

## Artigo

**Composição Química do Óleo Essencial de *Cardiopetalum calophyllum* Schltl. (Annonaceae) e suas Atividades Antioxidante, Antibacteriana e Antifúngica**

Xavier, M. N.; Alves, J. M.; Carneiro, N. S.; Souchie, E. L.; Silva, E. A. J.; Martins, C. H. G.; Ambrosio, M. A. L. V.; Egea, M. B.; Alves, C. C. F.; Miranda, M. L. D.\*

Rev. Virtual Quim., 2016, XX (XX), no prelo. Data de publicação na Web: 15 de julho de 2016

<http://rvq.sbg.org.br>

**Chemical Composition from Essential oil of *Cardiopetalum calophyllum* Schltl. (Annonaceae) and their Antioxidant, Antibacterial and Antifungal Activities**

**Abstract:** The Annonaceae family consists of ~135 genera with diverse species and a large number of chemical compounds arising from the secondary metabolism. However, the chemical composition of the essential oil of several species of the family such as *Cardiopetalum calophyllum* has not been completely determined. The leaves of *Cardiopetalum calophyllum* (Annonaceae) were collected during different months of the year, between 5:00 and 8:00 h in the morning, to determine the chemical composition of essential oils. In this study, the essential oils extracted from the leaves of *C. calophyllum*, collected in typical areas of the Cerrado of Goiás, were characterized. The essential oil was extracted by hydrodistillation for 4 h using a Clevenger apparatus. The chemical analysis was carried out by gas chromatography–mass spectrometry (GC-MS), and the constituents were identified by comparing the spectra and retention index obtained with those available in the literature. The chemical analyses showed high concentrations of sesquiterpene hydrocarbons. The antioxidant, antibacterial and antifungal activities of the essential oil of *C. calophyllum* are described for the first time in this work.

**Keywords:** *Cardiopetalum calophyllum*; essential oil; sesquiterpenes.

**Resumo**

A família Annonaceae é constituída por cerca de 135 gêneros, com uma diversidade extensa de espécies com grande quantidade de compostos químicos diversificados, advindos do metabolismo secundário. Entretanto, as informações sobre a composição química de óleo essencial de várias espécies da família ainda são incipientes, como é o caso da *Cardiopetalum calophyllum*. As folhas de *Cardiopetalum calophyllum* (Annonaceae) foram coletadas durante diferentes meses do ano, entre as 05:00 e 08:00 h da manhã, para determinação da composição química dos óleos essenciais. O trabalho teve como objetivo caracterizar quimicamente o óleo essencial extraído de folhas da *C. calophyllum*, coletadas em áreas típicas do Cerrado goiano. A extração do óleo essencial se deu pelo método de hidrodestilação em aparelho de Clevenger por um período de 4 horas. A análise química do óleo essencial foi realizada por cromatografia em fase gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) e a identificação dos constituintes pela comparação dos espectros obtidos com os espectros disponíveis na literatura e pelo cálculo do índice de retenção. As atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica do óleo essencial de folhas de *C. Calophyllum* estão sendo descritas pela primeira vez neste trabalho.

**Palavras-chave:** *Cardiopetalum calophyllum*; óleo essencial; sesquiterpenos.

\* Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Campus Pouso Alegre, CEP 37550-000, Pouso Alegre-MG, Brasil.

✉ [mayker.miranda@ifsuldeminas.edu.br](mailto:mayker.miranda@ifsuldeminas.edu.br)

DOI:

## Composição Química do Óleo Essencial de *Cardiopetalum calophyllum* Schldl. (Annonaceae) e suas Atividades Antioxidante, Antibacteriana e Antifúngica

Marcelo N. Xavier,<sup>a</sup> José Milton Alves,<sup>a</sup> Nárgella S. Carneiro,<sup>a</sup> Edson Luiz Souchie,<sup>a</sup> Elizabeth Aparecida J. da Silva,<sup>a</sup> Carlos Henrique G. Martins,<sup>b</sup> Maria Anita L. V. Ambrosio,<sup>b</sup> Mariana B. Egea,<sup>a</sup> Cassia Cristina F. Alves,<sup>a</sup> Mayker Lazaro D. Miranda<sup>c,\*</sup>

<sup>a</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia Goiano, Campus Rio Verde, CP 66, CEP 75901-970, Rio Verde-GO, Brasil.

<sup>b</sup> Universidade de Franca, Centro de Pesquisa em Ciências Exatas e Tecnologia, CEP 14404-600 Franca-SP, Brasil.

