

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE  
ESPÉCIES DA FAMÍLIA MYRTACEAE

Autora: Vanessa Paula da Silva  
Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Mariana Buranelo Egea

RIO VERDE – GO  
Fevereiro de 2017

INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO - CAMPUS RIO VERDE  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE  
ESPÉCIES DA FAMÍLIA MYRTACEAE

Autora: Vanessa Paula da Silva  
Orientadora: Dr.<sup>a</sup> Mariana Buranelo Egea  
Coorientadora: Dr.<sup>a</sup> Cassia Cristina Fernandes Alves

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de MESTRE EM AGROQUÍMICA, no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – Área de concentração Agroquímica.

RIO VERDE – GO  
Fevereiro de 2017

Silva, Vanessa Paula da

S586a Atividades biológicas de óleos essenciais de espécies da família  
Myrtaceae / Vanessa Paula da Silva. –

Rio Verde. – 2017.

76 f.: il.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Federal Goiano –  
Câmpus Rio Verde, 2017.

Orientador (a): Doutora. Mariana Buranelo Egea.

#### Bibliografia

1. Família Myrtaceae. 2. Óleos essenciais. 3. Leishmanicidas. 4. Bactericidas. 5. Fungicidas. I. Título. II. Instituto Federal Goiano – *Campus Rio Verde*.

632.9


INSTITUTO FEDERAL DE EDUCAÇÃO, CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
GOIANO – CAMPUS RIO VERDE  
DIRETORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGROQUÍMICA

**ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ÓLEOS  
ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA *Myrtaceae***

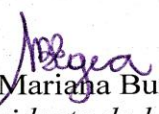
Autora: Vanessa Paula da Silva  
Orientador: Mariana Buranelo Egea

*TITULAÇÃO*: Mestre em Agroquímica – Área de concentração  
Agroquímica.

APROVADA em 20 de fevereiro de 2017.

  
Prof. Dr. Ailton César Lemes  
*Avaliador externo*  
Universidade do Minho -  
Portugal

  
Prof. Dr. Fábio Henrique Dyszy  
*Avaliador interno*  
IF Goiano/RV

  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Mariana Buranelo Egea  
*Presidente da banca*  
IF Goiano/RV

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por sua infinita bondade e misericórdia e por estar comigo em todos os momentos de minha vida.

À minha família, meus queridos pais Edilene Silva e Manoel Paulo, meus amados irmãos André Paulo e Tatiane Paula, minha cunhada Raquel Lemes e meu lindo sobrinho Daniel, que sempre me apoiaram nesta caminhada, incentivando, consolando nos momentos difíceis e amando incondicionalmente.

À minha querida mãe, Edilene Silva, por sua dedicação, conselhos e orações.

Ao meu amado pai, Manoel Paulo, pelo apoio, dedicação e por sempre me ajudar nas coletas das amostras.

Ao meu noivo e futuro esposo, Herli Mendes, que sempre esteve do meu lado ajudando em cada etapa da realização deste sonho, apoiando com palavras ternas e também me auxiliando nas coletas das amostras sem medir esforços.

Às minhas amigas e irmãs em Cristo, Elisângela Barbosa e Raiane Silva, pela amizade, amor, apoio, incentivo, pelas risadas, pelos momentos de descontração que guardarei para sempre em minha memória e em meu coração.

Aos meus amigos do grupo “Mary Bond”, Marianna (“mulé”) e Flávio (“homi”), pela amizade verdadeira, pelas palavras de incentivo e por todos os momentos de descontração, saudades de vocês.

Aos meus amigos do tempo de graduação, Paulo Genite, Deliane Oliveira e Manoel Aguiar, que constituíram nosso “Trio Ternura”, pela amizade sincera, companheirismo, incentivo e por todos os momentos de descontração, saudades de vocês.

À minha amiga Juliane Cristina, minha “nutri linda” por todo carinho, amizade e incentivo.

Aos meus amigos e companheiros de Mestrado, Manoel Aguiar ao qual tenho muito carinho, à Danielle Prado minha “mana” e amiga, aos amigos: Dêmily, João Pedro,

Sara, Cíntia, Daniela Macedo, Tainara e demais pela amizade, pelas palavras de apoio e incentivo.

À minha querida orientadora e professora Dr.<sup>a</sup> Mariana Buranelo Egea, por sua dedicação, pelo apoio, pelos ensinamentos, por seu exemplo de profissionalismo e competência e por sua amizade.

À minha coorientadora e professora Dr.<sup>a</sup> Cássia Cristina Fernandes Alves, pelo apoio, ensinamentos, dedicação e amizade.

Ao meu amigo e professor Dr. Mayker Lázaro Dantas Miranda, por seus conselhos, incentivos, pela ajuda nas análises e na escrita deste trabalho.

Ao professor Dr. Adriano Jakelaitis, pelo apoio e orientação no início do curso.

Às alunas de Iniciação Científica, Larissa e Mayzze, por toda ajuda e parceria.

À Elizabeth por sua amizade, por toda ajuda nas análises antifúngicas, apoio e incentivo.

À Nargella, por sua amizade e toda ajuda nas exsiccatas e análises antioxidantes.

À Jéssica e a toda equipe do Laboratório de Microbiologia de Alimentos, pela colaboração e ajuda nas análises.

Aos meus colegas do Laboratório de Química de Produtos Naturais e do Mestrado em Agroquímica, pela amizade, pelas trocas de conhecimento, apoio e dedicação.

A todos os professores do Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela dedicação, empenho e conhecimentos transmitidos.

À Universidade de Franca (UNIFRAN) e aos professores Dr. Carlos H. G. Martins e Lizandra G. Magalhães, por toda ajuda e parceria nas análises biológicas.

À CAPES, pela concessão da bolsa de estudos, providencial para o desenvolvimento desta pesquisa.

À Embrapa Arroz e Feijão, pela doação dos isolados dos fungos para realização desta pesquisa.

Ao Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde e ao Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pela oportunidade.

Aos professores membros da banca de defesa deste trabalho, Prof. Dr. Fábio H. Dyszy e Prof. Dr. Ailton Lemes, pela disponibilidade e pelas contribuições ao trabalho.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para mais uma etapa de minha vida.

Obrigada!

## **BIOGRAFIA DO AUTOR**

VANESSA PAULA DA SILVA, filha de Manoel Paulo da Silva e Edilene Silva, nasceu no dia 22 de setembro de 1993, na cidade de Santa Helena de Goiás, Goiás. Em dezembro de 2010, concluiu o ensino médio no Colégio Estadual José Salviano Azevedo em Santa Helena de Goiás. Em 2011, iniciou no curso superior em Licenciatura em Química pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – GO, concluindo em dezembro de 2014. Em março de 2015, iniciou no Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, pelo Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde – GO – área de concentração Agroquímica, sob orientação da professora Dr.<sup>a</sup> Mariana Buranelo Egea.

## ÍNDICE

	<b>Página</b>
ÍNDICE DE TABELAS.....	vii
ÍNDICE DE FIGURAS.....	viii
LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACÕES E UNIDADES.....	ix
RESUMO.....	xi
ABSTRACT.....	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	01
1.1. Família Myrtaceae.....	01
1.1.1. O gênero <i>Eugenia</i> e a espécie <i>Eugenia uniflora</i> .....	02
1.1.2. O gênero <i>Plinia</i> e a espécie <i>Plinia cauliflora</i> .....	03
1.1.3. O gênero <i>Syzygium</i> e a espécie <i>Syzygium cumini</i> .....	05
1.2. Óleos essenciais e suas propriedades.....	07
1.2.1. Mecanismos de ação de óleos essenciais contra micro-organismos patogênicos e fitopatogênicos .....	12
1.3. Referências Bibliográficas.....	13
2. OBJETIVOS.....	18
2.1. Objetivo geral.....	18
2.2. Objetivos específicos.....	18
CAPÍTULO I - Avaliação <i>in vitro</i> das atividades leishmanicida e antimicrobiana de óleos essenciais de três espécies da família Myrtaceae ocorridas no Cerrado.....	19
RESUMO.....	19
CHAPTER I - <i>In vitro</i> evaluation of leishmanicidal and antimicrobial activities of essential oils of the Myrtaceae family occurring in the Cerrado.....	21
ABSTRACT.....	21
1.1. INTRODUÇÃO.....	23
1.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	25
1.2.1. Material vegetal.....	25
1.2.2. Extração dos óleos essenciais.....	25
1.2.3. Rendimento dos óleos essenciais.....	26
1.2.4. Composição química dos óleos essenciais.....	26
1.2.5. Atividade leishmanicida.....	26
1.2.6. Atividade antibacteriana.....	27
1.2.7. Análise estatística.....	28
1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	28
1.3.1. Rendimento e composição química dos óleos essenciais.....	28



1.3.2. Atividade leishmanicida.....	34
1.3.3. Atividade antibacteriana.....	36
1.4. CONCLUSÕES.....	39
1.5. REFERÊNCIAS.....	40
CAPÍTULO II - Atividade contra os fungos fitopatogênicos <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> e <i>Rhizoctonia Solani</i> dos óleos essenciais de <i>Eugenia uniflora</i> e <i>Syzygium cumini</i> .....	45
RESUMO.....	45
CHAPTER II - Activity against phytopathogenic fungi <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> and <i>Rhizoctonia solani</i> of essential oils of <i>Eugenia uniflora</i> and <i>Syzygium cumini</i> .....	46
ABSTRACT.....	46
2.1. INTRODUÇÃO.....	47
2.2. MATERIAL E MÉTODOS.....	49
2.2.1. Material vegetal.....	49
2.2.2. Extração dos óleos essenciais.....	49
2.2.3. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais.....	50
2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
2.4. REFERÊNCIAS.....	55
3. CONCLUSÕES GERAIS.....	58
4. APÊNDICE.....	60
4.1. APÊNDICE A.....	60

---

## ÍNDICE DE TABELAS

		<b>Página</b>
Tabela 1	Rendimento médio dos óleos essenciais.....	29
Tabela 2	Compostos identificados por CG-MS do óleo essencial das folhas de <i>E. uniflora</i> , <i>P. cauliflora</i> e <i>S. cumini</i> .....	32
Tabela 3	Atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e determinação dos valores de concentração inibitória 50% (CI <sub>50</sub> ).....	35
Tabela 4	Efeito inibidor do óleo essencial de folhas de <i>E. uniflora</i> , <i>P. cauliflora</i> e <i>S. cumini</i> frente a bactérias orais, aeróbias e anaeróbias.....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

	<b>Página</b>
<b>INTRODUÇÃO</b>	
Figura 1 <i>Eugenia uniflora</i> . (A) árvore adulta; (B) folhas; (C) flores; (D) frutos.....	51
Figura 2 <i>Plinia cauliflora</i> . (A) árvore adulta; (B) folhas; (C) flores; (D) frutos.....	52
Figura 3 <i>Syzygium cumini</i> . (A) árvore adulta; (B) folhas; (C) flores; (D) frutos.....	53
Figura 4 Biossíntese simplificada de produtos do metabolismo secundário vegetal.....	51
Figura 5 Esquema simplificado da biossíntese de terpenos.....	52
Figura 6 Principais fatores que podem influenciar a produção de metabólitos secundários em plantas.....	53
<b>CAPÍTULO I</b>	
Figura 1 Estruturas químicas dos quatros constituintes majoritários identificados no óleo essencial das folhas de <i>E. uniflora</i> : (1) Germacrona, (2) Epatulenol, (3) $\alpha$ -selineno e (4) (Z)- $\beta$ -elemenona.....	52
Figura 2 Estruturas químicas dos quatros constituintes majoritários identificados no óleo essencial das folhas de <i>S. cumini</i> : (1) $\alpha$ -pineno, (2) Globulol, (3) Eugenol e (4) $\alpha$ -terpineol.....	53
Figura 3 Estruturas químicas dos quatros constituintes majoritários identificados no óleo essencial das folhas de <i>P. cauliflora</i> : (1) (E)-cariofileno, (2) $\beta$ -bisaboleno, (3) (E,E)- $\alpha$ -farneceno e o (4) Globulol.....	51
Figura 4 Estrutura química da Anfotericina B.....	52
Figura 5 Estrutura química do Dicloridrato de Clorexidina.....	53
<b>CAPÍTULO II</b>	
Figura 1 Percentual de inibição do crescimento micelial dos óleos essenciais de <i>Eugenia uniflora</i> e <i>Syzygium cumini</i> sobre o fungo <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .	52
Figura 2 Percentual de inibição do crescimento micelial dos óleos essenciais de <i>Eugenia uniflora</i> e <i>Syzygium cumini</i> sobre o fungo <i>Rhizoctonia solani</i> .....	53
Figura 3 Estrutura química do Fluazinam .....	51
Figura 4 Estrutura química do Ergosterol.....	52
<b>APÊNDICE A</b>	
Figura 1A Cromatograma do óleo essencial das folhas <i>in natura</i> de <i>Eugenia uniflora</i> coletadas em setembro de 2015 a março de 2016.....	51
Figura 2A Cromatograma do óleo essencial das folhas <i>in natura</i> de <i>Plinia cauliflora</i> coletadas em setembro de 2015 a março de 2016.....	52
Figura 3A Cromatograma do óleo essencial das folhas <i>in natura</i> de <i>Syzygium cumini</i> coletadas em setembro de 2015 a março de 2016.....	53

## LISTA DE SIMBOLOS, SIGLAS, ABREVIACOES E UNIDADES

$^{\circ}\text{C}$ .....	Grau Celsius.....	Temperatura
%.....	Porcentagem.....	Percentual
min.....	Minuto.....	Tempo
h.....	Hora.....	Tempo
$\mu\text{L}$ .....	Microlitro.....	Volume
$\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$ .....	Mililitro por minuto.....	Vazo
$\text{mL}$ .....	Mililitro.....	Volume
L.....	Litro.....	Volume
$\text{m}\cdot\text{v}^{-1}$ .....	Massa por volume.....	Medida
$\mu\text{g}$ .....	Micrograma.....	Massa
mg.....	Miligrama.....	Massa
g.....	Gramma.....	Massa
$\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ .....	Micrograma por mililitro.....	Medida
$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ .....	Miligrama por Litro.....	Medida
$\mu\text{m}$ .....	Micrometro.....	Comprimento
mm.....	Milmetro.....	Comprimento
cm.....	Centmetro.....	Comprimento
m.....	Metro.....	Comprimento
MeV.....	Mega Eltron-Volt.....	Energia
psi.....	Libra-fora por polegada quadrada..	Presso
$\alpha$ .....	Alfa.....	Letra Grega
$\beta$ .....	Beta.....	Letra Grega
$\delta$ .....	Delta.....	Letra Grega
$\gamma$ .....	Gamma.....	Letra Grega
$\tau$ .....	Tau.....	Letra Grega
<i>E. uniflora</i> .....	<i>Eugenia uniflora</i> .....	Nome cientfico
<i>P. cauliflora</i> .....	<i>Plinia cauliflora</i> .....	Nome cientfico
<i>S. cumini</i> .....	<i>Syzygium cumini</i> .....	Nome cientfico
<i>L. amazonensis</i> .....	<i>Leishmania amazonensis</i> .....	Nome cientfico
<i>S. sclerotiorum</i> .....	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .....	Nome cientfico
<i>R. solani</i> .....	<i>Rhizoctonia solani</i> .....	Nome cientfico
CI.....	Concentrao Inibitria.....	Abreviao
CI <sub>50</sub> .....	Concentrao Inibitria de 50%.....	Abreviao
CIM.....	Concentrao Inibitria Mnima.....	Abreviao
PIC.....	Percentual de Inibio Crescimento	Abreviao
IPP.....	Isopentil difosfato.....	Abreviao

ICM.....	Inibição Crescimento Micelial.....	Abreviação
GPP.....	Geranyl difosfato.....	Abreviação
FPP.....	Farnesil difosfato.....	Abreviação
GGPP.....	Geranylgeranyl difosfato.....	Abreviação
BDA.....	Batata Dextrose Ágar.....	Abreviação
DMSO.....	Dimetilsulfóxido.....	Abreviação
P.A.....	Para análise.....	Abreviação
NIST.....	National Institute of Standards and Technology.....	Abreviação
N <sub>2</sub> .....	Gás Nitrogênio.....	Símbolo químico
CO <sub>2</sub> .....	Gás Dióxido de Carbono.....	Símbolo químico
H <sub>2</sub> .....	Gás Hidrogênio.....	Símbolo químico
BRM 29673.....	Código Fungo <i>S. sclerotiorum</i> .....	Código de Identificação
MHOM/BR/PH8.....	Código Protozoário <i>L. amazonensis</i>	Código de Identificação
ATCC.....	American Type Culture Collection..	Código de Identificação

---

## RESUMO

SILVA, VANESSA PAULA DA. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano Campus Rio Verde -GO, fevereiro de 2017. **Atividades biológicas de óleos essenciais de espécies da família Myrtaceae.** Mariana Buranelo Egea “Orientadora”; Cássia Cristina Fernandes Alves “Coorientadora”.

Pesquisas relacionadas aos óleos essenciais vêm crescendo significativamente, principalmente por apresentarem importantes propriedades biológicas contra microorganismos patogênicos e fitopatogênicos, sendo potenciais substitutos dos produtos sintéticos, que têm demonstrado efeitos colaterais à saúde humana e ao meio ambiente. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a composição química e as atividades biológicas, quanto as ações antibacteriana, antifúngica e antiparasitária, de óleos essenciais extraídos das folhas de *Eugenia uniflora*, *Plinia cauliflora* e *Syzygium cumini*, espécies da família Myrtaceae. Os óleos essenciais foram obtidos através de hidrodestilação em aparelho tipo Clevenger por 3 horas. Os componentes dos óleos essenciais foram identificados por meio de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM). Foi avaliada a atividade antibacteriana dos óleos essenciais das espécies, *E. uniflora*, *P. cauliflora* e *S. cumini* sobre bactérias orais através do método de microdiluição em microplacas com 96 poços, determinando a concentração inibitória mínima (CIM). Os óleos essenciais de *E. uniflora*, *P. cauliflora* e *S. cumini*, foram testados contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, avaliando a viabilidade, crescimento do protozoário e determinando a concentração inibitória 50% (CI<sub>50</sub>). A atividade antifúngica dos óleos essenciais de *E.uniflora* e *S. cumini* foi avaliada sobre dois tipos de fungos, *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*, determinando

o Percentual de Inibição do Crescimento Micelial (PIC). Foram identificados 34 compostos para o óleo essencial de *E. uniflora*, sendo os compostos majoritários encontrados, o germacrona (8,52%), o espatulenol (8,20%), o  $\alpha$ -selineno (7,50%) e o (Z)- $\beta$ -elemenona (4,88%). Para o óleo essencial de *P. cauliflora* foram identificados 38 compostos, sendo os compostos majoritários encontrados, o (E)-cariofileno (14,69%),  $\beta$ -bisaboleno, (E,E)- $\alpha$ -farneceno (8,07%) e o globulol (7,86%). Já para o óleo essencial de *S. cumini* foram identificados 52 compostos, sendo os compostos majoritários encontrados o  $\alpha$ -pineno (21,20%), globulol (15,30%), o eugenol (11,20%), e o  $\alpha$ -terpineol (8,88%). Os óleos essenciais das três espécies Myrtaceae apresentaram atividade antibacteriana moderada sobre as bactérias orais testadas com CIM de 100 a 400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A ação leishmanicida dos óleos essenciais testados foi bastante promissora, sendo que a espécie *P. cauliflora* apresentou melhor resultado com  $\text{CI}_{50}$  de 0,46  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , a espécie *E. uniflora* apresentou  $\text{CI}_{50}$  de 0,99  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , e a espécie *S. cumini* obteve menor atividade com  $\text{CI}_{50}$  de 8,78  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Em relação a ação antifúngica, os óleos essenciais de *E. uniflora* e *S. cumini* reduziram o crescimento micelial dos fungos consideravelmente, apresentando PIC de 0 a 92% (*E. uniflora*) e 30 a 100% (*S. cumini*) sobre o fungo *S. sclerotiorum*, e PIC de 33 a 100% (*E. uniflora*) e 52 a 100% (*S. cumini*) sobre o fungo *R. solani*. Os resultados observados enfatizam as atividades biológicas apresentadas por óleos essenciais e os potencializam como possíveis agentes bactericidas, fungicidas e parasiticidas naturais.

**Palavras-chaves:** Família Myrtaceae, óleos essenciais, leishmanicidas, bactericidas, fungicidas.

## ABSTRACT

SILVA, VANESSA PAULA DA. Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano Campus Rio Verde-GO, February 2017. **Biological activities of essential oils of Myrtaceae family species.** Mariana Buranelo Egea "Adviser"; Cássia Cristina Fernandes Alves "Co-Adviser".

Researches related to essential oils have been growing significantly, mainly because they have important biological properties against pathogenic and phytopathogenic microorganisms, being a potential substitutes for synthetic products, which have demonstrated side effects on human health and the environment. The objective of this work was to evaluate the chemical and biological activities of the essential oils extracted from the leaves of *Eugenia uniflora*, *Plinia cauliflora* and *Syzygium cumini*, species of the family Myrtaceae, as well as its antifungal and antiparasitic actions. The essential oils were obtained by hydrodistillation in one type of Clevenger device for 3 hours. The components of the oils were identified by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS). The antibacterial activity of the essential oils of the species, *E. uniflora*, *P. cauliflora* and *S. cumini*, on oral bacteria was evaluated by means of the microdilution method in 96 well microplates, determining the minimum inhibitory concentration (MIC). The essential oils of *E. uniflora*, *P. cauliflora* and *S. cumini*, were tested as promastigotes of *Leishmania amazonensis*, evaluating a viability, protozoan growth and determining a 50% inhibitory concentration (IC50). The antifungal activity of the essential oils of *E. uniflora* and *S. cumini* was evaluated on two types of fungi, *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani*, determining the percentage of inhibition of mycelial growth (PIC). A total of 34 compounds were identified for the essential oil of *E. uniflora*, the major compounds found were germacrone (8.52%), spathulenol (8.20%),



$\alpha$ -selinene (7.50%) and (Z)- $\beta$ -elemenone (4.88%). For the essential oil of *P. cauliflora* were identified 38 compounds, being the major compounds found, (E)-caryophyllene (14.69%),  $\beta$ -bisabolene, (E,E)- $\alpha$ -farnecene (8.07%) and globulol (7.86%). For the *S. cumini* essential oil were identified 52 compounds, the major compounds found being  $\alpha$ -pinene (21.20%), globulol (15.30%), eugenol (11.20%), *o* and  $\alpha$ -terpineol (8.88%). The essential oils of the three species Myrtaceae presented moderate antibacterial activity on the oral bacteria tested with MICs of 100 to 400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . The leishmanicidal action of the essential oils tested was very promising, and the *P. cauliflora* species had the best IC50 result of 0.46  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , *E. uniflora* had IC50 of 0.99  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , and the *S. cumini* species obtained lower IC50 activity of 8.78  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . In relation to the antifungal action, the essential oils of *E. uniflora* and *S. cumini* reduced the fungal mycelial growth considerably, presenting PIC from 0 to 92% (*E. uniflora*) and 30 to 100% (*S. cumini*) on the fungus *S. sclerotiorum*, and PIC of 33 to 100% (*E. uniflora*) and 52 to 100% (*S. cumini*) on fungus *R. solani*. The observed results emphasize how biological activities are presented by essential oils and potentiators them like bactericidal agents, fungicides and natural parasiticides.

**Key words:** Family Myrtaceae, essential oil, leishmanicides, bactericides, fungicides.

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Família Myrtaceae

A família Myrtaceae, em todo o mundo, inclui aproximadamente 3.100 espécies em aproximadamente 140 gêneros, divididos em duas subfamílias, *Leptospermoideae* e *Myrtoideae*. No Brasil, a subfamília *Myrtoideae* compreende 23 gêneros e aproximadamente 1.000 espécies (Morais et al., 2014).

