UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
Programa de Pós-Graduação em Fármaco e Medicamentos
Área de Insumos Farmacêuticos

Determinação da atividade antimicrobiana na fase vapor
do óleo essencial de
Hesperozygis myrtoides (St.Hil. ex Benth.) Epling

MARCOS AURÉLIO ALMEIDA PEREIRA

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno

São Paulo

2016

MARCOS AURÉLIO ALMEIDA PEREIRA

Determinação da atividade antimicrobiana na fase vapor
do óleo essencial de
Hesperozygis myrtoides (St.Hil. ex Benth.) Epling

MARCOS AURÉLIO ALMEIDA PEREIRA

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Versão original

Orientador: Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno

São Paulo

2016

MARCOS AURÉLIO ALMEIDA PEREIRA

Determinação da atividade antimicrobiana na fase vapor
do óleo essencial de

Hesperozygis myrtoides (St.Hil. ex Benth.) Epling

Tese para obtenção do título de DOUTOR

Comissão Julgadora da Tese para obtenção do título de DOUTOR

Prof. Dr. Paulo Roberto Hrihorowitsch Moreno
Orientador/Presidente

1º examinador

2º examinador

3º examinador

4º examinador

São Paulo, _____

Ficha Catalográfica
Elaborada pela Divisão de Biblioteca e
Documentação do Conjunto das Químicas da USP.

P436d Pereira, Marcos Aurélio Almeida
Determinação da atividade antimicrobiana na fase vapor do
óleo essencial de *Hesperozygis myrtoides* (St. Hill ex Benth.)
Epling / Marcos Aurélio Almeida Pereira. -- São Paulo, 2016.
96p.

Tese (doutorado) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas da
Universidade de São Paulo. Departamento de Farmácia
Orientador : Moreno, Paulo Roberto Hrihorowitsch

1. Farmacognosia 2. Óleos essenciais 3. Bactericidas I. T.
II. Moreno, Paulo Roberto Hrihorowitsch, orientador.

615.321 CDD

RESUMO

Pereira, M.A.A., Determinação da atividade antimicrobiana na fase vapor do óleo essencial de *Hesperozygis myrtoides* (St.Hil. ex Benth.) Epling. 2016. 97f. Tese (Doutorado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, 2016.

O uso de plantas aromáticas ricas em óleos essenciais (OE) como agentes saneantes ou conservantes remonta às civilizações antigas. Nos dias atuais, o aumento nos surtos de infecções em hospitais e creches, bem como da resistência bacteriana, aumentou também a demanda por desinfetantes. Os OE's são reconhecidos por sua atividade antimicrobiana, mas a maioria dos estudos foi realizada na fase líquida. Buscando aproveitar a característica de alta volatilidade dos OE's, desenvolvemos uma metodologia para a avaliação da atividade antimicrobiana na fase vapor. Nesse sentido, utilizamos o OE extraído de *Hesperozygis myrtoides* (St.Hil. ex Benth.) Epling (Lamiaceae), uma espécie nativa com ocorrência nos estados do sudeste do Brasil. A planta foi coletada em Campos do Jordão e o óleo teve um rendimento médio de 1,99% (m/m), sendo os componentes majoritários pulegona (48,8%) e isomentona (16,2%). A atividade antimicrobiana foi comparada na fase líquida, pelo método da microdiluição em placa, com a fase vapor, pelo método da placa invertida modificado. Os resultados indicaram uma atividade mais potente para a fase vapor do que na fase líquida. *Staphylococcus aureus* apresentou CIM de 0,392 mg. L⁻¹ na fase vapor e 19 mg. L⁻¹ na líquida, já para *Candida albicans* foi 0,833 mg. L⁻¹ na fase vapor e 94,4 mg. L⁻¹ na fase líquida. Entretanto, para *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* e *Aspergillus brasiliensis* os valores da CIM, em ambas as fases, foram acima de 100 mg. L⁻¹, sendo então considerado inativo. A atividade antimicrobiana na fase vapor é mais intensa devido aos OE's se ligarem diretamente ao microrganismo sem a interferência do solvente. A toxicidade do OE foi avaliada frente a células tumorais humanas de mama (MCF-7) e próstata (CP-3) e em células de fibroblastos murinos normais (BALB/3T3) e indicaram uma DL₅₀ superior a 2.014 mg.Kg⁻¹, podendo ser considerado seguro. A atividade antimicrobiana associada à baixa toxicidade é um forte indicativo que este OE pode ser utilizado para descontaminação ambiental na fase vapor, inclusive em ambientes habitados.

Palavras-chave: Óleo Essencial, atividade antimicrobiana, fase líquida, fase vapor, citotoxicidade, descontaminação

ABSTRACT

Pereira, M.A.A., Determination of antimicrobial activity in the vapor phase of essential oil *Hesperozygis myrtoides* (St.Hil. Ex Benth.) Epling. 2016. 97 p. Thesis (PhD), Faculty of Pharmaceutical Sciences, University of São Paulo, in 2016.

Aromatic plants rich in essential oils (EO) have been used as sanitizing agents or preservatives since early civilizations. Nowadays, the increase in infectious outbreaks in hospitals and nurseries, as well as the bacterial resistance has also increased the demand for disinfectants. EO's are known for their antimicrobial activity, but most reports is in the liquid phase. Due to the EO high volatility, we have developed a methodology for evaluating the antimicrobial activity in the vapor phase. In this sense, we use the *Hesperozygis myrtoides* (St.Hil. Ex Benth.) Epling (Lamiaceae) EO, a native species occurring in southeastern Brazil. The plant was collected in Campos do Jordão (SP) and the oil had an average yield of 1.99% (m/m) and as major components pulegone (48.8%) and isomenthone (16.2%). Antimicrobial activity was compared in the liquid phase, microdilution method, with the vapor phase, modified inverted plate method. The results indicated that the vapor phase was a more potent than the liquid. *Staphylococcus aureus* afforded MIC 0.392 mg. L⁻¹ for the vapor phase and 19 mg. L⁻¹ for the liquid phase, while for *Candida albicans* it was 0.833 mg. L⁻¹ for the vapor and 94.4 mg. L⁻¹ for the liquid. However, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Bacillus subtilis* and *Aspergillus brasiliensis* had in both phases MIC's higher than 100 mg. L⁻¹, considered then inactive. The vapor phase antimicrobial activity is more intense because the EO are free to directly bind with the microorganism without the solvent interference. Toxicity was evaluated against human breast tumor cells (MCF-7) and prostate cancer (PC-3) and with normal murine fibroblast cells (BALB/3T3) indicating a DL50 higher 2,014 mg.Kg⁻¹, and it was considered safe. The antimicrobial activity associated with the low toxicity is a strong indication that this EO vapors can be used for environmental decontamination, even in inhabited places.

Keywords: essential oil, antimicrobial activity, liquid phase, vapor phase, toxicity, decontamination

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Dr. Paulo R. H. Moreno pela orientação, apoio e paciência.

À Professora Dra. Telma M. Kaneko da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo – USP, pela sua colaboração na realização dos ensaios antimicrobianos.

À Professora Dra. Maria C. M. Young do Instituto Botânico pela sua colaboração no desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Dra. Ivana B. Suffredini do Laboratório de Extração, Universidade Paulista – UNIP, pela realização dos ensaios antitumorais.

À Professora Dra. Patricia S. Lopes e Fúlvio Corazza, Departamento de Ciências Exatas e da Terra, Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, pela sua colaboração na realização dos ensaios citotóxicos.

À professora Dra. Edna Miyake Kato e ao técnico Roberto Honório da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo – USP, pela sua colaboração na realização de cortes histológicos.

À Professora Dra. Carmen L. Queiroga e ao Professor Dr. Adilson Sartoratto do Centro Pluridisciplinar de Pesquisas Químicas, Biológicas e Agrícolas, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, pelo auxílio na realização das análises por CG-EM.

A Marcos Enoque pelos testes de solubilidade dos óleos e Sueli pela coleta.

Aos Colegas Fabiana Issa, Agnieszka Ferreira e Fabiana Lima.

Aos alunos da UNIP Juliana Tiemi, Thelma Salvatori e Fabio Fiorucci Filho.

Ao Staff da Faculdade de Farmácia: Alexandre Spitaler, Luiz Caous, Davi Lima filho e Doralice Rita.

Aos professores: Elfriede, Felipe, Nádia, Anil, Chanel, Célia, Demarco, Satiko da USP

Aos professores: Eduardo Cassel, Flavia Thiessen, Renata Limberger

E a todos os colegas das aulas, simpósios e os que dividimos as bancadas dos laboratórios: Rafael, Wesley, Alessandro, Angela, Cabral, Fabiana, Jesus, Fheiz, Alberto, Michele, André, Carol, Cynthia e...

À CAPES pelo financiamento deste projeto.

E aos meus familiares, Pai (*in memoriam*), Mãe e Irmãos

E a minha companheira de todas as horas. Horas certas e incertas, das alegres e tristes, Elisabeth.

“A natureza não faz milagres; faz revelações”.
(Carlos Drummond de Andrade)

“De um modo suave, você pode sacudir o mundo”.
(Mahatma Gandhi)

“Há um mundo inteiro a ser descoberto em apenas uma gota de vida”.
(Elisabeth Pereira)

LISTA DE TABELAS

Número	Nome	Página
Tabela 1	Composição química do óleo essencial de <i>H. myrtoides</i> (coleta A - agosto, 2008 e coleta B - outubro 2013)	62
Tabela 2	Comparativo da composição química comum aos óleos essenciais de <i>H. myrtoides</i> de duas localidades. Percentual dos compostos presentes nos óleos	63
Tabela 3	Comparativo da composição química dos vapores do óleo essencial de <i>H. myrtoides</i> em função do tempo de volatilização. Percentual dos compostos presentes nos óleos na fase vapor	66
Tabela 4	Valores determinados para CIM e CBM/CFM do óleo essencial de <i>H. myrtoides</i> pelos métodos da microdiluição e placa invertida	73
Tabela 5	Atividade citotóxica para células tumorais humanas do OE de <i>H. myrtoides</i>	78

LISTA DE FIGURAS

Número	Nome	Página
Figura 1	Exsicata de <i>H. myrtoides</i> – Jardim Botânico do Rio de Janeiro	24
Figura 2	Exsicata de <i>H. myrtoides</i> – Jardim Botânico do Rio de Janeiro	24
Figura 3	Mapa das localidades de coletas das exsicatas de <i>H. myrtoides</i> depositadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro	25
Figura 4	Sistema empregando dessecador para determinação da atividade citotóxica de compostos voláteis	27
Figura 5	Sistema empregando recipiente especial, com porta de amostragem, usado para expor fungos patogênicos aos vapores de óleo essencial	28
Figura 6	Avaliação da atividade antimicrobiana dos vapores de OE's em caixa hermética	29
Figura 7	Desenho esquemático do poço de avaliação da atividade antimicrobiana de OE com fechamento hermético	30
Figura 8	Avaliação da atividade antimicrobiana dos vapores de OE's em poços com diferentes concentrações de OE, com indicativo da CIM	30
Figura 9	Sistema para determinar a atividade antimicrobiana na fase vapor	32
Figura 10	Variação do método da placa invertida com introdução de fibra de SPME para análise dos vapores.	33
Figura 11	Variação do método da placa invertida para determinação da atividade antimicrobiana na fase vapor	34
Figura 12	Esquema básico do teste desenvolvido com placa compartimentada	34
Figura 13	Região de coleta de <i>H. myrtoides</i> em Campos do Jordão, utilizada neste estudo	37

Figura 14	Planilha de acompanhamento utilizada para os testes	44
Figura 15	Cilindro de contenção dos vapores do OE	46
Figura 16	Aplicação da solução teste no papel filtro posicionado na tampa da placa de Petri	46
Figura 17	Cilindro de contenção dos vapores do OE	47
Figura 18	Dimensões da placa de Petri para cálculo do volume de expansão dos vapores dos OE's	48
Figura 19	Fotomicrografia da linhagem celular BALB/3T3 clone A31 em alta densidade	52
Figura 20	Vista da região de coleta	55
Figura 21	Vista da região de coleta tendo em 1º plano <i>H. myrtoides</i>	55
Figura 22	Planta de <i>H. myrtoides</i> em seu local de germinação	56
Figura 23	<i>H. myrtoides</i> vista lateral com flores	56
Figura 24	<i>H. myrtoides</i> folha nas posições: adaxial (A) e abaxial (B)	57
Figura 25	<i>H. myrtoides</i> detalhe da disposição das folhas	57
Figura 26	<i>H. myrtoides</i> folha posição adaxial, tricomas glandulares corados com sudam III – microscópio óptico	58
Figura 27	<i>H. myrtoides</i> folha posição adaxial, tricomas glandulares em verde – microscópio de fluorescência	58
Figura 28	Região da folha onde se evidencia o tricoma tector com cutícula verrugosa	59
Figura 29	Região da folha onde se evidencia a depressão com presença de glândula secretora	59
Figura 30	Aspecto geral do caule onde se evidenciam os tricoma tectores e a disposição estrutural do feixe vascular e a região medular	59
Figura 31	Região do caule onde se evidenciam felogênio, floema, xilema e região medular	60
Figura 32	Rota da biossíntese do mentol no óleo essencial de <i>Mentha x piperita</i>	60

Figura 33	Representação gráfica da composição química dos vapores do óleo essencial de <i>H. myrtoides</i> em função do tempo de volatilização. Percentual dos compostos presentes nos óleos na fase vapor.	65
Figura 34	Teste para contagem de colônias de <i>C. albicans</i> após exposição a concentrações crescentes de formaldeído. Aumento da concentração do OE no sentido da seta	67
Figura 35	<i>C. albicans</i> inoculada por <i>spread-plate</i> (A) e <i>pour-plate</i> (B), ambas com carga bacteriana 800 UFC	70
Figura 36	Papel de filtro sendo embebido na solução de acetato de etila/OE (aplicado 500 µL, gota a gota, de modo a recobrir todo o papel de filtro)	71
Figura 37	Crescimento de <i>Aspergillus brasiliensis</i> , mesma carga bacteriana sob diferentes concentrações do OE <i>H. myrtoides</i>	72
Figura 38	Crescimento de <i>Aspergillus brasiliensis</i> , mesma carga bacteriana sob diferentes concentrações do OE <i>H. myrtoides</i>	76
Figura 39	<i>Aspergillus brasiliensis</i> , mesma carga bacteriana - (A) Crescimento na presença do OE <i>H. myrtoides</i> , (B) Controle de crescimento	76

LISTA DE QUADROS

Número	Nome	Página
Quadro 1	Espécies reportadas para o gênero <i>Hesperozygis</i> e sua região de ocorrência	22
Quadro 2	Sistema de classificação de <i>Globally Harmonised System</i> baseado em dose letal	54

LISTA DE EQUAÇÕES

Número	Nome	Página
Equação 1	Índice de Kováts	40
Equação 2	Crescimento celular	51
Equação 3	Dose Letal DL ₅₀	54

LISTA DE ABREVIACÕES

Abreviação	Significado
OE	Óleo essencial
UFC	Unidade formadora de colônia
CIM	Concentração inibitória mínima
CBM	Concentração bactericida mínima
CFM	Concentração fungicida mínima
RDC	Resolução da Diretoria colegiada
DMSO	Dimetilsulfóxido
GPS	Global position sistem
FISPQ	Ficha de informações de segurança de produto químico
SBA	Agar Sabouraud dextrose
SBB	Caldo Sabouraud dextrose
TSA	Agar tryptcase soja
TSB	Caldo trypcase soja

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
3 OBJETIVO	36
3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	36
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 OBTENÇÃO DA PLANTA	37
4.2 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA PLANTA	38
4.3 OBTENÇÃO DO ÓLEO VOLÁTIL	38
4.4 ANÁLISE QUÍMICA	39
4.4.1 Análise do óleo essencial	39
4.4.2 Análise da evaporação do óleo essencial	39
4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES	40
4.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	41
4.6.1 Microrganismos testados	41
4.6.2 Atividade antimicrobiana do OE na fase líquida	41
4.6.2.1 Preparação e viabilidade do inóculo	41
4.6.2.2 Determinação da atividade antimicrobiana do OE na fase líquida	42
4.6.3 Atividade antimicrobiana do OE na fase vapor	45
4.6.3.1 Preparação e viabilidade do inóculo	45
4.6.3.2 Determinação da atividade antimicrobiana do OE na fase vapor	45
4.6.3.3 Cálculo da concentração dos vapores na área de expansão da placa	47
4.7 ATIVIDADE CITOTÓXICA FRENTE ÀS CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS	49
4.7.1 Células testadas	49
4.7.2 Preparo das células	49
4.7.3 Avaliação da citotoxicidade frente às células tumorais humanas	50
4.8 ATIVIDADE CITOTÓXICA FRENTE ÀS CÉLULAS NORMAIS DE FIBROBLASTOS MURINOS	51
4.8.1 Células testadas	51
4.8.2 Preparo das células	52
4.8.3 Avaliação da citotoxicidade frente às células de fibroblastos murinos	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	55

5.1 OBTENÇÃO DA PLANTA	55
5.2 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA	56
5.2.1 Caracterização macroscópica	56
5.2.2 Caracterização microscópica	58
5.3 OBTENÇÃO DO ÓLEO VOLÁTIL	61
5.4 COMPOSIÇÃO DO OE DE <i>H. MYRTOIDES</i>	61
5.4.1 Composição na fase líquida	61
5.4.2 Composição na fase vapor	66
5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO OE DE <i>H. MYRTOIDES</i>	69
5.6 CITOTOXICIDADE <i>IN VITRO</i> DO OE DE <i>H. MYRTOIDES</i>	77
5.6.1 Citotoxicidade do OE de <i>H. Myrtoides</i> frente às células tumerais humanas	78
5.6.2 Citotoxicidade do OE de <i>H. Myrtoides</i> frente às células normais de fibroblastos murinos.....	79
6 CONCLUSÕES	81
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	82

1 INTRODUÇÃO

O emprego de plantas como medicamentos se dá desde o início da história da humanidade. Recorrer às propriedades curativas de certas plantas foi um dos primeiros esforços na busca de soluções terapêuticas através da natureza. A evolução da ciência e da tecnológica permitiu desvendar a composição química de alguns vegetais e seus efeitos, confirmando, muitas vezes, a utilização popular (FRANCO et al., 2005).

