

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ CENTRO DE CIÊNCIAS  
BIOLÓGICAS E DA SAÚDE PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM  
CIÊNCIAS AMBIENTAIS – NÍVEL MESTRADO

CAMILA BEATRIZ SANTANA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, INSETICIDA E  
ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATOS DE *Myrcia oblongata* DC

CHEMICAL COMPOSITION, ANTIMICROBIAL ACTIVITY, INSECTICIDE AND  
ANTIOXIDANT OF ESSENTIAL OIL AND EXTRACTS OF *Myrcia oblongata* DC.

CASCADEL-PR

MAIO/2017

CAMILA BEATRIZ SANTANA

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, INSETICIDA E  
ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATOS DE *Myrcia oblongata* DC.

Dissertação apresentado ao Programa de Pós-graduação  
Stricto Sensu em Ciências Ambientais – Nível  
Mestrado, do Centro de Ciências Biológicas e da  
Saúde, da Universidade estadual do Oeste do Paraná,  
como requisito parcial para a obtenção do título de  
Mestre em Ciências Ambientais.

Área de Concentração: Ciências Ambientais

Orientador: Fabiana Gisele da Silva Pinto

CASCADEL-PR

Maio/2017

## RESUMO

Os produtos do metabolismo secundário das plantas têm despertado grande interesse econômico pela sua diversidade química e atividades biológicas. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi determinar a composição química dos extratos vegetais de *Myrcia oblongata*, avaliar o potencial antioxidante destes extratos, testar a atividade antimicrobiana frente a onze microrganismos padrões e dez sorotipos de *Salmonella* spp. de origem avícola, bem como avaliar o potencial de mortalidade dos extratos e óleo essencial sobre *Alphitobius diaperinus*. Foram identificados saponinas, esteróides, triterpenóides, taninos e flavonóides. Os extratos apresentaram atividade para todos os microrganismos testados, com exceção do extrato metanólico que não demonstrou atividade para *P. mirabilis* e *S. Enteritidis*. O extrato hexânico, acetato de etila e acetona possuem atividade antioxidante. O óleo essencial e os extratos de hexano, etanólico, metanólico e de acetato de etila apresentaram elevados índices de mortalidade sobre a larva de *A. diaperinus*. Para os adultos os melhores resultados foram obtidos para o óleo essencial, com mortalidade superior a 80%. Os resultados direcionam a importância de estudos para compreender o potencial e a ação de extratos vegetais e óleos essenciais, visando à diminuição de impactos causados pelo uso extensivo de antimicrobianos e antioxidantes sintéticos e pelo uso indevido de substâncias químicas para o controle de pragas.

**Palavras-chave:** avicultura, fitoquímica, *Salmonella*, inseticida, microdiluição, pragas

## ABSTRACT

The products of secondary plant metabolism have aroused great economic interest in their chemical diversity and biological activities. The objective of this work was to determine the chemical composition of *Myrcia oblongata* extracts, to evaluate the antioxidant potential of these extracts, to test the antimicrobial activity against eleven standard microorganisms and ten serotypes of *Salmonella* spp. Of poultry origin, as well as to evaluate the potential mortality of extracts and essential oil on *Alphitobius diaperinus*. Saponins, steroids, triterpenoids, tannins and flavonoids have been identified. The extracts presented activity for all microorganisms tested, except for the methanolic extract that did not show activity for *P. mirabilis* and *S. Enteritidis*. The hexane extract, ethyl acetate and acetone have antioxidant activity. The essential oil and extracts of hexane, ethanolic, methanolic and ethyl acetate showed high mortality rates on *A. diaperinus* larvae. For adults, the best results were obtained for essential oil, with a mortality greater than 80%. The results point to the importance of studies to understand the potential and action of plant extracts and essential oils, aiming at reducing the impacts caused by the extensive use of antimicrobials and synthetic antioxidants and by the undue use of chemical substances for pest control.

**Key words:** poultry farming, phytochemistry, Salmonella, insecticide, microdilution, pests



A paciência é diretamente proporcional ao propósito. Se você realmente quer, sabe o que quer, você tem paciência.  
Dr. Celso Charuri

## DEDICATÓRIA

Dedico à minha Família e aos verdadeiros Amigos.

## AGRADECIMENTOS

À Deus, pela Vida.

Aos meus pais Hamilton e Rejane e a minha irmã Anna Paula por toda compreensão, dedicação e ensinamentos. Que me ensinam Coragem e Fortaleza nos momentos difíceis e que compartilham as Alegrias. Mostram-me como tudo é cíclico e que independente do ciclo que eu esteja, tenho a certeza que vocês estarão por perto.

A minha filha Isadora, por me ajudar a chegar mais perto de sentir o Amor verdadeiro. Agradeço ao meu namorado, João Pedro, por mostrar que a Vida pode ser leve e engraçada, me ajudar a ser persistente e paciente, por me equilibrar sempre. Norimar e Selma que me tratam como filha, me sinto da família de vocês.

A minha orientadora, Dra. Fabiana Gisele da Silva Pinto, que mesmo depois de tantas tribulações, continuou confiando no meu trabalho. Muito obrigada! Aos antigos e novos colegas de laboratório Juliete, Adrieli, Cristiane, Thaís, Ana, Camila, Marina, Adriana, Jovana, Mayara e Rafaela cada uma com suas peculiaridades, suas características e diferenças que sem perceber me ajudam a ser alguém melhor. Meninas, gosto muito de vocês! Andreia (Boni), com uma paciência enorme, sempre ajudando (independente de quem seja), sempre resolvendo os problemas de todos, sem você seria muito difícil!

Obrigada mesmo!

Aos professores (principalmente Fabiana, Luis, Ana Tereza e Miryan) e aos colegas de mestrado que pela convivência me ajudaram a reconhecer e a lidar com as diferenças de cada um.

Aos verdadeiros Amigos, mas principalmente a deles que pelo exemplo, me ensinou Princípios, mostrou-me o verdadeiro sentido da Vida. Meu eterno agradecimento.



## Sumário

Revisão bibliográfica .....	9
Capítulo 1. Composição química, potencial antimicrobiano, antioxidante, acaricida e de repelência do óleo essencial de <i>Myrcia oblongata</i> DC.....	17
Capítulo 2. Atividades biológicas do óleo essencial e extratos vegetais de <i>Myrcia oblongata</i>	36
Anexo 1: Normas para submissão do primeiro artigo: Brazilian Journal of Biology .....	60
Anexo 2: Normas da revista Medical and Veterinary Entomology.....	66

## Revisão bibliográfica

### Setor avícola

A avicultura brasileira ocupa desde 2011 a liderança na exportação de carne de frango, além de ser o terceiro maior produtor mundial, produzindo um total de 13,14 milhões de toneladas ao ano (Ubabef, 2016). O aumento da produtividade avícola vinculou-se a inovações na tecnologia de produção e a novos métodos de processamento desta carne, visando diminuir o tempo e o custo de produção (Palermo, 2015).

Para diminuir o tempo de produção, a nutrição dos frangos também foi incrementada com minerais, vitaminas e antimicrobianos. Estes últimos são utilizados neste setor para tratamento de enfermidades, infecções e como promotores de crescimento (Belusso; Hespanhol, 2010). O termo, “antibióticos promotores de crescimento” (APC) é muito utilizado na indústria, apesar de não ser conceitualmente correto. Este termo, deriva do efeito positivo que os antimicrobianos possuem sobre o crescimento das aves. Entretanto, estes antimicrobianos são adicionados às rações, em dosagens abaixo da utilizada no tratamento de doenças, o que pode gerar problemas relacionados resistência microbiana (Rutz, 2007).

A utilização dos APC ao longo dos anos foi interessante no desempenho das aves, porém em 1959 foi discutido o primeiro caso de uma possível resistência bacteriana com a utilização de clortetraciclina (Elliot; Barnes, 1959). Este padrão de resistência foi sendo cada vez mais notificado, até que em 2006 uma decisão da União Europeia afetou o mercado de exportação de carne de frango brasileira, devido à proibição da utilização dos antimicrobianos como APC. Esta proibição provocou uma adequação para atender a demanda do mercado externo (Rutz, 2007).

No Brasil, o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) ao lado da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária vinculada ao Ministério da Saúde) regulamentam o uso terapêutico e como APC dos antimicrobianos na avicultura. Esta regulamentação tem o intuito de reduzir a seleção de bactérias resistentes aos antimicrobianos, no entanto mesmo que os APC sejam permitidos com restrição no Brasil, ainda há muitos problemas de resistência microbiana (Ubabef, 2014; Palermo, 2015).

Outro problema que gera resistência microbiana no setor avícola é o uso indevido de inseticidas químicos, para o controle de insetos pragas. Estes insetos tais como o *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) e *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae), conhecido como “cascudinho” e “piolho de galinha” respectivamente, são geralmente controlados com piretróides e organofosforados (Lambkin; Furlong, 2011). Porém, estes e

produtos químicos apresentam algumas desvantagens como seleção de populações de insetos resistentes, contaminação do ambiente e das aves, além da resistência microbiana de bactérias cujo insetos são vetores (Japp et al., 2010).

O *A. diaperinus* é o principal vetor de bactérias patogênicas em aviários, principalmente as enterobactérias, cuja presença demonstra o grande potencial deste inseto de albergar bactérias patogênicas nos aviários, durante todo o período de crescimento das aves. Este inseto tem a capacidade de carrear bactérias como *Bacillus* spp., *Streptococcus* spp., *Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Enterobacter* spp., *Klebsiella pneumoniae* e vários sorovares do gênero *Salmonella* spp. no seu interior (Segabinazi et al., 2005).

As *Samonellas* spp. em especial, são de extrema importância para a Saúde Pública, já que a salmonelose é responsável por altas taxas de morbidade e mortalidade em todo o mundo (Vargas et al., 2011). Além disso, a dispersão desta bactéria no ambiente natural é associada à produção intensiva de alimentos de origem animal, onde os produtos avícolas destacam-se como os principais reservatórios deste patógeno (D'aoust; Maurer, 2007).

### **Salmonelose**

Existem mais de 2.300 sorotipos diferentes de *Salmonella* spp., uma grande parte destes são patogênicos para o homem (Connor e Schwartz, 2005). Os sorotipos que mais causavam infecções alimentares nas últimas décadas foram *S. Agona*, *S. Hadar* e *S. Typhimurium*, porém nos últimos três anos a *S. Enteritidis* é a causa predominante de salmoneloses em vários países (Machado et al., 2016). Diferentes sorotipos de salmonelas são isoladas em amostras de aves. Recentemente em amostras de suabe de arrasto provenientes de granjas do Paraná, os sorotipos mais frequentemente isolados foram Heidelberg, Mbandaka, Newport, Schwarzengrund, Enteritidis, Livingstone, Orion, Give e Infantis (Pandini et al., 2015).

A epidemiologia deste gênero na cadeia produtiva de aves envolve dois processos. A transmissão vertical, que se dá através do ovo infectado, podendo desencadear nascimentos de pintos doentes. E a transmissão horizontal que ocorre através da contaminação do ambiente e da ração, além da existência de diferentes espécies animais que constituem reservatórios destas bactérias (Gomes, 2015).

Tendo em vista que o *A. diaperinus* é o principal reservatório da *Salmonella* spp. em aviários, pesquisas são realizadas no sentido de repelir ou matar este vetor, sem a utilização de inseticidas químicos (Marcomini et al., 2009). Pandini et al. (2014) obtiveram mortalidade de larvas de *A. diaperinus*, utilizando o óleo essencial de *Guarea kunthiana*, planta nativa do Brasil. Também foi verificado, que o extrato alcoólico de *G. kunthiana* repeliu

significativamente larvas e adultos desta espécie. A repelência e mortalidade deste inseto são de primordial importância para a diminuição da incidência de salmonelose.

Casos de salmoneloses são tratados com antimicrobianos em todo o mundo. Os antimicrobianos mais utilizados por muitos anos foram: ampicilina, sulfametoxazol associado à trimetoprima e cloranfenicol. A ocorrência cada vez maior de cepas resistentes a estes agentes provocou mudanças no tratamento desta doença, sendo o grupo das fluoroquinolonas e terceira geração de cefalosporinas, o tratamento de escolha (Boxstael et al., 2012). Esta resistência apresentada pelos sorotipos de *Salmonellas* spp. aos antimicrobianos, também foi demonstrada para 28 isolados em aviários, sendo verificado 25 diferentes padrões de resistência à estreptomicina, ácido nalidíxico e tetraciclina (Scur et al., 2014).

### **Resistência e suscetibilidade a antimicrobianos**

Tanto para as salmonelas quanto para outras bactérias o problema de resistência vem aumentando provavelmente devido ao uso extensivo e indevido de antimicrobianos, APC e inseticidas químicos (Anvisa, 2012; Ubabef, 2014). Registra-se um aumento significativo na frequência de bactérias resistentes, que antes eram reconhecidamente sensíveis a drogas rotineiramente usadas. Hoje, estas bactérias apresentam-se resistentes à vários fármacos disponíveis no mercado (Kasper; Fauci, 2015). As salmonelas, por exemplo, possuem uma variedade de elementos genéticos capazes de recombinar e de transportar genes de resistência dispersos por todo reino bacteriano (Bennett, 1999).

Foi constatado resistência intermediária de sorotipos de *Salmonella* spp. à antimicrobianos carbapenêmicos, como o imipenem (Ribeiro et al., 2008). Também foi verificado o perfil de resistência de diferentes sorotipos de *Salmonella* spp. isolados em aviários, frente a 12 diferentes antimicrobianos. Os resultados indicaram que 51% dos sorotipos de *Salmonella* spp. apresentaram resistência a um ou mais antimicrobianos, com 12 diferentes padrões de resistência. Os níveis de resistência verificados indicam que os antimicrobianos devem ser utilizados nos aviários de forma mais prudente, buscando assim, minimizar a disseminação de cepas resistentes (Pandini et al., 2014).

Amostras de *Escherichia coli* isoladas em aves também são frequentemente resistentes a antimicrobianos, o que representa um problema nacional (BARROS et al, 2012). Foram isoladas 120 amostras de *E. Coli* de origem aviária e verificou-se que a maioria das amostras possuía resistência a tetraciclina e 93 amostras apresentaram-se multirresistentes a três ou mais antibióticos (Zanatta et al. 2004). Outros autores que analisaram a resistência aos

antimicrobianos da região de Curitiba, Paraná, concluíram que isolados de criação intensiva de aves apresentaram 60% de resistência à ampicilina (Korb et al., 2015).

Foi testado o perfil fenogenotípico de resistência a antimicrobianos em espécies de *Staphylococcus*. Constatou-se que mais de 70% das amostras possuíam algum tipo de resistência. As cepas apresentaram um percentual alto de resistência à penicilina e ampicilina, quando comparado a outros antibióticos rotineiramente usados (Soares et al. 2012).

O panorama descrito, fez com que a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicasse medidas regulatórias para o uso de antimicrobianos, reforçando assim a importância de pesquisas com produtos alternativos que visam diminuir estes índices de resistência (Anvisa, 2012). Pesquisas evidenciam ações dos óleos essenciais e extratos vegetais na atividade antimicrobiana, antioxidante e inseticida de diversas famílias vegetais, reduzindo assim o risco de resistência microbiana, quando comparado a medicamentos e inseticidas sintéticos (Kasper; Fauci, 2015).

### **Ação antimicrobiana de óleos essenciais/extratos vegetais**

No contexto de medidas alternativas aos antimicrobianos e inseticidas sintéticos, os extratos vegetais e óleos essenciais destacam-se por sua eficiência em todo o mundo. No Brasil a exploração da atividade biológica de substâncias químicas de plantas, também vem ganhando destaque, já que demonstra ser uma forma eficiente e mais sustentável de controle de zoonoses e na diminuição dos índices de resistência microbiana (Weber et al., 2014; Pandini et al., 2015).

A atividade antimicrobiana destes óleos e extratos vegetais pode estar associada a compostos fenólicos, sendo que já foram identificadas por espectrometria de massas, cerca de sessenta compostos diferentes desta categoria. Também foram isolados monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides e cumarinas todos formados pelo metabolismo secundário das plantas (Rai; Carpinella, 2006).

Pesquisas com propriedades medicinais de plantas, ligadas a metabólitos secundários são geralmente voltadas para a utilização na medicina humana. No período de 1983 a 2000, foram aprovados mais de 600 medicamentos, dentre os quais 40% são produzidos a partir de substâncias isoladas de plantas (Pinto et al., 2003). Poucos trabalhos utilizam as propriedades terapêuticas dos vegetais para utilização no setor avícola. Trabalhos com fins terapêuticos, profiláticos, ou para melhorar o desempenho do crescimento animal, são de reconhecida importância, já que recentes descrições ao uso APC, tem gerado múltiplos problemas de resistência (Pandini et al., 2015).

### Controle alternativo de *A. diaperinus* e *D. gallinae*

O *A. diaperinus*, também conhecido como “cascudinho” ou “Fuscão preto”, é a principal praga que afeta os sistemas de criação de aves de corte no Brasil, já que estes sistemas favorecem a proliferação deste coleóptero em meio à cama de aviário, por conta da temperatura e reaproveitamento desta cama (Chernaki-leffer et al., 2001; Silva et al., 2005). Os cascudinhos causam vários prejuízos, como danos nas cortinas e materiais dos aviários, prejudicando o isolamento térmico e consequentemente desenvolvimento das aves. Além disto, este inseto é um reservatório potencial de diversos patógenos, entre eles a *Salmonella* spp. (McCallister, 1994). As aves ingerem as larvas e os adultos prejudicando o ganho de peso. Ao serem ingeridos estes insetos liberam substâncias tóxicas como as quinonas que causam lesões hepáticas (fígado friável) (Despins & Axtell, 1995).

Em aviários de postura comerciais o *D. gallinae* é considerado a principal espécie de parasita. Este ácaro é chamado vulgarmente de “piolho de galinha” ou “ácaro vermelho” (Turner, 1986). É hematófago e possui ampla distribuição em regiões de clima tropical (Lancaster & Meish, 1986). Este ácaro representa um desafio ao produtor, pois assim como o *A. diaperinus* é resistente à muitos produtos químicos utilizados para seu controle.

Desde o início deste século, substâncias como mercúrio metálico, naftalina, enxofre, sulfato de nicotina, banha e vaselina foram utilizadas com o objetivo de controlar pragas como *D. gallinae* e o *A. diaperinus* (Lanson, 1917; Abbot, 1919; Payne, 1929). Pesquisadores vêm estudando a ação acaricida e inseticida de diversas substâncias de diferentes composições químicas, como os organoclorados, carbamatos, piretróides e os organofosforados (mais utilizados). Estes organofosforados funcionam como inseticidas e/ou acaricidas que se ligam irreversivelmente ao sítio da enzima colinesterase, que é responsável pela clivagem da molécula de acetilcolina. Este processo promove hiperatividade no parasita, consequentemente convulsões e morte (Spinosa, 1996).

Na área do controle biológico, a busca por métodos alternativos ao uso de substâncias sintéticas, tem sido uma tendência mundial. A utilização de substâncias de origem vegetal com propriedades inseticidas são estudadas (Kim et al., 2007; Morrone et al., 2001). Foi relatado o controle no número de *D. gallinae* em 92% pelo óleo de neen (Lundh et. al., 2005). Utilizaram o óleo essencial de 56 plantas contra *D. gallinae* pelos métodos de uso direto e fumigação. Observaram que 32 destes óleos apresentam mortalidade de 100% em concentração de 0,35 mg.cm<sup>-2</sup>. Dentre os óleos que apresentaram 100% de mortalidade na concentração 0,07 mg.cm<sup>-2</sup> destacam-se as plantas: *Pimenta racemosa*, *Eugenia caryophyllata* e *Pimenta officinalis*

(Myrtaceae) (Kim et al. 2004). A atividade inseticida dos extratos *Annona muricata*, *Chenopodium ambrosioides*, *Eucalyptus grandis*, *Melia azedarach*, *Ocimum basilicum*, *Ruta graveolens* e *Tagetes erecta* apresentaram atividade de 40 a 97% contra o *A. diaperinus* por contato direto (Marcomini et al., 2009).

Apesar de ter crescido o número de pesquisas com óleos essenciais e extratos vegetais no controle de pragas, observa-se que ainda é pequeno o número de pesquisadores que vem trabalhando com isto no Brasil, mostrando a necessidade de reforçar a pesquisa que é de extrema importância para a avicultura (Vasantharaj, 2008; Corrêa et al., 2011).