Muitas espécies da família Myrtaceae além de apresentarem um potencial já consagrado para serem utilizadas na produção de frutas, podem, no médio e longo prazo constituírem em espécies de importância científica, principalmente pela diversidade de compostos naturais com propriedades benéficas a saúde, que estão sendo descobertos e estudados cada vez mais recentemente (Franzon et al., 2009). Assim, ao mesmo tempo, espécies dessa grande família botânica, poderão trazer benefícios para os consumidores, tanto na área alimentícia e comercial como na área da saúde, de forma natural e saudável. Além disso, o uso de espécies nativas pode ser uma alternativa para a exploração sustentável nas diversas regiões do país ( Bajalan e Pirbalouti, 2014).

Algumas espécies desta família também são empregadas principalmente em distúrbios gastrintestinais, hemorragias e infecções, cuja ação pode estar relacionada às propriedades adstringentes das plantas. Geralmente, as partes mais usadas no tratamento de enfermidades são as folhas e cascas já que os frutos comumente são comestíveis. As cascas são ricas em taninos, presentes também nas folhas, que ainda apresentam flavonoides, saponinas e óleos essenciais nas cavidades secretoras (Ishikawa et al., 2008; Moreira, 2010).

A presença de terpenos é uma característica definidora da família Myrtaceae, famosa por ter algumas das mais altas concentrações de terpenos foliares no reino vegetal

(Keszei et al., 2008). Muitas indústrias têm grande interesse nos compostos terpênicos presentes nos óleos essenciais devido as propriedades medicinais que eles apresentam. Portanto, espécies da família Myrtaceae se tornam ótimas fontes de óleos essenciais devido a alta concentração de terpenos encontrados predominantemente em suas folhas (Padovan et al., 2014).

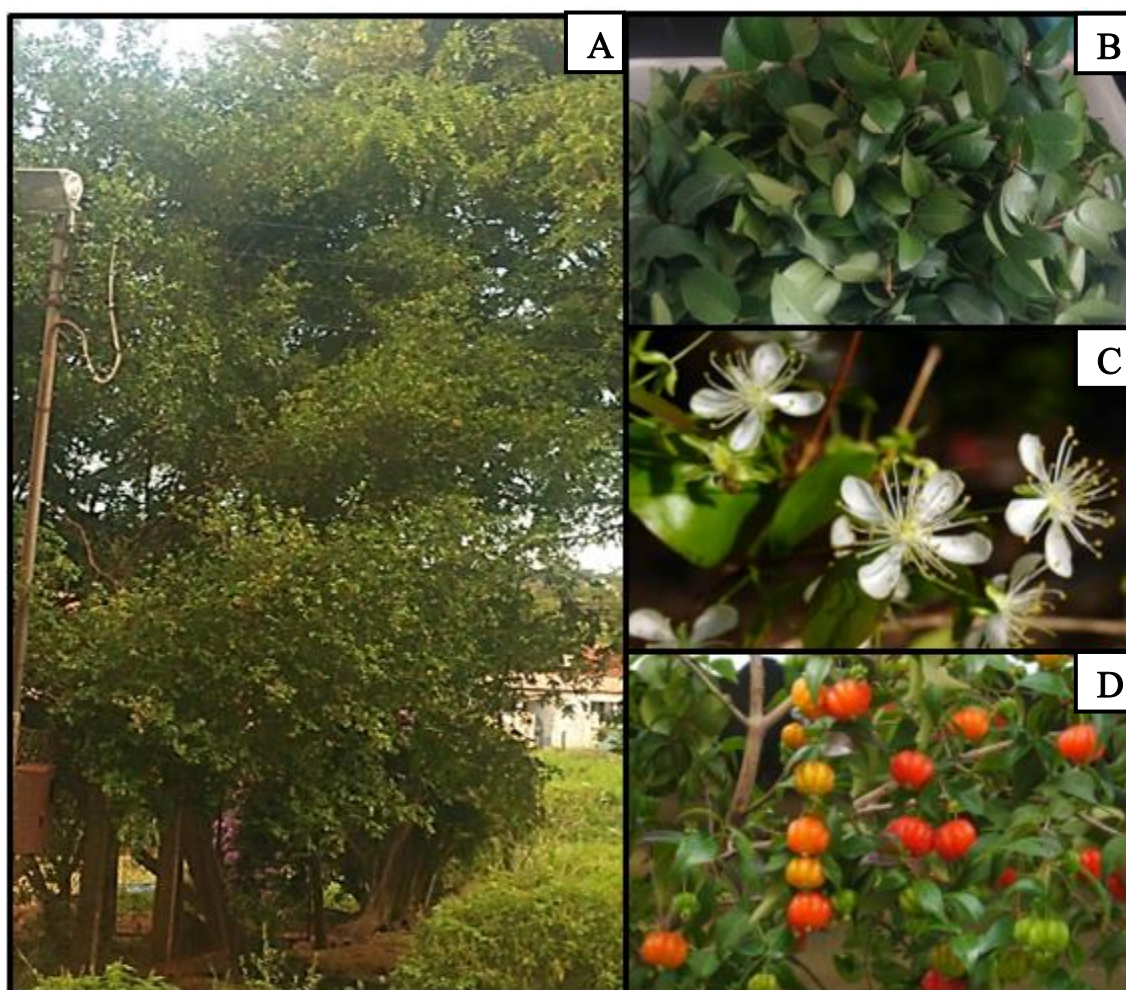
### 1.1.1 O gênero *Eugenia* e a espécie *Eugenia uniflora* (Pitangueira)

O gênero *Eugenia* compõe um dos maiores gêneros da família Myrtaceae, apresentando cerca de 1.115 espécies, distribuídas, principalmente, nas regiões tropicais das Américas. Muitas de suas espécies são usadas na medicina popular e outras submetidas a estudos químicos e avaliações de ações farmacológicas (Dias et al., 2013). Dentre as espécies desse gênero, destacam-se como frutíferas a pitangueira (*Eugenia uniflora*), cagaiteira (*Eugenia dysenterica*), cerejeira (*Eugenia cerasiflora*) e uvaieira (*Eugenia pyriformis*) (Vieira et al., 2006).

A espécie *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae) (Figura 1), conhecida como cerejeira brasileira ou pitangueira, é uma árvore frutífera amplamente distribuída em todo o Brasil. Seus frutos são comestíveis e suas folhas são utilizadas na medicina popular como diurético, antireumáticos, antifebril, anti-inflamatório e como agente terapêutico para doenças do estômago (Ogunwande et al., 2005; Victoria et al., 2012). A composição química variada e as propriedades biológicas do óleo essencial das folhas de pitangueira, cultivadas em diferentes regiões do Brasil e de outros países, têm demonstrando que *E. uniflora* apresenta elevado potencial para exploração medicinal e cosmética (Santos et al., 2015).

Os óleos essenciais de pitanga são usados pela indústria brasileira de cosméticos por apresentarem propriedades adstringentes e pela presença de diversos compostos voláteis, como terpenos, álcoois, ésteres, cetonas, dentre outros, que estão associados com o seu cheiro agradável (May et al., 2007). As principais aplicações dos óleos essenciais são em shampoos, condicionadores de cabelo, sabonetes, óleos corporais e perfumes (Amorim et al., 2009). Os óleos essenciais obtidos a partir das folhas de *E. uniflora* têm potencial antifúngico (Costa et al., 2010), antibacteriano, citotóxico, antinociceptivo e propriedades hipotérmicas (Amorim et al., 2009). De acordo com Victoria et al. (2012) os óleos essenciais de *E. uniflora* apresentaram atividade antimicrobiana contra duas

bactérias patogênicas importantes, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*, e contra dois fungos da espécie *Candida*, *C. lipolytica* e *C. Guilliermondii*, sendo que a administração de óleos essenciais por via oral não causou letalidade ou efeitos toxicológicos em ratos. Estes resultados sugerem que os óleos essenciais das folhas de *E. uniflora* podem ter potencial para uso na indústria farmacêutica.



**Figura 1:** *Eugenia uniflora*. (A) árvore adulta; (B) folhas; (C) flores; (D) frutos. Fonte: (A) e (B) arquivo pessoal; (C) Alves, 2012; (D) Ramalho, 2015.

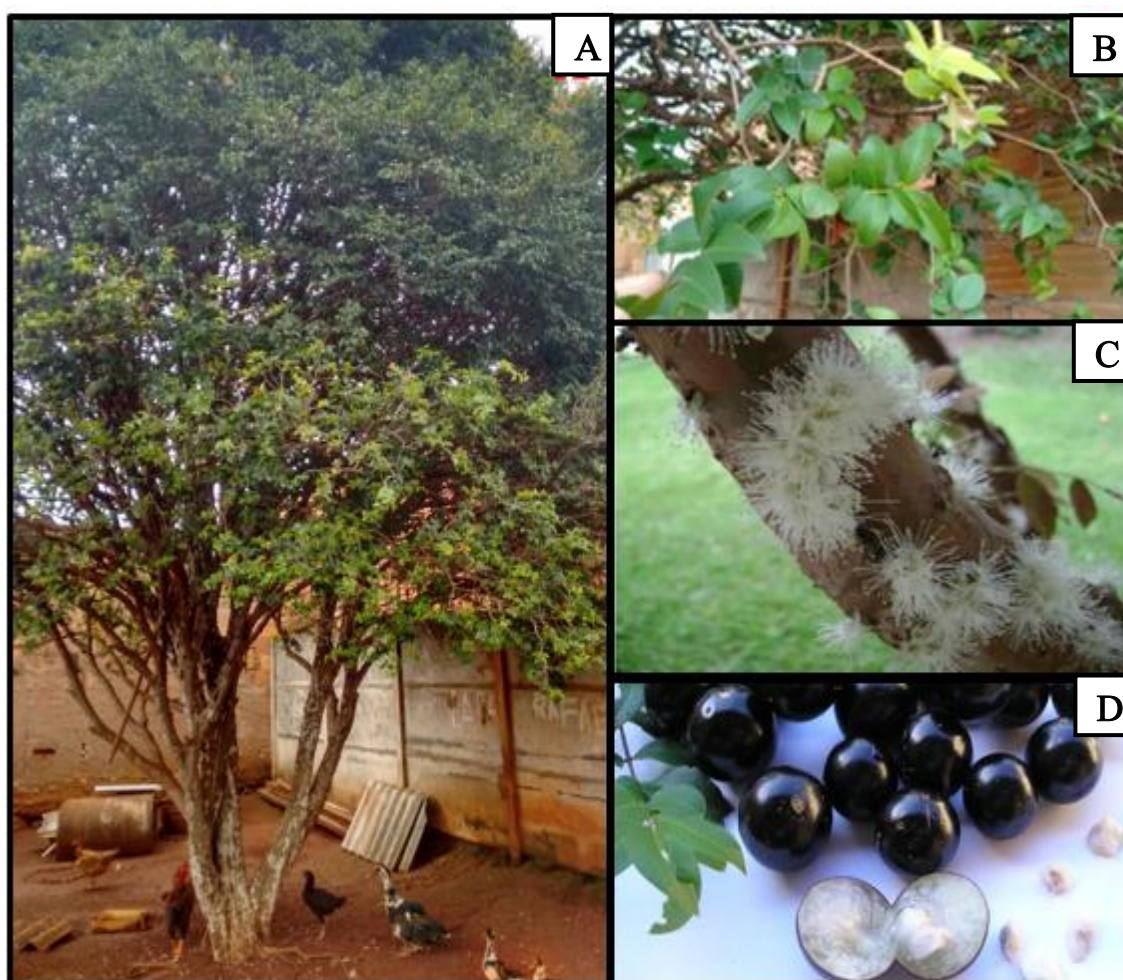
### 1.1.2 O gênero *Plinia* e a espécie *Plinia cauliflora* (Jaboticabeira)

O gênero inicialmente chamado de *Myrciaria* por Berg em 1857 foi alterado para o gênero *Plinia* pela proposta de Sobral em 1985 (Sobral, 1985). *Plinia* é um gênero pertencente família Myrtaceae, com cerca de 20 espécies que vão desde a América Central até o Brasil. *Myrciaria cauliflora* (Mart.) O. Berg, *Myrtus cauliflora* Mart., *Myrciaria cauliflora* (DC.) Berg, *Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg, *Eugenia cauliflora*



DC e *Myrciaria jaboticaba* Berg, *Myrciaria tenella* Berg e *Myrciaria trunciflora* Berg, são nomes científicos atribuídos as jaboticabeiras em geral, mas alguns correspondem a diferentes espécies e não a sinonímias de *Plinia cauliflora* (Apel et al., 2006).

A espécie *Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel (Figura 2), conhecida popularmente como jaboticabeira, com origem desconhecida, é uma Myrtaceae pertencente ao gênero *Plinia* e nativa da Mata Atlântica. São conhecidas nove espécies de jaboticabeira aqui descritas: jaboticaba de cabinho (*P. trunciflora* O. Berg), jaboticaba paulista ou jaboticaba-açu (*P. cauliflora* (DC) Berg), jaboticaba Sabará (*P. jaboticaba* (Vell.) Berg), e esta última é a espécie mais comercializada no Brasil (Mattos, 1983).



**Figura 2:** *Plinia cauliflora*. (A) árvore adulta; (B) folhas; (C) flores; (D) frutos. Fonte: (A) e (B) arquivo pessoal, (C) Danner, 2009, (D) Temporada, 2012.

Morfológicamente, a espécie *Plinia cauliflora* é uma árvore de altura entre 10-15 m, com tronco liso de 30-40 cm de diâmetro, cuja casca descama anualmente. As folhas são simples, de 6-7 cm de comprimento por 2-3 cm de largura e as flores e frutos

são afixados ao caule, característica pela qual se atribui seu nome. Ocorre, preferencialmente, em planícies aluviais e matas abertas do litoral e nas submatas do planalto, situadas em baixadas e beira de rios, sendo encontrada nas formações florestais do complexo atlântico e das florestas estacionais sem decíduais do Brasil, Argentina e Paraguai (Lorenzi, 2002; Moreira, 2010).

Além do interesse pelo consumo dos frutos, existe o interesse da indústria farmacêutica e alimentícia, essa fruteira contém óleos essenciais nas folhas (Apel et al., 2006) e antocianinas na casca dos frutos (Teixeira et al., 2008). Lima et al. (2008) caracterizaram duas variedades de jabuticaba no que diz respeito à composição centesimal, sólidos solúveis, acidez titulável total e pH, do fruto inteiro e de suas respectivas frações, e relataram a presença de diversos compostos bioativos e nutricionais, como saponinas, ácido oxálico, inibidor de tripsina, polifenóis e lectinas. Em relação aos óleos essenciais, poucos estudos têm sido relatados na literatura, no entanto, recentemente, o interesse e as pesquisas em torno de óleos essenciais e suas propriedades, para esta espécie, têm crescido bastante.

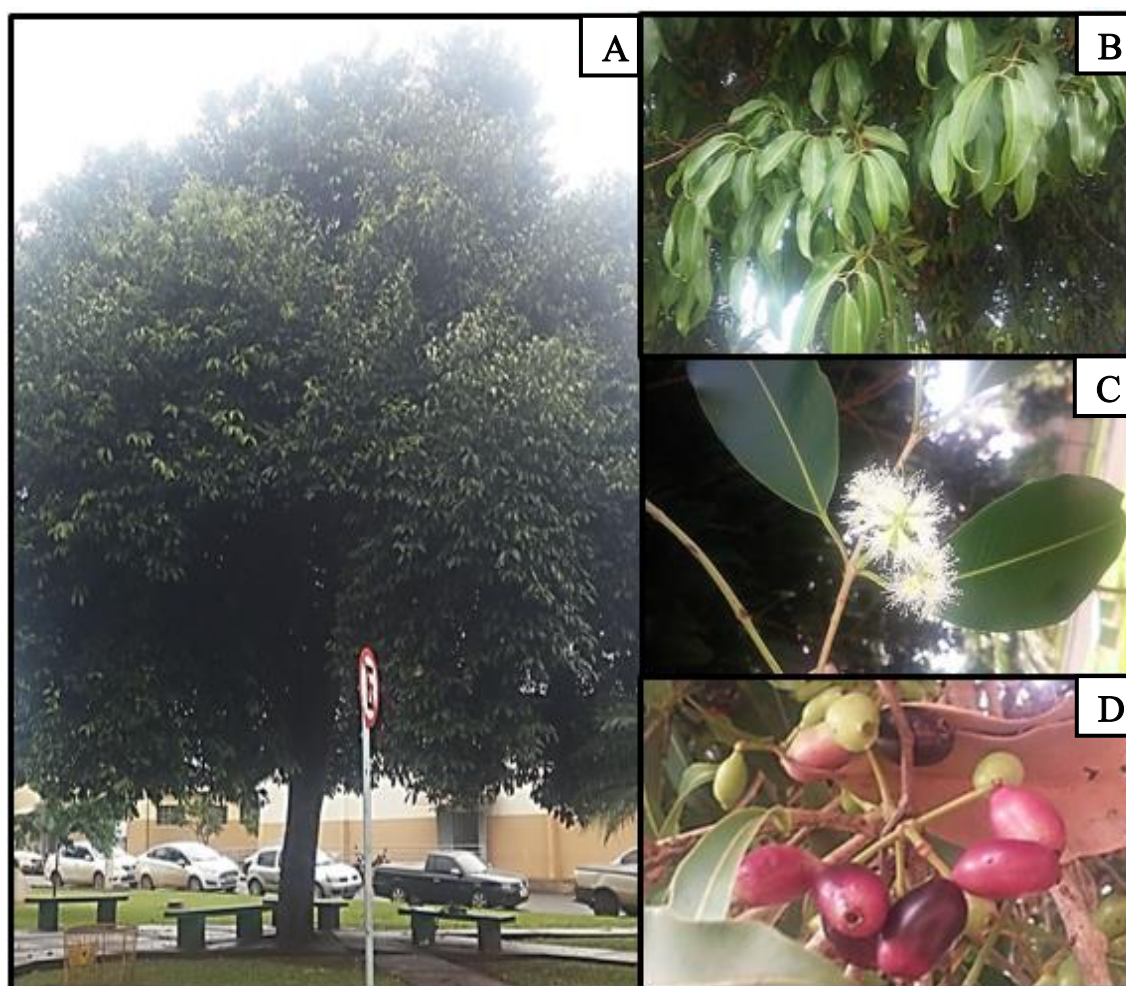
Lago et al. (2011) avaliaram a composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial obtido de folhas de *Plinia trunciflora* (O. Berg). A análise por CG-EM, bem como a determinação dos índices Kovats, determinaram os compostos,  $\alpha$ -cadinol (19,15%), apiol (11,15%) e cubenol (5,43 %) como componentes principais do óleo essencial. Quanto a atividade antimicrobiana, o óleo essencial de *P. trunciflora* foi testado contra bactérias e leveduras e foi ativo no sentido de duas bactérias Gram-positivas, *Streptococcus equi* e *Staphylococcus epiderme*. Além disso, a atividade biológica do óleo essencial foi detectada sobre leveduras patogênicas do gênero *Cândida* e *Cryptococcus*.

### **1.1.3 O gênero *Syzygium* e a espécie *Syzygium cumini* (Jambolera)**

O gênero *Syzygium* (família Myrtaceae) compreende cerca de 500 espécies, distribuídas principalmente em regiões de trópicos do mundo. Estudos sobre a composição química desse gênero, demonstraram a presença de triterpenos, taninos hidrolisáveis, antocianinas, flavonoides, derivados de cromona, fenilpropanoides, e derivados floroglucínóis (Tian et al., 2011).

*Syzygium cumini* (L.) Skeels, também conhecida como *Syzygium jambolanum* e *Eugenia cumini* (Figura 3), é uma planta medicinal importante em vários sistemas

tradicionais da medicina. Os frutos maduros são utilizados em bebidas, conservas, polpas, geleias e vinhos. Em associação à sua utilização alimentar, todas as partes da árvore como, folhas, frutos, e mais importante, as sementes, são usadas para tratar uma série de doenças como, o diabetes *mellitus*, inflamações, úlceras e diarreia (Sagrawat et al., 2006; Swami et al., 2012). Também, estudos pré-clínicos demonstraram que esta espécie, possui propriedades quimiopreventivas, radioprotetoras e propriedades antineoplásicas (Goyal et al., 2010; Arun et al., 2010). Diferentes partes da planta jamboleira (folhas, cascas, frutos, sementes e raízes) também foram relatados por suas propriedades antioxidantes, anti-inflamatórias, antimicrobianas, antifúngicas, antibacterianas, anti-HIV, dentre outras, sendo encontrados diversos compostos como, antocianinas, glicosídeo, ácido elágico, isoquercetina, canferol e miricetina (Swami et al., 2012).



**Figura 3:** *Syzygium cumini*. (A) árvore adulta; (B) folhas; (C) flores; (D) frutos. Fonte: arquivo pessoal.

Essa espécie conhecida popularmente como jambolão, jambo, jamelão, dentre outros se destaca por seu potencial antioxidante, apresentando, aproximadamente, 79 mg

de antocianina por 100g de fruto (Brito et al., 2007). Também possui importantes propriedades biológicas, como hipolipemiante e hipoglicemiantes (Baliga et al., 2011). O extrato de polifenóis obtido de folhas do jambolão pode ser utilizado no tratamento de *Diabetes mellitus* tipo 2 (De Bona et al., 2011; Constancio, 2015).

Estudos em torno das propriedades biológicas desta espécie, também têm crescido constantemente. Dias et al. (2013) avaliaram a composição química e o potencial biológico do óleo essencial das folhas de *S. cumini* coletadas no Brasil. Onze compostos foram identificados, com os componentes principais sendo,  $\alpha$ -pineno (31,85%), (Z)- $\beta$ -ocimeno (28,98%) e (E)- $\beta$ -ocimeno (11,71%). Foi avaliado o efeito moluscicida do óleo, contra *Biomphalaria glabrata* e o  $CI_{50}$  obtido foi de 90 mg.L<sup>-1</sup>. O óleo essencial também mostrou uma atividade significativa contra *Leishmania amazonensis*, com valor de  $CI_{50}$  de igual 60 mg.L<sup>-1</sup> e também contra *Artemia salina* com  $CI_{50}$  de 175 mg.L<sup>-1</sup>.

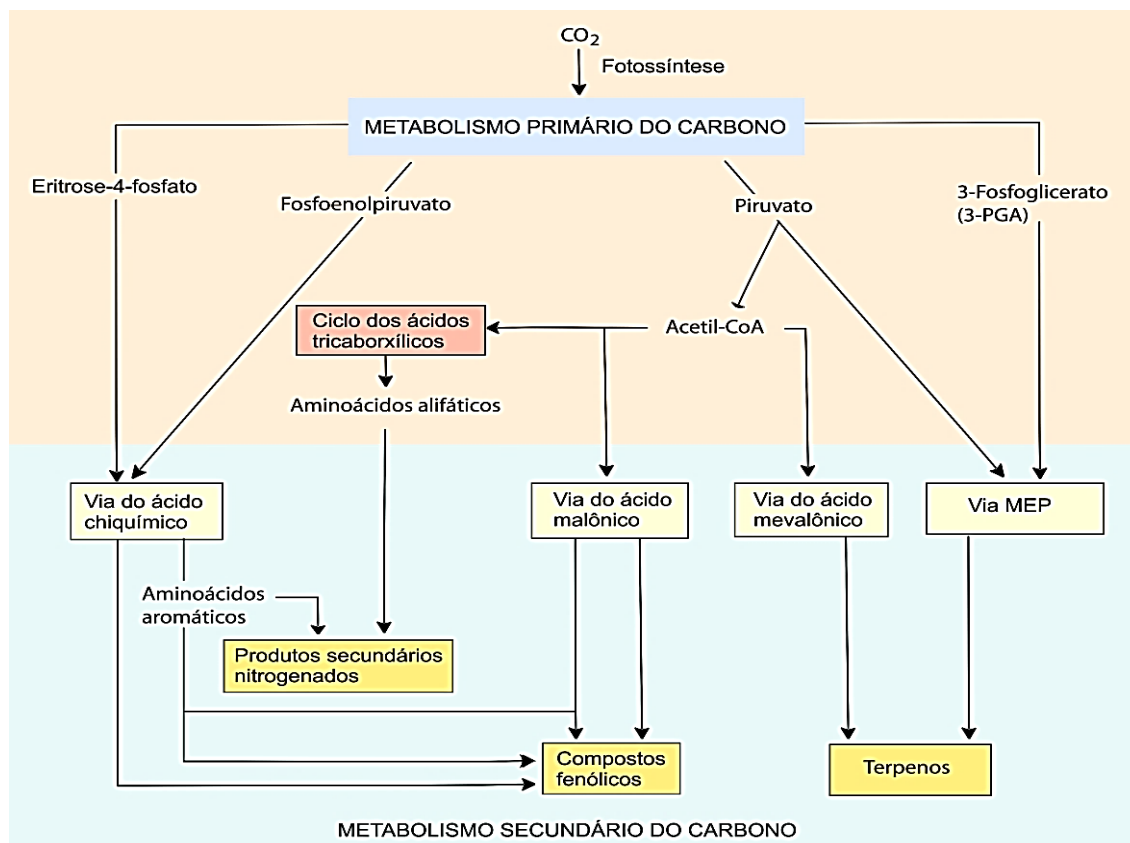
A atividade antifúngica de *S. cumini* foi avaliada por Saroj et al. (2015), sobre dois tipos de fungos fitopatogênicos, *Rhizoctonia solani* e *Choanephora cucurbitarum*. Os compostos químicos presentes no óleo essencial desta espécie, 7-hidroxicalameneno, 7-acetoxicalameneno, 1-epi-cubenol,  $\alpha$ -terpineol mostraram a inibição de 95, 80, 76, e 82%, respectivamente, contra *R. solani* enquanto 95, 70, 92, e 100% contra *C. cucurbitarum*. Os resultados sugerem que o óleo essencial de *S. cumini* tem potencial de ser utilizado como agente antifúngico no controle de doenças fúngicas em plantas.

