Figura 3 Estruturas químicas de constituintes voláteis de *C. dinisii* observados no estudo de Torres, Wisniewski e Simionatto (2010). (1) Limoneno, (2) α -Terpineol, (3) Borneol, (4) α -Pineno, (5) Drimenol.

Andrade et al. (2013) também estudaram a composição química do óleo essencial extraído, na estação do verão do horário da manhã, por hidrodestilação, das folhas de *C. dinisii*. Os constituintes majoritários encontrados foram os monoterpenos bicíclicos, α -pineno (35,41%), β -pineno (17,81%) e o sabineno (12,01%) e o sesquiterpeno biciclogermacreno (7,59%). Neste estudo o rendimento do óleo foi de 2,03% p/p.

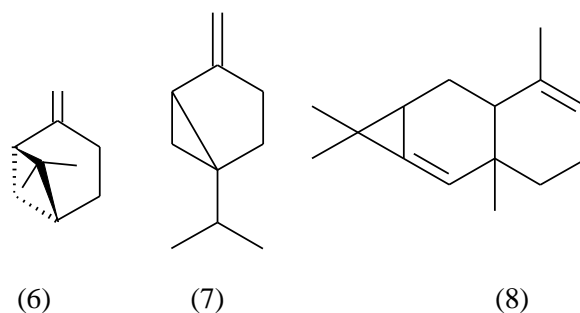


Figura 4 Estruturas químicas de constituintes voláteis encontrados em *C. dinisii* por Andrade et al. (2013). (6) β -Pineno, (7) Sabineno, (8) Biciclogermacreno.

Em outras espécies da família Canellaceae, como *Canella winterana*(L.) Gaertn., o óleo essencial das folhas apresentou o total de 19 componentes, sendo o mirceno, o (*E*)-cariofileno, (*Z* e *E*)- β -ocimeno os componentes majoritários (SETZER, 2007). Para outra espécie da mesma família a *Cinnamosma fragans* Baill, Turckey et al. (2008) identificaram o 1,8-cineol e o sabineno como componentes majoritários do óleo essencial.

A partir das cascas do caule de *C. dinisii* foram isolados dois compostos citotóxicos, cinamodial e capsicodendrina, além de três compostos inativos 6 β -acetoxisodrimenina, ugandensolideo e futronolideo. O extrato das folhas contém cinamosmolideo (MAHMOUD et al., 1980).

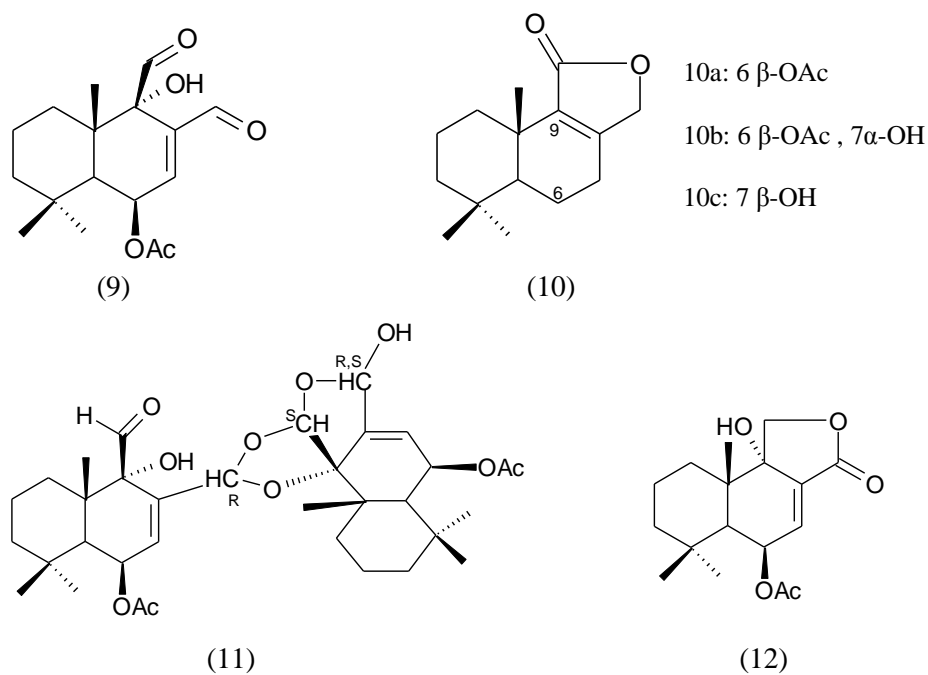


Figura 5 Estruturas químicas presentes em *C. dinisii* relatadas por MAHMOUD et al., 1980. (9) Cinamodial, (10a) 6 β -Acetoxisodrimenina, (10b)

Ugandensolídeo, (10c) Futronolídeo, (11) Capsicodendrina, (12) Cinamosmolídeo.

Segundo Bastos et al. (1991), desta espécie foram isolados pela primeira vez, através do extrato hexânico da casca do tronco, os compostos poligodial, isopoligodial, mukaadial e poligonona, pertencentes ao grupo dos sesquiterpenos drimânicos, sendo característicos da família *Canellaceae*.

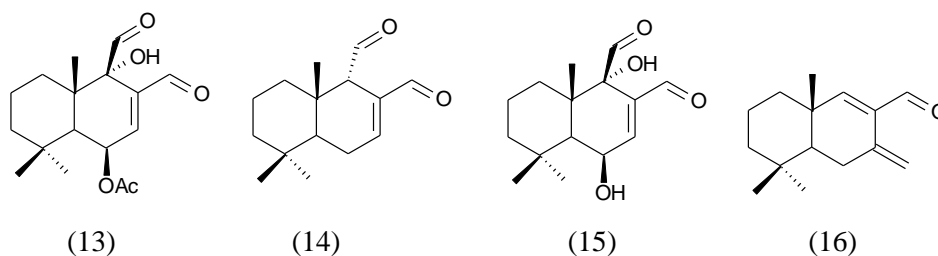


Figura 6 Estruturas químicas de sesquiterpenóides presentes em *C. dinisii* relatadas por Bastos et al. (1991). (13) Poligodial, (14) Isopoligodial, (15) Mukaadial, (16) Poligonona.

2.5.2 Propriedades biológicas da espécie *Cinnamodendron dinisii*

Esta espécie é popularmente conhecida como “pimenteira” devido o sabor picante de suas cascas e como “pau para tudo” devido suas propriedades medicinais. Na medicina popular *C. dinisii* é utilizada como uma panacéia, “remédio para todos os males” (REITZ, 1988), porém ainda são escassos os estudos em torno das suas propriedades medicinais.

Os compostos, capsicodendrina e o cinamodial, isolados do extrato clorofórmico de amostras da casca da raiz de *C. dinisii* apresentaram atividade citotóxica contra o carcinoma Eagle's 9KB e frente à cultura celular de nasofaringe. Enquanto que composto citotóxico cinamosmolídeo foi isolado do

extrato clorofórmico de amostras do ramo e folhas da espécie (MAHMOUD et al., 1980).

Bastos et al. (1991) verificaram em seus estudos que o sesquiterpeno drimânico cinamodial, isolado do extrato hexânico da casca do tronco de *C. dinisii*, apresentou atividade moluscicida. Os sesquiterpenos drimânicos são uma classe de hidrocarbonetos saturados (JANSEN; GROOT, 2004) característico da família Canellaceae e presentes nas espécies de *C. dinisii* (ANDRADE et al., 2013). Estes compostos apresentam diversas atividades biológicas, como anticancerígenas, antibióticas, desestimulantes da alimentação de insetos, moluscicida (BASTOS et al., 1991), bactericida, antifúngica, controlador do crescimento de plantas, citotóxica, fitotóxica e efeito piscicida (JANSEN; GROOT, 2004; TORRES; WISNIEWSKI; SIMIONATO, 2010).