<sup>c</sup> Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Sul de Minas Gerais, Campus Pouso Alegre, CEP 37550-000, Pouso Alegre-MG, Brasil.

\* [mayker.miranda@ifsuldeminas.edu.br](mailto:mayker.miranda@ifsuldeminas.edu.br)

*Recebido em 13 de dezembro de 2015. Aceito para publicação em 15 de julho de 2016*

### 1. Introdução

### 2. Parte Experimental

2.1. Material vegetal

2.2. Extração do óleo essencial

2.3. Análise do óleo essencial

2.4. Identificação dos constituintes do óleo essencial

2.5. Análises quantitativas da atividade antioxidante

2.6. Cepas bacterianas

2.7. Atividade antibacteriana

2.8. Cepa fúngica

2.9. Atividade antifúngica

2.10. Análise estatística para determinação da atividade antifúngica

### 3. Resultados e Discussão

### 4. Conclusão

### 1. Introdução

A família Annonaceae possui distribuição

panropical, sendo a América do Sul um dos principais centros da diversidade desse grupo, ao lado da América Central, Ásia e África.<sup>1</sup> O Brasil abriga cerca de 386 espécies

de anonáceas e a Amazônia possui três quartos de toda diversidade de Annonaceae com 27 gêneros e cerca de 280 espécies. A Mata Atlântica abriga 15 gêneros e 91 espécies, dentre os quais, dois gêneros e 40 espécies são endêmicos. O Cerrado possui 10 gêneros e aproximadamente 47 espécies de Annonaceae, porém não são endêmicos deste bioma.<sup>2</sup>

Diversas plantas da família Annonaceae são utilizadas na medicina popular devido as suas propriedades farmacológicas, atribuídas a presença de metabólitos secundários de diferentes classes, como alcaloides, acetogeninas e flavonoides.<sup>3</sup> Como exemplo, os frutos de *Annona spinescens* são utilizados no tratamento de úlcera, a infusão de frutos e sementes de *Annona crassiflora* são utilizados como antidiarreico, as folhas de *Annona squamosa* são utilizadas no tratamento de furúnculos e úlcera, as folhas de *Duguetia lanceolata* possuem ação anti-inflamatória e as folhas de *Annona glabra* apresentam ação anti-reumática.<sup>4-7</sup>

*Cardiopetalum calophyllum* (Figura 1) é uma planta típica do Cerrado, conhecida popularmente como imbirinha, sendo encontrada no Brasil central, Triângulo Mineiro, Goiás e Mato Grosso.<sup>8</sup>

Estudos fitoquímicos de cascas do caule de *C. calophyllum* revelaram a presença de alcaloides isoquinolínicos, destacando-se como constituinte majoritário o alcaloide liriodenina.<sup>9</sup> Relatos na literatura de estudos com *C. calophyllum* demonstram uma série de propriedades biológicas como atividade larvicida frente as larvas de *Aedes aegypti*, atividade leishmanicida frente a *Leishmania brasilienses* e *Leishmania amazonenses* e atividade ovicida e ninficida frente a *Rhodnius neglectus*.<sup>10-13</sup>

O presente trabalho aborda a composição química do óleo essencial das folhas de *Cardiopetalum calophyllum* acompanhada em diferentes meses do ano, bem como suas atividades antioxidante, antibacteriana e antifúngica.



**Figura 1.** Espécime de *Cardiopetalum calophyllum* (A). Flores de *Cardiopetalum calophyllum* (B). Folhas e frutos de *Cardiopetalum calophyllum* (C)

## 2. Parte Experimental

### 2.1. Material vegetal

As folhas de *C. calophyllum* foram coletadas no município de Rio Verde, Goiás, Brasil. A identificação botânica da espécie foi efetuada pelos biólogos Odirlei Simões e Marcelo Nogueira Xavier (DB/Universidade Estadual de Montes Claros - MG), sendo uma exsicata incorporada ao Herbário da Universidade Estadual de Montes Claros - MG, UNIMONTES, sob nº 3815. As coletas das folhas foram feitas durante os meses de março de 2014 a janeiro de 2015, entre as 05h00min e as 08h00min.

### 2.2. Extração do óleo essencial

As folhas coletadas foram secas à temperatura ambiente, reduzidas em moinho de facas e submetidas à extração do óleo essencial pelo método de hidrodestilação em aparelho do tipo Clevenger, por um período de 4 horas a partir da ebulição.<sup>14</sup> Em seguida, o hidrolato foi submetido à partição líquido-líquido em funil de separação. Foram realizadas três lavagens do hidrolato com três porções de 10 mL de diclorometano. Os óleos essenciais extraídos foram secos com sulfato de sódio anidro, acondicionados em pequenos frascos de vidro âmbar e mantidos sob refrigeração. O cálculo do rendimento foi realizado através da relação da massa do óleo essencial obtido com a massa de material vegetal *in natura* utilizado na extração.