As plantas aromáticas, ricas em óleos essenciais (OE's), têm sido usadas ao longo da história, seja na religião, na medicina ou na cosmética. Os antigos egípcios foram os primeiros a reconhecer o potencial das fragrâncias, tendo usado os OE's em tratamentos de doenças, rituais e cerimônias religiosas. As plantas aromáticas eram queimadas ou recobriam os pisos nos lares para perfumar. Já os OE's eram empregados juntamente com as resinas em mumificações.

Atribui-se a Hipócrates (460-370 a.C.) a indicação dos banhos aromáticos e fumigações. Em Atenas, na luta contra as epidemias, queimavam-se várias plantas aromáticas como alfazema, alecrim, hissopo e certamente muitas outras. Os Persas, através de Avicena (980-1037), são indicados como os primeiros a obter um OE puro a partir da *Rosa centifolia* (CUNHA, ROQUE, NOGUEIRA, 2012).

Durante a peste negra (1447-1351), foi considerado eficaz lavar-se com água e envolver o corpo em fumaça ou incenso. Sendo essas as primeiras tentativas em adotar costumes mais higiênicos como um esforço de manter a doença sob controle (PYBUS, SELL, 1999).

Os incensórios nas igrejas afastavam os maus odores e tinham ação antisséptica. Nos séculos XVII e XVIII os hospitais passaram a usar óleos essenciais, macerados aromáticos, queimar plantas com ação antisséptica, especialmente alecrim, alfazema, cidreira e tomilho (CUNHA, ROQUE, 2013).

Nos dias atuais, o aumento nos surtos de infecção em hospitais e creches gera uma alta demanda por desinfetantes líquidos (clorexidina, derivados de amônia quaternária, glutaraldeído, entre outros). Estes produtos são utilizados em todo o mundo devido a sua boa relação custo-benefício. Porém, a sua má utilização (concentrações ou espectro de atuação) pode estimular a resistência dos

microorganismos patogênicos (MAZZOLA et al., 2009). No Brasil, além destes desinfetantes, o formaldeído foi utilizado para desinfecção de alto nível, eliminação de bactérias vegetativas, bacilos da tuberculose, fungos, vírus e alguns esporos bacterianos, na forma de solução e também aplicado na forma de vapores (fumigação) para desinfecção de ambientes; hoje seu uso é proibido.

Os óleos essenciais são uma mistura complexa de monoterpenos (C_{10}), sesquiterpenos (C_{15}) e diterpenos (C_{20}), que podem ser acíclicos, mono e bicíclicos, e seus produtos oxigenados são os alcoóis, aldeídos, cetonas e compostos aromáticos (fenilpropanóides), principalmente fenóis e éteres. E justamente esta mistura complexa, afetada pelas interações abióticas (LIMA et al., 2003), torna interessante a busca de novas plantas ou daquelas pouco estudadas, principalmente se coletadas em regiões diversas, em épocas diferenciadas e em diferentes estágios vegetativos. (ARAÚJO et al., 2005; BERTUCCI et al., 2008).

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é reconhecida (DUARTE et. al., 2006), contudo as pesquisas continuam para identificar atividades antifúngicas, antibacterianas, fungistáticas, bacteriostáticas. A maioria dos testes antimicrobianos para OE é feita utilizando a fase líquida. Os estudos na fase vapor vêm ganhando importância nas áreas de alimentos processados ou grãos, descontaminação ambiental e hospitalar, não somente pela sua ação antimicrobiana, mas também pela forma de aplicação. Porém, até agora, não há método padronizado para avaliação dos testes na fase vapor (LANG, BUCHBAUER, 2012).

Apesar de todos os esforços, as infecções adquiridas em hospitais (nosocomiais), têm aumento, bem como a resistência bacteriana aos antimicrobianos usados e o *International Nosocomial Infection Control Consortiu* (INICC), (ROSENTHAL et al., 2014) divulgou seus estudos em mais de 43 países onde encontrou, *Staphylococcus aureus* resistente à metilicina, *Enterococcus faecalis* resistente à vancomicina, *Pseudomonas aeruginosa* resistente à amicacina, entre outros. O relatório do *European Center for Disease prevention and control* (ECDC), (ZARB et al., 2012) indicou que, em 21 países, a média de infecções nosocomiais é de 7,1%. Sendo que os locais no corpo humano mais atingidos são: o trato urinário (27%), seguido do trato respiratório, incluindo pneumonia 24%. Os microrganismos mais frequentemente isolados nas infecções nosocomiais são *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*. Estes dados indicam a necessidade de se buscar novas estratégias para

combater a resistência aos antibióticos, bem como a descoberta e desenvolvimento de novos compostos ativos. (FRENCH, 2010).

Uma das estratégias consiste na aplicação de agentes descontaminantes na fase vapor (ou gás) como os OE's com sua volatilidade natural e com sua eficiência antimicrobiana comprovada em testes de laboratório e também em teste em ambientes contaminados. Como um exemplo, temos a aplicação desenvolvida pela empresa Scent Technologies Ltd, usando uma máquina dispersora (ST Pro®), com uma mistura de OE's, que foi capaz de inibir *S. aureus* resistente à meticilina (MRSA) após 20 horas de exposição (DORAN et al. 2009).

Somando-se a ação antimicrobiana dos OE's ao baixo efeito toxicológico, torna o OE ou sua mistura, bons candidatos para atender a essa busca por novas estratégias de descontaminação, utilizando a via da fase vapor. Sua aplicação pode ser feita com a presença de pessoas, seja em hospitais, consultórios médicos ou ainda em ambientes de empacotamento de alimentos perecíveis. Para se chegar a este objetivo é necessário antes definir uma metodologia de teste e também avaliar a citotoxicidade e genotoxicidade do OE testado.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os óleos essenciais (OE's) possuem diversas aplicações terapêuticas, sendo a atividade antimicrobiana a mais estudada e empiricamente usada a séculos. O escopo de aplicação é amplo, por exemplo: antitumoral, no tratamento de doenças cardiovasculares, arteriosclerose e trombose. Além disso, os OE's possuem ação antiviral, antioxidante e como possíveis agentes antidiabéticos (AMR, 2007).

O número de trabalhos publicados, descrevendo a atividade biológica dos OE's vem crescendo. Boa parte destes está voltada para a análise das atividades antifúngica, antibacteriana, fungistática, bacteriostática e suas concentrações inibitórias mínimas (CIM). Essa classe de produtos naturais vem sendo ainda testada para conservação de alimentos, como por exemplo, o uso do OE de orégano (Lamiaceae) em saladas de legumes com maionese, onde foi verificada a redução da contagem de *Salmonella enteritidis* (SILVA et al., 2007). Encontram-se ainda algumas aplicações dos OE's como conservantes de cremes cosméticos, sendo identificada a ação bacteriostática pela associação dos OE's de *Melaleuca* (Myrtaceae), também conhecida como *tea tree*, e alecrim (Lamiaceae) na concentração de 0,5% (v/v) (PEREIRA, 2009). Em uma triagem com extratos e óleos essenciais de cerca de oitenta espécies vegetais, os melhores resultados frente *Candida albicans* foram obtidos para os óleos essenciais de plantas das famílias Asteraceae, Liliaceae, Poaceae, Verbenaceae e Lamiaceae (DUARTE et al., 2005).

Segundo Samuelsson (1999), as plantas com maior concentração de óleos essenciais pertencem às famílias Apiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae e Rutaceae. A família Lamiaceae, que tem uma distribuição cosmopolita, contempla cerca de 300 gêneros e 7.500 espécies. No Brasil ocorrem 28 gêneros e cerca de 350 espécies (SOUZA, LORENZ, 2008). Os gêneros exóticos *Mentha*, *Rosmarinus*, *Thymus*, *Lavandula* são reconhecidos como produtores de óleos essenciais com atividade antimicrobiana, antioxidante e anti-inflamatória (LIMA, et al., 2006a, PEREIRA, 2010).

O gênero, *Hesperozygis*, (Lamiaceae), apresenta onze espécies catalogadas que se encontram listadas no quadro 1 (p. 22) (TROPICOS, 2014; IPNI, 2014). No Brasil, o gênero *Hesperozygis* é encontrado nas áreas de mata Atlântica e

Cerrado nos Estados das regiões Sudeste e Sul tendo sido descritas sete espécies endêmicas para o gênero até o presente (HARLEY et al., 2014).

Quadro 1: Espécies reportadas para o gênero *Hesperozygis* e sua região de ocorrência

ESPÉCIE	LOCALIZAÇÃO
<i>H. dimidiata</i> Epling & Mathias	Brasil (Santa Catarina)
<i>H. kleinii</i> Epling	Brasil (Santa Catarina)
<i>H. myrtoides</i> (A.St.-Hil. ex Benth.) Epling	Brasil (Minas Gerais, Espírito Santo, Rio de Janeiro e São Paulo)
<i>H. nitida</i> (Benth.) Epling	Brasil (Minas Gerais, Rio de Janeiro, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul)
<i>H. rhododon</i> Epling	Brasil (Paraná)
<i>H. ringens</i> (Benth.) Epling	Brasil (Rio Grande do Sul)
<i>H. spathulata</i> Epling	Brasil (Paraná)
<i>H. pusilla</i> R.S.Irving	México
<i>H. bella</i> Epling	México
<i>H. ciliolata</i> Epling & W.S.Stewart	México
<i>H. marifolia</i> (S.Schauer) Epling	México

Fonte: Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. Disponível em <<http://www.tropicos.org>> Acesso em: 06 Fev. 2014 e Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 06 fev. 2014

Os estudos sobre o gênero *Hesperozygis* têm sido concentrados na análise da composição e atividades biológicas dos óleos essenciais. No Rio Grande do Sul, *H. ringens*, conhecido popularmente como “espanta pulga”, teve seu óleo essencial avaliado com o intuito de verificar sua ação alelopática, a variabilidade genética, química e o potencial acaricida. As análises indicaram pulegona como composto majoritário, tendo sua concentração variado entre 73% a 92%. Por outro lado, para *H. rhododon*, a mentona (43,4%) foi o composto majoritário, seguido da pulegona (29,6%) (VON POSER et al., 1996, FRACARO, 2006, RIBEIRO et al., 2010). Amostras de *H. myrtoides* coletadas em Minas Gerais, no município de Aiuruoca, apresentaram

atividade antimicrobiana e tiveram como compostos majoritários, em seu óleo essencial, pulegona (44,4%), isomentona (32,7%) e limoneno (3,5%) (MARTINI, et al, 2011a). No México, o óleo essencial de *H. marifolia* apresentou ação antifúngica contra *Aspergillus flavus*, sinalizando o seu potencial para a proteção de grãos durante a estocagem. Os principais componentes químicos deste óleo essencial foram pulegona (40,75%); isomentona (30,34%) e mentona (4,46%) (GUTIÉRREZ et al., 2011).

Minthostachys setosa (Briq.) Epling é outra espécie pertencente à mesma família, subfamília, tribo e subtribo do *H. myrtoides* e ocorre ao longo dos Andes, da Venezuela até a Argentina, e apresentou no seu OE pulegona 28,6%; mentona 12,6% e a isomentona, 11% como componentes majoritários, semelhante ao observado para as espécies de *Hesperozygis*. As folhas *M. setosa* eram utilizadas como conservante pelos Incas para a proteção pós-colheita, contra os fungos da batata, colocando os ramos sobre os tubérculos. O OE de *M. setosa* teve sua utilização empírica como antimicrobiano confirmada, principalmente devido à presença de pulegona, sendo considerado como candidato à utilização como conservante em formulações cosméticas e farmacêuticas. (PINTO, 2010).

Um dos primeiros relatos sobre *H. myrtoides* (Figura 1 p. 24) foi no Parque Nacional de Itatiaia, coletado em 1913 e identificado em 1942 (BRADE, 1945). Na época, esta espécie estava limitada aos Estados do Rio de Janeiro e Minas Gerais onde é popularmente conhecida como poejo ou poejo do campo. Em 1990, amostras foram coletadas em Campos do Jordão (SP), mirante de São José dos Alpes (Figura 2 p.24) e em 1991 o espécime foi localizado na serra do Caparaó (MG) no caminho do pico da Bandeira (REFLORA, 2016).

Figura 1- exsicata de *H.myrtoides* – Jardim Botânico do Rio de Janeiro

Fonte: Revista Rodriguésia, V. 19, 1945 (foto de J. Barbosa)

Figura 2- exsicata de *H.myrtoides* – Jardim Botânico do Rio de Janeiro

Fonte: Coletor: J. R. Pirani, 2592, em 25/05/1990, disponível em REFLORA, 2016

No Jardim Botânico do Rio de Janeiro, são listadas, no herbário virtual, 22 ocorrências de *H. myrtoides* em regiões de altitude entre 1900 e 2500 metros. Na Figura 3 (p.25) estão indicados no mapa os pontos de coletas.

Figura 3 – Mapa das localidades de coletas das exsiccatas de *H. myrtoides* depositadas no Jardim Botânico do Rio de Janeiro

Fonte –

Os testes para a avaliação da atividade antimicrobiana de OE's são realizados em fase líquida, seja por difusão em ágar, difusão em disco, cilindros de aço inoxidável, perfuração em ágar, diluição em caldo e microdiluição (OSTROSSKY, et al. 2008). Entretanto, nos últimos anos ocorreu um aumento do número de publicações testando a fase vapor, baseados na sua característica natural de volatilidade. A maioria dos trabalhos observa que as substâncias que compõem o OE, quando na fase vapor, estão livres para se ligarem ao microrganismo por suas características lipofílicas o que gera uma atividade, em geral, mais intensa que na fase líquida onde os componentes estão solvatados, o que reduz o contato com o microrganismo (LAIRD & PHILLIPS, 2011; MUNHÖZ-BONILLA et al., 2013).

O primeiro estudo relatado por uma instituição de pesquisa sobre a fase vapor foi publicado nos anais do Instituto Pasteur por Chamberlain em 1887, onde tratava da ação do OE em esporos de *Anthrax*. Posteriormente foram relatados os trabalhos de Greig-Smith (1919), Match and Kunkel (1920) entre outros trabalhos que demonstraram as propriedades bactericida dos OE's. (apud MARUZZELLA, SICURELLA, 1960). Porém estes testes não puderam ter uma avaliação adequada

devido ao pequeno número de OE's testados e às diferentes metodologias usadas pelos vários pesquisadores. Tentando solucionar e unificar a metodologia, foi testada a ação antimicrobiana de 133 OE's contra seis microrganismos, utilizando a metodologia da placa invertida e os resultados determinados pelo tamanho da zona de inibição. Os resultados indicaram atividade dos vapores em 71% dos OE's testados frente a *Mycobacterium avium*, (19%) *Bacillus subtilis* var. *aterrimus*, (14%), *Staphylococcus aureus*, (14%), *Streptococcus fecali*, (12%) e *Escherichia coli*, (6%) o mais resistente (MARUZZELLA, SICURELLA, 1960).

Alguns dos trabalhos com a fase vapor dos OE's são voltados para a indústria de alimentos, onde são utilizados como biopreservantes uma vez que os consumidores preferem aditivos naturais aos sintéticos (LANG & BUCHBAUER, 2012). Também é possível utiliza-los para gerar uma atmosfera modificada para o empacotamento (MAP) de forma a aumentar a vida de prateleira de produtos comestíveis embalados, buscando sempre a mínima alteração nas propriedades organolépticas. Os testes foram realizados seguindo a volatilização pelo método da placa invertida com os microrganismos de interesse da indústria alimentícia (LOPEZ et al., 2005; GOÑI et al., 2009).

Buscando substituir os inseticidas à base de organofosforados e piretróides por alternativas de origem natural, como os OE's, para serem usados em fumigações tóxicas ou na repelência (WENDEL, 2007; KIM, IL-KWON, 2008) visando proteger os grãos durante a estocagem, pois a presença de insetos e larvas resultam em perda de peso, redução do valor nutritivo e do grau de higienização comprometendo a qualidade e o poder germinativo dos grãos. Os resultados com trigo e feijão indicaram que as sementes submetidas à fumigação com OE's apresentaram-se mais saudáveis que os controles (RODRIGUES et al., 2006).

A aplicação de OE's contra fungos patogênicos em humanos é pouco encontrada na literatura e a aplicação na fase vapor é ainda menos estudada. Porém, quando se analisou a aplicação de quatorze óleos essenciais e seus constituintes majoritários contra quatro patógenos do trato respiratório: *Haemophilus influenzae*, *Streptococcus pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes* e *Staphylococcus aureus*, (INOUE et al., 2001a) e contra fungos dermatofíticos (INOUE et al., 2001 b) por contato do vapor e determinando suas doses inibitórias mínimas, foram verificados

resultados positivos que levaram os pesquisadores a concluir que a estratégia seria promissora, inclusive cunhando o termo “vaporterapia” para o processo.

Esta propriedade única entre os agentes antimicrobianos, alta volatilidade, associada à sua baixa toxicidade, torna os óleos essenciais promissores para reduzir a contaminação em ambientes, mesmo em presença de pessoas (DORAN et al., 2009).

Não existe um método oficial ou padrão para a avaliação da atividade antimicrobiana na fase vapor, mas basicamente existem dois métodos principais de avaliação com algumas variações conforme o objetivo do pesquisador. O primeiro método se vale de um vaso, dessecador ou cabine hermética, onde é possível introduzir várias placas de teste com diferentes microrganismos. Os vapores dos OE's são gerados em um volume conhecido que permite calcular a concentração do OE nesta atmosfera. Estes podem ser colocados em papel filtro com dimensões previamente definidas ou ainda em pequenos recipientes (Figuras 4, abaixo e 5, p. 28). Para melhorar a distribuição dos vapores, em alguns métodos é usado um agitador magnético e sua barra serve como hélice para a circulação dos vapores gerados.

