



**UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS
QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS**

CLEDES TEREZINHA DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis oreophila*
Malme**

DISSERTAÇÃO

**PATO BRANCO
2016**

CLEDES TEREZINHA DE OLIVEIRA

**CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Baccharis oreophila*
Malme**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do grau de Mestre em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Campus Pato Branco.

Orientadora: Prof.^a Dra. Sirlei Dias Teixeira

PATO BRANCO

2016

O48c Oliveira, Cledes Terezinha de.
Caracterização química, atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de *Baccharis oreophila* Malme / Cledes Terezinha de Oliveira. -- 2016.
58 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Profa. Dra. Sirlei Dias Teixeira
Dissertação (Mestrado) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. Pato Branco, PR, 2016.
Bibliografia: f. 53 – 58.

1. Óleos essenciais. 2. Cromatografia a gás. 3. Atividade antioxidante. I. Teixeira, Sirlei Dias, orient. II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. III. Título.

CDD (22. ed.) 660.281



Ministério Da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Câmpus Pato Branco
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Processos Químicos e Bioquímicos



TERMO DE APROVAÇÃO Nº 44

Título da Dissertação

**“Caracterização Química, Atividade Antioxidante E Antimicrobiana
Do Óleo Essencial De *Baccharis Oreophila*”**

Autora

Cledes Terezinha de Oliveira

Esta dissertação foi apresentada às 13 horas e 50 minutos do dia 29 de março de 2016, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM TECNOLOGIA DE PROCESSOS QUÍMICOS E BIOQUÍMICOS – Linha de pesquisa em Química Biotecnológica – no Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos. A autora foi arguida pela Banca Examinadora abaixo assinada, a qual, após deliberação, considerou o trabalho aprovado.

Profa. Dra. Sirlei Dias Teixeira
UTFPR/PB
Presidente

Profa. Dra. Vidiany Aparecida Queiroz Santos
UTFPR/PB
Examinadora

Prof. Dr. Rodrigo Hinojosa Valdez
IFPR/CAPANEMA
Examinador

Visto da Coordenação

**Prof. Dra. Cristiane Regina Budziak
Parabocz**

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em
Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos - PPGTP

O Termo de Aprovação assinado encontra-se na Coordenação do PPGTP

Este trabalho eu dedico à comunidade,
família e amigos...

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus por tudo que tem me concedido e pelas pessoas especiais que Ele colocou ao meu lado, sem as quais certamente tudo seria mais difícil.

À minha mãe e familiares.

Em especial à minha orientadora a Prof.^a Dra. Sirlei Dias Teixeira, pela oportunidade, conhecimento transmitido, dedicação e paciência.

À coordenadora do programa de Pós Graduação, Prof.^a Dra. Raquel Dalla Costa e demais professores do programa.

Ao Prof. Dr. Mário Antônio Alves da Cunha pela colaboração nas análises da atividade antioxidante que juntamente com a Prof.^a Dra. Tatiane Luiza Cadorin Oldoni contribuíram na qualificação desta dissertação.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Hinojosa Valdez que contribuiu de forma significativa na minha formação e gentilmente aceitou compor minha banca de defesa.

À Dra. Vidiany Aparecida Queiroz Santos pela contribuição na realização das minhas análises e por aceitar fazer parte da banca.

À Dra. Beatriz Helena Noronha Sales Maia, da Universidade Federal do Paraná, por possibilitar a análise cromatográfica (CG-EM) do óleo essencial na UFPR.

À Dra. Aurea Portes Ferriani, aluna de pós-doutorado na Universidade Federal do Paraná, por ceder o material vegetal e encaminhar a exsicata para identificação.

À minha sobrinha Jéssica Ferreira pela acolhida em Pato Branco. Minhas amigas de coração Edenes Loss, Miriam Cremasco, Carla Regina, Angela Haoack, Juliana Soares e aos amigos que conheci ao longo da caminhada na UTFPR, Camila Moresco, Cristiane Moura, Leandra Breda, Rafaela Candido, pelos momentos divertidos e pela ajuda nos momentos difíceis.

Ao meu amigo Fábio Bordignon Lahud pelo apoio.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná – Câmpus Pato Branco.

Muito Obrigada!!!

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher”.

(Cora Coralina)

RESUMO

OLIVEIRA, Cledes Terezinha de. **Caracterização química, atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de *Baccharis oreophila* Malme**. 2016. 58p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Pato Branco, PR, 2016.

A *Baccharis oreophila* Malme pertence à família *Asteraceae*. No Brasil são relatadas 120 espécies de *Baccharis*, a maioria localizadas nas regiões Sul e Sudeste, sendo esta última a que apresenta maior predominância, especialmente no estado de São Paulo. A família *Asteraceae* é bem conhecida pela produção de óleos essenciais, que são substâncias líquidas, aromáticas e voláteis produzidas por vegetais durante o metabolismo especializado, possuem propriedades bactericidas, antioxidantes e antifúngicas. Diante disso, este trabalho teve como objetivo, realizar a caracterização química e avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial das folhas secas de *B. oreophila* coletadas no inverno em Piraquara, Paraná. A obtenção do óleo essencial se deu por hidrodestilação com aparelho Clevenger, em triplicata, e a análise foi feita utilizando-se cromatógrafo a gás acoplado ao espectrômetro de massas CG/EM. A identificação dos constituintes foi realizada com base nos índices de retenção, calculados a partir da co-injeção de uma série de n-alcenos, seguido pela comparação de seus espectros de massas com a literatura. A atividade antimicrobiana foi verificada pelos métodos de disco difusão e microdiluição. A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos DPPH Trolox equivalente, ABTS Trolox equivalente e FRAP sulfato ferroso equivalente. O óleo essencial apresentou 0,47% de rendimento. Foram identificados 57 componentes (89,38%), 1,51% foram classificados como monoterpenos hidrogenados, 15,14% monoterpenos oxigenados, 34,84% sesquiterpenos hidrogenados e 37,87% sesquiterpenos oxigenados. Como componentes majoritários foram detectados o kusimono (16,37%), o espatulenol (16,12%), o δ -cadinene (5,68%) e o biciclogermacreno (4,09%). A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi realizada para os micro-organismos *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 18804 e *Candida tropicalis* ATCC 13803, os resultados revelaram que o óleo essencial mostrou atividade contra o *S. aureus* com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 1250 $\mu\text{g/mL}$. Na avaliação da atividade antioxidante o óleo essencial demonstrou potencial antioxidante para os três métodos avaliados, com valores de 1,468 m.mol.L^{-1} , 7,126 m.mol.L^{-1} e 45,515 m.mol.L^{-1} para ABTS, DPPH e FRAP, respectivamente. Tais resultados demonstram que o óleo essencial de *B. oreophila* apresentou potencial antimicrobiano frente a *S. aureus* e interessante atividade antioxidante, especialmente para o poder redutor do íon ferro, demonstrando seu potencial para futuras aplicações industriais. É importante destacar ainda, que não foram observados relatos na literatura destacando tais propriedades biológicas do óleo de *B. oreophila*.

Palavras-chave: Produtos Naturais. Cromatografia a Gás. Disco difusão. Microdiluição. Radical Livre.

ABSTRACT

OLIVEIRA, Cledes Terezinha de. **Chemical characterization, antioxidant activity and antimicrobial of *Baccharis oreophila* Malme essential oil.** 2016. 58p. Master's Dissertation (Master's degree in Technology Chemical and Biochemical Process) – The Federal University of Technology – Paraná, Pato Branco, PR, 2016.

The *Baccharis oreophila* Malme belongs to the *Asteraceae* family. In Brazil are reported 120 species of *Baccharis*, most located in the South and Southeast regions, the latter presents the highest prevalence, especially in the state of São Paulo. *Asteraceae* is well known for the production of essential oils, which are liquid, volatile and aromatic substances produced by plants specialized for metabolism possess antibacterial, antifungal, and antioxidant properties. Thus, this study aimed, perform chemical and evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of essential oil from dried leaves of *B. oreophila* collected in winter in Piraquara, Paraná. Obtaining essential oil was given by hydrodistillation in Clevenger apparatus, in triplicate, and the analysis was done using a gas chromatograph coupled to mass spectrometry GC / MS. The identification of the components was made based on retention indices calculated from the co-injection of a series of n-alkanes, followed by comparison of their mass spectra with literature. The antimicrobial activity was assessed by disk diffusion method and microdilution. The antioxidant activity was evaluated by the methods DPPH equivalent Trolox, ABTS and FRAP equivalent Trolox equivalent ferrous sulfate. The essential oil showed 0.47% yield. They identified 57 components (89.38%), 1.51% were classified as hydrogenated monoterpenes, oxygenated monoterpenes 15.14%, 34.84% and 37.87% hydrogenated sesquiterpenes sesquiterpenes oxygenates. As the major components were detected kusimono (16.37%), spathulenol (16.12%), the δ -cadinene (5.68%) and bicyclogermacrene (4.09%). The antimicrobial activity of essential oil was performed for the microorganisms *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Candida albicans* ATCC 18804 and *Candida tropicalis* ATCC 13803, the results showed that the essential oil showed activity against *S. aureus* Inhibitory Concentration minimum (CIM) 1250 $\mu\text{g/mL}$. In the evaluation of antioxidant activity essential oil showed antioxidant potential for the three methods evaluated, with values of 1,468 m.mol.L^{-1} , 7.126 m.mol.L^{-1} and 45.515 m.mol.L^{-1} for ABTS, DPPH and FRAP, respectively. These results demonstrate that the essential oil of *B. oreophila* showed antimicrobial potential against *S. aureus* and interesting antioxidant activity, especially for the reducing power of iron ion, demonstrating their potential for future industrial applications. It is important to emphasize that were not observed in the literature reports highlighting such biological properties of *B. oreophila* oil.

Keywords: Natural Products. Gas Chromatography. Disk diffusion. Microdilution. Free radical.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1.	Molécula de Dimetil alil pirofosfato	19
Figura 2.	Rota de biossíntese de metabólitos especializados ressaltando a formação de fenilpropanoides e terpenoides.....	20
Figura 3.	Planta <i>Baccharis oreophila</i> Malme (tronco, galho e folha).....	27
Figura 4.	Exsicata de <i>Baccharis oreophila</i> Malme, depositada no Museu Botânico Municipal de Curitiba.	27
Figura 5.	Reação de oxirredução do 2,3,5 trifeniltetrazólio em 1,3,5 trifenilformazan na presença de células viáveis.....	36
Figura 6.	Visualização do óleo essencial de <i>Baccharis oreophila</i> (coloração amarelada) ainda no aparelho de Clevenger, após 4 horas de experimento.	39
Figura 7.	Cromatograma de uma amostra de óleo essencial de <i>B. oreophila</i> obtido em equipamento CG/EM.....	40
Figura 8.	Espectro de massas do constituinte Khusimono (16,37%).....	40
Figura 9.	Molécula do Khusimono	41
Figura 10.	Espectro de massas do constituinte Espatuleno (16,12%).....	41
Figura 11.	Molécula do Espatuleno.....	41
Figura 12.	Espectro de massas do constituinte químico δ -Cadineno (5,68%).....	41
Figura 13.	Molécula do δ -Cadineno.....	42
Figura 14.	Espectro de massas do constituinte químico Bicyclogermacreno (4,09%).	42
Figura 15.	Molécula do Bicyclogermacreno	42
Figura 16.	Resultado do disco difusão com óleo essencial de <i>B. oreophila</i> frente a bactéria <i>S. aureus</i> e a levedura <i>C. albicans</i>	47
Figura 17.	Resultado da CIM do óleo essencial de <i>Baccharis oreophila</i> Malme sobre <i>S. aureus</i> pelo método de micro diluição em placa.....	50

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Principais óleos essenciais comercializados no mercado mundial.....	21
Tabela 2.	Constituintes químicos identificados no óleo essencial de <i>Baccharis oreophila</i> Malme obtido das folhas coletadas no inverno	43
Tabela 3.	Médias dos diâmetros dos halos de inibição em mm, do óleo essencial obtido de folhas de <i>B. oreophila</i> , coletadas no inverno, testado contra bactérias.....	48
Tabela 4.	Médias dos diâmetros dos halos de inibição em mm, do óleo essencial obtido de folhas de <i>B. oreophila</i> , coletadas no inverno, testado contra leveduras.....	48
Tabela 5.	Resultados obtidos da atividade antioxidante do óleo essencial <i>B. oreophila</i> pelo método FRAP (sulfato ferroso equivalente/mL), ABTS e DPPH (Trolox equivalente/mL).....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
ABTS	2,2-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-acido sulfônico)
CG	Cromatógrafo a Gás
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
DMSO	dimetilsulfóxido
DNA	Deoxyribonucleic acid
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
EC 50	Concentração eficiente
EM	Espectrômetro de Massas
FeIII-TPZ	complexo férrico-tripiridiltriazina
FeII-TPZ	complexo ferroso
FRAP	Potencial Redutor do íon férrico
ISO	International Standard Organization
NCCLS	<i>National Committe For Clinical Laboratory Standards</i>
OE	Óleo Essencial
PAL	Fenilalanina amonialiase
SIDA	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
UFC	Unidade Formadora de Colônia

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1 HISTÓRICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS	16
2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS	17
2.2.1 Terpenos	18
2.2.2 Fenilpropanoides	19
2.2.3 Importância Econômica dos Óleos Essenciais	20
2.3 ANTIMICROBIANOS	21
2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO AGENTES ANTIBACTERIANOS E ANTIFÚNGICOS	22
2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO AGENTE ANTIOXIDANTE	25
2.6 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO <i>BACCHARIS</i>	26
2.7 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS	28
2.7.1 Hidrodestilação	28
2.7.2 Prensagem	28
2.7.3 Enfloração (“enflourage”)	29
2.7.4 Extração com Solventes	29
2.7.5 Extração por CO ₂ Supercrítico	30
3 OBJETIVOS	31
3.1 OBJETIVO GERAL	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4 MATERIAIS E MÉTODOS	32
4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	32
4.2 SECAGEM E PREPARAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO	32
4.3 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	32
4.4 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL	32
4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO ÓLEO ESSENCIAL	33
4.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	34
4.6.1 Disco Difusão	35
4.6.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)	37
4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	37

4.7.1 Análise da Atividade Antioxidante pelo Método DPPH.....	37
4.7.2 Análise da Atividade Antioxidante pelo Método ABTS•+	38
4.7.3 Análise da atividade antioxidante pelo método FRAP	39
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1 RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL	39
5.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA	47
6 RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR DISCO DIFUSÃO.....	48
6.1 RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)	51
7 RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	52
8 CONSIDERAÇÕES FINAIS	53
REFERÊNCIAS.....	

