



CHRISTIANE MARIA DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA, ANTITUMORAL E ENSAIOS
ANTIOXIDANTES DO ÓLEO ESSENCIAL das
folhas e flores de *Callistemon viminalis***

**LAVRAS – MG
2015**

CHRISTIANE MARIA DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA,
ANTITUMORAL E ENSAIOS ANTIOXIDANTES DO ÓLEO ESSENCIAL
das folhas e flores de *Callistemon viminalis***

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

Orientadora
Dra. Maria das Graças Cardoso

**LAVRAS – MG
2015**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Oliveira, Christiane Maria.

Caracterização Química, Atividade Antibacteriana, Antitumoral
e Ensaio Antioxidante do Óleo essencial das Folhas e Flores de
Callistemon viminalis. / Christiane Maria Oliveira. – Lavras :
UFLA, 2015.

111 p. : il.

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

Orientador(a): Maria das Graças Cardoso.

Bibliografia.

1. Myrtaceae. 2. Potencial antioxidante. 3. Folhas e Flores. 4.
Câncer. 5. Atividades microbiológicas. I. Universidade Federal de
Lavras. II. Título.

CHRISTIANE MARIA DE OLIVEIRA

CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIBACTERIANA,
ANTITUMORAL E ENSAIOS ANTIOXIDANTES DO ÓLEO ESSENCIAL
das folhas e flores de *Callistemon viminalis*

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

APROVADA em 20 de fevereiro de 2015.

Dra. Marisi Gomes Soares	UNIFAL
Dra. Marisa Ionta	UNIFAL
Dr. Luís Roberto Batista	UFLA

Orientadora
Dra. Maria das Graças Cardoso

**LAVRAS – MG
2015**

DEDICO E OFEREÇO

A Deus, pela oportunidade e privilégio de ter me permitido chegar até aqui, e se for da vontade dele, ir mais longe.

Aos meus pais, Luiz e Nazaré.

Aos meus irmãos, Michele, David e Thiago, pelo apoio e carinho sempre.

À minha querida avó, Onecy pelo amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, acima de tudo, por ser presença constante em minha vida, por não me deixar tropeçar nesta caminhada em busca dos meus objetivos.

Aos meus queridos pais e irmãos, pelo amor incondicional, apoio e orações. Em especial ao meu irmão David, pela amizade e companheirismo sempre.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria das Graças Cardoso, pela oportunidade, por acreditar no meu potencial; pelo convívio durante esses cinco anos, por ter sempre me atendido prontamente quando precisei de ajuda e por compartilhar com tanta simplicidade de sua valiosa experiência.

À professora Dra. Marisi Gomes Soares, pela colaboração, pelo auxílio com as análises cromatográficas, pelo agradável convívio durante a minha hospedagem em sua casa, e toda a equipe do seu Laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM), da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL).

À professora Dra. Marisa Ionta, pela disponibilidade, orientação e sugestões sempre pertinentes; à toda a sua equipe do Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt), da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) pela realização dos ensaios antitumorais; em especial ao seu aluno Guilherme pela dedicação e auxílio na condução do experimento.

Ao Professor Dr. Luís Roberto Batista, pela disposição no seu Laboratório de Micotoxina e Micologia do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (DCA/UFLA), pela realização das atividades antibacterianas.

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

Aos amigos do Laboratório de Química Orgânica - Óleos Essenciais e de Análise de Qualidade de Aguardente, Cleusa, Cíntia, Lucilene, Danúbia, Maria Luisa, Rafaela Vieira, Luana, Thaís, Karen, Rafaela Brandão, Leonardo,

Wilder, Felipe, João, Rodolfo, Lucas, Gabriel, Alex e Bruno pelos bons momentos de convivência, pela amizade e ajuda nas dificuldades. Em especial, agradeço ao Leonardo pela amizade e ajuda nos testes antimicrobianos, ao Marcos pela dedicação e auxílio na condução do experimento de antioxidantes, pela sua humildade em estar sempre disposto em nos ajudar e a Juliana Andrade pelo companheirismo na realização dos testes antitumorais.

Aos amigos que sempre caminharam comigo e de forma decisiva contribuíram para que este sonho se tornasse real. A vocês, minha eterna gratidão!

Aos professores do programa de Pós-graduação em Agroquímica, pelo trabalho competente e responsável que desempenham junto a coordenação deste programa.

Às funcionárias da seção de pós-graduação pela atenção e colaboração.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Química (DQI), pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

Agradeço acima de tudo à minha família, apoio incondicional.

RESUMO GERAL

Este trabalho foi realizado com o objetivo de analisar a composição química dos óleos essenciais das folhas e flores de *Callistemon viminalis*, avaliar a atividade antibacteriana, realizar estudos referentes a atividade antitumoral e o potencial antioxidante “*in vitro*”. A extração dos óleos essenciais foi realizada pelo método de hidrodestilação, utilizando o aparelho de Clevenger modificado com duração de 2 horas, sendo, posteriormente, caracterizado quimicamente por Cromatografia em Fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (CG/EM) e Cromatografia em Fase Gasosa equipado com um Detector de Ionização de Chamas (CG/DIC). A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada pela técnica de difusão em cavidade em ágar, utilizando os micro-organismos *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Escherichia coli* ATCC 11229 e *Salmonella Cholerasuis* ATCC 6539. Os testes antitumorais foram realizados em linhagens celulares derivadas de tumores humanos utilizando no presente estudo cinco linhagens de células tumorais, carcinoma de pulmão (A549), adenocarcinoma mamário (MCF7), carcinoma de fígado (HepG2), glioblastoma (U251) e melanona (HT144). Também foi determinada a atividade antioxidante dos óleos essenciais por meio de diversas metodologias. Os constituintes majoritários que caracterizam os óleos essenciais das folhas e das flores foram os mesmos, 1,8 cineol, α -pineno e α -terpineol, nas concentrações de (50,4%, 25,8% e 8,7%) para as folhas e de (48,8%, 24,5% e 3,9%) para as flores respectivamente, havendo apenas pequenas diferenças quantitativas entre eles. O óleo essencial das folhas de *C. viminalis* apresentou atividade moderada sobre as bactérias tanto Gram-positivas e Gram-negativas, e o óleo essencial das flores somente apresentou atividade nas bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, não apresentando valores de inibição para as outras bactérias testadas. Analisando atividade antitumoral pode-se observar que os OE das folhas e flores apresentaram atividade moderada sobre a linhagem celular HT144, sendo observado na mesma uma redução da viabilidade dose-dependente em cerca de 40% e 25% na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os óleos essenciais analisados apresentaram baixo desempenho em relação à atividade antioxidante diante das diversas metodologias empregadas.

Palavras-chave: Myrtaceae. Potencial antioxidante. Folhas e Flores. Câncer. Atividades microbiológicas.

ABSTRACT

This work was carried out in order to analyze the chemical composition of the essential oils from the leaves and flowers of *Callistemon viminalis*, evaluate the antibacterial activity, perform studies on the antitumor activity and the antioxidant potential "in vitro". The extraction of essential oils was performed by hydrodistillation method, using the Clevenger apparatus modified with a duration of 2 hours, and subsequently chemically characterized by Gas Phase Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC/MS) and Gas Phase Chromatography equipped with a Flame Ionization Detector (GC/FID). Evaluation of antibacterial activity was carried out by diffusion in agar cavity using microorganisms *Staphylococcus aureus* ATCC 13565, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Escherichia coli* ATCC 11229 and *Salmonella cholerasuis* ATCC 6539. The tests were performed on anti-tumor derived cell lines of human tumors in this study using five tumor cell lines, lung carcinoma (A549), breast adenocarcinoma (MCF7), liver carcinoma (HepG2), glioblastoma (U251), and melanoma (HT144). It was also determined the antioxidant activity of essential oils through different methodologies. The major constituents featuring essential oils of leaves and flowers were the same, 1.8 cineole, α -pinene and α -terpineol, the concentrations of (50.4%, 25.8% and 8.7%) for and leaves (48.8%, 24.5% and 3.9%) for flowers respectively, with only minor quantitative differences between them. The essential oil from leaves of *C. viminalis* showed moderate activity against both Gram-bacteria positivas and Gram-negative, and the essential oils from flowers only showed activity in Gram-positiva *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, showing no inhibition values for the other bacteria tested. Analyzing antitumor activity can be observed that the leaves and flowers of the OE showed moderate activity on the cell line HT144, the same being observed a reduction in dose-dependent viability by about 40% and 25% at a concentration of 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Essential oils analyzed showed low performance in relation to the antioxidant activity on the different methodologies used.

Keywords: Myrtaceae. Antioxidant potential. Leaves and flowers. Cancer. Microbiological activities.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários.....	22
Figura 2	Estrutura básica de um fenilpropanoide.....	24
Figura 3	Estrutura química do isopreno.....	24
Figura 4	Biossíntese de fenilpropanoides.....	25
Figura 5	Mecanismo de formação das unidades isoprênica ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) pela via do mevalonato.....	26
Figura 6	Mecanismo de formação das unidades isoprênica ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) pela via da 1-deoxi-D-xilulose -5- P mevalonato.....	28
Figura 7	Esquema das vias de biossíntese de isoprenoides em plantas, a partir da formação dos blocos de isoprenóides isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilalil pirofosfato.....	29
Figura 8	Mecanismos de redução do DPPH.....	42
Figura 9	Reação de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico...	43
Figura 10	Reações para determinar o sequestro do radical hidroxil.....	44
Figura 11	Reações ocorridas na atividade antioxidante do fosfolipídênio empregando o ácido gálico como agente antioxidante.....	45
Figura 12	Reação de redução íon ferricianeto ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) a ferricianato ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$).....	46
Figura 13	Redução do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.....	47

Figura 14	Reação do malonaldeído com o ácido tiobarbitúrico (TBA)....	48
Figura 15	Aspecto geral da espécie <i>Callistemon viminalis</i>	49
Figura 16	Reação de redução do MTS a formazano por enzimas mitocondriais.....	58
Figura 17	Principais constituintes químicos encontrados nos óleos essenciais das folhas e flores de <i>C. viminalis</i>	69
Figura 18	Viabilidade celular (%) determinada através do ensaio MTS em culturas de células tratadas com óleo essencial de folhas de <i>C. viminalis</i> a 50 µg.mL ⁻¹	75
Figura 19	Viabilidade celular (%) determinada através do ensaio MTS em culturas de células tratadas com óleo essencial de flores de <i>C. viminalis</i> a 50 µg.mL ⁻¹	76
Figura 20	Viabilidade celular (%) determinada através do ensaio MTS em culturas de células HepG2 tratadas com óleo essencial de folhas de <i>C. viminalis</i> em diferentes concentrações por 48 horas.....	77
Figura 21	Viabilidade celular (%) determinada através do ensaio MTS em culturas de células HepG2 tratadas com óleo essencial de flores de <i>C. viminalis</i> em diferentes concentrações por 48 horas.....	78
Figura 22	Viabilidade celular (%) determinada através do ensaio MTS em culturas de células HT144 tratadas com óleo essencial de folhas de <i>C. viminalis</i> em diferentes concentrações por 48 horas.....	79
Figura 23	Viabilidade celular (%) determinada através do ensaio MTS em culturas de células HT144 tratadas com óleo essencial de flores de <i>C. viminalis</i> em diferentes concentrações por 48	

	horas.....	80
Figura 24	Análise comparativa entre as atividades antioxidante de OE de folhas e flores de <i>C. viminalis</i> e do padrão BHT, em função da concentração, pela metodologia do sequestro de radicais de DPPH.....	84
Figura 25	Estrutura do 1,8-cineol, principal constituinte químico encontrado nos óleos essenciais das folhas e flores de <i>C. viminalis</i>	86
Figura 26	Análise comparativa entre as atividades antioxidante de OE de folhas e flores de <i>C. viminalis</i> e do padrão BHT, em função da concentração, pelo teste β -caroteno/ácido linoleico.....	87
Figura 27	Análise comparativa entre as atividades antioxidante de OE de folhas e flores de <i>C. viminalis</i> e do padrão BHT, em função da concentração, pelo teste do ABTS.....	88
Figura 28	Análise comparativa entre as atividades antioxidante de OE de folhas e flores de <i>C. viminalis</i> e do padrão Ácido ascórbico, em função da concentração, pelo teste da porcentagem de inibição do radical hidroxil.....	90
Figura 29	Análise comparativa entre as atividades antioxidante de OE de folhas e flores de <i>C. viminalis</i> e do padrão BHT, em função da concentração, pelo método do fosfomolibdênio.....	91
Figura 30	Análise comparativa entre as atividades antioxidante de OE de folhas e flores de <i>C. viminalis</i> e do padrão BHT, em função da concentração, pelo método do poder redutor.....	93
Figura 31	Análise comparativa entre as atividades antioxidante de OE de folhas e flores de <i>C. viminalis</i> e do padrão BHT, em função	

da concentração, pela inibição da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)..... 94

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Linhagens celulares tumorais humanas utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa <i>in vitro</i>	57
Tabela 2	Resultados do teor de umidade e rendimentos do óleo essencial das folhas e flores da planta expressos em % p/p BLU (base livre de umidade).....	66
Tabela 3	Composição química do óleo essencial das folhas e flores de <i>C. viminalis</i> identificados por CG/EM.....	68
Tabela 4	Concentração mínima inibitória CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do óleo essencial das folhas e flores de <i>C. viminalis</i> encontrada para os micro-organismos <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Escherichia coli</i> , e <i>Salmonella Choleraesuis</i> .	71

LISTA DE SIGLAS E SÍMBOLOS

Acetil-CoA	Acetil-Coenzima A
BHA	Butil-hidroxi-anisol
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
AA	Ácido ascórbico
BLU	Base livre de umidade
CCD	Cromatografia de Camada Delgada
GC	Cromatografia Gasosa
GC/MS	Cromatografia gasosa acoplada ao espectrômetro de massas
GC/FID	Cromatografia em fase gasosa com detector por ionização de chamas
CI ₅₀	Concentração de 50% de inibição
CO ₂	Dióxido de carbono
COMTRADE	Commodity Trade Statistics Database
MDIC	Ministério do Desenvolvimento, Indústria e Comércio Exterior.
DIC	Delineamento inteiramente casualizado
DMAPP	Dimetilalil difosfato
IPP	Isopentenil difosfato
GPP	Geranilgeranil difosfato
GP	Galato de propila
GGPP	Geranil-geranil difosfato
DXPS	1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato
FPP	Farnesil difosfato
MEP	2-C-metil-D-eritrol-4-fosfato
DNA	Ácido desoxiribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazila
DPPH-H	2,2-defenil-picril-hidrazina
EDTA	Ácido etileno diamino tetra acético
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERRO	Espécies Reativas de Oxigênio
FDA	Food and Drug Administration
FID	Detector por ionização de chamas
OE	Óleo essencial
¹ O ₂	Oxigênio singleto
O ²⁻	Radical superóxido
OH [•]	Radical hidroxila
NO [•]	Óxido nítrico
ONOO ⁻	Peroxinitrito
Q [•]	Radical semiquinona
BHA	Butil-hidroxi-anisol

BHT	2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno
TBHQ	Tert-butil-hidroquinona
PG	Galato de propila
OH^-	Hidroxila
CH_3O^-	Metoxila
$\bullet\text{OH}$	Hidroxil
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
H_2O_2	Peróxido de hidrogênio
TBA	Ácido tiobarbitúrico
TCA	Ácido tricloroacético
Mo	Molibdênio
ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
UNIFAL	Universidade Federal Alfenas
UV-VIS	Ultravioleta visível
MCF7	Adenocarcinoma mamário
HEPG2	Carcinoma de fígado
A549	Carcinoma de pulmão
DEMEN	Dulbecco Modified Eagle Médium Mínimo Essencial
DMSO	Dimetilsulfóxido
MTS	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazólio)]
IR	Índice de retenção
v	Vestigial
BHI	Caldo-infusão de cérebro e coração
CL	Cloranfenicol
CMI	Concentração inibitória mínima
ISSO	International Organization for Standardization
Cm	Centímetro
G	Gramma
Kg	Quilograma
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celsius
L	Litros
M	Metros
μL	Microlitro
μg	Micrograma
R	Rendimento
μm	Micrômetro
mL	Mililitro
Nm	Nanômetro

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	19
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	21
2.1 Metabólitos secundários de plantas	22
2.2 Metabólitos secundários de plantas	22
2.3 Óleos essenciais	24
2.3.1 Mercado dos óleos essenciais.....	32
2.3.2 Propriedades biológicas dos óleos essenciais	33
2.3.2.1 Efeito inibitório dos óleos essenciais sobre bactérias.....	34
2.3.2.1.1 <i>Staphylococcus aureus</i>	35
2.3.2.1.2 <i>Listeria monocytogenes</i>	36
2.3.2.1.3 <i>Escherichia coli</i>	37
2.3.2.1.4 <i>Salmonella Cholerasius</i>	38
2.3.2.2 Câncer e atividade antitumoral	38
2.3.2.2.1 Aspectos gerais.....	38
2.3.2.2.2 Atividade antitumoral de produtos naturais e sintéticos	40
2.3.2.3 Atividade antioxidante de óleos essenciais.....	42
2.3.2.3.1 Metodologias empregadas na avaliação da atividade antioxidante.....	44
2.3.2.3.2 Método de sequestro de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazina)	44
2.3.2.3.3 Sistema β -caroteno/ácido linoleico.....	46
2.3.2.3.4 Hidroxil.....	47
2.3.2.3.5 Fosfomolibdato	48
2.3.2.3.6 Poder redutor.....	48
2.3.2.3.7 ABTS (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico)....	49
2.3.2.3.8 Análise da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS).....	50
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	52
3.1 Óleos essenciais	52
3.1.1 Coleta e preparação da espécie vegetal	52
3.1.2 Extração do óleo essencial	52
3.1.3 Determinação da umidade	53
3.1.4 Caracterização química e quantificação dos óleos essenciais	53
3.1.5 Avaliação da atividade bacteriana in vitro	54
3.1.5.1 Micro-organismos utilizados	55
3.1.5.2 Manutenção e ativação das culturas bacterianas	55
3.1.5.3 Teste de Difusão Cavidade em Ágar.....	55

3.1.6 Avaliação in vitro da atividade antitumoral.....	57
3.1.6.1 Linhagens celulares e condições de cultivo.....	57
3.1.6.2 Esquema de Tratamento.....	57
3.1.6.5 Viabilidade celular.....	58
3.1.7 Determinação da atividade antioxidante.....	59
3.1.7.1 Método de sequestro de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila).....	59
3.1.7.2 Sistema β-caroteno/ácido linoleico.....	60
3.1.7.3 Hidroxil.....	62
3.1.7.4 Fosfomolibdato.....	62
3.1.7.5 Poder redutor.....	63
3.1.7.6 ABTS.....	64
3.1.7.7 TBARS.....	64
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	66
4.1 Determinação da umidade e do rendimento das extrações dos óleos essenciais.....	66
4.2 Caracterização química e quantificação dos constituintes químicos nos óleos essenciais.....	68
4.3 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais.....	71
4.4 Atividade antitumoral in vitro.....	74
4.5 Atividade antioxidante de óleos essenciais.....	81
5. CONCLUSÕES.....	94
6. REFERÊNCIAS.....	95
7. ANEXOS.....	108

1 INTRODUÇÃO

As plantas têm sido tradicionalmente usadas por populações de todos os continentes no controle de diversas doenças e pragas, além de representar uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais se constituem modelos para síntese de um grande número de fármacos. O fato que gera interesse nos produtos encontrados na natureza é que esses apresentam enorme diversidade em termos de estrutura e de propriedades biológicas. A diversidade molecular dos produtos naturais é muito superior àquela derivada dos processos de síntese, que apesar dos avanços consideráveis, ainda é limitada. Estudos apontam que a maior parte da população nacional usa a medicina alternativa como fonte de recursos terapêuticos (DEWICK, 2009).

Com o aumento da demanda pela utilização de plantas medicinais na cura ou prevenção de doenças, há uma tendência mundial em resgatar hábitos de vida mais saudáveis, o que aumenta a utilização de plantas nas mais variadas formas. Isso impulsiona maiores estudos que busquem a caracterização, identificação e isolamento de novos compostos de plantas com propriedades medicinais e atividades farmacológicas. Entre estes compostos, destacam-se os óleos essenciais, que são substâncias extraídas dos vegetais por diferentes técnicas, despertando interesse devido as suas diversas propriedades como antissépticos, antimicrobianos, antifúngicos, antitumorais, anti-inflamatórios, repelentes, entre outras (SIMÕES et al., 2007).

Adicionalmente, os óleos essenciais tem sido bastante estudados na busca de novos compostos com atividade antioxidante reduzindo os efeitos negativos causados pelos radicais livres proporcionando assim qualidade aos alimentos e atuando na cura e prevenção de uma série de doenças.

Os óleos essenciais portanto, são considerados possíveis fontes naturais para o desenvolvimento de novos estudos. No entanto, grande parte da flora brasileira ainda não foi completamente estudada, sendo uma alternativa promissora para descoberta de novos compostos químicos de interesse farmacológico.

