

# Óleos essenciais de folhas de diversas espécies: propriedades antioxidantes e antibacterianas no crescimento espécies patogênicas<sup>1</sup>

Essential oils from leaves of various species: antioxidant and antibacterial properties on growth in pathogenic species

Cíntia Alvarenga Santos Fraga Miranda<sup>2</sup>, Maria das Graças Cardoso<sup>3\*</sup>, Luís Roberto Batista<sup>4</sup>, Leonardo Milani Avelar Rodrigues<sup>4</sup> e Ana Cristina da Silva Figueiredo<sup>5</sup>

**RESUMO** - Os óleos essenciais apresentam possibilidade de serem empregados nas indústrias de alimentos, bebidas, produtos de higiene pessoal e cosméticos para evitar ou reduzir a deterioração lipídica e a contaminação por micro-organismos. Este trabalho teve como objetivos avaliar as propriedades funcionais antimicrobianas e antioxidantes de óleos essenciais de folhas frescas de *Coniza bonariensis*, *Parthenium hysterophorus*, *Tithonia diversifolia*, *Ambrosia polystachya*, *Hedychium coronarium* e *Baccharis dracunculifolia*, extraídos por hidrodestilação. O potencial antioxidante foi avaliado pelas metodologias do consumo do radical DPPH e da inibição da oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico. A sensibilidade das bactérias *Salmonella Cholerasuis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* frente aos óleos essenciais foi determinada pela utilização do método de difusão em cavidade ágar. Os óleos essenciais destacaram-se pelo elevado conteúdo de terpenoides. Todos os óleos essenciais avaliados pela metodologia do sequestro do radical DPPH não apresentaram  $CI_{50}$  significativos. Pela metodologia do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, os óleos essenciais de *T. diversifolia* e *H. coronarium* não apresentaram atividades significativas e os de *C. bonariensis*, *P. hysterophorus*, *A. polystachya*, e *B. dracunculifolia* apresentaram  $CI_{50}$  superiores a maior concentração avaliada. Os óleos essenciais das espécies *C. bonariensis*, *T. diversifolia*, *H. coronarium* e de *B. dracunculifolia* apresentaram atividade antibacteriana para bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, com exceção do óleo volátil de *P. hysterophorus*, que não impediu o crescimento de nenhuma das cepas bacterianas testadas. O óleo essencial de *A. polystachya* apresentou potencial antibacteriano apenas nas cepas de *S. aureus*.

**Palavras-chave:** Óleos voláteis. Micro-organismos. Oxidação.

**ABSTRACT** - Essential oils can be employed in the food, drinks, toiletry and cosmetics industries to prevent or reduce lipid deterioration and contamination by microorganisms. The aim of this work was to evaluate the functional antimicrobial and antioxidant properties of essential oils of fresh leaves from *Coniza bonariensis*, *Parthenium hysterophorus*, *Tithonia diversifolia*, *Ambrosia polystachya*, *Hedychium coronarium* and *Baccharis dracunculifolia*, extracted by hydrodistillation. The methodologies used for assessing antioxidant potential were consumption of the DPPH radical and oxidation inhibition of the  $\beta$ -carotene/linoleic acid system. Sensitivity of the bacteria *Salmonella cholerasuis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to the essential oils was determined using the agar-well diffusion method. The essential oils were noteworthy for their high terpenoid content. None of the essential oils assessed by DPPH radical sequestration presented significant  $IC_{50}$ . Using  $\beta$ -carotene/linoleic acid methodology, the essential oils of *T. diversifolia* and *H. coronarium* showed no significant activity, and *C. bonariensis*, *P. hysterophorus*, *A. polystachya* and *B. dracunculifolia* showed  $IC_{50}$  greater than the highest concentration evaluated. The essential oils of *C. bonariensis*, *T. diversifolia*, *H. coronarium* and *B. dracunculifolia* displayed antibacterial activity for gram-negative and gram-positive bacteria, with the exception of the volatile oil of *P. hysterophorus*, which did not inhibit growth in any of the bacterial strains tested. The essential oil of *A. polystachya* displayed antibacterial activity only for strains of *S. aureus*.