Figura 4 – Sistema empregando dessecador para determinação da atividade citotóxica de compostos voláteis.

Fonte: MORTELSMANS, ZEIGER, 2000

Figura 5: Sistema empregando recipiente especial, com porta de amostragem, usado para expor fungos patogênicos aos vapores de óleo essencial.

Fonte SZCZERBANIK et. al., 2007.

Nos testes desenvolvidos por Mortelsmans e Zeiger (2000) e no método do Szczerbanik (2007) é possível amostrar a atmosfera do recipiente, mas não a atmosfera dentro da placa, a qual vai se alterando com as trocas gasosas com a atmosfera do recipiente de teste se a placa estiver fechada. Há também inconveniente de colocar um recipiente grande dentro da estufa de incubação.

Em outra variação do método o OE é colocado na parte superior em um papel filtro e as placas contendo os discos de ágar inoculadas na parte inferior. A caixa hermética é forrada com folhas de alumínio para evitar absorção dos óleos pelas paredes da caixa e proteger a caixa de contaminação (Figura 6, p. 29).

Figura 6 – Avaliação da atividade antimicrobiana dos vapores de OE's em caixa hermética.

Fonte: Bueno, 2015

Com este método, é possível testar vários microrganismos ao mesmo tempo o que para um *screening* é bastante útil, principalmente se for definido um valor limite de concentração para ser considerado ativo.

Outra forma de teste usa um aparato hermético especialmente construído para avaliação da atividade antimicrobiana na fase vapor em várias concentrações simultaneamente, sem criar um gradiente de concentração. O meio de cultura inoculado fica na parte superior e os poços onde fica o OE, na parte inferior. Os poços são hermeticamente fechados o que permite que cada poço tenha uma concentração diferente. Na Figura 7 (p. 30) está esquematizado um poço desse aparato de teste. (SEO et al., 2015).

Figura 7 – Desenho esquemático do poço de avaliação da atividade antimicrobiana de OE com fechamento hermético.

Fonte: SEO et al., 2015

Na Figura 8 (abaixo) é possível verificar que o aparato de teste da fase vapor compreende 7 poços com concentrações diferentes e controle positivo e negativo. O CIM é determinado pela concentração mais baixa onde não ocorreu crescimento.

Figura 8 – Avaliação da atividade antimicrobiana dos vapores de OE's em poços com diferentes concentrações de OE, com indicativo da CIM

Fonte: SEO et al., 2015

Neste sistema, temos a vantagem da possibilidade de testar vários microrganismos numa mesma atmosfera ou testarmos um microrganismo e várias concentrações simultaneamente. O método desenvolvido com o aparato de volatilização por poço tem como desvantagem a pequena área livre de volatilização de 1 mL que, com aumento da temperatura por causa da incubação e sendo o recipiente hermeticamente fechado, a pressão interna ao poço deve aumentar, o que o diferencia dos demais métodos. Adicionalmente as bactérias aeróbicas podem ter seu crescimento prejudicado pela falta de troca gasosa devido ao poço ser lacrado.

O segundo método utiliza a placa de Petri como recipiente de teste, individualizando o teste para cada microrganismo. O método apresenta a vantagem de podermos evitar contaminação cruzada e de determinar a concentração e a composição dos agentes antimicrobianos na atmosfera em contato direto com o microrganismo teste.

A primeira variante do método da placa de Petri é uma adaptação do método da difusão em disco, onde um disco de papel de filtro ou recipiente é colocado na tampa de uma placa de Petri. Os resultados são calculados pela formação de zonas de inibição que são medidas ou pelo número de colônias que são contadas como forma de expressar a atividade (Figura 9, p. 32). O meio inoculado é colocado sobre o fundo da placa e na tampa o OE. A placa é incubada nesta posição invertida para que os vapores dos OE's possam entrar em contato com o meio inoculado, sendo conhecido como método da placa invertida (ZAIKA, 1986).

Figura 9: Sistema para determinar a atividade antimicrobiana na fase vapor

Fonte Zaika, 1986.

Os OE's colocados diretamente em pequeno recipiente, como mostrado na Figura 9, geram uma evaporação mais lenta em função da altura da lâmina de OE formada, diferentemente quando se usa papel de filtro onde essa altura laminar se restringe à espessura do papel. O volume de OE testado e as dimensões do recipiente vão influenciar na velocidade de evaporação.

Outra variação do método utiliza uma placa especial na qual é possível a introdução de uma fibra de SPME (micro extração em fase sólida) (Figura 10, p. 33) na área de expansão (*headspace*) da placa para análise da composição dos vapores gerados (LOPEZ et al., 2005).

Figura 10: Variação do método da placa invertida com introdução de fibra de SPME para análise dos vapores. Obs.: medidas em milímetros

Fonte LOPEZ et. al., 2005

A possibilidade de avaliar a atmosfera interna da placa é bastante interessante principalmente para conhecer o perfil da composição do OE de forma a identificar o tempo em que os vapores refletem a composição do OE na fase líquida. As diferentes pressões de vapor de cada um dos componentes do óleo geram um gradiente de volatilização.

Em outra variação do método, um papel de filtro é colocado sobre o meio inoculado e sobre este é colocado um anel plástico que é tampado a fim de limitar a área de vaporização e formar um halo de inibição dentro do anel plástico (Figura 11, p. 34) (BUENO,2015).

Figura 11: Variação do método da placa invertida para determinação da atividade antimicrobiana na fase vapor.

Fonte Bueno, 2015

Este método mescla a difusão e vaporização no mesmo experimento em função do contato do papel de filtro embebido no OE com a superfície do meio de cultura. Portanto não é um método de determinação da atividade exclusivamente na fase vapor.

Uma variação mais recente para esse método é a utilização de placas de Petri compartimentadas (Figura 12, abaixo) em quatro seções, permitindo testar diferentes microrganismos na mesma atmosfera. Este teste tem como objetivo realizar um *screening* rápido de vários microrganismos ao mesmo tempo (KLOUCEK et al., 2012a e 2012b).

Figura 12: Esquema básico do teste desenvolvido com placa compartimentada.

Fonte KLOUCEK et. al., 2012 a e b.

Este método utiliza papel de filtro com dimensões da ordem de 80 mm e o OE é distribuído na superfície do papel colocado na tampa da placa. Para uma distribuição homogênea sobre a superfície do filtro, o OE é diluído em acetato de etila sempre calculando a dose para um volume fixo de aplicação.

Para a identificação do espectro da atividade antimicrobiana dos OE's, na fase vapor ou na fase líquida, a avaliação experimental é a abordagem fundamental e a metodologia usada pode influenciar nos resultados. Existem métodos padronizados para a avaliação de *sprays* germicidas (BUENO, 2015), mas ainda não há para os óleos essenciais na fase vapor. Os métodos apresentados anteriormente têm pontos positivos e negativos, porém a metodologia desenvolvida para *screening* (KLOUCK, 2012 a, b) adaptada para a avaliação do espectro de ação do OE frente aos microrganismos, pode ser uma boa alternativa em função da rapidez e facilidade de preparo, custo dos insumos e facilidade de descontaminação após os testes.

3 OBJETIVO:

O objetivo deste trabalho consiste em analisar a composição do óleo essencial de *Hesperozygis myrtoides* (St.Hil. ex Benth.) Epling, com ocorrência no Estado de São Paulo, e determinar seu potencial antimicrobiano. Adicionalmente, este óleo será utilizado como modelo para o desenvolvimento de um método de avaliação da atividade antimicrobiana na fase vapor com vistas ao desenvolvimento de produtos saneantes em vaporizadores com base em óleos essenciais.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a composição química do óleo essencial de *Hesperozygis myrtoides*.
- Determinar a dinâmica de evaporação do óleo essencial de *H. myrtoides* através da variação de sua composição na fase vapor.
- Desenvolver metodologia para avaliação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais na fase vapor.
- Avaliar o potencial antimicrobiano do óleo essencial de *H. myrtoides* nas fases líquida e vapor, através dos valores de suas concentrações inibitórias mínimas em ambas as fases.
- Avaliar a segurança, para futuras aplicações, por meio dos testes de citotoxicidade em células tumorais humanas e células normais derivadas de fibroblastos murinos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DA PLANTA

As amostras foram coletadas em fevereiro de 2008, setembro de 2009 e novembro de 2013, na região de São José dos Alpes, município de Campos do Jordão, Estado de São Paulo, (UTM 23K; 452.648m E; 7.486.063m S), em uma região com altitude de 1910 metros acima do nível do mar (figura 13, abaixo). Os indivíduos foram identificadas como *Hesperozygis myrtoides* (St.Hil. ex Benth.) Epling pela Dra. Inês Cordeiro do Instituto de Botânica do Estado de São Paulo, sendo as exsicatas depositadas no Herbário dessa mesma instituição, com os respectivos números de coletor NASCIMENTO 84, CORDEIRO 2131 e PEREIRA 02.

Figura 13 - Região de coleta de *H. myrtoides* em Campos do Jordão, utilizada neste estudo.

Figura 13 – Fonte Google Earth, 2014.

4.2 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DA PLANTA:

As plantas secas e frescas foram preparadas para a avaliação macroscópica e microscópica. Estas avaliações se basearam na literatura especializada (OLIVEIRA, AKISUE, G. AKISUE, M., 1998; SOUZA et. al. 2005) como base de reconhecimento das estruturas e indicativo do uso dos corantes. Os cortes histológicos foram feitos utilizando-se lâminas e micrótomo. Os cortes dos caules e folhas foram corados com azul de astra para identificar as paredes celulósicas que, quando coradas, apresentam cor azulada, com fucsina básica, que cora em vermelho as paredes celulares lignificadas e com Sudam III, que dá aos compostos lipofílicos (óleos e gorduras) uma cor vermelha mais clara, diferenciando assim as estruturas. A análise do corte foi feita em microscópio óptico Olympus® modelo CH2 e microscópio de fluorescência Leica® modelo DM 5500 B, com uma câmera DFC 365 FX acoplada e o programa LAS AF 3.2 para aquisição das imagens com o objetivo de ressaltar, quando possível, as estruturas da planta.

4.3 OBTENÇÃO DO ÓLEO VOLÁTIL

O material vegetal coletado foi seco à sombra e à temperatura ambiente. O óleo volátil foi obtido das partes aéreas do material vegetal por hidrodestilação em aparelho de Clevenger, durante 4 horas (Farmacopéia, 2001; OMS, 1992). A quantificação foi realizada por leitura do volume coletado no frasco florentino do aparelho de Clevenger, para cada extração realizada. Os óleos obtidos nas várias extrações foram misturados a fim de se obter uma amostra representativa e volumosa o suficiente para realizar os testes. Sendo estas armazenadas a -20 C, em frascos de vidro âmbar, até a análise dos constituintes.

4.4 ANÁLISE QUÍMICA

4.4.1 Análise do óleo essencial

Para a análise, os óleos voláteis obtidos por hidrodestilação foram diluídos em acetona p.a. (Merck) na razão de 1:99 (V/V). Para análise quantitativa, foi injetado 1,0 µL da amostra diluída, com razão de divisão de fluxo de 1/20, em um cromatógrafo Varian®, modelo CP 3380, com coluna DB-5 (30 m x 25 µm x 0,25 µm) equipado com um detector de ionização de chamas (CG-DIC). As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 250 e 290°C, respectivamente. A identificação dos componentes foi feita por cromatografia a gás, acoplada a um espectrômetro de massas (CG-EM), em um Cromatógrafo Agilent®, serie 6890, com um analisador de massas quadripolar (Agilente® 5973 Network Mass Seletive Detector) e equipado com uma coluna HP-5MS (30m x 25 µm x 0,25 µm). Para a análise no CG-EM, o injetor foi programado no modo sem divisão de fluxo com temperatura de 250°C e o volume de injeção foi de 1,0 µL da amostra diluída. O programa de temperatura foi o mesmo nos dois experimentos cromatográficos, com temperatura inicial de 40°C, sofrendo um incremento de 3°C/minuto até 240°C por 10 minutos. Em ambas as análises foi utilizado hélio como gás de arraste com uma pressão de 80 kPa e velocidade de 1 mL/min. Na análise por CG-DIC, foram ainda utilizados como gases auxiliares, nitrogênio, ar sintético e hidrogênio na razão de 1:1:10, respectivamente.

4.4.2 Análise da evaporação do óleo essencial

Para análise da dinâmica de evaporação dos componentes dos OE, uma massa de 6,3 µg (7µL) do óleo foi adicionada em um frasco com volume 0,062L, volume próximo ao da área livre para expansão dos vapores na placa de Petri, 0,054 L, gerando uma concentração de 101,6 µg/L. O frasco foi mantido em banho a 37°C, mesma temperatura empregada para a incubação das bactérias. Os produtos da evaporação foram coletados com seringa Gastight (Hamilton®) nos tempos 30, 90, 150, 210 e 270 minutos após a inserção do frasco com o óleo no banho. O volume de

1,0 mL dos produtos da evaporação do OE foi injetado em um Cromatógrafo Agilent®, serie 6890, acoplado a um espectrômetro de massas com analisador de massas quadripolar (Agilente® 5975 Network Mass Seletive Detector) equipado com coluna Agilent CP 8944 VF – 5 MS (30m x 25 µm x 0,25 µm). As temperaturas do injetor e do detector foram ajustadas para 220 e 290°C, respectivamente. O programa de temperatura foi o mesmo nos dois experimentos cromatográficos, com temperatura inicial de 60°C, sofrendo um incremento de 3°C/minuto até 240°C. Foi utilizado hélio como gás de arraste com uma pressão de 80 kPa e velocidade de 1 mL.min⁻¹.

4.5 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES

A identificação dos componentes do óleo foi baseada na comparação entre o índice de retenção e o espectro de massas de amostras autênticas e de dados retirados da literatura (ADAMS, 2007) ou, ainda, por comparação com espectros de massas registrados nos bancos de dados ADAMS, (2007) e Wiley 25. A fim de permitir uma comparação entre os tempos de retenção dos diferentes compostos obtidos com os dados da literatura, amostras autênticas e o banco de dados, foi utilizado o índice de retenção de Kováts uma série homologa de *n*-alcanos (C5 a C29) (BONATO, 2011).

Equação 1: Índice de Kováts

$$I = 100Z + \frac{100(\log t'_{RX} - \log t'_{RZ})}{(\log t'_{R(Z+1)} - \log t'_{RZ})}$$

Onde:

I= índice de Kováts

Z= número de átomos de carbono com menor peso molecular

t'_{RX} = tempo de retenção do composto x, sendo que t'_{RX} é intermediário a t'_{RZ} e t'_{R(Z+1)}

t'_{RZ} e t'_{R(Z+1)} = tempos de retenção ajustados de alcanos de cadeia normal

4.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.6.1 Microrganismos testados

Os microrganismos empregados nos ensaios foram selecionados a partir da listagem de organismos testes para produtos saneantes, abrangendo todas as classificações desses produtos (ANVISA, 1988): dois modelos de bactéria Gram positiva, *Staphylococcus aureus* subsp. *aureus* (ATCC 6538) e *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), dois modelos Gram negativos *Escherichia coli* (ATCC 8739) e *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027), e dois fungos, um filamentoso, *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404) e um leveduriforme *Candida albicans* (ATCC 10231). Este último foi incluído por se tratar de um organismo importante nas infecções nosocomiais. Estas cepas microbianas liofilizadas foram adquiridas na seção de Coleção de Culturas da FIOCRUZ (INCQS). As cepas foram reativadas em caldo nutritivo e fracionadas para serem estocadas em frascos tipo eppendorf com 10% da solução estéril de glicerol a -10°C.

4.6.2 Atividade antimicrobiana do OE na fase líquida

4.6.2.1 Preparação e viabilidade do inóculo

A partir das culturas dos microrganismos em estoque, estes foram reativados em caldo primeiramente e depois estriados em tubo inclinado com o meio de cultura correspondente, caldo e ágar caseína soja (TSB e TSA Difco®) para *S. aureus*, *B. subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* e caldo e ágar Sabouraud dextrose (SDB e DAS Difco®) para *A. brasiliensis* e *C. albicans*.

A padronização da densidade do inóculo foi feita através da comparação da turbidez com uma solução de sulfato de bário conforme a escala de Mc Farland (NCCLS/CLSI, 2003). A densidade óptica do tubo 0,5 da escala é comparada com a

densidade óptica do inóculo em espectrofotômetro (Micronal®) 630 nm. Sendo este valor estimado em $1,5 \times 10^8$ unidades formadoras de colônia (UFC) por mL.

Para *A. brasiliensis*, o inóculo foi preparado semeando em tubos inclinados este MO e, após seu crescimento, foi usada a técnica da lavagem de 3 tubos inclinados, ou seja no tubo foi adicionado 20 ml de solução salina estéril e agitado. O produto da extração (3 extrações por tubo) foi transferido para um frasco estéril. Sendo avaliada a concentração dos esporos por contagem em placa.

A partir de culturas estoques, as bactérias foram transferidas em estrias para a superfície do meio de cultura inclinado ágar caseína de soja e incubadas a 35-37 °C por 24 horas. *C. albicans* foi cultivada em SDA e incubada a 20-25 °C por 48 horas.

Para *A. brasiliensis* foram necessários três tubos cultivados em SDA e incubados a 20-25 °C por sete dias. A massa celular resultante do crescimento foi recolhida em 9 mL de solução salina estéril 0,85% (p/v) contendo 1% (p/v) polissorbato 80; a suspensão obtida foi padronizada através de diluições decimais seriadas.

A partir das suspensões padronizadas de cada microrganismo, foram efetuadas as diluições necessárias com solução salina estéril para obter uma concentração de 2×10^3 UFC/mL, para bactérias e fungos. No final de cada experimento foi realizado a semeadura da diluição microbiana para confirmação da viabilidade do inóculo.