Diante do exposto, o presente trabalho objetivou-se analisar a composição química do óleo essencial das folhas e flores de *Callistemon viminalis*, avaliar a atividade antibacteriana, realizar estudos referentes a atividade antitumoral e o potencial antioxidante “*in vitro*”.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 *Callistemon viminalis*

A espécie aromática *Callistemon viminalis*, popularmente conhecida como escova-de-garrafa, pertence à família Myrtaceae, é uma árvore de porte médio e folhagem persistente (Figura 15A). Está distribuída nos trópicos úmidos nomeadamente à Austrália, América do Sul e na Ásia tropical, e, atualmente está espalhada em todo o mundo. Sua nomenclatura deve-se ao formato interessante da florescência, que se parece com uma escovinha (Figura 15B). Muitas espécies desta família são importantes fontes de frutos comestíveis, temperos, plantas ornamentais e medicinais (OYEDEJI et al., 2009). Estudos relatam sua utilização na forma de chá, no tratamento de gastroenterites, diarreias e infecções de pele sendo também utilizada na China para o tratamento de hemorroidas (COWAN, 1999; JI, 2009).



(A)



(B)

Figura 15 Aspecto geral da espécie *Callistemon viminalis*: (A); Detalhe da inflorescência (B).

A maior parte dos constituintes dos óleos essenciais da família Myrtaceae são monoterpenos, fenóis, e sesquiterpenos, sendo diretamente responsáveis pelas atividades biológicas. Algumas espécies *Callistemon*, especialmente *Callistemon viminalis* são amplamente utilizadas como bioindicadores ambientais, sendo muito usadas como plantas ornamentais devido às suas flores decorativas. São fonte de compostos químicos com propriedades inseticidas, fungicidas e antimicrobiana (ZANDI-SOHANI; HOJJATI; CARBONELL-BARRACHINA, 2013).

OLIVEIRA et al. (2014) estudando o efeito alelopático do óleo essencial das flores de *C. viminalis* observou que o mesmo apresentou intensidades que variou proporcionalmente com as concentrações apresentando um efeito moderado. Foi relatada também atividade inseticida do óleo essencial das folhas contra o caruncho do feijão *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera; Bruchidae) apresentando segundo os autores uma moderada atividade (NDORMO et al., 2010).

Além desses, estudos anteriores relatam atividade antifúngica, antibacteriana e inseticida dos óleos essenciais da espécie *Callistemon* (NGUEFACK et al., 2007; SEYYDNEJAD et al., 2010; NDOMO et al., 2010).

2.2 Metabólitos secundários de plantas

As plantas possuem dois tipos de metabolismo que são divididos em dois grandes grupos; metabólitos primários, como a celulose, lignina, proteínas, lipídios entre outras, que realizam suas principais funções vitais e que fazem parte da atividade celular de praticamente todos os seres vivos e metabolismo secundário que não são considerados essenciais, porém, garantem vantagem para

a sua sobrevivência. Esses metabólicos têm, principalmente, função de atração e de defesa, são substâncias de baixo peso molecular, geralmente produzidas em pequenas quantidades, com características químicas muito variadas e são responsáveis por funções nem sempre bem definidas (OOTANI et al., 2013).

Atualmente, sabe-se que esses compostos estão diretamente envolvidos nos mecanismos que permitem a adequação daquele que o produz ao seu meio, por exemplo, atuando na defesa contra herbívoros e micro-organismos, na atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes e também na proteção contra os raios UV. Muitos são de importância comercial nas áreas farmacêutica, alimentar, agrônômica, perfumaria e outras (PEREIRA; CARDOSO, 2012). São biossintetizados somente em alguns tecidos ou mesmo em células especiais, devido ao grau de diferenciação e desenvolvimento deles, podendo, em alguns casos, a produção estar restrita a um estágio específico do desenvolvimento vegetal ou de determinadas condições ecológicas ou ambientais. Os tipos de metabólitos secundários são específicos de algumas espécies e/ou famílias (PIMENTEL et al., 2006).

Os metabólitos secundários produzidos pelas plantas podem ser divididos em três grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados, sendo todos eles originados do metabolismo da glicose, via dois intermediários principais: o ácido chiquímico e o acetato conforme apresentado na Figura 1 (SIMÕES et al., 2007).

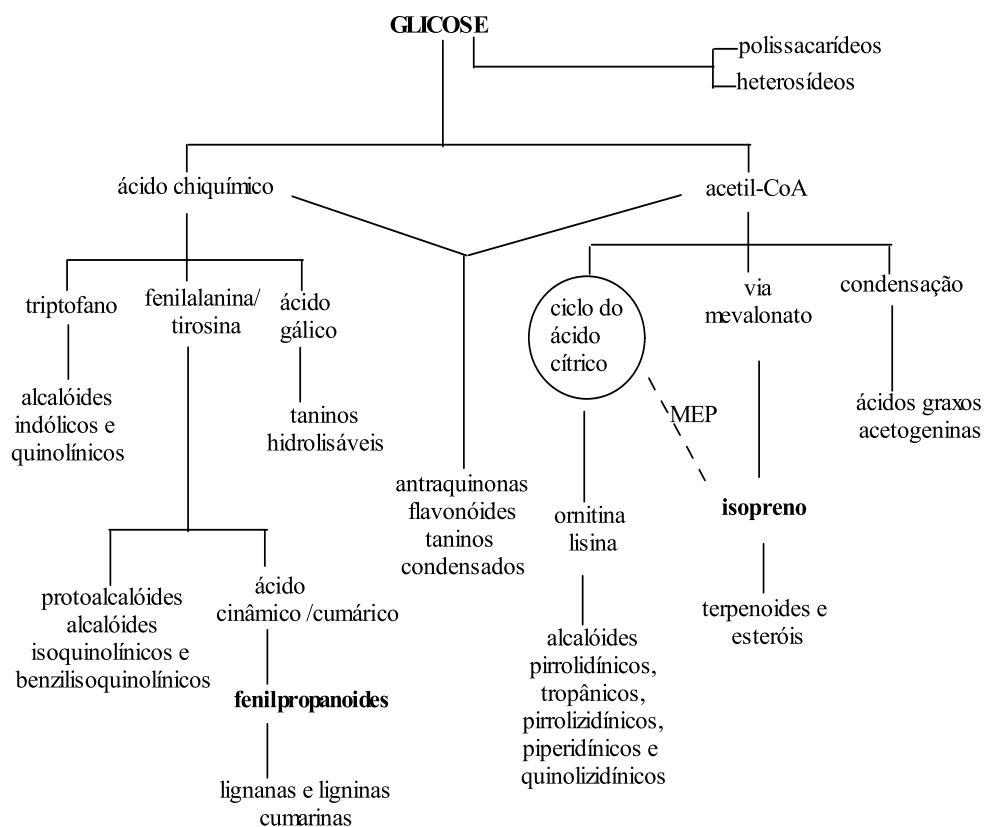


Figura 1 Principais rotas de biossíntese de metabólitos secundários.
Fonte: Simões et al. (2007).

2.3 Óleos essenciais

Entre os metabólitos secundários produzidos pelas plantas, os óleos essenciais destacam-se por sua grande importância terapêutica e econômica, representando a segunda classe de compostos naturais, com maior número de constituintes ativos. Conforme a International Standard Organization (ISO),

descrito por Simões et al. (2007), os óleos essenciais são produtos obtidos de partes de plantas por meio de destilação por arraste com vapor d'água, bem como produtos obtidos por pressão dos pericarpos de frutos cítricos. São definidos como misturas complexas de compostos voláteis, líquidos e geralmente odoríferos. Também são chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências por serem de aparência oleosa à temperatura ambiente e quando recentemente extraídos, são geralmente incolores ou ligeiramente amarelados, poucos sendo aqueles que apresentam cor como alto teor de azulenos, encontrado no óleo essencial extraído da camomila, mil-folhas e arnicão (GUIMARÃES et al., 2014).

Em geral, os óleos essenciais são muito instáveis na presença de luz, oxigênio, calor, substâncias oxidantes, redutoras e metais, sofrendo inúmeras reações de degradação, em sua maioria possuem elevado índice de refração de luz e são opticamente ativos, sendo essas propriedades utilizadas na sua identificação e no controle de qualidade (DEWICK, 2009).

Dependendo da família, os óleos essenciais podem ser encontrados em diferentes órgãos da planta como nas raízes, rizomas, folhas, flores, sementes entre outros, podendo ser encontrados em diferentes estruturas secretoras como em canais oleíferos, pêlos glandulares, bolsas lisígenas, e células parenquimáticas diferenciadas (MIRANDA et al., 2014).

A estrutura química dos óleos essenciais é composta basicamente por carbono, oxigênio e hidrogênio, sendo formados por uma mistura de diversas moléculas orgânicas, como hidrocarbonetos terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas e compostos sulfurados. Na mistura, tais compostos apresentam-se em diferentes concentrações, normalmente um deles é o composto majoritário, havendo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços). Apesar da

complexidade da composição, os constituintes dos óleos voláteis são formados por fenilpropanoides e terpenoides (DEWICK, 2009).

Os fenilpropanoides são caracterizados por apresentarem em sua estrutura um anel benzênico com uma cadeia lateral de três carbonos (Figura 2) e os terpenoides são constituídos de duas ou mais moléculas de isopreno (2-metil-1,3-butadieno) (Figura 3) (LÜCKER, 2002).

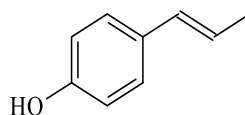


Figura 2 Estrutura básica de um fenilpropanoide

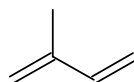


Figura 3 Estrutura química do isopreno

Os fenilpropanoides são formados a partir do ácido chiquímico, formado por unidades básicas dos ácidos cinâmico ou p-cumárico (Figura 4). Os ácidos cinâmicos são os precursores da maioria dos compostos fenilpropanoides, esses ácidos por meio de reduções enzimáticas, originam propenilbenzenos e alilbenzenos que, por meio de reações de oxidação com degradação das cadeias laterais, geram diversos compostos presentes na constituição de muitos óleos essenciais (LÜCKER, 2002).

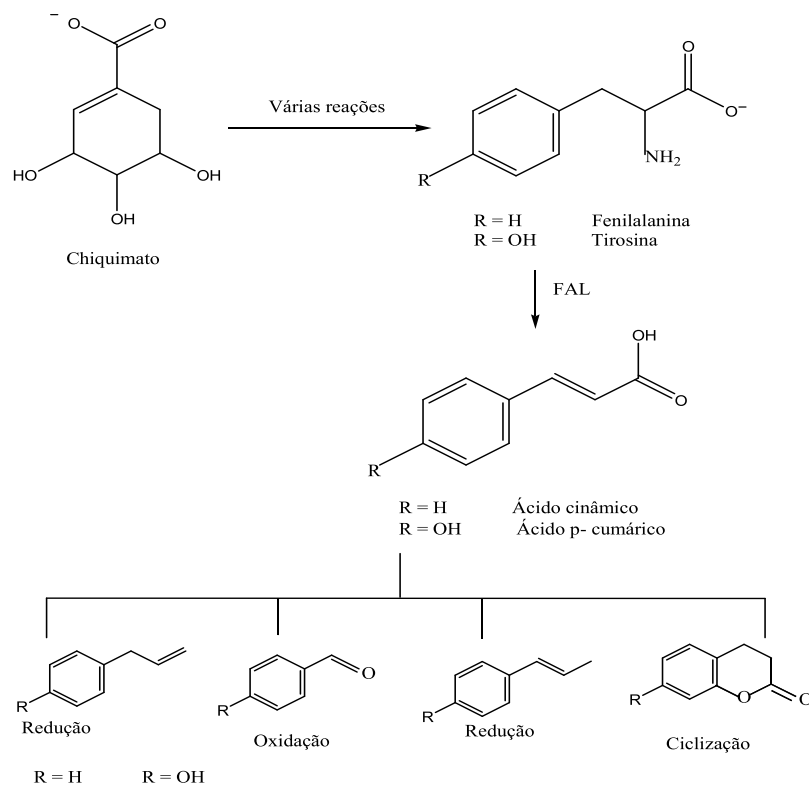


Figura 4 Biossíntese de fenilpropanoides.
Fonte: Dewick (2009).

Os terpenoides representam uma grande variedade de substâncias vegetais, sendo o termo empregado para designar todas as substâncias cujo monômero básico é o isopreno. Os compostos terpênicos frequentemente encontrados nos óleos essenciais são os monoterpênicos (90% dos óleos voláteis) e os sesquiterpenos.

Na formação dos terpenos, pode-se observar duas rotas metabólicas, a do mevalonato e a do 1-desoxi-D-Xilulose-5-fosfato (Figura 5).

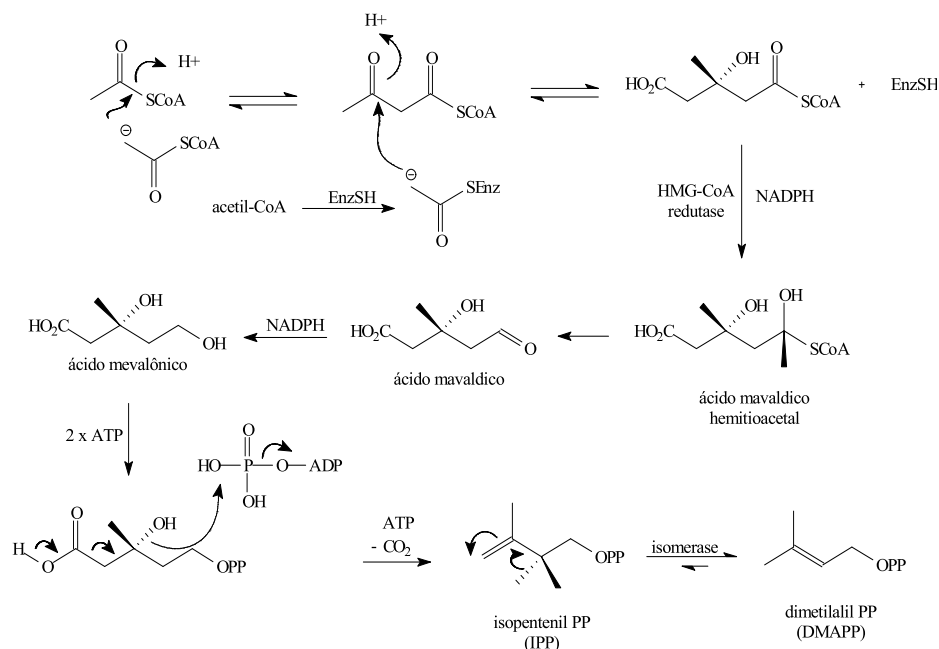


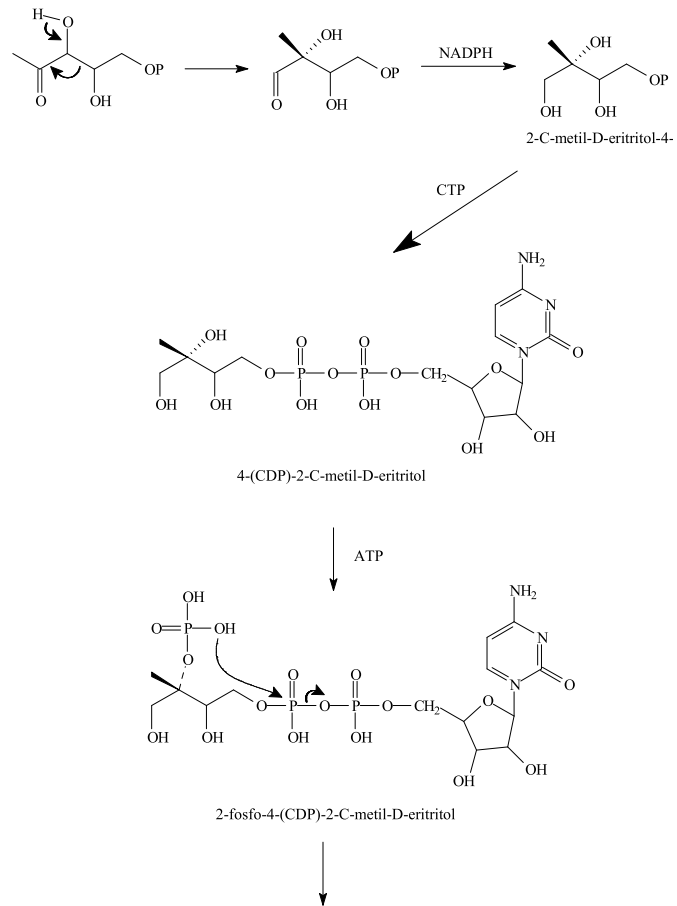
Figura 5 Mecanismo de formação das unidades isoprênicas ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) pela via do mevalonato (DEWICK, 2009).

Fonte: Adaptada de Resende (2013).

Pela primeira rota, três moléculas de acetil CoA são ligadas, a partir de uma série de etapas, para formar o ácido mevalônico. Esse importante intermediário de seis carbonos é, então, pirofosforilado, descarboxilado e desidratado para produzir o isopentenil difosfato (IPP), que é a unidade básica na formação dos terpenos (RESENDE, 2013).

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

intermediário, que é convertido em IPP (SIMÕES et al., 2007, descrito por REZENDE, 2013) (Figura 6).



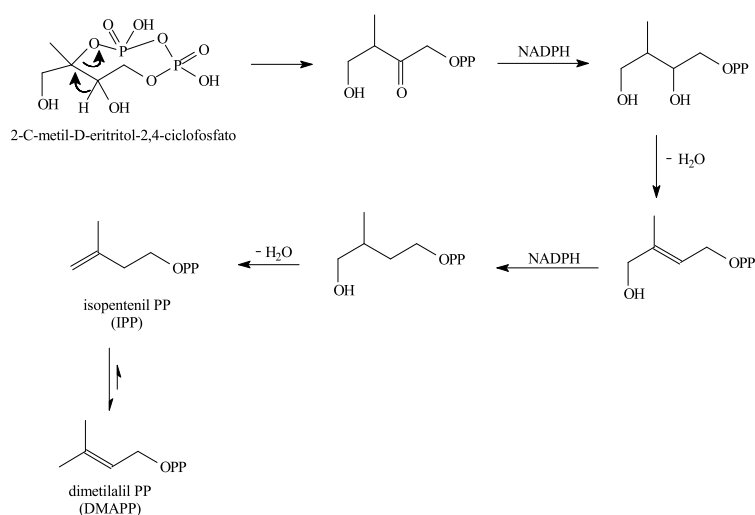


Figura 6 Mecanismo de formação das unidades isoprênica ativas, dimetilalil difosfato (DMAPP) e isopentenil difosfato (IPP) pela via da 1-deoxi-D-xilulose -5- P mevalonato (SIMÕES et al., 2007).

Fonte: Adaptada de Resende (2013).

O isopentenil difosfato e seu isômero, o dimetilalil difosfato (DMAPP), são as unidades pentacarbonadas ativas na biossíntese dos terpenos, que se unem para formar moléculas maiores. Inicialmente, o IPP e o DMAPP reagem e formam o geranyl difosfato (GPP), uma molécula de 10 carbonos, a partir da qual são formados os monoterpenos. O GPP pode, então, ligar-se a outra molécula de IPP, formando um composto de 15 carbonos, o farnesil difosfato (FPP), precursor da maioria dos sesquiterpenos. A adição de outra molécula de IPP forma o geranylgeranyl difosfato (GGPP), composto de 20 carbonos, precursor dos diterpenos. Finalmente, FPP e GGPP podem dimerizar para formar triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40), respectivamente (Figura 7) (LÜCKER, 2002).