**Key words:** Volatile oils. Microorganisms. Oxidation.

DOI: 10.5935/1806-6690.20160025

\*Autor para correspondência

<sup>1</sup>Recebido para publicação em 24/06/2013; aprovado em 14/07/2015

Parte da Tese de Doutorado do primeiro autor apresentada no Programa de Pós-Graduação em Agroquímica/DQI/UFLA

<sup>2</sup>Departamento de Agricultura, Universidade Federal de Lavras, DQI/UFLA, Lavras-MG, Brasil, 37.200-000, cintiafmiranda@yahoo.com.br

<sup>3</sup>Departamento de Química, Universidade Federal de Lavras, DQI/UFLA, Lavras-MG, Brasil, 37.200-000, mcardoso@dqf.ufla.br

<sup>4</sup>Departamento de Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Lavras, DQI/UFLA, Lavras-MG, Brasil, 37.200-000, luisrb@dca.ufla.br, leonardomilani19@yahoo.com.br

<sup>5</sup>Centro de Estudos do Ambiente e do Mar Lisboa, Faculdade de Ciências, Universidade de Lisboa, CBV, DBV, Lisboa, Portugal, 17.49-016, acsf@fc.ul.pt

## INTRODUÇÃO

O crescente interesse dos consumidores em ingredientes funcionais a partir de fontes naturais está permitindo a aplicação dos óleos essenciais nas indústrias de alimentos, bebidas, produtos de higiene pessoal e cosméticos, com o objetivo de evitar a deterioração lipídica, oxidação e a contaminação por micro-organismos. Aliado ao interesse do consumidor destaca-se o fato desses produtos de degradação gerarem enormes prejuízos da indústria pelo desenvolvimento de compostos tóxicos, que afetam gravemente a vida de prateleira de muitos produtos. Somam-se ainda a esses fatos a resistência crescente das bactérias aos antimicrobianos utilizados atualmente, além da possibilidade dos antioxidantes sintéticos mais empregados como o butil-hidroxi-anisol (BHA), 2,6-di-tert-butil-4-hidroxitolueno (BHT), tercbutil-hidroquinona (TBHQ) e galato de propila (PG) apresentarem efeito carcinogênico em experimentos com animais. Desta forma os óleos essenciais demonstram ser uma possibilidade viável para substituir ou associar-se a antioxidantes sintéticos e antimicrobianos convencionais, com a finalidade de diminuir a quantidade dessas substâncias nos alimentos (ANDRADE *et al.*, 2012; LANG; BUCHBAUER, 2012; SACCHETTI *et al.*, 2004).

Os óleos essenciais são metabólitos secundários extraídos de diversas partes de plantas, possuem composição química complexa e garantem aos vegetais vantagens adaptativas no meio em que estão inseridos (OUSSALAH *et al.*, 2007). A composição química dos óleos voláteis varia entre as espécies e partes de um mesmo vegetal. De acordo com Gobbo-Neto e Lopes (2007), uma mesma espécie botânica pode ser afetada pelo local de cultivo, condições de coleta, estabilização e estocagem, além dos fatores edafoclimáticos. Os constituintes dos óleos essenciais são principalmente os derivados terpênicos, como os mono e sesquiterpenos e os fenilpropanoides (SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

Segundo Gutierrez, Barry-Ryan e Bourke (2008), essas diversas combinações de constituintes químicos apresentadas pelos óleos essenciais, podem controlar a oxidação de alimentos e as bactérias que apresentam resistência consistentemente elevada a agentes antimicrobianos, tais como *Salmonella Cholerasuis*, *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*.

Diante da possibilidade de utilização dos óleos essenciais para aumentar a conservação, prolongar a validade de alimentos e diminuir o uso de antioxidantes sintéticos a agentes antimicrobianos, numerosos estudos têm se dedicado a demonstrar os potenciais promissores desses compostos no combate às bactérias patogênicas e aos radicais livres, tornando o emprego desses metabólitos uma alternativa viável ecológica

e economicamente (ANDRADE *et al.*, 2012; BURT, 2004; EBRAHIMABADI *et al.*, 2010; GUIMARÃES *et al.*, 2008; GUTIERREZ; BARRY-RYAN; BOURKE, 2008; JOSHI *et al.*, 2008; KULISIC *et al.*, 2004).

