

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

JESSICA ANGELA PANDINI

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, INSETICIDA E
ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATOS DE *Guarea kunthiana* A.
JUSS

CASCADEL-PR

Junho/2014

JESSICA ANGELA PANDINI

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, INSETICIDA E
ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATOS DE *Guarea kunthiana* A.
JUSS

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

Área de Concentração: Conservação e Manejo de Recursos Naturais

Orientador: Fabiana Gisele da Silva Pinto

CASCADEL-PR

Junho/2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P189c Pandini, Jessica Angela

Composição química, atividade antimicrobiana, inseticida e antioxidante do óleo essencial e extratos de *Guarea kunthiana* A. Juss./Jessica Angela Pandini. Cascavel, 2014.
89p.

Orientador^a: Prof^a. Dr^a. Fabiana Gisele da Silva Pinto
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual do Oeste do Paraná.

Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Conservação e Manejo de Recursos Naturais

1. Microbiologia. 2. Ação antimicrobiana. 3. *Guarea kunthiana*. 4.Extratos vegetais.5.Óleo essencial.6.*Salmonella* spp.7.Cascudinho dos aviários. I. Universidade Estadual do Oeste do Paraná. II. Título.

CDD

22.ed. 576

FOLHA DE APROVAÇÃO

“Sábio é o ser humano que tem coragem de ir diante do espelho da sua alma para reconhecer seus erros e fracassos e utilizá-los para plantar as mais belas sementes no terreno de sua inteligência.”
(Augusto Cury)

DEDICATÓRIA

À minha família e ao meu noivo Maicon pelo constante amor e incentivo,
com eterna gratidão dedico.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a Deus por estar sempre presente em minha vida, iluminando meus caminhos e ter colocado pessoas maravilhosas ao meu lado.

Aos meus pais, que sempre me guiaram e estiveram ao meu lado em todos os momentos difíceis com constante incentivo e amor (amo vocês incondicionalmente).

Ao meu noivo Maicon, que sempre esteve ao meu lado me ajudando nos experimentos, me apoiando sempre com sua paciência e compreensão (não há palavras que expressem o amor que sinto por você).

A minha orientadora Professora Fabiana Gisele da Silva Pinto por ter me oportunizado este trabalho e me apoiado nos experimentos e na redação dos artigos.

Ao Professor Luis Francisco Angeli Alves, pelas colaborações e sugestões recebidas na elaboração dos meus trabalhos.

A Professora Tereza Cristina Marinho Jorge, por ter concedido o Laboratório de Farmacognosia e pela colaboração e sugestões.

A Professora Livia Godinho Temponi pela identificação das plantas no Herbário (UNOP) e pela utilização dos equipamentos.

Ao Professor Willian Ferreira da Costa pela parceria e colaboração neste trabalho

Aos meus amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia Agrícola, pela ajuda nos experimentos e pelo apoio e amizade, principalmente a Ana Mamprim, Clau Martins, Andréia Bonini, Mayara Scur, Juliete de Lara e Camila Santana.

As minhas queridas amigas Daiane, Fernanda, Deise, Diana, Deisy e Susan que sempre estão presentes me ajudando e me apoiaram nos momentos difíceis.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná, por ter me oportunizado a realizar esta pesquisa, e a Capes pela disponibilização da bolsa.

Enfim, quero agradecer imensamente a todos e mesmo a aqueles que não foram citados, mas que de alguma forma prestaram sua colaboração para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

RESUMO	9
ABSTRACT	11
1. INTRODUÇÃO GERAL	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	
2.1. <i>Guarea kunthiana</i> A. Juss.	14
2.2. O gênero <i>Salmonella</i>	15
2.3. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos vegetais.....	17
2.4. Atividade antioxidante.....	19
2.5. Potencial inseticida de óleos essenciais e extratos vegetais.	21
3. CAPÍTULO 1: Atividade antimicrobiana, inseticida e antioxidante do óleo essencial e extratos de <i>Guarea kunthiana</i> A. Juss.	24
4. CAPÍTULO 2: Composição química, potencial antimicrobiano e antioxidante do óleo essencial de <i>Guarea kunthiana</i> A. Juss.....	53
4. REFERÊNCIAS.	78

RESUMO

O presente estudo teve por objetivo determinar a composição química do óleo essencial de *Guarea kunthiana* A Juss pelo método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), avaliar a atividade antimicrobiana deste óleo frente a diferentes bactérias Gram-positivas e Gram- negativas e uma levedura: *Escherichia coli*, *Salmonella entérica* subsp. *entérica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial e dos extratos aquoso, acetato de etila e alcoólico frente a diferentes sorotipos de *Salmonella* de origem avícola: Enteritidis, Infantis, Typhimurium, Heidelberg, Mbandaka, Give, Saintpaul, Orion, Gallinarum e Agona. Determinar a atividade inseticida do óleo e dos extratos frente a larvas e adultos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae), e por último avaliar a atividade antioxidante do óleo essencial e dos extratos pelo método de captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH). As análises de CG-EM resultaram na identificação de 13 constituintes, representando 96,52% da área relativa total do óleo essencial. Os principais compostos identificados foram α -Zingibereno (34,48%), β -Sesquifelandreno (22,90%) e α -Curcumeno (16,17%). Em relação à atividade antimicrobiana o óleo essencial foi efetivo frente a todos os micro-organismos testados exceto para as bactérias *E.coli* e *K. pneumoniae*, as quais se apresentaram resistentes à ação do óleo. Para os sorotipos de *Salmonella* avaliados, o óleo essencial exerceu maior atividade frente aos sorotipos Infantis, Typhimurium e Give, com valores de CIM e CBM de 54,6 μ g/mL para ambos, para os demais sorotipos testados a ação do óleo foi classificada como moderada, fraca e inativa. Em relação aos extratos todos os sorotipos testados

foram suscetíveis ao extrato de acetato de etila, seguido do extrato alcoólico, o extrato aquoso não apresentou atividade antimicrobiana. Os resultados referentes à atividade inseticida do óleo essencial revelaram que este exerceu melhor atividade frente às larvas na concentração de 200 mg/mL (28%), em relação aos adultos a porcentagem de mortalidade foi baixa (12%) nesta concentração. Com os extratos, os melhores resultados foram encontrados para o extrato alcoólico na concentração de 10%, com valores de 34 e 44% para larvas e adultos respectivamente. Os valores de atividade antioxidante revelaram que não houve diferenças significativas entre o antioxidante sintético butil-hidroxi-tolueno (BHT), o óleo essencial e o extrato alcoólico, revelando que tanto o óleo essencial quanto extrato alcoólico de *G. kunthiana* demonstraram elevada capacidade antioxidante.

Palavras chave: Ação antimicrobiana, *Guarea kunthiana*, extratos vegetais, óleo essencial *Salmonella* spp., cascudinho dos aviários.

ABSTRACT

The present study aimed to determine the chemical composition of the essential oil of *Guarea kunthiana* A Juss by the method of gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS), evaluate the antimicrobial activity of this oil against different Gram positive and Gram negative bacteria, and yeast: *Escherichia coli*, *Salmonella entérica* subsp. *entérica*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus mirabilis*, *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus epidermidis*, *Bacillus subtilis* e *Candida albicans*. Evaluate the antimicrobial activity of essential oil and aqueous extracts, ethyl acetate and alcohol against different serotypes of *Salmonella* in poultry origin: Enteritidis, Infantis, Typhimurium, Heidelberg, Mbandaka, Give, Saintpaul, Orion, Gallinarum e Agona. Determine the insecticidal activity of the oil and extracts against larvae and adults of *Alphitobius diaperinus* (Panzer 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae), and finally evaluate the antioxidant activity of essential oil and extracts by the capture of the hydrazyl free radical 2,2-diphenyl-1-picryl (DPPH). The analyses of GC-MS resulted in the identification of 13 constituents, representing 96.52% of the total area on the essential oil. The main compounds identified were α -Zingiberene (34.48%), β -Sesquifelandreno (22.90%) and α -Curcumene (16.17%). Regarding antimicrobial activity of the essential oil was effective against all micro-organisms tested except for the bacteria *E.coli* e *K. pneumoniae*, which presented themselves resistant to the action of the oil. For *Salmonella* serotypes evaluated, the essential oil had greater activity against serotypes Infantis, Typhimurium e Give, with values of MIC and MBC of 54,6 $\mu\text{g/mL}$ for both, for the other serotypes tested the action of the oil was classified as moderate, weak and inactive. Regarding extracts all serotypes tested were susceptible to the extract of ethyl

acetate, followed by alcoholic extract, the aqueous extract showed no antimicrobial activity. The results concerning the insecticidal activity of the essential oil revealed that it provided better activity against larvae at a concentration of 200 mg / mL (28%) compared to adults the mortality rate was low (12%) at this concentration. With the extracts, the best results were found for the alcoholic extract at a concentration of 10%, with values of 34 and 44% respectively, adults and larvae. The values of antioxidant activity showed no significant differences between the synthetic antioxidant butylated hydroxytoluene (BHT), essential oil and alcoholic extract, revealing that both the essential oil as alcoholic extract of *G. kunthiana* demonstrated high antioxidant capacity.

Key-words: Antimicrobial action, *Guarea kunthiana*, plant extracts, essential oil *Salmonella* spp., Darkling beetles.

1. Introdução geral

O rápido crescimento do setor avícola proporcionou uma fonte de proteína rapidamente disponibilizada e de custo reduzido, mas também aumentou a taxa de infecção das aves (TESSARI et al., 2008). Entre os principais patógenos veiculados na avicultura destacam-se os do gênero *Salmonella*. Estas bactérias são as principais causadoras de doenças entéricas em aves, e podem provocar perdas na produtividade, aumento da mortalidade e a contaminação de produtos de origem avícola (SANTOS e TURNES, 2005). A salmonelose é uma zoonose de importância mundial e uma das mais complexas em sua epidemiologia e controle (SOUZA et al., 2010).

A extensiva utilização de agentes antimicrobianos para o controle e tratamento de doenças na produção animal é provavelmente a principal causa do desenvolvimento de resistência do gênero *Salmonella* (SILVA e DUARTE, 2002; SOUZA et al., 2010). As salmonelas têm assumido grande importância epidemiológica devido ao grande número de surtos e infecções relacionados ao consumo de alimentos contaminados, sendo os produtos de origem avícola, os principais veículos de transmissão (AMSON et al., 2006; RIBEIRO et al., 2007). Diversos sorotipos estão associados a infecções em animais e humanos responsáveis por altas taxas de morbidade em todo o mundo e altos índices de mortalidade, principalmente em países subdesenvolvidos (SANCHEZ-VARGAS et al., 2011).

Outro grande problema do cenário avícola é a proliferação de insetos que encontram abrigo nas instalações dos aviários, como *Alphitobius diaperinus* (Panzer 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) conhecido como “cascudinho dos aviários”, considerado uma das principais pragas associadas à avicultura de corte (CHERNAKILEFFER, 2004). As formas larvais e adultas são ingeridas pelas aves no lugar da ração, sendo este fato atribuído a influências no desenvolvimento das mesmas, além de serem responsáveis pela queda na conversão alimentar das aves (ALVES et al., 2004; MATIAS, 2005). Além disto, o cascudinho é veiculador de diversos micro-organismos, e uma vez ingerido pelas aves, pode provocar danos no trato gastrointestinal das mesmas, e deixá-lo mais vulnerável à entrada de patógenos (AXTELL e ARENDS, 1990; JAPP et al., 2010).

O controle do cascudinho está baseado na utilização de inseticidas químicos de curto período residual, cuja aplicação causa uma redução populacional temporária e é limitada pela presença constante de animais nos aviários, além da possibilidade de

selecionarem populações de insetos resistentes e causarem a contaminação do ambiente e das aves, tornando-se também uma barreira comercial para exportação de carnes de aves, uma vez que resíduos destes produtos podem permanecer na carcaça (JAPP et al., 2010).

Devido aos problemas que os inseticidas químicos podem ocasionar, o surgimento de técnicas de manejo não poluidoras para o controle de pragas e doenças que permitam reduzir ações prejudiciais e levar a uma avicultura produtiva e de menor impacto ambiental se tornam extremamente relevantes (PINTO-JÚNIOR et al., 2010). No contexto de medidas alternativas, destacam-se os óleos essenciais e extratos vegetais, uma vez que estes podem apresentar propriedades antimicrobianas e inseticidas (HUSSAIN et al., 2010; HAMDAN et al., 2013). Além disto, os extratos vegetais e óleos essenciais podem apresentar propriedades antioxidantes, o que constitui uma alternativa de substituição aos antioxidantes sintéticos na ração de frangos, uma vez que estes primeiros podem causar efeitos de toxicidade (BAMONIRI et al., 2010; EBRAHIMABADI et al., 2010; FREITAS et al., 2012).

Neste sentido, pesquisas direcionadas a descoberta de produtos alternativos podem contribuir de forma significativa a fim de diminuir a utilização de produtos sintéticos para o controle de pragas e doenças, bem como proporcionar maior benefício na alimentação de frangos, permitindo assim, a obtenção de produtos de melhor qualidade.

2. Revisão Bibliográfica

2.1. *Guarea kunthiana* A. Juss

Guarea kunthiana A. Juss é uma planta nativa do Brasil pertencente à família Meliaceae, e encontra-se naturalmente distribuída em todo o território nacional e em quase todas as formações florestais. É uma árvore de aproximadamente 8 metros de altura, conhecida popularmente como figo-do-mato, jatuauba, peloteira, jito e canjambo. Apresenta ramos glabros, folhas de 16 cm de comprimento com 3-5 pares de folíolos, pecíolo de 16 cm de comprimento, folíolos opostos e curto-peciolados. Os frutos apresentam cápsula glabra, deiscente, de forma e tamanho muito variáveis (LORENZI, 2009).

Pesquisas já realizadas com os extratos hexânicos e etanólicos obtidos das folhas indicaram atividade inseticida sobre triatomíneos e larvas de *Aedes aegypti*, já com o

extrato hexânico da madeira da raiz de *G. kunthiana* foi verificada atividade antiparasitária frente às formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania donovani* (MESQUITA et al., 2005; COELHO, 2006; LIMA, 2006). Em relação à composição química, são descritos na literatura a presença de diterpenos e sesquiterpenos isolados a partir de extratos brutos fracionados obtidos das folhas e um limonóide equadoriano, isolado do extrato diclorometano das folhas (MOOTO et al., 1991; GARCEZ et al., 2004).

2.2. O gênero *Salmonella*

O gênero *Salmonella* é composto por bactérias Gram-negativas em forma de bastonetes, que pertencem à família Enterobacteriaceae, caracterizadas como anaeróbias facultativas que produzem gás a partir de glicose (exceto *S.typhimurium*) e são capazes de utilizar o citrato como única fonte de carbono (Hirsh, 2003). A maioria é móvel, através de flagelos peritríquios, exceção desta à *S. pullorum* e à *S. gallinarum*, que são imóveis. O pH ótimo para a multiplicação das salmonelas fica próximo de 7,0, sendo que valores superiores a 9,0 e inferiores à 4,0 são bactericidas. As salmonelas não toleram concentrações de sal superiores a 9 %. A temperatura ideal para a multiplicação destas bactérias é 35-37° C, sendo a mínima de 5° C e a máxima de 47° C. Porém valores de máximo e mínimo dependem do sorotipo (FRANCO e LANDGRAF, 2004).

A classificação do gênero *Salmonella* está atualmente baseada no esquema de White-Kaufmann-Le Minor e envolve mais de 2500 sorotipos identificados, relacionados à caracterização de seus antígenos somáticos (O) de parede com natureza lipopolissacarídea, flagelares (H) de natureza proteica e os capsulares ligados à virulência (Vi). Os antígenos O são resistentes ao calor e ao álcool, os antígenos Vi resistentes ao calor e os antígenos H são formados por uma proteína denominada flagelina, que é termolábel, inativada lentamente pelo álcool e que pode existir tanto na forma simples (monomérica) ou em duas formas separadas (difásica) (GUIBOURDENCHE et al., 2010).

As bactérias do gênero *Salmonella*, estão amplamente difundidas na natureza e podem colonizar uma variedade de animais, como mamíferos, anfíbios, répteis, aves e insetos, causando uma enfermidade denominada salmonelose (BUTAYE et al., 2006; SOUZA et al., 2010). As salmoneloses são reconhecidas como causa comum de doenças transmitidas por alimentos (DTAs) em humanos e representam um grave

problema de saúde pública tanto em países desenvolvidos quanto subdesenvolvidos (WHO, 2010). Os alimentos de origem animal são os principais veículos transmissores de *Salmonella* spp., especialmente os produtos avícolas (RIBEIRO et al., 2007). Nos Estados Unidos, são registrados anualmente de 800.000 a 4 milhões de casos de infecção por *Salmonella* spp., sendo que aproximadamente 580 casos evoluem para óbito (WHO, 2010).

No Brasil, o sorotipo Enteritidis é o principal causador de surtos alimentares, responsável por 43% dos casos relatados (BRASIL, 2011). Kottwitz et al. (2010), avaliando os surtos de salmonelose ocorridos no período de 1999 a 2008 no estado do Paraná, verificaram que o sorovar Enteritidis foi prevalente, encontrado em 87,8% das cepas isoladas de pacientes e em 80,6% das cepas provenientes de alimentos envolvidos nos surtos. Almeida et al. (2013) avaliando os surtos alimentares ocorridos no período de 2005 a 2008 no estado do Paraná, verificaram que as salmonelas foram um dos agentes etiológicos mais frequentes envolvidos em surtos de DTAs.