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, R. B. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. on *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* and *Candida* spp. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 15, n. 4, p. 474-482, 2013.

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

BARROS, F. D.; SALAZAR, J. *Cinnamodendron ochionianum*, a new species of Canellaceae from Brazil. **Journal for Botanical Nomenclature**, Saint Louis, v. 19, p. 11-14, 2009.

BASTOS, J. K. et al. Avaliação da atividade moluscicida de um sesquiterpenodrimânico obtido de *Capsicodendron dinisii*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 13, p. 83-89, 1991.

BLANK, A. F. et al. Influência do horário de colheita e secagem de folhas no óleo essencial de melissa (*Melissa officinalis* L.) cultivada em dois ambientes. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 1, p. 73-78, 2005.

BOTREL, P. P. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marrubioides* Epl., Lamiaceae em função da sazonalidade. **Acta Scientiarum Agronomy**, Maringá, v. 32, n. 3, p. 533-538, 2010.

CARNEIRO, F. M. et al. Tendências dos estudos com plantas medicinais no Brasil. **Revista Sapiência: Sociedade, Saberes e Práticas Educacionais**, Iporá, v. 3, n. 2, p. 44-75, jul./dez. 2014.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies arbóreas brasileiras**. Brasília: Embrapa informações Tecnológica; Colombo: Embrapa Florestas, 2010. v. 4, 644 p.

CASTRO, R. D.; LIMA, E. O. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocoteodorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 203-208, 2011.

CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo. **Manual das doenças transmitidas por alimentos: *Escherichia coli* enterotoxigênica (ETEC)**. 2002. Disponível em: <ftp://ftp.cve.saude.sp.gov.br/doc_tec/hidrica/ecoli_enterotoxi.pdf>. Acesso em: 5 maio 2015.

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

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, n. 4, p. 564-582, Oct. 1999.

COX, S. D. et al. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 88, n. 1, p. 170-175, Jan. 2000.

DESCHAMPS, C. et al. Avaliação higiênica-sanitária de cozinhas industriais instaladas no município de Blumenau, SC. **Higiene Alimentar**, São Paulo, v. 17, n. 112, p. 12-15, 2003.

DINGES, M. M.; ORWIN, P. M.; SCHLIEVERT, P. M. Exotoxins of *Staphylococcus aureus*. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 13, n. 1, p. 16-34, Jan. 2000.

DI PASQUA, R. et al. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 7, p. 2745-2749, 2006.

DUARTE, M. C. T. **Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil**. 2006. Disponível em: <https://www.multiciencia.unicamp.br/artigos_07/a_05_7.pdf>. Acesso em: 21 jan. 2014.

FUEYO, J. M. et al. Enterotoxin production and DNA fingerprinting in *Staphylococcus aureus* isolated from human and food samples. Relations between genetic types and enterotoxins. *International Journal of Food Microbiology*, Amsterdam. v. 67, n. 1/2, p. 139 - 145, July 2001.

GAZIM, Z. C. et al. Seasonal variation, chemical composition, and analgesic and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd in southern Brazil. *Molecules*, Basel, v. 15, p. 5509-5524, 2010.

GEROMINI, K. V. N. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas medicinais. *Arquivos de Ciências Veterinárias e Zoologia*, Umuarama, v. 15, n. 2, p. 127-131, 2012.

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

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

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

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

LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 2, p. 197-201, abr./jun. 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2009. v. 2, 384 p.

LUZ, J. M. Q.; EHLERT, P. A. D.; INNECCO, R. Horário de colheita e tempo de secagem da alfavaca-cravo. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 27, p. 539-542, 2009.

MAHMOUD, I. I. et al. Potential anticancer agents. XVI. Isolation of bicycloparnesane sesquiterpenoids from *Capsicodendron dinisii*. *Journal of Natural Products*, Cincinnati, v. 43, n. 3, p. 365-371, 1980.

MALUCHE, M. E.; SANTOS, J. I. *Candida sp.* e infecções hospitalares: aspectos epidemiológicos e laboratoriais. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 40, n. 1, p. 65-67, 2008.

MEIRA, Q. G. S. et al. Influence of temperature and surface kind on biofilm formation of *Staphylococcus aureus* from food-contact surface and sensitivity to sanitizers. **Food Control**, Vurrey, v. 25, p. 469-475, 2012.

MILLEZI, A. F. et al. In vitro antimicrobial properties of plant essential oils thymus vulgaris, *Cymbopogon citratus* and *laurusnobilis* against five important foodborne pathogens. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 32, p. 167-172, 2012.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 108-113, jan./mar. 2007.

NAZZARO, F. et al. Effect of essential oils on pathogenic bacteria. **Pharmaceuticals**, Basel, v. 6, n. 12, p. 1451-1474, 2013.

OLIVEIRA, F.; AKISSUE, G. **Fundamentos de farmacobotânica e de morfologia vegetal**. 3. ed. São Paulo: Atheneu, 2009. 228 p.

OUSSALAH, M. et al. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, Guildford, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2006.

PAULUS, D. et al. Teor e composição química de óleo essencial de cidró em função da sazonalidade e horário de colheita. **Horticultura Brasileira**, Brasília, v. 31, p. 203-209, 2013.

PEDROSO, R. S. et al. Sensibilidade de isolados de *Candida* spp. a antifúngicos por disco-difusão em ágar e microdiluição em caldo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 304-311, jan./fev. 2014.

PEREIRA, A. A. et al. Inativação termoquímica de *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Salmonella enterica Enteritidis* por óleos essenciais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 11, p. 2022-2028, nov. 2014.

PINTO, J. E. B. P.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Cultivo e processamento de plantas medicinais**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2002.

PUPO, M. T. et al. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

RAHMAN, A.; KANG, S. Inhibition of foodborne pathogens and spoiling bacteria by essential oil and extracts of *Erigeron ramosus* (walt.) b.s.p. **Journal of Food Safety**, Trumbull, v. 29, n. 2, p. 176-189, May 2009.

REITZ, R. **Flora ilustrada catarinense: Canellaceae**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1988.

RIBEIRO, D. S. et al. Avaliação do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) como modulador da resistência bacteriana. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 33, n. 2, p. 687-696, abr. 2012.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiocotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 372 p.

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

SANTOS, R. L. A. Investigação da atividade antimicrobiana do *Ocimum basilicum* (Manjeriço) sobre *Staphylococcus aureus*. **Revista Ciências em Saúde**, Itajubá, v. 3, n. 1, p. 33-42, 2011.

SANTURIO, D. F. et al. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a amostras de *Escherichia coli* isoladas de aves e bovinos. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 41, n. 6, p. 1051-1056, 2011.

SANTURIO, J. M. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 803-808, maio/jun. 2007.

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

SHINOHARA, S. et al. *Salmonella spp.*, importante agente patogênico veiculado em alimentos. **Ciência & Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 5, p. 1669-1674, set./out. 2008.

SILVA, P. **Farmacologia**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010. 1059 p.

SIMÕES, C. M. O. et al. (Org.). **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2007. p. 1102.

SIQUI, A. C. et al. Óleos essenciais: potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 16, p. 38-43, 2000.

SOUZA MATTEI, A. *Candida albicans versus Candida dubliniensis*: identificação, virulência, perfil de suscetibilidade antifúngica e epidemiologia dos casos clínicos de candidose sistêmica diagnosticados em um hospital de Porto Alegre – RS. 2013. 123 p. Tese (Doutorado em Ciências Pneumológicas) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2013.

TORRES, E.; WISNIEWSKI, A. J.; 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

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

ULTEE, A.; BENNINK, M. H. J.; MOEZELAAR, R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 68, n. 4, p. 1561-1568, 2002.