Embora os óleos essenciais representem uma possibilidade interessante para a preservação de alimentos, é necessário conhecer suas propriedades antibacterianas e antioxidantes, por meio da determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) e da Concentração de 50% de Inibição (CI<sub>50</sub>) desses metabólitos, estabelecendo assim uma correlação entre esses potenciais e a composição química dos mesmos (HYLDGAARD; MYGIND; MEYER, 2012). No presente experimento, relatam-se os resultados de um estudo destinado a comparar, pela primeira vez, as propriedades funcionais antimicrobianas e antioxidantes de óleos essenciais de folhas frescas das espécies botânicas *Coniza bonariensis*, *Parthenium hysterophorus*, *Tithonia diversifolia*, *Ambrosia polystachya*, *Hedychium coronarium* e *Baccharis dracunculifolia*.

## MATERIAL E MÉTODOS

### Material vegetal

As partes das folhas jovens (nervura e limbo) das espécies *C. bonariensis*, *P. hysterophorus*, *T. diversifolia*, *A. polystachya*, *H. coronarium* e *B. dracunculifolia* foram coletadas em plantas adultas no estágio de floração plena no Campus da Universidade Federal de Lavras, no município de Lavras/MG. A cidade de Lavras localiza-se no sul do estado de Minas Gerais (Brasil), 21°14' S, longitude 45°00' W Gr. e 918 m de altitude. As espécies foram coletadas no início da manhã de dias sem precipitação, no mês de fevereiro de 2012 e as exsiccatas foram depositadas no Herbário ESAL na UFLA, sob os registros de numeração 26945; 26944; 26947; 28948; 26942 e 26946, respectivamente.

Os óleos essenciais foram extraídos por hidrodestilação, utilizando um aparelho de Clevenger modificado adaptado a um balão de fundo redondo com capacidade de 4 litros, por um período de 2 horas conforme metodologia descrita pela Farmacopeia Brasileira (2010). O material obtido foi centrifugado por 5 minutos, e, os óleos foram acondicionados em frascos de vidro âmbar e armazenados sob refrigeração.

### Identificação e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

Nas análises de Cromatografia Gás-Líquido/Espectrometria de Massas (CGL/EM) foi utilizado um cromatógrafo Perkin Elmer Autosystem XL, equipado com uma coluna de sílica fundida DB-1 (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc.) acoplado a um espectrômetro de massas Perkin Elmer Turbomass (versão do software 4.1). A temperatura

do forno foi programada de 45 a 175 °C, aumentando 3 °C/min, e subsequentemente 15 °C/min até 300 °C. Atingidos 300 °C, a temperatura foi mantida constante durante 10min; temperatura da linha de transferência, 280 °C; temperatura da câmara de ionização, 220 °C; gás de arraste, hélio, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s e relação de repartição de fluxo, 1:40. A identidade dos compostos foi determinada por comparação dos seus índices de retenção, em relação aos dos n-alcenos C<sub>9</sub>-C<sub>21</sub> e espectros de massas, com os padrões comerciais e compostos de referência presentes em óleos existentes no laboratório e por comparação com uma biblioteca de espectros de massas desenvolvida no Laboratório do Centro de Biotecnologia Vegetal da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa (MENDES *et al.*, 2011).

Os óleos essenciais foram analisados por Cromatografia Gás-Líquido (CGL), num cromatógrafo Perkin Elmer 8700 equipado com dois detectores de ionização de chama (DIC), um sistema de tratamento de dados e um injetor, no qual foram instaladas duas colunas de polaridade diferente com as seguintes características: DB-1 de sílica fundida, de fase imobilizada em metilsilicone (30 m x 0,25 mm d.i., espessura de filme 0,25 µm; J & W Scientific Inc.); DB-17HT de fase imobilizada em fenilmetilsilicone (30 m x 0,25 mm d.i.). A temperatura do forno foi programada de 45 a 175 °C, aumentando 3 °C/min, e subsequentemente 15 °C/min até 300 °C. Atingidos 300 °C a temperatura foi mantida constante durante 10 min. A temperatura do injetor e dos detectores foram de 290 °C e 280 °C, respectivamente. Utilizou-se hidrogênio como gás de arraste, ajustado para uma velocidade linear de 30 cm/s. e a relação de repartição de fluxo foi de 1:50.

A composição percentual dos óleos foi determinada pela integração das áreas dos picos sem utilização de fatores de correção. Os valores apresentados correspondem ao valor médio de duas injeções.

### Ensaio de atividade antioxidante

O potencial antioxidante dos óleos essenciais foi avaliado pelas metodologias do consumo do radical DPPH e da inibição da oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico. Para fins de comparação foram empregados os padrões timol e ácido ascórbico, por possuírem atividade antioxidante reconhecida e o antioxidante sintético BHT. Todas as análises foram realizadas em triplicata, sendo calculada a média dos resultados.

