



UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

CARLA MARIA MARIANO FERNANDEZ

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Laurus nobilis* L. (LAURACEAE)

CASCABEL

2014

CARLA MARIA MARIANO FERNANDEZ

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO
ÓLEO ESSENCIAL DE *Laurus nobilis* L. (LAURACEAE)

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas (PCF-UNIOESTE) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná – UNIOESTE Campus Cascavel, para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Ferreira da Rosa
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Viviane da Silva Lobo

CASCADEL
2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

F363a Fernandez, Carla Maria Mariano
Avaliação da composição química e atividades biológicas do óleo essencial de *Laurus nobilis* L. (Lauraceae)./ Carla Maria Mariano Fernandez. — Cascavel, 2014.
51 p.

Orientador: Prof. Dr. Maurício Ferreira da Rosa
Co-orientadora: Profª. Drª. Viviane da Silva Lobo
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.
Programa de Pós-graduação *Strictu Sensu* em Ciências Farmacêuticas

1. *Laurus nobilis*. 2. Óleo essencial. 3. *Rhipicephalus microplus*. 4. *Aedes aegypti*. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

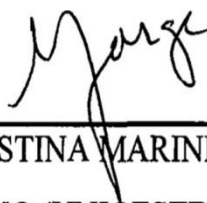
CDD 21.ed.615

FOLHA DE APROVAÇÃO

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA E APROVADA EM 05 DE DEZEMBRO DE 2014.



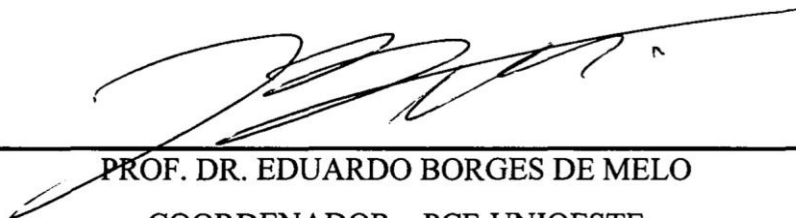
PROF. DR. MAURÍCIO FERREIRA DA ROSA
PCF-UNIOESTE (ORIENTADOR)



PROFA. DRA. TEREZA CRISTINA MARINHO JORGE
TITULAR INTERNO (UNIOESTE)



PROFA. DRA. VIVIANE DA SILVA LOBO
TITULAR EXTERNO (UTFPR)



PROF. DR. EDUARDO BORGES DE MELO
COORDENADOR PCF-UNIOESTE

AGRADECIMENTOS

Á Deus, pai misericordioso, que permitiu que tudo isso acontecesse e que me acompanha em todos os momentos.

Aos meus Pais, Venâncio e Josefina, pelo apoio e incentivo.

As minhas irmãs Ana Claudia e Maria Angélica, que em todos os momentos são minhas fiéis companheiras.

Ao meu marido, João Paulo, pelo apoio e incentivo.

Aos meus orientadores Prof. Dr. Maurício e Prof. Dr^a. Viviane, pela orientação e incentivo durante a realização deste trabalho.

Aos professores Zilda Cristiani Gazim (UNIPAR), Cleide Martins (UNIOESTE), Márcia Regina Simões (UNIOESTE) e José Eduardo Gonçalves (UNICESUMAR), pelo suporte oferecido na execução da parte experimental deste trabalho.

Agradeço, também à CAPES, pelo apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

A todos que direta ou indiretamente fizeram parte de minha formação.

AVALIAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DO ÓLEO ESSENCIAL DE *LAURUS NOBILIS* L. (LAURACEAE)

RESUMO

O *Laurus nobilis* L. é uma árvore pertencente à família Lauraceae, nativa da Ásia e cultivado no Sul e Sudeste do Brasil como uma planta ornamental, conhecido popularmente como louro. O óleo essencial foi extraído por hidrodestilação em aparelho de Clevenger por 2 horas. O óleo essencial foi fracionado em coluna cromatográfica para a obtenção das frações. O óleo essencial e as frações foram identificados por CG/EM. Foi mensurado o teor de compostos fenólicos do óleo essencial e das frações, e atividade antioxidante pelo método de sequestro do DPPH, atividade antimicrobiana frente as cepas: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e ATCC 70603, *Proteus mirabilis* ATCC 7002, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, as leveduras *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 20298, *Candida parapsilosis* ATCC 20019, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Cryptococcus gattii* L21/01 e *Cryptococcus neoformans* H99, e os fungos filamentosos *Aspergillus niger* IC (isolado clínico), *Aspergillus flavus* IMI 190443, *Aspergillus fumigatus* ATCC 16913 de pelo teste de difusão em ágar. Foi determinada da concentração mínima inibitória (CIM) das cepas sensíveis pelo método de diluição em caldo. E a atividade acaricida frente ao *Rhipicephalus microplus* pelo teste de imersão de fêmeas e larval, a atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* pelo teste de imersão larval. Foram identificados 20 compostos do óleo essencial com 99,01% das áreas dos picos identificados. O composto majoritário do óleo essencial foi o 1.8-cineol com 34,01%. O óleo essencial de louro apresentou 17,57µg equivalentes de ácido gálico/mg de óleo essencial de compostos fenólicos e mostrou atividade antioxidante pelo método DPPH com IC₅₀ de 15,52 mg/mL e as frações CH₂Cl₂:C₆H₁₄(8:2) 9,96 mg/mL e CH₂Cl₂:C₆H₁₄(7:3) 3,65 mg/mL. O óleo essencial e a fração CH₂Cl₂:AcOEt (9:1) mostraram atividade antibacteriana contra as bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* e atividade antifúngica contra as cepas de *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* com valores de concentração mínima inibitória (CIM) entre 10,00 e 0,31mg/mL. Em relação a atividade acaricida, o teste de imersão das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* houve redução da massa dos ovos, índice de produção de ovos e a viabilidade dos ovos foram afetados nas diferentes concentrações do óleo essencial em relação ao grupo controle. Sobre as larvas do carrapato o óleo essencial apresentou LC₅₀ de 3,52 µL/mL e LC₉₉ de 5,94 µL/mL, dentre as frações a CH₂Cl₂:AcOEt (8:2) foi a mais ativa com LC₅₀ de 0,13 µL/mL e LC₉₉ de 0,51 µL/mL E o óleo essencial apresentou sobre as larvas de *A. aegypti* LC₅₀ de 0,38 µL/mL e LC₉₉ de 0,48 µL/mL. Portanto, pode concluir que o óleo essencial possui ação antioxidante, antimicrobiana, acaricida e larvicida sobre o *R. microplus* e *A. aegypti*, e que o fracionamento foi de grande importância para a identificação de compostos com atividade biológica.

Palavras-chave: *Laurus nobilis*, óleo essencial, *Rhipicephalus microplus*, *Aedes aegypti*.

EVALUATION OF THE CHEMICAL COMPOSITION AND BIOLOGICAL ACTIVITIES OF THE ESSENTIAL OIL OF *LAURUS NOBILIS* L. (LAURACEAE)

ABSTRACT

The *Laurus nobilis* L. is a tree belonging to the family Lauraceae, native to Asia and cultivated in the South and Southeast of Brazil as an ornamental plant, popularly known as laurel. The essential oil was extracted by hydrodistillation in a Clevenger apparatus for 2 hours. The essential oil was fractionated in a chromatographic column to obtain the fractions. The essential oil and fractions were identified by GC/MS. Was mensured the content of phenolic compounds of essential oil and fractions, and antioxidant activity by the DPPH sequestration method, antimicrobial activity against the strains: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 and ATCC 70603, *Proteus mirabilis* ATCC 7002, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 and *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, yeasts *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 20298, *Candida parapsilosis* ATCC 20019, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Cryptococcus gattii* L21 / 01 and *Cryptococcus neoformans* H99, and the filamentous fungi *Aspergillus niger* IC (clinical isolate), *Aspergillus flavus* IMI 190443, *Aspergillus fumigatus* ATCC 16913 by the diffusion test on agar. The minimal inhibitory concentration (MIC) of the sensitive strains was determined by the broth dilution method. And the acaricidal activity against *Rhipicephalus microplus* by the test of immersion of females and larval, the larvicidal activity against *Aedes aegypti* by the test of larval immersion. Twenty compounds were identified in the essential oil with 99.01% of the identified peak areas. The major component of the essential oil was the 1.8-cineole with 34.01%. The essential oil of laurel presented 17.57 µg of gallic acid / mg of essential oil of phenolic compounds and showed antioxidant activity by the DPPH method with IC₅₀ of 15.52 mg/mL and the fractions CH₂Cl₂:C₆H₁₄ (8: 2) 9, 96 mg/mL and CH₂Cl₂: C₆H₁₄ (7: 3) 3.65 mg/mL. The essential oil and the CH₂Cl₂: AcOEt (9:1) fraction showed antibacterial activity against the bacteria *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Proteus mirabilis* and antifungal activity against strains of *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* and *Cryptococcus gattii* and *C. neoformans* with minimum inhibitory concentration (MIC) values between 10.00 and 0.31 mg/mL. In relation to the acaricide activity, the immersion test of engorged females of *R. microplus* had a decrease in egg mass, egg production index and egg viability were affected in the different concentrations of essential oil in relation to the control group. On the larvae of the tick, the essential oil presented LC₅₀ of 3.52 µL/mL and LC₉₉ of 5.94 µL/mL, among the fractions to CH₂Cl₂: AcOEt (8:2) was the most active with LC₅₀ of 0.13 µL/mL and LC₉₉ of 0.51 µL/mL and the essential oil presented on larvae of *A. aegypti* LC₅₀ of 0.38 µL/mL and LC₉₉ of 0.48 µL/mL. Therefore, it can be concluded that the essential oil has antioxidant, antimicrobial, acaricidal and larvicidal action on *R. microplus* and *A. aegypti*, and that the fractionation was of great importance for the identification of compounds with biological activity.

Keywords: *Laurus nobilis*, essential oil, *Rhipicephalus microplus*, *Aedes aegypti*.

Sumário

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES	16
LISTA DE FIGURAS	17
LISTA DE TABELAS	18
1. REVISÃO DE LITERATURA	19
1.1 INTRODUÇÃO	19
1.2 PLANTAS MEDICINAIS	20
1.3 METABOLISMO SECUNDÁRIO	21
1.3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	12
1.4 FAMÍLIA LAURACEAE	23
1.4.1 LOURO - <i>Laurus nobilis</i> L.....	24
1.5 ANTIMICROBIANOS	26
1.6 ANTIOXIDANTES	27
1.7 CARRAPATO DOS BOVINOS	28
1.8 <i>Aedes aegypti</i>	31
2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	34
3. ARTIGO 1	41
3.1 Título.....	41
3.2 Resumo	41
3.3 Introdução	41
3.4 Material e métodos	42
<i>Coleta da planta</i>	42
<i>Extração do óleo essencial</i>	42
<i>Isolamento das frações do óleo essencial de <i>L. nobilis</i></i>	42
<i>Análise de CG-EM</i>	42
<i>Obtenção dos carrapatos</i>	43
<i>Teste de imersão das fêmeas</i>	43
<i>Teste de imersão larval</i>	43
<i>Atividade larvicida <i>Aedes aegypti</i></i>	44
<i>Análise estatística</i>	44
3.5 Resultados.....	44
3.6 Discussão.....	47
3.7 Agradecimentos	48
3.8 Referências	48
4. ARTIGO 2	50
4.1 Título.....	50
4.2 Resumo	50
4.3 Introdução	50
4.4 Experimental.....	51
<i>Extração do óleo essencial</i>	51
<i>Isolamento das frações do óleo essencial de <i>L. nobilis</i></i>	51
<i>Análise de CG-EM</i>	51
<i>Quantificação de compostos fenólicos</i>	51
<i>Atividade antioxidante pelo método DPPH</i>	52
<i>Teste de disco-difusão em ágar</i>	52
<i>Determinação da concentração mínima inibitória (CIM)</i>	52
<i>Análise estatística</i>	53
4.5 Resultados e Discussão	53
4.6 Agradecimentos	57
4.7 Referências	57

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIACÕES

μg – Micrograma

$\mu\text{g/mL}$ – Microgramas por mililitro

μL – Microlitro

BHA – Butil-hidróxi-anisol

DPPH – Radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

FROL – Fração do óleo essencial de louro

EAG – Equivalente de Ácido Gálico

IC_{50} – Concentração de óleo essencial necessária para inibir 50%

mg – Miligrama

mg/g – Miligrama por grama

mg/mL – Miligrama por mililitro

mL – Mililitro

nm – Nanômetro

UNIOESTE – Universidade Estadual do Oeste do Paraná

UV-VIS – Ultravioleta-visível

CL_{50} – Concentração letal 50%

CL_{99} – Concentração letal 99%

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Laurus nobilis</i> L.....	17
Figura 2 - <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	20
Figura 3 - <i>Rhipicephalus (Boophilus) microplus</i>	20
Figura 4 - Mosquito <i>Aedes aegypti</i>	23

ARTIGO 1

Figura 1. Porcentagem de controle nas fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> (Acari: Ixodidae) tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial das folhas <i>Laurus nobilis</i> , sob condições laboratoriais ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $\text{UR} > 80\pm 10\%$).....	38
--	----

LISTA DE TABELAS

ARTIGO 1

Tabela 1. Composição química do óleo essencial obtido das folhas de <i>L. nobilis</i>	35
Tabela 2. Médias do peso da massa das fêmeas antes da ovoposição (mg), peso massa dos ovos (mg), índice de produção de ovos (%IPO) das fêmeas ingurgitadas de <i>Rhipicephalus microplus</i> tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial das folhas de <i>L. nobilis</i> sob condições laboratoriais ($27\pm 1^{\circ}\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10\%$) e porcentagem de eclodibilidade larval.....	35
Tabela 3. Concentração letal CL_{50} e CL_{99} do óleo essencial de <i>Laurus nobilis</i> e das frações isoladas para as larvas de <i>Rhipicephalus microplus</i> com os respectivos intervalos de confiança.....	36

ARTIGO 2

Tabela I. Composição química do óleo essencial obtido das folhas de <i>L. nobilis</i>	44
Tabela II. Atividade antioxidante do óleo essencial e das frações do louro pelo método do DPPH.....	45
Tabela III. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>L. nobilis</i> avaliado pelo teste de difusão em ágar (mm).....	45
Tabela IV. Concentração mínima inibitória do óleo essencial e as frações de <i>L. nobilis</i> (mg/mL).....	46

1. REVISÃO DE LITERATURA

1.1 INTRODUÇÃO

As plantas usadas na medicina popular constituem uma fonte quase inesgotável de novos compostos biologicamente ativos, despertando assim o interesse de muitos pesquisadores e da indústria farmacêutica. O Brasil, por possuir uma riquíssima biodiversidade, representada por seus animais e vegetais, que podem conter princípios ativos potencialmente úteis à humanidade, pode contribuir enormemente para essas pesquisas (COWAN, 1999 apud OLIVEIRA *et al.*, 2006; LAMEIRA e PINTO, 2008).

A Organização Mundial de Saúde (OMS) tem demonstrado grande interesse e valorizado as pesquisas com plantas para a prevenção e tratamento de doenças. Também reconhece que a população de muitos países em desenvolvimento utilizam largamente plantas ou práticas tradicionais nos seus cuidados básicos de saúde, o que não é diferente no Brasil (DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO, 2006; LORENZI e MATOS, 2008).

A busca por produtos que não causem danos ao homem, animais e meio ambiente, que minimizem os efeitos colaterais e que retardem o desenvolvimento de resistência têm sido o foco de inúmeras pesquisas utilizando plantas, pois estas são uma rica fonte de fitoativos. Dentre estes os óleos essenciais são alvos de pesquisas na busca de compostos naturais com potenciais atividades biológicas (BAKKALI *et al.*, 2008).

O louro (*Laurus nobilis* L.) é uma planta condimentar aromática cultivada em várias regiões do mundo, muito utilizada na culinária devido ao seu aroma e também na medicina popular no tratamento de distúrbios gastrointestinais (LORENZI e MATOS, 2008).

As folhas secas e o óleo essencial extraído das folhas do louro são amplamente empregados na indústria alimentícia em carnes, sopas e peixes, devido as suas propriedades flavorizantes e pela ação antimicrobiana e inseticida, para a conservação dos alimentos e na indústria cosmética usado em cremes, sabonetes e perfumes, constituindo uma importante atividade econômica nessas áreas (OZCAN e CHALCHAT, 2005).

O óleo essencial extraído das folhas de *L. nobilis* apresenta quantidades elevadas de fitoativos, entre eles os terpenos como fonte potencial antioxidante e ação antimicrobiana e inseticida (DERWICH, BENZIANE e BOUKIR, 2009).

1.2 PLANTAS MEDICINAIS

Os homens desde os tempos da antiguidade buscaram na natureza recursos para melhorar suas próprias condições de vida, empregando as plantas para a recuperação da saúde para fins de cura, tratamento ou prevenção de alguma enfermidade. A partir da medicina popular foram descobertos diversos medicamentos usados atualmente. (CARVALHO *et al.*, 2012; LORENZI e MATOS, 2008).