1 INTRODUÇÃO

As espécies do gênero *Baccharis* apresentam-se como arbustos perenes de 50 cm a 4 m de altura. Estes, conhecidos como carqueja, vassoura e vassourinha estão difundidas principalmente no Brasil, Argentina, Colômbia, Chile e México, atingindo regiões mais elevadas. A presença em grande quantidade dessa espécie no Brasil e nos Andes é um indicativo que uma dessas regiões é o provável local de origem desse gênero.

Diversos compostos já foram descritos para o gênero, terpenos e flavonoides, merecem destaque. Estes últimos são considerados como principal classe de compostos fenólicos, de maneira que diversos estudos relatam propriedades biológicas dos flavonoides, incluindo atividades anti-inflamatória, vasodilatadora, antialérgica, antiviral e antioxidante. De modo similar, a atividade antimicrobiana de plantas do gênero *Baccharis* também tem sido mencionada.

Compostos com propriedades biológicas produzidas por diversas plantas podem ser utilizados para síntese de novos medicamentos, ou mesmo ser utilizados como substitutos de princípios ativos sintéticos, como os antibióticos, no intuito de reduzir a resistência microbiana. As plantas sintetizam alguns compostos durante o metabolismo especializado, como, por exemplo, os óleos essenciais, com propriedades biológicas que as tornam alvo de interesse para busca de novos usos terapêuticos.

Os óleos essenciais são alvo de grande interesse econômico, pelas suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas, sendo utilizados na indústria cosmética, farmacêutica e agroalimentícia, não somente pela sua função aromática, mas também por suas propriedades terapêuticas. Estudos têm demonstrando a importância de substâncias antioxidantes visto que, estas tem papel importante sobre radicais livres e outros oxidantes que atuam no desenvolvimento de doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, além de doenças cardiovasculares, câncer, catarata, disfunções cerebrais e declínio do sistema imune.

As pesquisas sobre novos agentes antimicrobianos são necessárias devido ao surgimento de micro-organismos resistentes e infecções oportunistas, que – ocorrem associadas aos procedimentos de transplantes, quimioterapia antineoplásica e Síndrome da Imunodeficiência Adquirida AIDS, pesquisas sobre substâncias são necessárias. Neste contexto, o Brasil possui imensa biodiversidade,

pesquisas nesse campo contribuem para substâncias menos tóxicas e mais eficazes contra micro-organismos patogênicos.

Diante das informações relatadas anteriormente, este trabalho propõe a obtenção por hidrodestilação, do óleo essencial das folhas secas de *Baccharis oreophila* Malme coletadas no inverno, fazendo a caracterização química das amostras de óleo essencial obtidas, além da verificação da atividade antioxidante e atividade antimicrobiana das mesmas.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 HISTÓRICO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS

Segundo Santana (2013), o registro mais antigo que se conhece sobre a utilização de plantas aromáticas foi descoberto em um túmulo do período Neolítico (entre 5000 e 2500 anos a.C.), no qual constataram sinais de um homem envolvido em plantas aromáticas, caracterizadas como resíduos de grãos de pólen.

A utilização de essências teve origem nas antigas civilizações. Ao descobrir o fogo, o homem, ao queimar resinas e arbustos percebeu que esses materiais exalavam um forte aroma e os alquimistas perceberam que mesmo quando plantas aromáticas haviam sido retiradas do local sentiam seu aroma, o que os levou a buscar a quinta essência da matéria (JAKIEMIU, 2008).

Na tentativa de isolar o aroma das plantas, Paracelso, alquimista do século XVI, utilizou vapor de água para isolar o que chamou de “a alma” da planta ou a quinta essência daquele ser (BURT, 2004). Segundo o mesmo autor desde a antiguidade os óleos essenciais tidos como especiarias, eram utilizados devido a suas propriedades aromáticas, de sabor e conservação, porém, apenas a essência de terebentina foi mencionada por historiadores gregos e romanos, e a destilação como método de extração, aconteceu no oriente (Egito, Índia e Pérsia) há mais de 2000 anos atrás, melhorado pelos árabes no século IX.

No Brasil, o início da produção de óleos essenciais aconteceu no final da segunda década do século XX. O extrativismo de essências nativas como o pau-rosa (*Aniba rosaeodora*), durante a segunda guerra mundial passou a consolidar-se, período em que o país começou a organizar o sistema para exportação (VIVAN *et al.* 2011).

Durante esse período, foram registradas também, a produção de capim-limão, palma-rosa e erva-cidreira. A produção era suficiente para atender o mercado interno, no entanto, essas culturas conseguiram modificar o cenário do comércio exterior da época, passando da importação para a exportação. O mesmo aconteceu com as culturas de bergamota, vetiver, eucalipto e cabreúva, chegando a concorrer com produtos da Índia, Guatemala e Formosa e, no final da década de 60, as empresas pertencentes a esse ramo eram responsáveis pelo cultivo e produção de

menta, Sassafrás e Pau-rosa, bem como Hortelã-pimenta e Laranja (SANTOS, 2011).

2.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Segundo a Resolução – RDC nº 2, de 15 de janeiro de 2007:

Óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal, obtidos por processo físico (destilação por arraste com vapor de água, destilação a pressão reduzida ou outro método adequado). Podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados. Entende-se por retificados, os produtos que tenham sido submetidos a um processo de destilação fracionada para concentrar determinados componentes; por concentrados, os que tenham sido parcialmente desterpenados; por desterpenados, aqueles dos quais tenha sido retirada a quase totalidade dos terpenos (BRASIL, 2007).

A ISO (*International Standard Organization*) descreve óleos voláteis, como substâncias adquiridas de diversas partes das plantas por meio de destilação por arraste de vapor d'água, assim como os produtos obtidos por prensagem dos pericarpos de frutos cítricos. Simões *et al.* (2010), definem óleos essenciais como sendo compostos líquidos voláteis, aromáticos, também chamados de etéreos ou, em latim, *aetheroleum* por serem solúveis em solventes orgânicos apolares como o éter. Em contato com a água apresentam pouca solubilidade, porém o suficiente para aromatizar a solução, os chamados hidrolatos.

Biasi e Deschamps (2009) relatam que OEs são obtidos de diversas partes da planta, pois as estruturas distribuem-se em diferentes órgãos das espécies aromáticas, como nas folhas (eucalipto, capim-limão, menta, patchouli), caules (pau-rosa, carqueja, canela), sementes (noz moscada), flores (camomila, lavanda, laranjeira, calêndula), frutos (erva-doce, funcho), raízes (vetiver) e rizomas (gengibre).

Os óleos essenciais são misturas complexas de baixo peso molecular e seus compostos são geralmente obtidos utilizando métodos como hidrodestilação, destilação a vapor ou extração com solventes (BURT, 2004). No entanto, alguns fatores são determinantes na sua composição química, como sazonalidade, fase de desenvolvimento da planta, secagem pós-colheita, localização geográfica,

características do solo, partes da planta, métodos de extração e tempo de extração, entre outros (RAVINDRA; KULKARNI, 2015).

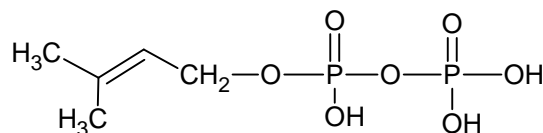
Siani *et al.* (2000), relatam que a produção de óleo pode estar associada à sobrevivência do vegetal em seu habitat, realizando papel fundamental na defesa contra micro-organismos e predadores, atração de insetos e outros agentes polinizadores. São substâncias terpênicas e eventualmente fenilpropanoides acrescidos de moléculas menores, como aldeídos, álcoois, ésteres e cetonas.

Os compostos dos óleos essenciais são provenientes do metabolismo especializado e são armazenados nas plantas em canais oleíferos, células diferenciadas, bolsas lisígenas ou tricomas glandulares. São fontes em potencial de substâncias biologicamente ativas, o que os tornam atrativos como matéria prima para indústria farmacêutica (medicamentos e perfumaria) e de alimentos (RAUT; KARUPPAYIL, 2014; SANTANA, 2013).

No entanto, seu percentual nas plantas é muito baixo, raramente excede 1%, com raras exceções como o cravo (*Syzygium aromaticum*) e noz-moscada (*Myristica fragrans*) que podem atingir mais que 10%. Contêm de 20-60 componentes pertencentes a diferentes classes químicas, alguns ainda, apresentam mais de 100 diferentes componentes. Tais compostos são líquidos hidrofóbicos, com densidade menor que a água, solúveis em álcool, apolares ou fracamente polares, incolores ou de coloração amarelo claro, com exceção do óleo essencial de camomila (*Matricaria chamomilla*) de coloração azulada (DJILANI; DICKO, 2012).

2.2.1 Terpenos

Os terpenos são pequenas moléculas de origem vegetal, sendo que a quantidade de unidades de isopreno (C_5H_8), presentes em suas estruturas, ditam a classificação destes constituintes (BERGAMASCHI, 2014). Estes compostos são metabólitos secundários, formados a partir do Pirofosfato de Isopentenilo (IPP) e Pirofosfato de Dimetilalilo (DMAPP), Figura 1, ambos produtos da Via do Mevalonato (EISENREICH, 1998).



γ,γ -dimethylallyl pyrophosphate

Figura 1. Molécula de Dimetil alil pirofosfato

Bakkali *et al.* (2008) descrevem que os terpenos são constituídos a partir de várias combinações de unidades de isopreno (5 carbonos), e os principais terpenos são os hemiterpenos (C_5 – 5 carbonos); monoterpenos (C_{10} – 10 carbonos); sesquiterpenos (C_{15} – 15 carbonos); diterpenos (C_{20} – 20 carbonos); triterpenos (C_{30} – 30 carbonos); tetraterpenos (C_{40} – 40 carbonos), os terpenos que possuem oxigênio em sua composição são chamados terpenoides. Quanto a representatividade, os monoterpenos constituem cerca de 90% de óleos essenciais e permitem uma variedade de estruturas com diversas funções.

2.2.2 Fenilpropanoides

Segundo Biasi e Deschamps (2009), a biossíntese de fenilpropanoides acontece como consequência da produção de aminoácidos aromáticos pela rota do ácido chiquímico. O aminoácido fenilalanina e com menor frequência a tirosina, são utilizados como substrato na primeira reação de biossíntese dos constituintes do óleo essencial, como pode ser observado na figura 2.

A fenilalanina, influenciada pela enzima fenilalanina amonialiase (PAL), abandona uma molécula da amônia, gerando o ácido cinâmico. A regulação dessa enzima é um elemento crucial na geração dos metabólitos do chiquimato.

Nas plantas, a ação da PAL é regulada por internos e externos, tais como hormônios, níveis de nutrientes, luz, infecção por fungos e injúrias.

Uma infecção fúngica provoca a síntese da PAL, o que ocasiona um acréscimo dos compostos fenólicos (SIMÕES *et al.* 2010). De acordo com o mesmo autor, os ácidos cinâmicos são os precursores da maioria dos compostos identificados como fenilpropanoides, que são compostos aromáticos com uma cadeia lateral de três átomos de carbono ligada ao anel aromático, e muitos desses metabólitos, são ácidos ou derivam destes. A redução da cadeia lateral dos ácidos

cinâmicos leva à formação de significativos compostos, presentes em óleos voláteis, como por exemplo, o eugenol, presente no cravo-da-índia e o anetol, presente no funcho, erva-doce e anis-estrelado.

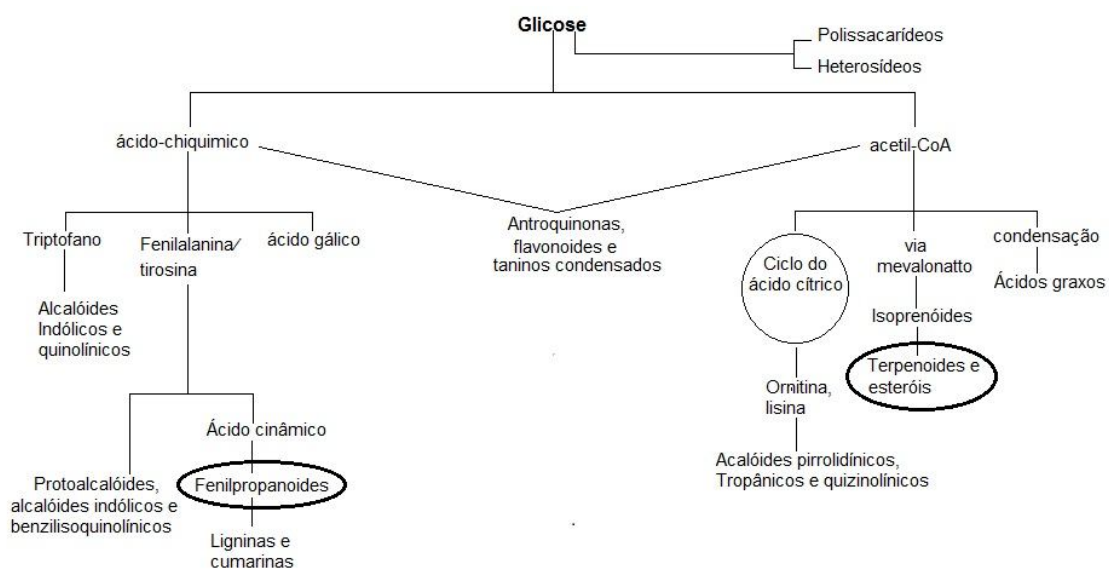


Figura 2. Rota de biossíntese de metabólitos especializados, ressaltando a formação de fenilpropanóides, terpenóides e esteróides.

Fonte: Simões, (2010)

2.2.3 Importância Econômica dos Óleos Essenciais

O Brasil devido à riqueza em diversidade natural, destaca-se no mercado mundial pela produção de óleos essenciais (OEs), ocupando o 4º lugar ao lado de países como Índia, China e Indonésia. Estima-se que 3000 grupos diferentes de óleos essenciais são conhecidos, dos quais, cerca de 300 têm importância comercial e, em suas formas isoladas apresentam substâncias como limoneno, citronelal, citral, mentol e safrol, destinados principalmente ao mercado de aromas e fragrâncias. O Brasil é grande produtor de óleo essencial de laranja (*Citrus sinensis* L.), como subproduto da indústria de sucos (BIZZO; HOVELL; REZENDE, 2009).

