

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

CAMILA VOGT DOS SANTOS

COMPOSIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATOS VEGETAIS DAS FOLHAS
DE *Myrcia palustris* DC.

CASCADEL-PR

Fevereiro/2019

CAMILA VOGT DOS SANTOS

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL E DOS EXTRATOS
VEGETAIS DE *Myrcia palustris* DC.

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: Ciências Ambientais

Orientador: Dra. Fabiana Gisele da Silva Pinto

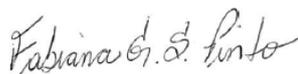
CASCADEL-PR

Fevereiro/2019

CAMILA VOGT DOS SANTOS

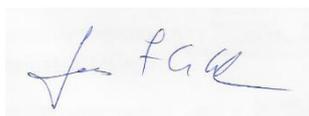
COMPOSIÇÃO QUÍMICA, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL E EXTRATOS VEGETAIS DAS FOLHAS DE *Myrcia palustris* DC.

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Conservação e do Manejo de Recursos Naturais em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título em Recursos Naturais em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestra em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, área de concentração Ciências Ambientais, linha de pesquisa Biologia Aplicada e Indicadores de Qualidade No Ambiente Terrestre, APROVADO(A) pela seguinte banca examinadora:



Orientador(a) - Fabiana Gisele da Silva Pinto

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Luis Francisco Angeli Alves

Universidade Estadual do Oeste do Paraná - Campus de Cascavel (UNIOESTE)



Adriana Fiorini Rosado

Universidade Federal do Paraná - Campus de Palotina (UFPR)

Cascavel, 20 de fevereiro de 2019

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

SANTOS, Camila Vogt dos
Composição Química, Avaliação da Atividade Antimicrobiana e Antioxidante do Óleo Essencial e Extratos Vegetais das Folhas de *Myrcia palustris* DC. / Camila Vogt dos SANTOS; orientador(a), Fabiana Gisele da Silva Pinto, 2019.
57 f.

Dissertação (mestrado), Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Conservação e Manejo de Recursos Naturais, 2019.

1. Atividade Antimicrobiana. 2. Produtos Naturais. 3. Atividade Antioxidante. I. Pinto, Fabiana Gisele da Silva. II. Título.

Aos meus pais e minha irmã, dedico.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a **Deus**, por ter me dado força para superar as dificuldades para que pudesse concluir essa etapa tão importante.

A Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em especial ao Programa de Pós-Graduação de Conservação e Manejo de Recursos Naturais pela estrutura para realização da pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento da pesquisa e concessão da bolsa.

A minha orientadora, Dr. Fabiana pela confiança, paciência e principalmente, pelos conhecimentos passados, que serviram de exemplo para minha vida profissional, acadêmica e pessoal.

Aos meus pais, **Odiles Camilo dos Santos e Neide Terezinha Vogt** e minha irmã **Joana Vogt dos Santos**, por todo amor concedido, pela oportunidade e apoio incondicional para que eu concluísse essa etapa tão importante na minha vida.

A todas as colegas do laboratório de Biotecnologia, principalmente **Ana Paula Mallmann** e **Marina Martins Nascimento**, amigas que me acompanham desde a graduação e sempre estiveram comigo nos momentos difíceis, mas principalmente, compartilharam muitas alegrias e risadas durante todos esses anos.

Aos familiares e amigos que sempre estiveram comigo, que participaram de alguma forma na conclusão desse ciclo, com muita alegria agradeço.

SUMÁRIO

Resumo Geral	13
Abstract	14
Revisão Bibliográfica.....	15
<i>Resistência bacteriana</i>	15
<i>Antimicrobianos alternativos, ação de extratos vegetais e óleos essenciais</i>	15
<i>Atividade antioxidante</i>	16
<i>Caracterização da planta</i>	17
Referências Bibliográficas	19
CAPÍTULO 1. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS FOLIARES DE <i>Myrcia palustris</i> DC.	23
Resumo.....	23
Abstract	24
Introdução.....	24
Material e Métodos	26
<i>Coleta, secagem e identificação da planta</i>	26
<i>Obtenção dos extratos vegetais</i>	26
<i>Prospecção fitoquímica</i>	27
<i>Determinação da atividade antimicrobiana</i>	27
<i>Microrganismos utilizados e preparação do inoculo</i>	27
<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i>	28
<i>Determinação da Concentração Bactericida (CBM)</i>	28
<i>Atividade Antioxidante</i>	29
Resultados e Discussão	30
<i>Prospecção fitoquímica</i>	30
<i>Atividade antimicrobiana</i>	31
<i>Atividade antioxidante</i>	35
Conclusão	37
Referências	39
CAPÍTULO 2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS <i>Myrcia palustris</i> DC. (MYRTACEAE).....	43
Resumo.....	43
Abstract	43
Introdução.....	44
Material e Métodos	45

<i>Coleta, secagem e identificação da planta:</i>	45
<i>Extração do Óleo essencial:</i>	46
<i>Cromatografia de gasosa acoplada à Espectrometria de Massas GC-MS:</i>	46
<i>Microrganismos utilizados e preparo do inóculo</i>	46
<i>Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)</i>	46
<i>Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)/Concentração Fúngica Mínima (CFM)</i>	47
<i>Atividade Antioxidante</i>	47
<i>Resultados e Discussão</i>	48
<i>Composição química do óleo essencial de M. palustris</i>	48
<i>Atividade antimicrobiana</i>	49
<i>Conclusão</i>	52
<i>Referências</i>	53

“Todas as vitórias ocultam uma abdicação.”

Simone de Beauvoir

RESUMO GERAL

É de extrema necessidade a busca por novos produtos de fontes naturais que possam substituir os sintéticos que são muito utilizados nas indústrias, o Brasil por apresentar a maior biodiversidade do mundo torna suas espécies uma alternativa na busca por moléculas bioativas na procura de novos antimicrobianos e antioxidantes que sejam naturais. Conhecida como “pitangueira-do-mato”, *M. palustris* é pertencente a família Myrtaceae, uma espécie nativa encontrada principalmente no Sul do Brasil e não apresenta estudos sobre suas atividades biológicas. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi determinar a composição química do óleo essencial de *M. palustris* por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), realizar a prospecção fitoquímica por meio de testes colorimétricos de seis extratos obtidos a partir das folhas de *M. palustris*, sendo eles: acetato de etila (AcEt), acetona (AcOH), aquoso (EAq), etanólico (EtOH), metanólico (MeOH) e hexânico (Hex); avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial e extratos vegetais pela técnica de microdiluição em caldo, utilizando bactérias de interesse médico, e a detecção do potencial antioxidante pela técnica de de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). O rendimento total a partir da extração pela técnica de hidrodestilação do óleo essencial foi de 0,35%. A CG-EM revelou a presença de 28 compostos, representando 80,75% do óleo essencial, sendo a maioria da classe dos sesquiterpenos. Com relação aos extratos vegetais os testes demonstraram a presença de compostos das classes: esteroides, flavonoides. Xantonas e taninos. A atividade antimicrobiana do óleo essencial foi observada para todas as bactérias Gram-positivas (*B. subtilis*, *E. faecalis* e *S. aureus*) com exceção de *S. epidermidis*, dentre as Gram-negativas verificou-se atividade inibitória apenas para *S. flexeri* e para levedura *C. albicans*, não foi observada atividade inibitória e nem fungicida. Referente aos extratos vegetais, todos demonstraram potencial antimicrobiano frente às cepas testadas, exceto o extrato Hex, que não apresentou atividade sobre *K. pneumoniae*. O EAq apresentou a menor eficiência para a maioria das cepas testadas. Para atividade antioxidante o óleo essencial apresentou uma capacidade de redução de radicais de DPPH até 82,81%, confirmando seu potencial antioxidante. Com exceção do EAq, todos os demais extratos apresentaram potencial antioxidante nas maiores concentrações testadas na faixa de 0,1 a 25 mg/mL; o EtOH (82,29%), MeOH (77,67%) e AcOH (74,10%) demonstraram maior captura dos radicais DPPH. Sugere-se que a atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos vegetais e do óleo essencial de *M. palustris* esteja relacionada com os metabólitos secundários presentes: esteroides, flavonoides, xantonas e taninos, os quais já apresentaram essas atividades biológicas comprovadas em outros estudos com extratos vegetais e devido à presença dos compostos majoritários α -Guaieno (25,89%), α -Bulneseno (13,39%) e β -Selineno (4,76%).

ABSTRACT

It is extremely necessary to search for new products from natural sources that can replace the synthetics that are widely used in industries, Brazil, for having the greatest biodiversity in the world, makes its species an alternative in the search for bioactive molecules in the search for new antimicrobials and antioxidants that are natural. Known as “pitangueira-domato”, *M. palustris* belongs to the family Myrtaceae, a native species found mainly in southern Brazil and does not present studies on its biological activities. Therefore, the objective of this work was to determine the chemical composition of the essential oil of *M. palustris* by gas chromatography coupled to mass spectrometry (CG-EM), perform phytochemical prospecting using colorimetric tests of six extracts obtained from the leaves of *M. palustris*, namely: ethyl acetate (AcEt), acetone (AcOH), aqueous (EAq), ethanolic (EtOH), methanolic (MeOH) and hexanic (Hex); to evaluate the antimicrobial activity of essential oil and plant extracts by the broth microdilution technique, using bacteria of medical interest, and the detection of the antioxidant potential by the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil (DPPH) technique. The total yield from the extraction by the essential oil hydrodistillation technique was 0.35%. CG-EM revealed the presence of 28 compounds, representing 80.75% of the essential oil, the majority being from the sesquiterpenes class. Regarding plant extracts, the tests showed the presence of compounds from the classes: steroids, flavonoids, Xanthones and tannins. The antimicrobial activity of the essential oil was observed for all Gram-positive bacteria (*B. subtilis*, *E. faecalis* and *S. aureus*) with the exception of *S. epidermidis*, among the Gram-negative bacteria, inhibitory activity was found only for *S. flexeri* and for yeast *C. albicans*, no inhibitory or fungicidal activity was observed. Regarding plant extracts, all showed antimicrobial potential against the strains tested, except for Hex extract, which showed no activity on *K. pneumoniae*. EAq showed the lowest efficiency for most strains tested. For antioxidant activity, the essential oil showed a DPPH radical reduction capacity of up to 82.81%, confirming its antioxidant potential. With the exception of EAq, all other extracts showed antioxidant potential in the highest concentrations tested in the range of 0.1 to 25 mg / mL; EtOH (82.29%), MeOH (77.67%) and AcOH (74.10%) showed greater capture of DPPH radicals. It is suggested that the antimicrobial and antioxidant activity of plant extracts and essential oil of *M. palustris* is related to the secondary metabolites present: steroids, flavonoids, xanthones and tannins, which have already shown these biological activities proven in other studies with plant extracts and due to the presence of the major compounds α -Guaieno (25.89%), α -Bulnesene (13.39%) and β -Selinene (4.76%).

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Resistência bacteriana

Para reduzir a carga de doenças infecciosas, os antimicrobianos tornaram-se essenciais na medicina. O mesmo ocorreu na produção de alimentos de origem animal, que a fim de causar melhorias na eficiência alimentar passou a ter antimicrobianos adicionados às dietas (Bezerra et al., 2017).

Porém, o uso inadequado ou em excesso desses produtos tem sido um dos fatores que mais contribui para a seleção de patógenos resistentes, tornando algumas infecções bacterianas difíceis, ou até impossíveis de tratar de forma confiável (Hawkey, 2008; Van Baeckel et al., 2014).

A exposição constante das bactérias e a pressão seletiva causada pelo uso excessivo de antimicrobianos levou ao aumento dos genes de resistência. A resistência bacteriana está atribuída a mutações cromossômicas, sendo que os microrganismos se adaptam e conseguem crescer mesmo na presença de antimicrobianos (Scur et al., 2014; Who, 2015; Bezerra et al., 2017).

Nesse contexto, como uma alternativa aos antimicrobianos destacam-se produtos oriundos das plantas, como extratos vegetais e óleos essenciais. Embora, os vegetais possuam atividade antimicrobiana comprovada, no Brasil trabalhos com produtos naturais no setor avícola ainda são poucos, tornando de grande importância mais pesquisas, buscando novos compostos para fins terapêuticos e/ou como promotores do crescimento, visto que os problemas com a resistência são bastante preocupantes (Weber et al., 2014; Pandini et al., 2015).

Antimicrobianos alternativos, ação de extratos vegetais e óleos essenciais

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as melhores fontes para se obter moléculas ativas são as plantas, visto que a natureza é responsável pela produção da maioria das substâncias orgânicas conhecidas. Extratos vegetais e óleos essenciais têm se mostrados promissores na tentativa de substituir os antimicrobianos sintéticos comumente utilizados, para os quais diversos microrganismos já se apresentam resistentes (Bona et al., 2012; Carvalho et al. 2014).

Dentre os bioativos que podem ser extraídos das plantas, estão os óleos essenciais e extratos vegetais. A principal diferença entre esses compostos é que para obter os extratos vegetais utiliza-se qualquer parte da planta (folhas, caules, raízes, flores), sendo

necessário considerar a natureza do que será extraído, bem como o solvente utilizado para a extração dos compostos químicos (Fascina, 2011; Pandini, 2014). Já os óleos essenciais são líquidos oleosos, obtidos através da hidrodestilação, caracterizados como compostos voláteis com aroma específico, e assim como os extratos podem estar presentes em todas as regiões da planta, sendo encontrados principalmente na região foliar (Croteau, Kutchan, Lewis, 2000).

Nesses produtos existem diferentes princípios ativos com atividades biológicas, essas moléculas são oriundas do metabolismo secundário das plantas, os quais são utilizados como mecanismo de defesa contra a predação. Dentre as várias substâncias podem ser citados os sesquiterpenos, diterpenos e triterpenos, compostos polifenólicos como flavonas, taninos e cumarinas; saponinas e flavonóides. Mas o destaque está para os compostos fenólicos, que são os responsáveis principalmente pelas propriedades antimicrobianas (Fascina, 2011; Furtado et al., 2015).

Dessa forma, estudos com produtos naturais tem por objetivo a diminuição do uso de antimicrobianos sintéticos, utilizando extratos vegetais e óleos essenciais na busca por compostos semelhantes a esses antimicrobianos comumente utilizados, porém com menor toxicidade, mais eficazes contra a resistência bacteriana e com menor impacto ambiental (Bona et al., 2014).