## 1.2 Óleos essenciais e suas propriedades

Os produtos do metabolismo secundário vegetal podem ser divididos em três grandes grupos segundo a sua biossíntese: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (Figura 4). Os terpenos produzidos pelo metabolismo secundário podem ser sintetizados por via do ácido mevalônico e via do metileritritol fosfato (MEP). Os compostos fenólicos conhecidos podem ser sintetizados pela via do ácido chiquímico ou pela via do ácido malônico. Os produtos nitrogenados são sintetizados através da via do ácido chiquímico ou a partir do ciclo dos ácidos tricabórxicos (Taiz e Zeiger, 2013).

As plantas medicinais produzem uma variedade de metabólitos secundários, como os óleos essenciais (Martins et al., 2010), que são utilizados como antibacterianos, analgésicos, antioxidantes, inseticidas, antiviral, na composição de diversos medicamentos (Pelissari et al., 2010).



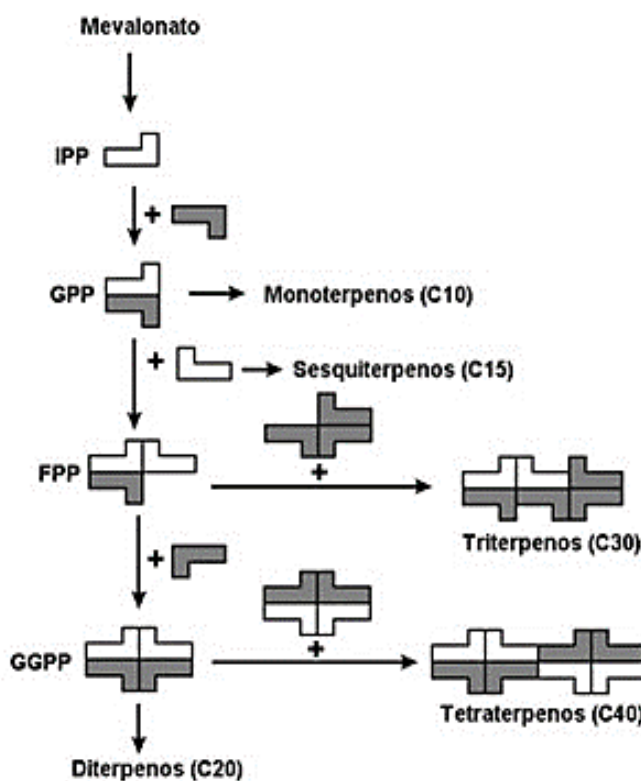


**Figura 4:** Biossíntese simplificada de produtos do metabolismo secundário vegetal. Fonte: Taiz e Zeiger (2013).

Os óleos essenciais são constituídos de uma grande variedade de substâncias, como hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, ácidos orgânicos, cumarinas e até compostos com enxofre (Simões et al., 2010). No entanto, os constituintes principais são os terpenoides voláteis, que são produzidos pelo metabolismo secundário de plantas aromáticas, derivados da molécula precursora de cinco carbonos, o isopentenil difosfato (IPP) e classificados de acordo com número de unidades isoprênicas, em monoterpenos com 10 carbonos, sesquiterpenos com 15 carbonos, diterpenos com 20 carbonos, triterpenos com 30 carbonos e tetraterpenos com 40 carbonos (Figura 5) (Santana, 2013; Busato et al., 2014).

Os terpenos representam a maior classe de compostos presentes nos óleos essenciais, sendo voláteis e contribuindo significativamente para a fragrância das plantas que os produzem (Lima et al., 2003). Além de serem responsáveis pela fragrância de óleos essenciais, os compostos terpênicos, podem apresentar atividade inseticida, fungicida, bactericida, antimicrobiana, antiviral, antioxidante, entre outras, principalmente, por agirem interrompendo sínteses fundamentais de metabólitos presentes nos micro-organismos (Azevedo et al., 2014; Souza et al., 2015). Os compostos terpênicos mais

frequentes nos óleos são os monoterpenos (cerca de 90%) e os sesquiterpenos, podendo encontrar os diterpenos quando extraídos com solventes orgânicos (Simões et al., 2010). Entretanto, essas substâncias têm sua produção, concentração e composição influenciadas por fatores ambientais e fisiológicos, que representa um dos principais obstáculos para a indústria (Zaroni et al., 2004). Assim, faz-se necessário o estudo da composição química dos óleos essenciais de acordo com a época de coleta do material vegetal.

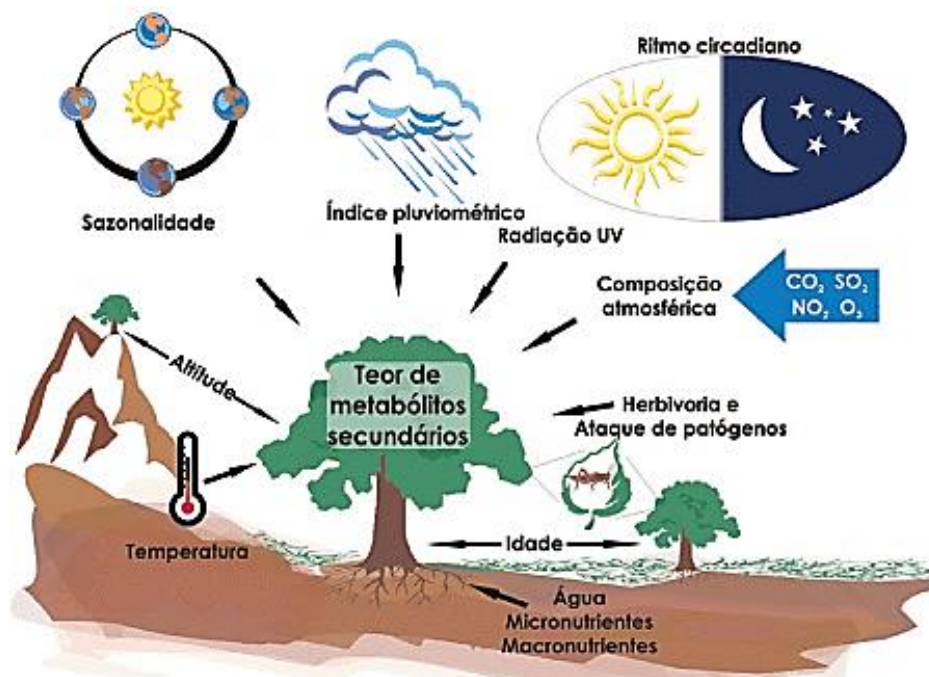


**Figura 5:** Esquema simplificado da biossíntese de terpenos. Fonte: Peres, 2015.

A composição química dos óleos essenciais é determinada por fatores genéticos, porém, outros fatores podem acarretar alterações significativas na produção dos metabólitos secundários. Os metabólitos secundários representam uma interface química entre as plantas e o meio ambiente. Os estímulos decorrentes do ambiente, em que a planta se encontra, podem redirecionar a rota metabólica, ocasionando a biossíntese de diferentes compostos (Morais, 2009). Na dinâmica de crescimento, desenvolvimento e estádios fenológicos das espécies vegetais, há alterações bioquímicas e fisiológicas capazes de modificar a elaboração de substâncias biologicamente ativas, nos aspectos qualitativos e quantitativos, influenciando diretamente, no teor e na qualidade dos metabólitos secundários (Taiz e Zeiger, 2013).

Bajalan e Pirbalouti (2014), analisaram a atividade antibacteriana do óleo essencial extraído das folhas de *Myrtus communis* L., pertencente à família Myrtaceae, coletadas em diferentes regiões, sobre quatro diferentes tipos de bactérias, pelo método de difusão de disco. Os resultados demonstraram que houve variação na atividade antibacteriana de acordo com a região de coleta do material vegetal para a produção do óleo essencial. Esses resultados corroboram com a ideia que a composição química dos óleos essenciais é modificada por diversos fatores ambientais, modificando assim a sua atividade.

O local e a época de coleta dos produtos naturais são fatores de grande importância, que devem ser levados em consideração para a coleta de uma planta, uma vez que sua composição e quantidade não são constantes no decorrer do ano. Assim, a composição química pode ser influenciada por características genótípicas e fenológicas (Figura 6) como, sazonalidade, composição atmosférica, índice pluviométrico, temperatura, ritmo circadiano, época de coleta, tipo de solo, altitude, entre outros (Gobbo-Neto e Lopes, 2007; Silva, 2013).



**Figura 6:** Principais fatores que podem influenciar a produção de metabólitos secundários em plantas. Fonte: Gobbo-Neto e Lopes (2007).

Segundo Perini (2011) e Paulus et al. (2013) ao longo do dia ocorrem oscilações de temperatura e umidade, podendo alterar a composição química e quantidade do óleo essencial. Sendo assim, o conhecimento do horário ideal de coleta do material vegetal,

visando obter maiores teores do princípio ativo desejado, é de extrema importância para os tratos e manejos de cultivo destas plantas, reafirmando a importância do ambiente em resposta ao metabolismo secundário da planta.

Quanto as propriedades, os óleos essenciais têm demonstrado importante potencial como agentes biológicos naturais, no combate de diversas doenças causadas por micro-organismos, patogênicos e fitopatogênicos (Hamini-Kadar et al., 2014; Souza et al., 2015). Com variada composição química, os óleos essenciais atuam contra bactérias, fungos e protozoários de forma natural, com menor toxicidade e maior eficácia (Mouna e Segni, 2014).

Estudos sobre a ação antibacteriana de óleos essenciais têm sido relatados na literatura. Souza et al. (2015) avaliaram a ação antibacteriana do óleo essencial de *Eugenia calycina* (Myrtaceae) contra bactérias orais, sendo observada forte atividade contra as bactérias anaeróbias *Prevotella nigrescens* e *Porphyromonas gingivalis*, e Concentração Inibitória Mínima (CIM) entre 50 e 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para a maioria dos micro-organismos orais testados. Melo et al. (2015) relatam a ação antibacteriana promissora do óleo essencial de *Tetradenia riparia* (Lamiaceae) contra as bactérias orais, *Streptococcus mitis* (CIM 31,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), *S. mutans* (CIM 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), *S. sobrinus* (CIM 31,2  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), e *Lactobacillus casei* (CIM 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

Propriedades antifúngicas e antiparasitárias de óleos essenciais também são demonstradas em vários estudos na literatura. Ma et al. (2015) avaliaram a atividade antifúngica do óleo essencial de *Anethum graveolens* L. (Apiaceae) sobre o fungo fitopatogênico *Sclerotinia sclerotiorum*. Foi observada boa atividade com inibição de 100% do crescimento micelial do fungo.

Azeredo et al. (2014) avaliaram os óleos essenciais das espécies Myrtaceae, *Eucalyptus globulus* e *Eugenia uniflora* quanto a ação antiparasitária contra o protozoário *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas, obtendo resultados de inibição satisfatórios, da ordem de  $\text{CI}_{50}$  70  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para *E. uniflora* e 5,05  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para *E. globulus*. Rodrigues et al. (2015) avaliaram os efeitos do óleo de *S. cumini* e do seu principal componente,  $\alpha$ -pineno contra o protozoário *Leishmania amazonensis*, causador da leishmaniose. O  $\alpha$ -pineno foi eficaz contra *L. amazonensis* com  $\text{CI}_{50}$  de 19,7  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , já o óleo essencial apresentou  $\text{CI}_{50}$  de 43,9  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ .

Assim, pode-se observar que os óleos essenciais têm demonstram promissoras atividades biológicas como agentes bactericidas, fungicidas e parasiticidas e podem ser

importantes tanto no combate doenças causadas por bactérias e fungos, quanto no controle de doenças tropicais negligenciadas como a leishmaniose e a doença de chagas.

### **1.2.1. Mecanismos de ação de óleos essenciais contra micro-organismos patogênicos e fitopatogênicos**

O potencial antimicrobiano de óleos essenciais sobre micro-organismos patogênicos e fitopatogênicos tem sido comprovado por diversos estudos e os óleos essenciais têm representado uma fonte promissora de novas drogas naturais, sendo importante o conhecimento dos mecanismos de ação que eles apresentam sobre os micro-organismos para facilitar a decisão do modo de aplicação em possíveis fármacos (Ma et al., 2015; Azevedo et al., 2014).

Tariku et al. (2011) associam a atividade parasitária dos óleos essenciais de *Artemisia absinthium* e *Echinops kebericho* contra protozoários do gênero *Leishmania*, a compostos terpênicos voláteis que conseguem atravessar facilmente as paredes celulares e as membranas citoplasmáticas dos protozoários, perturbando as camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolipídios, aumentando a permeabilidade e levando à lise celular.

Em relação a atividade bacteriostática ou bactericida dos óleos essenciais, de acordo com Probst (2012) e Stefanakis et al. (2013) compostos terpenoides, como  $\beta$ -cariofileno, germacreno D,  $\alpha$ -humulene, dentre outros, atuam de forma sinérgica, imitando substâncias usadas pela célula bacteriana (metabólitos) e se ligam a enzimas, inibindo-as, ou interferem com a integridade e funcionamento da membrana celular, através da mudança de potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória.

Já a ação fungicida de óleos essenciais é associada por Ma et al. (2015) a compostos terpenoides que podem agir inibindo a biossíntese do Ergosterol, um esterol presente na membrana celular dos fungos, por alguns terpenos possuírem estruturas parecidas com compostos intermediários e com o próprio Ergosterol, causando a inibição da enzima Citocromo P450 14  $\alpha$ - desmetilase que atua nesta síntese.

### 1.3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alves, E., 2012. *Diversidade arbórea e potencial de produção de óleo essencial de Eugenia uniflora L. e Myrcia multiflora (Lam.) Dc. No município de Turvo-PR*. 70p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Guarapuava.
- Amorim, A. C. L., Lima, C. K. F., Howell, A. M. C., Miranda, A. L. P., Rezende, C. M., 2009. Avaliação antinociceptivo e hipotérmica do óleo essencial das folhas e terpenóides isoladas de *Eugenia uniflora* L. (Pitanga brasileira). *Phytomed.* 16, 923-928.
- Apel, M. A., Sobral, M., Zuanazzi, J. A., Henriques, A. T., 2006. Essential oil composition of four *Plinia* species (Myrtaceae). *Flavour and Fragrance Journal.* 21, 565-567.
- Arun, R., Prakash, M., Abraham, S., 2010. Role of *Syzygium Cumini* Seed Extract in the Chemoprevention of *in Vivo* Genomic Damage and Oxidative Stress. *Journal of Ethnopharmacology.* 134, 329-333.
- Azeredo, C. M., Santos, T. G., Maia, B. H. L. de N., Soares, M. J., 2014. In vitro biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. *BMC Complementary and Alternative Medicine.* 309, 1472-6882.
- Azevedo, A. N., Buarque, P. R., Cruz, E. M. O., Blank, A. F., Alves, P. B., Nunes, M. L., Santana, L. C. L. A., 2014. Response surface methodology for optimisation of edible chitosan coating formulations incorporating essential oil against several foodborne pathogenic bacteria. *Food Control.* 43, 01-09.
- Bajalan, I., Pirbalouti, A. G., 2014. Variation in antibacterial activity and chemical compositions of essential oil from different populations of Myrtle. *Industrial Crops and Products.* 61, 303–307.
- Baliga, M. S., Bhat, H. P., Baliga, B. R. V., Wilson, R., Palatty, P. L., 2011. Phytochemistry, traditional uses and pharmacology of *Eugenia jambolana* Lam. (black plum): A review. *Food Research International.* 44, 1776–1789.
- Brito, E., Araújo, M. C. P., Alves, R. E., Carkeet, C., Clevidence, B. A., Novotny, J. A., 2007. Anthocyanins presente in selected tropical fruits: acerola, jambolão, jussara and guajiru. *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* 23, 9389-9394.
- Busato, N. V., Silveira, J. C., Costa, A. O. S., Costa Junior, E. F., 2014. Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. *Ciência Rural.* 44, 1574-1582.
- Constancio, V. S., 2015. *Efeito da jabuticaba (Myrciaria cauliflora), do fruto de palmeira juçara (Euterpe edulis Martius) e do jambolão (Syzygium cumini) sobre o perfil lipídico, a glicemia e a endotoxemia em camundongos submetidos a dieta de cafeteria*. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal do Espírito Santo, Alegre, Espírito Santo, 82p.

Costa, D. P., Alves Filho, E. G., Silva, L. M. A.; Santos, S. C., Passos, X. S., Silva, M. R. R., Seraphinc, J. C., Ferri, P. H., 2010. Influence of fruit biotypes on the chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Eugenia uniflora* Leaves. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 21, 851-858.

Danner, M. A., 2009. *Diagnóstico ecogeográfico e caracterização morfogenética de jabuticabeiras*. Pato Branco, UTFPR, 130p.

De Bona, K. S., Bellé, L. P, Bittencourt, P. E., Bonfanti, G., Cargnelluti, L. O., Pimentel, V. C., Ruviano, A. R., Schetinger, M. R., Emanuelli, T., Moretto, M. B., 2011. Erythrocytic enzymes and antioxidant status in people with type 2 diabetes: Beneficial effect of *Syzygium cumini* leaf extract in vitro. *Diabetes Research and Clinical Practice*. 94, 84-90.

Dias, C. N., Rodrigues, K. A. F., Carvalho, F. A. A., Carneiro, S. M. P., Maia, J. G. S., Andrade, E. H. A., Moraes, D. F. C., 2013. Molluscicidal and Leishmanicidal Activity of the Leaf Essential Oil of *Syzygium cumini* (L.) Skeels from Brazil. *Chemistry & Biodiversity*. 10, 1133-1141.

Franzon, R. C., Campos, L. Z. O., Proença, C. E. B., Silva, J. C. S., 2009. *Araçás do Gênero Psidium: principais espécies, ocorrência, descrição e usos*. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados, 48p.

Gobbo-Neto, L. Lopes, N. P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química nova*. 30, 374-381.

Goyal, P. K., Verma, P., Sharma, P., 2010. Evaluation of Anti-Cancer and Anti-Oxidative Potential of *Syzygium cumini* against Benzo[a]pyrene (BaP) Induced Gastric Carcinogenesis in Mice. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention*. 11, 753-758.

Hamini-Kadar, N., Hamdane, F., Boutoutaou, R., Kihal, M., Henni, J. E., 2014. Antifungal activity of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil against phytopathogenic fungi of tomato (*Aolanum lycopersicum*) in Algeria. *JEBAS (Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences)*. 2, 447-454.

Ishikawa, T.; Kato, E. T. M.; Yoshia, M., Kaneko, T. M., 2008. Morphoanatomic aspects and phytochemical screening of *Plinia edulis* (Vell.) Sobral (Myrtaceae). *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*. 44, 515-520.

Keszei A., Brubaker C. L., Foley W. J., 2008. A molecular perspective on terpene variation in Australian Myrtaceae. *Aust J Bot*. 56, 197-213.

Lago, J. H. G., Souza, E. D., Mariane, B., Pascon, R., Vallim, M. A., Martins, R. C., Baroli, A. A., Carvalho, B. A., Soares, M. G., Santos, R. T., Sartorelli, P., 2011. Chemical and biological evaluation of essential oils from two species of Myrtaceae - *Eugenia uniflora* L. and *Plinia trunciflora* (O. Berg) Kausel. *Molecules*. 16, 9827-9837.

Lima, H. R. P., Kaplan, M. A. C., Cruz, A. V. M., 2003. Influência dos fatores abióticos na produção e variabilidade de terpenóides em plantas. *Floresta e Ambiente*. 10, 71-77.

- Lima, A. J. B., Corrêa, A. D., Alves, A. P. C., Abreu, C. M. P., Barros, A. M. D., 2008. Caracterização química do fruto jabuticaba (*Myrciaria cauliflora* Berg) e de suas frações. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion.* 58, 416-421.
- Lorenzi, H., 2002. *Árvores Brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas do Brasil.* 4ª ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum.
- Ma, B., Ban, X., Huang, B., He, J., Tian, J., Zeng, H., Chen, Y., Wang, Y., 2015. Interference and Mechanism of Dill Seed Essential Oil and Contribution of Carvone and Limonene in Preventing Sclerotinia Rot of Rapeseed. *Plos ONE.* 10, 01-15.
- Martins, A. G. L. A., Nascimento, A. R., Mouchrek Filho, J. E., Mendes Filho, N. E., Souza, A. G., Aragão, N. E., Silva, D. S. V., 2010. Atividade antibacteriana do óleo essencial do manjeriço frente a sorogrupos de *Escherichia coli* enteropatogênica isolados de alfaces. *Ciência Rural.* 40, 1791-1796.
- Mattos, J. L. R., 1983. *Frutíferas nativas do Brasil.* São Paulo: Nobel.
- May, A., Moraes, A. R. A., Pinheiro, M. Q., 2007. Teor de Óleo Essencial de Pitanga em Função de Tratamentos Pós-colheita. *Revista Caatinga.* 3, 186 - 190.
- Melo, N. I., Carvalho, C. E., Fracarolli, L., Cunha, W. R., Veneziani, R. C. S., Martins, C. H. G., Crotti, A. E. M., 2015. Antimicrobial activity of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd. (Lamiaceae) against cariogenic bacteria. *Brazilian Journal of Microbiology.* 46, 519-525.
- Morais, L. A. S., 2009. Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais. *Horticultura Brasileira.* 27, 4050-4063.
- Morais, L. M., Conceição, G. M., Nascimento, J. M., 2014. Família Myrtaceae: Análise Morfológica e Distribuição Geográfica de uma Coleção Botânica. *Agrarian Academy.* 1, 317-346.
- Moreira, T. M. S., 2010. *Estudo da composição química, citotoxicidade e alvos da atividade antifúngica de Melaleuca alternifolia Cheel (Myrtaceae) e de Plinia Cauliflora (Mart.) Kausel (Myrtaceae).* Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – UNESP, Araraquara.
- Mouna, M., Segni, L., 2014. Biological Activity of Essential Oil of *Eucalyptus Camendulensis* on Some Fungi and Bacteria. *Journal of Engineering Research and Applications.* 4, 71-73.
- Ogunwande, I. A., Olawore, N. O., Ekundayo, O., Walker, T. M., Schmidt, J. M., Setzer, W. N., 2005. Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L. *The International Journal of Aromatherapy.* 15, 147–152.
- Padovan, A., Keszei, A., Kulheim, C., Foley, W. J., 2014. The evolution of foliar terpene diversity in Myrtaceae. *Phytochem Rev.* 13, 695–716.