### 2.3. Análise do óleo essencial

O óleo essencial foi diluído em hexano e submetido à análise em cromatógrafo em fase gasosa modelo QP-5000 da Shimadzu® com detector por espectrometria de massas

(CG-EM). A análise foi realizada com coluna capilar de sílica fundida, modelo DB-5 (30 m de comprimento x 0,25 mm de diâmetro interno x 0,25 µm de espessura de filme) da Shimadzu®, sendo utilizado como gás de arraste hélio (He) em fluxo de 1,0 mL/min. A injeção em modo split 1:20 foi realizada com injetor a 240 °C. A temperatura do detector foi de 270 °C e o forno foi programado de 60 a 180 °C a 3 °C/min. Para a detecção foi aplicado a técnica de impacto eletrônico a 70 eV. Foram realizadas três repetições para o óleo essencial analisado.

### 2.4. Identificação dos constituintes do óleo essencial

A determinação da composição química do óleo essencial foi realizada através dos espectros de massas, obtidos por CG-EM. Os compostos foram identificados por comparação de seus espectros de massa com um banco de dados (NIST 11 biblioteca) e também pela comparação de seus índices de retenção (IR) com os relatados na literatura.<sup>15</sup> Os índices de retenção foram determinados utilizando a curva de calibração de uma série de *n*-alcanos (C<sub>10</sub>-C<sub>29</sub>), injetada sob as mesmas condições cromatográficas utilizadas para as amostras.

### 2.5. Análises quantitativas da atividade antioxidante

A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos da capacidade sequestrante do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (DPPH) e pela captura do radical livre ABTS<sup>•+</sup> (2,2-azinobis-3-etilbenzolina-6-ácido sulfônico). Foram preparadas soluções em etanol de 0,5 a 10 g L<sup>-1</sup> para todos os ensaios.

Para o método DPPH, as leituras das absorbâncias foram realizadas após 60 minutos da adição de 0,1 mL do óleo essencial em diferentes concentrações e 3,9 mL da solução de DPPH (0,06 mM) em

espectrofotômetro digital de UV-Vis marca Bel Engineering modelo UV-M51 no comprimento de onda de 515 nm, em cubeta de quartzo. Os resultados foram expressos em  $EC_{50}$   $\mu\text{g/mL}$  (quantidade de amostra necessária para reduzir em 50% a concentração inicial do radical DPPH).<sup>16</sup> Para o ensaio ABTS<sup>+</sup>, uma alíquota de 30  $\mu\text{L}$  de cada diluição do óleo essencial foi adicionada à 3 mL do radical ABTS<sup>+</sup> deixado por 6 minutos no escuro. A absorbância foi lida a 734 nm em espectrofotômetro digital de UV-Vis marca Bel Engineering modelo UV-M51 utilizando etanol como branco. Os resultados foram expressos como micromolar de Trolox por grama de óleo ( $\mu\text{M trolox g}^{-1}$ ).<sup>17-18</sup>

## 2.6. Cepas bacterianas

As cepas testadas foram obtidas junto a *American Type Culture Collection* (ATCC, RockvilleMD, EUA). Os micro-organismos usados na avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *C. calophyllum* foram: *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478) e *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285).

## 2.7. Atividade antibacteriana

Os valores de concentração inibitória mínima (CIM) do óleo essencial foram determinados em triplicata pelo método de microdiluição, em microplacas com 96 poços (TPP, EUA).<sup>19</sup> As amostras foram dissolvidas em dimetilsulfóxido (DMSO, Synth, São Paulo, Brasil; 8000  $\mu\text{g/mL}$ ), seguido da diluição em caldo de soja triptica (Difco, Detroit, MI, EUA) para bactérias aeróbias e Schaedler Caldo (Difco), suplementado com hemina (5,0  $\mu\text{g/mL}$ ) e vitamina K (10,0  $\mu\text{g/mL}$ ) para as bactérias anaeróbias, com a finalidade de atingir concentrações variando de 400 a 12,5  $\mu\text{g/mL}$ . A concentração de DMSO final foi de 4% (v/v), e esta solução foi usada como um controle negativo. O inóculo