### Análise quantitativa da atividade antioxidante pelo consumo do radical livre DPPH

Este ensaio foi realizado de acordo com metodologia descrita por Sousa *et al.* (2007), com algumas modificações. Preparou-se uma solução estoque de DPPH em metanol na concentração de 40 µg mL<sup>-1</sup>. As amostras foram diluídas em metanol nas concentrações

de 250; 200; 150; 100; 50 e 25 µg mL<sup>-1</sup>. As medidas das absorbâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução das amostras e 2,7 mL da solução de DPPH) foram realizadas no tempo de 60 minutos e as leituras foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis (SHIMATZU UV-160 1PC), no comprimento de onda 515 nm. Como branco, utilizaram 2,7 mL de metanol e 0,3 mL da solução metanólica mais concentrada de cada amostra e, como controle, empregaram-se 2,7 mL de solução estoque de DPPH e 0,3 mL de metanol. Os valores de absorbância foram convertidos em porcentagem de atividade antioxidante. Para determinação da CI<sub>50</sub>, construiu-se uma curva, plotando-se na abscissa as concentrações das amostras (µg mL<sup>-1</sup>) e, na ordenada, a porcentagem de atividade antioxidante.

### Análise quantitativa da atividade antioxidante pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico

A determinação da atividade antioxidante no sistema ácido linoleico/β-caroteno foi realizada conforme metodologia descrita por Lopes-Lutz *et al.* (2008), com algumas modificações. A uma solução contendo β-caroteno (2 mg) e clorofórmio (10 mL), foram adicionados 20 mg de ácido linoleico e 200 mg Tween 20. O clorofórmio foi totalmente evaporado em evaporador rotatório. Posteriormente, adicionaram-se 50 mL de água destilada, previamente saturada com oxigênio por 30 minutos (emulsão A). Alíquotas (200 µL) de cada amostra foram dissolvidas em metanol, nas concentrações de 250; 200; 150; 100; 50 e 25 µg mL<sup>-1</sup> e, em seguida, foram adicionadas a 2,5 mL de emulsão de ácido linoleico/β-caroteno. As amostras foram submetidas à oxidação, incubando-as a 50 °C por 60 minutos. Como branco, utilizou-se a emulsão A sem o β-caroteno (2,5 mL) e 200 µL da solução metanólica mais concentrada de cada amostra e, como controle, empregaram-se 2,5 mL da emulsão de β-caroteno e 200 µL de metanol. A absorbância foi lida a 470 nm e a atividade antioxidante relativa foi determinada. Foram plotados gráficos com os percentuais da degradação do β-caroteno *versus* as concentrações analisadas, para a obtenção da CI<sub>50</sub>.

### Ensaio biológicos

As bactérias empregadas foram cepas padrões ATCC, previamente purificadas e mantidas em eppendorfs contendo meio de congelamento de *Salmonella choleraesuis* ATCC 6539, *Listeria monocytogenes* ATCC 19117, *Staphylococcus aureus* ATCC 13565 e *Escherichia coli* ATCC 11229. Para a ativação das culturas, as cepas foram ativadas em caldo BHI, com posterior incubação em BOD 37 °C, por 24 horas para a obtenção do inóculo.

A sensibilidade das bactérias frente aos óleos essenciais foi determinada pelo método de difusão em cavidade ágar. Após ativação das bactérias,

alíquotas desse meio foram transferidas para um tubo com 5 mL de caldo de soja triptica (TSB). Os tubos foram incubados a 37 °C, até alcançar a turbidez de uma solução-padrão McFarland de 0,5, o que resultou em uma suspensão contendo 10<sup>8</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. As leituras de turbidez foram realizadas utilizando espectrofotômetro (Shimadzu UV-160 1 PC), no comprimento de onda de 625 nm (NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS, 2003).