4.6.2.2 Determinação da atividade antimicrobiana do OE na fase líquida

A atividade antimicrobiana foi avaliada pelo método de microdiluição, já estabelecido no grupo (MORENO et al., 2009; LIMA. et al., 2006 b). Os testes são realizados no meio de cultura TSB para bactérias e os fungos em SBA

A amostra para teste fora preparada, inicialmente, de uma solução concentrada 150 mg.mL^{-1} , do OE diluído em metanol:dimetilsulfóxido 1:1 (v/v). A partir desta solução estoque foram feitas diluições seriadas para determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

Soluções de antibióticos de Cloranfenicol, Amicacina, Nistatina, ciprofloxacina e tetraciclina, todos na concentração de 1mg/mL, foram empregadas como controles positivos, conforme o microrganismo teste.

O ensaio foi executado pelo método de microdiluição com técnicas assépticas, empregando microplacas de cultura de células de fundo chato estéreis, adaptando-se os volumes de inóculo, amostra e meio de cultura para 200 µL (ELOFF, 1998). As duas primeiras colunas da microplaca foram utilizadas para os controles, que foram: 200 µL de TSB ou SDB (controle do meio de cultura); 200 µL de meio de cultura inoculado com o micro-organismo teste (controle de crescimento), 190 µL de meio de cultura inoculado com o micro-organismo teste e 10 µL de solvente (DMSO:MeOH 1:1 v/v) (controle do solvente), e 10 µL da solução de antibiótico e 190 µL de meio de cultura inoculado com o micro-organismo em estudo (controle positivo ou de atividade antimicrobiana). As colunas restantes foram destinadas ao ensaio propriamente dito, e os controles com 10 µL das amostras e 190 µL de meio de cultura foram realizados para corrigir (descontar) a absorbância das próprias amostras. Após a incubação de 24 horas a 35°C, para bactérias, ou 48 horas a 25°C, para leveduras, foram realizadas as leituras em 630 nm utilizando-se o leitor de microplacas (LGC Biotecnologia®).

Para os fungos, o ensaio foi semelhante, no entanto com incubação por 72 horas a 25 °C e não foi realizada a leitura no leitor de microplaca. A determinação da inibição foi visual, considerando presença ou ausência de crescimento.

As amostras foram analisadas em quadruplicatas e o ensaio repetido duas vezes. Para a esquematização do trabalho com as microplacas foi montado uma planilha de acompanhamento que está exemplificado na Figura 14 (pág. 44).

Os resultados da CIM foram estipulados conforme NCCLS/CLSI, norma M 38A, indicando a menor concentração do OE de *H. myrtoides* onde não houve crescimento do microrganismo testado. Os resultados que foram bactericidas ou fungicidas (CBM/CFM) na fase líquida, foram estipulados pelas diluições dos poços que não tiveram crescimento. Estes foram semeados em meio de cultura sólido para verificar se haveria ou não crescimento.

Figura 14: Planilha de acompanhamento utilizada para os testes.

Microorganismo testado: _____

data: _____

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A												
B												
C												
D												
E												
F												
G												
H												

- Controle de crescimento (meio inoculado). Coluna 2
- Controle de crescimento do solvente (meio inoculado + solvente). Coluna 3
- Controle de sensibilidade ao antibiótico (_____). Coluna 4
- Controle de esterilidade do meio. Coluna 11
- Área da borda externa vazia

Diluições:

Placas : volume adicionado: _____

Placa 1: contagem: _____

Placa 2: contagem: _____

Placa 3: contagem: _____

4.6.3 Atividade Antimicrobiana na Fase Vapor dos Óleos Essenciais

4.6.3.1 Preparação e viabilidade do inóculo

O inóculo foi preparado com descrito na seção 4.6.2.1 (pág. 41) diferenciando que nos testes da fase vapor utilizamos meio de cultura sólido. Após vários testes, definimos como melhor forma a inoculação “*pour-plate*”, onde o inóculo é adicionado no centro da placa e em seguida o meio de cultura, ainda líquido, é vertido. Em movimentos na forma de “8” é feita a homogeneização da solução salina inoculada, com carga bacteriana conhecida, com o meio de cultura. A homogeneidade da distribuição dos microrganismos e sua densidade na placa é importante, por isso o volume de meio adicionado é sempre constate, 20,0 mL, a agitação segue a mesma sistemática. O volume de inóculo adicionado deve gerar entre 250 e 350 UFC´s. Este número de colônias permite uma distribuição mais homogênea e com um distanciamento, entre as colônias, mais adequado, facilitando a observação das diferentes colônias, seu tamanho, desenvolvimento e contagem.

4.6.3.2 . Determinação da atividade antimicrobiana do OE na fase vapor

O método utilizado foi adaptado a partir dos métodos descritos anteriormente na literatura (INOUE et al., 2001a; LOPEZ et al., 2005; SZERBANIK et al., 2007; KLOUCK et al., 2012 a e b). Os testes foram realizados em triplicata e o ensaio repetido duas vezes utilizando-se TSA para as bactérias e (SDA) para os fungos. A carga bacteriana de 250-350 UFC´s foi aplicada por *pour plate* e o OE foi aplicado em um papel filtro, com diâmetro de 80 mm, colocado na tampa da placa de Petri, método da “placa invertida”

As amostras foram preparadas a partir de uma solução estoque do OE diluído em acetato de etila. As diluições seriadas foram calculadas de maneira que a dose de OE testado estivesse no volume de 500µL. Este volume foi definido em função de ser suficiente para ser aplicado em toda área do papel de filtro. Após a aplicação

da solução de OE no papel de filtro, esperava-se 1 minuto para evaporar o solvente antes de fechar com a placa inoculada, método da placa invertida (Figuras 15 e 16, abaixo). Os testes indicaram que, após esse tempo, não houve influência do solvente sobre o crescimento dos microrganismos.

Figura 15: Cilindro de contenção dos vapores do OE.

Fonte: Marcos Pereira

Figura 16: Aplicação da solução teste no papel filtro posicionado na tampa da placa de Petri

Fonte: Marcos Pereira

As placas foram incubadas em estufa microbiológica a 37°C por 24 h para as bactérias e a 25°C por 48 h para os fungos. Após o período de incubação, as unidades formadoras de colônias (UFC) foram contadas e comparadas com o controle de crescimento. Em seguida, as placas de cada dose foram aeradas em capela de fluxo laminar, por 5 minutos, para eliminar os vapores do OE e novamente incubadas. Desta forma, podemos verificar se o efeito observado foi letal ou apenas inibidor do crescimento.

Como controle positivo para o ensaio e para comparação da atividade utilizamos soluções de formaldeído, devido a este ser um agente fumigante com propriedades desinfetantes e antissépticas. A partir de uma solução comercial de formaldeído 37% (m/m) (Synth®) foram preparadas diluições seriadas com água/metano (9:1) que também foram aplicadas no volume de 500 μ L.

Adicionalmente, foram preparados controles dos solventes utilizados: acetato de etila e água/metanol (9:1). As placas foram envoltas, individualmente, em filme plástico e papel alumínio e, para evitar o efeito cruzado na estufa pelo extravasamento dos vapores, acondicionadas em um cilindro de metal (Figura 17, a seguir).

Figura 17: Cilindro de contenção dos vapores do OE.

Fonte: Marcos Pereira

4.6.3.3 Cálculo da concentração dos vapores na área de expansão da placa.

A concentração do óleo essencial responsável pela inibição do crescimento foi determinada pela contagem das UFC's em relação ao controle de crescimento, usando a massa de óleo aplicada em função do volume livre da placa para a expansão dos vapores do óleo, em litros (Figura 18 – pág. 48):

Figura 18: Dimensões da placa de Petri para cálculo do volume de expansão dos vapores dos OE's

Medidas em centímetros:

Volume (V) de meio: 20 cm³

Diâmetro (D)= 8,5 ; Raio (r) = D/2

Altura (h)= 1,3

$$V_{\text{total}} = h \pi r^2 = 73,7 \text{ cm}^3$$

Volume total menos o volume ocupado pelo meio de cultura= Volume da área de expansão.

Volume da área de expansão 53,7 cm³ ou 0,0 54 L

Fonte: Marcos Pereira

Os resultados considerados como sensíveis à concentração do OE testado foram aqueles onde não houve crescimento no tempo de incubação do microrganismo. Este valor foi considerado como a concentração inibitória mínima (CIM) do OE. Para a determinação da concentração bactericida ou fungicida mínima (CBM/CFM), os papeis de filtro com OE foram retirados da tampa e as placas abertas foram aeradas por 5 minutos em cabine de fluxo laminar horizontal para que ocorresse a troca da atmosfera interna. Após, as placas voltaram para estufa para serem novamente incubadas. A menor concentração onde não houve crescimento ou desenvolvimento de colônias nas placas reincubadas foi considerada a concentração bactericida ou fungicida mínima.

4.7 ATIVIDADE CITOTÓXICA FRENTE A CÉLULAS TUMORAIS HUMANAS

Os testes da atividade citotóxica foram avaliados pelo ensaio da sulforodamina B (SRB) no laboratório de Extração da Universidade Paulista – UNIP, coordenado pela prof.^a Ivana B. Suffredini, seguindo a metodologia descrita por Monks et al. (1991).

4.7.1 Células Testadas

Os testes foram realizados frente a células de adenocarcinoma humano isoladas da próstata (PC-3) e da mama (MCF-7). Estes tipos de câncer são os mais incidentes na população brasileira após o câncer de pele não-melanoma (ALMEIDA, 2015).

4.7.2 Preparo das Células

As células foram cultivadas em meio RPMI-1640 (Bio Whittaker®) acrescido de 10% de soro fetal bovino e 1% de L-glutamina (Sigma®) por um período de 24 horas. Sendo então visualizadas e contadas em microscópio ótico Axiostar (Carl Zeiss ®). As células são manipuladas de modo a permanecerem na fase *log* de crescimento. A incubação é feita em estufa a 37°C em atmosfera com umidade relativa de 100% e 5% de CO₂. (ASSIS, 2009).

4.7.3 Avaliação da ação citotóxica frente às células tumorais humanas

Os ensaios foram realizados com 190 μL do meio contendo a concentração de 7.500 células/poço para PC-3 e 10.000 células/poço MCF-7 acrescidos do volume de 10 μL do óleo testado diluído em DMSO. As amostras foram preparadas a partir de uma alíquota de 10 μL que foi retirada da amostra a ser testada (diluída a 40 mg/mL) e adicionada a 190 μL de meio de cultura em um tubo de vidro, para se obter uma diluição de 1:200. Depois disso, uma diluição seriada em outros 4 tubos de vidro foi realizada para que fosse obtida uma série de cinco diluições logarítmicas. Alíquotas de 100 μL dessas suspensões foram transferidas para cada poço correspondente, contendo as células tumorais em 100 μL de meio de cultura. Cada diluição foi testada em sextuplicata. As concentrações finais no poço foram de 180,0; 18,0; 1,8; 0,18 e 0,018 $\mu\text{g/mL}$.

Parte dos poços da microplaca foi reservada para controle (branco) de amostra (100 μL de meio de cultura e 100 μL de amostra), controle de crescimento (100 μL de meio de cultura e 100 μL de suspensão celular) e controle do meio (tempo zero) (200 μL de meio de cultura). Como controle positivo, a solução de Doxorrubicina foi utilizada (100 μL de meio de cultura e 100 μL de Doxorrubicina).

As microplacas de 96 poços foram incubadas por 48 h e, após este período, as células viáveis foram fixadas com solução de ácido tricloroacético 50% por 1 hora, sob refrigeração. As células não fixadas foram removidas por lavagem com água. As células fixadas foram coradas com 100 μL da solução de SBR 0,4% em ácido acético 1% durante 10 minutos. O excesso de corante foi retirado e a placa foi seca. O tampão Tris-HCl (1,2 g/L, pH 7,2) foi adicionado (100 μL) para diluir o corante e permitir a leitura em leitora de microplacas (EL 800 BIO-TEK Instruments®) em 515 nm. Os resultados das transmitâncias das amostras foram comparados com os controles: de crescimento, do meio e da amostra. A equação 2 (p. 51), abaixo, indica o percentual de crescimento das células para cada concentração da amostra de óleo essencial. Os resultados plotados em gráfico (% de crescimento vs. dose) permitem calcular a equação da curva que foi utilizada para determinar o índice de toxicidade para 50% da população em estudo (IC_{50}).

Equação 2. Crescimento celular

$$\% \text{ Crescimento} = \frac{Tr \text{ amostra} - Tr0}{Tr \text{ controle} - Tr0}$$

Onde:

Tr amostra= transmitância de amostra ou antibiótico,

Tr0= transmitância do meio (tempo zero),

Tr controle = transmitância de controle de crescimento.

4.8 ATIVIDADE CITOTÓXICA FRENTE ÀS CÉLULAS NORMAIS DE FIBROBLASTOS MURINOS

Os testes da atividade citotóxica foram realizados nos laboratórios do Departamento de Ciências Exatas e da Terra da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, coordenado pela prof.^a Patricia L. Santos, através do método MTS “*CellTiter 96® Aqueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assays* (PROMEGA CORPORATION®, 2012). Sendo este um método alternativo, desenvolvido para minimizar a dor e o estresse de animais, bem como reduzir o número de animais utilizados nos testes clássicos *in vivo* (RAJCA-FERREIRA, 2016).

4.8.1 Células Testadas

Células derivada de fibroblastos de embriões de camundongos da espécie *Mus musculus*, a linhagem celular BALB/3T3 ATCC CCL 163 (Figura 19, p.52) têm como características específicas: não serem tumorgênicas; crescerem aderentes ao frasco de cultura em uma diluição elevada. (ESTEVES-PEDRO, 2013)

Figura 19 - Fotomicrografia da linhagem celular BALB/3T3 clone A31 em alta densidade.

Fonte: ATCC, 2013

4.8.2 Preparo das Células

Os ensaios que envolveram cultura de células foram realizados em condições assépticas, segundo as recomendações do *OECD Principles on Good Laboratory Practice* (OECD, 1998). A incubação celular ocorreu a 37°C, em atmosfera úmida e 5 % de CO₂. A composição do meio de cultura para o cultivo da linhagem BALB/3T3 clone A31 é denominado DM10, o qual corresponde ao DMEM (*Dubelcco's Modified Eagle Medium*, Gibco®), acrescido de antibiótico e antimicótico (penicilina 100 UI/mL, estreptomicina 100 mg/mL e anfotericina 0,025 mg/mL), 4 mmol/L de glutamina e 10% (v/v) de soro fetal bovino (ISO 10993-5, 2009). A incubação celular ocorreu até atingir a sub-confluência (aproximadamente 80%) na placa de cultura. Para o processo de descolamento celular foi utilizada a solução de tripsina 0,05% (m/v) EDTA 0,02% (m/v) em tampão fosfato de pH 7,4 (ICCVAM, 2006).

4.8.3 Avaliação da Citotoxicidade frente às células de fibroblastos murinos

O ensaio de citotoxicidade em BALB/3T3 foi realizado a partir de uma solução estoque do óleo de *H. myrtoides* diluído em DMSO. Destes, o volume correspondente a 13,42 mg foi diluído em 5.000 µL de DM10 (solução estoque) e para as diluições posteriores se utilizou a série geométrica decimal fator de diluição 2,15 (1.115 µL do meio mais 1.000 µL da solução estoque) que tem como vantagem a possibilidade de comparar estudos toxicológicos independentes (RENAMA, 2016).

Os testes foram realizados em quintuplicada para cada dosagem utilizada. Foram semeadas (2×10^4 células/poço) em placas de 96 poços e incubadas por 24 horas. Após a incubação inicial, o ensaio foi realizado pela adição de 50 µL da solução contendo a concentração adequada das diluições do óleo essencial e 50 µL do meio em cada poço. Parte dos poços de microplaca foi reservada para controle (branco) de meio (100 µL de meio de cultura), controle de crescimento (50 µL de meio de cultura e 50 µL de suspensão celular). Como controle positivo, o solvente DMSO foi utilizado (50 µL de DMSO e 50 µL de suspensão celular).

Após 24 horas da adição de amostras, o meio de cultura foi retirado e os poços foram lavados com a solução de salina (0,9 %). Em seguida, foram adicionados 100 µL da solução do corante vital MTS/PMS (5-(3-carboximetóxfenil)-2-(4,5-dimetiltiazolil)-3-(4-sulfofenil) tetrazólio / meta-sulfato de fenazina). Depois da adição do corante, as placas foram incubadas durante 3 horas (37°C, CO₂ 5%).

Após, o conteúdo de cada poço foi retirado e os poços foram lavados com 100 µL da solução de salina (0,9%). Em seguida, foram adicionados 150 µL da solução de dessorção (ácido acético 1%, água 49%, etanol 50%) e as placas foram agitadas durante 10 min, utilizando Compact Rocker OR300 (MecLab). Posteriormente, a alteração na taxa de crescimento foi avaliada pela medida de absorbância (490 nm), utilizando espectrofotômetro de placa Leitor BioTek (Synergy HT) (NIH, 2001; ICCVAM, 2006).

Os resultados, obtidos a partir da leitura da absorbância, foram avaliados pelo programa Phototox®: Statistical Software Phototox Version 2.0. As curvas dose-resposta de viabilidade celular foram determinadas. A partir das curvas, os valores de IC₉₀ e IC₅₀,

que correspondem respectivamente à concentração máxima não tóxica (com 90% e 50% de viabilidade celular) e ao potencial citotóxico da amostra, foram calculados (DOYLE e GRIFFITHS, 2000). Os valores de IC_{50} foram utilizados para determinar a toxicidade oral aguda por meio da dose letal mediana (DL_{50}), segundo a Equação 3 (abaixo) (NIH, 2001; ICCVAM, 2006). Baseado em valores de DL_{50} assim obtidos, a toxicidade das amostras foi agrupada, usando o sistema de classificação de *United Nations Globally Harmonised System* (GHS) em cinco categorias (Quadro 2, abaixo) (ESTEVES-PEDRO, 2013; BULGHERONI et al., 2009).