A salmonelose é uma das principais zoonoses para a saúde pública em todo o mundo, principalmente pela alta morbidade e dificuldade de controle. Além disto, o que tem preocupado os órgãos de vigilância sanitária é a emergência de cepas resistentes aos antibióticos de diversas classes (THAKUR et al., 2007; VAZ et al., 2010).

Em consequência da ampla distribuição de *Salmonella* spp. no intestino das aves, desde 1953 são empregados agentes antibacterianos, os quais foram incorporados à ração animal, devido principalmente aos seus efeitos benéficos e vantajosos no desenvolvimento ponderal das aves. Esta prática consolidou-se, e estes antimicrobianos passaram a ser chamados de promotores de crescimento, devido ao fato de reduzirem a morbidade e a mortalidade causadas por doenças clínicas e subclínicas e melhorarem o desempenho animal e a conversão alimentar, favorecendo assim o crescimento (BUTAYE et al., 2003). Porém, o amplo uso destes agentes tem sido alvo de restrições na União Europeia a qual a partir de 2006, proibiu a utilização destes promotores de crescimento na ração animal, principalmente pelo fato de que resíduos destes antibióticos poderiam permanecer na carne, e assim serem transmitidos ao consumidor final (FUKAYAMA et al., 2005). Desta forma, tais regulamentações têm forçado a busca de alternativas que garantam o máximo crescimento animal sem afetar a qualidade do produto final, tais como prebióticos, ácidos orgânicos, enzimas e, principalmente, extratos vegetais e óleos essenciais (SANTURIO et al., 2007).

2.3. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos vegetais

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas, constituídas por compostos terpenos e terpenoides, e em menores quantidades hidrocarbonetos, aldeídos, alcoóis, ésteres, lactonas, cumarinas e outros compostos (DORMAN e DEANS, 2000; SIMÕES e SPITZER, 2007). São produzidos por células secretoras ou grupo de células, podendo ser extraídos de partes de plantas como frutos, flores, cascas, folhas, ou de plantas inteiras como especiarias e ervas medicinais, tendo como principal característica a volatilidade (TROMBETTA et al., 2005; SCHERER et al., 2009). Não se misturam a água e podem ser extraídos por diferentes métodos como hidrodestilação, destilação a vapor, CO₂ supercrítico, ou com a utilização de solventes orgânicos ou gorduras. O óleo essencial de uma planta serve como característica para aquela espécie. Mesmo que óleos diferentes apresentem compostos que são qualitativamente iguais, diferenças quantitativas farão com que um óleo possua propriedades químicas e biológicas diferentes dos demais (TROMBETTA et al., 2005).

Os extratos vegetais são preparações concentradas, que podem ser obtidas através de diferentes processos, tais como infusão, decocção, maceração, percolação, dentre outros (OLIVEIRA e AKISUE, 2009). O processo metodológico de extração deve levar em conta uma série de fatores, principalmente a natureza do material a ser extraído (tipo de órgãos e tecidos vegetais), estabilidade do material vegetal e o solvente a ser utilizado, sendo que este último é de extrema importância para a extração dos compostos químicos desejados (HANDA, 2008; SILVEIRA, 2012).

Pesquisas já realizadas evidenciam diversas ações dos óleos essenciais e extratos vegetais, principalmente atividade antimicrobiana, antioxidante e inseticida (CONSTANTIN et al., 2001; KRIFA et al., 2011; MOKHTAR et al., 2011). O potencial antimicrobiano dos óleos essenciais é exercido principalmente por compostos da classe dos terpenoides (BURT, 2004). Os compostos terpenoides são também conhecidos como isoprenoides, e constituem uma classe de produtos naturais obtidos de plantas com uma grande variedade estrutural e funcional. Alguns destes compostos são importantes no metabolismo primário dos vegetais, participando de processos como respiração e desenvolvimento celular. Entretanto, a maioria dos terpenoides são produtos do metabolismo secundário, tendo como papel principal intermediar a função planta versus ambiente (PHILLIPS et al., 2008). Os compostos terpênicos mais

frequentes nos óleos voláteis são os monoterpenos e os sesquiterpenos (SIMÕES e SPITZER, 2007).

Alguns mecanismos de ação antimicrobiana dos óleos essenciais foram estudados, envolvendo diversas espécies de plantas e micro-organismos. De acordo com Greay e Hammer (2011), o mecanismo de ação dos monoterpenos envolve a interferência na integridade e no funcionamento da membrana celular, através da mudança de potencial da membrana, perda de material citoplasmático e inibição da cadeia respiratória. Para Dorman e Deans (2000), a maioria dos compostos presentes nos óleos essenciais atuam na parede celular bacteriana desnaturando e coagulando proteínas, além de causarem alteração na permeabilidade da membrana citoplasmática, levando a interrupção dos processos vitais da célula, como o transporte de elétrons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações que dependem de enzimas, o que pode resultar em perda do controle quimiosmótico da célula afetada, acarretando em consequente morte bacteriana. Os compostos terpenoides também podem influenciar fatores de virulência em células bacterianas alterando sua capacidade de infecção. Desta forma, se destacam como importantes alternativas para o controle de patógenos, principalmente bactérias multirresistentes aos antimicrobianos convencionais (TEPLITSKI et al., 2000; ZHANG, 2003).

Os diferentes mecanismos de ação dos óleos essenciais na célula microbiana dependem da composição química da planta, e faz-se necessário afirmar que esta pode ser modificada por diversos aspectos, incluindo desde o modo de extração, a fatores próprios da planta e do ambiente em que ela está inserida (SILVA et al., 2011). Gobbo-Neto e Loppes (2007) citam alguns fatores que podem influenciar a produção de metabólitos secundários nas plantas tais como sazonalidade, ritmo circadiano, idade e desenvolvimento da planta, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, teor de nutrientes, altitude e ataque a patógenos.

Outros compostos presentes nos óleos essenciais e extratos vegetais são os compostos fenólicos, os quais incluem uma grande diversidade de estruturas, simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático (CARVALHO et al., 2007). Podem ser classificados em dois grupos: os flavonoides e os não-flavonoides, sendo que ambos são metabólitos secundários presentes em frutas e vegetais (ANGELO e JORGE, 2007). Os flavonoides podem ser classificados de acordo com as suas estruturas químicas, sendo que suas maiores classes incluem as flavonas, flavonóis, catequinas,

antocianidinas, isoflavonas, auronas e chalconas. Estes compostos estão distribuídos nas folhas, sementes, flores e raízes de plantas, e sua atividade biológica depende de sua estrutura química e da orientação relativa dos grupamentos na molécula (AGATI et al., 2012). Além dos flavonoides, outros compostos com importantes funções nos vegetais são os taninos, os quais são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e outros produtos vegetais. Além disto, estes compostos possuem a capacidade de se complexar com proteínas, sendo este fator responsável pela ação no controle de insetos, fungos e bactérias (MELLO e SANTOS, 2007).

O mecanismo de ação antimicrobiana dos compostos fenólicos pode ser explicado por sua ação na degradação da parede celular, danos a membrana citoplasmática, coagulação do citoplasma, influência na regulação do sistema de transporte de íons e elétrons e extravazamento do material celular (BURT, 2004). Cabe ressaltar, que a atividade antimicrobiana de extratos vegetais e óleos essenciais, também pode ser influenciada pelo tipo de bactéria a ser estudada, uma vez que existem variações nas estruturas de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas. A parede celular das bactérias Gram-positivas contém uma camada mais espessa de peptidoglicano, o que pode lhe fornecer uma maior rigidez. Entretanto, as bactérias Gram-negativas possuem uma membrana envolvendo a parede celular, o que restringe a difusão de compostos hidrofílicos pela camada de lipopolissacarídeos. Sem esta estrutura, a parede celular das bactérias Gram-positivas pode ser mais facilmente permeabilizada por compostos (WU et al., 2008).

2.4. Atividade Antioxidante

Os antioxidantes podem ser definidos como quaisquer substâncias que, quando presentes em baixas concentrações, comparadas com as concentrações dos substratos oxidáveis, retardam ou inibem a oxidação deste substrato pela reação com os radicais livres, impedindo ou diminuindo o estresse oxidativo (HALLIWEL e GUTTERIDGE, 1985). Os radicais livres desempenham um papel fundamental no metabolismo celular. No entanto, quando presentes em excesso, podem gerar estresse oxidativo e consequentemente atacar e danificar qualquer molécula encontrada no organismo, levando a alterações teciduais, responsáveis por diversas patologias, incluindo o câncer (SOARES et al., 2005).

Do ponto de vista químico, os antioxidantes são compostos aromáticos que contém pelo menos uma hidroxila, podendo ser sintéticos como o butil hidroxianisol (BHA) e o butil hidroxitolueno (BHT), ou naturais, como os compostos fenólicos, organosulfurados e terpenos, que fazem parte da constituição de diversos vegetais (KITTS, 1994). Os antioxidantes sintéticos comumente utilizados em rações são o BHA e o BHT, porém, estudos relacionados com a toxicologia destes compostos têm demonstrado a possibilidade destes apresentarem efeitos carcinogênicos. Desta forma, pesquisas se direcionam no sentido de encontrar compostos naturais antioxidantes, uma vez que estes podem substituir os antioxidantes sintéticos, ou realizar associações com estes, com o intuito de diminuir a sua quantidade em alimentos (SOARES, 2002).

As plantas são capazes de sintetizar tais compostos antioxidantes, principalmente os compostos fenólicos, que participam dos mecanismos de defesa contra danos oxidativos causados por espécies reativas de oxigênio. Os compostos fenólicos são considerados antioxidantes primários e atuam capturando ou neutralizando radicais livres, na doação de hidrogênio, inativação do oxigênio singlete e quelação de íons metálicos (RICE-EVANS et al., 1995; SHYLAJA e PETER, 2004; NICIFOROVIC et al., 2010). O grupo dos flavonoides é conhecido pela alta capacidade de sequestrar radicais livres, o que tem permitido sua caracterização como um antioxidante de ocorrência natural (RICE-EVANS et al., 1997). Muitas das ações biológicas dos flavonoides têm sido atribuídas pelas suas propriedades antioxidantes, que podem ocorrer por capacidade de redução de radicais livres, doação de hidrogênio e influência no estado redox intracelular (WILLIAMS et al., 2004). Os taninos podem atuar como sequestradores de radicais livres e no bloqueio da peroxidação lipídica (MELLO e SANTOS, 2007).

Os compostos terpênicos também podem atuar como excelentes antioxidantes naturais. Estudos revelam que alguns compostos monoterpênicos exerceram excelente atividade antioxidante contra a peroxidação lipídica e redução de radicais livres (WANNES et al., 2010; MOTHANA et al., 2011; COSTA et al., 2012). Alguns sesquiterpenos também podem atuar como excelentes antioxidantes, promovendo a redução de radicais livres (DING et al., 2011).

Diversos métodos são utilizados para a avaliação da atividade antioxidante de extratos vegetais e óleos essenciais, e dentre eles, destaca-se o método do DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil), o qual tem sido bastante utilizado por diversos autores devido principalmente a sua simplicidade e rapidez (MOLYNEUX, 2004; ESTEVINHO et al.,

2008) . A molécula de DPPH é considerada um radical livre estável por apresentar um elétron livre que pode deslocar-se por toda a sua estrutura, além disto, não dimeriza facilmente, como ocorre com os demais radicais livres. Este efeito de ressonância apresentado pela molécula do DPPH lhe confere uma coloração violeta escura, que é caracterizada por apresentar uma banda de absorção em cerca de 517 nm quando em solução de etanol ou metanol. Quando a solução do DPPH é mantida em contato com alguma substância que pode doar um radical hidrogênio, a reação gera a sua forma reduzida com a perda da coloração violeta (resultando em um resíduo de coloração amarela em virtude da presença do grupamento picril) (ALVES et al., 2010).

2.5. Potencial inseticida de óleos essenciais e extratos vegetais

Nos vegetais, os óleos essenciais exercem funções relacionadas à atração de polinizadores, proteção contra predadores, patógenos, perda de água e, também, desempenham funções ecológicas, especialmente como inibidores da germinação. Estas características tornam as plantas que os produzem potentes fontes de agente biocidas, principalmente pelas suas propriedades bactericidas, fungicidas e inseticidas (KNAAK e FIUZA, 2010; ROCHA et al., 2012). Alguns óleos essenciais possuem alta toxicidade, podendo causar ação repelente, inibição de apetite, além de exercerem influência no desenvolvimento de alguns insetos (MENEZES, 2005; RASTELLO et al., 2009).

Os compostos terpênicos presentes nos óleos essenciais de muitas espécies de plantas, podem agir como retardadores de crescimento, redutores da capacidade reprodutiva e supressores de apetite podendo levar insetos à morte por inanição ou toxicidade direta (VIEGAS-JÚNIOR, 2003; MENEZES, 2005).

Os extratos vegetais utilizados tanto em sua forma total ou purificada, também apresentam diferentes modos de ação nos insetos, tais como toxicidade, retardamento no desenvolvimento, inibição de apetite e redução da fecundidade e fertilidade (CAVALCANTE et al., 2006; SANTOS et al., 2010).

A família Meliaceae é dotada de uma diversidade de compostos químicos, tais como limonoides, diterpenos, sesquiterpenos, triterpenos, esteroides e cumarinas (CORTEZ et al, 2000; MAGALHÃES et al., 2010; MAREK et al., 2012; YUAN et al., 2013). Um dos compostos mais abundantes são os limonoides, também chamados de meliacinas devido ao seu sabor amargo, que são provavelmente os maiores representantes da classe dos terpenos com atividade inseticida (LUO et al., 1999;

VIEGAS-JÚNIOR, 2003). Dentre os limonoides isolados desta família, destaca-se a azadiractina obtida da planta *Azadirachta indica* (nim), que é vastamente estudada pelo seu potencial inseticida, incluindo ações como interferência no desenvolvimento de insetos alterando e até impedindo a ecdise, ação supressora de apetite, retardamento no desenvolvimento, entre outros (COELHO et al., 2006).

Alphitobius diaperinus Panzer (1797) (Coleoptera, Tenebrionidae) conhecido no Brasil como “cascudinho dos aviários”, é um inseto originário do leste africano, comumente encontrado em grãos armazenados e em galpões de criação de frangos de corte, matrizes e perus (PFEIFFER e AXTEL, 1980). É considerado uma das principais pragas da avicultura moderna, introduzido em sistemas de produção animal, provavelmente, por meio de ração contaminada, dispersando-se e adaptando-se facilmente às condições dos aviários (JAPP et al., 2010).

Além de causarem redução na conversão animal das aves, que se alimentam dos insetos preferencialmente à ração, são veiculadores de alguns agentes patogênicos principalmente fungos (*Aspergillus* sp.) e bactérias (*Escherichia* sp., *Bacillus* spp., *Streptococcus* sp., *Salmonella* sp.) (ALVES et al., 2004; PINTO-JÚNIOR et al., 2010). Dentre as bactérias que podem ser veiculadas pelo cascudinho, destacam-se as do gênero *Salmonella*, por apresentarem maior importância na avicultura devido ao risco de contaminação alimentar em humanos (CHERNAKI-LEFFER et al., 2002).

Em condições de temperatura e umidade adequadas, o cascudinho se desenvolve e forma continuamente novos focos de infestação de um lote para outro. Devido a isto, são empregadas medidas de controle, principalmente a utilização de inseticidas químicos na cama de aviário. Porém o uso extensivo destes inseticidas, em concentrações incorretas e a falta de tecnologia de aplicação, tornam este método de controle insuficiente, fazendo com que surjam novos focos de infestação, mesmo após a aplicação do produto químico, além de causarem contaminação no ambiente e nas aves, acúmulo de resíduos tóxicos em alimentos, intoxicação de produtores, eliminação de inimigos naturais, e, principalmente a seleção de populações de insetos resistentes (CRUZ et al., 1995; SALIN et al., 2000; CHERNAKI-LEFFER, 2004; ALVES et al., 2010; JAPP et al., 2010; CHERNAKI-LEFFER et al., 2011). Desta forma, a busca por métodos de controle alternativos, como a utilização de novos princípios ativos extraídos de plantas medicinais que possam ser utilizados de forma integrada com outros métodos, se torna de extrema importância para o controle de pragas, reduzindo assim, o impacto da utilização dos produtos químicos. Além disto, deve-se levar em conta a

utilização de métodos de controle que não causem danos à sanidade das aves e à saúde humana (KNAAK e FIUZA, 2010).

Em vista da importância da utilização de produtos naturais para o controle de pragas e micro-organismos patogênicos e do estudo focado em plantas que possuem seu potencial biológico desconhecido, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o potencial antimicrobiano, inseticida e antioxidante do óleo essencial e dos extratos aquoso, alcoólico e de acetato de etila de *Guarea kunthiana* A. Juss.

Capítulo 1: Atividade antimicrobiana, inseticida e antioxidante do óleo essencial e extratos de *Guarea kunthiana* A. Juss

Jessica Angela Pandini¹; Fabiana Gisele da Silva Pinto¹ Mayara Camila Scur¹; Luís Francisco Angeli Alves¹

¹ State University of West Paraná–UNIOESTE. Universitária Street, 1619, Cascavel - PR. Cep: 85819-110.