A concentração do inóculo obtida pela solução-padrão McFarland de 0,5 foi diluída em TSB até a concentração de 10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>, sendo, posteriormente transferida para o meio de cultura TSA, para a espécie *L. monocytogenes*, e para as demais espécies, transferida para o Ágar Mueller-Hinton. Nos meios de cultura foram colocadas pérolas de vidro, para a formação dos poços de deposição, os quais foram preenchidos com 10 µL do óleo essencial diluído em dimetilsulfóxido (DMSO), nas concentrações de 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,90 µL mL<sup>-1</sup>. Para o controle positivo 10 µL de cloranfenicol (100 µg mL<sup>-1</sup>) foram depositados no poço. Como controle negativo foi utilizado à mesma quantidade de dimetilsulfóxido (DMSO). As placas foram incubadas em BOD 37 °C por 24 horas. Decorrido esse tempo, foram medidas as circunferências dos halos formados, com três repetições para cada tratamento. A CMI foi definida como a menor concentração do óleo essencial em que foi observada a formação do halo de inibição.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

### Caracterização química e quantificação dos constituintes dos óleos essenciais

Os compostos majoritários do óleo essencial de *C. bonariensis* foram o limoneno (56,7%), o *trans*-β-

ocimeno (26,3%) e o *cis*-verbenol (4,4%), no óleo de *P. hysterophorus*, o germacreno-D (35,9%), o *trans*-β-ocimeno (8,5%) e o β-mirceno (7,6%), enquanto no óleo de *T. diversifolia* foram o β-pineno (38,3%), o α-pineno (28,6%) e o limoneno (8,8%). No óleo essencial de *A. polystachya* foram encontrados como componentes majoritários o germacreno-D (29,3%), o *trans*-β-ocimeno (13,6%) e o β-cariofileno (9,8%), no de *H. coronarium*, o β-pineno (46,9%), o α-pineno (19,2%), o β-cariofileno (13,2%), enquanto no de *B. dracunculifolia*, o limoneno (30,9%), o *trans*-nerolidol (22,4%) e o β-pineno (14,5%).

Em relação à composição desses óleos essenciais, pôde-se destacar o elevado conteúdo de terpenoides, em que os monoterpênicos predominaram nos óleos essenciais de *C. bonariensis*, *T. diversifolia*, *H. coronarium* e *B. dracunculifolia* e os sesquiterpenoides nos óleos voláteis de *P. hysterophorus* e *A. polystachya* (Tabela 1). Santos *et al.* (2006) destacaram os monoterpênicos e os sesquiterpenoides como os principais compostos encontrados nos óleos voláteis, corroborando com os dados encontrados.

### Atividade antioxidante

Os óleos essenciais são uma mistura complexa de dezenas de compostos com diferentes comportamentos, grupos funcionais e polaridade. Devido a essa complexidade estrutural, Wang *et al.* (2008) afirmam que o efeito antioxidante de um óleo essencial não pode ser atribuído a um ou alguns de seus constituintes, visto que além dos compostos principais, os constituintes encontrados em concentrações menores podem contribuir de forma significativa para a atividade do óleo. Anteriormente Kulisic *et al.* (2004) salientaram a importância da utilização de diferentes metodologias avaliadoras da atividade antioxidante, para tentar descrever a capacidade de combater os radicais livres apresentadas por esses metabólitos. Nas metodologias empregadas no presente

**Tabela 1** - Percentual de constituintes químicos agrupados dos óleos essenciais das folhas de *C. bonariensis* (Cb), *P. hysterophorus* (Ph), *T. diversifolia* (Td), *A. polystachya* (Ap), *H. coronarium* (Hc) e *B. dracunculifolia* (Bd)

Componentes agrupados	%					
	Cb	Ph	Td	Ap	Hc	Bd
Monoterpenos hidrocarbonetos	86,6	18,8	86,1	32,7	75,8	58,2
Monoterpenos oxigenados	5,6	1,3	0,2	1,5	8,5	0,3
Sesquiterpenos hidrocarbonetos	3,4	47,4	5,8	48,8	14,2	9,1
Sesquiterpenos oxigenados	1,7	6,1	7,6	13,9	0,7	27,5
Diterpenos oxigenados	v	0,6	v	0,4	v	v
Outros	v	1,6	v	v	v	v
Total	97,3	75,7	99,7	97,3	99,2	95,2

v: vestigial (<0,05%)

estudo, a capacidade de cada óleo essencial de combater os radicais, foi determinada com base nas respectivas  $CI_{50}$ . Os valores de  $CI_{50}$  para a atividade antioxidante dos óleos essenciais, antioxidantes sintéticos, BHT, ácido ascórbico e padrão timol, pelos métodos do sequestro de radicais DPPH e do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico estão descritos na Tabela 2.