Pesquisas com óleos essenciais já relataram sua atividade antibacteriana, como por exemplo, nas espécies *Guarea kuntiana* (figado-do-mato) e *Prunus myrtifolia* (pessegueiro-bravo) (Pandini et al., 2015; Weber et al., 2014). Já estudos com extratos vegetais também apresentaram sua atividade comprovada, como nas espécies *Psidium cattleianum* (araçá-rosa) e *Matricaria chamomila* (camomila) (Carvalho et al., 2014; Scur et al., 2016).

Sendo o Brasil um dos países mais abundantes em relação à biodiversidade, temos assim, uma ampla área para pesquisa de novos compostos bioativos dentro de seus recursos naturais, além disso, está valorizando suas espécies nativas, enfatizando a importância de sua conservação.

Atividade antioxidante

O processo oxidativo leva à produção de energia que é necessária para atividades essenciais das células, mas o metabolismo do oxigênio nas células também ocasiona a produção de radicais livres. Os agentes oxidantes são compostos produzidos pelo

metabolismo que não são controlados, podendo causar alterações na estrutura e funções celulares (Roesler et al., 2007).

Nesse aspecto moléculas antioxidantes inibem ou retardam a oxidação de substratos pela reação com radicais livres impedindo danos a moléculas-alvo (Pandini, 2014; Calloni, 2014).

Uma classificação que pode se dar aos antioxidantes se diz sobre sua disponibilidade, podendo ser sintéticos ou naturais. Os sintéticos mais comuns são BHA (Hidroxianisol butilato), BHT (Hidroxitolueno butilato), TBHQ (a terc-butil-hidroquinona), galato de propila e sorbatos. Porém, o uso abusivo desses antioxidantes sintéticos vem sendo questionado devido ao seu risco, que está associado com efeitos deletérios e/ou tóxicos no organismo, além de reduzir a qualidade dos produtos (Arakaki, 2015).

Diante disso, pesquisas vêm sendo realizadas desde a década de 80, a fim de descobrir compostos antioxidantes de origem natural mais seguros a indústria alimentícia e farmacêutica, e que possam substituir os antioxidantes sintéticos, os quais estão associados a efeitos carcinogênicos, aumento de peso do fígado e proliferação do retículo endoplasmático (Degáspari, Waszczyński, 2004; Pandini, 2014; Gonçalves, Santos, Morais, 2015).

Pandini (2014) avaliou o potencial dos extratos vegetais e óleo essencial de *Guarea kunthiana*, que demonstraram elevada capacidade antioxidante. Várias outras plantas apresentaram atividade antioxidante quando testados seus extratos vegetais e óleos essenciais, podendo citar: *Cymbopogon nardus* (citronela) (Andrade et al., 2012), *Campomanesia xanthocarpa* (gabirobeira) (Abe et al., 2014), *Annona crassiflora* (araticum) e *Caryocar brasiliense* (pequi) (Roesler et al., 2007).

Caracterização da planta

Myrtaceae uma das maiores famílias que constituem a flora brasileira, compreendendo mais de 130 gêneros e cerca de 3000 espécies, distribuídas preferencialmente em regiões tropicais (Souza, Lorenzi, 2008). No Brasil, é a família mais encontrada em formações vegetais, sendo frequentemente a maior em número de espécies. São registrados 23 gêneros e 1034 espécies, principalmente na região da Mata Atlântica. No Paraná a família está representada por 257 espécies, sendo o estado da região Sul com maior concentração de espécies (Cerqueira et al., 2009; Sobral et al., 2014).

É uma família caracterizada por possuir espécies ricas em óleos essenciais, além do grande interesse econômico. As Myrtaceae brasileiras são constituídas por numerosas espécies frutíferas como a *Psidium guajava* (goiabeira), *Myrciaria cauliflora* (jabuticabeira) e *Eugenia uniflora* (pitangueira), que são comercialmente exploradas, representando apenas uma pequena parte do grande potencial econômico desta família, tendo em vista o grande número de frutos comestíveis produzidos por espécies não comerciais (Gressler, Pizo, Morellato, 2006).

Estudos limitados aos componentes do óleo essencial de folhas de algumas espécies desta família nos mostram que podem possuir importantes atividades biológicas como, antimicrobiana, larvicida, antioxidante, citotóxica e antiinflamatória (Stefanello, Pascoal, Salvador, 2011).

O gênero *Myrcia* é um dos maiores representantes da família, apresenta cerca de 300 espécies distribuídas do México ao Sul do Brasil (Pires, Souza, 2011; Cerqueira et al., 2009). Algumas espécies da família são utilizadas na medicina popular como adstringentes, diuréticos, contra diabetes mellitus, para estancar hemorragias e no tratamento de hipertensão e úlceras. Além disso, estudos com extratos de *Myrcia fallax* demonstraram atividade contra células cancerígenas e atividade antidiabética (Limberger et al., 2004; Cerqueira et al., 2009).

Mesmo apresentando muitas espécies, são encontradas poucas publicações em relação à composição química dessas plantas. Estudos com óleos essenciais de *Myrcia myrtifolia*, *Myrcia acuminatissima* e *Myrcia bombycina* demonstraram maior presença de monoterpenos. Em relação aos extratos vegetais, foi estudado o extrato metanólico de *Myrcia multiflora* relatando a presença de flavonas e acetofenonas glicosiladas (Cerqueira et al., 2009).

Sobre a espécie de interesse *M. palustris* DC., popularmente conhecida como pintagueira-do-mato, não foram encontradas publicações relatando suas atividades biológicas, portanto, diante da importância em estudar novas espécies da família Myrtaceae, torna-se importante realizar estudos com o óleo essencial e extratos vegetais desta espécie, visando conhecer seus componentes químicos, bem como avaliar atividade antimicrobiana e antioxidante.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, S. Y. et al. **Prospecção fitoquímica, teor de flavonóides e capacidade antioxidante de *Campomanesia xanthocarpa* Mart. ex. O Berg (Myrtaceae).** Revista Eletrônica de Farmácia, v.11, n.2, p.1-14, 2014.

ABPA. **Associação Brasileira de Proteína Animal Relatório anual de 2017.** Disponível em: < <http://abpa-br.com.br/setores/avicultura/publicacoes/relatorios-anuais> > Acesso: 31 jul. 2017.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry.** Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.

ALCÂNTARA, J. B. **Pesquisa de *Salmonella* sp. em aves criadas em sistema industrial e alternativo. Dissertação apresentada para obtenção do grau de Doutorado em Ciência Animal junto à escola de veterinária e zootecnia da Universidade Federal de Goiás, 2015.**

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

ARAKAKI, D. G. **Atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* da polpa do jatobá-do-cerrado (*Hymenaea stigonocarpa* Mart.).** Dissertação apresentada à Universidade Federal do Mato Grosso do Sul para o programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento – Nível Mestrado, 2015.

ARRUDA, M. F. C. **Estudos morfoanatômicos, fitoquímicos e de atividades biológicas de *Campomanesia guazumifolia* (CAMBESS.) O. Berg, Myrtaceae.** Dissertação apresentada na Universidade Federal do Paraná para o Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – Nível Mestrado. Fevereiro, 2013.

BELUSSO, D.; HESPANHOL, A. N. A evolução da avicultura industrial brasileira e seus efeitos territoriais. **Revista Percurso – NEMO**, v.2, n.1, p.25-51, 2010.

BEZERRA, W. G. A. et al. Antibióticos no setor avícola: uma revisão sobre a resistência microbiana. **Archivos de Zootecnia**, v.66, v.254, p.301-307, 2017.

BONA, E. A. M. et al. Avaliação da atividade antimicrobiana de erva-mate (*Ilex paraguariensis*) sobre sorovares de *Salmonella* spp. de origem avícola. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e da Saúde**, v.12, p.45-8, 2010.

BONA, E. A. M. et al. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. **Arquivo Instituto Biológico**, São Paulo, v.81, n.3, p.218-225, 2014.

CALLONI, C. **Jaboticaba (*Plinia cauliflora* (O. Berg) Kausel): Composição química, atividade antioxidante *in vitro* e redução do estresse oxidativo/nitrosativo via modulação da função mitocondrial em cultura de fibroblastos humanos (MRC-5).** Dissertação apresentada à Universidade de Caxias do Sul para o Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia – Nível Mestrado, 2014.

CARVALHO, A. F. et al. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólico e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Campinas, v.16, n.3, p.521-526, 2014.

CERQUEIRA, M. D. et al. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). **Química nova**, v.32, n.6, p.1544-1548, 2009.

CHEYAN, N. et al. Antimicrobial activities of different extracts of eight plant spices from four different family against some pathogenic microorganisms. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, v. 10, p. 193-197, jan. 2012.

CORDEIRO, J. C. P. **Atividade antimicrobiana de extratos vegetais e formação de biofilme pelos isolados de *Salmonella* spp. provenientes de caprinos e ovinos do Vale do São Francisco**. Trabalho apresentado a Universidade Federal do Vale do São Francisco para o Programa de Pós- Graduação em Ciência Animal. 2014.

CORTEZ, A. et al. Resistência antimicrobiana de cepas de *Salmonella* spp. isoladas de abatedouros das aves. *Arquivo Instituto Biológico, São Paulo*, v.73, n.2, p.157-163, 2006.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural products (secondary metabolites). In: BUCHANAN, B., GRUISSEM, W., JONES, R. (Eds.). **Biochemistry and molecular biology of plants**. New York: American Society of Plant Physiologists, p. 1250–1268, 2000.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, v.5, n.1, p.33-40, 2004.

DIAS, M. R. **Rastreamento molecular de *Salmonella* spp. e contaminação microbiológica na linha de abate e processamento de frangos de corte**. Dissertação apresentada á Universidade Federal de Viçosa para o Programa de Pós-Graduação em Medicina Veterinária, para obtenção do título de Magister Scientiae. 2015.

FASCINA, V. B. **Aditivos fitogênicos e ácidos orgânicos em dietas de frangos de corte**. Tese apresentada a Universidade Estadual Paulista para o Programa de Pós-Graduação em zootecnia – Nível Doutorado, Junho, 2011.

FDA, 2015. **FDA Annual Summary Report on Antimicrobial Sold or Distributed in 2013 for Use in Food-Producing Animals**. Disponível em: <<https://www.fda.gov/AnimalVeterinary/NewsEvents/CVMUpdates/ucm440585.htm>> Acesso em: 17 ago 2017.

FERREIRA, M. E. et al. *Zanthoxylum chiloperone* leaves extract: first sustainable chagas disease treatment. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 133, p. 986–993, 2011.

FURTADO, J. M., et al. Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Eucalyptus globulus*, *Justicia pectoralis* e *Cymbopogon citratus* frente a bactérias de interesse. UNOPAR Científica. **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.17, n.4, p.233-7, 2015.

GONÇALVES, J. H. T.; SANTOS, A. S.; MORAIS, H. A. Atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e triagem fitoquímica de ervas condimentares desidratadas. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 13, n. 1, p. 486-497, 2015.

GRESSLER, E.; PIZO, M. A.; MORELLATO, P. C. **Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil**. Revista Brasileira de Botânica, v.9, n.4, p.509-530, 2006.

HAWKEY, P. M. The growing burden of antimicrobial resistance. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v.63, p.1-9, 2008.

IBRAHIM, M. A. et al. Seroepidemiological studies on poultry salmonellosis and its public health importance. **Journal of World's Poultry Research**, v.3, n.1, p.18-23, 2013.

KOTTWITZ, L. B. M. et al. Avaliação epidemiológica de surtos de salmonelose ocorridos no períodos de 1999 a 2008 no Estado do Paraná, Brasil. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v.32, n.1, p.9-15, 2010.

LEONÍDEO, A. R. A. et al. Genes de resistência aos antimicrobianos de *Salmonella* sp. **Jornal Brasileiro de Ciência Animal**, v.8, n.15, p.574-614, 2015.

LIMBERGER, R. P. et al. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. **Química Nova**, v.27, n.6, p.916-919, 2004.

LORENZI, H.; MATOS F. J. A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas**. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

MACIEL, M. J. et al. Avaliação do extrato alcoólico de hibisco (*Hibiscus sabdariffa* L.) como fator de proteção antibacteriana e antioxidante. **Revista Instituto Adolfo Lutz São Paulo**, v. 71, n. 3, 2012.

MATOS, F. J. ABREU. À fitoquímica experimental. Fortaleza: UFC, 1997. 141 p.

PANDINI, J. A. **Composição química, atividade antimicrobiana, inseticida e antioxidante do óleo essencial e extratos de *Guarea Kunthiana* A. Juss.** Dissertação apresentada na Universidade Estadual do Oeste do Paraná para o Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Conservação e Manejo de Recursos Naturais –Nível Mestrado. Junho, 2014.

PANDINI, J. A. et al. Ocorrência e perfil de resistência antimicrobiana de sorotipos de *Salmonella* spp. isolados de aviários do Paraná, Brasil. Instituto Arquivo Biológico, São Paulo, v. 82, p. 1-6, 2015.

PASCHOAL, A. C. C.; LUCIANO, F. B.; MACEDO, R. E. F. de. Avaliação da atividade antimicrobiana de compostos naturais contra *Salmonella* Enteritidis. In: Seminário de Iniciação Científica da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 21., 2013, Curitiba. **Anais eletrônicos**. Curitiba: Pontifícia Universidade Católica do Paraná, 2013. Disponível em: <http://www2.pucpr.br/reo_l/semic2013/trabalho.php?dd_0=10988&dd9_0=e26cfd01ae&dd10=view.html>. Acesso em: 01 ago. 2017.

PERIN, A. P. Ocorrência e quantificação de *Salmonella* spp. em cortes de frango congelados: levantamento epidemiológico no Estado do Paraná e perfil de suscetibilidade a antimicrobianos. Dissertação apresentada na Universidade Federal do Paraná ao Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal – Nível Mestrado, 2017.

PIRES, M. M. Y.; SOUZA, L. A. Morfoanatomia e aspectos da biologia floral de *Myrcia guianensis* (Aublet) A. P. de Candolle e de *Myrcia laruotteana* Cambesse (Myrtaceae). **Acta Scientiarum. Biological Sciences**, v.33, n.3, p.325-331, 2011.

RIZZO, P. V. et al. Extratos vegetais em dietas para frangos de corte. Revista Brasileira de Zootecnia, v.39, n.4, p.801-807, 2010.

RODRIGUES, K. A. da F. et al. *Eugenia uniflora* L. Essential Oil as a Potential Anti-Leishmania Agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and Possible Mechanisms of Action. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, 2013.