RESUMO

O objetivo do trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial e dos extratos aquoso, alcoólico e de acetato de etila de *Guarea kunthiana* A. Juss, frente a dez sorotipos de *Salmonella* de origem avícola, sendo: Enteritidis, Infantis, Typhimurium, Heidelberg, Mbandaka, Give, Saintpaul, Ohio, Gallinarum e Agona, bem como o potencial inseticida do óleo e dos extratos frente a larvas e adultos de *Alphitobius diaperinus* (Panzer 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae), e também, determinar a atividade antioxidante destes pelo método de captura do radical 2,2-difenil-2-picrilhidrazil (DPPH). Em relação à atividade antimicrobiana do óleo essencial de *G. kunthiana*, os sorotipos mais sensíveis foram Infantis, Typhimurium e Give, com valores de CIM e CBM de 54,6 µg/mL para ambos, para os demais sorotipos testados a ação do óleo foi classificada como moderada, fraca ou inativa. Em relação aos extratos, maior susceptibilidade antimicrobiana foi verificada para o extrato alcoólico, com valores de CIM e CBM de 0,39 mg/mL para o sorotipo Infantis e CIM e CBM de 0,78 para o sorotipo Gallinarum. Os resultados da atividade inseticida do óleo essencial e dos extratos foram considerados baixos, com 28% de mortalidade para as larvas e 12% para os adultos na concentração de 200 mg/mL. Para os extratos, os melhores resultados

foram com o extrato alcoólico na concentração de 10%, com 34 e 44% para larvas e adultos, respectivamente. Os valores de atividade antioxidante revelaram que não houve diferenças significativas entre o antioxidante sintético butil-hidroxi-tolueno (BHT), o óleo essencial e o extrato alcoólico, revelando que tanto o óleo essencial quanto extrato alcoólico de *G. kunthiana* demonstraram elevada capacidade antioxidante.

Key-words: Avicultura, *Salmonella* spp., *Alphitobius diaperinus*, mortalidade.

INTRODUÇÃO

A avicultura brasileira vem se desenvolvendo e se modernizando rapidamente alcançando níveis elevados de produtividade, transformando-se em um dos setores mais importantes do agronegócio brasileiro. A produção de carnes de frango chegou a 12,30 milhões de toneladas em 2013, mantendo o Brasil como maior exportador mundial e terceiro maior produtor de carnes de frango, atrás dos Estados Unidos e da China (Ubabef, 2014).

O intenso crescimento deste setor acarretou em alguns problemas, como o surgimento de doenças entéricas ocasionadas principalmente pelo gênero *Salmonella*, as quais provocam perda de produtividade devido ao aumento de mortalidade e à contaminação de produtos de origem avícola (Santos e Turnes, 2005), além de serem as maiores responsáveis por toxinfecções alimentares em seres humanos (Teixeira e Lima, 2008).

Outro grande problema do setor avícola é a proliferação de insetos e pragas, principalmente de *Alphitobius diaperinus* (Panzer 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) conhecido no Brasil como “cascudinho dos aviários”. Além deste inseto prejudicar a conversão alimentar e o ganho de peso das aves, as formas larval e adulta são mantenedoras de patógenos viáveis na superfície externa e no seu trato digestivo sendo,

portanto, potenciais vetores de patógenos causadores de doenças, principalmente de bactérias do gênero *Salmonella* spp (Hazeleger et al., 2008)

Inseticidas a base de produtos de origem vegetal têm sido alvo de diversas pesquisas, pois os mesmos constituem-se numa alternativa ao uso de agroquímicos sintéticos, uma vez que muitos deles não apresentam efeitos prejudiciais ao meio ambiente, por serem biodegradáveis e exercerem baixa toxicidade ao homem e animais (Vieira et al., 2001; Marques et al., 2013). Além da atividade inseticida vastamente reportada de óleos essenciais e extratos vegetais, os mesmos podem agir também como antibacterianos, antifúngicos e antioxidantes (Devi et al., 2014; Guimarães et al., 2014).

Estudos já realizados com a planta nativa do Brasil *Guarea kunthiana* A. Juss (Meliaceae) relatam potencial inseticida com os extratos hexânicos e etanólicos obtidos das folhas. (Mesquita et al., 2005; Coelho, 2006; Lima, 2006). Porém, não é relatado na literatura o potencial antimicrobiano e antioxidante, e tão pouco, atividade inseticida frente a *A. diaperinus*, sendo este, portanto, o primeiro estudo.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial e dos extratos aquoso, acetato de etila e alcoólico de *G. kunthiana* frente a dez sorotipos de *Salmonella*, determinar a atividade inseticida destes frente a *A. diaperinus*, e também, determinar a atividade antioxidante dos mesmos.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e identificação do material vegetal

As folhas de *G. kunthiana* foram coletadas no período de setembro e dezembro de 2013, em uma propriedade rural na região Oeste do estado do Paraná, Brasil (Latitude S 24° 31', Longitude W 53° 44', altitude 442 m). A secagem das folhas foi realizada em estufa a 35° C para posterior trituração em moinho de facas até obtenção de material vegetal triturado com granulometria inferior a 0,42 mm. Uma exsicata foi

enviada ao herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNOP) para a identificação botânica sendo depositada sob o número 7843 Pandini, J. A.

Obtenção dos extratos

A metodologia para a preparação dos extratos foram feitas de acordo com Weber et al. 2014 e Ceyhan et al. 2012 com modificações. Para a preparação do extrato aquoso, dez gramas de material vegetal triturado foram adicionados a 100 mL de água destilada, esta mistura foi mantida em agitador rotativo shaker a 220 rpm durante 24 h. Após este período, a solução foi filtrada utilizando-se papel filtro Whatman nº. 1 e centrifugada a 5000 x por 15 min. O sobrenadante foi coletado, obtendo-se, desta forma, o extrato na concentração final de 100 mg/mL. O extrato foi armazenado a 4° C. Os extratos orgânicos foram preparados de acordo com a mesma metodologia do extrato aquoso, após a coleta do sobrenadante o extrato foi submetido à rotaevaporação e, os extratos brutos foram diluídos com dimetilsulfóxido (DMSO) 10% até uma concentração final de 400 mg/mL e armazenados a 4° C.

Prospecção fitoquímica

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

Obtenção do óleo essencial

O óleo essencial foi obtido de acordo com a metodologia proposta por Weber et al. (2014). Para tal, cerca de 60 g de material vegetal triturado foram submetidos à extração em 700 mL de água destilada por um período de 3-4 h, pela metodologia de arraste por vapor d'água utilizando-se um aparelho do tipo Clevenger, após a extração, o óleo essencial foi armazenado a 4° C ao abrigo da luz.

Atividade antimicrobiana

Micro-organismos e condições de teste

Os micro-organismos utilizados foram 10 sorotipos de *Salmonella* de maior ocorrência na região Oeste do estado do Paraná, Brasil (Scur et al., 2014). Os sorotipos foram isolados de fezes (suabe de cloaca), cama de aviário (suabe de arrasto) e rações (farinhas/insumos de rações) de frangos de corte, provenientes de diferentes aviários da região Oeste do estado do Paraná, Brasil, fornecidas por um laboratório Veterinário de Cascavel, Paraná, Brasil, sendo: Enteritidis, Infantis, Typhimurium, Heidelberg, Mbandaka, Give, Saintpaul, Orion, Gallinarum e Agona. Para o teste, os micro-organismos foram recuperados em caldo de enriquecimento “Brain Heart Infusion” (BHI) e incubados por 24 h a $36\pm 0,1^{\circ}\text{C}$. Após este período, as cepas microbianas foram padronizadas em solução salina (0,85%) até atingirem a concentração final de $1\times 10^5\text{UFC/mL}$ para servir como inóculo.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Óleo essencial e extratos vegetais

A CIM do óleo essencial e dos extratos vegetais foi determinada de acordo com o método de microdiluição em caldo proposta por Santúrio et al. (2007) e Weber et al. (2014). O óleo essencial foi diluído em metanol e em caldo Mueller-Hinton (MH) na proporção de 1:10 até atingir a concentração de 7000 $\mu\text{g/mL}$. Em placas de microtitulação de 96 poços foram distribuídos a partir da segunda coluna 150 μL de caldo MH. Nas primeiras colunas foram adicionados 300 μL da solução do óleo de *G. kunthiana*, e a partir daí foram realizadas diluições de 7.000-3,4 $\mu\text{g/mL}$. Ao final adicionou-se 10 μL de inóculo em cada poço, e as placas foram incubadas a $36\pm 0,1^{\circ}\text{C}$ por 18-24h. Decorrido este intervalo de tempo, adicionou-se uma alíquota de 10 μL de cloreto de trifêniltetrazólio (CTT) a 10%, e as placas foram novamente incubadas a

36±0,1 °C por 3 h. A presença de coloração vermelha foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório do óleo essencial.

Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)

A CBM dos extratos e do óleo essencial foi feita de acordo com a metodologia de Weber et al. (2014). Antes da adição do CTT em todos os poços, foi retirada uma alíquota de 10 µL e inoculado na superfície de meio Agar MH. As placas foram incubadas por 24 h a 36±0,1°C e após este período, a CBM foi definida como a menor concentração do óleo essencial capaz de causar a morte do inóculo.

Como controle positivo foi utilizado Gentamicina 200 mg/mL, e como controle negativo foi utilizado metanol para o teste com o óleo essencial e DMSO 10% para o teste com os extratos.

Classificação da atividade antimicrobiana

A CIM e a CBM do óleo essencial e dos extratos foi classificada de acordo com os critérios propostos por Sartoratto et al. (2004) para o óleo essencial e Araújo (2010) para os extratos vegetais. Para o óleo essencial, a atividade foi classificada como elevada (<100 µg/mL), moderada (entre 100 e 500 µg/mL), baixa (entre 500 e 1000 µg/mL) e muito baixa (acima de 1000 µg/mL). Para os extratos a classificação foi: elevada (≤12,5 mg/mL), moderada (12,5 a 25 mg/mL), baixa (50-100 mg/mL) e muito baixa (acima de 100 mg/mL).

Atividade inseticida

A avaliação do potencial inseticida do óleo essencial e dos extratos de *G. kunthiana* foi realizada de acordo com a metodologia de Marcomini et al. (2009), com modificações. Para tal, foram utilizados larvas e adultos de *A. diaperinus*, provenientes de um aviário comercial do Município de Maripá, Paraná, Brasil.

Aplicação dos extratos vegetais

Os extratos aquoso, alcoólico e de acetato de etila de *G. kunthiana* foram diluídos em DMSO 10% até atingirem as concentrações de 10 e 5%. A aplicação dos extratos foi realizada diretamente sobre os insetos, dispostos em uma placa de Petri, sendo pulverizado 1 mL sobre cada placa utilizando-se Torre de Potter calibrada com pressão de 0,70 kgf/cm². Após a aplicação, os insetos foram transferidos para outra placa de Petri e mantidos em câmara B.O.D (26 ± 1° C e fotofase 14 h), alimentados com cerca de 2 g de ração para aves. Foram preparadas cinco repetições com 30 insetos cada, com um total de 150 insetos por tratamento. O controle consistiu da aplicação de água destilada estéril (testemunha geral) sobre os insetos e também de um controle com DMSO 10%.

Aplicação do óleo essencial

O óleo essencial de *G. kunthiana* foi diluído em acetona 10% até atingir as concentrações de 100 e 200 mg/mL. O procedimento de aplicação sobre as larvas e adultos de *A. diaperinus* foi realizado seguindo os mesmos procedimentos da aplicação dos extratos. O controle consistiu da aplicação de água destilada estéril e de acetona na concentração de 10%, seguindo os mesmos procedimentos adotados para os demais tratamentos. A avaliação da mortalidade dos insetos foi realizada após 10 dias, considerando-se mortos aqueles insetos que não respondiam ao toque de uma pinça.

Análise dos dados

Os dados foram avaliados quanto à normalidade e homogeneidade utilizando o teste de Kolmogorov-Smirnov e teste de Levene, respectivamente. A partir destas informações, procedeu-se a variância pelo teste F e as médias foram comparadas entre si pelo teste de Tukey a 5% de significância utilizando-se o programa Statistica 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA).

Atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi determinada pelo método de redução do radical livre DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) baseada na metodologia proposta por Scherer e Godoy (2009), Rufino et al. (2007) e Weber (2014). Para tal, alíquotas de 0,1 mL do óleo na concentração de 6000 µg/mL e dos extratos aquoso (100 mg/mL) de acetato de etila e alcoólico (400 mg/mL) foram tratadas com 3,9 mL de solução metanólica de DPPH 0,2 mM e levemente homogeneizadas em agitador de tubos. Após a agitação, os tubos foram deixados em repouso ao abrigo da luz durante 30 minutos. Decorrido o tempo de reação, a absorbância das amostras foi mensurada em 515 nm. Como controle negativo foi utilizado 0,1 mL de solução controle (álcool metílico, acetona e água) e como controle positivo utilizou-se o antioxidante sintético comercial butil-hidroxi-tolueno (BHT), nas mesmas condições do controle negativo. Como branco, foi utilizado álcool metílico para a calibração do espectrofotômetro. A capacidade de sequestro do radical livre foi expressa pela equação: $I\% = [(Abs_0 - Abs_1) / Abs_0] \times 100$, onde Abs_0 é a absorbância do controle e Abs_1 é a absorbância da amostra. O IC_{50} (quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH) foi calculado com base na equação da reta obtida da curva de calibração. Os testes foram realizados em triplicata.

Os dados obtidos pelos cálculos da capacidade de sequestro do radical DPPH e o IC_{50} foram analisados pelo teste de Tukey, a 5% de significância, utilizando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2011).

Análise dos dados

Os dados obtidos pelos cálculos da capacidade de sequestro do radical DPPH e o IC_{50} foram analisados pelo teste de Tukey, a 5% de significância, utilizando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Prospecção fitoquímica

O perfil fitoquímico dos extratos de *G. kunthiana* revelou a ocorrência de triterpenóides nos extratos aquoso e de acetato de etila e taninos e flavonóides nos extratos aquoso e alcoólico. Não foi detectada a presença de alcalóides, cumarinas, saponinas, antocianinas e antocianidinas (Tabela 1).

Tabela 1. Classes de metabólitos secundários identificados nos extratos aquoso, alcoólico e de acetato de etila de *G. kunthiana*.

Classes de metabólitos	Extratos		
	Aquoso	Alcoólico	Acetato de etila
Taninos pirogálicos	+	+	-
Alcaloides	-	-	-
Cumarinas	-	-	-
Saponinas	-	-	-
Antocianinas	-	-	-
Flavonóides	+	+	-
Triterpenoides	+	+	+
Esteroides	-	-	-

+: Presença do composto; -: Ausência do composto

Os resultados obtidos corroboram com dados da literatura. Lago e Roque (2009) avaliaram os compostos presentes no extrato etanólico da madeira de *Guarea Macrophylla* e verificaram a presença de triterpenoides. Pereira et al. (2012), avaliando os compostos presentes no extrato metanólico verificaram a presença de flavonóides.

Hernes e Hedges (2004) verificaram a presença de taninos e triterpenoides nas extrações com solventes de acetato de etila e água em *G. rubiflora* e *G. trichilliodes*.

Atividade antimicrobiana

Considerando-se os valores de classificação da CIM e CBM, pode-se verificar que o óleo essencial exerceu elevada atividade frente a *S. Infantis*, *S. Typhimurium* e *S. Give*, com valores de CIM e CBM de 54,6 µg/mL para ambas. Para *S. Saintpaul* e *S. Agona*, os valores foram moderados com CIM e CBM de 218,7µg/mL para o sorotipo Saintpaul e CIM e CBM de 437µg/mL para o sorotipo Agona. Para os sorotipos Ohio e Gallinarum os valores foram de baixa atividade com CIM e CBM de 875 µg/mL. Para *S. Heildelberg* os valores de CIM e CBM de 1750 µg/mL foram considerados muito baixos. Para *S. Enteritidis* e *S. Mbandaka*, o óleo essencial não exerceu nenhuma atividade (Tabela 2).

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial de *G. kunthiana* frente aos micro-organismos testados.

Micro-organismos	CIM/CBM ^a		
	Óleo essencial ^b	Metanol ^c	Gentamicina ^d
<i>S. Enteritidis</i>	Sa/Sa	Sa/ Sa	0.78/0.78*
<i>S. Infantis</i>	54.6/54.6	Sa/ Sa	0.78/0.78*
<i>S. Typhimurium</i>	54.6/54.6	Sa/ Sa	0.78/0.78*
<i>S. Heildelberg</i>	1750/1750	Sa/ Sa	0.78/0.78*
<i>S. Mbandaka</i>	Sa/ Sa	Sa/ Sa	0.78/0.78*
<i>S. Give</i>	54.6/54.6	Sa/ Sa	0.78/0.78*
<i>S. Saintpaul</i>	218.7/218.7	Sa/ Sa	0.78/0.78*
<i>S. Ohio</i>	875/875	Sa/ Sa	0.78/0.78*

<i>S. Gallinarum</i>	875/875	Sa/ Sa	0.78/0.78*
<i>S. Agona</i>	437/437	Sa/ Sa	0.78/0.78

^a Concentração inibitória mínima (CIM)/Concentração bactericida mínima (CBM) e Concentração fungicida mínima (CFM); ^b Testado na concentração de 7000-3.4 µg/mL; ^c Testado na concentração de 7000 µg/mL; ^d Testado na concentração de 100-0.78 mg/mL; Sa: Sem atividade; Nt: Não testado* mg/mL.