WILLIAMS, N. D.; TORRES, A. G.; LLOYD, S. J. Evolution and epidemiology of diarrheagenic *Escherichia coli*. In: TORRES, A. G. (Ed.). **Pathogenic Escherichia coli in Latin America**. Tucson: University of Texas, 2010. p. 8-24

CAPÍTULO 2**VARIAÇÃO SAZONAL, HORÁRIO DE COLHEITA, COMPOSIÇÃO
QUÍMICA E POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL
DE *Cinnamodendron dinissi* Swacke**

RESUMO

Cinnamodendron dinisii é uma espécie vegetal brasileira, popularmente conhecida como “pimenteira” e “para tudo”. Esta espécie é muito utilizada na medicina popular, porém são escassos os estudos a seu respeito. Este estudo objetivou avaliar a influência das variações sazonais e do horário de colheita sobre o teor e a composição química do óleo essencial extraído de folhas frescas de *C. dinisii*, bem como o seu potencial antimicrobiano. Folhas frescas de *C. dinisii* foram coletadas na metade das quatro estações do ano nos horários de 8, 11, 14 e 17h. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado por 60 minutos. Os teores de óleo extraído foram determinados em g.100 g⁻¹ de folhas frescas e a sua composição química por CG-DIC e CG-EM. Não foram observadas diferenças significativas nos teores de óleo essencial de *C. dinisii* nos diferentes horários de coletas, porém nas estações de inverno (0,30-0,37 g.100 g⁻¹) e primavera (0,31-0,36 g.100 g⁻¹) o teor do óleo foi significativamente maior que nas outras estações. Em relação à composição química do óleo essencial foram observadas diferenças quantitativas e qualitativas entre as estações do ano e os horários de colheitas. Os principais constituintes identificados foram o α - e β -pineno, 1,8-cineol, terpinen-4-ol, biciclogermacreno, espatulenol e óxido de cariofileno. As Concentrações Inibitória Mínima (CIM), Mínima Bactericida (CMB) e Fungicida Mínima (CFM) foram determinadas empregando-se a técnica de microdiluição. O óleo essencial para esse ensaio foi extraído por arraste a vapor de água e analisado por CG-DIC e CG-EM. Os microrganismos avaliados foram *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028, *Candida albicans* ATCC 10231. O óleo essencial de *C. dinisii* apresentou maior potencial anti-Candida que antibacteriano. As CIM e CFM para *C. albicans* foram ambas de 0,56 μ g/ml de óleo essencial. A composição química principal desse óleo foi constituída de α -pineno (27,18%), sabineno (15,23%), β -pineno (16,84%), 1,8-cineol (5,02%) e biciclogermacreno (6,64%).

Palavras-chave: Pimenteira. Sazonalidade. Atividade antimicrobiana. Óleo volátil.

ABSTRACT

Cinnamodendron dinisii is a Brazilian plant species, popularly known as 'pepper' and 'for all'. This species is widely used in folk medicine, but there are few studies about it. This study aimed to evaluate the influence of seasonal variations and harvesting time on the content and chemical composition of essential oil extracted from fresh leaves of *C. dinisii* and its antimicrobial potential. Fresh leaves of *C. dinisii* were collected in the middle of the four seasons at the times of 8, 11, 14 and 17 h. The essential oil was extracted by hydrodistillation in Clevenger modified apparatus for 60 minutes. Extracted oil contents were determined in g.100 g⁻¹ of fresh leaves and its chemical composition by GC-FID and GC-MS. No significant differences were observed in the essential oil content of *C. dinisii* at different harvesting times, but in the winter (0.30 to 0.37 g g.100⁻¹) and spring (from 0.31 to 0.36 g.100 g⁻¹) seasons the oil content was significantly higher than in other seasons. Regarding the essential oil chemical composition quantitative and qualitative differences were observed among seasons and harvest times. The main constituents identified were the α - and β -pinene, 1,8-cineole, terpinen-4-ol, bicyclogermacrene, spathulenol and caryophyllene oxide. Minimum Inhibitory (MIC), Minimum Bactericidal (MBC) and Minimum Fungicidal (MFC) Concentrations were determined by microdilution technique. The essential oil for this assay was extracted by steam distillation and analyzed by GC-FID and GC-MS. Target microorganisms were *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, ATCC 14028 *Salmonella* Typhimurium, *Candida albicans* ATCC 10231. The essential oil of *C. dinisii* showed higher anti-Candida potential antibacterial. Both MIC and MFC of *C. albicans* were 0.56 mg/ml of essential oil. The main chemical compounds of the essential oil were α -pinene (27.18%), sabinene (15.23%), β -pinene (16.84%), 1,8-cineol (5.02%) and bicyclogermacrene (6.64%).

Key words: *Cinnanodendron dinisii*. Bacteria. Seasonality. Antimicrobial activity.

1 INTRODUÇÃO

Cinnamodendron dinisii Schwacke é uma espécie vegetal brasileira, pertencente à família *Canellaceae*, que ocorre entre os estados de Minas Gerais e Rio Grande do Sul (LORENZI, 2009). Esta espécie é popularmente conhecida como “pimenteira” devido o sabor picante de suas cascas e como “pau para tudo” devido suas propriedades medicinais. Na medicina popular *C. dinisii* é utilizada como uma panacéia (REITZ, 1988), porém ainda são escassos os estudos em torno das suas propriedades medicinais.

A pimenteira, assim como outras espécies da família *Canellaceae* é uma planta rica em óleos essenciais constituídos, principalmente, de monoterpenos, quando extraído de suas folhas (TORRES; WISNIEWSKI; SIMIONATTO, 2010). Óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário das plantas, cuja produção e composição química sofrem influência de fatores externos, como temperatura, pluviosidade, sazonalidade e período do dia (GOBBO NETO et al., 2007). Determinar a melhor época do ano e o melhor horário de coleta das plantas aromáticas é essencial para a produção de óleos essenciais de interesse medicinal.

Outro ponto a se considerar é que nas últimas décadas intensificaram-se as investigações em torno de produtos naturais com potencial antimicrobiano. Dois fatos têm alavancado as pesquisas de novos agentes antibacterianos e antifúngicos derivados de plantas: a crescente resistência bacteriana aos antimicrobianos presentes no mercado e as dificuldades impostas pelo tratamento com medicamentos antifúngicos atuais (CLEFF et al., 2012). Estas novas substâncias podem representar tratamentos menos tóxicos para o paciente e mais eficazes contra os microrganismos resistentes (PUPO et al., 2007).

Este trabalho objetivou avaliar a influência da variação sazonal e do horário de colheita sobre teor e composição química de óleo essencial extraído de folhas frescas de *Cinnamodendron dinisii*, bem como avaliar o potencial antimicrobiano deste óleo.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Material vegetal

O material vegetal foi obtido de nove espécimens adultos de *Cinnamodendron dinisii* Swacke pertencentes ao Horto Medicinal do Departamento de Agricultura da Universidade Federal de Lavras (UFLA) localizado na cidade de Lavras, Minas Gerais, Brasil, situada nas coordenadas geográficas 21° 14' 42" S, 45° 0' 0" W, 919 m altitude. Segundo a classificação climática de Köppen (1948), o clima regional é do tipo CWa, com características CWb, com duas estações definidas: quente e chuvosa, de outubro a março e, amena e seca, de abril a setembro. Os dados climatológicos durante a condução do experimento estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1 Dados climatológicos de temperatura, precipitação, umidade relativa do ar e radiação na cidade de Lavras-MG, entre os meses de Março de 2014 e Fevereiro de 2015. UFLA, 2015

Estação do Ano	Temperatura Média (°C)	Precipitação (mm)	Umidade Relativa (%)	Radiação (kJ/m)
Outono/2014	20,9	1,7	71,9	7,5
Inverno/2014	18,4	0,8	62,8	8,1
Primavera/2014	22,3	5,4	64,9	7,2
Verão/2015	23,5	5,3	72,1	7,0

A colheita das folhas foi realizada por amostragem geral dos ramos, sendo coletadas folhas em todas as partes da planta, ápice, base e parte intermediária.