### **Atividade antioxidante**

Além da atividade antimicrobiana e inseticida dos extratos e óleos essenciais, conhecer a atividade antioxidante é de grande importância, já que alguns compostos isolados em plantas podem substituir conservantes sintéticos em indústrias. Porém, para este fim é necessário conhecer o princípio ativo dos extratos e óleos essenciais, além dos efeitos adversos como toxicidade, potencial carcinogênico, entre outros (Maciel et al., 2012).

Antioxidantes, são compostos que atrasam a velocidade da oxidação através de inibição de radicais livres. Estes antioxidantes podem ser sintéticos ou naturais, sendo que necessitam ser seguros para a utilização na alimentação humana e animal. Para isto, existem muitas pesquisas direcionadas à descoberta de novos antioxidantes presentes em plantas, além de comparar estas substâncias herbais com produtos sintéticos (Gonçalves et al., 2015).

Tanto para o óleo essencial quanto para extratos vegetais, a família Rutaceae demonstra apresentar uma diversidade de metabólitos secundários que podem apresentar atividade antioxidante, inseticida e antibacteriana (Maciel et al, 2012). Alguns pesquisadores avaliaram o extrato de *Zanthoxylum rhoifolium* (Rutaceae) e verificaram elevado potencial antioxidante (Turnes et al., 2014).

### **Triagem fitoquímica e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)**

A identificação o de metabólitos secundários responsáveis pelo potencial antimicrobiano, antioxidante e inseticida dos extratos e óleos essenciais se dá através de triagem fitoquímica e CG-EM. A fitoquímica é a área responsável pelo estudo dos princípios ativos de drogas vegetais. Estes princípios ativos são obtidos através dos metabólitos secundários das plantas (Gobbo-Neto; Norberto, 2007). Os metabólitos secundários exercem função fundamental no ciclo de vida dos vegetais, conferindo proteção à radiação solar, herbívora,

parasitismo, além de possuírem atividade biológica comprovada para microrganismos (Peres, 2004).

Os métodos comumente usados para a extração, isolamento e purificação dos constituintes dos metabólitos secundários presentes nos extratos e óleos essenciais são os métodos cromatográficos, como cromatografia gasosa e a espectrometria, que é utilizada para a determinação da estrutura química destes compostos (Degani et al., 1998; Verdian-Rizi et al., 2008). Utilizando estes métodos, foram isolados em membros da família Myrtaceae principalmente compostos fenólicos e flavonóides, responsáveis por diferentes atividades biológicas (Imatomi, M. 2010; Carvalhor Junior, A. R., 2014). Diversos estudos vêm sendo realizados objetivando identificar os constituintes químicos responsáveis pelas propriedades terapêuticas das plantas desta família.

### **Família Myrtaceae e gênero *Myrcia***

A família Myrtaceae compreende cerca de 142 gêneros e mais de 5.500 espécies, com distribuição pantropical, principalmente na América do sul e Austrália (Heywood et al. 2007, Wilson 2011). No Brasil, esta família possui mais de 1.000 espécies catalogadas em 23 gêneros (Sobral et al. 2015). A identificação taxonômica é complexa, pois as espécies se assemelham muito nos caracteres morfológicos. Uma característica comum entre os táxons desta família é a presença de glândulas de óleo (Solereeder, 1908; Metcalfe & Chalk, 1950).

O gênero *Myrcia* é um dos maiores da família com mais de 300 espécies presentes no território brasileiro (Govaerts *et al.* 2008). Os óleos essenciais e extratos vegetais deste gênero apresentam amplo espectro de atividades fisiológicas, como antiinflamatória, antioxidante, anticancerígena, antimicrobianas, antifúngicas e hipoglicemiantes (Fevereiro, 1996; Sixel. 1996; Kalemba & Kunicka, 2003).

Extratos e óleos essenciais do gênero *Myrcia* mostraram-se eficientes no controle do crescimento de uma ampla variedade de microrganismos, incluindo fungos filamentosos, leveduras e bactérias. Usos práticos dessas atividades são sugeridos em humanos e animais, bem como na indústria de alimentos e no controle e repelência de insetos e pragas (Rosado, et al., 2009; Rosa et al., 2016).

*Eugenia beaurepaireana*, *Eugenia brasiliensis* e *Eugenia umbeliflora* (Myrtaceae) apresentaram bom potencial antimicrobiano frente à micoplasmas (Benfatti, et al., 2010). O óleo essencial de *Myrcia sylvatica* demonstraram toxicidade para *Aedes aegypti* e *Artemia salina* (Rosa et al., 2016). Além do potencial antioxidante, hemolítica, antitumoral,

antiostratogênica e citogenotóxica de *Melaleuca alternifolia*, *Melaleuca quinquenervia* e *Backhousia citriodora* (Andrade, 2015).

**Capítulo 1. Composição química, potencial antimicrobiano, antioxidante, acaricida e de repelência do óleo essencial de *Myrcia oblongata* DC**

Chemical composition, potential antimicrobial, antioxidant, acaricide and repellency of essential oil of *Myrcia oblongata* DC

C. B. SANTANA<sup>a</sup>, F. G. S. PINTO<sup>a\*</sup>, J. G. L. SOUZA<sup>a</sup>, M. D. A. CORACINI<sup>a</sup>, A. H. WALERIUS<sup>a</sup>, V.D.SOARES<sup>b</sup>, W. F. COSTA<sup>b</sup>

<sup>a</sup>Programa de Conservação e Manejo de Recursos Naturais, Laboratório de Biotecnologia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE. Cascavel – PR, Brasil. Cep: 85819-

110.

<sup>b</sup>Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá – UEM. Maringá – PR, Brasil. Cep: 87020-900.

\* fabiana.pinto@unioeste.br

Keywords: CG-EM, óxido de cariofileno, *Dermanyssus gallinae*

**RESUMO**

Os óleos essenciais tem despertado interesse no setor industrial por apresentarem multiplicidade de aplicações, destacando-se por suas propriedades antimicrobianas, antioxidantes dentre outras. Diante disto, o objetivo deste estudo foi determinar a composição química do óleo essencial de *Myrcia oblongata* DC pelo método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), avaliar o potencial antioxidante do óleo pelo método de captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH), testar a atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo, bem como avaliar a repelência e potencial fumigante deste óleo sobre *Dermanyssus gallinae* (Degeer, 1778). As análises de CG-EM resultaram na identificação de 30 constituintes, sendo majoritários o óxido de cariofileno (22,03%) e o trans-verbenol (11,94%). O óleo apresentou atividade antioxidante moderada quando comparada ao antioxidante sintético (BHT). Em relação à atividade antimicrobiana, o óleo essencial demonstrou atividade inibitória para as bactérias Gram-positivas, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus epidermidis*, e para

levedura *Candida albicans* e não apresentou atividade para bactérias Gram negativas. Todas as concentrações do óleo essencial testadas no teste de fumigação sobre *D. gallinae* apresentaram mortalidade inferior a 20%, e observou-se potencial de repelência apenas na concentração de 10%.

Palavras-chave: CG-EM, óxido de cariofileno, *Dermanyssus gallinae*

### **ABSTRACT:**

The essential oils have aroused interest in the industrial sector due to their multiplicity of applications, especially for their antimicrobial properties, antioxidants, among others. The objective of this study was to determine the chemical composition of the essential oil of *Myrcia oblongata* DC by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), to evaluate the antioxidant potential of the oil by the free radical capture method 2, 2-diphenyl-1-picryl hydrazyl (DPPH), to test antimicrobial activity by the broth microdilution method, as well as to evaluate the repellency and fumigant potential of this oil on *Dermanyssus gallinae* (Degeer, 1778). The GC-MS analysis resulted in the identification of 30 constituents, with the majority being caryophyllene oxide (22.03%) and trans-verbenol (11.94%). The oil presented moderate antioxidant activity when compared to the synthetic antioxidant (BHT). Antimicrobial activity of the essential oil showed an inhibitory activity for Gram-positive bacteria, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* and *Staphylococcus epidermidis*, and for yeast *Candida albicans* and showed no activity for Gram-negative bacteria. All concentrations of the essential oil tested in the fumigation test on *D. gallinae* presented mortality below 20%, and repellency potential was observed only at the concentration of 10%.

Key words: CG-MS, caryophyllene oxide, *Dermanyssus gallinae*

### **Introdução**

Os principais produtos de origem vegetal utilizados no setor industrial são os óleos essenciais (Sartoratto et al., 2004). Estes compostos são metabólitos secundários extraídos de diversas partes das plantas e sua composição química varia entre diferentes espécies e entre suas estruturas anatômicas (Oussalah et al., 2007). Devido a estes compostos, os óleos essenciais se destacam como agentes antimicrobianos, antioxidantes, além de apresentarem potencial de e mortalidade contra ácaros considerados pragas (Baser and Buchbauer, 2015).

As bioatividades dos óleos essenciais podem ser exercidas por diferentes compostos, dentre eles os terpenóides (Burt, 2004). Estes estão presentes tanto como hemiterpenos, monoterpenos, ou sesquiterpenos, além de seus derivados (Xavier et al., 2016). Dentre as famílias que concentram estes elementos, destaca-se a família Myrtaceae (Cipriani et al., 2012) que vem sendo reconhecida não só pelas investigações relativas as suas atividades biológicas como também pela presença de óleos essenciais (Acirole, 2001). Esta família possui distribuição natural por todos os continentes do hemisfério sul, compreendendo 145 gêneros e 5.970 espécies (The Plant List, 2013). No Brasil, está presente principalmente na Floresta Atlântica, representada por 1.025 espécies, pertencentes a 23 gêneros (Sobral et al., 2016).

Algumas espécies de *Myrcia* spp. (Myrtaceae) são utilizadas na medicina popular, destacando-se a *Myrcia amazônica*, cujas folhas são utilizadas para tratamento de leucemia (Mors et al., 2000) e *Myrcia bracteata* utilizada para assaduras e casos de diarreia (Simões and Spitzer, 2004; Sá et al., 2012). Entretanto, não há relatos na literatura sobre bioatividades e composição química do óleo essencial de *Myrcia oblongata* DC.

Apesar da falta de relatos sobre as bioatividades de *M. oblongata*, os óleos essenciais de sua família são de reconhecida importância, destacando-se por sua atividade antimicrobiana (Simonetti, et al., 2016). Esta propriedade antimicrobiana de produtos de origem vegetal cresceu na última década, por conta do aumento do uso extensivo e indevido de antimicrobianos. Registra-se um aumento significativo na frequência de bactérias resistentes, que antes eram reconhecidamente sensíveis a drogas rotineiramente usadas. Hoje, estas bactérias apresentam-se resistentes a vários fármacos disponíveis no mercado (Kasper et al., 2015), ressaltando assim a importância da pesquisa de novos compostos.

Outro setor crescente no Brasil é a avicultura, sendo crescente o problema com pragas (Palermo, 2015), como o *Dermanyssus gallinae* (Acari: Dermanyssidae), ácaro da galinha. Este parasita pode ocasionar perdas na produção avícola devido ao seu potencial reprodutivo, levando os produtores a utilizarem diversos tipos de produtos sintéticos para combatê-lo, ocasionando severos problemas de resistência de pragas, altos níveis de resíduos, intoxicação do ambiente e do homem e destruição de inimigos naturais (Soto et al., 2011). Por conta deste panorama, a utilização de repelentes e acaricidas de origem vegetal merece atenção dentre os métodos alternativos ao controle químico de pragas convencional (Sparagano et al., 2014).

Na perspectiva de desenvolvimento de novos produtos com potencial antimicrobiano, acaricida e para outras bioatividades, faz-se necessário a realização de ensaios de toxicidade para verificar a segurança dos óleos essenciais, por isto conhecer a atividade antioxidante

também é de grande importância (Rosa et al., 2016). Além disto, a procura por novos agentes antioxidantes, para uso nas indústrias aumentou em decorrência a crescente resistência dos microrganismos patogênicos aos produtos sintéticos (Tepe et al., 2004; Xavier et al., 2016).

Diante disso, este estudo objetivou a determinação da composição química do óleo essencial das folhas da *M. oblongata*, a avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial, e verificar a atividade repelente e acaricida deste óleo essencial sobre *D. gallinae*.

## **Material e métodos**

### **Coleta, secagem e identificação do material vegetal**

As folhas de *M. oblongata* foram coletadas no período de março a junho de 2016, na estação de outono, no Parque Ecológico Paulo Gorski (24°56'14" a 24°58'17"S, 53°25'14" a 53°27'06"W), no município de Cascavel, Paraná, Brasil. A identificação da espécie foi realizada no Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNOP) e a amostra registrada sob o número UNOP 1816.

As folhas foram secas a 40°C e moídas em moinho de facas do tipo *Willye* na granulometria 0,42mm. O pó obtido foi armazenado em recipientes de vidro protegidos da luz e em temperatura ambiente até a extração do óleo essencial (Ceyhan et al., 2012; Weber et al., 2014).

### **Obtenção do óleo essencial**

Segundo metodologia proposta por Weber et al. (2014), 140g do material vegetal seco de *M. oblongata* foram adicionados a 1.400 mL de água destilada. A solução foi colocada em aparelho Clevenger seguindo a metodologia de arraste por vapor d' água por aproximadamente 3h. O óleo obtido foi armazenado em freezer a 4°C até o momento do uso.

### **Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)**

A identificação dos compostos presentes no óleo essencial foi realizada com um cromatógrafo de gases FOCUS GS (Thermo Electron) acoplado a um espectrômetro de massa DSQ II (Thermo Electron), um detector com impacto de ionização eletrônica a 70 V e analisador de massa tipo quadrupolo. Para a separação cromatográfica utilizou-se uma coluna capilar de silício fundido DB-5 (diâmetro interno de 30 mx 0,25 mm, espessura de película 0,25 µm) e fase estacionária de fenilo a 5% / dimetilpolissiloxano a 95%.

A temperatura inicial foi de 50 °C / 2 min e a temperatura do injetor foi de 250 °C seguido de um aumento para 180 °C / 2 °C min<sup>-1</sup> e 290 °C / 5 °C min<sup>-1</sup>. A interface entre o GC e a MS foi mantida a 270 °C, a temperatura da fonte de ionização para a análise espectrométrica de massa foi de 250 °C. O fluxo de gás de suporte foi mantido constante à 1 mL.min<sup>-1</sup>. A amostra e os padrões de alceno C7-C28 foram injetados numa razão de separação de 1:25. A identificação dos compostos foi realizada comparando aos tempos de retenção obtidos a partir da literatura (Adams, 2007) e através dos seus Índices de Retenção.

### **Atividade antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana foi realizada de acordo com metodologia por Pandini et al. (2015) com modificações. As bactérias utilizadas foram: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella Enteritidis* (ATCC 13076) e *Salmonella Gallinarum* (ATCC 1138), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Bacillus subtilis* (CCD-04) e a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231). Os microrganismos foram recuperados em caldo de enriquecimento *Brain Heart Infusion* (BHI) e incubados por 24 h a 37 °C. As concentrações finais das bactérias foram padronizadas para  $1 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> em solução salina a 0,85%.

O teste da “Concentração Inibitória Mínima (CIM)”, foi realizado conforme as normas do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2007) em placas de microdiluição de 96 poços. O óleo essencial foi diluído a uma concentração de 7000 µg.mL<sup>-1</sup>. Para isto, uma alíquota de 70 mg do óleo foi diluído em 1 mL de metanol (10%). Desta solução 500 µl foram homogeneizados em 4.5 mL de caldo Muller-Hinton (MH). Foram realizadas diluições seriadas que variaram de 7.000 até 3,4 µg.mL<sup>-1</sup>. Uma alíquota de 10 µl de cada microrganismo foi adicionada aos poços que continham 150 µl de caldo MH e incubados por 24 h a 37 °C. Depois do período de incubação, 10 µL de solução de cloreto de trifetil tetrazolium (CTT) a 1% foi adicionado em cada poço das microplacas que foram incubadas por mais três. A presença de coloração vermelha nos poços foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório do óleo essencial.

Para a realização do teste de “Concentração Bactericida Mínima (CBM)”, foram retirados 10 µL da solução de cada poço e inoculados em placas de Petri contendo Ágar MH. As placas foram incubadas por 24 h a 37 °C.

Como controle positivo utilizou-se gentamicina (bactérias) e nistatina (*C. albicans*) ambos à 30 mg.mL<sup>-1</sup>. A CIM e a CBM foram realizados em triplicata e classificados de acordo

com os critérios propostos por Sartoratto et al. (2004), sendo a atividade considerada baixa (7000 a 3500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), moderada (1700 a 875  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), alta (437,5 a 218.75  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ou muito alta (<109.375  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

### **Atividade antioxidante**

A atividade antioxidante do óleo essencial foi mensurada de acordo com o método da redução do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) (Scherer et al., 2009; Weber et al., 2014). Para tal, uma alíquota de 0,1 mL do óleo essencial na concentração de 7000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  foi tratada com 3,9 mL de solução metanólica a 50% e homogeneizadas em agitador de tubos. As absorbâncias das amostras foram mensuradas em espectrofotômetro à 515 nm. Como controle negativo foi utilizado uma solução composta de metanol, acetona e água (40 mL de solução acetona à 70%, 40 mL de solução de metanol a 50% e 20 mL de água destilada) com adição do radical DPPH. Como controle positivo utilizou-se o antioxidante sintético comercial butil-hidroxi-tolueno (BHT). Como branco, foi utilizado metanol 50% para a calibração do espectrofotômetro.

Foram determinadas as absorbâncias do DPPH nas concentrações de 34, 64, 100, 134, 166 e 200  $\mu\text{m}$  (leituras:  $\lambda = 515 \text{ nm}$ ), a fim de determinar uma função linear de dispersão dos dados (das absorbâncias do DPPH).

Os cálculos da atividade antioxidante foram realizados da seguinte maneira: inicialmente foi calculada a equação da reta de DPPH (função linear). O índice de sequestro de DPPH pelo óleo essencial e pelo BHT (controle positivo) foi calculado através da equação:  $\% [(Abs0 - Abs1) / Abs0] \times 100$ , onde Abs0 é a absorbância do controle negativo e Abs1 é a absorbância da amostra. O IC<sub>50</sub> que é a concentração do óleo necessária para reduzir 50% do radical livre DPPH, foi calculada através das absorbâncias das diferentes concentrações de DPPH o que gerou uma função linear. Os valores de absorbância foram analisados pelo teste Qui-quadrado para aderência, com nível de significância de 0,05. Para a realização das análises estatísticas, utilizou-se o programa estatístico R<sup>®</sup> versão 3.3.2.

### **Teste de fumigação do óleo essencial de *M. oblongata* sobre *D. gallinae***

Os ácaros foram coletados em um aviário comercial localizado na cidade de Medianeira – PR, Brazil e transportados ao Laboratório de Biotecnologia Agrícola - Unioeste, Cascavel, onde foram separadas somente as fêmeas ingurgitadas para os testes de fumigação. Os ácaros foram utilizados até 3 dias após a coleta.

O teste de fumigação foi realizado conforme metodologia propostas por Locher et al. (2010) e Tabari et al. (2015). O óleo essencial foi diluído em acetona 10% em quatro concentrações: 10%, 5%, 2,5% e 1,25%, sendo cinco repetições de 20 ácaros para cada concentração. O controle foi realizado com água destilada e acetona 10%. Os 20 ácaros foram colocados em um papelão (1 cm x 1 cm) e posteriormente em um eppendorf (2 mL) com tampa cortada, sendo a abertura do eppendorf foi fechada com tecido voal amarrado com elástico. Cada eppendorf foi colocado em um tubo de fundo chato de vidro (4 cm x 7 cm) selado com parafilme, para impedir a perda dos voláteis do óleo. Em cada tubo de fundo chato havia um pedaço de papel filtro tipo Whatman n. 2 (2 cm x 2 cm), contendo 50 µL do óleo essencial ou controle. Este método evitou o contato direto do ácaro com o papel filtro. Os ácaros foram acondicionados em câmara climatizada tipo BOD (27° ± 29 ° C, 14 h de fotofase e U.R. de 70%) e, após 24 h, as taxas de mortalidade foram analisadas. Foram considerados mortos os ácaros que não se moviam ao serem tocados com um pincel de cerdas finas. Foi realizado teste da Análise das variâncias (ANOVA), com nível de significância de 0,05, seguido do teste de Tukey de comparação das médias. Para a realização das análises estatísticas, utilizou-se o programa estatístico R<sup>®</sup> versão 3.3.2.