As plantas medicinais são definidas como toda e qualquer planta, cultivada ou não, utilizada pelo homem com propósitos terapêuticos (BRASIL, 2010). Necessita levar em consideração que essas plantas medicinais são consumidas às vezes sem comprovação de suas atividades farmacológicas, sendo um importante problema de saúde, pois os efeitos adversos ocorrem corriqueiramente (CARVALHO *et al.*, 2012).

O mercado mundial dos medicamentos fitoterápicos é estimado em 20 bilhões de dólares por ano, e no Brasil estima-se que as vendas de produtos farmacêuticos derivados de plantas alcançaram 550 milhões de dólares, e que em 2050 somente a Floresta Amazônica será capaz de produzir 500 bilhões de dólares em medicamentos e cosméticos, a partir de plantas medicinais e aromáticas (LAMEIRA e PINTO, 2008).

O Brasil é o país com maior diversidade genética vegetal do mundo, embora seja pouca conhecida. É um dos países com maiores perspectivas para exploração econômica da biodiversidade, em função do número expressivo de espécies nativas, das excelentes condições climáticas e do grande potencial hídrico (GUILHERMINO, QUENTAL e BOMTEMPO, 2012; SIMÕES *et al.*, 2007). Apesar de a produção científica nessa área seja considerada expressiva, os conhecimentos gerados não se refletem na disponibilidade de novas tecnologias e produtos (CALIXTO e SIQUEIRA, 2008).

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, com uma vasta diversidade molecular, estrutural e de propriedades físico-químicas e biológicas. Cerca de 15-17% das plantas foram estudadas sistematicamente quanto ao seu potencial medicinal (SIMÕES *et al.*, 2007)

Hoje, estas substâncias presentes nas plantas continuam fornecendo à base de uma proporção enorme dos medicamentos usados para tratar doenças cardíacas, depressão, dor, câncer, asma, distúrbios neurológicos e outros (LAMEIRA e PINTO, 2008).

Dentre elas, as plantas aromáticas que são usadas como medicinais, pois as substâncias delas extraídas, os óleos essenciais são usadas como flavorizantes ou aromatizantes na indústria alimentícia e cosmética e também com finalidade farmacêutica, e destacam-se pelo potencial inseticida (BAKKALI *et al.*, 2008; ROBBERS *et al.*, 1997).

Assim, são necessárias colaborações multidisciplinares e internacionais na exploração da natureza, como fonte para o desenvolvimento de fármacos (SIMÕES *et al.*, 2007).

1.3 METABOLISMO SECUNDÁRIO

Metabolismo é o conjunto de reações químicas que ocorrem continuamente em uma célula, com a presença de enzimas específicas que garantem uma certa direção a essas reações, sendo os compostos formados, degradados ou transformados denominados metabólitos. O metabolismo é dividido em metabolismo primário, relacionado a macromoléculas (carboidratos, lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos) que são considerados essenciais aos processos à vida, e o metabolismo secundário, denominado também como especial, não está necessariamente relacionados aos processos essenciais para o organismo produtor conferindo-lhe vantagens de sobrevivência e perpetuação da sua espécie (COSTA, 1994; ROBBERS *et al.*, 1997; SIMÕES *et al.*, 2007).

O metabolismo secundário está presente em vegetais, micro-organismos e, em menor escala, em animais. As rotas metabólicas dos metabólitos secundários não possuem distribuição geral e talvez só sejam ativados durante alguns estágios particulares de crescimento e desenvolvimento ou em períodos de estresse de forma a permitir a adequação do produtor a seu meio, como defesa contra herbívoros e micro-organismos, a proteção contra os raios UV, a atração de polinizadores ou animais dispersores de semente, e também participação em alelopatias (BAKKALI *et al.*, 2008; GORCLICK e BERNSTEIN, 2014; ROBBERS *et al.*, 1997; SIMÕES *et al.*, 2007).

Os metabólitos secundários são originados a partir do metabolismo da glicose via dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato. O ácido chiquímico origina os aminoácidos aromáticos, precursores de parte dos alcalóides, taninos hidrolisáveis, ligninas, lignanas e cumarinas. O acetato origina precursores responsáveis pela origem dos terpenos, dentre eles os óleos essenciais e outras classes de alcaloides. Já as antraquinonas, os flavonoídes e taninos condensados são originados das duas vias (ROBBERS *et al.*, 1997; SIMÕES *et al.*, 2007).

O metabolismo secundário possui uma elevada capacidade biossintética, tanto em relação ao número de substâncias produzidas quanto à sua diversidade em uma espécie. Por serem fatores de interação entre organismos, micro-organismos, frequentemente apresentam atividades biológicas interessantes, com grande importância comercial na área farmacêutica, alimentícia, agrônômica e cosmética. Isto tem aumentado o interesse científico por constituírem uma fonte particularmente promissora de novas moléculas potencialmente úteis ao homem, entre estes os óleos essenciais (OLIVEIRA *et al.*, 2006; SINGH *et al.*, 2014; SIMÕES *et al.*, 2002).

1.3.1 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são originados no metabolismo secundário de plantas aromáticas, são voláteis, odoríferos, lipofílicos, líquidos com densidade menor ou maior do que a da água, distribuídos nas diversas partes da planta, agindo como proteção a predadores e atratores de polinizadores podendo ser chamados também de óleos etéreos ou essências (ROBBERS *et al.*, 1997). Ocorrendo em estruturas especializadas como: pêlos glandulares, células parenquimáticas, canais oleíferos ou em bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (ROBBERS *et al.*, 1997; SIMÕES *et al.*, 2007).

Os óleos essenciais são misturas de 20 a 60 componentes, destacando a presença de terpenos e fenilpropanóides de diferentes concentrações, caracterizados por 2 ou 3 compostos majoritários de 20 a 70% de concentração em relação aos outros compostos, denominados compostos traços (ROBBERS *et al.*, 1997; SIMÕES *et al.*, 2007).

A composição química do óleo essencial extraído de uma mesma espécie e da mesma parte da planta pode variar significativamente de acordo com a época da coleta, condições climáticas, o tipo de solo e outros fatores como ciclo vegetativo e o processo de obtenção (EDRIS, 2007).

Os óleos essenciais geralmente obtidos por hidrodestilação, o vapor libera as moléculas aromáticas e as arrasta até um sistema de resfriamento, onde são condensadas e separadas por diferença de densidade. E quase sempre são ópticamente ativas e apresentam alto índice de refração, podendo esses índices serem usados na identificação e controle de qualidade e caracterização (CHE DIN, 2006).

São alvos de pesquisas na busca de novos compostos naturais biologicamente ativos sendo eles os terpenos e compostos fenólicos, usados nas diversas áreas, com destaque para agentes antimicrobianos, antioxidantes e inseticidas (OUSSALAH *et al.*, 2006 apud CASTRO *et al.*, 2011).

Dentre os biocarrapaticidas provenientes do metabolismo secundário, os óleos essenciais que possuem atividade terapêutica, estão sendo testados quanto a atividade acaricida, podendo agir como fumigantes, inseticidas de contato, repelentes e pode afetar alguns parâmetros biológicos, tais como a taxa de crescimento, o tempo de vida e reprodução (CAMPOS *et al.*, 2012).

Óleos essenciais pode ser uma fonte alternativa de controle de larvas de mosquito, uma vez que são biodegradáveis em produtos não tóxicos e potencialmente adequados para utilização em programas de gestão integrada. Muitos pesquisadores têm relatado a eficácia de óleos essenciais de plantas contra larvas de mosquitos e parasitas humanos (KALAIVANI, SENTHIL-NATHAN e MURUGESAN, 2012).

As angiospermas dicotiledôneas apresentam plantas ricas em óleos essenciais, tais como as famílias Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, dentre outras (SIMÕES *et al.*, 2007).

1.4 FAMÍLIA LAURACEAE

Pertencente a ordem de Laurales da divisão das Magnoliídeas, a família Lauraceae está amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais do mundo, especialmente no Sudeste da Ásia e Norte da América do Sul, sendo umas das famílias mais primitivas, possuindo registros de 2.800 a.C. Formada por cerca de 50 gêneros e 2.500 espécies, sendo representada no Brasil por 24 gêneros e cerca de 400 espécies (JOLY, 1993; JUDD *et al.*, 2009; MARQUES, 2001).

Na Mata Atlântica e nas florestas da região Sul do Brasil a família Lauraceae é uma das famílias de maior destaque na composição florística, sendo frequentemente

representada tanta em números de espécies quanto de indivíduos (SOUZA e LORENZI, 2012).

Na maioria são árvores, arbustos ou lianas parasíticas, possuindo nós unilacunares, com células esparsas contendo óleos aromáticos, frequentemente com taninos e alcalóides isoquinolínicos. Apresentam folhas alternas e espiraladas, ocasionalmente opostas, simples, raramente lobadas, inflorescências geralmente paniculada, com flores bissexuais e unissexuais, radiais, geralmente pequenas, brancas, esverdeadas e amareladas, e os frutos drupa ou raramente baga unisseminada, associado com o receptáculo carnosos ou lenhoso e persistente (BARROSO, 1978; JUDD *et al.*, 2009).

Várias espécies são economicamente importantes, dentre elas o louro (*Laurus nobilis*), a canela (*Cinnamomum verum*), a cânfora (*C. camphora*) e o sassafrás (*Sassafras albidum*) utilizadas na culinária e produtoras de óleo essencial que alcançam alto valor de mercado, usadas como fonte de matérias-primas em indústrias. A *Persea americana*, o abacate é uma importante frutífera tropical e a *Aniba rosaeodora*, o pau-rosa é muito utilizada na perfumaria, pela extração de linalol. As plantas da desta família também são muito utilizadas na medicina popular com uso variado, desempenhando diferentes funções contra diversas doenças, destacando os gêneros *Aniba*, *Cinnamomum*, *Nectandra*, *Laurus* e *Ocotea*. E outros gêneros como *Beilschmiedia*, *Chlorocardium*, *Ocotea*, *Litsea*, fornecem madeira, constituindo uma família com alto valor econômico e com uma ampla diversidade de usos (JUDD *et al.*, 2009; SOUZA e LORENZI, 2012).

1.4.1 LOURO - *Laurus nobilis* L.

O *Laurus nobilis* L. é uma angiosperma pertencente à família Lauraceae, conhecido popularmente como louro, loureiro, guacararaíba-loureiro, loureiro, louro-de-apolônio, louro-comum, loureiro-dos-poetas, loureiro-de-apolônio, loureiro-de-presunto, loureiro-ordinário, é uma árvore ou arbusto nativo da Ásia e cultivado no Sul e Sudeste do Brasil, cultivada na Europa e Estados Unidos como uma planta ornamental (LORENZI e MATOS, 2008; MARQUES, 2001).



Figura 1. Exemplo de *Laurus nobilis* L. Fonte: Carla M.M. Fernandez

É considerada uma planta nobre na Grécia antiga usada na confecção as famosas coroas de louro com que eram agraciados os atletas e outros heróis, do nome do gênero *Laurus* e seu uso, originou-se o termo laureado (JOLY, 1993; LORENZI e MATOS, 2008). Na cidade de Pompéia foram encontrados frutos de loureiro, como o florescimento do loureiro na região ocorre na primavera e seus frutos aparecem na planta no mês de novembro, então sabe-se que foi neste mês, no ano de 79 a.C. que a cidade foi arrasada (MORELLI, 2010)

O louro mede de 2-4 m de altura, ramificada, perenifólia, aromática com folhas simples, coriáceas, ovais e verde-escuras de 4-8 cm de comprimento. Apresenta flores amareladas dioicas ou hermafroditas, reunidas em fascículos axilares, florescendo de março a maio. Os frutos são bagas globosas de cor preta. Reproduz-se por estacas com folhas, sementes e alporquia (LORENZI e MATOS, 2008; MORELLI, 2010).

Empregada na medicina popular tradicional é usada folhas através de infusão ou decocção, considerada estimulante das afecções gástricas e reumáticas, usada externamente contra reumatismo e como antisséptico para caspas e piolhos (JOLY, 1993; LORENZI e MATOS, 2008). É usado externamente no tratamento de hemorroída e dores reumáticas e também para dermatites (AMIN *et al.*, 2007).

O *L. nobilis* apresenta em sua composição pectinas, taninos, açúcares, ácidos graxos, terpenos (geraniol, linalol, cineol, eugenol, terpineno e pineno) e óleo essencial extraído das folhas e das flores (LORENZI e MATOS, 2008).

O louro é uma planta importante na indústria, usada em alimentos, perfumaria e cosméticos, com uma demanda maior do que 3.000 toneladas de folhas por ano, sendo o

seu óleo essencial com maior valor comercial agregado (LIRA *et al.*, 2009; MARZOUKI *et al.*, 2008).

O óleo essencial de louro geralmente é extraído por hidrodestilação ou por fluído supercrítico, tem um rendimento de 0,5 a 1,5 mL/100g de folhas, possui coloração ligeiramente amarelado ou incolor (DERWICH, BENZIANE e BOUKIR, 2009).

Os métodos de secagem empregados nas folhas podem alterar o rendimento e a composição química do óleo essencial, tanto diminuindo a concentração de certos componentes como o aparecimento de outros componentes devido à ocorrência de reações de oxidação, hidrólise e de formas glicosiladas, de alguma forma podem alterar o aroma original da planta fresca (DÍAZ-MAROTO *et al.*, 2002).

A composição química do óleo essencial das folhas do louro apresenta variabilidade de acordo com a região cultivada e sazonalidade (LIRA *et al.*, 2009). Porém o 1,8 cineol é composto majoritário em todos os casos, variando de 20 a 56%, seguido do linalol e α -terpineol e outros monoterpenos hidrogenados como β -pineno e sabineno. Compostos aromáticos (eugenol, metil eugenol e elimicina) presentes entre 1 a 12%. Estes compostos são responsáveis pelo aroma das folhas e extremamente importantes na qualidade sensorial das folhas (DÍAZ-MAROTO *et al.*, 2002; SELLAMI *et al.*, 2011).

O óleo essencial de louro tem sido amplamente estudado, apresentou atividade antibacteriana e antifúngica (ANGELINI *et al.*, 2006; EL *et al.*, 2014). Possui uma elevada atividade antioxidante avaliada por vários métodos, anti-inflamatória, inseticida e repelente, antiviral, analgésica, anticolinesterásica e possui baixo efeito sedativo (DERWICH, BENZIANE e BOUKIR, 2009).

1.5 ANTIMICROBIANOS

A busca por antimicrobianos naturais está crescendo cada vez mais como alternativa para substituir ou reduzir os usos antimicrobianos convencionais, usados na clínica e em aditivos alimentares (VALERIANO *et al.*, 2012).

Há uma grande preocupação em nível mundial devido ao surgimento de microorganismos resistentes aos antimicrobianos, que ocasionam um enorme problema à saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, e tem aumentado drasticamente nos últimos anos (SANTOS e NOVALES, 2012).

Também há um aumento na preocupação dos consumidores com os alimentos livres ou com níveis menores de preservativos químicos, pois estes aditivos podem ser tóxicos aos humanos (SOUZA *et al.*, 2005).

O uso de produtos naturais como compostos antimicrobianos parece ser uma maneira de reduzir doenças e danos econômicos causados por micro-organismos patogênicos e também para controlar a presença de bactérias e estender a vida de prateleira de alimentos processados (DORMAN e DEANS, 2000).

As plantas sintetizam muitos compostos provenientes do metabolismo secundário, com estruturas químicas complexas e muitos deles foram relatados com propriedades antimicrobianas, dentre eles os alcalóides, flavonóides, isoflavonóides, taninos, cumarinas, glicosídeos, terpenos e compostos fenólicos (SIMÕES *et al.*, 2007).

Os óleos essenciais são considerados os agentes antimicrobianos presentes em plantas, foi estabelecido cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (COWAN, 1999 apud VALERIANO *et al.*, 2012).

Estudos *in vitro* dos componentes dos óleos essenciais derivados de terpenos e seus derivados oxigenados tem sido extensivamente avaliados, e tem mostrado ação inibitória no crescimento de bactérias e fungos, e também antioxidante. Assim, sendo uma alternativa no uso como aditivo com atividade antimicrobiana e também em combinação com outros antimicrobianos (SANTOS e NOVALES, 2012).

1.6 ANTIOXIDANTES

Os radicais livres são espécies que possuem elétrons com spins não emparelhados, geradas *in vivo*, tanto por reações químicas quanto pelo metabolismo. Esses elétrons desemparelhados alteram a reatividade química de um átomo ou molécula, geralmente tornando-o mais reativo do que o correspondente não radical (ATKINS, 2006; HALLIWELL, 1994b).

A reatividade de diferentes radicais livres varia, mas algumas podem causar graves danos a moléculas biológicas, especialmente ao DNA, lipídios e às proteínas, promovendo danos que podem contribuir para o envelhecimento e o aparecimento de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose e artrite reumática (HALLIWELL, 1994a; SILVA *et al.*, 2011).

Os antioxidantes são compostos que inibem ou retardam significativamente a oxidação de lipídios ou outras moléculas ao inibirem a iniciação ou propagação da reação de oxidação de substratos (MATKOWSKI, 2008; SILVA *et al.*, 2011).