Apesar do custo elevado, devido ao grande volume necessário de material vegetal para obtenção do óleo essencial, a produção e consumo mundial estão crescendo rapidamente. Segundo estimativas, a produção mundial varia entre 40.000 a 60.000 toneladas anuais (DJILANI; DICKO, 2012).

Esse mercado movimenta cerca de US\$ 1,8 bilhões anuais e o Brasil tem participação menor de 0,1% de OEs de sua biodiversidade. Apesar disso o Brasil ocupa o 3º lugar como exportador de óleos essenciais, depois dos Estados Unidos e França, movimentando cerca de 147 milhões de dólares. Desse volume, 91% consiste em óleo essencial de cítricos, principalmente laranja, subproduto da indústria de sucos e portanto, apresenta baixo custo. Os principais óleos essenciais exportados pelo Brasil incluem o de laranja em primeiro lugar, seguido do óleo de laranja, limão, eucalipto, pau-rosa, lima, capim-limão, que são utilizados como matéria-prima para perfumaria, produtos de limpeza, alimentos, indústria química e medicamentos (FERRAZ, 2009). No cenário mundial, os óleos essenciais de maior importância estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Principais óleos essenciais comercializados no mercado mundial.

Óleo Essencial	Espécies
Laranja (Brasil)	<i>Citrus sinensis</i> (L.) Osbeck
Menta Japonesa (Índia)	<i>Mentha arvensis</i> L. f. <i>piperascens</i> Malinv. ex Holmes
Eucalipto (tipo cineol)	<i>Eucalyptus globules</i> Labill., <i>E. polybractea</i> R.T. Baker e <i>Eucalyptus</i> spp.
Citronela	<i>Cymbopogon winterianus</i> Jowitt e <i>C. nardus</i> (L.) Rendle
Hortelã-pimenta	<i>Mentha x piperita</i> L.
Limão	<i>Citrus limon</i> (L.) N.L. Burm.
Eucalipto (tipo citronela)	<i>Eucalyptus citriodora</i> Hook.
Cravo-da-Índia	<i>Syzygium aromaticum</i> (L.) Merr. e L. M. Perry
Cedro (EUA)	<i>Juniperus virginiana</i> L. e <i>J. ashei</i> Buchholz
Lima destilada (Brasil)	<i>Citrus aurantifolia</i> (Christm. & Panz.) Swingle
Hortelã (nativa)	<i>Mentha spicata</i> L.
Cedro (China)	<i>Chamaecyparis funebris</i> (Endl.) Franco
Lavandim	<i>Lavandula intermedia</i> EmericexLoisel
Sassafrás (China)	<i>Cinnamomum micranthum</i> (Hayata) Hayata
Cânfora	<i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J. Presl.
Coentro	<i>Coriandrum sativum</i> L.
Grapefruit	<i>Citrus paradisi</i> Macfady
Patchouli	<i>Pogostemon cablin</i> (Blanco) Benth.

Fonte: Adaptado de Bizzo; Hovell; Rezende (2009).

2.3 ANTIMICROBIANOS

Baseado em testes realizados *in vitro*, os agentes antimicrobianos são classificados em microbiocidas ou microbiostáticos. Os agentes bacteriostáticos impedem o crescimento de bactérias e são considerados, sob o ponto de vista clínico, menos desejáveis. Os agentes bactericidas têm o poder de destruir os micro-

organismos e possuem maior eficácia durante a fase de crescimento logarítmico (THOMPSON; BEVAN, 1979).

2.4 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO AGENTES ANTIBACTERIANOS E ANTIFÚNGICOS

As bactérias são seres procariotos de composição muito simples, que diferem entre si por algumas particularidades como: morfologia, composição química, atividades bioquímicas e nutricionais. Além disso, sua membrana citoplasmática é protegida pela parede celular.

As bactérias de interesse médico, apresentam morfologia em forma de cocos, bacilos e em espiral. São classificadas em dois grandes grupos: Gram-positivos e Gram-negativos. “Alguns gêneros estão associados a importantes infecções causadas ao homem, entre eles podemos citar: *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Salmonella* e *Pseudomonas*” (TRABULSI; ALTERTHUM, 2005, p. 7).

De modo semelhante aos micro-organismos, as plantas produzem uma enorme variedade de compostos químicos biologicamente ativos, e tais compostos naturais podem também ser utilizados como matéria-prima para a elaboração de novas substâncias, em particular fármacos. Esses compostos naturais têm sido ao longo do tempo, mencionados como modelos para síntese desses medicamentos (ADATI, 2006).

Raut e Karuppayil (2014), relataram que moléculas de plantas são bem conhecidas por suas propriedades antimicrobianas e os óleos essenciais têm mostrado atividade de amplo espectro contra bactérias Gram positivas e Gram negativas.

De acordo com Trujillo *et al.* (2015), além de aroma, os óleos essenciais possuem propriedades antioxidantes e antimicrobianas. Esta última é resultado da ação dos compostos fenólicos que atuam sobre a membrana citoplasmática e promovem o extravasamento de íons e conteúdo citoplasmático resultando assim, em lise celular.

Raut e Karuppayil (2014), destacam que o principal modo de ação dos OEs é a desestabilização da membrana bacteriana, pois os óleos essenciais são

lipofílicos, facilmente permeáveis através da parede e membrana celular. Essa interação dos OEs com polissacarídeos, ácidos graxos e fosfolípídeos facilita a permeabilidade, acarretando a perda de íons e conteúdos celulares o que resulta em morte celular. Além dessa interação, há o mecanismo de desnaturação de proteínas citoplasmáticas e inativação de enzimas celulares que também provocam a morte da célula bacteriana.

Em levantamentos realizados por Ferronato *et al.* (2007), óleos essenciais de *Baccharis dracunculifolia* e *Baccharis uncinella* mostraram atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*.

Araújo *et al.* (2004), avaliaram óleos essenciais de *Lippia alba* e *Eucalyptus citriodora* em ensaios com cepas da bactéria *S. aureus*, utilizando as técnicas de disco difusão e microdiluição, considerando halo de inibição de crescimento microbiano igual/superior a 10 mm de diâmetro, como resultado satisfatório e obtiveram halo de 12 mm para ambos os óleos essenciais e uma CIM de 17% e 8% com os óleos essenciais de *Lippia alba* e *Eucalyptus citriodora*.

Em relação aos fungos, são organismos eucariotos e alvos difíceis de atingir, principalmente alguns fungos considerados oportunistas, como por exemplo, espécies de (*Candida sp.*, *Aspergillus spp.* e *Cryptococcus sp.* A característica de apresentarem cepas resistentes e efeitos colaterais aos medicamentos atualmente prescritos representa dificuldades na prevenção e tratamento a infecções fúngicas. Portanto, infecções fúngicas invasivas são citadas como responsáveis por casos de alta morbidade e mortalidade (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

As leveduras do gênero *Candida* são responsáveis pela candidíase ou candidose, doença causada por diversas espécies deste gênero. As lesões causadas por este fungo podem ser consideradas brandas, agudas ou crônicas; sendo o principal agente a *Candida albicans* devido a sua virulência. Porém, outras espécies como *Candida tropicalis*, *Candida parapsilosis* e *Candida glabrata* também são relatadas como responsáveis pelo desenvolvimento de candidíase (BARBEDO; SGARBI, 2010).

Uma das maiores preocupações são as infecções sistêmicas por *C. albicans*, geralmente associadas à utilização de cateter, nutrição parenteral, cirurgias, danos na pele e mucosas (CANUTO; RODERO, 2002). Além desses fatores, outra condição bastante preocupante refere-se à imunossupressão causada

pela Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), ou induzida por transplantes, quimioterapias com antitumorais, uso indiscriminado de antimicrobianos de largo espectro, e ainda, o uso crônico de corticoides (BERGOLD; GEORGIADIS, 2004).

Em estudo realizado em complexo hospitalar, Antunes *et al.* (2004), verificaram que espécies do gênero *Candida* não *albicans* representavam 51,6% dos casos de candidoses da instituição, onde *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei* e outras espécies foram responsáveis por 25,8%, 13,3%, 3,3%, 1,7% e 7,5% respectivamente.

Alguns fungos patogênicos ao ser humano incluindo as leveduras, são susceptíveis a OEs, e a eficiência varia de acordo com o organismo estudado e o óleo essencial testado (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Alguns óleos essenciais apresentam atividade variável contra *Candida albicans*, como é caso do coentro, anis e funcho com valores de concentração inibitória mínima (CIM) de 0,25%, 0,5% e 1% respectivamente (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Os OEs de canela, erva-cidreira, hortelã japonês, gengibre grama, gerânio e cravo foram observados como sendo os mais promissores contra a *C. albicans*, sendo que, as concentrações mais eficazes variam entre 0,01 e 0,15% (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

A eficácia de OEs e os seus constituintes como o citral, citronelal, geraniol e acetato de geranil, os principais constituintes do óleo essencial de eucalipto, de melaleuca e de gerânio, são relatados por bloquear a fase S do ciclo celular da *C. albicans* e sua atividade pode ser mediada por meio da inibição da membrana de ergosterol e vias de sinalização envolvida na morfologia das hifas das leveduras (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Diante do constante surgimento de cepas microbianas resistentes a antimicrobianos e as limitações de pacientes imunocomprometidos a antimicrobianos disponíveis, Raut e Karuppayul (2014), destacam a importância de serem desenvolvidos estudos principalmente no que tange a utilização de terapias alternativas e complementares, incluindo a utilização de óleos essenciais por possuírem propriedades farmacêuticas importantes, o que possibilita a utilização do produto isolado ou em combinação para tratamento de doenças infecciosas, assim como não infecciosas.

2.5 ÓLEOS ESSENCIAIS COMO AGENTES ANTIOXIDANTES

O oxigênio presente na atmosfera, é essencial para a respiração e outras reações oxidativas em todos os organismos aeróbicos. Durante a redução do oxigênio molecular, espécies reativas de oxigênio são formadas, os radicais livres, que estão envolvidos no desenvolvimento de muitas doenças como aterosclerose, doenças neurodegenerativas, inflamatórias e envelhecimento (ANDERSON, 1996).

Youngson (1995 apud RUFINO *et al.* 2007), citam que os radicais livres do oxigênio com seus elétrons não pareados têm a capacidade de atacar e danificar qualquer molécula no organismo, em questão de segundos. Devido sua alta reatividade, são capazes de entregar seu elétron não pareado ou capturar um elétron de outra molécula, tornando-se estável, porém, a molécula atacada, transforma-se em um radical o que pode desencadear efeitos destrutivos sobre os tecidos.

Borek (1997 apud RUFINO *et al.* (2007) em seu trabalho comenta que as espécies reativas do oxigênio são: ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxila (OH^{\bullet}), óxido nítrico (NO), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical lipídico (L^{\bullet}), dentre outros. Eles são importantes nos processos biológicos de produção de energia e fagocitose. Estas formas de oxigênio são demasiadamente danosas para os constituintes celulares, incluindo o DNA, os lipídeos, ácidos graxos e as proteínas (WOLFF; GARNER; DEAN, 1986; STORZ *et al.* 1987). No entanto, Anderson (2000 apud RUFINO *et al.* 2007) ressalta que apesar do peróxido de hidrogênio não ser considerado um radical livre, e sim um não radicalar, ele é capaz de permear a membrana nuclear e provocar lesões na molécula de DNA.

O equilíbrio celular em relação aos radicais livres é mantido por diferentes antioxidantes como os flavonoides, terpenoides e demais compostos fenólicos dos óleos essenciais que apresentam efeitos antioxidantes significativos, como exemplo, timol e carvacrol, constituintes principais do óleo essencial de tomilho e orégano, que atuam como fortes antioxidantes (RAUT; KARUPPAYIL, 2014). Em seus ensaios Sartor *et al.* (2013), relatam propriedades antioxidantes atribuídas a plantas do gênero *Baccharis*.

2.6 CARACTERÍSTICAS DO GÊNERO *BACCHARIS*

A origem do nome *Baccharis* (*Bakkaris*), vem do grego, antiga denominação para algumas plantas arbustivas, sendo um grande gênero da família *Asteraceae*, com aproximadamente 500 espécies (BUDEL *et al.* 2005), das quais muitas utilizadas na medicina popular, sendo que algumas espécies já foram investigadas química e farmacologicamente para uso medicinal.

A produção de OEs está relacionada a vários gêneros distribuídos entre cerca de 60 famílias, como exemplo, *Alliaceae*, *Apiaceae*, *Asteraceae*, *Lamiaceae*, *Myrtaceae*, *Poaceae* e *Rutaceae* são bem conhecidas pela capacidade de produção de OEs com valor industrial e medicinal (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

Todas as plantas pertencentes as famílias produtoras de OEs são ricas em terpenoides, enquanto que em plantas que fazem parte das famílias como *Apiaceae*, *Laminaceae*, *Myrtaceae*, *Piperaceae* e *Rutaceae* são encontrados com mais frequência fenilpropanoides (RAUT; KARUPPAYIL, 2014).

A família *Asteraceae* é o grupo das angiospermas mais numeroso, representando cerca de 1.100 gêneros e 25.000 espécies. São plantas constituídas por pequenas ervas ou arbustos e raramente árvores. Aproximadamente 98% dos gêneros são representados por plantas de pequeno porte, e são localizados em todos os tipos de ambientes, mas principalmente nas regiões tropicais montanhosas na América do Sul (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

Na Argentina há a estimativa de 100 espécies, 28 espécies no México, 40 na Colômbia, o que denota um significativo grupo de plantas neste país, de maneira que 38% são endêmicas. No Brasil, são relatadas 120 espécies de *Baccharis*, a maioria localizada na região sudeste, especialmente no estado de São Paulo, mas também tem ampla dispersão nos estados de Santa Catarina, Paraná e Rio Grande do Sul (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005).