Observou-se que houve variação de suscetibilidade antimicrobiana entre os sorotipos testados. Esta variação foi também reportada por Carramiñana et al. (2004) e Scur et al. (2013), os quais justificaram diferenças em alguns sorotipos testados frente a diferentes antimicrobianos, atribuindo esta variação a origem dos sorotipos, e às pressões seletivas que os mesmos podem sofrer com a utilização de diferentes antimicrobianos, levando a seleção de sorotipos resistentes.

O mecanismo de ação antimicrobiana dos óleos essenciais envolvem diferentes ações, como a perturbação da membrana citoplasmática, interrupção da força motriz de prótons e do fluxo de elétrons, do transporte ativo e da coagulação dos conteúdos celulares (Burt, 2004). Um dos aspectos mais importantes é a hidrofobicidade dos componentes químicos, o que permite uma partição dos lipídios da membrana da célula bacteriana e das mitocôndrias, podendo acarretar um extravazamento do conteúdo celular (Burt, 2004; Holley e Patel, 2005).

Em relação à classificação da atividade antimicrobiana dos extratos, pode-se verificar que o extrato alcoólico exerceu elevada atividade frente aos sorotipos *Infantis* e *Gallinarum*, com valores de CIM e CBM de 0,39 e 0,78 mg/mL, respectivamente. Já o extrato de acetato de etila exerceu baixa atividade antimicrobiana frente aos sorotipos testados, com valores de CIM e CBM variando de 100-200 mg/mL. Para o extrato aquoso não foi verificada atividade antimicrobiana (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos diferentes extratos de *G. kunthiana* frente aos sorotipos de *Salmonella* testados.

Micro- organismos	CIM/CBM mg/mL ^a				
	Aquoso ^b	Acetato de Etila ^c	Alcoólico ^d	DMSO ^e 10%	Gentamicina ^f 200 mg/mL
<i>S. Enteritidis</i>	Sa/Sa	200/200	200/200	Sa/Sa	0.78/0.78
<i>S. Infantis</i>	Sa/Sa	200/200	0.39/0.39	Sa/Sa	0.78/0.78
<i>S. Typhimurium</i>	Sa/Sa	200/200	200/200	Sa/Sa	0.78/0.78
<i>S. Heidelberg</i>	Sa/Sa	200/200	200/200	Sa/Sa	0.78/0.78
<i>S. Mbandaka</i>	Sa/Sa	200/200	200/200	Sa/Sa	0.78/0.78
<i>S. Give</i>	Sa/Sa	100/200	100/200	Sa/Sa	0.78/0.78
<i>S. Saintpaul</i>	Sa/Sa	200/200	200/200	Sa/Sa	0.78/0.78
<i>S. Ohio</i>	Sa/Sa	100/200	Sa/ Sa	Sa/Sa	0.78/0.78
<i>S. Gallinarum</i>	Sa/Sa	200/200	0.78/0.78	Sa/Sa	0.78/0.78
<i>S. Agona</i>	Sa/Sa	200/200	200/200	Sa/Sa	0.78/0.78

^a Concentração inibitória mínima (CIM)/Concentração bactericida mínima mg/mL; ^b Testado na concentração de 50-0.04 mg/mL; ^c Testado na concentração de 200- 0.09 mg/mL; ^dTestado na concentração de 200-0.09 mg/mL; ^e Testado na concentração de 10%; ^f Testado na concentração de 100-0.78; Sa: Sem atividade;

O potencial antimicrobiano do extrato alcoólico pode ser justificado pela presença de alguns metabólitos secundários, tais como os taninos, triterpenóides e flavonóides (Tabela 1). A ação antimicrobiana dos flavonóides está provavelmente relacionada à capacidade de complexar proteínas extracelulares e solúveis, e também as estruturas da parede celular bacteriana (Sato et al., 1996). Cushnie e Lamb (2011)

sugerem que a atividade antibacteriana dos flavonóides pode ser atribuída a danos na membrana citoplasmática (perfuração e/ou redução da fluidez da membrana), inibição da síntese de ácidos nucléicos (causada pela inibição da topoisomerase) e inibição do metabolismo energético (causada pela inibição da NADH- citocromo C redutase).

A ação antimicrobiana dos taninos pode estar relacionada ao fato destes compostos terem habilidade em complexar macromoléculas, como polissacarídeos e proteínas, podendo causar uma desnaturação, e consequentemente alterar as proteínas da membrana celular bacteriana. Esta ação com proteínas ocorre por interações não específicas como pontes de hidrogênio, efeitos hidrofóbicos e através de ligações covalentes (Simões et al., 2007).

Os triterpenos são compostos muito frequentes em plantas e com inúmeras atividades biológicas, principalmente ação antimicrobiana e inseticida (Chung et al., 2011; Garcez et al., 2013). Seu mecanismo de ação na célula bacteriana está relacionado ao rompimento dos compostos lipofílicos (Bagamboula et al., 2004).

Apesar de ter sido detectada a presença de esteróides, taninos, flavonóides e triterpenóides no extrato aquoso (Tabela 1), o mesmo não exerceu atividade antimicrobiana, isto pode ser justificado pela suposição destes compostos estarem presentes em quantidades ínfimas ou devido à quantidade aplicada do extrato, a qual pode não ter sido suficiente para promover ação inibitória (Degáspari et al., 2005). Isto também pode ser relatado para o extrato de acetato de etila, o qual possui compostos triterpenóides na sua composição (Tabela 1) e exerceu baixa atividade antimicrobiana.

Atividade inseticida

O extrato alcoólico 10% apresentou a maior porcentagem de mortalidade de larvas (34,0%), enquanto que com o extrato de acetato de etila foram obtidos 21,3 e 26,0%, para as concentrações de 5 e 10%, respectivamente. Já o extrato aquoso,

apresentou os valores de mortalidade mais baixos 12,5 e 14,6% para as concentrações de 5 e 10%, respectivamente exercendo, portanto, baixa atividade (Tabela 4).

Tabela 4: Porcentagem de mortalidade de larvas do cascudinho (*A. diaperinus*), 10 dias após terem sido submetidos à aplicação direta dos extratos vegetais e do óleo essencial de *G. kunthiana*, em condições de laboratório ($26 \pm 1^\circ \text{C}$, fotofase de 14 horas).

Tratamento (Extratos vegetais)	% Mortalidade
Testemunha Água	$3.3 \pm 1.49\text{e}$
DMSO 10%	$4.0 \pm 1.24\text{e}$
Extrato aquoso 5%	$12.5 \pm 1.59\text{d}$
Extrato aquoso 10 %	$14.6 \pm 1.69\text{cd}$
Extrato de acetato 5 %	$21.3 \pm 1.33\text{bc}$
Extrato de acetato 10 %	$26.0 \pm 2.21 \text{ b}$
Extrato alcoólico 5 %	$24.6 \pm 2.26\text{b}$
Extrato alcoólico 10 %	$34 \pm 1.63^{\text{a}}$
Tratamento (Óleo essencial)	% Mortalidade
Testemunha Água	$2.6 \pm 1.49\text{c}$
Acetona 10%	$3.3 \pm 1.24\text{c}$
Óleo 100 mg/mL	$14 \pm 1.24\text{b}$
Óleo 200 mg/mL	$28.6 \pm 1.69^{\text{a}}$

Médias ($\pm$ EPM) seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$)

Em relação ao efeito sobre adultos, o extrato alcoólico a 10% apresentou o maior valor de mortalidade (44,6%), seguido pelo extrato de acetato de etila (23,3 e 28,0%) nas concentrações de 5 e 10%, respectivamente e por último, o extrato aquoso que apresentou os menores valores de mortalidade (16,6 e 19,3%) (Tabela 4). Pode-se verificar que houve diferenças de atividade em relação aos diferentes solventes

utilizados, o que confirma a questão da diferença de afinidade dos solventes em relação aos diferentes compostos da planta. Segundo Ferri (1996), os extratos extremamente polares (aquosos) apresentam menor atividade quando comparados com extratos de polaridade intermediária (etanólicos).

Observa-se que tanto para larvas como para adultos o extrato alcoólico foi o que apresentou maior eficiência. Compostos como taninos presentes na composição deste extrato (Tabela 1) podem justificar a atividade encontrada, uma vez que os mesmos são considerados compostos que agem na defesa contra pragas, pois apresentam a capacidade de se ligar com proteínas digestivas dos insetos agindo como redutores digestivos, reduzindo significativamente o crescimento e a sobrevivência de insetos, uma vez que inativam enzimas digestivas e criam um complexo de taninos-proteínas de difícil digestão (Mello e Filho, 2002; Cavalcante et al., 2006).

Em relação ao óleo essencial, verifica-se que na concentração de 200 mg/mL apresentou maior percentual de mortalidade (28,6%) seguida da concentração de 100 mg/mL, a qual apresentou valor mais baixo de mortalidade (14,0%) (Tabela 5).

Tabela 5: Porcentagem de mortalidade de adultos do cascudinho (*A.diaperinus*), 10 dias após terem sido submetidos à aplicação direta dos extratos vegetais e óleo essencial de *G. kunthiana*, em condições de laboratório ($26 \pm 1^\circ \text{C}$, fotofase de 14 horas).

Tratamento (Extratos vegetais)	% Mortalidade
Testemunha Água	$2.0 \pm 1.33 \text{ c}$
DMSO 10%	$2.0 \pm 0.81 \text{ c}$
Extrato aquoso 5%	$16.6 \pm 2.35 \text{ b}$
Extrato aquoso 10 %	$19.3 \pm 2.44 \text{ b}$
Extrato de acetato 5 %	$23.3 \pm 1.82 \text{ b}$
Extrato de acetato 10 %	$28.0 \pm 2.26 \text{ b}$

Extrato alcoólico 5 %	26.6 ± 3.49 b
Extrato alcoólico 10 %	44.6 ± 4.42 a
Tratamento (Óleo essencial)	% Mortalidade
Testemunha Água	1.3 ± 1.33 b
Acetona 10%	2.0 ± 0.81 b
Óleo 100 mg/mL	10 ± 1.49 a
Óleo 200 mg/mL	12 ± 1.33 a

Médias ($\pm$ EPM) seguidas de mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

Em relação aos valores de mortalidade dos adultos frente à aplicação do óleo essencial, verifica-se que os valores de mortalidade foram baixos, com 10,0% para a concentração de 100 mg/mL e 12,0% para a concentração de 200 mg/mL, sendo que as duas concentrações não diferiram estatisticamente (Tabela 5).

Em relação ao óleo essencial, este exerceu maior atividade frente às larvas em relação aos adultos. A ação inseticida de óleos essenciais pode ocorrer de diversas maneiras, podendo causar: mortalidade, deformações em diferentes estágios de desenvolvimento, repelência e deterência. Por meio do contato, os óleos essenciais podem interagir com o tegumento do inseto, além de atuar em enzimas digestivas e neurológicas (Isman, 2006; Knaak e Fiuza, 2010).

Atividade antioxidante

Em relação aos resultados de atividade antioxidante, ressalta-se que os valores do IC₅₀ estão inversamente relacionados à porcentagem de sequestro do DPPH, sendo que quanto maior o índice de sequestro, menor o valor do IC₅₀. Observa-se que não houve diferenças significativas entre o controle positivo BHT o óleo essencial e o extrato alcoólico, demonstrando desta forma, que os mesmos exerceram ótima atividade antioxidante. Comparando-se o extrato aquoso com o antioxidante sintético, pode-se

verificar que houve diferenças significativas, demonstrando desta forma uma moderada capacidade antioxidante. Já o extrato de acetato de etila apresentou baixa capacidade de sequestro do radical (Tabela 6).

Tabela 6: Índice de DPPH (2,2-difenil-2-picrilhidrazil) (% de sequestro) e IC₅₀ do óleo essencial e dos diferentes extratos testados.

Soluções de teste	% sequestro DPPH	IC ₅₀
Controle positivo (BHT)	95.85±0.04 a	9.27±0.08 a
Óleo essencial	91.52±0.09 a	17.54±0.18 a
Alcoólico	92.60± 0.86 a	15.33±1.62 a
Aquoso	76.54± 2.00 b	45.30±3.75 b
Acetato de Etila	6.61 ±1.04 c	176.84±1.96 c

Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão de triplicatas. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p <0,05)

A alta capacidade antioxidante do extrato alcoólico pode estar associada à presença de compostos fenólicos detectados na prospecção fitoquímica, tais como flavonoides e taninos (Tabela 1). O potencial antioxidante dos compostos fenólicos se deve principalmente às suas propriedades redutoras e estrutura química. Estas características são responsáveis por desempenhar um papel importante na neutralização ou sequestro de radicais livres e quelação de metais de transição, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (Chun et al., 2005; Sousa et al., 2007).

Os flavonoides podem atuar como agentes redutores, sequestradores de radicais livres, quelantes de metais ou desativadores do oxigênio singleto (Melo e Guerra, 2002; Canterle, 2005). Vários taninos atuam como seqüestradores de radicais livres, os quais interceptam o oxigênio ativo formando radicais estáveis (Mello e Santos, 2007).

De acordo com os resultados obtidos, o óleo essencial e os extratos testados de *G. kunthiana* exerceram atividade antimicrobiana, inseticida e antioxidante. Este estudo representa o primeiro relato na literatura da atividade antimicrobiana, potencial inseticida frente a *A. diaperinus* e atividade antioxidante do óleo essencial e dos extratos aquoso, alcoólico e de acetato de etila de *G. kunthiana*, e pode servir como base para a realização de novas pesquisas com plantas que apresentam potencial biológico desconhecido. Cabe ressaltar a importância de estudos mais aprofundados para a determinação da ação dos compostos presentes no óleo essencial e nos extratos testados isoladamente e em sinergismo e até mesmo testes de toxicidade, os quais podem contribuir para a aplicação destes produtos no setor avícola.

CONCLUSÃO

O óleo essencial de *G. kunthiana* exerceu maior atividade antimicrobiana frente aos sorotipos Infantis, Typhimurium e Give. Em relação aos extratos, maior susceptibilidade antimicrobiana foi verificada para o extrato alcoólico frente aos sorotipos Infantis e Gallinarum. Os valores de atividade inseticida foram considerados baixos para o teste com o óleo essencial e com os extratos vegetais. Os resultados de atividade antioxidante revelaram que o óleo essencial e o extrato alcoólico não apresentaram diferenças significativas com o antioxidante sintético.

AGRADECIMENTO (S)

A Capes, a Fundação Araucária e CNPq pelo financiamento.

REFERÊNCIAS

Aliogiannis N, Kalpoutzakis E, Mitaku S, Chinou JB (2001). Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oils of Two Origanum Species. J. Agric. Food. Chem. 49: 4168-4170.

Ayres MCC, Brandão MS, Vieira-Junior GM, Menor JCAS, Silva HB, Soares MJ, Chaves MH (2008). Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. Rev. Bras. Farmacognos. 1: 90-97.

Bagamboula CF, Uyttendaele M, Debevere J (2004). Antimicrobial and antioxidative activities of the essential oils and methanol extracts of *Salvia cryptantha*(Montbretet Aucher ex Benth.) and *Salvia multicaulis* (Vahl.). Food. Chem. 84:519-525.

Burt S (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. Int. J. Food. Microbiol. 94: 223-253.

Cavalcante GM, Moreira AFC, Vasconcelos SD (2006). Insecticidal potential of aqueous extracts from arboreous species against whitefly. Pesq. Agrop. Bras.41: 9-14.

Canterle LP (2005). Erva-mate e atividade antioxidante. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, pp. 99.

Carramiñana JJ, Rota C, Agustín I, Herrera A (2004). High prevalence of multiple resistance to antibiotics in *Salmonella* serovars isolated from a poultry slaughterhouse in Spain. Vet. Microbiol. 104: 133-139.

Ceyhan N, Keskin D, Ugur A (2012). Antimicrobial activities of different extracts of eight plant spices from four different family against some pathogenic microorganisms. J. Food Agric. Environ. 10: 193-197.

Chung PY, Navaratnam P, Chung LY (2011). Synergistic antimicrobial activity between pentacyclic triterpenoids and antibiotics against *Staphylococcus aureus* strains. Ann. Clin. Microbiol. Antimicrob. 25: 1-6.

Coelho AAM (2006). Análise inseticida de extratos de plantas do bioma cerrado sobre triatomíneos e larvas de *Aedes aegypti*. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, pp. 104.

Cushnie TP, Lamb AJ (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *Int. J. Antimicrob. Agents*. 38: 99-107.

Degáspari CH, Waszczynskyj N, Prado MRM (2005). Antimicrobial activity of *Schinus terebenthifolius* Raddi. *Ciênc. Agrotec*. 29: 617-622.

Devi NS, Padma Y, Raju RRV (2014). In vitro biological screening and chemical constituents of *Euphorbia perbracteata* Gage. *J. Med. Plants. Res*. 8: 564-570.

Felipe DF, Filho BPD, Nakamura CV, Cortez DAG (2008). Evaluation of the Antimicrobial Activity of *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallenscens* (C. DC.) Yunck. *Lat. Am. J. Pharm*. 27:618-20.

Ferri PH (1996). Química de produtos naturais: Métodos gerais. In: Stasi LCD. Plantas medicinais: Arte e ciência. Um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo: UNESP, pp. 230.

Ferreira DF (2007). Sistema Sisvar para análises estatísticas. <<http://www.dex.ufla.br/~danielff/software.htm>> Acesso em 12 abr. 2014.