Antioxidantes sintéticos são amplamente utilizados como aditivos alimentares para evitar a rancificação, devido ao seu alto desempenho, baixo custo e grande disponibilidade. Os antioxidantes sintéticos usualmente na indústria alimentícia são: butil-hidroxi-tolueno (BHT), butil-hidroxi-anisol (BHA), terc-butil-hidroquinona (TBHQ) e propilgalato (PG), pois aumentam a vida de prateleira de alimentos lipídicos ou que contenham lipídios em sua composição (RAMALHO e JORGE, 2006).

Devido à tendência da utilização de ingredientes naturais nos alimentos, há um crescente aumento em novos estudos na descoberta de novas substâncias naturais, a fim de encontrar substâncias com maior eficácia e menor toxicidade à saúde (DEMO *et al.*, 1998).

Os compostos naturais antioxidantes encontrados nas plantas ou outras fontes, na maioria deles são compostos fenólicos principalmente tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos, sendo os óleos essenciais fontes destes compostos e também possuem outros constituintes que apresentam ação antioxidante como: monoterpenos, cetonas, aldeídos, hidrocarbonetos (MELO *et al.*, 2006 apud SILVA *et al.*, 2011).

1.7 CARRAPATODOS BOVINOS

O *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* é a espécie de carrapato encontrado em bovinos, sendo um artrópode da ordem dos ácaros, pertencendo ao grupo das aranhas e escorpiões. Hoje, é considerado um importante ectoparasita de impacto econômico no Brasil, os prejuízos provocados pelas infestações em rebanhos são superiores a US\$ 2 bilhões por ano na América Latina (EMBRAPA, 2009; FURLONG, 2005; PEREIRA *et al.*, 2010).



Figura 2 e 3. *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Fonte: EMBRAPA

É originário da Ásia, precisamente da Índia e Ilha de Java. Há relatos de registros a cerca de 2.000 anos atrás, em uma tumba egípcia de uma hiena com protuberâncias que acreditam ser de carrapatos (FURLONG, 2005).

Foi trazido ao Brasil com a movimentação de animais e mercadorias, onde as condições climáticas favoreceram a sobrevivência e desenvolvimento do carrapato. Hoje está presente em todos os estados brasileiros durante o ano todo, exceto nos estados da região Sul. Devido aos diferentes métodos de criação e raças não foi possível estabelecer um controle padrão contra o ectoparasita em todo o território brasileiro (EMBRAPA, 2009; FURLONG, 2005; PEREIRA *et al.*, 2010).

O carrapato dos bovinos causa perdas diretas e indiretas aos animais e aos produtores, principalmente pelo hematofagismo que pode comprometer a produção de leite e carne pela diminuição do apetite que leva a anemia por causa da espoliação a fêmea ingere cerca de 0,5 a 3,0 mL de sangue por dia. Também causa danos ao couro devido a desvalorização do produto, favorece a penetração de moscas e berne na pele do animal. E pode inocular pela saliva toxinas nos hospedeiros e protozoários como *Babesia bovis*, *B. bigemina* e a rickettsia *Anaplasma marginale*, ocasionando o quadro clínico Tristeza Parasitária Bovina (TPB). Compromete o desenvolvimento da pecuária de uma região, devido ao aumento de custos com acaricidas para manter a sanidade do rebanho bovino, sendo as raças europeias e o rebanho de leite os mais atacados pelo carrapato (HOYCAEN e PIMENTA, 2013; GAZIM *et al.*, 2011; OLIVO *et al.*, 2008).

No ciclo biológico do carrapato, ocorrem duas fases. A fase não parasitária que começa com a fêmea ingurgitada (teleógina), ao completar sua alimentação desprende-se do corpo do bovino e vai para o solo, e realiza postura de cerca de dois a três mil

ovos em um local protegido dos raios solares. Em um período de três a seis semanas dependendo das condições climáticas (temperatura e umidade) ocorre a eclosão dos ovos em larvas, após o endurecimento da cutícula que leva dois ou três dias inicia-se o geotropismo negativo em direção as extremidades das plantas ao redor de onde nasceram, procurando os hospedeiros. São atraídas pelo gás carbônico da respiração dos animais e pelo deslocamento de ar, assim sobem e fixam no hospedeiro, dando origem a fase parasitária, nesta iniciam o repasto sanguíneo, realiza a cópula e a fêmea aumenta de volume cerca de duzentas vezes o tamanho normal, até que totalmente ingurgitada, cai no solo e inicia a nova fase do ciclo biológico. O macho permanece no bovino por mais tempo duas a três vezes a mais que a fêmea para realizar a cópula (FURLONG, 2005; PEREIRA *et al.*, 2010).

O controle do carrapato bovino é muito complexo devido à interação de vários fatores, como raça bovina, época do ano, manejo, condições ambientais e principalmente pela resistência deste aos acaricidas convencionais (PEREIRA *et al.*, 2010).

Hoje o Brasil possui regiões onde não existem produtos capazes de controlar o ectoparasita, isso foi ocasionado pelo uso incorreto pelos produtores rurais como: uso indiscriminado, subdoses, modo de aplicação incorreto, produtos inadequados, falta de tratamento e a resistência cruzada, que por sua vez causados pela falta de conhecimento e embasamento técnico pelo produtor rural de como controlar o carrapato, assim promovendo a seleção de carrapatos geneticamente resistentes aos diferentes princípios ativos, pois reduzem e diminuem a vida útil de produtos mais amplamente usados na controle do ectoparasita (EMBRAPA, 2009; FURLONG, 2005; PEREIRA *et al.*, 2010).

Este controle tem sido feito principalmente na fase parasitária por meio de produtos químicos, com organofosforados, formamidinas, piretroídes e avermectinas, os quais acarretam dois grandes problemas: o desenvolvimento acelerado da resistência ao princípio ativo e resíduos nos produtos de origem animal e meio ambiente, que tem provocado grande preocupação na sociedade e órgãos governamentais, gerando malefícios ao homem, que consome os produtos de origem animal e ao próprio animal (CHAGAS *et al.*, 2002; FURLONG, 2005).

A utilização de extratos de plantas no controle do carrapato também tem sido foco de inúmeras pesquisas, pois a demanda dos consumidores por alimentos livres de resíduos químicos e a procura de por produtos que não prejudiquem o meio ambiente,

sendo economicamente e ecologicamente viáveis (FERNANDES, BESSA e FREITAS, 2008; ROSADO-AGUILAR *et al.*, 2010).

A utilização de óleos essenciais vem se mostrando bastante promissor no controle deste ectoparasita, por serem vários princípios ativos e possuírem degradação rápida no meio ambiente, não favorecem o desenvolvimento de resistência por parte dos insetos, por ser um processo que ocorre muito lentamente (CHAGAS *et al.*, 2003; HOYCAEN e PIMENTA, 2013; OLIVO *et al.*, 2008).

1.8 *Aedes aegypti*

O mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) é o vetor da dengue, originário da África, se desenvolve em áreas tropicais e subtropicais, onde o clima quente e úmido favorece seu desenvolvimento e proliferação. A transmissão da doença ocorre pela picada do mosquito fêmea infectado, que possui hábitos diurnos e noturnos (BRASIL, 2013).



Figura 4. Mosquito *Aedes aegypti*. Fonte: Ministério da Saúde

O ciclo biológico do *A. aegypti* é composto por quatro fases: ovo, larva, pupa e adulto. Após o acasalamento, a fêmea alimenta-se de sangue para a maturação dos ovócitos, e após quatro dias ela deposita seus ovos em criadouros favoráveis, e estes podem sobreviver até 450 dias sem o contato com a água. Após o contato com a água os ovos eclodem em larvas, após três dias se tornam pupas e em dois dias atingem a forma adulta (BRASIL, 2002; BRASIL, 2009).

Se a fêmea picar uma pessoa com dengue, ela se infecta e torna-se capaz de transmitir o vírus a outros humanos por meio da picada, dando origem aos ovos do mosquito já infectados e transmissores de dengue (BRASIL, 2009).

A dengue é uma doença viral que tornou-se um problema mundial de saúde pública, a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que entre 50 a 100 milhões de pessoas se infectem anualmente, em mais de 100 países, de todos os continentes, exceto a Europa. Cerca de 550 mil doentes necessitam de hospitalização e 20 mil morrem em consequência da doença (BRASIL, 2013).

É uma doença causada por um arbovírus, sendo este dividido em quatro sorotipos diferentes: DEN-1, DEN-2, DEN-3 e DEN-4. A dengue pode manifestar-se de duas formas diferentes: a forma clássica que apresenta-se com febre, dor de cabeça, no corpo e nas articulações com tratamento é de suporte ou seja, alívio dos sintomas, e a forma hemorrágica, sendo mais severa, com ocorrência de hemorragias e pode ser fatal (BRASIL, 2009; COSTA *et al.*, 2005; MAGALHÃES *et al.*, 2010).

No Brasil, as epidemias geralmente ocorrem no verão, durante ou imediatamente após períodos chuvosos. O único modo possível de evitar a transmissão da doença é a eliminação do mosquito transmissor (BRASIL, 2013; SILVA *et al.*, 2014a).

Na tentativa de manter a incidência da enfermidade sob controle, são destinados recursos e programas para a erradicação do vetor nos centros urbanos, onde há uma série de fatores que beneficiam a biologia e comportamento do mosquito, como aumento da densidade populacional em áreas urbanas, abastecimento irregular de água, aumento do lixo urbano e o transporte de cargas e pessoas (BRASIL, 2013).

O controle do culicídeo utilizando inseticidas químicos, como *Temephós*® (Temefós 1% p/p e ingredientes Inertes 99% p/p), *Malathion*® (ingrediente ativo: *Malathion* 50% p/p e grupo químico: organofosforado) e *Fenitrothion*® (*fenitrothion* 40% p/p, agente molhante, emulsificante e inertes sólidos) constituem a principal medida adotada pelos Programas de Saúde Pública. Por outro lado a utilização destes produtos contribuem para a contaminação do meio ambiente (BRAGA e VALLE, 2007; BRASIL, 2010; TIWARY *et al.* 2007).

Já tem sido registrada, em diferentes partes do mundo e no Brasil, a ocorrência de resistência deste díptero aos inseticidas convencionais, através dos mecanismos de diminuição da taxa de penetração pela cutícula do vetor, detoxificação metabólica

aumentada e diminuição da sensibilidade do sítio alvo. Todos esses mecanismos são inespecíficos e, geralmente, conferem resistência cruzada a outro inseticida estruturalmente relacionado (TIWARY *et al.* 2007; COSTA *et al.* 2005; MACORIS *et al.* 2003; MAGALHÃES *et al.* 2010).

O aparecimento de resistência do mosquito aos inseticidas tem estimulado a busca de alternativas para o controle do vetor, dentre elas o uso de bioinseticidas, que possui inúmeras vantagens em relação aos inseticidas químicos, como a diminuição dos custos de produção e a preservação do ambiente e dos alimentos da contaminação química. Além disso, esses produtos possuem características de serem recursos renováveis e serem rapidamente degradáveis (BONATO, CAVALCA e LOLIS, 2010; ROEL, 2001).

Os extratos de plantas e os óleos essenciais têm sido foco de pesquisas em vários países e também no Brasil, pois são consideradas fontes de compostos bioativos contra insetos e outras atividades biológicas. Com este intuito a utilização de plantas com ação larvicida são alternativas viáveis no controle do vetor (SILVA *et al.*, 2014a; SILVA *et al.*, 2014b; TABANCA *et al.*, 2013).

Esta pesquisa tem intuito de avaliar a composição química, compostos fenólicos, atividade acaricida sobre o *Rhipicephalus microplus*, larvicida sobre o *Aedes aegypti*, antioxidante pelo método do DPPH e antimicrobiana sobre bactérias gram-positivas e negativas do óleo essencial de *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) obtido por hidrodestilação e das frações provenientes do fracionamento deste óleo por cromatografia clássica empregando misturas de solventes de diferentes polaridades.

2. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMIN, G. *et al.* Influence of Phenological Stages and Method of Distillation on Iranian Cultivated Bay Leaves Volatile Oil. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v.10, p. 2895-2899, 2007.

ANGELINI, P. *et al.* Antimicrobial activities of various essential oils against foodborne pathogenic or spoilage moulds. **Annals of Microbiology**, v.56, n.1, p. 65-69, 2006.

ANTHONY, K.P. DEOLU-SOBOGUN, S.A. SALEH, M.A. Comprehensive Assessment of Antioxidant Activity of Essential Oils. **Journal of Food Science**, v.77, n.8, p. 839-843, 2012.

ATKINS, P.; JONES, L. **Princípios de Química – Questionando a vida moderna e o meio ambiente**. 3ª ed. Editora Bookman, 2006.

BAKKALI, F. *et al.* Biological effects of Essential oils – A review. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, n.2, p.446-475, 2008.

BARROSO, G. M. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. São Paulo: Editora da Universidade de São Paulo, 1978.

BONATO C. M, CAVALCA P. A. M, LOLIS M. R. B. Homeopathic and Larvicide Effect of *Eucalyptus cinerea* Essential Oil against *Aedes aegypti*. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v.53, p. 835-843, 2010.

BRAGA, I. A.; VALLE, D. *Aedes aegypti*: inseticidas, mecanismos de ação e resistência. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, v.16, n.4, p. 279-293, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Dengue: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento / Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde. – Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde, 2009.

BRASIL. Resolução nº.10 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. Dengue : diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão. – 4. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2013.

CALIXTO, J.B.; SIQUEIRA JR.J.M. Desenvolvimento de Medicamentos no Brasil: Desafios. **Gazeta Médica da Bahia**, v.78, n.1, p. 98-106, 2008.

CAMPOS, R.N.S. *et al.* Óleos Essenciais de Plantas Medicinais e Aromáticas no Controle do Carrapato *Rhipicephalus microplus*. **Archivos de Zootecnia**, v.61, p.67-78, 2012.

CARVALHO, A.C.B. *et al.* Regulação Brasileira em Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Revista Fitos**, v.7, n.1, p. 5-16, 2012.

CASTRO, C.E. *et al.* Antimicrobial activity of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.13, n.3, p.293-297, 2011.

CHAGAS, A.C.S. *et al.* Acaricide effect of *Eucalyptus* spp. essential oils and concentrated emulsion on *Boophilus microplus*. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v.39, p. 247–253, 2002.

CHAGAS, A.C.S. *et al.* Sensibilidade do carrapato *Boophilus microplus* a solventes. **Ciência Rural**, v.33, p. 109–114, 2003.

CHE DIN, N. B. **Extraction of essential oils from jasmine flower using supercritical CO₂ co-solvent extraction**. 2006 37f. Monografia (Bacharel em Engenharia Química) – Faculty of Chemical & Natural Resources Engineering, University College of Engineering & Technology Malaysia.

COSTA, A. F. **Farmacognosia**, 5 ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 1994.

COSTA, J. G. M. *et al.* Estudo químico-biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p. 304-309, 2005.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v.12, n.4, p. 564-582, 1999.

DEMO, A. *et al.* Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves. **Food Research International**, v.31, n.5, p. 351-354, 1998.

DERWICH, E. BENZIANE, Z. BOUKIR, A. Chemical Composition and Antibacterial Activity of Leaves Essential Oil of *Laurus nobilis* from Morocco. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v.3, n.4, p. 3818-3824, 2009.

DIÁRIO OFICIAL DA UNIÃO. Aprova a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde. Diário Oficial da União de 04 de maio de 2006. Portaria nº 971 de 03 de maio de 2006, Ed.84, Brasília, 2006.

DÍAZ-MAROTO, M.C. *et al.* Effect of Drying Method on the Volatiles in Bay Leaf (*Laurus nobilis* L.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, p. 4520-4524, 2002.

DORMAN, H.J.D. DEANS, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v.88, p. 308-316, 2000.

EDRIS, A. Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 308-323, 2007.

EL S.N. *et al.* Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils Extracted from *Laurus nobilis* L. Leaves by Using Solvent-Free Microwave and Hydrodistillation. **Food and Nutrition Sciences**, v.5, p. 97-106, 2014.

EMBRAPA GADO DE LEITE. **Principais erros cometidos na luta contra os carrapatos**. Juiz de Fora, 2009.

FERNANDES, F.F., BESSA, P.A.D., FREITAS, E.P.S. Evaluation of activity of the crude ethanolic extract of *Magonia pubescens* St. Hil (Sapindaceae) against larvae of the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.51, p. 1147–1152, 2008.

FURLONG, J. **Carrapato: problemas e soluções**. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005. Disponível em: <http://www.cnp.gl.embrapa.br>, acessado em 15 de setembro de 2013.

GAZIM, Z.C. *et al.* Acaricidal activity of the essential oil *Tetradenia riparia* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Experimental Parasitology**, v.129, p. 175-178, 2011.

GORCLICK, J. BERNSTEIN, N. Elicitation: An Underutilized Tool in the Development of Medicinal Plants as a Source of Therapeutic Secondary Metabolites. **Advances in Agronomy**, v.124, p. 201-230, 2014.

GUILHERMINO, J.F.; QUENTAL, C.; BOMTEMPO, J.V. Sistema de Inovação em Fitomedicamentos: os Desafios Da Gestão para o Desenvolvimento de Fitomedicamentos a partir da Biodiversidade Brasileira. **Revista Fitos**, v.7, n.3, p. 169-171, 2012.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants: a personal view. **Nutrition Reviews**, v. 52, n. 8, p. 253-265, 1994a.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, v. 344, n. 8924, p. 721-724, 1994b.

