



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**AVALIAÇÃO DOS CONSTITUINTES FENÓLICOS E VOLÁTEIS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg
(GABIROBA).**

EDMILSON DE OLIVEIRA ROCHA

UBERLÂNDIA – MG

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

AVALIAÇÃO DOS CONSTITUINTES FENÓLICOS E VOLÁTEIS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE *Campomanesia pubescens* (DC.)O. Berg

EDMILSON DE OLIVEIRA ROCHA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação do Instituto de Química, da Universidade Federal de Uberlândia, como requisito parcial para a obtenção do título de MESTRE EM QUÍMICA.

Orientação: Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes

Coorientação: Prof. Dr. Roberto Chang

Uberlândia – MG

2011



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
Instituto de Química
Programa de Pós Graduação em Química – MESTRADO
E-mail: cpqquimica@ufu.br - Fone: 3239-4385

ALUNO(A): EDMILSON DE OLIVEIRA ROCHA

NÚMERO DE MATRÍCULA: 100308

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

***“Avaliação dos constituintes fenólicos e voláteis, atividade
antioxidante e antimicrobiana de *Campomanesia
Pubescens* O. Berg”***

ORIENTADOR(A):

PROF. DR. SÉRGIO ANTÔNIO LEMOS DE MORAIS

A Dissertação foi **APROVADA** em apresentação pública realizada na Sala 206 do Bloco 1B, no Campus Santa Mônica, no dia 29 de julho de 2011, às 14h00 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA:

Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes
(IQUFU)

Prof. Dr. Antonio Otavio de Toledo Patrocínio
(IQUFU)

Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins
(UNIFRAN)

Uberlândia, 29 de julho de 2011.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar força, coragem e discernimento para superar os obstáculos deste trabalho.

A minha esposa Ana Maria e o meu filho Túlio e a Kimberly pelo carinho e incentivo constantes.

Ao Professor Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes, pela confiança e firme orientação em todos os momentos.

Ao Professor Dr. Roberto Chang por sua coorientação.

Ao Professor Dr. Evandro Afonso do Nascimento, por suas valiosas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Instituto de Química pela oportunidade concedida para realização deste trabalho.

Ao Professor e técnico Edmar Eustáquio de Souza, pela amizade e incentivo.

Aos colegas do laboratório de pesquisa pelo companheirismo e apoio em tantos momentos.

Ao Doutorando Luis Carlos Scalon Cunha, pela colaboração direta na produção deste trabalho.

Aos técnicos dos laboratórios de ensino, que me incentivaram e apoiaram, dando força nos momentos mais difíceis.

Ao professor Dr. Carlos Henrique Gomes Martins do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca - LaPeMa, pela realização das análises de atividade antimicrobiana.

A todas as pessoas que diretamente e indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
1.1 Cerrado brasileiro.....	13
1.2 Compostos fenólicos.....	14
1.2.1 Flavonóides.....	15
1.2.2 Antioxidantes.....	18
1.3 Óleos essenciais.....	20
1.4 Atividade antimicrobiana.....	21
1.4.1 Cavidade bucal e microbiologia bucal.....	22
1.5 Gênero <i>Campomanesia</i>	23
1.6 A espécie <i>Campomanesia pubescens</i> (DC) O. Berg.....	26
1.6.1 Estudos referentes à espécie <i>Campomanesia pubescens</i> (DC) O. Berg.....	28
2. Objetivo.....	30
3. Metodologia.....	31
3.1 Coleta da espécie.....	32
3.2 Análise química.....	33
3.2.1 Preparo das amostras.....	33
3.3 Extração do óleo essencial por hidrodestilação.....	34
3.4 Extração etanólica para determinação de Fenóis totais e proantocianidinas.....	35
3.4.1 Determinação de fenóis totais (FT), pelo método de Folin-Ciocalteu.....	36
3.4.2 Determinação de taninos condensados (proantocianidinas).....	36
3.4.3 Análise quantitativa da atividade antioxidante (AA).....	37
3.5 Separação identificação de compostos voláteis.....	39
3.6 Análise biológica do óleo essencial.....	39

4. Resultados e Discussões.....	40
4.1 Teor do óleo essencial.....	40
4.2 Extração etanólica.....	41
4.3 Determinação do teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu	41
4.4 Determinação de taninos condensados (proantocianidinas).....	44
4.5 Análise quantitativa da atividade antioxidante.....	45
4.6 Identificação dos constituintes voláteis por CG-EM.....	52
4.7 Atividade antimicrobiana.....	60
5. Conclusões.....	64
6. Referências.....	65
7. Apêndice.....	75

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Espécies de gabioba catalogadas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.....	24
Tabela 2 - Teores de umidade nas amostras da raiz, caule, folha e fruto.....	40
Tabela 3 - Massas e porcentagens dos extratos brutos da raiz, caule, folha e fruto da gabioba.....	41
Tabela 4 - Teor de fenóis totais (mg de EAG/g de extrato etanólico).....	42
Tabela 5 - Teor de proantocianidinas (mg de ECAT/g de extrato etanólico).....	44
Tabela 6 - Valores de CE ₅₀ do extrato da raiz, caule, folha e fruto de <i>C. pubescens</i>	50
Tabela 7 - Valores de atividade antioxidante CE ₅₀ de outras plantas em µg/mL.....	51
Tabela 8 - Valores de atividade antioxidante CE ₅₀ de frutos em µg/mL.....	51
Tabela 9 - Composição do óleo essencial de <i>C. pubescens</i>	52
Tabela 10 - Compostos voláteis majoritários presentes na folha, fruto, caule e raiz.....	59
Tabela 11 - Resultados das concentrações inibitórias mínimas para os óleos essenciais da gabioba.....	60
Tabela 12 – Microrganismos, procedência, morfotipos e meios de culturas utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana.....	75

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura básica dos flavonóides.....	15
Figura 2 - Estruturas químicas dos flavonóides.....	16
Figura 3 - Estrutura do flavan-3-óis (a) e a condensação de duas moléculas de flavan-3-óis originando uma proantocianidina (b).....	17
Figura 4 - Algumas estruturas químicas de antocianidinas e espécies de origem.....	18
Figura 5 – Fotografia de <i>Campomanesia pubescens</i> , no cerrado do município de Uberlândia – MG.....	26
Figura 6 – Fotografia do fruto de <i>Campomanesia pubescens</i> , no cerrado do município de Uberlândia-MG.....	27
Figura 7 – Fluxograma de trabalho.....	31
Figura 8 - Exsicatas de <i>Campomanesia pubescens</i> (DC.) O. Berg, Herbarium Uberlandense.....	32
Figura 9 - Aparelho de Clevenger para hidrodestilação.....	34
Figura 10 - Montagem para extração contínua utilizando o aparelho de Soxhlet....	35
Figura 11 - Curva de Calibração do ácido gálico.....	42
Figura 12 - Curva de calibração da catequina.....	44
Figura 13 - Curva de calibração do DPPH.....	45
Figura 14 - Comportamento cinético do extrato metanólico da raiz frente ao DPPH.....	46
Figura 15 - Gráfico de consumo de DPPH em função das diferentes concentrações da raiz.....	46
Figura 16 - Comportamento cinético do extrato metanólico do caule frente ao DPPH.....	47
Figura 17 - Gráfico do consumo de DPPH em função das diferentes concentrações do caule.....	47
Figura 18 - Comportamento cinético do extrato metanólico da folha frente ao DPPH.....	48
Figura 19 - Gráfico do consumo de DPPH em função das diferentes concentrações da folha.....	48

Figura 20 - Comportamento cinético do extrato metanólico do fruto frente ao DPPH.....	48
Figura 21 - Gráfico do consumo de DPPH em função das diferentes concentrações do fruto.....	49
Figura 22 - Fórmula estrutural dos compostos majoritários encontrados na folha...	54
Figura 23 - Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial da folha de <i>C. pubescens</i>	55
Figura 24 - Fórmula estrutural dos compostos majoritários encontrados no fruto...	56
Figura 25 - Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial do fruto de <i>C. pubescens</i>	56
Figura 26 - Fórmula estrutural dos compostos majoritários encontrados no caule...	57
Figura 27 - Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial do caule de <i>C. pubescens</i>	57
Figura 28 - Fórmula estrutural dos compostos majoritários encontrados na raiz....	58
Figura 29 - Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial da raiz de <i>C. pubescens</i>	58
Figura 30 – Esquema representativo das etapas desenvolvidas para o método de microdiluição.....	81
Figura 31 - Microplacas com soluções dos extratos testadas frente a <i>S. mutans</i> revelada com resazurina.....	82

Lista das principais abreviações e símbolos

AA – Atividade antioxidante

ATCC – (do inglês) “*American Type Culture Collection*”

BHT- Butil-hidroxitolueno

CE₅₀ – Concentração média efetiva.

CG-EM – Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas.

CIM – Concentração inibitória mínima.

CLSI – (do inglês) “*Clinical and Laboratory Standards Institute*”

DHA – Ácido desidroascórbico.

DMSO – Dimetilsulfóxido

DPPH – 2,2–difetil-1-picrilhidrazila.

EAG – Equivalentes de ácido gálico.

ECAT – Equivalentes de catequina.

EROs – Espécies reativas de oxigênio.

FT – Fenóis Totais.

KI – Índice de Kovats.

LaPeMa – Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada.

MM – Massa molecular.

TIC – Total de íons cromatográfico.

TSB – (do inglês) “*Trypticase soy broth*”.

UFC – Unidades Formadoras de Colônia.

UV-VIS – Ultravioleta visível.

RESUMO

Campomanesia pubescens (DC.) O. Berg, também conhecida como gabioba pilosa, pertence à família Myrtaceae. Este gênero apresenta 25 espécies distribuídas do México à Argentina, e 15 delas são nativas do Brasil, e podem ser encontradas nos estados da Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul e no Tocantins. O objetivo deste trabalho foi avaliar o teor de compostos fenólicos, identificar os constituintes voláteis (óleo essencial), determinar a atividade antioxidante e antimicrobiana de partes da planta (raiz, caule, folha e fruto). Os teores de compostos fenólicos totais determinados pelo método de Folin-Ciocalteu, foi de 19,3 para a raiz, 114,0 caule, 115,0 folha e 31,0 para o fruto, expressos em equivalente de ácido gálico / grama de amostra. O teor de proantocianidinas foi de 1,9 para a raiz, 7,6 caule, 17,3 folha e 2,1 para o fruto em equivalentes de catequina/grama de amostra. A atividade antioxidante foi avaliada pelo o método de seqüestro de radical livre 2,2–difetil-1-picrilhidrazil (DPPH). Os valores de CE_{50} encontrados para os extratos metanólicos foram: fruto 56,6 $\mu\text{g/mL}$, folha 6,6 $\mu\text{g/mL}$, caule 7,4 $\mu\text{g/mL}$ e para a raiz 8,0 $\mu\text{g/mL}$. Os resultados mostraram que *C. pubescens* é uma boa fonte natural de antioxidantes. Os óleos essenciais foram analisados por CG/EM. Os principais compostos identificados na raiz foram Bicyclogermacreno, Epatulenol, Germacreno-D e Viridiflorol, ao passo que, para o óleo essencial do caule, foram identificados como principais o Eucaliptol, Epatulenol e Bicyclogermacreno. O óleo essencial dos frutos contém aproximadamente 80% de monoterpenos, destacando-se Limoneno e Eucaliptol. O óleo essencial das folhas é constituído por 55,36% de sesquiterpenos e os componentes principais são Bicyclogermacreno, Germacreno-D e Eucaliptol. Os óleos essenciais apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positiva e Gram-negativa testadas, e estes resultados podem levar a uma alternativa para o controle de bactérias em doenças bucais.

ABSTRACT

Campomanesia pubescens (DC) O. Berg, better known as “gabirola pilosa” belongs to the Myrtaceae family. The genus has 25 species distributed from Mexico to Argentina, and 15 species are natives of Brazil, and can be found in Bahia, Espírito Santo, Minas Gerais, São Paulo, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul and Tocantins states. The objective of this study was to evaluate the content of phenolic compounds, identify volatile constituents (essential oils), and estimate antioxidant and antimicrobial activities of plant parts (root, stem, leaf and fruit). The levels of total phenolics determined by Folin-Ciocalteu method for the root was 19.3, stem 114.0, leaf 115.0 and fruit 31.0, expressed in Galic acid equivalents (GAC) per gram of sample. The proanthocyanidins content was 1.9 for the root, stem 7.6, leaf 17.3 and fruit 2.1, in catechin equivalents per gram of sample. The antioxidant activity was evaluated by free radical scavenging method using 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH). The CE₅₀ results found for methanolic extracts were: fruit 56.6 µg/mL, leaf 6.6 µg/mL, stem 7.4 µg/mL and root 8.0 µg/mL. The results showed that *C. pubescens* is a good source of natural antioxidants. The essential oils were analyzed by GC/MS. The major compounds identified in root were Bicyclogermacrene, Spathulenol, Germacrene-D and Viridiflorol; while that for the essential oil of the stem were identified as the main Eucalyptol, Spathulenol and Bicyclogermacrene. In the shoots of *Campomanesia pubescens* fruit whose essential oil contains approximately 80% monoterpenes, especially Limonene and Eucalyptol. The essential oil of leaves is composed by 55.36% of sesquiterpenes and the major components are Bicyclogermacrene, Germacrene-D and Eucalyptol. The essential oils showed antimicrobial activity against Gram-positive and Gram-negative tested; these results can lead to an alternative control of bacteria in oral diseases.

1. Introdução

1.1 Cerrado brasileiro

Atualmente os problemas ambientais ultrapassam fronteiras, não diferenciando sua localização geográfica. Uma catástrofe ambiental, seja causada pela natureza ou pelo ser humano, irá ocasionar mudanças em vários países, como por exemplo, a demanda por alimentos. Isto porque, em uma economia globalizada, as safras agrícolas interferem mundialmente na sua oferta para a população mundial. Portanto, cada vez mais se intensificam as atividades agrícolas explorando até então áreas onde o ser humano ainda não tinha acesso. Diante deste contexto, se faz necessário cada vez mais compreender o ecossistema no qual uma sociedade está inserida, não só compreender sua existência, mas também o impacto que irá causar a sua ausência.

O cerrado é um dos ecossistemas do Brasil que está se reduzindo, devido à exploração feita pelo homem. Recentemente, esforços vêm sendo realizados para a manutenção e conservação dessas áreas, tendo em vista a importância da biodiversidade vegetal e da fauna nelas presentes (SILVA, 2006). A flora do cerrado possui diversas espécies frutíferas com grande potencial de utilização agrícola, que são tradicionalmente utilizadas pela população local como, por exemplo, a gabioba. Os frutos, em geral, são consumidos in natura ou na forma de sucos, licores, sorvetes, geléias e doces e o consumo aumenta paulatinamente devido ao valor nutritivo e aos efeitos terapêuticos. A utilização da polpa de frutas congeladas está em expansão nas indústrias de produtos lácteos (sorvetes, doces e outros) o que aumenta o interesse dos produtores e dos consumidores. Informações a respeito das características químicas e do valor nutricional dos frutos do cerrado são ferramentas importantes para avaliação do consumo e formulação de novos produtos (KUSKOSKI et al., 2006).

1.2 Compostos fenólicos

É crescente o interesse em substâncias que possuam propriedades antioxidantes, que são fornecidos ao organismo humano como alimentos ou como medicamentos preventivos específicos. Em plantas que possuem propriedades medicinais e atividade antioxidante, são relatadas a presença de polifenóis, especialmente ácidos fenólicos e flavonóides (IGNAT, 2011). Inúmeros estudos realizados com compostos fenólicos, especialmente os flavonóides demonstram a capacidade dos mesmos em captarem radicais livres (atividade antioxidante). Os compostos fenólicos existem no reino vegetal com a função de defender as plantas. São eles que protegem os vegetais dos ataques físicos como o dos raios solares (ultravioletas) e dos ataques biológicos de fungos, vírus e bactérias. Estrategicamente os compostos fenólicos estão concentrados nas folhas, casca e sementes dos vegetais para que eles cumpram com eficiência esse papel. Eles possuem potentes atividades antioxidante, antimicrobiana e antiviral que lhes proporcionam virtudes terapêuticas.

Os compostos fenólicos, encontrados nas plantas são de fundamental importância e vem despertando interesses nos últimos anos por causa de suas funções bioativas e são considerados como metabólitos secundários. Devido à grande diversidade de processos metabólicos na formação das substâncias fenólicas, é difícil estimar o seu teor quantitativo nos tecidos das plantas de um modo absoluto.

Estes compostos apresentam diversas funções: atuam como radicais livres, como inibidores de crescimento, protetores das plantas ao stress ambiental e ainda como mecanismo de defesa a pragas e doenças. As plantas podem sintetizar e acumular uma vasta gama destes metabólitos secundários em resposta a um stress fisiológico. Outros apresentam uma forte absorção aos raios ultravioletas, funcionando como protetores dos constituintes das células primárias mais vulneráveis (DNA, RNA, outros.) (EVARISTO; LEITÃO, 2001).

1.2.1 Flavonóides

Os flavonóides constituem uma ampla classe de compostos naturais, sintetizados por plantas. Tais compostos naturais possuem uma série de propriedades bioquímicas e farmacológicas que tem despertado grande interesse dos cientistas. São extensamente encontrados na natureza, em sementes e grãos de várias frutas e vegetais e também ocorrem em diferentes plantas medicinais. O consumo de alimentos ricos em flavonóides deve ser estimulado, afim de que a população possa se beneficiar do valor nutricional e dos potenciais efeitos terapêuticos destes compostos (ARAÚJO et al., 2005; ZHANG & LIN, 2007).

Os Flavonóides são estruturas polifenólicas de baixo peso molecular encontradas naturalmente nas plantas, apresentam 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental constituído por dois anéis aromáticos, A e B e um anel heterocíclico oxigenado C formando um sistema ($C_6-C_3-C_6$) (IGNAT 2011). A Figura 1 apresenta o esqueleto básico de um flavonóide.

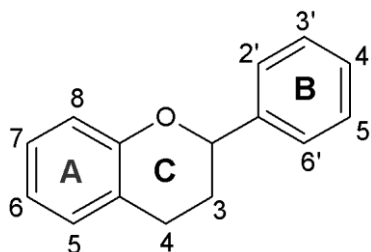


Figura 1: Estrutura básica dos flavonóides.

Atualmente são conhecidos cerca de 4200 flavonóides que desempenham as mais variadas funções biológicas no organismo humano (PEDRIALI, 2005). Eles protegem as plantas contra a incidência de raios ultravioleta e visível, além de insetos, fungos, vírus e bactérias.

Os flavonóides encontrados nas folhas podem ser diferentes daqueles presentes nas flores, galhos, raízes ou frutos, podendo apresentar diferentes concentrações dependendo do órgão vegetal em que se encontra (MACHADO et al., 2008). A Figura 2 mostra exemplos de vários tipos de flavonóides.

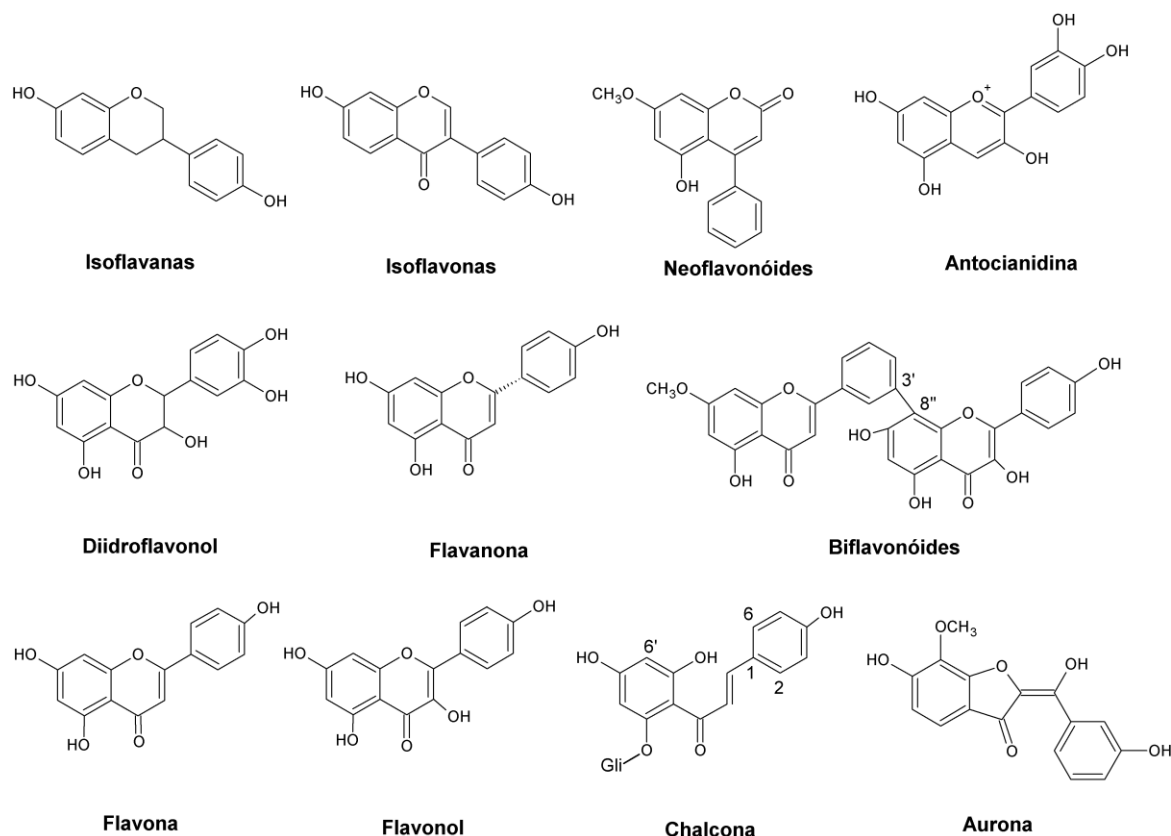


Figura 2: Estruturas químicas dos flavonóides.