Espécies desse gênero, têm importância econômica no combate à erosão e como planta ornamental, embora sua presença em pastagens pode ser considerada uma praga, por ocasionar intoxicação em rebanhos. Por outro lado, devido ao seu uso na medicina popular, principalmente na América Latina, o estudo de espécies do gênero *Baccharis* tem mostrado grandes avanços destacando a presença de flavonoides (VERDI; BRIGHENTE; PIZZOLATTI, 2005; BUDEL *et al.* 2005).

Dentre as espécies mais estudadas, especialmente em relação à constituição química e atividade biológica, destacam-se a *B. megapotamica*, *B. incarum*, *B. trimera*, *B. trinervis*, *B. salicifolia*, *B. uncinella*, *B. crispa*, *B. coridifolia*, *B. dracunculifolia*, *B. grisebachii*, *B. genistelloides* e *B. tricuneata* (FERRONATO *et al.* 2007). A espécie *B. oreophila* por sua vez ainda é pouco estudada.

A seguir figuras do tronco, galhos e folhas de *Baccharis oreophila* Malme.



Figura 3. Planta *Baccharis oreophila* Malme (tronco, galho e folha)

Fonte: <http://florestaombrofilamista.com.br/sidol/?menu=species&menu=home&page=details&id=171>

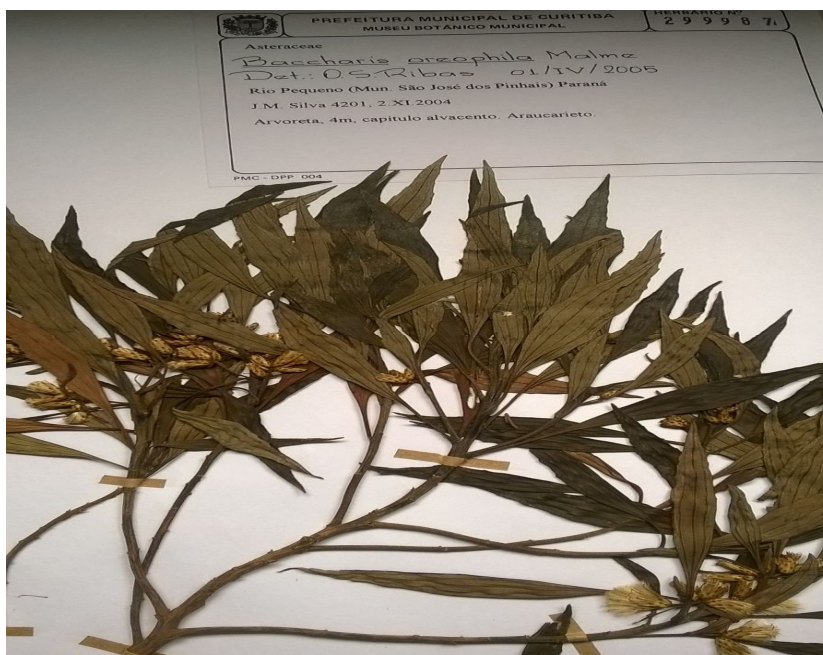


Figura 4. Exsicata de *Baccharis oreophila* Malme, depositada no Museu Botânico Municipal de Curitiba.

Fonte: Dra. Aurea Portes Ferriani

2.7 MÉTODOS DE OBTENÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS

O óleo essencial presente no interior das células vegetais é liberado na presença de calor e pressão, e a cor pode variar de pálido a amarelo escuro dependendo da espécie e da parte do vegetal. Sua obtenção se dá por vários métodos, sendo os mais comuns a hidrodestilação; enfloração; extração com solventes orgânicos; prensagem e extração com fluídos supercríticos (SIMÕES *et al.* 2010; ALEKESIC; KNEZEVIC, 2013).

2.7.1 Hidrodestilação

A hidrodestilação é relatada por Simões *et al.* (2010), como sendo o método mais utilizado comercialmente no Brasil e quando utilizado em pequena escala utiliza-se o aparelho Clevenger, de maneira que o material vegetal permanece em contato com a água em ebulição. O calor provoca o rompimento da parede celular e o óleo essencial presente nos compartimentos oleíferos evapora juntamente com o vapor da água que segue para o condensador, sofrendo resfriamento, e separando-se da água por diferença de densidade. Após a separação, o óleo deve ser seco com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para evitar perdas por hidrólise durante o tempo de armazenamento.

2.7.2 Prensagem

O processo de obtenção de OEs cítricos realizado por destilação ou qualquer outro método que utiliza aquecimento resulta em odor e sabor desagradável ao produto. Para sanar tal problema, um processo amplamente utilizado, principalmente pelas indústrias citrícolas, é a prensagem, em razão dos OEs serem retirados das cascas das frutas cítricas como limão, laranja e tangerina, o que resulta em um óleo de excelente qualidade (SANTOS, 2011).

Santos (2011), relata que após o processo de prensagem forma-se uma emulsão. Os sólidos e fragmentos são removidos, e a emulsão que contém de 1 a 3% de OE passa por centrifugação para retirada de possíveis partículas sólidas e em seguida, por uma segunda centrifugação, de maneira que se obtém um sistema ternário com fase leve (rica em óleos essenciais), fase intermediária (rica em água) e sólidos insolúveis (lodo de descarte). A fração contendo OE é concentrada por centrifugação, permanecendo em tanques decantadores para a separação final a frio do óleo e da cera residual.

2.7.3 Enfloração (“enflourage”)

Método muito utilizado no passado, atualmente é empregado por algumas indústrias de perfumes, em particular para algumas plantas com baixo teor de OE e alto valor comercial como é o caso do jasmim. O método baseia-se em depositar pétalas ou flores sobre uma placa, com uma camada de gorduras sobre molduras, as quais são sustentadas por estruturas de madeira, em temperatura ambiente, durante determinado período, pois a gordura tem a capacidade de absorver os constituintes voláteis. A cada 24h o material vegetal deve ser substituído por material novo, o processo se repete até a gordura se tornar saturada. Na sequência, a gordura é derretida e o óleo essencial é retirado com o auxílio de solventes (BIASI; DESCHAMPS, 2009). Esse processo é mais lento que os demais, pois deve ser repetido durante semanas consecutivas (geralmente excedem dois meses), além de ser necessário grande cuidado na extração dos OE de pétalas de flores, em função de que a fragilidade e instabilidade de alguma espécie ou órgão vegetal, podem ocasionar degradação do produto, o que impossibilita sua comercialização (SANTOS, 2011).

2.7.4 Extração com Solventes

Os óleos voláteis são obtidos com solventes apolares e/ou de média polaridade, como o éter etílico, éter de petróleo ou diclorometano, porém extraem outros componentes lipofílicos. Esse método baseia-se na obtenção do aroma mais

próximo daquele observado nas flores naturalmente e nesse processo, as flores frescas são colocadas em contato com o solvente em temperatura ambiente, e por isso o óleo essencial é obtido juntamente com ceras e pigmentos. A solução obtida é mantida em evaporador e concentrada em baixa temperatura. Após a remoção do solvente, o óleo essencial das flores é obtido (BIASI; DESCHAMPS, 2009; SIMÕES *et al.* 2010).

2.7.5 Extração por CO₂ Supercrítico

Atualmente a extração por CO₂ Supercrítico é o método de escolha para extração a nível industrial, pelo fato de ser rápido e eficiente e nenhum resíduo de solvente permanecer no produto obtido. O processo é realizado em condições de alta pressão e temperatura acima de 31°C, de maneira que o CO₂ é liquefeito por meio de compressão e atinge um quarto estado, no qual sua viscosidade é análoga a de um gás. Após realizada a extração, faz-se o CO₂ retornar ao estado gasoso, resultando em sua total eliminação (SANTOS, 2011).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

- Realizar a Caracterização química, avaliação da atividade microbiológica e potencial antioxidante do óleo essencial de *Baccharis oreophila* Malme.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar quimicamente o óleo essencial da espécie, utilizando cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, por meio da identificação e quantificação dos componentes presentes no óleo essencial de *Baccharis oreophila*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial de *B. oreophila* pelo método de disco difusão e microdiluição frente a cepas das bactérias *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, leveduras *Candida albicans* ATCC 18804 e *Candida tropicalis* ATCC 13803.
- Avaliar a atividade antioxidante *in vitro* do óleo essencial de *B. oreophila*, pelos métodos de atividade de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), captura do radical 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ABTS e poder redutor do íon ferro (FRAP).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

A coleta do material botânico foi realizada no inverno em Piraquara – PR e identificado pelo botânico Osmar dos Santos Ribas, do Herbário do Museu Botânico Municipal de Curitiba, sob registro 299987, sendo comparada à exsicata depositada no mesmo. A coleta foi realizada em 29 de maio de 2015.

4.2 SECAGEM E PREPARAÇÃO DO MATERIAL BOTÂNICO

Após a coleta, o material botânico foi pré-seco à temperatura ambiente, realizando-se a separação das folhas e capítulos florais. Posteriormente, o material separado foi seco em estufa de ar circulante a 50°C e moído.

4.3 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

O material vegetal seco das folhas foi submetido à hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado por 4h (70 g em aproximadamente 1000 mL de água destilada). O óleo essencial assim obtido, para ser utilizado nos ensaios microbiológicos, foi coletado do aparelho de Clevenger utilizando pipeta de Pasteur, o qual foi centrifugado e seco com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4). Todo o procedimento foi feito em triplicata. As amostras (em triplicata), destinadas à análise por CG-EM, foram obtidas da mesma forma, com o diferencial de que quando necessário utilizou-se éter etílico para realização da completa separação da água.

4.4 ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL

Para a análise por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massas, a amostra foi diluída a 1% (m/v) em diclorometano e analisada nas seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida Rtx-5MS (5% difenil + 95%

dimetilpolisiloxano (30 m x 0,25 mm x 0,25 μm). Como gás de arraste foi empregado o hélio com vazão de aproximadamente $1,0 \text{ mL min}^{-1}$, em modo Split 1:10, estando o injetor a 250°C e o sistema de ionização 70 eV. Foi injetado 1 μL de amostra na seguinte rampa de aquecimento: temperatura inicial 60°C (0') até 250°C , com aquecimento de $3^\circ\text{C}/\text{minuto}$.

Os componentes dos óleos essenciais foram identificados com base no índice aritmético (IA), determinados através da utilização de uma série homóloga de hidrocarbonetos lineares saturados contendo de $\text{C}_9\text{-C}_{19}$ átomos de carbono, injetados nas mesmas condições cromatográficas. Os índices aritméticos foram calculados com base nos tempos de retenção obtidos.

4.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Baccharis oreophila* foi investigada contra bactérias e leveduras. As bactérias testadas foram a *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, representantes dos grandes grupos das Gram negativas e Gram positivas respectivamente. Os testes também foram realizados com as leveduras *Candida albicans* ATCC 18804 e uma não albicans representada pela *Candida tropicalis* ATCC 13803.

A determinação da atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de disco difusão, também chamado de difusão em placas e pela concentração inibitória mínima (CIM) que define a menor concentração de óleo essencial capaz de inibir o crescimento de micro-organismos.

O disco difusão é um método físico, no qual um micro-organismo é testado contra uma substância biologicamente ativa, em meio de cultivo sólido, e correlaciona-se o tamanho da zona de inibição de crescimento do micro-organismo em teste com a concentração da substância avaliada (OSTROSKY *et al.* 2008). Já a concentração inibitória mínima (CIM), corresponde à menor diluição na qual é verificada ausência de crescimento microbiano viável, de forma que quanto menor a CIM, maior a potência da substância testada.

As técnicas acima relatadas foram baseadas no protocolo padrão CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*), antigo NCCLS (*National Committee For Clinical Laboratory Standards*), documentos M27-A3 (Método de Referência para

Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica), M44-A2 (Metodologia para Testes de Sensibilidade Antifúngica por Disco–Difusão para Leveduras), M02-A11 (Padrões de desempenho para testes em disco de susceptibilidade antimicrobiana), M7-A6 (Metodologia do Teste de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico), com algumas modificações. Os micro-organismos utilizados no estudo foram provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC®). Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.6.1 Disco Difusão

Para o teste de difusão em disco, sugerido por Rabanal *et al.* (2002) e por Karaman *et al.* (2003) com embasamento nos protocolos CLSI (M44-A2; M02-A11), com algumas modificações, as bactérias foram inoculadas por superfície, em ágar Mueller Hinton e as leveduras em ágar Sabouraud preparados conforme orientação do fabricante e mantidos sob refrigeração.

O procedimento foi realizado com repiques de culturas inoculadas nos mesmos meios de cultura e incubadas por 24 h, temperatura de 35°C, a fim de se obter culturas ativas. Após o tempo de incubação, as cepas foram repicadas para tubo de ensaio contendo solução salina 0,9 % esterilizada até atingir turbidez correspondente à concentração 0,5 da escala McFarland ($\cong 1,5 \times 10^8$ UFC/mL). Na sequência, um *swab* foi mergulhado no tubo com suspensão microbiana e semeado de forma uniforme nas placas de petri contendo ágar. Em seguida, 10 μ L das substâncias testadas (diluição 1 e 2) foram impregnados em discos de 5 mm, os quais foram dispostos sobre o meio de cultura previamente inoculado com o micro-organismo de interesse para determinar se a substância testada causa inibição no crescimento radial do micro-organismo.

O óleo essencial foi avaliado sem diluição, ou seja, óleo puro, na diluição 10^{-1} (100 μ L de óleo, 10 μ L de Dimetilsulfóxido (DMSO), 890 μ L de solução salina esterilizada) e na diluição 10^{-2} (10 μ L da solução anterior 10^{-1} , 90 μ L de solução salina esterilizada). É importante destacar que em DMSO 10%, concentração do solvente utilizado, não ocorre inibição do crescimento dos micro-organismos (KARAMAN *et al.* 2003).

Os antimicrobianos padrões utilizados para controle positivo foram norfloxacino, tetraciclina, fluconazol e anfotericina B, preparados pesando-se 0,001 g do antimicrobiano, 10 µL de DMSO e 990 µL de solução salina 0,9% esterilizada, ou seja, concentração de 1 mg/mL para cada antimicrobiano. Para controle negativo foi utilizada solução de DMSO 1 %. Após o procedimento, as placas permaneceram em estufa microbiológica por um período de 24-48h, a temperatura de 35-37°C para bactérias, e 48-72h, a temperatura de 25-27°C para fungos, após foram realizadas leituras, utilizando-se paquímetro, para medição da circunferência dos halos de inibição (OSTROSKY *et al.* 2008).