HOYCAEN, P.A.S.; PIMENTA, D.S. Extrato de plantas medicinais como carrapaticida de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.4, p.627-631, 2013.

JOLY, A. B., **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal**. São Paulo: Editora Nacional, 1993.

JUDD S. *et al.* **Sistemática Vegetal Um Enfoque Filogenético**. 3 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009.

KALAIVANI, K.; SENTHIL-NATHAN, S.; MURUGESAN, A.G. Biological activity of selected Lamiaceae and Zingiberaceae plant essential oils against the dengue vector *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Parasitology Research**, v.110, n.3, p.1261-1268, 2012.

LAMEIRA, O. A.; PINTO, J. E. B. P. **Plantas medicinais: do cultivo, manipulação e uso à recomendação popular**. Belém: Editora Embrapa Amazônia Oriental, 2008.

LIRA, P.D.L. *et al.* Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (*Laurus nobilis* L.) from Argentina. **Industrial Crops and Products**, v.30, p. 259-264, 2009.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil Nativas e Exóticas**, 2 ed. São Paulo:Instituto Plantarum, 2008.

MAGALHÃES, L.A.M. *et al.* Chemical Composition and Larvicidal Activity against *Aedes aegypti* Larvae of Essential Oils from Four *Guarea* species, v.15, p. 5734-5741, 2010.

MACORIS, M.L.G. *et al.* Resistance of *Aedes aegypti* from the state of São Paulo, Brazil, to organophosphates insecticides. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.98, p. 703-708, 2003.

MARQUES, C. A. Importância da Família Lauraceae. **Floresta e Ambiente**, v.8, n.1, p. 195-206, 2001.

MARZOUKI, H. *et al.* Extraction and Separation of Volatile and Fixed Oils from Berries of *Laurus nobilis* L. by Supercritical CO₂. **Molecules**, v.13, p. 1702-1711, 2008.

MATKOWSKI, A. Plant in vitro culture for the production of antioxidants. **Biotechnology Advances**, v. 26, p. 548–560, 2008.

MELO, E.A. *et al.* Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. **Ciências e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p. 639-644, 2006.

MORELLI, M. S. **Guia de produção para plantas medicinais, aromáticas e flores comestíveis**. Porto alegre:Editora Cidadela, 2010.

OLIVEIRA, R.A.G. *et al.* Estudo da inferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p. 77-82, 2006.

OLIVO, C.J. *et al.* Óleo de citronela no controle do carrapato de bovinos. **Ciência Rural**, v.38, p. 406–410, 2008.

OUSSALAH, M. *et al.* Antimicrobial effects of selected plant essential oils on the growth of a *Pseudomonas putida* strain isolated from meat. **Meat Science**, v.73, p. 236-244, 2006.

OZCAN, M. CHALCHAT, J. C. Effect of Different Locations on the Chemical Composition of Essential Oils of Laurel (*Laurus nobilis*L.)Leaves Growing Wild in Turkey. **Journal of Medicinal Food**, v.8, n.3, p; 408-411, 2005.

PEREIRA, C.D.; SOUZA, G.R.L.; BAFFI, M.A. **Carrapato dos bovinos: métodos de controle e mecanismos de resistência a acaricidas**. Planaltina DF:Embrapa dos Cerrados, 2010.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes Utilizados em Óleos, Gorduras e Alimentos Gordurosos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p.755-760, 2006.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e Farmacobiotechnologia**, São Paulo:Premier, 1997.

ROEL A. R. Utilização de plantas com propriedades inseticidas: uma contribuição para o Desenvolvimento Rural Sustentável. Universidade Católica Dom Bosco. **Revista Internacional de Desenvolvimento Local**, v.1, p. 43-50, 2001.

ROSADO-AGUILAR, J.A. *et al.* Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). **Veterinary Parasitology**, 168, p. 299–303, 2010.

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

SELLAMI, I.H. *et al.* Qualitative and quantitative changes in the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves as affected by different drying methods. **Food Chemistry**, v.126, p. 691-697, 2011.

SILVA, T.C.L. *et al.* Atividades antioxidante e antimicrobiana de *Ziziphus joazeiro* mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v.32, n.2, p. 193-199, 2011.

SILVA, C.B. *et al.* Effects of volatile oils of the *Microlobius foetidus* on trypsin, chymotrypsin and acetylcholinesterase activities in *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v.8, n.5, p.148-156, 2014a.

SILVA, C.B. *et al.* *Byrsonima intermedia* preparations inhibits trypsin and chymotrypsin activities from *Aedes aegypti* larval gut. **Journal of Medicinal Plant Research**, v.8, n.9, p.416-422, 2014b.

SIMÕES, C.M.O. *et al.* **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 4 ed. Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS/Ed. Da UFSC, 2007.

SINGH, C.R. *et al.* Antioxidant and Antibacterial Activity of Field Grown and Tissue Cultured Root Callus of Mangrove Species. **European Journal of Medicinal Plants**, v.4, n.6, p. 723-742, 2014.

SOUZA, E.L. *et al.* Antimicrobial Effectiveness of Spices: an Approach for Use in Food Conservation Systems. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.48, p. 549-558, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2012.

VALERIANO, C. *et al.* Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.14, n.1, p.57-67, 2012.

TIWARY, M. *et al.* Chemical composition and larvicidal activities of the essential oil of *Zanthoxylumarmatum* DC (Rutaceae) against three mosquito vectors. **Journal of Vector Borne Diseases**, v.44, p. 198-204, 2007.

TABANCA, N. *et al.* Comparative investigation of *Umbelluria californica* and *Laurus nobilis* leaf essential oils and identification of constituents active against *Aedes aegypti*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, p. 12283-12291, 2013.

3. ARTIGO 1

Submissão: Revista Parasitology Research

3.1 Título

Composição química, atividade acaricida do óleo essencial de *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) sobre o *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) e larvicida sobre o *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae)

3.2 Resumo

O objetivo deste trabalho foi identificar a composição química e avaliar as atividades acaricida e larvicida sobre as fêmeas ingurgitadas e as larvas de *Rhipicephalus microplus* do óleo essencial extraído das folhas de *Laurus nobilis* e as frações provenientes do fracionamento do óleo essencial por cromatografia clássica e a ação do óleo essencial de louro sobre as larvas de *Aedes aegypti*. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação e analisado por CG/MS. Foram identificados 20 compostos do óleo essencial com 99,01% das áreas dos picos identificados. O composto majoritário do óleo essencial foi o 1,8-cineol com 34,01%. O teste de imersão das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus* houve redução da massa dos ovos, índice de produção de ovos e a viabilidade dos ovos foram afetados nas diferentes concentrações do óleo essencial em relação ao grupo controle. Sobre as larvas do carrapato o óleo essencial apresentou LC₅₀ de 3,52 µL/mL e LC₉₉ de 5,94 µL/mL, dentre as frações a CH₂Cl₂:AcOEt (8:2) foi a mais ativa com LC₅₀ de 0,13 µL/mL e LC₉₉ de 0,51 µL/mL, seguida da fração CH₂Cl₂:AcOEt (9:1) com LC₅₀ de 0,75 µL/mL e LC₉₉ de 5,09 µL/mL. O β-felândreno com LC₅₀ de 1,37 µL/mL e LC₉₉ de 3,22 µL/mL, a C₆H₁₄:CH₂Cl₂ (5:5) com LC₅₀ de 2,04 µL/mL e LC₉₉ de 8,70 µL/mL e o 1,8-cineol com LC₅₀ de 27,96 µL/mL e LC₉₉ de 67,34 µL/mL. E o óleo essencial apresentou sobre as larvas de *A. aegypti* LC₅₀ de 0,38 µL/mL e LC₉₉ de 0,48 µL/mL. Portanto, pode concluir que o óleo essencial possui ação acaricida e larvicida sobre o *R. microplus* e *A. aegypti*.

Palavras-chave *Laurus nobilis*, óleo essencial, *Rhipicephalus microplus*, *Aedes aegypti*.

3.3 Introdução

O *Rhipicephalus microplus* é um carrapato encontrado em bovinos, sendo hoje considerado um importante ectoparasita de impacto econômico no Brasil. Os prejuízos provocados pelas infestações em rebanhos são superiores a US\$ 2 bilhões por ano na América Latina (Furlong 2005; Pereira et al. 2010). O carrapato dos bovinos causa perdas diretas e indiretas aos animais e aos produtores, principalmente pelo hematofagismo, que pode comprometer a produção de leite e carne, devido ao aumento dos custos com acaricidas para manter a sanidade do rebanho bovino (Hoycaen e Pimenta 2013; Pereira et al. 2010).

Este controle tem sido feito principalmente por meio de produtos químicos, como organofosforados, formamidas, piretroídeos e avermectinas, os quais acarretam dois grandes problemas: o desenvolvimento acelerado da resistência ao princípio ativo e resíduos nos produtos de origem animal e ao meio ambiente, que tem provocado grande preocupação na sociedade e dos órgãos governamentais (Furlong 2005).

Outro grande problema de saúde pública é o mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae), o vetor da dengue. Originário da África, o mosquito se desenvolve em áreas tropicais e subtropicais do mundo, onde o clima quente e úmido favorece seu desenvolvimento e proliferação. A transmissão da doença ocorre pela picada do mosquito fêmea infectada (Brasil 2013).

O único modo possível de evitar a transmissão da doença é a eliminação do mosquito transmissor (Brasil 2013). O controle do mosquito é realizado utilizando inseticidas, como organofosforados. Os fatores limitantes são o desenvolvimento de resistência e a poluição do meio ambiente (Brasil 2009).

Como alternativa no controle tanto do carrapato quanto do mosquito, a utilização de bioinseticidas provenientes do metabolismo secundário das plantas tem sido foco de inúmeras pesquisas devido ao aumento da demanda por produtos ecologicamente amigáveis, que não contaminem os alimentos e que não prejudiquem o meio ambiente (Daemon et al. 2012; Rosado-Aguilar et al. 2010).

Dentre os metabólitos secundários destacam-se os óleos essenciais. A utilização destes produtos tem demonstrado resultados promissores neste controle devido a suas propriedades acaricidas e larvicidas (Chagas *et al.* 2004; Lage *et al.* 2013).

Os óleos essenciais são constituídos de vários princípios ativos, possuem vários mecanismos de ação e degradação rápida no meio ambiente, deste modo não favorecem o desenvolvimento de resistência dos insetos e baixo impacto ambiental, também são de baixa toxicidade ao homem e a organismos não alvos (Costa *et al.* 2005).

O *Laurus nobilis* L. é uma angiosperma pertencente à família Lauraceae, conhecida popularmente como louro, é uma planta nativa da Ásia e cultivado no Sul e Sudeste do Brasil (Marques 2001). É uma planta condimentar aromática muito utilizada na culinária devido ao seu aroma e também na medicina popular no tratamento distúrbios gastrointestinais (Lorenzi e Matos 2008).

O louro é uma planta importante na indústria usada em alimentos, perfumaria e cosméticos, com demanda maior que 3000 toneladas de folhas por ano, sendo o seu óleo essencial com maior valor comercial agregado (Lira *et al.* 2009; Marzouki *et al.* 2008). As folhas secas e o óleo essencial do louro são amplamente empregados na indústria alimentícia em carnes, sopas e peixes, devido as suas propriedades flavorizantes e também pela ação antimicrobiana e inseticida, para a conservação dos alimentos, constituindo-se uma importante atividade econômica nessas áreas (Ozcan e Chalchat 2005).

O óleo essencial de louro tem sido amplamente estudado por apresentar quantidades elevadas de fitoativos, entre eles os terpenos. Vários estudos relataram suas atividades antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória, inseticida e repelente, antiviral, analgésica, anticolinesterásica e baixo efeito sedativo (Angelini *et al.* 2006; El *et al.* 2014).

Esta pesquisa tem intuito de avaliar as atividades acaricida e larvicida do óleo essencial obtido das folhas de *L. nobilis* sobre o *R. microplus* e sobre as larvas do *A. aegypti*. Até o presente estudo, não há relatos na literatura sobre estas atividades do óleo essencial do louro sobre o carrapato dos bovinos.

3.4 Materiais e métodos

Coleta da planta

As folhas de *Laurus nobilis* foram coletadas em maio de 2014 em Pérola – Paraná, Brasil. A exsiccata está depositada no Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNOP), sob o número 1615.

Extração do óleo essencial

O óleo essencial foi obtido das folhas frescas do louro por hidrodestilação usando aparelho tipo Clevenger por 2 horas. O óleo essencial foi coletado e seco com sulfato anidro de sódio, e estocado em frasco âmbar a 4°C.

Isolamento das frações do óleo essencial de *L. nobilis*

Uma amostra de 4,0 g de óleo essencial foi submetida à cromatografia em coluna utilizando sílica gel 60 (0,01-0,20 mm) como fase estacionária (FE) na proporção 1:25, sendo esta ativada anteriormente por aquecimento a 90 °C por 45 minutos. A amostra foi eluída sequencialmente com 100 mL de hexano (C₆H₁₄), hexano:diclorometano (C₆H₁₄:CH₂Cl₂)(9:1; 8:2; 7:3 e 5:5), diclorometano-hexano (CH₂Cl₂:C₆H₁₄)(7:3; 8:2; 9:1), diclorometano (CH₂Cl₂), diclorometano-acetato de etila (CH₂Cl₂:AcOEt) (9:1; 8:2; 7:3 e 5:5), acetato de etila:diclorometano (AcOEt :CH₂Cl₂) (7:3; 8:2; 9:1), acetato de etila (AcOEt), acetato de etila:metanol (AcOEt:MeOH) (9:1; 8:2; 7:3 e 5:5), metanol:acetato de etila (MeOH:AcOEt) (7:3; 8:2; 9:1) e metanol (MeOH). Em seguida as frações foram concentradas à pressão reduzida, utilizando rotaevaporador (Tecnal TE-211) até redução do volume para aproximadamente 2,0mL.

Análise de CG-EM

A identificação dos componentes químicos do óleo essencial de *L. nobilis* foi realizada por cromatografia gasosa (Agilent, 7890 B) acoplada à espectrometria de massas (Agilent 5977A MSD). A coluna utilizada foi HP-5 MS UI Agilent (30 m x 0,250 mm x 0,25 µm). As condições de análises foram: temperatura do injetor 250 °C com razão de divisão de fluxo split 1:30, temperatura do forno da coluna iniciou à 50 °C, após 3°C/min até 260 °C permanecendo por 2 minutos, a linha de transferência foi mantida a 250 °C e a fonte de íons e quadrupolo, 250 °C e 130°C, respectivamente. O gás hélio (He) foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1 mL/min. O sistema de detecção foi o EM no modo “Scan”, na faixa de razão massa/carga (m/z) de 40-500, com “Solvent Delay” de 5 min.

As amostras de óleo foram diluídas na proporção de 1:1000 com diclorometano, sendo injetado no cromatógrafo 1µL desta diluição. A amostra foi injetada em triplicata. Além dos resultados obtidos por CG/EM, a identificação dos compostos também foi baseada na comparação dos seus índices de retenção (IR) obtidos usando uma série homóloga de n-alcenos (C8-C25). O seu espectro de massas foram comparados com a biblioteca NIST 11 e com a literatura (Adams 2007).

Obtenção dos carrapatos

Aproximadamente 300 fêmeas de *R. microplus* foram coletadas naturalmente de gado infestados de uma fazenda em Umuarama, Paraná, Brasil, com uso suspenso de acaricidas por pelo menos 45 dias antes da realização do estudo. As fêmeas foram usadas no teste e incubadas a 27–28 °C e 70–80% de umidade relativa (UR) por duas semanas até a realização da postura.

Teste de imersão das fêmeas

O teste de imersão seguiu o procedimento proposto por Drummond *et al.* (1973), as fêmeas ingurgitadas foram divididas em seis grupos com dez fêmeas cada, com peso homogêneo ($p > 0.05$). Então cada grupo foi imergido por 5 min nas concentrações do óleo essencial testadas (200,0; 100,0; 50,0; 10,0; 5,0 e 4,0 µL/mL). A solução emulsificante (2,0% Tween 80) foi usada como controle negativo. Depois, cada fêmea foi pesada e mantida individualmente em placas de Petri (6×6 cm) para monitorar a (cada carrapato = unidade experimental). Os grupos experimentais foram mantidos em ambiente climatizado (27±1 °C e UR>80±10 %) e os ovos foram coletados diariamente até a última fêmea. A massa dos ovos coletados de cada fêmea foi colocada em tubos de ensaio, selados com algodão e mantidos em condições de temperatura e umidade acima descritas.

Os seguintes parâmetros biológicos foram avaliados: peso das fêmeas antes da ovoposição, peso das massas dos ovos e porcentagem de eclosão. Com estes valores foi possível calcular a índice de produção de ovos e porcentagem de controle.