Flavonóides possuem capacidade de inibir a xantina oxidase, enzima responsável pela oxidação de tecidos, sendo, portanto, capazes de inibir a formação de radicais livres e o “combate” do envelhecimento precoce. A capacidade de remoção de radicais livres pelos flavonóides pode prevenir processos de estresse oxidativo, que causam morte celular como a degeneração de neurônios e membranas celulares (SMITH et al, 1987; GIASSEN et al, 2002; LIN et al, 2002).

As proantocianidinas são bioflavonóides ativos que podem ser encontrados em inúmeras plantas. As concentrações variam de planta a planta, mas as concentrações mais elevadas podem ser encontradas no extrato de semente de uva. É considerado um forte antioxidante, mais potente que a vitamina C e E. As proantocianidinas têm um importante papel nas doenças imunológicas, circulatórias e também em patologias do sistema nervoso. As principais fontes alimentares de proantocianidinas além das uvas são as maçãs, ameixas, leguminosas, vinho tinto, chá, suco, cacau e chocolate (NANDAKUMAR et al., 2008, SERRANO et al., 2009, WANG et al., 2011).

As proantocianidinas ou taninos condensados são polímeros de alto peso molecular que tem como precursoras unidades monoméricas de (catequinas e epicatequinas) em união com flavan-3,4-dióis ou leaonantocianidinas, naturalmente encontradas em folhas, frutos, sementes, castanhas e cascas de muitas plantas (EFRAIM 2004; REZENDE 2008). O esqueleto básico de um flavan-3-óis e a estrutura de uma proantocianidina são mostrados na Figura 3.

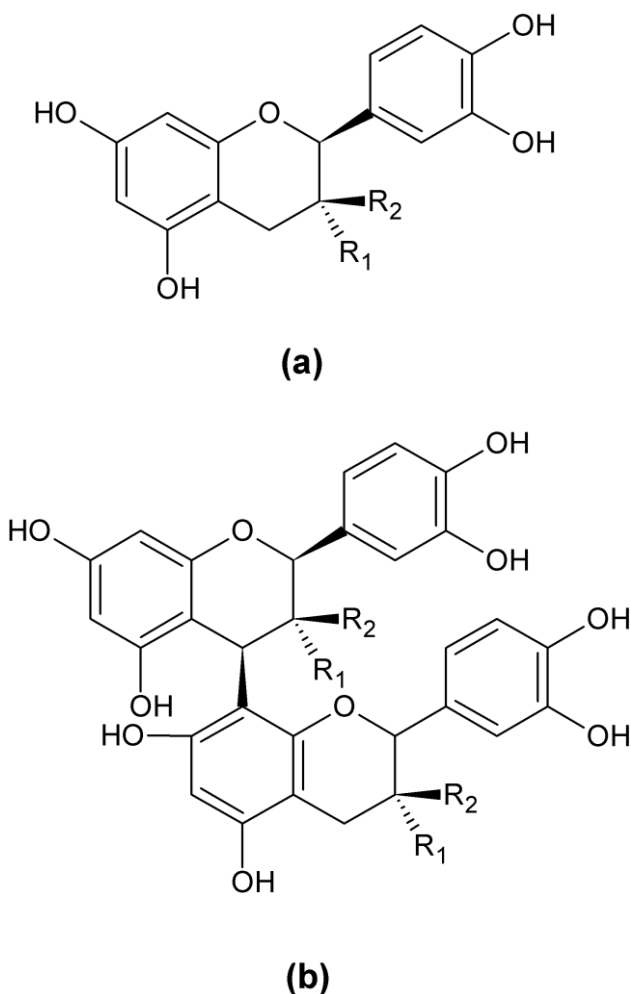


Figura 3: Estrutura do flavan-3-óis (a) e a condensação de duas moléculas de flavan-3-óis originando uma proantocianidina (b).

Antocianidinas são pigmentos fenólicos naturais instáveis responsáveis pela coloração vermelha, azul ou púrpura de várias espécies de frutas, flores, ou plantas. Elas normalmente são encontradas nas cascas dos frutos, como no caso da uva, acerola, porém em alguns casos estão presentes também na polpa e em outras par-

tes do vegetal, como raízes, tronco, cascas e folhas. Atuam como antioxidante e protegem as plantas dos raios UV. São muito importantes na polinização e reprodução das plantas (LIMA et al., 2006, MALACRIDA & MOTTA, 2005). O uso de antocianidinas como corante em alimento tem atraído interesse devido ao seu efeito terapêutico e potencial nutricional.

Na Figura 4 são mostrados alguns exemplos de antocianidinas com as espécies de plantas com os quais estes compostos foram identificados.

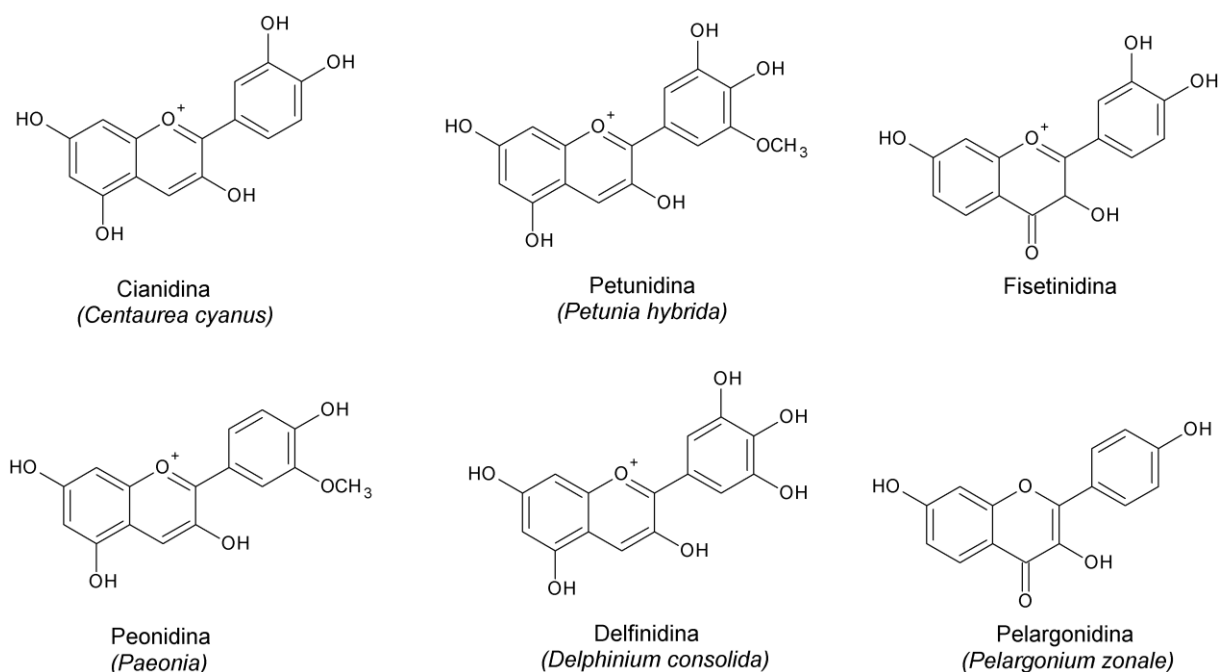


Figura 4: Algumas estruturas químicas de antocianidinas e espécies de origem.

1.2.2 Antioxidantes

Em estudos realizados nas últimas décadas, mostram que dietas ricas em frutos e hortaliças, vêm contribuindo para saúde e bem estar, reduzindo o risco de doenças cardiovasculares e algumas formas de câncer. Esse efeito positivo a saúde tem sido atribuído a alto teor de antioxidantes presentes nas plantas (KEVERS, et al., 2011).

A oxidação é um processo metabólico que leva à produção de energia necessária para as atividades essenciais das células. Entretanto, o metabolismo do oxigênio nas células vivas também leva à produção de espécies reativas de oxigênio (E-

ROs), tais como radical hidroxila ($\cdot\text{OH}$), ânion radical superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) e hidroperoxila ($\text{ROO}\cdot$) (SOUSA et al., 2007). Esses oxidantes são compostos produzidos pelo metabolismo normal do corpo e se não controlados podem provocar danos extensivos ao DNA e oxidar lipídios e proteínas. O dano oxidativo tem sido associado ao desenvolvimento de muitas doenças crônicas e doenças degenerativas como Alzheimer, bem como está envolvido no processo de envelhecimento, incluindo o câncer, doenças cardíacas. Estudos clínicos e epidemiológicos têm mostrado evidências de que antioxidantes fenólicos de cereais, frutas e vegetais são os principais fatores que contribuem para a baixa e significativa redução da incidência de doenças crônicas e degenerativas encontradas em populações cujas dietas são altas na ingestão desses alimentos. Em consequência a pesquisa por antioxidantes naturais tem aumentado muito nos últimos anos (ROESLER, 2007).

Antioxidantes são compostos que atuam inibindo e / ou diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres e compostos oxidantes. São importantes porque com o combate aos processos oxidativos tem-se menores danos ao DNA e às macromoléculas, amenizando assim os danos cumulativos que podem desencadear outras doenças como câncer, cardiopatias e cataratas (MAIA, 2007).

Como já foram mencionados previamente, os polifenóis são produtos secundários do metabolismo vegetal que constituem um amplo e complexo grupo de fitoquímicos, com mais de 8.000 estruturas conhecidas. Estes diversificados grupos de compostos encontram-se divididos em várias classes, segundo o esqueleto carbônico, dentre as quais se destacam os ácidos fenólicos e flavonóides, entre outros. A capacidade antioxidante dos polifenóis é devida, principalmente, as suas propriedades redutoras, cuja intensidade da ação antioxidante exibida por estes fitoquímicos é diferenciada uma vez que depende, fundamentalmente, do número e posição de hidroxilas presentes na molécula (MELO et al., 2008).

A vitamina C é também considerada um antioxidante natural que pode inibir o desenvolvimento de doenças coronárias e de certos cânceres (SEVERO et al., 2009). A vitamina C em frutos é composta, em sua maior parte, pelo ácido ascórbico e sua forma oxidada, o ácido desidroascórbico (DHA), que possuem um papel importante sob as reações de stress oxidativo.

1.3 Óleos essenciais

O estudo científico dos componentes químicos responsáveis pelo sabor característico das frutas justifica-se pela importância na qualidade dos frutos e seus produtos. Os compostos voláteis presentes nas frutas apresentam um exótico e aromático sabor, bastante apreciado pelos consumidores (NARAIN et al., 2004). O sabor é principalmente uma resposta integrada às sensações do gosto e do aroma. A sensação do gosto é atribuída, principalmente, à presença dos compostos não voláteis nos alimentos (tais como açúcares, sais, ácidos, limonina) determinando as quatro sensações básicas descritas como doce, salgado, azedo e amargo. A sensação do aroma é bem mais complexa, pois o olfato humano pode discriminar entre milhares de compostos voláteis, normalmente conhecidos como óleo essencial. Os compostos voláteis contribuem significativamente para o sabor característico dos alimentos (FRANCO et al., 2004).

Óleos essenciais são líquidos oleosos voláteis munidos de aroma intenso e quase sempre agradável, provenientes do metabolismo secundário, existentes em aproximadamente duas mil espécies e distribuídas em sessenta famílias. Na fitoterapia, os óleos voláteis destacam-se pelas suas propriedades antibacterianas, analgésicas, sedativas, expectorantes, estimulantes e estomáquicas. O maior problema ao desenvolvimento da agroindústria produtora de óleos essenciais é a concorrência com similares sintéticos. Felizmente, a indústria que mais necessita deste, a alimentícia, tem substituído os produtos sintéticos por naturais, em função das exigências atuais dos mercados (FERRI, 1996). A obtenção dos óleos essenciais das plantas é feita principalmente através da técnica de arraste a vapor e também pela prensagem do pericarpo de frutos cítricos. São constituídos principalmente de mono e sesquiterpenos e de fenilpropanóides, metabólitos que conferem suas características organolépticas (BIZZO et al., 2009).

O Brasil é o terceiro maior mercado mundial do setor de higiene pessoal, perfumaria e cosmética, e os óleos essenciais são matérias primas de grande aplicação nessas indústrias (ABIHDPEC, 2011). O aumento na produção e consumo de óleo essencial no Brasil é em grande parte devido ao desenvolvimento da indústria brasileira de cosméticos. Os óleos essenciais também são empregados pelas indústrias de alimento, química e medicamentos (SOUZA et al., 2010). Maior parte da produção de óleo no Brasil é proveniente de óleos essenciais de cítricos que são subpro-

dutos da indústria de sucos, contribuindo com 5% do total de óleos importados e ocupa um lugar de destaque entre os grandes exportadores internacionais (BIZZO et al., 2009).

Farmacologia, botânica, microbiologia, fitopatologia, alimentos e preservação são algumas áreas em que os óleos essenciais podem ser aplicados. A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG-EM) é indispensável para a avaliação qualitativa e quantitativa do óleo essencial (DAFERERA et al., 2000). A composição química do óleo essencial de uma planta depende de uma série de parâmetros, tais como condições ambientais, estação de coleta, procedimento de extração, condições de armazenamento das plantas coletadas até a extração, etc (SEVERO et al., 2009).

1.4 Atividade antimicrobiana

As atividades antimicrobianas de compostos e óleos essenciais oriundos das plantas têm sido reconhecidas durante anos, mas recentemente estudos científicos vêm confirmando essas propriedades. Vários grupos de pesquisadores estudam a atividade biológica de plantas medicinais de diversas regiões do mundo, orientados pelo uso popular das espécies nativas. Por outro lado, os microrganismos que causam prejuízos à saúde humana estão se tornando resistente à maioria dos antimicrobianos conhecidos, o que incentiva ainda mais a procura por antibióticos de ocorrência natural (DUARTE, 2006). Os óleos essenciais de varias espécies de plantas apresentam atividade antimicrobiana a um grande número de bactérias incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos. E também podem apresentar ação contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (STIEVEN et al., 2009, DUARTE et al., 2004).

No Brasil pesquisas relacionadas a produtos naturais e atividade antimicrobiana vêm crescendo nos últimos anos. Entretanto, poucos dados estão disponíveis referentes a espécies nativas e exóticas. Esse baixo número de registro é consequência da disseminação restrita dos resultados de pesquisa, geralmente apresentados em eventos científicos locais ou regionais. Sendo que as maiorias dos estudos são testes isolados com uma ou poucas espécies, geralmente baseada em informações etnofarmacológicas, diferentemente de pesquisas que abrangem a flora de uma região definida, onde várias famílias botânicas são estudadas (DUARTE, 2006).

1.4.1 Cavidade bucal e microbiota bucal

A cavidade bucal possui estruturas anatômicas distintas, sendo compreendidas basicamente por um tecido duro (dente) e por tecidos moles como mucosas alveolares e ceratinizada e língua. A renovação constante das superfícies por descamação previne o acúmulo de microrganismos. Entretanto, os dentes apresentam uma superfície dura não-descamativa que favorece o desenvolvimento de grandes depósitos bacterianos. Já a mucosa bucal é caracterizada por contínua descamação das células epiteliais permitindo a rápida eliminação de bactérias aderidas na mucosa (MARCOTTE e LAVOIE, 1998).

Durante a vida, todas as superfícies do corpo são expostas à colonização por uma grande variedade de microrganismos (LINDHE, 1999). Vários compartimentos orgânicos do corpo humano abrigam uma série de microrganismos que infectam esses locais, mesmo no estado saudável, constituindo a microbiota própria de cada local. O motivo da não existência de uma microbiota única em todas as partes do corpo deve-se inicialmente ao fato de cada região ser um habitat diferente, com condições ambientais diferentes. As composições teciduais, os nutrientes necessários para cada microrganismos, teores de umidade, pH, taxas de oxigênio, receptores para aderência bacteriana, entre outros, se diferem em cada parte do corpo. Com isso, os microrganismos colonizam certa região e se adaptam às suas condições ecológicas (DE LORENZO, 2004).

A microbiologia bucal é uma das mais complexas de todo o corpo humano. Mais de 700 espécies bacterianas já foram detectadas através de métodos moleculares, das quais somente 40% foram cultivadas em laboratório (AAS et al., 2005).

Os microrganismos são encontrados na saliva em populações não aderidas e em comunidades organizadas, dentro de uma matriz complexa de produtos extracelulares microbianos e compostos salivares crescendo nas superfícies do esmalte dental, conhecida como biofilme (MARSH, 2005), podendo estar aderidos nas superfícies do dente e língua.

Após a limpeza dos dentes, macromoléculas hidrofóbicas são adsorvidas pelas superfícies, formando um filme condicionante denominado película adquirida. Este filme é composto por uma variedade de glicoproteínas salivares (mucinas), anticorpos, peptídeos e outras moléculas orgânicas (CLARK et al., 1978). A película altera a carga e a energia livre de superfície, aumentando a eficiência da adesão

bacteriana (LINDHE, 1999). A firme aderência de bactérias à superfície dental revestida pela película salivar é o primeiro passo essencial para a formação do biofilme dental (Placa Dental) (MARSH, 2005).

1.5 O gênero *Campomanesia*

A família Myrtaceae é uma das maiores da flora brasileira, composta por mais de 130 gêneros e 4000 espécies de arbusto e árvores representadas nas Américas principalmente pelas plantas frutíferas. Apresentam-se com folhas simples, geralmente opostas e margens inteiras de coloração sempre verde, caracteristicamente, providas de glândulas produtoras de óleo essenciais (LORENZI & SOUZA, 2008).

O gênero *Campomanesia* representado por árvores e arbustos pode ser encontrado do Norte da Argentina até Trindade e das costas brasileiras até o Peru, Equador e Colômbia. São plantas poucas exigentes quanto ao tipo de solo. Algumas delas crescem naturalmente em solo pobres em nutrientes, como é o caso de *C. adamantium*. Os frutos das *Campomanesias* destacam-se como importante alimento para a fauna constituída por um grande número de pássaros, pequenos mamíferos, peixes e até répteis e representam os principais agentes dispersores das sementes das espécies deste gênero. Floresce nos meses de setembro a novembro. Os frutos amadurecem de novembro a dezembro apresentando formato redondo de coloração que varia do verde escuro ao verde-claro e amarelo espalhando aroma adocicado e bastante agradável (VALLILO et al., 2006b).

A maior parte das gabirobeiras pertence à família Myrtaceae e ao gênero *Campomanesia*, que apresenta 25 espécies distribuídas do México à Argentina sendo 15 delas nativas do Brasil onde a espécie está distribuída em Minas Gerais, Goiás e Espírito Santo chegando até o Rio Grande do Sul (PEIXOTO et al., 2005). Como exceção à família da Myrtaceae pode-se citar a gabiroba-brava (*Vitex multinervis Schauer*) que pertence à família Verbenaceae, conhecida popularmente na flora florestal paulista por Tarumã-azeitona. Existem, também, algumas gabirobeiras que pertence à família Myrtaceae, mas não ao gênero *Campomanesia* como a gabiroba de cachorro (*Abbevillea guabioba* Berg) e a gabiroba nativa (*Abbevillea chrysophylla* Berg) (SOUZA et al., 2004). As gabirobeiras são plantas pouco exigentes quanto ao tipo de solo. No Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento se encontram devidamente registrados onze espécies de gabirobeira (MINISTÉRIO DA A-

GRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO, 2009). Estas espécies estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1. Espécies de gabioba catalogadas no Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento.