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.27, n.1, p.53-60, 2007.

SANTURIO, J. M. et al. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. *Ciência Rural*, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 803-808, mai./jun. 2007.

SCUR, M. C. et al. Antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and different plant extracts of *Psidium cattleianum* Sabine. **Brazilian Journal of Biology**, v.76, n.1, p.101-108, 2016.

SCUR, M. C. et al. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolates recovered from poultry of Western Paraná, Brazil. *Academic Journals*, v. 9, n. 9, p. 823-830, jan. 2014.

SILVA, A. C.; JORGE, N. Cogumelos: compostos bioativos e propriedades antioxidantes. **UNOPAR Científica. Ciências Biológicas e Saúde**, v.3, p.375-84, 2011.

SILVA, C. B. C. et al. Seroprevalence of *Salmonella* and *Mycoplasma* in commercial broilers, backyard chickens, and spent hens in the region of Triângulo Mineiro, state of Minas Gerais, Brazil, **Brazilian Journal of Poultry Science**, v.17, n.1, p.57-62, 2015.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Rio Grande do Sul: editora da UFSC, 1999. 821 p.

SOUZA, G. C. et al. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the South of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v.90, p.135-143, 2004.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. *Botânica Sistemática*. 2 ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2008.

STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Review – Essential oils from neotropical Myrtaceae: chemical diversity and biological properties. *Chemistry and Biodiversity*, Zurich, v.8, n.1, p.73-94, 2011.

TAVARES, L. P.; RIBEIRO, K. C. S. Desenvolvimento da avicultura de corte brasileira e perspectiva frente à influenza aviária. *Organizações Rurais & Agroindustriais*, v.9, n.1, p.79-88, 2007.

VAN BAECKEL, T. P. et al. Global antibiotic consumption 2000 to 2010: an analysis of national pharmaceutical sales data. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(14\)70780-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(14)70780-7)> Acesso em: 25 jul. 2017.

VAZ, A. N. et al. Pesquisa de *Salmonella* em Mutuns (*Mitu mitu*) mantidos em cativeiro. **Ciência Animal Brasileira**, v.16, n.1, p.68-72, 2015.

WEBER, L. D. et al. Chemical composition and antimicrobial and antioxidante activity of essential oil and various plant extrates from *Prunus myrtifolia*. **African Journal of Agricultural Research**, v. 9, n. 9, p. 846-853, 2014.

CAPÍTULO 1. PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS FOLIARES DE *Myrcia palustris* DC.

PHYTOCHEMILCA PROSPECTION, ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES OF FOLIAR EXTRACTS FROM *Myrcia palustris* DC.

Resumo

É emergente a necessidade de investigação de produtos de fontes naturais para que possam contribuir/substituir os sintéticos comumente utilizados. A família vegetal de Myrtaceae conhecida popularmente como “pintagueira-do-mato” é uma espécie nativa encontrada principalmente no Sul do Brasil, que apresenta poucos estudos biológicos, com a vantagem de ser uma planta numerosa no país. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi realizar uma investigação quanto a prospecção fitoquímica por meio de testes colorimétricos de seis extratos obtidos a partir de folhas de *M. palustris* DC, sendo eles: acetato de etila (AcEt), acetona (AcOH), aquoso (EAq), etanólico (EtOH), metanólico (MeOH) e hexânico (Hex); avaliar sua atividade antimicrobiana pela técnica de microdiluição em caldo, utilizando bactérias de interesse médico e detecção do seu potencial antioxidante frente ao método 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). Os resultados demonstraram a presença de compostos das classes: esteroides, flavonoides, xantonas e taninos. Quanto a atividade antimicrobiana, observou-se que todos os extratos demonstraram potencial antimicrobiano frente às cepas testadas, com exceção do extrato Hex, que não apresentou atividade sobre *K. pneumoniae*. O EAq foi o que apresentou menor eficiência para a maioria das cepas testadas. Em relação à atividade antioxidante, com exceção do EAq, todos os demais apresentaram potencial antioxidante nas maiores concentrações testadas na faixa de 0,1 a 25 mg/mL; o EtOH (82,29%), MeOH (77,67%) e AcOH (74,10%) demonstraram maior captura dos radicais DPPH. Sugere-se que a atividade antimicrobiana e antioxidante desses extratos esteja relacionada com os metabólitos secundários presentes: esteroides, flavonoides, xantonas e taninos, os quais já apresentaram essas atividades biológicas comprovadas em outros estudos com extratos vegetais.

Palavras-chaves: atividade biológica, potencial biotecnológico, substâncias bioativas, DPPH

Abstract

There is an emerging need for research the products from natural sources so that they can contribute / replace the commonly used synthetics. The plant family of Myrtaceae popularly known as “pintagueira-do-mato” is a native species found mainly in southern Brazil, which presents few biological studies, with the advantage of being a numerous plant in the country. Therefore, the objective of this work was to carry out an investigation regarding phytochemical prospecting through colorimetric tests of six extracts obtained from leaves of *M. palustris* DC, namely: ethyl acetate (AcEt), acetone (AcOH), aqueous (EAq), ethanolic (EtOH), methanolic (MeOH) and hexanic (Hex); to evaluate its antimicrobial activity using the broth microdilution technique, using bacteria of medical interest and detecting its antioxidant potential against the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazil (DPPH) method. The results demonstrated the presence of compounds from the classes steroids, flavonoids, xanthones, and tannins. Regarding antimicrobial activity, it was observed that all extracts demonstrated antimicrobial potential against the strains tested, except for the HE, which did not show activity on *K. pneumoniae*. DAE showed the lowest efficiency for most of the strains tested. Regarding antioxidant activity, except from DAE, all others showed antioxidant potential in the highest concentrations tested in the range of 0.1 to 25 mg/mL: EE (82.29%), ME (77.67%), and AE (74.10%) showed greater capture of DPPH radicals. It is suggested that the antimicrobial and antioxidant activities of these extracts is related to the secondary metabolites present, which have already had these biological activities demonstrated in other studies with plant extracts.

Keywords: biological activity, biotechnological potential, bioactive substances, DPPH.

Introdução

Os produtos naturais sempre apresentaram papel importante para o desenvolvimento de novos fármacos, cosméticos e outros bioprodutos, isso devido à vasta diversidade estrutural e grupos funcionais presente nas várias espécies vegetais do mundo (Bolzani et al., 2016; Amorim et al., 2019). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) a melhor fonte para se obter moléculas bioativas são as plantas, e neste sentido, o Brasil se destaca no contexto mundial por apresentar a maior biodiversidade, tornando-se um grande aliado das indústrias, oferecendo matéria-prima para a descoberta de novas moléculas, que

possam contribuir/substituir os produtos químicos (Carvalho et al., 2014; Arantes et al., 2016).

Ao investigar novas moléculas é interessante buscar por espécies nativas, visando à valorização destas, além de enfatizar a importância da conservação da flora brasileira que oferece compostos bioativos dentro de seus recursos naturais. A família Myrtaceae se destaca por ser numerosa no país com 20 gêneros e mil espécies catalogadas (Carneiro et al., 2017). O gênero possui apelo econômico por representar espécies frutíferas como goiabeira (*Psidium guajava*) e jabuticabeira (*Myrciaria cauliflora*) (Gressler et al., 2006) dentre outras. Amorim et al. (2019) mostrou por meio de análises biogeográficas que esse gênero realiza papel importante no bioma de Mata Atlântica para a diversificação do grupo, a partir do qual várias transições ocorreram a outras regiões neotropicais, em especial das florestas savanas.

Um importante representante da família Myrtaceae é o gênero *Myrcia* DC., muito utilizada na medicina popular e com efeitos no controle de glicemia em *Myrcia multiflora* e a espécie *Myrcia fallax* com evidências de atividade contra células cancerígenas (Limberger et al., 2004). A espécie *Myrcia oblongata* já foi descrita com potencial antioxidante, acaricida, inseticida e antimicrobiana (Santana et al., 2018). Na literatura não há relatos sobre atividades biológicas de *Myrcia palustris* DC., esta é uma espécie nativa encontrada principalmente nos estados de Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

Entre os problemas enfrentados pelas indústrias atualmente, está à busca por antioxidantes, substâncias as quais desaceleram ou inibem os processos oxidativos retardando o processo de apodrecimento dos alimentos. Além disso, os antioxidantes são de extrema importância na saúde humana, com a função de neutralizar radicais livres, que impedem a oxidação também no organismo a nível celular; processo esse relacionado com algumas doenças, como mal de Alzheimer (Pastene et al., 2009).

Os compostos sintéticos presentes em diversos produtos, com objetivo de conservação de alimentos e fármacos, podem causar efeitos nocivos para o organismo animal e humano, o que torna necessário buscar por produtos naturais com ação antioxidante como alternativa aos sintéticos (Sousa et al., 2007; Melo et al., 2011; Santos et al., 2018).

A utilização indevida de produtos sintéticos afeta também a área da medicina, tanto humana quanto veterinária, pois ao tentar combater infecções causadas por microrganismos, são utilizadas altas dosagens de antimicrobianos/antifúngicos acarretando na seleção de patógenos resistentes (Rossi e Andreazzi, 2005; Arantes et al., 2016). Assim, um antimicrobiano de fonte vegetal pode suprimir a ação bacteriana em diferentes sistemas com baixo efeito tóxico e custo de obtenção, por ser tratar de uma fonte natural (Amorim et al., 2019; Souza et al., 2019).

Mediante toda problemática exposta, juntamente com a importância da conservação da flora brasileira e a busca por novos compostos bioativos de interesse, esta pesquisa tem por objetivo identificar os metabólitos secundários presente nos diferentes extratos vegetais das folhas de *M. palustris* e determinar o potencial antimicrobiano e antioxidante dessa espécie

Material e Métodos

Coleta, secagem e identificação da planta

As folhas de *M. palustris* foram coletadas entre dezembro de 2017 e fevereiro de 2018, no Parque Ecológico Paulo Gorski, localizado em Cascavel, Paraná, Brasil (24°57'51.61"S e 53°26'14.80"O). Uma exsicata da planta foi levada ao Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNOP) para identificação botânica e registro do *voucher*, sob o número UNOP 8915. Após as coletas, as folhas foram secas a 40° C e moídas em moinho de facas tipo *willye*, com membrana 0,42 mm de granulometria e, posteriormente, o pó obtido foi armazenado em frasco de vidro fechado ao abrigo da luz, em temperatura ambiente por no máximo quatro dias (Weber et al., 2014).

Obtenção dos extratos vegetais

A partir das folhas secas de *M. palustris* foram preparados os extratos vegetais segundo a metodologia proposta por Pandini et al. (2015), com modificações. O material vegetal seco (10 g) foi submetido à extração com diferentes solventes (100 mL): acetato de etila P.A (AcEt), acetona P.A (AcOH), água destilada P.A (EAq), etanol P.A (EtOH), hexano P.A (Hex) e metanol P.A (MeOH). Essas preparações líquidas foram mantidas em agitador rotativo a 220

rpm pelo período de 24 h. Em seguida, foram filtradas utilizando papel filtro Whatman nº 1 e centrifugadas a 5000 rpm durante 15 min. O sobrenadante foi coletado e submetido a rotaevaporação, com exceção do extrato aquoso que foi armazenado a 4º C. Ao final, foram obtidos os extratos brutos orgânicos e o aquoso que foram armazenados ao abrigo da luz e sob refrigeração a 4º C. O rendimento dos extratos vegetais foi calculado pela equação 1.

$$\text{Equação 1 } \% = \frac{\text{massa do extrato (g)}}{\text{massa vegetal seca e móida (g)}} \times 100$$

Prospecção fitoquímica

Os testes referentes à prospecção fitoquímica dos diferentes extratos vegetais de *M. palustris*, foram realizados segundo metodologia descrita por Matos (1997). Esses testes se basearam na visualização colorimétrica e/ou na formação de precipitado após a adição dos reagentes específicos. As classes de metabólitos secundários identificados foram: saponinas a partir da reação com água destilada e ácido clorídrico P.A.; esteroides e triterpenóides por meio da reação de Liebermann-Burchards; alcaloides empregando o reagente de Dragendorff; antocianidinas, antocianinas, auronas, chalconas, flavononóis, flavonas, flavonóis e xantonas a partir de mudanças de pH no meio; cumarinas por meio de reação de fluorescência com hidróxido de potássio e taninos através da reação com cloreto férrico.

Determinação da atividade antimicrobiana

Microrganismos utilizados e preparação do inóculo

A atividade antimicrobiana dos extratos vegetais de *M. palustris* foi avaliada seguindo a metodologia proposta por Scur et al. (2014) com modificações. Os microrganismos utilizados são das coleções *American Type Culture Collection* (ATCC) e *Cefar Diagnóstica* (CCD), sendo as bactérias Gram positivas: *Bacillus subtilis* (CCD-04), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228); Gram negativas: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Salmonella* Galinarum (ATCC 1138), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028). Os microrganismos foram

recuperados em caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI) durante 24 horas a 36° C, em seguida, semeados em placa contendo ágar Muller-Hinton (MH) e incubados durante 24 horas a 36° C. Para realização dos experimentos, a concentração dos microrganismos foi ajustada em solução salina 0,85% para 1×10^5 UFC/mL.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

Os ensaios foram realizados segundo metodologia de microdiluição em caldo descrita por Weber et al (2014), com modificações. Os extratos vegetais de *M. palustris* foram solubilizados em Tween 1%. Em placas de microdiluição de 96 poços foram distribuídos em todos os poços 150 µL de Mueller-Hinton (MH) caldo. O primeiro poço recebeu mais 150 µL do extrato vegetal na concentração inicial de 200 mg/mL. Em seguida, foi realizada a diluição seriada obtendo concentrações que variaram de 200 a 0,09 mg/mL. Ao final, foram adicionados 10 µL de inóculo em cada poço e a placa foi incubada a 36° C por 24 h. Para o controle positivo foi utilizado antibiótico comercial Gentamicina (200 mg/mL). Como controle negativo foi adicionado o inóculo ao caldo MH, sem presença do extrato para verificar a viabilidade dos microrganismos testados. Também foi realizado o controle do diluente tween 1% para verificar possível interferência no ensaio. Para interpretação dos resultados, foi adicionado 20 µL de cloreto de trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5% atuando como um revelador colorimétrico, os poços que apresentaram coloração vermelha foram considerados negativos para inibição do crescimento bacteriano. A CIM foi realizada em triplicada sendo possível determinar a menor concentração do extrato vegetal capaz de inibir o crescimento microbiano.