O índice de produção de ovos (%IPO) foi obtido de acordo com a equação proposta por Bennett (1974). $IPO = \frac{\text{peso da massa dos ovos}}{\text{peso das fêmeas antes da ovoposição}} \times 100$. A porcentagem de controle dos tratamentos, foi obtida de acordo com Drummond *et al.* (1973). Primeiro, calculou-se o índice de produção estimada (ER): $(\text{peso da massa dos ovos/peso das fêmeas antes da ovoposição}) \times \text{porcentagem de eclosão} \times 20.000$. Depois, foi calculado a porcentagem de controle: $(ER \text{ do grupo controle} - ER \text{ do grupo tratado}) / ER \text{ do grupo controle} \times 100$ (Gomes *et al.* 2012).

Teste de imersão larval

Para o teste de pacotes de larvas (LPT), o óleo essencial foi testado nas concentrações de 25,0; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19; 0,09; 0,04; 0,02 e 0,01 µL/mL e as frações testadas foram a C₆H₁₄:CH₂Cl₂ (9:1), C₆H₁₄:CH₂Cl₂ (5:5), CH₂Cl₂:AcOEt (9:1), CH₂Cl₂:AcOEt (8:2), MeOH nas concentrações que variaram de 25,00 a 0,02 µL/mL e a solução de controle negativo foi idêntica à técnica anterior. No teste, o óleo essencial e as frações foram diluídas em uma solução aquosa contendo 2,0% de um agente emulsionante (Tween 80 v/v).

Para o teste LPT, as larvas foram obtidas das fêmeas ingurgitadas de *R. microplus*. Os testes foram realizados entre 10 e 20 dias após a eclosão, e foram utilizadas apenas as larvas que apresentaram geotropismo negativo. As larvas foram expostas as soluções testes em envelopes de papel filtro (2 x 2 cm) (Fernandes *et al.* 2008). Aproximadamente 100 larvas foram colocadas em cada envelope de papel filtro tratado. Os pacotes com as larvas foram incubadas a 27–28 °C e UR 85–95% por 24 horas. Os envelopes

foram então abertos e inspecionados, as larvas que não apresentaram movimentos e não responderam aos estímulos foram consideradas mortas. Cada tratamento foi realizado em triplicata (Gazim et al. 2011).

Atividade larvicida *Aedes aegypti*

Para os bioensaios foram utilizadas larvas do terceiro estágio do *A. aegypti* oriundas do Núcleo de Controle de Endemias Transmissíveis por Vetores - Secretaria de Vigilância Sanitária do município de Toledo, PR.

O óleo essencial de *L. nobilis* foi diluído em polisorbato 80 a 2 % nas concentrações de 100,0, 50,0; 25,0; 12,5; 6,25; 3,12; 1,56; 0,78; 0,39; 0,19 $\mu\text{L/mL}$. Dez larvas no terceiro estágio de *A. aegypti* foram separadas utilizando uma pipeta de Pasteur e colocadas em frascos de 250 mL com 10 mL das diferentes concentrações do óleo essencial. Para o controle negativo utilizou-se uma solução com polisorbato 80 a 2.0% e como controle positivo utilizou-se um organofosforado a base de Temephós® na concentração de 400 mg/mL. O número de larvas mortas foi obtido após estas serem expostas ao óleo essencial nas diferentes concentrações por 24 horas. As larvas que não apresentaram movimentos e não responderam aos estímulos foram consideradas mortas (Costa et al. 2005).

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o Programa Minitab 17. Os dados processados e submetidos a análise de variância (ANOVA), e as diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%. Concentrações letais (CL) para matar 50% e 99% das larvas e seus respectivos 95% intervalos de confiança (IC) foram calculados pela análise de Probit (software SAS version 9.1).

3.5 Resultados

O óleo essencial de louro obtido por hidrodestilação apresentou um rendimento de 0,67%, sua composição química está demonstrada na Tabela 1. A análise por CG-EM do óleo essencial extraído das folhas frescas identificou 20 componentes, baseado no índice de retenção (IR) e na comparação dos espectros de massas. O óleo essencial de louro contém em sua composição química terpenóides (89,89%) e fenilpropanóides (9,12%). Dentro da classe dos terpenóides contém hidrocarbonetos monoterpênicos (14,07%) e monoterpênicos oxigenados (74,02%), hidrocarbonetos sesquiterpênicos (1,29%) e sesquiterpenos oxigenados (0,51%). A classe dos monoterpênicos oxigenados representa a classe majoritária do óleo essencial, tendo o 1,8-cineol (34,01%) como a substância encontrada em maior quantidade, seguida pelo acetato de linalila (15,81%) e α -terpineol (14,95%) e o fenilpropanóide metil-eugenol (7,74%).

Os constituintes das frações obtidas por cromatografia clássica foram identificadas por CG/EM. A fração $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (9:1) possui o β -felandreno (100%), a fração $\text{C}_6\text{H}_{14}:\text{CH}_2\text{Cl}_2$ (5:5) o α -terpineol com 93,83% e a fração $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$ (8:2) com 79,19% de α -acetato de terpenila, e a fração $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}$ (9:1) apresentou o acetato de linalila como composto majoritário com 90,64%. E a fração MeOH apresenta o 1,8-cineol (100%).

A atividade acaricida do óleo essencial de louro está apresentada na Tabela 2. O óleo essencial de *L. nobilis* nas concentrações de 200,0; 100,0 e 50,0 $\mu\text{L/mL}$ causaram respectivamente a mortalidade de 30, 20 e 10% sobre as fêmeas ingurgitadas, e reduziram a massa dos ovos (44,1; 56,4 e 57,2 mg, respectivamente) e o índice de produção de ovos (29,83, 37,80 e 39,44%, respectivamente) em relação ao grupo controle (99,5 mg e 67,36%, respectivamente). A viabilidade dos ovos foi afetada pelos tratamentos com 10,0; 5,0 e 4,0 $\mu\text{L/mL}$ do óleo essencial com diferenças significativas ($p < 0.05$) em relação ao grupo controle e o percentual de eclodibilidade também foi afetado com diferenças em relação ao grupo controle. A porcentagem de controle com a exposição ao óleo essencial de *L. nobilis* apresentada na Figura 1 mostra que o óleo essencial alcançou 57,9% em 200,0 $\mu\text{L/mL}$ e 45,2; 42,4; 36,6; 26,8 e 14,2 % nas concentrações de 100,0; 50,0; 10,0; 5,0 e 4,0 $\mu\text{L/mL}$, respectivamente.

Tabela 1 Composição química do óleo essencial obtido das folhas de *L. nobilis*.

Componentes	I.R.	Área (%)
Hidrocarbonetos monoterpênicos		14,07
α -felandreno	882	0,33
α -pineno	886	2,72
β -felandreno	1013	7,09
β -pineno	1016	2,45
β -mirceeno	1032	0,87
2-careno	1058	0,32
o-cimeno	1066	0,29
Monoterpenos oxigenados		74,02
1,8-cineol	1074	34,01
γ -terpineno	1099	0,67
<i>p</i> -ment-1-en-8-ol	1107	0,30
acetato de linalila	1145	15,81
L- α -terpineol	1207	0,47
terpinen-4-ol	1218	2,40
α -acetato de terpenila	1233	5,41
α -terpineol	1389	14,95
Hidrocarbonetos sesquiterpênicos		1,29
azuleno	1431	0,55
cariofileno	1457	0,74
Sesquiterpenos oxigenados		0,51
óxido de cariofileno	1614	0,51
Fenilpropanóides		9,12
eugenol	1395	1,38
metil-eugenol	1446	7,74
Total identificado		99,01

I.R.: Índice de Retenção em coluna HP-5 MS.

Tabela 2 Médias do peso da massa das fêmeas antes da ovoposição (mg), peso massa dos ovos (mg), índice de produção de ovos (%IPO) das fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial das folhas de *L. nobilis* sob condições laboratoriais ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e UR $>80\pm 10\%$) e porcentagem de eclodibilidade larval.

Tratamentos	Peso das fêmeas antes da ovoposição (mg)	Peso massa dos ovos (mg)	Índice de reprodução dos ovos (%)	Porcentagem de eclodibilidade larval (%)
Controle – Tween 80 (2%)	151,5 ^a \pm 43,9	99,5 ^a \pm 20,6	67,36 ^a \pm 21,9	93,49 ^a \pm 3,23
4 $\mu\text{L/mL}$	148,7 ^a \pm 37,5	70,7 ^b \pm 17,0	47,54 ^b \pm 13,93	90,16 ^{a,b} \pm 1,12
5 $\mu\text{L/mL}$	146,3 ^a \pm 42,4	68,5 ^{b,c} \pm 21,3	46,82 ^b \pm 9,4	78,20 ^{a,b} \pm 6,95
10 $\mu\text{L/mL}$	148,4 ^a \pm 29,6	63,5 ^c \pm 23,5	42,58 ^{b,c} \pm 5,7	74,07 ^{a,b} \pm 0,15
50 $\mu\text{L/mL}$	146,0 ^a \pm 43,4	57,2 ^{c,d} \pm 26,6	39,44 ^{b,c} \pm 18,3	73,54 ^{a,b} \pm 4,08
100 $\mu\text{L/mL}$	149,2 ^a \pm 33,3	56,4 ^{c,d} \pm 28,5	37,80 ^c \pm 24,9	72,52 ^b \pm 0,72
200 $\mu\text{L/mL}$	147,8 ^a \pm 33,9	44,1 ^d \pm 25,7	29,83 ^d \pm 11,9	70,66 ^b \pm 4,89

Médias seguidas de diferentes letras na mesma coluna diferem significativamente de 5% de significância.

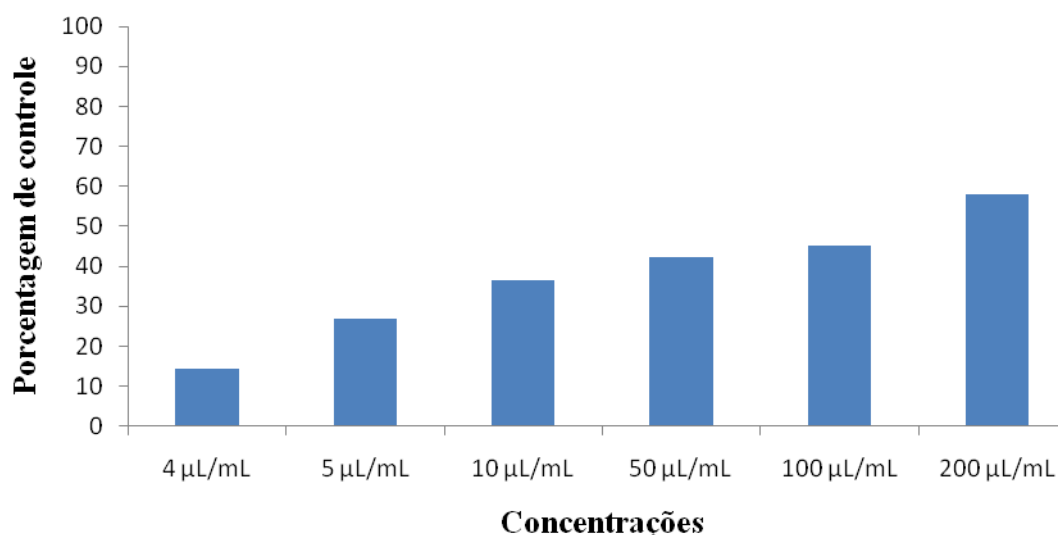


Fig. 1 Percentagem de controle nas fêmeas ingurgitadas de *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) tratadas com diferentes concentrações do óleo essencial das folhas *Laurus nobilis*, sob condições laboratoriais ($27\pm 1^\circ\text{C}$ e $\text{UR}>80\pm 10\%$)

Os resultados para a atividade larvicida pelo teste de imersão larval para as larvas de *R. microplus* constam na Tabela 3. O óleo essencial de louro demonstrou toxicidade sobre as larvas com 100% de mortalidade na concentração de 6,25 µL/mL, o β-felandreno com 100% de mortalidade até 2,5 µL/mL e o 1,8-cineol 38% de mortalidade em 25 µL/mL. A fração C₆H₁₄:CH₂Cl₂ (5:5) apresentou 100% de mortalidade em 5 µL/mL, e as frações CH₂Cl₂:AcOEt (9:1) e CH₂Cl₂:AcOEt (8:2) mostraram 100% de mortalidade em 3,2 e 0,8 µL/mL, respectivamente.

Os resultados para as CL₅₀ e CL₉₉ mostraram que o óleo essencial de louro CL₅₀ 3,52 µL/mL e CL₉₉ de 5,94 µL/mL, a fração CH₂Cl₂:AcOEt (8:2) foi a mais ativa com CL₅₀ de 0,13 µL/mL e CL₉₉ de 0,51 µL/mL, a qual possui o α-acetato de terpenila como composto majoritário, seguida da fração CH₂Cl₂:AcOEt (9:1) com CL₅₀ de 0,75 µL/mL e CL₉₉ de 5,09 µL/mL, que possui o acetato de linalila como majoritário. Já o β-felandreno apresentou CL₅₀ de 1,37 µL/mL e CL₉₉ de 3,22 µL/mL. A fração C₆H₁₄:CH₂Cl₂ (5:5) com CL₅₀ de 2,04 µL/mL e CL₉₉ de 8,70 µL/mL e o 1,8-cineol apresentou CL₅₀ de 27,96 µL/mL e CL₉₉ de 67,34 µL/mL. O controle negativo (Tween 80) não foi tóxico às larvas.

Nos testes com as larvas de *Aedes aegypti* o óleo essencial de *L. nobilis* até a concentração de 0,78 µL/mL foi suficiente para causar 100% de mortalidade, após o óleo essencial foi diluído até 0% de mortalidade para determinar os valores das LC₅₀ de 0,38 µL/mL e LC₉₉ de 0,48 µL/mL.

Tabela 3 Concentração letal CL₅₀ e CL₉₉ do óleo essencial de *Laurus nobilis* e das frações isoladas para as larvas de *Rhipicephalus microplus* com os respectivos intervalos de confiança.

	CL ₅₀ (µL/mL) (IC)	CL ₉₉ (µL/mL) (IC)
Óleo essencial de Louro	3,52 (3,39-3,65) ^b	5,94 (5,55-6,49) ^b
1,8-cineol	27,96 (26,35-30,02) ^a	67,34 (55,65-89,62) ^a
β-felandreno	1,37(1,22-1,56) ^c	3,22 (2,57-4,69) ^b
C ₆ H ₁₄ :CH ₂ Cl ₂ (5:5)	2,04 (1,75-2,38) ^{b,c}	8,70 (6,47-13,52) ^b
CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (9:1)	0,75 (0,68-0,81) ^{c,d}	5,09 (4,22-6,40) ^b
CH ₂ Cl ₂ :AcOEt (8:2)	0,13 (0,12-0,15) ^d	0,51 (0,43-0,62) ^c

CL₅₀: concentração letal 50%; CL₉₉: concentração letal 99%; IC: Intervalo de confiança. Médias seguidas de diferentes letras na mesma coluna diferem significativamente de 5% de significância.

3.6 Discussão

A composição química do óleo essencial das folhas frescas do louro apresenta o 1,8-cineol (34,01%) como composto majoritário. De acordo com Lira *et al.* (2009) o rendimento do óleo essencial de louro obtido por hidrodestilação varia de 0,3 a 1,3%, estando de acordo com o encontrado neste estudo que foi 0,67%. Também foi observado por Moghtader e Salari (2012) e Sellami *et al.* (2011) o 1,8-cineol como constituinte variando de 20 a 62% nas amostras de óleo essencial de louro, como encontrado neste estudo.

O óleo essencial das folhas frescas de louro coletado na região de El Kef da Tunísia foi caracterizado por Sellami *et al.* (2011) que identificou 29 constituintes, com o 1,8-cineol como composto majoritário (61,17%), seguido do metil-eugenol (9,58%) e eugenol (5,19%), o α -acetato de terpenila (0,65%) e não apresentando em sua composição o acetato de linalila, com predominância dos monoterpenos oxigenados como classe majoritária (85,04%). Silveira *et al.* (2012) analisou por CG-EM o óleo essencial de louro de Concórdia (Santa Catarina - Brasil), apresentou o 1,8-cineol (35,50%) como constituinte majoritário, o linalol (14,10%), α -acetato de terpenila (9,65%) e o sabineno (9,45%). As diferenças na composição química do óleo essencial de *L. nobilis* podem ser atribuídas à origem da planta, época de coleta, processo de secagem e a outros fatores como condições climáticas, solo, estado vegetativo e processo de obtenção (Simões *et al.* 2007). Assim, atribui-se que a composição química do óleo essencial de louro obtido neste estudo pode ter sido afetada por estes fatores, pois os demais estudos foram realizados em locais diferentes deste estudo.