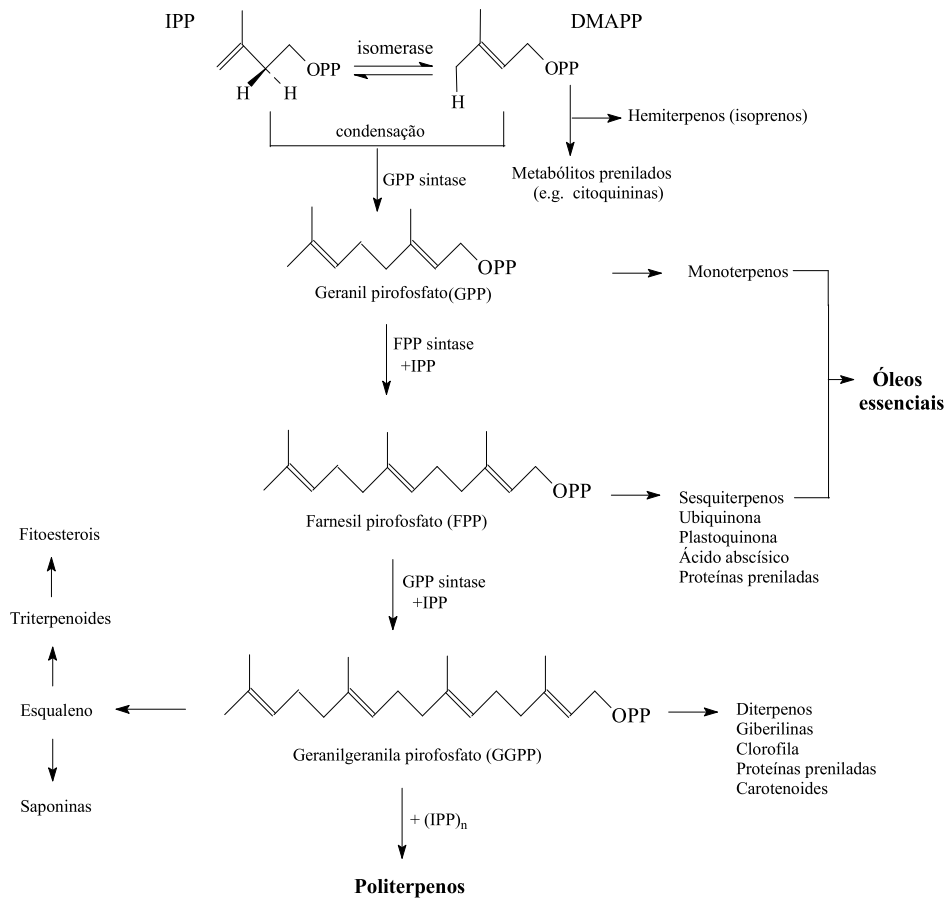


Figura 7 Esquema das vias de biossíntese de isoprenoides em plantas, a partir da formação dos blocos de isoprenóides isopentenil pirofosfato (IPP) e dimetilalil pirofosfato (DMAPP) (DEWICK, 2009).
 Fonte: Adaptada de Resende (2013).

Durante muito tempo, os óleos essenciais foram considerados como desperdício fisiológico ou produtos de desintoxicação. Atualmente, desenvolvem funções relacionadas com sua volatilidade, agindo como inibidores da germinação, na proteção contra predadores, na atração de polinizadores, na proteção contra a perda de água e aumento da temperatura, entre outras atividades estudadas (OOTANI et al., 2013).

2.3.1 Mercado dos óleos essenciais

Atualmente, muitas indústrias comercializam óleos essenciais como matéria-prima para diversos produtos, com aplicações na perfumaria, cosmética, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos. Aproximadamente 300 óleos essenciais são de importância comercial no mundo, dentre os quais se destacam os óleos essenciais de laranja, limão, lima, eucaliptos (tipos cineol e citronelal), citronela, hortelã-pimenta, e dentre outros (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

O mercado mundial de óleos essenciais vem crescendo constantemente, sua produção brasileira é avaliada em 35 milhões de dólares, o que corresponde a 13,1% da produção mundial. O maior problema da agroindústria produtora de óleos é a concorrência com similares sintéticos. Felizmente, a indústria que mais necessita desse, a alimentícia, tem substituído os produtos sintéticos por naturais, por causa das exigências atuais do mercado (INTERNATIONAL TRADE STATISTICS, 2014).

De acordo com a base de dados americana COMTRADE, os maiores consumidores de OE no mundo são os EUA (40%), a União Européia - UE (30%), sendo a França o país líder em importações e o Japão (7%), ao lado do Reino Unido, Alemanha, Suíça, Irlanda, China, Cingapura e Espanha. O

mercado mundial de OE gira em torno de US\$ 10 milhões/ano, apresentando crescimento aproximado de 11% por ano (INTERNATIONAL TRADE STATISTICS, 2014).

O Brasil ocupa lugar de destaque na produção de óleos essenciais, sendo o 3º maior exportador de óleos essenciais do mundo, com aproximadamente US\$ 410 milhões, perdendo apenas para os Estados Unidos e França. No entanto, desse volume, 91% consiste em óleo essencial de cítricos, principalmente laranja (80%). O Brasil produz e exporta por ordem de importância óleos essenciais de laranja, limão, eucalipto, pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), lima (*Citrus limettioides*) e capim-limão (*Cymbopogon citratus*) e importa outros óleos como sassafrás (*Ocotea odorifera*) e menta (*Mentha piperita*) (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009; BRASIL, 2014). Muitas espécies são utilizadas como plantas aromáticas, especialmente como matéria prima para fabricação de produtos de limpeza. O óleo essencial da espécie *Eucalyptus* pertencente a família Myrtaceae está entre os mais comercializados, sendo o seu principal componente o 1,8-cineol, um dos responsáveis por suas propriedades (TOMAZ et al., 2014).

2.3.2 Propriedades biológicas dos óleos essenciais

A aplicação de óleos essenciais varia de lugar para lugar, e parecem depender da disponibilidade, o tipo e a eficácia das plantas adequadas em diferentes localizações geográficas.

Os óleos essenciais são considerados fontes naturais para o desenvolvimento de novos produtos. No entanto, grande parte das espécies vegetais que ainda não foram estudadas são de grande importância, sendo descoberta de novos compostos químicos, a partir de plantas, capazes de

controlar o desenvolvimento de microorganismos e atuar em diversos mecanismos.

Estudos confirmam a atividade biológica de várias espécies de plantas produtoras de óleos essenciais que apresentam ação anti-inflamatória, antibacteriana, antifúngica, inseticida, alelopática, antioxidante, entre outras, sendo largamente empregados por suas propriedades já observadas na natureza (BIASI; DESCHAMPS, 2009; BAKKALI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2014). Fatores como estrutura, grupo funcional e composição do óleo essencial determinam sua atividade biológica e suas propriedades físico-químicas, determinando assim a sua aplicação.

2.3.2.1 Efeito inibitório dos óleos essenciais sobre bactérias

Os alimentos quando não manipulados de forma correta, são capazes de transmitir diversos micro-organismos, muitas vezes patógenos para os homens. Várias bactérias são responsáveis pela contaminação de produtos estocados e alimentos industrializados, causando sérios problemas de intoxicação alimentar para a saúde pública. Entre elas, citam-se as bactérias Gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes* e Gram-negativas *Salmonella Cholerasius*, *Escherichia coli*.

A resistência desses microrganismos patogênicos vem se tornando cada vez mais grave, devido às dificuldades para se descobrirem e de se lançarem novos antimicrobianos. Assim, esse problema tem contribuído durante décadas para estudos de novos compostos sintéticos e/ou naturais originados de plantas (PUPO; COUTINHO; VIEIRA, 2007).

Os óleos essenciais de várias espécies de plantas podem atuar como agentes naturais na preservação de alimentos e serem acrescentados durante seu processamento, inibindo o crescimento de bactérias e fungos.

2.3.2.1.1 *Staphylococcus aureus*

As bactérias do gênero *Staphylococcus* pertencem à família Micrococcaceae. Além deste gênero, outros como *Planococcus*, *Micrococcus* e *Stomatococcus*, fazem parte da mesma (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A principal espécie deste gênero é o *S. aureus*, que tem a forma esférica (são cocos) Gram-positivos, cerca de 0,5 a 1,5 µm de diâmetro, e formam grupos com aspecto de cachos de uvas.

É um importante patógeno envolvido na etiologia das infecções humanas, sendo encontrado, como microbiota normal, nas fossas nasais, virilha e axilas. É responsável por diferentes tipos de infecções, a maioria infecções ligeiras da pele e tecidos moles, mas também é agente etiológico de formas graves de pneumonia e endocardites. De acordo com levantamentos do Ministério da Saúde trata-se de uma bactéria que se tornou resistente a vários antibióticos; primeiramente à penicilina, em 1947, e, logo depois, à meticilina. (MENEGOTTO; PICOLI, 2007; BRASIL, 2007).

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

Entre os principais substratos alimentícios, capazes de suportar o desenvolvimento natural do *Staphylococcus aureus*, podem ser citados os

produtos lácteos, como os queijos, leite cru ou pasteurizado, manteiga e sorvetes, produtos de confeitaria, como bolos recheados, tortas e doces cremosos, carnes frescas e curadas, ovos e massas alimentícias (SANTOS, 2004).

2.3.2.1.2 *Listeria monocytogenes*

As espécies de *Listeria* são bacilos delgados e curtos Gram-positivos que não formam esporos, sendo móveis (com flagelos peritríquios), 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 (ADAMS; MOSS, 2004; JAY, 2005).

Listeria spp. é um microrganismo que se encontra amplamente disseminado na natureza, podendo ser encontrada no solo, na água, nos alimentos e como microbiota normal do homem e animais (ADAMS; MOSS, 2004). Todas as espécies de *Listeria* são encontradas na natureza e podem, eventualmente, contaminar os alimentos, sendo estes, leite cru ou pasteurizado, queijos, sorvetes, vegetais crus, carnes e derivados, aves, peixes e frutos do mar porém, somente a *Listeria monocytogenes* é patogênica para o homem, tornando-se um dos principais patógenos nas doenças transmitidas pelos alimentos (TAEGER, 1999).

A listeriose, doença causada pela bactéria *L. monocytogenes*, é vista em humanos como uma doença invasiva em grupos de risco bem definidos, podendo afetar, principalmente, indivíduos imunodeprimidos, gestantes e idosos, sendo uma zoonose de grande importância na saúde pública, visto que pode ocasionar aborto, septicemias e meningites nos quais a doença é altamente perigosa. Órgãos de saúde e indústrias alimentícias aumentaram o interesse sobre *L. monocytogenes* devido a diversos fatores, entre eles, a resistência a

condições adversas (elevada concentração de sais, baixas temperaturas), a gravidade da patologia e à incidência de listeriose veiculada por alimentos (HARVEY; CHAMPE; FISHER, 2008).

2.3.2.1.3 *Escherichia coli*

A *Escherichia coli* é uma bactéria Gram negativa com diâmetro de 1,1 a 1,5 x 2,0 a 6 µm, anaeróbica facultativa e um dos habitantes mais comuns do trato intestinal. Sua presença na água e nos alimentos é um importante indicador de contaminação fecal, porém, não é normalmente considerada patogênica, entretanto, pode ser a responsável de infecções urinárias e produtora de enterotoxinas, que podem causar graves doenças de origem alimentar (TORTORA, 2000). Pertence à família Enterobacteriaceae, pode ser móvel, dotada de flagelos peritricóicos ou imóveis. Possuem um papel nutricional importante, sintetizando vitaminas, especialmente a vitamina K. A *Escherichia coli* geralmente permanece confinada ao lúmen intestinal sem causar nenhum dano; entretanto, em organismos imunossuprimidos ou debilitados, ou quando a barreira gastrointestinal é violada, até mesmo as linhagens não patogênicas de *E. coli* podem causar infecção (SOLORZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

Pelo o fato de o gado bovino apresentar-se como um portador assintomático de *E. coli* patogênica, pode-se explicar a incidência destas cepas em alimentos elaborados à base de carne, leite não pasteurizado e derivados, e em vegetais crus e minimamente processados. O leite e derivados podem sofrer contaminação direta ou indireta por esse micro-organismo (SAGINUR; SUH, 2008; CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION, CDCP, 2000; ISLAM et al., 2005).

2.3.2.1.4 *Salmonella Cholerasuis*

As salmonelas se apresentam na forma de bacilos medindo de 0,7-1,5 x 2,0-5µm, Gram-negativos e anaeróbios facultativos. Existem mais de 2.324 diferentes sorovares no gênero *Salmonella*, produzindo muitas e variadas enfermidades identificadas de um grande número de hospedeiros distribuídos pelo mundo. Apresentam crescimento ótimo a 37 °C. A maioria das cepas são móveis, apresentando na sua estrutura flagelos peritríquios (FRANCO; LANDGRAF, 2008).

A *Salmonella Cholerasuis* é uma *Salmonella enterica* sorovar *Cholerasuis*, que faz parte dos sorovares adaptados ao hospedeiro neste caso a suínos. Essa espécie tem propensão de invadir a corrente sanguínea (bacteremia), causando febre alta e persistente, dor no tórax, calafrios, sudorese e vômito, e o estado pode ser passageiro ou crônico (JAY, 2005).

2.3.2.2 Câncer e atividade antitumoral

2.3.2.2.1 Aspectos gerais

O câncer é uma das doenças que, ainda nos dias atuais, mais causa mortes no mundo, também denominado de neoplasia maligna e tumor maligno. É caracterizada pela divisão e crescimento desordenado de células que são capazes de invadir órgãos e tecidos, podendo espalhar-se (metástase) para outras regiões do corpo, dividindo-se rapidamente, estas células tendem a ser muito agressivas e incontroláveis, determinando a formação de tumores (acúmulo de células cancerosas) ou neoplasias malignas (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, INCA, 2014; LEMKE; WILLIANS, 2008). Diversos fatores, incluindo sexo,

idade, alimentação, raça e predisposição genética estão relacionados à incidência, distribuição geográfica e o comportamento de tipos específicos de cânceres.

O processo de carcinogênese pode evoluir em três fases: iniciação ou fase celular, promoção ou tecidual, progressão ou sistêmica.

Na fase de iniciação, tanto os fatores endógenos como exógenos, podem por um único evento, induzir um dano irreversível ao DNA de uma célula. Contudo, um único evento não é suficiente para induzir uma mudança maligna, necessitando posteriormente da ação de promotores tumorais.

Na fase de promoção, segue a expansão clonal da célula transformada, que sofre inúmeras alterações genéticas e epigenéticas. Frequentemente os tumores são detectados nesta fase.

A fase final é de progressão, onde as células transformadas adquirem outras modificações genéticas e epigenéticas, entram em um processo proliferativo ilimitado, com um aumento do grau de malignidade, o tumor aumenta de tamanho e pode se espalhar formando focos secundários de tumor (metástase). As metástases caracterizam a fase sistêmica das neoplasias (WORLD HEALTH ORGANIZATION, WHO, 2014).

Entre as doenças crônico-degenerativas de maior incidência na população ocidental destaca-se o câncer. Nas últimas décadas, o câncer vem se apresentando como um problema de saúde pública mundial, despertando um grande interesse na pesquisa para o desenvolvimento de fármacos com atividade antitumoral (BRANDÃO et al., 2010).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que até 2030 sejam previstos 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, convivendo com esta doença. O maior efeito desse aumento vai incidir em países de baixas e médias rendas. No Brasil, as estimativas para o ano de 2014, válidas também para o ano de

2015, apontam a ocorrência de aproximadamente 576 mil casos novos de câncer, incluindo os casos de pele não melanoma, que é o tipo mais incidente, reforçando a magnitude do problema do câncer no país (INCA, 2014; WHO, 2014).

Através de pesquisas relacionadas aos produtos naturais, a descoberta de medicamentos para o câncer vem sendo cada vez mais estudada, sendo que cerca de 60% dos medicamentos utilizados tem em alguma instância, sua origem relacionada à uma fonte natural. Diante da enorme biodiversidade do país, as fontes naturais ainda estão disponíveis em abundância e oferecem as melhores possibilidades de encontrar substâncias de interesse terapêutico (COSTA-LOTUFO et al., 2010).

2.3.2.2.2 Atividade antitumoral de produtos naturais e sintéticos

Em vista da importância das plantas medicinais para a sociedade atual, os estudos de extratos vegetais com atividade antitumoral têm se intensificado na busca de novos agentes quimioterápicos mais seguros e efetivos para o tratamento do câncer.

Historicamente, há evidências da utilização de agentes quimioterápicos sob a forma de sais metálicos como o arsênico, cobre e chumbo em civilizações antigas do Egito e da Grécia. Porém, a partir da década de 50, com a identificação dos primeiros antibióticos antitumorais, houve um rápido desenvolvimento da quimioterapia antitumoral, levando ao descobrimento de diversos fármacos importantes. Gullo et al. (2006), relatam que dos novos fármacos descobertos para tratamento de câncer e doenças infecciosas, 60 e 75% respectivamente eram oriundos de fontes naturais.

Atualmente as pesquisas continuam no sentido de desenvolver novas substâncias, porém a ênfase maior reside na descoberta de substâncias mais

seletivas equivalentes as já conhecidas, com efeitos tóxicos menos agressivos, já que para todos os grupos de agentes antitumorais apresentados existem uma alta incidência de efeitos adversos associados à elevada toxicidade dos mesmos (PABLA; DONG, 2008).

Dentre os grandes sucessos alcançados nos últimos 20 anos também se destacam na pesquisa os agentes anticâncer provenientes de produtos naturais incluindo derivados sintéticos ou semi-sintéticos, os alcaloides vimblastina e vincristina que são extraídos da espécie *Catharanthus roseus* (Apocynaceae) frequentemente utilizados na medicina como potentes quimioterápicos (BRANDÃO et al., 2010).

A cisplatina ou cis-DDP (cis-diaminedichloroplatinum II) depois da descoberta de sua atividade anti-tumoral, tornou-se um fármaco sintético amplamente utilizado para o tratamento de câncer devido a sua importância estar relacionada à habilidade de causar um efeito satisfatório em pacientes com câncer testicular avançado, apresentando um resultado terapêutico significativo em câncer de ovário, útero, bexiga, cabeça/pescoço (RANG; DALE; RITTER, 1999; PABLA; DONG, 2008). Porém, seu uso contínuo pode levar a um considerável efeito tóxico e até mesmo a propensão dos tumores desenvolverem resistência ao fármaco.

Esses exemplos demonstram que a maior parte dos fármacos comercializados atualmente são de origem natural ou de produtos sintéticos baseados em produtos naturais. Assim, os produtos naturais constituem uma das principais fontes de drogas efetivas no tratamento do câncer, despertando um grande interesse no desenvolvimento de novos fármacos, com melhor atividade e menor toxicidade.

2.3.2.3 Atividade antioxidante de óleos essenciais

Nos últimos anos, com a tendência do mercado de utilizar produtos naturais, pesquisas com antioxidantes naturais tiveram grande destaque junto à comunidade científica. As suspeitas de que os antioxidantes sintéticos sejam carcinogênicos tem direcionado os estudos para os compostos naturais que apresentam esta capacidade, na tentativa de propiciar o desenvolvimento de técnicas que procuram reduzir os efeitos negativos de substâncias oxidantes.

A geração de radicais livres, resultado dos processos metabólicos necessários para produção de energia, causam prejuízos à saúde da população, o que aumenta ainda mais o interesse pelos compostos antioxidantes provenientes de fontes naturais (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006).

Compostos que contêm um ou mais elétrons não pareados e quimicamente ativos são conhecidos como radicais livres (R^{\cdot}). Entre as principais espécies de radicais livres, denominadas espécies reativas de oxigênio ou nitrogênio (ERRO ou 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) (ANDRADE et al., 2013).

Os radicais livres não causam danos somente nos alimentos, mas também ao organismo humano, sendo responsáveis por danos oxidativos nas células e tecidos, os quais têm sido relacionados com a citologia de várias doenças, dentre aquelas degenerativas, como o câncer, aterosclerose e cardiopatias, entre outras. O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes resulta em danos celulares, e é conhecido como estresse oxidativo (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os antioxidantes são definidos como substâncias que quando presentes em concentrações pequenas impedem ou retardam a velocidade da oxidação, por meio de um ou mais mecanismos, inibem e/ou diminuem os efeitos

desencadeados pelos radicais livres e compostos oxidantes em substratos oxidáveis. Estas substâncias podem ser enzimáticas, como a catalase e as glutatiónas peroxidases, encarregadas de reduzir peróxidos geradores de radicais $\cdot\text{OH}$ e $\cdot\text{OR}$, destaca-se também as superóxido dismutases, consideradas como a linha de frente de defesa antioxidante, ou não enzimáticas, como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno, ascorbato (vitamina C), os compostos fenólicos e os óleos essenciais (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Os antioxidantes sintéticos mais utilizados para controlar a oxidação lipídica são os compostos fenólicos butil-hidroxi-anisol (BHA), 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT), tert-butil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG) (SOUSA et al., 2007). Estudos toxicológicos têm demonstrado a possibilidade destes antioxidantes apresentarem efeito carcinogênico em experimentos realizados com animais, por isso, o uso destes antioxidantes sintéticos é restrito em vários países (RAMALHO; JORGE, 2006; PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Devido aos possíveis problemas que podem ser provocados pelo consumo de antioxidantes sintéticos, muitas pesquisas têm sido desenvolvidas a fim de encontrar produtos naturais com propriedade funcional de antioxidação, que permitirão a substituição dos sintéticos ou a sua redução nos alimentos.

Muitos componentes produzidos por plantas têm sido objeto de pesquisas em relação ao potencial antioxidante, demonstrando resultados satisfatórios. Entre eles têm-se os óleos voláteis (RUBERTO; BARATTA, 2000; KULISIC et al., 2004;) e componentes não voláteis testados na forma de extratos (TEPE et al., 2005; MATA et al., 2007; SINGH et al., 2008; CHAN et al., 2008).

A presença de compostos contendo um ou mais grupos hidroxila (OH), ou metoxila (CH_3O) ligados ao anel aromático, insaturações e elétrons disponíveis para serem doados, nos óleos essenciais, conferem a eles atividade

antioxidante. O grupo metóxi é um forte grupo doador de elétron, o que aumenta a estabilidade do anel benzênico, resultando em aumento da atividade sequestradora de radicais livres (CARVALHO, 2004).