Ramos floridos da espécie foram herborizadas e depositadas no Herbário da EPAMIG, sob o registro Herbário PAMG 57520 (ANEXO I). A espécie foi classificada pela Dra. Andréia Fonseca Silva, curadora do Herbário PAMG como *Cinnamodendron dinisii* Swacke.

2.2 Variação sazonal e horário de coleta

Folhas de *C. dinisii* foram coletadas na metade das estações do outono, inverno e primavera de 2014 e do verão de 2015, às 8:00 h, 11:00 h, 14:00 h e 17:00 h. A extração do óleo essencial foi realizada no Laboratório de Fitoquímica do Departamento de Agricultura da UFLA pelo processo de hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado.

O óleo essencial foi extraído a partir de 50 g de folhas frescas rasuradas hidrodestiladas por 60 minutos. O óleo foi purificado por partição líquido-líquido com diclorometano e seco com sulfato de magnésio anidro. Os óleos essenciais purificados foram mantidos em *vials* hermeticamente fechados, em refrigerador a 4°C, até as análises químicas. O teor de óleo foi calculado e expresso em g. 100 g⁻¹ de folhas frescas.

O delineamento experimental empregado foi inteiramente casualizado, realizado em quadruplicata com 3 repetições, em esquema fatorial 4 x 4, sendo 4 estações e 4 horários de colheita. As repetições foram realizadas por 3 dias consecutivos. Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância, utilizando o Teste F, e as médias comparadas a 5% de probabilidade pelo teste

deTukey ($p < 0,05$). Para as análises estatísticas dos dados empregou-se o *software* estatístico R versão 5.0 (R DEVELOPMENT CORE TEAM, 2012). O pacote utilizado foi ExpDes.

2.3 Análise Cromatográfica do óleo de *Cinnamodendron dinisii*

As análises químicas dos óleos voláteis foram realizadas por Cromatografia de Fase Gasosa empregando-se um Cromatógrafo Agilent® 7890A, operado com sistema de processamento de dados HP GC Chem Station Ver. A.01.14, equipado com injetor/amostrador automático CombiPAL Autosampler System (CTC Analytic AG, Switzerland) e um Detector de Ionização em Chama (DIC). As amostras foram preparadas diluindo-se o óleo essencial em acetato de etila (1%, v/v). O volume de injeção foi de 1,0 µL, no modo *split* a uma razão de injeção de 50:1. Empregou-se coluna capilar de sílica fundida HP-5MS (30 m de comprimento x 250 µm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). Hélio foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 240°C. A temperatura inicial do forno foi de 50 °C mantido por 1 minuto, seguido por uma rampa de temperatura de 4°C/min até 200 ° C, seguida de uma rampa de 15°C/min até 240 °C, mantendo-se em condição isotérmica por 15 minutos e chegando à temperatura máxima de 250°C. As concentrações dos constituintes foram expressas pela média da porcentagem de área relativa aos picos cromatográficos ± o desvio padrão de 4 amostras analisadas.

As análises qualitativas foram realizadas em Cromatógrafo Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto

eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. As condições operacionais foram as mesmas empregadas nas análises por CG-DIC.

Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à coinjeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C8-C20, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY - NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados usando a equação de Van de Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção descritos em literaturas (ADAMS, 2007).

2.4 Ensaios da atividade antimicrobiana *in vitro*

Os ensaios antimicrobianos com o óleo essencial de *C. dinisii* foram realizados no Laboratório de Microbiologia da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de São João del Rey, campus Centro Oeste Dona Lindu, Divinópolis-MG.

2.4.1 Extração e análise do óleo essencial

Foram utilizadas folhas frescas de *C. dinisii* colhidas em Maio de 2014. O material vegetal fresco foi submetido a destilação por arraste a vapor, por 90 minutos em destilador de óleos essenciais Marconi MA480. Após a extração, o óleo essencial foi purificado por decantação e mantido sob refrigeração a 4°C até a realização das análises químicas e dos ensaios biológicos. A análise química do óleo essencial foi realizada conforme descrito no item 2.3.

2.4.2 Microrganismos estudados

Foram utilizados *Staphylococcus aureus* ATCC 6538, *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella* Typhimurium ATCC 14028 e *Candida albicans* ATCC 10231. Os inóculos destes microrganismos foram preparados em solução de cloreto de sódio 0,9% (p/v) a partir de cultura de 24 h dos microrganismos de culturas-estoque. Os inóculos foram padronizados em 0,5 da escala de McFarland (aproximadamente 10^8 UFC/mL).

2.4.3 Ensaio antimicrobiano

A susceptibilidade dos microrganismos frente ao óleo de *C. dinisii* foi avaliada empregando-se o método de microdiluição em caldo (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS - NCCLS, 2003). As microplacas de poliestireno com 96 poços foram preparadas adicionando-se, em cada poço: 150 µL de caldo Sabouraud-dextrose (placa teste para leveduras), 150 µL de caldo caseína soja (placa teste para bactérias) e 15 µL da suspensão de microrganismos diluída 200 vezes em solução salina, exceto no controle negativo.

Para o preparo do ensaio foram adicionados 150 µL da solução de óleo 72µl /mL (concentração final de óleo: 36µl /mL) e diluições seriadas foram realizadas de modo a obter as concentrações de 36µl/mL a 0,035µl/mL de óleo. Os testes foram realizados em triplicata. Como controle foram utilizados o controle negativo (sem microrganismo), controle positivo (suspensão dos microrganismos), controle positivo para Tween (microrganismos + Tween 80), controle positivo para álcool etílico (suspensão de microrganismo + álcool etílico 10% (v/v), controle inibidor para levedura (fluconazol), controle inibidor

para bactéria (amoxicilina). As microplacas foram incubadas a $35\pm 2,5$ °C por 24 h.

Para *Candida albicans*, após o período de incubação, alíquotas 10 µL de solução aquosa de brometo 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a 5 mg/mL foram adicionadas em cada poço e as microplacas incubadas novamente por 5 horas a 37 °C, sendo a menor concentração na qual não foi observada coloração púrpura considerada a CIM.

Para bactérias, após o período de incubação, adicionaram-se 10 µL de uma solução de cloreto de 2,3,5 trifeniltetrazólio (TTC) – preparada em água em cada poço e as microplacas foram incubadas novamente por 5 horas a 37 °C, sendo a menor concentração na qual não foi observada coloração avermelhada considerada a CIM.

Para determinação da CMB e CMF, 10 µL do cultura dos poços em que houve inibição do crescimento dos microrganismos foram adicionados em placas de Petri estéreis contendo ágar nutriente (bactéria) e ágar Sabouraud (fungo). Após o período de incubação (24 h a $35\pm 2,5$ °C) o crescimento microbiano foi avaliado e a CMB e CFM foram determinadas como a menor concentração do óleo essencial em que não foi observado crescimento microbiano.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Avaliação sazonal e horário de coleta

Os teores de óleos essenciais extraídos das folhas de *C. dinisii* por hidrodestilação variaram de $0,16\pm 0,06\%$ a $0,37\pm 0,09\%$. Os teores mínimos observados no presente estudo corroboram com àqueles observados por Torres,

Wisniewski e Simionatto (2010) em estudos sobre a composição química dos componentes voláteis dessa mesma espécie ($0,17 \pm 0,08\%$).

Não houve interação significativa entre horário de coleta e estação do ano para teor do óleo essencial das folhas de *C. dinisii*. No entanto, os teores de óleos essenciais dessa espécie mostraram-se sujeitos a variação sazonal (Figura 7).