Ostroski *et al.* (2008), citam que a medida do halo de inibição deve partir da circunferência do disco até a margem, onde há crescimento de micro-organismo, e de acordo com o tamanho do halo, os micro-organismos podem ser classificados em sensível, moderadamente sensível e resistente. O resultado final foi determinado pela média aritmética dos valores dos halos de inibição obtidos nos ensaios.

4.6.2 Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os testes de microdiluição foram realizados de acordo com as metodologias dos autores já citados para o método de disco difusão e protocolos CLSI (M27-A3;M7-A6). Foram utilizadas placas com 96 poços, dispostos em 12 colunas (1 a 12) e 8 linhas (A a H). Todos os poços receberam 100 µL do caldo Sabouraud quando o teste foi realizado com leveduras e 100 µL de caldo Mueller Hinton quando bactérias foram utilizadas nos testes. Também foram adicionados 100 µL das diluições do óleo de *B. oreophila* nas concentrações 2500; 1250; 625; 312,5; 156,25; 78,25 e 34,05 µg/mL. Primeiramente, preparou-se a solução estoque, pesando-se 5 mg (5000 µg) do óleo essencial, acrescentando-se 10 µL de DMSO e 990 µL de solução salina. A partir dessa solução, transferiu-se 500 µL para um *ependorf* com 500 µL de caldo Sabourad ou Mueller Hinton obtendo-se assim, a primeira diluição a ser testada (2500 µg/mL), repetiu-se o procedimento até realizar a menor diluição, que foi de 34,05 µg/mL.

Rabanal *et al.* (2002) em seus ensaios, sugerem utilizar 5 µL de inóculo, equivalente a 10⁵ células por µL de suspensão microbiana em cada poço, preparada em solução salina esterilizada, com turbidez equivalente de uma solução

padrão da escala de McFarland 0,5. A linha H foi destinada aos controles, entre eles o controle negativo (caldo sem a adição de micro-organismo), controle positivo (caldo com a adição do micro-organismo) e controle com antimicrobianos padrões, os mesmos utilizados no teste de disco difusão. Os antimicrobianos comerciais padrão, foram diluídos à concentração de 1 mg/mL para os testes. Após o procedimento, as placas permaneceram em estufa microbiológica por um período de 24 horas à temperatura de 35-37°C para bactérias, e 24 horas à temperatura de 25-27°C para leveduras. Na sequência, foram acrescentados 20 µL de 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5% e após 2 horas foi realizada a leitura. Os poços em que o óleo essencial apresentou atividade frente os micro-organismos permaneceram incolores, e quando houve desenvolvimento microbiano, estes foram corados de vermelho. A coloração é uma indicação positiva da viabilidade, através da detecção da respiração a nível celular (DUARTE *et al.* 2005; COSTA *et al.* 2008). O TTC é um revelador indicador de oxirredução utilizado para apontar células viáveis. O mecanismo baseia-se na redução enzimática do 2,3,5-trifeniltetrazólio (incolor) em 1,3,5-trifenilformazan (vermelho), na presença de células vivas, em virtude da atividade de diversas desidrogenases, as quais catalisam as reações respiratórias nas mitocôndrias durante a glicólise e o ciclo de Krebs, conforme pode ser observado na figura 5 (GABRIELSON *et al.* 2002; COSTA *et al.* 2008). O mesmo autor cita em seu trabalho que os sais de tetrazólio são utilizados como indicadores de crescimento desde a década de 1940. Eles detectam sistemas enzimáticos oxidativos por atuarem como receptores de elétrons, são incolores e solúveis em água, e mudam de cor quando são reduzidos.

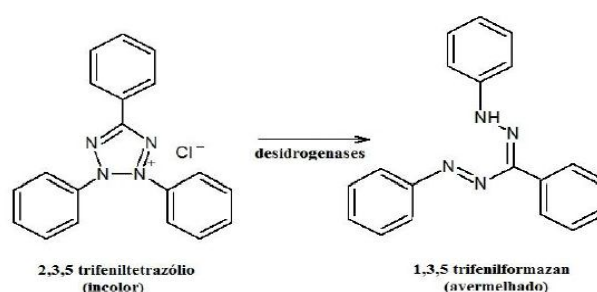


Figura 5. Reação de oxirredução do 2,3,5 trifeniltetrazólio em 1,3,5 trifenilformazan na presença de células viáveis.

Fonte: Rozatto (2012)

4.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.7.1 Análise da Atividade Antioxidante pelo Método DPPH

Foi utilizado o método DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) descrita por Brand-Williams; Cuvelier e Berset (1995) com algumas modificações. Este método consiste em misturar 0,1 mL da amostra apropriadamente diluída em tubo de ensaio e adicionar 3,9 mL de solução DPPH (0,025 g/L em metanol). A leitura da absorbância desta mistura foi realizada em 515 nm. Foi utilizado como controle o metanol. As leituras foram realizadas em $t=0$ e $t=60$ minutos quando a reação chega ao seu estado estacionário. Foi construída uma curva substituindo a amostra por solução do antioxidante padrão Trolox em diferentes concentrações (0,02;0,06;0,1;0,14;0,18 e 0,22 m.mol.L⁻¹). A atividade antirradicalar foi calculada considerando a absorbância obtida no tempo final de 60 minutos, plotada versus a concentração de Trolox em m.mol.L⁻¹. A equação da regressão linear foi obtida e os valores das amostras expressos em m.mol.L⁻¹ de Trolox equivalente (TE)/mL de óleo essencial. Todas as determinações foram realizadas em triplicata.

4.7.2 Análise da Atividade Antioxidante pelo Método ABTS^{•+}

Este método é utilizado para medir a atividade antioxidante por meio da captura do radical 2,2-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) ou ABTS^{•+}, de acordo com a metodologia proposta por Rufino *et al.* (2007) e Wooton-Beard; Moran e Ryan (2011) com modificações.

Foram preparadas soluções de ABTS (7 m.mol.L⁻¹) e persulfato de potássio (140 m.mol.L⁻¹) e para obter a solução do radical ABTS^{•+}, adicionou-se 5 mL da solução de ABTS com 88 µL da solução de persulfato de potássio em tubo de ensaio, o qual foi mantido ao abrigo da luz e em temperatura ambiente durante 16 horas. Em seguida, 1 mL da solução ABTS^{•+} foi diluída em álcool etílico absoluto, até obter absorbância de $0,700 \pm 0,05$ nm a 734 nm, então, foram adicionados 30 µL da amostra (devidamente diluída) e 3 mL da solução do radical ABTS^{•+} em tubo de ensaio, agitou-se em vórtex, e deixou-se em repouso ao abrigo da luz por 6 minutos. Realizou-se a leitura a 734 nm em triplicata. Utilizou-se como controle o mesmo

solvente utilizado como solução extratora. Para construir a curva padrão, utilizou-se o mesmo procedimento reacional das amostras, porém, com diferentes concentrações de Trolox (0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 m.mol.L⁻¹). Construiu-se uma curva padrão com concentração de Trolox (m.mol.L⁻¹) versus absorbância a 734 nm, para obtenção da regressão linear. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em m.mol.L⁻¹ de Trolox equivalente/mL de óleo essencial.

4.7.3 Análise da Atividade Antioxidante pelo Método FRAP

O método FRAP (*Ferric Reducing Antioxidant Power*) – Poder Antioxidante de Redução do Ferro, consiste na reação de redução do complexo férrico-tripiridiltriazina (FeIII-TPZ) ao complexo ferroso (FeII-TPZ) (BENZIE; STRAIN, 1996).

Esta análise foi conduzida seguindo protocolo descrito por Rufino *et al.* (2006) e Wooton-Beard; Moran; Ryan (2011) com modificações. Inicialmente foram preparadas as seguintes soluções: tampão acetato de sódio 300 m.mol.L⁻¹, pH 3.6; solução de TPTZ 10 m.mol.L⁻¹ em HCl 40 m.mol.L⁻¹; cloreto férrico 20 m.mol.L⁻¹ e solução de sulfato 2 m.mol.L⁻¹. No momento da análise, preparou-se a solução FRAP, adicionando-se 25 mL de solução tampão acetato de sódio pH 3,6 a 2,5 mL de solução TPTZ e 2,5 mL de solução de cloreto férrico em frasco de vidro âmbar e armazenou-se a 37°C. Em seguida, foram pipetados 90 µL da amostra (devidamente diluída) para tubo de ensaio e adicionados 270 µL de água destilada e 2,7 mL (2700 µL) de solução de FRAP. Agitou-se o tubo em vórtex e incubou-se, ao abrigo da luz, durante 30 minutos à temperatura de 37°C. A leitura foi realizada a 595 nm em triplicata. Foi utilizado como controle o reagente FRAP.

Para construir a curva padrão, foi utilizado o mesmo procedimento reacional das amostras, porém, substituindo a amostra pelas soluções de sulfato ferroso (0,2, 0,5, 1,0, 1,5 e 2,0 m.mol.L⁻¹). Construiu-se a curva padrão, plotando as leituras de absorbância versus a concentração de sulfato ferroso. Os resultados da atividade antioxidante foram expressos em m.mol.L⁻¹ de sulfato ferroso/mL de óleo essencial. Realizou-se a construção da curva.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial obtido das folhas secas e trituradas de *B. oreophila* coletadas no inverno, teve um bom rendimento 0,466 %. Apresentou coloração amarelada conforme pode ser observado na Figura 6. Em pesquisa realizada por Agostini *et al.* (2005) sobre teores de óleo essencial apresentados por doze espécies de *Baccharis* coletadas no sul do Brasil constataram quantidades variáveis entre 0,1 e 0,5% p/v.

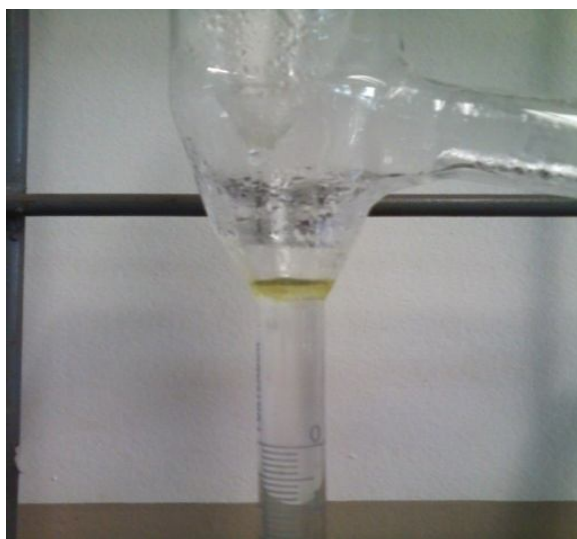


Figura 6. Visualização do óleo essencial de *Baccharis oreophila* (coloração amarelada) ainda no aparelho de Clevenger, após 4 horas de experimento.
Foto: Autora

5.2 COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A caracterização química foi baseada no índice de retenção, calculado em relação aos tempos de retenção de padrões *n*-alcanos (C₉-C₁₉) e nos fragmentos observados nos espectros de massas e comparação desses com a literatura (ADAMS, 2007).

Para cromatografia com temperatura programada, o índice de Kovats é calculado usando a equação:

$$I = 100 \times \left[n + (N - n) \frac{t'_{r(\text{unknown})} - t'_{r(n)}}{t'_{r(N)} - t'_{r(n)}} \right]$$

Onde:

I = Índice de Kovats;

n = o número de átomos de carbono do n-alcano de menor cadeia;

N = o número de átomos de carbono do n-alcano de maior cadeia;

$t'_{r(\text{unknown})}$ = tempo de retenção do composto a ser identificado;

$t'_{r(n)}$ = tempo de retenção do composto com o menor número de átomos de carbono;

$t'_{r(N)}$ = tempo de retenção do composto com o maior número de átomos de carbono.

O cromatograma do OE de *B. oreophila* pode ser observado na Figura 7.

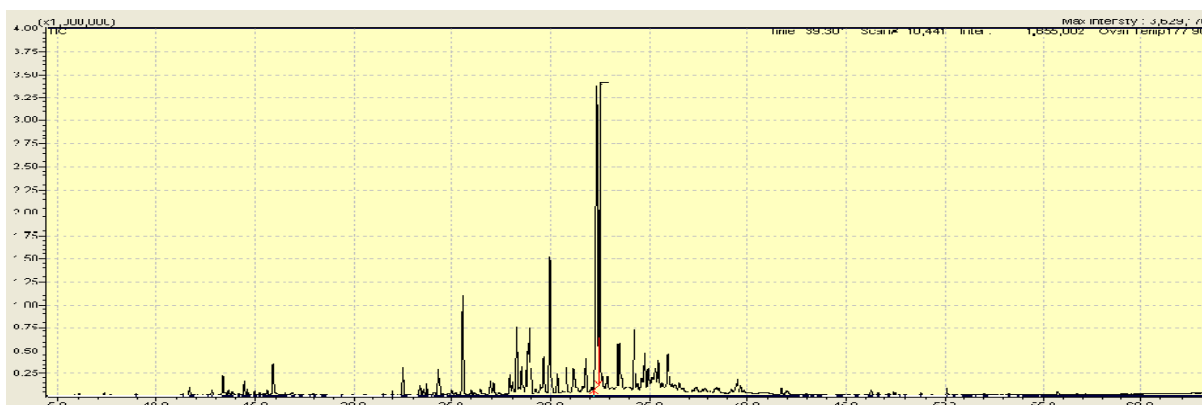


Figura 7. Cromatograma de uma amostra de óleo essencial de *B. oreophila* obtido em equipamento CG/EM.

Os espectros de massas dos constituintes majoritários estão representados nas Figuras 8, 10, 12 e 14.

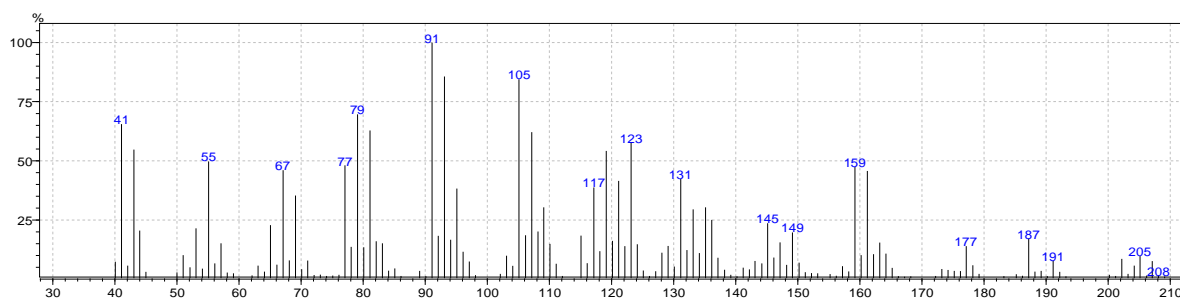


Figura 8. Espectro de massas do constituinte Kusimono (16,37%).