Apesar dos estudos sugerirem que a maioria dos componentes possui atividade antioxidante, de acordo com Cerqueira, Medeiros e Augusto (2007), estudos sugerem que alguns desses compostos possuem atividade pró-oxidante, tornando necessários mais estudos referentes ao potencial antioxidante dos óleos essenciais.

2.3.2.3.1 Metodologias empregadas na avaliação da atividade antioxidante

Diferentes metodologias têm sido desenvolvidas para determinar a atividade antioxidante. São diversos os métodos analíticos permitindo uma rápida seleção de substâncias potencialmente eficientes na atividade antioxidante. Dentre os testes “*in vitro*” existentes, tem-se:

2.3.2.3.2 Método de sequestro de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazina)

Neste ensaio avalia-se a redução do radical estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), sendo um ensaio muito utilizado por ser um recurso fácil e preciso para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais (ANAGNOSTOPOULOU et al., 2006). Segundo Hristea et al. (2006), o DPPH apresenta muitas aplicações devido à sua alta estabilidade e à sua coloração púrpura que é perdida ao ser reduzido. Dessa forma, o processo de redução pode

ser monitorado espectrofotometricamente no comprimento de onda de 517 nm em solução metanólica ou etanólica (HUANG; OU; PRIOR, 2005).

A essência desse método está na reação dos compostos antioxidantes com o DPPH que o converte em 1,1-difenil-2-picrilhidrazina, ocorrendo a perda da coloração do meio reacional, o grau de descoloração indica o potencial de reduzir o radical DPPH e, conseqüentemente, a atividade antioxidante (JAYAPRAKASHA et al., 2007). De acordo com Ebrahimabadi et al. (2010), a redução do DPPH pode ocorrer via transferência de um átomo de hidrogênio ou por um mecanismo de transferência de elétrons por parte do composto antioxidante (Figura 8).

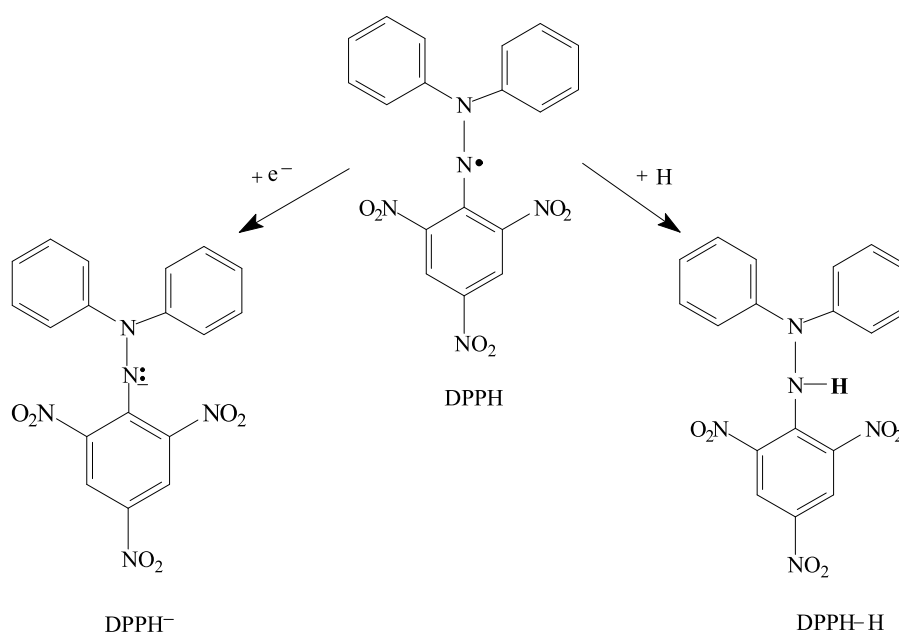


Figura 8 Mecanismos de redução do DPPH

2.3.2.3.3 Sistema β -caroteno/ácido linoleico

O método de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico avalia a capacidade de uma amostra ou composto em proteger um substrato lipídico da oxidação (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). É um ensaio baseado em medidas espectrofotométricas da descoloração (oxidação) do β -caroteno causada pelo ataque de radicais resultantes da oxidação do ácido linoleico por espécies reativas de oxigênio presentes no meio. Na ausência de substâncias antioxidantes no meio reacional, ele perde a coloração alaranjada rapidamente, uma vez que os radicais livres formados pela perda de um próton de um grupo metileno dialílico do ácido linoleico ataca as insaturações da molécula de β -caroteno, com isso o composto perde suas características cromólicas, e conseqüentemente a sua coloração laranja, que é monitorada espectrofotometricamente (Figura 9) (JAYAPRAKASHA et al., 2007).

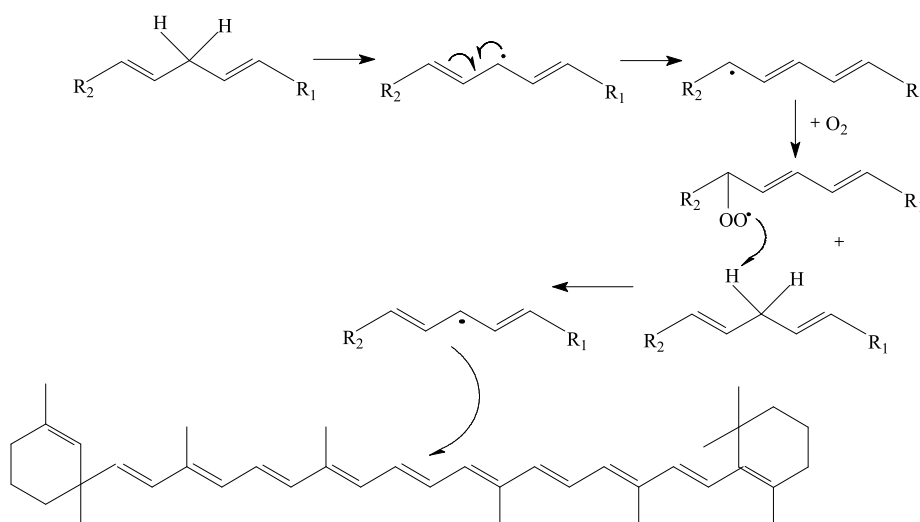


Figura 9 Reação de oxidação do Sistema β -caroteno/ácido linoleico

2.3.2.3.4 Hidroxil

Um dos métodos específicos para determinar o sequestro do radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) é o ensaio empregando-se a 2-deoxirribose. Neste ensaio, $\bullet\text{OH}$ é gerado pela reação do cloreto férrico (FeCl_3) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) na presença de ascorbato, que reagem para formar Ferro (II)-EDTA juntamente com ascorbato oxidado. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) reage com Ferro (II)-EDTA para formar Ferro (III)-EDTA e $\bullet\text{OH}$ através da reação de Fenton. O radical formado pode então reagir com 2-deoxirribose para formar produtos que, sob aquecimento com ácido tiobarbitúrico (TBA) em pH baixo, apresentam coloração rosada, sendo monitorado por espectrofotometria na região do visível (520 nm) (MARTÍNEZ-TOMÉ; GARCÍA-CARMONA; MURCIA, 2001) (Figura 10). No ensaio, ocorrem as seguintes reações:

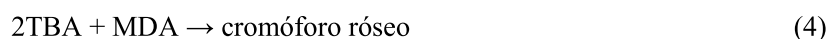
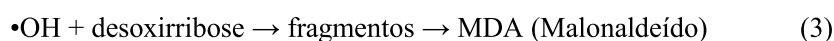


Figura 10 Reações para determinar o sequestro do radical hidroxil

Substâncias que tenham propriedades antioxidantes podem competir com a 2-desoxirribose pelo radical, acarretando num decréscimo da taxa de degradação de desoxirribose, produzindo assim uma diminuição na intensidade da coloração.

2.3.2.3.5 Fosfomolibdato

Este método baseia-se na redução do Mo (VI) para Mo (V), em presença de um composto antioxidante, ocasionando a formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V), em pH ácido, sendo determinado espectrofotometricamente a 695 nm (Figura 11). Por meio desta técnica, é possível determinar a capacidade antioxidante total da amostra em estudo.

A solução teste inicial possui coloração amarela, tornando-se verde a medida que a solução de fosfato de molibdênio se reduz. Este método possui a vantagem de avaliar a capacidade antioxidante tanto de componentes lipofílicos quanto de hidrofílicos (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

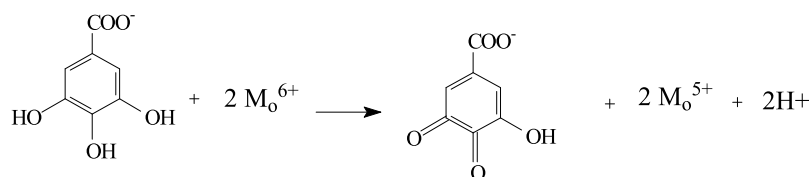


Figura 11 Reações ocorridas na atividade antioxidante do fosfomolibdênio empregando o ácido gálico como agente antioxidante

2.3.2.3.6 Poder redutor

O teste do poder redutor avalia a capacidade do antioxidante de reduzir o íon ferricianeto a ferricianato, que na presença do íon férrico (proveniente do FeCl_3) forma uma coloração azul da Prússia (Figura 12). Quanto maior a absorbância, maior a capacidade antioxidante devido à maior formação de ferricianeto férrico (SANTOS et al., 2007).

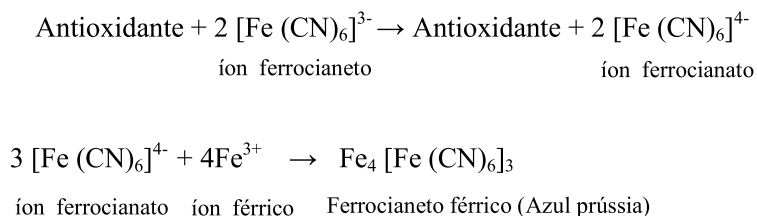


Figura 12 Reação de redução íon ferricianeto ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{3-}$) a ferricianato ($[\text{Fe}(\text{CN})_6]^{4-}$)

2.3.2.3.7 ABTS

A metodologia do ABTS ((2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico) mede a atividade antioxidante por meio da captura do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ que pode ser gerado através de uma reação química, eletroquímica ou enzimática (Figura 13).

O radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ necessita ser gerado antes por reações químicas (como o persulfato de potássio) ou enzimáticas, e, é solúvel tanto em água como em solventes orgânicos, permitindo a análise tanto de amostras hidrofílicas como lipofílicas (ARNAO, 2000).

Por meio da adição do persulfato de potássio, ocorre a formação do radical ABTS, que apresenta cor esverdeada. Na medida em que o antioxidante é misturado com esse radical, ocorre a redução do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a ABTS, provocando a perda da coloração do meio reacional. A Figura 13 representa a reação, em que o $\text{ABTS}^{\bullet+}$ apresenta forte absorção no intervalo de 600-750 nm e pode ser facilmente determinado espectrofotometricamente, sendo um radical estável na ausência de antioxidantes.

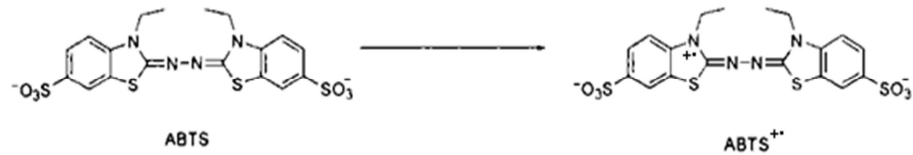


Figura 13 Redução do ABTS^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio

2.3.2.3.8 Análise da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica é um indicador de estresse oxidativo em células e tecidos. O malonaldeído (MDA) é um dos principais produtos formados no processo oxidativo, sendo portanto, amplamente utilizado como marcador biológico de peroxidação lipídica e estresse oxidativo. O princípio do método TBARS se baseia na interação entre o MDA que é formado a partir de um substrato lipídico e o ácido tiobarbitúrico (ATB). A condensação das moléculas de MDA e ATB forma um composto cor-de-rosa com forte absorvância a 532-535nm que pode ser facilmente identificado por espectrofotometria, permitindo a avaliação da peroxidação lipídica através do TBARS (Figura 14) (DEL RIO; STEWART; PELLEGRINI, 2005).

No entanto, o MDA não é o único produto de oxidação dos lipídios que reage com o TBA, o ácido tiobarbitúrico pode reagir com diferentes compostos carbonílicos formados durante a peroxidação, os quais são chamados de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico apresentando ao teste do TBA certas limitações (MOON; SHIBAMOTO, 2009).

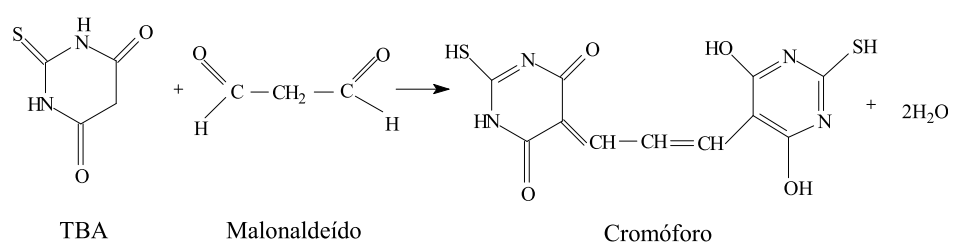


Figura 14 Reação do malonaldeído com o ácido tiobarbitúrico (TBA)

3 MATERIAL E MÉTODOS

A pesquisa foi desenvolvida na Universidade Federal de Lavras (UFLA) e em parceria com a Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL) sendo realizada nas etapas descritas a seguir:

3.1 Óleos essenciais

3.1.1 Coleta e preparação da espécie vegetal

A espécie vegetal foi coletada no mês de março de 2014, no período da manhã, no Câmpus da Universidade Federal de Lavras, na região de Lavras-MG (latitude de 21°13'S, longitude de 44°58'W e altitude média de 915m), sendo um dia de clima ameno e sem precipitação. As partes das plantas utilizadas para extração dos óleos essenciais foram às folhas e flores, separadamente. Essas foram limpas delicadamente, posteriormente picadas e pesadas, sendo imediatamente utilizadas para extração do óleo essencial.

A exsicata da planta foi preparada e levada ao Herbário ESAL, do Departamento de Biologia da Universidade Federal de Lavras, para confirmação de sua espécie cujo o registro é **26.624**.

3.1.2 Extração do óleo essencial

O óleo essencial das folhas e flores foi extraído no Laboratório de Química Orgânica da Universidade Federal de Lavras. O método de extração empregado foi o de hidrodestilação, utilizando-se o aparelho de Clevenger modificado (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA,

ANVISA, 2010). Foram pesadas 300 gramas do material vegetal e submetidas ao processo de hidrodestilação por 2 horas. Após a extração, 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 x G por 5 min. Após centrifugação o óleo essencial foi armazenado em recipiente âmbar escuro sob refrigeração.

Foram realizadas três extrações de óleo essencial para cada parte da planta (folha e flor).

O rendimento da extração do óleo essencial foi calculado e expresso em peso de óleo por peso de material com Base Livre de Umidade (% p/p BLU).

3.1.3 Determinação da umidade

Paralelamente às extrações, foi realizado o teste de umidade, utilizando-se 5g do material vegetal picado, imerso em 70 mL de cicloexano em balão de fundo redondo com capacidade de 250 mL, acoplado ao aparelho de Dean-Stark modificado. O material foi aquecido em uma manta aquecedora a uma temperatura de 35 °C aproximadamente por 2 horas, medindo-se o volume de água em um coletor volumetricamente graduado. A umidade foi calculada em triplicata, medindo-se o teor de água contido em 100g de amostra (PIMENTEL et al., 2006).

3.1.4 Caracterização química e quantificação dos óleos essenciais

A análise quantitativa e a identificação dos constituintes dos óleos essenciais foram realizadas no laboratório de Fitoquímica e Química Medicinal (LFQM) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL).

A análise por CG foi executada em um cromatógrafo Hewlett-Packard 5890 – séries II (gás de arraste: He) equipado com detector FID, coluna capilar HP-5 (5% de difenil em 95% de dimetilpolissiloxano - comprimento: 30 m, diâmetro interno: 0,32 mm, espessura do filme: 0,25 mm), injetor automático HP 7673 (modo "split" 1:20) e integrador eletrônico HP 3396A. Programação de temperatura do forno: 60-280 °C com taxa de aquecimento de 3 °C/min mantendo-se 10 min a 280 °C. As temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 220 e 280 °C, respectivamente. As concentrações dos componentes foram calculadas tendo como base as áreas dos picos no cromatograma, seguindo a ordem de eluição da coluna HP-5. A análise por CG/EM foi realizada em cromatógrafo Hewlett-Packard HP-6890 (coluna HP-5 - 5% de difenil em 95% de dimetilpolissiloxano - comprimento: 30 m, diâmetro interno: 0,32 mm, espessura do filme: 0,25 mm, gás de arraste: He) acoplado a espectrômetro Hewlett-Packard HP-5973 (operando por impacto eletrônico 70 ev), nas mesmas condições de programações de temperatura descritas acima.

A identificação dos componentes foi baseada na comparação de seus espectros de massas com aqueles da base de dados do espectrômetro (Bibliotecas Wiley e NIST) e confirmada pela determinação de seus índices de Kovats, que foram calculados relativamente aos tempos da retenção de uma série de n-alkanos (ADAMS, 2007).

3.1.5 Avaliação da atividade bacteriana in vitro

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais em estudo foram realizadas no Laboratório de Micotoxina e Micologia do Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (DCA/UFLA).

3.1.5.1 Micro-organismos utilizados

Foram utilizadas cepas puras de *Escherichia coli* ATCC 11229, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Salmonella Choleraesuis* ATCC 6539 e *Staphylococcus aureus* ATCC 13565. Preservadas a -18°C em meio de cultura de preservação.

3.1.5.2 Manutenção e ativação das culturas bacterianas

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

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

3.1.5.3 Teste de Difusão Cavidade em Ágar

Após ativação das bactérias em caldo BHI, 300 µL desse meio foram transferidos para um tubo com 5 mL de caldo de soja tríptica (TSB). Os tubos foram incubados a 37 °C, e após 30 minutos foi realizada a leitura de turbidez utilizando espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1 PC), no comprimento de onda de 625 nm, de acordo com as normas instituídas pelo National Committee

for Clinical Laboratory Standards, até que se obtivesse a turbidez de uma solução-padrão McFarland de 0,5, resultando em uma suspensão contendo 10^8 UFC mL⁻¹ (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, NCCLS, 2003). Posteriormente, a concentração de inóculo obtida pela escala McFarland de 0,5 (10^8 UFC mL⁻¹), foi diluída até atingir a concentração de 10^6 UFC mL⁻¹, sendo, em seguida, transferida para o meio de cultura TSA, para as espécies *Listeria monocytogenes*, e para as demais espécies, transferida para o Ágar Mueller- Hinton. O ágar no qual foi inoculada a cultura bacteriana foi depositado sobre uma camada do mesmo ágar, no qual foram adicionados pérolas de vidro (estéreis) com 4 mm de diâmetro, para a formação de poços no meio de cultura. Esses poços foram preenchidos com 10 µL dos controles e do óleo essencial diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO), nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,90 µg.mL⁻¹.

Foram realizadas três repetições para cada tratamento, uma testemunha relativa com a aplicação de 10 µL de DMSO e, como padrão de comparação, utilizou-se uma solução de 100 µg mL⁻¹ do antibiótico cloranfenicol. As placas foram incubadas invertidas em BOD 37 °C por 24 horas, e, posteriormente, foram realizadas medições diametralmente opostas dos halos de inibição formados.

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

3.1.6 Avaliação in vitro da atividade antitumoral

A atividade antitumoral dos óleos essenciais em estudo foi realizada no Laboratório de Biologia Animal Integrativa (LABAInt) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL).

3.1.6.1 Linhagens celulares e condições de cultivo

Os testes foram realizados em linhagens celulares derivadas de tumores humanos (Tabela 1). As culturas de células foram mantidas em DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Sigma, CA, EUA) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Vitrocell, Campinas, Brasil). As culturas foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera controlada (95% de ar e 5% de CO₂).

3.1.6.2 Esquema de Tratamento

As células foram semeadas em placas de 96 poços a uma densidade de 5×10^3 , 1×10^4 ou 2×10^4 células/poço, dependendo da linhagem celular utilizada. Após aderência (24h), as células foram tratadas por 48 h com os óleos essenciais extraídos da folha e flor de *C. viminalis*. Os óleos foram solubilizados em DMSO para a obtenção da solução-estoque (100 mg.mL^{-1}).

Inicialmente, os óleos essenciais foram testados em diferentes linhagens celulares derivadas de tumores humanos a uma concentração de ($50 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) para a observação do perfil de atividade dos mesmos (screening). Na sequência, curvas dose-resposta foram realizadas usando diferentes concentrações de óleo essencial extraído da folha ($5 - 200 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$) sobre as linhagens HT144 e

HepG2. A concentração final de DMSO não ultrapassou 0,5 % (v/v) e não alterou a viabilidade celular que foi determinada por MTS.

Tabela 1 Linhagens celulares tumorais humanas utilizadas nos ensaios de atividade antiproliferativa *in vitro*.