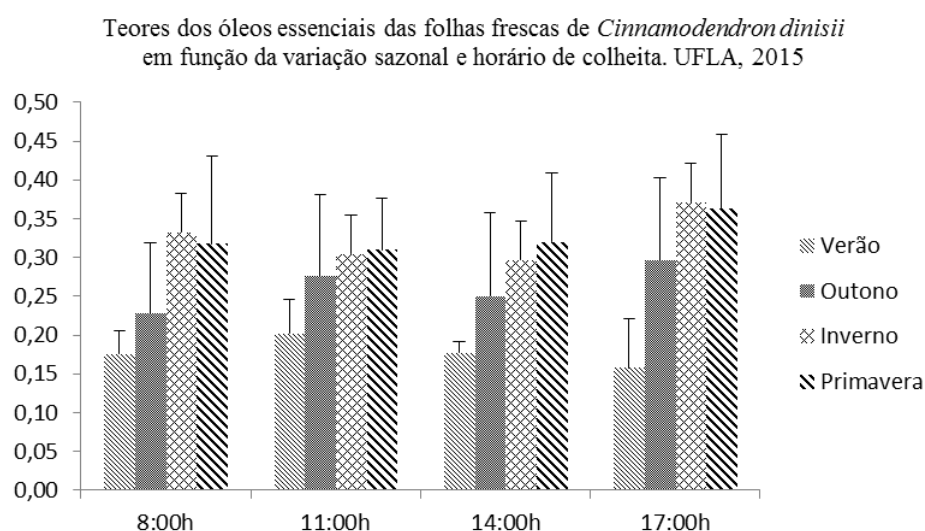


Figura 7 Teores dos óleos essenciais das folhas frescas de *Cinnamodendron dinisii* em função da variação sazonal e horário de colheita. UFLA, 2015.

Os teores máximos, 0,33% em média, foram observados no inverno e na primavera, os quais foram estatisticamente diferentes dos teores do outono e verão. No verão observou-se o menor teor de óleo essencial (0,18% em média). Variação sazonal no rendimento do óleo essencial de muitas espécies é explicada por diversos fatores que influenciam o metabolismo secundário das plantas, fatores genéticos, o estágio de desenvolvimento da planta, a

sazonalidade, o índice pluviométrico, a temperatura entre outros (GOBBO NETO; LOPES, 2007).

A variação nos teores do óleo essencial de *C. dinisii* pode ser explicada pela fenologia da espécie. O estágio de desenvolvimento da planta pode promover variações tanto no teor, como na composição do óleo essencial. O metabolismo secundário do vegetal é influenciado pelo período de desenvolvimento da planta, seja para atrair polinizadores, para se defender de insetos ou para se desenvolver diante das condições climáticas (NASCIMENTO et al., 2007).

Os dados obtidos neste estudo são semelhantes aos encontrados por Ehlert et al. (2013) em estudo com *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae), fenótipo limoneno-carvona, cultivadas em Botucatu/SP. Neste estudo também não se observou diferenças significativas no teor de óleo essencial extraído das folhas coletadas nos horários de 8:00, 10:00, 12:00, 14:00 e 16:00h (EHLERT et al., 2013). O óleo essencial extraído das folhas frescas de *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd, Gazim et al. (2010) também apresentou maior teor do óleo essencial no inverno.

3.2 Análises Cromatográficas

Nos óleos essenciais das folhas de *C. dinisii* coletadas em diferentes horários e estações do ano foi detectada a presença de 43 constituintes químicos, dos quais 42 foram identificados (Tabela 2). Os óleos essenciais obtidos da pimenteira constituíram-se majoritariamente de monoterpenos e de sesquiterpenos. Os principais constituintes identificados foram o α -pineno, β -pineno, 1,8-cineol, terpinen-4-ol, biciclogermacreno, espatulenol e óxido de cariofileno.

Corroborando com o presente estudo, Andrade et al. (2013) também caracterizaram α -pineno, β -pineno, sabineno e biciclogermacreno como constituintes principais do óleo essencial extraído das folhas da pimenteira coletadas em fevereiro de 2011 pela manhã.

Foram observadas diferenças químicas quantitativas e qualitativas nos constituintes voláteis de *C. dinisii* durante as estações do ano e os horários de coleta. As maiores variações de teores foram observadas nos principais componentes do óleo (Figura 8): α -pineno (3,1% a 21,6%), sabineno (4,6% a 12,9%), β -pineno (4,0% a 16,2%), 1,8-cineol (3,8% a 9,5%), terpinen-4-ol (0,3% a 8,8%), biciclogermacreno (0,0% a 21,3%), espatulenol (2,8% a 18,7%) e óxido de cariofileno (1,2% a 9,5%) (Figura 2).

Os teores de α -pineno, β -pineno e sabineno apresentaram oscilações sazonais e de horários de coleta similares entre si. Estes compostos apresentaram, em geral, maiores concentrações no inverno se comparado às outras estações. Sendo que para o horário de coleta, estes compostos apresentaram maiores porcentagens, em todas as estações, quando coletado as 8h.

A concentração de 1,8-cineol apresentou valores máximos no Outono em todos os horários de coleta, com exceção do horário de 8h quando este composto apresentou maior teor no verão. As menores concentrações deste composto foram observadas na primavera.

O terpine-4-ol apresentou comportamento similar ao 1,8-cineol, porém neste caso as concentrações máximas foram observadas no Outono em todos os horários de coleta. Para o terpinen-4-ol observou-se uma considerável queda no seu teor, em todos os horários de coleta, na época de primavera.

Tabela 2 Composição química dos óleos essenciais de folhas frescas de *Cinnamodendron dinisii* coletadas em diferentes estações e horários

Constituintes químicos	*IR	8 horas				11 horas				14 horas				17 horas			
		V	O	I	P	V	O	I	P	V	O	I	P	V	O	I	P
α -tujeno	926	0,6	0,6	0,8	0,5	0,6	0,9	0,7	0,4	0,7	-	0,7	0,6	0,8	-	0,7	0,6
α -pineno	933	7,2	18,0	21,6	13,5	13,4	12,2	19,1	11,8	18,8	3,3	17,5	15,4	7,9	3,1	18,5	16,4
Canfeno	947	0,3	0,6	0,5	0,3	0,5	0,6	0,5	0,3	0,5	-	0,5	0,4	0,3	-	0,5	0,4
Sabineno	973	6,3	8,1	12,9	9,5	8,9	6,0	12,2	8,3	12,2	4,8	11,0	9,4	6,1	4,6	10,5	10,8
β -pineno	976	6,2	9,3	16,2	11,2	9,3	7,1	15,2	10,3	14,6	4,5	14,6	12,1	6,6	4,0	14,6	12,6
mirreno	991	1,7	1,0	1,9	1,8	1,0	1,9	1,8	1,7	1,8	-	1,8	1,8	1,4	-	1,8	1,9
α -terpineno	1016	0,4	-	-	0,5	0,3	-	-	0,5	0,3	-	-	0,6	0,4	-	-	0,6
<i>o</i> -cimeno	1024	3,6	3,5	3,3	1,0	2,5	2,9	3,5	1,1	2,0	5,0	3,5	1,2	2,7	4,2	3,3	0,9
silvestreno	1028	1,0	1,4	2,0	1,5	1,1	1,4	2,0	1,5	1,8	1,2	2,0	1,6	1,1	1,0	1,9	1,6
1,8-cineol	1031	7,9	3,9	5,7	3,8	5,7	6,1	5,8	4,1	4,9	9,5	5,6	4,1	5,7	7,8	5,3	4,0
β - <i>cis</i> -ocimeno	1038	3,4	0,5	1,1	4,1	2,8	1,1	0,7	3,9	2,9	-	1,1	3,8	2,4	-	1,4	4,1
β - <i>trans</i> -ocimeno	1048	3,4	0,3	0,6	4,2	2,9	1,0	0,4	3,8	2,8	-	0,7	3,7	2,4	-	0,8	4,3
γ -terpineno	1059	1,0	-	0,1	1,2	0,7	-	-	1,3	0,8	-	-	1,4	0,6	-	0,1	1,4
hidrato de <i>cis</i> -sabineno	1067	0,9	1,0	0,6	0,5	0,8	1,0	0,7	0,5	0,4	1,2	0,7	0,5	0,8	1,2	0,6	0,4
Terpinoleno	1089	0,3	-	-	0,4	0,3	-	-	0,4	0,3	-	-	0,4	0,3	-	-	0,4
ni (<i>m/z</i> =154)	1098	-	2,1	-	-	-	1,3	-	-	-	2,5	-	-	-	2,2	-	-

“Continua...”