#### **Teste de repelência do óleo essencial de *M. oblongata* sobre *D. gallinae***

Os ensaios foram realizados em sala climatizada, com temperatura de 23 ± 2°C e 70% de U.R., na escotofase, já que o ácaro *D. gallinae* apresenta hábito noturno e durante o dia permanece aglomerado e escondido. Para que fosse possível observar o comportamento dos ácaros, fez-se o uso de um lâmpada vermelha (15w, 100v) pois esta não influencia na visão dos artrópodes.

Para verificar se o óleo essencial promove repelência do ácaro, foi realizado experimento com olfatômetro em Y (Eiras and Mafra Neto, 2001). O olfatômetro utilizado consistiu de um tubo de vidro em formato de Y (22cm× 14cm × 2cm), contendo um tubo principal e dois tubos laterais (braços) que formam um ângulo de 120° com o tubo principal. Nos ensaios o olfatômetro foi operado com um fluxo de ar contínuo de 3L/min, previamente umidificado e filtrado com carvão ativado. Nos tubos laterais foram colocados pedaços de papéis filtro cortados em retângulos (1 cm x 4 cm), impregnados com 10 µL do controle (etanol P.A.) ou 10 µL do óleo diluído. Na extremidade inferior do tubo principal foi pincelado detergente para impedir a fuga dos ácaros.

Foram avaliadas três concentrações do óleo essencial: 10%, 5% e 1%, usando etanol P.A. como solvente. Para cada concentração do óleo foram realizadas 30 repetições com

cinco ácaros. Durante 5 minutos foi observado o comportamento dos ácaros. Foi registrado o tempo que os ácaros levaram para alcançar a fonte de odor e, caso nenhum ácaro escolhesse uma das fontes, o teste era interrompido e os ácaros descartados. Só foram consideradas as repetições em que os ácaros escolheram uma das fontes de odor. A cada 5 repetições, o olfatômetro foi lavado, secado em estufa a 60°C, e a posição do braço contendo o controle ou o repelente foi invertida para evitar qualquer influência do meio externo.

Os resultados relativos a escolha de uma fonte de odor foram analisados estatisticamente pelo teste de Qui-Quadrado para aderência, com nível de significância de 0,05. O tempo que os ácaros levaram para alcançar a fonte de odor foi analisado através do teste t para amostras independentes com o mesmo nível de significância ( $\alpha=0,05$ ). Para a realização das análises estatísticas, utilizou-se o programa estatístico R<sup>®</sup> versão 3.3.2.

## **Resultados e discussão**

### **Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM)**

A análise de CG-EM resultou na identificação de 30 compostos, representando 80,85% da área total do óleo essencial de *M. oblongata*. Os compostos majoritários foram óxido de cariofileno (22,03%) e trans-verbenol (11,94%). O óxido de cariofileno é um sesquiterpeno bicíclico, já o trans-verbenol é um composto resultante da bioconversão de -pineno (Souza et al., 2011) terceiro composto de maior abundância (6,65%). Estes compostos majoritários estão presentes em grande quantidade também em outras espécies da família Myrtaceae (Limberger et al., 2004; Oliveira et al., 2016), como *Myrcia salzmannii* (Cerqueira et al., 2009), *Myrcia obtecta*, *Myrcia hatschbachii* e *Myrcia aborescens* (Limberger et al., 2004).

Comparando o presente estudo com dados descritos na literatura, houve variação na quantidade dos compostos presentes no óleo essencial de *M. oblongata* (Tabela 1). Esta variação pode ser atribuída a variáveis ambientais, como época de coleta das folhas, ritmo circadiano, desenvolvimento da planta, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, teor de nutrientes no solo, altitude, poluição, ataque de patógenos, entre outros fatores (Gobbo and Lopes, 2007). Estas variáveis demonstram influenciar significativamente na composição dos óleos essenciais (Dudareva et al., 2004).

### **Atividade antimicrobiana**

Os valores de CIM e CBM do óleo essencial de *M. oblongata* sobre os microrganismos variaram de 218,75 a 7000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (Tabela 2). Os melhores resultados foram observados para bactérias Gram-positivas, sendo a maior atividade inibitória/bactericida para *E. faecalis*,

(CIM/CBM: 218,75 / 875  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), seguido de *S. aureus* e *B. subtilis*, ambos com CIM 875 e CBM 1700  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e *S. epidermidis* (1700/1700  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). A atividade do óleo sobre as bactérias Gram-negativas foi considerada baixa, com o melhor resultado para *E. coli*, CIM e CBM de 7000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , seguidos de *P. aeruginosa* e *S. Enteritidis* ambas com CIM de 7000  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e sem atividade para o CBM. Não foi verificada atividade para *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* e *S. Gallinarum*. Para a *C. albicans* foi observado atividade inibitória/fungicida 3500/3500  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  (CIM/CBM), respectivamente.

Para *C. albicans* a atividade do óleo essencial foi considerada baixa. Não há relatos na literatura para plantas do mesmo gênero, porém resultados semelhantes foram encontrados para *Eucalyptus citriodora* e *Eugenia uniflora*, também pertencentes a família Myrtaceae. Os óleos essenciais das folhas destas plantas foram testados sobre diferentes espécies de *Candida spp.* e apresentaram atividade moderada e baixa (Lima et al., 2006; Castro and Lima, 2010). A baixa suscetibilidade da célula fúngica ao óleo essencial, pode ser devido à baixa hidrofobicidade dos constituintes químicos. Quanto menor a hidrofobicidade, menor é a permeabilidade do óleo na célula, o que diminui a eficácia do óleo essencial (Prabuseenivasan et al., 2006).

As bactérias Gram-positivas foram mais suscetíveis à ação do óleo essencial em relação às Gram-negativas. Isto também foi observado para o óleo essencial de *Myrcia tomentosa* e *Myrcia myrtifolia*, que apresentaram atividade para *B. subtilis*, *S. aureus* e outras bactérias Gram-positivas (Sá, 2010; Yokomizo and Nakaoka 2014; Simonetti, et al., 2016). Esta maior suscetibilidade das Gram-positivas pode ser explicada devido à presença de uma parede bacteriana que não restringe a penetração de moléculas tóxicas, enquanto as Gram-negativas possuem um sistema de barreira na membrana externa da parede bacteriana formada por fosfolipídios, lipopolissacarídeos e proteínas que conferem maior impermeabilidade aos antibacterianos (Lambert, 2002; Madigan et al., 2010).

### **Atividade Antioxidante**

O índice de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil) apresentou como função linear a equação:  $y = 0,0105 \cdot x - 0,0249$ . As absorvâncias obtidas (óleo essencial e BHT) foram analisadas pelo teste Qui-quadrado para aderência, com nível de significância de 0,05, sendo constatada que não há diferença estatística significativa entre as absorvâncias do controle positivo (BHT) e do óleo essencial de *M. oblongata* ( $\chi^2 = 0.21356$ ; GL = 1; p-valor = 0.644). Para o IC<sub>50</sub> também não ocorreu diferença estatística significativa ( $\chi^2 = 1.8639$ ; GL = 1; p-valor = 0.1722).

Apesar do óleo essencial de *M. oblongata* não apresentar alta atividade antioxidante como a do BHT segundo a classificação de Scherer e Godoy (2009), possui atividade moderada nesta mesma classificação, evidenciando assim, que este óleo na concentração de  $7000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  apresenta potencial antioxidante (Figura 1).

Os valores da porcentagem de sequestro do DPPH através da equação de absorbância e o IC<sub>50</sub> estão demonstrados na Tabela 3 sendo a porcentagem de sequestro de DPPH de 88,33% e um IC<sub>50</sub> de 2,80 para o óleo essencial e 94,58% e IC<sub>50</sub> de 1,39 para o BHT.

A atividade antioxidante de representantes do gênero *Myrcia* spp. foram verificados na literatura para *Myrcia splendens*, *Myrcia bella* e *Myrcia lingua* e na família (Myrtaceae) em *Blepharocalyx salicifolius*, *Eugeni bimarginata*, *Eugenia dysenterica*, *Eugenia klotzschiana*, *Hexachlamys edulis*, *Psidium australe*, *Psidium cinereum*, *Psidium laruotteanum* e *Psidium guajava*, todas estas espécies apresentam atividade antioxidante considerada elevada ou moderada (Takao et al., 2015; Lima et al., 2015), assim como a *M. oblongata* neste estudo. O potencial antioxidante dos representantes da família Myrtaceae podem estar associados à presença de cariofilenos, verbenóis e compostos fenólicos presentes nas espécies desta família. Estes compostos possuem atividade antioxidante comprovada através de diferentes técnicas de cromatografia (Shahidi et al., 1992).

Os resultados de atividades antioxidantes relatados na literatura nem sempre podem ser comparados entre si, uma vez que as diferentes metodologias geram respostas distintas (Molyneux, 2004). Entre as metodologias mais utilizadas destaca-se o método de redução do radical livre DPPH, utilizado neste estudo, por ser uma alternativa rápida e de baixo custo quando comparado a outras técnicas cromatográficas (Molyneux, 2004; Alves et al., 2010).

### **Teste de fumigação do óleo essencial de *M. oblongata* sobre *D. gallinae***

Constatou-se que as médias entre as quatro concentrações (10%, 5%, 2,5% e 1,25%) do óleo essencial de *M. oblongata* são iguais ao controle pelo teste de Tukey ( $F=0,21$ ,  $p > 0,05$ ;  $GL = 4$ ). Todas as concentrações do óleo essencial apresentaram mortalidade inferior a 20% (tabela 4). Resultados semelhantes ao nosso foram observados para o óleo de *Eugenia uniflora* (Myrtaceae), que não promoveu mortalidade significativa no teste de fumigação sobre *Ornithonyssus bursa* (Acari: Dermanyssidae) (Villaça, 2012). Não há relatos de atividade fumigante para o gênero *Myrcia*.

O tempo de exposição dos ácaros neste experimento foi de 24h. A letalidade da fumigação pode estar relacionada com o tempo de exposição ao óleo essencial, segundo Souza

e Fávero (2015). Os autores também não obtiveram mortalidade do ácaro em 24h, que só ocorreu após 48h de experimento para o óleo essencial de *Eucalyptus urograndis* (Myrtaceae).

Apesar do teste de fumigação deste experimento não ter apresentado mortalidade superior a 20%, acaricidas tendo como ingredientes ativos óleos essenciais de plantas já estão disponíveis no mercado. Estes produtos são obtidos principalmente de plantas da família Myrtaceae, como *Syzygium aromaticum* (Isman et al., 2010). A volatilidade dos óleos essenciais permite uma ação fumigante comprovada, podendo ser uma alternativa aos acaricidas convencionais (Aslan et al., 2004). Porém o tipo aplicação dos óleos influencia nos resultados de mortalidade dos ácaros. Desta maneira, diferentes metodologias de efeito acaricida do óleo essencial de *M. oblongata* devem ser investigadas.

### **Repelência do óleo essencial de *M. oblongata* sobre *D. gallinae***

A atividade de repelência do óleo essencial de *M. oblongata* sobre o ácaro de galinha foi analisada em três concentrações diferentes e avaliados através do número de respostas (teste Qui-Quadrado para aderência) e tempo de respostas (Teste t para amostras independentes). Nas concentrações de 1% e 5%, o número de ácaros atraídos para o óleo essencial são semelhantes aos do controle ( $\chi^2 = 0,926$ ; GL=1; p=0.336 e  $\chi^2 = 3,24$ ; GL=1; p=0.0719, respectivamente) (Tabela 5). Estas duas concentrações também obtiveram as médias de tempo semelhantes entre os tratamentos e os controles (t=1,52; p=0,93 e t= 2,51; p=0,99) respectivamente. Os resultados demonstram que o óleo essencial, nas menores concentrações, não promoveram repelência dos ácaros. Na concentração de 10% também não houve diferença estatística quanto ao tempo de resposta do controle e do óleo (t=2,78; p= 0,99). Porém, houve menor número de ácaros atraídos ao óleo essencial (17) do que para o controle

(5) ( $\chi^2 = 6,545$ ; GL = 1; p = 0.0105). Este resultado demonstra o potencial de ação repelente do óleo essencial de *M. oblongata* na concentração de 10%.

Há estudo sobre a atividade acaricida dos óleos essenciais de quatro espécies da família Myrtaceae, *Eucalyptus globulus*, *Eucalyptus radiata*, *Eucalyptus staigeriana* e *Eucalyptus citriodora*, sobre *D. Gallinae* (George et al., 2009). Os autores constataram que os óleos mais ativos possuíam maior número de constituintes químicos na sua composição. A espécie *M. oblongata*, testada no presente trabalho, apresenta 30 compostos (Tabela 1) que podem interagir e causar a repelência ao ácaro. Além disso, a atividade de terpenos como o -pineno e o óxido de cariofileno, este último sendo um dos compostos majoritários da *M. oblongata*, são reconhecidamente repelentes sobre os coleópteros *Sitophilus zeamais*, *Tribolium confusum*

(Coleoptera: Curculionidae) e o ácaro *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) (Tapondejou et al., 2005; Lima and Moraes, 2009).

## Conclusão

Foram identificados 30 compostos químicos no óleo essencial de *M. oblongata*, sendo os majoritários o óxido de cariofileno (22.03%) e o trans-verbenol (11.94%). As atividades antimicrobianas do óleo essencial para as bactérias Gram-positivas foram mais elevadas do que para as Gram-negativas. A melhor atividade foi para *E. faecalis*, seguido de *S. aureus*, *B. subtilis* e *S. epidermidis*. Para as bactérias Gram-negativas a atividade foi considerada baixa, com os melhores resultados para *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. Enteritidis*. O óleo não apresentou atividade para *P. mirabilis*, *K. pneumoniae* e *S. Gallinarum*. A atividade sobre *C. albicans* foi considerada baixa. Na concentração de 7000 µg.mL<sup>-1</sup> o óleo apresentou potencial antioxidante e também demonstrou potencial de repelência sobre *D. gallinae* na concentração de 10%, mas não causou repelência quando aplicado em concentrações abaixo de 10%. O teste de fumigação de *M. oblongata* sobre *D. gallinae* demonstrou que concentrações do óleo essencial entre 1.25% e 10% promoveram baixa mortalidade.

## Referencial Bibliográfico

ACIOLE, S.D.G., 2001. *Avaliação da atividade inseticida dos óleos essenciais das plantas Amazônicas Annonaceae Boraginaceae e de Mata Atlântica Myrtaceae como alternativa de controle as larvas de Aedes aegypti (Linnaeus,1762) (Diptera Culicidae)*. Lisboa: Universidade de Lisboa, 72 p. Dissertação de Mestrado em Biologia Humana e Ambiental.

ADAMS, R.P., 2007. Identificação de componentes de óleos essenciais por cromatografia gasosa / espectrometria de massa. Londres: Allured Pub. Corp, pp. 804.

ALVES, C. Q., DAVID, J. M., BAHIA, M. V. and AGUIAR R. M., 2010. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. *Química Nova*, vol. 33, n.º 10, pp. 2202–2210.

BASER, K. H. C. and BUCHBAUER, G., 2015. *Handbook of Essential Oils: Science, Technology, and Applications*. 2<sup>nd</sup>. ed. 1112 p. CRC Press.

BURT, S., 2004. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, vol. 94.

- CASTRO, R. D. and LIMA, E. O., 2010. Atividade antifúngica in vitro do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. *Revista de Odontologia da UNESP*, vol. 39, n<sup>o</sup>. 3, pp. 179–184.
- CEYHAN, N., KESKIN, D. and UGUR, A., 2012. Antimicrobial activities of different extracts of eight plant spices from four different family against some pathogenic microorganisms. *Journal of Food Agriculture and Environment*, vol. 10, pp. 193-197.
- CIPRIANI A. F., FIGUEIREDO, R. M., SOARES, G. L. G. and KAPLAN, M. A. C., 2012. Implicações químicas na sistemática e filogenia de Bignoniaceae. *Química Nova*, vol. 35, n<sup>o</sup>. 11, pp. 2125-2131.
- CERQUEIRA, M. D. DE, MARQUES, E. J. DE, MARTINS, D., ROQUE, N. F., CRUZ, F. G., and SILVA, M. L. DA. 2009. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). *Química Nova*, vol. 32, n<sup>o</sup>. 6, pp. 1544-1548. <https://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000600035>
- COLLIER, K. F. S., ALBUQUERQUE, G. S., EIRAS, A. E., ARAUJO, M. C., KASPER, D., FAUCI, A., LONGO, D. and HAUSER, S., 2015. *Harrison's Principles of internal medicine*. 19nd ed. 3000 p. McGraw-Hill Professional Publishing Michigan: Reference Publications Incorporation. 501p.
- EIRAS, A. E., MAFRA NETO, A. 2001. Olfatometria aplicada ao estudo do comportamento de insetos. (Eds.) Vilela, E. F., Della Lucia, T. M. C. Feromônios de insetos: biologia, química e emprego no manejo de pragas. Holos, Ribeirão Preto, p. 27-39.
- LIMBERGER R. P., SOBRAL, M., HENRIQUES A. T. 2004. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Química Nova*, vol. 27, n<sup>o</sup>. 6, pp. 916-919.
- LOCHER, N., KHALED, A. S., ABDEL-GHAFFAR, F. and MEHLHORN, H., 2010. In vitro and field studies on the contact and fumigant toxicity of a neem-product (Mite-Stop®) against the developmental stages of the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. *Parasitol Res*, vol.107, pp. 417– 423.
- MONTEIRO, L. B., 2001. Estímulos olfativos Envolvidos na Localização de presas pelo ácaro predador *Neioseius californicus* (McGregor) (Acari: Phytoseiidae) em macieiras e plantas hospedeiras alternativas. *Neotropical Entomology*, vol. 30, n<sup>o</sup>. 4, pp. 631-639.

MORS, W.B., RIZZINI, C.T. and PEREIRA, N. A. 2000. *Medicinal plants of Brazil*.

OUSSALAH, M., CAILLET, S., SAUCIER, L. and LACROIX, M. 2007. Inhibitory effects of selected plant essential oils on the growth of four pathogenic bacteria: *E.coli* O157:H7, *Salmonella* Typhimurium, *Staphylococcus aureus* and *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, vol.18, n<sup>o</sup>.5, pp.414-20.

PALERMO, N. J., 2015 [24 abril 2015]. *Web*: Fatos e mitos sobre resistência bacteriana a antimicrobianos usados em produção animal [online]. Available from: <http://facta.org.br/fatos-e-mitos-sobre-resistencia-bacteriana-aantimicrobianos-usados-em-producao-animal/>

PANDINI, J. A., PINTO, F. G. S., SCUR, M. C., ALVES, L. F. A. and MARTINS, C. C., 2015. Antimicrobial, insecticidal, and antioxidant activity of essential oil and extracts of *Guarea kunthiana* A. Juss. *Journal of Medicinal Plants Research*, vol. 9, n<sup>o</sup>. 17, pp. 48-55.

ROSA, C. S., VERAS, K. S., SILVA, P. R., LOPES NETO, J. J., CARDOSO, H. L. M., MAIA, J. G. S., MONTEIRO, O. S. and MORAES, D. F. C., 2016. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey) DC. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 18, n<sup>o</sup>. 1, pp. 1-9.

SÁ, F. A. S., BORGES, L. L., PAULA, J. R., SAMPAIO, B. L., FERRI, P. H. and PAULA, J. R., 2012. Essential oils in aerial parts of *Myrcia tomentosa* : composition and variability. vol. 22, n<sup>o</sup>.6, pp.1233–1240.

SARTORATTO, A., MACHADO, A. L. M., DELARMELINA, C. FIGUEIRA, G. M., DUARTE, M. C. T. and REHDER, V. L. G., 2004. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, vol. 35, n<sup>o</sup>. 4, pp. 275–280.

SCHERER, R. WAGNER, R. DUARTE, M. C. T. and GODOY, H. T., 2009. Composition and antioxidant and antimicrobial activities of clove, citronella and palmarosa essential oil. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. vol. 11 n<sup>o</sup>. 4, pp. 442-449.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P. K. and WANASUNDARA, P. D., 1992. Phenolic antioxidants. *Reviews in food science and nutrition*. vol. 32, no. 1, p. 67-103.

SIMONETTI, E., ETHUR, M.E., CASTRO, L.C., KAUFFMANN, C., GIACOMIN, A.C., LEDUR, A., AROSSI, K., PACHECO, L.A., GOETTERT, M.I., FALEIRO, D., and FREITAS, E.M., 2016. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 18, n<sup>o</sup> 1, pp. 9-18. [https://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15\\_005](https://dx.doi.org/10.1590/1983-084X/15_005)

SIMÕES, C. M. O. and SPITZER, V., 2004. Óleos voláteis. IN: SIMÕES, C. M. O, SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P. DE, MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. *Farmacognosia: da planta a o medicamento*. 5.ed. Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, cap. 18, p. 475.