Sigla	Nome
A549	carcinoma de pulmão
MCF7	adenocarcinoma mamário
HepG2	carcinoma de fígado
U251	glioblastoma
HT144	melanona

3.1.6.5 Viabilidade celular

A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio colorimétrico (MTS) utilizando o Kit CellTiter 96TM da Promega®. Esse ensaio baseia-se na conversão do sal brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil-2H-tetrazólio)] (MTS) (amarelo) em formazano (púrpura), via enzimas desidrogenases presentes na mitocôndria da célula viável (Figura 16).

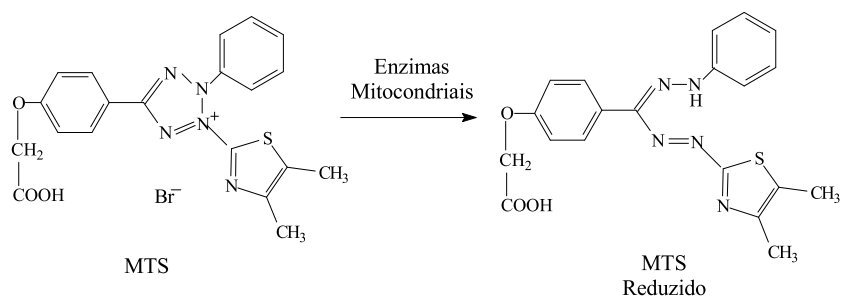


Figura 16 Reação de redução do MTS a formazano por enzimas mitocondriais.
Fonte: Cory et al. (1991).

A quantidade produzida de formazano, um composto solúvel em meio de cultura que absorve luz a 490 nm, é diretamente proporcional ao número de células vivas (CORY et al., 1991). Dessa forma, essa reação ocorre somente em células vivas e que estejam com suas mitocôndrias ativas, configurando-se assim um ensaio versátil e quantitativo (MOSMAMM, 1983). A viabilidade foi determinada comparando-se os valores de absorbância entre amostras tratadas com os valores de absorbância obtidos nas amostras controles. Os experimentos foram realizados em triplicata e os dados apresentados foram correspondentes à média \pm desvio-padrão.

$$\% \text{ Viabilidade celular} = (\text{Abs}_{\text{amostra}} \times 100) / \text{Abs}_{\text{controle}}$$

3.1.7 Determinação da atividade antioxidante

3.1.7.1 Método de sequestro de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila)

A atividade antioxidante foi avaliada por meio da capacidade sequestrante dos óleos essenciais em capturar os radicais 1,1-difenil-2-picrilidrazina (DPPH) conforme metodologia descrita por Sousa et al. (2007), modificada por Guimarães et al. (2011). Uma solução metanólica de DPPH foi preparada na concentração de 40 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Em um tubo de ensaio foram adicionados 2,7 mL da solução-estoque de DPPH, seguido da adição de 0,3 mL de cada diluição do óleo em etanol (750; 500; 250; 200; 150; 100; 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Paralelamente, foi preparado o controle, contendo todos os reagentes exceto o óleo essencial. Posteriormente foram realizadas leituras após 60 minutos em um espectrofotômetro no comprimento de onda de 515 nm, sendo a porcentagem de atividade antioxidante calculada, empregando a equação 1:

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

Em que:

A_{am} : absorbância da amostra analisada;

A_{cont} : absorbância do controle.

Para fins de comparação, foram testados o padrão BHT. A curva analítica foi construída utilizando as mesmas concentrações do óleo.

3.1.7.2 Sistema β -caroteno/ácido linoleico

A avaliação da atividade antioxidante pela metodologia da inibição da oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoléico foi realizada conforme metodologia descrita por Lopes-Lutz et al. (2008), modificada por Guimarães et al. (2011).

Em um balão de fundo redondo, foram adicionados 60 µL de ácido linoleico, 600 mg de Tween 20, 6 mg de β-caroteno e 10 mL de clorofórmio que, posteriormente, foi retirado utilizando rota-evaporador a 50°C. Após a remoção do clorofórmio, o resíduo foi dissolvido com 150 mL de água destilada oxigenada sob vigorosa agitação. Em tubos de ensaio, 2,7 mL dessa solução foram adicionados a 0,3 mL de cada diluição do óleo (750; 500; 250; 200; 150; 100; 50 µg.mL⁻¹), sendo o controle composto apenas de metanol. A absorvância foi medida imediatamente em espectrofotômetro a 470 nm.

Os tubos foram incubados a 50°C para a reação de oxidação e a leitura da absorvância foi medida em um intervalo de 60 minutos. Todas as leituras foram realizadas em triplica.

A atividade antioxidante relativa foi expressa pela equação 2 :

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

Em que:

A_0 = Absorvância no início da incubação, com a amostra;

A_t = Absorvância depois de 60 minutos, com a amostra;

A_{00} = Absorvância no início da incubação, sem a amostra;

A_{0t} = Absorvância depois de 60 minutos, sem a amostra;

As amostras foram lidas frente a um branco composto da emulsão sem o β-caroteno e, como controle, foi utilizado uma mistura de emulsão de β-caroteno e metanol.

3.1.7.3 Hidroxil

O ensaio da atividade do radical $\bullet\text{OH}$ foi desenvolvido de acordo com Boulanouare et al. (2013) com pequenas modificações. Em tubos de ensaio foram adicionados, 50 μL da amostra de cada diluição do óleo essencial (750; 500; 250; 200; 150; 100; 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Em seguida, foram adicionados 100 μL de um Mix de solução [Fe-EDTA], 100 μL de desoxirribose, 680 μL de solução tampão fosfato monobásico de potássio 0,1M (KH_2PO_4 , pH 7,4) e 100 μL de H_2O_2 113 mM levados em banho-maria por 2 horas a 37°C. Para terminar a reação foi adicionado 500 μL TCA e 500 μL TBA e em seguida incubados por 10 minutos à temperatura de aproximadamente 95°C. A absorbância foi determinada por espectrofotometria em 520 nm. O branco não contém desoxirribose, o controle negativo não contém amostra, e no controle positivo presença da amostra.

A seguinte equação foi utilizada para avaliar a atividade sequestradora do radical hidroxil:

$$\% \text{ AA} = [(A_{\text{cont}} - A_{\text{am}})/A_{\text{cont}}] \times 100$$

Onde A_{cont} representa a absorbância do controle negativo (sem amostra) e A_{am} é a absorbância na presença da amostra.

3.1.7.4 Fosfomolibdato

Uma alíquota de 50 μL da amostra foi adicionada em tubos de ensaio com as respectivas diluições do óleo essencial (750; 500; 250; 200; 150; 100; 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) juntamente com 2000 μL da solução do fosfomolibdênio (Molibdato de amônio 4 mM, fosfato de sódio 28 mM, ácido sulfúrico 0,6 M). Os tubos

foram fechados hermeticamente e levados ao banho-maria a 95 °C por 1 hora. Em seguida, os tubos foram resfriados e a leitura foi efetuada em espectrofotômetro UV-VIS a 695 nm. O padrão utilizado foi o ácido ascórbico. (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

Uma maior absorbância da mistura de reação indica maior poder redutor da amostra. Os resultados foram expressos pela construção de um gráfico de absorbância *versus* concentração.

3.1.7.5 Poder redutor

Uma alíquota de 50 µL da amostra foi adicionado em tubos de ensaio com as respectivas diluições do óleo essencial (750; 500; 250; 200; 150; 100; 50 µg.mL⁻¹) juntamente com 500 µL de Solução Tampão fosfato 0,1 M em pH 7,4 e 500 µL de hexacianoferrato (III) de potássio com posterior agitação. A mistura foi incubada em banho-maria a 50°C, por 20 minutos. Alíquotas de 500 µL de ácido tricloroacético a 10% (p/v) foram adicionadas aos tubos de ensaio, juntamente com 1500 µL de H₂O e 300 µL de FeCl₃ a 0,1% (p/v). A leitura foi efetuada em espectrofotômetro UV-VIS a 700 nm. Uma maior absorbância da mistura de reação indica maior poder redutor da amostra. Para a determinação da atividade antioxidante, foi construída uma curva da absorbância *versus* a concentração da amostra.

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

3.1.7.6 ABTS (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico])

A atividade antioxidante pelo método ABTS^{•+} (2,2-azinobis-[3-etil-benzotiazolin-6-ácido sulfônico]) foi realizada conforme a metodologia descrita por Guerreiro et al. (2013). O radical ABTS é formado pela reação da solução ABTS^{•+} 7 mM com a solução de persulfato de potássio 2,45 mM, incubados à temperatura de 25°C e no escuro, durante 12-16 h. Uma vez formado, o radical foi diluído com etanol P.A. até a obtenção do valor de absorbância (0,7 - 0,72) a 734 nm. Em ambiente escuro transferiu-se uma alíquota de 50 µL da amostra para tubos de ensaio com 1950 µL do radical ABTS.

Para fins de comparação, foi testado o padrão ácido ascórbico. A curva analítica foi construída utilizando as mesmas concentrações do óleo.

A seguinte equação foi utilizada para avaliar a atividade antioxidante:

$$\% AA = [(A_{\text{cont}} - A_{\text{am}})/A_{\text{cont}}] \times 100$$

Onde A_{cont} representa a absorbância do controle negativo (sem amostra) e A_{am} é a absorbância na presença da amostra.

3.1.7.7 Análise da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Foi utilizada a metodologia empregada por Bounatirol et al. (2007), seguida de pequenas modificações. Inicialmente, em um tubo de ensaio, foi adicionado 0,5 mL de gema de ovo homogeneizada em água (10 % p/v) (como fonte de lipídeos), 0,1 mL das respectivas diluições do óleo essencial (750; 500;

250; 200; 150; 100; 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Em seguida, adicionou-se 0,1 mL da solução $[\text{FeSO}_4 - \text{EDTA}]$ 6mM e 0,1 mL de H_2O_2 10 mM. Posteriormente, adicionou-se 0,2 mL de água destilada, completando o volume no tubo para 1,0 mL. Após agitação por 30 segundos, aqueceu-se a 50°C por 30 minutos. Posteriormente, foram adicionados 1,5 mL de uma solução de ácido acético 20% em água (pH 3,5) e 1,5 mL de ácido tiobarbitúrico 0,8% p/v diluído em uma solução de dodecilsulfato de sódio 1,1% p/v em água. Em seguida as amostras foram levadas ao vortex e deixadas por 60 minutos a 95°C em banho maria. Resfriou-se à temperatura ambiente e, posteriormente, adicionou-se 2,0 mL de butanol em cada tubo, centrifugando as soluções a 3000 rpm por sete minutos. Com o auxílio de uma pipeta de Pauster, recolheu-se a fase orgânica, e sua absorvância foi lida em espectrofotômetro a 532 nm.

Para fins de comparação, foi testado o padrão BHT. A curva analítica foi construída utilizando as mesmas concentrações do óleo.

A seguinte equação foi utilizada para avaliar a atividade antioxidante:

$$\% \text{ AA} = [(A_{\text{cont}} - A_{\text{am}})/A_{\text{cont}}] \times 100$$

Onde A_{cont} representa a absorvância do controle negativo (sem amostra) e A_{am} é a absorvância na presença da amostra.

Para os resultados da atividade antioxidante, o experimento foi disposto em delineamento inteiramente casualizado (DIC) em esquema fatorial (3 x 7), sendo 3 (2 óleos essenciais e um padrão) e 7 concentrações (750; 500; 250, 200, 150, 100, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), com 3 repetições. O programa estatístico utilizado foi o Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados - Sisvar (FERREIRA, 2011), onde os dados foram submetidos à análise de variância e as médias

comparadas pelo teste de Scott-Knott ao nível de 5% de probabilidade. Os resultados foram plotados em gráficos de barras em relação às concentrações analisadas."

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Determinação da umidade e do rendimento das extrações dos óleos essenciais

Os resultados obtidos para o teor de umidade e o rendimento das extrações dos óleos essenciais das folhas e flores da espécie *Callistemon viminalis* estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2 Resultados do teor de umidade e rendimentos do óleo essencial das folhas e flores da planta expressos em % p/p BLU (base livre de umidade)

	Teor de umidade (%)	Rendimento de óleos essenciais (%)
Folha	46,66	1,14
Flor	45,33	0,24

Pesquisas de Srivastava et al. (2003), com o óleo essencial das folhas de *C. viminalis* coletada na Índia apresentaram valores de rendimento (0,45%) inferiores dos encontrados neste trabalho. Anteriormente, Brophy et al. (1997) e Oyedeji et al. (2009), avaliando o óleo essencial das folhas da mesma espécie coletada na Austrália e na África do Sul respectivamente, observaram um rendimento de 0,63% e 0,90%, enquanto no Brasil, Silva et al. (2010), observaram um rendimento de 0,3% para as folhas. OLIVEIRA et al. (2014)

estudando o OE das flores de *C. viminalis* coletadas em Lavras-MG, observaram um valor de rendimento (0,32%) próximo ao encontrado neste trabalho.

Verificando o rendimento da extração do óleo essencial das folhas de *C. viminalis* do presente experimento podemos observar que o mesmo, foi maior que aqueles apresentados pelos pesquisadores. Este fato pode ser atribuído principalmente, devido a fatores ambientais e genéticos, como diferenças na sazonalidade, temperatura, tipo de solo, precipitação e mesma espécie (GOBBONETO; LOPES, 2007).

Verifica-se, pelos dados descritos na Tabela 2, que os rendimentos médios das extrações dos óleos essenciais de *C. viminalis* apresentaram um maior teor de óleo essencial na parte da folha comparado com a flor. Em concordância com os dados verificados neste trabalho, estudos com os OE das folhas e flores de *C. viminalis* apresentaram rendimentos de 1,42% para folhas e 0,30% para flores, valores estes aproximado aos obtidos nesta pesquisa (PIRES et al., 2013).

De acordo com Deschamps et al. (2006), a variação no teor de óleo essencial em diferentes partes de uma mesma planta pode estar relacionado com a densidade de estruturas secretoras ou possíveis características fisiológicas da planta como perdas por volatilização ou catabolismo, que podem variar de acordo com a família botânica. Esta variação também foi verificada por Botrel et al. (2009) em hortelã-do-campo (*Hyptis marrubioides*). Observaram que na extração do óleo essencial obtiveram um rendimento de 0,42% para folhas e 0,63% para flores. Silva, Barbosa e Silva (2003), pesquisando o óleo essencial de Bamburral (*Hyptis suaveolens*), também encontraram esta diferença, pois o mesmo apresentou um rendimento de 0,30% para folhas e 0,45% para flores, o que difere dos dados do presente estudo com óleos essenciais de *Callistemon viminalis*, que apresentaram maior teor de óleo essencial nas folhas.

4.2 Caracterização química e quantificação dos constituintes químicos nos óleos essenciais

Os constituintes químicos presentes no óleo essencial extraído das folhas e flores, seguidos pelos seus índices de Kovats e os seus teores expressos em percentagem encontram-se na Tabela 3, e as estruturas químicas dos compostos majoritários estão apresentadas na Figura 17.

Tabela 3 Composição química do óleo essencial das folhas e flores de *C. viminalis* identificados por CG/EM.

Pico	IK	Compostos	(%) Folhas	(%) Flores
1	939	α - pineno	25,81	24,52
2	952	α - Fencheno	0,19	0,27
3	979	β - pineno	0,35	1,70
4	990	mirreno	0,47	0,28
5	1004	1-menta 7,8 dieno	0,35	0,34
6	1017	α - terpineno	-	0,40
7	1024	p- cimeno	1,45	2,06
8	1031	1,8 cineol	50,45	48,83
9	1059	γ - terpineno	0,70	2,30
10	1088	p-menta2,4-8- dieno	-	0,71
11	1096	linalol	0,61	1,46
12	1121	<i>Exo</i> -fenchol	0,47	0,24
13	1133	1-terpineol	0,17	0,19
14	1139	<i>Trans</i> - pinocarveol	0,72	0,16
15	1160	isoborneol	0,63	0,30

16	1177	terpinen-4-ol	1,76	1,63
17	1188	α -terpineol	8,74	3,94
18	1216	<i>Trans</i> -carveol	0,19	-
19	1590	globulol	0,97	0,58
20	1619	junenol	0,39	-
21	1813	criptomeridiol	0,23	0,41

*IK= índice de Kovats, %= porcentagem do componente

A partir dos dados descritos na Tabela 3, pode-se observar que foram identificados nos óleos essenciais extraídos das folhas e flores de *C. viminalis*, os mesmos constituintes, porém em percentuais diferentes, identificando 19 compostos químicos no óleo essencial em ambas as partes, folhas e flores. O 1,8-cineol, α -pineno e α -terpineol foram os componentes majoritários, nas concentrações de (50,4%, 25,8% e 8,7%) para as folhas e de (48,8%, 24,5% e 3,9%) para as flores, respectivamente.

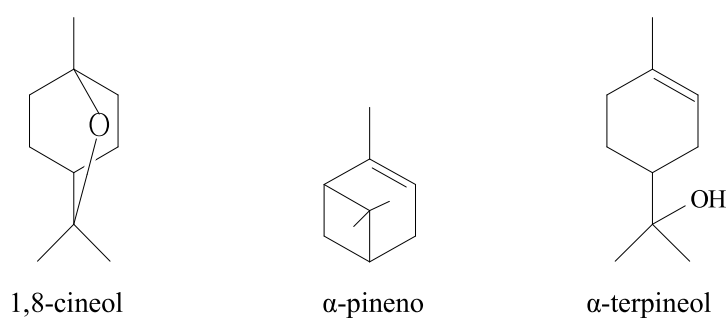


Figura 17 Principais constituintes químicos encontrados nos óleos essenciais das folhas e flores de *C. viminalis*

Oyedeji et al. (2009) identificaram 20 constituintes no óleo essencial das folhas de *C. viminalis* coletadas na África do Sul e relataram como componentes principais, 1,8-cineol (83,2%), α -pineno (6,4%) e α -terpineol (4,9%). Entretanto Silva et al. (2010) avaliando a composição química do óleo essencial de *C. viminalis* coletada em Viçosa (MG) no Brasil identificaram como componentes principais o 1,8-cineol (65%), α -pineno (12%) e α -terpineol (13%) nas respectivas concentrações. Estes resultados corroboram em termos de componentes majoritários com aqueles encontrados nesse trabalho.

Pires et al. (2013) avaliando a composição química dos óleos essenciais das folhas e flores de *C. viminalis* coletadas em Goiânia (GO) no Brasil, observaram que o 1,8-cineol foi o componente majoritário no óleo essencial das folhas frescas e flores (70,43% e 42,39%), seguido do triciclono (12,97% e 28,08%) e α -terpineol (6,56% e 6,67%), sendo que no óleo essencial das folhas e flores do presente estudo não foi encontrado o composto triciclono.

A produção de metabólitos secundários pode ser influenciada por diversos fatores; essas pequenas variações quantitativas e qualitativas nos teores dos constituintes provavelmente se devem a demandas fisiológicas (crescimento, defesa e reprodução), fatores genéticos, fatores ambientais como solo, precipitação e clima que provavelmente podem ter influenciado na composição química do óleo essencial desta espécie (DESCHAMPS et al., 2012; MASETTO et al., 2011; GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Os componentes majoritários na maioria dos estudos apresentados foram o 1,8-cineol, α -pineno e α -terpineol, inferindo que os resultados encontrados neste estudo são concordantes com os encontrados nos trabalhos citados.

Algumas propriedades medicamentosas são relatadas para a espécie *C. viminalis*, como sua utilização na forma de chá, no tratamento de gastroenterites, diarreias, infecções de pele e tratamento de hemorroidas, contudo sem uma comprovação por estudos científicos. Entretanto, vários constituintes presentes

no seu óleo essencial têm importantes atividades comprovadas. O 1,8-cineol é utilizado principalmente devido às suas propriedades antimicrobianas e expectorantes, sendo frequentemente empregado em diversas formulações pela indústria farmacêutica. Estudos revelam que o 1,8-cineol reduz o crescimento em células cancerígenas (leucemia), além de possuir um comportamento não tóxico, atividades anti-inflamatória, antimicrobiana e nematocida (DE VICENZI et al., 2002; ROSADO et al., 2006).

4.3 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais

Os valores referentes às concentrações mínimas inibitórias (CMIs) dos óleos essenciais obtidas no experimento para as bactérias em estudo estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 Concentração mínima inibitória CMI ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos óleos essenciais das folhas (CV_1) e flores (CV_2) de *C. viminalis* encontrada para os micro-organismos *Staphylococcus aureus*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, e *Salmonella Choleraesuis*.

Bactéria	Gram	CMI ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)			
		CV ₁	CV ₂	DMSO	CL
<i>S. aureus</i> ATCC 13565	+	500	125	NI	100
<i>L. monocytogenes</i> ATCC 19117	+	250	NI	NI	100
<i>E. coli</i> ATCC 11229	-	125	125	NI	100
<i>S. Choleraesuis</i> ATCC 6539	-	500	NI	NI	100

*CV₁: Folha CV₂: Flor; NI: não ocorreu inibição, CL: Cloranfenicol, DMSO: dimetilsulfóxido

O óleo essencial das folhas de *C. viminalis* apresentou atividade moderada sobre as bactérias tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas e, o óleo essencial das flores somente apresentou atividade nas bactérias Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e Gram-negativa *Escherichia coli*, não apresentando valores de inibição para as outras bactérias testadas (Tabela 4).