Linalol	1100	1,6	3,1	1,4	1,8	1,4	3,2	1,6	1,6	1,2	3,0	1,5	1,7	1,5	3,2	1,4	1,5
<i>trans</i> -pinocarveol	1139	1,7	1,3	0,7	0,2	1,1	1,1	0,8	0,2	0,5	2,5	0,7	0,2	1,2	2,1	0,7	0,2
Borneol	1164	0,4	1,4	0,7	0,4	1,2	1,6	0,9	0,5	0,7	1,5	0,8	0,4	1,1	1,7	0,8	0,4
terpinen-4-ol	1178	5,7	7,7	5,8	0,4	4,9	8,8	6,7	0,4	5,0	6,9	6,8	0,4	5,9	7,8	6,7	0,3
α -terpineol	1191	0,4	0,6	0,4	0,2	0,4	0,8	0,5	0,0	0,4	0,6	0,5	-	0,5	0,7	0,5	-
mirtenol	1197	1,2	1,0	0,5	-	0,8	0,5	0,6	0,0	0,4	1,9	0,6	-	0,8	1,5	0,5	-
verbenona	1211	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,7	-	-	-	0,6	-	-
acetato de bornila	1288	1,4	0,9	0,3	0,3	1,1	1,1	0,4	0,3	0,3	1,4	0,4	0,3	0,9	1,4	0,3	0,3
acetato de <i>trans</i> -pinocarveol	1299	-	1,6	-	-	-	0,7	-	-	-	2,0	-	-	-	2,0	-	-
acetato de <i>cis</i> -pinocarveol	1308	-	1,4	-	-	-	1,0	-	-	-	2,7	-	-	-	2,0	-	-
δ -elemeno	1340	0,2	-	-	0,4	0,3	-	-	0,4	0,2	-	-	0,3	0,4	-	-	0,3
acetato α -terpineol	1351	1,3	1,5	1,0	1,1	1,2	1,7	1,2	1,0	1,0	1,3	1,2	1,0	1,3	1,6	1,1	0,9
eugenol	1359	-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-
copaeno	1379	0,1	-	0,2	0,2	0,1	-	0,3	0,3	0,2	-	0,2	0,3	0,3	-	0,2	-
β -elemeno	1394	0,2	-	0,3	0,3	0,3	0,1	0,4	0,4	0,3	-	0,4	0,3	0,4	0,6	0,3	0,3
β -cariofileno	1424	1,3	0,8	1,9	3,8	1,2	1,3	2,3	3,6	2,3	-	2,3	3,1	4,6	-	2,4	3,2
aromadendreno	1444	0,4	0,6	0,2	0,2	0,3	0,6	0,3	0,3	0,2	0,4	0,3	0,2	0,3	0,5	0,3	0,2
β -humuleno	1459	0,8	0,4	0,6	0,3	0,4	0,2	0,7	0,2	0,9	-	0,8	0,2	1,4	-	0,9	0,2
germacrene D	1486	0,2	-	-	0,2	0,1	-	-	0,2	0,1	-	-	0,2	0,3	-	-	0,2
biciclogermacreno	1502	12,1	1,8	2,2	17,7	11,8	2,7	1,9	19,2	8,9	1,2	3,5	15,4	21,2	-	4,6	15,5

“Continua...”

α -farnesene	1510	0,1	-	-	0,4	0,1	-	-	0,4	0,1	-	-	0,4	0,1	-	-	0,3
δ -cadineno	1528	0,4	-	0,2	0,4	0,3	0,3	0,3	0,5	0,3	-	0,3	0,5	0,5	-	0,3	0,3
<i>E</i> -nerolidol	1566	1,6	1,9	1,2	1,6	1,5	2,1	1,7	1,7	1,1	1,6	1,5	1,4	1,6	2,1	1,5	1,4
espatulenol	1584	16,6	15,2	6,9	3,6	13,5	16,7	7,8	4,2	5,3	16,3	8,6	3,8	10,0	18,7	8,0	2,8
óxido de cariofileno	1590	7,1	6,5	1,9	1,4	6,1	6,9	2,7	1,7	1,4	8,5	2,3	1,5	3,7	9,5	2,2	1,2
viridiflorol	1598	-	-	0,3	0,2	-	-	0,3	0,2	-	-	0,3	0,2	-	-	0,3	0,2
drimenol	1771	0,4	1,0	0,4	0,5	0,6	1,0	0,6	0,6	0,4	0,6	0,5	0,5	0,5	0,9	0,6	0,5
Monoterpenos hidrocarbônicos		36,3	47,5	63,2	50,2	47,1	35,2	58,9	45,9	60,4	18,7	54,3	53,2	34,3	18,0	55,2	56,8
Monoterpenos oxigenados		19,9	21,5	15,3	7,2	16,2	23,5	16,8	8,2	14,4	31,0	17,9	8,1	18,9	32,6	17,3	7,6
Sesquiterpenos hidrocarbônicos		16,3	3,6	5,4	24,1	14,5	6,2	5,9	25,8	13,1	2,8	7,5	20,7	29,0	1,1	8,9	20,3
Sesquiterpenos oxigenados		25,7	24,7	10,7	7,4	21,8	26,7	13,0	8,5	8,2	27,1	13,3	7,3	15,8	31,2	12,6	6,2
Fenilpropanóides		-	-	-	-	0,3	-	-	-	-	-	-	-	0,3	-	-	-
Não identificado			2,1				1,4				2,5				2,2		
TOTAL (%)		99,3	99,5	94,6	88,8	99,9	92,9	94,2	88,4	96,1	82,1	93,0	89,2	98,3	85,2	93,9	90,9

*Índice de retenção relativo à série *n*-alcanos (C8-C20) em colunas HP-5MS na ordem de eluição. V=Verão; O= Outono; P=Primavera; I=Inverno. nd: não detectado. ni: não identificado.

O biciclogermacreno foi, entre os componentes principais do óleo de *C. dinisii*, o que apresentou maior variação sazonal e de horário de coleta. Considerando a variação sazonal, as maiores concentrações deste composto foram observadas no verão e na primavera. No outono e no inverno este composto apresentou teores bem abaixo das outras duas estações. Considerando o horário de coleta, o biciclogermacreno esteve presente em maior concentração às 17 h do verão, do inverno e da primavera se comparado aos outros horários. Porém, neste mesmo horário de coleta, 17 h, no outono não foi identificada a presença deste composto.

Os sesquiterpenóides espatulenol e óxido de cariofileno também apresentaram comportamentos similares frente às variações sazonais e de horário de coleta. Ambos apresentaram maiores concentrações no outono em todos os horários de coleta, salvo à coleta de 8 h onde os teores máximos destes componentes foi ligeiramente maior no verão.