Garcez WS, Garcez FR, Silva LMGE, Sarmiento UC (2013). Substâncias de origem vegetal com atividade larvicida contra *Aedes aegypti*. *Rev. Virtual. Quim*. 5: 363-393.

Guimarães LGL, Cardoso MG, Andrade J, Teixeira ML, Gomes MS, Machado MF (2014). Antioxidant capacity of essential oils extracted from *Lippia sidoides*, *Ageratum*

fastigiatum, *Ocotea odorifera*, *Mikania glauca* and their major components. J. Med. Plants. Res. 8: 632-639.

Hazeleger WC, Bolder NM, Beumer RR, Reitsma WFJ (2008). Darkling beetles (*Alphitobius diaperinus*) and their larvae as potencial vectors for the transfer of *Campylobacter jejuni* and *Salmonella enterica* serovar Paratyphi B variant Java between successive broiler flocks. Appl. Environ. Microbiol 74: 6887-6891.

Holetz FBGL, Pessini NR, Sanches DAG, Cortez DAG, Nakamura, CV Filho BPD (2002). Screening of Some Plants Used in the Brazilian Folk Medicine for the Treatment of Infectious Diseases Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 97: 1027-31.

Holley RA, Patel D (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. Food. Microbiol. 22: 273-292.

Isman MB (2006). Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. Ann. Rev. Entomol. 51: 45-66.

Knaak N, Fiuza LM (2010). Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. Neotrop. Biol. Cons. 5:120-132.

Lago JHG, Roque NF (2009). Phytochemical study of the wood from *Guarea macrophylla* (Meliaceae) Quim. Nova. 32: 2351-2354.

Lima RC (2006). Limonóide de *Guarea kunthiana* com potencial leishmanicida. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, pp. 77.

Marcomini AM, Alves LFA, Bonini AK, Mertz NR, Santos JC (2009). Atividade inseticida de extratos vegetais e do óleo de nim sobre adultos de *Alphitobius diaperinus* Panzer (Coleoptera, Tenebrionidae). Arq. Inst. Biol. 76: 409-416.

- Marques CRG, Mikami AY, Pissinati A, Piva LB, Santos OJAP, Ventura UM (2013). Mortalidade de *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) por óleos de nim e citronela. *Ciênc. Agrár.* 34: 2565-2574.
- Matos FJA (1997). Introdução à Fitoquímica Experimental. Fortaleza: Edições UFC. pp. 141.
- Mello JCP, Santos SD (2002). Taninos. In: Simões CMO. Farmacognosia da planta ao medicamento. UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina, pp. 1104.
- Mello MO, Filho, SMC (2002). Plant-Insect Intections: an Evolutionary Arms Race Between two Distinct Defense Mechanisms. *Braz. J. Plant. Physiol.* 14: 71-81.
- Mesquita ML, Desrivot J, Bories C, Fournet A, Paula JE, Grellier P, Espíndola LS (2005). Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian cerrado plants. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 100: 783-787.
- Pereira C, Júnior, CBB, Kuster RM, Simas NK, Sakuragui CM, Porzel A, Wessjohann L (2012). Flavonoids and a neolignan glucoside from *Guarea macrophylla* (Meliaceae). *Quim. Nova* 35: 1123-1126.
- Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Moraes SM, Sampaio CG, Pérez-Jiménes J, Saura-Calixto FD (2007). Metodologia Científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *Comun. Téc.* 127:1-4.
- Santos JRGL, Turnes CG (2005). Probiotics in aviculture. *Ciênc. Rural.* 35:741-747.

- Santurio JM, Santurio DF, Pozzatti P, Moraes C, Franchin PR, Alves SH (2007). Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente à sorovares de *Salmonella* de origem avícola. Cienc Rural. 37:803-808.
- Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder, VLG (2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Braz. J. Microbiol. 35: 275-280.
- Sato M, Fujiwara S, Tsuchiya H, Fujii T, Linuma M, Tosa H, Ohkawa Y (1996). Flavones with antibacterial activity against carcinogenic bacteria. J.Ethnopharmacol. 54: 171-176.
- Scherer R, Godoy HT (2009). Antioxidant activity index (AAI) by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. Food. Chem. 112: 654-658.
- Scur MC, Pinto FGS, Bona EAM, Weber LD, Alves LFA, Moura AC. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolates recovered from poultry of Western Paraná, Brazil. Afr. J. Agric. Res. 9: 823-830.
- Simões CMO, Schenkel, EP, Gosman G (2007). Farmacognosia da planta ao medicamento. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS. pp. 1102.
- Teixeira LC, Lima AMC (2008). Ocorrência de *Salmonella* e *Listeria* em carcaças de frango oriundas de dois sistemas de criação no município de Campinas, SP. Arch. Vet Sci v. 13: 191-196.
- Ubabef (2014). União brasileira de avicultura. Relatório Anual 2014. Disponível em: <<http://www.ubabef.com.br/files/publicacoes/8ca705e70f0cb110ae3aed67d29c8842.pdf>> . Acesso em 12 abr. 2014.

Vieira PC, Fernandes JB, Andrei CC (2001). Plantas inseticidas. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Melo JCP, Mente LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre: Ed. Universidade do UFRGS, pp. 751-766.

Weber LD, Pinto FGS, Scur MC, Souza JGL, Costa WF, Leite CW (2014). Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and various plant extracts from *Prunus myrtifolia*. A. J. A. R. 9: 846-853.

AGRADECIMENTO (S)

A Capes, a Fundação Araucária e CNPq pelo financiamento.

NORMAS DA REVISTA JOURNAL OF MEDICINAL PLANT RESEARCH

Introduction

Authors should read the editorial policy and publication ethics before submitting their manuscripts. Authors should also use the appropriate reporting guidelines in preparing their manuscripts.

Research Ethics

Studies involving human subjects should be conducted according to the World Medical Association (WMA) Declaration of Helsinki - Ethical Principles for Medical Research Involving Human Subjects.

Studies involving non human animals should follow appropriate ethical guidelines such as the Animal Welfare Act, The Animals (Scientific Procedures) Act (Amendment) Order 1993, The EU parliament directive on the protection of animals used for scientific purposes, ARRPs policies and guidelines, etc.

Reporting guideline

Responsible reporting of research studies, which includes a complete, transparent, accurate and timely account of what was done and what was found during a research study, is an integral part of good research and publication practice and not an optional extra.

JMPR supports initiatives aimed at improving the reporting of health research. Authors should follow these guidelines when drafting their manuscripts.

Authors should endeavour to address all items recommended by the guidelines (as a minimum). Adherence to recommended reporting guidelines will increase the probability of manuscripts to be accepted for publication.

The EQUATOR website provides a central repository of up-to-date reporting guidelines and other resources that assist authors to prepare a good research manuscript.

Manuscript Handling Fee

The manuscript handling fee for JMPR is \$600 (USD).

Preparing your manuscript

The type of article should determine the manuscript structure. However, the general structure for articles should follow the IMRAD structure. Authors are also encouraged to follow the appropriate reporting guidelines as stated by the Equator-Network in preparing their manuscripts.

Title

The title phrase should be brief.

List authors' full names (first-name, middle-name, and last-name).

Affiliations of authors (department and institution).

Emails and phone numbers.

Abstract

The abstract should be less than 300 words. Abstract may be presented either in unstructured or structured format. The keywords should be less than 10.

Abbreviations

Abbreviation should be used only for non standard and very long terms.

The Introduction

The statement of the problem should be stated in the introduction in a clear and concise manner.

Materials and methods

Materials and methods should be clearly presented to allow the reproduction of the experiments.

Results and discussion

Results and discussion maybe combined into a single section. Results and discussion may also be presented separately if necessary.

Disclosure of conflict of interest

Authors should disclose all financial/relevant interest that may have influenced the study.

Acknowledgments

Acknowledgement of people, funds etc should be brief.

Tables and figures

Tables should be kept to a minimum.

Tables should have a short descriptive title.

The unit of measurement used in a table should be stated.

Tables should be numbered consecutively.

Tables should be organized in Microsoft Word or Excel spreadsheet.

Figures/Graphics should be prepared in GIF, TIFF, JPEG or PowerPoint.

Tables and Figures should be appropriately cited in the manuscript.

References

References should be listed in an alphabetical order at the end of the paper. DOIs, PubMed IDs and links to referenced articles should be stated wherever available.

Examples:

Goren A, Laufer J, Yativ N, Kuint J, Ben Ackon M, Rubinshtein M, Paret G, Augarten A (2001). Transillumination of the palm for venipuncture in infants. *Pediatric. Emerg. Care* 17:130-131.

<http://dx.doi.org/10.1097/00006565-200104000-00013> PMID:11334094

Mishra A, Mishra SC (2001). Cost-effective diagnostic nasal endoscopy with modified otoscope. *J. Laryngol. Otol.* 115:648-649.

<http://dx.doi.org/10.1258/0022215011908739> PMID:11535147

Acceptance Certificate

Authors are issued an Acceptance Certificate for manuscripts that have been reviewed and accepted for publication by an editor.

Payment of manuscript handling fee

Once a manuscript has been accepted, the corresponding author will be contacted to make the necessary payment of the manuscript handling fee. Kindly note that on the manuscript management system, the payment option is ONLY enabled for manuscripts that have been accepted for publication.

Proofs

Prior to publication, a proof is sent to the corresponding author. Authors are advised to read the proof and correct minor typographical or grammatical errors. Authors should promptly return proofs to the editorial office.

Publication

Once proofs are received at the editorial office, the manuscripts are usually included in the next issue of the journal. The article will thereafter be published on the journal's website

Publication Notification

After the article is made available on the journal's website, a publication notice is sent to the corresponding author with links to the issue and article.

Capítulo 2: Composição química, potencial antimicrobiano e antioxidante do óleo essencial de *Guarea kunthiana* A. Juss

Jessica Angela Pandini¹, Fabiana Gisele da Silva Pinto¹, Mayara Camila Scur¹, Willian Ferreira da Costa², Marina Roberta de Souza² Livia Godinho Temponi³

¹Laboratório de Biotecnologia, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, BR.

²Departamento de Química, Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR, BR.

³Laboratório de Botânica, Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Cascavel, PR, BR.

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi determinar a composição química do óleo essencial de *Guarea kunthiana* A. Juss pelo método de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), avaliar o potencial antimicrobiano deste óleo pelo método de microdiluição em caldo frente a diferentes micro-organismos, sendo cinco bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella entérica* subsp. *entérica* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), quatro Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) e *Bacillus subtilis* (CCD-04) e a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231), e por fim, determinar a atividade antioxidante do óleo pelo método de captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil (DPPH). As análises de CG-EM resultaram na identificação de 13 constituintes, representando

96,52% da área relativa total do óleo essencial. Os principais compostos identificados foram α -Zingibereno (34,48%), β -Sesquifelandreno (22,90%) e β -Curcumeno (16,17%). Em relação à atividade antimicrobiana, o óleo essencial foi efetivo frente a todos os micro-organismos testados exceto para as bactérias *E.coli* e *K. pneumoniae*, as quais se apresentaram resistentes à ação do óleo. Em geral, as bactérias Gram-positivas foram mais suscetíveis à ação do óleo essencial em relação às Gram-negativas. O óleo essencial apresentou potencial antioxidante na concentração de 6000 $\mu\text{g/mL}$. Nas demais concentrações, o óleo exerceu baixa capacidade de captura do radical.

Palavras-chave: *Guarea kunthiana*, óleo essencial, composição química, atividade antimicrobiana, antioxidante.

INTRODUÇÃO

Entre os principais produtos de origem vegetal com propriedades medicinais estão os óleos essenciais (Sartoratto et al., 2004) que vêm se destacando no setor industrial como ingredientes de formulações alimentícias, cosméticas, sanitizantes, além do uso na medicina alternativa e em terapias naturais (Ceyhan et al., 2012; Scherer e Godoy, 2009). Além disso, os óleos essenciais podem apresentar propriedades antimicrobianas e inseticidas, sendo os estudos referentes a estas propriedades de extrema relevância, principalmente aqueles que envolvem plantas com potencial biológico desconhecido (Krifa et al., 2011).

Os óleos essenciais são caracterizados quimicamente como misturas complexas de compostos de baixo peso molecular, sendo alguns altamente voláteis e capazes de gerar sabores e/ou aromas (Trombetta et al., 2005). Pesquisas científicas evidenciam o papel dos óleos essenciais nas interações biológicas das plantas e do seu potencial como agente terapêutico, incluindo ações anti-inflamatórias, analgésicas, anti-tumorais,

antifúngicas e antibacterianas, incluindo bactérias que causam intoxicação alimentar e deterioração de alimentos (Siani et al., 2000; Silva et al., 2003; Sousa et al., 2004; Osei-Safo et al., 2010; Kaileh et al., 2007).

Além destas propriedades, muitos óleos essenciais possuem atividade antioxidante confirmada, sendo estes, extremamente importantes na prevenção de doenças, atuando na inibição e atraso da oxidação das biomoléculas por meio da prevenção da iniciação ou da propagação da cadeia de reações de oxidação (Kaure Kapoor, 2001; Bamoniriet al., 2010; Mokhtar et al., 2011). Devido aos efeitos prejudiciais que os antioxidantes sintéticos podem apresentar, tais como toxicidade e carcinogenicidade, o interesse na descoberta de compostos antioxidantes naturais tem aumentado consideravelmente (Lossoet al., 2007).

A bioatividade dos óleos essenciais pode ser exercida por diferentes compostos dentre eles, os terpenoides (Burt, 2004). Os monoterpenos são bem conhecidos como constituintes da essência volátil de óleos essenciais extraídos de plantas medicinais e ervas aromáticas, o que justifica sua importância para a indústria de perfumes e aromatizantes. Alguns sesquiterpenos podem atuar como compostos antimicrobianos e anti-herbivoria (Croteauet al., 2000).

O crescente interesse pelos compostos bioativos naturais intensificou a realização de pesquisas que visam à substituição dos agentes químicos sintéticos no setor industrial, uma vez que os produtos naturais são menos prejudiciais à saúde (Gao et al., 2011), além de serem biodegradáveis e geralmente apresentarem baixa toxicidade em mamíferos (Figueiredo et al., 2008).

A família Meliaceae possui distribuição pantropical, incluindo cerca de 50 gêneros e 600 espécies. No Brasil, ocorrem seis gêneros e cerca de 100 espécies (Lorenzi e Matos, 2008). Os membros desta família apresentam uma vasta diversidade de compostos

químicos, incluindo limonoides, triterpenos, esteroides, diterpenos, sesquiterpenos e cumarinas (Cortez et al., 2000; Garcez et al., 2004; Lago et al., 2000; Lago et al., 2002; Soares et al., 2012). Os limonoides são os compostos mais abundantes, e provavelmente os maiores representantes da classe dos terpenos com atividade inseticida (Luo et al., 1999). Além destas propriedades, estes compostos podem atuar também como antitumorais, antifúngicos, bactericidas, antivirais (Champagne, 1992), antioxidantes (Jayaprakasha e Patil, 2007), leishmanicidas (Lima, 2006) e antimaláricos (Kirandeepet al., 2009).

Dentre as espécies que pertencem à família Meliaceae, *Guarea kunthiana* A. Juss, conhecida popularmente como jatuauba, figo-do-mato, peloteira e jító, se destaca por ser uma árvore nativa do Brasil e ter ampla distribuição geográfica, com ocorrência em todo o território nacional (Lorenzi, 2009). Pesquisas já realizadas com extratos das raízes desta planta relataram atividade antiparasitária (Lima, 2006; Mesquita et al., 2005) e inseticida (Coelho et al., 2006). Estudos fitoquímicos indicaram a ocorrência de diterpenos e sesquiterpenos no extrato etanólico obtido das folhas de *G. kunthiana* (Garcez et al., 2004) e um limonoide equadoriano, isolado a partir do extrato diclorometano das folhas (Mootoo et al., 1991). Contudo, não há relatos na literatura do potencial antimicrobiano, antioxidante e da composição química do óleo essencial de *G. kunthiana*, sendo este, portanto, o primeiro estudo.

Assim, o objetivo deste trabalho foi determinar a composição química do óleo essencial de *G. kunthiana*, seu potencial antimicrobiano frente a diferentes micro-organismos, sendo cinco bactérias Gram-negativas, quatro Gram-positivas e uma levedura, e ainda avaliar sua atividade antioxidante.

MATERIAL E MÉTODOS

Coleta e identificação da planta

As folhas de *G. kunthiana* foram coletadas no período de março e abril de 2013, em uma propriedade rural da região Oeste do estado do Paraná, Brasil (S 24° 31', W 53° 44', altitude 442 m). Após a coleta, as folhas foram secas em estufa a 35°C por um período de 48 horas para posterior trituração em moinho de facas até obtenção de material vegetal triturado com granulometria inferior a 0,42 mm. Uma exsicata foi enviada ao Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNOP) para a identificação botânica sob o número 7843 Pandini, J. A.

Obtenção do óleo essencial

Cerca de 60 g de material vegetal triturado de *G. kunthiana* foram submetidos à extração em 700 mL de água destilada por um período de 3-4 h, pela metodologia de arraste por vapor d'água, utilizando-se um aparelho do tipo Clevenger. Após a extração, o óleo obtido foi armazenado ao abrigo da luz a uma temperatura de 4°C até sua utilização (Weber, 2014).