Paulus, D., Valmorbidia, R., Toffoli, E., Nava, G. A., 2013. Teor e composição química de óleo essencial de cidró em função da sazonalidade e horário de colheita. *Horticultura brasileira*. 31, 203-209.

Pelissari, G. P., Pietro, R. C. L. R., Moreira, R. R. D., 2010. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Melampodium divaricatum* (Rich.) DC., Asteraceae. *Brazilian J. of Pharmacognosy*. 20, 70-74.

Peres, L. E. P., 2015. *Metabolismo secundário das plantas*. Disponível em: <<http://www.oleos essenciais.org/metabolismo-secundario-das-plantas/>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2017.

Perini, V. B. M., 2011. *Análise do óleo essencial, produção de biomassa e Fungitoxicidade do capim citronela (Cymbopogon nardus)*. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal). Universidade Federal do Tocantins, Gurupi, 100 p.

Probst, I. S., 2012. *Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico*. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – UNESP, Botucatu.

Ramalho, R. R. F., 2015. *Variabilidade de compostos fenólicos e voláteis durante o amadurecimento de frutos de três variedades de Eugenia uniflora L.* Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Instituto de Química (IQ). Programa de Pós-Graduação em Química, Goiânia, 53p.

Rodrigues, K. A. F., Amorim, L. V., Dias, C. N., Moraes, D. F. C., Carneiro, S. M. P., Carvalho F. A. A., 2015. Syzygium cumini (L.) Skeels essential oil and its major constituent  $\alpha$ -pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immuno modulation in vitro. *Journal of Ethno pharmacology*. 160, 32–40.

Sagrawat, H., Mann, A., Kharya, M., 2006. Pharmacological Potential of Eugenia Jambolana: A Review. *Pharmacogenesis Magazine*. 2, 96-104.

Santana, H. C. D., 2013. *Caracterização química do óleo essencial de Baccharis reticularia DC. (Asteraceae) em função de diferentes procedências e da sazonalidade no Distrito Federal*. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Programa de Pós-Graduação em Agronomia, Universidade de Brasília, 84p.

Santos, F. R.; Braz-Filho, R.; Castro, R. N., 2015. Influência da idade das folhas de *Eugenia uniflora* L. na Composição Química do Óleo Essencial. *Quim. Nova*. 38, 762-768.

Saroj, A., Pragadheesh, V. S., Palanivelu, Yadav, A., Singh, S. C. Samad, A., Negi, A. S., Chantova, C. S., 2015. et al. Anti-phytopathogenic activity of *Syzygium cumini* essential oil, hydrocarbon fractions and its novel constituents. *Industrial Crops and Products*, Índia. 74, 327–335.

Silva, P. S. S., 2013. *Caracterização da Composição Química dos Óleos Essenciais de Lychnophora pinaster Mart. em Função da Sazonalidade*. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – UNESP, Botucatu.

Simões, C. M. O., Schenkel, E. P., Gosmann, G., Mello, J. C. P., Mentz, L. A., Petrovick, P. R. (Orgs.), 2010. *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 6.ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS: Florianópolis: Editora da UFSC, 1104p.

Sobral, M., 1985. *Alterações nomeclaturais em Plinia (Myrtaceae)*. Boletim do Museu Botânico de Curitiba. 63, 01-04.

Souza, E.R.N., TEBALDI, V.M.R., PICCOLI, R.H., 2015. Adaptação e adaptação cruzada de *Listeria monocytogenes* aos compostos eugenol e carvacrol. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas.17, 528-533

Stefanakis, M. K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D.; Katerinopoulos, H. E., Makridis, P., 2013. Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food Control*. 34, 539-546.

Swami, S. B., Thakor, N. S. J., Patil, M. M., Haldankar, P. M., 2012. Jamun (*Syzygium cumini* (L.)): A Review of Its Food and Medicinal Uses. *Food and Nutrition Sciences*. 3, 1100-1117.

Taiz, L., Zeiger, E., 2013. *Fisiologia Vegetal*. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 848p.

Tariku, Y., Hymete, A., Hailu, A., Rohloff, J., 2011. In vitro Evaluation of Antileishmanial Activity and Toxicity of Essential Oils of *Artemisia absinthium* and *Echinops kebericho*. *Chemistry & Biodiversity*. 8, 614-623.

Teixeira, L. N., Stringheta, P. C., Oliveira, F. A., 2008. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Revista Ceres*. 55, 297-304.

Temporada das jabuticabas., 2012. Aldeia Acabamento e Complementos, Goiânia. Disponível em:< <http://aldeiatem.com/post/8570/temporada-das-jabuticabas>>. Acesso em: 20 de janeiro de 2017.

Tian, L-W., Xu, M., Wang, D., Zhu, H-T., Yang, C-R., Zhang, Y-J., 2011. Phenolic constituents from the leaves of *Syzygium forrestii* Merr. and Perry. *Biochemical Systematics and Ecology*. 39, 156–158.

Victoria, F.N., Lenardão, E. J., Savegnago, L., Perin, G., Jacob, R. G., Alves, D., Da Silva, W. P., Da Motta, A. S., Nascente, P. S., 2012. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. *Food and Chemical Toxicology*. 50, 2668–267.

Vieira, R. F., Agostini-Costa, T. S., Silva, D. B., Ferreira, F. R., Sano, S. M., 2006. *Frutas nativas da região centro-oeste do Brasil*. Embrapa, Brasília.

Zaroni, M., Pontarolo, R., Abrahão, W. S. M., Fávero, M. L. D., Correa Júnior, C., Stremel, D.P., 2004. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 14, 29-39.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivo Geral

Avaliar a composição química e as atividades biológicas contra micro-organismos patogênicos e fitopatogênicos de óleos essenciais de espécies da família Myrtaceae.

### 2.2. Objetivos Específicos

- Realizar a coleta das folhas das espécies Myrtaceae, *Eugenia uniflora*, *Plinia cauliflora* e *Syzygium cumini*;
- Extrair o óleo essencial das folhas *in natura* das espécies Myrtaceae coletadas;
- Identificar e quantificar os compostos químicos presentes nos óleos essenciais extraídos;
- Avaliar a atividade antibacteriana dos óleos essenciais sobre bactérias orais;
- Avaliar a atividade leishmanicida dos óleos essenciais sobre as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*;
- Avaliar a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* e *Syzygium cumini* contra os fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*.

## **CAPÍTULO I - Avaliação *in vitro* das atividades leishmanicida e antimicrobiana de óleos essenciais de três espécies da família Myrtaceae ocorridas no Cerrado**

(Normas de acordo com o formato da Revista Industrial Crops and Products)

### **RESUMO**

Os óleos essenciais de *Eugenia uniflora*, *Plinia cauliflora* e *Syzygium cumini*, família Myrtaceae, foram analisados em Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massas (CG-EM) para identificação dos componentes voláteis presentes e avaliados quanto a suas ações bactericida e leishmanicida *in vitro*. Foram identificados 34 compostos para o óleo essencial de *E. uniflora*, sendo os compostos majoritários encontrados o germacrona (8,52%), o espatulenol (8,20%), o  $\alpha$ -selineno (7,50%) e o (Z)- $\beta$ -elemenona (4,88%). Para o óleo essencial de *P. cauliflora* foram identificados 38 compostos, sendo os compostos majoritários encontrados o (E)-cariofileno (14,69%),  $\beta$ -bisaboleno, (E,E)- $\alpha$ -farneceno (8,07%) e o globulol (7,86%). Para o óleo essencial de *S. cumini* foram identificados 52 compostos, sendo os compostos majoritários encontrados o  $\alpha$ -pineno (21,20%), globulol (15,30%), o eugenol (11,20%) e o  $\alpha$ -terpineol (8,88%). Os óleos essenciais das três espécies apresentaram atividade antibacteriana moderada sobre bactérias orais dos gêneros *Streptococcus* e *Bacteroides*, com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 100 a 400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A ação leishmanicida dos óleos essenciais testados foi bastante promissora, sendo que a espécie *P. cauliflora* apresentou melhor resultado com Concentração Inibitória 50% (CI<sub>50</sub>) de 0,46  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , a espécie *E. uniflora* apresentou CI<sub>50</sub> de 0,99  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , e a espécie *S. cumini* obteve menor atividade com CI<sub>50</sub> de 8,78

$\mu\text{g.mL}^{-1}$ , contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Os resultados obtidos neste estudo ressaltam a variabilidade da composição química de óleos essenciais e um alto potencial de utilização dos mesmos como bactericidas e leishmanicidas naturais.

**Palavras-chave:** Myrtaceae. Óleos essenciais. Leishmanicidas naturais. Bactericidas naturais.

## CHAPTER I - In vitro evaluation of leishmanicidal and antimicrobial activities of essential oils of the Myrtaceae family occurring in the Cerrado

(Standards in accordance with the Industrial Crops and Products journal)

### ABSTRACT

The essential oils of *Eugenia uniflora*, *Plinia cauliflora* and *Syzygium cumini*, family Myrtaceae, were analyzed in Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry (GC-MS) in order to identify in order their volatile components and evaluated for their bactericidal and leishmanicidal activity in vitro. A total of 34 compounds were identified from the essential oil of *E. uniflora*. The major compounds found were germacrone (8.52%), spathulenol (8.20%),  $\alpha$ -selinene (7.50%) and (Z)- $\beta$ -elemenone (4.88%). For the essential oil of *P. cauliflora* were identified 38 compounds, being the major compounds found (E)-caryophyllene (14.69%),  $\beta$ -bisabolene, (E,E)- $\alpha$ -farnecene (8.07%) and globulol (7.86%). From the *S. cumini* essential oil were identified 52 compounds, the major compounds found were  $\alpha$ -pinene (21.20%), globulol (15.30%), eugenol (11.20%), o and  $\alpha$ -terpineol (8.88%). The essential oils of the three species presented moderate antibacterial activity against oral bacteria *Streptococcus* and *Bacteroides*, with Minimum Inhibitory Concentration (MIC) From 100 to 400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . The leishmanicide activity against of the *Leishmania amazonensis* promastigotes essential oils tested was quite promising, and the *P. cauliflora* species presented the best result with a 50% of inhibitory concentration ( $\text{IC}_{50}$ ) of 0.46  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , the *E. uniflora* species showed  $\text{IC}_{50}$  of 0.99  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , and the *S. cumini* species obtained lower activity with  $\text{IC}_{50}$  of 8.78  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . These

results obtained highlight the variability of the chemical composition of essential oils and a high potential of their bactericides and leishmanicides activity.

**Key words:** Myrtaceae. Essential oil. Natural leishmanicides. Natural bactericides.

## 1.1. INTRODUÇÃO

O Cerrado brasileiro é rico em variedade de espécies botânicas endêmicas e é considerado um dos maiores representantes do bioma Cerrado em todo o mundo (MMA, 2011; Gonçalves et al., 2016). No Cerrado brasileiro existem cerca de 211 espécies de Myrtaceae em 14 gêneros (Imatomi et al., 2013) e é a família mais citada em estudos florísticos e fitossociológicos sendo considerada uma das maiores no Brasil e de grande importância ecológica (Morais et al., 2014). Por isso, esta família apresenta grande potencial econômico, com várias espécies frutíferas utilizadas no setor alimentício. Dentre as espécies brasileiras, destacam-se as frutíferas como a goiabeira (*Psidium guajava* L.), a jaboticabeira (*Plinia cauliflora* (Mart.) Kausel), a pitangueira (*Eugenia uniflora* L.), a gabirobeira (*Campomanesia xanthocarpa* (Mart.) O. Berg), o cambucizeiro (*Campomanesia phaea* (O. Berg) Landrum), o cambucazeiro (*Plinia edulis* (Vell.) Sobral) e a jamboleira (*Syzygium cumini* (L.) Skeels) (Souza et al., 2011). Seus frutos e/ou polpas são comercializados na forma *in natura*, sucos, geleias, conservas ou doces. Ainda, algumas delas são utilizadas na medicina tradicional, como *Eucalyptus globulus* L. (eucalipto) no tratamento da gripe, congestão nasal e sinusite, e *Syzygium cumini* L. (jamboleira) empregada como antioxidante, anti-inflamatório e principalmente no tratamento de diabetes *mellitus* tipo 2 (Morais et al., 2014; Swami et al., 2012).

Uma das características mais marcantes das espécies desta família é a presença de glândulas oleíferas evidentes nas folhas, flores e frutos sob a forma de pontos translúcidos (Judd et al., 1999 apud Sobral, 2003). Os óleos essenciais são normalmente constituídos de compostos voláteis derivados de dois grupos de metabólitos secundários, os terpenos e os fenilpropanoides, que atuam na defesa vegetal contra fitopatógenos (Rodrigues et al., 2013). Estudos recentes com óleos essenciais de espécies Myrtaceae demonstram que os mesmos têm apresentado importantes propriedades, como inseticida (Kumar et al., 2012), parasiticida (Rodrigues et al., 2015), fungicida (Hamini-Kadar et al., 2014), bactericida (Sousa et al., 2015), antimicrobiana (Mouna e Segni, 2015),



antioxidante (Victoria et al., 2013), antitumoral (Carvalho et al., 2014), entre outras. Além disso, podem ser utilizados para controle de pragas por meio de aplicação direta do óleo essencial ou do princípio ativo isolado, ou servir como matéria-prima para descoberta de novos produtos sintéticos de grande importância para tratamento de doenças (Busato et al., 2014; Bajalan e Pirbalouti, 2014).

Protozoários parasitas do gênero *Leishmania*, são responsáveis por um espectro de doenças coletivamente conhecidas como leishmaniose, que afeta a pele, membranas, mucosas e órgãos internos. Casos de leishmaniose já chegam a mais de 12 milhões relatados em 88 países em todo o mundo, tendo de 1 a 2 milhões de novos casos sendo relatados anualmente (Shukla et al., 2011; Dias et al., 2013; Rodrigues et al., 2015). O aumento da incidência da leishmaniose está associada com o desenvolvimento urbano, o desmatamento, mudanças ambientais e aumento da migração para as áreas em que a doença é endêmica. Apesar da sua importância epidemiológica, o tratamento é realizado ainda com fármacos quimioterapêuticos que são administrados parenteticamente, requerendo supervisão médica e tendo muitos efeitos colaterais (Rodrigues et al., 2013).

Outro problema enfrentado atualmente é em relação as doenças causadas por bactérias orais como a cárie e a periodontite. As cáries dentais são um grave problema de saúde oral presente na maioria dos países industrializados, afetando 60-90% das crianças em idade escolar e a maioria dos adultos. Alguns estudos recentes sugerem que as bactérias orais também podem estar associadas a doenças sistêmicas, tais como pneumonia e doença cardiovascular (Kumar, 2013). A clorexidina é um dos agentes antimicrobianos mais amplamente utilizados contra bactérias bucais, embora estudos têm relatado que ela se mostrou ineficaz contra a cárie dentária em ensaios clínicos, e tem sido apontada como potencial causa da seleção e persistência de bactérias com baixo nível de resistência a antibióticos. A resistência de patógenos às drogas é um dos maiores problemas no tratamento de doenças microbianas (Kumar, 2013; Sousa et al., 2015).

Diante dos problemas anteriormente descritos de doenças causadas por parasitas do gênero *Leishmania* e bactérias orais, os óleos essenciais têm sido estudados como possíveis agentes ativos. Isso acontece pela complexidade da composição química que alguns óleos essenciais demonstram, apresentando menor toxicidade e menores riscos de aparecimento de resistência dos micro-organismos (Azevedo et al., 2014). Desta forma, o objetivo deste trabalho foi avaliar as atividades leishmanicida e antimicrobiana dos óleos essenciais de três espécies da família Myrtaceae ocorridas do Cerrado brasileiro.

## 1.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 1.2.1. Material vegetal

As espécies *Eugenia uniflora* e *Plinia cauliflora* foram coletadas no município de Santa Helena de Goiás, localizado no sudoeste do Estado de Goiás (latitudes 17°48'35.9", 17°48'32.8" e longitudes 50°365'26.2", 50°35'04.6", respectivamente, com altitude média de 570 m ao nível do mar). A espécie *Syzygium cumini* foi coletada no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde (latitude 17°48'28", longitude 50°53'57). As espécies foram identificadas no Herbário Jataiense Germano Guarim Neto, e depositadas como exsicata sob os números de identificação 7441 (*Plinia cauliflora*), 7442 (*Eugenia uniflora*) e 7443 (*Syzygium cumini*). As folhas de cada espécie foram coletadas entre os meses de setembro/2015 a março/2016 às 18 horas do dia anterior às extrações em pontos aleatórios da copa da planta. Após a coleta, as folhas foram transportadas para o Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, foram trituradas e procedeu-se a extração dos óleos essenciais.

### 1.2.2. Extração dos óleos essenciais

Para a extração dos óleos essenciais, utilizou-se o processo de hidrodestilação, em que 100 g de amostra de cada espécie foram submetidas ao processo de hidrodestilação utilizando aparelho do tipo Clevenger por 3 horas (Craveiro et al., 1981). Nesta extração, o material vegetal foi imerso em água destilada sob aquecimento até à fervura, resultando na formação de componentes voláteis, os quais, após condensação, foram separados da fase aquosa por decantação. O óleo essencial foi extraído da fase aquosa utilizando uma partição líquido-líquido em funil de separação, por três sucessivas extrações de 15 minutos com 10 mL de diclorometano P.A. (100%) (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil). Sulfato de sódio anidro P.A. (100%) (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) foi adicionado na mistura para separar o resíduo de água e posteriormente removido por filtração. A evaporação do diclorometano foi realizada a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) até que o óleo essencial apresentasse massa constante e por fim foram armazenados a 4°C até a realização das análises.

### 1.2.3. Rendimento dos óleos essenciais

O rendimento (teor percentual) dos óleos essenciais, foi determinado de acordo com a Equação 1.

$$\text{Rendimento} = \left[ \frac{\text{massa do óleo (g)}}{\text{massa do material vegetal (100g)}} \right] \times 100 \quad (1)$$

### 1.2.4. Composição química dos óleos essenciais

As análises foram realizadas por Cromatografia Gasosa em um cromatógrafo modelo CG 7820A com Espectrômetro de Massas MSD 5975 (Agilent Technologies, Santa Clara, Califórnia, Estados Unidos) equipado com uma coluna DB-5ms (25 m, 250 µm de diâmetro interno, espessura da película 0,25 µm). O gás de arraste foi o hexano a uma vazão de 1,2 mL.min<sup>-1</sup> e uma pressão de 5,70 psi. Uma amostra de 1 µL foi injetada no modo split (5mL.min<sup>-1</sup>). Injetor e detector foram mantidos a temperatura de 260 °C. Programação da coluna: temperatura inicial de 50 °C e, rampa de 4 °C.min<sup>-1</sup> até 240 °C e permanência nesta por 5 minutos. Os parâmetros do detector de EM foram os seguintes: a temperatura da linha de transferência foi de 280°C, o forno 150°C.min<sup>-1</sup> e para a detecção foi aplicada a técnica de impacto eletrônico a 1635 MeV. Os compostos voláteis foram identificados por comparação dos tempos de retenção obtidos com os tempos de retenção de hidrocarbonetos lineares (série homóloga de C<sub>8</sub>-C<sub>18</sub>). A identificação dos compostos também foi realizada através de uma comparação dos índices de retenção lineares e espectros de massas com a biblioteca NIST 2.0 (U.S. National Institute of Standards and Technology, 2008) e confirmados com dados relatados pela literatura (Siani et al., 2013; Rodrigues et al., 2013; Saroj et al., 2015; Santos et al., 2015; Rodrigues et al., 2015). A quantificação (%) foi realizada através de medições de normalização da área do pico.

### 1.2.5. Atividade leishmanicida

Para avaliação da atividade leishmanicida, as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/PH8) foram mantidas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, São Paulo, Brasil) suplementado com 10 % de soro bovino fetal. Posteriormente, cerca de 1x10<sup>6</sup> parasitos foram distribuídos em placas de 96 poços, e os

óleos essenciais foram previamente dissolvidos em dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil) e adicionados nas culturas nas concentrações de 3,12 a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Anfotericina B (Eurofarma, São Paulo, Brasil) foi adicionada nas culturas nas concentrações de 0,19 a 3,12  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . As culturas foram incubadas a 25° C em estufa BOD (Quimis, Diadema, São Paulo, Brasil) por 24 h e a atividade leishmanicida foi determinada pela inibição do crescimento das formas promastigotas pela contagem, em câmara de Neubauer (Global Glass, Porto Alegre, Brasil), do número total de promastigotas vivas, levando-se em consideração a motilidade flagelar. Como controle negativo foi utilizado meio RPMI 1640 (Gibco) contendo 0,1 % de DMSO (Synth) e como controle positivo foi utilizado Anfotericina B na concentração de 1  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Os resultados foram expressos como a média da porcentagem de lise em relação ao controle negativo (0,1 % DMSO). Foram realizados dois experimentos em triplicata. Os valores de concentração inibitória 50 % ( $\text{CI}_{50}$ ) foram determinados por meio de curvas de regressão não linear utilizando o software *GraphPad Prism* versão 5.0 para Windows (GraphPad software, Estados Unidos). Procedimento aprovado pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal do Comitê de Ética da Universidade de Franca sob o protocolo número 010/14.

#### **1.2.6. Atividade antibacteriana**

As cepas testadas foram obtidas junto a *American Type Culture Collection* (ATCC, RockvilleMD, EUA), sendo os micro-organismos patogênicos do tipo oral: *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478), *Streptococcus salivarius* (ATCC 25975) e *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285).

A atividade antibacteriana foi determinada em Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos óleos essenciais pelo método de microdiluição em microplacas com 96 poços (TPP, EUA) e realizados em triplicata (Alves et al., 2008). Para bactérias aeróbias, as amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO) (Synth, Diadema, São Paulo, Brasil; 8000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), e posteriormente em Caldo Trípico de Soja (TSB) (Difco, Detroit, MI, EUA) e para bactérias anaeróbias utilizou-se o Caldo Schaedler (Difco), suplementado com hemina (5,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e vitamina K (10,0  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), com a finalidade de atingir concentrações de 400 a 0,195  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . O inóculo foi ajustado para cada micro-

organismo a fim de obter uma concentração de células de  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colônias (UFC) por mL de caldo, de acordo com o National Committee for Clinical Laboratory Standard, (CLSI). O dicloridrato de clorexidina (DCC) (Sigma, Poole, Dorset, Reino Unido) foi utilizado como controle positivo nas concentrações de  $0,0115 \mu\text{g.mL}^{-1}$  a  $5,9 \mu\text{g.mL}^{-1}$  e o DMSO, nas concentrações de 1 a 5% (v/v), como controle negativo. Foi realizado o controle de esterilidade dos caldos TSB e Schaedler, do dicloridrato de clorexidina, das amostras e do controle da cultura (inóculo), incubando-os sem a adição dos micro-organismos. As microplacas (96 poços) com os micro-organismos aeróbios e anaeróbios foram fechados com um vedante de placa estéril, sendo os micro-organismos aeróbios incubados aerobicamente a  $37^\circ\text{C}$  durante 24 h, enquanto os anaeróbios foram incubados de 48 a 72 horas a  $37^\circ\text{C}$  em câmara anaeróbia (Don Whitley Scientific, Bradford, Reino Unido), com 5 % a 10 % de  $\text{H}_2$ , 10 % de  $\text{CO}_2$ , 80 % a 85 % de  $\text{N}_2$ . Logo depois,  $30 \mu\text{L}$  de resazurina (Sigma) em solução aquosa (0,01 %) foi adicionada para indicar viabilidade de micro-organismos e os valores de CIM foram determinados a partir da concentração mais baixa do óleo essencial capaz de inibir o crescimento dos micro-organismos.

### 1.2.7. Análise estatística

Os resultados experimentais dos rendimentos dos óleos essenciais e das atividades biológicas foram expressos como média de três medições. A significância da diferença entre as médias foi calculada pelo teste Tukey usando o software R i386 versão 3.3.1 e valores de  $p \leq 0,05$  foram considerados significativos.