ESPECIES DE GABIROBA			
NOME COMUM	NOME CIENTÍFICO	Nº REGISTRO	DATA REGISTRO
Gabioba-adamantium	<i>Campomanesia adamantium</i> O.Berg	23633	25/06/2008
Gabioba do Amazonas	<i>Campomanesia eugenioides</i> (Cambess) D Legrand	23634	25/06/2008
Gabioba capoteira	<i>Campomanesia guazumifolia</i> (Cambess.) O. Berg	23635	25/06/2008
Gabioba laurifolia	<i>Campomanesia laurifolia</i> Gardner	23636	25/06/2008
Gabioba da folha fina	<i>Campomanesia lineatifolia</i> Ruiz & Pav	23637	25/06/2008
Gabioba branca	<i>Campomanesia neriflora</i> (O.Berg) Nied	23638	25/06/2008
Gabioba cambuci	<i>Campomanesia phaea</i> (O. Berg) Landrum	23639	25/06/2008
Gabioba pilosa ou peluda	<i>Campomanesia pubescens</i> (DC) O.Berg	23640	25/06/2008
Gabioba da grada	<i>Campomanesia reitziana</i> D.Legrand	23641	25/06/2008
Gabioba do campo	<i>Campomanesia schlechtendahlana</i> (O.Berg)Nied	23642	25/06/2008
Gabioba de árvore	<i>Campomanesia xanthocarpa</i> O. Berg	23643	25/06/2008

Além dessas catalogadas se podem citar ainda: guabioba de minas (*Campomanesia fenzliana* Berg), gabioba do cerrado (*Campomanesia coeruela* Berg), gabioba-graúda (*Campomanesia Klotzschiana* Berg), gabioba-mirim (*Campomanesia aprica* Berg), etc. (SOUSA et al., 2004).

A gabiobeira vive em clima tropical quente com baixo índice pluviométrico, devendo estar sempre exposta ao sol. A propagação se dá através de sementes, que devem ser semeadas logo após a extração do fruto porque perdem rapidamente a capacidade germinativa. Pode ser cultivada em canteiros. Não é exigente quanto ao tipo de solo, crescendo inclusive em terrenos pobres. A colheita geralmente ocorre no mês de novembro. No entanto, quando é cultivada apresenta maior preferência pelos solos do tipo vermelho-amarelo. A necessidade de água é moderada. Os fru-

tos podem ser conservados em sacos plásticos na geladeira ou no congelador (VALLILO et al., 2006a).

No Brasil a gabirola é muito encontrada nos cerrados das regiões Sul, Sudeste e Centro Oeste. Sendo, também, disseminada para outros países da América do Sul, é muito encontrada na Argentina e Uruguai. No sul do Brasil, na região norte e oeste do Paraná além da variedade de cerrado difundem-se, também a variedade arbórea que alcança a vários metros de altura, produzindo frutos com sabor e aparência da variedade de campo e cerrado, porém, quando maduros apresentam a cor amarela. A composição química compreende: proteínas, carboidratos, niacina sais minerais e vitaminas do complexo B. A parte mais usada são os frutos e brotos. Apresenta propriedades medicinais, adstringente e antidiarreica. A infusão das folhas é relaxante para aliviar dores musculares, através de banhos de imersão (VALLILO et al., 2006a).

Geralmente a planta ocorre na forma de arbusto com 0,40 a 1,00 m de altura e em moitas, suas flores são pequenas de coloração creme esbranquiçada. Os frutos são bagas comestíveis arredondados com polpa amarelada quando maduros, suculenta, envolvendo as sementes, é de coloração verde-amarelada e amadurecem entre setembro e novembro. A primeira frutificação ocorre a partir de um a dois anos após o plantio. A gabirola pode ser utilizada na arborização urbana, de fácil manutenção, quase não necessita de podas de condução e ainda produz abundante floração branca o que lhe confere aptidão paisagística. São valorizadas ainda suas qualidades como planta melífera (PEIXOTO et al., 2005).

1.6 A espécie *Campomanesia pubescens* (DC) O. Berg

A gabioba da espécie *Campomanesia pubescens* (DC) O. Berg é um arbusto de porte muito variável de acordo com a fertilidade do solo, característico do cerrado e de campo principalmente sujo. Ocorre na Bahia, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, São Paulo e no Tocantins. Apresenta caule piloso, folhas oblongas, membranáceas e pilosas nas duas faces, flores isoladas, axilares, brancas, sépalas agudas triangulares e bractéolas lineares, fruto globuloso, comestível e saboroso (SOUSA et al., 2004). Na Figura 5 é apresentado um arbusto de gabioba.



Figura 5: Fotografia de *Campomanesia pubescens*, no cerrado do município de Uberlândia - MG.

Distingue-se de outras gabiobeiras arbustivas por ter geralmente, pedúnculos densamente pubescentes e normalmente mais longos que o broto floral, além de ter folhas ainda imaturas por ocasião da antese e serem coriáceas na maturidade com pubescência na face inferior. Flores solitárias, formadas em agosto-setembro. Frutos com polpa succulenta de sabor acidulado que amadurecem em novembro-dezembro (LORENZI et al., 2008). Seus frutos são usados para fazer licores, sucos e doces (Figura 6). A infusão de suas folhas é usada na medicina popular no tratamento de diarreias e doenças na bexiga (SILVA et al., 2009a).



Figura 6 – Fotografia do fruto de *Campomanesia pubescens*, no cerrado do município de Uberlândia-MG.

As três espécies de gabioba mais difundida no Brasil são: gabioba-adamantium (*Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg), gabioba de árvore (*Campomanesia xanthocarpa* O. Berg) e a gabioba-pilosa ou peluda (*Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg). Destas três espécies, as mais estudadas são Gabioba adamantium e a gabioba de árvore.

Para a gabioba adamantium se encontra na literatura estudos para determinação de compostos fenólicos e atividade antioxidante das folhas, os valores encontrados para compostos fenólicos podem contribuir diretamente à ação antioxidante do extrato das folhas (COUTINHO et al., 2008a).

Em outro estudo realizado, determinou-se composição química dos compostos voláteis das folhas e frutos da gabioba adamantium (COUTINHO et al., 2008b). Identificação de terpenos no óleo essencial de frutos de *Campomanesia adamantium* (VALLILO et al., 2006a), estudos de germinação (MELCHIOR et al., 2006), avaliação do potencial citotóxico e atividade antioxidante (RAMOS et al., 2007).

E para gabioba de árvore são encontrados trabalhos referentes ao comportamento farmacológico e propriedades toxicológicas dessas plantas (BIAVATTI et al., 2004), composição química dos frutos (VALLILO et al., 2008), análise dos extratos hidroalcoólicos das folhas e comportamento anti-ulcerogênica (MARKMAN et al., 2004).

1.6.1 Estudos referentes à espécie *Campomanesia pubescens* (DC) O. Berg

Para a gabioba pilosa (*C. pubescens*) foram encontrados estudos na literatura referentes à composição química dos óleos essenciais das folhas, frutos e flor (SILVA et al., 2009b; CARDOSO & RE-POPP1, 2009). Aplicação dos frutos na fermentação para produção de vinhos e um congresso referente à identificação de flavononas e chalconas (DUARTE et al., 2009; SILVA et al., 2007).

Estudo com o extrato das folhas de *Campomanesia pubescens*, foi ensaiado para a avaliação do seu efeito tóxico, utilizando para tal, dosagens de amostras sanguíneas de animais tratados com o extrato nas concentrações de 250 mg/kg a 500 mg/kg, por um período de noventa dias. Nestas amostras foram investigadas possíveis alterações bioquímicas e hematológicas. Os resultados sugerem que os extratos de *Campomanesia pubescens* foi eficaz em reduzir os números de monócitos, indicando um possível efeito antiinflamatório (GUERRERO, et al., 2010).

Em outro estudo foi avaliada a atividade antimicrobiana e a composição química do extrato hexânico dos frutos de *Campomanesia pubescens* e *Campomanesia adamantium*, frente a seis tipos de microrganismos, utilizando o método de micro diluição para a determinação da concentração inibitória mínima. Os microrganismos usados para os ensaios foram: *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans*, *S. setúbal*, *S. cerevisiae* e *E. coli*. Os extratos apresentaram atividade antimicrobiana frente a todos os microrganismos testados, com CIM variando entre 5 µg/mL a 20 µg/mL (CARDOSO et al., 2010a).

Estudos avaliaram a atividade antioxidante, toxicidade e composição por CG-EM do extrato hexânico das folhas de *C. pubescens*. Para a atividade antioxidante utilizou-se o método β -caroteno/ácido linoléico e o método radical livre DPPH. O extrato hexânico apresentou em sua composição sesquiterpenos hidrocarbonetos e oxigenados e β -sitosterol. O extrato hexânico não foi considerado tóxico para a *Artemia salina* (CARDOSO et al., 2008).

No que se refere ao aspecto botânico são encontrados mais publicações (PERIOTTO, 2008; PEIXOTO et al. 2005; CARDOSO & SAJO, 2006; MORAIS & LOMBARDI, 2006).

Uma revisão cuidadosa dos trabalhos realizados com a espécie *Campomanesia pubescens* até o presente momento indicam que, existam poucos dados disponíveis na literatura e não foram encontrados trabalhos em relação à composição química e atividade biológica para o caule e raiz desta espécie. Portanto, é possível perceber a importância e a justificativa de se investigar esta planta do cerrado.

2. Objetivos

Realizar os seguintes estudos químicos e biológicos da espécie vegetal *Campomanesia pubescens*:

- Quantificação dos teores de compostos fenólicos e de proantocianidinas.
- Determinação da atividade antioxidante.
- Obtenção do óleo essencial, seguir da análise e identificação de compostos voláteis.
- Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial frente a microrganismos bucais.

3. Metodologia

A Figura 7 mostra um fluxograma dos trabalhos efetuados para planta *C. Pubescens*.

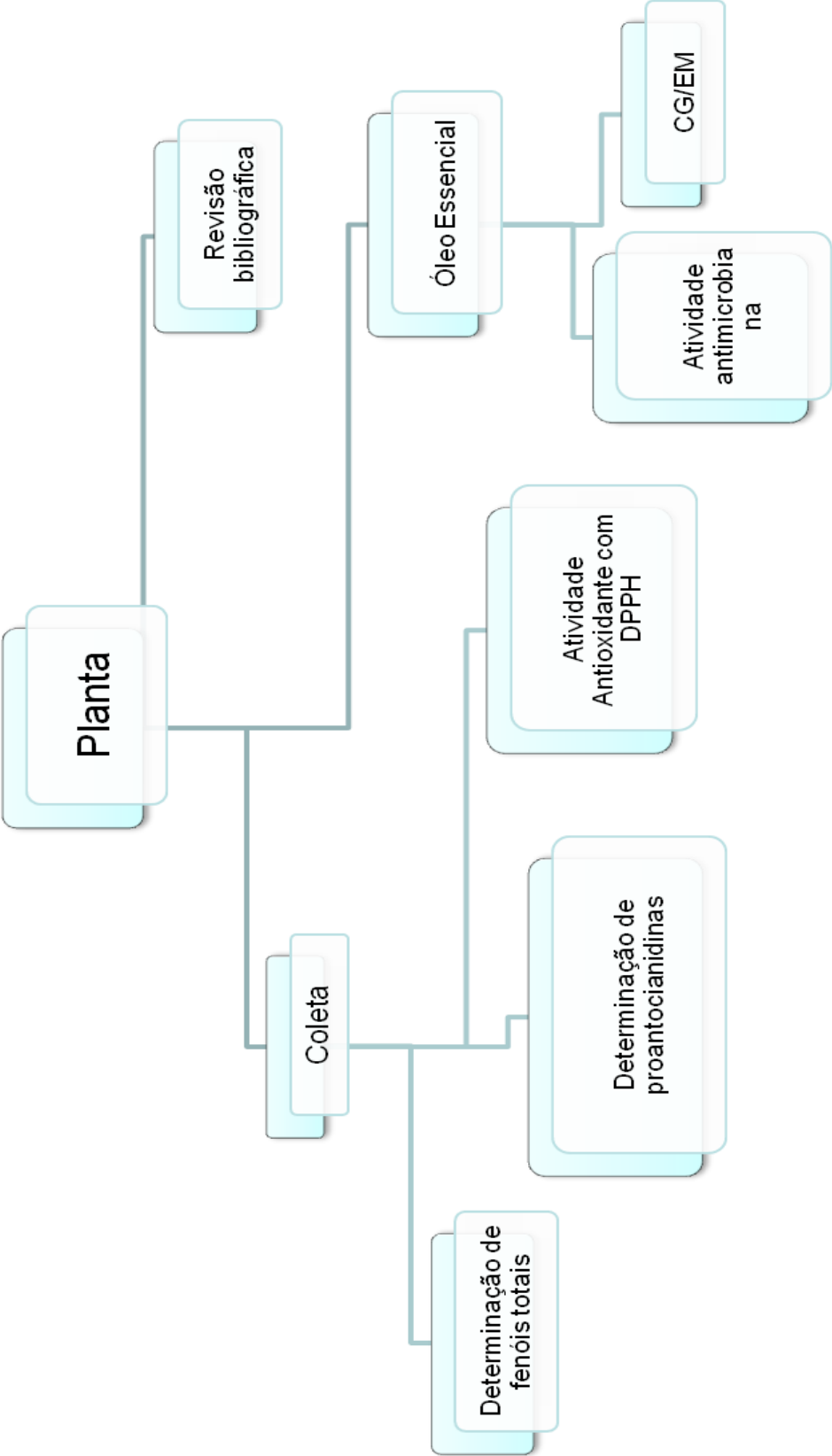


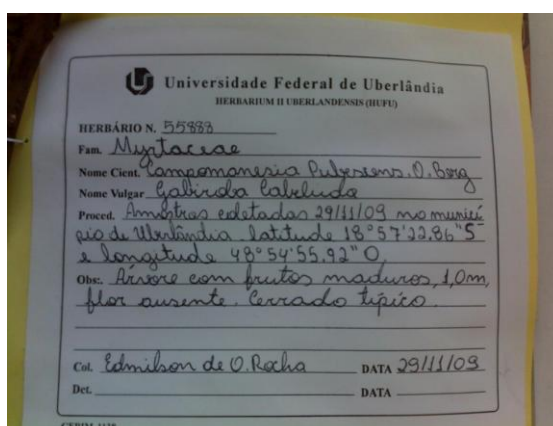
Figura 7: Fluxograma de trabalho

3.1 Coleta da espécie

Espécimes de *Campomanesia pubescens*, foram coletadas entre os meses de setembro a dezembro de 2009 no Município de Uberlândia MG, altitude de 660 m, segundo as coordenadas geográficas: latitude 18° 57' 22.86" S e longitude 48°54' 55.92" O. Os materiais foram acondicionados e transportados adequadamente ao laboratório de Química dos Produtos Naturais do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Espécimen testemunha foi herborizado e incorporado ao acervo do Herbarium Uberlandense do Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), sob o registro de número 55888 para *C. pubescens*. Figura 8 apresenta exsicatas de *C. pubescens* (DC.) O. Berg (a) e o documento comprobatório (b).



(a)



(b)

Figura 8: Exsicatas de *Campomanesia pubescens* (DC.) O. Berg, Herbarium Uberlandense.

Para determinação do teor e da constituição química do óleo essencial e atividade antimicrobiana, foram utilizadas amostras frescas coletadas em pontos aleatórios das plantas sempre no período da manhã. As análises das amostras foram realizadas em triplicata.

3.2 Análises Químicas

As análises químicas foram realizadas no laboratório de Química dos Produtos Naturais do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia.

3.2.1 Preparos das amostras

Cerca de 1,0 Kg do material vegetal (raízes, caule ou folhas) foi seco à temperatura ambiente por 7 dias, picado e triturado e a serragem resultante moída em um moinho de bolas de porcelana. O pó resultante de cada amostra foi armazenado em sacos de polietileno e armazenado no freezer a $-18,0^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises.

Aproximadamente 1,0 Kg de frutos foram misturados aleatoriamente formando uma amostra composta e em seguida triturado e homogeneizado integralmente, em multiprocessador, para posterior análise. A polpa resultante foi armazenada em sacos de polietileno e guardada no freezer a $-18,0^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises.

Para a determinação da umidade utilizou-se uma balança de luz infravermelha da marca Kett, modelo FD-600. As amostras de aproximadamente 1,00 g foram deixadas a uma temperatura de 105°C por quinze minutos até que o teor de umidade ficasse constante. Calculou-se o rendimento.

3.3 Extração do óleo essencial por hidrodestilação

Cerca de 100 g de (fruto, folha, caule e raiz) de *C. pubescens* foram coletadas no período da manhã, cortadas e submetidas à extração por hidrodestilação, utilizando o aparelho tipo Clevenger, montagem apresentada na Figura 9, por um período de 4 horas (MORAIS et al., 2009). O extrato orgânico foi recolhido com aproximadamente 50,0 mL de água e extraído com diclorometano (3 x de 30,0 mL). Descartou-se a fase aquosa e a fase orgânica foi seca com sulfato de magnésio anidro. Em seguida, filtrou-se. Para a remoção do solvente (diclorometano) foi utilizado um evaporador rotatório. O óleo foi recolhido e acondicionado em um frasco, sendo mantido sob-refrigeração à temperatura de aproximadamente $-18,0^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises. A massa do óleo essencial obtido foi pesada em uma balança analítica, e calculou-se percentagem correspondente de óleo, em relação à massa da amostra.



Figura 9: Montagem do aparelho de Clevenger, para hidrodestilação.

3.4 Extração etanólica para determinação de Fenóis totais e proantocianidinas

Cerca de 50,0 gramas de amostra seca (raízes, caule, folhas e frutos) foi pesada e extraída com aparelho de Soxhlet com etanol 95% (faixa de ebulição 78-79 °C) (Figura 10). Foi fixada uma velocidade/quantidade em torno de 6 a 8 sifonagens por hora à temperatura constante e com fluxo de gotejamento entre 100 e 150 gotas por minuto. As extrações foram realizadas durante 6 horas.

Depois, filtrou-se e o filtrado foi evaporado em um evaporador rotatório a 40°C até o volume ser reduzido para 30,0 mL, coletado em frasco âmbar e armazenado no freezer a -18,0°C até sua utilização. Para quantificação do extrato, recolheu-se 1,0 mL do mesmo e secou-se em estufa a aproximadamente 105°C em um frasco tarado, durante 6 horas. Em seguida, o sólido resultante foi resfriado à temperatura ambiente em um dessecador e sua massa foi medida em uma balança analítica (FERRI,1996).



Figura 10: Montagem para extração contínua utilizando o aparelho de Soxhlet.

3.4.1 Determinação de fenóis totais (FT), pelo método de *Folin - Ciocalteau*

Uma alíquota dos extratos etanólicos (raízes, caules, folhas e frutos) contendo 0,1 mL de amostra foi diluído em metanol e transferido para um balão volumétrico de 200,0 mL e o volume final completado com metanol. Desta solução, retirou-se uma alíquota de 0,5 mL que foi transferida para um tubo de ensaio. Adicionou-se 2,5 mL de uma solução aquosa do reativo Folin-Ciocalteau a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi incubada por 5 minutos em banho aquecido a 50°C e, posteriormente, mediu-se a absorbância a 760 nm, tendo como o branco o metanol e todos os reagentes menos o extrato. O teor de fenóis totais (FT) foi determinado por interpolação da absorbância das amostras com uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e os resultados foram expressos como mg de EAG (equivalente de ácido gálico) por grama de extrato (JACOBSON, et al., 2005; SOUSA et al., 2007; FERRI, 1996).

3.4.2 Determinação de taninos condensados (proantocianidinas).

Retirou-se uma alíquota de 0,1 mL do extrato etanólico (raízes, caules, folhas e frutos) e diluiu-se em metanol até o volume de 200,0 mL. Desta solução, retirou-se uma alíquota de 2,0 mL e transferiu-se para um balão volumétrico de 5,0 mL. Neste mesmo balão, adicionou-se 3,0 mL de uma solução de vanilina em ácido sulfúrico 70 %, na concentração de 10,0 mg mL^{-1} . A mistura foi mantida em banho de água a uma temperatura de 50°C por 15 minutos. A amostra foi esfriada e a absorbância medida a 500 nm utilizando como branco o metanol e todos os reagentes menos o extrato. Determinou o teor de taninos condensados por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva padrão, construída com padrões de catequina (5, 10, 15, 20 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados são expressos como mg de EC (equivalentes de catequina) por grama de extrato (MORAIS et al., 2009).