A ação acaricida do óleo essencial de louro sobre *R. microplus* foi parcialmente efetiva com controle de 57% em 200 $\mu\text{L/mL}$. Gazim *et al.* (2011) avaliou a ação inibitória do óleo essencial de *Tetradenia riparia* sobre a ovoposição, a qual foi de 100% de inibição da eclosão dos ovos nas concentrações de 1,80% a 12,5%. Ribeiro *et al.* (2010) testaram o óleo essencial de *Hesperozygis ringens* nas concentrações de 50 e 25 $\mu\text{g/mL}$ e observaram efeito inibitório de 95 e 30%, respectivamente na taxa de eclosão dos ovos. Gomes *et al.* (2012) avaliou o óleo essencial de *L. sidoides* inibiu a porcentagem de eclosão dos ovos de *R. microplus* em 54, 57 e 72% para as concentrações de 10, 20 e 30 $\mu\text{L/mL}$, respectivamente, e inibiram 100% de eclosão em 60 e 80 $\mu\text{L/mL}$. Lage *et al.* (2012) estudou a *L. triplinervis* obtiveram as seguintes porcentagens de inibição de eclosão obtidos com a exposição ao óleo em concentrações de 10 e 20 mg/mL foram de 17 e 29%, e de 51% na concentração de 30 mg/mL em as duas concentrações mais elevadas (40 e 50 mg/mL), o controle foi superior a 90%, atingindo 98% na maior concentração.

Investigações feitas por Tabanca *et al.* (2013) avaliaram a ação larvicida do óleo essencial de louro sobre as larvas de *A. aegypti* após 24 h de exposição, porém o óleo essencial não apresentou efeito na dose 125 $\mu\text{g/mL}$ e avaliou também o efeito do composto majoritário o 1,8-cineol e o α -terpineol, ambos não mostraram efeito larvicida na dose de 100 $\mu\text{g/mL}$.

Os resultados mostraram que o óleo essencial de louro e suas frações possuem potencial significativo para controlar as larvas de *R. microplus*. Chagas *et al.* (2002), realizaram um estudo em relação a atividade carrapaticida do *Eucalyptus globulus* que possui o 1,8-cineol como constituinte majoritário e *E. staigeriana* sobre o *R. microplus* mataram 100% das larvas nas concentrações de 200 mg/mL e 100 mg/mL . O óleo essencial de *Cunila incisa* demonstrou 18% de mortalidade em 10 $\mu\text{L/mL}$, sendo a qual possui o 1,8-cineol como composto majoritário (Apel *et al.* 2009).

Está evidenciado na literatura que o composto majoritário 1,8-cineol apresenta ação antibacteriana e antifúngica e também ação inseticida sobre o *Sitophilus oryzae*, *Rhyzopertha dominica*, *Tribolium castaneum*, *Lavandula spica*, *Bemisia argentifolii* e o *Aedes aegypti* com 100% de mortalidade em 100 mg/L (Araújo *et al.* 2003; Rozman *et al.* 2007). Demonstrou ação larvicida na concentração de 10,6% sobre o carrapato bovino com 100% de mortalidade em 5 minutos de exposição (Prates *et al.* 1998).

Outros compostos, que por sua vez, são constituintes do óleo essencial de louro foram estudados quanto ao potencial inseticida como o eugenol que em 5 $\mu\text{L/mL}$ mostrou 100% de mortalidade sobre o *R. microplus* (Monteiro *et al.* 2012) e sobre *Sitophilus oryzae*, *Rhyzopertha dominica* e *Tribolium castaneum* assim como o acetato de linalila. O α -pineno e o β -pineno em 80 mg/mL apresentaram 100% de mortalidade em 10 minutos de exposição sobre as larvas do carrapato bovino (Prates *et al.* 1998).

Dessa forma, fazem necessários novos estudos que sejam realizados utilizando plantas medicinais e aromáticas no controle do carrapato bovino e a associação destas com carrapaticidas químicos já utilizados, no intuito de substituir ou diminuir a concentração destes minimizando os efeitos tóxicos que estes provocam ao animal, homem e ao meio ambiente (Campos *et al.* 2012). Com este intuito a utilização de plantas com ação inseticidas são alternativas viáveis no controle dos insetos (Furlong *et al.* 2007).

Portanto, podemos concluir que o óleo essencial de *L. nobilis* e suas frações apresentaram atividade acaricida sobre as fêmeas ingurgitadas e as larvas de *R. microplus*. O óleo essencial de louro também apresentou ação larvicida sobre as larvas de *A. aegypti*. Assim, a ação do óleo essencial pode estar relacionada à presença destes constituintes destas frações em sua composição. Podendo ser uma alternativa no controle tanto do carrapato e do mosquito. No entanto, são necessários experimentos complementares envolvendo outros estágios de desenvolvimento do carrapato bovino e do mosquito da dengue e testes em condições naturais.

3.7 Agradecimentos

Os autores agradecem pelo apoio financeiro a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

3.8 Referências

- Adams RP (2007) Identification of Essential Oils Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Allured, Carol Stream
- Angelini P, Pagiotti R, Menghini A, Vianello B (2006) Antimicrobial activities of various essential oils against foodborne pathogenic or spoilage moulds. *Annals of Microbiology* 56:65-69
- Apel MA, Ribeiro VL, Bordignon SA, Henriques AT, von Poser G (2009) Chemical composition and toxicity of the essential oils from *Cunila* species (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. *Parasitology Research* 105:863–868
- Araújo ECC, Silveira ER, Lima MAS, Neto MA, Andrade JL, Lima MAA (2003) Insecticidal activity and chemical composition of volatiles oils from *Hyptis martiusii* Benth. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 51:3760-3762
- Bennett GF (1974) Oviposition of *Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acarina: Ixodidae). I Influence of tick size on egg production. *Acarology* 16:52–61
- Brasil (2009) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Diretrizes nacionais para prevenção e controle de epidemias de dengue / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. – Brasília : Ministério da Saúde
- Brasil (2013) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Diretoria Técnica de Gestão. Dengue : diagnóstico e manejo clínico: adulto e criança / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Diretoria Técnica de Gestão. – 4ª ed. – Brasília : Ministério da Saúde
- Campos RNS, Bacci L, Araújo APA, Blank AF, Arrigoni-Blank MF, Santos GRA, Roner MNB (2012) Óleos essenciais de plantas medicinais e aromáticas no controle do carrapato *Rhipicephalus microplus*. *Revista Archivos de Zootecnia* 61: 67-78
- Chagas ACS, Passos WM, Prates HT, Leite RC, Furlong J, Fortes ICP (2002) Acaricide effect of *Eucalyptus* spp. essential oils and concentrated emulsion on *Boophilus microplus*. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science* 39:247–253
- Chagas ACS (2004) Controle de parasitas utilizando extratos vegetais. *Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária* 13:156–160
- Costa JGM, Rodrigues FFG, Angelico EC, Silva MR, Mota ML, Santos NKA, Cardoso ALH, Lemos TLG (2005) Estudo químico- biológico dos óleos essenciais de *Hyptis martiusii*, *Lippia sidoides* e *Syzygium aromaticum* frente às larvas do *Aedes aegypti*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* 15:304–309
- Daemon E et al (2012) Spectroscopic evaluation of thymol dissolved by different methods and influence on acaricidal activity against larvae of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). *Parasitology Research* 111:1901–1906
- Drummond RO, Ernest SE, Trevino JL, Gladney WJ, Graham OH (1973) *Boophilus anulatus* and *Boophilus microplus*: laboratory test of insecticides. *Journal of Economic Entomology* 66:130–133
- El SN, Karagozlu N, Karakaya S, Sahin S (2014) Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils Extracted from *Laurus nobilis* L. Leaves by Using Solvent-Free Microwave and Hydrodistillation. *Food and Nutrition Sciences* 5: 97-106
- Furlong J Carrapato: problemas e soluções. Juiz de Fora: Embrapa Gado de Leite, 2005.
- Furlong J, Martins JR, Prata MCA (2007) O carrapato dos bovinos e a resistência: temos o que comemorar? *A Hora Vet* 27:1–7
- Fernandes FF, Bessa PAD, Freitas EPS (2008) Evaluation of activity of the crude ethanolic extract of *Magonia pubescens* St. Hil (Sapindaceae) against larvae of the cattle tick *Rhipicephalus*

(*Boophilus microplus* (Canestrini, 1887) (Acari: Ixodidae). Brazilian Archives of Biology and Technology 51:1147–1152

Gazim ZC, Demarchi IG, Lonardoni MVC, Amorim ACL, Hovell AMC, Rezende CM, Ferreira GA, Lima ED, Cosmo FA, Cortez DAG (2011) Acaricidal activity of the essential oil *Tetradenia riparia* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Experimental Parasitology 129:175-178

Gomes GA, Monteiro CMO, Senra TOS, Zeringota V, Calmon F, Matos RS, Daemon E, Gois RWS, Santiago GMP, Carvalho MG (2012) Chemical composition and acaricidal activity of essential oil from *Lippia sidoides* on larvae of *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) and larvae and engorged females of *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). Parasitology Research 111:2423-2430

Hoycaen PAS, Pimenta DS (2013) Extrato de plantas medicinais como carrapaticida de *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais 15:627-631

Lage TCA, Montanari RM, Fernandes SA, Monteiro CMO, Senra TOS, Zeringota V, Calmon F, Matos RS, Daemon E (2013) Activity of essential oil of *Lippia triplinervis* Gardner (Verbenaceae) on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae). Parasitology Research 112:863-869

Lira PDL, Retta D, Tkacik E, Ringuet J, Coussio JD, Baren CV, Bandoni AL(2009) Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (*Laurus nobilis* L.) from Argentina. Industrial Crops and Products 30:259-264

Lorenzi H, Matos FJA(2008) Plantas Mediciniais no Brasil Nativas e Exóticas. 2ª ed. São Paulo:Instituto Plantarum

Marques CA (2001) Importância da Família Lauraceae. Floresta e Ambiente8:195-206

Marzouki H, Piras A, Marongiu B, Rosa A, Dessi MA (2008) Extraction and Separation of Volatile and Fixed Oils from Berries of *Laurus nobilis* L. by Supercritical CO₂. Molecules 13:1702-1711

Moghtader M, Salari H (2012) Comparative survey on the essential oil composition from the leaves and flowers of *Laurus nobilis* L. from Kerman province. Journal of Ecology and the Natural Environment 4:150-153

Monteiro CMO, Maturano R, Daemon E, Catunda-Junior FEA, Calmon F, Senra TOS, Faza A, Carvalho MG (2012) Acaricidal activity of eugenol on *Rhipicephalus microplus* (Acari: Ixodidae) and *Dermacentor nitens* (Acari: Ixodidae) larvae. Parasitology Research 111:1295-1300

Ozcan M, Chalchat JC (2005) Effect of Different Locations on the Chemical Composition of Essentials Oils of Laurel (*Laurus nobilis* L.)Leaves Growing Wild in Turkey.Journal of Medicinal Food 8:408-411

Pereira CD, Souza GRL, Baffi MA (2010) Carrapato dos bovinos: métodos de controle e mecanismos de resistência a acaricidas. Planaltina DF: Embrapa dos Cerrados

Prates HT, Santos JP, Waquil JM, Fabris JD, Oliveira AB, Foster JE (1998) Insecticidal Activity of Monoterpenes Against *Rhyzopertha dominica* (F.) and *Tribolium castaneum* (Herbst). Journal of Stored Products Research 34:243-249

Ribeiro VLR, Santos IC, Bordignon SAL, Apel MA, Henriques AT, Poser GL (2010) Acaricidal properties of the essential oil from *Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. Bioresource Technology 101:2506-2509

Rosado-aguilar JA, Aguilar-Caballero A, Rodriguez-Vivas RI, Borges-Argaez R, Garcia-Vazquez Z, Mendez-Gonzalez M (2010) Acaricidal activity of extracts from *Petiveria alliacea* (Phytolaccaceae) against the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). Veterinary Parasitology 168:299–303

Rozman V, Kalinovic I, Korunic Z (2007) Toxicity of naturally occurring compounds of Lamiaceae and Lauraceae to three stored-product insects. Journal of Stored Products Research 43:349–355

Sellami IH, Wannes WA, Bettaieb I, Berrima S, Chahed T, Marzouk B, Limam F (2011) Qualitative and Quatitative changes in the essential oil of *Laurus nobilis* L. leaves as affected by different drying methods. Food Chemistry 126:691-697

SilveiraSM, JúniorAC, ScheuermannGN, SecchiFL, VieiraCRW (2012)Chemical composition and antimicrobial activity of essentials oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and food pathogens.Ciência Rural, 42 (7):1300-1306

Simões CMO, Spitzer V (2007) Óleos voláteis. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR orgs. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6ª ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC

Tabanca N, Avonto C, Wang M, Parcher JF, Ali A, Demirci B, Raman V, Khan IA (2013) Comparative investigation of *Umbelluria californica* and *Laurus nobilis* leaf essential oils and identification of constituents active against *Aedes aegypti*. Journal of Agricultural and Food Chemistry 61:12283-12291

4. ARTIGO 2

Submissão: Journal Essential Oil Research

4.1 Título

Composição química, compostos fenólicos, atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial extraído das folhas de *Laurus nobilis* L. (Lauraceae) coletadas no Sul do Brasil

4.2 Resumo

O óleo essencial das folhas de *Laurus nobilis* foi obtido por hidrodestilação e analisado por cromatografia gasosa/espectrometria de massa (CG/EM). Foram identificados 20 compostos do óleo essencial com 99,01% das áreas dos picos identificados. O composto majoritário do óleo essencial foi o 1,8-cineol com 34,01%. O óleo essencial de louro apresentou 17,57µg equivalentes de ácido gálico/mg de óleo essencial de compostos fenólicos e mostrou atividade antioxidante pelo método DPPH com IC₅₀ de 15,52 mg/mL e as frações CH₂Cl₂:C₆H₁₄(8:2) 9,96 mg/ mL e CH₂Cl₂:C₆H₁₄(7:3) 3,65 mg/mL. O óleo essencial e a fração CH₂Cl₂:AcOEt (9:1) mostraram atividade antibacteriana contra as bactérias *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Proteus mirabilis* e atividade antifúngica contra cepas de *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* com valores de concentração mínima inibitória (CIM) entre 10,00 e 0,31mg/mL.

Palavras-chave

Laurus nobilis, antimicrobiana, antioxidante

4.3 Introdução

Há um crescente aumento em novos estudos na descoberta de substâncias naturais, a fim de se encontrar substâncias com maior eficácia e menor toxicidade à saúde (1). As plantas sintetizam muitos compostos provenientes do metabolismo secundário, com estruturas químicas complexas e muitos deles foram relatados com propriedades antimicrobianas e antioxidantes (2).

Os antioxidantes são compostos que inibem ou retardam significativamente a oxidação de lípidios ou outras moléculas ao inibirem a iniciação ou propagação da reação de oxidação de substratos, que promovem danos que podem contribuir para o envelhecimento e o aparecimento de doenças degenerativas, como câncer, aterosclerose e artrite reumática (3-5).

Os compostos naturais antioxidantes encontrados nas plantas ou outras fontes são, na maioria deles, compostos fenólicos, principalmente tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos, sendo os óleos essenciais fontes destes compostos e também outros constituintes que também apresentam ação antioxidante, tais como monoterpenos, cetonas, aldeídos e hidrocarbonetos (5-6).

Os óleos essenciais também são considerados os agentes antimicrobianos um dos mais importantes presentes em plantas. Foi estabelecido cientificamente que cerca de 60% dos óleos essenciais possuem propriedades antifúngicas e 35% exibem propriedades antibacterianas (7-8). Tendo em vista que é uma grande preocupação em nível mundial a pesquisa de novos agentes antimicrobianos devido ao surgimento de micro-organismos resistentes, que ocasionam um enorme problema à saúde pública em países desenvolvidos e em desenvolvimento, e tem aumentado drasticamente nos últimos anos (9).

Os óleos essenciais destacaram-se como produto natural, por ser um produto de uso multifuncional, ter grande aceitação dos consumidores e pelos riscos dos aditivos sintéticos oferecem à saúde. São alvos de pesquisa com a finalidade de conservação, com aplicações em alimentos, lavouras, produtos farmacêuticos e cosméticos. Dentre as plantas produtoras de óleos essenciais, as ervas e especiarias têm despertado grande interesse devido o uso como condimentos devido às propriedades antioxidantes e antimicrobianas (10-11).

O *Laurus nobilis* L. é uma árvore nativa da Ásia pertencente à família Lauraceae, conhecido popularmente como louro, é cultivado no Sul e Sudeste do Brasil (12-13). É uma planta condimentar aromática muito utilizada na culinária devido ao seu aroma e as folhas são usadas na medicina popular tradicional por meio de infusão ou decocção, sendo considerada estimulante das afecções gástricas e reumáticas, usada externamente contra reumatismo e como antisséptico para caspas e piolhos (12-14).

As folhas do louro tem ampla utilização nas indústrias alimentícias, cosméticas e de perfumaria, destacando o óleo essencial com maior valor agregado. O óleo essencial apresenta quantidades elevadas de fitoativos, entre eles os terpenos, que tem sido amplamente estudados, devidos a atividades antibacteriana, antifúngica, antioxidante, anti-inflamatória, inseticida e repelente, antiviral, analgésica, anticolinesterásica e baixo efeito sedativo (15-17).

Esta pesquisa tem intuito de caracterizar a composição química do óleo essencial, quantificar os compostos fenólicos e avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial e das frações obtido das folhas de *L. nobilis* coletadas no Sul do Brasil.

4.4 Experimental

Coleta da planta

As folhas de *Laurus nobilis* L. foram coletadas em maio de 2014 em Pérola – Paraná, Brasil. A excisata está depositada no Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNOP), sob o número 1615.