De acordo com os dados apresentados pôde-se observar que todos os óleos essenciais avaliados não apresentaram habilidade em capturar radicais estáveis DPPH, não apresentando atividades antioxidantes consideráveis. O timol apresentou  $CI_{50}$  superior à maior concentração avaliada, ao contrário dos compostos antioxidantes padrões, ácido ascórbico e BHT, que demonstraram eficiência no combate aos radicais DPPH, reduzindo as absorbâncias das soluções. As baixas atividades apresentadas pelos óleos essenciais podem ser explicadas pelo fato dos mesmos serem pouco solúveis nas condições do experimento e, segundo Andrade *et al.* (2012), essa metodologia deve ser aplicada, principalmente para compostos hidrofílicos, como o ácido ascórbico, justificando seu elevado desempenho em sequestrar os radicais DPPH.

O ensaio do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico é apropriado para avaliar antioxidantes lipofílicos, como os óleos essenciais que, de acordo com Kulisic *et al.* (2004), explica a atividade reduzida de moléculas polares, como o ácido ascórbico. Entre os óleos essenciais estudados, o de *T. diversifolia* e *H. coronarium* não apresentaram atividades significativas e os óleos das espécies *C. bonariensis*, *P. hysterophorus*, *A. polystachya*, e *B. dracunculifolia* apresentaram  $CI_{50}$  superiores à maior concentração avaliada ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Essa baixa atividade pode ser explicada pelo

fato de que, os constituintes majoritários dos óleos avaliados no presente experimento, não serem compostos que contêm átomos de hidrogênio na posição alílica e/ou posições benzílicas. Segundo Ebrahimabadi *et al.* (2010), os compostos fenólicos são aqueles que mostram melhor atividade nessa metodologia, devido a abstração relativamente fácil de um átomo de hidrogênio a partir desses grupos funcionais, por radicais peróxidos nas circunstâncias do teste.

As atividades antioxidantes dos óleos essenciais extraídos das folhas de *C. bonariensis*, *P. hysterophorus*, *T. diversifolia*, *A. polystachya*, *H. coronarium* e *B. dracunculifolia* não foram descritos anteriormente na literatura. Entretanto, a composição química e as propriedades antioxidantes do óleo essencial extraídos dos rizomas da espécie *H. coronarium*, coletados na Índia, foram estudadas por Joshi *et al.* (2008), que empregaram as metodologias do sequestro de radicais DPPH, da redução do  $\text{Fe}^{3+}$  e quelação do  $\text{Fe}^{2+}$ . Os autores encontraram como constituintes majoritários desse óleo, o diterpeno trans-meta-menta-2,8-dieno (25,2%) e os monoterpenos linalol (21,7%) e  $\alpha$ -terpineol (10,9%). De acordo com as análises do seu potencial antioxidante, observaram moderados potenciais na redução do  $\text{Fe}^{3+}$ , na capacidade dose-dependente de quelar  $\text{Fe}^{2+}$ , através da ferrozina e na habilidade de sequestrar radicais DPPH. Os resultados encontrados pelos referidos autores não corroboraram com os encontrados no presente estudo, por se tratarem de constituintes químicos e consequentemente potenciais antioxidantes distintos. De acordo com Gobbo-Neto e Lopes (2007), os metabólitos secundários encontrados em diferentes partes de uma mesma espécie botânica são diferentes, o que justifica essas divergências verificadas.

**Tabela 2** - Atividade antioxidante dos óleos essenciais de *C. bonariensis*, *P. hysterophorus*, *T. diversifolia*, *A. polystachya*, *H. coronarium* e *B. dracunculifolia*, timol e ácido ascórbico pelos métodos de sequestro de radicais DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila) e da inibição da oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico

Amostras	Metodologias	
	DPPH	$\beta$ -caroteno/ácido linoleico
	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$CI_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
<i>C. bonariensis</i>	NI	> 250
<i>P. hysterophorus</i>	NI	> 250
<i>T. diversifolia</i>	NI	NI
<i>A. polystachya</i>	NI	> 250
<i>H. coronarium</i>	NI	NI
<i>B. dracunculifolia</i>	NI	> 250
BHT	48,84	< 25
Timol	> 250	105,82
Ácido Ascórbico	44,36	118,15

\* $CI_{50}$ : Concentração de inibição de 50%, \*\*NI: não apresentou inibição na faixa das concentrações avaliadas

### Atividade antibacteriana

O potencial antibacteriano dos óleos essenciais pode ser atribuído, segundo Solórzano-Santos e Miranda-Novales (2012), à hidrofobicidade dos mesmos, o que lhes permite partição com os lípidios da membrana celular e mitocôndrias das bactérias, causando perturbação das estruturas celulares e aumentando a permeabilidade da membrana, provocando o vazamento de moléculas essenciais à sua sobrevivência e levando as bactérias à morte. Os resultados da avaliação antimicrobiana dos óleos essenciais estão sumarizados na Tabela 3, onde os valores de CMI dos óleos essenciais desse estudo estão expressos.