Determinação da Concentração Bactericida (CBM)

Antes da adição do TTC 0,5% para determinação da CIM foram retiradas alíquotas de 2 µL de cada poço dos ensaios e transferida individualmente para placas de petri contendo MH agar, que foram incubadas por 24 horas a 36° C. Para determinar CBM, ou seja, a menor concentração dos extratos vegetais capaz de causar a morte do microrganismo, neste método é verificado a presença/ausência do crescimento de colônia microbiana na placa nas diferentes concentrações de extratos no ensaio de CIM (Scur, et al. 2014). A atividade dos

extratos foi classificada de acordo com metodologia de Araújo (2010) sendo definido como: atividade alta ($\leq 12,5$ mg/mL), moderada (12,5 a 25 mg/mL), baixa (50 a 100 mg/mL) e muito baixa (>100 mg/mL). Os ensaios foram realizados em triplicata.

Atividade Antioxidante

O teste da atividade antioxidante dos extratos foram realizadas pelo método de redução do DPPH, proposto por Rufino et al. (2007) e Weber et al. (2014). Foi realizado uma curva de calibração (0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 μ M de DPPH) para obter a concentração do DPPH no meio após a reação com o óleo essencial, com a equação 2, onde y é a concentração de DPPH e x a absorbância. Em seguida, os extratos vegetais foram solubilizados em metanol P.A, obtendo concentrações que variaram de 0,1 a 25 mg/mL. Uma alíquota de 0,1 mL desses extratos foram adicionados a 3,9 mL da solução de metanólica de DPPH (60 mM) e homogeneizadas em tubo agitador. Como controle negativo 0,1 mL de Metanol foi adicionado a 3,9 mL de DPPH, e como controle positivo, o antioxidante sintético BHT (butil-hidroxi-tolueno) foi utilizado em concentrações de 0,25 a 1 mg/mL. Os testes foram realizados no escuro, utilizando espectrofotômetro a 515 nm para as leituras de 1 min até a estabilização da absorbância. O metanol P.A. foi utilizado para calibração do aparelho. A porcentagem de sequestro de radicais livres (AA%) foi expressa pela equação 3, onde A_0 é a absorbância do controle negativo e A_1 é a absorbância da amostra. Para o cálculo do IC_{50} (quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH), as concentrações dos extratos vegetais e BHT foram utilizadas para obter a equação da linha com R^2 maior que 0,80, e assim encontrar o valor de IC_{50} , a partir da regreção linear. Os testes foram realizados em triplicada e expressos como média \pm desvio padrão.

Em seguida, os extratos foram calculados pela equação 4 e classificados de acordo com o AAI em fraco (AAI $<0,5$), moderado (AAI entre 0,5 e 1,0), forte (AAI entre 1,0 e 2,0) e muito forte (AAI $> 2,0$), conforme metodologia proposta em Scherer and Godoy, (2009).

$$\text{Equação 2 } y = 0,0113x - 0,0429 (R^2 = 0,995)$$

$$\text{Equação 3 } AA\% = \frac{(A_0 - A_1)}{A_1} \times 100$$

$$\text{Equação 4 } AAI = AA\% \frac{AA\%}{IC50}$$

Resultados e Discussão

Prospecção fitoquímica

A partir da confecção dos extratos vegetais de *M. palustris* com diferentes solventes o seguinte rendimento foi obtido: EAq (49,52%), MeOH (19,52%), EtOH (18,42%), AcOH (11,54%), AcEt (5,72%) e Hex (4,95%); tal rendimento pode ser influenciado pela temperatura e o tempo de extração, e também pela escolha do solvente, visto que apresentam estrutura molecular, polaridade e solubilidade diferentes, o que influencia o comportamento vegetal-solvente (Pinelo et al., 2004; Cabana et al., 2013; Fernández-Agulló et al., 2013).

A prospecção fitoquímica detectou a presença de compostos pertencentes às classes das saponinas, esteroides, flavonoides (flavonas, flavonóis e flavovonóis), xantonas e taninos. Os metabólitos secundários como flavonas e flavovonóis foram identificados em todos os extratos (Tabela 1). A maior diversidade de classes de compostos foi observada nos EtOH (7), MeOH (6) e AcOH (6), seguido de AcEt (5), Hex (5) e EAq (3), corroborando com a literatura que relata solventes como etanol, metanol e acetona como melhores extratores vegetais (Cabana et al., 2013; Fernández-Agulló et al., 2013; Souza et al., 2019).

A família Myrtaceae é muito estudada em relação a sua composição química, sendo relatada com grande potencial em acumular compostos fenólicos como taninos, flavovonóis, flavonas e flavonóis (Takao et al., 2015). Contudo, é importante ressaltar que há diferenças nos compostos entre espécies da mesma família, gênero e até espécie, isso porque o local onde a planta está inserida, fatores ambientais como: temperatura, disponibilidade de água, adubação, época da coleta bem como método de extração, podem interferir na via metabólica das plantas, alterando a biossíntese de diferentes compostos em cada estação do ano (Gobbo-Neto e Lopes, 2007; Morais, 2009).

Tabela 1: Prospecção fitoquímica dos extratos vegetais das folhas de *Myrcia palustris*.

Metabolite Classes	Extracts <i>Myrcia palustris</i>					
	EtOH	MeOH	AcEt	AcOH	Hex	EAq
Saponins	+	-	-	+	-	+
Esteroids	+	+	+	+	+	-
Triterpenoids	-	-	-	-	-	-
Alkaloids	-	-	-	-	-	-
Anthocianins	-	-	-	-	-	-
Anthocyanins	-	-	-	-	-	-
Flavonas	+	+	+	+	+	+
Flavonoids	+	+	+	+	+	-
Xanthones	+	+	+	+	+	-
Chalconas	-	-	-	-	-	-
Auronas	-	-	-	-	-	-
Flavonols	+	+	+	+	+	+
Tannins	+	+	-	-	-	-
Coumarins	-	-	-	-	-	-

+ Presença do composto; - ausência do composto. EtOH: extrato etanólico; MeOH: extrato metanólico; AcEt: acetato de etila; AcOH: extrato acetona; Hex: extrato hexânico e EAq: extrato aquoso.

Mesmo podendo apresentar diferentes compostos, devido às distintas condições em que cada planta se encontra, como citado acima, os metabólitos secundários encontrados nos extratos de *M. palustris* já foram identificados em outras espécies da família como taninos, esteroides, saponinas, flavonoides e alcalóides em *Gomidesia affinis*, *Gomidesia spectabilis* e *Pimenta pseudocaryophyllus* (Sakita e Aguiar, 2006; Paula et al., 2008). Como em *M. palustris*, várias outras espécies do gênero apresentaram compostos fenólicos, representados por flavonoides, flavonas, antocianinas, flavonóis e taninos. Esses metabólitos foram identificados em espécies como *Myrcia oblongata* (Santana, 2017), *Myrcia bella* (Saldanha, 2010) e *Myrcia hiemalis* (Silva, 2007).

Atividade antimicrobiana

Observou-se uma variação da concentração de CIM e CBM dos extratos de acordo com o solvente extrator e o microrganismo testado. Dessa forma, todos os extratos, com exceção dos Hex e EAq apresentaram atividade antimicrobiana para todas as cepas testadas. O EAq demonstrou menor eficiência frente às cepas testadas (tabela 2), e a baixa atividade antimicrobiana pode ser justificada devido à baixa dissolução/afinidade dos compostos químicos presentes na planta a água no método de extração (tabela 1).

Os extratos EtOH e MeOH apresentaram as maiores atividades antimicrobianas quando comparados aos outros extratos, com concentrações de CIM e CBM variando de 1,56 a 25 mg/mL entre as cepas Gram negativas e positivas, apresentando atividade classificada como alta. A prospecção fitoquímica de ambos os extratos relatou a presença dos mesmos compostos (esteroides, flavonas, flavonóis, xantonas, flavononóis e taninos), justificando a atividade antimicrobiana semelhante apresentada por eles. Nestes dois extratos há presença de taninos, que podem ter contribuído para maior atividade antimicrobiana, visto que foram identificados apenas nos mesmos. Segundo Mello, (2001) os taninos possuem três mecanismos de ação que o torna bactericida e/ou fungicida, o primeiro é a inibição da síntese de enzimas, o segundo atua sobre as membranas celulares, modificando o seu metabolismo e o terceiro ocorre uma complexação dos taninos e íons metálicos que diminui a disponibilidade a célula microbiana.

Os extratos de AcOH e Hex apresentaram perfil de atividade antimicrobiana semelhantes, considerada de baixa a alta para todas as bactérias, com CIM e CBM variando entre 3,12 a 100 mg/mL. A justificativa para sua atividade antimicrobiana semelhante pode ser atribuída aos compostos químicos presentes, sendo estes os mesmos, com exceção das saponinas encontradas somente no AcOH (tabela 1).

O AcEt apresentou atividade antimicrobiana de baixa à moderada para todos os microrganismos testados, sendo o extrato com menor eficiência após o EAq, no entanto, revelou a presença dos mesmos grupos de compostos fitoquímicos dos outros extratos (esteroides, flavonas, flavonóis, xantonas e flavanonóis). Apesar disso, a prospecção fitoquímica (tabela 1) por se tratar de um método qualitativo, não permite quantificar esses grupos, ou seja, é detectado a presença e ausência de tais compostos, seguindo a metodologia colorimétrica aplicada neste estudo, o que provavelmente justifica extratos contendo mesma classe de compostos fitoquímicos apresentarem comportamentos antimicrobianos distintos (Pandini et al., 2015; Amorim et al., 2019).

Além disso, a presença desses grupos de compostos fitoquímicos em baixas quantidades provavelmente não foram suficientes para inibir significativamente os microrganismos testados; outra característica relevante é que não só a quantidade, mas também há a ação sinérgica que quando utilizados

esses compostos em combinação dentro do mesmo extrato podem exercer efeitos aditivos ou sinérgicos sobre o microrganismo (Pandini et al., 2015; Amorim et al., 2019).

Ao comparar esse estudo com outros já reportados, foi possível verificar que o extrato EtOH apresentou melhor potencial antimicrobiano semelhante a outros estudos, como em Nene et al., (2016) que ao avaliar extratos de *M. bela* obteve atividade antimicrobiana para *S. aureus*; e em Souza et al., (2019) além do extrato etanólico, o metanólico das folhas de *Zanthoxylum caribaeum* L. também exibiu capacidade antimicrobiana.

Tabela 2: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) dos extratos vegetais das folhas de *Myrcia palustris*.

Microrganismos	CIM/CBM (mg/mL)					
	EtOH	MeOH	AcOH	Hex	AcEt	EAq
Gram (+)						
<i>B. subtilis</i>	6,25/12,5	6,25/12,5	12,5/50	3,12/25	6,25/12,5	200/-
<i>E. faecalis</i>	6,25/6,25	12,5/12,5	50/50	12,5/25	12,5/25	-/-
<i>S. aureus</i>	1,56/1,56	3,12/3,12	12,5/12,5	25/50	12,5/25	50/50
<i>S. epidermidis</i>	1,56/1,56	3,12/3,12	6,25/12,5	25/50	25/50	-/-
Gram (-)						
<i>E. coli</i>	6,25/12,5	6,25/12,5	12,5/50	25/50	25/50	100/-
<i>K. pneumoniae</i>	6,25/25	3,12/12,5	1,25/25	-/-	25/100	-/-
<i>P. aeruginosa</i>	1,56/1,56	1,56/1,56	6,25/6,25	100/100	50/50	50/100
<i>P. mirabilis</i>	1,56/3,12	1,56/3,12	6,25/6,25	12,5/50	25/50	-/-
<i>S. Enteritidis</i>	3,12/6,25	6,25/6,25	3,12/6,25	12,5/50	12,5/25	-/-
<i>S. Gallinarum</i>	6,25/12,5	6,25/12,5	12,5/25	25/50	25/100	-/-
<i>S. Tiphymurium</i>	6,25/12,5	6,25/25	100/100	25/50	25/100	-/-

-: não apresentou atividade; EtOH: extrato etanólico; MeOH: extrato metanólico; AcOH: extrato acetona; HEX: extrato hexânico; AcEt: extrato acetato de etila; EAq: extrato aquoso.

Apesar de poucos estudos sobre atividade antimicrobiana de extratos vegetais do gênero *Myrcia* serem relatados, várias pesquisas demonstram atividade de extratos de espécies pertencentes a família Myrtaceae sobre diferentes microrganismos. Os extratos metanólico de *Eucalyptus globulos*, *Eucalyptus maculata* e *Eucalyptus viminalis* inibiram significativamente o crescimento de microrganismos gram-positivos: *E. faecalis* e *S. aureus* (Takahashi et al., 2004). O extrato etanólico de *Psidium guajava* inibiu o crescimento de bactérias Gram positivas e negativas como *S. aureus* e *P. mirabilis* (Gonçalves et al., 2005). A eficiência de extratos vegetais de *Myrciaria*

cauliflora e *Syzygium cumini* já foi comprovada contra *E. coli*, *K. pneumoniae*, *P. aeruginosa*, *S. Tiphymurium*, *S. aureus* e *B. subtilis* por Bona et al., (2014).

Já foi comprovada a atividade antimicrobiana de metabólitos secundários de diversas plantas, com isso sugere-se que o potencial de *M. palustris* esteja relacionado com a presença principalmente de taninos e flavonoides presente nesses extratos. Os compostos pertencentes à classe dos flavonoides (flavonas, flavonóis, xantonas e flavovonóis) podem agir nos microrganismos por três mecanismos: causando a perfuração e a redução da fluidez da membrana plasmática; causando inibição da topoisomerase, acarretando na inibição da síntese de ácidos nucleicos e/ou inibindo o metabolismo energético, estes por sua vez, causam danos irreversíveis às células (Sher, 2009; Samy e Gopalakrishnakone, 2010; Cushnie e Lamb, 2011).

O elevado potencial dos extratos EtOH e MeOH pode ser atribuído à presença dos taninos, que já apresentam ação antimicrobiana comprovada na literatura (Simões et al., 2007). O mecanismo de ação antimicrobiano dos taninos está na inibição de enzimas bacterianas e/ou na capacidade de se complexarem com os substratos dessas enzimas. Além disso, modificam o metabolismo devido à ação sobre a membrana celular e fundamentam-se no complexo tanino + íons metálicos, acarretando a diminuição de íons essenciais para o metabolismo microbiano. Ademais, é capaz de fazer com que as colônias de bactérias se desintegrem, resultando na inibição do crescimento microbiano (Scalbert, 1991; Doss et al., 2009).