Para determinar a CMI, foi considerada a menor concentração de óleo essencial que impediu o crescimento dos microrganismos. As amostras que apresentarem valores de CMI menores que 10 µg/mL são considerados excelentes; valores entre 10 e 100 µg/mL bons e valores entre 100 e 500 µg/mL atividade moderada. Valores acima de 500 µg/mL são considerados de fraca atividade (MACHADO et al., 2005).

Vários estudos relatam que o efeito antimicrobiano dos óleos essenciais depende de vários fatores, entre eles a hidrofobicidade e a capacidade de partição na membrana plasmática, sendo alguns compostos capazes de desintegrar a membrana externa de algumas bactérias (ULTEE; BENNINK; MOEZELAAR, 2002; BURT, 2004).

Outros trabalhos, como os de Lambert et al. (2001) e Bakkali et al. (2008), citam que os compostos lipofílicos encontrados nos óleos essenciais são mais ativos em bactérias Gram-positivas, em que a parede celular externa é constituída por uma camada grossa de peptidoglicano (polissacarídeo), com teor de lipídeos nulo ou muito baixo, sendo capazes de romper a sua membrana composta de diferentes polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, podendo também danificar a parede celular e levar à liberação de macromoléculas e lise celular. Para as bactérias Gram-negativas, a membrana externa é rica em lipídeos, gerando dificuldade para a entrada e saída de algumas moléculas (BURT, 2004). Os resultados obtidos neste trabalho diferem daqueles aonde são relatados que bactérias Gram-positivas são mais sensíveis a óleos essenciais do que as Gram-negativas, uma vez que as bactérias Gram-positivas testadas no

presente trabalho *S. aureus* e *L. monocytogenes* apresentaram CMI altos para o óleo essencial das folhas de *C. viminalis* (BURT, 2004; DORAN et al. 2009).

Trabalhos de Silva et al. (2010), mostraram que o óleo essencial das folhas da espécie *C. viminalis* apresentou atividade frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli* com valores de CMI acima de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, resultados estes que corroboram com os encontrados neste estudo, uma vez que foi encontrado uma atividade moderada frente as bactérias *S. aureus* e *E. coli*.

Pires et al. (2013), observaram que a CMI obtida para os óleos essenciais de *C. viminalis* de folhas e flores frente às bactérias Gram positivas e Gram negativas foram iguais ou superiores a $2000 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Esta variação dos resultados apresentados no presente trabalho com os observados pelos autores pode ser explicada devido à dificuldade em se comparar resultados em condições experimentais diferentes, às várias linhagens existentes de uma mesma bactéria, que podem ou não apresentar maior resistência e, a diferença entre os constituintes de um mesmo óleo essencial (SEFIDKON et al., 2007; BURT, 2004).

Entre as várias técnicas de determinação de atividade antimicrobiana de óleos essenciais, a técnica de difusão em ágar é a mais utilizada. 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). Assim, a eficiência do óleo pode ser determinada pela diferença do tamanho do halo formado.

Apesar dos óleos essenciais apresentarem dificuldade de se difundir uniformemente pelo meio de cultura devido à sua natureza hidrofóbica, a sua alta volatilidade contribui para a formação de halos de inibição, tornando a técnica de difusão em ágar um método válido na determinação da atividade antimicrobiana (LAMBERT et al., 2001; INOUE; UCHIDA; ABE, 2006).

Estudos relatam que compostos como o eugenol, carvacrol e timol, que tem natureza fenólica apresentam grande atividade antimicrobiana devido a essa classe de compostos se ligar aos grupos aminas e hidroxil das proteínas da membrana plasmática das bactérias alterando sua permeabilidade e levando-as à morte (GREAY; HAMMER, 2011).

Tal atividade não pode ser facilmente associada a um composto específico, devido a complexibilidade e variabilidade dos componentes dos óleos, assim como também deve ser levado em consideração o sinergismo entre os componentes.

4.4 Atividade antitumoral in vitro

A atividade antitumoral *in vitro* de óleos essenciais extraídos das folhas e flores de *C. viminalis* foi avaliada sobre diferentes linhagens derivadas de tumores humanos. Na varredura inicial (*screening*), os óleos foram usados a uma concentração de $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Os resultados mostraram que houve modesta redução de viabilidade em culturas de HT144 tratadas por 48h com o óleo essencial (OE) da folha de *C. viminalis* (Figura 18). Contudo, as culturas tratadas com OE extraído da flor de *C. viminalis* não apresentaram alteração significativa da taxa de viabilidade em relação aos controles (Figura 19).

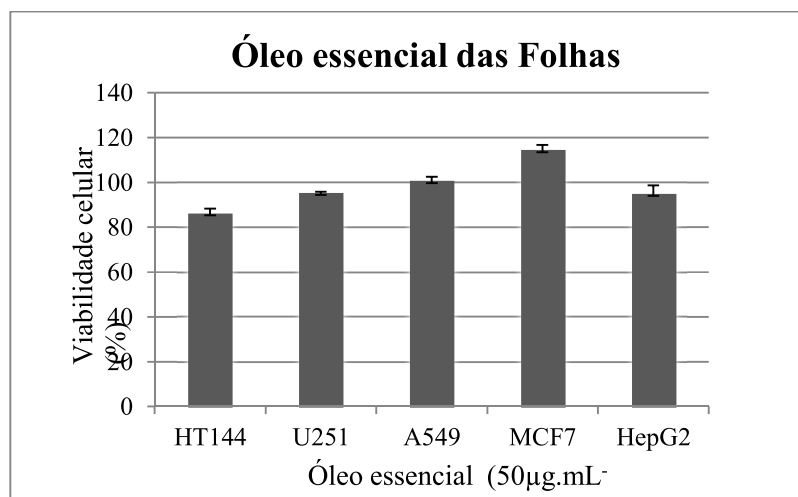


Figura 18 Viabilidade celular (%) determinada através do ensaio MTS em culturas de células tratadas com óleo essencial de folhas da *C. viminalis* a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

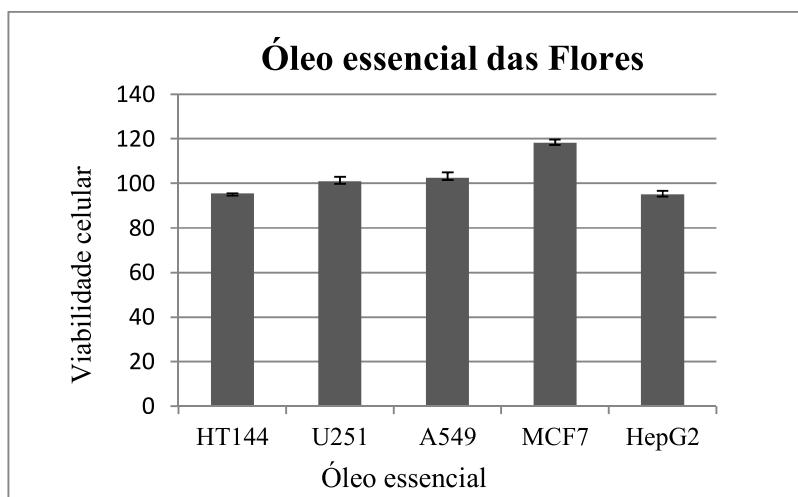


Figura 19 Viabilidade celular (%) determinada através do ensaio MTS em culturas de células tratadas com óleo essencial de flores da *C. viminalis* a $50 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

As linhagens HepG2 e HT144 foram selecionadas para verificar possível efeito concentração-dependente dos óleos essenciais. Os resultados mostraram redução de aproximadamente 20% na viabilidade celular em culturas HepG2 tratadas com os óleos essenciais na concentração de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Figura 20 e 21). Na linhagem HT144, o efeito dose-dependente fica evidente uma vez que a viabilidade diminui a medida que as concentrações aumentam (Figuras 22 e 23).

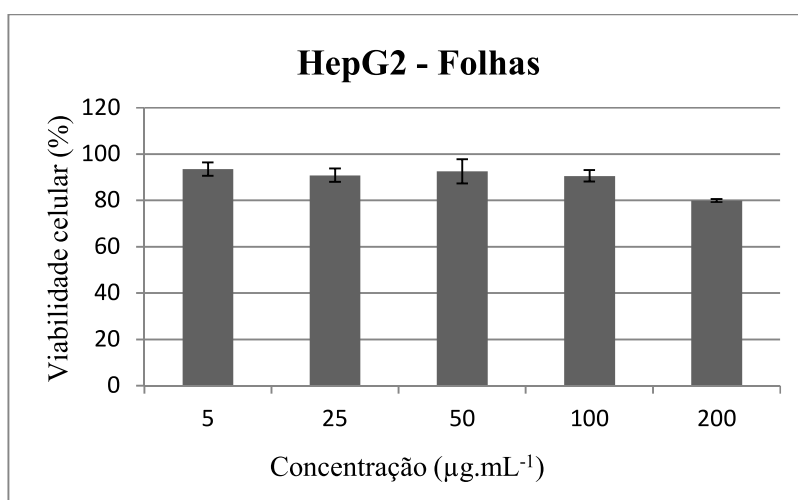


Figura 20 Viabilidade celular (%) determinada através do ensaio MTS em culturas de células HepG2 tratadas com óleo essencial de folhas da *C. viminalis* em diferentes concentrações por 48 horas.

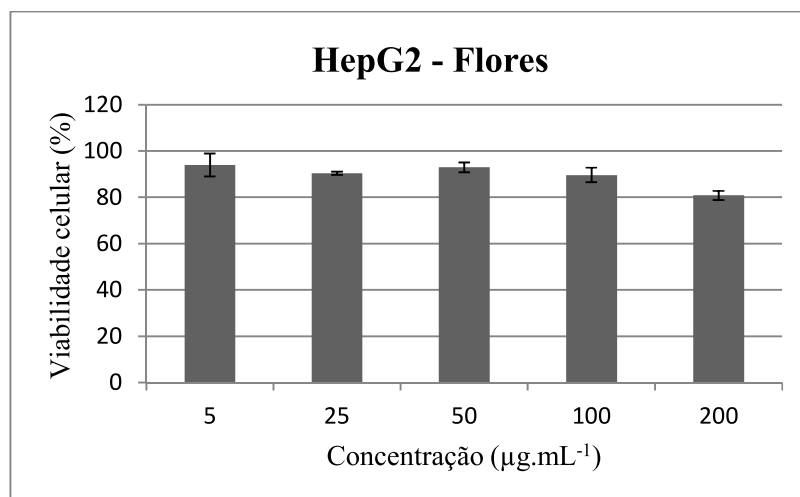


Figura 21 Viabilidade celular (%) determinada através do ensaio MTS em culturas de células HepG2 tratadas com óleo essencial de flores da *C. viminalis* em diferentes concentrações por 48 horas.

Ao comparar o efeito citotóxico dos OEs sobre a linhagem HT144 foi possível observar que o OE das folhas apresenta maior atividade em relação ao OE das flores. Culturas tratadas por 48 horas a $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ com os OEs tiveram redução em cerca de 40% e 25% na viabilidade, respectivamente, considerando os OEs de folhas e flores (Figuras 22 e 23).

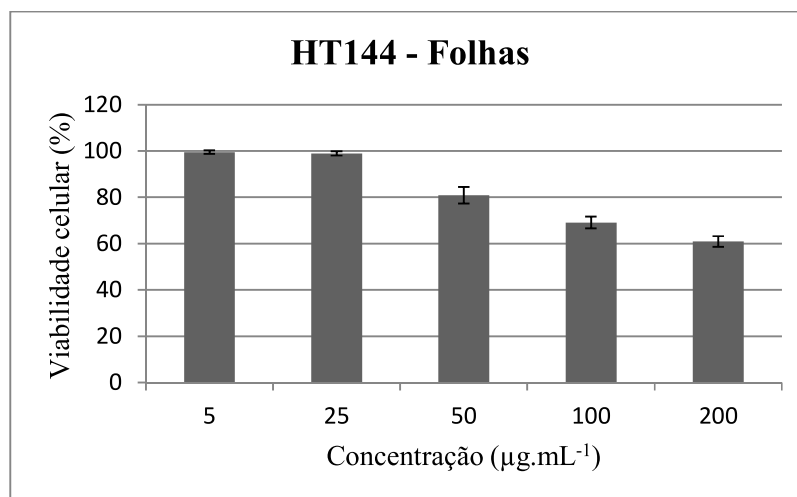


Figura 22 Viabilidade celular (%) determinada através do ensaio MTS em culturas de células HT144 tratadas com óleo essencial de folhas da *C. viminalis* em diferentes concentrações por 48 horas.

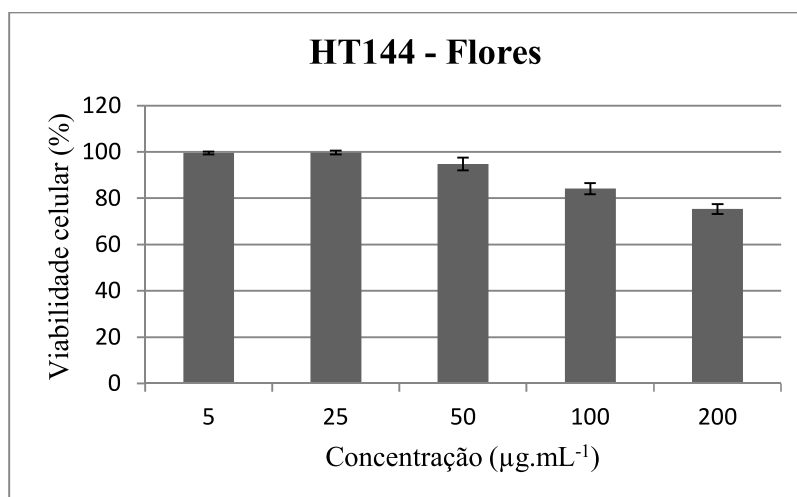


Figura 23 Viabilidade celular (%) determinada através do ensaio MTS em culturas de células HepG2 tratadas com óleo essencial de flores da *C. viminalis* em diferentes concentrações por 48 horas.

A natureza lipofílica dos OE lhes permite facilmente atravessar as membranas das células e alcançar o seu interior, efeitos citotóxicos de vários compostos podem estar relacionados com danos a membrana celular ou alterações em sua permeabilidade. Vários estudos relatam que os constituintes dos OE são potentes na prevenção e tratamento do câncer (GAUTAM; MANTHA; MITTAL, 2014).

Sobral et al. (2014) mostram através de estudos realizados *in vitro* e *in vivo* que a atividade antitumoral de óleos essenciais de muitas espécies tem sido relacionada com a presença de monoterpenos na sua composição, classes de compostos também encontrados na composição química dos óleos essenciais de *C. viminalis*.

Foram estudados os efeitos do composto timol sobre células de melanoma B16-F10 e carcinoma HepG2, células tumorais também estudadas neste trabalho e verificaram que o composto timol exibiu citotoxicidade com um valor de IC₅₀ de 88,5 ug.mL⁻¹, afirmando que o composto estudado induziu parada do ciclo celular em fase G0/G1 (YIN; YAN; ZU, 2012).

A citotoxicidade do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L. e três dos seus principais componentes 1,8-cineol (27,23%), α -pineno (19,43%) e β -pineno (6,71%) também foi investigada contra linhagens celulares derivadas de câncer de ovário humano (SK-OV-3 e HO-8910) e célula de câncer de fígado (Bel-7402), no qual evidenciaram que o óleo essencial *R. officinalis* L. exibiu uma pronunciada citotoxicidade sobre as três linhagens celulares, cujos valores de IC₅₀ foram 0,025 %, 0,076 e 0,13 % (v/v) respectivamente, já o monoterpeno 1,8-cineol que também é o composto majoritário encontrado neste trabalho, demonstrou citotoxicidade moderada nas linhagens testadas (WANG et al., 2012).

A citotoxicidade do 1,8-cineol e α -terpineol, constituintes majoritários também encontrados neste estudo foi avaliada contra linhagens celulares HepG2 e K-562 (eritroleucêmica humana) onde os autores observaram uma atividade moderada frente aos compostos estudados (HAYES et al., 1997). Lampronti, Saab e Gambari (2006), demonstraram que OE de *Satureja montana*, cujo componente principal é o α -terpineol, apresentou citotoxicidade importante sobre a linhagem K562. Hassan e colaboradores (2010) sugerem que o composto α -terpineol inibe o crescimento de células tumorais através de um mecanismo que envolve a inibição da via de NF-kB (fator nuclear kappa B).

Jin e colaboradores (2010) demonstraram que o composto α -pineno, também encontrado neste estudo, desencadeou estresse oxidativo e vias de sinalização relacionados em células tumorais A549 e células HepG2.

Em relação à citotoxicidade contra células HeLa derivadas de câncer cervical, Döll-Boscardin et al. (2012) observaram que os óleos essenciais de folhas jovens e adultos de *E. benthamii* apresentaram IC₅₀ de 84,24 e 110,02 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, 24 horas e 120,57 e 101,90 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ às 72 horas, respectivamente. Verificou-se que os constituintes majoritários α -pineno, γ -terpineno e terpinen-4-ol, não apresentaram efeito sobre esta célula cancerígena. Conforme proposto por estudos anteriores que realizaram o efeito citotóxico de óleos essenciais, os valores de IC₅₀ entre 10-50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ representam uma forte atividade citotóxica, os valores de IC₅₀ entre 50-100, 100-200, e 200-300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ indicam propriedades citotóxicas moderados, fracos e muito fracos, respectivamente e os valores de IC₅₀ superiores a 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ representam nenhuma citotoxicidade (SYLVESTRE et al., 2006).

Estes dados citados pelos autores podem supor que a atividade moderada do OE das folhas e flores de *C. viminalis* contra a linhagem celular testada HT144 pode ser decorrente dos compostos majoritários 1,8-cineol, α -pineno e α -terpineol, porém não se pode afirmar uma vez que os óleos essenciais

apresentam uma composição química complexa, com diferentes constituintes químicos e, diversas vezes, a ação sinérgica entre seus constituintes determinam a atividade do óleo essencial (FONTES et al., 2013).

Para estes estudos, os monoterpenos são classificados somente como "ativos". Assim, pesquisas adicionais são necessárias serem desenvolvidas para explicar como os monoterpenos podem atuar para inibir a proliferação e para induzir a morte das células tumorais.

4.5 Atividade antioxidante de óleos essenciais

Existem muitos métodos de análise da atividade antioxidante, com fundamentos, mecanismos de ação e aplicações diferentes. Por isso torna-se necessário realizar múltiplos testes para se obter um resultado mais satisfatório.

O método de sequestro de radicais DPPH (1,1-difenil-2 picrilidrazila) foi usado para avaliar a capacidade antioxidante dos OE das folhas e flores de *C. viminalis* comparando-as ao padrão BHT. Pelos resultados obtidos, foi determinada a porcentagem de atividade sequestradora de radicais (quantidade de DPPH[•] consumida pelo antioxidante).

Os resultados da atividade antioxidante (%AA) dos OE das respectivas partes das plantas e do padrão nas concentrações 750; 500; 250, 200, 150, 100, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ estão apresentadas na Figura 24.

De acordo com os resultados apresentados, observa-se que os óleos essenciais de folhas e flores proporcionaram uma fraca atividade antioxidante. Houve diferença significativa apenas entre o padrão BHT e os óleos essenciais das folhas e flores. Para maior concentração, a atividade antioxidante apresentou um valor médio de 3,28 % para as flores e 2,88 % para as folhas. Comparando

os valores médios da atividade antioxidante das folhas e flores observa-se que não houve diferença significativa e que ambas apresentaram uma baixa atividade antioxidante.

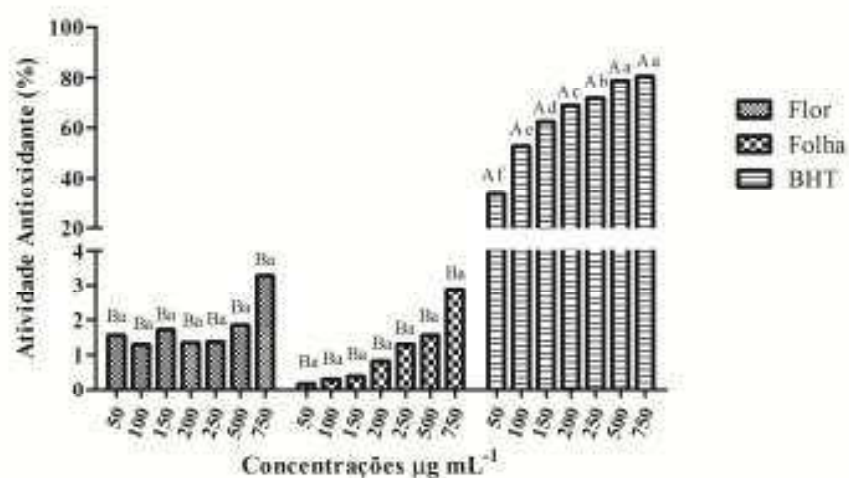


Figura 24 Análise comparativa entre as atividades antioxidante de OE de folhas e flores de *C. viminalis* e do padrão BHT, em função da concentração, pela metodologia do sequestro de radicais de DPPH

O óleo essencial das folhas e flores de *C. viminalis* não demonstrou, mesmo em concentrações altas, capacidade considerável em reduzir o radical DPPH. Toscan (2010) avaliando a atividade antioxidante do composto 1,8-cineol, composto este também encontrado neste estudo, observou um valor de IC_{50} de $86,07 \pm 6,27 \mu\text{L} \cdot \text{mL}^{-1}$, considerando baixa atividade antioxidante.