foi ajustado para cada organismo a fim se obter uma concentração de células de  $5 \times 10^5$  unidades formadoras de colônias por mL, de acordo com o *National Committee for Clinical Laboratory Standard* (NCCLS).<sup>20</sup> O dicloridrato de clorexidina (DCC, Sigma, Poole, Dorset, Reino Unido) foi utilizado como controle positivo, e as concentrações variaram de 0,0115  $\mu\text{g/mL}$  a 5,9  $\mu\text{g/mL}$ . Foram realizados os controles de esterilidade dos caldos TSB e SCHAEDLER, esterilidade do dicloridrato de clorexidina, esterilidade da amostra, controle da cultura (inóculo) e o controle do DMSO. As microplacas (96 poços) com os micro-organismos aeróbios foram fechados com um vedante de placa estéril e incubados aerobicamente a 37 °C durante 24 h. Os micro-organismos anaeróbios foram fechados com um vedante de placa estéril e incubados de 48 a 72 horas numa câmara anaeróbia (Don Whitley Scientific, Bradford, Reino Unido), com 5 % a 10 % de  $\text{H}_2$ , 10 % de  $\text{CO}_2$ , 80 % a 85 % de  $\text{N}_2$ , a 37 °C. Logo depois, resazurina (Sigma, 30  $\mu\text{L}$ ) em solução aquosa (0,01 %) foi adicionada para indicar viabilidade de micro-organismos. Os valores de CIM foram determinados a partir da concentração mais baixa do óleo essencial, capaz de inibir o crescimento de micro-organismos.

## 2.8. Cepa fúngica

O fungo isolado *Sclerotinia sclerotiorum* Ss12 (BRM 29673), agente causal do mofo branco, foi cedido pela Embrapa Arroz e Feijão, localizada em Santo Antônio de Goiás-GO e foi mantido em estufa de crescimento no laboratório de microbiologia vegetal do IF Goiano - campus Rio Verde até a sua utilização nos ensaios.

## 2.9. Atividade antifúngica

A determinação da atividade antifúngica do óleo essencial foi realizada no laboratório de microbiologia vegetal do IF Goiano – campus Rio Verde, seguindo metodologia de

difusão em disco com algumas adaptações.<sup>21</sup> No ensaio, a atividade antifúngica do óleo essencial obtido de folhas de *C. calophyllum*, foi avaliada sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum*, em concentrações de 50, 100, 150, 200 e 300 µL do óleo essencial em estudo. Como controle negativo, utilizou-se a testemunha (ausência do óleo essencial) e o fungicida *frownicide* 500 SC, na concentração de 10 µg mL<sup>-1</sup> do ingrediente ativo, como controle positivo. O princípio ativo do fungicida *frownicide* 500 SC é o fluazinam presente na ordem de 500 g/L (50% m/v) no produto comercializado. O óleo essencial foi adicionado em diferentes concentrações ao meio de cultura após esterilização e solidificação, bem como para o tratamento com fungicida, com auxílio da alça de

*Drigalski* previamente esterilizada. Após a solidificação do meio de cultura, e adição do óleo essencial, discos de BDA de 8 mm de diâmetro, contendo micélio com 7 dias de idade, foram depositados no centro das placas de Petri de 9 cm de diâmetro, as quais foram incubadas à temperatura de 27 ± 2 °C e fotoperíodo de 12 horas, a primeira avaliação foi realizada após 24 horas de incubação e se procedeu até o crescimento total das testemunhas. Para cada tratamento avaliado foi realizada 3 repetições.

A determinação da inibição do crescimento do fungo foi realizada pela média das repetições para cada tratamento, através de valores de PIC (Percentual de Inibição do Crescimento Micelial),<sup>22</sup> cuja fórmula é:

$$\text{PIC} = \frac{(\text{crescimento controle} - \text{crescimento tratamento})}{(\text{crescimento controle})} \times 100$$

### 2.10. Análise estatística para determinação da atividade antifúngica

O experimento foi montado segundo esquema ao acaso constituído de oito tratamentos: controle positivo, controle negativo, 0, 50, 100, 150, 200 e 300 µL com seis repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância e as médias dos tratamentos foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade por meio do *software* ASSISTAT.

## 3. Resultados e Discussão

O óleo essencial das folhas de *C. calophyllum* em todos os meses analisados foi composto predominantemente por uma mistura complexa de monoterpenos e sesquiterpenos (Tabela 1). Os teores médios de óleo essencial (%) na biomassa *in natura*

de *C. calophyllum* nos meses avaliados podem ser observados na Figura 3.