## 1.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 1.3.1. Rendimento e composição química dos óleos essenciais

A hidrodestilação das folhas de *Eugenia uniflora*, *Plinia cauliflora* e *Syzygium cumini* permitiu a extração de óleos essenciais com rendimentos entre 0,03 a 0,51% (m/m em base fresca) (Tabela 1). O óleo essencial de folhas de *E. uniflora* apresentou maior teor (0,51%) com diferença significativa para as demais espécies, *P. cauliflora* (0,05%) e *S. cumini* (0,03%), que não diferiram entre si. O rendimento do óleo essencial de *E.*

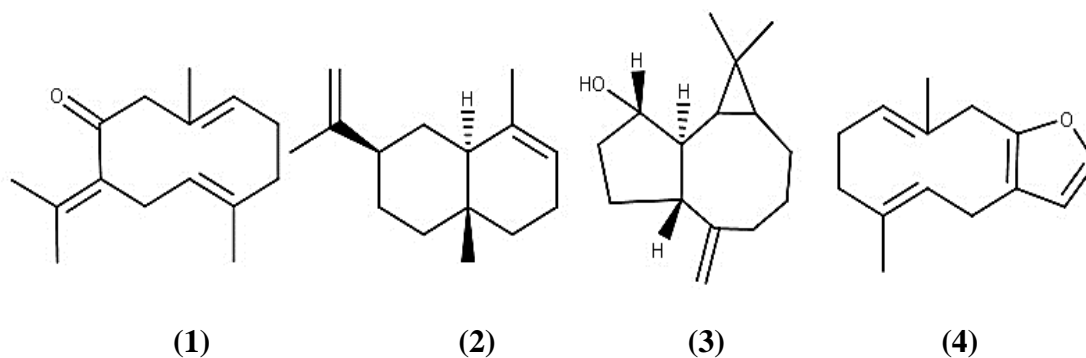
*uniflora* encontrado neste trabalho foi superior ao relatado por Rodrigues et al. (2013) (0,30%). Diferente disso, para a espécie *P. cauliflora* o rendimento foi inferior ao que havia sido reportado por Apel et al. (2006) (0,1%). Resultado semelhante ao encontrado neste trabalho foi reportado para a espécie *S. cumini* por Saroj et al. (2015) (0,05%).

**Tabela 1** – Rendimento médio dos óleos essenciais

Espécies Myrtaceae	Rendimento (%)	Outros autores
<i>E. uniflora</i>	0,51 ± 0,02 a	Rodrigues et al. (2013) – 0,30%
<i>P. cauliflora</i>	0,05 ± 0,01 b	Apel et al. (2006) – 0,10%
<i>S. cumini</i>	0,03 ± 0,00 b	Saroj et al. (2015) – 0,05%

\*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

A Tabela 2 apresenta os compostos identificados por CG-EM dos óleos essenciais extraídos das folhas das espécies *E. uniflora*, *P. cauliflora* e *S. cumini*. Para a espécie *E. uniflora* foram identificados 34 compostos que corresponderam a 89,62% do total do óleo, sendo 2,07% de monoterpenos hidrocarbonetos, 28,91% de sesquiterpenos hidrocarbonetos, 47,93% de sesquiterpenos oxigenados e 10,71% de outros compostos, como álcoois, ésteres, cetonas e hidrocarbonetos simples. Os quatro compostos majoritários encontrados foram o germacrona (8,52%), o espatulenol (8,20%), o  $\alpha$ -selineno (7,50%) e o (Z)- $\beta$ -elemenona (4,88%) (Figura 1).

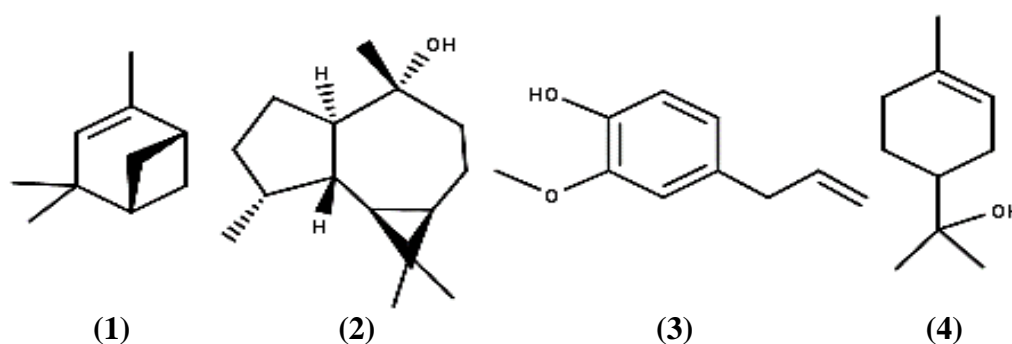


**Figura 1:** Estruturas químicas dos quatro constituintes majoritários identificados no óleo essencial das folhas de *E. uniflora*: (1) germacrona, (2)  $\alpha$ -selineno, (3) espatulenol e (4) (Z)- $\beta$ -elemenona.

A composição química do óleo essencial de *E. uniflora* observada, apresentou diferenças com relatos de outros autores para a mesma espécie, quanto aos compostos majoritários encontrados e quantidade de compostos identificados. Victoria et al. (2012) encontraram como compostos majoritários no óleo essencial de *E. uniflora*, os compostos germacrenos A (11,60%), B (21,20%) e D (11,40%) e o óxido de selina-1,3,7-(11)-trien-

8-ona (9,70%). Santos et al. (2015) identificaram 95,81% do total do óleo essencial de *E. uniflora*, sendo os compostos majoritários encontrados, o curzereno (35,75%), germacreno B (19,22%) e o cariofileno (12,55%).

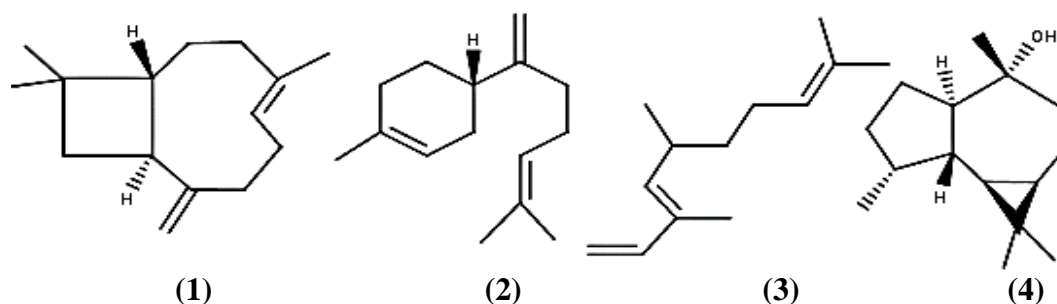
Para a espécie *S. cumini* foram identificados 38 compostos que correspondiam a 100% do total do óleo, sendo 34,48% de monoterpenos hidrocarbonetos, 10,16% de monoterpenos oxigenados, 12,61% de sesquiterpenos hidrocarbonetos, 25,32% de sesquiterpenos oxigenados e 17,45% de outros compostos, como álcoois, ésteres, cetonas e hidrocarbonetos simples. Os quatro compostos majoritários encontrados foram o  $\alpha$ -pineno (21,20%), globulol (15,30%), o eugenol (11,20%), o e o  $\alpha$ -terpineol (8,88%) (Figura 2).



**Figura 2:** Estruturas químicas dos quatro constituintes majoritários identificados no óleo essencial das folhas de *S. cumini*: (1)  $\alpha$ -pineno, (2) globulol, (3) eugenol e (4)  $\alpha$ -terpineol.

Alguns compostos identificados para a espécie *S. cumini* foram semelhantes aos relatados por alguns autores, sendo o composto identificado em maior quantidade,  $\alpha$ -pineno (21,20%), descrito por Mohamed et al. (2013), Dias et al. (2013) e Saroj et al. (2015), como majoritário para o óleo essencial desta espécie, com 32,32; 31,85 e 17,20%, respectivamente. O eugenol, presente em 11,20% do total do óleo essencial de *S. cumini*, havia sido relatado por Rodriguez et al. (2014) como principal constituinte (67,50%) do óleo essencial de *S. cumini*.

A espécie *P. cauliflora* teve 52 compostos identificados que correspondiam a 96,72% do total do óleo, sendo 0,09% de monoterpenos hidrocarbonetos, 0,42% de monoterpenos oxigenados, 61,80% de sesquiterpenos hidrocarbonetos, 34,32% de sesquiterpenos oxigenados e 0,09% de outros compostos, como álcoois, ésteres e cetonas. Sendo os quatro compostos majoritários encontrados o (E)-cariofileno (14,69%),  $\beta$ -bisaboleno (9,36%), (E,E)- $\alpha$ -farneceno (8,07%) e o globulol (7,86%) (Figura 3).



**Figura 3:** Estruturas químicas dos quatro constituintes majoritários identificados no óleo essencial das folhas de *P. cauliflora*: (1) (E)-cariofileno, (2) β- bisaboleno, (3) (E,E)-α-farneseno e o (4) globulol.

A literatura disponível não mostrou um consenso para os compostos majoritários encontrados no óleo essencial de *P. cauliflora*. Apel et al. (2006) relataram os compostos, espatulenol (27,20%) e o óxido de cariofileno (21,60%) como os principais constituintes desta espécie. Fortes et al. (2011) encontraram como compostos majoritários, o germacreno D (24,10%) e β-eudesmol (16,50%). Esta alteração na composição química dos óleos essenciais está bem documentada na literatura científica e se deve a influência de fatores genéticos, edafoclimáticos, bem como, decorrentes do cultivo e processos de extração dos mesmos (Gobbo-Neto e Lopes, 2007; Pires et al., 2013; Bajalan e Pirbalouti, 2014).

As três espécies de Myrtaceae apresentaram apenas dois compostos em comum em sua composição, os compostos terpênicos limoneno e allo-aromadendreno. O limoneno está presente em maior quantidade nos óleos essenciais de espécies de Citrus e tem chamado a atenção dos profissionais da saúde, pois tem demonstrado ações antimicrobianas (Igarashi, 2015; Estevam et al., 2016), antiparasitárias (Graebin et al., 2010), inseticidas (Soares et al., 2012) e até antitumorais (Almeida et al., 2015).

De acordo com Taiz e Zeiger (2013), durante o crescimento, desenvolvimento e os processos de maturação das espécies vegetais, ocorrem alterações bioquímicas e fisiológicas que modificam a produção de substâncias biologicamente ativas, tanto na qualidade como em quantidade, influenciando diretamente no teor e nos metabólitos secundários. Assim, é de extrema importância observar as condições de cultivo em que a espécie vegetal se encontra, padronizar a forma e o horário de coleta do material vegetal, assim como, avaliar o teor e a composição química dos óleos essenciais antes da realização de testes biológicos com os mesmos.

A variada composição química dos óleos essenciais, no geral, os caracterizam como materiais de partida interessantes para a síntese de compostos semissintéticos de



alto valor comercial, pois são fontes naturais de substâncias contendo ligações insaturadas, centros assimétricos e diferentes grupos funcionais, como carbonila, hidroxila, epóxido, ésteres e anéis aromáticos (Lenardão et al., 2015; Jacob et al., 2017). Além disso, o uso de compostos terpênicos como matéria-prima para a síntese de novos produtos está de acordo com o sétimo princípio da Química Verde, pois constituem uma classe de compostos oriundos de fontes renováveis (Lenardão et al., 2003; Jacob et al., 2017).

**Tabela 2** – Compostos identificados por CG-MS do óleo essencial das folhas de *E. uniflora*, *P. cauliflora* e *S. cumini*.

IRL	Compostos	<i>E. uniflora</i>	<i>S. cumini</i>	<i>P. cauliflora</i>
856	(Z)-2-Hexenol <sup>b</sup>	1,31	2,14	-
862	$\alpha$ -Pinenol <sup>a</sup>	-	21,20	-
871	$\beta$ -Pinenol <sup>b</sup>	-	0,46	-
878	Mircenol <sup>b</sup>	0,86	-	-
888	Eugenol <sup>b</sup>	-	11,20	-
893	$\beta$ -Mircenol <sup>b</sup>	-	1,77	-
1024	p-Cimeno <sup>a</sup>	0,61	1,45	-
1029	Limoneno <sup>a</sup>	0,60	6,08	0,09
1034	(Z)- $\beta$ -Ocimeno <sup>b</sup>	-	2,02	-
1045	(E)- $\beta$ -Ocimeno <sup>b</sup>	-	0,36	-
1072	$\gamma$ -Terpineno <sup>a</sup>	-	0,41	-
1090	Terpinoleno <sup>a</sup>	-	0,39	-
1094	Linalool <sup>b</sup>	-	0,33	-
1099	Undecanol <sup>b</sup>	-	-	0,09
1107	(-)-endo-Fenchol <sup>b</sup>	-	0,25	-
1110	Acetato de heptila <sup>a</sup>	-	0,39	-
1120	Allo-ocimeno <sup>b</sup>	-	0,34	-
1142	Hidrato de canfeno <sup>b</sup>	-	0,52	-
1146	Thujanol <sup>b</sup>	-	0,22	-
1156	Borneol <sup>a</sup>	-	0,36	-
1181	4-Terpineol <sup>a</sup>	-	0,37	-
1197	$\alpha$ -Terpineol <sup>a</sup>	-	8,88	0,42
1218	Acetato de endo-fenchila <sup>a</sup>	-	0,84	-
1284	Acetato de bornila <sup>a</sup>	-	2,35	-
1298	Acetato de terpenila <sup>b</sup>	-	0,53	-
1332	$\delta$ -Elemeno <sup>b</sup>	-	-	0,19
1336	$\alpha$ -Elemeno <sup>b</sup>	0,80	-	0,39
1348	n.i.	-	-	0,12
1370	n.i.	-	-	0,20
1376	$\alpha$ -Copaeno <sup>b</sup>	-	0,30	2,01
1382	$\beta$ -Bourboneno <sup>b</sup>	-	-	0,14
1385	n.i.	-	-	0,21
1390	$\beta$ -Elemeno <sup>b</sup>	4,81	-	2,41
1424	(E)-Cariofileno <sup>a</sup>	-	-	14,69
1429	$\beta$ -Gurjuneno <sup>a</sup>	1,67	-	1,15

1436	Aromadendreno <sup>b</sup>	-	6,79	0,13
1440	$\alpha$ -Humuleno <sup>a</sup>	-	-	1,32
1447	(E)- $\beta$ -Farneceno <sup>a</sup>	-	-	0,21
1457	Allo-aromadendreno <sup>a</sup>	0,76	4,30	1,80
1462	Germacreno B <sup>b</sup>	-	-	1,05
1474	$\beta$ -Chamigreno <sup>b</sup>	1,18	-	1,17
1477	$\gamma$ -Muuroleno <sup>a</sup>	-	-	0,96
1484	Germacreno D <sup>b</sup>	-	-	6,68
1490	$\beta$ -Selineno <sup>a</sup>	3,56	-	0,34
1493	$\beta$ -Bisaboleno <sup>a</sup>	-	-	9,36
1494	$\alpha$ -Selineno <sup>b</sup>	7,50	-	-
1497	Curzereno <sup>b</sup>	2,08	-	-
1497	$\gamma$ -Cadineno <sup>b</sup>	-	-	4,45
1500	(E,E)- $\alpha$ -Farneceno <sup>a</sup>	-	-	8,07
1513	$\alpha$ -Cadineno <sup>a</sup>	-	0,33	0,19
1518	$\beta$ -Cadineno <sup>b</sup>	1,08	-	1,64
1518	$\delta$ -Cadineno <sup>a</sup>	-	0,26	0,80
1522	(E)- $\gamma$ -Bisaboleno <sup>b</sup>	-	-	0,85
1526	(Z)-1,4-Cadinadieno <sup>b</sup>	-	0,63	-
1537	$\alpha$ -Calacoreno <sup>b</sup>	-	-	0,22
1552	(E)-Nerolidol <sup>a</sup>	-	0,59	-
1554	Elemol <sup>a</sup>	-	-	0,31
1560	Germacreno B <sup>a</sup>	0,83	-	0,62
1564	Cariofileno <sup>a</sup>	-	0,30	-
1571	Maaliol <sup>a</sup>	1,49	-	-
1576	Óxido de cariofileno <sup>a</sup>	-	1,00	0,28
1578	Espatuleno <sup>b</sup>	8,20	-	0,33
1581	<i>epi</i> - Globulol <sup>b</sup>	-	-	4,74
1584	Globulol <sup>a</sup>	-	15,30	7,86
1587	Viridiflorol <sup>a</sup>	3,49	-	1,41
1595	Guaiol <sup>a</sup>	2,84	0,55	-
1596	1,10-di- <i>epi</i> -Cubenol <sup>b</sup>	-	-	2,02
1598	(Z)- $\beta$ -Elemenona <sup>b</sup>	4,88	-	-
1599	Viridiflorol <sup>a</sup>	-	0,60	-
1606	Epóxido de humuleno II <sup>a</sup>	-	0,43	0,66
1609	5- <i>epi</i> -7- $\alpha$ -Eudesmol <sup>a</sup>	-	-	0,33
1612	$\beta$ -Oplopenona <sup>a</sup>	-	4,50	-
1612	10- <i>epi</i> - $\gamma$ -Eudesmol <sup>b</sup>	-	-	1,19
1617	Cariofiladienol II <sup>a</sup>	-	-	0,21
1619	1- <i>epi</i> -Cubenol <sup>b</sup>	-	-	0,85
1624	Selina-1,3,7(11)-trien-8-ona <sup>b</sup>	0,84	-	-
1628	Eudesmol <sup>b</sup>	2,19	-	-
1630	$\tau$ -Cardinol <sup>a</sup>	-	-	3,39
1635	$\alpha$ -Muurolol <sup>a</sup>	-	-	0,97
1639	$\gamma$ -Eudesmol <sup>a</sup>	-	-	1,29
1645	Óxido de $\alpha$ -bisabolol B <sup>a</sup>	-	-	0,78
1648	14-Hidroxi-9- <i>epi</i> -(E)-cariofileno <sup>a</sup>	-	-	0,60
1656	Atractilona <sup>a</sup>	1,51	-	-
1656	$\alpha$ -Cadinol <sup>a</sup>	-	1,28	0,69
1659	7- <i>epi</i> - $\alpha$ -Eudesmol <sup>b</sup>	3,22	-	2,51

1661	$\alpha$ -Eudesmol <sup>b</sup>	-	-	2,12
1667	Valeranona <sup>b</sup>	1,06	-	-
1671	Cadaleno	-	-	0,96
1673	$\alpha$ -Bisabolol	-	-	0,33
1680	Germacra-4(15),5,10(14)-trien-1- $\alpha$ -ol <sup>b</sup>	2,28	-	-
1684	Óxido de $\alpha$ -bisabolol A <sup>a</sup>	-	-	0,77
1694	Germacrona <sup>a</sup>	8,52	-	0,68
1712	(2Z, 6Z)-Farnesol <sup>a</sup>	2,21	-	-
1725	Chamazuleno <sup>b</sup>	1,55	-	-
1771	Guaiazuleno <sup>b</sup>	3,09	-	-
1795	8- $\alpha$ -Acetoxielemol <sup>b</sup>	3,54	-	-
1819	(Z,E)-Acetato de farnesila <sup>b</sup>	3,02	-	-
1838	(E,E)-Acetato de farnesila <sup>b</sup>	4,86	-	-
1868	7-Acetoxicalameneno <sup>a</sup>	1,66	-	-
1898	Nonadecano <sup>a</sup>	1,52	-	-
1911	n.i.	2,84	-	-
<b>Monoterpenos hidrocarbonetos</b>		2,07	34,48	0,09
<b>Monoterpenos oxigenados</b>		-	10,16	0,42
<b>Sesquiterpenos hidrocarbonetos</b>		28,91	12,61	61,80
<b>Sesquiterpenos oxigenados</b>		47,93	25,32	34,32
<b>Outros</b>		10,71	17,45	0,09
<b>Não identificado</b>		2,84	-	0,53
<b>Total identificado</b>		89,62	100,02	96,72

IRL Índice de retenção linear;

n.i., composto não identificado

<sup>a</sup>Identificação baseada na retenção cromatográfica em colunas DB-5ms, dados do espectro de massas

<sup>b</sup>Identificação baseada na retenção cromatográfica em colunas DB-5ms e descrição na literatura

### 1.3.2. Atividade leishmanicida

Os óleos essenciais de *E. uniflora*, *P. cauliflora* e *S. cumini*, testados em concentrações de 3,12 a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, após 24h, apresentaram alta porcentagem de mortalidade frente ao protozoário testado, sendo o aumento da mortalidade diretamente proporcional ao aumento de concentração dos óleos essenciais das espécies estudadas (Tabela 3).

A espécie *E. uniflora* apresentou a maior atividade nas concentrações de 25 e 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , em relação as outras espécies tendo  $\text{CI}_{50}$  de 0,99  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A espécie *P. cauliflora* apresentou maior atividade nas concentrações de 3,12 a 12,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  em relação as outras espécies tendo  $\text{CI}_{50}$  de 0,46  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . E a espécie *S. cumini* obteve menor atividade em todas as concentrações em relação as outras espécies, e maior  $\text{CI}_{50}$  de 8,78  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . Comparados com a Anfotericina B, que apresentou  $\text{CI}_{50}$  de 0,60  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , os óleos essenciais, exceto pelo *S. cumini*, obtiveram resultados promissores como leishmanicidas

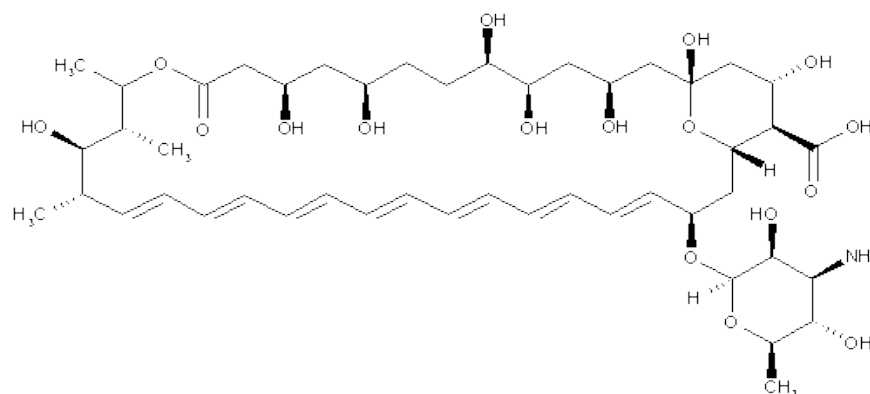
naturais. A espécie *P. cauliflora* obteve menor  $CI_{50}$  que Anfotericina B demonstrando grande potencial contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*.

**Tabela 3** - Atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* e determinação dos valores de concentração inibitória 50% ( $CI_{50}$ ).

Tratamentos	% Lise / Concentrações ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )					$CI_{50}$ ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
	50	25	12,5	6,25	3,12	
<b>Óleos Essenciais</b>						
<i>E. uniflora</i>	99,42 aA	90,92 bA	77,80 cA	74,63 dA	71,32 eA	0,99
<i>P. cauliflora</i>	98,12 aB	88,75 bB	87,46 cB	84,86 dB	76,07 eB	0,46
<i>S. cumini</i>	95,82 aC	75,21 bC	47,97 cC	38,89 dC	35,00 eC	8,78
<b>Controle Positivo</b>	<b>3,12</b>	<b>1,56</b>	<b>0,78</b>	<b>0,39</b>	<b>0,19</b>	
Anfotericina B	98,14 a	89,08 b	75,73 c	13,06 d	4,87 e	0,60
<b>Controle Negativo</b>						
Meio RPMI + 0,1% DMSO	-	-	-	-	-	0,00

\*Médias seguidas pela mesma letra, minúscula na linha e maiúscula na coluna, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De acordo com a União Química Farmacêutica Nacional S.A (UNIANF®) (2015), a anfotericina B (Figura 4) é fungicida/parasiticida dependente da concentração obtida nos fluidos corporais e da sensibilidade dos fungos e protozoários. A anfotericina B age ligando-se aos esteróis da membrana celular dos fungos e protozoários sensíveis, alterando a permeabilidade da membrana de ambos e provocando extravasamento dos componentes intracelulares. No entanto, este antifúngico sintético tem se mostrado altamente tóxico, pois apesar de possuir maior afinidade por ergosterol, um esterol presente na membrana dos fungos, pode apresentar capacidade em ligar-se ao colesterol e outros constituintes da membrana celular de mamíferos (Kaminski, 2014). Assim, a busca por produtos antifúngicos e antiparasitários de ocorrência natural e com menor toxicidade tem crescido significativamente, e os óleos essenciais de *E. uniflora*, *S. cumini* e principalmente *P. cauliflora*, com base nos resultados observados, mostram-se fortes candidatos para substituírem a Anfotericina B no combate de micro-organismos patogênicos e fitopatogênicos.