A análise dessas CMI permitiu afirmar que os óleos essenciais das espécies avaliadas foram mais eficientes para inibir bactérias Gram-positivas, apresentando CMI menores que as Gram-negativas. De acordo com Mann, Cox e Markham (2000), esse comportamento pode ser explicado pelo fato das bactérias Gram-negativas possuírem uma membrana externa que impede a penetração de macromoléculas e compostos hidrofóbicos, aumentando sua resistência aos óleos essenciais. Entre as bactérias avaliadas, a *E. coli* mostrou-se mais resistente aos óleos avaliados, sendo inibida somente pelo óleo essencial de *H. coronarium*. Já o óleo essencial de *P. hysterothorus* não inibiu o crescimento de nenhuma das bactérias avaliadas.

Os óleos essenciais com conteúdos maiores de monoterpenos mostraram-se mais eficientes na inibição do crescimento bacteriano. O óleo essencial de *C. bonariensis* mostrou-se efetivo contra as cepas de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *S. Choleraesuis*, o de *T. diversifolia* sobre as cepas de *S. aureus* e *S. Choleraesuis*, o de *H. coronarium* nas cepas de *S. aureus*, *L. monocytogenes* e *E. coli* e o de

*B. dracunculifolia* sobre as cepas de *L. monocytogenes* e *S. Choleraesuis*. Os óleos essenciais ricos em sesquiterpenoides mostraram-se menos ativos na inibição do crescimento das bactérias avaliadas, sendo que o de *P. hysterothorus* não impediu o crescimento de nenhuma das cepas bacterianas testadas nesse experimento; o de *A. polystachya* apresentou potencial antibacteriano apenas em cepas de *S. aureus*. Essa atividade antibacteriana sobre bactérias Gram-negativas apresentadas por monoterpenoides pode ser justificada, pela capacidade desses compostos de chegarem ao citoplasma dessas bactérias, passando pelos poros de proteínas presentes em sua membrana externa (HELANDER *et al.*, 1998).

Os óleos essenciais de *C. bonariensis*, *P. hysterothorus*, *T. diversifolia*, *A. polystachya* e *H. coronarium* não tiveram suas propriedades antibacterianas descritas anteriormente. A atividade antibacteriana do óleo essencial das folhas de *B. dracunculifolia* coletadas no Paraná, sobre as bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 pelo método da difusão em disco de papel foi avaliada por Ferronato *et al.* (2007). Esses aplicaram o óleo essencial diretamente nos discos (nas concentrações de 1; 3; 5 e 10 µL/disco) incubando as placas a 36 °C por 24 a 48 horas, usando cloranfenicol e amoxicilina como controles. Como resultados os autores verificaram que o óleo apresentou atividade antimicrobiana contra todas as bactérias avaliadas, ao contrário do presente experimento, em que o óleo de *B. dracunculifolia* inibiu o crescimento das bactérias *L. monocytogenes* e *S. Choleraesuis*. Esta divergência de potencial antibacteriana entre os óleos essenciais da mesma espécie botânica coletada em diferentes localidades, possivelmente deve-se às diferenças entre as constituições químicas desses óleos

**Tabela 3** - Concentração mínima inibitória dos óleos essenciais de *C. bonariensis*, *P. hysterothorus*, *T. diversifolia*, *A. polystachya*, *H. coronarium* e *B. dracunculifolia*, cloranfenicol e dimetilsulfóxido encontrada para as bactérias *S. aureus*, *L. monocytogenes*, *E. coli*, e *S. Choleraesuis*