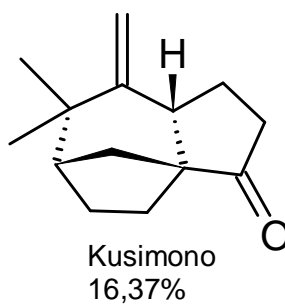


Figura 9. Molécula do Kusimono

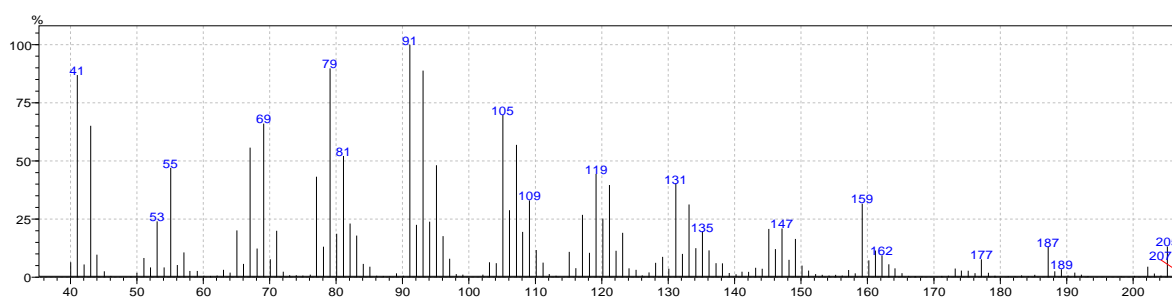


Figura 10. Espectro de massas do constituinte Espatuleno(16,12%).

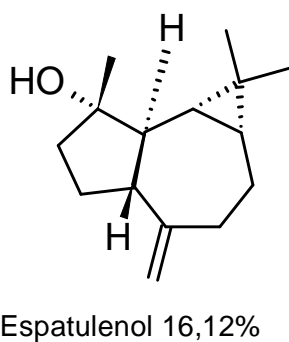


Figura 11. Molécula do Espatuleno

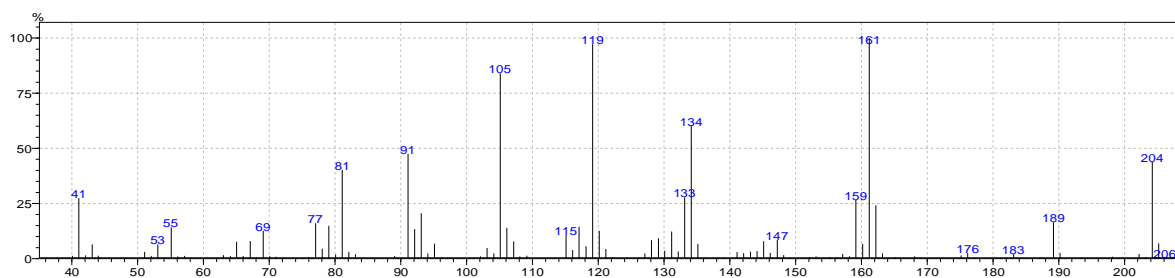


Figura 12. Espectro de massas do constituinte químico δ -Cadineno(5,68%).

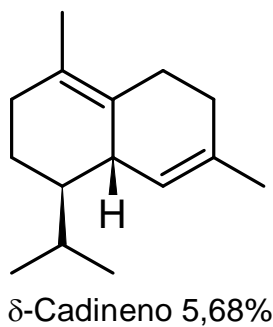


Figura 13. Molécula do δ -Cadineno

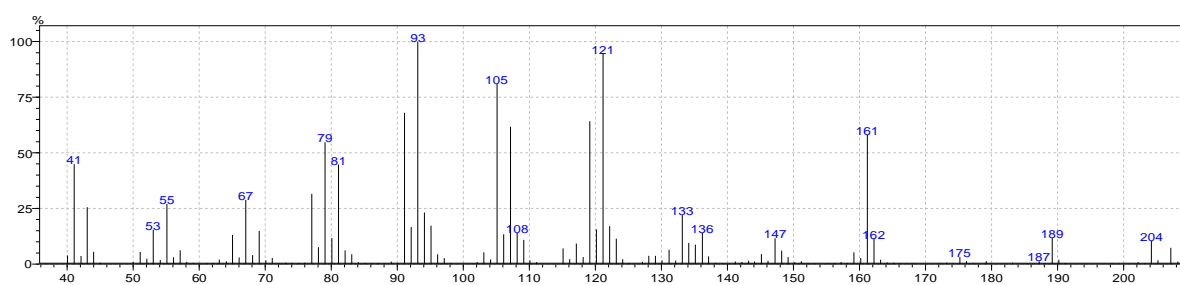


Figura 14. Espectro de massas do constituinte químico Bicylogermacrene (4,09%).

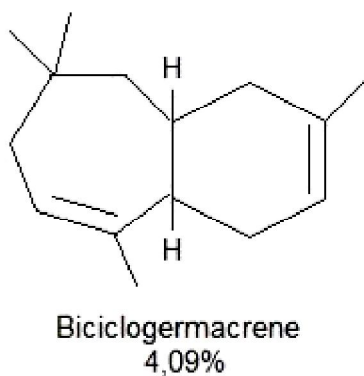


Figura 15. Molécula do Bicylogermacrene

Quanto à caracterização química, na Tabela 2 estão apresentados os constituintes químicos, teores (%), índices de retenção calculados (IRC) e índices de retenção da literatura (IRL) do óleo essencial obtido de folhas coletadas no inverno de *B. oreophila*. Como constituintes majoritários foram identificados o kusimono 16,37%, espatulenol 16,12%, cadineno 5,68% e bicylogermacrene 4,09% (ADAMS, 2007).

O constituinte kusi-mono possui atividade contra várias pragas, como baratas, moscas, besouros, mosquitos, além de ser utilizado na elaboração de perfumes (SAKURAI; KITAHARA; MORI, 1988). O espatulenol apresenta importância biológica com propriedades antibacterianas e moderada atividade citotóxica (LIMBERGER *et al.* 2004).

O composto biciclogermacreno apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram positivas e Gram negativas (SANTOS *et al.* 2013).

Tabela 2. Constituintes químicos identificados no óleo essencial de *Baccharis oreophila* Malme obtido das folhas coletadas no inverno.

Componentes	Percentual detectado (%)	Índice de Retenção Calculado (IRC)	Índice de Retenção da Literatura (IRL)
1- dehydro-Sabina ketone	0,26	1104	1120
2- α - Campholenal	0,16	1130	1126
3- trans-Pinocarveol	0,75	1144	1139
4-trans-Sabinol	0,18	1150	1142
5-Viridene	0,15	1154	1167
6-Pinocarvone	0,45	1168	1164
7-p-Mentha-1,5-dien-8-ol	0,30	1172	1170
8-Terpinen-4-ol	0,13	1182	1177
9-iso-Menthol	0,07	1188	1182
10-cis-Pinocarveol	0,24	1196	1184
11- α -Terpineol	1,44	1203	1188
12- δ -Elemene	0,14	1342	1338
13- α -Cubebene	0,97	1354	1348
14- α -Ylangene	0,41	1372	1375
15-Isoledene	0,23	1380	1376
16- β -Cubebene	0,60	1381	1388
17-Sibirene	1,21	1395	1400
18- α -Gurjunene	0,10	1416	1409
19-(E)-Caryophyllene	3,73	1425	1419
20- β -Copaene	0,16	1435	1432
21-Aromadendrene	0,21	1445	1441
22-trans-Muurola-3,5-diene	0,57	1457	1453
23- α -Humulene	0,51	1460	1454
24-Dauca-5,8-diene	0,75	1480	1472
25-Germacrene D	0,52	1483	1485
26- α -Amorphene	2,70	1488	1495
27-Viridiflorene	1,61	1493	1496
28-trans-Muurola-4(14),5-diene	0,90	1499	1493
29-Bicyclogermacrene	4,09	1503	1500
30- α -Muurolene	0,96	1507	1500
31-trans- β -guaiene	0,26	1514	1502
32-Butylated hydroxytoluene	0,50	1519	1515
33-Cubebol	1,66	1524	1515
34- δ -Cadinene	5,68	1531	1523
35-trans-Cadina-1,4-diene	0,83	1540	1534
36- α -Calacorene	1,34	1551	1545
37-Longicamphenylone	1,97	1561	1563
38- β -Calacorene	0,38	1572	1565
39-Spathulenol	16,12	1591	1578
40-Khusimone	16,37	1597	1604

Continuação da Tabela 2

Componentes	Percentual detectado (%)	Índice de Retenção Calculado (IRC)	Índice de Retenção da Literatura (IRL)
41-Isolongifolan-7- α -ol	1,11	1615	1619
42- α -Corocalene	0,50	1632	1623
43-1-epi-Cubebol	3,45	1638	1628
44-1,7-diepi- α -Cedrenal	0,49	1643	1641
45-Cubenol	2,63	1652	1646
46- α -Muurolol	1,45	1656	1646
47- α -Eudesmol	0,90	1661	1653
48-Selin-11-en-4- α -ol	1,46	1666	1659
49-14-hidroxy-9-epi-(E)-Caryophyllene	1,60	1669	1669
50-Khusilol	0,70	1673	1676
51-Khusinol	3,06	1682	1680
52-Eudesma-4(15),7-dien-1 β -ol "impure"	0,61	1698	1688
53-Eudesm-7(11)-em-4-ol	0,22	1703	1700
54-nor-Calamen-10-one	0,09	1715	1702
55-Isobicyclgermacrenal	0,33	1720	1734
56-Khusimol	0,16	1735	1742
57- Cyclocolorenone	0,64	1752	1760
58- γ -Curcumen-15-al	0,24	1771	1768
59- (E)-Isovalencenol	0,13	1788	1793
Monoterpenos hidrogenados	1,51%		
Monoterpenos Oxigenados	15,15%		
Sesquiterpenos hidrogenados	34,84%		
Sesquiterpenos oxigenados	37,88%		
Total de compostos identificados	89,38%		

Analisando os resultados apresentados da Tabela 2, o OE de *B. oreophila*, demonstrou predominância de sesquiterpenos oxigenados com 37,87%, sesquiterpenos hidrogenados 34,84%, fração de monoterpenos oxigenados 15,15% e uma pequena fração de monoterpenos hidrogenados 1,51%.

Rodrigues, Vaquero e Moreno (2010), avaliando também o óleo essencial de *B. oreophila*, obtiveram resultados inferiores para os compostos hidrocarbonetos sesquiterpênicos 6,04% e monoterpenos oxigenados 1,41% e superiores para sesquiterpenos oxigenados 54,6% e hidrocarbonetos monoterpênicos 22,5%.

Em ensaios efetuados por Fabiane *et al.* (2008), foi possível identificar 93,43% dos compostos do óleo essencial de *B. dracunculifolia*, sendo 48,42% de monoterpenos e 45,01% de sesquiterpenos. Estes mesmos autores identificaram também, 91,34% do óleo de *B. uncinella*, o qual possuía 37,86% de monoterpenos e 53,48% de sesquiterpenos, os quais também são diferentes dos observados neste estudo, e ainda relatam que, quando comparados entre si, ambas as amostras de óleo essencial apresentaram resultados semelhantes, ou seja, 26 compostos, com destaque para o β - pineno (27,45%), ϵ -nerolidol (14,02%), limoneno (10,67%) e espatulenol (9,54%), quando analisado o óleo essencial de *B. dracunculifolia*. Para

B. uncinella observaram a presença de β - pineno (18,76%), ϵ -nerolidol (12,96%), limoneno (6,70%) e espatulenol (10,54%).

Resultados similares aos obtidos neste estudo foram observados por Perreira *et al.* (2010), em trabalho realizado com *B. dracunculifolia*, onde estes autores identificaram como constituintes majoritários o ϵ -nerolidol (33,51%), espatulenol (16,24%), α -muurolol (4,66%), δ -cadinene (3,66%) e bicyclogermacrene (3,42%).

Por outro lado, em estudo com óleo essencial de *Baccharis tridentata*, Souza *et al.* (2011), identificaram 28 substâncias que são responsáveis por 93,14% da constituição química do óleo essencial dessa espécie e o α -tujeno representa o composto majoritário (22,93%), seguido do β -pineno (20,33%) e β -felandreno (16,15%), constituintes esses que diferem dos encontrados como majoritários do óleo essencial de *B. oreophila* desse trabalho.

Silva *et al.* (2007) estudando a variabilidade sazonal dos óleos essenciais de *Baccharis trimera* selvagem e cultivada, encontraram como constituintes majoritários o (E)-cariofileno com seu teor variando de 12 a 21%, o germacreno-D com teor entre 6,3 e 28% e o bicyclogermacreno com teor entre 12 e 23%, valor maior que o encontrado no óleo essencial de *B. oreophila*.

Em trabalho realizado para determinar os constituintes químicos da *B. salicifolia*, Flores *et al.* (2009) mencionam que o β -cariofileno é o constituinte majoritário com 65,16%.

É importante ressaltar que, quando se compara os resultados deste trabalho, em termos de componentes majoritários detectados, com outros trabalhos, o componente espatulenol (16,12%), é também detectado nesses trabalhos. Em Fabiane *et al.* (2008), 9,54% de espatulenol no óleo essencial de *B. dracunculifolia* e 10,54% no de *B. uncinella*. Em Perreira *et al.* (2010), espatulenol em um teor de 16,24%, em *B. dracunculifolia*, além de bicyclogermacrene (3,42%), que também foi considerado um dos majoritários no presente trabalho (4,09%). Ainda em relação ao bicyclogermacrene, foi relatado por Silva *et al.* (2007), em estudo sazonal no óleo essencial de *Baccharis trimera*, com percentuais variando entre 12 e 23%.