Análise CG/EM

A análise dos compostos presentes no óleo essencial foi realizada em um cromatógrafo em fase gasosa FOCUS GC (ThermoElectron), acoplado a um espectrômetro de massas DSQ II (ThermoElectron) empregando um detector com fonte de ionização por impacto de elétrons de 70V e analisador de massas do tipo quadrupolo. A separação cromatográfica foi efetuada por uma coluna capilar de sílica fundida DB-5 ms (30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de fase estacionária; composição de 5% fenil e 95% dimetilpolissiloxano).

A temperatura do injetor foi de 250°C e a vazão do gás de arraste foi mantida constante a 1 mL.min⁻¹. A amostra e os padrões dos alcanos foram injetados no modo split com razão de 1:25. A programação da temperatura foi: temperatura inicial de 50°C/2 min, seguida de aumento para 180° C/2° C min⁻¹ e 290° C/5° C min⁻¹. A interface entre o CG e o EM foi mantida em 270°C e a temperatura da fonte de ionização do espectrômetro de massas foi de 250°C. A identificação dos compostos foi realizada por comparação de seus tempos de retenção com os tempos de retenção obtidos na literatura (Adams, 2007) e por meio de seus índices de retenção de Kovats.

Atividade antimicrobiana

Micro-organismos e condições de teste

O óleo essencial da planta foi testado frente a diferentes micro-organismos, sendo cinco cepas de bactérias Gram-negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella entérica* subsp. *entérica* (ATCC 14028), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933) e *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), quatro Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *S.epidermidis* (ATCC 12228) e *Bacillus subtilis* (CCD-04) e a levedura *Candida albicans* (ATCC 10231) (American Type Culture Collection, USA).

Para o teste, os micro-organismos foram recuperados em caldo de enriquecimento “Brain Heart Infusion” BHI e incubados por 24 h a 36±0,1°C. Após este período, as cepas microbianas foram padronizadas em solução salina (0,85%) até atingirem a concentração final de 1×10⁵UFC/mL, com exceção da levedura *C. albicans* que foi diluída na concentração final de 1×10⁶ UFC/mL para servir como inóculo.

Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A CIM foi determinada como a menor concentração do óleo capaz de inibir o crescimento microbiano. O ensaio de microdiluição foi realizado conforme as normas do Clinical Laboratory Standards Institute (2007).

O óleo essencial foi diluído em metanol e caldo Mueller-Hinton (MH) para o teste com as bactérias e em metanol e caldo RPMI-1640 para *C. albicans* na proporção de 1:10 até atingir a concentração de 7000 µg/mL. Em placas de microtitulação de 96 poços foram distribuídos a partir da segunda coluna 150µL de caldo MH para as bactérias e caldo RPMI-1640 para *C. albicans*. Nas primeiras colunas foram adicionados 300 µL da solução do óleo de *G. kunthiana*, e a partir daí foram realizadas diluições de 7.000-3,4 µg/mL. Ao final adicionou-se 10 µL de inóculo em cada poço, e as placas foram incubadas a 36±0,1° C por 18-24h. Decorrido este intervalo de tempo, adicionou-se uma alíquota de 10 µL de cloreto de trifeniltetrazólio (CTT) a 10%, e as placas foram novamente incubadas a 36±0,1° C por 3 h. A presença de coloração vermelha foi interpretada como prova negativa do efeito inibitório do óleo essencial.

Determinação da concentração bactericida mínima (CBM) e concentração fungicida mínima (CFM)

A partir dos poços onde não houve crescimento bacteriano visível, antes da adição do CTT, foi retirada uma alíquota de 10 µL e inoculado na superfície de meio Agar MH. As placas foram incubadas por 24 h a 36±0,1°C e após este período, a CBM/CFM foi definida como a menor concentração do óleo essencial capaz de causar a morte do inóculo (Santúrio et al., 2007).

Como controle negativo foi utilizado metanol, e para o controle positivo foi utilizado gentamicina para as bactérias e nistatina para *C. albicans*, ambos testados nas concentrações de 100-0,78 mg/mL.

Atividade antioxidante

A atividade antioxidante do óleo essencial foi mensurada de acordo com o método da redução do radical livre 2,2-difenil-1-picril hidrazil(DPPH), baseada na metodologia proposta por Scherer e Godoy (2009), Rufino et al. (2007) e Weber, 2013. Para tal, alíquotas de 0,1 mL do óleo essencial em diferentes concentrações (6000-375 µg/mL) foram tratadas com 3,9 mL de solução metanólica de DPPH 0,2 mM e levemente homogeneizadas em agitador de tubos. Após a agitação, os tubos foram deixados em repouso ao abrigo da luz durante 30 minutos. Decorrido o tempo de reação, a absorbância das amostras foi mensurada em 515 nm. Como controle negativo foi utilizado 0,1 mL de solução controle (metanol, acetona e água) e como controle positivo utilizou-se o antioxidante sintético comercial BHT (butil-hidroxi- tolueno), nas mesmas condições do controle negativo. Como branco, foi utilizado metanol para a calibração do espectrofotômetro. A capacidade de sequestro do radical livre foi expressa pela equação: $I\% = [(Abs_0 - Abs_1)/Abs_0] \times 100$, onde Abs_0 é a absorbância do controle e Abs_1 é a absorbância da amostra. O IC_{50} (quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH) foi calculado com base na equação da reta obtida da curva de calibração. Os testes foram realizados em triplicata.

Os dados obtidos pelos cálculos da capacidade de sequestro do radical DPPH e o IC_{50} foram analisados pelo teste de Tukey, a 5% de significância, utilizando-se o programa Sisvar (Ferreira, 2011).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A análise de CG/EM, resultou na identificação de 13 compostos, representando 96,52% da área relativa total do óleo essencial. Os compostos majoritários foram α -Zingibereno (34,48%), β -Sesquifelandreno (22,90%) e α -Curcumeno (16,17%) (Tabela1).

Os compostos identificados foram na maioria hidrocarbonetos sesquiterpênicos (84,37%), seguidos do diterpeno Caureno (9,95%) e do sesquiterpeno oxigenado Espatuleno (2,20%). A ocorrência de sesquiterpenos é bem evidenciada nos óleos essenciais de diferentes espécies de *Guarea*, tais como: *G. convergens*, *G. humaitensis*, *G. scabra* e *G. silvatica* que demonstraram principalmente a presença de hidrocarbonetos sesquiterpênicos e oxigenados e do diterpeno Caureno, variando os compostos majoritários entre as espécies testadas (Magalhães et al., 2010). Lago et al. (2000), avaliando os compostos presentes no óleo essencial de *G. guidonia*, relataram somente a ocorrência de sesquiterpenos. Estudos com a espécie *G. macrophyla* indicaram a ocorrência de sesquiterpenos oxigenados e hidrocarbonetos, diterpenos e também de ácidos graxos, sendo que os compostos apresentaram variações em diferentes épocas do ano. (Lago et al., 2000; Lago et al., 2006).

A variação dos compostos químicos presentes nos óleos essenciais pode ser atribuída a diferentes fatores, como sazonalidade, ritmo circadiano, idade e desenvolvimento da planta, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, teor de nutrientes, altitude, poluição atmosférica e ataque de patógenos (Gobbo-Neto e Lopes, 2007). A alteração de alguns destes fatores tem demonstrado influenciar significativamente no rendimento e composição de óleos essenciais (Dudareva et al., 2004), atribuindo a isso, as diferenças encontradas quando se comparam diferentes estudos.

Quanto ao potencial antimicrobiano, o óleo essencial de *G. kunthiana* exerceu atividade frente a todos os micro-organismos testados, exceto para as bactérias *E. coli* e *K. pneumoniae*, as quais se apresentaram resistentes a ação do óleo. Os valores de CIM variaram entre 13,6 a 3500 µg/mL e CBM de 54,6 a 3500 µg/mL para as bactérias Gram-positivas e CIM e CBM de 7000 µg/mL para as Gram-negativas. Para *C. albicans* os valores de CIM e CBM foram 1750 e 3500 µg/mL, respectivamente (Tabela 2).

No geral, as bactérias Gram-positivas foram mais suscetíveis à ação do óleo essencial em relação às Gram-negativas. Não há relatos na literatura do potencial antimicrobiano do óleo essencial de *G. kunthiana* e são escassos os trabalhos relativos a testes antimicrobianos com óleos essenciais de plantas da família Meliaceae. Dados semelhantes a este estudo foram reportados por Sairam et al. (2000), que ao avaliarem o potencial antibacteriano e antifúngico do óleo essencial de *Azadirachta indica* (Meliaceae) observaram maior atividade antimicrobiana do óleo essencial frente as bactérias Gram-positivas quando comparadas as Gram-negativas. Aromdee e Sriubolmas (2006), avaliando o potencial antimicrobiano desta mesma planta, verificaram atividade antimicrobiana moderada frente a *B. subtilis* e *C. albicans*, já Parthasarathy e Thombare (2013) reportaram atividade somente para *Staphylococcus auricularis* com o óleo essencial desta espécie.

Os mecanismos de ação dos óleos essenciais nas células bacterianas envolvem diferentes alvos. Uma das características mais importantes é a hidrofobicidade de seus componentes, o que permite uma partição nos lípidios da membrana da célula bacteriana e nas mitocôndrias, perturbando as estruturas e levando a um extravazamento do conteúdo celular (Burt, 2004). A maior resistência das bactérias Gram-negativas à ação dos óleos essenciais pode ocorrer devido à complexidade da dupla membrana apresentada por estes micro-organismos, a qual limita a difusão de compostos

hidrofóbicos, através da cobertura lipopolissacarídica (Burt et al., 2004; Holley e Patel, 2005).

Em geral, a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais depende da composição química da planta, o que pode variar de acordo com o período do ano (Reis et al., 2003; Yesil-Celiktaset al., 2007). Alguns compostos presentes no óleo essencial de *G. kunthiana*, como o α -Zingibereno apresenta propriedades antimicrobianas (Croteau et al., 2000) com relatado para *Zingiber officinale* (gengibre) que apresenta este composto como majoritário no óleo essencial, o qual demonstrou significativa atividade frente a algumas bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Andrade et al., 2012), sendo que as propriedades terapêuticas desta planta são atribuídas em parte pela ação deste composto (Zarate et al., 1992). A outros compostos como o Cariofileno e o Germacreno-D são atribuídas propriedades antibacterianas e antifúngicas (Costa et al., 2010; Veiga-Júnior e Pinto et al., 2002). O Epatulenol possui propriedades antibacterianas (Pacciaroni et al., 2000), o que pode justificar a atividade encontrada.

Apesar de alguns destes compostos estarem presentes em baixas concentrações, eles podem ter efeito sobre a eficiência global da atividade antimicrobiana do óleo essencial em ação sinérgica com os demais constituintes (Burt, 2004; Vagionas et al., 2007; Giles et al., 2010). Embora os componentes majoritários possam representar muitas vezes mais de 85% da caracterização química dos óleos essenciais, a sua proporção não está relacionada com a grandeza de sua atividade, podendo esta inclusive ser fundamental para a ação farmacológica dos compostos que aparecem em quantidades ínfimas (Galindo et al., 2010).

A análise dos resultados de atividade antioxidante do óleo essencial de *G. kunthiana*, demonstra que existem diferenças significativas entre as diferentes concentrações testadas do óleo essencial e o antioxidante sintético comercial (BHT). Porém, a

diferença do índice de IC₅₀ entre os valores do antioxidante sintético (BHT) e a concentração de 6000 µg do óleo essencial é pequena (9,27 para o BHT e 17,54 para o óleo essencial). O mesmo pode ser verificado quando se comparam os valores de porcentagem de sequestro do radical DPPH (95,85% para o BHT e 91,52% para o óleo essencial), demonstrando desta forma, que o óleo essencial apresentou maior atividade antioxidante nesta concentração. Nas demais concentrações avaliadas o óleo essencial apresentou baixa capacidade de sequestro do radical DPPH (Tabela 3).

A capacidade de sequestrar radicais livres do óleo essencial de *G. kunthiana* pode ser atribuída à presença de alguns compostos como o α -Zingibereno, que desempenha importante papel na defesa de algumas plantas contra a oxidação (Rice-Evans et al., 1997). Outros compostos, como o Cariofileno, possuem reconhecida atividade antioxidante, e pode ter esta capacidade aumentada pelo efeito sinérgico com os demais compostos presentes (Shahidi e Wanasundara., 1992; Moraes et al., 2006).

Os resultados de atividade antioxidante relatados na literatura são difíceis de serem comparados, uma vez que esta é fortemente influenciada pelo método de determinação. Várias metodologias têm sido descritas para a avaliação da atividade antioxidante de compostos químicos presentes nos óleos essenciais e também de extratos vegetais. Alguns autores propõem testes que recorrem à redução de radicais livres gerados *in vitro*, resultantes da ação antioxidante de substâncias avaliadas, destacando-se o método do DPPH (2,2-difenil-2-picrilhidrazil), por ser uma alternativa rápida e de custo praticável (Molyneux, 2004).

Os produtos derivados de plantas servem como um protótipo no controle do crescimento de micro-organismos patogênicos e na produção de medicamentos menos tóxicos e mais eficazes (Ahmad e Beg, 2001; Kelmanson et al., 2000). É crescente a preocupação das indústrias em fazer uso de compostos menos agressivos, e a não

inclusão de matérias primas sintéticas para a conservação de produtos (Packer; Luz, 2007). Desta forma, estudos vêm sendo conduzidos com óleos essenciais para a descoberta de novos compostos com potencial antimicrobiano e antioxidante, uma vez que estes dois mecanismos aumentam de forma significativa a aplicação dos produtos (Guleria e Kumar, 2006; Mokhtar et al., 2011).

Este estudo representa o primeiro relato na literatura da composição química e potencial antimicrobiano e antioxidante do óleo essencial de *G. kunthiana*, e pode servir como base para a realização de novas pesquisas com plantas que apresentam potencial biológico desconhecido. Destaca-se assim, a importância dos estudos fitoquímicos, uma vez que os mesmos revelam a presença de compostos ativos que podem justificar os potenciais biológicos encontrados.

Desta forma, o óleo essencial de *G. kunthiana* tem potencial para ser utilizado na indústria de alimentos, cosmética e farmacêutica, uma vez que o mesmo apresenta propriedades antimicrobianas e antioxidantes. Cabe ressaltar, a importância de estudos mais aprofundados, principalmente para a determinação do mecanismo de ação deste óleo essencial, bem como a ação de seus compostos testados isoladamente e em sinergismo.

CONCLUSÕES

A análise por CG-EM do óleo essencial de *G. kunthiana* revelou a presença de 13 compostos, sendo α -Zingibereno, β -Sesquifelandreno e α -Curcumeno os principais componentes. Para o teste de atividade antimicrobiana, o óleo essencial foi efetivo frente a todos os micro-organismos testados exceto para *E. coli* e *K. pneumoniae*, no geral, as bactérias Gram-positivas foram mais suscetíveis a ação do óleo essencial em comparação às Gram-negativas. Em relação à atividade antioxidante, o óleo foi efetivo

na concentração de 6000 µg/mL, expressando valores próximos ao antioxidante sintético.

REFERÊNCIAS

Adams RP(2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. London: Allured Pub. Corp, pp. 804.

Ahmad I, Beg AZ(2001). Antimicrobial and phytochemical studies on 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens.J Ethnopharmacol. 74:113-123.

Andrade MA, Cardoso MG, Batista LR, Mallet ACT, Machado SMF (2012). Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. Rev Ciênc Agron. 43: 399-408.

Aromdee C, Sriubolmas N (2006). Essential oil of the flowers of *Azadirachta indica* A. Juss(Meliaceae).J Sci Techno.28: 115-119.

Bamoniri A, Abdolrasoul HE, Mazoochi A, Behpour M, Kashi FJ, Batooli, H (2010). Antioxidant and antimicrobial activity evaluation and essential oil analysis of *Semenovia tragoides* Boiss. from Iran. Food Chem. 122: 553-558.

Burt S (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-a review. Int J Food Microbiol.94: 223-253.

Carvalho ACB, Nunes DSG, Baratelli, TG, Shuqair, NSMSAQ, Netto EM (2007). Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos. T&C Amaz. 5: 26-32.

Ceyhan N, Keskin D, Ugur A (2012). Antimicrobial activities of different extracts of eight plant spices from four different family against some pathogenic microorganisms. J. Food Agric Environ. 10: 193-197.

Champagne DE, Koul O, Isman MB, Scudder GGE, Towers GHN. 1992. Biological activity of limonoids from the rutales. Phytochem.31: 377-394.

CLSI.Clinical Laboratory Standards Institute. 2007. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing: Seventh Informational Supplement M100-S17.

Coelho AAM(2006). Análise inseticida de extratos de plantas do bioma cerrado sobre triatomíneos e larvas de *Aedes aegypti*. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, pp.104.

Cortez DAG, Fernandes JB, Vieira PC, Silva MF, Ferreira AG (2000). A limonoid from *Thichilia stipulata*. Phytochem. 55: 711-713.

Costa EV, Pinheiro MLB, Silva JRA, Maia BHLNS, Duarte MCT, Amaral ACF, Machado GMC, Leon LL (2010). Alkaloids from the bark of *Guatteria hispida* and their evaluation as antioxidant and antimicrobial agents. J Nat Prod.73:1180–1183.

Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG(2000). Natural Products (Secondary Metabolites) In: Buchanan B, Gruissem W, Jones R (eds.) Biochemistry & Molecular Biology of Plants. Rockville: Courrier Companies, Inc, pp. 318-1250.

Dudareva N, Pichersky E, Gershenzon J (2004). Biochemistry of Plant Volatiles. Plant Physiol. 135:1893–1902.