Amostras	CMI (µL mL <sup>-1</sup> )			
	<i>S. aureus</i>	<i>L. monocytogenes</i>	<i>E. coli</i>	<i>S. Choleraesuis</i>
Gram	+	+	-	-
<i>C. bonariensis</i>	15,62	500	NI	3,9
<i>P. hysterothorus</i>	NI	NI	NI	NI
<i>T. diversifolia</i>	15,62	NI	NI	250
<i>A. polystachya</i>	125	NI	NI	NI
<i>H. coronarium</i>	125	250	250	NI
<i>B. dracunculifolia</i>	NI	3,9	NI	500
CL	I	I	I	I
DMSO	NI	NI	NI	NI

\*NI: não ocorreu inibição, I: ocorreu inibição, CL: Cloranfenicol (100 µL mL<sup>-1</sup>), DMSO: dimetilsulfóxido

essenciais, que segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), podem variar de acordo com localidade e época de coleta da espécie vegetal, ciclo vegetativo e fatores edafoclimáticos, o que corrobora com os dados encontrados.

## CONCLUSÕES

1. Os óleos essenciais extraídos das folhas de *C. bonariensis*, *P. hysterophorus*, *T. diversifolia*, *A. polystachya*, *H. coronarium* e de *B. dracunculifolia* destacaram-se pelo elevado conteúdo de terpenoides, onde os monoterpenoides predominaram nos óleos essenciais de *C. bonariensis*, *T. diversifolia*, *H. coronarium* e *B. dracunculifolia* e os sesquiterpenoides nos óleos de *P. hysterophorus* e *A. polystachya*;
2. Todos os óleos essenciais avaliados pela metodologia do sequestro do radical DPPH não apresentaram  $CI_{50}$  significativos. Pela metodologia do  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, os óleos essenciais de *T. diversifolia* e *H. coronarium* não apresentaram atividades significativas e os de *C. bonariensis*, *P. hysterophorus*, *A. polystachya*, e *B. dracunculifolia* apresentaram  $CI_{50}$  superiores à maior concentração avaliada ( $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ );
3. Os óleos essenciais das espécies *C. bonariensis*, *T. diversifolia*, *H. coronarium* e de *B. dracunculifolia* apresentaram atividade antibacteriana para bactérias Gram-negativas e para bactérias Gram-positivas, com exceção do óleo volátil de *P. hysterophorus*, que não impediu o crescimento de nenhuma das cepas bacterianas testadas no presente experimento e o de *A. polystachya* apresentou potencial antibacteriano apenas em cepas de *S. aureus*.

## AGRADECIMENTOS

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Pest-OE/EQB/LA0023/2011 pelo apoio financeiro e pelas bolsas concedidas.

## REFERÊNCIAS

ANDRADE, M. A. *et al.* Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.

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

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

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Ateneu, 2010. parte I, p. 2-7.

FERRONATTO, R. *et al.* Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D. C. e *Baccharis uncinella* D. C. (Asteraceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, n. 2, p. 224-230, 2007.

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

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

GUTIERREZ, J.; BARRY-RYAN, C.; BOURKE, P. The antimicrobial efficacy of plant essential oil combinations and interactions with food ingredients. **International Journal of Food Microbiology**, v. 124, n. 1, p. 91-97, 2008.

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

HYLDGAARD, M.; MYGIND, T.; MEYER, R. L. Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, n.12, p. 1-24, 2012.

JOSHI, S. *et al.* Terpenoid compositions, and antioxidant and antimicrobial properties of the rhizome essential oils of different *Hedychium* species. **Chemistry & Biodiversity** v. 5, n. 2, p. 299-309, 2008.

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

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 27, n. 1, p.13-39, 2012.

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

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

MENDES, M. D. *et al.* ISSR molecular characterization and leaf volatiles analysis of *Pittosporum undulatum* Vent. naturalized in the Azores archipelago (Portugal). **Industrial Crops and Products**, v. 33, n. 3, p. 710-719, 2011.

NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Methods for dilution antimicrobial**

**susceptibility tests for bacteria that grow aerobically.** 6. ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003, 65 p.

OUSSALAH, M. *et al.* Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E. coli* O157:H7, *Salmonella Typhimurium*, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. **Food Control**, v. 18, n. 5, p. 414-420, 2007.

SACCHETTI, G. *et al.* Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, n. 3, p. 621-632, 2004.

SANTOS, A. S. *et al.* A proteção patentária na utilização de óleos essenciais e compostos terpênicos para o

desenvolvimento tecnológico e industrial. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 8, n. 4, p. 14-22, 2006.

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

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

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