Quadro 2: Sistema de classificação de *Globally Harmonised System* baseada em dose letal

Categorias de GHS	DL_{50} mg/kg	Efeito para a saúde humana
1	<5	Fatal se ingerido
2	5-50	Fatal se ingerido
3	50-300	Tóxico se ingerido
4	300-2000	Perigoso se ingerido
5	2000-5000 ou >5000	Pode ser perigoso se ingerido ou não classificado

Fonte: **GHS**-*Globally Harmonised System*, **DL_{50}** - dose letal mediana (BULGHERONI et al., 2009)

Através do valor de IC_{50} , calculamos a toxicidade oral aguda por meio da dose letal mediana (DL_{50}), segundo a Equação 3, abaixo (NIH, 2001; ICCVAM, 2006).

Equação 3: Cálculo da DL_{50}

$$\text{Log } DL_{50} (\text{mg/Kg}) = 0,372 \times \text{Log } IC_{50} (\mu\text{g/mL}) + 2,2014$$

Onde:

DL_{50} - dose letal mediana

IC_{50} - Índice de toxicidade para 50% da população das células em estudo

Fonte: NIH, 2001; ICCVAM, 2006.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DA PLANTA

As plantas coletadas em 2009, devidamente identificada como *Hesperozygis myrtoides* (St-Hi.e ex Benth.) Epling, foram utilizadas nos primeiros trabalhos de extração do óleo essencial e avaliação morfológica. Em outubro de 2013, nova coleta foi realizada nas mesmas coordenadas geográficas e as partes aéreas ainda frescas foram preparadas para a avaliação morfológica e posteriormente a extração do óleo essencial das partes secas. Foi observado que os espécimes estavam concentrados em uma área bem definida (Figura 20, abaixo) com um raio aproximado de 20 a 25 metros. Fora deste perímetro não os encontrávamos mais. A altitude registrada no equipamento de GPS indicou 1910 m. A área era de crista da montanha (Figura 21, abaixo), notamos uma incidência elevada de ventos, temperatura mais amena em relação ao vale situado ao pé da montanha e a ausência de vegetação de porte arbóreo.

Figura 20: Vista da região de coleta

Fonte: Marcos Pereira

Figura 21: Vista da região de coleta tendo em 1º plano *H. myrtoides*

Fonte: Marcos Pereira

5.2 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA

5.2.1 Caracterização macroscópica

Pela avaliação macroscópica a planta apresenta porte herbáceo e odor pronunciado mentolado e levemente canforado, que, pelo esmagamento das folhas, é bastante aumentado. No campo, encontramos indivíduos com tamanho aproximado de 20 a 63 cm de altura (Figuras 22 e 23, abaixo).

Figura 22: Planta de *H. myrtoides* em seu local de germinação

Fonte: Marcos Pereira

Figura 23: *H. myrtoides* vista latera, com flores.

Fonte: Paulo Moreno

As folhas têm contorno elíptico com ápice agudo e base em cunha com formato estreito e oblongo na proporção de 3:1 com comprimento entre 9 a 14 mm. As margens são revolutas e a nervação é tipo peninérvia (Figuras 24 A e B, abaixo)

Figuras 24: *H. myrtoides* folha nas posições: adaxial (A) e abaxial (B)

Fonte Marcos Pereira

Fonte Marcos Pereira

As folhas se apresentam, em relação ao caule e entre si, com disposição alterna e transversal (Figura 25, abaixo).

Figura 25: *H. myrtoides* detalhe da disposição das folhas

Fonte: Marcos Pereira

Na superfície da folha, tanto na posição adaxial quanto na abaxial, se observam tricomas glandulares com 4 a 8 células (Figuras 26 e 27, abaixo). A Média calculada é de 9,8 tricomas glandulares por mm² de área foliar.

Figura 26: *H. myrtoides* folha posição adaxial, tricomas glandulares corados com sudam III – microscópio óptico.

Figura 26: Fonte Marcos Pereira

Figura 27: *H. myrtoides* folha posição adaxial, tricomas glandulares em verde – microscópio de fluorescência.

Figura 27: Fonte Marcos Pereira e Pierro Bagnaresi

5.2.2 Caracterização microscópica

Na avaliação microscópica da folha se observa que a epiderme é recoberta por uma cutícula que apresenta estrias. Os tricomas tectores encontrados são simples e pluricelulares com cutícula verrugosa (Figura 28, p. 59) e os tricomas glandulares, que são compostos de 4 a 8 células, estão localizados em depressões (Figura 29, p.59).

Figura 28: Região da folha onde se evidencia o tricoma tector com cutícula verrugosa.

Fonte Marcos Pereira e Roberto Honório

Figura 29: Região da folha onde se evidencia a depressão com presença de glândula secretora.

Fonte Marcos Pereira e Roberto Honório

O sistema vascular (Figura 30, abaixo) apresenta feixe colateral aberto onde se observa o câmbio fascicular.

Figura 30: Feixe vascular colateral aberto, Floema, xilema e câmbio fascicular.

Fonte Marcos Pereira

O caule apresenta forma quadrangular, característica das Lamiaceae, com elevado número de tricomas tectores pluricelulares e alguns tricomas glandulares com pedúnculo curto (Figura 31, abaixo). O feixe vascular apresenta estrutura sifonostélica contínua (Figura 32, a seguir).

Figura 31: Aspecto geral do caule onde se evidenciam os tricoma tectores e a disposição estrutural do feixe vascular e a região medular.

Fonte: Marcos Pereira

Figura 32: Região do caule onde se evidenciam felogênio, floema, xilema, e região medular.

Fonte: Marcos Pereira

Os estômatos observados na parte adaxial da folha foram classificados como diacíticos, mesmo tipo encontrado na *Mentha x piperita* (PEGORARO, 2007)

Não foram encontrados na literatura estudos morfo-anatômicos para o gênero *Hesperozygis*. Em estudos com espécies de *Mentha*, que também pertence a sub-tribo *menthinae*, indicaram que as estruturas secretoras são caracterizadas por tricomas glandulares peltados e capitados, dispostos na superfície das folhas (GIULIANI & BINI, 2008; TEIXEIRA, 2013). Por outro lado, em *H. myrtoides* os tricomas glandulares nas folhas se encontram em invaginações ou depressões, o que pode indicar uma diferenciação para proteção desses tricomas aos ventos constantes e mudanças climáticas abruptas, comuns para regiões de altitude e topo das montanhas, onde se encontra a espécie.

5.3 OBTENÇÃO DO ÓLEO VOLÁTIL

Devido à capacidade do aparelho de Clevenger, as extrações foram feitas em lotes e obtivemos os seguintes rendimentos para cada lote das plantas coletadas em novembro de 2013, 2,25%, 1,89%, 1,80%, 2,04%, resultando uma média de 1,99% de óleo essencial obtido das partes aéreas secas. Os óleos recolhidos na extração de cada lote, apresentaram coloração levemente amarelada e foram misturados, resultando um total de 11,8 gramas de óleo com densidade relativa de 0,895 g/cm³.

No gênero *Hesperozygis* o teor de óleo essencial pode variar entre 1 e 4,9% (VON POSER et al., 1996; FRACARO, 2006; RIBEIRO et al., 2010; GONZALES-CHAVEZ et. al., 2011). O rendimento obtido com *H. myrtoides* variou entre 0,98% e 2,99% com as amostras coletadas em 2010 e 2012 na cidade de Aiuruoca, MG, (MARTINI; 2011a, CASTILHO, 2016). Neste trabalho, os resultados obtidos para o rendimento dos óleos essenciais das folhas de *H. myrtoides*, nas três coletas em Campos de Jordão, foi de 1,80, 0,77 e 1,99%, respectivamente para as coletas de agosto de 2008, setembro de 2009 e novembro de 2013. Os resultados por nós obtidos são comparáveis com aqueles obtidos no espécime coletado em Minas Gerais e com os dados reportados para o gênero *Hesperozygis*.

5.4 COMPOSIÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *H. myrtoides*

5.4.1 Composição na fase líquida

A composição do óleo essencial do gênero apresenta como componente majoritário pulegona, exceto para espécie *H. rhododon* na qual mentona foi o composto principal (VON POSER et al., 1996). A variação quantitativa de pulegona no gênero *Hesperozygis* é grande chegando a 95,7% para *H. ringens* (TONI et. al. 2014); 40,8% para *H. marifolia* (GONZALES-CHAVEZ et. al, 2011) e 29,6% para *H. rhododon* (RIBEIRO et. al. 2010.)

A análise da composição do óleo essencial de *H. myrtoides* detectou, pelo menos, 15 compostos (Tabela 1, abaixo). O composto majoritário para o espécime de Campos de Jordão foi a pulegona seguido de iso-mentona, em ambos períodos de coleta, confirmando os resultados anteriores para o gênero e também para a espécie (MARTINI, 2011b; CASTILHO, 2016).

Tabela 1: Composição química do óleo essencial de *H. myrtoides*
(Coletas: agosto, 2008 e outubro 2013).

Compostos	2008		2013		
	IK lit.	Teor (%)	IK	Teor (%)	IK
alfa-pineno	932	1,0	936	0,6	933
beta-pineno	974	1,2	974	0,5	979
limoneno	1024	5,1	1035	4,2	1029
1,8 cineol	1026	-	-	1,2	1033
linalol	1095	0,7	1108	-	-
mentona	1148	6,2	1161	-	-
iso-mentona	1158	15,8	1173	16,2	1167
não identificado (M ⁺ 152)	-	-	-	0,7	1177
não identificado (M ⁺ 154)	-	-	-	0,5	1180
trans-isopulegona		5,4	1183	-	-
neoisomentol	1186	9,7	1191	8,3	1190
pulegona	1237	30,8	1253	48,8	1242
acetato de neoisomentila	1305	12,2	1316	11,1	1305
acetato de trans-isopulegona		2,5	1319	3,1	1308
não identificado (M ⁺ 152)	-	-	-	0,59	1343
não identificado	-	1,3	1355	-	-
não identificado (M ⁺ 154)	-	-	-	1,2	1399
endo-arbozol	1434	3,0	1411	-	-
beta-cariofileno	1417	4,0	1422	1,8	1417
germacreno D	1480	1,0	1483		
óxido de cariofileno	1583	-	-	0,8	1581
Total	-	99,9	-	99,6	

IK: Índice de Kováts- IK lit. Índice de Kováts literatura (Adams, 2007)

Na Tabela 2 (abaixo) estão comparados os compostos, em comum, encontrados nas amostras de Aiuruoca coletadas em abril de 2010 e 2012, com os encontrados em Campos do Jordão nas coletas de 2008 e 2013, sendo pulegona e iso-mentona constituintes majoritários em ambas as localidades. Os valores das coletas de Aiuruoca em 2012 são a média dos componentes individuais do óleo referentes às quatro coletas no ano. Nessas amostras foram detectados picos no acúmulo de limoneno (22,7%) em novembro, pulegona (57,3%) em junho e iso-mentona (47,7%) em julho (CASTILHO et al., 2016).

Tabela 2: Comparativo da composição química comuns aos óleos essenciais de *H. myrtooides* de duas localidades. Percentual dos compostos presentes nos óleos.

Compostos	Aiuruoca ^A	Aiuruoca ^B	C. do Jordão ^C	C. do Jordão ^D
alfa-pineno	0,2	0,4	1,0	0,6
beta-pineno	0,3	0,4	1,2	0,5
beta-cariofileno	0,3	1,2	4,0	1,8
limoneno	3,5	9,3	5,1	4,1
mentona	0,3	0,3	6,2	-
neo isomentol	2,6	3,1	9,7	8,1
iso-mentona	32,7	30,4	15,8	16,2
pulegona	44,4	35,5	30,8	48,8
% Total	84,3	80,6	73,8	80,1

(A) MARTINI et al.; 2011b -

(B) CASTILHO et al., 2016 (média do ano de 2012 – 4 coletas)

(C) Agosto de 2008

(D) Outubro de 2013

Avaliando-se a concentração média de pulegona em cada localidade observou-se um teor semelhante em ambas, Aiuruoca com média de 40,0% e Campos do Jordão com 39,8%. Contudo, com relação à quantidade média de iso-mentona os óleos extraídos em Campos do Jordão (16,0%) apresentaram praticamente a metade do valor encontrado em Aiuruoca (31%).

Os estudos das rotas biossintéticas dos monoterpenos, em *Menta x piperita*, demonstram que o (-) limoneno é o precursor dos derivados com esqueleto *p*-mentano. Esse composto, é formado a partir do geranil difosfato, convertido sequencialmente em *trans*-isopiperitenol, (-) isopiperitona, (+) isopulegona e por fim em (+) pulegona. A partir da (+) pulegona, dois caminhos são possíveis, a enzima pulegona redutase pode dar origem à (+) mentona, precursora do mentol e neo-mentol, ou (-) iso-mentona, que é precursora do iso-mentol, e neo-isomentol (Figura 33, p. 65). (CROTEAU et al., 2010).

Os resultados aqui obtidos, somados àqueles da literatura, indicam certa similaridade na rota biossintética dos monoterpenos presentes no óleo essencial *H. myrtoides* com aquela proposta para as espécies de *Mentha*. Em nossas análises detectamos os compostos oriundos da rota da iso-mentona, iso-mentol e neo-isomentol. Contudo, na outra via, somente a mentona foi detectada em algumas análises; os produtos finais dessa via, mentol e neo-mentol, não são identificados. A análise sazonal da composição dos óleos de *H. myrtoides* (CASTILHO et al., 2016) indicou que a menor concentração de pulegona coincide com a maior concentração relativa de iso-mentona (21,4 e 47,7% respectivamente) e quando pulegona se encontra em alta quantidade, temos menores valores para iso-mentona (57,3 e 21,1% respectivamente). A semelhança nas rotas biossintéticas pode ser explicada pela proximidade taxonômica entre *Mentha* e *Hesperozygis*, ambos fazem parte da mesma subfamília Nepetoideae, tribo Mentheae e subtribo Menthinae. (BRAUCHLER et al., 2010; ANGHILLO et al., 2014).

Figura33: Rota da biossíntese do mentol no óleo essencial de *Mentha x piperita*

Fonte: Adaptado de Rodney Croteau; Toni M. Kutchan & Norman G. Lewis. In: BUCHANAN, GRUISSEM & JONES, 2010; Natural Products, Secondary Metabolites - Capítulo 24.

5.4.2 Composição na fase vapor

Avaliação da dinâmica de evaporação dos componentes individuais do OE de *H. myrroides* permitiu observar o tempo necessário para que a atmosfera formada pelo OE dentro da placa de Petri reflita a composição da fase líquida. A tabela 4 (abaixo) indica as concentrações relativas, em tempos diferentes, da composição da fase vapor dentro de um frasco com volume conhecido hermeticamente fechado, sendo o tempo zero o óleo na fase líquida.

Tabela 3: Comparativo da composição química dos vapores do óleo essencial de *H. myrroides* em função do tempo de volatilização. Percentual dos compostos presentes nos óleos na fase vapor.

		% rel. na fase vapor nos tempos em minutos					
IR	compostos	Zero	30	90	150	210	270
932	alfa-pineno	0,58	10,27	5,02	2,24	1,92	1,21
972	sabineno	NI	2,54	2,21	1,85	1,98	1,73
978	beta-pineno	0,53	6,23	3,35	1,33	1,05	0,61
1029	limoneno	4,16	28,76	21,49	8,42	5,13	2,98
1032	1,8-cineol	1,21	5,18	5,55	3,05	2,04	1,19
1157	mentona	NI	5,92	7,06	10,21	10,76	9,97
1166	iso-mentona	16,21	10,04	12,69	14,98	16,24	13,79
1190	neo-isomentol	8,13	2,29	3,2	4,66	4,75	6,05
1239	pulegona	48,83	25,45	33,63	41,84	44,04	48,13
1305	acet. de iso-mentila	11,12	3,32	5,09	7,43	8,38	10,00
1319	acet.de trans isopulegona	3,10	NE	NE	NE	NE	NE
1422	beta cariofileno	1,80	NE	NE	NE	NE	NE
Total			100,00	99,29	96,01	96,29	95,66

NE= Não Encontrado

O limoneno, um hidrocarboneto monoterpênico, aparece como o composto majoritário na primeira amostragem, 30 minutos após a adição do OE. Com o passar do tempo a concentração relativa de pulegona, um monoterpeno oxigenado, vai aumentando. A concentração relativa de pulegona só atinge um valor semelhante àquele observado na fase líquida no tempo de 270 min.

A Figura 34 (abaixo) representa a dinâmica de evaporação dos componentes do OE, onde se observa em destaque alfa-pineno e limoneno, hidrocarbonetos monoterpênicos, que apresentam volatilizações mais rápidas, traduzidas em maior percentual relativo nos tempos iniciais em relação aos monoterpênicos oxigenados, iso-mentona e pulegona.

Figura 34: Representação gráfica da composição química dos vapores do óleo essencial de *H. myrtoides* em função do tempo de volatilização. Percentual dos compostos presentes nos óleos na fase vapor.

No tempo de 90 minutos, pode ser observada uma maior participação dos monoterpenos oxigenados na composição da fase vapor. As diferentes pressões de vapor dos componentes individuais do óleo indicam a maior facilidade de volatilização dos compostos como o limoneno seguindo a ordem de saída no CG.

Na fase líquida (tempo zero) não foi identificada a presença de mentona, porém na fase vapor esse composto foi detectado numa proporção considerável. Essa diferença entre a fase líquida e a vapor pode ser o resultado da oxidação do limoneno em mentona devido à exposição ao calor (volatilização à 37°C) e à presença do oxigênio na atmosfera do frasco. Essa hipótese pode ser suportada pela presença de mentona nas análises da composição dos OE obtidos com o material das coletas de 2008 de Campos do Jordão, onde esse composto foi detectado numa proporção de 6,2 %. A extração desses óleos foi feita após um longo período de secagem ao natural, o que poderia ter contribuído para uma oxidação de alguns de seus componentes em mentona, principalmente a partir do limoneno. O mesmo pode ter ocorrido com as amostras de Aiuroca, onde a mentona foi identificada com concentrações entre 0,3 - 0,5 % (MARTINI et al.; 2011b; CASTILHO et. al., 2016).