Ferreira DF (2011). Sisvar: a computer statistical analysis system. CiêncAgrotec. 35: 1039-1042.

Figueiredo AC, Barroso JG, Pedro LG, Scheffer JJC(2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Frag J*. 23: 213-226.

Galindo LA, Pultrini AM, Costa M(2010). Biological effects of *Ocimumgratissimum* L. are due to synergic action among multiple compounds present in essential oil. *J Nat Med*. 64:436-441.

Gao C, Tian C, Lu Y, Xu J, Luo J, Guo X(2011). Essential oil composition and antimicrobial activity of *Sphallerocarpusgracilis* seeds against selected food-related bacteria. *FoodControl*. 22: 517-522.

Garcez FR, Garcez WS, Silva AFG, Bazzo RC, Resende UM (2004). Terpenoid constituents from leaves of *Guarea kunthiana*. *J BrazChem Soc*. 15: 767-772.

Giles M, Zhao JANM, Agboola S (2010). Chemical composition and antibacterial propreties of essential oil of three Australian *Eucalyptus* species.*FoodChem*. 119: 731-737.

Gobbo-Neto L, Lopes NP(2007). Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Quím Nova*. 30: 374-381.

Guleria S, Kumar A (2006). Antifungal activity of some Himalayan medicinal plants using direct bioautography. *J CelMol Biol*. 5: 95-98.

Holley RA, Patel D(2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials.*Food Microbiol*.22: 273-292.

Jayaprakasha GK, Patil BS(2007). In vitro evaluation of the antioxidant activities in fruit extracts from citron and blood orange. Food Chem. 101: 410-418.

Kaileh M, Vanden BW, Boone E, Essawi T, Haegeman G(2007). Screening of indigenous Palestinian medicinal plants for potential anti-inflammatory and cytotoxic activity.J Ethnopharmacol.113: 510-516.

Kaur C, Kapoor HC(2001). Antioxidants in fruits and vegetables – the millennium's health.Int. J Food Sci Technol. 36:703-725.

Kelmanson JE, Jager AK, Staden VJ(2000). Zulu medicinal plants with antibacterial activity.J Ethnopharmacol.69: 241–246.

Kirandeep K, Meenakshi J, Tarandeep K, Jain R(2009). Antimalarials from nature. Bioorg Med Chem. 17:3229–3256.

Krifa M, Gharad T, Haouala R(2011). Biological activities of essential oil, aqueous and organic extracts of *Pituranthostortuosus* (Coss.) Maire.Sci Hortc. 128: 61-67.

Lago JHG, Brochini CB, Roque NF (2002). Terpenoids from *Guareaguidonia*. Phytochem.60: 333-338.

Lago JHG, Brochini CB, Roque NF(2000). Terpenes from leaves of *Guareamacrophylla* (meliaceae) Phytochem.55: 727-731.

Lago JHG, Soares MG, Batista-Pereira LG, Silva MFGF, Corrêa AG, Fernandes JB, Vieira PC, Roque NF(2006). Volatile oil from *Guareamacrophylla* ssp. *tuberculata*: seasonal variation and electroantennographic detection by *Hypsipylagrandella*. Phytochem. 67: 589-594.

Lima RC(2006). Limonóide de *Guarea kunthiana* com potencial leishmanicida. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, pp. 77.

Lorenzi H(2009). Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, pp. 384.

Lorenzi H, Matos FJA(2008). Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, pp. 576.

Losso JN, Shahidi F, Bagchi D (2007). Anti-angiogenic functional and medicinal foods. Boca Raton, FL: Taylor and Francis, pp. 736.

Luo X, Ma Y, Wu S, Wu D(1999). Two novel azadirachtin derivatives from *Azadirachta indica*. J Nat Prod. 62: 1022-1024.

Magalhães LAM, Lima MP, Marques MOM, Facanali R, Pinto ACS, Tadei WP(2010). Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae of essential oils from four *Guarea* species. Molecules. 15: 5734-5741.

Mesquita ML, Desrivot J, Bories C, Fournet A, Paula JE, Grellier P, Espíndola LS(2005). Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian cerrado plants. Mem Inst Oswaldo Cruz. 100: 783-787.

Mokhtar E, Ouariachi E, Tomi P, Bouyanzer A, Hammouti B, Desjobert JM, Costa J, Paolini J(2011). Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotis verticillata* from Marroco. Food Chem Toxic. 49: 533-536.

Molyneux P (2004). The use the stable radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. Songklanakarin J Sci Technol. 26: 211-219.

Mootoo BS, Játiva C, Tinto WF, Reynolds WF, McLean S(1991).Ecuadorin, a novel tetranortriterpenoid of *Guarea kunthiana*: structure elucidation by 2-D NMR spectroscopy. Can J Chem. 70: 1260-1264.

Morais SM, Júnior FEAC, Silva ARA, Neto JSM(2006). Atividade antioxidante de óleos essenciais de espécies de *Croton* do nordeste do Brasil. Quim Nova. 29: 907-910.

Osei-SafoD, Mensah IA, Garneau FX, Koumaglo HK(2010). A comparative study of the antimicrobial activity of the leaf essential oils of chemo-varieties of *Clausenianisata* (Willd.)Hook. F. exBenth. IndCrop Prod. 32: 634-638.

Pacciaroni ADV, Mongelli H, Espinar LA, Romano A, Ciccio G, Silva GL(2000). Bioactive constituent of *Conyza alba*. Planta Med. 66: 720-723.

Packer JF, Luz MMS(2007). Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. Rev Bras Farmacogn. 17: 102-107.

Parthasarathy H, Thombare S(2013). Evaluation of antimicrobial activity of *Azadirachta indica*, *Syzygium aromaticum* and *Cinnamomum zeylanicum* against oral microflora. Asian J Exp Sci. 27: 13-16.

Reis MS, Mariot A, Steenbock W (2003). Diversidade e domesticação de plantas medicinais. In: Simões CMO. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5.ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora UFRGS/Editora UFSC, pp.43-74.

Rice-Evans CA, Miller NJ, Paganga G(1997). Antioxidant properties of phenolic compounds. Trends Plant Sci. 97: 152-159.

Rufino MSM, Alves RE, Brito ES, Morais SM, Sampaio CG, Pérez-Jiménes J, Saura-Calixto FD(2007). Metodologia Científica: determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Comun Téc.127:1-4.

Sairam M, Ilavazhagan G, Sharma SK, Dhanraj SAB, Suresh B, Parida MM, Jana AM, Devendra K, Selvamurthy W (2000). Anti-microbial activity of a new vaginal contraceptive NIM-76 from neem oil (*Azadirachta indica*). J Ethnopharmacol. 71: 377-382.

Santurio JM, Santurio DF, Pozzatti P, Moraes C, Franchin PR, Alves SH(2007). Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente à sorovares de *Salmonella* de origem avícola. Cienc Rural. 37:803-808.

Sartoratto A, Machado ALM, Delarmelina C, Figueira GM, Duarte MCT, Rehder, VLG(2004). Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Braz J Microbiol. 35: 275-280.

Scherer R, Godoy HT (2009). Antioxidant activity index (AAI) by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. Food Chem. 112: 654-658.

Shahidi F, Wanasundara PKJPD(1992). Phenolic antioxidants. Crit Rev Food Sci Nutr. 32: 67-103.

Siani AC, Sampaio ALF, Sousa MC, Henriques MGMO, Ramos MFS(2000). Óleos essenciais: potencial antiinflamatório. Biotecnol Ciênc Desenvolv. 16: 38-43.

Silva J, Abebe W, Sousa SM, Duarte VG, Machado MIL, Matos FJA(2003). Analgesic and anti-inflammatory effects of essential oil of Eucalyptus. J Ethnopharmacol. 89: 277-283.

Soares LR, Silva ACQ, Freire TV, Garcez FR, Garcez WS(2012). Sesquiterpenos de sementes de *Guareaquidonia* (Meliaceae). Quim Nova. 35: 323-326.

Sousa AC, Alviano DS, Blanck AF, Alves PB, Alviano CS, Gattas CR(2004). *Melissa officinalis*L. essential oil: antitumoral and antioxidant activities. J .Pharm Pharmacol.56: 677–681.

Trombetta D, Castelli F, Sarpietro MG, Venuti V, Cristani M, Daniele C, Saija A, Mazzanti G, Bisignano G(2005).Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. Antimicrob Agents Chemother. 49: 2474–2478.

Vagionas K, Graikou K, NgassapaO, Runyoro K, Chinou I (2007). Composition and antimicrobial activity of the essential oils of three *Satureja*species growing in Tanzania.FoodChem.103: 319-324.

Veiga-Júnior VF, Pinto AC(2002). O gênero *Copaifera* L. Quím Nova. 25: 273-286.

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

Yesil-Celiktas O, Hames-Kocabas EE, Bedir E, Vardar-Sukan F, Ozek T, Baser KHC (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of

Rosmarinus officinalis, depending on location and seasonal variations. Food Chem.100: 553-559.

Zarate R, Sukrasno, Yeoman MM(1992). Application of two rapid techniques of column chromatography to separate the pungent principles of ginger, *Zingiber officinale* Roscoe. J Chromatogr. 609: 407-413.

Tabela 1: Componentes voláteis do óleo essencial de *G. kunthiana* obtidos pela análise de GC-MS.

TR (min) ^a	Componentes ^b	%Area	IK ^c
35,27	α -Copaeno	0,67	1373
36,36	β -Elemeno	5,19	1386
37,85	Cariofileno	0,48	1414
39,05	α -Bergamoteno	1,91	1434
40,51	β -Farneseno	0,44	1459
41,59	Germacreno-D	0,52	1477
41,93	α -Curcumeno	16,17	1482
42,72	α -Zingibereno	34,48	1495
44,18	Calameneno	1,27	1520
44,33	β -Sesquifelandreno	22,90	1523
47,18	Espatulenol	2,20	1573
52,58	Cadalenol	0,34	1671
69,66	Caureno	9,95	2033
Total		96,52	-
Sesquiterpenos hidrocarbonetos		84,37	-
Sesquiterpenos oxigenados		2,20	-
Diterpenos		9,95	-

^a Tempo de retenção em minutos

^b Compostos identificados na coluna capilar DB-5 ms

^c IK índice de Kovats

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM), Concentração Bactericida Mínima (CBM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) do óleo essencial de *G. kunthiana* frente aos micro-organismos testados.

Micro-organismos		CIM/CBM e CFM ^a			
		Óleo essencial ^b	Metanol ^c	Gentamicina ^d	Nistatina ^e
Gram -	<i>E. coli</i>	Sa	Sa	0,78/0,78	Nt
	<i>P. aeruginosa</i>	7000/7000	Sa	0,78/0,78	Nt
	<i>S. entérica</i>	7000/7000	Sa	0,78/0,78	Nt
	<i>P. mirabilis</i>	7000/7000	Sa	0,78/0,78	Nt
	<i>K. pneumoniae</i>	Sa	Sa	0,78/0,78	Nt
Gram +	<i>S. aureus</i>	13,6/54,6	Sa	0,78/0,78	Nt
	<i>E. faecalis</i>	437,5/875	Sa	0,78/0,78	Nt
	<i>S. epidermidis</i>	3500/3500	Sa	0,78/0,78	Nt
	<i>B. subtilis</i>	875/875	Sa	0,78/0,78	Nt
Levedura	<i>C. albicans</i>	1750/3500	Sa	Nt	0,78/0,78

^a Concentração inibitória mínima (CIM)/Concentração bactericida mínima (CBM) e Concentração fungicida mínima (CFM), * mg/mL.

^b Testado na concentração de 7000-3,4 µg/mL.

^d Testado na concentração de 100-0,78 mg/mL.

^e Testado na concentração de 100-0,78 mg/mL.

Sa: Sem atividade; Nt: Não testado

Tabela 3: Índice de DPPH (2,2-difenil-2-picrilhidrazil) (% de sequestro) e IC₅₀ das diferentes concentrações testadas do óleo essencial de *G. kunthiana*

Soluções de teste	% sequestro DPPH	IC ₅₀
Controle positivo (BHT)	95,85±0,04 ^a	9,27±0,08 ^a
6000 µg	91,52±0,09 ^b	17,54±0,18 ^b
3000 µg	56,18± 1,10 ^c	82,45±2,07 ^c
1500 µg	27,23± 0,42 ^d	137,81±0,80 ^d
750 µg	24,34 ±0,09 ^e	143,72±0,18 ^e
375 µg	23,57 ± 0,48 ^e	144,72±0,91 ^e

Os valores apresentados correspondem à média e desvio padrão de triplicatas. Valores seguidos da mesma letra na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p <0,05)

4. Referências

- AGATI, G.; AZZARELLO, E.; POLLASTRI, S.; TATTINI, M. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Plant Science**, v. 196, p. 67–76, 2012.
- ALMEIDA, J. C.; PAULA, C. M. S.; SVOBODA, W. K.; LOPES, M. O.; PILONETTO, M. P.; ABRAHÃO, W. M.; GOMES, E. C. Perfil epidemiológico de casos de surtos de doenças transmitidas por alimentos ocorridos no Paraná, Brasil. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 34, n. 1, p. 97-106, 2013.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010
- ALVES, L. F. A.; ALVES, V. S.; BRESSAN, D. F.; NEVES, P. M. O. J.; ALVES, S.B. Ocorrência de *Metarhizium anisopliae* (Metsch.) Sorok. em adultos de cascudinho (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) Coleoptera: Tenebrionidae) em aviários comerciais em Cascavel, PR. **Neotropical Entomology**, v. 33, n. 6, p. 793-795, 2004.
- ALVES, L. F. A.; UEMURA-LIMA, D. H.; OLIVEIRA, D.G.P.; GODINHO, R.P.V. Eficiência de um novo inseticida comercial para o controle do cascudinho dos aviários (*Alphitobius diaperinus*) (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae). **Arquivos do Instituto Biológico**, v. 77, n. 4, p. 693-700, 2010.
- AMSON, G.Y.; HARACEMIV, S. M. C.; MASSON, M. L. Levantamentos de dados epidemiológicos Relativos à ocorrência/ surtos de doenças transmitidas por alimentos (DTA's) no Estado do Paraná – Brasil no período de 1978 a 2000. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 30, n. 6, p.1139-1145, 2006.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos – Uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 1-9, 2007.
- AXTELL, R. C.; ARENDS, J. J. Ecology and management of arthropod pest of poultry. **Annual Review of Entomology**, v. 35, p. 101-126, 1990.

BAMONIRI, A.; ABDOLRASOUL, H. E.; MAZOOCHI, A.; BEHPOUR, M.; KASHI, F. J.; BATOOLI, H. Antioxidant and antimicrobial activity evaluation and essential oil analysis of *Semenovia tragioides* Boiss. from Iran. **Food Chemistry**, v. 122, p. 553-558, 2010.

BRASIL. Dados epidemiológicos dos surtos de Doenças Transmitidas por Alimentos no Brasil. Disponível em:< <http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/surtos.pdf>>. Acesso em: 12 abr. 2014.

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

BUTAYE, P.; DEVRIESE, L. A.; HAESEBROUK, F. Antimicrobial growth promoters used in animal feed: effects of less well know antibiotics on Gram positive bacteria. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 16, n. 2, p. 175-188, 2003.

CARVALHO, J.M.; MAIA, G.A.; FIGUEIREDO, R.W.; BRITO, E.S.; RODRIGUES, S. Storage stability of coconut–cashew apple juice beverage. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 31, p. 178–189, 2007.

CAVALCANTE, G. M.; MOREIRA, A. F. C.; VASCONCELOS, S.D. Potencialidade inseticida de extratos aquosos de essências florestais sobre mosca-branca. **Pesquisa agropecuária brasileira**, v. 41, n. 1, p. 9-14, 2006.

CHERNAKI-LEFFER, A. M. **Dinâmica populacional, estimativa da resistência a inseticidas e suscetibilidade do cascudinho *Alphitobius diaperinus* (Panzer, 1797) (Coleoptera: Tenebrionidae) a inseticidas reguladores de crescimento e a fungos entomopatogênicos**. 2004. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba. 2004.

CHERNAKI-LEFFER, A. M.; GÓMEZ, D. R. S.; ALMEIDA, L. M.; LOPES, I. O. N. Susceptibility of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera, Tenebrionidae) to cypermethrin, dichlorvos and triflumuron in southern Brazil. **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 55, n. 1, p. 125–128, 2011.

CHERNAKI-LEFFER, A. M.; BIESDORF, S. M.; ALMEIDA, L. M.; LEFFER, E. V. B.; VIGNE, F. Isolamento de enterobactérias em *Alphitobius diaperinus* e na cama de aviários no Oeste do estado do Paraná, Brasil. **Revista Brasileira de Ciência Avícola**, v. 4, n. 3, p. 243-247, 2002.

COELHO, A. A. M. **Análise inseticida de extratos de plantas do bioma cerrado sobre triatomíneos e larvas de *Aedes aegypti***. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

COELHO, C. A. A.; SOUZA, N. A.; FEDER, M. D.; SILVA, C. E.; GARCIA, E. S.; AZAMBUJA, P.; GONZALEZ, M. S.; RANGEL, E. F. Effects of azadirachtin of the development and mortality of *Lutzomya longipalis* larvae (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae). **Journal of Medical Entomology**, v. 43, n. 2, p. 262-266, 2006.