SIMONETTI, E., ETHUR, M. E., CASTRO, L. C., KAUFFMANN, A. C. G., LEDUR, A., AROSSI, K., PACHECO, L. A., GOETTERT, M. I., FALEIRO, D. and FREITAS, E. M., 2016. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos de *Eugenia anomala* e *Psidium salutare* (Myrtaceae) frente à *Escherichia coli* e *Listeria monocytogenes*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, vol. 18, n<sup>o</sup>.18, pp. 9–18.

SOTO, C. J., JOHN, O. P., GOSLING, S. D. and POTTER, J., 2011. Age differences in personality traits from 10 to 65: Big Five domains and facets in a large cross-sectional sample. *Journal of Personality and Social Psychology*, vol. 100, pp. 330–348. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21171787>.

SOBRAL, M., PROENÇA, C., SOUZA, M., MAZINE, F. and LUCAS, E. Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. 2016 [citado em 2016 out. 18]. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB10335>

SPARAGANO, O. A. E., D. R., HARRINGTON, D. W. J. and GIANGASPERO, A., 2014. Significance and Control of the Poultry Red Mite, *Dermanyssus gallinae*. *Annual Review of Entomology*, vol. 59, pp. 447-466.

TABARI, M. A., YOUSSEFI, M. R., BARIMANI, A. and ARAGHI, A., 2015. Carvacrol as a potente natural acaricide against *Dermanyssus gallinae*. *Parasitology Research*. vol. 114, ed. 10, pp. 3801-3806.

TAKAO, L. K., IMATOMI, M. and GUALTIERI, S. C. J., 2015. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). *Brazilian Journal of Biology*, vol. 75, no. 4, pp. 948–952.

TEPE, B., DONNEY, E., UNLU, M., CANDAN, F., DAFERERA, D., UNLU, G.V., POLISSIOU, M. and SOKMEN, A. A., 2004. Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *S. cryptantha* (Montbret et Aucher ex Benth) *S. multicaulis* (Vahl). *Food Chemistry*, vol. 84, pp. 519-525.

The Plant List. Myrtaceae [online]. 2013 [citado em 2015 set. 22]. Disponível em: <http://www.theplantlist.org/1.1/browse/A/Myrtaceae>

WEBER, L. D., PINTO, F.G.S., SCUR, M.C., SOUZA, J.G.L., COSTA, W.F. and LEITE, C.W., 2014. Chemical composition antimicrobial and antioxidante activity of essential oil and various plant extrates from *Prunus myrtifolia*. *African Journal of Agricultural Research*, vol. 9, pp. 846-853.

XAVIER, M. N., ALVES, J. M., CARNEIRO, N. S., SOUCHIE, E. L., SILVA, E. A. J., MARTINS H. G., AMBRÓSIO, M. A. L. V., EGEA, M. B., ALVES, C. C. F. and MIRANDA, M. L. D., 2016. Composição Química do Óleo Essencial de *Cardiophyllum calophyllum* Schltl (Annonaceae) e suas Atividades Antioxidante, Antibacteriana e Antifúngica. *Revista Virtual de Química*, vol. 20, n<sup>o</sup>. 20.

YOKOMIZO, N. K. S. and NAKAOKA-SAKITA, M., 2014. Atividade antimicrobiana e rendimento do óleo essencial de *Pimenta pseudocaryophyllus* var. *pseudocaryophyllus* (Gomes) Landrum, Myrtaceae. *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, vol. 16, n<sup>o</sup>. 3, pp.513–520.

**Tabela 1.** Composição química do óleo essencial das folhas da espécie *M. oblongata*

Nº	Compostos	Monoterpeno	Tr (min)	Área (%)	IR	*IR
1	-Pineno	Monoterpeno	7:39	6,65	945	942
2	Canfeno	Monoterpeno	7:98	0,12	962	958
3	2,4-tujadieno	Monoterpeno	8:12	0,44	966	959
4	p-cimeno	Monoterpeno	10:91	0,27	1038	1033
5	Crisantenona	Monoterpeno	15:11	0,28	1134	1131
6	-Campholenal	monoterpeno oxigenado	15:37	0,37	1140	1130
7	L-pinovarveol	monoterpeno oxigenado	15:96	0,98	1153	1154
8	cis-verbenol	monoterpeno oxigenado	16:04	1,52	1154	1142
9	**trans-verbenol	monoterpeno oxigenado	16:21	11,94	1158	1150
10	Pinocarvona		16:93	0,52	1173	1168
11	Felandreno-8-ol	monoterpeno oxigenado	17:44	1,80	1185	1170
12	Mirtenol	monoterpeno oxigenado	18:49	0,75	1208	1202
13	Cis-verbenona	monoterpeno oxigenado	18:96	3,32	1218	1218
14	trans-carveol	monoterpeno oxigenado	19:63	0,31	1233	1229
15	-Cubebeno	Hidrocarboneto	25:13	0,36	1356	1355
16	-Copaeno	hidrocarboneto sesquiterpênico	26:33	1,12	1384	1383
17	-Cubebeno	hidrocarboneto sesquiterpênico	26:87	0,37	1396	1392
18	-Cariofileno	hidrocarboneto sesquiterpênico	28:16	3,70	1426	1428
19	(+)-Epi- ciclosesquifelandreno	hidrocarboneto sesquiterpênico	29:39	0,35	1456	1470
20	-Cariofileno	hidrocarboneto sesquiterpênico	29:65	0,70	1462	1458
21	Aromadendreno	hidrocarboneto sesquiterpênico	29:81	0,46	1466	1463
22	-Eudesmeno	hidrocarboneto sesquiterpênico	31:03	3,47	1495	1496
23	Elixeno	hidrocarboneto sesquiterpênico	31:30	2,66	1502	1511
24	Cadineno	hidrocarboneto sesquiterpênico	32:25	2,94	1525	1524
25	Calameneno	hidrocarboneto sesquiterpênico	32:37	3,11	1528	1529

26	Calacoreno	hidrocarboneto sesquiterpênico	33:14	1,30	1548	1548
27	Álcool de cariofileno	sesquiterpeno oxigenado	33:49	2,04	1557	1563
28	(-)-EspatulenoI	sesquiterpeno oxigenado	34:53	4,22	1583	1582
29	**Óxido de cariofileno	sesquiterpeno oxigenado	34:69	22,03	1587	1583
30	Epoxido de Humuleno II	sesquiterpeno oxigenado	35:76	2,75	1614	1607
<b>NI</b>			<b>41:60</b>	<b>1,78</b>	<b>1722</b>	
<b>TOTAL</b>				<b>82,63%</b>		
Monoterpenos				7,76%		
Monoterpeno oxigenado				21,51%		
Hidrocarboneto sesquiterpênico				20,54%		
Sesquiterpeno oxigenado				32,82%		

\*\* Compostos Majoritários; <sup>a</sup>TR: tempo de retenção; <sup>b</sup>IR: valores dos Índices de Retenção calculados; <sup>c</sup>IR: valores dos índices de Retenção encontrados na literatura; <sup>d</sup>NI: não identificado.

**Tabela 2.** Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de *M. oblongata* frente a microrganismos padrões

<b>Microrganismos</b>	<b>CIM/CBMouCFM (µg/mL)</b>
<i>Gram-negativos</i>	
<i>E. coli</i>	7000/7000
<i>P. aeruginosa</i>	7000/—
<i>P. mirabilis</i>	—
<i>K. pneumoniae</i>	—
<i>S. Enteritidis</i>	7000/—
<i>S. Gallinarum</i>	—
<i>Gram-positivos</i>	
<i>S. epidermidis</i>	1700/1700
<i>S. aureus</i>	875/1700
<i>E. faecalis</i>	218.75/875
<i>B. subtilis</i>	875/1700

*Levedura* 3500/3500  
*C. albicans*

\*Atividade baixa: 7000 a 3500; Atividade moderada: 1700 a 875; Atividade alta: 437,5 a 218,75; Muito alta: <109,375.

**Tabela 3.** Índice de DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil) (% de sequestro) e IC50

Solução teste	% sequestro DPPH	IC <sub>50</sub>
Controle positivo BHT	94,58%	1,39
Óleo essencial de <i>M. oblongata</i>	88,33%	2,80

BHT= antioxidante sintético comercial; DPPH =2,2-difenil-1-picril hidrazil; IC50 = concentração do óleo necessário para reduzir 50% do radical DPPH

**Tabela 4.** Fumigação do óleo essencial de *M. oblongata* sobre *D. gallinae*, n = 100

	Controle (água destilada, Tween e acetona 10%)	OE 10%	OE 5%	OE 2,5%	OE 1,25%
	0,6~1 ± 0,5 a	3,8~4 ± 1,8 a	2,4~3 ± 1,8 a	2,4~3±2,6 a	2 ± 1,7 a
<b>Mortalidade (%)</b>	5%	20%	15%	15%	10%

Médias ± desvio padrão das mortalidades dos ácaros em 24h. Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey.

**Tabela 5.** Número total de fêmeas de *D. gallinae* atraídas a uma fonte de odor e tempo médio (h:m:s) que levaram para escolher um dos braços do olfatômetro em Y, para três concentrações do óleo essencial de *M. Oblongata*, n = 150

	N° total respostas	Tempo (h:m:s)
<b>Controle</b>	16	00:45:16
<b>Óleo essencial 1%</b>	10	00:26:24
<b>Controle</b>	17	00:41:12
<b>Óleo essencial 5%</b>	8	00:15:59
<b>Controle</b>	*17	00:45:54
<b>Óleo essencial 10%</b>	5	00:15:07

\*Houve diferença estatística significativa quanto ao número de respostas entre o controle e o óleo essencial na concentração de 10% (Teste Qui-quadrado,  $p < 0,05$ ). Para o tempo, não houve diferença estatística significativa em nenhuma das concentrações (Teste t,  $p > 0,05$ ) em relação aos controles.

**Capítulo 2. Atividades biológicas do óleo essencial e extratos vegetais de *Myrcia oblongata***

Biological activities of essential oil and plant extrats of *Myrcia oblongata*

C. B. SANTANA<sup>a</sup>, F. G. S. PINTO<sup>a\*</sup>, J. G. L. SOUZA<sup>a</sup>, TOLEDO, A. G.<sup>a</sup>

<sup>a</sup>Programa de Conservação e Manejo de Recursos Naturais,  
Laboratório de Biotecnologia, Universidade Estadual do Oeste  
do Paraná – UNIOESTE. Cascavel – PR, Brasil. Cep: 85819-

110.

\* fabiana.pinto@unioeste.br

**RESUMO**

Os produtos do metabolismo secundário das plantas têm despertado grande interesse econômico pela sua diversidade química e atividades biológicas. Diante disto, o objetivo deste trabalho foi determinar a composição química dos extratos vegetais de *Myrcia oblongata*, avaliar o potencial antioxidante destes extratos, testar a atividade antimicrobiana frente a onze microrganismos padrões e dez sorotipos de *Salmonella* spp. de origem avícola, bem como avaliar o potencial de mortalidade dos extratos e óleo essencial sobre *Alphitobius diaperinus*. Foram identificados saponinas, esteróides, triterpenóides, taninos e flavonóides. Os extratos apresentaram atividade para todos os microrganismos testados, com exceção do extrato metanólico que não demonstrou atividade para *P. mirabilis* e *S. Enteritidis*. O extrato hexânico, acetato de etila e acetona possuem atividade antioxidante. O óleo essencial e os extratos de hexano, etanólico, metanólico e de acetato de etila apresentaram elevados índices de mortalidade sobre a larva de *A. diaperinus*. Para os adultos os melhores resultados foram obtidos para o óleo essencial, com mortalidade superior a 80%. Os resultados direcionam a importância de estudos para compreender o potencial e a ação de extratos vegetais e óleos essenciais, visando à diminuição de impactos causados pelo uso extensivo de antimicrobianos e antioxidantes sintéticos e pelo uso indevido de substâncias químicas para o controle de pragas.

**Palavras-chave:** avicultura, fitoquímica, *Salmonella*, inseticida, microdiluição, pragas

## ABSTRACT

The products of secondary plant metabolism have aroused great economic interest in their chemical diversity and biological activities. The objective of this work was to determine the chemical composition of *Myrcia oblongata* extracts, to evaluate the antioxidant potential of these extracts, to test the antimicrobial activity against eleven standard microorganisms and ten serotypes of *Salmonella* spp. Of poultry origin, as well as to evaluate the potential mortality of extracts and essential oil on *Alphitobius diaperinus*. Saponins, steroids, triterpenoids, tannins and flavonoids have been identified. The extracts presented activity for all microorganisms tested, except for the methanolic extract that did not show activity for *P. mirabilis* and *S. Enteritidis*. The hexane extract, ethyl acetate and acetone have antioxidant activity. The essential oil and extracts of hexane, ethanolic, methanolic and ethyl acetate showed high mortality rates on *A. diaperinus* larvae. For adults, the best results were obtained for essential oil, with a mortality greater than 80%. The results point to the importance of studies to understand the potential and action of plant extracts and essential oils, aiming at reducing the impacts caused by the extensive use of antimicrobials and synthetic antioxidants and by the undue use of chemical substances for pest control.

**Key words:** poultry farming, phytochemistry, *Salmonella*, insecticide, microdilution, pests

## Introdução

Com o aumento da produtividade avícola cresceu também o número de doenças entéricas ocasionadas por bactérias, principalmente da família Enterobacteriaceae que incluem gêneros *Salmonella* (Palermo, 2015). Estas bactérias em especial, são de extrema importância para a Saúde Pública, já que a salmonelose é responsável por altas taxas de mortalidade em humanos no mundo todo (Vargas *et al.*, 2011). Além disso, a dispersão destas bactérias no ambiente está associada à produção intensiva de alimentos de origem animal, sendo que os produtos avícolas se destacam como os principais reservatórios deste patógeno (D'aoust & Maurer, 2007).

Tanto para as salmonelas quanto para outras bactérias o problema de resistência a antimicrobianos vem aumentando devido ao uso extensivo e indevido destes, como promotores de crescimento (APC) nas aves (Anvisa, 2015; Ubabef, 2016). Registra-se um aumento significativo na frequência de bactérias resistentes, que antes eram reconhecidamente sensíveis a drogas rotineiramente usadas. Hoje, estas bactérias apresentam-se resistentes à vários fármacos disponíveis no mercado (Kasper *et al.*, 2015).

Outro problema no setor avícola é o uso frequente de produtos químicos, para o controle de pragas, tais como, o *Alphitobius diaperinus* (Coleoptera: Tenebrionidae) conhecido como “cascudinho”. Estes coleópteros são controlados com piretróides e organofosforados (Lambkin *et al.*, 2011). Porém, estes e outros produtos apresentam algumas desvantagens como seleção de populações resistentes, contaminação do ambiente e das aves, além da resistência microbiana de bactérias presentes em alguns insetos (Japp *et al.*, 2010).

Além da atividade antimicrobiana e inseticida dos extratos e óleos essenciais, conhecer a atividade antioxidante é de grande importância, já que alguns compostos isolados em plantas podem substituir conservantes sintéticos em produtos e nas indústrias. Porém, para este fim é necessário conhecer o princípio ativo dos extratos e óleos essenciais, além dos efeitos adversos como toxicidade e composição química destes produtos (Maciel *et al.*, 2012).

Devido a este panorama, trabalhos para fins terapêuticos, profiláticos e sobre alternativas ao uso destes compostos químicos são de reconhecida importância (Silva *et al.*, 2016), neste sentido, os extratos vegetais e os óleos essenciais destacam-se por sua eficiência em todo o mundo. No Brasil a exploração da atividade biológica de substâncias químicas de plantas, demonstra ser uma forma eficiente e mais sustentável no controle de zoonoses e na diminuição dos índices de resistência microbiana (Weber *et al.*, 2014; Pandini *et al.*, 2015).

Neste contexto, aumenta a importância da exploração do potencial antimicrobiano, antioxidante e inseticida dos vegetais, bem como a identificação de seus constituintes químicos. Este trabalho foi dividido em quatro experimentos com o objetivo de identificar os compostos fitoquímicos presentes nos extratos vegetais de *Myrcia oblongata* DC.; verificar a atividade antioxidante, avaliar a atividade antimicrobiana destes frente a onze bactérias padrões e uma levedura, também analisar a atividade do óleo essencial e extratos sobre dez sorotipos de *Salmonella* spp. de importância avícola; além de avaliar a atividade inseticida do óleo essencial e extratos vegetais sobre as larvas e adultos de *A. diaperinus*.

## **Material e métodos**

### **Coleta e identificação do material vegetal**

As folhas de *M. oblongata* foram coletadas no período de março a junho de 2016, na estação de outono, no Parque Ecológico Paulo Gorski (24°56'14" a 24°58'17"S, 53°25'14" a 53°27'06"W), no município de Cascavel, oeste do Paraná. A planta foi identificada pelo herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNOP), cujos voucher é: UNOP 1816.

As folhas foram secas a 40° C em estufa e moídas em moinho de facas do tipo *Willye* na granulometria 0,42 mm. O pó obtido foi armazenado em recipientes de vidro protegidos da luz e em temperatura ambiente até o preparo dos extratos vegetais e a extração do óleo essencial (Ceyhan *et al.*, 2012; Weber *et al.*, 2014).

### **Obtenção do óleo essencial**

Segundo metodologia proposta por Weber *et al.* (2014), o material vegetal seco de *M. oblongata* (140 g) foi adicionado a 1.400 mL de água destilada. A solução foi colocada em aparelho Clevenger seguindo a metodologia de arraste por vapor d' água por aproximadamente 3 h à 100° C. O óleo obtido foi armazenado em freezer a 4° C até a utilização.

### **Obtenção dos extratos**

Para o extrato aquoso, as folhas secas e trituradas (20 g) foram adicionadas a água destilada (100 mL), esta mistura foi mantida em agitador rotativo shaker a 170 rpm durante 24 h. Esta solução foi filtrada em papel filtro Whatman nº. 1 e centrifugada a 3.800 x por 15 minutos. Os extratos de metanol (MeOH), etanol (EtOH), acetato de etila (AcEt), acetona (AcOH) e hexano (Hex) foram preparados de forma semelhante ao aquoso, porém após a coleta do sobrenadante os extratos foram submetidos à rotaevaporação. Todos os extratos foram armazenados a 4 ° C.

### **Prospecção fitoquímica**

Os testes fitoquímicos para a detecção da presença de esteróides, triterpenóides, taninos, alcalóides, cumarinas, saponinas, antocianinas e flavonóides foram realizados de acordo com a metodologia desenvolvida por Matos (1997).

### **Atividade antimicrobiana**

A atividade antimicrobiana foi realizada conforme metodologia proposta por Weber *et al.* (2014) e Pandini *et al.* (2015) com modificações.

Foram utilizadas bactérias obtidas do Banco internacional: *Bacterial Quality Control Strains*, sendo elas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) e a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231). Além da *Salmonella* Gallinarum do Instituto Adolfo Lutz – IAL e

*Bacillus subtilis* da coleção de culturas de diagnóstico “Cefar Diagnóstica” (CCCD-B005). Também, utilizaram-se dez sorotipos de *Salmonellas* spp. de ocorrência na região Oeste do Paraná, Brasil (Scur *et al.*, 2014), estes sorotipos foram isolados de diferentes aviários da região e fornecidos pela **MercoLab Laboratórios Ltda**, sendo: *S. Albany*, *S. Braenderup*, *S. Gafsa*, *S. Heidelberg*, *S. Idikan*, *S. Lexington*, *S. Livingstone*, *S. Montevideo*, *S. SaintPaul* e *S. Senftenberg*.

Todos os microrganismos foram recuperados em caldo de enriquecimento Brain Heart Infusion (BHI) e incubados por 24 h a 37° C. As concentrações finais das bactérias foram padronizadas para  $1 \times 10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> e da levedura  $1 \times 10^5$  UFC.mL<sup>-1</sup> em solução salina a 0,85%.

Para a realização do teste da Concentração Inibitória Mínima (CIM), o óleo essencial foi diluído a uma concentração de 7000 µg.mL<sup>-1</sup>. Para isto, uma alíquota de 70 mg do óleo foi diluída em 1 mL de metanol (10%). Desta solução 500 µL foram homogeneizados em 4.5 mL de caldo Muller-Hinton (MH). Os extratos vegetais foram diluídos na seguinte proporção: para 0,40 g de extrato, 1 mL de metanol P.A e 1 mL de MH caldo (concentração 2x). O extrato aquoso foi utilizado diretamente nos poços com 150 µL caldo MH.