Dentre o grupo dos esteroides, um composto comum aos extratos AcOH, EAq e EtOH foi a presença das saponinas (tabela 1), que provavelmente deve ter contribuído para as atividades antimicrobianas, agindo sobre a membrana celular e aumentando a permeabilidade (Simões et al., 2004; Desoti et al., 2011). É importante ressaltar que as bactérias que os extratos tiveram melhores performance de inibição foram as *S. Galinarium* e *S. Enteriditis*, estas apresentam grande importância para o setor avícola, por estarem presentes no ambiente de acomodação das aves e ser um veículo de contaminação nas matrizes e conseqüentemente nos ovos produzidos; no estudo de Hwang et al., (2020) as salmonelas são avaliadas para a sua prevalência no sistema de produção aviária bem como os fatores meteorológicos associados a contaminação, tamanha importância esse grupo bacteriano possui nos sistemas confinados de aves.

Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante dos extratos vegetais de *M. palustris* foi determinada pela diminuição da absorbância a 515 nm, utilizando o ensaio de sequestro do DPPH. Os extratos que apresentaram maior sequestro de radicais DPPH quando comparados entre si, foram EtOH (82,29%), MeOH (77,67) e AcOH (74,10%), na sua maior concentração testada (1 mg/mL) e valores de IC₅₀ de 0,29, 0,48 e 1,48 mg/mL, respectivamente. Já os Hex (65,17%) e AcEt (69,49%) apresentaram porcentagens de atividade antioxidante menores que 70%, mesmo na sua maior concentração testada (25 mg/mL), e os valores de IC₅₀ de 16,83 e 18,42, respectivamente.

Com exceção do EAq (19,49%), todos os demais extratos de *M. palustris* apresentaram atividade antioxidante considerada elevada EtOH (82,29%), MeOH (77,67), AcOH (74,10%) Hex (65,17%) e AcEt (69,49%), embora não tenham alcançado a porcentagem do antioxidante sintético BHT, com 98,75% (1 mg/mL) e valor de IC₅₀ de 0,28 mg/mL. Isso significa que, é necessária uma maior quantidade dos extratos vegetais, para sequestrar a mesma quantidade de radicais livres DPPH, quando comparado com o controle. O extrato aquoso não pode ser considerado um bom antioxidante visto que, na sua maior concentração (25 mg/mL) apresentou capacidade antioxidante muito baixa, de 19,49% e valor de IC₅₀ de 60,38 mg/mL (tabela 3). Dessa forma, observa-se que a capacidade de sequestrar radicais livres depende da concentração testada e do solvente extrator (Ruffino et al., 2007; Scherer e Godoy, 2009; Weber et al., 2014).

Ao comparar nossos dados com os da literatura priorizamos trabalhos com o mesmo método que utilizamos nessa pesquisa, o método do DPPH é muito utilizado e consiste na captura deste radical livre, acarretando um decréscimo da absorbância (Ruffino et al., 2007). Estudos sobre o potencial antioxidante de extratos foliares com espécies da família Myrtaceae são escassos, o foco desse estudo no Brasil são os frutos comestíveis. Contudo, o potencial antioxidante de infusões foliares de algumas espécies desta família foi observado, em *Psidium laruotteanum* e *Psidium australe* que revelou uma interessante fonte de antioxidante natural associada a presença de compostos fenólicos dos extratos (Takao et al., 2015).

Tabela 3: Porcentagem de sequestro de radicais DPPH e valor de IC₅₀ dos extratos vegetais de *Myrcia palustris*.

Concentração (mg/mL)	Controle BHT	Extratos de <i>Myrcia palustris</i>					
		EtOH	MeOH	AcOH	Hex	AcEt	EAq
25	-	-	-	-	69,49±0,5	65,17±0,4	19,49±0,1
20	-	-	-	-	55,80±0,4	52,38±0,2	15,77±0,3
15	-	-	-	-	47,90±0,9	40,77±0,8	12,20±0,0
10	-	-	-	-	33,03±0,7	33,03±1,8	7,73±1,9
5	-	-	-	-	22,02±0,4	21,13±2,0	2,52±0,0
1	98,75±0,2	82,29±0,5	77,67±0,8	74,10±0,6	-	-	-
0,80	-	77,67±0,3	70,23±0,3	53,42±0,8	-	-	-
0,50	77,23±0,1	-	-	-	-	-	-
0,40	-	62,79±0,9	51,63±0,7	38,98±0,8	-	-	-
0,25	53,48±1,3	-	-	-	-	-	-
0,20	-	47,91±1,1	32,18±0,3	30,80±0,6	-	-	-
0,10	38,03±0,2	32,88±0,3	24,10±0,3	25,89±0,3	-	-	-
0,05	20,35±3,0	-	-	-	-	-	-
IC ₅₀	0,28±0,0	0,29±0,0	0,48±0,0	1,48±0,5	16,83±0,1	18,42±0,2	60,38±2,4
IAA	3,52±0,2	0,82±0,5	1,61±0,8	0,5±0,6	0,041±0,5	0,03±0,4	0,032±0,1

EtOH: extrato etanólico; MeOH: extrato metanólico; AcOH: extrato acetona; Hex: extrato hexânico; AcEt: extrato acetato de etila e EAq: extrato aquoso. IC₅₀: concentração apresentando 50% de inibição; IAA: Índice de atividade antioxidante. O potencial antioxidante determinado de acordo com Scherer e Godoy (2009).

Os extratos vegetais de *M. palustris* demonstraram forte atividade antioxidante para o EtOH e MeOH e moderado para AcEt e AcOH e os demais Hex e EAq apresentaram índice, seguindo a classificação proposta por Scherer e Godoy, (2009)

Dentro do gênero *Myrcia*, os AcOH (IAA= 8,5) MeOH (IAA= 4,7) e Hex (IAA= 4,0) das folhas maduras de *Myrcia splendens* apresentaram atividade antioxidante considerada elevada (Pontes et al., 2018). Outras espécies como *Myrcia tomentosa* (IAA= 4,1), *Myrcia bella* (IAA= 3,9) e *Myrcia lingua* (IAA= 3,9) também apresentaram atividade antioxidante, considerada muito elevada (Takao et al., 2015).

A atividade antioxidante de *M. palustris* pode estar atribuída aos compostos fenólicos presentes em cada extrato, os quais apresentam atividade antioxidante comprovada (Aquino et al., 2017). Porém, é possível observar diferenças na capacidade antioxidante entre os extratos de *M. palustris* e, quando se compara com outras espécies, isso porque embora todos apresentem compostos fenólicos, estes podem estar em diferentes quantidades e/ou forma

molecular, interferindo na capacidade de sequestrar radicais livres DPPH de cada extrato (Takao et al., 2015; Aquino et al., 2017; Pontes et al., 2018).

Em todos os extratos de *M. palustris* foram encontrados os compostos fenólicos, os quais estão amplamente distribuídos na natureza, podendo atuar como antioxidantes através de várias formas. Uma delas está relacionada com a sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, já que sua estrutura permite suportar um elétron desemparelhado. Além disso, conseguem reparar a lesão de moléculas atacadas por radicais livres e, bloqueiam a propagação de radicais livres na oxidação lipídica (Sucupira et al., 2012). Essa classe é representada por uma grande variedade de compostos, dentre eles estão os flavonoides, apresentando sob muitas variações tais como, flavonóis, flavonas, flavononóis e antocianinas (Morais et al., 2009; Silva et al., 2010; Takao et al., 2015). Os flavonoides apresentam grande capacidade antioxidante devido ao seu esqueleto carbônico, que favorece a estabilização de radicais livres (Aquino et al., 2017).

Outro metabólito que representa os compostos fenólicos são os taninos, encontrados em muitas espécies vegetais são moléculas que atuam no processo de estabilização de radicais livres. A presença desse composto no EtOH e MeOH pode justificar seu elevado potencial antioxidante, visto que foram identificados apenas nesses extratos (Paiva et al., 2002; Bernardes et al., 2011; Aquino et al., 2017).

Conclusão

O rendimento dos extratos vegetais variou conforme os solventes utilizados, sendo Eaq (49,52%), MeOH (19,52%), EtOH (18,42), AcOH (11,54%), AcEt (5,72%) e Hex (4,95%). A prospecção fitoquímica detectou a presença de esteroides, flavonoides (flavonas, flavonóis e flavononóis), xantonas e taninos.

A atividade antimicrobiana com melhor performance de inibição foi observada nos extratos AcEt, AcOH, EtOH e MeOH apresentando atividade para todas as cepas testadas.

O potencial antioxidante foi estabelecido para todos os extratos, com exceção do aquoso, destaque para o EtOH com 82,29% de sequestro de radical DPPH.

Myrcia palustris DC une importantes características para aplicabilidade biotecnológica, por possuir comprovada atividade antimicrobiana e potencial

antioxidante; o que pode ser usada como matéria-prima em diferentes aplicações industriais na incorporação ou desenvolvimentos novos produtos.

Referências

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

ARANTES VP, SANTOS LF, DINIZ KS, SILVA GO AND COSTA GM. 2016. Estudo comparativo da atividade antibacteriana de extratos vegetais de *Senna spectabilis*, *Rosmarinus officinalis* e *Eugenia uniflora* frente à cepa padrão de *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Staphylococcus aureus* ATCC 6528 e *Streptococcus pyogenes* ATCC 19615. Arq Cienc Saúde UNIPAR 20: 151-158.

BONA EAM, PINTO FGS, FRUET TK, JORGE TCMJ AND MOURA AC. 2014. Comparação de métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração inibitória mínima (cim) de extratos vegetais aquosos e etanólicos. Arq Inst Biol 81: 218-225.

Bruno S. Amorim, Thais N.C. Vasconcelosc,d, Gustavo Souzaa, Marccus Alvesa, Alexandre Antonellie,f,g,h, Eve Lucas. Advanced understanding of phylogenetic relationships, morphological evolution and biogeographic history of the mega-diverse plant genus *Myrcia* and its relatives (Myrtaceae: Myrteae) 2019

CABANA R, SILVA LR, VALENTAO P, VITURRO CI AND ANDRADE PB. 2013. Effect of different extraction methodologies on the recovery of bioactive metabolites from *Satureja parvifolia* (Phil.) Epling (Lamiaceae). Ind Crops Prod 48: 49-56.

CARNEIRO NS et al. 2017. Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities of essential oils from leaves and flowers of *Eugenia klotzschiana* Berg (Myrtaceae). An Acad Bras Cienc 89: 1907-1915.

CARVALHO AF, SILVA DM, SILVA TRC, SCARCELLI E AND MANHANI MR. 2014. Avaliação da atividade antibacteriana de extratos etanólicos e de ciclohexano a partir das flores de camomila (*Matricaria chamomilla* L.). Rev Bras PI Med 16: 521-526.

CUSHNIE TPT AND LAMB AJ. 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. Int J Antimicrob Agents 38: 99-107.

FERNÁNDEZ-AGULLÓ A, PEREIRA E, FREIRE MS, VALENTÃO P, ANDRADE PB, GONZÁLEZ ÁLVAREZ JA AND PEREIRA JA. 2013. Influence of solvent on the antioxidant and antimicrobial properties of walnut (*Juglans regia* L.) green husk extracts. Ind Crops Prod 42: 126–132.

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.

GONÇALVES, J. H. T.; SANTOS, A. S.; MORAIS, H. A. Atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e triagem fitoquímica de ervas condimentares desidratadas. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, v. 13, n. 1, p. 486-497, 2015.

GRESSLER E, PIZO MA, AND MORELLATO P. 2006. Polinização e dispersão de sementes em Myrtaceae do Brasil. *Revista Brasil Bot* 29: 509-530.

DOSS A, MUBARACK HM AND DHANABALAN R. 2009. Antibacterial activity of tannins from the leaves of *Solanum trilobatum* Linn. *Indian J Sci Technol* 2: 41-43.

D. Hwang, M.J. Rothrock, H. Pang, et al., Predicting Salmonella prevalence associated with meteorological factors in pastured poultry farms in southeastern United States, *Science of the Total Environment* (2020), <https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.136359>

Shi, Jie, Yazhu Wang, Huanran Wei, Jiajun Hu, Min-Tian Gao. Structure analysis of condensed tannin from rice straw and its inhibitory effect on *Staphylococcus aureus*. *Industrial Crops & Products* 145. 11 p. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2020.112130>

Juliete Gomes de Lara de SOUZA¹; Fabiana Gisele da Silva PINTO^{1*}; Adrieli Gorlin TOLEDO¹; Luis Francisco Angeli ALVES^{1**}; DeJane Santos ALVES. BIOLOGICAL ACTIVITIES AND PHYTOCHEMICAL SCREENING OF LEAF EXTRACTS FROM *Zanthoxylum caribaeum* L. (Rutaceae). *Biosci. J.*, Uberlândia, v. 36, n. 1, p. 223-234, Jan./Feb. 2020. <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v36n1a2020-48051>

.LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Química Nova*, v.27, n.6, p.916-919, 2004.

MATOS FJ. 1997. À fitoquímica experimental. Fortaleza: UFC, 141 p.

MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; TIVERON, A. P.; MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T. L. C.; ZANUS, M. C.; PEREIRA, G. E.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. *Ciência Rural*, v.41, n.6, p.1088-1093, 2011.

MELLO, JPC; SANTOS, S.C (2001) Em farmacognosia: da planta ao medicamento; Simões, CMO; Scheckel, EP. Orgs; Ed. UFSC: Porto Alegre, 3 ed.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, n.1B, p.315-320, 2009.

NENE RV, CARDOSO CRP, TEIXEIRA JR, FAUSTINO PAS, CARVALHO MR, MADALENO LL AND FRIGIERI MC. 2016. Atividade antimicrobiana de *Myrcia bella*, *Arrabidaea brachypoda* e *Hymenaea courbaril*. *Cienc Tecnol* 8.

PANDINI, J. A.; PINTO, F. G. S.; SCUR, M. C.; ALVES, L. F. A.; MARTINS, C. C. Antimicrobial, insecticidal, and antioxidant activity of essential oil and extracts of *Guarea kunthiana* A. Juss. *Journal of Medicinal Plant Research*, v.9, n.3, p.48-55, 2015.