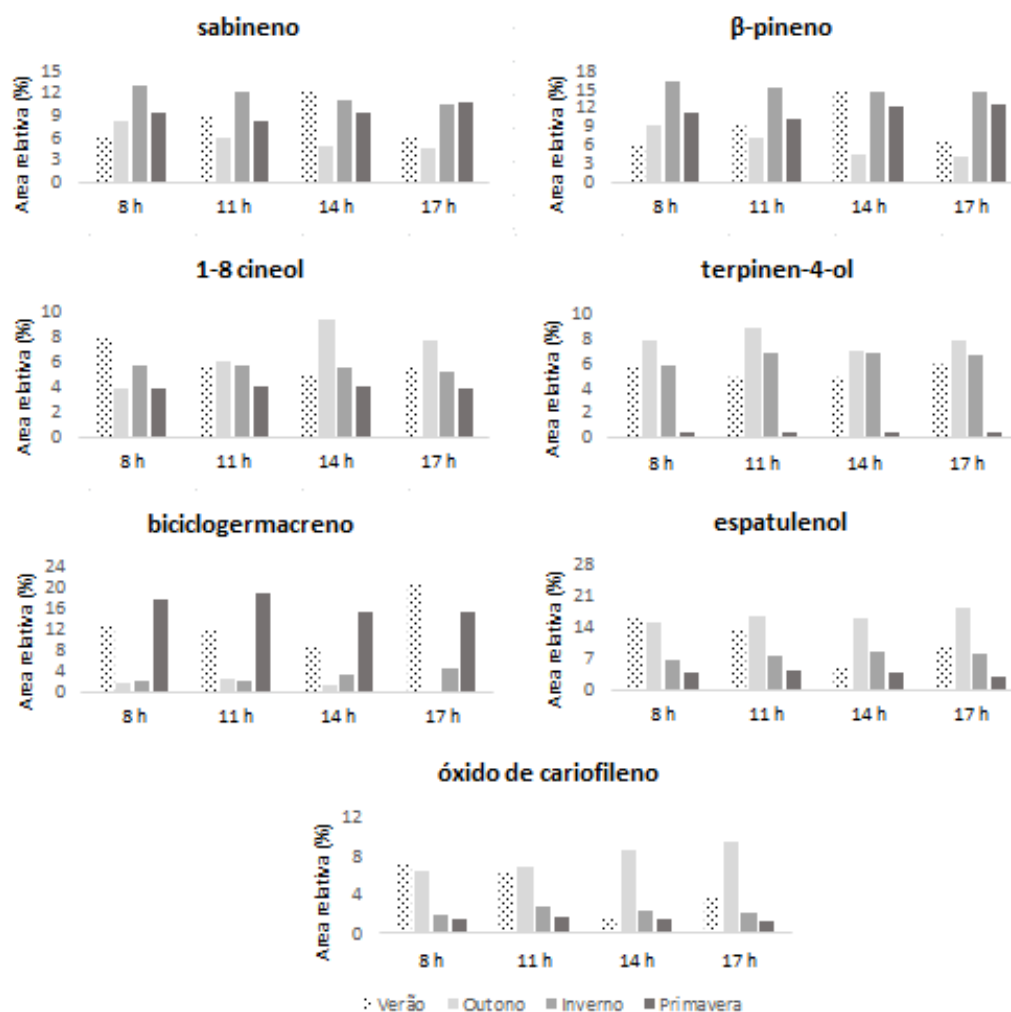


Figura 8 Variações na porcentagem dos componentes majoritários presentes no óleo essencial das folhas de *C. dinisii* em função da sazonalidade e horário de coleta

Resultados similares de influência do horário de coleta sobre a composição dos óleos essenciais foi observado em estudo com *Lippia alba*. Ehlert et al. (2013) demonstraram, para esta espécie, que o horário de coleta influenciou na porcentagem relativa dos principais componentes do óleo. A concentração dos compostos majoritários, carvona e limoneno, variaram nos

diferentes horários de colheita avaliados. A carvona apresentou maior porcentagem às 10h e o limoneno às 16h, se comparado aos outros horários estudados.

As diferenças qualitativas no perfil químico do óleo essencial de *C. dinisii* podem ser caracterizadas pelas diferenças quantitativas observadas nos teores das distintas classes de terpenos. Observou-se que houve uma grande flutuação dos teores das classes químicas de terpenos conforme a estação do ano e o horário de coleta.

Os monoterpenos hidrocarbonetos, em geral, foram a classe que apresentou maiores teores em todas as estações. Os sesquiterpenos hidrocarbonetos apresentaram menores concentrações no outono e inverno se comparado as outras estações. Os monoterpenos e os sesquiterpenos oxigenados apresentaram maiores concentrações no outono e menores na primavera.

As maiores influências do horário de coleta foram observadas para os monoterpenos hidrocarbonetos que, em geral, apresentaram maiores concentrações no horário das 17h.

Diferenças qualitativas na composição química do óleo foram observadas entre as estações. Os constituintes terpinoleno, α -terpineno e o germacreno D estavam presentes no verão e primavera e ausentes no outono e inverno. Já o viridiflorol esteve presente no inverno e na primavera e ausente nas outras estações. O eugenol foi o único fenilpropanóide identificado no óleo da pimenteira, ele esteve presente somente nas coletas realizadas no verão (Tabela 2).

A influência sazonal sobre a constituição química de óleos essenciais observada neste estudo, também foi observada em estudos anteriores. Luz et al. (2014) identificou maior porcentagem de citral no óleo extraído de *Melissa officinalis* coletada no verão. No inverno a produção do citral foi desfavorecida

pela produção de outros metabólitos, tais como citronelal, citrolenol, citronelato de metila, cariofileno e óxido de cariofileno.

Chaves (2002) avaliou o efeito da sazonalidade sobre a composição do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum*, (alfavaca cravo). Os resultados obtidos, neste estudo, demonstraram que houve interferência na composição do óleo essencial em função da sazonalidade. O óleo essencial extraído das folhas de *O. gratissimum* apresentou como componente majoritário, o eugenol no verão, e o β -selineno e *E*-cariofileno no inverno.

Estes resultados comprovam que a época em que a planta é coletada é muito importante, já que a composição química quantitativa e qualitativa de seus metabólitos secundários pode variar ao longo do dia e do ano. Estas variações químicas ocorrem como uma resposta da planta frente às condições ambientais em que ela está se desenvolvendo. Temperatura, umidade, duração e intensidade das irradiações solares, interações com polinizadores e predadores são algumas das condições que influenciam na composição química dos óleos essenciais (CERQUEIRA et al., 2009).

3.3 Atividade antimicrobiana

O potencial antimicrobiano do óleo essencial de *C. dinisii* foi avaliado frente *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium* e *Candida albicans*.

Os resultados do teste de microdiluição (Tabela 3) demonstraram que o óleo de *C. dinisii* se mostrou efetivo contra as bactérias e a *C. albicans*, porém a efetividade foi maior frente a *C. albicans*. Tanto a CIM quanto a CFM para *C. albicans* foram de 0,5625 μ l/ml. A inibição de bactérias foi observada nas concentrações 18 e 36 μ l/ml do óleo. Para a *S. aureus* a CIM e a CMB também apresentaram resultados coincidentes, ambas foram de 18 μ l/ml. A CIM e CMB

estabelecidas para *E.coli* e *Salmonella* Typhimurium foram maiores ou iguais concentrações de 36 µl/ml do óleo de *C. dinisii*. Os resultados das análises dos controles demonstraram que o Tween 80 e o álcool não influenciaram o crescimento dos microrganismos testados. As concentrações inibitórias mínimas para o fluconazol foi de 0,5 mg/ml fluconazol para *C. albicans*, 7,81 mg/ml amoxicilina para *S.aureus*, 1,95 mg/ml amoxicilina para *E.coli*, e 0,9766 mg/ml amoxicilina para *Salmonella* Typhimurium.