O CIM tanto para o óleo quanto para os extratos foram realizados conforme as normas do Clinical and Laboratory Standards Institute (2007). Para o óleo essencial foram adicionados em placas de microdiluição de 96 poços, 150 µL de caldo MH (em todos os poços) e 150 µL da solução com óleo essencial (preparada anteriormente). Foram realizadas diluições seriadas de 7.000 até 3,4 µg.mL<sup>-1</sup> nos poços posteriores. Para os extratos, a solução de extrato, metanol e MH caldo (preparada anteriormente) foi adicionada no primeiro poço de cada linha em uma concentração de 200 mg.mL<sup>-1</sup>, nos poços posteriores foram adicionados 150 µL de caldo MH (concentração dobrada) e realizado diluições seriadas que variaram de 200 mg.mL<sup>-1</sup> a 3,12 mg.mL<sup>-1</sup>.

Em cada poço foi adicionado 10 µL do inóculo de microrganismo, diluído anteriormente. As placas foram levemente homogeneizadas e levadas a incubação por 24h a 37° C. A CIM foi realizada em triplicata.

Depois do período de incubação foi adicionado 10 µL de solução de cloreto de trifetil tetrazolium (CTT) a 1% em cada poço das microplacas, estas foram incubadas por mais três horas a 37° C. A presença de coloração vermelha nos poços foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório do óleo essencial ou extrato vegetal, enquanto a ausência da coloração foi considerada prova positiva da ação inibitória, ou seja, o óleo essencial ou o extrato vegetal não inibiram o crescimento dos microrganismos presentes nas microplacas.

Como controle positivo foi utilizada solução de gentamicina  $30 \text{ mg.mL}^{-1}$  para as bactérias e nistatina para a levedura *C. albicans*. Também foi realizado um controle com metanol, para tal foram adicionados  $70 \text{ }\mu\text{L}$  de caldo MH,  $70 \text{ }\mu\text{L}$  de metanol 10% e  $10 \text{ }\mu\text{L}$  dos microrganismos testados.

Antes de ser adicionado o CTT nos poços, foram retirados  $10 \text{ }\mu\text{L}$  da solução de cada poço, incluindo os controles, e inoculados em placas de Petri contendo Ágar MH para a realização do teste de Concentração Bactericida mínima (CBM) ou Concentração fungicida mínima (CFM). As placas foram incubadas por 24 h a  $37^\circ \text{ C}$ .

A CIM e a CBM do óleo essencial foram classificadas de acordo com os critérios propostos por Sartoratto *et al.* (2004), sendo a atividade considerada baixa ( $7000$  a  $3500 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), moderada ( $1700$  a  $875 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ), alta ( $437,5$  a  $218,75 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ) ou muito alta ( $<109,375 \text{ }\mu\text{g.mL}^{-1}$ ). Para os extratos a classificação foi considerada alta ( $<12,5 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), moderada ( $12,5$  a  $25 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), baixa ( $50$  a  $100 \text{ mg.mL}^{-1}$ ), e muito baixa ( $>100 \text{ mg.mL}^{-1}$ ) (Araújo, 2010).

### **Atividade antioxidante**

A atividade antioxidante do óleo essencial foi mensurada de acordo com o método da redução do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH) (Scherer *et al.*, 2009; Weber *et al.*, 2014). Para tal, uma alíquota de  $0,1 \text{ mL}$  dos extratos vegetais, na concentração de  $200 \text{ mg.mL}^{-1}$  foram tratados com  $3,9 \text{ mL}$  de solução metanólica a 50% e homogeneizados em agitador de tubos. As absorvâncias das amostras foram mensuradas em espectrofotômetro à  $515 \text{ nm}$ . Como controle negativo foi utilizado uma solução composta de metanol, acetona e água ( $40 \text{ mL}$  de solução acetona à 70%,  $40 \text{ mL}$  de solução de metanol a 50% e  $20 \text{ mL}$  de água destilada) com adição do radical DPPH. Como controle positivo utilizou-se o antioxidante sintético comercial butil-hidroxi-tolueno (BHT). Como branco, foi utilizado metanol 50% para a calibração do espectrofotômetro.

Foram determinadas as absorvâncias do DPPH nas concentrações de 34, 64, 100, 134, 166 e  $200 \text{ }\mu\text{m}$  (leituras:  $\lambda = 515\text{nm}$ ), a fim de determinar uma função linear de dispersão dos dados (das absorvâncias do DPPH).

Os cálculos da atividade antioxidante foram realizados da seguinte maneira: inicialmente foi calculada a equação da reta de DPPH (função linear). O índice do sequestro de DPPH pelos extratos vegetais e pelo BHT (controle positivo) foram calculados através da equação:  $\% [(Abs_0 - Abs_1) / Abs_0] \times 100$ , onde o  $Abs_0$  é a absorvância do controle negativo e  $Abs_1$  é a absorvância da amostra. O  $IC_{50}$  que é a concentração do óleo/extrato vegetal

necessária para reduzir 50% do radical livre DPPH, foi calculado através das absorbâncias das diferentes concentrações de DPPH, o que gerou uma função linear. Os valores das absorbâncias foram analisados pelo teste da Análise das variâncias (ANOVA), com nível de significância de 0,05, seguido do teste de Tukey de comparação das médias. Para a realização das análises estatísticas, utilizou-se o programa estatístico R<sup>®</sup> versão 3.3.2.

### **Atividade inseticida do óleo essencial e extratos vegetais de *M. oblongata* sobre larvas e adultos de *A. diaperinus***

O experimento foi baseado em Marcomini *et al.* (2009) com modificações. As larvas e adultos de *A. diaperinus* foram coletadas em um aviário de frango de corte em Cascavel, Região Oeste do Paraná, Brasil e utilizadas para experimento 24 h depois da coleta. As larvas de 1 cm foram separadas dos adultos, estes foram posteriormente divididos em 5 repetições de 20 (n = 100) por concentração dos extratos/óleo.

Os extratos vegetais (acetato de etila, acetona, metanol, etanol e hexano), foram diluídos em acetona em quatro concentrações diferentes 10%, 5%, 2,5% e 1,25%. Para preparar 15 mL na concentração de 10%, 1,5 mL de acetona P.A foram diluídas em 1,5 mL de cada extrato, resultando em uma solução que posteriormente foi homogeneizada com 12 mL de água destilada estéril com espalhante adesivo *Tween* 80<sup>®</sup> a 0,1% (1g de Tween para 100 mL de água), a fim da concentração da acetona corresponder a 10%. Na concentração de 5%, 1,5 mL de acetona P. A. foram diluídas em 0,75 mL de cada extrato e posteriormente em 12,75 mL de água destilado com Tween. As diluições posteriores (2,5% e 1,25%) seguiram a mesma regra. O extrato aquoso foi aplicado logo após o preparo sobre as larvas e adultos, na concentração de 200 mg.mL<sup>-1</sup>. O óleo essencial foi diluído em acetona 10% também nas concentrações de 10%, 5%, 2,5% e 1,25%. O controle foi realizado com água destilada estéril, espalhante adesivo *Tween* 80<sup>®</sup> a 0,1% (na mesma proporção dos extratos) e acetona 10%.

Os insetos de cada repetição foram colocados em placas de Petri tipo gerbox (diâmetro: 7 cm) com um papel filtro Whatman n<sup>o</sup>. 1 (diâmetro: 5 cm) e alimentados com 1 g de palha de trigo. Antes de colocados nas placas gerbox e logo após o preparo das concentrações dos extratos e óleo essencial, os cascudinhos caminharam por 30 segundos em copo plástico (modificação da metodologia Marcomini *et al.*, 2009) contendo cada diluição, estes copos foram agitados para evitar que os insetos saíssem dos recipientes. A avaliação da mortalidade foi realizada em 24 h, foram considerados mortos os insetos que não respondiam ao toque com pinça.

Foi realizado teste fatorial da análise das variâncias (ANOVA fatorial) com o teste de acompanhamento Scott-Knott ( $\alpha = 0,05\%$ ).

## Resultados

### Fitoquímica dos extratos vegetais

Na determinação da fitoquímica das folhas de *M. oblongata* foi possível constatar grupos de compostos provenientes do metabolismo secundário das plantas, tais como saponinas, esteróides, triterpenóides, taninos e flavonóides. O extrato aquoso demonstrou a presença de saponinas e taninos, já nos extratos hexânico, acetato de etila e acetona foram verificados esteróides, triterpenóides e taninos. Os extratos etanólico e metanólico demonstraram apenas a presença de triterpenóides (tabela 1).

### Atividade antimicrobiana

Os extratos de *M. oblongata* apresentaram atividade antimicrobiana para todos os microrganismos testados, com exceção do extrato metanólico, que não foi constatada a atividade bactericida para *P. mirabilis* e *S. Enteritidis* (tabela 2) e do extrato aquoso que não apresentou atividade para nenhum microrganismo testado (tabelas 2 e 3).

A CIM e CBM do óleo essencial de *M. oblongata* variaram de  $437,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$  a  $7000 \mu\text{g.mL}^{-1}$  para as dez salmonelas testadas (tabela 3). As melhores atividades foram verificadas sobre os sorotipos *S. Lexington* e *S. SaintPaul* com CIM  $437,5$  / CBM  $3,500$  e  $875$  /  $1,750$  respectivamente. Os extratos vegetais apresentaram atividade sobre todos os sorotipos de *Salmonella* spp. avaliados, variando de  $1,57$  a  $100 \text{ mg.mL}^{-1}$ .

### Atividade antioxidante

As absorvâncias do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil) nas concentrações 34, 66, 100, 134, 166, 200  $\mu\text{m}$ , apresentaram como função linear a equação:  $y = 0,0139. x - 0,138$  e  $R^2 = 0,9233$ , esta função linear foi utilizada para os cálculos de  $\text{IC}_{50}$  (tabela 4).

Pelo teste de Análise das variâncias (ANOVA), com nível de significância de 0,05, constatou-se que pelo menos uma das médias de absorvância dos seis extratos é diferente ( $p < 0,05$ ; GL = 6). As médias dos extratos hexânico e de acetato de etila não diferiram do BHT (controle positivo) pelo teste de Tukey (tabela 4). Estes dois extratos apresentaram atividade superior a 80%. Os extratos etanólico, metanólico e aquoso não apresentaram atividade

antioxidante, isto é, não houve redução de absorvâncias significativas na leitura no espectrofotômetro, apresentando porcentagem de sequestro de DPPH inferiores a 30%.

### **Atividade inseticida do óleo essencial e extratos vegetais de *M. oblongata* sobre larvas e adultos de *A. diaperinus***

Para as larvas de *A. diaperinus* houve diferença estatística entre as médias dos tratamentos ( $p < 0,05$ ; GL = 24) pelo teste fatorial da Análise das variâncias (ANOVA fatorial). O melhor percentual de mortalidade foi para o extrato hexânico, com média de 97,75%, seguido do óleo essencial 95,25%. O extrato de acetato de etila e metanólico que não diferiram entre si pelo teste Scott-Knott ( $\alpha = 0,05\%$ ) e apresentaram letalidade de 87,75% e 86,5%, respectivamente. O extrato etanólico (78,5%) e de acetona (59,8%) obtiveram as menores médias. Não houve mortalidade para o extrato aquoso (tabela 6).

Os adultos de *A. diaperinus* demonstraram diferentes respostas de mortalidade entre os tratamentos pelo teste fatorial da Análise das variâncias (ANOVA fatorial) ( $p < 0,05$ ; GL = 24). O melhor índice de mortalidade foi para o óleo essencial (92,5%). Os demais extratos apresentaram mortalidade inferior a 20%, o extrato metanólico 19,75%, acetato de etila 19,25%, hexânico 13,25%, acetona 6,5% e etanólico 2,25% (tabela 7). Não houve mortalidade para o extrato aquoso.

## **Discussão**

### **Fitoquímica dos extratos**

A família Myrtaceae é bastante estudada quanto à produção de metabólitos secundários. Foi demonstrada a presença de taninos, esteróides e saponinas nas folhas de *Gomidesia affinis* e *Gomidesia spectabilis* desta família (Sakita & Aguiar, 2006). Além de triterpenos, flavonóides e alcalóides nos extratos de *Calycorectes psidiiflorus* (Domingues *et al.*, 2010) e taninos e flavonóides em *Pimenta pseudocaryophyllus*, todas deste mesmo táxon (Paula, *et al.*, 2008), sendo que para o gênero *Myrcia* foram encontrados na literatura relatos de compostos fenólicos em *Myrcia bela* (Saldanha, 2010), *Myrcia hiemalis* (Silva, 2007) e *Myrcia rotundifolia* (Cerqueira, 2002).

Em estudos com compostos fenólicos foi demonstrada sua capacidade antioxidante, assim como seu possível efeito na prevenção de diversas enfermidades cardiovasculares, cancerígenas e neurológicas. A ação benéfica dos compostos fenólicos na saúde humana vem sendo relacionada com sua atividade antiinflamatória, e impede a ação de radicais livres no organismo (Harborne & Williams, 2000; Sánchez-Moreno, 2002).

Compostos fenólicos tais como esteróides, triterpenóides, taninos e flavonóides apresentam em sua estrutura grupamentos benzênicos e grupamentos de hidroxilas (Hernández & Gonzáles, 1999). Os flavonóides são polifenóis, fenóis simples ou ácidos, onde os átomos de hidrogênio dos grupos hidroxila, as duplas ligações dos anéis benzênicos e a dupla ligação da função oxo (-C=O) de alguns flavonóides podem conferir atividades biológicas (Hrazdina, 1970; Rice-Evans, 1996), como antioxidante (Rosa *et al.*, 2010), antimicrobiana (Flambó, 2013) e repelência contra insetos (Rathi *et al.*, 2008).

Os flavonoides estão presentes em alguns frutos e vegetais, estes se apresentam como flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianinas, isoflavonas e chalconas (Graham, 1992; Van acquire, 1996). Os não-flavonoides são os derivados dos ácidos hidroxicinâmico e hidroxibenzoico, que também podem apresentar atividades biológicas. Estas atividades estão relacionadas com a posição dos grupos hidroxilas e também com a proximidade do grupo -CO<sub>2</sub>H em relação ao grupo fenil (Hrazdina *et al.*, 1970).

Os triterpenóides que estão no grupo dos terpenos possuem estruturas diversificadas, com mais de 40 mil formas diferentes. Estas diferentes formas estão presentes em plantas, animais e microrganismos e apresentam muitas funções no reino vegetal, animal e na saúde humana. Estes compostos são liberados quando ocorre ataque de predadores e patógenos, no entanto, o papel biológico de diversos terpenóides ainda não é conhecido (Gershenzon & Dudareva, 2007; Roberts, 2007; Domingo *et al.*, 2009).

### **Atividade antimicrobiana**

Vários estudos demonstram a atividade de extratos vegetais de membros da família Myrtaceae sobre diferentes tipos de microrganismos. Ferreira e Vargas (1999) indicaram que no ensaio com *S. Typhimurium* o extrato de *Myrciaria tenella* (Myrtaceae), apresentou atividade mutagênica sobre esta bactéria, provavelmente devido à presença de flavonóides e taninos nos extratos. Estes compostos também estão presentes nos extratos de *M. oblongata*. Extratos com diferentes solventes de *Psidium guajava* demonstraram atividade antimicrobiana sobre o crescimento de *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis*, *K. pneumoniae*, *S. Typhimurium* e *Candida* sp. (Carvalho *et al.*, 2002; Chah *et al.*, 2006; Nair & Chanda, 2007). Além disso, também foi relatado a eficiência dos extratos de *Myrciaria cauliflora*, *P. guajava* e *Syzygium cumini* que apresentaram atividade pelo método CIM e CBM/CFM sobre *C. albicans*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. Typhimurium*, *S. aureus* e *B. subtilis* (Bona *et al.*, 2014).

O extrato aquoso não apresentou atividade para nenhum microrganismo testado (tabelas 2 e 3). Este resultado concorda com informações reportadas por outros autores que não encontraram atividade antimicrobiana de extratos aquosos de *P. guajava*, *M. cauliflora* e *S. cumini* (Myrtaceae) para *C. albicans*, *E. coli*, *K. pneumoniae*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *S. Typhimurium*, na concentração de  $400 \text{ mg.mL}^{-1}$ , pelas metodologias de difusão em ágar e de microdiluição (CIM e CBM) (Bona *et al.*, 2014).

A atividade antibacteriana do óleo essencial pode ser explicada pela presença, dos compostos majoritários o óxido de cariofileno (22,03%), trans-verbenol (11,94%) e -Pineno (6,65%), por serem altamente hidrofóbicos, estes monoterpenos podem interagir com a membrana celular dos microrganismos causando danos importantes na membrana plasmática e acabam provocando a lise celular (Turina *et al.* 2006). Burt (2004) afirma que a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais está relacionada ao efeito sinérgico dos constituintes químicos, o que pode ter ocorrido com o óleo essencial de *M. oblongata*.

Os extratos vegetais apresentaram atividade sobre todos os sorotipos de *Salmonella* spp. avaliados. Resultados semelhantes foram observados por Voss-Rech *et al.* (2011), sendo que 20 sorotipos de salmonelas foram testados em relação aos extratos de *Eugenia jambolana*, *Eugenia uniflora*, *Caryophyllus aromaticus* e *Psidium araca* (Myrtaceae), e todos apresentaram CIM e CBM que variaram de  $40 \text{ mg.mL}^{-1}$  a  $240 \text{ mg.mL}^{-1}$ . A grande variação entre o efeito de inibição pode estar relacionada aos diferentes grupos metabólitos presentes nos extratos (Raven *et al.*, 2007).

Apesar da utilização de comparações entre metodologias para avaliar a atividade antimicrobiana, existe uma dificuldade em comparar os resultados obtidos por diferentes autores, uma vez que existem modificações nas metodologias utilizadas, ou seja, não há um mesmo padrão seguido por todos os pesquisadores. As variações ocorrem desde o método de preparação do inóculo, diluições, até a leitura dos resultados padronizadas por cada pesquisa (Cavanagh & Wilkinso, 2002).

### **Atividade antioxidante**

A atividade antioxidante dos extratos hexânico, acetado de etila e acetona pode estar associada à presença de compostos fenólicos, principalmente os taninos e flavonóides que possuem reconhecida atividade antioxidante (Ali *et al.*, 2011). A eficiência destes compostos está ligada a transferência de hidrogênio que neutraliza a ação de radicais livres (Brewer, 2011). Os flavonóides atuam como quelante de metais, desativadores de oxigênio singlete e consequentemente reduzem os radicais livres (Melo *et al.*, 2002; Canterle, 2005). Os taninos são

capazes de interceptar o oxigênio ativo formando radicais estáveis (Mello & Santos, 2007). As quantidades dos compostos fenólicos variam em razão de diferentes variáveis que acometem as plantas, tais como clima, tipo de solo, espécie, cultivar, temperatura, ataque de patógenos, além do tipo de armazenamento das folhas e extratos vegetais (Melo *et al.*, 2008). Em alimentos, os compostos fenólicos podem contribuir para a estabilidade oxidativa (Castañeda *et al.*, 2009).

Extratos de doze espécies da família Myrtaceae: *Blepharocalyx salicifolius*, *Eugenia bimarginata*, *Eugenia dysenterica*, *Eugenia klotzschiana*, *Hexachlamys edulis*, *Psidium australe*, *Psidium cinereum*, *Psidium laruotteanum* e do gênero *Myrcia*: *Myrcia bella*, *Myrcia lingua*, *Myrcia splendens* e *Myrcia tomentosa* foram testados sobre o radical livre DPPH. Apresentaram valores de porcentagem de sequestro de DPPH e IC<sub>50</sub> similares ou maiores que *Camellia sinensis* (controle positivo), cujo chá apresenta elevada atividade antioxidante devido à grande quantidade de compostos fenólicos (Takao *et al.*, 2015). O extrato aquoso de *Lafloensia pacari* (Myrtaceae) não apresentou atividade antioxidante significativa na concentração de 400 µg.mL<sup>-1</sup> (Campos & Frasson, 2011). Estes dados dos extratos da família Myrtaceae e do gênero *Myrcia* assemelham-se aos encontrados para *M. oblongata*.