3.4.3 Análise quantitativa da atividade antioxidante

Primeiramente foram preparados 50,0 mL de solução estoque de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) em metanol na concentração de aproximadamente 50 mg mL⁻¹, a qual foi mantida sob-refrigeração e protegida da luz. Foram feitas diluições de 50, 45, 40, 35, 30, 25, 20 e 10 mg mL⁻¹. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorbância a 517 nm de todas as soluções (10 a 50 mg mL⁻¹), medidas em cubetas de vidro com percurso óptico de 1 cm e tendo como branco o metanol. As medidas de absorbância foram efetuadas em triplicata.

A atividade antioxidante foi determinada, através do radical livre estável DPPH seguindo o método descrito por BRAND-WILLIAMS et al. (1995) e modificado por YILDIRIM et al. (2001). Foi pesado cerca de 1,00 g da amostra bruta moída (raízes, caule, folha e fruto) e submetida à extração com 10,0 mL metanol por 30 minutos em banho de aquecimento a 40 °C. A solução obtida foi filtrada e teve seu volume ajustado para 250,0 mL, enquanto que, para o fruto o volume foi ajustado para 50,0 mL. Para quantificação dos extrativos solúveis, 1,0 mL desta solução foi recolhida e seca num frasco tarado a 105 °C, durante 6 horas e em seguida resfriado a temperatura ambiente em um dessecador e pesado. O filtrado de cada amostra foi submetido a 5 diluições sucessivas de 83%, 66%, 49%, 32% e 15% em metanol. A concentração de DPPH no meio reacional foi calculada através de uma curva de calibração obtida por regressão linear. Para cada solução foi tomada uma amostra de 0,10 mL e adicionado 3,90 mL de solução de DPPH (concentração aproximadamente 40 µg mL⁻¹ em metanol) recentemente preparada. Também, foi feito um branco nas mesmas condições, mas sem o DPPH. Após a adição do radical DPPH, as soluções foram deixadas em repouso e suas absorbâncias registradas no comprimento de onda de 517 nm durante uma hora, em intervalos de 5 minutos entre cada leitura.

A porcentagem de atividade antioxidante (AA) foi determinada pela equação 1:

$$AA (\%) = \frac{AbvC1 - (AbvA - AbvC2) \times 100}{AbvC1} \quad (\text{equação 1})$$

Onde:

AbvC1 corresponde à absorbância do controle 1 (0,10 mL de metanol + 3,90 mL de DPPH.); AbvA corresponde a absorbância da amostra ao final de 60 minutos e AbvC2 corresponde a absorbância do controle 2 (0,10 mL de amostra + 3,90 mL de metanol).

A porcentagem de DPPH remanescentes (CE₅₀), ou seja, a quantidade de DPPH que não reagiu com os antioxidantes da amostra é calculada pela equação 2.

$$\%DPPH_{\text{remanescente}} = \frac{[DPPH]_t}{[DPPH]_{t_0}} \times 100$$

Onde: t = é a concentração de DPPH no meio após reação com extrato.

t₀ = é a concentração de DPPH no início da reação (tempo zero).

A concentração efetiva média (CE₅₀), que representa a concentração de amostra necessária para sequestrar 50 % dos radicais de DPPH, foi calculada plotando-se a porcentagem de DPPH sequestrado versus as concentrações dos extratos de cada amostra (ARGOLO et al., 2004).

3.5 Separação e identificação de compostos voláteis

A separação e identificação dos constituintes voláteis foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria (CG-EM) de massas num aparelho da Shimadzu, modelo GC17A/QP5000. O programa de temperatura é de 60-240 °C (3°C.min.⁻¹); injetor no modo splitless a 220°C ; hélio a fluxo constante de 17mL.min.⁻¹. O detector de massas opera com energia de impacto de 70 eV e são captados os fragmentos de 40 a 650 u; temperatura da interface de 240 °C; temperatura da fonte de íons de 240°C. Um microlitro da amostra, dissolvido em diclorometano, foi injetado. A identificação dos compostos foi feita por meio das bibliotecas de espectros de massas da Wiley (7, 27, 139, 147 e 229) e por índices de Kovat. Para obtenção dos índices de Kovats, uma mistura de padrões de alcanos (C9-C20) é preparada usando hexano como solvente (ADAMS, 2001; FRANCO et al., 2004).

3.6 Análise biológica do óleo essencial

As análises de atividade antimicrobiana foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca (LaPeMA), com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.

A atividade antimicrobiana foi determinada utilizando o método da microdiluição em caldo segundo o CLSI para os microrganismos aeróbios (CLSI, 2006) e CLSI para os microrganismos anaeróbios (CLSI, 2007). O preparo das soluções, reagentes empregados e a metodologia do experimento para a determinação das concentrações inibitórias mínimas estão descritos detalhadamente no Apêndice 1.

4. Resultados e Discussões

A umidade da raiz, caule, folha e fruto devem ser conhecidos a fim de que a água existente na planta não seja quantificada como produto em algumas análises executadas. Os resultados dos teores de umidade estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2: Teores de umidade nas amostras da raiz, caule, folha e fruto.

AMOSTRAS	TEOR DE UMIDADE (%)
Raiz	$11,0 \pm 0,1$
Caule	$13,0 \pm 0,4$
Folha	$14,0 \pm 0,8$
Fruto	$85,0 \pm 0,4$

Foi realizado o cálculo do teor de umidade para evitar que a massa de água seja considerada nas análises. Os dados obtidos mostram que os frutos apresentaram maior teor de umidade, devido a sua polpa succulenta. Valores de umidades próximos para os frutos são descritos na literatura para *Campomanesia adamantium* (VALLILO, et al., 2006b).

4.1 Teores de óleo essencial

O teor médio de óleo essencial, em porcentagem, foi obtido em relação à massa da planta. O fruto apresentou maior rendimento do óleo essencial $0,94 \pm 0,04$ %, as folhas $0,64 \pm 0,06$ %, o caule $0,15 \pm 0,01$ % e para a raiz o rendimento foi de $0,12 \pm 0,02$ %. O fruto de *C. pubescens* apresentou um rendimento superior em comparação ao descrito para os óleos essenciais do fruto e da flor de *C. pubescens* da região Campo Grande MS onde foram encontrados valores de 0,10% e 0,04% respectivamente (SILVA et al., 2009b, CARDOSO & POPPI, 2009). Em outro estudo, o teor de óleo essencial da flor de *C. sessiflora* e *C. xanthocarpa*, foram de 0,08% e 0,10% (CARDOSO et al., 2010b). Os teores de óleos essenciais observados para a folha, o caule e raiz de *C. pubescens* não puderam ser comparados com os da literatura, pois não foram encontrados estudos comparativos da raiz e caule para essa espécie.

4.2 Extração etanólica

Os resultados da extração etanólica estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3: Massas e porcentagens dos extratos brutos da raiz, caule, folha e fruto da gabirola.

Amostras	Massa obtida (g)	Teor extrato etanólico (%)
Raiz	$0,8 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,2$
Caule	$3,4 \pm 0,3$	$7,0 \pm 0,6$
Folha	$7,4 \pm 0,2$	$15,0 \pm 0,4$
Fruto	$14,0 \pm 0,4$	$28,0 \pm 0,7$

O fruto apresentou uma maior porcentagem de extrato etanólico do que as outras amostras analisadas, indicando que este possui uma quantidade maior de substâncias solúveis nesse extrato do que as outras amostras.

4.3 Determinação do teor de fenóis totais pelo método de Folin – Ciocalteu

A análise do teor compostos fenólicos totais (FT) utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu que forma um complexo de coloração azul na presença de agentes redutores (SOUSA et al., 2007).

A partir da determinação das absorbâncias obtidas para as amostras de concentrações conhecidas de ácido gálico, foi traçada uma curva de calibração da absorbância em função da concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$, Figura 11.

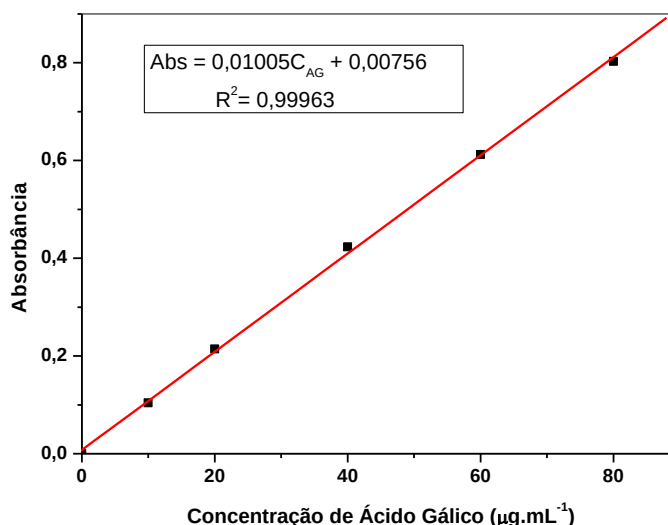


Figura 11: Curva de Calibração do ácido gálico.

Os resultados obtidos na determinação de fenóis totais (FT) pelo método Folin-Ciocalteu, expressos como equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama da amostra, são apresentados na tabela 4.

Tabela 4: Teor de fenóis totais (mg de EAG/g de extrato etanólico).

Extratos	mg de EAG/ g de extrato etanólico
Raiz	$19,3 \pm 0,6$
Caule	$114,0 \pm 1,3$
Folha	$115,0 \pm 1,8$
Fruto	$31,0 \pm 5,0$

A partir dos resultados obtidos foi possível confirmar a presença e quantificar o teor de fenóis totais nos extratos testados. Os extratos da folha e caule avaliados apresentaram altos teores de compostos fenólicos. Os menores teores de FT foram registrados nos extratos etanólicos da raiz e frutos. Valores bem variados para os teores destes compostos podem ser observados. Em comparação com os teores de FT para o extrato etanólico bruto da folha de três espécies de *Eugenia* (*E. brasiliensis*, *E. beaurepaireana* e *E. umbelliflora*) que foram de 162,6 , 138,0 e 128,1 mg g^{-1} , respectivamente, e para o caule destas mesmas espécies, foram encontrados valo-

res de 174,4 , 225,4 e 105,8 mg EAG/g de amostra, respectivamente (MAGINA et al., 2010). Em outros estudos envolvendo a análise de compostos fenólicos de frutos de *Eugenia uniflora* L. (pitanga roxa) o teor de fenóis foi de 3,25 equivalentes de catequina por grama de amostra (LIMA et al., 2002). Portanto, os valores de fenóis totais determinados da folha e caule de *C. pubescens* são menores em comparação com as três espécies citadas. Já o fruto em relação aos de outras plantas da família Myrtaceae, como jabuticaba, jambolão e araçá vermelho (GONÇALVES et al., 2009), foi observado um decréscimo no conteúdo de fenóis totais que pode ser atribuído a uma série de alterações químicas e enzimáticas de determinados fenóis durante o processo de amadurecimento (ROBARDS et al.; 1999). Os resultados de FT encontrados na raiz são altos quando comparado com os resultados encontrados para a raiz de carnaúba (SOUSA et al., 2007).

Trabalhos descritos na literatura para a folha de *C. adamantium* coletadas em quatro cidades diferentes do Mato Grosso do Sul, mostram que os valores de compostos fenólicos variam entre 7,2 mg g⁻¹ e 21,2 mg g⁻¹ para o teor de fenóis totais (COUTINHO et al., 2008a), resultados esses inferiores ao das folhas de *C. pubescens*. Em outro estudo de BRUM, 2010 envolvendo extrato etanólico da folha e fruto de *C. pubescens* apresentaram teores de fenóis de (465,5 e 161,1 mg g⁻¹) respectivamente, resultados estes bem acima em relação aos descritos neste trabalho.

4.4 Determinação de taninos condensados (proantocianidinas)

A partir da leitura de absorbâncias das amostras de catequina em concentrações conhecidas foi traçada uma curva de calibração da absorbância pela concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$ mostrado na Figura 12.

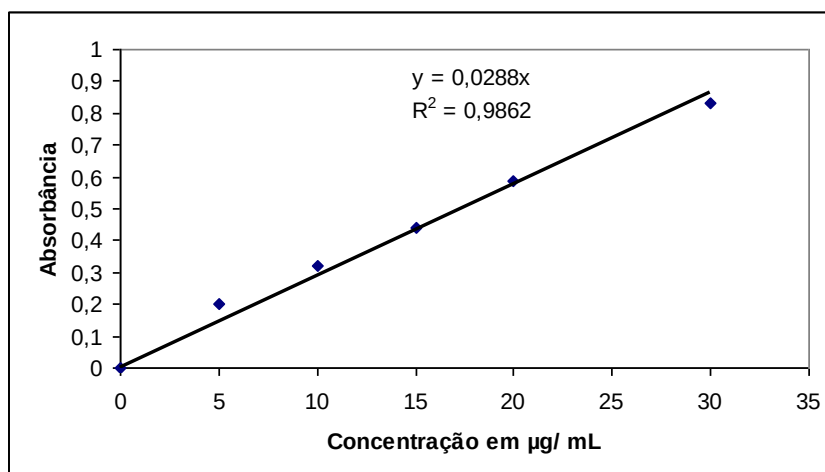


Figura 12: Curva de calibração da catequina.

Os valores de proantocianidinas obtidos foram expressos em equivalentes de catequina (ECAT) por grama de extrato etanólico, mostrados na Tabela 5.

Tabela 5: Teor de proantocianidinas (mg de ECAT/g de extrato etanólico).

Extratos	mg de ECAT/ g de extrato etanólico
Raiz	$1,9 \pm 0,7$
Caule	$7,6 \pm 0,3$
Folha	$17,3 \pm 0,5$
Fruto	$2,1 \pm 0,2$
Aroeira (acetona) *	$6,1 \text{ mg g}^{-1}$
Aroeira (MeOH)*	$31,2 \text{ mg g}^{-1}$

* Valores encontrados por Queiroz et al., (2002).

Os teores de proantocianidinas variaram significativamente entre as amostras. A folha apresentou maior teor de proantocianidinas; o fruto e a raiz apresentaram menores valores de proantocianidinas.

Não há estudos sobre os teores de proantocianidinas de partes de *C. pubescens*, mas os valores encontrados para fruto e raiz são menores que os valores normalmente encontrados para as madeiras de aroeira, pesquisados por Queiroz et al. (2002), uma vez que a função protetora das proantocianidinas não seria importante para o fruto e a raiz. O caule e as folhas requerem essa proteção uma vez que estão constantemente expostos.

4.5 Análise quantitativa da atividade antioxidante

Um dos métodos para se determinar o potencial antioxidante de uma amostra é o ensaio utilizando o DPPH que avalia a capacidade sequestrante de radicais livres. O DPPH possui forte coloração arroxeadada e ao se reduzir muda sua coloração para amarelo, sendo que está mudança de cor é medida por espectrometria na região do ultravioleta-visível (UV-VIS), mais especificamente em 517 nm. A mudança de cor permite avaliar o desaparecimento do radical livre DPPH em solução devido à formação de espécies mais estáveis.

A partir da leitura das absorbância obtidas para as amostras de concentração conhecida do radical livre DPPH, as quais estão traçadas na curva de calibração, Figura 13.

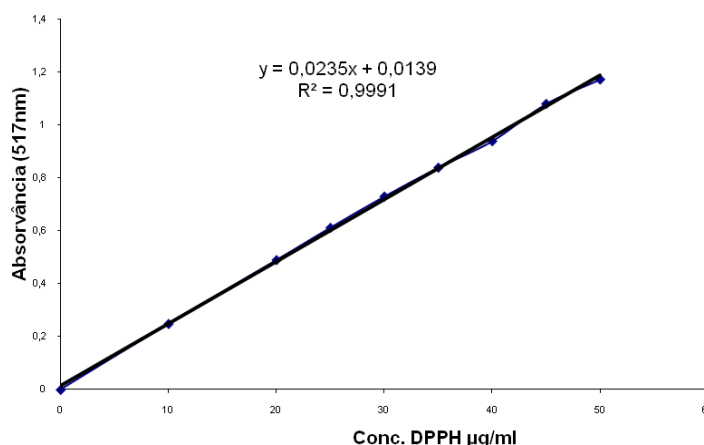


Figura 13: Curva de calibração do DPPH.

Através dos resultados obtidos, traçaram-se gráficos das atividades antioxidantes (AA) em diferentes concentrações ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos extratos em função do tempo para a raiz, caule, folha e fruto (Figuras 14, 16, 18 e 20). A partir das absorbâncias foram construídos os gráficos de consumo de DPPH em função das diferentes concentrações dos extratos da raiz, caule, folha e fruto de *C. pubescens* Figuras 15, 17, 19 e 21.

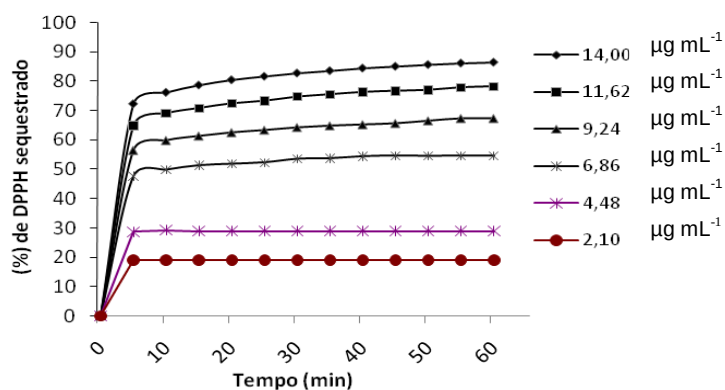


Figura 14: Comportamento cinético do extrato metanólico da raiz frente ao DPPH.

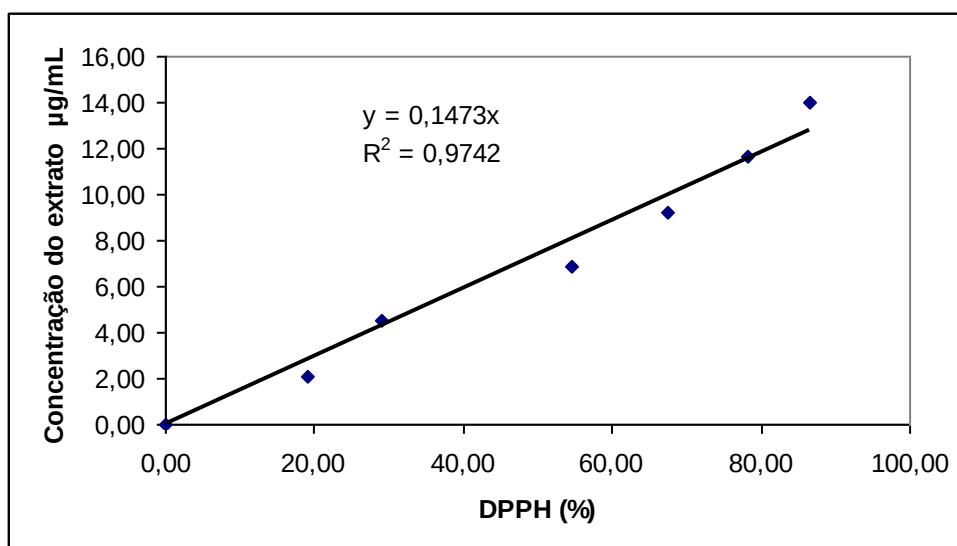


Figura 15: Gráfico de consumo de DPPH em função das diferentes concentrações da raiz.

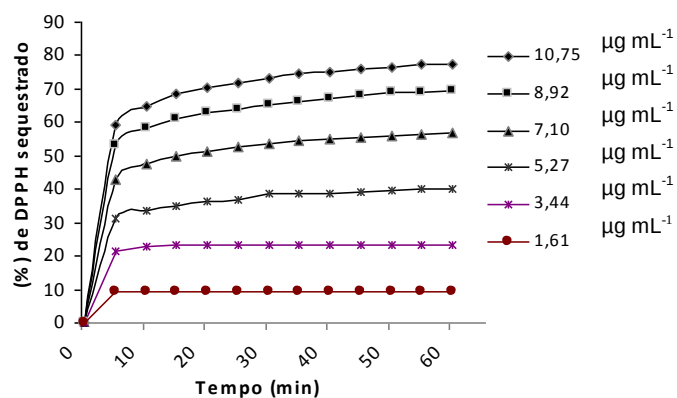


Figura 16: Comportamento cinético do extrato metanólico do caule frente ao DPPH.