**Figura 4:** Estrutura química da Anfotericina B.

Alguns estudos revelam que a atividade leishmanicida de óleos essenciais é atribuída, principalmente, a compostos terpenoides como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos, que podem atravessar facilmente as paredes celulares e as membranas citoplasmáticas, perturbando diferentes camadas de polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípidios, aumentando a permeabilidade e levando à lise celular (Tariku et al., 2011). O composto monoterpeneo,  $\alpha$ -pineno, composto majoritário do óleo essencial da espécie *S. cumini* com 21,20%, foi relatado como principal ativador da atividade leishmanicida de óleos essenciais por Dias et al. (2013) e Rodrigues et al. (2015). Os compostos geraniol e limoneno, estando o segundo presente nos óleos essenciais deste trabalho, foram reportados por Estevam et al. (2016) como responsáveis pela atividade leishmanicida de óleos essenciais de espécies de Citrus.

No entanto, a ação leishmanicida de óleos essenciais ainda é atribuída a sinergia existente entre os compostos químicos que os constituem e não a compostos isolados, sendo necessários estudos mais específicos quanto a composição química que apresentam e a ação leishmanicida dos mesmos (Peixoto et al., 2011; Tariku et al., 2011).

### 1.3.3. Atividade antibacteriana

A atividade antibacteriana dos óleos essenciais das folhas de *E. uniflora*, *P. cauliflora* e *S. cumini* sobre bactérias orais, esta apresentada na Tabela 4.

De acordo com Holetz et al. (2002) valores de CIM inferiores a  $100 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  são considerados como boa atividade; de 100 a  $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  atividade mediana; de 500 a  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  atividade fraca e acima de  $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  a atividade é considerada nula. Assim, pode-se observar que todas as espécies apresentaram atividade inibitória mediana com

variação da CIM de 100 a 400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  sobre as bactérias testadas. Para a espécie *E. uniflora* observou-se menor concentração inibitória (100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sobre a bactéria *Streptococcus sanguinis* e maior concentração inibitória (400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sobre as bactérias *Streptococcus salivarius* e *Bacteroides fragilis*. A espécie *P. cauliflora* apresentou menor concentração inibitória (100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sobre a bactéria *Streptococcus mutans*, e maior concentração inibitória (400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sobre as bactérias *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus salivarius* e *Bacteroides fragilis*. A espécie *S. cumini* apresentou concentração inibitória de 200  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  sobre as bactérias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus salivarius* e *Bacteroides fragilis* e maior concentração inibitória (400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) sobre as bactérias *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* e *Streptococcus sobrinus*.

**Tabela 4-** Efeito inibidor do óleo essencial de folhas de *E. uniflora*, *P. cauliflora* e *S. cumini* frente a bactérias orais, aeróbias e anaeróbias.

Micro-organismos	Concentração Inibitória Mínima (CIM) – $\mu\text{g.mL}^{-1}$			Dicloridrato de Clorexidina ( $\mu\text{g.mL}^{-1}$ )
	<i>E. uniflora</i>	<i>P. cauliflora</i>	<i>S. cumini</i>	
<b>Aeróbios</b>				
<i>Streptococcus mutans</i> <sup>a</sup> (ATCC 25175)	200	100	200	0,92
<i>Streptococcus mitis</i> <sup>a</sup> (ATCC 49456)	400	200	400	1,84
<i>Streptococcus sanguinis</i> <sup>a</sup> (ATCC 10556)	100	400	400	0,92
<i>Streptococcus sobrinus</i> <sup>a</sup> (ATCC 33478)	200	400	400	0,92
<i>Streptococcus salivarius</i> <sup>a</sup> (ATCC 25975)	400	400	200	0,46
<b>Anaeróbio</b>				
<i>Bacteroides fragilis</i> <sup>b</sup> (ATCC 25285)	400	400	200	0,74

<sup>a</sup>Bactéria gram-positiva; <sup>b</sup>Bactéria gram-negativa.

As bactérias orais do gênero *Streptococcus* agem principalmente, nos esmaltes dos dentes e tecidos gengivais, provocando cáries e doenças periodontais. Já as bactérias do gênero *Bacteroides* podem causar infecções na cavidade peritoneal e formação de abscessos decorrentes de traumas (Nakano e Avila-Campus, 2004; Estevam et al., 2016). Desta forma, o controle destas bactérias orais é de extrema importância, sendo que, atualmente o controle de bactérias orais em geral é feito através de antibióticos e/ou antissépticos sintéticos, no entanto, alguns destes produtos têm gerado desenvolvimento

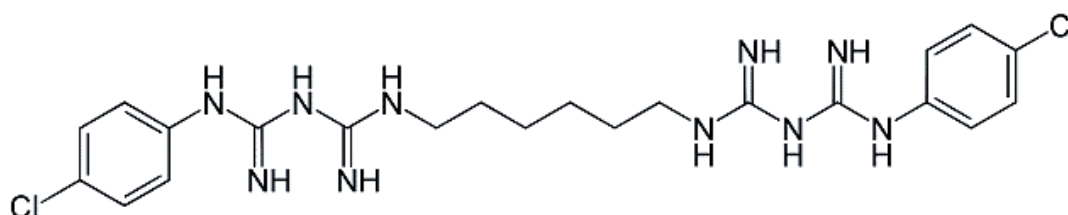
de resistência por parte dos micro-organismos além de apresentarem efeitos colaterais a saúde humana (Kasim et al., 2014; Sousa et al., 2015).

De acordo com Horner et al. (2012) a resistência intrínseca, ou insusceptibilidade, à Clorexidina é demonstrada por esporos bacterianos e micobactérias, sendo que, em ambos os casos, as camadas externas da célula formam uma barreira impermeável à entrada de moléculas deste composto. Em bactérias Gram-negativas, como *Proteus* e *Providencia*, as propriedades intrínsecas da membrana externa também conferem resistência à este antisséptico nas concentrações em uso (Russell, 1999).

Em relação aos efeitos da Clorexidina sobre células humanas, Giannelli et al. (2008) avaliaram a citotoxicidade do Digluconato de Clorexidina sobre as linhagens celulares osteoblásticas, endoteliais e fibroblásticas, sendo as diferentes liagens celulares expostas a várias concentrações do antisséptico durante diferentes tempos e analisadas quanto à viabilidade celular e à morte celular. Também foram feitas análises do potencial de membrana mitocondrial, mobilização intracelular de  $Ca^{2+}$  e geração de espécies reativas de oxigênio. Sendo assim, foi observado que o antisséptico afetou a viabilidade celular de acordo com a quantidade e tempo de exposição, particularmente em osteoblastos. Seu efeito tóxico consistiu na indução de mortes celulares apoptóticas e autofágicas/ necróticas e envolveu perturbação da função mitocondrial, aumento intracelular de  $Ca^{2+}$  e estresse oxidativo. Estes dados sugerem que o Digluconato de Clorexidina é altamente citotóxico *in vitro* e convida ao uso mais aconselhado do antisséptico nos procedimentos cirúrgicos orais.

Assim, com base nos resultados apresentados e relatos encontrados na literatura, os óleos essenciais seriam potenciais antibacterianos naturais contra bactérias orais, de forma, a substituírem futuramente os compostos antibacterianos sintéticos, como o Dicloridrato de Clorexidina (Figura 5), que tem causado malefícios a saúde, pela toxicidade as células humanas e desenvolvimento de resistência por parte dos micro-organismos patogênicos (Kasim et al., 2014). Ou ainda, os óleos essenciais poderiam ser usados em conjunto com antibióticos sintéticos, visto que, alguns óleos essenciais possuem a capacidade de reverter/paralisar as bombas de efluxo, que são mecanismos comuns de resistência aos antissépticos, como a clorexidina (Aelenei et al., 2016). As bombas de efluxo são dependentes da energia, alimentadas pelo ATP ou pela força motora do próton (PMF) e têm a capacidade de remover antissépticos e antibióticos de acordo com o seu substrato. O efluxo é o principal mecanismo de susceptibilidade reduzida à

clorexidina (Horner et al., 2012). Assim, revertendo a resistência dos micro-organismos, os óleos essenciais potencializariam o efeito do antibiótico/antisséptico sintético.



**Figura 5:** Estrutura química do Dicloridrato de Clorexidina

De acordo com Probst (2012) e Stefanakis et al. (2013), a atividade bacteriostática ou bactericida dos óleos essenciais é exercida principalmente por compostos terpenoides, como  $\beta$ -cariofileno, germacreno D,  $\alpha$ -humulene, óxido de cariofileno e 1,8-cineol, que atuam, de forma sinérgica, imitando substâncias usadas pela célula bacteriana (metabólitos) e se ligam a enzimas, inibindo-as, alternadamente, interferem com a integridade e funcionamento da membrana celular, através da mudança de potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória. Stojković et al. (2011) e Kasim et al. (2014) também enfatizaram que os compostos terpenoides 1,8-cineol,  $\beta$ -cariofileno e  $\alpha$ -pineno são importantes agentes antimicrobianos de óleos essenciais.

O composto fenólico, eugenol, presente de forma majoritária no óleo essencial de *S. cumini* com 11,20%, também é reportado por alguns autores como principal agente da atividade antibacteriana de óleos essenciais. Rodriguez et al. (2014) associa a atividade antibacteriana significativa do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* sobre a bactéria oral *Streptococcus mutans*, ao composto eugenol, que foi relatado como composto majoritário (67,50%). Souza et al. (2015) também relatam a atividade antibacteriana do eugenol juntamente com o carvacrol, de forma isolada, sobre o micro-organismo *Listeria monocytogenes*.

#### 1.4. CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de *E. uniflora*, *P. cauliflora* e *S. cumini* apresentaram em sua composição química uma mistura de mono e sesquiterpenos, sendo os compostos majoritários, do óleo essencial de *E. uniflora*, germacrona (8,52%), espatulenol (8,20%),  $\alpha$ -selineno (7,50%) e (Z)- $\beta$ -elemenona (4,88%), para o óleo essencial de *P. cauliflora* o



(E)-cariofileno (14,69%),  $\beta$ - bisaboleno, (E,E)- $\alpha$ -farneceno (8,07%) e o globulol (7,86%), e para o óleo essencial de *S. cumini* os compostos,  $\alpha$ -pineno (21,20%), globulol (15,30%), eugenol (11,20%), e o  $\alpha$ -terpineol (8,88%). Quanto as atividades biológicas testadas, os óleos essenciais estudados apresentaram moderada atividade antibacteriana sobre bactérias orais e promissora atividade leishmanicida sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*. Esses resultados corroboram com a ideia que moléculas bioativas presentes nos óleos essenciais destas espécies de Myrtaceae, ocorridas no Cerrado, podem vir a ser utilizadas para o desenvolvimento de novos fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêuticas.

## 1.5. REFERÊNCIAS

Aelenei, P., Miron, A., Trifan, A., Bujor, A., Gille, E., Aprotosoiaie, A. C., 2016. Essential Oils and Their Components as Modulators of Antibiotic Activity against Gram-Negative Bacteria. *Medicines*, 19; 01- 34.

Almeida, M. P., Romero, R.B., Romero, A. L., Crespan, E. R., 2015. Explorando a química e a atividade antifúngica de óleos essenciais: Uma proposta de projeto para a Educação Básica. *Lat. Am. J. Sci. Educ.* 2, 01-14.

Alves, E. S., Tresmondi, F., Longui, E. L., 2008. Análise estrutural de folhas de *Eugenia uniflora* L. coletadas em ambientes rural e urbano, SP, Brasil. *Acta bot. bras.* 22, 241-248.

Apel, M. A., Sobral, M., Zuanazzi, J. A., Henriques, A. T., 2006. Essential oil composition of four *Plinia* species (Myrtaceae). *Flavour and Fragrance Journal*. 21, 565-567.

Azevedo, A. N., Buarque, P. R., Cruz, E. M. O., Blank, A. F., Alves, P. B., Nunes, M. L., Santana, L. C. L. A., 2014. Response surface methodology for optimisation of edible chitosan coating formulations incorporating essential oil against several foodborne pathogenic bacteria. *Food Control*. 43, 1-9.

Bajalan, I., Pirbalouti, A. G., 2014. Variation in antibacterial activity and chemical compositions of essential oil from different populations of Myrtle. *Industrial Crops and Products*. 61, 303–307.

Busato, N. V., Silveira, J. C., Costa, A. O. S. da, Junior, E. F. C., 2014. Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor. *Ciência Rural*, Santa Maria. 44, 1574-1582.

Carvalho, A. A., Andrade, L. N., Sousa, E. B. V., Sousa, D. P., 2014. Antitumor Phenylpropanoids Found in Essential Oils. *BioMed Research International*. 2015, 01-21.

Craveiro, A. A.; Fernandes, A. G.; Andrade, C. H. S.; Matos, F. J. A.; Alencar, J. W.; Machado, M. I. L., 1981. *Óleos essenciais de plantas donordeste*. UFC, 210 p.

Dias, C. N., Rodrigues, K. A. F., Carvalho, F.A. A., Carneiro, S. M. P., Maiac, J. G. S., Andrade, E. H. A., Moraes, D. F. C., 2013. Molluscicidal and Leishmanicidal Activity of the Leaf Essential Oil of *Syzygium cumini* (L.) Skeels from Brazil. *Chem. Biodiversity*. 10, 1133-1141.

Estevam, E. B. B., Miranda, M. L. D., Alves, J. M., Egea, M. B., Pereira, P. S., Martins, C. H. G., Esperandim, V. R., Magalhães, L. G., Bolela, A. C., Casal, C. M., Souza, A. F., Alves, C. C. F., 2016. Composição Química e Atividades Biológicas dos Óleos Essenciais das Folhas Frescas de *Citrus limonia* Osbeck e *Citrus latifolia* Tanaka (Rutaceae). *Rev. Virtual Quim.* 8, 1842-1854.

Fortes, G. A. C., Naves, S. S., Godoi, F. F. F., Duarte, A. R., Ferri, P. H., & Santos, S. C., 2011. Assessment of a maturity index in jaboticaba fruit by the evaluation of phenolic compounds, essential oil components, sugar content and total acidity. *American Journal of Food Technology*. 6, 974–984.

Giannelli, M., Chellini, F., Margheri, M., Tonelli, P., Tani, A., 2008. Effect of chlorhexidine digluconate on different cell types: a molecular and ultrastructural investigation. *Toxicol In Vitro*. 22, 308-317.

Gobbo-Neto, L. Lopes, N. P., 2007. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química nova*. 30, 374-381.

Gonçalves, T. A. P., Nisgoski, S., Oliveira, J. S. C., Marcati, R., Ballarin, A. W., Muñiz, G. I. B., 2016. A Contribution To The Identification Of Charcoal Origin In Brazil II – Macroscopic Characterization Of Cerrado Species. *An Acad Bras Cienc*. 16, 01-10.

Graebin, C. S., Madeira, M. D. E. F., Yokoyama-Yasunaka, J. K., Miguel, D. C., Uliana, S. R., Benitez, D., Cerecetto, H., González, M., Rosa, R.G., Eifler-Lima, V. L., 2010. Synthesis and in vitro activity of limonene derivatives against *Leishmania* and *Trypanosoma*. *Eur J Med Chem*. 45, 1524-1528.

Hamini-Kadar, N., Hamdane, F., Boutoutaou, R., Kihal, M., Henni, J. E., 2014. Antifungal activity of clove (*Syzygium aromaticum*) essential oil against phytopathogenic fungi of tomato (*Aolanum lycopersicum*) in Algeria. *JEBAS (Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences)*. 2, 447-454.

Holetz, F. B., Pessini, G. L., Sanches, N. R., Cortez, D. A. G., Nakamura, C. V., Dias, F. B. P., 2002. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 97, 1027p.

Horner, C., Mawer, D., Wilcox, M., 2012. Reduced susceptibility to chlorhexidine in staphylococci: is it increasing and does it matter?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 67, 2547-2559.

Igarashi, M. C., 2015. *Incorporação de antimicrobianos naturais em filme biodegradável à base de alginato para o controle de Listeria monocytogenes em embutido cárneo fatiado*. 105p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas), USP, São Paulo.

Imatomi, M., Novaes, P., Gualtieri, S.C.J., 2013. Interspecific variation in the allelopathic potential of the family Myrtaceae. *Acta bot. bras.* 27, 70-77.

Jacob, R. G., Oliveira, D. H., Dias, I. F. C., Schumacher, R. F., Savegnago, L., 2017. Óleos Essenciais como Matéria-Prima Sustentável para o Preparo de Produtos com Maior Valor Agregado. *Revista Virtual de Química*. 9, 01-23.

Judd, W. S., Campbell, C. S., Kellogg, E. A., Stevens, P. F., Donoghue, M. J., 1999. *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sunderland: Sinauer. apud Sobral, M., 2003. *A Família das Myrtaceae no Rio Grande do Sul*. São Leopoldo: Editora UNISINOS.

Kasim, L. S., Olaleye, K. O., Fagbohun, A. B., Ibitoye, S. F., Adejumo, O. E., 2014. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Essential Oils from *Struchium sparganophora* Linn. Ktze Asteraceae. *Advances in Biological Chemistry*. 4, 246-252.

Kumar, P., Mishra, S., Malik, A., Satya, S., 2012. Compositional analysis and insecticidal activity of Eucalyptus globulus (family: Myrtaceae) essential oil against housefly (*Musca domestica*). *Acta Tropica*. 122, 212 - 218.

Kumar, P. S., 2013. Oral microbiota and systemic disease. *Anaerobe*. 24, 90–93.

Lenardão, E. J., Freitag, R. A., Dabdoub, M. J., Batista, A. C. F., Silveira, C. C., 2003. “Green Chemistry” – Os 12 princípios da química verde e sua inserção nas atividades de ensino e pesquisa. *Química Nova*. 26, 123-129.

Lenardão, E. J., Silva, W. P., Jacob, R. G., Maia, D. S. V., Golbeck, J. C., Fonseca, S. F., 2015. Semi-synthetic compounds as antimicrobial agentes in food preservation. In: A. Méndez-Vilas. (Org.). *The Battle Against Microbial Pathogens: Basic Science, Technological Advances and Educational Programs*. 1, 576-583.

MMA - Ministério do Meio Ambiente., 2011. *Monitoramento do desmatamento nos biomas brasileiros por satélite - acordo de cooperação técnica MMA/IBAMA - Monitoramento do bioma Cerrado 2009-2010*. Brasília: MMA, 65 p.

Mohamed, A. A., Ali, S. I., El-Baz, F. K., 2013. Antioxidant and Antibacterial Activities of Crude Extracts and Essential Oils of *Syzygium cumini* Leaves. *Plos ONE*. 8, 01-07.

Morais, L. M., Conceição, G. M. da, Nascimento, J. M., 2014. Família Myrtaceae: Análise Morfológica e Distribuição Geográfica de uma Coleção Botânica. *Agrarian Academy*. 1, 317.

Mouna, M., Segni, L., 2014. Biological Activity of Essential Oil of *Eucalyptus Camendulensis* on Some Fungi and Bacteria. *Journal of Engineering Research and Applications*. 4, 71-73.

Nakano, V.; Avila-Campus, M. J., 2004. Virulence Markers and Antimicrobial Susceptibility of Bacteria of the *Bacteroides fragilis* Group Isolated from Stool of Children with Diarrhea in São Paulo, Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*. 99, 307p.

Peixoto, J. A., Silva, M. L. A., Crotti, A. E. M., Veneziani, R. C. S., Gimenez, V. M. M., Januário, A. H., Groppo, M., Magalhães, L. G., Santos, F. F., Albuquerque, S., Silva Filho, A. A., Cunha, W. R., 2011. Antileishmanial Activity of the Hydroalcoholic Extract of *Miconia langsdorffii*, Isolated Compounds, and Semi-Synthetic Derivatives. *Molecules*. 16, 1825-1833.

Pires, C. H., Paula, J. A. M., Tresvenzol, L. M. F., Ferri, P. H., Paula, J. R., Fiuza, T. S., Bara, M. T. F., 2013. Composição química e atividade antimicrobiana dos óleos essenciais das folhas e flores de *Callistemon viminalis* (sol. ex Gaertn.) G. Don ex. Loudon (Myrtaceae). *Rev Ciênc Farm Básica Apl*. 34, 597-601.

Probst, I. S., 2012. *Atividade antibacteriana de óleos essenciais e avaliação de potencial sinérgico*. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – UNESP, Botucatu.

Rodrigues, K. A. F., Amorim, L. V., Oliveira, J. M. G. de, Dias, C. N., Moraes, D. F. C., Andrade, E. H. A., Maia, J. G., Carneiro, S. S. M. P., Carvalho, F. A. A., 2013. *Eugenia uniflora* L. Essential Oil as a Potential Anti-*Leishmania* Agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and Possible Mechanisms of Action. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*. 10, 01-10.

Rodrigues, K. A. F., Amorim, L. V., Dias, C. N., Moraes, D. F. C., Carneiro, S. M. P., Carvalho F. A. A., 2015. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent  $\alpha$ -pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immuno modulation in vitro. *Journal of Ethno pharmacology*. 160, 32–40.

Rodríguez, O., Sánchez, R. M., Verde, M. J., Núñez, M. A., Castro, R., Chávez, A., 2014. Obtaining the essential oil of *Syzygium aromaticum*, identification of eugenol and its effect on *Streptococcus mutans*. *J Oral Res*. 3, 218-224.

Russell, A.D., 1999. Bacterial resistance to disinfectants: present knowledge and future problems. *J. Hosp. Infect*. 43, 57-68.

Santos, F. R., Braz-Filho, R., Castro, R. N., 2015. Influência da idade das folhas de *Eugenia uniflora* L. na composição química do óleo essencial. *Quim. Nova*. 38, 762-768.

Saroj, A., Pragadheesh, V. S., Palanivelu, Yadav, A., Singh, S. C. Samad, A., Negi, A. S., Chantova, C. S., 2015. et al. Anti-phytopathogenic activity of *Syzygium cumini* essential oil, hydrocarbon fractions and its novel constituents. *Industrial Crops and Products*. 74, 327–335.

Shukla, A. K., Patra, S., Dubey, V. K., 2011. Deciphering molecular mechanism underlying antileishmanial activity of *Nyctanthes arbor-tristis*, an Indian medicinal plant. *Journal of Ethnopharmacology*. 134, 996–998.

Siani, A. C., Souza, M. C., Henriques, M. G. M. O., Ramos, F. S., 2013. Anti-inflammatory activity of essential oils from *Syzygium cumini* and *Psidium guajava*. *Pharm. Biol.* 13, 01–07.

Soares, C. S. A., Silva, M., Costa, M. B., Bezerra, C. E. S., Carvalho, L. M., Soares, A. H. V., 2012. Atividade inseticida de óleos essenciais sobre *Macrosiphum euphorbiae* (Thomas) (Hemiptera: Aphididae) em roseira. *Revista Brasileira de Agroecologia.* 7, 169-175.

Sousa, R. M. F., Morais, S. A. L., Vieira, R. B. K., Napolitano, D. R., Guzman, V. B., Moraes, T. S., Cunha, L. C. S., Martins, C. H. G., Chang, R., Aquino, F. J. T., Nascimento, E. A., Oliveira, A., 2015. Chemical composition, cytotoxic, and antibacterial activity of the essential oil from *Eugenia calycina* Cambess. leaves against oral bacteria. *Industrial Crops and Products.* 65, 71–78.

Souza, G. H. B., Mello, J. C. P., Lopes, N. P., 2011. *Farmacognosia: Coletânea Científica*. Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 372p.