A avaliação da composição de OE's de espécies de coníferas do Japão submetidos ao aquecimento de 50°C por 24 h sugeriu que alguns monoterpenos, tais como alfa-terpineno, beta-miceno e limoneno, podem ter sido convertidos em paracimeno, sendo proposto que o caminho dessa degradação seria polimerização e/ou oxidação e desidrogenação (KUSUMOTO & SHIBUTANI, 2015). Em outro trabalho, onde foi analisada a volatilização de OE de *Crithmum maritimum* L., visando utilização em produtos alimentícios, os percentuais relativos da composição do OE apresentaram uma diferença significativa entre o tempo zero e o tempo 50 minutos para todos os componentes (PETRETTO et al., 2013). Um comportamento semelhante foi observado para o OE de *H. myrtoides* que também, neste tempo, apresentava concentrações diferentes do tempo zero. Para uma possível utilização de OE em ambientes públicos, escritórios ou residências como sanitizante ambiental, seria interessante verificar a interação dos agentes oxidantes, como as irradiações solares, os índices de ozônio, dióxido e monóxido de carbono presentes no ar atmosférico, com os componentes químicos que formam o OE (GROSJEAN et al., 1996; HUEY, et al., 2007).

5.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DO OE de *H. myrtoides*

Dentre os métodos usados para a determinação da atividade antimicrobiana na fase líquida, foi escolhido o método da microdiluição. Este método é um dos mais tradicionais, principalmente por requerer pequenas quantidades de amostra o que possibilita ter um número maior de réplicas, tornando-o mais preciso (ELOFF, 1998).

Para a fase vapor não há uma metodologia padrão para a avaliação da atividade antimicrobiana. Em geral, é usado um método que compreende colocar a placa com ágar semeado com o microrganismo sobre um reservatório com OE (método da placa invertida) e o halo de inibição é o critério mais usado para determinar a atividade antimicrobiana (LANG & BUCHBAUER, 2012). Optou-se por testar as variações e fazer adaptações ao método da placa invertida, citados na literatura, a fim de estabelecer uma metodologia que seja bem adaptada às condições existentes a nossa disposição, fácil de reproduzir e com custo relativamente baixo.

Como um dos objetivos específicos é comparar os resultados entre a fase líquida e a fase vapor, foi necessário harmonizar as unidades para a expressão dos resultados para CIM e CBM/CFM. Normalmente os resultados são expressos em unidade de massa de OE por unidade de volume ($\mu\text{g.mL}^{-1}$, mg.mL^{-1} ou mg.L^{-1}) ou ainda unidade de volume de OE por unidade de volume ($\mu\text{L.mL}^{-1}$ ou mL.L^{-1}). Em nosso caso, a unidade de massa adotada foi o miligrama (mg) e a unidade de volume o litro (L), passando a expressar todos os resultados em mg.L^{-1} .

Os testes realizados com as soluções de antibióticos de cloranfenicol, amicacina, nistatina, ciprofloxacina e tetraciclina, todos na concentração padrão de 1mg.mL^{-1} (1.000 mg.L^{-1}), confirmaram que os microrganismos foram sensíveis aos antibióticos.

Como o método da microdiluição está bem estabelecido no grupo (MORENO et al., 2009; LIMA et al., 2006 b), não houve alterações na metodologia previamente estabelecida.

Entretanto, para a fase vapor os primeiros testes seguiram a indicação de avaliar o potencial antimicrobiano pela dimensão dos halos. Porém, nos testes iniciais, estes se apresentaram disformes e irregulares, impedindo de medir acuradamente a

área formada, com os meios disponíveis. Uma forma alternativa para a avaliação do efeito inibitório é a contagem do número de colônias formadas. Dessa forma a comparação numérica do efeito obtido com um controle de crescimento fornece um percentual relativo do efeito de inibição. Os resultados iniciais obtidos com o formaldeído (controle positivo) indicaram que a contagem seria uma maneira rápida e reproduzível de avaliar o efeito inibitório na fase vapor. Outra vantagem foi poder observar mais detalhadamente o desenvolvimento das colônias individualmente. Mesmo em dosagens onde não houve inibição total do crescimento para o formaldeído, foi possível observar que as colônias se desenvolveram de forma mais lenta em relação ao controle de crescimento, indicando ação de retardo no desenvolvimento dessas colônias (Figura 35, a seguir).

Figura 35. Teste para contagem de colônias de *C. albicans* após exposição a concentrações crescentes de formaldeído. Aumento da concentração do OE no sentido da seta.

Aumento da concentração do OE no sentido da seta.

Fonte: Marcos Pereira

Após definir que a forma de avaliação da eficiência da ação antimicrobiana da fase vapor seria por contagem das UFC's, se procedeu à determinação da carga microbiana e do método de semeadura. A carga mais indicada foi de 250-350 UFC's que nos permitiu uma distribuição e distanciamento adequados pela superfície da placa das colônias, facilitando sua contagem e a observação individual de cada colônia. O primeiro método de semeadura testado foi *spread-plate* ou distensão, no qual o volume correspondente à carga microbiana é transferido para a superfície do meio e espalhado com alça de Drigalsky. O segundo, foi semeadura pelo método de *pour-plate* ou disseminação (método em profundidade) no qual a carga microbiana é

adicionada na placa e sobre ela é vertido o meio de cultura fundido (e resfriado à 42-45°C), sendo homogeneizado por agitação suave em forma de “8”. O inóculo aplicado por *spread-plate* na superfície foi mais influenciado pelo volume e tempo de absorção e pequenas inclinações das bancadas, o que gerou áreas com maior concentração de colônias, inclusive com agrupamentos que impediam a contagem. O método, *pour-plate*, apresentou uma melhor homogeneidade na distribuição das colônias (Figura 36, a seguir).

Figura 36: *C. albicans* Inoculada por *spread-plate* (A) e *pour-plate* (B); ambas com carga bacteriana 800UFC

Fonte: Marcos Pereira

O OE a ser vaporizado no interior da placa é colocado, em geral, em discos de papeis de filtro estéril com diâmetros que variam entre 6,25 mm (MARUZZELLA & SICURELLA, 1960) e 9,0 mm (ANDRADE et. al., 2015) quando se usa o halo de inibição como forma de avaliar a ação antimicrobiana. No *screening* onde se testava 4 microrganismos ao mesmo tempo, em placa de Petri com divisão, o diâmetro do papel usado foi 85 mm (KLOUCK et al, 2012 b). Na avaliação pelo número de UFC's foi percebido que a homogeneidade da atmosfera interna da placa de Petri era afetada pelo formato e pela área do papel de filtro utilizado. Para minimizar estes efeitos, foram testados papeis de filtro com diâmetros variados e o diâmetro de 80 mm foi o mais adequado, já que recobria quase a totalidade da placa, a qual tem diâmetro de 85 mm. Esta dimensão de papel filtro exigiu uma distribuição do OE em todo o papel de filtro para se ter uma atmosfera homogênea no interior da placa. Para isso o OE foi diluído em acetato de etila e suas diluições seriadas foram calculadas para o volume final de 500 µL, volume suficiente para cobrir todo o papel de filtro (Figura 37, p. 72). O acetato

de etila pode influenciar o desenvolvimento dos microrganismos. No entanto, deixando o papel de filtro com a solução OE em acetato de etila evaporar por 1 minuto esta influência é eliminada (KLOUCK et. al., 2012b). Com estes procedimentos foi obtida a melhor homogeneidade dos vapores do OE, gerando uma atmosfera interna à placa equilibrada na concentração do OE.

Figura 37: Papel de filtro sendo embebido na solução de acetato de etila/OE (aplicado 500 μ L, gota a gota, de modo a recobrir todo o papel de filtro)

Fonte: Marcos Pereira

O formaldeído (metanal) foi utilizado como controle positivo, por sua ação antimicrobiana e alta volatilização. Seu manuseio requer cuidados devido a seus efeitos adversos (altamente tóxico, alergênico e carcinogênico). Por isso seu uso foi proibido em saneantes, em processos de desinfecção e esterilização de artigos médico-hospitalares (ANVISA, RDC 35 e 37 de 2008).

Nos testes, da fase líquida, foi considerada como CIM a menor concentração do OE de *H. myrtoide*s, onde não houve crescimento do microrganismo testado (NCCLS/CLSI norma M 38 A). Para concentração bactericida ou fungicida mínima (CBM/CFM), as diluições dos poços que não tiveram crescimento na placa de Elisa foram semeadas em placa Petri e incubadas para verificar se haveria crescimento dos microrganismos. A menor concentração testada onde, não ocorreu crescimento na placa, foi considerada a concentração bactericida ou fungicida mínima.

Nas determinações de CIM na fase vapor, quando se usa o halo de inibição como controle, o valor é calculado comparando o diâmetro dos halos gerados pelo OE

com aquele obtido com um controle, geralmente éter dietílico (LOPEZ et al., 2005). Em nosso sistema de contagem de colônias na fase vapor o CIM é a menor concentração do OE de *H. myrtoides*, onde não foi detectada a formação de colônias do microrganismo testado. Não foram encontrados na literatura indicações de determinação de CBM/CFM na fase vapor. Com a finalidade de determinar se a atividade observada para o OE era bacteriostática ou fungistática, após o período normal de incubação, os papéis de filtro contendo o OE foram retirados e as placas deixadas abertas em capela de fluxo laminar horizontal e aeradas por 5 minutos, para que fosse trocada a atmosfera, eliminando a presença do OE. Após a aeração, as placas são novamente incubadas. Na menor concentração, onde não houver crescimento ou desenvolvimento de colônias nas placas re-incubadas será considerada como a concentração bactericida ou fungicida mínima (CBM/CFM).

Na tabela 4 (abaixo) estão sumarizados os valores de CIM e CBM/CFM obtidos para o OE de *H. myrtoides* frente aos seis microrganismos testados.

Tabela 4: Valores determinados para CIM e CBM/CFM do óleo essencial de *H. myrtoides* pelos métodos da microdiluição e placa invertida

Microrganismo (ATCC)	Fase líquida (mg.L ⁻¹)		Fase vapor (mg.L ⁻¹)		
	CIM	CBM/CFM	CIM	CBM/CFM	Formol
<i>A. brasiliensis</i> (16404)	1.447	1.740	378,0	594,0	0,149
<i>B. subtilis</i> (6633)	1.884	2.153	704,8	1.044,0	0,224
<i>C. albicans</i> (10231)	94,4	157,3	0,833	1,6	0,820
<i>E. coli</i> (8739)	>151.000	ND	>3.000	ND	0,060
<i>P. aeruginosa</i> (9027)	3.170	4.900	2.600	3.700	0,186
<i>S. aureus</i> (6538)	19,0	54,7	0,392	0,522	0,022

CIM: Concentração inibitória mínima; CBM: Conc. bactericida mínima; CFM: Conc. fungicida mínima

Para a fase líquida, são consideradas inativas frente ao microrganismo desafiado substâncias com MIC igual ou superior a 100 mg.L⁻¹ (MORENO et al., 2013; TAYLOR, 2013). Os melhores resultados para este óleo foram para a bactéria Gram-positiva *S. aureus* (19,0 mg.L⁻¹) e o fungo leveduriforme *C. albicans* (94,4 mg.L⁻¹). Com relação a *C. albicans*, em estudo anterior com uma amostra de Aiuroca frente a uma cepa resistente, o valor de CIM foi superior a 1000 mgL⁻¹ (MARTINI, 2011b). Os óleos

de outras espécies de Lamiaceae também não foram muito ativos frente a esse microrganismo. Os óleos de diversas espécies de *Mentha* só foram ativos em concentrações muito superiores àquela onde se considera ativo, tais como *M. arvensis* var. *piperita*, (1.100 mg. L^{-1}) , *M. piperita*, (600 mg. L^{-1}) , *M. pulegium*, (740 mg. L^{-1}) (DUARTE et al., 2005). Em outra espécie de Lamiaceae, *Minthostachys setosa*, que apresenta uma composição semelhante ao OE de *H. myrtoides*, o valor de CIM para esse microrganismo foi de 700 mg.L^{-1} , (PINTO, 2010). Para os demais microrganismos desafiados, bactérias Gram-negativas, *P. aeruginosa* e *E. coli*, a bactéria esporulada, *B. subtilis*, e o fungo filamentoso, *A. brasiliensis*, os resultados foram superiores a 100 mg L^{-1} , indicando uma baixa susceptibilidade frente ao OE, não sendo considerados ativos.

As técnicas de fumigação são muito antigas e foram muito utilizadas, no passado, como formas de desodorização e sanitização de ambientes. Porém, o número de publicações sobre o tema ainda é relativamente pequeno, embora venha sendo observado um crescimento, e estas publicações não indicam um valor de corte para que uma dose seja considerada inativa. Se considerarmos o mesmo critério para fase líquida (100 mg.L^{-1}), os resultados continuam indicando que os OE de *H. myrtoides* somente seriam ativos para *C. albicans* e *S. aureus*, mas com CIM's próximos a 1 mg.L^{-1} , 1,6 e 0,522 respectivamente (Tabela 4 p. 74). Para *S. aureus* os vapores do óleo de canela (aldeído cinâmico 63,1%) apresentaram CIM de $6,25 \text{ mg.L}^{-1}$ e o OE de menta 25 mg.L^{-1} , sendo considerados bons e promissores para serem aplicados como vaporoterapia, (INOUE, et al., 2001a).

Em uma outra variação do método da placa invertida, é utilizada uma concentração fixa de OE, 1.000 mg.L^{-1} e se verifica o percentual de inibição. Os resultados indicaram uma inibição de no máximo 85,2% para *S. aureus* (ATCC 25923), mesmo assim foi considerado susceptível frente ao OE de *Melaleuca alternifolia* (ANDRADE et al., 2015).

A harmonização dos resultados em termos de unidade ou a conversibilidade destas unidades, pelo fornecimento da densidade do OE, e a determinação de um valor de corte para que a dose seja considerada ativa, são fatores importantes para a comparação dos resultados. Isto ajudará no desenvolvimento de programas de triagem (*screening*) para OE's na fase vapor. Sendo assim, a comunidade científica poderia estabelecer um consenso sobre este método de

avaliação da atividade antimicrobiana com vistas às várias aplicações possíveis. Assim, o crescente número de trabalhos que vêm buscando essas avaliações e também as grandes diferenças entre os resultados da fase líquida com a fase vapor, poderiam ser comparados entre si. Os trabalhos que testaram e compararam a fase líquida com a fase vapor de alguns óleos essenciais frente aos microrganismos, como por exemplo frente *Tricophyton mentagrophytes* (TIMM 1189), *T. rubrum* (TIMM 2659) indicaram que o CIM para exposição ao vapor foi de 20 a 100 vezes menor que o CIM em diluição em Agar. Estes testes foram realizados com os óleos e seus componentes majoritários, capim limão (cital), lavanda (linalol e acetato de linalila), tomilho (carvacrol) e perila (perilaldeído), (INOUE, et al., 2001 b). Essas diferenças entre os valores de CIM na fase líquida em relação à fase vapor também foram observadas quando comparados o CIM para *Candida albicans* (ATCC 10231) contra OE de capim limão (*Cymbopogon citratus*) na fase líquida (288 mg.L^{-1}) com a fase vapor ($32,7 \text{ mg.L}^{-1}$), sendo necessários 8,8 vezes menos massa de OE na fase vapor (TYAGI & MALIK, 2010).

Para o OE de *H. myrtoides* as diferenças anteriormente citadas se comprovaram, sendo possível afirmar que o valor de CIM para *S. aureus* é 48 vezes menor na fase vapor, e 103 vezes menor para *C. albicans*. O mesmo pode ser visto para os microrganismos *A. brasiliensis*, *B. subtilis*, *E. coli* e *P. aeruginosa* onde o óleo foi inativo (valores acima de 100 mg.L^{-1}), na fase vapor as doses para o CIM foram reduzidas 1,2 a 3,8 vezes na fase vapor.

Para o formaldeído em solução, os dados da literatura informam CIM's de 156 mg.L^{-1} para *S. aureus* e *E. coli* e de 235 mg.L^{-1} para *B. subtilis*, (MAZZOLA et al., 2009). Na fase vapor, obtivemos valores inferiores aos reportados para o meio líquido, $0,022 \text{ mg.L}^{-1}$ para *S. aureus*, $0,060 \text{ mg.L}^{-1}$ para *E. coli* e $0,224 \text{ mg.L}^{-1}$ para *B. subtilis*. Esses resultados corroboram com as observações para o OE, confirmando que a fase vapor é mais efetiva para a ação antimicrobiana.

Uma possível explicação para a maior atividade observada, é que na fase líquida o OE está solvatado; já na fase vapor, está mais livre do involucro do solvente o que permite se ligar, mais facilmente à membrana dos microrganismos por suas características lipofílicas (MUNHÖZ-BONILLA et al., 2003; LAIRD & PHILLIPS, 2011).

A utilização do OE de *H. myrtoides* ou outros OE's na fase vapor é uma estratégia que pode vir a combater a resistência aos antibióticos ou ainda manter a

carga microbiana ambiental baixa, o que por si só, já reduziria as infecções que têm se tornado um fator importante no prolongamento das internações hospitalares, sendo que 7,1% dos pacientes de hospitais da Europa são infectados e 37.000 mortes anuais atribuídas (ECDC, 2008). As evidências neste sentido são crescentes e os estudos têm demonstrado que o OE na fase vapor, dependendo da aplicação, tem vantagens sobre a utilização do OE na fase líquida, tais como uso em concentrações mais baixas, aumento da atividade (LAIRD e PHILLIPS, 2011), redução da carga bacteriana transportada no ar em uma variedade de ambientes (DORAN et al., 2009) e aumentando o tempo de prateleira de produtos através de uma atmosfera modificada de empacotamento (LOPEZ et al., 2005).

Outro fator que extrapola os valores de CIM, é que pelo método da contagem das colônias foi possível visualizar o desenvolvimento dos microrganismos testados. Sendo constatado que, mesmo em concentrações não consideradas efetivas o OE de *H. myrtoide*s teve uma ação que reduziu a velocidade de crescimento das colônias (dimensão) e do seu número (Figura 38 e 39, abaixo). Esta menor proliferação, vista nos testes, pode contribuir para diminuir a probabilidade de infecção.