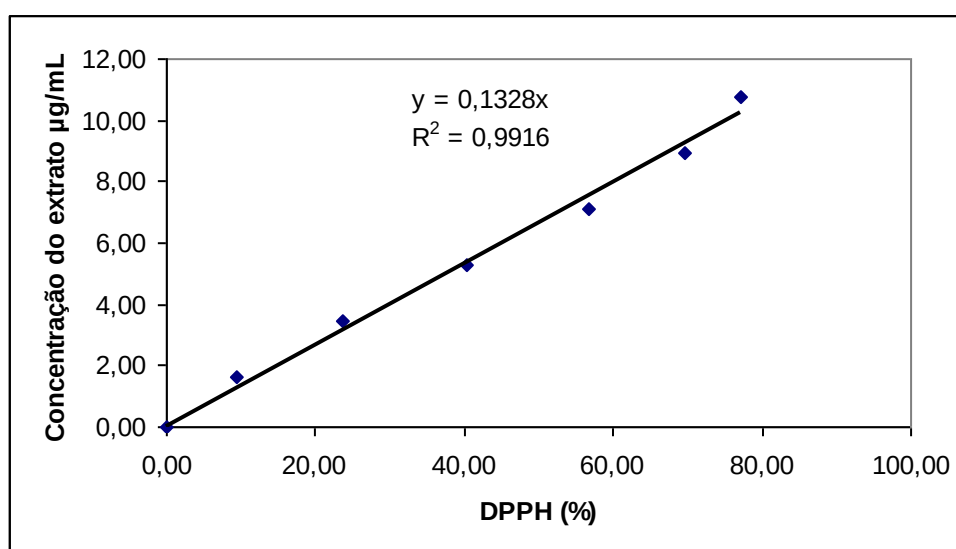


Figura 17: Gráfico do consumo de DPPH em função das diferentes concentrações do caule.

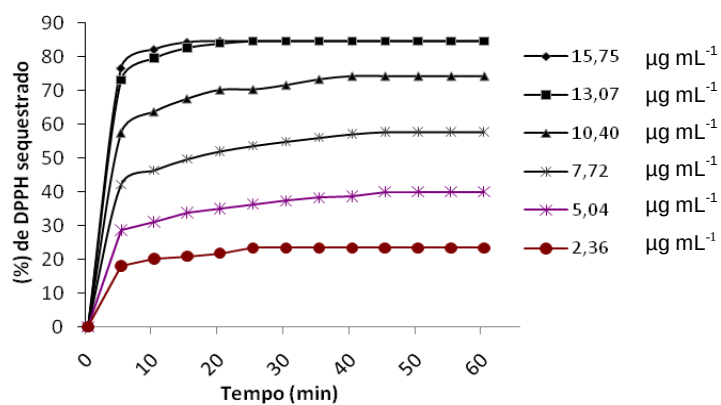


Figura 18: Comportamento cinético do extrato metanólico da folha frente ao DPPH.

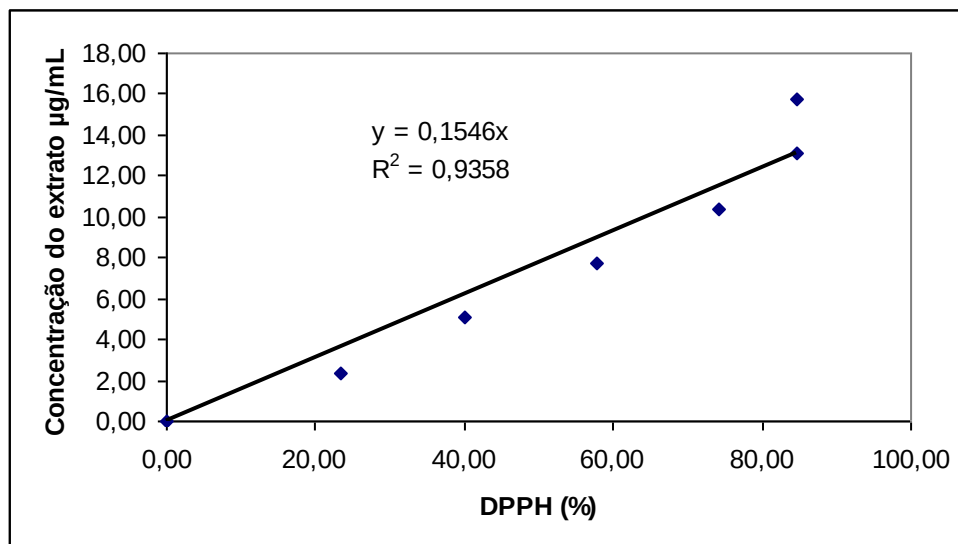


Figura 19: Gráfico do consumo de DPPH em função das diferentes concentrações da folha.

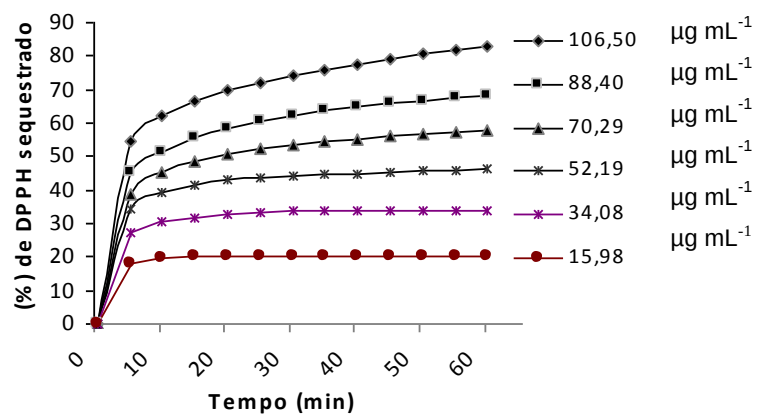


Figura 20: Comportamento cinético do extrato metanólico do fruto frente ao DPPH.

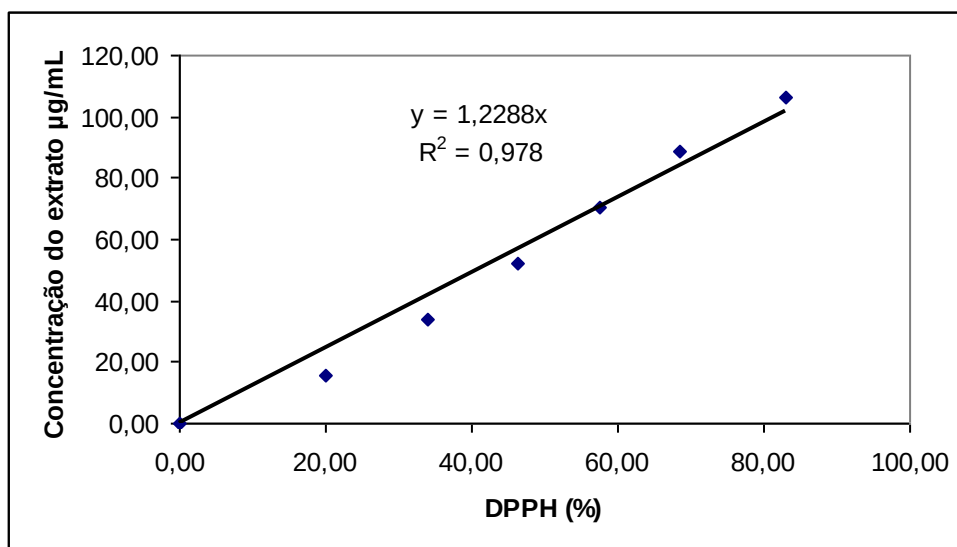


Figura 21: Gráfico do consumo de DPPH em função das diferentes concentrações do fruto.

Os resultados da atividade antioxidante da raiz, caule, folha e fruto de *C. Pubescens* são expressos através da concentração efetiva média CE_{50} , que representa a concentração de amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH.

Tabela 6: Valores de CE_{50} dos extratos metanólico da raiz, caule, folha e fruto de *C. pubescens*.

Amostras	Raiz	Caule	Folha	Fruto	BHT
CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	$8,0 \pm 0,7$	$7,4 \pm 0,6$	$6,6 \pm 1,6$	$56,6 \pm 2,3$	$6,5 \pm 0,1$

De acordo com os resultados obtidos, o extrato metanólico da folha apresentou uma maior capacidade de abstração de radicais livres, seguido do caule e raiz. O fruto também apresentou um bom potencial antioxidante, mas quando comparado com outras partes da planta mostrou uma menor atividade. Ao comparar os resultados obtidos na análise quantitativa da atividade antioxidante com o conteúdo de fenóis presentes nas amostras, observa-se que os resultados são condizentes. Vários estudos mostram que o CE_{50} encontra-se diretamente relacionado com o teor de compostos fenólicos (WANG et al., 2004; CHANG et al., 2001; MAGINA et al., 2010).

O valor de CE_{50} encontrado para o extrato metanólico (raiz, caule, folha e fruto), em relação ao padrão BHT, observou que o extrato metanólico do fruto teve um valor mais alto de CE_{50} . A folha mostrou valor de CE_{50} (6,6) similar ao padrão BHT. Os resultados de CE_{50} encontrados para caule e raiz também são bons em comparação ao padrão BHT.

Na Tabela 7 se encontra os valores de atividade antioxidante de algumas plantas (SOUZA et al., 2007).

Tabela 7: Valores de atividade antioxidante CE₅₀ de outras plantas em µg mL⁻¹.

Amostras	CE₅₀
<i>T. brasilienses</i> (Folhas) “A-mêndoa-Brava”	44,53
<i>T. brasilienses</i> (Casca)	27,59
<i>T. fagifolia</i> (Folhas) “Capitão-do-mato”	42,23
<i>C. macrophylun</i> (Folhas) “Caneleiro”	78,45
<i>Q. grandiflora</i> (Folhas) “Pau-terra-do-cerrado”	50,16
<i>C. prunifera</i> (Raiz) “Carnaúba”	111,14

Comparativamente aos dados da Tabela 7, observou-se que a raiz, caule e a folha apresentam valores de CE₅₀ muito bons e menores do que os encontrados na literatura.

O fruto, que por sua vez, possui baixa quantidade de fenóis totais apresentou um elevado valor de CE₅₀, mas quando comparado com frutos de outras plantas do cerrado, possui valores de CE₅₀ menores do que a Cagaita, Pequi, Araticum e Lobeira (ROESLER, et al., 2007), conforme a Tabela 8.

Tabela 8: Valores de atividade antioxidante CE₅₀ de frutos de outras espécies do cerrado em µg-mL⁻¹.

Amostra	CE₅₀
Cagaita (casca + polpa)	387,47
Pequi (semente+ polpa)	298,75
Araticum (polpa)	148,82
Lobeira (semente + polpa)	162,97

Em um estudo da atividade antioxidante do extrato hexânico para as folhas de *C. pubescens* CARDODO et al. (2008) relataram um baixo efeito de “seqüestro” de radical, mostrando que o método DPPH responde melhor para amostras mais polares. Segundo COUTINHO et al. (2010) ensaios de atividade antioxidante das folhas de *C. adamantium* coletadas em diferentes estações do ano mostraram também baixa atividade antioxidante para extrato hexânico, enquanto que as amostras de extrato de acetato de etila das folhas apresentaram um valor mais elevado. No estudo da determinação de compostos fenólicos e avaliação da capacidade antioxidante das folhas de *C. adamantium* os extratos apresentaram valores de atividade antioxidante

com percentuais de inibição de 52 a 92% para com radical livre DPPH (COUTINHO et al., 2008a; 2009; 2010).

Em um estudo de atividade antioxidante dos frutos e folhas de *C. pubescens* de Campo Grande MS, empregando o radical livre DPPH, os extratos etanólicos dos frutos e folhas apresentaram percentuais de inibição (88,08%; 87,74%; 42,16%) e (88,10%; 85,20%; 47,58%), respectivamente (BRUM et al., 2010). Para os extratos metanólico dos frutos e folhas de *C. pubescens* do cerrado triângulo mineiro, são observados melhores valores de percentuais de inibição (82,90%; 68,41%; 57,65%) para os frutos e (84,63%; 84,23%; 74,18%) as folhas, indicando melhor potencial antioxidante. Para a atividade antioxidante dos extratos metanólico do caule e raiz de *C. pubescens* não foram encontrados estudos na literatura.

4.6 Identificação dos constituintes voláteis por CG-EM

Na literatura foram relatados estudos referentes à análise do óleo essencial relativos às folhas, flores e frutos de *C. pubescens* da região de Campo Grande MS, região Centro Oeste (SILVA et al., 2009a, 2009b; CARDOSO & POPPI, 2009), mas até o momento nenhum relato foi encontrado para o óleo essencial da raiz e caule. Para a região específica do cerrado Mineiro nenhum relato é citado na literatura referente ao estudo químico de óleos essenciais de *C. pubescens*.

A tabela 9 mostra a composição de óleos essenciais da raiz, caule, folha e fruto de *C. pubescens*.

Tabela 9: Composição do óleo essencial de *C. pubescens*.

Compostos	MM	KI	% TIC			
			Raiz	Caule	Folhas	Frutos
1-hexeno	x	x	X	X	2.60	x
But-2-enoato de etila	116	x	X	X	X	1.30
Furfural	96	836	1.07	X	X	X
Hex-3-en-1-ol (Z)	100	859	X	X	X	1.60
Alfa-tujeno	136	930	X	X	1.00	X
Alfa-pineno	136	939	X	1.49	1.70	7.71
Sabineno	136	975	X	X	1.15	X
Beta-pineno	136	979	X	X	0.60	2.65
Beta-mirceno	136	991	X	X	0.68	3.01

Alfa-terpineno	136	1017	X	X	1.97	X
Limoneno	136	1029	X	3.29	1.82	25.98
1,8 Cineol Eucaliptol)	154	1031	X	24.54	8.17	24.57
Trans-beta-ocimeno	136	1050	X	0.61	X	1.98
Gama-terpineno	136	1060	X	0.91	3.69	1.23
Alfa terpinoleno	136	1089	X	X	0.85	X
Linalol	154	1097	X	1.23	X	1.57
Trans-sabineno hidratado	154	1177	X	1.21	5.22	1.16
Alfa-terpineol	154	1189	X	4.31	2.72	6.92
Acetato de Linalila	200	1257	X	0.72	X	X
Gama-elemenno	204	1338	X	X	1.26	X
Acetato de beta terpenila	196	1349	X	4.53	1.10	X
Acetato de alfa terpenila	196	1372	4.13	X	X	X
n.i.	?	1379	1.75	X	X	X
Beta-elemenno	204	1391	1.20	0.64	1.51	X
Trans-cariofileno	204	1419	5.15	2.84	4.98	1.98
Aromadrendeno	204	1441	0.81	X	0.87	X
Alfa-humuleno	204	1455	0.97	X	1.14	0.61
Allo Aromadendreno	204	1460	0.64	X	0.83	X
Alfa amorfeno	204	1475	0.80	X	0.97	X
Germacreno-D	204	1485	9.02	5.07	9.38	0.89
Alfa selineno	204	1494	0.87	X	0.60	X
Biciclogermacreno	204	1500	14.65	7.59	12.54	2.17
Gama-cadineno	204	1514	0.76	X	0.60	X
Delta-cadineno	204	1523	3.21	1.17	2.29	1.45
Germacreno-B	204	1561	1.13	X	0.96	X
Espatuleno	220	1578	10.23	8.36	1.34	2.37
Viridiflorol	222	1590	7.45	4.11	3.59	1.69
n.i.	222	1597	4.74	2.21	3.07	1.64
Eudesmol <5-epi-7epi-alfa>	222	1605	1.01	0.68	0,95	X
n.i.	222	1640	0,98	5.87	X	X
Cubenol <1-epi->	222	1647	1.18	0.83	X	X
n.i.	220,222	1645	6.71	1.91	1.68	X
Cubenol	222	1647	1.18	1.85	3.42	X
n.i	222	1657	8.71	2.89	4.64	1.01
n.i.	222	1660	1.59	1.22	X	X
Hexadecanol	242	1838	0.83	X	X	X
Ácido Hexadecanóico	256	1897	3.85	X	X	X
Total	x	x	94.62	90,08	89.79	93,49

n. i. = não identificado, MM = massa molecular, KI = índice Kovats , TIC = total íons cromatográfico

A composição do óleo essencial presente nas amostras das folhas de *C. pubescens* apresentou 55,36% em sesquiterpenos e os componentes principais foram Bicyclogermacreno (12,54%), Germacreno D (9,38%), Eucaliptol (8,17%) e Trans-sabineno hidratado (5,22%) (Figura 22). Estes resultados contrastam com aqueles encontrados para as folhas de óleo de *C. pubescens* da região de Campo Grandes MS que apresentou 60,3% de monoterpenos e 34,5% de sesquiterpenos e os compostos majoritários foram o Limoneno (22,4%), Alfa-pineno (13,4%) e Sabineno (9,3%) (SILVA et al., 2009a). De acordo com LIMA (2008) essas diferenças ocorrem devido a vários fatores que afetam a composição química dos óleos como clima da região, qualidade do solo, horário de coleta e genético. Em geral a baixa intensidade de luminosidade diminui a produção de monoterpenos e pequenas variações diárias de temperatura estimulam a produção de terpenóides. Na Figura 25 é mostrado cromatograma do óleo essencial da folha de *C. pubescens*.

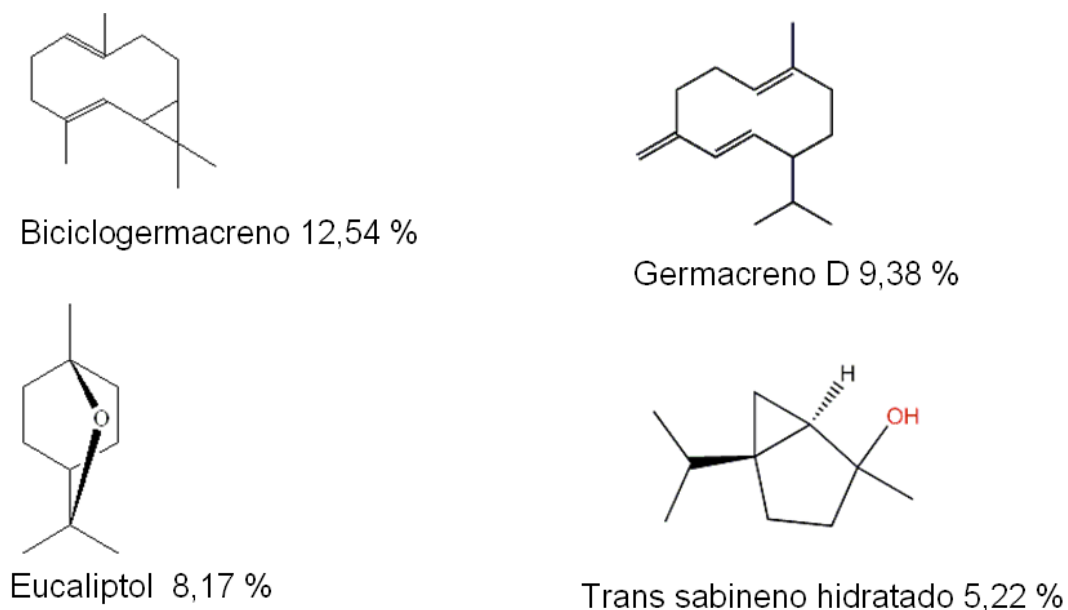


Figura 22: Fórmula estrutural dos compostos majoritários encontrados na folha.

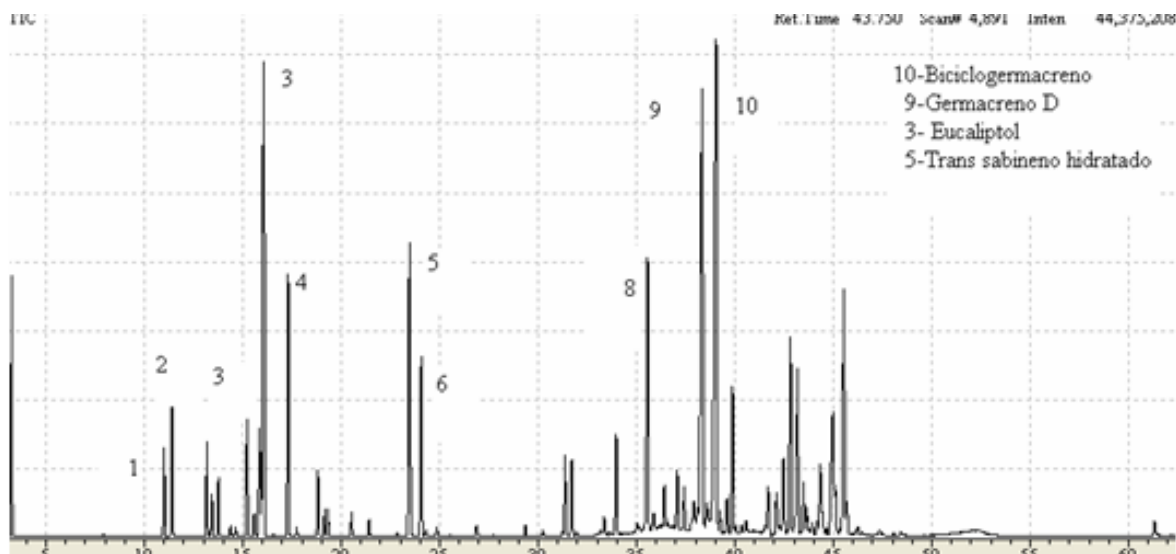


Figura 23: Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial da folha de *C. pubescens*.