Stefanakis, M. K., Touloupakis, E., Anastasopoulos, E., Ghanotakis, D., Katerinopoulos, H. E., Makridis, P., 2013. Antibacterial activity of essential oils from plants of the genus *Origanum*. *Food Control.* 34, 539-546.

Stojković, D., Soković, M., Glamočlija, J., Džamić, A., Ćirić, A., Ristić, M., Grubišić, D., 2011. Chemical composition and antimicrobial activity of *Vitex agnus-castus* L. fruits and leaves essential oils. *Food Chemistry.* 128, 1017–1022.

Swami, S. B., Thakor, N. S. J., Patil, M. M., Haldankar, P. M., 2012. Jamun (*Syzygium cumini* (L.)): A Review of Its Food and Medicinal Uses. *Food and Nutrition Sciences.* 3, 1100-1117.

Taiz, L., Zeiger, E., 2013. *Fisiologia Vegetal*. 5.ed. Porto Alegre: Artmed, 848p.

Tariku, Y., Hymete, A., Hailu, A., Rohloff, J., 2011. In vitro Evaluation of Antileishmanial Activity and Toxicity of Essential Oils of *Artemisia absinthium* and *Echinops kebericho*. *Chemistry & Biodiversity.* 8, 614-623.

UNIANF® - União Química Farmacêutica Nacional S.A, 2015. *Anfotericina B*. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila\\_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=9032052015&pIdAnexo=2892182](http://www.anvisa.gov.br/datavisa/fila_bula/frmVisualizarBula.asp?pNuTransacao=9032052015&pIdAnexo=2892182)>. Acesso em: 21 de janeiro de 2017.

Victoria, F.N., Lenardão, E. J., Savegnago, L., Perin, G., Jacob, R. G., Alves, D., Da Silva, W. P., Da Motta, A. S., Nascente, P. S., 2012. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties. *Food and Chemical Toxicology.* 50, 2668–267.

Victoria, F. N., Brahm, A. S., Savegnagoc, L., Lenardão, E. J., 2013. Involvement of serotonergic and adrenergic systems on the antidepressant-like effect of *E. uniflora* L. leaves essential oil and further analysis of its antioxidant activity. *Neuroscience Letters.* 544, 105–109.

## **CAPÍTULO II - Atividade contra os fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani* dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* e *Syzygium cumini***

(Normas de acordo com o formato da Revista Brazilian Journal of Microbiology)

### **RESUMO**

O uso abusivo de defensivos agrícolas tem gerado graves desequilíbrios ambientais pela alta toxicidade que apresentam. Portanto, há necessidade de novos agentes antifúngicos naturais que apresentem menor toxicidade e maior eficácia. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a ação antifúngica dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* e *Syzygium cumini*, espécies Myrtaceae, sobre os fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia Solani*. Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação em Clevenger por 3 horas. A ação antifúngica dos óleos essenciais foi avaliada sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e *R. solani* em doses de 10 a 300 µL de óleo essencial, e foi determinado o Percentual de Inibição do Crescimento Micelial (PIC). Os óleos essenciais de *E. uniflora* e *S. cumini* reduziram o crescimento micelial dos fungos consideravelmente, apresentando PIC de 0 a 92% (*E. uniflora*) e 30 a 100% (*S. cumini*) sobre o fungo *S. sclerotiorum*, e PIC de 33 a 100% (*E. uniflora*) e 52 a 100% (*S. cumini*) sobre o fungo *R. solani*. Os resultados observados corroboram com a ideia de que os óleos essenciais possam ser utilizados como fungicidas naturais no controle de pragas agrícolas.

**Palavras-chaves:** Myrtaceae. Óleos essenciais. Atividade antifúngica. *Sclerotinia sclerotiorum*. *Rhizoctonia Solani*.

## **CHAPTER II - Activity against phytopathogenic fungi *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia solani* of essential oils of *Eugenia uniflora* and *Syzygium cumini***

(Standards in accordance with the Brazilian Journal of Microbiology journal)

### **ABSTRACT**

The indiscriminate use of pesticides has generated serious environmental imbalances due to their high toxicity. Therefore, there is a need for new natural antifungal agents that exhibit less toxicity and greater efficacy. Thus, the objective of this work was to evaluate the antifungal activity of the essential oils From *Eugenia uniflora* and *Syzygium cumini*, Myrtaceae species, on phytopathogenic fungi *Sclerotinia sclerotiorum* and *Rhizoctonia Solani*. The essential oils were extracted by hydrodistillation in Clevenger for 3 hours. The antifungal action of the essential oils was evaluated on the mycelial growth of *S. sclerotiorum* and *R. solani* in doses of 10 to 300  $\mu$ L of essential oil, and the percentage of inhibition of mycelial growth (PIC) was determined. The essential oils of *E. uniflora* and *S. cumini* reduced mycelial growth of the fungi considerably, presenting PIC from 0 to 92% (*E. uniflora*) and 30 to 100% (*S. cumini*) on *S. sclerotiorum* fungus, and PIC 33 to 100% (*E. uniflora*) and 52 to 100% (*S. cumini*) on fungus *R. solani*. The observed results corroborate the idea that the essential oils can be used as natural fungicides in the control of agricultural pests.

**Key words:** Myrtaceae. Essential oil. Antifungal activity. *Sclerotinia sclerotiorum*. *Rhizoctonia Solani*.

## 2.1. INTRODUÇÃO

De acordo com o Ministério do Meio Ambiente (2014), o Brasil é um dos maiores consumidores de defensivos agrícolas do mundo. Anualmente, cerca de 2,5 bilhões de dólares são empregados na aquisição desses produtos, sendo que o país é responsável pelo consumo de cerca de 50% da quantidade de defensivos utilizados em toda a América Latina. Como resultado do uso abusivo de defensivos agrícolas, ocorrem desequilíbrios ambientais, causando a contaminação de alimentos, animais e reservas hídricas, e ocasionando a redução na qualidade e na expectativa de vida da população. Assim, faz-se constante a busca de alternativas para o manejo fitossanitário compatíveis com a qualidade ambiental visada no manejo sustentável (Fonseca et al., 2015).

A demanda crescente por fontes alternativas de matéria-prima para as áreas industriais e a necessidade em reduzir o impacto dos processos químicos sobre o meio ambiente, tem colocado a biomassa como substituto natural dos produtos químicos sintéticos. Assim, a biomassa vegetal pode através de processos químicos e biotecnológicos ser transformada em substâncias úteis para as indústrias químicas (Jacob et al., 2017). E os óleos essenciais, que são produtos da biomassa vegetal, têm sido avaliados no combate de micro-organismos fitopatogênicos, principalmente, por possuírem variada composição química, apresentando propriedades antifúngicas, de forma natural, com menor toxicidade, maior eficácia e menor número de cepas resistentes do que fungicidas sintéticos, como o Frownicide que é um fungicida classificado como Classe I e considerado altamente tóxico (Pragadheesh et al., 2013). Assim, os óleos essenciais se tornam uma alternativa para substituírem os antifúngicos sintéticos, pois o tratamento de infecções fúngicas é limitado devido a toxicidade, a baixa eficiência e o desenvolvimento de resistência em algumas espécies pelo uso indiscriminado e inadequado dos fungicidas (Kumar et al., 2014; Stević et al., 2014).

A maioria das plantas são resistentes aos diferentes patógenos com os quais convivem, essa resistência pode estar relacionada à existência de substâncias antifúngicas



que são naturalmente produzidas. Portanto, espera-se que a descoberta de metabólitos naturais, como os óleos essenciais que sintetizados por diversas plantas que compõem a flora nativa e que têm apresentado efeito antimicrobiano e/ou antifúngico, possam contribuir para o controle das doenças das plantas e serem aplicados em produtos com finalidade biológica (Correa e Salgado, 2011). Além de apresentar atividade direta sobre fitopatógenos como bactérias, nematoides e fungos, ou indireta, ativando mecanismos de defesa das plantas aos patógenos, cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (Maia et al., 2015).

O potencial dos inseticidas e antifúngicos à base de princípios ativos vegetais proporciona a utilização de moléculas que, pela complexidade de composição, diminuem os riscos do aparecimento de resistência (Porto et al., 2013). Na bicamada fosfolipoproteica da membrana dos fungos está presente um esterol único aos fungos chamado ergosterol. A própria molécula de ergosterol, ou as enzimas utilizadas na sua rota biossintética são importantes alvos para a ação de alguns antifúngicos (Onyewu et al., 2003; Moreira, 2010). E alguns óleos essenciais estudados têm demonstrado ação antifúngica contra patógenos de difícil controle devido a sinergia dos compostos terpênicos que eles possuem, e que agem tanto na membrana celular, aumentando a permeabilidade, quanto na inibição da biossíntese do ergosterol (Romero et al., 2012; Khadhri et al., 2014).

A maior parte dos patógenos que causam doenças em plantas cultivadas podem ser veiculados e transmitidos principalmente pelas sementes, sendo que muitas possuem grande significado econômico, como acontece com o mofo branco (*Sclerotinia sclerotiorum*), considerado um patógeno de soja de importância mundial (Juliatti et al., 2013). Outro patógeno que causa grande preocupação é o fungo *Rhizoctonia solani* que ocorre em culturas como a batata, o feijão, o fumo, o milho e a soja, causando podridões radiculares no início do desenvolvimento das plantas e provocando redução no vigor e na germinação da semente. A incidência e a severidade do ataque estão associadas às condições do solo e a sequência de culturas cultivadas na área, afetando grandemente a produção destes alimentos e causando prejuízo econômico aos produtores rurais (Reis et al., 2014).

Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a ação antifúngica dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* e *Syzygium cumini*, espécies Myrtaceae, sobre os fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia Solani*.

## 2.2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.2.1 Material vegetal

A espécie *Eugenia uniflora* foi coletada no município de Santa Helena de Goiás, localizado no sudoeste do Estado de Goiás (latitude 17°48'35.9" e longitudes 50°36'52.2" com altitude média de 570 m ao nível do mar). A espécie *Syzygium cumini* foi coletada no Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano - Campus Rio Verde (latitude 17°48'28", longitude 50°53'57). As espécies foram identificadas no Herbário Jataiense Germano Guarim Neto, e depositadas como exsicata sob os números de identificação 7442 (*Eugenia uniflora*) e 7443 (*Syzygium cumini*). As folhas de cada espécie foram coletadas entre os meses de setembro/2015 a março/2016 às 18:00 horas do dia anterior às extrações, em pontos aleatórios da copa da planta. Após a coleta, as folhas foram transportadas para o Laboratório de Química de Produtos Naturais do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano – Campus Rio Verde, foram trituradas e procedeu-se a extração dos óleos essenciais

### 2.2.3. Extração dos óleos essenciais

Para a extração dos óleos essenciais utilizou-se o processo de hidrodestilação, e 100 g de amostra de cada espécie foi submetida ao processo de hidrodestilação utilizando aparelho do tipo Clevenger por 3 horas (Craveiro et al., 1981). Nesta extração, o material vegetal é imerso em água destilada sob aquecimento até à fervura, resultando na formação de componentes voláteis, os quais, após condensação, separam-se da fase aquosa por decantação. O óleo essencial foi extraído da fase aquosa utilizando uma partição líquido-líquido em funil de separação, por três sucessivas extrações de 15 minutos com 10 mL de diclorometano P.A. (100%) (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil). Sulfato de sódio anidro P.A. (100%) (Dinâmica, Diadema, São Paulo, Brasil) foi adicionado na mistura para separar o resíduo de água e posteriormente removido por filtração. A evaporação do diclorometano foi realizada a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) até que o óleo essencial apresentasse massa constante e por fim armazenados a 4°C até a realização das análises.

#### 2.2.4. Avaliação da atividade antifúngica dos óleos essenciais

Os isolados de *Sclerotinia sclerotiorum* Ss12 (BRM 29673) e *Rhizoctonia solani* utilizados no experimento foram cedidos pela Embrapa Arroz e Feijão, localizada em Santo Antônio de Goiás, GO. Os isolados foram mantidos em estufa de crescimento no Laboratório de Microbiologia Vegetal do Instituto Federal Goiano - Campus Rio Verde, até a sua utilização nos ensaios. A atividade antifúngica foi determinada seguindo metodologia utilizada por Silva et al. (2009) com adaptações. No ensaio, os óleos essenciais foram avaliados sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* e *R. solani*, em concentrações pré-definidas de 10, 20, 30, 40, 50, 100, 150, 200, 250 e 300  $\mu\text{L}$ . Como controle negativo, o tratamento testemunha não continha nenhum óleo essencial, e o controle positivo continha o fungicida frowncide 500 SC (Syngenta, Sorocaba, São Paulo, Brasil), na concentração de 10  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  do ingrediente ativo. As concentrações dos óleos essenciais ou o fungicida 500 SC (10 $\mu\text{L}$ ), foram adicionadas ao meio de cultura BDA (batata, dextrose e ágar) (Acumedia, Indaiatuba, São Paulo, Goiás), após esterilização e solidificação do meio, com auxílio da alça de Drigalski previamente esterilizada. Após isso, os discos de BDA (8 mm de diâmetro), contendo micélio com 7 dias de idade, foram depositados no centro das placas de Petri e incubadas à temperatura de  $23 \pm 3$  °C com fotoperíodo de 12 horas. A primeira avaliação medindo o halo de inibição foi realizada após 24 horas de incubação e até o crescimento total das testemunhas. A determinação da inibição do crescimento dos fungos foi realizada pela média das repetições para cada tratamento, através de valores de PIC (Percentual de Inibição do Crescimento Micelial) (Edginton et al., 1971).

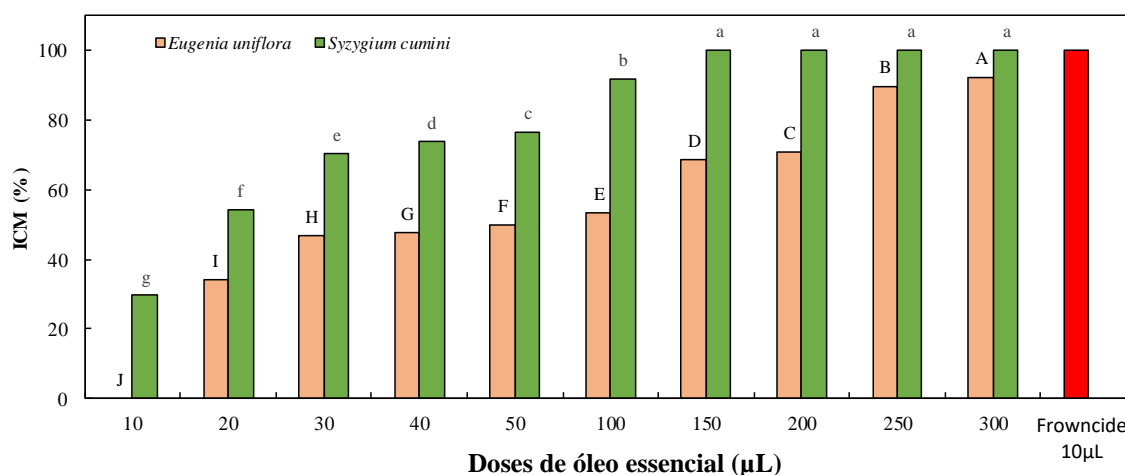
### 2.3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os óleos essenciais extraídos das folhas de *E. uniflora* e *S. cumini*, nas dosagens de 10 a 300  $\mu\text{L}$ , foram avaliados contra os fungos fitopatogênicos *Sclerotinia sclerotiorum* e *Rhizoctonia solani*. Foi avaliado o crescimento micelial dos fungos frente aos tratamentos recebidos e determinado o percentual de inibição micelial após um período, determinado de acordo com o crescimento total das testemunhas, sendo de 4 dias para o *S. sclerotiorum* e 9 dias para *R. solani*. Não houve crescimento micelial no controle negativo, demonstrando a ausência de contaminação cruzada no método utilizado. Os

resultados revelaram alta atividade fungicida para ambas as espécies sobre os dois fungos fitopatogênicos testados.

Os óleos essenciais de *E. uniflora* e *S. cumini* reduziram o crescimento micelial do fungo *S. sclerotiorum*, consideravelmente, em determinadas concentrações. A espécie *S. cumini* apresentou maior atividade de inibição do crescimento micelial, sendo que nas doses de 150 a 300  $\mu\text{L}$  de óleo essencial não houve crescimento do fungo. Já a espécie *E. uniflora* apresentou menor efeito inibidor, sendo que na dose de 10  $\mu\text{L}$  não houve inibição do crescimento micelial.

A partir da observação do crescimento micelial do fungo *S. sclerotiorum* foi determinado o percentual de inibição micelial dos óleos essenciais, conforme demonstrado na Figura 1. A espécie *E. uniflora* apresentou percentuais de inibição de 0 a 92%, tendo apresentado inibição dose-dependente. Já a espécie *S. cumini* apresentou percentuais de inibição de 30 a 100%, sendo que as doses de 150 a 300  $\mu\text{L}$  assim como o fungicida Frowncide (controle positivo) inibiram 100% do crescimento micelial e na mesma dose do Frowncide (10  $\mu\text{L}$ ) obteve  $\frac{1}{4}$  do efeito apresentado pelo fungicida.

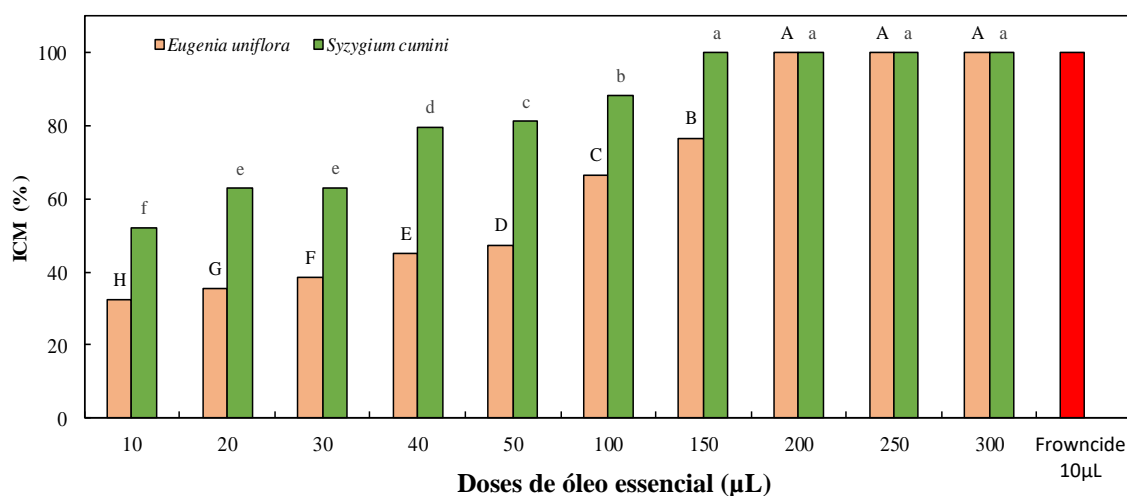


**Figura 1:** Percentual de inibição do crescimento micelial dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* e *Syzygium cumini* sobre o fungo *Sclerotinia sclerotiorum*. \*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para a espécie *E. uniflora* e minúsculas para a espécie *S. cumini*, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Analisando o crescimento micelial observado para o fungo *R. solani* também submetido a diferentes condições e tratamentos, observou-se atividade significativa quando comparado com o fungicida Frowncide (controle positivo). Os óleos essenciais de *E. uniflora* e *S. cumini* reduziram o crescimento micelial do fungo, consideravelmente, em determinadas doses de óleo essencial, chegando a inibir todo o crescimento micelial em doses mais elevadas. Para a espécie *E. uniflora* na dose de 300 $\mu\text{L}$  e a espécie *S. cumini*

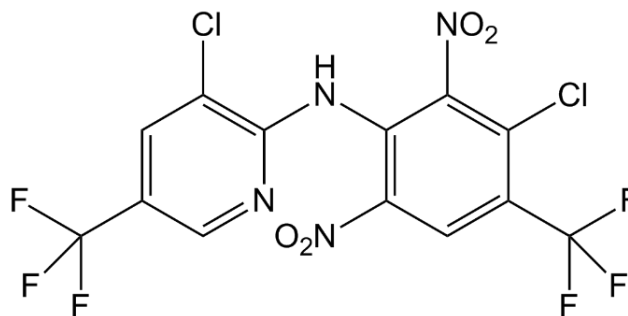
nas doses de 150 a 300 $\mu$ L houve a inibição total do crescimento micelial do fungo *R. solani*, assim como pelo fungicida Frowncide.

A Figura 2 demonstra o percentual de inibição micelial dos óleos essenciais sobre o fungo *R. solani*. Ambas as espécies demonstraram capacidade de inibição frente ao fungo testado, chegando a ter percentual de inibição de 100% assim como o fungicida Frowncide, nas doses de 150 a 300 $\mu$ L para a espécie *S. cumini* e 150 $\mu$ L para *E. uniflora*. E na mesma dose do Frowncide (10  $\mu$ L) as espécies *E. uniflora* e *S. cumini* apresentaram efeito de inibição de  $\frac{1}{3}$  e  $\frac{1}{2}$ , respectivamente, em relação ao fungicida.



**Figura 2:** Percentual de inibição do crescimento micelial dos óleos essenciais de *Eugenia uniflora* e *Syzygium cumini* sobre o fungo *Rhizoctonia solani*. \*Médias seguidas pela mesma letra, maiúsculas para a espécie *E. uniflora* e minúsculas para a espécie *S. cumini*, não diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

De acordo com dados técnicos fornecidos pela empresa Syngenta Proteção de Cultivos LTDA (2002), o fungicida Frowncide 500 SC, que possui como ingrediente ativo o composto Fluazinam (Figura 3), é considerado altamente perigoso ao meio ambiente, sendo fortemente persistente ao solo, bioconcentrável em peixes e altamente tóxico para organismos aquáticos em geral. Este fungicida é classificado como Classe I, considerado altamente tóxico. Assim, diante da alta toxicidade apresentada por fungicidas sintéticos atualmente utilizados, visa-se a busca de novos agentes antifúngicos naturais que apresentem menor toxicidade e maior eficácia. E com base nos resultados observados, os óleos essenciais das espécies *E. uniflora* e *S. cumini* se tornam fortes candidatos como fungicidas naturais contra micro-organismos fitopatogênicos.



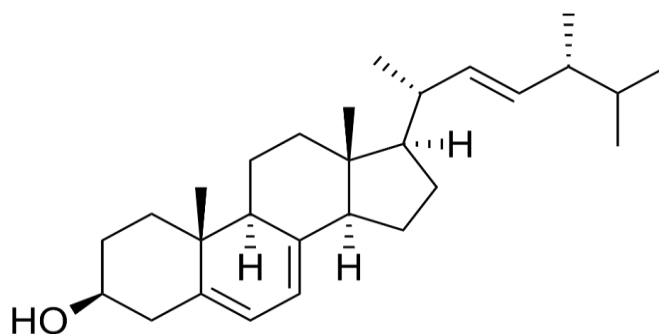
**Figura 3:** Estrutura química do Fluazinam

Alguns estudos presentes na literatura relatam a atividade antifúngica de óleos essenciais de outras espécies da família Myrtaceae sobre fungos fitopatogênicos. Saroj et al. (2015) analisaram o óleo essencial de *S. cumini* e alguns compostos isolados contra o fungo fitopatogênico *R. solani*. O óleo essencial de *S. cumini* apresentou percentual de inibição de 70%, em fase de contato, já os compostos isolados mostraram percentual de inibição de 95% (7-hidroxi-calameneno), 80% (7-acetoxialameneno), 76% (1-epi-cubenol) e 82% ( $\alpha$ -terpineol). Elgorban et al. (2015) observaram a ação antifúngica do óleo essencial da espécie Myrtaceae, *Eucalyptus globulus*, na concentração de 500ppm sobre os fungos *S. sclerotiorum* e *R. solani*, apresentando percentual de inibição de 100% para ambos os fungos. Rana et al. (2011) avaliaram o potencial antifúngico da espécie *Syzygium aromaticum* (L.), conhecida como cravo-da-índia, pertencente à família Myrtaceae, contra alguns fungos patogênicos *Fusarium moniliforme*, *Fusarium oxysporum*, *Aspergillus sp.*, *Mucor sp.*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporium gypseum*. Todas as espécies de fungos foram inibidas de forma satisfatória a partir da aplicação do óleo essencial da espécie Myrtaceae avaliada.