Figura 38: crescimento de *Aspergillus brasiliensis*, mesma carga bacteriana sob diferentes concentrações do OE *H. myrtoide*s

Fonte: Marcos Pereira

Figura 39: *Aspergillus brasiliensis*, mesma carga bacteriana: (A) crescimento na presença do OE *H. myrtoide*s, (B) Controle de crescimento.

Fonte: Marcos Pereira

A regulação da aplicação e o registro de antimicrobianos estão normatizados pela RDC 14 da ANVISA, de 28 de fevereiro de 2007, pela qual o OE de *H. myrtoide*s pode ser candidato a desodorizante (classe 1), desinfetante para uso geral (classe 3.1), desinfetante hospitalar para superfície fixas e produtos não críticos

(classe 3.3). Porém, como foi inativo para *E. coli* não é possível sua aplicação na indústria alimentícia (classe 3.2) e lactários (classe 3.4.1).

Os OE são conhecidos por sua atividade antimicrobiana (DUARTE et al., 2005), baixa toxicidade (LAIRD e PHILLIPS, 2011; MORENO et al., 2013) e pelo sinergismo entre os componentes do óleo (PINTO, 2010; FALCÃO et al., 2012), mas antes de aplicações práticas, seja em ambientes hospitalares, consultórios médicos, ou locais de empacotamento de alimentos, entre outros, são necessários testes que garantam a segurança do uso para as pessoas que utilizam esses ambientes.

5.6 CITOTOXICIDADE *IN VITRO* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *H. myrtoides*

Com o objetivo de avaliar a segurança, para futuras aplicações, foram verificado os efeitos adversos resultantes da interferência, no caso do OE, nos processos essenciais para a sobrevivência, proliferação e função celular. Estes métodos, *in vitro*, são validados e recomendados pela *Organisation for Economic Co-operation and Development* (OECD). Estes são métodos alternativos e seguem o princípio dos 3R's: *Refinement* (refinamento), minimização da dor e o estresse promovendo alívio aos animais; *Reduction* (redução), diminuição do número de animais utilizados sem perda da qualidade em relação aos testes clássicos *in vivo*; e *Replacement* (substituição), estabelece que um determinado objetivo seja alcançado sem o uso de animais vertebrados vivos nos testes (ESTEVES-PEDRO, 2013). Os primeiros testes foram em células tumorais humanas (mama e próstata) e células normais derivadas de fibroblastos murinos. Os valores de IC₅₀, obtidos com as culturas de fibroblastos, nos permitem uma extrapolação para um nível de dose tóxica por via oral em humanos, permitindo assim a classificação do OE dentro de categorias toxicológicas pré-estabelecidas.

5.6.1 Citotoxicidade do óleo essencial de *H. myrtoides* frente a células tumorais humanas

Alguns OE podem apresentar um potencial citotóxico que pode ser interessante para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade anticâncer, como o OE de *Tajetes erecta* L., *Foeniculum vulgare* Mill (OLIVEIRA et al., 2015) e a Lamiaceae, *Cantinoa stricta* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore, planta nativa do Brasil, distribuída na região sul, apresentou atividade para MCF-7 (mama) (SCHARF et. al., 2016). Porém os OE's de *Mentha x piperita*, *M. spicata*, *M. arvensis* e *M. longifolia*, frente às células MC-7 e carcinoma de próstata LN-CaP, não indicaram potencial de atividade antitumoral (HUSAIN et al, 2010). Entretanto OE da *Mentha x villosa*, que tem uma composição diferente das mentas anteriores, apresentou uma atividade antitumoral para carcinoma de cólon (HCT-116) e adenocarcinoma de ovário (OVCAR-8), (AMARAL, 2014). A avaliação da citotoxicidade do OE de *H. myrtoides* (Tabela 5, abaixo) frente às células tumorais humanas, isoladas de próstata (PC-3) e de mama (MCF-7) apresentou baixa toxicidade. Não sendo considerado como tendo potencial para o desenvolvimento de novos fármacos antitumorais, pois os valores de IC₅₀ obtidos foram superiores a 30 mg.L⁻¹ (SULFINESS e PEZZUTO, 1990).

Tabela 5 - Atividade citotóxica para células tumorais humanas do OE de *H. myrtoides*

Células tumorais humanas	IC ₅₀ (mg.L ⁻¹)
Mama (MCF-7)	50 ± 2,5
Próstata (PC-3)	230 ± 10,8

Como o OE não apresentou toxicidade para células tumorais humanas e buscando um uso seguro em uma possível aplicação como sanitizante em ambientes habitados, o próximo passo para garantir a segurança na aplicação é o teste com

células normais para fornecer um indicativo sobre a dose tóxica oral aguda estimada pela DL₅₀.

5.6.2 Citotoxicidade do óleo essencial de *H. myrtoides* frente a células normais de fibroblastos murinos

Como alguns OE's, como o cravo da índia (*Syzygium aromaticum* L.), são adicionados à composição de produtos de higiene pessoal e perfumes (VALENTE et al., 2009), determinar a citotoxicidade é uma forma de garantir o uso seguro. Não diferentemente para o OE de *H. myrtoides* em um possível processo de sanitização pelos seus vapores.

Os resultados obtidos para as células tumorais forneceram um indicativo de dose inicial para os testes de citotoxicidade frente às células normais *in vitro*. As amostras diluídas em série foram testadas com células da linhagem BALB/3T3 (ATCC CCL - 163). A partir das curvas de crescimento (viabilidade) da cultura celular foram calculados os valores de IC₉₀ e IC₅₀ que correspondem, respectivamente, ao índice de citotoxicidade para 90% e 50% da população celular em estudo.

Os valores de IC₅₀, obtidos nesse ensaio, podem ser então utilizados para estimar a toxicidade oral aguda por meio da dose letal mediana (DL₅₀).

O OE de *H. myrtoides* não apresentou um gradiente de inibição que permitisse calcular o IC₅₀, em função da falta de pontos com inibição próximos de 50% do crescimento das células testadas, sendo apenas possível calcular o IC₉₀ em 737,0 ± 58 µg/mL, isto é, nessa dose há uma redução de 10% da população de células tratadas com o OE.

Considerando que para um cálculo efetivo da dose letal mediana (DL₅₀) é necessário se ter o valor de IC₅₀ (equação 3, p. 54), usamos o dado da concentração mais elevada (921,2 µg/mL) empregada no ensaio. Portanto, uma estimativa da DL₅₀ para OE de *H. myrtoides* pode ser encontrada acima de 2.014 mg.Kg⁻¹. Este valor enquadra o OE de *H. myrtoides* na categoria 5 (Pode ser perigoso se ingerido ou não classificado) do Sistema de classificação do GHS (*Globally Harmonised System*,)

Quadro 2 (p.54), sendo esta a de menor efeito para a saúde humana (BULGHERONI et al., 2009).

O valor calculado para OE indica que este possui uma toxicidade menor do que a da cafeína com DL_{50} de 200 $mg.Kg^{-1}$ e também menor do que o seu componente majoritário isolado, pulegona, com 470 $mg.Kg^{-1}$ (FISPQ cafeína e pulegona - Roth, 2013). O formaldeído, utilizado como controle positivo na fase vapor, tem uma DL_{50} de 100 $mg.Kg^{-1}$ (FISPQ formaldeído – Copenor, 2009).

Uma outra classificação relativa dos agentes químicos pela DL_{50} divide os compostos em 6 categorias: supertóxicos, Grau 6 tem $DL_{50} < 5 mg.Kg^{-1}$; extremamente tóxicos (Grau 5, $DL_{50} = 5- 50 mg.Kg^{-1}$); muito tóxicos (Grau 4, $DL_{50} = 50 - 500 mg.Kg^{-1}$); moderadamente tóxicos (Grau 3, $DL_{50} = 500 - 5.000 mg.Kg^{-1}$); pouco tóxicos (Grau 2, $DL_{50} = 5.000 - 15.000 mg.Kg^{-1}$) e praticamente atóxicos (Grau 1, $DL_{50} > 15.000 mg.Kg^{-1}$) (VALENTE et al. 2009). Segundo essa classificação, OE de *H. myrtoides*, pode ser inicialmente classificado como moderadamente tóxico (Grau 3) e sua dose letal para um adulto de 70Kg seria maior que 141 g. Algumas substâncias empregadas comumente apresentam valores semelhantes ou menores do que o obtido para o OE de *H. myrtoides* como o ácido acetilsalicílico que tem DL_{50} de 70 g., vitamina A (retinol) de 140 g e o sal (cloreto de sódio) de 210 g, todos calculados para um adulto de 70 Kg (VALENTE et al. 2009; LETHAL DOSES TABLE, 2016).

Para uma melhor segurança na aplicação ambiental, em função da aspiração dos vapores, seria ainda necessária uma avaliação da toxicidade em células específicas como de pulmão e cérebro, e também testes para avaliar o potencial genotóxico.

6. CONCLUSÕES

- O OE de *H. myrtoides* apresenta composição semelhante as outras plantas do gênero tendo como componentes majoritários pulegona (48,8%) e iso-mentona (16,2%).
- A dinâmica de evaporação indicou que após 4 horas a 37°C a composição da fase vapor é similar a da fase líquida.
- A metodologia da placa invertida adaptada foi reprodutível e os experimentos apresentaram facilidade de execução, sem necessidade de equipamentos especiais.
- O OE de *H. myrtoides* foi considerado ativo nas fases líquidas e vapor apenas frente *C. albicans* ATCC 10231 e *S. aureus* ATCC 6538 com os respectivos MIC's de 94,4 e 19,0 mg.L⁻¹ na fase líquida e de 1,6 e 0,522 mg.L⁻¹, na fase vapor. A quantidade necessária para inibição total do crescimento, na fase vapor, foi entre 103 e 48 vezes menor.
- Os testes de citotoxicidade indicaram que o OE de *H. myrtoides* pode ser considerado seguro, segundo a classificação relativa dos agentes químicos pela DL₅₀ e segundo o Sistema de classificação do GHS (*Globally Harmonised System*).

O conjunto do trabalho nos permite afirmar que a metodologia desenvolvida pode ser adotada como indicativo para o estabelecimento de normas na investigação da atividade antimicrobiana na fase vapor. Além disto, há fortes indicativos de que o OE de *H. myrtoides* pode ser usado, com segurança, como um agente antimicrobiano, já que demonstrou atividade na fase líquida e na fase vapor. Seriam necessários mais testes em células específicas, como cérebro e coração e avaliar a genotoxicidade do OE, para uma aplicação mais segura.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4. ed. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation, 2007.

ALMEIDA, S. M. V. de. **Síntese, elucidação estrutural, avaliação da interação com DNA, atividades antiproliferativa e anti-topoisomerase de novos derivados de Acridina**. Recife: O Autor, 2015.

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

ANDRADE, B. F. M. T.; BARBOSA, L. N.; ALVES, F. C. B.; ALBANO M.; RALL, V. L. M.; *et al.* The antibacterial effects of *Melaleuca alternifolia*, *Pelargonium graveolens* and *Cymbopogon martinii* essential oils and major compounds on liquid and vapor phase. **Journal of Essential Oil Research**, v. 28(3), out. 2015.
doi: 10.1080/10412905.2015.1099571.

ANGHILOO, S.; ESMAILLOU, Z.; GOHARI, G.; DADPOUR, M. R. Comparative inflorescence and floral ontogeny in the genus *Mentha* (Mentheae: Nepetoideae: Lamiaceae): variable sequences of organ appearance and random petal aestivation. **Plant. Syst. Evol.**, v. 300, p. 329-345, 2014.
doi: 10.1007/s00606-013-0885-8.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Dep. Vigilância Sanitária em Produtos Saneantes e domissanitários. **Portaria 15** de 23 de agosto de 1988.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC 14** de 28 de fevereiro de 2007. Publicado no Diário Oficial, 5 mar. 2007.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **RDC 36 e 37** de 2008. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2008/050608_1.htm>. Acessado em: maio 2016.

ARAÚJO, M. E. M. de. **Química Analítica aplicada aos produtos naturais**. Departamento de química e bioquímica. Faculdade de Ciências de Lisboa. 60 p., 2005.

ASSIS, C. M.; MORENO, P. R. H.; MARX YOUNG, M. C.; CAMPOS, I. P. de A.; SUFREDINI, I. B. Isolamento e avaliação da atividade biológica dos alcalóides majoritários de *Tabernaemontana angulata* Mart. ex Müll. Arg., Apocynaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2b, João Pessoa, abr./jun. 2009.

BERTUCCI, Ana *et al.* Prospección química Del bosque de galería Del río Uruguay. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18 (1), p. 21-25, jan./mar. 2008.

BONATO, P. S. Cromatografia Gasosa. In: _____; COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L. **Fundamentos de Cromatografia**. 4. ed. Campinas: Unicamp, 2011, p. 203-272.

BRADE, A. C. Contribuição para o conhecimento da flora dos parques nacionais de Itatiaia e Serra do Órgãos. **Rodriguésia**, ano IX, n. 19, set./dez. 1945.

BRAUCHLER, C.; MEIMBERG, H. Gunther Heubl Molecular phylogeny of Menthinae (Lamiaceae, Nepetoideae, Mentheae) –Taxonomy, biogeography and conflicts. **Molecular Phylogenetics and Evolution**, v. 55, p. 501-523, 2010.

BUENO, J., Models of evaluation of antimicrobial activity of essential oil in vapour phase: a promising use in healthcare decontamination. **Natural volatiles & Essential Oils**, V.2 (2) p. 16-29, 2015

BULGHERONI, A.; KINSNER-OVASKAINEN, A.; HOFFMANN, S.; HARTUNG, T.; PRIETO, P. Estimation of acute oral toxicity using the No Observed Adverse Effect Level 175 (NOAEL) from the 28 day repeated dose toxicity studies in rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 53, p. 16-19, 2009.

CASTILHO, C. V. V.; BIZZO, H. R.; SANTOS, M. C., BARBI, N. dos S.; DIAS, J. C. M., AGUIAR, P. F., DELLACASSA, E. MARTINEZ, N., PINTO, S. C., LEITÃO, S. G. Evaluation of chemical composition of the essential oil from Brazilian *Hesperozygis myrtooides* (St. Hill ex Benth) at different collection periods and sites, **Journal of Essential Oil Research**, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1080/10412905.2015.1133459>, 2016>

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). Capítulo 24. In: BUCHANAN, B.; GRUISSEM, W.; JONES, R. L. **Biochemistry & Molecular Biology of Plants**. Eds. © 2010, American Society of Plant Physiologists.

CUNHA, A. P. da; ROQUE, O. R. **Aromaterapia fundamentos e utilização**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 2013.

_____; _____. NOGUEIRA, M. T. **Plantas aromáticas e óleos essenciais composição e aplicações**. Lisboa: Fundação Calouste Gulbekian, 2012.

DORAN A. L.; MORDEN, W. E.; DUNN, K.; EDWARDS-JONES, V. Vapour-phase activities of essential oils against antibiotic sensitive and resistant bacteria including MRSA. **Letters in Applied Microbiology**, v. 48, p. 387-392, 2009.

DOYLE, A.; GRIFFITHS, J. B. **Cell and Tissue Culture for Medical Research**. New York: Wiley-Liss, 2000, p. 403-409.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Multiciência**, v. 7, out. 2006.

_____.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A; REHDE, V. L. G.; DELARMELINA, C. Anti *Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, p. 305-311, 2005.

FISPQ, Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos; cafeína, disponível em:
<https://www.carlroth.com/downloads/sdb/PT/N/SDB_N815_PT_PT.pdf> acessado em 10/06/2106

FISPQ, Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos; Pulegona, disponível em:
<https://www.carlroth.com/downloads/sdb/pt/5/SDB_5168_PT_PT.pdf> acessado em 10/06/2106

FISPQ, Ficha de Informação de Segurança de Produtos Químicos; Formaldeído, disponível em:
<http://www.copenor.com.br/webcopenor/Ficha%20de%20Seguranca/PT/FISPQ_Formalde%C3%ADdo.pdf> acessado em 10/06/2106

ECDC - European Centre for Disease Prevention and Control. **Annual Epidemiological Report on Communicable Diseases in Europe 2008**. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control, 2008. [ISBN 978-92-9193-137-8].

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Medica**, v. 64, p. 711-713, 1998.

ESTEVES-PEDRO, N. M. **Avaliação in vitro da toxicidade de óleos essenciais da flora Latino-americana candidatos ao uso em cosméticos**. 2013. 134 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo Faculdade de Ciências Farmacêuticas, São Paulo.

FALCÃO, M. A.; FIANCO, A. L. B; LUCAS, A. M.; PEREIRA, M. A. A.; TORRES, F. C.; VARGAS, R. M. F.; CASSEL, E. Determination of antibacterial activity of vacuum distillation fractions of *lemongrass* essential oil. **Phytochemistry Reviews**, v. 11, n. 4, p. 405-412, 2012.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4. ed. Parte II. Fascículo 2. In: **Diário Oficial**, Suplemento ao n. 1. 10 jan. 2001.

FRACARO, F. **Ecologia molecular, variabilidade genética, química e cultivo *in vitro* de *Hesperozygis ringens* BENTH.** 2006. 89 p. Tese (Doutorado - Área de concentração em Ecologia e Recursos Naturais). Universidade Federal de São Carlos, São Paulo.

FRANCO, J. **Prospecção fitoquímica e análise e microbiológica do óleo essencial de *Eucalyptus cinerea* F. Muell. ex.Benth., myrtaceae.** 2005. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

FRENCH, G. L. The continuing crisis in antibiotic resistance. **Int. J. Antimicrob. Agents**, 36 Suppl. 3:S3-7, nov. 2010. doi: 10.1016/S094-8579(10)70003-0.

GIULIANI, C.; BINI, L.M.;Insight into structure and chemistry of glandular trichomes of Labiatae, with emphasis on subfamily Lamioideae. **Plant. Syst. Evol.** V. 276, p. 199-208, 2008

GOÑI, P.; LÓPEZ, P.; SÁNCHEZ, C.; GÓMEZ-LUS, R.; BECERRIL, R.; NERÍN, C. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. **Food Chemistry**, v. 116, p. 982-989, 2009.