PASTENE E, GOMÉZ M, SPEISKY H AND NUÑEZ-VERGARA L. 2009. Un sistema para la detección de antioxidantes volátiles comúnmente emitidos desde especies y hierbas medicinales. *Quim Nova* 32: 482-487.

PONTES FC, ABDALLA VCP, IMATOMI M, FUENTES LFG AND GUALTIERI SCJ. 2018. Antifungal and antioxidant activities of mature leaves of *Myrcia splendens* (Sw.) DC. *Braz J Biol* 1-6.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoides and phenolic acids. *Free Radical Biology & Medicine*, v.20, n.7, p.933-956, 1996.

ROSSI F AND ANDREAZZI DB. 2005. Resistência bacteriana: interpretando o antibiograma, 1a ed., São Paulo: Atheneu.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. *Embrapa*, v.127, p.1-4, 2007.

SANTANA, C. B.; SOUZA, J. G. L., CORACINI, M. D. A.; WALERIUS, A. H.; SOARES, V. D.; COSTA, W. F; PINTO, F. G. S. Chemical composition of essential oil from *Myrcia oblongata* DC and potencial antimicrobial, antioxidant and acaricidal activity against *Dermanyssus gallinae* (DEGEER, 1778). *Bioscience Journal*, v.34, n.4, p.996-1009, 2018.

SCUR, M. C.; PINTO, F. G. S.; BONA, E. A. M.; WEBER, L. D.; ALVES, L. F. A.; MOURA, A. C. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolates recovered from poultry of Western Paraná, Brazil. *African Journal of Agricultural Research*, v.9, n.9, p.823-830, 2014.

SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, n.4, p.572-577, 2007.

SAMY RP AND GOPALAKRISHNAKONE P. 2010. Therapeutic potential of plants as antimicrobials for drug discovery. *Evid Based Complement Alternat Med* 7: 283-294.

SANTOS C, GALAVERNA RS, ANGOLINI CFF, NUNES VVA, ALMEIDA LFR, RUIZ ALTG, CARVALHO JE, DUARTE RMT, DUARTE MCT AND EBERLIN MN. 2018. Antioxidative, antiproliferative and antimicrobial activities of phenolic compounds from three *Myrcia* species. *Molecules* 23: 986-998.

SANTOS JAS, SENA TJO, SANTOS KBS, COSTA MLA, SANTOS KCB AND SANTOS AF. 2018. Estudo do potencial antioxidante de *Anacardium occidentales* L. e determinação de seus compostos fenólicos. *Diversitas Journal* 3: 455-474.

SCALBERT A. 1991. Antimicrobial properties of tannins. *Phytochem* 30: 3875-3883.

SCHERER, R. GODOY, HT. (2009) Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. *Food Chemistry* 112, 3. 654-658 p. doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.06.026.

SHER A. 2009. Antimicrobial activity of natural products from medicinal plants. *J Med Sci* 7: 72-78.

SOUSA CMM et al. 2007. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Quim Nova 30: 351-355.

SOUZA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Química Nova, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SOUZA, T. J. T.; APEL, M. A.; BORDIGNON, S.; MATZENBACHER, N. I.; ZUANAZZI, A. S.; HENRIQUES, A. T. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.17, n.3, p.368-372, 2007.

TAKAO, L. K.; IMATOMI, M.; GUALTIERI, S. C. J. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). Brazilian Journal of Biology, v.75, n.4, p.948-952, 2015.

WEBER, L. D.; PINTO, F. G. S.; SCUR, M. C.; SOUZA, J. G. K.; COSTA, W. F.; LEITE, C. W. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and various plant extract from *Prunus myrtifolia* (L.) Urb. African Journal of Agricultural Research, v.9, n.9, p.846-853, 2014.

CAPÍTULO 2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DO ÓLEO ESSENCIAL DE FOLHAS *Myrcia palustris* DC. (MYRTACEAE)

CHEMICAL COMPOSITION, ANTIMICROBIAL AND ANTIOXIDANT ACTIVITY OF LEAVES ESSENTIAL OIL THE *Myrcia palustris* DC. (MYRTACEAE)

Resumo

O Brasil apresenta a maior biodiversidade no mundo e neste contexto, suas espécies nativas tornam-se uma alternativa na busca de moléculas bioativas para bioprospecção de antimicrobianos e antioxidantes naturais. Pertencente à família Myrtaceae, a espécie *Myrcia palustris* DC, conhecida popularmente como pintagueira-do-mato, não apresenta estudos referente às suas atividades biológicas e composição química. Diante disso, o objetivo deste trabalho foi determinar a composição química do óleo essencial de *M. palustris* por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM), avaliar sua atividade antimicrobiana pela técnica de microdiluição em caldo e a atividade antioxidante pela técnica de 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH). O rendimento total a partir da extração pela técnica de hidrodestilação do óleo essencial foi de 0,35%. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas revelou a presença de 28 compostos, sendo a maioria da classe dos sesquiterpenos. A atividade antimicrobiana foi observada para todas as bactérias Gram-positivas (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) com exceção de *Staphylococcus epidermidis*. Em relação às Gram-negativas, verificou-se atividade inibitória apenas para *Shigella flexneri*. Para levedura *C. albicans* não foi observada atividade inibitória e nem fungicida. O óleo essencial apresentou capacidade de redução de radicais de DPPH até 82,81%, confirmando seu potencial antioxidante. Sugere-se que a ação antimicrobiana e antioxidante presentes no óleo essencial de *M. palustris* esteja relacionada à presença dos compostos majoritários α -Guaieno (25,89%), α -Bulneseno (13,39%) e β -Selineno (4,76%).

Palavra-chave: Atividades biológicas, Pitangueira-do-mato, substâncias bioativas, DPPH.

Abstract

Brazil has the greatest biodiversity in the world and in this context, its native species become an alternative in the search for bioactive molecules for bioprospecting antimicrobials and natural antioxidants. Belonging to the Myrtaceae family, the species *Myrcia palustris* DC, popularly known as pintagueira-do-mato,

does not present studies regarding its biological activities and chemical composition. Therefore, the objective of this work was to determine the chemical composition of the essential oil of *M. palustris* by gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS), to evaluate its antimicrobial activity by the broth microdilution technique and the antioxidant activity by the DPPH technique. 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH). The total yield from the essential oil hydrodistillation technique was 0.35%. Gas chromatography coupled with mass spectrometry revealed the presence of 28 compounds, the majority being from the sesquiterpenes class. Antimicrobial activity was observed for all Gram-positive bacteria (*Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) with the exception of *Staphylococcus epidermidis*. Regarding Gram-negatives, there was an inhibitory activity only for *Shigella flexneri*. For yeast *Candida albicans*, no inhibitory or fungicidal activity was observed. The essential oil showed a capacity to reduce DPPH radicals up to 82.81%, confirming its antioxidant potential. It is suggested that the antimicrobial and antioxidant action present in the essential oil of *M. palustris* is related to the presence of the major compounds α -Guaieno (25.89%), α -Bulnesene (13.39%) and β -Selinene (4, 76%).

Keywords: Biological activities, Pintagueira-do-mato, bioactive substances, DPPH.

Introdução

Nos últimos anos é cada vez maior a procura por produtos que possam substituir os sintéticos (antimicrobianos e antioxidantes) nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética, isso porque o consumidor está se tornando cada vez mais criterioso e exigente quanto à qualidade dos produtos que consome. Além disso, os produtos sintéticos comumente utilizados vêm causando inúmeros problemas tanto para o meio ambiente quanto para animais e humanos, em decorrência do seu uso exacerbado e das elevadas concentrações em que são aplicados (MACHADO; JUNIOR, 2011; SILVA et al., 2018).

Ademais, o uso exacerbado de antimicrobianos tem selecionado a presença de microrganismos resistentes, reforçando a preocupação das indústrias em usar produtos que sejam naturais, isso porque a maioria dos produtos provenientes de espécies vegetais são menos agressivos ao ambiente e com menor toxicidade para o homem e ambiente (SILVA et al., 2007; PACKER; LUZ, 2007; OSTROSKY et al., 2008).

Por sua vez, a substituição de antioxidantes sintéticos também se faz necessário. Atualmente, os antioxidantes mais utilizados são butil-hidroxi-tolueno (BHT), butil-hidroxi-anisol (BHA), *terc*-butil-hidroxi-quinona (TBHQ), tri-hidroxi-butil-fenona (THBP) e galato de propila (GP). Essas substâncias já despertam preocupação referente às doses utilizadas, podendo apresentar também efeitos tóxicos. Além disso, há evidências de que radicais livres e outros antioxidantes são os grandes responsáveis por causar inúmeras doenças degenerativas e cardiovasculares, bem como declínio do sistema imune e disfunções cerebrais. Desta maneira, estudos para descobertas de antioxidantes e antimicrobianos de origem natural já estão sendo realizadas, justificando a importância de estudos para descoberta de moléculas capazes de sequestrar radicais livres e inibir o

crescimento de microrganismos resistentes (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004; SOUSA, et. al., 2007; MELO, et. al., 2011; GONÇALVES et al., 2015).

O Brasil é o local mais rico em biodiversidade no mundo, tornando-se muito importante na busca de novos princípios ativos, fornecendo matérias-primas para obtenção de novos produtos químicos. Muitas espécies vegetais nativas já servem como fonte de pesquisas a fim de descobrir suas atividades biológicas (ROSA et al., 2016).

Nesse sentido, os óleos essenciais (OEs) presentes em plantas aromáticas, são substâncias provenientes do metabolismo secundário, constituídas por substâncias voláteis, e seus compostos orgânicos são as principais substâncias com ação terapêutica (ALMEIDA et al., 2015; ROSA et al., 2016; BECKER et al., 2017). Recentemente, foram reconhecidos como poderosos antioxidantes naturais, podendo ser utilizados como substitutos em potenciais aos antioxidantes sintéticos na indústria alimentícia e farmacêutica, além disso, representam uma abordagem interessante contra a ocorrência da resistência de patógenos microbianos aos medicamentos atuais (MIMICA-DUKIC et al., 2004; BONZIN et al., 2007; SOLÓRZANO-SANTOS; MIRANDA-NOVALES, 2012).

Dentre as muitas espécies que apresentam atividades biológicas, as da família Myrtaceae destacam-se por ser uma das mais abundantes do ecossistema brasileiro, e ainda por apresentarem um alto teor de óleo essencial, que são muito estudados e testados em várias atividades biológicas (SILVA et al., 2018). O gênero *Myrcia* é bastante interessante do ponto de vista químico e farmacológico, e se destaca pelo seu potencial terapêutico, além disso, muitas espécies já apresentam potencial citotóxico, antioxidante, antiinflamatória e analgésica (STEFANELLO et al., 2011). Dentre todas as atividades já descritas para o gênero *Myrcia*, as mais relatadas são em relação à diabetes comprovando seu uso na medicina popular. Conhecidas como “planta insulina”, as espécies *M. multiflora*, *M. salcifolia* e *M. shaerocarpa* são muito usadas no tratamento desta doença (RUSSO et al., 1990).

Conhecida popularmente como pitangueira-do-mato, murta-do-brejo e baga-de-sabiá, a espécie nativa *M. palustris* DC. é encontrada principalmente no sul do Brasil e destaca-se na pesquisa por novos compostos que possam substituir os antimicrobianos e o antioxidantes sintéticos que são atualmente utilizados.

Diante disso, o objetivo deste estudo foi determinar a composição química do OE das folhas de *M. palustris*, bem como avaliar sua atividade antimicrobiana e determinar o potencial antioxidante.

Material e Métodos

Coleta, secagem e identificação da planta:

As folhas de *M. palustris* foram coletadas entre dezembro de 2017 e fevereiro de 2018, no Parque Ecológico Paulo Gorski, localizado em Cascavel, Paraná, Brasil (24°57'51.61"S e 53°26'14.80"O). Uma exsicata da planta foi levada ao Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNOP) para identificação botânica e registro do *voucher*, sob o número UNOP 8915. Após as coletas, as folhas foram secas a 40 °C e moídas em moinho de facas tipo *willye*, com membrana 0,42 mm de granulometria e, posteriormente, o pó obtido foi armazenado em frasco de vidro fechado ao abrigo da luz, em temperatura ambiente até a extração do óleo essencial (WEBER et al., 2014).

Extração do Óleo essencial:

Para a extração do óleo essencial 140 g do material vegetal foi adicionado a 1,4 L de água destilada, de acordo com WEBER et al. (2014). A solução foi colocada em aparelho clewenger seguindo a técnica de hidrodestilação por aproximadamente 5 horas. A porcentagem de rendimento do óleo essencial (%) foi verificada através da equação $\% = \frac{OE(w)}{VM(w)} \times 100$, onde OE é o óleo essencial extraído e VM é massa vegetal seca e moída. O óleo extraído foi armazenado em freezer a 4 °C até o momento da utilização.

Cromatografia de gasosa acoplada à Espectrometria de Massas GC-MS:

As análises dos compostos do óleo essencial de *M. palustris* foram realizadas a partir do sistema Thermo-Finnigan CG-EM. A separação dos compostos foi realizada utilizando GC FOCUS (*Thermo Electron*), acoplado a um espectrômetro de massas DSQ II (*Thermo Electron*) e um injetor automático TriPlus (*Thermo Electron*), utilizando uma coluna capilar de sílica fundida HP-5ms (30m comprimento, 0,25 e 0,25 um ID do filme; composição 5% fenil-95% de dimetilpolissiloxano). A temperatura do injetor foi de 250 °C. A amostra e os padrões de alcano C7-C28 foram injetados em uma razão de divisão 1:25. A programação da temperatura utilizada foi de 50° C mantida por 2 min, um aumento de temperatura para 180° C na proporção de 2° C min⁻¹, seguido por um aumento para 290° C na proporção de 5° C min⁻¹. A interface entre o GC e a MS foi mantida a 270° C e a temperatura da fonte de ionização do espectrometro de massa foi de 250° C. A identificação dos compostos foi realizada comparando seus tempos de retenção com os tempos de retenção obtidos da literatura e seus índices de retenção (ADAMS, 2007; BABUSHOK et al., 2011; YU et al., 2007).