Naziha et al. (2011) estudando o óleo essencial de *Melaleuca armillaris* que apresenta em sua constituição o composto majoritário 1,8-cineol (85,8 %) observaram que o mesmo não apresentou resultados satisfatórios pelo ensaio de

DPPH ($IC_{50} = 2183,6 \pm 44,3 \text{ mg.L}^{-1}$). O mesmo resultado negativo foi verificado para o óleo essencial de *Eucalyptus globulus*, pesquisado por Amakura et al. (2009). Neste trabalho, os autores encontraram um IC_{50} acima de 100 mg.mL^{-1} . Segundo esses, o componente 1,8-cineol não apresenta atividade antioxidante relevante, e a sua ação depende da concentração em que se encontra no óleo, sendo esta influenciada pela origem do material, pelos métodos de preparação e pelo solvente utilizado.

Sacchetti et al. (2005) estudando espécies da família Myrtaceae observaram que o óleo essencial de *E. globulus* juntamente com o óleo de guaiava (*Psidium guayava*), mesmo em concentrações altas (6 mg/mL) apresentaram um valor de 24,5 e 11,8% respectivamente. Concluíram que os óleos essenciais ricos em certos monoterpenos são praticamente ineficazes na redução do radical livre DPPH.

O fato do óleo essencial das folhas e flores de *C. viminalis* não ter apresentado atividade antioxidante satisfatória, pode ser justificado devido a não facilidade de doação de um átomo de hidrogênio por parte dos constituintes presentes nos óleos essenciais em estudo para neutralizar o radical DPPH, conforme relatos na literatura.

Os monoterpenos hidrocarbonetos e monoterpenos oxigenados, classes de compostos encontrados na composição química dos óleos de *C. viminalis*, não permite um alto poder antioxidante, além da presença majoritária do 1,8-cineol, considerado sem atividade redutora, uma vez que este componente majoritário não tem esta capacidade de ceder hidrogênios para que ocorra a reação de estabilização do radical como mencionado anteriormente (Figura 25).

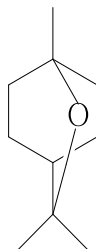


Figura 25 Estrutura do 1,8-cineol, principal constituinte químico encontrado nos óleos essenciais das folhas e flores de *C. viminalis*

Através dos resultados obtidos e considerando a similaridade na composição química do óleo essencial das folhas e flores, observa-se que a diferença quantitativa existente entre os principais constituintes de cada óleo essencial influenciou pouco na resposta da inibição frente ao DPPH. Apesar das amostras apresentarem os mesmos compostos majoritários não foi possível inferir com precisão que sejam estes os responsáveis pela ação observada, pois o efeito antioxidante dos óleos essenciais, muitas vezes, decorre do sinergismo existente entre as substâncias (CANDAN et al., 2003).

Avaliando a capacidade antioxidante dos OE em estudo pelo teste β -caroteno/ácido linoleico pode-se observar pelos resultados apresentados na Figura 25 que houve diferença significativa para OE testados nas concentrações 750; 500; 250, 200, 150, 100, 50 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Verificou-se por meio da análise de variância que houve diferença significativa entre os OE flores e folhas apenas nas concentrações 50 e 100 $\mu\text{g.L}^{-1}$. A atividade antioxidante média do óleo essencial das flores em sua maior concentração foi de 31,77 %, enquanto o das folhas apresentou um valor médio de 33,11 %.

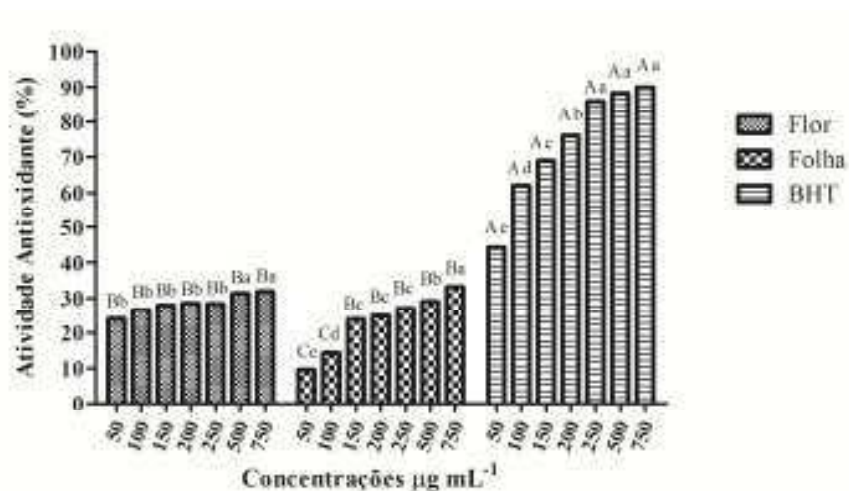


Figura 26 Análise comparativa entre as atividades antioxidante de OE de folhas e flores de *C. viminalis* e do padrão BHT, em função da concentração, pelo teste β -caroteno/ácido linoleico

Os fenóis são antioxidantes eficientes sendo responsáveis pela atividade antioxidante de muitos óleos essenciais que os contêm como o timol e carvacrol. Os alcoóis são considerados como a segunda classe de monoterpenos oxigenados mais ativas quanto à atividade antioxidante, como o geraniol (RUBERTO; BARATA, 2000). Isto pode explicar a fraca atividade antioxidante dos óleos essenciais das folhas e flores de *C. viminalis*, uma vez que o constituinte encontrado em maior quantidade responsável pela atividade é o monoterpeno 1,8-cineol, que não possui uma estrutura favorável para doar átomos de hidrogênios ao radical peroxil não podendo assim neutralizá-lo e proteger o β -caroteno.

Ebrahimabadi et al. (2010) estudando óleos essenciais de diversas espécies ricos em terpenos, observaram que no ensaio de oxidação do sistema β -caroteno/ácido linoleico, estes apresentam atividades superiores às aquelas

apresentadas pelos mesmos óleos quando comparado pelo ensaio de sequestro de radicais DPPH. Ainda segundo os autores, o ensaio β -caroteno/ácido linoleico apresenta especificidade por compostos lipofílicos (ANDRADE et al., 2013).

Assim como o método de DPPH, o método ABTS provoca perda da coloração do meio reacional, permitindo análise tanto de amostras hidrofílicas como lipofílicas. Pode-se perceber pelos resultados do método referido que houve diferença significativa das atividades antioxidantes entre os OE das flores e folhas apenas nas concentrações 200 e 250 $\mu\text{g.L}^{-1}$, não havendo diferença nas outras concentrações. A atividade antioxidante média do óleo essencial das flores, em sua maior concentração foi de 7,67 %, enquanto o das folhas apresentou um valor médio de 6,94 % (Figura 27).

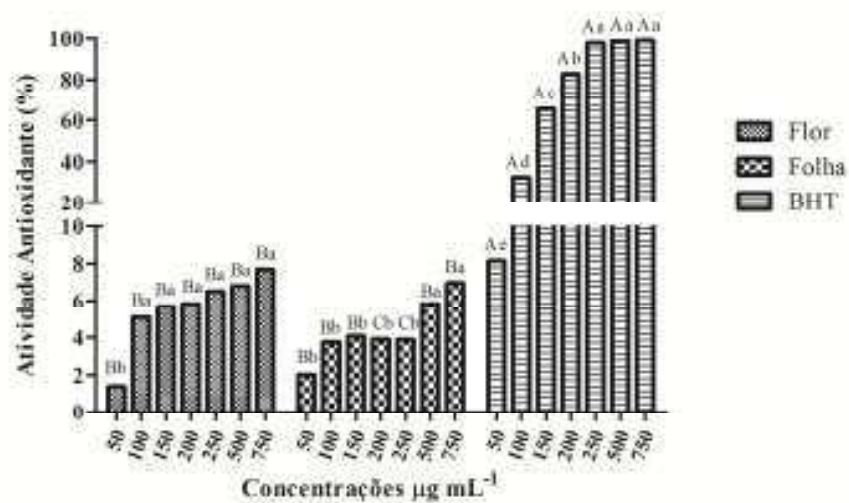


Figura 27 Análise comparativa entre as atividades antioxidante de OE de folhas e flores de *C. viminalis* e do padrão BHT, em função da concentração, pelo teste do ABTS

Corroborando com este estudo, Gomes (2014) avaliando a atividade antioxidante de cinco espécies do gênero citrus, não pertencentes à mesma deste trabalho, observou através deste método que o óleo essencial de *C. aurantifolia* ($0,92 \mu\text{mol.mL}^{-1}$) e *C. limon* ($0,86 \mu\text{mol.mL}^{-1}$) foram os que obtiveram maiores atividades antioxidantes, valores estes expressos em equivalentes de Trolox μmol por (mL) de óleo essencial, inferindo que o teste ABTS apresenta uma boa especificidade para óleos essenciais.

Segundo autores, na ausência de fenóis, ABTS^{*+} é estável, mas reage energeticamente com um doador de átomo de hidrogênio, como os fenóis, sendo convertido em uma forma não colorimétrica do ABTS. Os autores determinam a quantidade de ABTS^{*+} consumida devido à reação deste com a amostra contendo fenóis, sendo expressa em Trolox equivalente (MILLER et al., 1993; RE, et al., 1999). Isto pode explicar a fraca atividade antioxidante dos óleos essenciais das folhas e flores de *C. viminalis*, uma vez que o constituinte encontrado em maior quantidade responsável pela atividade é o monoterpeneo 1,8-cineol, que não possui uma estrutura favorável para doar átomos de hidrogênios.

Os resultados apresentados na Figura 28 mostram os valores encontrados para a atividade antioxidante empregando o método 2-desoxirribose (teste da porcentagem de inibição do radical hidroxil). Observa-se que a atividade média do óleo essencial das flores, em sua maior concentração foi de 32,56 %, enquanto o das folhas apresentou um valor médio de 33,11 %. Essa atividade variou significativamente tanto entre os óleos essenciais folhas e flores nas concentrações de 50, 100 e $150 \mu\text{g.L}^{-1}$ quanto para cada óleo de acordo com as concentrações utilizadas.

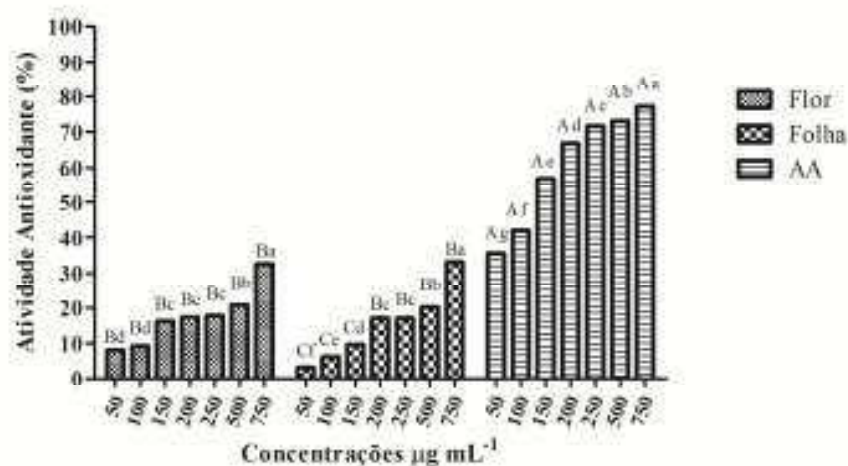


Figura 28 Análise comparativa entre as atividades antioxidante de OE de folhas e flores de *C. viminalis* e do padrão Ácido ascórbico, em função da concentração, pelo teste da porcentagem de inibição do radical hidroxil

Singh et al. (2008) avaliando os óleos essenciais das folhas frescas de eucalipto cujos compostos majoritários foram γ -pineno (28,53 %), 1,8-cineol (19,48 %) e β -citronelal (14,15%) observaram uma porcentagem de radical hidroxil inibido de 56, 4% na concentração de 400 $\mu\text{L}.\text{mL}^{-1}$. Esses resultados corroboram com aqueles encontrados neste estudo, onde foi observado baixa atividade antioxidante pelo método analisado.

Costa et al. (2012) avaliando o potencial antioxidante do composto ciano-carvona por meio da remoção dos radicais hidroxila (OH^\cdot), observaram que o composto foi capaz de remover o radical OH^\cdot de maneira significativa em 47,2, 51,1, 52,2, 57,6 e 64,6% de atividade, nas concentrações testadas. Neste estudo foi verificado que a ciano-carvona, derivado de monoterpene reduziu a oxidação da 2-desoxirribose em todas as concentrações, sendo altamente eficaz na inibição dos danos oxidativos produzidos pelo radical hidroxila. Os autores

sugerem que a capacidade de remoção do radical hidroxila de um extrato de uma determinada planta medicinal pode estar diretamente relacionada ao seu potencial antioxidante. O radical hidroxila é altamente reativo e pode causar danos oxidativo ao DNA, lipídios e proteínas.

Avaliando a atividade antioxidante por meio da redução de molibdênio (VI) para molibdênio (V) podemos observar por meio da análise de variância, que houve diferença significativa da atividade antioxidante entre OE flores e folhas, apenas nas concentrações 500 e 750 $\mu\text{g.L}^{-1}$ (Figura 29).

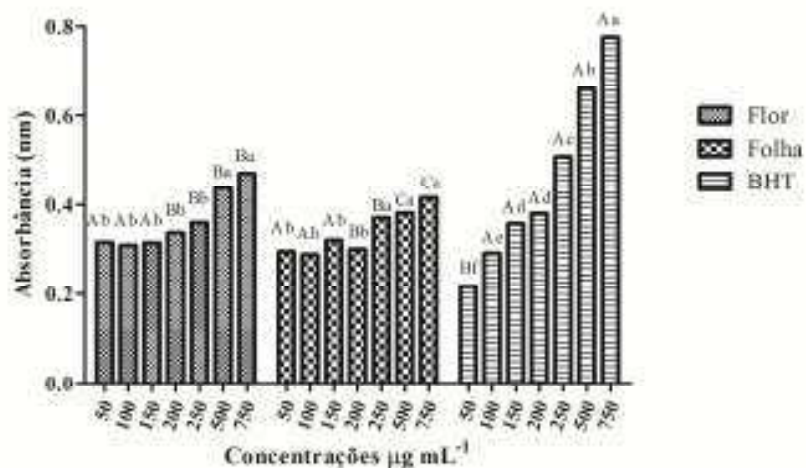


Figura 29 Análise comparativa entre as atividades antioxidante de OE de folhas e flores de *C. viminalis* e do padrão BHT, em função da concentração, pelo teste do fosfomolibdênio

No método do fosfomolibdênio é observada a capacidade antioxidante total da amostra, ou seja, a habilidade tanto em doar um par de elétrons (mecanismo redox) que depende da presença de compostos na amostra que possuam anéis fenólicos com duplas ligações, quanto em doar apenas um elétron

ou um hidrogênio (mecanismo radicalar), que depende da presença de componentes com hidroxilas disponíveis; essa atividade está relacionada a um ou à união desses dois mecanismos de redução. A partir dos resultados apresentados neste estudo podemos inferir que houve uma baixa atividade antioxidante, uma vez que absorbância permanece quase constante com o aumento da concentração comparando-se ao padrão BHT.

Avaliando a atividade antioxidante por esse método, estudos realizados com o óleo essencial das cascas e caule de *Liquidambar styraciflua* L., apresentaram resultados satisfatórios, inferindo que esta atividade pode estar relacionada com a presença de compostos que agem por ambos os mecanismos de redução, provocando uma maior redução do complexo (FRANCO, 2013).

Empregando o método do poder redutor, pode-se observar que os resultados apresentados para atividade antioxidante demonstram que houve diferença significativa nas concentrações 250, 500 e 750 $\mu\text{g.L}^{-1}$. Apesar da baixa atividade, o aumento da concentração resultou num discreto incremento do poder redutor, uma vez que o teste avalia a capacidade do antioxidante de reduzir o íon ferricianeto a ferricianato (Figura 30).

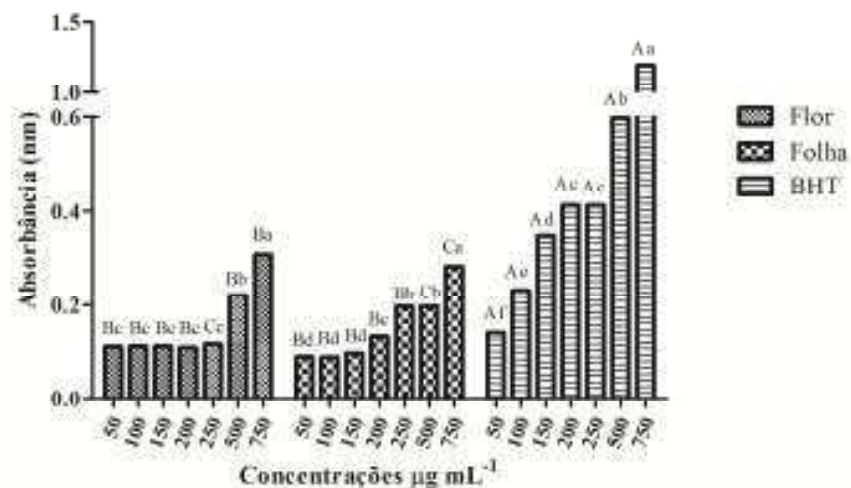


Figura 30 Análise comparativa entre as atividades antioxidante de OE de folhas e flores de *C. viminalis* e do padrão BHT, em função da concentração, pelo método do poder redutor

Silva (2014) avaliando a atividade antioxidante pelo método do poder redutor, observou que o óleo essencial de *Mentha viridis* apresentou atividade antioxidante muito fraca, enquanto que o óleo essencial de *Mentha pulegium*, nas concentrações de 0,78 a 50 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, superaram a atividade antioxidante do padrão BHT. Salarbashi et al. (2014), avaliando atividade antioxidante de *Zataria multiflora* e *Mentha pulegium* pelo mesmo método, atribuíram esta atividade aos compostos fenilpropanóides e terpenos presentes nos óleos essenciais como timol, carvacrol e γ -terpineno.

Perante a metodologia que avalia a atividade antioxidante pela inibição da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS), os óleos essenciais apresentaram baixa atividade antioxidante. Observando os resultados apresentados na Figura 31, a atividade antioxidante média do óleo essencial das flores, em sua maior concentração foi de 28,92 %, enquanto o das folhas

apresentou um valor médio de 28,12 %. Essa atividade variou significativamente tanto entre os óleos essenciais folhas e flores nas concentrações de 100, 150, 200 e 250 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, quanto para cada óleo de acordo com as concentrações utilizadas.

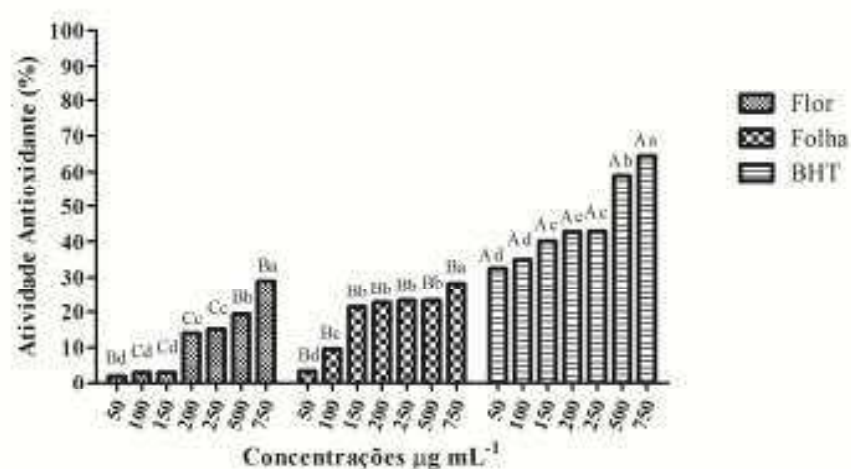


Figura 31 Análise comparativa entre as atividades antioxidante de OE de folhas e flores de *C. viminalis* e do padrão BHT, em função da concentração, pela inibição da formação de espécies reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

Guimarães et al. (2014) avaliando o óleo essencial de várias espécies encontrou valores de atividade antioxidante pelo método TBARS, (54,29 %) para espécie *L. sidoides* seguido pelos óleos de *O. odorifera* (45,55%), *M. glauca* (46,95%), *C. verbenacea* (36,96%) e *A. fastigiata* (26,56%), sendo que o padrão testado γ -terpineno apresentou uma alta atividade entre os demais padrões testados. Ruberto e Baratta (2000), avaliando a atividade antioxidante de quase 100 compostos que normalmente são encontrados nos mais diversos óleos

essenciais utilizando a mesma metodologia, também encontrou resultados similares. Entre os compostos avaliados que apresentaram maior atividade antioxidante, como os hidrocarbonetos monoterpênicos γ -terpineno, α -terpineno e terpinoleno na concentração de 1000 ppm, estes apresentaram 79,5, 71,5 e 64,6% de atividade, respectivamente.