CONSTANTIN, M. B.; SARTORELLI, P.; LIMBERGER, R.; HENRIQUES, A. T.; STEPPE, M.; FERREIRA, M. J. P.; OHARA, M. T.; EMERENCIANO, V. P.; KATO, M. J. Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: Antimicrobial activities and analysis by GC/MS and ¹³C-NMR. **Planta Medica**, v. 67, p. 771-773, 2001.

CORTEZ, D. A. G.; FERNANDES, J. B.; VIEIRA, P. C.; SILVA, M. F.; FERREIRA, A. G. A limonoid from *Thichilia stipulata*. **Phytochemistry**, v. 55, n. 7, p. 711-713, 2000.

COSTA, D. A.; OLIVEIRA, G. A. L.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Avaliação do potencial antioxidante in vitro do composto ciano-carvona. **Revista de Ciência Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 33, n. 4, p. 567-575, 2012.

CRUZ, I.; LIMA, D. A.N.; FIGUEIREDO, M. L. C.; VALICENTE, F. H. Aspectos biológicos do parasitóide *Campoletis flavicincta* (Ashmead) criados em lagartas de *Spodoptera frugiperda* (Smith). **Anais da Sociedade Entomológica do Brasil**, v. 24, n. 2, p. 201-208, 1995.

DING, Y.; KIM, J. A.; YANG, S. Y.; KIM, W. K.; LEE, S. H.; JANG, H. D.; KIM, Y. H. Antioxidative Sesquiterpenes from *Artemisia iwayomogi*. **Bulletin Korean Chemistry Society**, v. 32, n. 9, p. 3493-3496, 2011.

DORMAN, H. J. D.; DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. **Journal of Applied Microbiology**, v. 88, n. 2, p. 308-316, 2000.

EBRAHIMABADI, A. H.; EBRAHIMABADI, E. H.; BIDGOLI, Z. D.; KASHI, F. J.; MAZOOCHI, A.; BATOOLI, H. Composition and antioxidant and antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Stachys inflata* Benth from Iran. **Food Chemistry**, v. 119, p. 452-458, 2010.

ESTEVINHO, L.; PEREIRA, P. A.; MOREIRA, L.; DIAS, L. G.; PEREIRA, E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 12, p. 3774-3779, 2008.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos Alimentos**. São Paulo: Atheneu, 2004. 182 p.

FREITAS, E. R.; BORGES, A. S.; TREVISAN, M. T. S.; WATANABE, P. H.; CUNHA, A. L.; PEREIRA, A. L. F.; ABREU, V. K.; NASCIMENTO, G. A. J. Extratos etanólicos da manga como antioxidantes para frangos de corte. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 8, p. 1025-1030, 2012.

FUKAYAMA, E. H.; BERTECHINI, A. G.; GERALDO, A.; KANJI KATO, R. SOLIS MURGAS, L. D. Extrato de Orégano como Aditivo em Rações para Frangos de Corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**, v. 34, n. 6, p. 2316-2326, 2005.

GARCEZ, F. R.; GARCEZ, W. S.; SILVA, A. F. G.; BAZZO, R. C.; RESENDE, U. M. Terpenoid constituents from leaves of *Guarea kunthiana*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 15, n. 5, p. 767-772, 2004.

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

GREAY, S. J.; HAMMER, K. A. Recent developments in the bioactivity of mono- and diterpenes: anticancer and antimicrobial activity. **Phytochemistry Reviews**, p. 1-6, 2011.

GUIBOURDENCHE, M.; ROGGENTIN, P.; MIKOLEIT, M.; FIELDS, P. I.; BOCKEMUHL, J.; GRIMONT, P.A.D.; WEILL, F. Supplement 2003-2007 (No. 47) to

the White-Kauffmann-Le Minor scheme. **Research in Microbiology**, v. 161, n. 1, p. 26-29, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in biology and medicine**. Oxford University Press, Oxford, UK, 1985. 888 p.

HAMDAN, D. I.; MOHAMED, M. E.; ABDULLA, R. H.; MOHAMED, S. M.; SHAZLY, A. M. Anti-inflammatory, insecticidal and antimicrobial activities and chemical composition of the essential oils of different plant organs from navel orange (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck var. Malesy) grown in Egypt. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, p. 1204-1215, 2013.

HANDA, S. S. An overview of extraction techniques for medicinal and aromatic plants. In: HANDA, S. S. KHANUJA, S. P. S.; LONGO, G.; RAKESH, D. D. **Extraction Technologies for Medicinal and Aromatic Plants**. Trieste : United Nations Industrial Development Organization and the International Centre for Science and High Technology (ICS - UNIDO), 2008. p. 21-54.

HIRSH, D.C. Salmonella In: HIRSH, D. C.; ZEE, Y.C. **Microbiologia Veterinária**. Rio de Janeiro: Guanabara-Koogan. 2003. p. 59-73.

HUSSAIN, A. I., ANWAR, F., NIGAM, P. S., ASHRAF, M., GILIANI, A. H. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 90, n. 11, p. 1827–36, 2010.

JAPP, A. K.; BICHO, C. L.; SILVA, A. V. F. Importância e medidas de controle para *Alphitobius diaperinus* em aviários. **Ciência Rural**, v. 40, n. 7, p. 1668-1673, 2010.

KITTS, D. D. Bioactive substances in food: identification and potential uses. **Canadian Journal of the Physiology and Pharmacology**, v.72, n. 4, p. 23-434, 1994.

KNAAK, N.; FIUZA, L. M. Potencial dos óleos essenciais de plantas no controle de insetos e microrganismos. **Neotropical Biology and Conservation**, v. 5, n. 2, p.120-132, 2010.

KOTTWITZ, L. B. M.; OLIVEIRA, T. C. R. M.; ALCOCER, I.; FARAH, S. M.; ABRAHAO, W. S. M.; RODRIGUES, D. P. Epidemiological data of salmonellosis outbreaks occurred between 1999 and 2008 in Parana State, Brazil. **Acta Scientiarum Health Science**, v. 32, n. 1, p. 9–15, 2010.

KRIFA, M.; GHARAD, T.; HAOUALA, R. Biological activities of essential oil, aqueous and organic extracts of *Pituranthos tortuosus* (Coss.) Maire. **Scientia Horticulturae**, v. 128, p. 61-67, 2011.

LIMA, R. C. **Limonóide de *Guarea kunthiana* com potencial leishmanicida**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade de Brasília, Brasília, 2006.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. 2009. 384 p.

LUO, X.; MA, Y.; WU, S.; WU, D. Two novel azadirachtin derivatives from *Azadirachta indica*. **Journal of Natural Products**, v. 62, n. 7, p. 1022-1024, 1999.

MAGALHÃES, L. A. M., LIMA, M. P., MARQUES, M. O. M., FACANALI, R., PINTO, A. C. S., TADEI, W. P. Chemical composition and larvicidal activity against *Aedes aegypti* larvae of essential oils from four *Guarea* species. **Molecules**, v. 15, n. 8, p. 5734-5741, 2010.

MAREK, C. B.; ITNOSE, A. M.; JORGE, T. C. M.; PARIZOTTO, R. A.; TEBALDI, N. R.; REICHERT, A. M. Influence of leaf extracts from *Melia azedarach* L. on butyrylcholinesterase activity in rat liver. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 22, p. 3931-3938, 2012.

MATIAS, R.S. Controle de *Alphitobius diaperinus* com inseticidas piretróides e organofosforados em granjas avícolas no sul do Brasil. **A Hora Veterinária**, v. 25, n. 148, p. 47-51, 2005.

MELLO, J. C. P.; SANTOS, S. D. Taninos. In: Simões, C. M. O. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina. 2002. 1102 p.

MENEZES, E. L. A. Inseticidas botânicos: seus princípios ativos, modo de ação e uso agrícola. Disponível em: <
<http://www.cnpab.embrapa.br/system/files/downloads/doc205.pdf>>. Acesso em abr. 2014. 2005.

MESQUITA, M. L.; DESRIVOT, J.; BORIES, C.; FOURNET, A.; PAULA, J. E.; GRELLIER, P.; ESPÍNDOLA, L. S. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian cerrado plants. **Memórias Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 7, p. 783-787, 2005.

MOKHTAR, E.; OUARIACHI, E.; TOMI, P.; BOUYANZER, A.; HAMMOUTI, B.; DESJOBERT, J. M.; COSTA, J.; PAOLINI, J. Chemical composition and antioxidant activity of essential oils and solvent extracts of *Ptychotis verticillata* from Marroco. **Food Chemical Toxicology**, v. 49, n. 2, p. 533-536, 2011.

MOLYNEUX, P. The use the stable radical diphenylpicryl-hydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science Technology**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MOOTOO, B. S.; JÁTIVA, C.; TINTO, W. F.; REYNOLDS, W. F.; MCLEAN, S. Ecuadorin, a novel tetranortriterpenoid of *Guarea kunthiana*: structure elucidation by 2-D NMR spectroscopy. **Canadian Journal of Chemistry**, v. 70, p. 1260-1264, 1991.

MOTHANA, R. A. A.; HASSON, S. S.; SCHULTZE, W.; MOWITZ, A.; LINDEQUIST, U. Phytochemical composition and *in vitro* antimicrobial and antioxidant activities of essential oils of three endemic Soqotraen *Boswellia* species. **Food Chemistry**, v. 126, p. 1149–1154, 2011.

NICIFOROVIC, N.; MIHAILOVIĆ, V.; MAŠKOVIĆ, P.; SOLUJIĆ, S.; STOJKOVIĆ, A.; MURATSPAHIĆ, D. P. Antioxidant activity of selected plant species; potential new sources of natural antioxidants. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 3125-3130, 2010.

OLIVEIRA, S. D.; FLORES, F. S.; SANTOS, L. R.; BRANDELLI, A. Antimicrobial resistance in *Salmonella* Enteritidis strains isolated from broiler carcasses, food, human

and poultry-related samples. **International Journal of Food Microbiology**, v. 97, n.3, p. 297-305, 2005.

PHILLIPS, M. A.; LÉON, P.; BORONAT, A.; CONCÉPCION, R. M. The plastidial MEP pathway: unified nomenclature and resources. **Trends in Plant Science**, v. 13, n. 12, p. 619-23, 2008.

PINTO-JÚNIOR, J. A. R.; CARVALHO, R. I. N.; NETTO, S. P.; WEBER, S. H.; SOUZA, E.; FURIATTI, R. S. Bioactivity of essential oils of Brazilian sassafras and eucalyptus against lesser mealworm. **Ciência Rural**, v. 40, n. 3, p. 637-643, 2010.

PFEIFFER, R. W.; AXTELL, R. C. Coleoptera of poultry manure in caged-layer houses in North Carolina. **Environmental Entomology**, v. 9, n. 1, p. 21-28, 1980.

RASTELLO, R. M.; MENEGATT, C.; MOSSI, A. J. Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Revista Brasileira de Entomologia**, v. 53, n. 2, p. 304-307, 2009.

RIBEIRO, A. R.; KELLERMANN, A.; SANTOS, L. R.; BESSA, M. C.; NASCIMENTO, V. P. *Salmonella* spp. in raw broiler parts: occurrence, antimicrobial resistance profile and phage typing of the *Salmonella* Isolates. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, n. 2, p. 296-299, 2007.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Antioxidant properties of phenolic compounds. **Trends in Plant Science**, v. 2, p. 152-159, 1997.

ROCHA, D. K.; MATOS, O. C.; CABRAL, M. D.; NOVO, M. T. Efeito de óleos essenciais de *Mentha pulegium* e *Foeniculum vulgare* sobre *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762). **Instituto de Investigação Científica Tropical**, p. 1-9, 2012.

SALIN, C.; DELETTRE, Y. R.; CANNAVACCIUOLO, M.; VERNON, P. Spatial distribution of *Alphitobius diaperinus* (Panzer) (Coleoptera: Tenebrionidae) in the soil of a poultry house along a breeding cycle. **European Journal Soil Biology**, v. 36, p. 107–115, 2000.

SANCHEZ-VARGAS, M.; ABUELHAJJA, M. A.; GÓMEZ-DUARTE, O. G. Salmonella infections: An update on epidemiology, management, and prevention. **Travel Medicine and Infectious Diseases**, v. 9, n. 6, p. 1-15, 2011.

SANTOS, J. R. G. L.; TURNES, C. G. Probiotics in aviculture. **Ciência Rural**, v. 35, n. 3, p. 741-747, 2005.

SANTOS, M. R. A.; SILVA, A. G.; LIMA, R. A.; LIMA, D. K. S.; SALLET, L. A. P.; TEIXEIRA, C. A. D.; POLLI, A. R.; FACUNDO, V. A. Atividade inseticida do extrato das folhas de *Piper hispidum* (Piperaceae) sobre a broca-do-café (*Hypothenemus hampei*) **Revista Brasileira de Botânica**, v. 33, n. 2, p. 319-324, 2010.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente à sorovares de *Salmonella* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.

SCHERER, R.; WAGNER, R.; DUARTE, M.C.T.; GODOY, H.T. Composição e atividades antioxidante e antimicrobiana dos óleos essenciais de cravo-da-índia, citronela e palmarosa. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 11, n. 4, p. 442-449, 2009.

SHYLAJA. M. R.; PETER, K. V. The functional role of herbal spices. In: PETER, K. V. **Handbook of herbs and spices**. V.2. Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2004, 360 p.

SILVA, E. N.; DUARTE, A. *Salmonella* Enteritidis in poultry: retrospective in Brazil. **Brazilian Journal of Poultry Science**, v. 4, n. 2, p. 85-100, 2002.

SILVA, K. C. **Monitoramento dos mecanismos de resistência em *Salmonella* spp. e *Escherichia coli* isoladas de animais de produção agropecuária e alimentos**

derivados. 2011. Dissertação de mestrado (Mestrado em ciências). Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

SILVEIRA, S. M. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais e óleos essenciais e aplicação do óleo essencial de louro (*L. nobilis*) como agente conservador natural em embutido cárneo fresco**. 2012. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2012.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos essenciais. In: SIMÕES, C. M. O. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da UFSC e UFRGS, 2007. 1102 p.

SOARES, D.G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 41, n. 1, p. 95-100, 2005.

SOARES, S. E. Ácidos Fenólicos como Antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 15, p. 71-81, 2002.

SOUZA, B. P; MAGNANI, M; OLIVEIRA, T. Mechanisms of quinolone resistance in *Salmonella* spp. **Ciências Agrárias**, v. 31, v. 2, p. 413-428, 2010.

TEPLITSKI, M.; ROBINSON, J. B.; BAUER, W. D. Plants secrete substances that mimic bacterial N-acyl homoserine lactone signal activities and affect population density-dependent behaviors in associated bacteria. **Molecular Plant-Microbe Interactions**, v. 13, n. 6, p. 637–648, 2000.

TESSARI, E. N. C.; CARDOSO, A. L. S. P.; KANASHIRO, A. M. I.; STOPPA, G. F. Z.; LUCIANO, R. L.; CASTRO, A. G. M. Ocorrência de *Salmonella* spp. em carcaças de frangos industrialmente processadas, procedentes de explorações industriais do Estado de São Paulo, Brasil. **Ciência Rural**. v. 38, n. 9, p. 2557–60, 2008.

THAKUR, S.; TADESSE, D. A.; MORROW, M.; GEBREYES, W. A. Occurrence of multidrug resistant *Salmonella* in antimicrobial-free (ABF) swine production systems. **Veterinary Microbiology**, n. 125, p. 362–367, 2007.

TROMBETTA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M.G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C.; SAIJA, A.; MAZZANTI, G.; BISIGNANO, G. Mechanisms of Antibacterial action of three monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n. 6, p. 2474-2478, 2005.

VAZ, C. S.; STRECK, A. F.; MICHAEL, G. B.; MARKS, F. S.; RODRIGUES, D. P.; REIS, E. M.; CARDOSO, M. R.; CANAL, C. W. Antimicrobial resistance and subtyping of subspecies *enteric* serovar Enteritidis isolated from human outbreaks and poultry in southern Brazil. **Poultry Science**. v. 89, n. 7, p. 1530–6, 2010.

VIEGAS JÚNIOR, C. Terpenos com atividade inseticida: uma alternativa para o controle químico de insetos. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 390-400, 2003.

WANNES, A. W.; MHAMDI, B.; SRITI, J.; JEMIA, M. B.; OUCHIKH, O.; HAMDAROU, G.; KCHOUK, M. E.; MARZOUK, B. Antioxidant activities of the essential oils and methanol extracts from myrtle (*Myrtus communis* var. *italica* L.) leaf, stem and flower. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1362–1370, 2010.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signalling molecules?. **Free Radical Biology Medicine**, v. 36, n. 7, p. 838–849, 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Drug resistant Salmonella. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs139/en/>>. Acesso em: 12 mai. 2014.

WU, S.; N. G. L. Antioxidant and free radical scavenging activities of wild bitter melon (*Momordica charantia* Linn. var. *abbreviata* Ser.) in Taiwan. LWT. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 323-330, 2008.

YUAN, C. M.; ZHANG, Y.; TANG, G. H.; DI, Y. T.; CAO, M. M.; WANG, X. Y.; ZUO, G. Y.; LI, S. L.; HUA, H. M.; HE, H. P.; HAO, X. J. Khayseneganins A-H, limonoids from *Khaya senegalensis*. **Journal Natural Products**, v. 76, n. 3, p. 327-33, 2013.

ZHANG, L. H. Quorum sensing and proactive host defense. **Trends in plant Science**, v. 8, n. 5, p. 238- 244, 2003.