#### **Atividade inseticida do óleo essencial e extratos vegetais de *M. oblongata* sobre larvas e adultos de *A. diaperinus***

Resultados com índices de mortalidade superiores a 50% para extratos e óleos da família Myrtaceae, foram demonstrados pelo óleo essencial de *Eucalyptus citriodora* sobre nematóides (Macedo *et al.*, 2011). Os pós (extratos) de *Eucalyptus grandis* e *Eucalyptus citriodora* também provocaram alta letalidade sobre o coleóptero *Acanthoscelides obtectus* (Mazzonetto *et al.*, 2003).

Os óleos essenciais podem atuar sobre enzimas digestivas, neurológicas ou ainda interagir com o tegumento do inseto (Isman, 2006). Kim *et al.* (2003) descreveram a relação entre a estrutura química e a atividade biológica dos compostos, constatando que quanto maior a habilidade de um composto químico dissolver-se em gorduras, maior a penetração no tegumento do inseto. Prado (2007) destacou que alguns compostos podem atuar por contato, ou seja, são absorvidas pela quitina do exoesqueleto ou vias respiratórias, apresentando uma ação fumigante.

Neste trabalho, o óleo essencial promoveu mortalidade superior a 80% tanto para larvas quanto para adultos em todas as concentrações testadas (10, 5, 2,5 e 1,25%), isto se deve possivelmente, as substâncias presentes no óleo essencial e a forma de aplicação. O óleo de *M. oblongata* apresenta como compostos majoritários óxido de cariofileno, trans-verbenol e -

pineno, estes terpenos que possuem potencial de repelência e mortalidade comprovada sobre coleópteros como *Sitophilus zeamais* (Tapondjou *et al.*, 2005) e *Tribolium confusum* (Lima & Moraes, 2009).

Quando se analisou os constituintes voláteis da *Cyanea angustifolia*, constataram 40 tipos diferentes de terpenos, ressaltando que estes constituintes são responsáveis pela inibição da acetilcolinesterase nos insetos (Savaris *et al.*, 2012). Tais substâncias também foram encontradas na fitoquímica de *M. oblongata*. Pauliquevis e Favero (2015), analisando diferentes métodos de aplicação do óleo essencial de *Pothomorphe umbellata*, verificaram que foi eficiente pelo método de superfície de contato sobre *Sitophilus zeamais*, metodologia semelhante a utilizada neste estudo com *M. oblongata*.

A atividade inseticida de membros da família Myrtaceae é comprovada. O óleo essencial de *Eugenia uniflora* e *Melia azedarach* à 10% foi testado sobre *Atta laevigata* e apresentou elevado potencial de mortalidade (Jung *et al.*, 2013). Os extratos de *Eugenia florida* e *Eugenia handroana* (Myrtaceae) reduziram a sobrevivência de *Atta sexdens rubropilos* (Formicidae) via ingestão na dieta (Torres *et al.*, 2013). Os extratos vegetais de *Myrcia oblecta* demonstraram atividade inseticida para o controle de *S. zeamais* (Coleoptera) (Vendramin, 2010).

## Conclusão

Na prospecção fitoquímica foram identificados nos extratos vegetais de *M. oblongata* saponinas, esteroides, triterpenoides, taninos e flavonoides.

Os extratos de *M. oblongata* apresentaram atividade para todos os microrganismos testados, com exceção do extrato metanólico que não demonstrou atividade bactericida para *P. mirabilis* e *S. Enteritidis*. O extrato hexânico, de acetato de etila e acetona apresentaram atividade antioxidante semelhante ao BHT (controle positivo).

O óleo essencial e o extrato hexânico apresentaram as maiores mortalidades, acima de 95%, sobre larvas de *A. diaperinus*. Os extratos de acetato de etila, acetona, metanólico e etanólico apresentaram mortalidade superior a 50%. Não houve mortalidade para o extrato aquoso.

O melhor índice de letalidade para adultos de *A. diaperinus* foi para o óleo essencial (92,5%). Os demais tratamentos apresentaram mortalidade inferior a 20%.

## Referencial bibliográfico

Ali, L.; Svensson, B.; Alsanius, B.W.; Olsson, M.E. (2011). Late season harvest and storage of Rubus berries - major antioxidant and sugar levels. *Scientia Horticulturae*, 129, 376-381.

Anvisa (2015). Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 20. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isoladas ou em associação. *Diário Oficial da União*, Seção 1, 39-40.

Araújo, N. R. R. (2010) *Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre microrganismos relacionados à lesão de mucosite oral*. Dissertação de Mestrado, – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Belém. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

Bona, E. A. M. De; Pinto, F. G. S. Da; Fruet, T. K.; Jorge, T. C. M.; Moura, A. C. De. (2014). Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. *Arquivos do Instituto Biológico*, 81, 3, 218-225.

Brewer, M.S. (2011) Natural antioxidants: Sources, compounds, mechanisms of action, and potential applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 10, 221-247.

Burt, S. (2004) Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. *International Journal of Food Microbiology*, 94, 223-253.

Campos, J. S.; Frasson, A. P. Z. (2011) Avaliação da atividade antioxidante do extrato aquoso de *Lafoensia pacari* A. em emulsão não-iônica. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 32, 3, 363-368.

Carterle, L. P. (2005) *Erva-mate e atividade antioxidante*. Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria.

Carvalho, A. A. T.; Sampaio, M. C. C.; Sampaio, F. C.; Melo, A. F. M.; Sena, K. X. F. R.; Chiappeta, A. A.; Higino, J. S. (2002) Atividade Antimicrobiana in vitro de extratos hidroalcoólicos de *Psidium guajava* L. sobre bactérias gram-negativas. *Acta Farmaceutica Bonaerens*, 21, 4, 255-258.

Castañeda, O. C. A.; Pacheco, H. M. L.; Páez, H. M. E.; Rodríguez, J. A.; Galán, V. C. A. (2005) Chemical studies of anthocyanins: A review. *Food Chemistry*, 113, 859-871.

Cavanagh, H. M. A.; Wilkinson, J. M. (2002) Biological activities of lavender essential oil. *Phytother Research*, 16:301-8.

**Ceyhan, N.; Keskin, D.; Ugur, A. (2012). Antimicrobial activities of different extracts of eight plant spices from four different families against some pathogenic microorganisms. *Journal of Food Agriculture and Environment*, 10, 93-197.**

Chah, K. F.; E. Z. E. C. A.; Emuelosi, C. E.; Esimone, C. O. (2006) Antibacterial and wound healing properties of methanolic extracts of some Nigerian medicinal plants. *Journal of Ethnopharmacology*, 104, 164-167, 2006.

D'aoust, J. Y.; Maurer, J. (2007) *Salmonella* species. In: Doyle, M. P.; Beuchat, L. R. *Food Microbiology*, 3. Washington, *Academic Press*, 10, 87- 219.

Domingo, V.; Arteaga, J. F.; Moral, J. F. Q.; Barrero, A. F. (2009) Unusually cyclized triterpenes: occurrence, biosynthesis and chemical synthesis. *Natural Product Reports*, 26, 115.

Domingues, E. A., Nakamura, C. V.; Souza, M. C.; Teixeira, T. S.; Peixoto, J. L. B.; Sarragiotto, M. H.; Vidotti, G. J. (2010) Estudo fitoquímico e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* e da atividade antimicrobiana de *Calycorectes psidiiflorus* (O. Berg) Sobral, Myrtaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20, 23-27.

Ferreira, I. C. D. F.; Vargas, V. M. F. (1999) Mutagenicity of medicinal plant extracts in *Salmonella*/ microsome assay. *Phytother Research*, 13, 5, 397-400.

Fevereiro, P. C. A. (1996) Aspectos botânicos. In: Bragança, L.A.R. Plantas medicinais antidiabéticas. Uma abordagem multidisciplinar. *Editora da Universidade Federal Fluminense*, 55-67.

Flambó, D. F. A. L. P. (2013). Atividades biológicas dos flavonóides: atividade antimicrobiana. Trabalho apresentado à Universidade Fernando Pessoa como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Freitas, M. I. T.; Bevilaqua, C. M. L.; Oliveira, L. M. B. De; Camurça-Vasconcelo, A. L. F., Vieira, L. S. Da, Amóra, S. S. A. Dos. (2011) Evaluation of *Eucalyptus citriodora* essential oil on goat gastrointestinal nematodes. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária*, 20, 3, 223-227.

Gershenson, J.; Dudareva, N. (2007) The function of terpene natural products in the natural world. *Nature Chemical Biology*, 3, 408.

- Góttlieb, O. R.; Silva, M. L.; Maia, J. G. S. (1972) *Phytochemistry*, 11, 1185.
- Govaerts, R.; Sobral, M.; Ashton, P.; Barrie, F.; Holst, B.K.; Landrum, L.R.; Matsumoto, K.; Mazine, F.F.; Nic Lughadha, E.; Proença, C.; Soares-Silva, L.H.; Wilson, P.G.; Lucas, E. (2008). World checklist of Myrtaceae. *Royal Botanic Gardens*, 455.
- Harborne, J. B.; Williams, C. A. (2000) Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, New York, 52, 6, 481- 504.
- Hernández, A. M.; Prieto Gonzáles, E. A. Plantas que contienen polifenoles (1999) *Revista Cubana de Investigaciones Biomedica*, 18, 1, 12-14.
- Heywood, V. H., Brummit, R. K., Culham, A.; Seberg, O. (2007) Flowering plant families of the world. *Firefly Books*, 225-226.
- Hrazdina, G.; Borzel, A. J.; Robinson, W. B. (1970) Studies on the stability of the anthocyanidin-3,5- diglucosides. *American Journal of Enology and Viticulture*, 21, 4, 201-204.
- Imatomi, M. (2010) *Estudo alelopático de espécies da família Myrtaceae do cerrado*. Tese Programa de Pós-graduação em Ecologia e Recursos Naturais do Centro de Ciências Biológica e da Saúde da Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, SP.
- Isman, M. B. (2000) Plant essential oils for pest and disease management. *Crop Protection*, v. 19, 603-608.
- Isman, M. B. (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. *Annual Review of Entomology*, 51: 45-66.
- Japp, A. K.; Bicho, C. L.; Silva, A. V. F. (2010). Importância e medidas de controle para *Alphitobius diaperinus* em aviários. *Ciência Rural*, 40, 7.
- Jung, P. H., S.; Nieri, A. C. Da; Martins, E.; Potrich, M. S.; Lozano E. R. Da; Margarida R. (2013). Atividade inseticida de *Eugenia uniflora* L. e *Melia azedarach* L. sobre *Atta laevigata* Smith. *Floresta e Ambiente*, 20, 2, 191-196.
- Kalemba, D.; Kunicka, A. (2003) Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10, 813-29.

Kasper, D. L.; Fauci, A. S. (2015) Doenças Infecciosas de Harrison. 2 ed. Artmed: Mc Graw Hill education.

Kéita, S. M.; Vicent, C.; Schmit, J. Efficacy of essential oil of *Ocimum basilicu* and *O. gratissimum* applied as na insecticidal fumigant and powder to control *Callosobruchus maculatus*. (2001) *Journal Stored Product Research*, 37, 4, 339-349.

Kim, E.H.; Kim, H.K.; Choi, D.H.; Ahn, Y.J. (2003) A caricidal activity of clove bud oil compounds against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari:Acaridae). *Applied Entomology and Zoology*, 38, 2, 261-266.

Lambkin, T.A.; Furlong, M.J. (2011) Metabolic mechanisms only partially explain resistance to pyrethroids in Australian broiler house populations of lesser mealworm (Coleoptera: Tenebrionidae). *Journal Of Economic Entomology*, 104, 629- 635.

Landrum, L.R. & Kawasaki, M.L. (1997). The genera of Myrtaceae in Brazil: an illustrated synoptic treatment and identification keys. *Brittonia* 49, 508-536.

Locher, N.; Khaled, A. S.; Abdel-Ghaffar, F.; Mehlhorn, H. (2010) In vitro and field studies on the contact and fumigant toxicity of a neem-product (Mite-Stop®) against the developmental stages of the poultry red mite *Dermanyssus gallinae*. *Parasitol Res*, 107, 417–423.

Machado G. B., Moura S. V., Fortes T. P., Felix S. R., Timm C. D., Silva E. F. (2016) Impacto da salmonelose na suinocultura e suas implicações em saúde pública. *Arquivo Instituto Biol.*, 83, 1-5.

Maciel, M. J.; Paim, M. P.; Carvalho, H. H. C.; Wiest, J. M (2012) Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante. *Revista Instituto Adolfo Lutz* São Paulo, 71, 3.

Marcomini, A. M.; Alves, L. F. A.; Bonini, A. K.; Mertz, N. R.; Santos, J. C. (2009) Atividade inseticida de extratos vegetais e do óleo de nim sobre adulto de *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera, Tenebrionidae). *Arquivo Instituto Biologia*, 76, 409-416.

Matos, F. J. A. (1997) Introdução à Fitoquímica Experimental. Fortaleza: *Edições UFC*. 141.

Mazzonetto, F., Vendramim, J. D. (2003) Effect of powders from vegetal species on *Acanthoscelides obtectus* (Say) (Coleoptera: Bruchidae) in stored bean. *Neotropical Entomology*, 32, 1, 145-149.

Mello, J. C. P.; Santos, S. D. (2007) Taninos. In: Simões C. M. O. *Farmacognosia da planta ao medicamento*. UFSC: *Universidade Federal de Santa Catarina*, 1104.

Mello, M. O.; Filho, S. M. C. (2002) Plant-insect intections: an evolutionary arms race between two distinct defense mechanisms. *Brazilian Journal of Plant Physiol.* 14, 71-81.

Melo, E. De A.; Maciel, M.I.S.; Lima, V.L.A.G. De; Nascimento, R.J. (2008) Capacidade antioxidante de frutas. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44, 193-201.

Nair, R.; Chanda, S. (2007) In vitro antimicrobial activity of *Psidium Guajava* L. leaf extracts against clinically important pathogenic microbial strains. *Brazilian Journal of Microbiology*, São Paulo, 38, 452-458.

Palermo, N. J. (2015) Fatos e mitos sobre resistência bacteriana a antimicrobianos usados em produção animal.

Pandini, J. A. Pinto, F. G. S.; Scur, M. C.; Alves, L. F. A.; Martins, C. C. (2015) Antimicrobial, insecticidal, and antioxidante activity of essential oil and extracts of *Guarea kunthiana* A. Juss. *Journal of Medicinal Plant Research*, 3.

Paula, J. A.; Paula, J. R.; Bara M. T. F.; Rezende, M. H. Ferreira, H. D. (2008) Estudo farmacognóstico das folhas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gmomes) L. R. Landrum – Myrtacea. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 18, 265-278.

Pauliquevis, C. F.; Favero, S. (2015) Atividade insetistática de óleo essencial de *Pothomorphe umbellata* sobre *Sitophilus zeamais*. *Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental*, 19, 12, 1192-1196.

Pegorini, C. S. (2016) *Associação do óleo essencial de Eugenia uniflora e Bacillus thuringiensis sobre Alphetobius diaperinus (panzer) (coleop.: tenebrionidae)*. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Zootecnia da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Campus Dois Vizinhos.

Prado, G. P. (2007) *Caracterização química e bioatividade do óleo essencial de Cunila angustifolia Benth (Lamiaceae) sobre Alphitobius diaperinus (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae)*. Dissertação do Mestrado em Ciências Ambientais - Universidade Comunitária Regional de Chapecó.

Rathi, J. M.; Absara, S.; Priyadharshine, K.; Jegathambika V. (2008). Qualitative phytochemical screening of some locally available insecticidal plants. *Journal of biopesticides*: 1, 52-54.

Rice-Evans, C. A.; Miller, N. J.; Paganga, G. (1996) Structure-antioxidant activity relationships of flavonoids and phenolic acids. *Free Radical Biology and Medicine*, 20, 7, 933-956.

Roberts, S. C. (2007) Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. *Nature Chemical Biology*, 3, 387.

Rosa, C.S.; Veras, K.S.; Silva, P.R.; Lopes Neto, J.J.; Cardoso, H.L.M.; Alves, L.P.L.; Brito, M.C.A.; Amaral, F.M.M.; Maia, J.G.S.; Monteiro, O.S.; Moraes, D.F.C. (2016). Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. *Rev. Bras. Pl. Med.*, Campinas, 18, 1, 19-26.

Rosa, E. A. Da, S.; Silva, B. C.; Silva, F. M. Da, Tanaka, C. M. A.; Peralta, R. M.; Oliveira, C. M. A. De, Kato, L.; Ferreira, H. D.; Silva, C. C. Da. (2010). Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 20, 4, 484-488.

Rosado, L.D.S., Rodrigues, H.C.A., Pinto, J.E.B.P., Custódio, T.N., Pinto, L.B.B., & Bertolucci, S.K.V.. (2009). Allelopathy of aqueous extract and essential oil of leaves from basil "Maria Bonita" on lettuce, tomato and melissa germination. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 11, 4, 422-428.

**Russo, E. M. K.; Reichelt, A. A. J.; Desa, J. R.; Furlanetto, R. P.; Moises, R. C. S.; Kasamatsu, T. S.; Chacra, A. R. (1990) Clinical trial of Myrcia uniflora and Bauhinia forficata leaf extracts in normal and diabetic patients. Braz. J. Med. Biol. Res., 23, 11.**

Sakita, M. N.; Aguiar O. T. (2006) Aguiar Triagem fitoquímica e aspectos botânicos de *Gomidesia affinis* (Camb.) Legr. E *Gomidesia spectabilis* (dc.) Berg. *Biológico*, São Paulo, 68, Suplemento, 817-820.

Saldanha, L. L. *Prospecção química e avaliação das atividades antioxidante e alelopática de Myrcia bella Cambess.* (2013) Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas (Botânica), AC: Fisiologia.

Sánchez-Moreno, C. (2002) Methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. *Food Science Technology International*, 8, 3, 121-137.

Sánchez-Vargas, F. M.; Abu-El-Haija M. A.; Gómez-Duarte O. G. (2011) *Salmonella* infections: An update on epidemiology, management, and prevention, 9, 6, 263-277.

Santiago, J. A DE. (2015) *Óleos essenciais de três espécies de myrtaceae: composição química, atividades antioxidante, hemolítica, antitumoral, antiocrotogênica e citogenotóxica.* Tese de Doutorado em Agroquímica -Universidade Federal de Lavras, Lavras.

Sartoratto A.; Machado A. L. M.; Delarmelina C.; Figueira G. M.; Duarte M. C. T.; Rehder L. G. (2004) Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 275-280.

Savaris, M.; Lampert, S.; Garcia, F. R. M.; Sabedot-Bordin, S. M.; Moura, N. F. (2012) Atividade inseticida de *Cunila angustifolia* sobre adultos de *Acanthoscelides obtectus* em laboratório. *Ciência e Tecnologia*, 5, 1, 1-5.

Scherer, R. Wagner, R. Duarte, M.C.T., Godoy, H.T. (2009) Composition and antioxidant and antimicrobial activities of clove, citronella and palmarosa essential oil. *Revista Brasileira de Plantas medicinais*, 11, 4, 442-449.

Silva, D. P. (2007) *Estudo fitoquímico e avaliação das atividades antimicrobianas e antiparasitárias dos flavonóides isolados de Myrcia hiemalis (Myrtaceae).* Dissertação apresentada ao Colegiado de Pós-graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal da Bahia para obtenção do grau de Mestre em Química, área de Concentração em Química Orgânica.

Silva, F. C.; Duarte, L. P.; Vieira Filho, S. A. (2014) Celastráceas: Fontes de Triterpenos Pentacíclicos com Potencial Atividade Biológica. *Revista Virtual de Química*, 6, 5, 1205-1220.