Extração do óleo essencial

O óleo essencial foi obtido das folhas frescas do louro por hidrodestilação usando aparelho tipo Clevenger por 2 horas. O óleo essencial foi coletado, seco com sulfato de sódio, e estocado em frasco âmbar a 4°C.

Isolamento das frações do óleo essencial de *L. nobilis*

Uma amostra de 4,0 g de óleo essencial foi submetido à cromatografia em coluna utilizando sílica gel 60 (0,01-0,20 mm) como fase estacionária (FE) na proporção 1:25, sendo esta ativada anteriormente por aquecimento à 90 °C por 45 minutos. A amostra foi eluída sequencialmente com 100 mL de hexano (C₆H₁₄), hexano:diclorometano (C₆H₁₄:CH₂Cl₂)(9:1; 8:2; 7:3 e 5:5), diclorometano-hexano (CH₂Cl₂:C₆H₁₄)(7:3; 8:2; 9:1), diclorometano (CH₂Cl₂), diclorometano-acetato de etila (CH₂Cl₂:AcOEt) (9:1; 8:2; 7:3 e 5:5), acetato de etila:diclorometano (AcOEt :CH₂Cl₂) (7:3; 8:2; 9:1), acetato de etila (AcOEt), acetato de etila:metanol (AcOEt:MeOH) (9:1; 8:2; 7:3 e 5:5), metanol:acetato de etila (MeOH:AcOEt) (7:3; 8:2; 9:1) e metanol (MeOH). Em seguida as frações foram concentradas à pressão reduzida, utilizando evaporador rotatório (Tecnal TE-211) até redução do volume para aproximadamente 2 mL.

Análise de CG-EM

A identificação dos componentes químicos do óleo essencial de *L. nobilis* foi realizada por cromatografia gasosa (Agilent, 7890 B) acoplada à espectrometria de massas (Agilent 5977A MSD). A coluna utilizada foi HP-5 MS UI Agilent (30 m x 0,250 mm x 0,25 µm). As condições de análises foram: temperatura do injetor 250 °C com razão de divisão de fluxo split 1:30, temperatura do forno da coluna iniciou em 50 °C, depois 3°C/min até 260 °C permanecendo por 2 minutos, a linha de transferência foi mantida a 250 °C e a fonte de íons e quadrupolo, 250 °C e 130°C, respectivamente. O gás He foi utilizado como gás de arraste com fluxo de 1 mL/min. O sistema de detecção foi o EM no modo “Scan”, na faixa de razão massa/carga (*m/z*) de 40-500, com “Solvent Delay” de 5 min. As amostras de óleo foram diluídas na proporção de 1:1000 com diclorometano, sendo injetado no cromatógrafo 1 µL desta diluição. A amostra foi injetada em triplicata. Além dos resultados obtidos por CG/EM, a identificação dos compostos também foi baseada na comparação dos seus índices de retenção (IR) obtidos usando uma série homóloga de n-alcenos (C8-C25). O seu espectro de massa foram comparados com a biblioteca NIST 11 e com a literatura (18).

Quantificação de compostos fenólicos

A quantificação de compostos fenólicos foi realizada utilizando o reagente Folin-Ciocalteu. O óleo essencial foi dissolvido em metanol, a fim de se obter uma concentração de 1,0 mg/mL. (19). A quantidade total de fenóis de cada óleo essencial foi quantificada por meio de uma curva padrão preparada com ácido gálico nas seguintes concentrações: 10, 20, 40, 60, 80, 100 µg/mL. A partir da curva, foi calculado um coeficiente de determinação (R²). Para a reação, uma alíquota de 0,3 mL da

solução metanólica de óleo essencial foi adicionada de 2,5 mL de solução aquosa do reagente Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi incubada por 15 minutos em banho-maria (BIOPAR) a 50 °C e, posteriormente, a absorvância foi medida em espectrofotômetro (UV/VIS Shimadzu 1601PC) a 760 nm. O branco foi obtido substituindo-se o volume de amostra por água, mantendo-se as mesmas quantidades de reagente de Folin-Ciocalteu e solução de carbonato de sódio. Os resultados foram expressos em µg equivalentes de ácido gálico (EAG) por mg de amostra. Cada ensaio foi realizado em triplicata.

Atividade antioxidante pelo método DPPH

Para a avaliação da atividade antioxidante foi avaliada a capacidade sequestrante do radical DPPH (2,2-difenil-1-picrihidrazila) pelo óleo essencial. O óleo essencial e as frações foram avaliados nas concentrações de 5,0; 2,5; 1,25 e 0,625 mg/mL, todos diluídos em metanol. A 0,1 mL de cada diluição da amostra foi adicionado 3,9 mL da solução de DPPH 60 µM em metanol. Após 25 minutos à temperatura ambiente, foram realizadas as leituras das absorvâncias em espectrofotômetro (UV/VIS Shimadzu 1601PC) a 515 nm. Como controle negativo foi utilizada a solução de DPPH 60 µM com metanol e como controle positivo a quercetina. Metanol foi usado como branco. O ensaio foi realizado em triplicata e o cálculo da porcentagem de inibição de radicais livres seguiu a Equação 1:

$$\% \text{ de inibição} = \frac{\text{Abs}_{\text{controle}} - \text{Abs}_{\text{amostra}}}{\text{Abs}_{\text{controle}}} \times 100 \quad (1)$$

Onde: $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ é a absorvância da amostra e $\text{Abs}_{\text{controle}}$ é a absorvância da solução de DPPH em metanol. Após o cálculo, foi construído um gráfico de porcentagem de inibição versus a concentração de óleo essencial. Através da equação deste gráfico, foi possível calcular o valor de IC_{50} (20).

Teste de disco-difusão em ágar

O óleo essencial foi testado contra as bactérias: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 13883 e ATCC 70603, *Proteus mirabilis* ATCC 7002, *Pseudomonas aeruginosa* 27853 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, as leveduras *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida krusei* ATCC 20298, *Candida parapsilosis* ATCC 20019, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Cryptococcus gattii* L21/01 e *Cryptococcus neoformans* H99, e os fungos filamentosos *Aspergillus niger* IC (isolado clínico), *Aspergillus flavus* IMI 190443, *Aspergillus fumigatus* ATCC 16913. Para o teste de disco-difusão foi utilizado o óleo essencial bruto, com a aplicação de 4 µL do óleo essencial em discos de papel filtro estéreis de 4 mm de diâmetro. Foi utilizado o disco impregnado com o controle positivo (CP) cloranfenicol (30 µg/disco) e cetoconazol (300 µg/disco) (21-22). Após, os discos impregnados foram colocados sobre o meio de cultura Mueller-Hinton e Mueller-Hinton suplementado com 2% de glicose e 0,5 µg/mL de azul de metileno (23) para fungos previamente inoculados com as cargas microbianas com turvação equivalente ao tubo 0,5 da Escala Mc Farland (1×10^8 UFC/mL) nas placas de Petri, que foram incubadas a 35°C por 24 horas para bactérias, 48 horas para leveduras e fungos filamentosos. Após o tempo de incubação foram realizadas as leituras dos halos de inibição. O diâmetro dos halos de inibição, incluindo o diâmetro do disco, foram medidos em milímetros (mm) com o auxílio de um paquímetro. O experimento foi realizado em triplicata.

Determinação da concentração mínima inibitória (CIM)

Para os micro-organismos sensíveis ao óleo essencial foram determinados a concentração mínima inibitória. Primeiramente preparou-se uma solução do óleo essencial de 80 mg/mL diluído em Polisorbato 80 a 2% (Tween 80) em Caldo Muller-Hinton para as bactérias e Caldo Muller Hinton suplementado com 2% de glicose para fungos e leveduras. Realizou-se a distribuição de 100 µL do meio de cultura em poços de uma placa de microdiluição; a seguir, acrescentou-se 200 µL da solução do óleo essencial ao segundo poço e, após homogeneização, transferiu-se para o terceiro e assim sucessivamente

até o décimo poço, obtendo-se concentrações finais de: 40,0; 20,0; 10,0; 5,0; 2,5; 1,25; 0,62 e 0,31mg/mL. Preparou-se uma suspensão microbiana em solução salina, com turvação equivalente ao tubo 0,5 da Escala Mc Farland (1×10^8 UFC/mL). A seguir, diluiu-se a suspensão bacteriana 1:10 em caldo Muller-Hinton, obtendo-se como inóculo 1×10^7 UFC/mL e a suspensão de levedura diluiu-se 1:50 seguida de diluição 1:20 em Caldo Muller Hinton modificado para fungos, obtendo-se como inóculo 1×10^5 UFC/mL. Desta suspensão, inoculou-se 100µL em cada poço já contendo as concentrações do óleo essencial, realizado em triplicata. Realizou-se o controle de esterilidade no poço um, o controle de toxicidade com o polisorbato 80 a 2% em meio de cultura no poço onze e no poço doze realizou-se o controle de crescimento onde foi aplicado a suspensão microbiana em meio de cultura. Incubou-se as microplacas à 35°C por 24h em condições de aerobiose. A determinação da CIM consistiu-se em examinar a placa, onde registrou-se a menor concentração do óleo essencial capaz de causar inibição total do crescimento (24). O mesmo procedimento foi realizado com as frações do óleo essencial com uma solução inicial de 20 mg/mL.

Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas com o Programa Minitab 17. Os dados foram processados e submetidos a análise de variância (ANOVA), e as diferenças entre as médias foram determinadas pelo teste de Tukey com nível de significância de 5%.

4.5 Resultados e Discussão

O óleo essencial de louro obtido por hidrodestilação apresentou um rendimento de 0,67%, sua composição química está demonstrada na (Tabela I). A análise por CG-EM do óleo essencial extraído das folhas frescas identificou 20 componentes, baseado no índice de retenção (IR) e na comparação dos espectros de massas. O óleo essencial de louro contém em sua composição química terpenóides (89,89%) e fenilpropanóides (9,12%). Dentro da classe dos terpenóides contém hidrocarbonetos monoterpênicos (14,07%) e monoterpênicos oxigenados (74,02%), sesquiterpenos hidrocarbônicos (1,29%) e sesquiterpenos oxigenados (0,51%). A classe de monoterpênicos oxigenados representa a classe majoritária do óleo essencial, tendo o 1,8-cineol (34,01%) como a substância encontrada em maior quantidade, seguida pelo acetato de linalila (15,81%) e α -terpineol (14,95%) e o metil-eugenol (7,74%).

A composição química do óleo essencial das folhas frescas do louro apresenta o 1,8-cineol (34,01%) como composto majoritário. De acordo com Lira *et al.* (25) o rendimento do óleo essencial de louro obtido por hidrodestilação varia de 0.3 a 1.3%, estando de acordo com o encontrado neste estudo que foi 0,67%. Também foi observado por Moghtader e Salari (26) e Sellami *et al.* (27) o 1,8-cineol como constituinte variando de 20 a 62% nas amostras de óleo essencial de louro, como encontrado neste estudo.

O óleo essencial das folhas frescas de louro da província de Hatay na Turquia foi caracterizado por Dadalioglu e Evrendilek (28) que identificaram 12 componentes do óleo essencial o 1,8-cineol (60,72%), α -terpineno(12,53%) e o sabineno(12,12%) como constituintes majoritários e em menores quantidades o eugenol (0,53%) e metil-eugenol (0,68%) e ausência do α -acetato de terpenila e a presença dos hidrocarbonetos monoterpênicos β -terpineno e γ -terpineno e o hidrocarboneto sesquiterpênico β -cariofileno (0,40%).Silveira *et al.* (29) analisou por CG-EM o óleo essencial de louro de Concórdia (Santa Catarina - Brasil), apresentou o 1,8-cineol (35,50%) como constituinte majoritário, o linalol (14,10%), α -acetato de terpenila (9,65%) e o sabineno (9,45%).As diferenças na composição química do óleo essencial de *L. nobilis* podem ser atribuídas à origem da planta, época de coleta, processo de secagem e a outros fatores como condições climáticas, solo, estado vegetativo e processo de obtenção (30). Assim, atribui-se que a composição química do óleo essencial de louro obtido neste estudo pode ter sido afetada por estes fatores, pois os demais estudos foram realizados em locais diferentes deste estudo.

Tabela I. Composição química do óleo essencial obtido das folhas de *L. nobilis*.

SI No	Constituintes do óleo essencial	Área (%)	I.R.
	Hidrocarbonetos monoterpênicos	14,07	
1	α -felandreno	0,33	882
2	α -pineno	2,72	886
3	β -felandreno	7,09	1013
4	β -pineno	2,45	1016
5	β -mirceno	0,87	1032
6	2-careno	0,32	1058
7	o-cimeno	0,29	1066
	Monoterpenos oxigenados	74,02	
8	1,8-cineol	34,01	1074
9	γ -terpineno	0,67	1099
10	<i>p</i> -ment-1-en-8-ol	0,30	1107
11	acetato de linalila	15,81	1145
12	L- α -terpineol	0,47	1207
13	terpinen-4-ol	2,40	1218
14	α -acetato de terpenila	5,41	1233
15	α -terpineol	14,95	1389
	Hidrocarbonetos sesquiterpênicos	1,29	
17	azuleno	0,55	1431
19	cariofileno	0,74	1457
	Sesquiterpenos oxigenados	0,51	
20	óxido de cariofileno	0,51	1614
	Fenilpropanóides	9,12	
16	eugenol	1,38	1395
18	metil-eugenol	7,74	1446
	Total identificado	99,01	

I.R.: Índice de Retenção em coluna HP-5 MS.

Os constituintes das frações obtidas por cromatografia clássica foram identificadas por CG/EM. A fração $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{C}_6\text{H}_{14}(7:3)$ possui o α -terpineol (54,75%), 1,8-cineol (30,89%), eugenol (4,50%) e metil-eugenol (9,90%) e a fração $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{C}_6\text{H}_{14}(8:2)$ 1,8-cineol (77,48%), metil-eugenol (21,23%) e α -terpineol (1,29%). A fração $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{AcOEt}(9:1)$ apresentou o acetato de linalila como composto majoritário com 90,64%. E a fração MeOH 100% apresenta o 1,8-cineol (100%).

O óleo essencial de *L. nobilis* apresentou $17,57 \pm 0,7$ μg equivalentes de ácido gálico/mg de óleo essencial, estando coerente com a composição química do óleo essencial que possui 9,12% de fenilpropanóides, tendo os compostos fenólicos eugenol e metil-eugenol em sua constituição, já que os demais componentes do óleo essencial são terpenóides.

O óleo essencial de *L. nobilis* apresentou atividade antioxidante pelo método do DPPH (Tabela II), foi capaz de inibir 50% do radical DPPH em 15,52 mg/mL, suas frações foram mais ativas com IC_{50} de 3,65 e 9,96 mg/mL para $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{C}_6\text{H}_{14}(7:3)$ e $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{C}_6\text{H}_{14}(8:2)$, respectivamente. Ambas as frações apresentam o metil-eugenol em sua composição, sendo este em maior concentração na fração mais ativa. O eugenol e o metil-eugenol tem atividade antioxidante conhecidas relatadas por vários estudos, o eugenol presente na fração $\text{CH}_2\text{Cl}_2:\text{C}_6\text{H}_{14}(8:2)$ inibe o processo de peroxidação lipídica induzida por espécies reativas de oxigênio, ou seja, radicais livres (6, 31-32). Assim podem ser considerados os principais responsáveis pela atividade antioxidante. Basak e Candan *et al.* (33) obtiveram IC_{50} de 0,575 $\mu\text{L}/\text{mL}$ para o óleo essencial de louro e os constituintes majoritários o 1,8-cineol e α -pineno não apresentaram inibição do radical DPPH. El *et al.* (15) estudaram a atividade antioxidante do óleo essencial de louro da Turquia e relataram que em 0,03 mg/mL inibiu 83.3% o radical DPPH.

Tabela II. Atividade antioxidante do óleo essencial e das frações do louro pelo método do DPPH

	DPPH (mg/mL)
Óleo essencial	15,52±2,11 ^a
CH ₂ Cl ₂ :C ₆ H ₁₄ :7:3	3,65±0,07 ^c
CH ₂ Cl ₂ :C ₆ H ₁₄ :8:2	9,96±0,62 ^b
Quercetina	0,042 ^d

Médias seguidas de diferentes letras na mesma coluna diferem significativamente de 5% de significância.

Na (Tabela III) está demonstrado os resultados da atividade antimicrobiana em teste de difusão em ágar, o óleo essencial apresentou efeito similar ao cloranfenicol contra *K. pneumoniae* ATCC 13883 com halo de inibição de 9±2 mm e 10±2 mm, respectivamente, e demonstrou inibição contra a bactérias Gram-negativa *E. coli* e *P. mirabilis*, porém com halo de inibição inferior ao controle positivo.