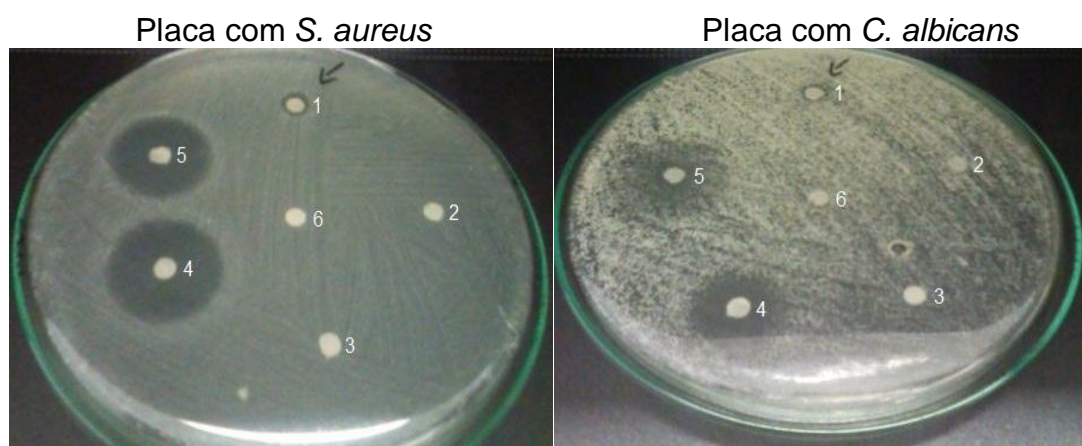
Fabiane *et al.* (2008), relatam em seu trabalho que em uma determinada espécie, o rendimento do óleo e a concentração de cada um dos constituintes podem variar durante o desenvolvimento do vegetal, bem como alguns fatores como ambiente, temperatura, umidade, exposição ao vento, ao sol, exercem influência

direta na composição e rendimento, o que justifica a diferença entre uma amostra de óleo essencial e outra, mesmo sendo obtido da mesma espécie.

6 RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA POR DISCO DIFUSÃO

Os resultados para atividade antimicrobiana estão apresentados nas tabelas 3 e 4 e figura 16, os quais demonstraram que o óleo essencial de *B. oreophila* apresentou potencial antimicrobiano frente ao *S. aureus* com média dos diâmetros dos halos de inibição de 10,33 mm e *C. albicans* com média de 8,66 mm.

Conforme relatado por Koyama *et al.* (1997), diversos componentes dos OEs podem atuar como agentes antimicrobianos e estes podem diferir de espécie para espécie e possuir funções específicas para destruir ou invadir a estrutura microbiana. Os testes para atividade antimicrobiana por disco difusão demonstraram que o *S. aureus* e a *C. albicans* apresentaram sensibilidade à amostra de óleo essencial puro de *B. oreophila*, conforme pode ser observado na Figura 16.



Disco 1: Óleo essencial (OE) puro
 Disco 2: OE [10⁻¹]
 Disco 3: OE [10⁻²]
 Disco 4: tetraciclina
 Disco 5: norfloxacino
 Disco 6: Água destilada

Disco 1: Óleo essencial (OE) puro
 Disco 2: OE [10⁻¹]
 Disco 3: OE [10⁻²]
 Disco 4: anfotericina
 Disco 5: fluconazol
 Disco 6: Água destilada

Figura 16. Resultado do disco difusão com óleo essencial de *B. oreophila* frente a bactéria *S. aureus* e a levedura *C. albicans*.

Fonte: Autora

Tabela 3. Médias dos diâmetros dos halos de inibição em mm, do óleo essencial obtido de folhas de *B. oreophila*, coletadas no inverno, testado contra bactérias.

Microrganismo	OE puro	OE[10 ⁻¹]	OE[10 ⁻²]	Tet	Norf
<i>E. coli</i>	–	–	–	–	–
<i>S. aureus</i>	10,33	–	–	26,66	21,66

OE [10⁻¹]: 100 µL de óleo essencial + 10 µL de Dimetilsulfóxido + 890 µL de salina;

OE [10⁻²]: 10 µL da solução anterior + 90 µL de salina;

tet: tetraciclina;

norf: norfloxacino

Tabela 4. Médias dos diâmetros dos halos de inibição em mm, do óleo essencial obtido de folhas de *B. oreophila*, coletadas no inverno, testado contra leveduras.

Microrganismo	OE puro	OE[10 ⁻¹]	OE[10 ⁻²]	Anf	Fluc
<i>C. tropicalis</i>	–	–	–	–	–
<i>C. albicans</i>	8,66	–	–	14	11,33

OE [10⁻¹]: 100 µL de óleo essencial + 10 µL de Dimetilsulfóxido + 890 µL de salina;

OE [10⁻²]: 10 µL da solução anterior + 90 µL de salina;

anf: anfotericina B

fluc: fluconazol

Os resultados estão de acordo com os testes realizados por Ferronato *et al.* (2007) com óleo essencial de *Baccharis uncinella* e *Baccharis dracunculifolia* coletados na região Sudoeste do Paraná, pois verificaram que o óleo essencial inibiu o crescimento da *E. coli* com halos de inibição de 13,05 mm e 18,92 mm respectivamente e *S. aureus* com halos de inibição de 12,41 mm e 14,53 mm respectivamente. Em ensaios elaborados por Vannini *et al.* (2007), pelo método de difusão em ágar, variante poço escavado, com óleo essencial de *B. uncinella* proveniente de material vegetal coletado no mês de março, de maneira que o óleo diluído 1:2 apresentou atividade sobre o *S. aureus* com halo de inibição de 15 mm, já o óleo essencial oriundo de material vegetal coletado no mês de setembro, na mesma diluição apresentou a média para o halo de inibição de 20 mm. Soares *et al.* (2013), testaram extrato de *Baccharis dracunculifolia* na concentração 45%, obtiveram halo de inibição de 16,7 mm frente ao *S. aureus*, e sobre *E. coli*, halo de 21,3 mm.

6.1 RESULTADOS DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)

A determinação da CIM foi realizada para *S. aureus* e *C. albicans*, os quais demonstraram sensibilidade no teste de disco difusão. Conforme observado na

figura 17. A CIM do óleo essencial de *B. oreophila* frente ao *S. aureus* foi de 1250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. No entanto, o OE não apresentou ação sobre a levedura *C. albicans* nas mesmas concentrações, o que podemos concluir que as cepas da levedura em questão se comportam de maneira diferente ao *S. aureus* na presença do óleo essencial de *B. oreophila*.

Estes resultados estão de acordo com Flores *et al.* (2009) os quais constataram atividade do óleo essencial de *Baccharis salicifolia* contra bactérias Gram positivas, com CIM variando entre 0,47 e 0,94 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, destacando o resultado da CIM de 0,94 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para os ensaios utilizando *S. aureus*, porém o óleo essencial de *B. salicifolia* não expressou ação positiva sobre leveduras do gênero *Candida*.

Desta mesma forma, Rodrigues, Vaquero e Moreno (2010), avaliaram atividade antimicrobiana pela CIM de OE de folhas de *B. oreophila* e descreveram 91% de inibição sobre *S. aureus*, 60,2% de inibição para *C. albicans*, 96,5% contra *Pseudomonas aeruginosa* e ausência de inibição sobre *E. coli*.

Alianni *et al.* (2001) em ensaios realizados com óleos essenciais de *Origanum scabrum* determinaram a CIM extremamente forte apresentando valores entre 280-1270 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e atividade fraca, representada em valores da CIM entre 1810- 8850 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Duarte *et al.* (2005) citam em seu trabalho que óleos essenciais ou extratos que apresentam CIM inferior a 2000 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ são considerados com potencial antimicrobiano. Este comportamento foi observado neste trabalho para o óleo essencial de folhas de *B. oreophila* coletadas no inverno na concentração de 1250 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo considerada uma CIM forte, com potencial antimicrobiano frente ao *S. aureus*, como pode ser observado na Figura 17.

Concentração Inibitória mínima
Óleo essencial de *Baccharis oreophila* Malme
S. aureus
12/12/2015

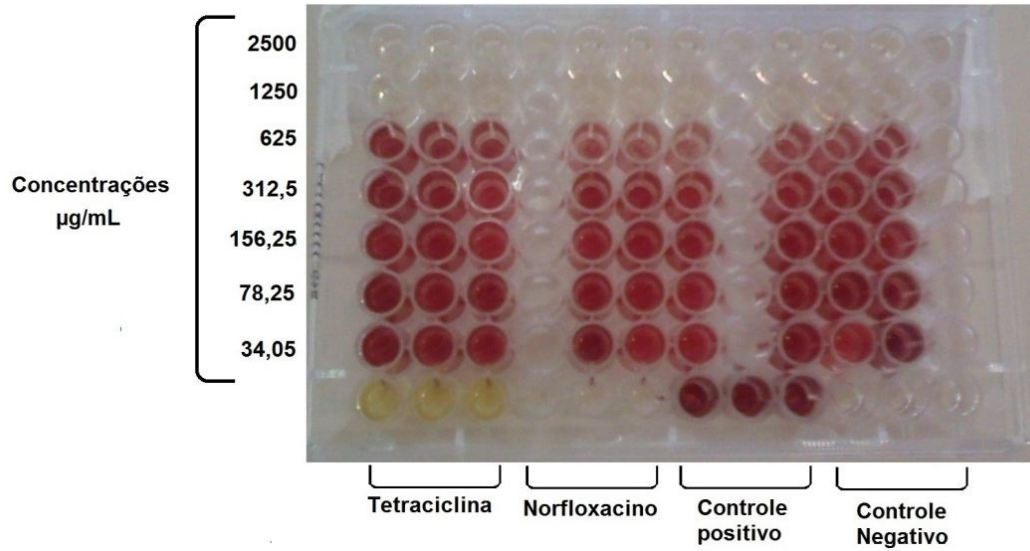


Figura 17. Resultado da CIM do óleo essencial de *Baccharis oreophila* Malme sobre *S. aureus* pelo método de micro diluição em placa.
Fonte: Autora

7 RESULTADOS DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os resultados para atividade antioxidante do óleo essencial de *B. oreophila* utilizando os métodos de ABTS, FRAP e DPPH estão apresentados na Tabela 5.

Tabela 5. Resultados obtidos para atividade antioxidante do óleo essencial *B. oreophila* pelos métodos ABTS (Trolox equivalente/mL); FRAP (sulfato ferroso equivalente/mL), e DPPH (Trolox equivalente/mL).

	ABTS (734 nm) m.mol.L ⁻¹ TE/mL	FRAP (595 nm) m.mol.L ⁻¹ sulfato equiv./mL	DPPH (515 nm) m.mol.L ⁻¹ TE/mL (60 minutos)
Média	1,4	45,51	7,12
DV	0,02	0,52	0,38

Foi possível observar que o OE das folhas de *B. oreophila* apresentou atividade antioxidante para os três métodos avaliados, sendo que o maior resultado foi observado utilizando o método de FRAP (45,51 m.mol⁻¹ de sulfato ferroso equivalente/mL), seguido pelo DPPH com 7,12 m.mol.L⁻¹ de TE/mL e, por último o ABTS com 1,45 m.mol.L⁻¹ de TE/mL. Similarmente ao observado neste estudo, Tischer (2014) verificou poder antioxidante pelos métodos de DPPH EC50 (0,992) e FRAP (66,14 mg de óleo essencial/mg de Trolox) utilizando amostras de óleo essencial de *B. articulata* obtido de planta seca na estufa. Desta mesma forma, Ferronato *et al.* (2006), relataram propriedades antioxidantes de óleos essenciais de *B. dracunculifolia* e *B. uncinella*, utilizando reações de oxidação acoplada do β -caroteno e do ácido linoleico. Estes autores observaram que ambos os óleos essenciais inibiram a formação de espécies reativas de oxigênio em até 65,66% para *B. dracunculifolia* e 52,18% para *B. uncinella* quando na presença de 50 μ L de óleo essencial.

Sartor *et al.* (2013) também observou atividade antioxidante de 1,33 mg/mL pelo método de DPPH Ec50 realizada com extrato metanólico de *B. dentata* coletada no inverno. Já em pesquisa realizada por Souza *et al.* (2011) para avaliar atividade antioxidante pelo teste de neutralização do radical DPPH com óleo essencial de *B. tridentata* relataram atividade próxima de zero.

8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Apesar do gênero *Baccharis* possuir aproximadamente 120 espécies no Brasil, o óleo essencial de *Baccharis oreophila* é pouco investigado e informações sob o aspecto químico e de atividade biológica sobre a espécie, são escassas.

Foram caracterizados 89,38% do óleo essencial, obtido das folhas coletadas no inverno. Dos 59 constituintes identificados, destacam-se como majoritários, o kusimono (16,37%), o espatulenol (16,12%), o δ -cadineno (5,68%) e o biciclogermacreno (4,09%).

O óleo essencial dessa espécie mostrou-se eficiente na inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* com Concentração Inibitória Mínima (CIM) de 1250 $\mu\text{g.mL}$, porém a *Candida albicans* mostrou-se resistente ao óleo essencial nesse teste.