- Silva, T. M.; Milbradt, E. L.; Zamae, J. C.; Andreatti, R. L. F.; Okamoto, A. S. (2016) Transferência de resistência antimicrobiana entre enterobactérias patogênicas de importância aviária – impactos em saúde pública. *Archives of Veterinary Science*, 21, 2, 09-20.
- Sixel, P.J. (1996) Aspectos gerais no preparo e no controle de qualidade de plantas e fitoterápicos hipoglicemiantes. In: BRAGANÇA, L.A.R. Plantas medicinais antidiabéticas: uma abordagem multidisciplinar. *Niterói: EDUFF*, 105-22.
- Sobral, M., Proença, C., Souza, M., Mazine, F., Lucas, E. (2015) Myrtaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro.
- Takao, A. L. K.; Imatomib M.; Gualtieria S. C. J. (2015) Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). *Braz. J. Biol.*, 75, 4, 948-952.
- Torres, A. F.; Lasmar, O.; Caravvalho, G. A.; Santa-Cecília, L. V. C.; Zanatti, R.; Oliveira, D. (2013) Atividade inseticida de extratos de plantas no controle de formiga cortadeira, em cafeeiro. *Coffee Science*, 8, 3, 371-378.
- Turina, A. Del V.; Nolan, M.V.; Zygadlo, J.A.; Perillo, M.A. (2006). Natural terpenes: Self-assembly and membrane partitioning. *Biophysical Chemistry*. 122, 101- 113.
- Ubabef. Relatório anual (2016). Brasília. Disponível em: <http://www.ubabef.com.br/>. Acesso em 7 jan. 2017.
- Van Acquire, S. A. (1996) Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. *Free Radic Biol Med.*, 20, 3, 331-342.
- Villaça, C. L. P. B. (2012) Prospecção de produtos naturais para o controle de *Ornithonyssus bursa* (berlese) (acarí: dermanyssidae). Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioprospecção Molecular da Universidade Regional do Cariri – PPBM/URCA.
- Voss-Rech, D.; Cátia Silene KleinI; Vânia Helena Techio; Gerson Neudi Scheuermann; Gilberto Rech; Laurimar Fiorentin (2011) Antibacterial activity of vegetal extracts against serovars of Salmonella. *Cienc. Rural*, 41, 2, 314-320.

Voss-Rech, D.; Klein, C. S.; Techio, C. H.; Scheuermann, G. N.; Rech, G.; Fiorentin, L. (2011) Antibacterial activity of vegetal extracts against serovars of Salmonella. *Ciência Rural*, 41, 2, 314-320.

Weber, L. D.; Pinto, F.G.S.; Scur, M.C.; Souza, J.G.L.; Costa, W.F.; Leite, C.W. (2014) Chemical composition and antimicrobial and antioxidante activity of essential oil and various plant extrates from *Prumus myrtifolia*. *African Journal of Agricultural Research*, 9, 846-853.

Wilson, P.G. (2011) Myrtaceae. In: K. Kubitzki (ed.). Flowering plants. Eudicots: The families and genera of vascular plants. *Springer, Berlin, Heidelberg*, 10, 212-271

**Tabela 1.** Classes de metabólitos secundários identificados nos extratos de *M. oblongata*

Classes de Metabólitos	Extratos de <i>M. oblongata</i>					
	Aquoso	EtOH	MeOH	AcEt.	AcOH	Hex
Saponinas	+	-	-	-	-	-
Esteróides	-	-	-	+	+	+
Triterpenóides	-	+	+	+	+	+
Alcalóides	-	-	-	-	-	+
Taninos	+	-	-	+	+	+
Cumarinas	-	-	-	-	-	-
Antocianinas	-	-	-	-	-	-
Flavonóides	-	-	-	+	-	+

+ Presença do composto; - ausência do composto.

**Tabela 2.** Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos extratos vegetais de *M. oblongata* frente a microrganismos padrões

Microrganismos	Extratos CIM/CBM				
	Hexano	Metanol	Etanol	Acetato de etila	Acetona
<b>Gram-negativos</b>					
<i>E. coli</i>	50/100	50/50	100/100	50/100	6,25/25
<i>P. aeruginosa</i>	25/100	25/100	50/100	100/100	12,5/100
<i>P. mirabilis</i>	25/50	100/—	25/100	50/200	1,5625/25
<i>K. pneumoniae</i>	50/100	12,5/25	12,5/100	12,5/50	12,5/100
<i>S. Enteritidis</i>	50/200	50/—	50/100	6,25/50	25/100
<i>S. Gallinarum</i>	50/100	50/100	100/200	50/100	100/200
<b>Gram-positivas</b>					
<i>S. epidermidis</i>	12,5/50	12,5/12,5	6,25/25	6,25/25	3,125/12,5
<i>S. aureus</i>	25/50	12,5/50	12,5/50	3,125/50	6,25/12,5
<i>E. faecalis</i>	25/100	6,25/50	50/100	3,125/25	3,125/12,5
<i>B. subtilis</i>	25/50	25/100	50/100	25/25	12,5/25
<b>Levedura</b>					
<i>C. albicans</i>	12,5/25	50/100	100/100	25/100	25/100

Alta – < 12,5 mg.mL<sup>-1</sup>; Moderada - 12,5 a 25 mg.mL<sup>-1</sup>; baixa - 50 a 100 mg.mL<sup>-1</sup>; muito baixa - > 100 mg.mL<sup>-1</sup>.

**Tabela 3.** Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos vegetais e óleo essencial de *M. oblongata* frente a diferentes sorotipos de *Salmonella* spp

Microrganismos	Extratos CIM/CBM					
	Hexano	Metanol	Etanol	Acetato de etila	Acetona	OE
<i>S. Albany</i>	12,5/50	100/100	50/100	25/50	50/100	3,500/7000
<i>S. Braenderup</i>	6,25/50	50/200	12,5/100	3,125/50	25/50	3,500/7000
<i>S. Gafsa</i>	12,5/100	100/200	50/100	25/200	12,5/100	1,750/3,500
<i>S. Heidelberg</i>	12,5/50	12,5/100	25/100	12,5/50	12,5/50	3,500/7000
<i>S. Idikan</i>	6,25/100	100/—	100/100	6,25/100	25/200	1,750/3,500
<i>S. Lexington</i>	12,5/200	100/100	100/100	50/200	25/100	437,5/3,500
<i>S. Livingstone</i>	25/100	100/200	50/200	6,25/50	25/100	3,500/3,500
<i>S. Montevideo</i>	12,5/100	100/100	100/200	12,5/100	12,5/100	3,500/—
<i>S. SaintPaul</i>	6,25/25	50/100	100/200	1,5625/25	6,25/100	875/1,750

S. Senftenberg	12,5/100	25/100	25/100	12,5/50	100/50	3,500/7000
----------------	----------	--------	--------	---------	--------	------------

Atividade dos extratos variam de: 200 mg.mL<sup>-1</sup> a 0,0976 mg.mL<sup>-1</sup>. Atividade Alta - < 12,5 mg.mL<sup>-1</sup>; Moderada - 12,5 a 25 mg.mL<sup>-1</sup>; baixa - 50 a 100 mg.mL<sup>-1</sup>; muito baixa - > 100 mg.mL<sup>-1</sup>. Atividade do óleo essencial - baixa: 7000 a 3500; moderada: 1700 a 875; alta: 437,5 a 218,75; muito alta: < 109,375. Não houve atividade para os extratos aquosos.

**Tabela 4.** Índice de DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil) (% de sequestro) e IC50 em diferentes extratos de *M. oblongata*

Solução teste	Média ± desvio padrão	% sequestro DPPH	IC50
Controle positivo BHT	0,4070 ± 0,44 a	93,77%	6,18
Hexano	0,2672 ± 0,1 a b	90,18%	9,37
Acetato de etila	0,4260 ± 0,42 a b c	84,14%	14,13
Acetona	0,5824 ± 0,19 c	76,26%	19,17

Valores seguidos da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Tukey.

**Tabela 5.** Mortalidade média (%) causada pelo óleo essencial e extratos vegetais de *M. oblongata* sobre larvas de *A. diaperinus*

Extratos / óleo essencial	Concentrações				Testemunha	p-valor
	1,25%	2,5%	5%	10%		
Acetato de etila	87bC	86bC	83cC	95aC	0	< 0,0001
Acetona	17,20dE	74bE	82aE	66cE	0	< 0,0001
Metanólico	70cC	90bC	90bC	96aC	0	< 0,0001
Etanólico	16bD	98aD	100aD	100aD	0	< 0,0001
Hexânico	96aA	97aA	99aA	99aA	0	< 0,0001
Óleo essencial	81bB	100aB	100aB	100aB	0	0,0923
p-valor	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001		
CV (%)						<b>3,14</b>

Letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $\alpha = 0,05\%$ ); CV: coeficiente de variação; Média de mortalidade em porcentagem.

**Tabela 6.** Mortalidade média (%) causada pelo óleo essencial e extratos vegetais de *M. oblongata* sobre adultos de *A. diaperinus*

Extratos / óleo essencial	Concentrações				Testemunha	p-valor
	1,25%	2,5%	5%	10%		
Acetato de etila	8bB	19aB	21aB	29aB	0	0,0350
Acetona	0bB	2bB	5bB	19aB	0	0,0373
Metanólico	9bB	15bB	22aB	33aB	0	0,0073
Etanólico	3aC	1aC	2aC	3aC	0	0,9909
Hexânico	1cB	5cB	16bB	31aB	0	0,0002
Óleo essencial	87aA	87aA	96aA	100aA	0	0,1710
p-valor	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001		
CV (%)						<b>58,76</b>

Letras minúsculas na linha e maiúsculas na coluna diferem entre si pelo teste de Scott-Knott ( $\alpha = 0,05\%$ ); CV: coeficiente de variação; Média de mortalidade em porcentagem.

**Anexo 1: Normas para submissão do primeiro artigo: Brazilian Journal of Biology**

ISSN 1519-6984 *versão impressa*

ISSN 1678-4375 *versão online*

**Finalidade e normas gerais** O Brazilian Journal of Biology publica resultados de pesquisa original em qualquer ramo das ciências biológicas. Estará sendo estimulada a publicação de trabalhos nas áreas de biologia celular, sistemática, ecologia (auto-ecologia e sinecologia) e biologia evolutiva, e que abordem problemas da região neotropical. A revista publica somente artigos em inglês. Artigos de revisões de temas gerais também serão publicados desde que previamente propostos e aprovados pela Comissão Editorial.

**Informações Gerais:** Os originais deverão ser enviados à Comissão Editorial e estar de acordo com as Instruções aos Autores, trabalhos que não se enquadrem nesses moldes serão imediatamente devolvidos ao (s) autor (es) para reformulação. Os trabalhos que estejam de acordo com as Instruções aos Autores, serão enviados aos assessores científicos, indicados pela Comissão Editorial. Em cada caso, o parecer será transmitido anonimamente aos autores. Em caso de recomendação desfavorável por parte de um assessor, será usualmente pedida a opinião de um outro. Os trabalhos serão publicados na ordem de aceitação pela Comissão Editorial, e não de seu recebimento. Os artigos aceitos para a publicação se tornam propriedade da revista. O trabalho a ser considerado para publicação deve obedecer às seguintes recomendações gerais: Ser digitado e impresso em um só lado do papel tipo A4 e em espaço duplo com uma margem de 3 cm à esquerda e 2 cm à direita, sem preocupação de que as linhas terminem alinhadas e sem dividir palavras no final da linha. Palavras a serem impressas em itálico podem ser sublinhadas. O título deve dar uma idéia precisa do conteúdo e ser o mais curto possível. Um título abreviado deve ser fornecido para impressão nas cabeças de página.

*Nomes dos autores* – As indicações Júnior, Filho, Neto, Sobrinho etc. devem ser sempre antecedidas por um hífen. Exemplo: J. Pereira-Neto. Usar também hífen para nomes compostos (exemplos: C. Azevedo-Ramos, M. L. López-Rulf). Os nomes dos autores devem constar sempre na sua ordem correta, sem inversões. Não usar nunca, como autor ou co-autor nomes como Pereira-Neto J. Usar *e, y, and, et* em vez de & para ligar o último co-autor aos antecedentes. Os trabalhos devem ser redigidos de forma concisa, com a exatidão e a clareza necessárias para sua fiel compreensão. Sua redação deve ser definitiva a fim de evitar modificações nas provas de impressão, muito onerosas e cujo pagamento ficará sempre a cargo do autor. Os trabalhos (incluindo ilustração e tabelas) devem ser submetidos através da interface de administração do sistema “Submission da SciELO” cujo endereço [www.scielo.br/bjb](http://www.scielo.br/bjb) (SUBMISSÃO - ONLINE).

Serão considerados para publicação apenas os artigos redigidos em inglês. Todos os trabalhos deverão ter resumos em inglês e português. Esses resumos deverão constar no início do trabalho e iniciar com o título traduzido para o idioma correspondente. O Abstract e o Resumo devem conter as mesmas informações e sempre sumariar resultados e conclusões. Em linhas gerais, as diferentes partes dos artigos devem ter a seguinte seriação: 1ª página – Título do trabalho. Nome(s) do(s) autor(es). Instituição ou instituições, com endereço. Indicação do número de figuras existentes no trabalho. Palavras-chave em português e inglês (no máximo 5). Título abreviado para cabeça das páginas. Rodapé: nome do autor correspondente e endereço atual (se for o caso). 2ª página e seguintes – Abstract (sem título). Resumo: em português (com título); Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos. Em separado - Referências, Legendas das figuras, Tabelas e Figuras. O trabalho a ser considerado para publicação deve obedecer às seguintes recomendações gerais: Ser digitado e impresso em um só lado do papel tipo A4 e em espaço duplo com uma margem de 3 cm à esquerda e 2 cm à direita, sem preocupação de que as linhas terminem alinhadas e sem dividir palavras no final da

linha. Palavras a serem impressas em itálico podem ser sublinhadas. O título deve dar uma idéia precisa do conteúdo e ser o mais curto possível. Um título abreviado deve ser fornecido para impressão nas cabeças de página.

*Nomes dos autores* – As indicações Júnior, Filho, Neto, Sobrinho etc. devem ser sempre antecedidas por um hífen. Exemplo: J. Pereira-Neto. Usar também hífen para nomes compostos (exemplos: C. Azevedo-Ramos, M. L. López-Rulf). Os nomes dos autores devem constar sempre na sua ordem correta, sem inversões. Não usar nunca, como autor ou co-autor nomes como Pereira-Neto J. Usar *e, y, and, et* em vez de & para ligar o último co-autor aos antecedentes. Os trabalhos devem ser redigidos de forma concisa, com a exatidão e a clareza necessárias para sua fiel compreensão. Sua redação deve ser definitiva a fim de evitar modificações nas provas de impressão, muito onerosas e cujo pagamento ficará sempre a cargo do autor. Os trabalhos (incluindo ilustração e tabelas) devem ser submetidos através da interface de administração do sistema “Submission da SciELO” cujo endereço [www.scielo.br/bjb](http://www.scielo.br/bjb) (SUBMISSÃO - ONLINE). Serão considerados para publicação apenas os artigos redigidos em inglês. Todos os trabalhos deverão ter resumos em inglês e português. Esses resumos deverão constar no início do trabalho e iniciar com o título traduzido para o idioma correspondente. O Abstract e o Resumo devem conter as mesmas informações e sempre resumir resultados e conclusões. Em linhas gerais, as diferentes partes dos artigos devem ter a seguinte seriação: 1ª página – Título do trabalho. Nome(s) do(s) autor(es). Instituição ou instituições, com endereço. Indicação do número de figuras existentes no trabalho. Palavras-chave em português e inglês (no máximo 5). Título abreviado para cabeça das páginas. Rodapé: nome do autor correspondente e endereço atual (se for o caso). 2ª página e seguintes – Abstract (sem título). Resumo: em português (com título); Introdução, Material e Métodos, Resultados, Discussão, Agradecimentos. Em separado - Referências, Legendas das figuras, Tabelas e Figuras. As seguintes informações devem acompanhar todas as espécies citadas no artigo:

- Para zoologia, o nome do autor e da data de publicação da descrição original deve ser dada a primeira vez que a espécie é citada nos trabalhos:

- Para botânica e ecologia, somente o nome do autor que fez a descrição deve ser dada a primeira vez que a espécie é citada nos trabalhos. O trabalho deverá ter, *no máximo*, 25 páginas, incluindo tabelas e figuras, em caso de Notes and Comments limitar-se a 4 páginas. A seriação dos itens de Introdução e Agradecimentos só se aplicam, obviamente, a trabalhos capazes de adotá-la. Os demais artigos (como os de Sistemática) devem ser redigidos de acordo com critérios geralmente aceitos na área.

**Referências Bibliográficas:** 1. Citação no texto: Use o nome e o ano de publicação: Reis (1980); (Reis, 1980); (Zaluar and Rocha, 2000); Zaluar and Rocha (2000). Se houver mais de dois autores, usar “et al.” 2. Citações na lista de referências devem estar em conformidade com a norma *ISO 690/2010*. No texto, será usado o sistema autor-ano para citações bibliográficas (estritamente o necessário), utilizando-se “and” no caso de 2 autores. As referências, digitadas em folha separada, devem constar em ordem alfabética. Nas referências de artigos de periódicos deverão conter nome (s) e iniciais do (s) autor(es), ano, título por extenso, nome da revista (por extenso e em itálico), volume, número, primeira e última páginas. Referências de livros e monografias deverão também incluir a editora e, conforme citação, referir o capítulo do livro. Deve (m) também ser referido (s) nome(s) do(s) organizador(es) da coletânea.

Exemplos: Livro: LOMINADZE, D.G., 1981. *Cyclotron waves in plasma*. 2nd ed. Oxford: Pergamon Press. 206 p. International series in natural philosophy, no. 3.

Capítulo de livro: WRIGLEY, E.A., 1968. Parish registers and the historian. In: D. J. STEEL, ed. *National index of parish registers*. London: Society of Genealogists, pp. 15- 167.

Artigo de periódico: CYRINO, J.E. and MULVANEY, D.R., 1999. Mitogenic activity of fetal bovine serum, fish fry extract, insulin-like growth factor-I, and fibroblast growth factor on brown bullhead catfish cells--BB line. *Revista Brasileira de Biologia* =

*Brazilian Journal of Biology*, vol. 59, no. 3, pp. 517- 525. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-71081999000300017>. PMID: 10765463.

Dissertação ou tese: LIMA, P.R.S., 2004. *Dinâmica populacional da Serra Scomberomorus brasiliensis (Osteichthyes; Scombridae), no litoral ocidental do Maranhã-Brasil*. Recife: Universidade Federal Rural de Pernambuco, 45 p. Dissertação de Mestrado em Recursos Pesqueiros e Aquicultura.

Trabalho apresentado em evento: RANDALL, D.J., HUNG, C.Y. and POON, W.L., 2004. Response of aquatic vertebrates to hypoxia. In: *Proceedings of the Eighth International Symposium on Fish Physiology, Toxicology and Water Quality*, October 12-14, Chongqing, China. Athens, Georgia, USA: EPA, 2006, pp. 1-10.

Referência disponível online: AGÊNCIA NACIONAL DE ÁGUAS – ANA, 2013 [viewed 4 February 2013]. *Hidro Web: Sistema de Informações hidrológicas* [online]. Available from: <http://hidroweb.ana.gov.br/>

A Revista publicará um Índice inteiramente em inglês, para uso das revistas internacionais de referência. As provas serão enviadas aos autores para uma revisão final (restrita a erros e composição) e deverão ser devolvidas imediatamente. As provas que não forem devolvidas no tempo solicitado - 5 dias - terão sua publicação postergada para uma próxima oportunidade, dependendo de espaço.

*Material Ilustrativo* – Os autores deverão limitar as tabelas e as figuras (ambas numeradas em arábicos) ao **estritamente necessário**. No texto do manuscrito, o autor indicará os locais onde elas deverão ser intercaladas. As tabelas deverão ter seu próprio título e, em rodapé, as demais informações explicativas. Símbolos e abreviaturas devem ser definidos no texto principal e/ou legendas. Na preparação do material ilustrativo e das tabelas, deve-se ter em mente o tamanho da página útil da REVISTA (22 cm x 15,0 cm); (coluna: 7 cm) e a idéia de conservar o sentido vertical. Desenhos e fotografias exageradamente grandes poderão perder muito em nitidez

quando forem reduzidos às dimensões da página útil. As pranchas deverão ter no máximo 30 cm de altura por 25 cm de largura e incluir barra (s) de calibração. As ilustrações devem ser agrupadas, sempre que possível. A Comissão Editorial reserva-se o direito de dispor esse material do modo mais econômico, sem prejudicar sua apresentação. *Disquete* – Os autores são encorajados a enviar a versão final (e somente a final), já aceita, de seus manuscritos em disquete. Textos devem ser preparados em Word for Windows e acompanhados de uma cópia idêntica em papel.

**Recomendações Finais:** Antes de remeter seu trabalho, preparado de acordo com as instruções anteriores, deve o autor relê-lo cuidadosamente, dando atenção aos seguintes itens: correção gramatical, correção datilográfica (apenas uma leitura sílaba por sílaba a garantirá), correspondência entre os trabalhos citados no texto e os referidos na bibliografia, tabelas e figuras em arábicos, correspondência entre os números de tabelas e figuras citadas no texto e os referidos em cada um e posição correta das legendas.