Diante dos resultados encontrados, não se pode estabelecer uma relação entre a estrutura dos compostos e sua atividade antioxidante de acordo com as metodologias apresentadas. A dificuldade em estabelecer uma correlação entre a atividade antioxidante e os seus componentes em se tratando de óleos essenciais é grande devido à sua complexa composição, além da possível ocorrência de sinergismo. Além disso, há possível influência de outros fatores, tais como concentração, temperatura, luz, tipo de substrato e estado físico do sistema, sobre o ensaio antioxidante utilizado (VIUDA-MARTOS et al., 2009).

5 CONCLUSÕES

Os compostos majoritários que caracterizam os óleos essenciais das folhas e das flores da espécie *C. viminalis* foram o 1,8-cineol, α -pineno e α -terpineol nas concentrações de (50,4%, 25,8% e 8,7%) e (48,8%, 24,5% e 3,9%) respectivamente, havendo apenas pequenas diferenças quantitativas entre eles.

A atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas e flores apresentou atividade moderada sobre as bactérias tanto Gram-positivas e Gram-negativas. O óleo essencial das flores somente apresentou atividade em *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, não apresentando valores de inibição para as outras bactérias testadas.

Os resultados mostraram que os óleos essenciais das folhas e flores apresentaram uma modesta atividade antitumoral sobre a linhagem celular HT144 tratada por 48h, sendo observado na mesma uma redução da viabilidade dose-dependente em cerca de 40% e 25% na concentração de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, mostrando que OE das folhas apresentou maior atividade em relação ao OE das flores.

Pode-se observar que os óleos essenciais das folhas e flores apresentaram uma fraca atividade antioxidante diante das seis diversas metodologias empregadas, teste do β -caroteno/ácido linoleico, DPPH, TBARS, ABTS, hidroxil, fosfomolibdênio e poder redutor comparadas aos padrões testados. Sendo assim, conclui-se que os óleos essenciais de *C. viminalis* tanto das folhas quanto das flores diante das metodologias testadas, não apresenta capacidade antioxidante.

6 REFERÊNCIAS

- ADAMS, M. R.; MOSS, M. D. **Food microbiology**. 2nd ed. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2004. 479 p.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oils components by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4th ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804 p.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Farmacopeia brasileira**. 5. ed. Brasília, 2010. p. 198-199.
- AMAKURA, Y. et al. Marker constituents of the natural antioxidant Eucalyptus leaf extract for the evaluation of food additives. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, Tokyo, v. 73, n. 5, p. 1060-1065, 2009.
- ANAGNOSTOPOULOU, M. et al. Radical scavenging activity of various extracts and fractions of sweet orange peel (*Citrus sinensis*). **Food Chemistry**, London, v. 94, n. 1, p. 19-25, 2006.
- ANDRADE, M. et al. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils from *Cinnamodendron dinisii* Schwacke and *Siparuna guianensis* Aublet. **Antioxidants**, v. 2, n. 4, p. 384-397, 2013.
- ANDRADE, M. A. et al. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr./jun. 2012.
- ARNAO, M. B. Some methodological problems in determination of antioxidant activity using chromogen radicals: a practical case. **Trends in Food & Technology**, London, v. 11, n. 11, p. 419- 421, 2000.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BARREIROS, A.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 1, p. 113-123, jan./fev. 2006.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, 1999.

BIASI, L. A.; DESCHAMPS, C. **Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. 1. ed. Curitiba: Layer Studio Gráfico e Editora, 2009.

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.

BOTREL, P. P. et al. Teor e composição química do óleo essencial de *Hyptis marruboides* Epling (Lamiaceae) em diferentes genótipos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 2, p. 164-169, 2009.

BOULANOUAR, B. et al. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 46, p. 85-96, 2013.

BOUNATIROU, S. et al. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of the essential oils isolated from Tunisian *Thymus capitatus* Hoff. Et Link. **Food Chemistry**, London, v. 105, p. 146-155, 2007.

BRANDÃO, H. N. et al. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 6, 2010.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Investigação e controle de bactérias multirresistentes**. Brasília: ANVISA, 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controlereniss/manual%20controle_bacterias.pdf>. Acesso em: 12 dez. 2014.

BRASIL. MINISTÉRIO DO DESENVOLVIMENTO, INDÚSTRIA E COMÉRCIO EXTERIOR. 2014. Disponível em: <<http://alicesweb.desenvolvimento.gov.br>>. Acesso em: 10 dez. 2014.

BROPHY, J. J. et al. Variation in *Callistemon viminalis* (Myrtaceae): new evidence from leaf essential oils. **Australian Systematic Botany**, Meuborne, v. 10, n. 10, p. 1-13, 1997.

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

CANDAN, F. et al. Antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and methanol extracts of *Achillea millefolium* subsp. *millefolium* Afan. (Asteraceae). **Journal Ethnopharmacology**, v. 87, p. 215-220, 2003.

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

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Outbreak of Escherichia coli O157:H7 infection associated with eating fresh cheese curds-wisconsin, June 1998. **Morbidity Mortality Weekly Report**, Atlanta, v. 49, n. 40, p. 911-913, Oct. 2000.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CHAN, E. W. C. et al. Antioxidant and tyrosinase inhibition properties of leaves and rhizomes of ginger species. **Food Chemistry**, London, v. 109, n. 3, p. 477-483, 2008.

COMMODITY TRADE STATISTICS DATABASE. COMTRADE Brasil. **Exportações de óleos essenciais**. Disponível em: < <http://comtrade.un.org/>>. Acesso em: 21 jan. 2013.

COSTA, D. A. Atividade antioxidante da ciano-carvona. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 33, n. 4, p. 567-575, 2012.

COSTA-LOTUFO, L. V. et al. A contribuição dos produtos naturais como fonte de novos fármacos anticâncer: estudos no Laboratório Nacional de Oncologia Experimental da Universidade Federal do Ceará. **Virtual Química**, Fortaleza, v. 2, p.1-10, 2010.

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

DE VICENZI, M. et al. Constituintes of aromatic plants: eucalyptol. **Fitoterapia**, Milano, v. 73, p. 269-275, 2002.

DEL RIO, D.; STEWART, A. J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases**, v. 15, p. 316-328, 2005.

DESCHAMPS, C. et al. Densidade de tricomas glandulares e produção de óleo essencial em *Mentha arvensis* L., *Mentha x piperita* L. e *Mentha cf. aquatica* L. **Ciência e Natura**, Santa Maria, v. 28, n. 1, p. 23-34, 2012.

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

DÖLL-BOSCARDIN, P. M. et al. In vitro cytotoxic potential of essential oils of *Eucalyptus benthamii* and its related terpenes on tumor cell lines. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-8, 2012.

DORAN, A. L. et al. Vapour-phase activities of essential oils against antibiotic sensitive and resistant bacteria including MRSA. **Letters in Applied Microbiology**, Oxford, v. 48, n. 4, p. 387-392, 2009.

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.

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

FONTES, J. E. N. et al. Antitumor effect of the essential oil from leaves of *Guatteria pogonopus* (Annonaceae). **Chemistry & Biodiversity**, v. 10, n. 4, p. 722-729, Apr. 2013.

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

FRANCO, G. F. **Bioprospecção das partes aéreas e óleo essencial de *Liquidambar styraciflua* L., Altingiaceae**. 2013. 117 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2013.

GAUTAM, N.; MANTHA, A. K.; MITTAL, S. Essential oils and their constituents as anticancer agents: a mechanistic view. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 23, June 2014.

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

GOMES, M. S. **Atividades biológicas dos óleos essenciais de três espécies do gênero citrus e de seus componentes majoritários**. 2014. 126 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

GREAY, S. J.; HAMMER, K. A. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, p. 1-2, May 2011.

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

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

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

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

GULLO, V. P. et al. Drug discovery from natural products. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, Hampshire, v. 33, p. 523-531, 2006.

HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C.; FISHER, B. D. **Microbiologia ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2008. 448 p.

HASSAN, S. B. et al. Alpha terpineol: a potential anticancer agent which acts through suppressing NF- κ B signaling. **Anticancer Research**, v. 30, n. 6, p. 1911–1919, June 2010.

HAYES, A. J. et al. In vitro cytotoxicity of Australian tea tree oil using human cell lines. **Journal of Essential Oil Research**, Carol Stream, v. 9, p. 575–582, 1997.

HRISTEA, E. N. et al. Novel 1,1-diphenylhydrazine derivatives of benzofurazan and their dimerization. **International of Molecular Science**, Amsterdam, v. 7, n. 5, p. 130-143, 2006.

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

INOUYE, S.; UCHIDA, K.; ABE, S. Vapor activity of 72 essential oils against a *Trichophyton mentagrophytes*. **Journal of Infection and Chemotherapy**, Oxford, v. 12, n. 4, p. 210-216, Aug. 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **José Alencar Gomes da Silva (Brasil)**. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

INTERNATIONAL TRADE STATISTICS. **Contrade**. 2014. Disponível em: <trade.nosis.com/pt/Comex/Importacao-Exportacao/Brasil>. Acesso em: 27 ago. 2014.

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.

ISMAN, M. et al. **Essential oil-based pesticides: new insight from old chemistry**. Weinheim: Wiley-VCH, 2007. p. 201–209.

JAY, J. M. **Microbiologia 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, p. 330–336, 2007.

Jl, T. **Traditional chinese medicine pills for treating hemorrhoid**. CN 101352524 A 20090128, 2009.

JIN, K. et al. α -pinene triggers oxidative stress and related signaling pathways in A549 and HepG2 cells. **Food Science and Biotechnology**, v. 19, p. 1325–1332, 2010.

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

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

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

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 Bacteriology**, v. 91, p. 453-462, 2001.

LAMPRONTI, I.; SAAB, A. M.; GAMBARI, R. Antiproliferative activity of essential oils derived from plants belonging to the Magnoliophyta division. **International Journal of Oncology**, v. 29, p. 989-995, 2006.

LEMKE, T. L.; WILLIAMS, D. A. **Principles of medicinal chemistry**. 6. ed. Lippincott Williams & Wilkins, 2008. 1377 p.

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

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

MACHADO, M. et al. Potent antibacterial activity of *Eugenia umbelliflora*. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 43, n. 7, p. 636-639, 2005.

MARTÍNEZ-TOMÉ, M.; GARCÍA-CARMONA, F.; MURCIA, M. A.; J. Comparison of the antioxidant and pro-oxidant activities of broccoli amino acids with those of common food additives. **Journal Science of Food and Agriculture**, London, v. 81, p. 1019-1026, 2001.

MASETTO, M. A. M. et al. Teor e composição do óleo essencial de inflorescências e folhas de *Lavandula dentata* L. em diferentes estádios de desenvolvimento floral e épocas de colheita. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, p. 413-21, 2011.

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

MENEGOTTO, F. R.; PICOLI, S. U. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, Rio de Janeiro, v. 39, n. 2, p. 147-50, 2007.

MILLER, N. J. et al. Novel method for measuring antioxidant capacity and its application to monitoring antioxidant status in premature neonates. **Clinical Science**, v. 84, p. 407-412, 1993.

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

MIYAZAWA, M.; YAMAFUJI, C. Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, p. 1765-1768, 2005.

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

MONTINE, T. J. et al. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 33, n. 55, p. 620-626, 2002.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, Mar. 2009.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal Immunological Methods**, v. 16, n. 65, p. 1-2, p. 55-63, Dec. 1983.

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

NAZIHA, C. et al. Chemical study and antimalarial, antioxidant, and anticancer activities of *Melaleuca armillaris* (Sol Ex Gateau) Sm essential oil. **Journal of Medicinal**, v. 14, n. 11, p. 1383-1388, Nov. 2011.

NDORMO, A. F. et al. Insecticidal activities of essential oil of *Callistemon viminalis* applied as fumigant and powder against two bruchids. **Journal Applied Entomology**, v. 134, p. 333-342, 2010.

NGUEFACK, J. et al. Effects of plant extracts and chemical fungicide in controlling a rice seed-born fungus under laboratory and in irrigated cropping system in Ndop-Cameroon. **African Crop Science Society Conference**, El-Minia, v. 8, p. 791-796, Oct. 2007.

OLIVEIRA, C. M. et al. Chemical composition and allelopathic activity of the essential oil from *callistemon viminalis* (myrtaceae) blossoms on lettuce (*lactuca sativa* l.) seedlings. **American Journal of Plant Sciences**, v. 5, p. 3551-3557, 2014.

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

OYEDEJI, O. O. et al. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oils of *Callistemon citrinus* and *Callistemon viminalis* from south Africa. **Molecules**, v. 14, n. 6, p. 1990-1998, June 2009.

PABLA, N.; DONG, Z. Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies. **Kidney International**, Malden, v. 73, p. 994-1007, 2008.

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

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

PIRES, C. H. et al. Composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas e flores de *Callistemon viminalis* (sol. ex Gaertn.) G. Don ex. Loudon (Myrtaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 34, n. 4, p. 597-601, 2013.

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

PUPO, M. T.; COUTINHO, M. B. G.; VIEIRA, P. C. Biologia química: uma estratégia moderna para a pesquisa em produtos naturais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 6, p. 1446-1455, 2007.

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.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M. **Farmacologia**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, p. 1231-1237, 1999.

RESENDE, J. M. **Óleo essencial de *lychnophora pinaster mart.***: caracterização química, atividade antibacteriana, antifúngica, antiocrotóxigênica e hemolítica. 2013. 117 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

ROSADO, A. et al. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, Jena, v. 14, p. 957-962, 2006.

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

SACCHETTI, G. et al. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, London, v. 91, p. 621-632, 2005.

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.

SALARBASHI, D. et al. Development of new active packaging film made from a soluble soybean polysaccharide incorporated *Zataria multiflora* Boiss and *Mentha pulegium* essential oils. **Food Chemistry**, London, v. 146, p. 614-622, 2014.

SANTOS, A. L. **Comportamento do Staphylococcus aureus em queijo minas frescal fabricado com leite cru**. 2004. 54 p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2004.

SANTOS, M. H. et al. Influence of processing and roasting on the antioxidant activity of coffee (*Coffea arabica*). **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 3, p. 604- 610, maio/jun. 2007.

SEFIDKON, F. et al. The effect of distillation methods and stage of plant growth on the essential oil content and composition of *Satureja rechingeri* Jamzad. **Food Chemistry**, London, v. 100, p. 1054-1058, 2007.

SEYYDNEJAD, S. M. et al. Antibacterial activity of hydroalcoholic extract of *Callistemon citrinus* and *Albizia lebbek*. **American Journal Applied Science**, v. 7, p. 13–16, 2010.

SILVA, F. S. ***Mentha viridis* (L). L. e *Menthapulegium*. L.:** caracterização química, atividades antibacteriana, antioxidante, fosfolipásica, hemolítica e genotóxica dos óleos essenciais. 2014. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2014.

SILVA, C. J. et al. Chemical Composition and antibacterial activities from the essential oils of myrtaceae species planted in Brazil. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 104-108, 2010.

SILVA, A. F.; BARBOSA, L. C. A.; SILVA, E. A. M. Composição química do óleo essencial de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, n. 1, p. 1-7, 2003.

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

SINGH, G. et al. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 9, p. 3295-3302, 2008.

SOBRAL, M. V. et al. Antitumor activity of monoterpenes found in essential oils. **The Scientific World Journal**, Article ID 953451, 35 p. 2014.

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

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

SRIVASTAVA, S. K. et al. Essential oil composition of *Callistemon viminalis* leaves from India. **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 18, p. 361-363, 2003.

SYLVESTRE, M. et al. Essential oil analysis and anticancer activity of leaf essential oil of *Croton flavens* L. from Guadeloupe. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 103, n. 1, p. 99–102, 2006.

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

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

TOMAZ, M. A. et al. Composição química e atividade alelopática do óleo essencial de eucalipto. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, p. 475-483, 2014.

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

TOSCAN, C. M. **Atividade antimicrobiana e antioxidante de terpenóides**. 2010. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade de Caxias do Sul. Centro de Ciências Agrárias e Biológicas, Caxias do Sul, 2010.

TREVISAN, M. T. S; MACEDO, F. V. V. Seleção de plantas com atividade anticolinesterase para tratamento da doença de Alzheimer. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 3, p. 301-304, 2003.

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.

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Câncer**. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/en/>>. Acesso em: 10 nov. 2014.

WANG, W. et al. Efferth, antibacterial activity and anticancer activity of *Rosmarinus officinalis* L. essential oil compared to that of its main components. **Molecules**, v. 17, n. 3, p. 2704–2713, 2012.

YIN, Q. H.; YAN, F. X.; ZU, X. Y. Anti-proliferative and pro-apoptotic effect of carvacrol on human hepatocellular carcinoma cell line HepG-2. **Cytotechnology**, v. 64, p. 43–51, 2012.

ZANDI-SOHANI, N.; HOJJATI, M.; CARBONELL-BARRACHINA, Á. A. Insecticidal and repellent activities of the essential oil of *Callistemon citrinus* (Myrtaceae) Against *Callosobruchus maculatus* (F.) (Coleoptera: Bruchidae). **Neotropical Entomology**, Londrina, v. 42, n. 1, p. 89–94, Feb. 2013.

ANEXO

Apêndice A

Tabela 1A Valores médios dos halos de inibição (cm) de *Escherichia coli* ATCC 11229 exposta às diferentes concentrações dos óleos essenciais das folhas (CV1) e flores (CV2) *C. viminalis*.

Bactéria	Proporção (óleo essencial /DMSO)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halos de inibição (cm) CV1	Halos de inibição (cm) CV2
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 11229)	Cloranfenicol	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2,0 a	2,0 a
	1:1	500	0 c	0 c
	1:2	250	0 c	0 c
	1:4	125	0,6 b	0,8 b
	1:8	62,50	0 c	0 c
	1:16	31,25	0 c	0 c
	1:32	15,62	0 c	0 c
	1:64	7,81	0 c	0 c
	1:128	3,90	0 c	0 c
	DMSO	0	0 c	0 c
CV (%)			49,61	40,78

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

Tabela 2A Valores médios dos halos de inibição (cm) de *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 exposta às diferentes concentrações dos óleos essenciais das folhas (CV1) e flores (CV2) *C. viminalis*.

Bactéria	Proporção (óleo essencial /DMSO)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halos de inibição (cm) CV1	Halos de inibição (cm) CV2
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 13565)	Cloranfenicol	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2,1 a	2,1 a
	1:1	500	0,8b	0 c
	1:2	250	0 c	0 c
	1:4	125	0 c	0,6 b
	1:8	62,50	0 c	0 c
	1:16	31,25	0 c	0 c
	1:32	15,62	0 c	0 c
	1:64	7,81	0 c	0 c
	1:128	3,90	0 c	0 c
	DMSO	0	0 c	0 c
CV (%)			7,32	6,84

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

Tabela 3A Valores médios dos halos de inibição (cm) de *Salmonella Cholerasuis* ATCC 6539 exposta às diferentes concentrações dos óleos essenciais das folhas (CV1) e flores (CV2) *C. viminalis*.

Bactéria	Proporção (óleo essencial /DMSO)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halos de inibição (cm) CV1	Halos de inibição (cm) CV2
<i>Salmonella Cholerasuis</i> (ATCC 6539)	Cloranfenicol	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2,1 a	2,1 a
	1:1	500	0,5 b	0 b
	1:2	250	0 c	0 b
	1:4	125	0 c	0 b
	1:8	62,50	0 c	0 b
	1:16	31,25	0 c	0 b
	1:32	15,62	0 c	0 b
	1:64	7,81	0 c	0 b
	1:128	3,90	0 c	0 b
	DMSO	0	0 c	0 b
CV (%)			16,87	15,89

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

Tabela 4A Valores médios dos halos de inibição (cm) de *Listeria monocytogenes* ATCC 19117 exposta às diferentes concentrações dos óleos essenciais das folhas (CV1) e flores (CV2) *C. viminalis*.

Bactéria	Proporção (óleo essencial /DMSO)	Concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Halos de inibição (cm) CV1	Halos de inibição (cm) CV2
<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 19117)	Cloranfenicol	100 $\mu\text{g mL}^{-1}$	2,2 a	2,2 a
	1:1	500	0,8 b	0 b
	1:2	250	0,5 b	0 b
	1:4	125	0 c	0 b
	1:8	62,50	0 c	0 b
	1:16	31,25	0 c	0 b
	1:32	15,62	0 c	0 b
	1:64	7,81	0 c	0 b
	1:128	3,90	0 c	0 b
	DMSO	0	0 c	0 b
CV (%)			18,87	15,89

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