O óleo essencial das folhas de *B. oreophila* apresentou atividade antioxidante nas três metodologias avaliadas, sendo o FRAP o mais eficiente (45,51 m.mol.L^{-1} de sulfato ferroso equivalente/mL), seguido pelo DPPH com 7,12 m.mol.L^{-1} de TE/mL e ABTS com 1,45 m.mol.L^{-1} de TE/mL

A partir dos resultados obtidos, sugerem-se estudos posteriores, avaliando amostras coletadas em diferentes estações, além da possibilidade de fracionamento e purificação de compostos presentes no óleo essencial para avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante desses componentes separadamente.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, Roberto P. **Identificacion of Essential Oil Components by Gas Chromatography /Mass Spectroscopy**. Allured Publishing Corporation. Carol Stream, Illinois, 2007.
- ADATI, Roberto T. **Estudo farmacognóstico de *Acanthospermum australe* (Loefl) O. Kuntze Astaraceae**. Tese doutorado. 2006.
- ALEKESIC, Verica.; KNEZEVIC, Petar. Antimicrobial and antioxidative activity of extracts and essential oils of *Myrtus communis* L. **Microbiological Research**, v. 169, p. 240-254.
- ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, Ioanna B. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two origanum species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, 9. ed., p. 4168-4170, 2001.
- ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation research**, v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996.
- ANTUNES, Ana G. V.; PASQUALOTTO, Alessandro C.; DIAZ, Maíra C.; D'AZEVEDO, Pedro A.; SEVERO, Luiz C. Candidemia in a Brazilian tertiary care hospital: species distribution and antifungal susceptibility patterns. **Revista do instituto de medicina tropical de São Paulo**, v. 46, n. 5. 2004.
- ARAÚJO, José C. L. V.; LIMA, Edeltrudes O.; CEBALLOS, Beatriz S. O.; FREIRE, Kristerson R. L.; FILHO, Lauro S. Ação antimicrobiana de óleos essenciais sobre micro-organismos potencialmente causadores de infecções oportunistas. **Revista da Patologia Tropical**, v. 3 n. 1, p. 55-64, 2004.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-75, feb., 2008.
- BARBEDO, Leandro S.; SGARBI, Diana B. G. Candidíase. **Jornal Brasileiro Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22-38, Niterói, abr., 2010.
- BENZIE, Iris F. F.; STRAIN, John J. The Ferric Reducing Ability of Plasma (FRAP) as a Measure of "Antioxidant Power: The FRAP Assay. **Analytical Biochemistry**, v. 239, p. 70-76, 1996.
- BERGAMASCHI, Jonathan. M. **Terpenos**. Jundiaí, 2014. Disponível em: <<http://www.terpenoil.com.br/tecnologia/terpenos.pdf>>.
- BERGOLD, Ana M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 159-172, 2004.
- BIASI, Antonio; DESCHAMPS, Cícero. **Plantas aromáticas: do cultivo à produção de óleo essencial**. Curitiba: Layer Studio, 2009.

BIZZO, Humberto R.; HOVELL, Ana M. C.; REZENDE, Claudia. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química nova**, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, Marie E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL, Ministério da Saúde, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – Anvisa. **Resolução – RDC**, n. 2, de 15 de janeiro de 2007. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>.

BUDEL, Jane M.; DUARTE, Marcia R.; SANTOS, C. A. M.; FARAGO, Paulo V.; MATZENBACHER, Nelson J. O progresso da pesquisa sobre o gênero *Baccharis*, *Asteraceae*: I – Estudos botânicos. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, 2005.

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

CANUTO, Masiá M.; RODERO, Gutiérrez F. Antifungal drug resistance to azoles and polyenes. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 2, n. 9, p. 550-563, Sep. 2002. Disponível em: <<http://www.thelancet.com/journals/laninf/article/PIIS1473-3099%2802%2900371-7/abstract>>

CLINICAL and Laboratory Standards Institute (CLSI) **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard—Eleventh Edition. CLSI document M02-A11. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute; 2012.

_____. **Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts**. M27-A3. 3rd. ed. Wayne, Pa, USA. 2008.

_____. **Method for Antifungal Disk Diffusion Susceptibility Testing of Yeasts**. Second Edition. M44-A2. 2nd. ed. Wayne, Pa, USA. 2009.

_____. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania, USA, 2003.

COSTA, Nilton P.C.; FILHO, Julio M.; NETO, José B.F.; KRZYZANOWKI, Francisco C.; HENNING, Ademir A. Teste de tetrazólio em semente de soja com condicionamento abreviado- séries sementes. **Comunicado técnico on line EMBRAPA**. Londrina, PR, maio, 2008. Disponível em: <[file:///C:/Users/Usuario/Documents/56%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Usuario/Documents/56%20(1).pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2016.

DJILANI, Abdelouaheb; DICKO, Amadou. The Therapeutic Benefits of Essential Oils. **Nutrition, well-Being and Health**, p. 155-178, 2012.

DUARTE, Marta C.; FIGUEIRA, Glyn M.; SARTORATTO, Adilson; REHDER, Vera L. G.; DELARMELENA, C. Anti-candida activity of brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, 2. ed., p. 305-311, 2005.

EISENREICH, Wolfgang; SCWARZ, Mathias; CARTAYRADE, Alain; ARIGONI, Duilio; ZENK, Meinhard H.; BACHER, Adelbert. The deoxyxylulose phosphate pathway of terpenoid biosynthesis in plants and microorganisms. **Chemistry & Biology**, p. 221-233, Munique e Zurique, 1998.

FABIANE, Kely C.; FERRONATO, R.; SANTOS, Ana C.; ONOFRE, Sideney B. Características físico-químicas dos óleos essenciais de *Baccharis dracunculifolia* e *Baccharis uncinella* D. C (*Asteraceae*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, 2008.

FERRAZ, João B. S.; BARATA, Lauro E. S.; SAMPAIO, Paulo T. B.; GUIMARÃES, Giuliano B. Perfumes da floresta amazônica: em busca de uma alternativa sustentável. **Ciência e Cultura**, v. 61, n. 3, p. 40-43, 2009.

FERRONATO, Regina; MARCHESAN, Eli D.; BEDNARSKI, Franciela; ALENCAR, Severino M.; ONOFRE, Sideney B. Atividade antioxidante dos óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C e *Baccharis uncinella* D.C (*Asteraceae*). **Arquivos Ciências da Saúde Unipar**, v. 10, n. 2, p. 67-70, 2006.

_____. 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, 2007.

FLORES, Roberto C; PONZI, Marta; ARDANAZ, Carlos; TONN, Carlos E.; DONADEL, Osvaldo J. Chemical composition of essential oil of *Baccharis salicifolia* (Ruiz & Pavon) Pers. And antibacterial activity. **Journal of the Chilean chemical society**, v. 54, n. 4, p. 475-476, 2009.

GABRIELSON, Jenny; HART, Mark; JARELOV, Anna; KUHN, Inger; MCKENZIE, Douglas; MALLBY, Roland. Evaluation of redox indicators and the use of digital scanners and spectrophotometer for quantification of microbial growth in microplates. **Journal of microbiological methods**, p. 63-73, 2002.

JAKIEMIU, Elizabete A. R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. Dissertação de Mestrado, 2008.

KARAMAN, Ibrahim; SAHIN, F.; GULLUCE, M.; OGUTÇU, H.; SENGUL, M.; ADIGUZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 85, p. 231-235, 2003.

KOYAMA, S.; YAMAGUCHI, Y.; TANAKA, S.; MOTOYOSHIYO, J. A new substance (yoshixol) with an interesting antibiotic mechanism from wood oil Japanese traditional tree (Kiso-Hinoki), *Chamaecyparis obtuse*. **General Pharmacology**, v. 28, n. 5, p. 797-804, 1997.

LIMBERGER, Renata P.; SOBRAL, Marcos; HENRIQUES, Amélia T.; MENUT, Chantal; BESSIÈRE, Jean. M. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 916-919, 2004.

OSTROSKY, Elissa O.; MIZUMOTO, Miriam K.; LIMA, Marcos E. L.; KANEKO, Telma M.; NISHIKAWA, Suzana O.; FREITAS, Beatriz R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira e Farmacognosia**, v. 18, n. 2, 2008.

PERREIRA, Natalia A.; MAGALHÃES, Lizandra; MORAES, Denis R.; CAIXETA, Soraya C.; SOUZA, João P.; BASTOS, Jairo; CUNHA, Wilson; SILVA, Marcio L.; NANAYAKKARA, Dhammiko; SILVA FILHO, Ademar A. Antiprotozoal, schistosomicidal, and antimicrobial activities of the essential oil from the leaves of *Baccharis dracunculifolia*. **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p. 993-1001, 2010.

RABANAL, R. M.; ARIAS, A.; PRADO, B.; HERNÁNDEZ-PÉREZ, M.; SANCHEZ-MATEO, C. C. Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from de Canary Islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 287-292, 2002.

RAUT, Jayant S.; KARUPPAYIL, Sakunny M. A status review on the medicinal properties of essential oils. **Industrial crops and products**, v. 62, p. 260-264, 2014.

RAVINDRA, N. S.; KULKARNI, R. N. Essential oil yield and quality in rose-scented geranium: variation among clones and plant parts. **Scientia Horticulturae**, v. 185, p. 31-35, 2015.

RODRIGUES, Pamela M.; VAQUERO, Nancy; MORENO, Paulo R. H. Análise da variação sazonal da composição do óleo essencial de *Baccharis oreophila* Malme (Asteraceae). **XXI Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**. João Pessoa, PB, 2010. Anais eletrônico. Disponível em: <<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=2432&numeroEdicao=18>>. Acesso em: 20 out. 2015.

RUFINO, Maria S. M.; ALVES, Ricardo E.; BRITO, Edy S.; MORAIS, Selene M.; SAMPAIO, Caroline G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, Jara; SAURA-CLIXTO, Fulgencio D. Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS^{o+}. **Comunicado Técnico on line EMBRAPA**. Fortaleza, CE, jul., 2001.

_____. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de redução do Ferro – FRAP. **Comunicado Técnico on line EMBRAPA**. Fortaleza, CE, dez., 2006.

SAKURAI, Kazutoshi; KITAHARA, Takeshi; MORI, Kehji. A new synthesis of (-)-khusimone. **Tetrahedron**, v. 44, 21. ed., p. 6581-6588, 1988.

SANTANA, Hellen C. D. de. **Caracterização química do óleo essencial de *Baccharis reticularia* DC. (Asteraceae) em função de diferentes procedências e da sazonalidade no Distrito Federal**. Brasília, Dissertação de Mestrado, 2013.

SANTOS, Adailson S. **Óleos Essenciais – Uma abordagem econômica e industrial**. Rio de Janeiro: Interciência, 2011. 386p.

SANTOS, Thalita G.; DOGNINI, Jocinei; BEGNINI, Iêda M.; REBELO, Ricardo A.; VERDI, Marcio; GASPER, Andre L.; DALMARCO, Eduardo M. Chemical characterization of essential oils from *Drimys angustifolia* miers (Winteraceae) and antibacterial activity of their major compounds. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 24, n. 1, p. 164-170, 2013.

SARTOR, T.; XAVIER, V. B.; FALCÃO, M. A.; MONDIN, C. A.; SANTOS, M. A.; CASSEL, E.; ASTARITA, L. V.; SANTARÉM, E. R. Seasonal changes in phenolic compounds and in the biological activities of *Baccharis dentata* (Vell.) G.M. Barroso. **Industrial crops and products**, v. 51, p. 355-359, 2013.

SIANI, Antônio C.; SAMPAIO, André L. F.; SOUSA, Mariana C.; HERNRIQUES, Maria G. M. O.; RAMOS, Monica F. S. Óleos essenciais: Potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, p. 38-43, 2000.

SILVA, Fabino G.; OLIVEIRA, Carolina B. A.; PINTO, José E. B. P.; NASCIMENTO, Vivian E.; SANTOS, Suzana C.; SERAPHIN, José C.; FERRI, Pedro H. Seasonal variability in the essential oil of wild and cultivated *Baccharis trimera*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, n. 5. São Paulo, 2007.

SIMÕES, Claudia Maria O. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da Universidade UFRGS / Editora da UFSC, 2010.

SOARES, Killarney A.; RESENDE, Anselmo; JUNIOR, Watercides S.; PANDOLFO, Cristina. Avaliação da atividade antimicrobiana de extrato de alecrim-do-campo (*Baccharis dracunculifolia*) sobre bactérias Gram negativas e Gram positivas. **Ensaio e Ciência: Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 17, n. 4, p. 17-28, 2013.

SOUZA, S. P. *et al.* Óleo essencial de *Baccharis tridentata* Vahl: Composição química, atividade antioxidante e fungitóxica, e caracterização morfológica das estruturas secretoras por microscopia eletrônica de varredura. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 4, 2011.

STORZ, G.; CHRISTMAN, M. F.; SIES, H.; AMES, B. N. Spontaneous mutagenesis and oxidative damage to DNA in *Salmonella typhimurium*. **Proceedings of the National Academy of Science**, v. 84, n. 2, p. 8917-8921, 1987.

TISCHER, Bruna. **Avaliação do efeito de diferentes métodos de secagem, moagem e extração no óleo essencial de *Baccharis articulata* (Lam.) Pers.** 2014. 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Rurais, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2014.

THOMPSON, J. H.; BEVAN, J. A. **Fundamentos da Farmacologia**. São Paulo: Harper & Row, 1979.

TRABULSI, L. R.; ALTERTHUM, F. **Microbiologia**. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

TRUJILLO, Laura S.; GRAU, Alejandra R.; FORTUNY, Robert S.; BELLOSO, Olga M. Physicochemical characterization and antimicrobial activity of food-grade emulsions and nanoemulsions incorporating essential oil. **Food Hydrocolloids**, v. 43, p. 547-556, 2015.

VAN, Den Dool H.; KRATZ P. D. A generalization of Retention Index System including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **J. Chromatogr**, v. 11, p. 463-471, 1963.

VANNINI, Aneli B., VIEIRA, Gladys R. T.; DALMARCO, Eduardo M.; REBELO, Ricardo A. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Baccharis uncinella* DC. proveniente da região sudoeste do Paraná.).In: Sociedade Brasileira de Química XXI Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil. 2010, João Pessoa, PB. **Anais eletrônico**. Disponível em:

<<https://uspdigital.usp.br/siicusp/cdOnlineTrabalhoVisualizarResumo?numeroInscricaoTrabalho=2432&numeroEdicao=18>>. Acesso em: 20 out. 2015.

VERDI, Luiz G.; BRIGHENTE, Inês M. C.; PIZZOLATI, Moacir G. Gênero *Baccharis* (*Asteraceae*): aspectos químicos, econômicos e biológicos. **Química nova**, v. 28, n. 1, 2005.

VIVAN, Aparecida G.; BARBOZA, Fabrício S.; LUZ, Maria L. G. S.; LUZ, Carlos A. S.; RAMIREZ, Orlando P.; GOMES, Mário C.; SOARES, Fátima C. Estudo técnico e econômico de um sistema móvel de extração de óleo essencial de eucalipto. **Revista Cerne**, v. 17, n. 1, p. 23-31, 2011.

WOLFF, Simon P.; GARNER, Anthony.; DEAN, Roger T. Free radicals, lipids and protein degradation. **Trends in biochemical sciences**, v. 11, n. 2, p. 27-31, 1986.

WOOTTON-BEARD, Peter C.; MORAN, Aisling; RYAN, Lisa. Stability of the total antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin–Ciocalteu methods. **Food Research International**, v. 44, n. 1, 217-224, 2011.