De acordo com Romero et al. (2012) os óleos essenciais podem causar a inibição de micro-organismos por diferentes mecanismos de ação. Os efeitos tóxicos na estrutura e função da membrana celular têm sido utilizados para explicar a ação antimicrobiana dos óleos essenciais e de seus componentes isolados, pois, alguns compostos terpênicos podem agir, ligam-se aos grupos aminas e hidroxilamina de proteínas presentes nas membranas das bactérias alterando sua permeabilidade e resultando na morte dessa bactéria. Esses efeitos estão associados ao caráter lipofílico de compostos terpênicos, como o limoneno,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, dentre outros, que constituem os óleos essenciais, e que de forma sinérgica e/ou isolada, sofrem partição da fase aquosa para dentro da membrana celular. Isto leva à expansão da membrana, aumento da fluidez e da

permeabilidade da célula, permitindo a liberação dos componentes intracelulares vitais à sobrevivência do micro-organismo (Kumar, 2014; Almeida et al., 2015).

Alguns estudos sugerem que a ação antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser consequência da inativação de enzimas, incluindo aquelas envolvidas no metabolismo energético e na síntese de componentes estruturais, além do aumento da permeabilidade da membrana celular e consequentemente a liberação de componentes intracelulares vitais para os micro-organismos (Kumar, 2014). De acordo com Ma et al. (2015), compostos terpenoides presentes nos óleos essenciais podem agir inibindo a biossíntese do Ergosterol (Figura 4), um esterol presente na membrana celular dos fungos, principalmente, por alguns terpenos possuírem estruturas parecidas com compostos intermediários e com o próprio Ergosterol, causando a inibição da enzima Citocromo P450 14  $\alpha$ - desmetilase que atua nesta síntese.



**Figura 4:** Estrutura química do Ergosterol

Assim, a atividade antifúngica observada para as espécies *E. uniflora* e *S. cumini* pode ser atribuída a presença dos compostos terpênicos, descritos como compostos majoritários dos óleos essenciais destas espécies no capítulo anterior (p. 43-49). Os principais compostos terpênicos são germacrona (8,52%), espatulenol (8,20%),  $\alpha$ -selineno (7,50%) e (Z)- $\beta$ -elemenona (4,88%) majoritários do óleo essencial de *E. uniflora*, e os compostos  $\alpha$ -pineno (21,20%), globulol (15,30%), e  $\alpha$ -terpineol (8,88%) majoritários do óleo essencial de *S. cumini*.

O composto fenólico eugenol, também reportado como majoritário para o óleo essencial de *S. cumini* no capítulo anterior (p. 43-49), com 11,20%, e por alguns autores (Dias et al., 2013; Rodriguez et al., 2014), tem demonstrado grande ação antifúngica frente aos fungos patogênicos e fitopatogênicos, pois, através da natureza ácida do grupo hidroxila, presente em sua estrutura, forma a ligação de hidrogênio com o centro ativo

das enzimas dos micro-organismos, impedindo as ações enzimáticas (Rana et al., 2011; Oliveira et al., 2016).

Conclui-se que os óleos essenciais de *E. uniflora* e *S. cumini* obtiveram ação antifúngica sobre os fungos fitopatogênicos *S. clerotiorum* e *R. solani* com elevados percentuais de inibição. Os compostos terpênicos presentes na composição dos óleos essenciais destas espécies, de acordo com relatos na literatura, seriam responsáveis pela atividade antifúngica observada. Esta atividade encontrada neste trabalho sugere que os óleos essenciais possam vir a ser utilizados como fungicidas naturais.

## 2.4. REFERÊNCIAS

Almeida, M.P.; Romero, R.B.; Romero, A.L.; Crespan, E.R. (2015). Explorando a química e a atividade antifúngica de óleos essenciais: Uma proposta de projeto para a Educação Básica. *Lat. Am. J. Sci. Educ.* 1, 21-26.

Correa, J.C.R.; Salgado, H.R.N. (2011). Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais.* 13, 500-506.

Craveiro, A.A.; Fernandes, A.G.; Andrade, C.H.S.; Matos, F.J.A.; Alencar, J.W.; Machado, M.I.L. (1981). *Óleos essenciais de plantas donordeste.* UFC, 210 p.

Dados Técnicos, *Frownicide 500 SC* – Syngenta Proteção de Cultivos LTDA. (2002). Disponível em: <[https://www.extrapratica.com.br/BR\\_Docs/English/Instructions/101checked.pdf](https://www.extrapratica.com.br/BR_Docs/English/Instructions/101checked.pdf)> Acesso em: 03 de janeiro de 2017.

Dias, C.N.; Rodrigues, K.A.F.; Carvalho, F.A.A.; Carneiro, S.M.P.; Maiac, J.G.S.; Andrade, E.H.A.; Moraes, D.F.C. (2013). Molluscicidal and Leishmanicidal Activity of the Leaf Essential Oil of *Syzygium cumini* (L.) Skeels from Brazil. *Chem. Biodiversity.* 10, 1133-1141.

Elgorban, A.M.; Bahkali, A. H.; El-Metwaly, M.A.; Elsheshtawi, M.; Abdel-Wahab, M. A. (2015). In vitro Antifungal Activity of Some Plant Essential Oils. *International Journal of Pharmacology.* 11, 56-61.

Fonseca, M.C.M.; Lehner, M.S.; Gonçalves, M.G.; Paula Júnior, T.J.; Silva, A.F.; Bonfim, F.P.G.; Prado, A.L. (2015). Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. *Rev. Bras. Pl. Med.* 17, 45-50.

Jacob, R. G.; Oliveira, D. H.; Dias, I. F. C.; Schumacher, R. F.; Savegnago, L. (2017). Óleos Essenciais como Matéria-Prima Sustentável para o Preparo de Produtos com Maior Valor Agregado. *Revista Virtual de Química.* 9, 01-23.



- Juliatti, F.C.; Crato, F.F.; Juliatti, F.C.; Couto, K. R.; Juliatti, B.C.M. (2013). Escala diagramática para avaliação da severidade de mofo branco em soja, *Biosci. J.*, Uberlândia. 29, 676-680.
- Khadhri, A.; Mokni, R.E.; Almeida, C.; Nogueira, J.M.F.; Araújo, M.E.M. (2014). Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia. *Industrial Crops and Products*. 52, 29– 31.
- Kumar, V.; Mathela, C.S.; Tewari, G.; Singh, D.; Tewari, A.K.; Bisht, K.S. (2014). Chemical composition and antifungal activity of essential oils from three Himalayan Erigeron species. *LWT - Food Science and Technology*. 56, 278-283.
- Maia, T.F.; Donato, A.; Fraga, M.E. (2015). Atividade antifúngica de óleos essenciais de plantas: revisão. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*. 17, 105-116.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente. *Informativo MMA*. (2014). Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/seguranca-quimica/eventos-novo/item/10660-seminario-regulacao-agrotoxebiocidas>>. Acesso em: 02 de janeiro de 2017.
- Moreira, T.M.S. (2010). *Estudo da composição química, citotoxicidade e alvos da atividade antifúngica de Melaleuca Alternifolia Cheel (Myrtaceae) e de Plinia Cauliflora (Mart.) Kausel (Myrtaceae)*. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – UNESP, Araraquara.
- Oliveira, L.B.S.; Batista, A.H.M.; Fernandes, F.C.; Sales, G.W.P.; Nogueira, N.A.P. (2016). Atividade antifúngica e possível mecanismo de ação do óleo essencial de folhas de *Ocimum gratissimum* (Linn.) sobre espécies de *Candida*. *Rev. Bras. Pl. Med.* 18, 511-523.
- Onyewu, C.; Blankenship, J.R.; Poeta, M. (2003). Ergosterol Biosynthesis Inhibitors Become Fungicidal when Combined with Calcineurin Inhibitors against *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida krusei*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 47, 956–964.
- Porto, K.R.A.; Roel, A.R.; Machado, A.A.; Cardoso, C.A.L.; Severino, E.; Oliveira, J.M. (2013). Atividade inseticida do líquido da castanha de caju sobre larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera: Culicidae). *R. bras. Bioci.* 11, 419-422.
- Pragadheesh, V.S.; Sarojc, A.; Yadav, A.; Samad, A.; Chanotiya, C.S. (2013). Compositions, enantiomer characterization and antifungal activity of two *Ocimum* essential oils. *Industrial Crops and Products*. 50, 333– 337.
- Rana, I.S.; Rana, A.S.; Rajak, R.C. (2011). Evaluation of Antifungal Activity in Essential Oil of the *Syzygium Aromaticum* (L.) by Extraction, Purification and Analysis of Its main component Eugenol. *Brazilian Journal of Microbiology*. 42, 1269-1277.
- Reis, A.A.; Santos, E.A.O.; Ceresini, P.C.; Prado, H.F.A. (2014). Produção de Amilases pelo patógeno *Rhizoctonia Solani Ag1-Ia* isolados de culturas de braquiária e soja. *Ciência & Tecnologia*. 6, 01-05.

Rodríguez, O.; Sánchez, R.M.; Verde, M.J.; Núñez, M.A.; Castro, R.; Chávez, A. (2014). Obtaining the essential oil of *Syzygium aromaticum*, identification of eugenol and its effect on *Streptococcus mutans*. *J Oral Res.* 3, 218-224.

Romero, A.L.; Specian, V.; Oliveira, R.C.; Diniz, S.S.S. (2009). Atividade do óleo essencial de tomilho (*Thymus vulgaris* L.) contra fungos fitopatogênicos. *Cient. Ciênc. Biol. Saúde.* 11,15-18.

Saroj, A.; Pragadheesh, V.S.; Palanivelu; Yadav, A.; Singh, S.C.; Samad, A.; Negi, A.S.; Chantova, C.S. (2015). et al. Anti-phytopathogenic activity of *Syzygium cumini* essential oil, hydrocarbon fractions and its novel constituents. *Industrial Crops and Products.* 74, 327–335.

Silva, A.C.; Sales, N.L.P.; Araújo, A.V.A.; Caldeira Júnior, C.F. (2009). Efeito in vitro de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolado do maracujazeiro. *Ciênc. Agrotec.* 33, 1853 -1860.

Stević, T.; Berić, T.; Šavikina, K.; Soković, M.; Gođevac, D.; Dimkić, I.; Stanković, S. (2014). Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Industrial Crops and Products.* 55, 116–122.

### 3. CONCLUSÕES GERAIS

Os óleos essenciais das espécies Myrtaceae, *E. uniflora*, *P. cauliflora* e *S. cumini* apresentaram variabilidade em sua composição química e em seu teor, quando comparados com estudos realizados por outros autores. O teor observado foi de 0,51% para *E. uniflora*, 0,05% para *P. cauliflora* e 0,03% para *S. cumini*. Em relação a composição química, foram identificados 34 compostos para o óleo essencial de *E. uniflora*, sendo os compostos majoritários o germacrona (8,52%), o espatulenol (8,20%), o  $\alpha$ -selineno (7,50%) e o (Z)- $\beta$ -elemenona (4,88%), para o óleo essencial de *P. cauliflora* foram identificados 38 compostos, sendo os compostos majoritários o (E)-cariofileno (14,69%),  $\beta$ -bisaboleno, (E,E)- $\alpha$ -farneceno (8,07%) e o globulol (7,86%), e para o óleo essencial de *S. cumini* foram identificados 52 compostos, sendo os compostos majoritários o  $\alpha$ -pineno (21,20%), o globulol (15,30%), o eugenol (11,20%), e o  $\alpha$ -terpineol (8,88%). Estes resultados corroboram com a ideia de que o teor e a composição química de óleos essenciais são influenciados por fatores abióticos e estímulos decorrentes do ambiente em que as espécies se encontram.

Os óleos essenciais de *E. uniflora*, *P. cauliflora* e *S. cumini* apresentaram atividade antibacteriana moderada sobre as bactérias orais testadas, com CIM de 100 a 400  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ . A ação bactericida observada, de acordo com relatos na literatura, estaria relacionada com a presença de compostos terpenoides, como  $\beta$ -cariofileno, germacreno D,  $\alpha$ -humulene, óxido de cariofileno, 1,8-cineol e o eugenol, que de forma isolada ou sinérgica, agem inibindo a biossíntese de compostos fundamentais para a célula dos micro-organismos bacterianos.

Quanto a atividade leishmanicida, os óleos essenciais de *E. uniflora*, *P. cauliflora* e *S. cumini* apresentaram ação promissora contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, com valores de  $\text{CI}_{50}$  de 0,46  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (*P. cauliflora*), 0,99  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (*E.*

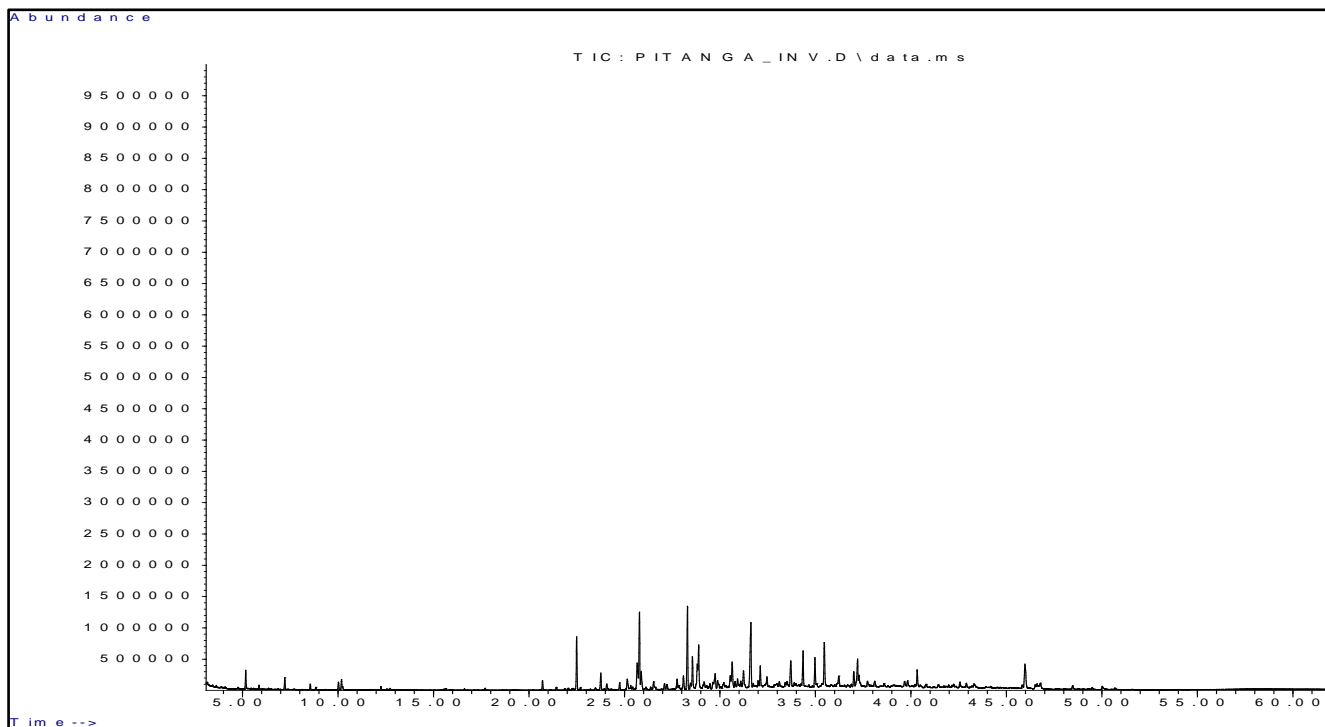
*uniflora*) e  $8,78 \mu\text{g.mL}^{-1}$  (*S. cumini*). A ação leishmanicida apresentada por óleos essenciais é atribuída a presença dos compostos,  $\alpha$ -pineno e limoneno, dentre outros compostos terpênicos que agem de forma sinérgica.

Em relação a ação antifúngica, os óleos essenciais de *E. uniflora* e *S. cumini* reduziram o crescimento micelial dos fungos fitopatogênicos consideravelmente, apresentando PIC de 0 a 92% (*E. uniflora*) e 30 a 100% (*S. cumini*) sobre o fungo *S. sclerotiorum*, e PIC de 33 a 100% (*E. uniflora*) e 52 a 100% (*S. cumini*) sobre o fungo *R. solani*. Sendo os compostos limoneno,  $\alpha$ -pineno e  $\beta$ -pineno, dentre outros, que constituem os óleos essenciais, descritos como responsáveis, de forma sinérgica e/ou isolada, pela inativação de enzimas, além da destruição ou inativação de material genético dos micro-organismos.

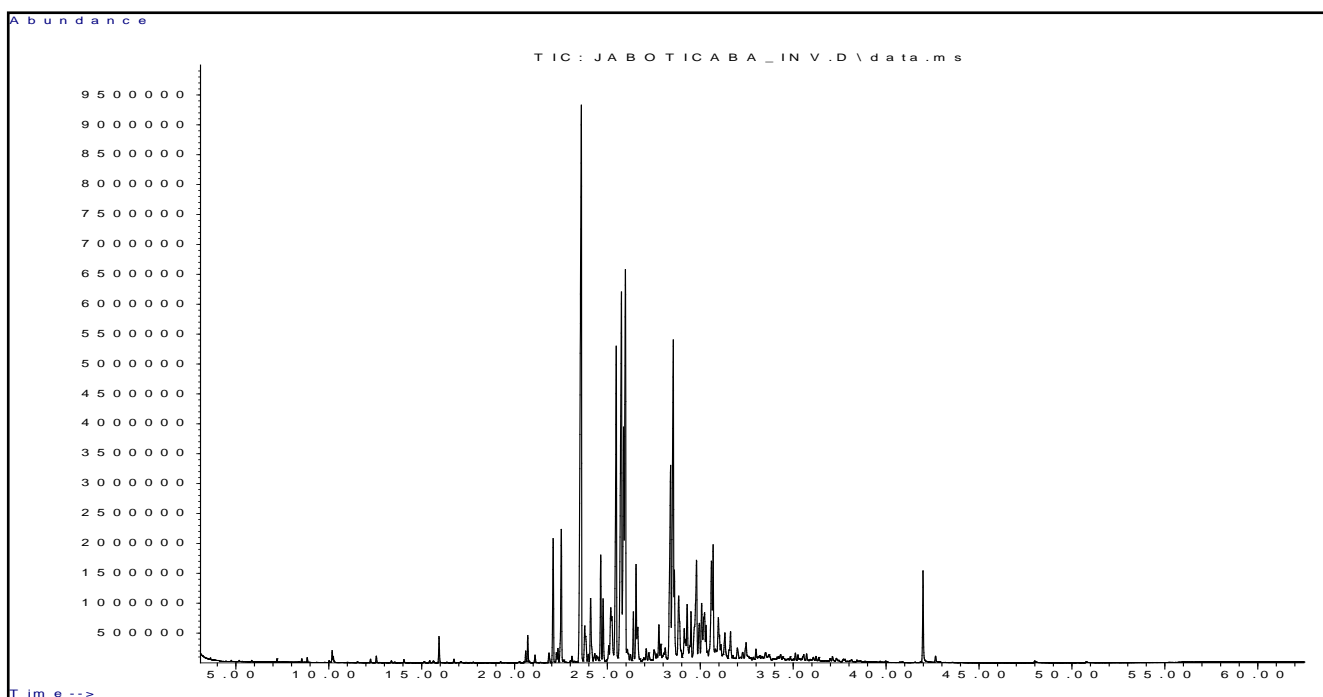
Os resultados descritos neste trabalho contribuem para pesquisas relacionadas às propriedades biológicas de óleos essenciais. As atividades antibacteriana, leishmanicida e antifúngica apresentadas por óleos essenciais são atribuídas a composição química apresentada pelos mesmos. Estudos posteriores são ainda necessários, quanto a avaliação da toxicidade e dos mecanismos de ação dos compostos que constituem os óleos essenciais, para que, possam vir a ser utilizados como bactericidas, leishmanicidas ou fungicidas naturais.

## 4. APÊNDICE

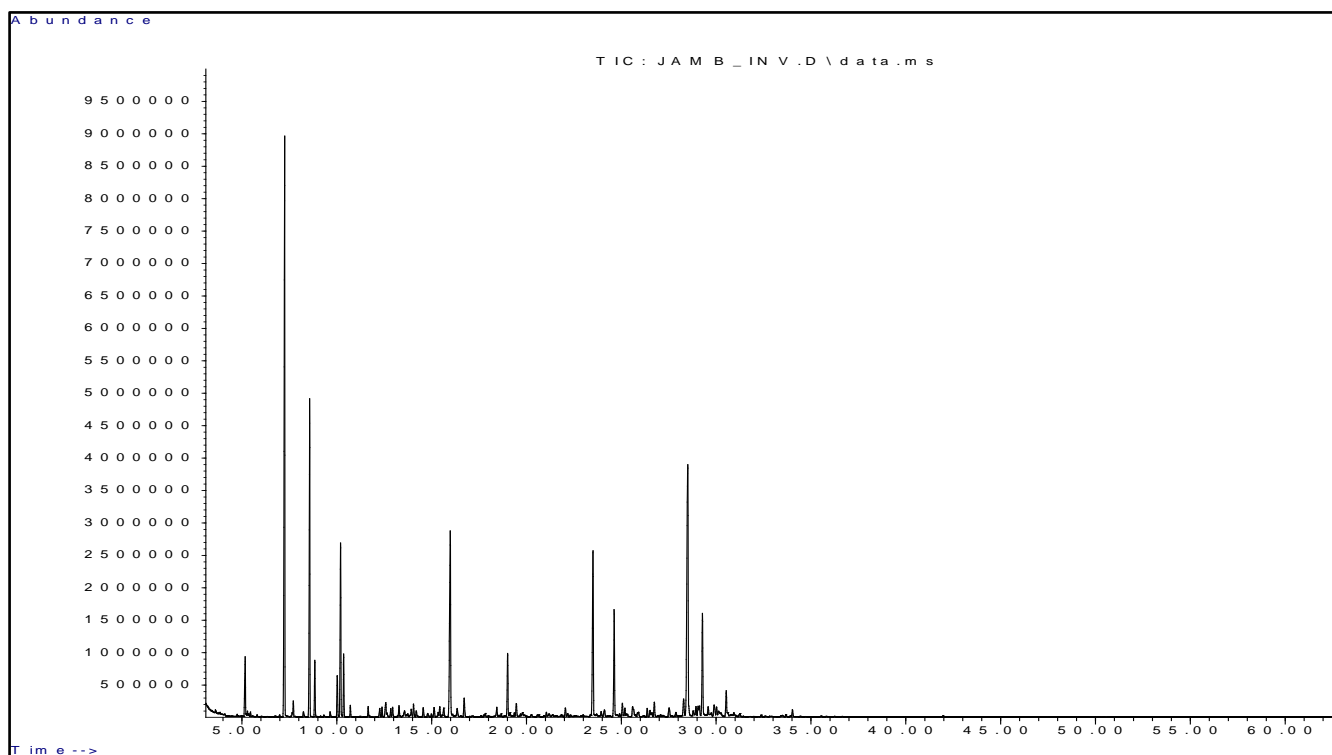
### 4.1. APÊNDICE A – Cromatogramas dos óleos essenciais de *E. uniflora*, *P. cauliflora* e *S. cumini*.



**Figura 1A:** Cromatograma do óleo essencial das folhas *in natura* de *Eugenia uniflora* coletadas em setembro de 2015 a março de 2016.



**Figura 2A:** Cromatograma do óleo essencial das folhas *in natura* de *Plinia cauliflora* coletadas em setembro de 2015 a março de 2016.



**Figura 3A:** Cromatograma do óleo essencial das folhas *in natura* de *Syzygium cumini* coletadas em setembro de 2015 a março de 2016.