## **Anexo 2: Normas da revista Medical and Veterinary Entomology**

### **Diretrizes do autor**

A entomologia médica e veterinária aceita a submissão de manuscritos em três categorias:

Artigos Originais

Comunicações curtas

Revisão

Os artigos originais devem conter informações originais relevantes para a revista (ver Declaração de Objetivos e Escopo) que não tenham sido publicadas anteriormente. Estas contribuições não devem conter mais de 6000 palavras no corpo (isto é, excluindo referências e informações suplementares). Apenas as referências mais pertinentes devem ser citadas e não devem normalmente exceder 30.

As comunicações curtas devem também conter informações originais relevantes para a revista, mas que são mais concisas, contendo um máximo de 15 referências e não devem conter mais de 3000 palavras; Eles não precisam ter a estrutura formal de documentos completos, mas devem fornecer métodos suficientes e dados necessários para a sua compreensão. Comunicações curtas não devem ter mais de duas tabelas e figuras. Trabalhos incompletos ou preliminares não serão considerados.

As revisões devem ser análises autorizativas de estudos recentes, revisados por pares, que tratam de assuntos atuais que são relevantes para a revista. As revisões são normalmente solicitadas pelos Editores / Conselho Editorial, mas as propostas não solicitadas serão consideradas se consideradas adequadas pelos Editores. Recomenda-se que os autores enviem um e-mail perguntando sobre a adequação de sua revisão antes da submissão. As resenhas não devem exceder 5.000 palavras (excluindo tabelas, figuras de legendas abstratas ou referências).

A submissão à Entomologia Médica e Veterinária é inteiramente on-line através de Manuscritos ScholarOne ([mc.manuscriptcentral.com/mve](http://mc.manuscriptcentral.com/mve)). Os autores receberão orientação online, passo a passo durante todo o processo de submissão do manuscrito. Os autores deverão selecionar uma classificação para a sua submissão (Médico ou Veterinário, com base no conteúdo principal do manuscrito), bem como uma designação de categoria (Artigo Original, Comunicação Breve, etc.). As provas eletrônicas em PDF serão geradas automaticamente a partir de arquivos carregados e precisarão ser revisadas e aprovadas pelo autor antes de o envio estar completo.

Os autores serão convidados a recomendar até 3 revisores (com endereços de e-mail) que eles se sentem qualificados para avaliar a sua apresentação. Não sugira revisores que o (s) autor (es) tenha publicado nos últimos três anos. A provisão dos nomes não implica que eles serão definitivamente usados como revisores. Os autores também serão convidados a fornecer os nomes dos indivíduos que preferem não serem escolhidos como revisores.

Submissão de um artigo é entendido para implicar que o artigo é original e não está sendo considerado para publicação em outro lugar. Submissão também implica que todos os autores tenham aprovado o manuscrito para a liberação e estão de acordo com o seu conteúdo. Após a aceitação do artigo pela revista, o (s) autor (es) será solicitado (s) a transferir os direitos autorais do artigo para o Editor. Esta transferência assegurará a maior difusão possível de informações.

Todos os autores deveriam ter feito contribuições substanciais para: (1) a concepção e desenho do estudo, ou aquisição de dados, ou análise e interpretação de dados, (2) redigir o manuscrito ou revisá-lo criticamente para conteúdo intelectual importante, (3) aprovação final da versão a ser submetida. Os autores devem verificar um número recente da revista e formatar o manuscrito de modo que este se conforme ao estilo da revista. Submissões formatadas incorretamente serão devolvidas ao autor correspondente pelo administrador. Os autores cuja língua materna não é o Inglês são fortemente solicitados a ter seus manuscritos verificados por um colega de língua inglesa ou por qualquer empresa que pode fornecer inglês e serviços de copyediting antes da apresentação.

As comunicações originais devem incluir as seguintes seções:

Página de título - com o título, uma lista de autores e suas afiliações, um cabeçalho (versão curta do título)

O título deve ser conciso com um nome comum do (s) organismo (s) sujeito (s)

Não inclua Ordem: Família ou Autoridade no título

Resumo - contendo o (s) objetivo (s) da pesquisa, procedimentos básicos, principais achados e principais conclusões. Não exceder 200 palavras.

Na primeira utilização de um taxon indicar Ordem: Família e da Autoridade

Não repita essas informações no texto principal

Informações de Autor Correspondentes - incluindo endereço completo, números de telefone e fax, bem como um endereço de e-mail.

**Palavras-chave** - até 10 palavras-chave não incluídas no título. Os nomes taxonômicos devem ser listados primeiro (em ordem alfabética), seguidos por outras palavras (por ordem alfabética).

Corpo de manuscrito deve ser organizado no seguinte:

### **Introdução**

Por favor, indique claramente a razão para a pesquisa e os principais objetivos do artigo Colocar a pesquisa no contexto da literatura anterior

### **Material e métodos**

A descrição do equipamento e dos procedimentos deve ser concisa mas completa o suficiente para que o leitor possa repetir a pesquisa.

Identificar equipamentos e produtos químicos / farmacêuticos com o nome do fabricante ou fornecedor, cidade e país.

Descrever métodos estatísticos com detalhes suficientes para permitir que o leitor tenha acesso aos dados originais para verificar os resultados relatados.

### **Resultados**

Os meios devem ser sempre acompanhados por uma medida de variância (SE, SD ou intervalos de confiança de 95%) eo tamanho da amostra ( $n$ ); medianas devem ser seguidas pela faixa ou intervalo interquartil.

### **Discussão**

Não repita os resultados, mas discuta os achados em relação a outras publicações.

Agradecimentos

Referências

Estilo de Harvard. As referências devem ser citadas no texto por autor e data, *eg*, (Dangl et al., 1989, Steeves & Sussex, 1989, Bloggs, 1990a, b).

Ashford, AE (1998) Sistemas dinâmicos de vacúolos pleiomórficos: são endossomas e compartimentos de transporte em hifas fúngicas? *Título do Jornal em Full*, 28, 119-159.

Causton, B. (1984) A escolha de resinas para imunocitoquímica de elétrons. *Immunolabelling for Electron Microscopy* (editado por JM Polak e IM Varndell), pp. 29-36. Elsevier, Amsterdam.

Smith, B. (1984) Título do capítulo. *Título do livro*, pp. 29-36. Editor, Cidade. Fischer-Parton, S. (1999) *Papel do tráfico de pH, cálcio e vesículas na regulação do crescimento da ponta de hifas de Neurospora crassa*. Dissertação de Mestrado, Universidade de Edimburgo.

Littlefield, LJ e Heath, MC (1979) *Ultrastructure of Rust Fungi*. Academic Press, Nova Iorque.

## **Tabelas**

A redução de tabelas grandes e / ou a inclusão desses dados em arquivos suplementares devem ser consideradas. Inversão de colunas e linhas, muitas vezes, reduzir as dimensões de uma tabela.

Se uma grande quantidade de dados devem ser apresentados, uma tentativa deve ser feita para dividi-los sobre duas ou mais tabelas.

As tabelas devem ser numeradas de acordo com a sequência em que são referidas no texto. Cada tabela deve ser apresentada como uma página separada do manuscrito e nunca deve ser incorporada no texto.

As tabelas devem ter um título conciso que permita ao leitor interpretar o conteúdo sem referência ao texto manuscrito.

Cabeçalhos de coluna e linha devem ser concisos. As abreviaturas padrão das unidades de medida devem ser acrescentadas entre parênteses.

As linhas verticais não devem ser usadas para separar colunas. Deixe um espaço extra entre as colunas.

Explicações adicionais cruciais para a compreensão dos dados devem ser dadas como notas de rodapé na parte inferior da tabela.

## **Figura Legends**

As legendas devem estar isoladas com todas as informações relevantes que permitam ao leitor interpretar as informações sem referência ao texto.

## **Figuras**

Todas as figuras, sejam desenhos em linha ou fotografias devem ser enviadas como arquivos separados, de preferência em formato TIFF ou EPS.

A resolução deve ser de, no mínimo, 300 dpi (consulte as seguintes informações sobre a preparação de obras de arte eletrônicas).

As figuras devem ser numeradas de acordo com a sequência em que são referidas no texto.

Rotulagem em figuras deve ser grande o suficiente para ser claro mesmo com redução de tamanho para impressão. Todas as letras devem estar em inglês. Use o mesmo tipo de letra por toda parte e siga o estilo do diário.

Quando necessário, uma escala deve ser dada como uma barra na Figura para que não haja mudança com redução.

As ilustrações coloridas só podem ser incluídas na impressão se o custo adicional de reprodução for contribuído pelo autor: você receberia informações sobre os custos de Wiley após o recebimento do seu artigo aceito.

### **As Comunicações Curtas devem conter as seguintes seções:**

Página de título - com o título, uma lista de autores e suas afiliações, um cabeçalho (versão curta do título)

Resumo - contendo o (s) objetivo (s) da pesquisa, procedimentos básicos, principais achados e principais conclusões. Não exceder 200 palavras.

Corpo de manuscrito - deve conter todos os materiais e métodos (ver acima), os resultados e discussão do significado dos resultados

Referências - ver acima

Tabelas - Máximo de dois

Figuras - Máximo de dois

### **Conflito de interesses**

*Entomologia Médica e Veterinária* exige que todos os autores divulguem quaisquer potenciais fontes de conflito de interesse. Qualquer interesse ou relacionamento, financeiro ou de outra natureza, que possa ser percebido como influenciando a objetividade de um autor é considerado uma fonte potencial de conflitos de interesses. Estes devem ser revelados quando diretamente relevantes ou indiretamente relacionados com o trabalho que os autores descrevem em seu manuscrito. As fontes potenciais de conflitos de interesses incluem, mas não se limitam a, propriedade de patentes ou ações, associação a um conselho de administração da empresa, associação a um conselho consultivo ou comitê para uma empresa e consultoria ou recebimento de honorários de orador de uma empresa. A existência de um conflito de interesses não exclui a publicação nesta revista. Se os autores não têm conflito de interesse para declarar, eles também devem declarar isso na submissão.

É responsabilidade do autor correspondente revisar esta política com todos os autores e listar, coletivamente, a carta de apresentação (se aplicável) ao Editor-Chefe, no manuscrito (nas notas de rodapé, seção Conflito de Interesses ou Agradecimentos), E no sistema de apresentação on-line TODOS os relacionamentos comerciais pertinentes e outros.

Além disso, é necessária uma declaração que confirme que não existem disputas sobre a propriedade dos dados apresentados no documento e todas as contribuições foram atribuídas apropriadamente, por coautoria ou reconhecimento, conforme apropriado à situação.

Todas as submissões a esta revista são obrigadas a cumprir as declarações acima. A critério do Editor, podem ser exigidos esclarecimentos e outros compromissos de todos os autores que apresentaram. Não obstante, a interpretação do cumprimento de todas as declarações acima deverá ser reservada aos Editores desta Revista e ao Diretor de Redação da Sociedade, cuja decisão sobre todas as questões relacionadas e decorrentes das declarações acima será final.

### **Diretrizes Éticas**

A revista espera que os autores respeitem as diretrizes desses órgãos estatutários ou disciplina específica do país de origem ou a execução da pesquisa.

### **Visão geral**

*Entomologia Médica e Veterinária* é coberta pelo serviço Early View da Wiley. Os artigos da Early View são artigos completos em texto integral publicados on-line antes da publicação em uma edição impressa. Os artigos estão, portanto, disponíveis assim que estiverem prontos, ao invés de ter que esperar pela próxima edição de impressão programada. Early View artigos estão completos e final. Eles foram totalmente revistos, revisados e editados para publicação, e as correções finais dos autores foram incorporadas. Como eles estão na forma final, nenhuma alteração pode ser feita após a publicação on-line. A natureza dos artigos do Early View significa que eles ainda não têm números de volume, emissão ou página, portanto os artigos do Early View não podem ser citados da maneira tradicional. Eles são, portanto, dado um Digital Object Identifier (DOI), que permite que o artigo a ser citado e acompanhado antes de ser atribuído a um problema. Após a publicação impressa, o DOI permanece válido e pode continuar a ser usado para citar e acessar o artigo. Mais informações sobre as DOIs podem ser encontradas em: <http://www.doi.org/faq.html>

## **Offprints**

Acesso livre ao PDF final offprint ou seu artigo estará disponível somente através de Serviços de Autor. Por favor, inscreva-se para serviços de autor se você gostaria de acessar o seu artigo PDF offprint e desfrutar de muitos outros benefícios do serviço oferecido.

## **Direito autoral**

Se seu trabalho for aceito, o autor identificado como o autor correspondente formal para o trabalho receberá um e-mail solicitando-lhes para fazer login em Serviços de Autor; Onde através do Wiley Author Licensing Service (WALS), eles serão capazes de completar o contrato de licenças em nome de todos os autores no papel.

### **Para autores que assinam o contrato de transferência de direitos autorais**

Se a opção OnlineOpen não estiver selecionada, o autor correspondente será apresentado com o contrato de transferência de direitos autorais (CTA) para assinar. Os termos e condições do CTA podem ser visualizados nas amostras associadas às Perguntas Frequentes de Copyright abaixo:

CTA Termos e Condições [http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-\\_301.html](http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html)

### **Para autores que escolhem OnlineOpen**

Se a opção OnlineOpen estiver selecionada, o autor correspondente terá uma escolha das seguintes Licenças Creative Commons: Open Access Agreements (OAA):

Licença Creative Commons Attribution License OAA Licença

Creative Commons Atribuição Não-Comercial OAA

Licença Creative Commons Atribuição-Não-comercial-ODN Licença OAA

Para visualizar os termos e condições deste acordo de acesso aberto, visite as FAQ de direitos autorais hospedadas no Wiley Author Services [http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-\\_301.html](http://exchanges.wiley.com/authors/faqs---copyright-_301.html) e visite <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright-Licença.html>.

Se você selecionar a opção OnlineOpen e sua pesquisa for financiada por alguns financiadores [por exemplo, The Wellcome Trust e membros do Research Councils UK (RCUK) ou do Austrian Science Fund (FWF)], você terá a oportunidade de publicar seu artigo sob um CC-BY que o apoia no cumprimento dos requisitos do seu Funder. Para obter mais informações sobre essa política e sobre a política de auto-arquivamento do

Journal, visite: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

### **OnlineOpen**

OnlineOpen está disponível para autores de artigos que desejam tornar seu artigo acesso aberto. Com o OnlineOpen, o autor, sua agência de financiamento ou instituição paga uma taxa para garantir que o artigo seja disponibilizado a não-assinantes após a publicação via Wiley Online Library, bem como depositado nos sites espelhados PubMed Central e PMC. Além da publicação on-line via Wiley Online Library, os autores de artigos OnlineOpen são autorizados a publicar o PDF final e publicado de seu artigo em um site, repositório institucional ou outro servidor público gratuito, imediatamente após a publicação. Se você quiser que seu artigo seja de acesso aberto, escolha o contrato de licença apropriado quando fizer login no sistema de serviços de autor da Wiley. Clique em "Criar meu artigo OnlineOpen" e escolha a licença apropriada clicando em "Assinar contrato de licença agora" quando fizer login no sistema de serviços de autor da Wiley.

### **Nota aos donatários do NIH**

De acordo com o mandato do NIH, Wiley Blackwell publicará a versão aceita das contribuições escritas pelos bolsistas do NIH para o PubMed Central após a aceitação. Esta versão aceita será disponibilizada publicamente 12 meses após a publicação. Para obter mais informações, consulte [www.wiley.com/go/nihmandate](http://www.wiley.com/go/nihmandate)

### **Política de arquivamento do material do autor**

Observe que, a menos que solicitado especificamente, a Wiley Blackwell descartará todo o material impresso ou eletrônico enviado 2 meses após a publicação. Se você solicitar a devolução de qualquer material enviado, por favor informe o Escritório Editorial ou Editor de Produção o mais rápido possível se ainda não o fez.

### **Formulários de Contrato de Trabalho de Cores**

É a política da *Medicina e Veterinária Entomologia* para os autores a pagar o custo total para a reprodução de impressão de sua arte colorida. A arte da cor será publicada on-line gratuitamente. Portanto, observe que se houver trabalhos de cor em seu manuscrito quando ele for aceito para publicação, o Wiley Blackwell exigirá que você preencha e envie um antes que seu artigo possa ser publicado. Este formulário pode ser baixado como um PDF \* da internet. Se você não conseguir acessar a Internet ou não conseguir baixar o formulário, entre em contato

com o Editor de Produção em: [mve@wiley.com](mailto:mve@wiley.com) e eles poderão enviar por e-mail ou FAX um formulário para você.

Por favor, envie ou envie todas as páginas do seu formulário preenchido para o Serviço de Atendimento ao Cliente. Tenha em atenção que as cópias electrónicas ou por fax não podem ser aceites em conformidade com os requisitos do PCI DSS (Payment Data Industry Standard). Uma vez preenchido, por favor devolva o formulário original ao Serviço de Atendimento ao cliente no endereço abaixo:

### **Serviços ao Cliente (OPI)**

John Wiley & Sons Ltd, Centro Europeu de Distribuição

New Era Estate

Oldlands Way

Bognor Regis

West Sussex

PO22 9NQ

Qualquer artigo recebido por Wiley Blackwell sem trabalho em cores não será publicado até que o formulário tenha sido devolvido. Para consultas, entre em contato com o editor de produção da revista.

\* Para ler arquivos PDF, você deve ter o Acrobat Reader instalado no seu computador. Se você não tem este programa, isso está disponível como um download gratuito no seguinte endereço da web: <http://www.adobe.com/products/acrobat/readstep2.html>. Por favor, note que este link para um site externo. A revista não se responsabiliza pelo conteúdo de sites externos.

### **Preparação de obras de arte eletrônicas**

Uma vez que seu manuscrito tenha sido aceito, gostaríamos de receber sua arte. Por favor, prepare seus números de acordo com as Diretrizes de Arte Eletrônica do editor.

Crie arquivos EPS para imagens contendo lineart. Arquivos EPS devem ser salvos com fontes incorporadas (e com uma visualização TIFF se possível). Os seguintes pacotes podem ser usados para criar arquivos EPS: Adobe Illustrator 7.0 e superior, Deneba Canvas 6.0 e superior, CorelDRAW 7.0 e superior, SigmaPlot 8.01 e superior. Outros programas também podem ser capazes de criar arquivos EPS - use as funções SAVE AS ou

EXPORT. Os arquivos EPS podem ser produzidos a partir de outras aplicações (por exemplo, PowerPoint, Excel), mas os resultados podem ser imprevisíveis (por exemplo, fontes e sombreamento não convertidos corretamente, linhas em falta, linhas pontilhadas se tornando sólidas).

Crie imagens de arquivos TIFF contendo meias-tons / fotografias. Para imagens digitalizadas, a resolução de varredura (no tamanho final da imagem, veja acima para um guia de tamanhos) deve ser a seguinte para garantir uma reprodução adequada: lineart, > 800 dpi; Meias-tons, > 300 dpi Figuras contendo imagens de meio-tom e linha, > 600 dpi Os seguintes programas podem ser usados para criar arquivos TIFF: Adobe Photoshop 4.0 e superior, Adobe Illustrator 9.0 e GraphPad Prism 3. Outros programas também podem ser capazes de Criar arquivos TIFF - use as funções SAVE AS ou EXPORT.

Imagens em preto e branco devem ser fornecidas como 'escala de cinza'; As imagens em cores devem ser fornecidas como CMYK.

As figuras múltiplas devem ser fornecidas no layout final em um arquivo, rotulado como (A), (B), etc.

Forneça números no tamanho final largura, se possível: 19 picas (única coluna) ou 40 picas (coluna dupla).

Use sans serif, fontes de tipo verdadeiro para rótulos, se possível, preferencialmente Arial ou Helvetica, ou Times (New) Roman, se forem necessárias fontes serif.

Certifique-se de que todas as linhas e letras estão claras. O autor correspondente receberá um alerta por e-mail contendo um link para um site. Um endereço de e-mail de trabalho deve, portanto, ser fornecido para o autor correspondente. A prova pode ser baixada como um arquivo PDF (Portable Document Format) a partir deste site. O Acrobat Reader será necessário para ler este arquivo. Este software pode ser baixado (gratuitamente) no seguinte site: <http://get.adobe.com/pt/reader/>. Isso permitirá que o arquivo seja aberto, lido na tela e impresso para que qualquer correção seja adicionada. Outras instruções serão enviadas com a prova. As provas de cópia impressa serão publicadas se nenhum endereço de e-mail estiver disponível. Alterações excessivas feitas pelo autor nas provas, excluindo erros de composição, serão cobradas separadamente.