O óleo essencial presente na amostra de frutos apresentou maior concentração de monoterpenos (80%), destacando-se Limoneno (25,98%) e Eucaliptol (24,57%), Alfa-pineno (7,71%) e Alfa terpineol (6,92%) (Figura 24). Segundo Vallilo et al. (2006a) a presença de desses compostos no óleo essencial, pode ser um dos fatores responsáveis pelo aroma cítrico observados nos frutos, principalmente o limoneno, o qual é o componente majoritário do óleo volátil em várias espécies de Citrus.

Os resultados encontrados para o óleo essencial do fruto de *C. pubescens* diferem radicalmente daqueles encontrados para o óleo dos frutos do cerrado de Campo Grande que apresentou teores sesquiterpenos 89,5% e apenas 7,9% de monoterpenos, destacando-se Criptomeridiol (14,2%), Espatulanol (6,7%) e Globulol (SILVA et al., 2009b).

A Figura 25 mostra o cromatograma do óleo essencial do fruto de *C. pubescens*.

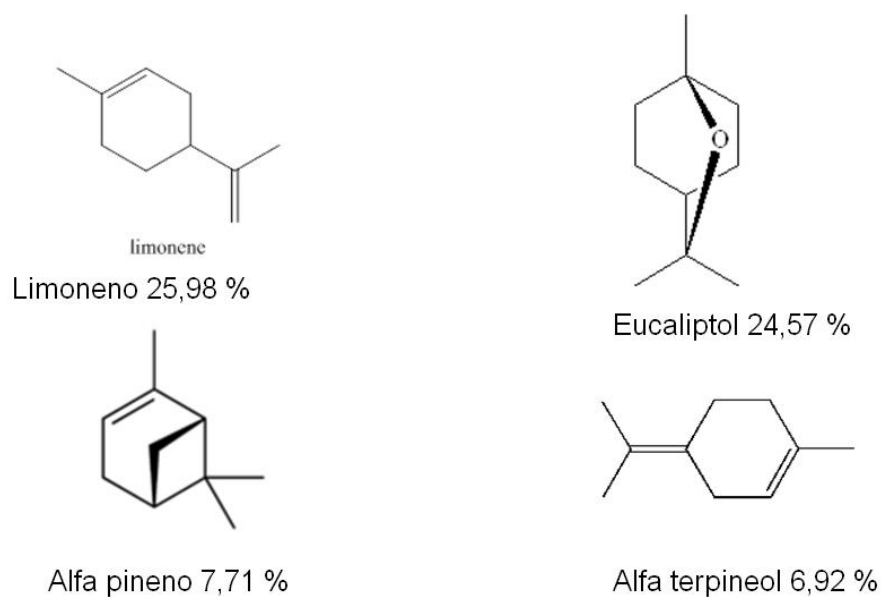


Figura 24: Fórmula estrutural dos compostos majoritários encontrados no fruto.

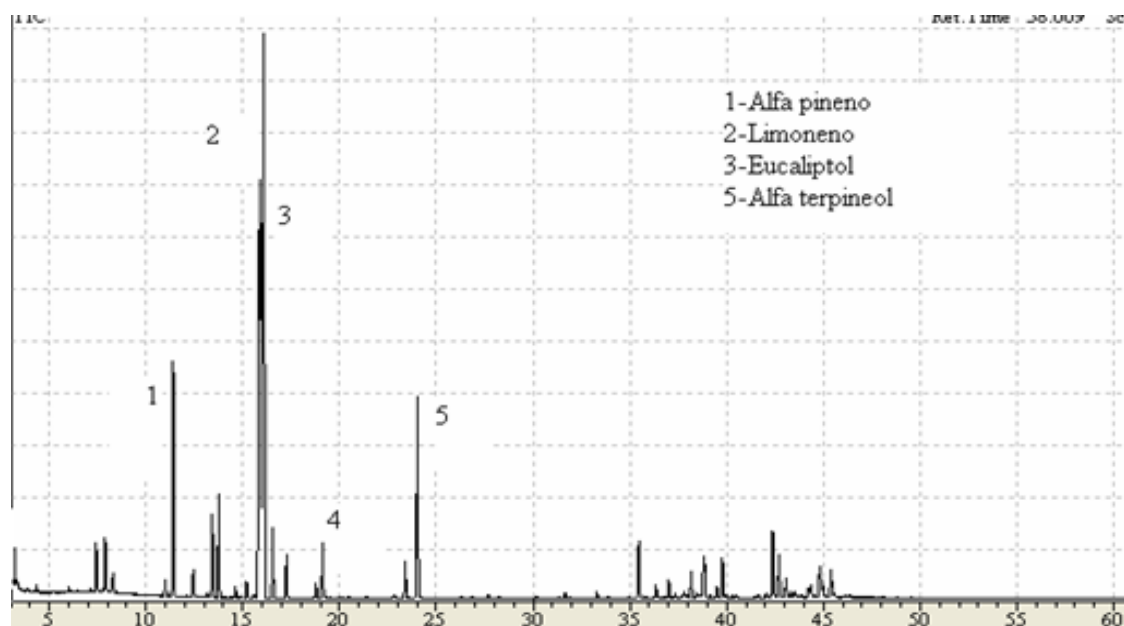


Figura 25: Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial do fruto de *C. pubescens*.

No óleo essencial do caule de *C. pubescens*, os constituintes majoritários foram Eucaliptol (24,54%), Espatulenol (8,36%), Biciclogermacreno (7,59%) e Germa-

creno D (5,07%) (Figura 26). A Figura 27 o cromatograma do óleo essencial do caule.

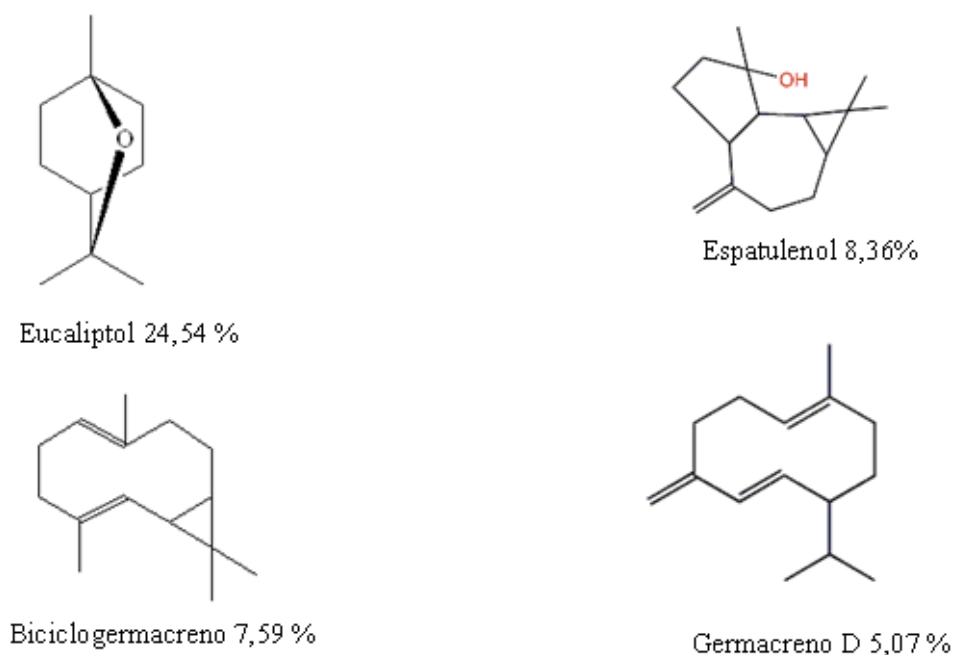


Figura 26: Fórmula estrutural dos compostos majoritários encontrados no caule.

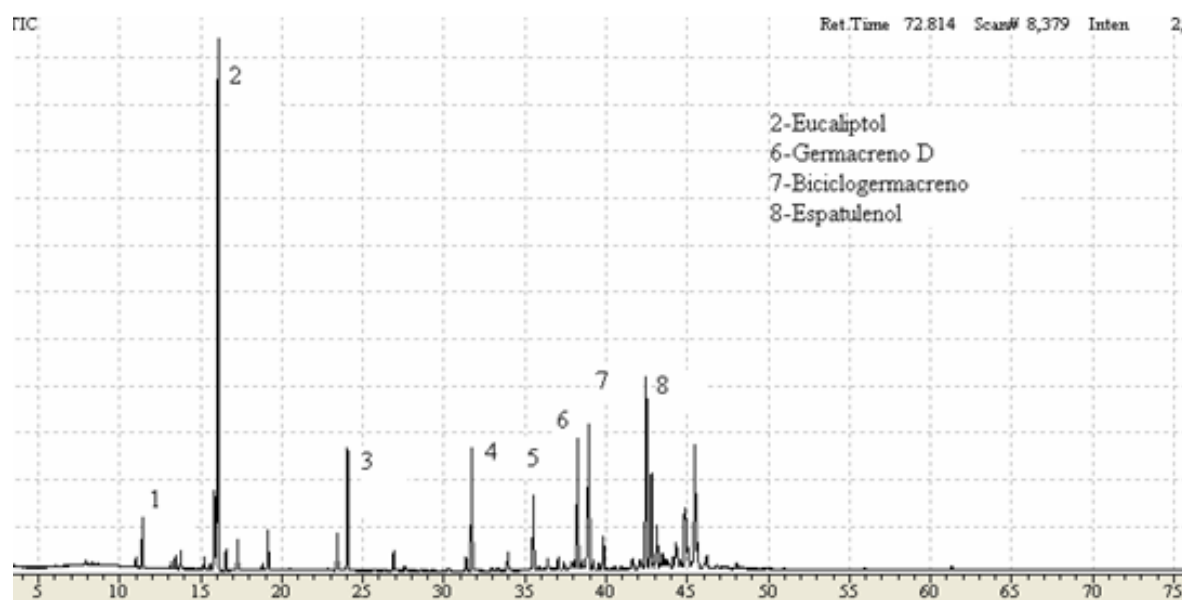


Figura 27: Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial do caule de *C. pubescens*.

O óleo essencial da raiz de *C. pubescens* se destaca dos outros por ter apenas um representante de monoterpênicos (acetato de Alfa-terpenila) e os sesquiterpe-

nos são dominantes. Os componentes principais são Biciclogermacreno (14,65%), Espatuleno (10,23%), Germacreno D (9,02%) e Viridiflorol (7,45%) (Figura 28). O cromatograma do óleo essencial da raiz é mostrado na Figura 29.

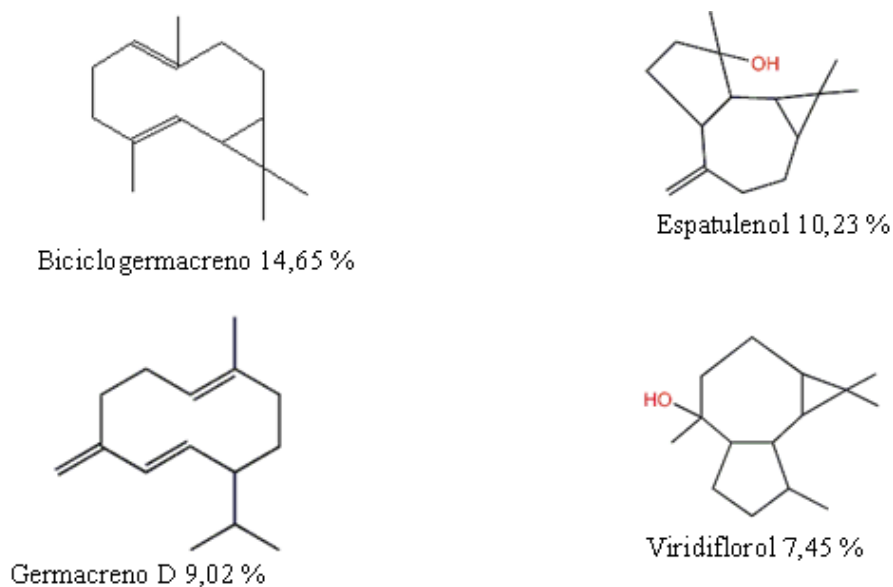


Figura 28: Fórmula estrutural dos compostos majoritários encontrados na raiz.

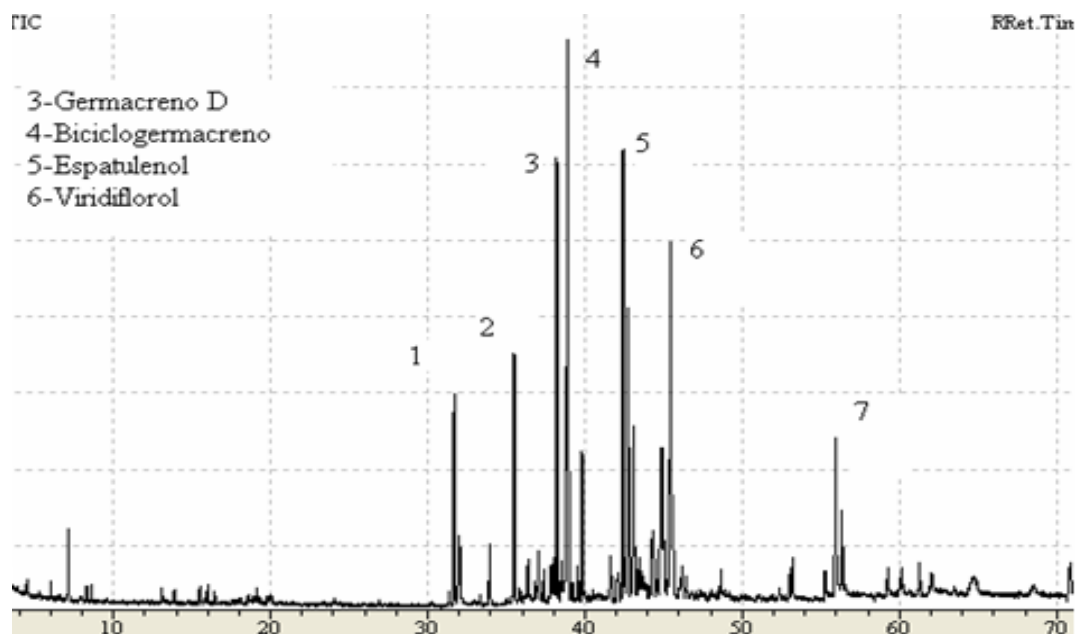


Figura 29: Cromatograma (CG-EM) do óleo essencial da raiz de *C. pubescens*.

Finalmente é importante ressaltar que os perfis do cromatograma são muitos semelhantes, apenas variações nas concentrações são observadas.

A Tabela 10 encontra-se os compostos voláteis majoritários presentes em várias partes da planta.

Tabela 10: Compostos voláteis majoritários presentes na folha, fruto, caule e raiz.

Componente	Folha %	Fruto %	Caule %	Raiz %
Alfa pineno	1,70	7,71	1,49	Ausente
Limoneno	1,82	25,98	3,29	Ausente
Eucaliptol	8,17	24,57	24,54	Ausente
Trans - sabineno Hidratado	5,22	1,16	1,21	Ausente
Alfa terpineol	2,72	6,92	4,31	Ausente
Germacreno D	9,38	0,89	5,07	9,02
Biciclogermacreno	12,54	2,17	7,59	14,65
Espatulenol	1,34	2,37	8,36	10,23
Viridiflorol	3,59	1,69	4,11	7,45

Dos componentes encontrados no óleo essencial do fruto, o Limoneno, está presente em maior porcentagem, este já vêm sendo amplamente utilizado nas indústrias de alimento, aliado ao interesse da aplicação de aroma natural em vez dos sintéticos (JÚNIOR & PASTORE, 2007). O óleo essencial da folha, o Biciclogermacreno é o constituinte majoritário. No caule, o Eucaliptol é o constituinte em maior porcentagem. O Eucaliptol é usado em aplicações de aromaterapia, solvente industrial e comercial, bem como o potencial para controle de insetos e ervas daninhas de forma ambientalmente aceitável, além de sua utilização já existente em produtos farmacêuticos (BARTON, 2011). De acordo com a Tabela 10, na raiz os constituintes majoritários foram os sesquiterpenos Germacreno D, Biciclogermacreno, Espatulenol e Viridiflorol.

4.7 Atividade antimicrobiana

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada, utilizando o método da microdiluição em caldo, objetivando a determinação da concentração inibitória mínima dos óleos essenciais da raiz, caule, folha e fruto de *Campomanesia pubescens* testados. Outras técnicas poderiam ter sido empregadas para avaliar a susceptibilidade dos microrganismos frente às amostras dos óleos. Entretanto, o método da diluição em caldo é considerado a melhor opção segundo trabalho realizado, comparando quatro diferentes técnicas mais comumente utilizadas nos laboratórios para avaliação de atividade antimicrobiana (ALVES et al., 2008).

Os óleos essenciais da raiz, caule, folha e fruto da gabioba (*C. pubescens*) apresentaram atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo, diante dos microrganismos indicadores aeróbios e anaeróbios avaliados. Os resultados estão apresentados na Tabela 11.

Tabela 11: Resultados das concentrações inibitórias mínimas para os óleos essenciais da gabioba.

AMOSTRAS	Resultados - µg/mL						
	ANAERÓBIAS		AERÓBIAS				
	<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	<i>E. faecalis</i> ATCC 4082	<i>S. mitis</i> ATCC 49456	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43717
Óleo do Fruto	250	125	1.000	> 2.000	500	500	2.000
Óleo da Folha	500	125	1.000	2.000	500	500	1.000
Óleo do Caule	500	1.000	> 2.000	> 2.000	2.000	> 2.000	> 2.000
Óleo da Raiz	62,5	250	>2.000	>2.000	2.000	>2.000	>2.000
CONTROLE Clorexidina	0,0922	0,1844	0,3688	7,375	0,3688	0,0922	14,75

Os resultados da presente investigação indicam que os óleos essenciais da espécie *C. pubescens* possuem atividade antibacteriana frente às bactérias bucais

aeróbias e anaeróbias avaliadas. As concentrações inibitórias mínimas (CIM's) para os óleos essenciais estiveram entre 62,5 e 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as bactérias anaeróbias e entre 500 superior a 2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as bactérias aeróbias.

Os óleos essenciais foram mais ativos frente às bactérias anaeróbias, pois apresentaram menores valores de concentrações inibitórias mínimas quando comparado às aeróbias. Todos os óleos foram ativos frente às bactérias anaeróbias. Diante dos valores de CIM o óleo da raiz foi o mais ativo frente a *F. nucleatum* com uma concentração inibitória de 62,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Já os óleos essenciais do fruto e da folha exibiram CIM de 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a *B. fragilis*.

Com relação aos aeróbios, os valores de CIM variaram entre 500 e 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Dos óleos testados, o da folha foi o mais ativo, com inibição de todos os microrganismos indicadores avaliados e com as mais baixas concentrações inibitórias. O óleo do caule foi o menos ativo nas concentrações testadas, apresentando inibição somente contra *S. mitis* (2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A bactéria mais resistente aos óleos testados foi a *E. faecalis* com CIM de 2.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Segundo BAJPAI et al. (2007), alguns óleos essenciais possuem maior atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (aeróbias), pois as bactérias anaeróbias Gram-negativas apresentam uma bicamada fosfolipídica na sua parede celular, sendo mais resistentes. Os resultados deste trabalho são discordantes e mostram a relevância dos valores encontrados uma vez que, os óleos foram mais ativos frente às anaeróbias. A atividade antibacteriana dos óleos de *C. pubescens* pode estar relacionada com a presença de compostos terpênicos identificados por CG-EM, principalmente de monoterpenos e sesquiterpenos. É possível que existam, outros compostos presentes nos óleos que estejam contribuindo com o efeito antimicrobiano dos mesmos e até favorecendo interações sinérgicas. Alguns compostos que foram encontrados em alta concentração nos óleos de *C. pubescens*, já foram relatados na literatura com altos potenciais antimicrobianos como: linalol, α -pineno, β -pineno, espatulenol, limoneno e eucaliptol (1,8 Cineol) (SONBOLI et al 2006).

Poucos estudos com atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a bactérias bucais, foram encontrados na literatura.