Microrganismos utilizados e preparo do inoculo

A atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. palustris* foi avaliada seguindo a metodologia proposta por SCUR et al. (2014) com modificações. Os microrganismos utilizados são das coleções *American Type Culture Collection* (ATCC) e *Cefar Diagnóstica* (CCD), sendo as bactérias Gram positivas: *Bacillus subtilis* (CCD-04), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *S. epidermidis* (ATCC 12228); Gram negativas: *Aeromonas hydrophila* (ATCC 7966), *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Salmonella* Enteritidis (ATCC 13076), *Salmonella* Galinarum (ATCC 1138), *Salmonella* Heidelberg (ATCC), *Salmonella* Typhimurium (ATCC 14028), *Shigella flexeri* (ATCC 12022) e também a levedura *Candida albicans* (ATCC 12031). Os microrganismos foram recuperados em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI), durante 24 horas a 36 °C, em seguida, semeado em placa de petri contendo ágar Muller-Hinton (MH) e incubados durante 24 horas a 36 °C. Para realização dos experimentos, a concentração dos microrganismos foi ajustada em solução salina 0,85% para 1×10⁵ UFC.mL⁻¹ para bactérias e 1×10⁶ UFC.mL⁻¹ para levedura *C. albicans*.

Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração Inibitória Mínima (CIM) foi realizada pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com SCUR et al. (2014). O óleo essencial foi

solubilizado em metanol (P.A), filtrado com membrana filtrante e diluído em caldo MH para bactérias e em Roswell Park Memorial Institute (RPMI-1640) para a levedura *C. albicans*. Na placa de microdiluição de 96 poços foram dispensados 150 µL de MHB ou RPMI-1640 caldo, e em seguida, diluições seriadas do óleo essencial foram realizadas nas concentrações de 7000-3,41 µg/mL. Por fim, 10 µL do inóculo foram adicionados a cada poço e incubados a 36 °C por 24 horas. Para o controle positivo foram utilizados antibiótico comercial Gentamicina (200 mg/mL) e o antifúngico comercial Nistadina (200 mg/mL). Para comprovar a viabilidade do microrganismo, um controle negativo foi feito, dispensando no poço apenas 150 µL MHB ou RPMI-1640 e 10 µL do inóculo. Para interpretação dos resultados, foi utilizado 25 µL de Cloreto de Trifeniltetrazólio (TTC) a 0,5%, atuando como um revelador colorimétrico, os poços que apresentaram coloração vermelha obtiveram resposta negativa para inibição do crescimento bacteriano. A CIM foi realizada em triplicata sendo possível determinar a menor concentração do óleo essencial capaz de inibir o crescimento microbiano.

Determinação da Concentração Bactericida Mínima (CBM)/Concentração Fúngica Mínima (CFM)

Antes da adição do TTC 0,5% para determinação da CIM foi retirada uma alíquota de 2 µL de cada poço e transferida individualmente para placas de Petri contendo MH agar, que foram incubadas por 24 horas a 36° C. Para determinar CBM ou CFM, ou seja, a menor concentração do óleo essencial capaz de causar a morte do microrganismo, foi observado o crescimento de colônia microbiana na placa (SCUR, et al. 2014). A CIM e CBM do óleo essencial foram classificados de acordo com os critérios propostos por SARTORATTO et al. (2004). A atividade foi classificada em alta (<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). O ensaio foi realizado em triplicata.

Atividade Antioxidante

O teste da atividade antioxidante do óleo essencial foi realizado pelo método de redução do DPPH, proposto por RUFINO et al. (2007) e Weber et al. (2014). Foi realizada uma curva de calibração (0, 10, 20, 30, 40, 50 e 60 µM de DPPH) para obter a concentração do DPPH no meio após a reação com o óleo essencial, com a equação $y = 0,0113x - 0,0429$ ($R^2 = 0,995$), onde y é a concentração de DPPH e x a absorbância. Em seguida, alíquota de 0,1 mL do óleo essencial em diferentes concentrações (35, 75, 150, 300, 600 mg/mL) foram adicionados a 3,9 mL da solução de metanólica de DPPH (60 mM) e homogeneizadas em tubo agitador. Como controle negativo 0,1 mL de Metanol foi adicionado a 3,9 mL de DPPH, e como controle positivo, o antioxidante sintético BHT (butil-hidroxi-tolueno) foi utilizado em diferentes concentrações (1, 0,50, 0,25, 0,10 e 0,05 mg/mL). Os testes foram realizados no escuro, utilizando espectrofotômetro a 515 nm para as leituras de 1 min até a estabilização da absorbância. O metanol P.A. foi utilizado para calibração do aparelho. A porcentagem de sequestro de radicais livres (AA%) foi expressa pela equação: $AA\% = \frac{(A_0 - A_1)}{A_1} \times 100$, onde A_0 é a absorbância do controle negativo e A_1 é a absorbância da amostra. Para o cálculo do IC₅₀ (quantidade de substância antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial de DPPH), as concentrações do óleo essencial e BHT foram utilizadas para obter a equação da linha com R² maior que 0,80, e assim encontrar o valor de IC₅₀, a partir da

regressão linear. Os testes foram realizados em triplicada e expressos como média \pm desvio padrão.

Resultados e Discussão

Composição química do óleo essencial de *M. palustris*

Verificou-se que as folhas de *M. palustris* apresentaram rendimento de 0,35%. Dentre as espécies do gênero, *M. palustris* apresentou um baixo rendimento quando comparada com *M. sylvatica* (0,5%) (ROSA, et al., 2016) e *M. tumosa* com (0,54%) (SÁ, et al., 2012), mesmo assim este valor é considerado aceitável para um potencial cultivo industrial (HENRIQUES, et al., 1997).

A composição química do óleo essencial das folhas de *M. palustris* revelou a presença de 29 compostos (Tabela 1), representando 80,75% da área total da amostra analisadas. Os compostos majoritários encontrados no OE foram os sesquiterpenos α -Guaieno (25,89%), α -Bulneseno (13,39%), seguido de β -Selineno (4,76%).

Tabela 1. Composição química do óleo essencial das folhas de *M. palustris* obtido por hidrodestilação e analisado por CG-EM.

Nº	Composto	TR	Área (%)	IR	IR*
1	α -Cubebeno	25,35	0,18	1344	1345
2	α -Copaeno	26,57	0,77	1372	1376
3	β -Bourboneno	26,90	0,27	1379	1381
4	β -Elemeno	27,19	2,71	1386	1390
5	α -Gurjuneno	27,91	0,23	1403	1409
6	Cariofileno	28,41	3,38	1415	1419
7	β -Gurjuneno	28,84	0,44	1430	1431
8	α -Guaiaeno**	29,16	25,89	1433	1437
9	α -Humuleno	29,90	0,65	1450	1453
10	Aromadendreno	30,08	0,30	1455	1460
11	γ -Muuroleno	30,75	1,30	1471	1476
12	Germacreno D	30,98	3,13	1476	1480
13	β -Selineno**	31,29	4,76	1484	1486
14	Viridifloreno	31,40	0,97	1486	1492
15	α -Selineno	31,59	4,50	1491	1493
16	α -Muuroleno	31,74	1,09	1494	1498
17	α -Bulneseno**	31,87	13,39	1498	1504
18	γ -Cadineno	32,30	1,02	1508	1513
19	δ -Cadineno	32,53	3,04	1514	1514
20	cis-calameno	32,63	0,55	1517	1523
21	α -Calacoreno	33,40	0,47	1536	1540
22	Espatulenol	34,78	4,52	1571	1576
23	Óxido de Cariofileno	34,96	1,12	1575	1581
24	Globulol	35,13	1,25	1579	1582
25	epi-Globulol	35,45	0,59	1587	1585
26	iso-espatulenol	36,94	0,83	1626	1633
27	epi- α -cadinol	37,32	0,52	1636	1638
28	epi- α -muurolol	37,39	0,91	1638	1641
29	α -Cadinol	37,81	1,97	1649	1652

30	NI	10,10
Total de Compostos		90.85 80,75%

**Compostos majoritários; NI: Compostos Não Identificados; TR: Tempo de Retenção; IR: Índice de Retenção; IR*: Índice de Retenção encontrado na literatura.

Dentro da família Myrtaceae, o gênero *Myrcia* é o mais estudado, apresentando cerca 16 espécies analisadas, e assim como em *M. palustris*, a presença de sesquiterpenos foi predominante em 15 delas, sendo que em *M. acuminatissima* e *M. bombycina* o conteúdo de monoterpenos foi ligeiramente maior que o de sesquiterpenos (CERQUEIRA, et al., 2009). O OE de *M. oblongata* apresenta como principal composto o sesquiterpeno, o óxido de cariofileno também identificado no OE de *M. palustris*, mas em menor quantidade (SANTANA et al., 2018). O terceiro principal composto também sesquiterpeno, β -Selineno, já foi identificado em outras espécies do gênero como *M. olingatha*, *M. lajeana* e *M. hatschbachii* (LIMBERGER et al., 2014). O composto majoritário encontrado, α -Guaieno, não foi identificado em nenhuma outra espécie do gênero *Myrcia*.

Observa-se então que o perfil químico do OE de *M. palustris* diferiu em quantidade, número de compostos e conformação molecular entre as espécies do mesmo gênero. Essa variação pode estar relacionada a condições ambientais distintas, tais como: solo, temperatura, irrigação, forma e época do plantio, intensidade das radiações solares, interações com polinizadores e predadores, etc (NASCIMENTO et al., 2007; SCHERER et al., 2009). Ademais, técnicas de extração e proveniência do material da planta (fresco ou seco) também podem interferir nos compostos químicos dos óleos essenciais, influenciando diretamente em suas propriedades funcionais, como atividades antioxidante e antimicrobiana (GOBBO-NETO; LOPES, 2007; CERQUEIRA et al., 2009).

Atividade antimicrobiana

Os resultados de CIM e CBM do óleo essencial de *M. palustris* variaram de 1750 a 218,75 $\mu\text{g/mL}$ (tabela 2). Com exceção de *S. epidermidis* foi observada atividade para as outras cepas Gram-positivas, o melhor resultado apresentado foi para *B. subtilis* e *S. aureus* com CIM e CBM de 437,5 e 875 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, considerado uma atividade moderada. Para *E. faecalis* o OE apresentou atividade antimicrobiana de baixa a moderada com CIM de 437,5 e CBM de 1750 $\mu\text{g/mL}$. Dentre as bactérias Gram-negativas, foi observada atividade inibitória moderada do OE contra *S. flexeri*, com CIM de 218,75 $\mu\text{g/mL}$. Para a levedura *C. albicans* o OE não apresentou atividade antimicrobiana (SARTORATTO et al., 2004; PANDINI et al., 2015).

Apesar de não ter sido encontrado nenhum relato da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *M. palustris* na literatura, foi observado dentro do gênero *Myrcia* espécies com propriedades antimicrobianas, como *M. myrtifolia* (CERQUEIRA et al., 2007), *M. aff fosteri*, *M. ovata* (TENÓRIO et al., 2011), *M. tomentosa* (SÁ et al., 2012) e *M. oblongata* (SANTANA et al., 2018).

A atividade antimicrobiana do OE de *M. palustris* pode ser devido a seus compostos majoritários α -Guaieno, α -Bulneseno e β -Selineno. Esses compostos são sesquiterpenos e já é bem estabelecido o fato de que muitos terpenóides quando presentes em OEs apresentem efeitos antimicrobianos. Ademais, deve-se levar em consideração que OE é uma mistura complexa e ocorre interação

sinérgica de todos os compostos, contribuindo com sua eficiência (CLAESON et al., 1992; JIMENEZ et al., 2012; LIN et al., 2012).

Observou-se que as bactérias Gram-positivas foram mais suscetíveis ao OE de *M. palustris* do que as Gram-negativas. Resultado semelhante foi verificado para o OE das espécies *M. tomentosa* e *M. oblongata* que apresentaram atividade antimicrobiana moderada para *B. subtilis*, *S. aureus* e *E. faecalis* (SÁ et al., 2012; SANTANA et al., 2018). Diversos estudos já demonstraram que bactérias Gram-positivas são mais suscetíveis aos OEs quando comparadas as Gram-negativas, provavelmente devido à presença de compostos lipofílicos nos OEs, que promovem dano direto na membrana celular, causando seu rompimento. Além disso, afeta também a manutenção do pH e o bloqueio de enzimas bacterianas (LANG; BAUCHBAUER, 2011; XAVIER et al., 2016).

Para *C. albicans* o OE não apresentou atividade, ao buscar resultados semelhantes na literatura encontramos o OE da espécie *M. oblongata*, que apresentou atividade considerada baixa, com CIM e CFM de 3500 µg/mL (SANTANA et al., 2018). A baixa eficiência do OE para leveduras pode ser justificada, pois os seus constituintes químicos do OE apresentar baixa hidrofobicidade, e por isso não conseguem interagir com os componentes lipídicos, sendo impedidos de penetrar na célula (CASTRO e LIMA, 2010).

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) do óleo essencial das folhas de *M. palustris*

Microrganismos	Óleo Essencial
	CIM/CBM (µg/mL)
Gram (+)	
<i>B. subtilis</i>	437,5/875
<i>E. faecalis</i>	437,5/1750
<i>S. aureus</i>	437,5/875
<i>S. epidermidis</i>	NA/NA
Gram (-)	
<i>A. hydrophila</i>	NA/NA
<i>E. coli</i>	NA/NA
<i>K. pneumoniae</i>	NA/NA
<i>P. aeruginosa</i>	NA/NA
<i>P. mirabilis</i>	NA/NA
<i>S. Enteritidis</i>	NA/NA
<i>S. flexeri</i>	218,75/NA
<i>S. Gallinarum</i>	NA/NA
<i>S. Heidelberg</i>	NA/NA
<i>S. Typhimurium</i>	NA/NA
Levedura	
<i>C. albicans</i>	NA/NA

NA: sem atividade

A redução dos radicais livres pelo OE foi dependente das concentrações utilizadas, sendo o melhor resultado expresso na concentração de 600 mg/mL, apresentando a maior porcentagem de sequestro de DPPH de 82,81% e valor de IC₅₀ 255,97±3,2 (Tabela 3 e 4). Esse valor de IC₅₀ foi considerado

estatisticamente diferente do valor encontrado para o BHT, com IC_{50} $0,28 \pm 0,0$ mg/mL (teste $\chi^2 = 252,8$; GL=1, $p < 0,05$). Isso demonstra a necessidade de utilizar uma maior concentração de OE para reduzir a mesma quantidade de radicais livres DPPH quando comparado com o produto sintético comercial (BHT).

Tabela 3: Valor de IC_{50} pelo ensaio do DPPH do óleo essencial das folhas de *Myrcia palustris*.