GONZÁLEZ-CHÁVEZ, M.M., CÁRDENAS-ORTEGA, N. C., MÉNDEZ-RAMOS, C. A., PÉREZ-GUTIÉRREZ, S. Fungicidal Properties of the Essential Oil of *Hesperozygis marifolia* on *Aspergillus flavus* Link. **Molecules**, V.16, p. 2501-2506; 2011

GROSJEAN, D.; WILLIAMS II, E. L.; SEINFELD, J. H. Atmospheric oxidation of selected terpenes and related carbonyls: gas-phase carbonyl products. **Environ. Sci. Technol.**, v. 26 (8), p. 1526-1533, 1992.

GUTIÉRREZ S. P.; CHÁVEZ, M. M. G.; ORTEGA, N. C. C.; RAMOS, C. A. M. Fungicidal Properties of the Essential Oil of *Hesperozygis marifolia* on *Aspergillus flavus*. **Molecules**, v. 16, p. 2501-2506, 2011.

HARLEY, R.; FRANÇA, F.; SANTOS, E. P.; SANTOS, J. S.; PASTORE, J. F. Lamiaceae. In: **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8159>>. Acessado em: 11 dez. 2010 e 05 fev. 2014.

HUEY-J. S.; CHUNG-J. C.; HO-Yuan, C.; PEI-C, W. The effects of evaporating essential oils on indoor air quality. Department of Environmental and Occupational Health. **Atmospheric Environment**, v. 41 (6), p. 1230-1236, 2007.

HUSAIN, A. I.; ANWAR, F.; NIGAM, P. S.; ASHRAF, M.; GILANI, A. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. **J. sci. Food Agric.**, v. 90, p 1827-1836, 2010.

ICCVAM - INTERAGENCY COORDINATING COMMITTEE ON THE VALIDATION OF ALTERNATIVE METHODS. Interagency Center for the Evaluation of Alternative Toxicological Methods. Peer review panel report: The use of in vitro basal cytotoxicity test methods for estimating starting doses for acute oral systemic toxicity testing. **NIH publication** n. 07-4519. Research Triangle Park: National Toxicology Program, 2006. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvm/docs/acutetox_docs/atpanelrpt06/atpanelrpt.pdf>. Acessado em: 01 dez. 2015.

INOUE, S.; YAMAGUCHI, H.; TAKIZAWA, T. Antibacterial activity of essential oils and their majors constituents against respiratory tract pathogens by gaseous contact. **Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 47, p. 565-573, 2001a.

_____; _____; UCHIDA, K. In-vitro and in vivo anti-trichophyton activity of essential oils by vapour contact. **Mycoses**, v. 44, p. 99-107, 2001b.

KIM, J.; IL-KWON, P. Fumigant toxicity of Korean medicinal plant essential oils and components from *Asiasarum sieboldi* root against *Sitophilus oryzae* L. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, p. 79-83, 2008.

KLOUCEK, P.; KOKOSKA, L.; SMID, J.; FLESARB, J.; HAVLIK, J.; TITERAC, D.; RADAB, V.; DRABEK, O. In vitro Inhibitory Activity of Essential Oil Vapors against *Ascosphaera apis*. **Natural Products Communications**, v. 7, n. 2, p. 253-256, 2012a.

_____; _____; _____; FRANKOVA, A.; VALTEROVA, I.; PAVELA, R. Fast screening method for assessment of antimicrobial activity of essential oils in vapor phase. **Food Research International**, v. 47, p. 161-165, 2012b.

KUSUMOTO, N.; SHIBUTANI, S. Evaporation of volatiles from essential oils of Japanese conifers enhances antifungal activity. **Journal of Essential Oil Research**, doi: 10.1080/10412905.2015.1045993, 2015.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008-2010) on essential oil as antimicrobial and antifungals. **Flavor and Fragrance Journal**, v. 27, p. 13-39, 2012.

LAIRD, K.; PHILLIPS, C. Vapour phase: a potential future use for essential oils as antimicrobials? **Letters in Applied Microbiology** V.54, p. 169–174, 2011

LETHAL DOSES TABLE, Cornell University, disponível em:
<http://ei.cornell.edu/teacher/pdf/ATR/ATR_Chapter1_X.pdf>, acessado em 20/06/2016

LIMA, H. R. P.; KAPLAN, M. A. C.; CRUZ, A. V. M. Influência dos fatores abióticos e variabilidade dos terpenóides em plantas. **Floresta e Ambiente**, v. 10, n. 2, p. 71-77, ago./dez. 2003.

LIMA, I. de O.; *et al.* Atividade fúngica de óleos essenciais sobre espécies de cândida. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 16 (2). abr./jun. 2006 a.

LIMA, M. E. L.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M. C. M.; SOBRAL, M. E. G.; MORENO, P. R. H. Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum (Myrtaceae) native from São Paulo state – Brazil. **Pharmacologyonline**, v. 3, p. 589-593, 2006 b.

LISTA DE ESPÉCIES DA FLORA DO BRASIL. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acessado em: 06 fev. 2014.

LOPEZ, P.; SANCHES, C.; BATLEE, R.; NERIN, C. Solid and vapor-phase antimicrobial activities of six essential oils: susceptibility of selected foodborne bacterial and fungal strains. **Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 17, p. 6939-6946, 2005.

MARTINI, M. G.; BIZZO, H. R.; MOREIRA, D. de L.; NEUFELD, P. M.; MIRANDA, S. N.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S.; LEITÃO, S. G. Chemical Composition and Antimicrobial Activities of the Essential Oils from *Ocimum selloi* and *Hesperozygis myrtooides*. **Natural Products Communications**, v. 6, n. 7, p. 1027-1030, 2011a.

_____. **Análise química e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Ocimum selloi* Benth, *Hesperozygis myrtooides* Epling e *Mentha pulegium* L. (Lamiaceae).** 2011b. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade Federal do Rio de Janeiro, Faculdade de Farmácia, Rio de Janeiro.

MARUZZELLA, J. C.; SICURELLA, N. A. Activity of Essential Oil Vapors. **Journal of The American Pharmaceutical Association**, v. 49, n. 11, p. 692-694, 1960.

MAZOLLA, P. G.; JOZALA, A. F.; NOVAES, L. C. L.; MORIEL, P.; PENNA, T. C. V. Minimal inhibitory concentration (MIC) determination of disinfectant and/or sterilizing agents. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 45, n. 2, p. 241-248, abr./jun. 2009.

MONKS, A.; SCUDIERO, D.; SKEHAN, P.; SHOEMAKER, R.; PAULL, K.; VISTICA, D.; HOSE, C.; LANGLEY, J.; CRONISE, P.; VAIGRO-WOLFF, A.; GRAY-GOODRICH, M.; CAMPBELL, H.; MAYO, J.; BOYD, M. Feasibility of a high-flux anticancer drug screen using a diverse panel of cultured human tumor cell lines. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 83, n. 11, 1991.

MORENO, P. R. H.; COSTA-ISSA F. I.; RAJCA-FERREIRA, A. K.; PEREIRA, M. A. A.; KANEKO, T. M. Native Brazilian Plants Against Nosocomial Infections: A Critical Review on their Potential and the Antimicrobial Methodology. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 13, p. 3040-3078, 2013.

_____.; LIMA, M. E. L.; CARUZO, M. B. R.; TORRES, D. S. C.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M. C. M. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of the Essential Oil from *Croton heterocalyx* Baill. (Euphorbiaceae s.s.) Leaves. **The Journal of Essential Oil Research**, v. 21, p. 190-192, 2009.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutation Research**, v. 455, p. 29-60, 2000.

MUNHÖZ-BONILLA, A.; CERRADA, M.; FERNANDEZ-GARCIA, M. **Polymeric materials with antimicrobial activity**: from synthesis to applications. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2013.

NCCLS/CLSI. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica dos Fungos Filamentosos: Norma Aprovada**. NCCLS document M38-A [ISBN 1-56238-470-8], 2002. Disponível em:
<http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPAS1M38-A.pdf>
Acessado em: 20 jun. 2016

NCCLS/CLSI- *National Committee for Clinical Laboratory Standards* – **Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada** – Oitava Edição, M2-A8, Volume 23 nº1 [ISBN 1-56238-485-6], 2003. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/servicosade/manuais/clsi/clsi_OPASM2-A8.pdf>
Acessado em: 2 jan. 2013

NIH: NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH. Guidance document on using in vitro data to estimate in vivo starting doses for acute toxicity. **NIH Publication**, n. 01-4500, ago. 2001. Disponível em:

<http://iccvam.niehs.nih.gov/docs/acutetox_docs/guidance0801/iv_guide.pdf>.

Acessado em: 16 jan. 2016.

OLIVEIRA, F.; AKISUE, G.; AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. 1. ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

OLIVEIRA, P. F. de; ALVES, J. M.; DAMASCENO, J. L.; OLIVEIRA, R. A. M.; DIAS, H. J.; CROTTI, A. E. M.; TAVARES, D. C. Cytotoxicity screening of essential oils in cancer cell lines. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, p. 183-188, 2015.

OMS - ORGANISATION MONDIALE DE LA SANTE. **Quality Control Methods for Medicinal Plant Materials**. [Série de Informes Técnicos]. Genebra, 1992.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L.; KNEKO, T.M.; NISSHIKAWA, S.O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinações da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, V. 18(2), p. 301-307, 2008

PEGORARO, R. L. **Avaliação do crescimento e produção de óleos essenciais em plantas de mentha x *piperita* L. var. *piperita* (lamiaceae) submetidas a diferentes níveis de luz e nutrição**. 2007. Dissertação (Mestrado em Biologia Vegetal). Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

PEREIRA, B. M. Avaliação da eficácia dos óleos essenciais de alecrim (*Rosmarinus officinalis*) e melaleuca (*Melaleuca alternifolia*) como conservante de creme cosmético. **Infarma**, Brasil, v. 21, n. 7/8, p. 29-33, 2009.

PEREIRA, M. A. A. **Estudo da atividade antimicrobiana de óleos essenciais extraídos por destilação por arraste a vapor e por extração supercrítica**. 2010. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Tecnologia de Materiais). Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2010.

PETRETTO, G. L.; FODDAI, M.; MALDINI, M.; CHESSA, M.; VENDITTI, T.; D'HALLEWIN, G.; PINTORE, G. A novel device for the study of antimicrobial activity by vapor contact of volatile substances on food products. **Communications in Agricultural and Applied Biological Sciences**. Universiteit Gent, 78(2), p. 65-72, 2013.

PINTO, D. M. L. **Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato de *Minthostachys setosa* (Briq.) Epling**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo.

PROMEGA CORPORATION. CellTiter 96® AQueous Non-Radioactive Cell Proliferation Assay. **Technical Bulletin**, USA. 2012. Disponível em: <<http://www.promega.com.br/~media/files/resources/protocols/technical%20bulletins/0/celltiter%2096%20aqueous%20non-radioactive%20cell%20proliferation%20systems%20protocol.pdf>>. Acessado em: 19 nov. 2015.

PYBUS, D.; SELL, C. **The Chemistry of Fragrances**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 1999.

REFLORA, Consulta pública do herbário virtual Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acessado em: 06 jun. 2016

RENAMA, Apendice 7, Rede nacional de Métodos Alternativos, disponível em <<http://renama.org.br/2012/09/metodos-alternativos/>> acessado em 20 de jun. 2016

RAJCA-FERREIRA, A.K. **Análise química e atividades biológicas de *Guatteria elliptica* R. E. Fries (Annonaceae)**, 2016. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo.

RIBEIRO, V. L. S.; SANTOS J. C. dos.; BORDIGNON S. A. L.; APEL, A.; HENRIQUES, A. T.; VON POSER G. Acaricidal properties of the essential oil from *Hesperozygis ringens* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 2506-2509, 2010.

RODRIGUES, E. dos A.; SCHWAN-ESTRADA, K. R. F.; STANGARLIN, J. R.; SCAPIM, C. A.; FIORI-TUTIDA, A. C. G. Potencial da planta medicinal *Ocimum gratissimum* no controle de *Bipolaris sorokiniana* em sementes de trigo. **Acta Sci. Agron**, v. 28, n. 2, p. 213-220, 2006.

ROSENTHAL, V. D.; MAKI, D. G.; MEHTA, Y. *et al.* International Nosocomial Infection Control Consortiu (INICC) report, data summary of 43 countries for 2007-2012. **American Journal of Infection Control**, v. 42(9), p. 942-956, 2014.

SAMUELSSON, G. **Drugs of Natural Origin: A Textbook of Pharmacognosy**. Stockholm: Swedish Pharmaceutical Press, 1999. 551 p.

SCHARF, D. R.; SIMIONATTO, E. L.; CARVALHO, J. E.; SALVADOR, M. J.; SANTOS, E. P.; STEFANELLO, M. E. A. Chemical Composition and Cytotoxic Activity of the Essential Oils of *Cantinoa stricta* (Benth.) Harley & J.F.B. Pastore (Lamiaceae). **Rec. Nat. Prod.**, v. 10:2, p. 257-261, 2016.

SILVA, J. P. L. da. **Avaliação da ação de antimicrobianos naturais no controle de *Salmonella enteritidis* em saladas de legumes com maionese**. 2007. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas). Universidade de São Paulo. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. São Paulo.

SEO, H. S.; BEUCHAT, L.R.; KIM, H. RYU, J.H.; Development of an experimental apparatus and protocol for determining antimicrobial activities of gaseous plant essential oils. *International Journal of Food Microbiology*, V. 215, p. 95-100, 2015.

SOUZA, L. A.; ROSA, S. M.; MOSCHETA, I. S.; MOURÃO, K. S. M.; RODELLA, R. A.; ROCHA, D. C.; LOLIS, M. I. G. A. **Morfologia e anatomia vegetal: técnica e prática**. 1. ed. Ponta Grossa-PR: Editora UEPG, Universidade Estadual de Ponta Grossa, 2005.

SOUZA, V. C.; LORENZ, H. **Identificação das famílias de Fanerógenas Nativas e Exóticas no Brasil, baseado na APGII**. 2. ed. Nova Odessa: Instituto Plantarum, São Paulo, 2008.

SUFFNESS, M.; PEZZUTO, J. M. Assays related to cancer drug discovery. In: HOSTEFFMANT K. (Ed.). **Methods in plant biochemistry: assays for bioactivity**. London: Academic Press, p. 71-133, 1990.

SZCZERBANIK, M.; JOBLING, J.; MORRIS, S.; HOLFORD, P. Essential oil vapours control some common postharvest fungal pathogens. **Australian Journal of Experimental Agriculture**, v. 47, p. 103-109, 2007.

TAYLOR, P. W. Alternative natural for a new generation of bacterial agentes. **International Journal of Atimicrobial agents**, v. 42, p. 195-201, 2013.

TEIXEIRA, M. L., **Óleos essenciais de *Lippia origanoides* Kunth. e *Mentha spicata* L.: composição química, potencialidades biológicas e caracterização das estruturas secretoras**, 2013, Dissertação (mestrado agroquímica, produtos Naturais), Universidade Federal de Lavras, Lavras. Disponível em: <<http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/670>>

THE INTERNATIONAL PLANT NAME INDEX. The Royal Botanic Gardens, Kew, The Harvard University Herbaria, and the Australian National Herbarium. Disponível em: <<http://www.ipni.org>>. Acessado em: 06 fev. 2014.

TROPICOS.ORG. Missouri Botanical Garden. Disponível em <<http://www.tropicos.org>>. Acessado em: 06 fev. 2014.

TYAGI, A. K., MALIK, A. Liquid and vapour-phase antifungal activities of selected essential oils against *candida albicans*: microscopic observation and chemical characterization of *Cymbopogon citratus*. **Complementary & alternative medicine**, V. 10 (65), 2010

TONI, C.; BECKER, A. G.; SIMOES, L. N.; PINEIRO, C. G.; LIMA SILVA, L. de; HEINZMANN, B. M.; CARON, B. O.; BALDISSEROTTO, B. Fish anesthesia: effects of the essential oils of *Hesperozygis ringens* and *Lippia alba* on the biochemistry and physiology of silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Fish Physiol Biochem**, 2014 jun. 40(3):701-14. doi: 10.1007/s10695-013-9877-4

VALENTE, R. O. H.; SAMPAIO, F. C.; SOUZA, I. A.; HIGINO, J. S. Estudo toxicológico pré-clínico (agudo) do extrato do *Syzygium aromaticum* (L) em roedores. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19(2B), p. 557-560, abr./jun. 2009.

VON POSER, G.; MENUT, C.; TOFFOLI, M. E.; VERIN, P.; SOBRAL, M.; BESSIE J. M.; LAMATY, G.; HENRIQUES, A. T. Essential oil composition and allelopathic of the Brazilian lamiaceae *Hesperozygis ringens* (Benth.) Epling and *Hesperozygis rhododon* Epling. **J. Agric. Food chem**, v. 44, p. 1829-1832, 1996.

WENDEL, J. T. P.; OLIVEIRA, J. C. S.; CÂMARA, C. A. G. Atividade Acaricida dos Óleos Essenciais de Folhas e Frutos de *Xylopia sericea*, Sobre o Ácaro Rajado (*Tetranychus urticae* KOCH). **Química Nova**, v. 30, n. 4, p. 838-841, 2007.

ZAICA, L. L. In: #67, at the **Symposium on Spices and Herbs**, Division of Agriculture and Food Chemistry 191st, American Chemical Society National Meeting, April 13-18, 1986, New York, NY.

ZARB, P.; COIGNARD, B.; GRISKEVICIENE, L.; *et al.* The European Centre for Disease Prevention and Control (ECDC) pilot point prevalence survey of healthcare-associated infections and antimicrobial use. **Eurosurveillance**. v. 17(46), nov. 2012. Disponível em: <<http://www.eurosurveillance.org/ViewArticle.aspx?ArticleId=20316>>. Acessado em: 20 fev. 2016