Tabela 3 Concentração inibitória mínima (CIM), concentração mínima bactericida/concentração fungicida mínima (CMB/CFM) do óleo de *C. dinisii* frente a *S. aureus*, *E. coli*, *S. Typhimurium* e *C. albicans*.

Microrganismos	CIM (µl de óleo/ml)	CMB/CFM (µl de óleo/ml)
<i>S. aureus</i> ATCC 6538	18	18
<i>E. coli</i> ATCC 8739	> 36	> 36
<i>S. Typhimurium</i> ATCC 14028	36	> 36
<i>C. albicans</i> ATCC 10231	0,5625	0,5625

Estes resultados corroboram com os resultados de atividade microbiana observados por Andrade et al. (2013), com o óleo essencial das folhas de *C. dinisii*. Neste estudo o óleo da pimenteira apresentou baixo efeito inibitório contra bactérias *S. aureus* ATCC 13565, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *E. coli* ATCC 11229, *Salmonella* Cholerasuis ATCC 6539 e *Pseudomas aeruginosa* 15442. Por outro lado, as concentrações mínimas inibitórias para as espécies fúngicas *Aspergillus flavus*, *A. carbonarius*, *A. niger* e *Penicillium comune*. foi de 31,25- 125,00 µl /ml, atividade considerada satisfatória por esses autores.

A análise cromatográfica deste óleo de *C. dinisii* indicou a presença de 5 componentes principais: α -pineno (27,18%), sabineno (15,23%), β -pineno (16,84%), 1,8-cineol (5,02%) e biciclogermacreno (6,64%).

Apesar da atividade antimicrobiana do óleo essencial da *C. dinisii* ainda ter sido pouco estudada, estudos com óleos essenciais de diversas espécies vegetais já comprovaram o potencial antimicrobiano desta classe de metabólitos secundários. O óleo essencial de alecrim, *Romarinus officinallis*, rico em cânfora, verbenona e 1,8-cineol, sendo este último também majoritário no óleo de *C. dinisii* em questão, apresentou atividade antifúngica sobre *Candida albicans* em concentrações a partir de 2,5 μ l/ml (CLEFF et al., 2012). Assim como o óleo de essencial de alecrim, os óleos essenciais de *Cinnamomum zeylanicum* e *Pneumus boldus* demonstraram atividade anti-*Candida*, com um potencial de 58% de inibição das leveduras testadas (LIMA et al., 2006).

Nakashima, Franco e Boller (2005) também demonstraram atividade do óleo de *Eucalyptus cinerea* frente *C.albicans*, sendo que o 1-8 cineol e o α -pineno foram alguns dos constituintes majoritários deste óleo. Este resultado condiz com os resultados do óleo da pimenteira que também apresentou o 1-8-cineol e o α -pineno como principais compostos e atividade antigúngica frente a cepas de *C. albicans*.

Os resultados deste estudo demonstraram maior poder inibitório sobre *C. albicans* quando comparado às espécies bacterianas testadas. Almeida et al. (2013), já haviam observado comportamento semelhante ao testar a atividade antimicrobiana do óleo essencial extraído das folhas de *Cymbopogon citratus*. O óleo de *C. citratus* demonstrou maior porcentagem de inibição do crescimento de *C.albicans* comparado à *S. aureus* e *Streptococcus mutans*.

Os óleos essenciais representam um dos derivados de plantas mais estudados quanto à atividade antimicrobiana, porém o mecanismo desta

atividade não está totalmente elucidado. Segundo Prabuseenivasan, Jayakumar e Ignacimuthu (2006) a hidrofobicidade dos óleos essenciais estão relacionada ao possível mecanismos de sua ação antimicrobiana. Esta característica química facilita a interação deste metabólito secundário com estruturas celulares lipídicas dos microrganismos. Esta interação promove o aumento da permeabilidade celular e conseqüente saída de eletrólitos e compostos intracelulares essenciais à sobrevivência da célula dos microrganismos.

A atividade antibacteriana de óleos essenciais tem sido comprovada em diversos estudos científicos e a cada dia surgem novos estudos neste sentido (NASCIMENTO et al., 2007). O óleo da pimenteira apresentou maior efetividade contra bactérias gram positiva *S. aureus*, quando comparada as gram negativas *E.coli* e *Salmonella Typhimurium*,. Este fato pode estar relacionado à presença de membrana externa nas bactérias Gram negativas, já que a atividade antimicrobiana do óleo foi ainda menor sobre as espécies Gram negativas. Esta membrana corresponde a uma superfície lipofílica que impede a penetração de compostos hidrofóbicos, como os óleos essenciais (BURT, 2004).

4 CONCLUSÃO

O rendimento extrativo do óleo essencial das folhas frescas de *Cinnamodendron dinisii* sofre influência da sazonalidade, porém não sofre influência dos horários de colheita.

Variações sazonais e de horário de colheita sobre os teores dos constituintes químicos do óleo ocorrem principalmente com os compostos principais. Estes compostos foram o α -pineno, o β -pineno, o sabineno, o 1,8-cineol, o terpinen-4-ol, o biciclogermacreno, o espatulenol e o óxido de cariofileno.

As análises microbiológicas demonstraram atividade frente às espécies bacterianas *S. aureus*, *S. entérica* e *E. coli*, porém, o óleo de *C. dinisii* demonstrou maior atividade contra cepas de fungos de *C. albicans*. Apesar dos resultados da atividade antimicrobiana ser incipientes, os mesmos demonstram um caminho para o desenvolvimento de novas alternativas de medicamentos ao difícil tratamento de infecções fúngicas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/Quadrupol e mass spectroscopy**. Carol Stream: Allured, 2007.
- ALMEIDA, R. B. A. et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf. on *Staphylococcus* spp., *Streptococcus mutans* and *Candida* spp. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 15, n. 4, p. 474-482, 2013.
- ANDRADE, M. A. et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. **Antioxidants**, Basel, v. 2, p. 384-397, 2013.
- BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.
- CERQUEIRA, M. D. et al, Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 6, p. 1544-1548, 2009.
- CHAVES, F. C. M. **Produção de biomassa, rendimento e composição de óleo essencial de alfavaca-cravo (*Ocimum gratissimum* L.) em função de adubação orgânica e épocas de corte**. 2002. 144 p. Tese (Doutorado em Agronomia) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2002.

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

EHLERT, P. A. D. et al. Influência do horário de colheita sobre o rendimento e composição do óleo essencial de erva-cidreira brasileira [*Lippia alba*(Mill.) N. E. Br.] **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 15, n. 1, p. 72-77, 2013.

GAZIM, Z. C. et al. Seasonal variation, chemical composition, and analgesic and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of *Tetradenaria riparia* (Hochst.) Codd in southern Brazil. **Molecules**, Basel, v. 15, p. 5509-5524, 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, p. 374-381, 2007.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. 3. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2009. v. 2, 384 p.

LUZ, J. M. Q. et al. Produção de óleo essencial de *Melissa officinalis* L. em diferentes épocas, sistemas de cultivo e adubações. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 16, n. 3, p. 552-560, 2014.

NAKASHIMA, J. F.; FRANCO, L.; BOLLER, C. Composição química e atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Mull. ex Benth., Myrtaceae, extraído em diferentes intervalos de tempo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 3, p. 191-194, jul./set. 2005.

NASCIMENTO, P. F. C. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 1, p. 108-113, jan./mar. 2007.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard. 6th ed. Wayne, 2003.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version 2.0 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library**. Gaithersburg, 2008.

PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 6, n. 39, p. 1-8, 2006.

PUPO, M. T. et al. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

R DEVELOPMENT CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, 2012. Disponível em: <<http://www.R-project.org/>>. Acesso em: 23 abr. 2015.

REITZ, R. **Flora ilustrada catarinense: Canellaceae**. Itajaí: Herbário Barbosa Rodrigues, 1988.

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