Amostra	IC_{50} (mg/mL)	Equação	R^2
BHT	$0,28 \pm 0,0$	$y = 76,571x + 28,47$	0,91
Óleo essencial de <i>M. palustris</i>	$255,97 \pm 3,2$	$y = 0,104x + 23,37$	0,96

média \pm desvio padrão.

Tabela 4: Porcentagem de sequestro de radicais DPPH do óleo essencial das folhas de *M. palustris*.

Concentração (mg/mL)	Controle BHT	Óleo essencial de <i>M. palustris</i>
600	-	$82,81 \pm 1,0$
300	-	$59,28 \pm 0,0$
150	-	$42,75 \pm 0,1$
75	-	$31,18 \pm 0,5$
35	-	$21,49 \pm 0,0$
1	$98,75 \pm 0,2$	-
0,50	$77,23 \pm 0,1$	-
0,25	$53,48 \pm 1,3$	-
0,10	$38,03 \pm 0,2$	-
0,05	$20,35 \pm 3,0$	-

(-) Não testado; média \pm desvio padrão.

Estudos sobre potencial antioxidante com espécies do gênero *Myrcia* apresentaram atividade antioxidante moderada, como é o caso de *M. bella*, *M. tomentosa*, *M. lingua*, *M. splendens* (MAGINA et al., 2010) e *M. oblongata* (SANTANA et al., 2018). Já com relação à espécie *M. palustris* não foram encontrados na literatura dados sobre atividade antioxidante de seu OE.

Em suma, plantas da família Myrtaceae apresenta grande capacidade em acumular substâncias fenólicas, já relatados na literatura como capazes de inibir os radicais livres presente no meio, sendo mais potentes que vitamina C, vitamina E e carotenoides (RICE-EVANS et al., 1996; MORAIS et al., 2009; TAKAO et al., 2015). A atividade antioxidante atribuída aos compostos fenólicos está relacionada às suas propriedades redutoras e com a sua estrutura química, as quais desempenham importante papel no sequestro dos radicais livres, podendo agir na fase inicial e também na propagação do processo oxidativo (SOUZA et al., 2007). Porém, alguns óleos essenciais apresentam comportamento antioxidante, conforme a estrutura química de seus compostos como, por exemplo, os terpenos que estão presentes em grandes quantidades no OE de *M. palustris* (AMORATI et al., 2013).

É esperado que esses resultados auxiliem para futuros estudos sobre atividades biológicas deste óleo essencial. Ressaltando a importância de maiores estudos, principalmente referente a seus compostos, isolando-os e testando-os separadamente para então futura utilização em diversos setores industriais.

Conclusão

A composição química do OE de *M. palustris* revelou a presença de 29 compostos, os principais identificados são das classes dos sesquiterpetos: α -Guaieno (25,89%), α -Bulneseno (13,39%), seguido de β -Selineno (4,76%). Sendo o composto majoritário α -Guaieno não encontrado em nenhuma outra espécie do gênero.

O OE de *M. palustris* apresentou atividade antimicrobiana para todas as cepas Gram-positivas testadas (*B. subtilis*, *E. faecalis* e *S. aureus*) com exceção de *S. epidermidis*. Em relação às Gram-negativas apresentou atividade inibitória para *S. flexneri*.

Foi demonstrada sua capacidade de sequestrar os radicais livres (DPPH) apresentando atividade antioxidante de até 82,81%.

Referências

- ADAMS, R. P. Identificação de componentes de óleos essenciais por cromatografia gasosa /espectrometria de massa. Londres: Allured Pub. Corp, 2007. 804 p.
- ALMEIDA, M. P.; ROMERO, R. B.; ROMERO, A. L.; CRESPIAN, E. R. Explorando a química e a atividade antifúngica de óleos essenciais: uma proposta de projeto para a educação básica. Latin American Journal of Science Education. 2015.
- AMORATI, R.; FOTI, M. C.; VALGIMIGLI, L. Antioxidant activity of essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.61, p.10835-10847, 2013.
- BABUSHOK, V. I.; ZENKEVICH, I. G. Retention indices for most Frequently reported essential oil compounds in GC. Chromatographia, v.69, n.3/4, 2008.
- BECKER, N. A.; VOLCÃO, L. M.; CAMARGO, T. M.; FREITAG, R. A.; RIBEIRO, G. A. Biological properties of *Eugenia uniflora* L. essential oil: phytochemistry composition and antimicrobial activity against gram negative bacteria. Vitalles - Revista de Ciências da Saúde v.1, p.22-30, 2017.
- BOZIN, B.; MIMICA-DUKIC, N.; SAMOJLIK, I.; JOVIN, E. Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and Sage (*Rosmarinuns officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v.55, n.19, p.7879-7885, 2007.
- CASTRO, R. D. e LIMA, E. O. Atividade antifúngica *in vitro* do óleo essencial de *Eucalyptus globulus* L. sobre *Candida* spp. Revista Odontológica, v.39, n.3, p.179-184, 2010.
- CERQUEIRA, M. D.; MARQUES, E. J.; MARTINS, D.; ROQUE, F. N.; CRUZ, F. G. Variação sazonal da composição do óleo essencial de *Myrcia salzmannii* Berg. (Myrtaceae). Química Nova, v.32, n.6, p.1544-1548, 2009.
- CERQUEIRA, M. D.; SOUZA-NETA, L. C.; PASSOS, M. G. V. M.; LIMA, E. O.; ROQUE, N. F.; MARTINS, D.; GUEDES, M. L. S.; CRUZ, F. G. Seasonal variation and antimicrobial activity of *Myrcia myrtifolia* essential oils. Journal of the Brazilian Chemical Society, v.18, n.5, p.998-1003, 2007.
- CLAESON, P.; RADSTROM, P.; SKOLD, O.; NILSSON, A.; HOGLOUND, S. Bactericidal effect of the sesquiterpene T-Cadinol on *Staphylococcus aureus*. Phytotherapy Research, v.6, p.94-98, 1992.
- DEGÁSPARI, C. H. e WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. Visão Acadêmica, v.5, n.1, p.33-40, 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.
- GONÇALVES, J. H. T.; SANTOS, A. S.; MORAIS, H. A. Atividade antioxidante, compostos fenólicos totais e triagem fitoquímica de ervas condimentares desidratadas. Revista da Universidade Vale do Rio Verde, v. 13, n. 1, p. 486-497, 2015.

HENRIQUES, A. T.; SOBRAL, M.; BRIDI, R.; VÉRIN, P.; MENUT, C.; LAMATY, G.; BRESSIÉRE, M. Essential oils from Five southern Brazilian species of *Myrcia* (Myrtaceae). *Journal of Essential Oil Research*, v.9, p.13-18, 1997.

JIMÉNEZ, D., ARAQUE, M.; ROJAS, L.; CORDERO, A.; BRICEÑO, B. Volatile components and 404 antibacterial activity from *Myrcia splendens* (Sw.) DC. shoots. *Rev. Fac. Farm*, v.54, p.7-11, 2012.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, v.27, p.13-39, 2011.

LIMBERGER, R. P.; SOBRAL, M.; HENRIQUES, A. T. Óleos voláteis de espécies de *Myrcia* nativas do Rio Grande do Sul. *Química Nova*, v.27, n.6, p.916-919, 2004.

LIN, J.; DOU, J.; XU, J.; AISA, H. A. Chemical Composition, antimicrobial and antitumor activities of the essential oils and crude extracts of *Euphorbia macrorrhiza*. *Molecules*, v.17, p.5030-5039, 2012.

MACHADO, B. F. M. T. e JUNIOR, A. F. Óleos essenciais: aspectos gerais e usos em terapias naturais. *Cadernos Acadêmicos*, v.3, n.2, p.105-127, 2011.

MAGINA, M. A.; GILIOLI, A.; MORESCO, H. H.; COLLA, G.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). *Latin American Journal of Pharmacy*, v.29, n.3, p.376-82, 2010.

MELO, P. S.; BERGAMASCHI, K. B.; TIVERON, A. P.; MASSARIOLI, A. P.; OLDONI, T. L. C.; ZANUS, M. C.; PEREIRA, G. E.; ALENCAR, S. M. Composição fenólica e atividade antioxidante de resíduos agroindustriais. *Ciência Rural*, v.41, n.6, p.1088-1093, 2011.

MIMICA-DUKIC, N.; BOZIN, B.; SOKOVIC, M.; SIMIN, N. Antimicrobial and antioxidant activities of *Melissa officinalis* L. (Lamiaceae) essential oil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.52, v.2489-2489, 2004.

MORAIS, S. M.; CAVALCANTI, E. S. B.; COSTA, S. M. O.; AGUIAR, L. A. Ação antioxidante de chás e condimentos de grande consumo no Brasil. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.19, n.1B, p.315-320, 2009.

NASCIMENTO, P. F. C.; NASCIMENTO, A. C.; RODRIGUES, C. S.; ANTONIOLLI, A. R.; SANTOS, P. O.; JUNIOR, A. M. B.; TRINDADE, R. C. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, n.1, p.108-113, 2007.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.2, p.301-307, 2008.

PACKER, J. F. e LUZ, M. M. S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, n.1, p.102-107, 2007.

PANDINI, J. A.; PINTO, F. G. S.; SCUR, M. C.; ALVES, L. F. A.; MARTINS, C. C. Antimicrobial, insecticidal, and antioxidant activity of essential oil and extracts of *Guarea kunthiana* A. Juss. Journal of Medicinal Plant Research, v.9, n.3, p.48-55, 2015.

RICE-EVANS, C. A.; MILLER, N. J.; PAGANGA, G. Structure-antioxidant activity relationships of flavonoides and phenolic acids. Free Radical Biology & Medicine, v.20, n.7, p.933-956, 1996.

ROSA, C. S.; VERAS, K. S.; SILVA, P. R.; LOPES NETO, J. J.; CARDOSO, H. L. M.; ALVES, L. P. L.; BRITO, M. C. A.; AMARAL, F. M. M.; MAIA, J. G. S.; MONTEIRO, O. S.; MORAES, D. F. C. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v.18, n.1, p.19-26, 2016.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre DPPH. Embrapa, v.127, p.1-4, 2007.

RUSSO, E. M.; REICHEL, A. A.; DE-SA, J. R.; FURLANETTO, R. P.; MOISES, R. C.; KASAMATSU, T. S.; CHACRA, A. R. Clinical trial of *Myrcia uniflora* and *Bauhinia forficata* leaf extracts in normal and diabetic patients. Brazilian Journal of Medical and Biology Research, v.23, n.1, p.11-20, 1990.

SÁ, F. A. S.; BORGES, L. L.; PAULA, J. A. M.; SAMPAIO, B. L.; FERRI, P. H.; PAULA, J. R. Essential oils in aerial parts of *Myrcia tomentosa*: composition and variability. Brazilian Journal of Pharmacognosy, v.22, n.6, p.1233-1240, 2012.

SANTANA, C. B.; SOUZA, J. G. L.; CORACINI, M. D. A.; WALERIUS, A. H.; SOARES, V. D.; COSTA, W. F.; PINTO, F. G. S. Chemical composition of essential oil from *Myrcia oblongata* DC and potencial antimicrobial, antioxidant and acaricidal activity against *Dermanyssus gallinae* (DEGEER, 1778). Bioscience Journal, v.34, n.4, p.996-1009, 2018.

SARTORATTO, A.; MACHADO, A. L. M.; DELARME, C.; FIGUEIRA, G. M.; DUARTE, M. C. T.; REHDER, V. L. G. Composition and antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants used in Brazil. Brazilian Journal of Microbiology, v.35, p.275-280, 2004.

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

SCUR, M. C.; PINTO, F. G. S.; BONA, E. A. M.; WEBER, L. D.; ALVES, L. F. A.; MOURA, A. C. Occurrence and antimicrobial resistance of *Salmonella* serotypes isolates recovered from poultry of Western Paraná, Brazil. African Journal of Agricultural Research, v.9, n.9, p.823-830, 2014.

SILVA, A. C.; IACUZIO, R.; CÂNDIDO, T. J. S.; RODRIGUES, M. X.; SILVA, N. C. C. Resistência antimicrobiana de *Salmonella* spp., *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* isolados de carcaças de frangos: resistência a antibióticos e óleos

essenciais. Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável (RBAS), v.8, n.1, p.95-103, 2018.

SILVA, J. G.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S.; SIQUEIRA-JUNIOR, J. P.; PEREIRA, J. V.; PEREIRA, M. S. V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.17, n.4, p.572-577, 2007.

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

SOUZA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. Química Nova, v.30, n.2, p.351-355, 2007.

SOUZA, T. J. T.; APEL, M. A.; BORDIGNON, S.; MATZENBACHER, N. I.; ZUANAZZI, A. S.; HENRIQUES, A. T. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.17, n.3, p.368-372, 2007.

STEFANELLO, M. E. A.; PASCOAL, A. C. R. F.; SALVADOR, M. J. Essential Oils from Neotropical Myrtaceae: Chemical diversity and biological properties. Chemistry & Biodiversity, v.8, n.1, p.73-94, 2011.

TAKAO, L. K.; IMATOMI, M.; GUALTIERI, S. C. J. Antioxidant activity and phenolic content of leaf infusions of Myrtaceae species from Cerrado (Brazilian Savanna). Brazilian Journal of Biology, v.75, n.4, p.948-952, 2015.

WEBER, L. D.; PINTO, F. G. S.; SCUR, M. C.; SOUZA, J. G. K.; COSTA, W. F.; LEITE, C. W. Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activity of essential oil and various plant extract from *Prunus myrtifolia* (L.) Urb. African Journal of Agricultural Research, v.9, n.9, p.846-853, 2014.

XAVIER, M. N.; ALVES, J. M.; CARNEIRO, N. S.; SOUCHIE, E. L.; SILVA, E. A. J.; MARTINS, C. H. G.; AMBROSIO, M. A. L. V.; EGEA, M. B.; ALVES, C. C. F.; MIRANDA, M. L. D. Composição química do óleo essencial de *Cardiopetalum calophyllum* Schltdl. (Annonaceae) e suas atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica. Revista Virtual de Química, 2016.

YU, J. Q.; LIAO, Z. X.; CAI, X. Q.; LEI, J. C.; ZOU, G. L. Composition, antimicrobial activity and cytotoxicity of essential oils from *Aristolochia mollissima*. Environmental Toxicology and Pharmacology, v.23, p.162-167, 2007.