Em um estudo de atividade antibacteriana com óleos voláteis de *Lippia sidoides* frente às bactérias aeróbias bucais foi encontrado valores de CIM iguais a 5.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para *S. mutans* e 10.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os microrganismos *S. mitis*, *S. sanguinis* e *S. salivarius* (BOTELHO et al., 2007). No mesmo trabalho foi determinado a

CIM para os compostos timol e carvacrol, com valores de 5000 e 2500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. Para os óleos da raiz, caule, folhas e frutos de *C. pubescens* foram observados menores valores de CIM tanto para o óleo de *Lippia sidoides* como para as substâncias puras timol e carvacrol, indicando maior efeito antibacteriano. Em outro estudo com o óleo essencial da espécie *Satureja Khuzistanica Jamzad* contra os microrganismos bucais *E. faecalis*, *S. mutans* e *S. sanguinis* foram encontrados concentrações inibitórias de 310 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (SEGHATOLESLAMI et al., 2009).

Com relação a outros tipos de bactérias citam-se os trabalhos de atividade antimicrobiana. Ensaio de atividade antimicrobiana do óleo essencial da folha e raiz de *Espeletia angustifolia* Cuatrec, foram observados atividade apenas contra bactérias Gram-positivas. Os valores de CIM determinados para *S. aureus*, ambos de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para raiz e folha e *E. faecalis* de 240 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a raiz e 360 $\mu\text{g mL}^{-1}$, folhas (MECCIA et al., 2007).

Estudo dos compostos voláteis das folhas de *Myrciaria tenella*, frente a oito linhagem de bactérias foi realizada a atividade antimicrobiana, sendo que o óleo volátil apresentou maior efeito contra a *Enterobacter* sp. e *Shigella flexnerii*. A primeira é responsável por infecções nasocorinais e urinárias. Já a segunda é responsável pela shigelose, que causa diarreia hemorrágica, infecção e ulcerações gastrintestinais (SCHENEIDER et al 2008).

Outro estudo foi avaliado, a atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., (Alfavaca), demonstrou atividade antibacteriana frente a todas as bactérias testadas, em destaques a atividade verificada frente às cepas resistentes de *E. faecalis*, *S. aureus* e *Escherichia coli*. Os valores obtidos de CIM variaram respectivamente, entre 500 - 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para bactérias Gram-positivas e 1000 – 2000 para as Gram-negativas (SILVA et al., 2010).

Diante das comparações dos valores de CIM com óleos essenciais de outros vegetais é possível afirmar que óleos da raiz, caule, folhas e fruto de *C. pubescens* exibiram importante efeito antimicrobiano. Além disso, Aligianis et al. (2001) propuseram uma classificação para materiais vegetais com base nos resultados de CIM, considerando como: forte inibição CIM até 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$; inibição moderada CIM entre 600 e 1500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e como fraca inibição CIM acima de 1600 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Diante desta classificação pode-se considerar que os óleos de *C. pubescens* evidenciaram

forte efeito antimicrobiano, uma vez que, a maioria das bactérias testadas sofreram inibição com CIM entre 62,5 e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Portanto, os óleos essenciais de *Campomanesia pubescens* podem vir a ser empregados como uma alternativa natural em soluções antissépticas bucais na prevenção de doenças causadas por patógenos orais, visto que os óleos apresentaram relevante atividade contra bactérias gram-positivas e gram-negativas.

5. Conclusões

- O alto teor de fenóis totais encontrados na raiz, caule, folha e fruto da gabi-roba pilosa, fazem dessa planta uma excelente fonte natural de antioxidantes.
- A atividade antioxidante foi evidenciada pelo método de DPPH, o fruto apre-sentou um bom potencial antioxidante em comparação a frutos de outras plantas do cerrado. O extrato metanólico da folha apresentou atividade antio-xidante (CE_{50}) satisfatório em relação ao padrão BHT. Os extratos da raiz e caule evidenciaram, também, boa atividade antioxidante.
- O óleo volátil do fruto apresentou de altas concentrações de Limoneno, Euca-liptol, Alfa Pineno e Alfa Terpeneol. Na folha os constituintes majoritários do óleo essencial foram Bicyclogermacreno, Germacreno D, Eucaliptol e Trans-sabineno hidratado. No óleo essencial do caule os principais componentes fo-ram Eucaliptol, Espatulenol e Bicyclogermacreno e no óleo da raiz os sesqui-terpenos foram os constituintes dominantes.
- Os estudos da atividade antimicrobiana do óleo essencial revelaram inibição contra bactérias gram-positiva e gram-negativa. O óleo da raiz apresentou menor valor de CIM ($62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$) para a bactéria *F. nucleatum*. Os resulta-dos de CIM para o fruto e folha, mostram que os óleos essenciais possuem efeito antibacteriano com maior atividade frente às bactérias anaeróbias, com menores valores de CIM, ($125 \mu\text{g mL}^{-1}$) fruto e folha para a bactéria *B. fragi-lis*.
- Os bons resultados da atividade antimicrobiana para o óleo essencial da gabi-roba pilosa indicam que a planta apresenta potencial antimicrobiano que pode ter aplicabilidade na produção de novos agentes terapêuticos que atuam na prevenção de doenças bucais.

6. Referências

AAS, J. A.; PASTER, J. B.; STOKES, N. L.; OLSEN, I.; DEWHIRST, E. F. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **J. Clin. Microbiol.**, v. 43, p. 5721-5732, 2005.

ABIHPEC-Associação Brasileira das Indústrias de Higiene Pessoal, Cosméticos e Perfumaria. <http://www.abihpec.org.br/dadosdomercado_panorama_setor.php>. Acesso em: 20 maio. 2011.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. Carol Stream, USA, Allured Publishing Corporation, p. 456. 2001.

ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CHINO, J. B.; Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two *Origanum* species. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, p. 4168-4170, 2001.

ALVES, E. A.; VINHÓLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substância puras de *Miconia*. **Quim. Nova**, v. 31, p. 1224-1229, 2008.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 48 suppl. S1. p. 5 -16, 2001.

ARAÚJO, P. W. B.; JUNIOR, L. J. Q.; VASCONCELOS, H. D.; ALMEIDA R. G. S. Flavonóides e hipertensão. **Rev. Bras. Hipertens.** v.12, n. 3, p. 188-189, 2005.

ARGOLO, A. C.; SANTANA, A. E. G.; PLETSCH, M.; COELHO, L. C. B. B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresour. Technol.**, v. 95, n. 2, p. 229-233, 2004.

BAJPAI, V. K.; RAHMAN, A.; CHOI, U. K. ; YOUN, S. J. ; KANG, S. C. Inhibitory parameters of the essential oil and various extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu to reduce food spoilage and food-borne pathogens. **Food Chem.**, v. 105, n.3, p. 1061-1066, 2007.

BARTON, A. Industrial uses of Eucalyptus oil. Division of Science and Engineering-Chemistry, Murdoch University, Murdoch 6150 – Disponível em: <http://www.oilmallee.org.au/images/uploads/Documents/industrial_use_of_eucalyptuc_oil_pr_of_by_allan_barton_murdoch_univ>. Acesso em jul. 2011.

BIAVATTI, M. W.; FARIAS, C.; CURTIUS, F.; BRASIL, L. M.; HORT, S.; SCHUSTER, L.; LEITE, S. N.; PRADO, S. R. Preliminary studies on *Campomanesia xanthocarpa* (Berg.) and *Cuphea carthagenensis* (Jacq.) J. F. Macbr. Aqueous extract: weight control and biochemical parameters. **J. Ethnopharmacol.** v. 93, n. 2-3, p. 385-389, 2004.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; RESENDE C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 32, n.3, p. 588-594, 2009.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Braz. Journ. of Medical and Biol. Research**, v.40, n. 3, p. 349-356, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 28, n. 1, p.25-30, 1995.

BRUM, C. S.; CARDOSO, C. A. L. **Avaliação da composição, da toxicidade e das atividades antimicrobianas e antioxidante de extratos etanólicos das folhas e frutos de *Campomanesia pubescens*.** Anais do 7^o ENIC v. 1, n.1 <<http://periodicos.uems.br/index.php/enic7/issue/current>>. Acesso em: 20 jan. 2010.

CARDOSO, C. A. L.; RE-POPPI, N.; Identification of the volatile compounds of flower oil of *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae). **J. Essent. Oil Res.** v. 21, n. 5, p. 433-434, 2009.

CARDOSO, C. A. L.; SALMAZZO, G. R.; HONDA, N. K.; PRATES, C. B.; VIEIRA, M. C.; COELHO, R. G. Antimicrobial activity of the extracts and fractions of hexanic species (Myrtaceae). **J. Med. Food**, v. 13, n. 5, p. 1273-1276, 2010a.

CARDOSO, C. A. L.; SILVA, J. R. M.; KATAOKA, V. M. F.; BRUM, C. S.; POPPI, N. R. Avaliação da atividade antioxidante, toxicidade e composição química por CG-EM do extrato hexânico das folhas de *Campomanesia pubescens*. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v. 29, n. 3, p. 297-301, 2008.

CARDOSO, C. L.; KATAOKA, V. M. R.; POPPI, N. Identification of the volatile compounds of flowers *Campomanesia sessiflora* O. Berg and *Campomanesia xanthocarpa* O. Berg. **J. Essent. Oil Res.** v. 22, n. 3, p. 254-256, 2010b.

CARDOSO, C. M. V.; SAJO, M. G. Nervação foliar em espécies brasileiras de Myrtaceae Adans. **Acta Bot. Bras.**, v. 20, n. 3, p. 657-669, 2006.

CHANG, R. **Análises dos compostos fenólicos da madeira do *E. grandis* e do *E. urophilla* do triângulo mineiro.** 2000. 75 p. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

CHANG, S. T.; WU, J. H.; WANG, S. Y.; KANG, P. L.; YANG, N. S.; SHYUR, L. F.; Antioxidant activities of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. **J. Agric. Food Chem.**, v.49, n. 7, p. 3420-3424, 2001.

CLARK, W. B.; BAMMANN, L. L.; GIBBONS, R. J. Comparative estimates of bacterial affinities and adsorption sites on hydroxyapatite surfaces. **Infect. Immun.**, v. 19, p. 846-853, 1978.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE; *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard - M7-A7*, ed. 7, vol. 26, 2006.

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE; *Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, approved standard – M11-A7*, ed. 7, vol. 27, 2007.

COUTINHO, I. D.; COELHO, R. G.; KATAOKA, V. M. F.; HONDAL, N. K.; SILVA, J. R. M.; VILEGAS, W.; CARDOSO, C. A. L. Determination of phenolic compounds and evaluation of antioxidant capacity of *Campomanesia adamantium* leaves. **Ecl. Quím.**, v. 33, n. 4, p. 53-60, 2008a.

COUTINHO, I. D.; CARDOSO, C. A.; RE-POPPI, N.; MELO, A. M.; VIERA, M. C.; HONDAL, N. K.; COELHO, R. G. Gas chromatography – mass spectrometry (GC-MS) and evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of essential oil of *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Guavira). **Braz. Journ. Pharm. Sciences**, v.45, n. 4, p. 767-776, 2009.

COUTINHO, I. D.; KATAOKA, V. M. F.; HONDA, N. K.; HONDAL, N. K.; COELHO, R. G.; VIERA, M. C.; CARDOSO, C. A. L. Influência da variação sazonal nos teores de flavonóides e atividade antioxidante das folhas de *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg Myrtaceae. **Rev. Bras. Faramacognosia**, v. 20, n. 3, p. 322-327, 2010.

COUTINHO, I. D.; RE-POPPI, N.; CARDOSO, C. L. Identification of the volatile compounds of leaves and flowers in guavira (*Campomanesia adamantium* O. Berg). **J. Essent. Oil Res.** v. 20, n. 5, p. 405-407, 2008b.

DAFERRA, D. J. ; ZIOGAS, B. N. ; POLISSIOU, M. G. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 48, n. 6, p. 2576-81, 2000.

DE LORENZO, J. L. **Microbiologia para o estudante de odontologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. 671 p.

DUARTE, M. C. T.; Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiência**, v.7, n. 10, p. 1-16, 2006.

DUARTE, M. C. T.; FIGUEIRA, G. M.; PEREIRA, B.; MAGALHÃES, P. M.; DELAR-MELINA, C. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcolicos de espécies da coleção de plantas medicinais CPQBA/UNICAMP. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 14, supl. 01, p. 06-08, 2004.

DUARTE, W. F.; DIAS, D. R.; PEREIRA, G. V. M.; GERVASIO, I. M.; SCHWAN, F. R. Indigenous and inoculated yeast fermentation of gabioba (*Campomanesia pubescens*) pulp for fruit wine production. **J. Ind. Microbiol. Biotechnol.** v. 36, n. 4, p. 557-569, 2009.

EFRAIM, P. **Estudo para minimizar as perdas de flavonóides durante a fermentação de cacau para produção de chocolate**. 2004. 114 p. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, Campinas.

EVARISTO, I. M. ; LEITÃO, M. C. Identificação e quantificação por DAD-HPLC, da fração fenólica contida em folhas de *Quercus suber* L. **Silva Lus.** v. 9, n. 2, p. 135-141, 2001.

FERRI, P. H. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência – um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Fundação Editora Unesp, 1996. Cap.10, p. 129-156.

FRANCO, M. R. B.; RODRIGUEZ-AMAYA,D.; LANÇAS, F. M. Compostos voláteis de três cultivares de manga (*Mangifera indica* L.). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 2, p. 165-169, 2004.

GIASSON, B. I.; ICHIROPOULOS H.; LEE, V. M.; TROJANOWSKI J. Q. The relationship between oxidative/nitrative stress and pathological inclusions in Alzheimer's and Parkinson's diseases. **Free Radic. Biol. Med.** v. 12, n 12, p. 1264-1275, 2002.

GONÇALVES, J. H. HAMM.; MANICA-BERTO, R.;CONTREIRA, C. L.; PEGORARO, C.; RUFATO, A. R.; SILVA, J. A. Estudo fitoquímico em frutos da família myrtaceae. **XVIII CIC XI ENPOS I MOSTRA CIENTIFICA FAEM/UFPel** 2009.

GUERRERO, F. M. G.; ZIMMERMAN, L. R.; CARDOSO, E. V.; CARDOSO de LIMA, C. A.; PERDOMO, R. T.; CAROLLO, C. A.; GUERRERO, A. T. Investigação da toxicidade crônica das folhas de guavira (*Campomanesia pubescens*) em ratos machos. **Rev. Fitos**, v. 5, n. 2, p. 64-72, 2010.

IGNAT, I.; IRINA, V.; POPA, V. I.; A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chem.**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.

JACOBSON, T. K. B.; GARCIA, J.; SANTOS, S. C.; DUARTE, J. B.; FARIAS, G. J.; KLIEMAN, H. J. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron spp.*). **Pesq. Agropec. Trop.** v. 35, n. 3, p. 163-169, 2005.

JUNIOR, M. R. M.; PASTORE, G. M.; Biotransformação de limoneno: uma revisão das principais rotas metabólicas. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, 382 – 387, 2007.

KEVERS, C.; PINCEMAIL, J.; TABART, J.; DEFRAIGNE, J. O.; DOMMES, J.; Influence of cultivar, harvest time, storage conditions, and peeling on the antioxidant capacity and phenolic and ascorbic acid contents of apples and pears. **J. Agric. Food Chem.**, v. 59, n. 11, p. 6165-6171, 2011.

KUSKOSKI, E. M.; ASUERO, A. G.; MORALES, M. T. FETT, R. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianidinas. **Ciênc. Rural**, v. 36, n. 4, p. 1283-1287, 2006.

LIMA, R. K. **Óleos essenciais de *Myristica fragans* Houtt e de *Salvia microphylla* H.B.K.: caracterização química, atividade biológica e antioxidante.** 2008. 144 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Lavras, Lavras.

LIMA, V. L. A. G.; MELO, E. A. .; LIMA, D. E. S.; Fenóis totais e carotenóides totais em pitanga. **Sci. Agríc.** v. 59, n.3, p. 447-450, 2002.

LIMA, V. L. A. G.; PINHEIRO, I. O.; NASCIMENTO, M. S.; GOMES, P. B.; GUERRA, N. B. Identificação de antocianidinas em acerolas do banco ativo de germoplasma da Universidade Federal Rural de Pernambuco. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 4, p. 927-935, 2006.

LIN, C.; CHEN, C.; LEE, H.; LIN, J. Prevention of celular ROS damage by isovitexin and related flavonoids. **Planta Med.** v. 68, n. 4, p. 365-367, 2002.

LINDHE, J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral.** 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1999. 720 p.

LORENZI, H. & SOUZA, W.C 2008. **Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**, baseado em APG II . Editora Plantarum. 2ª Ed. 640p.

MACHADO, H.; NAJEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Bol. Cent. Biol. Reprod.** v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.

MAGALHÃES, C. G. **Efeito do stress hídrico sobre a composição química e atividade antimicrobiana do óleo essencial de três espécies de *Leptospermum* Forst J. R. Forst & G. Forst (Myrtaceae)**. 2008. 60 p. Dissertação (mestrado- Pós – Graduação em Agroquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.

MAGINA, M. A.; GILIOLI, A.; MORESCO, H. H.; COLA, G.; PIZZOLATTI, M. G.; BRIGHENTE, I. M. C. Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae). **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 29, n. 3, p. 376-382, 2010.

MAIA, G. A.; SOUSA P.H.M.; LIMA, A.S. 2007. **Processamento de sucos de frutas tropicais**. Fortaleza: Edições UFC, 2007, 320 p.

MALACRIDA, C. R.; MOTA, S. da. Compostos fenólicos totais e antocianidinas em suco de uva. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 25, n. 4, p. 659-664. 2005.

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of *salivary immunoglobulin A*. **Microbiol. Mol. Biol. Rev.**, v. 62, p. 71-109, 1998.

MARKMAN, B. E. O.; BACCHI, E. M.; KATO, E. T. M. Antiulcerogenic effects of *Campomanesia xanthocarpa*. **J. Ethnopharmacol.** v. 94, n. 1, p. 55-57, 2004.

MARSH, P. D. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life style. **J. Clin. Periodontol**, v. 32, supl. 6, p. 7-15, 2005.

MECCIA, G.; ROJAS, L. B.; VELASCO, J.; DIAZ, T.; USUBILLAGA, A. Composition and antibacterial screening of the essential oils of leaves and roots of *Espeletia angustifolia* Cuatrec. **NPC** v. 22, n. 12, p. 1221-1224, 2007.

MELCHIOR, S. J.; CUSTÓDIO, C. C.; MARQUES, T. A.; NETO, N. B. M. Colheita e armazenamento de sementes de gabioba (*Campomanesia adamantium* Camb. – Myrtaceae) e implicações na germinação. **Rev. bras. Sementes**, v. 28, n. 3, p. 141-150, 2006.

MELO, E. A. DE MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G. de.; NASCIMENTO, R. J. do. Capacidade antioxidante de frutas. **Rev. Bras. Ciência farm.** v. 44, n.2, p. 193-201, 2008.

MINISTERIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **CultivaWeb**. Disponível em: http://marsv103.agricultura.gov.br/proton/cultivarweb/cultivares_registradas.php?acao=pesquisar&postado=1&cod_pagina=1&first=G Acesso em: 31 de mar. 2009.

MORAIS, P. O.; LOMBARDI, J. A. A família Myrtaceae na reserva particular do patrimônio natural da Serra do Caraça, Catas Altas, Minas Gerais, Brasil. **Lundiana**, v.7, n.1, p. 3-32, 2006.

MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; NASCIMENTO, P. M.; NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café conilon submetido à diferente grau de torra. **Quim. Nova**, 2009, v. 32, n. 2, 327-331.

NANDAKUMAR, V.; SINGH, T.; KATIYAR, S. K.; Multi-targed prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. **Cancer Lett.**, v. 269, n. 2, p. 378-387, 2008.

NARAIN, N.; ALMEIDA, J. N.; GALVÃO, M. S.; MADRUGA, M. S.; BRITO, E. S. Compostos voláteis do fruto do maracujá (*Passiflora edulis* forma Flavicarpa) e de cajá (*Spondias mombin* L.) obtidos pela técnica de headspace dinâmico. **Cienc. Tecnol. Aliment.**, v. 24, n. 22, p. 212-216, 2004.

PEDRIALI, C. A. **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidante**. 2005. 127 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). USP - Faculdade de Ciências Farmacêuticas (FCF).

PEIXOTO, N.; SILVA, E. S.; TEIXEIRA, F. G.; Moreira, F. M.; **Avaliação do crescimento inicial de populações de gabioba**. In: III Seminário de Iniciação Científica e I Jornada de Pesquisa e Pós Graduação, 2005, Anápolis - GO. III Seminário de Iniciação Científica e I Jornada de Pesquisa e Pós Graduação - Suplemento CD-ROM, 2005.