Tabela III. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *L. nobilis* avaliado pelo teste de difusão em ágar (mm)

Micro-organismos	Óleo essencial <i>L. nobilis</i>	Cloranfenicol (30µg/disco)	Cetoconazol (300µg/disco)
<i>S. aureus</i>	0±0 ^b	31±1 ^a	-
<i>E. coli</i>	12±1 ^b	31±0 ^a	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 13883	9±2 ^a	10±2 ^a	-
<i>K. pneumoniae</i> ATCC 700603	0±0 ^b	11±1 ^a	-
<i>P. mirabilis</i>	12±2 ^b	16±1 ^a	-
<i>P. aeruginosa</i>	0±0 ^b	12±2 ^a	-
<i>C. albicans</i>	15±1 ^b	-	31±3 ^a
<i>C. krusei</i>	15±1 ^b	-	22±2 ^a
<i>C. parapsilosis</i>	17±3 ^a	-	19±2 ^a
<i>C. tropicalis</i>	20±3 ^b	-	40±1 ^a
<i>C. gattii</i>	18±3 ^b	-	26±2 ^a
<i>C. neoformans</i>	15±1 ^a	-	15±1 ^a
<i>A. niger</i>	0±0 ^b	-	15±1 ^a
<i>A. flavus</i>	0±0 ^b	-	18±3 ^a
<i>A. fumigatus</i>	0±0 ^b	-	16±2 ^a

- : não testado; Médias e desvio padrão.

Médias seguidas de diferentes letras na mesma coluna diferem significativamente de 5% de significância.

Em relação às leveduras, o óleo essencial de *L. nobilis* demonstrou inibição similar ao cetoconazol contra a *C. parapsilosis* com halos de inibição de 17±2 mm e 19±2 mm, respectivamente, e *C. neoformans* 15±1 mm e 15±1 mm, respectivamente, e apresentou inibição frente a *C. albicans* com halo de inibição de 15±1 mm, *C. krusei* 15±1 mm, *C. tropicalis* 20±2 mm e *C. gathi* 18±3 mm, entretanto com halos de inibição inferiores ao cetoconazol. E não apresentou ação antimicrobiana contra aos fungos filamentosos *A. niger*, *A. flavus* e *A. fumigatus* e as bactérias *S. aureus*, *K. pneumoniae* ATCC 700603 e *P. aeruginosa*.

De modo geral, o óleo essencial de louro apresentou maior atividade sobre as leveduras do que sobre as bactérias testadas e não possuiu ação antimicrobiana contra as cepas de fungos filamentosos analisados. Silveira *et al.* (29) relataram que o óleo essencial de das folhas de louro coletado em Santa-atarina (PR) - Brasil inibiu fortemente a bactéria Gram-negativa *E. coli* (24,5±0,7 mm) e teve ação moderada sobre a *S. aureus* (18,9±0,5 mm), e não foi ativo contra a *P. aeruginosa*. Ertuket *al.* (34) estudaram o potencial antimicrobiano do óleo essencial de louro proveniente da Turquia, o óleo essencial inibiu as cepas de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *C. albicans* e *A. niger*.

Os resultados da concentração mínima inibitória (CIM) do óleo essencial e das frações constam na (Tabela IV). O óleo essencial de louro obteve CIM de 5mg/mL para as bactérias Gram-negativas *E. coli* e *K. pneumoniae*, enquanto para o *P. mirabilis* foi de 10 mg/mL. Para as leveduras do gênero *Candida*, apresentou CIM de 5 mg/mL para a *C. krusei* e *C. tropicalis* e 10 mg/mL para *C. albicans* e *C. parapsilosis*. Para as leveduras *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* o CIM de 0,31 e 0,62 mg/mL. A

fração CH₂Cl₂:AcOEt (9:1) apresentou ação antibacteriana contra a *E. coli* com CIM de 10 mg/mL e antifúngica contra as leveduras do gênero *Candida*, com valores CIM superiores ao óleo essencial, em relação ao gênero *Cryptococcus* apresentou efeito semelhante em relação ao *C. neoformans* e CIM de 0,62 mg/mL para o *C. gattii*, porém ação inferior ao óleo essencial, a ação desta fração pode ser atribuída ao acetato de linalila seu constituinte majoritário. A fração MeOH 100% não apresentou ação antimicrobiana em 10 mg/mL.

Tabela IV. Concentração mínima inibitória do óleo essencial e as frações de *L. nobilis* (mg/mL)

	Óleo essencial de louro	CH ₂ Cl ₂ :AcOEt9:1	MeOH 100%
<i>E. coli</i>	5 ^c	10 ^b	>10 ^a
<i>K. pneumoniae</i>	5 ^c	>10 ^a	>10 ^a
<i>P. mirabilis</i>	10 ^c	>10 ^a	>10 ^a
<i>C. albicans</i>	5 ^b	1.25 ^c	>10 ^a
<i>C. krusei</i>	10 ^b	2.5 ^c	>10 ^a
<i>C. parapsilosis</i>	5 ^b	2.5 ^c	>10 ^a
<i>C. tropicalis</i>	10 ^b	1.25 ^c	>10 ^a
<i>C. gattii</i>	0.31 ^c	0.62 ^b	>10 ^a
<i>C. neoformans</i>	0.62 ^c	0.62 ^c	>10 ^a

Médias seguidas de diferentes letras na mesma coluna diferem significativamente de 5% de significância.

As diferenças nas atividades biológicas entre este estudo e aquelas relatadas na literatura devem-se diferenças na composição química do óleo essencial de louro que influencia diretamente na atividade biológica. Estudos recentes têm mostrado a atividade antimicrobiana do óleo essencial de louro em diferentes micro-organismos (15-17). No entanto, é a primeira vez que a atividade antifúngica contra as cepas de *Candida krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans* tem sido demonstrada. Ozcan *et al.* (35) determinou o CIM do óleo essencial de louro coletado em Harbiye – Turquia das cepas de *E. coli* e *C. albicans* com CIM de 4,0 e 0,1 mg/mL, respectivamente. Silveira *et al.* (29) relataram CIM de 2,5 mg/mL para *E. coli*. E o óleo essencial proveniente do Marrocos mostrou CIM de 0,7 mg/mL para *K. pneumoniae* (16).

Monoterpenos e sesquiterpenos com anéis aromáticos e grupos fenólicos são capazes de formar ligações de hidrogênio com sítios ativos de enzimas alvos, sendo a principal explicação do efeito antimicrobiano dos óleos essenciais, outros como álcoois, aldeídos e ésteres também contribuem para a atividade antimicrobiana (36). O composto majoritário do óleo essencial o 1,8-cineol exibiu atividade antibacteriana contra as cepas *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus*, *S. intermedius* e *Bacillus subtilis* (37). Outros constituintes do óleo essencial o α -pineno, β -pineno, eugenol e o terpinen-4-ol tem atividade antibacteriana (38-39). O acetato de linalila apresentou atividade antibacteriana sobre as cepas de *S. aureus* e *E. coli* com CIM de 1,25 e 5,00 mg/mL, respectivamente (40). Tadtong *et al.* (41) avaliaram a atividade antimicrobiana de óleos essenciais misturados com acetato de linalila e observaram que o efeito antimicrobiano com a acumulação de componentes ativos, tais como acetato de linalila foram mais expressivos que o óleo essencial bruto. Marcos-Arias *et al.* (42) testou os compostos isolados eugenol, terpinen-4-ol e α -terpineol sobre as cepas de *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, todos apresentaram efeito antifúngico.

Provavelmente em nossa investigação foi a primeira vez que documentou-se a atividade antifúngica do óleo essencial e das frações contra as cepas *Candida krusei*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis* e *Cryptococcus gattii* e *C. neoformans*. Portanto, o óleo essencial de louro apresentou propriedades antioxidante e antimicrobiana, assim como as frações isoladas deste, podendo estas propriedades do óleo essencial estar relacionada à presença destes constituintes em sua composição, podendo ser uma alternativa promissora contra esses patógenos. No entanto, são necessários estudos da toxicidade dessas substâncias e experimentos *in vivo* para confirmação.

4.6 Agradecimentos

Os autores agradecem pelo apoio financeiro a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

4.7 Referências

1. A. Demo, C. Petrakis, P. Kefalas, D. Boskou, *Nutrient antioxidants in some herbs and Mediterranean plant leaves*. Food Research International, **31(5)**, 351-354 (1998).
2. A.E. Edris, *Pharmaceutical and Therapeutic Potentials of Essential Oils and Their Individual Volatile Constituents: A Review*. Phytotherapy Research, **21**, 308-323 (2007).
3. B. Halliwell, *Free radicals and antioxidants: a personal view*. Nutrition Reviews, **52 (8)**, 253-265 (1994).
4. A. Matkowski, *Plant in vitro culture for the production of antioxidants*. Biotechnology Advances, **26**, 548-560 (2008).
5. T.C.L. Silva, C.C.B.R. Almeida, J. Veras Filho, T.J.S. Peixoto Sobrinho, E.L.C. Amorim, E.P. Costa, J.M. Araújo, *Atividades antioxidante e antimicrobiana de Ziziphus joazeiro mart. (Rhamnaceae): avaliação comparativa entre cascas e folhas*. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada, **32 (2)**, 193-199 (2011).
6. H.J.D. Dorman, P. Surai, S.G. Deans, *In vitro antioxidant activity of a number of plant essential oils and phytoconstituents*. Journal Essential Oil Research, **12(2)**, 241-248 (2000).
7. M.M. Cowan, *Plant Products as Antimicrobial Agents*. Clinical Microbiology Reviews, **12 (4)**, 564-582(1999).
8. C. Valeriano, R.H. Piccoli, M.G. Cardoso, E. Alves, *Atividade antimicrobiana de óleos essenciais em bactérias patogênicas de origem alimentar*. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, **14 (1)**, 57-67(2012).
9. F.S. Santos, M.G.M. Novales, *Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents*. Current Opinion in Biotechnology, **23**, 136-141(2012).
10. B.F.M.T. Andrade, L.N. Barbosa, I.S. Probst, A.F. Junior, *Antimicrobial Activity of Essential Oils*. Journal Essential Oil Research, **26 (1)**, 34-40 (2014).
11. C.A.S.F. Miranda, M.G. Cardoso, S.M.F. Machado, M.S. Gomes, J. Andrade, M.L. Teixeira, *Correlação entre composição química e eficácia antioxidante de óleos essenciais de plantas condimentares por análise de agrupamentos hierárquicos (HCA)*. E-xacta Belo Horizonte, **7(1)**, 65-74 (2014).
12. H. Lorenzi, F.J.A. Matos, *Plantas Mediciniais no Brasil Nativas e Exóticas*, 2 ed. Instituto Plantarum: São Paulo (2008).
13. C.A. Marques, *Importância da Família Lauraceae*. Floresta e Ambiente, **8 (1)**, 195-206 (2001).
14. A.B Joly, *Botânica: Introdução à taxonomia vegetal*. Editora Nacional: São Paulo (1993).
15. P. Angelini, R. Pagiotti, A. Menghini, B. Vianello, *Antimicrobial activities of various essential oils against foodborne pathogenic or spoilage moulds*. Annals of Microbiology, **56 (1)**, 65-69(2006).
16. E. Derwich, Z. Benziane, A. Boukir, *Chemical Composition and Antibacterial Activity of Leaves Essential Oil of Laurusnobilis from Morocco*. Australian Journal of Basic and Applied Sciences, **3 (4)**, 3818-3824(2009).
17. S.N. EL, N. Karagozlu, S. Karakaya, S. Sahin, *Antioxidant and Antimicrobial Activities of Essential Oils Extracted from Laurusnobilis L. Leaves by Using Solvent-Free Microwave and Hydrodistillation*. Food and Nutrition Sciences, **5**, 97-106(2014).
18. R.P Adams, *Identification of essential oil components by gas chromatography / mass spectroscopy*. Allured Publishing Corporation: Carol Stream, IL, USA(2007).
19. M. Viuda-Martos, Y.R. Navajas, E.S. Zapata, J. Fernández, J.A. Pérez-Álvarez, *Antioxidant activity of essential oils of five spice plants widely used in a Mediterranean diet*. Flavour and Fragrance Journal, **25**, 13-19(2010).
20. M.S.M. Rufino, R.E. Alves, E.S. Brito, S.M. Morais, C.G. Sampaio, J. Pérez-Jiménez, F.D. Saura-Calixto, *Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH*. Comunicado Técnico Embrapa, **127**, 1-4 (2007).

21. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). *Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests: approved standard*. 8 ed. 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA (2003a) (CLSI document M2-A8).
22. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). *Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts: approved guideline*. 2ed. 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA (2009) (CLSI document M44-A2).
23. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). *Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard*. 3ed. 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA (2008) (CLSI document M27-A3).
24. CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: approved standard*. 8 ed. 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA (2003b) (CLSI document M7-A6).
25. P.D.L Lira, D. Retta, E. Tkacik, J. Ringuélet, J.D. Coussio, C. Van Baren, A.L. Bandoni, *Essential oil and by-products of distillation of bay leaves (Laurusnobilis L.) from Argentina*. *Industrial Crops and Products*, **30**, 259-264 (2009).
26. M. Moghtader, H. Salari, *Comparative survey on the essential oil composition from the leaves and flowers of Laurus nobilis L. from Kerman province*. *Journal of Ecology and the Natural Environment*, **4 (6)**, 150-153 (2012).
27. I.H. Sellami, W.A. Wannas, I. Bettaieb, S. Berrima, T. Chahed, B. Marzouk, F. Limam, *Qualitative and quantitative changes in the essential oil of Laurusnobilis L. leaves as affected by different drying methods*. *Food Chemistry*, **126**, 691-697 (2011).
28. I. Dadalioglu, G.A. Evrendilek, *Chemical Compositions and Antibacterial Effects of Essential Oils of Turkish Oregano (Origanum minutiflorum), Bay Laurel (Laurus nobilis), Spanish Lavender (Lavandula stoechas L.) and Fennel (Foeniculum vulgare) on Common Foodborne Pathogens*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 8255-8260 (2004).
29. S.M. Silveira, A.C. Júnior, G.N. Scheuermann, F.L. Secchi, C.R.W. Vieira, *Chemical composition and antimicrobial activity of essential oils from selected herbs cultivated in the South of Brazil against food spoilage and food pathogens*. *Ciência Rural*, **42 (7)**, 1300-1306 (2012).
30. C.M.O. Simões, V. Spitzer, Óleos Voláteis. In: C.M.O. Simões, E.P. Schenkel, G. Gosmann, J.C.P. Mello, L.A. Mentz, P.R. Petrovick, *Farmacognosia: da planta ao medicamento*. 5 ed. Editora da UFRGS/Editora da UFSC: Porto Alegre/Florianópolis (2007).
31. M. Ogata, M. Hoshi, S. Urano, T. Endo, *Antioxidant Activity of Eugenol and Related Monomeric and Dimeric Compounds*. *Chemical and Pharmaceutical Bulletin*, **48 (10)**, 1467-1469 (2000).
32. C.A.M. Pereira, J.F. Maia, *Estudo da atividade antioxidante do extrato e do óleo essencial obtido das folhas da alfavaca (Ocimum gratissimum L.)*. *Ciências e Tecnologia de Alimentos*, **27 (3)**, 2474-2478 (2007).
33. S.S. Basak, F. Candan, *Effect of Laurus nobilis L. L. Essential Oil and its main components on α -glucosidase and Reactive Oxygen Species Scavenging Activity*. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, **12 (2)**, 367-379 (2013).
34. O. Erturk, T.B. Ozbucak, A. Bayrak, *Antimicrobial activities of some medicinal essential oils*. *Herba Polonica*, **52 (1)**, 58-66 (2006).
35. B.Ozcan, M. Esen, M.K. Sangun, A. Coleri, M. Caliskan, *Effective antibacterial and antioxidant properties of methanolic extract of Laurus nobilis seed oil*. *Journal of Environmental Biology*, **31 (5)**, 637-641 (2010).
36. N. Belletti, M. Ndagihimana, C. Sisto, M. Guerzoni, R. Lanciotti, F. Gardini, *Evaluation of the Antimicrobial Activity of Citrus Essences on Saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural and Food Chemistry*, **52**, 6932-6938 (2004).
37. A. Sivropoulou, C. Nikolaou, E. Papanikolaou, S. Kokkini, T. Lanaras, M. Arsenakis, *Antimicrobial, Cytotoxic and Antiviral Activities of Salvia fruticosa Essential Oil*. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, **45**, 3197-3201 (1997).
38. F. Bakkali, S. Averbeck, D. Averbeck, M. Idaomar, *Biological effects of Essential oils – A review*. *Food and Chemical Toxicology*, **46 (2)**, 446-475 (2008).
39. H.J.D. Dorman, S.G. Deans, *Antimicrobial agents from plants: antibacterial of plant volatile oils*. *Journal of Applied Microbiology*, **88**, 308-316 (2000).
40. D. Trombetta, F. Castelli, M.G. Sarpietro, V. Venuti, M. Cristiani, C. Daniele, A. Saija, G. Mazzanti, G. Besignano, *Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, **49 (6)**, 2474-2478 (2005).
41. S. Tadtong, S. Suppawat, A. Tintawee, P. Saramas, S. Jareonvong, T. Hongratanaworakit, *Antimicrobial activity of blended essential oil preparation*. *Natural Product Communications*, **7(10)**, 1401-1404 (2012).

42. C. Marcos-Arias, E. Eraso, L. Madariaga, G. Quindós, *In vitro activities of natural products against oral Candida isolates from denture wearers*. BMC Complementary & Alternative Medicine, **11** (119), 1-7 (2011).