PERIOTTO, F. **Aspectos da germinação de sementes, da emergência de plântula e da morfologia dos frutos e sementes de *Campomanesia pubescens* (DC). O. Berg (myrtaceae)**. 2008. 87 p. Tese (Doutorado) - Universidade Federal de São Carlos, São Carlos.

QUEIROZ, C. R. A. A.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Rev. Árvore**, vol.26, n.4, p. 493-497, 2002.

RAMOS, D. D.; CARDOSO, C. A. L.; YAMAMOTO, N. T. Avaliação do potencial citotóxico e atividade antioxidante em *Campomanesia adamantium* (Cambess.) O. Berg (Myrtaceae). **R. bras. Bioci.** v. 5, supl. 2, p. 774-776, 2007.

REZENDE, A. A. A. **Efeito protetor de proantocianidinas de sementes de *Vedes vinifera* L. (Vitaceae) contra efeitos genotóxicos do cloridrato de doxorubicina, em células somáticas de *Drosophila melanogaster***. 2008. 54 p. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica). Instituto de Genética e Bioquímica - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **J. Ethnopharmacol.** v. 100, n. 1-2, p. 80-84, 2005.

ROBARDS, K.; PRENZLER, P. D.; TUCKER, G.; SWATSITANG, P.; GLOVER, W. Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. **Food Chem.**, v. 66, n. 66 p. 401-436 1999.

ROESLER, R.; MALTA, L. G. CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v.27, n. 1, p. 53-60, 2007.

SCHENEIDER, N. F. Z.; MOURA, N. F.; COLPO, T.; MARINS, K.; MARONGONI, C.; FLACH, A. Estudos dos compostos voláteis e atividade antimicrobiana da *Myrciaria tenella* (Cambuí). **Rev. Bras. Farm.**, v. 89, n. 2, p. 131-133, 2008.

SEGHATOLESLAMI, S.; SAMADI, N.; SALEHNIA, A.; AZIMI, S. Antibacterial activity of endemic *Satureja Khuzistanica* Jamzad essential oil against oral pathogens. **Iranian Endodontic Journal**, v. 4, n. 1 p. 5-9, 2009.

SERRANO, J.; PINIA, P. R.; DAUER, A.; AURA, A. M.; CALIXTO, F. S.; Tannins: Current knowledge of food sources, intakes, bioavailability and biological effects. **Mol. Nutr. Food Res.** v. 53, n. Suppl 2, p. S310-S329, 2009.

SEVERO, J.; GALARÇA, S. P.; AIRES, R. F.; CANTILLANO, R. F. F.; ROMBALDI, C. V.; SILVA, J. A. Avaliação de compostos fenólicos, antocianidinas, vitamina C e capacidade antioxidante em mirtilo armazenado em atmosfera controlada. **Braz. J. Food Technol.**, v.1, n. 1, p. 65-69, 2009.

SILVA, G. B., MARTIM, L., SILVA, C. L., YONG, M. C. M.; LADEIRA, A. M. Potencial alelopático de espécies arbóreas nativas do Cerrado. **Hoehnea**, v. 33, n. 3, p. 331-338, 2006.

SILVA, L. L.; HELDWEIN, C. G.; REETZ, L. G. B.; HORNER, R.; MALLMANN, C. A.; HEINZMANN, B. M. Composição química, atividade antibacteriana *in vitro* e toxicidade em *Artemia salina* do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. **Rev. Bras. Farmacogn.** v. 20, n. 5, p. 700-705, 2010.

SILVA, N. C. C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas.** 2010. 69 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Botucatu.

SILVA, J. R. M.; CARDOSO, A. L. C.; COELHO, R. G.; HONDA, N. K. **Isolamento e identificação de chalconas e avaliação da atividade antioxidante no extrato hexânico dos frutos de *Campomanesia pubescens*.** In XVI Congresso Ítalo-latinoamericano de etnomedicina. La Plata, Argentina, SILAE, Press (2007), p. 349.

SILVA, J. R. M.; CARDOSO, C. A. L.; RE-POPPI, N. Essential oil composition of the leaves of *Campomanesia pubescens*. **Chem. Nat. Compd.**, v. 45, n. 4, p. 565-567, 2009a.

SILVA, J. R. M.; RE-POPPI, N.; CARDOSO, C. A. L.; Fruit oil of *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae). **J. Essent. Oil Res.** v. 21, n. 4, p. 315-316, 2009b.

SMITH, C. V.; ANDERSON, R. E. Methods for determination of lipid peroxidation in biological samples. **Free Radic. Biol. Med.** v. 3., n. 5, p. 341-344, 1987.

SOARES, S. P.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microrganismos da cárie dental. **Rev. Odonto Cienc.** v. 23, n. 2, p. 141-144, 2008.

SONBOLI, A.; BABAKAHANI, B.; MEHRABIAN, A. R. Antimicrobial activity of six constituents of essential oil from *Salvia*. **Z. Naturforsch** v. 61, p. 160-164, 2006.

SOUSA, C. M. de M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; AYRES, C. C. COSTA, L. S.; ARAÚJO, D. S.; CALVACANTE, 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. **Quim. Nova**, v. 30, n. 2, p. 351- 355, 2007.

SOUSA, J. S. I.; PEIXOTO, A. M.; TOLEDO, F. F.; REICHARDT, K.; FILHO, J. M. **Enciclopédia agrícola brasileira: E-H**. Edition: illustrated, Publicado por EdUSP, 2004, 500p. Disponível em: <http://books.google.com.br/books?id=Pydx4Jb_4-EC&printsec=frontcover&source=gbs_summary_r&cad=0#PPa418,M1>. Acesso em: 31 mar. 2009.

SOUZA, S. A. M.; MEIRA, M. R.; FIGUEREDO, S. L.; MARTINS, E. R.; Óleos essenciais: aspectos econômicos e sustentáveis. **Enciclopédia Bios**. v. 6, n. 10, p. 1-11, 2010.

STIEVEN A. C.; MOREIRA J. J. S.; SILVA C. F. Óleos essenciais de uvaia (*eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Ecl. Quím.**, v. 34, n.3, p. 7-13, 2009.

VALLILO, M. I.; BUSTILOS, O. V.; AGUIAR, O.T. de Identificação de terpenos no óleo essencial dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg - MYRTACEAE. **Rev. Inst. Flor.**, v. 18, n. único, p. 15-22, 2006a.

VALLILO, M. I.; LAMARDO, L. C. A.; GABERLOTTI, E. O.; MORENO, P. R. H. Composição química dos frutos de *Campomanesia adamantium* (Cambessédes) O. Berg. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 4, p. 805-810, 2006b.

VALLILO, M. I.; MORENO, P. R. H.; OLIVEIRA, E.; LAMARDO, L. C. A.; GARBELOTTI, M. L.; Composição química dos frutos de *Campomanesia xanthocarpa* Berg-Myrtaceae. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 28, supl., p. 231-237, 2008.

WANG, S. Y.; WU, J. H.; CHENG, S. S.; LO, C. P.; CHANG, H. N.; SHYUR, L. F.; CHANG, S. T. Antioxidant activity of extracts from *Calocedrus formosana* leaf, bark and heartwood. **J. of Wood Sci.**, v. 50, n. 5, p. 422-426, 2004.

WANG, Y.; CHUNG, S. J.; SONG, W. O.; CHUN, O. K.; Estimation of daily proanthocyanidin intake and major food sources in the U.S. diet. **J. Nutr.** v. 141, n. 3, p. 447-452, 2011.

WOLLGAST, J.; PALLARONI, L.; AGAZZI, M. E.; ANKALAM, E. Analysis of procyanidins in chocolate by reversed-phase high-performance liquid chromatography with electrospray ionization mass spectrometric and tandem mass spectrometric detection, **J. Chromatogr. A.** v. 926, n.1, p. 211-220, 2001.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, 2001.

ZHANG, L.; ZUO, Z.; LIN, G.; Intestinal and hepatic glucuronidation of flavonoids. **Mol. Pharmaceutics**, v. 4, n. 6, p. 833-845, 2007.

7. Apêndice

7.1 Microrganismos utilizados nos ensaios

Para a determinação da atividade antimicrobiana do óleo essencial, obtidos a partir de hidrodestilação em aparelho de Clevenger, da raiz, caule, folha e fruto da gabioba foram utilizadas as seguintes cepas padrão provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC), *Streptococcus sanguinis* (ATCC10556), *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43717), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586) e *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) (Tabela 2).

Tabela 12 – Microrganismos, procedência, morfotipos e meios de culturas utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana.

Microrganismo/Cepas Padrão ATCC	Morfotipo	Meio de cultura do inóculo	Meio de cultura do teste
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	Coco Gram positivo	TSA	TSB
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4082	Coco Gram positivo	TSA	TSB
<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456	Coco Gram positivo	TSA	TSB
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Coco Gram positivo	TSA	TSB
<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ATCC 43717	Coco Gram positivo	TSA	TSB
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	Bacilo Gram negativo	Schaedler Ágar	Caldo
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	Bacilo Gram negativo	Schaedler Ágar	Caldo

TSB: Caldo

7.2 Meios de cultura utilizados

Os meios de cultura utilizados para determinação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima foram Caldos Schaedler e Ágar Schaedler suplementado para bactérias anaeróbias e caldo triptona de soja (TSB) e Agar sangue para bactérias aeróbias descritas abaixo.

Caldo Schaedler (BD[®])

Composição:

Digestão Pancreática de Caseína.....	8,1g
Digestão Peptídica de Tecido Animal.....	2,5g
Digestão Papaínica de farelo de soja.....	1,0g
Dextrose.....	5,82g
Extrato de Levedura.....	5,0g
Cloreto de Sódio.....	1,7g
Fosfato dipotássico.....	0,82g
Hemina.....	0,01g
L-Cystina	0,4g
TRIS (hidroximetil) aminometano	3,0g

Preparação:

Dissolveu-se aproximadamente 28,4 g do pó em 1000,0 mL de água destilada, o qual foi homogeneizado e autoclavado por 15 minutos a 121 ± 1 °C. Após a autoclavagem, foi suplementado com 1,0 mL de solução de Hemina a 5 mg mL^{-1} e 1,0 mL de solução de menadione a 1 mg mL^{-1} .

Caldo triptona de soja TSB (BD[®])

Composição:

Peptona de caseína	17,0g
Peptona de soja	3,0g
Glicose	2,5g
Cloreto de Sódio	5,0g

Hidrogenofosfato dipotássico..... 2,5g

Preparação:

Dissolveu-se cerca de 30,0 g do pó de TSB em 1000,0 mL de água destilada, o qual foi homogeneizado e autoclavado por 15 minutos a 121 ± 1 °C.

Base para ágar sangue (BD[®])

Composição:

Infusão de músculo cardíaco	2,0g
Digestão Pancreática de Caseína	13,0g
Extrato de levedura	5,0g
Cloreto de Sódio	5,0g
Ágar	15,0g

Preparação:

Dissolveu-se cerca de 40,0g do pó em 1000,0 mL de água destilada, o qual foi aquecido e homogeneizado até a dissolução do pó e autoclavado por 15 minutos a 121 °C. Após a autoclavação, a base foi resfriada de 45 a 50 °C e adicionado 5% de sangue desfibrinado de carneiro e 25,0 mL dessa mistura colocados em placas de Petri.

Ágar Schaedler (BD[®])

Composição:

Digestão Pancreática de Caseína.....	8,2g
Digestão Peptídica de Tecido Animal.....	2,5g
Digestão Papaínica de farelo de soja.....	1,0g
Dextrose.....	5,8g
Extrato de Levedura.....	5,0g
Cloreto de Sódio.....	1,7g
Fosfato dipotássio.....	0,8g
Hemina.....	0,01g
L-Cytina.....	0,4g
TRIS (hidroximetil) aminometano.....	3,0g
Ágar.....	13,5g

Preparação:

Dissolveu-se aproximadamente 41,9 g do pó em 1000,0 mL de água destilada, o qual foi aquecido e homogeneizado até a completa dissolução do pó, após foi autoclavado por 15 minutos a 121 °C. Logo em seguida, foi suplementado com 1,0 mL de solução de Hemina a 5 mg mL⁻¹, 1,0 mL de solução de menadione a 1mg mL⁻¹ e 5% de sangue desfibrinado de carneiro e distribuídos 30,0 mL em placas de Petri.

O vocábulo “suplementado”, no decorrer do texto, deve ser considerado como a adição de 1,0 mL de solução de Hemina a uma concentração de 5 mg mL⁻¹ e 1,0 mL de menadione a uma concentração de 1,0 mg mL⁻¹ para cada 1,0 L de meio de cultura.

Solução de Hemina

Dissolveu-se cerca de 0,5 g de Hemina em 10, 0 mL de NaOH a 1,0 N e adicionou-se 90,0 mL de água destilada esterilizada. Após obter a solução na concentração final de 5 mg mL⁻¹, esta foi filtrada em membrana filtrante de 0,22 µm para um tubo esterilizado.

Solução Menadione

Dissolveu-se em frasco esterilizado 0,1g de menadione em 100,0 mL de etanol absoluto, obtendo-se uma solução na concentração de 1,0 mg mL⁻¹.

7.3 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial

A atividade antimicrobiana do óleo essencial da raiz, caule, folha e fruto da *C. pubescens* foi determinada, utilizando método da microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

7.4. Preparo das amostras do óleo essencial para o método de microdiluição

Para a realização da técnica de microdiluição em microplaca, todas as amostras selecionadas foram inicialmente preparadas com concentrações de aproximadamente $8000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (solução de partida). Para conseguir esta concentração, dissolveu-se 2,0 mg de cada amostra em 250 μL de DMSO.

Em seguida preparam-se as seguintes soluções:

Solução mãe para o teste de microdiluição em caldo para aeróbios: Retirou-se 125 μL da solução de partida, colocou-se em um frasco de 10,0 mL e acrescentou-se 1875 μL de caldo TSB, obtendo-se uma nova solução de concentração $500 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Solução mãe para o teste de microdiluição em caldo para anaeróbios: Retirou-se 162,5 μL da solução de partida e acrescentou-se 2437,5 μL de caldo Schaedler suplementado, obtendo-se uma nova solução de concentração $500 \mu\text{g mL}^{-1}$.

7.5 Preparo do inóculo

Com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, foram transferidas culturas de 24 horas dos microrganismos indicadores, crescidos no meio Ágar triptona de soja adicionado de 0,5% de sangue de carneiro, para tubos contendo caldo triptona soja (Aeróbios); o mesmo procedimento foi utilizado para preparação das bactérias anaeróbias com crescimento de 72 h em ágar Schaedler. Padronizou-se o inóculo, fazendo a comparação deste com o tubo 0,5 ($1,5 \times 10^8 \text{ UFC mL}^{-1}$) para bactérias na escala Mc Farland. Esta preparação do inóculo foi realizada para todas as bactérias.

7.6 Preparação da droga padrão

A droga padrão utilizada para validação da técnica foi dicloridrato de clorexidina. Primeiro pesou-se cerca de 1,0 mg da droga e dilui-se em 10,0 mL de água destilada esterilizada, tendo uma concentração de 0,1 mg mL⁻¹. Após, transferiu 1,0 mL dessa primeira diluição para um tubo, contendo 4,0 mL de caldo Schaedler suplementado; essa última diluição de concentração de 0,02 mg mL⁻¹ é a solução usada para a realização da técnica. Levou-se em consideração a potência de 100% da droga.

7.7 Controles positivos e negativos

Para a determinação de atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição, utilizou-se como controle positivo, frente aos microrganismos indicadores, dicloridrato de clorexidina. Para o método de CIM, as concentrações de dicloridrato de clorexidina variaram de 0,0115 µg mL⁻¹ a 5,9 µg mL⁻¹.

Ainda realizaram-se para o método de microdiluição em caldo os seguintes controles: esterilidade dos caldos TSB e Schaedler; controle da cultura (inóculo); esterilidade da clorexidina, esterilidade dos óleos essenciais e controle do DMSO.

7.8 Método da microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima

A determinação de concentração inibitória mínima das soluções dos óleos essenciais foi realizada segundo o método de microdiluição em caldo segundo o CLSI para os microrganismos aeróbios (CLSI, 2006) e o CLSI para os microrganismos anaeróbios (CLSI, 2007).

Realizou-se todo procedimento em capela de fluxo laminar, com os cuidados necessários; as vidrarias, ponteiras e os meios de cultura foram esterilizados. Foram utilizados microplacas estéreis com 96 orifícios. Cada orifício recebeu inóculo, caldo triptona soja ou caldo Schaedler e amostra das soluções preparadas, de tal maneira que o volume final em cada orifício foi de 100,0 µL para os microrganismos aeróbios e 200,0 µL para os anaeróbios (Figura 11).

Avaliaram-se as amostras das soluções nas seguintes concentrações: 2000 a 12,5 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Determinou-se, então, a menor concentração de cada amostra capaz de inibir o crescimento dos microrganismos indicadores.

As microplacas foram seladas com parafilme e incubadas a 37 °C por 24 horas. As placas que contêm *S. mutans*, *S. sanguinis* e *S. mitis* foram incubadas em microaerofilia pelo sistema de chama vela. Após o período de incubação, foram adicionados em cada orifício 30,0 μL de resazurina (Sigma) preparado em solução aquosa (0,01%) para bactérias. Este sistema revelador permite a observação imediata da atividade antimicrobiana da amostra testada, sendo que a cor azul representa ausência de crescimento bacteriano e a cor vermelha, a presença de crescimento bacteriano (Figura 12). Os microrganismos anaeróbicos são incubados por 48 a 72 horas em câmara de anaerobiose a 36 °C. Em seguida, utiliza-se o mesmo revelador (resazurina) para a determinação das concentrações inibitórias mínimas frente aos microrganismos anaeróbicos.

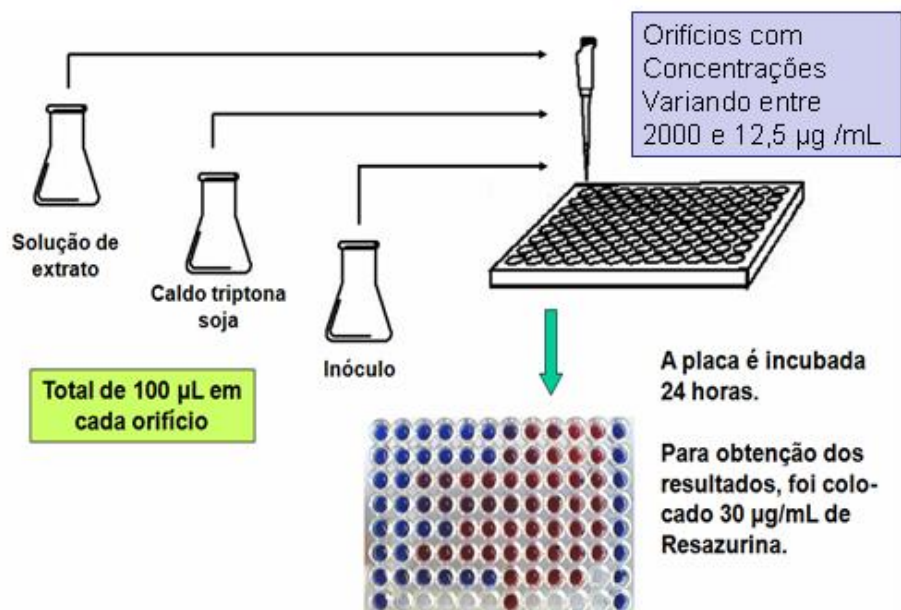


Figura 30: Esquema representativo das etapas desenvolvidas para o método de microdiluição.

Para todas as bactérias testadas, foi realizado o controle do solvente (DMSO) nas concentrações de 5 a 1%. Todos os extratos foram avaliados frente aos microrganismos indicadores em triplicata.

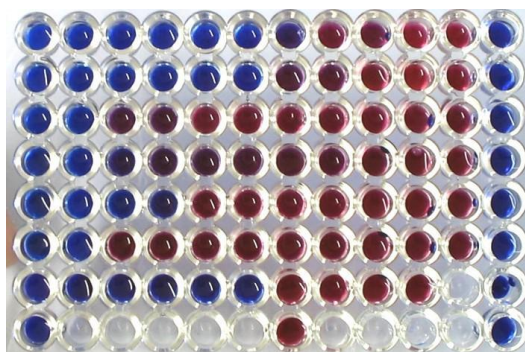


Figura 31: Exemplo de microplacas com soluções dos extratos testadas frente a *S. mutans* revelada com resazurina.