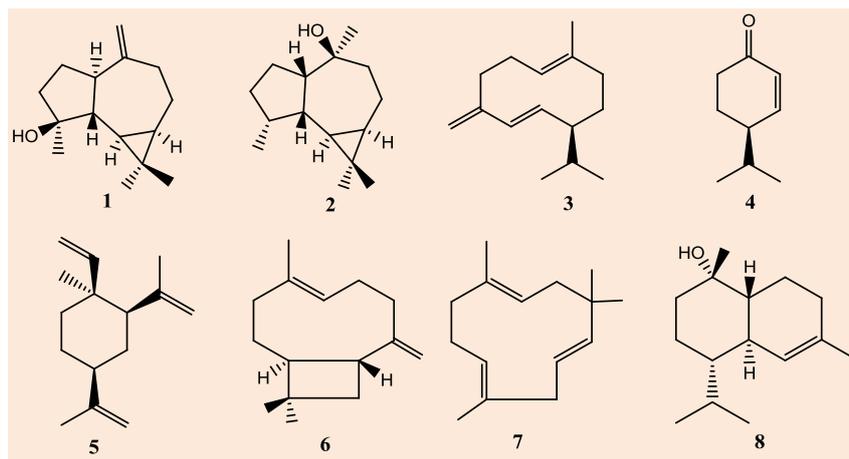
O composto majoritário em todo o período analisado foi o sesquiterpeno oxigenado espatulenol (1), chegando a representar aproximadamente 28% da amostra no mês de março/2014. Outro componente que se destacou foi o viridiflorol (2) que, assim como o espatulenol esteve presente no óleo essencial em todos os meses analisados. O germacreno-D (3) teve um aumento gradativo das suas concentrações ao longo do período analisado, atingindo a maior concentração no mês de outubro/14, valor correspondente a 15,6 % dos componentes do óleo essencial. Compostos como criptona (4), β-elemeno (5), cariofileno (6), humuleno (7) e τ-cadinol (8) também estiveram presentes em todos os meses analisados, porém em pequenas concentrações. As estruturas químicas dos compostos (1-8) mencionadas no texto podem ser conferidas na Figura 2.

**Tabela 1.** Composição química do óleo essencial das folhas de *C. calophyllum* avaliada durante os meses de março de 2014 a janeiro de 2015

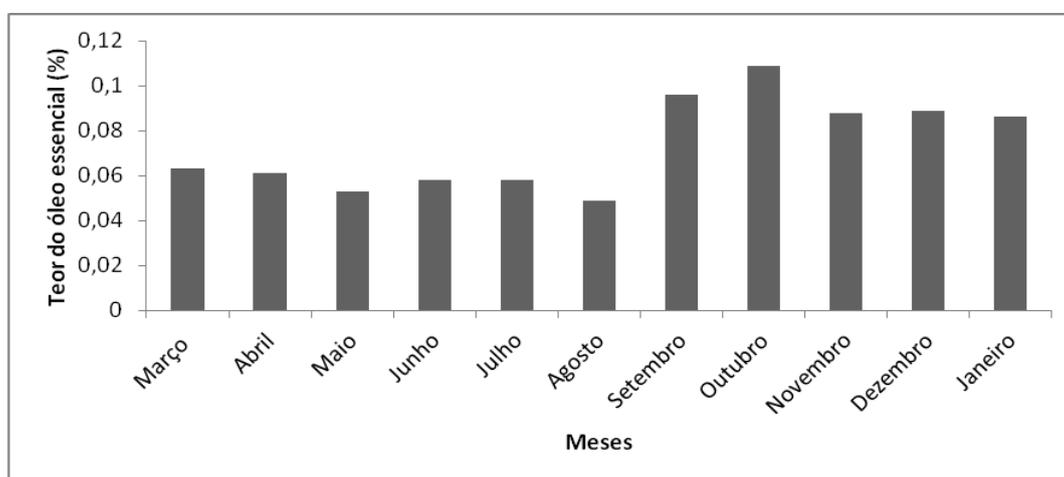
Composto	IR	Março	Abril	Maió	Junho	Julho	Agosto	Setembro	Outubro	Novembro	Dezembro	Janeiro
MONOTERPENOS OXIGENADOS												
% ÁREA RELATIVA												
<i>cis</i> - $\beta$ -Ocimeno	007	-	-	-	-	-	-	-	-	0,15	-	-
Linalol	053	-	0,10	-	-	-	-	0,09	-	-	0,07	0,07
Criptona	140	0,43	0,34	0,31	0,25	0,18	0,24	0,31	0,58	0,34	0,13	0,09
Isocitronelol	199	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,06
Dióxido de limoneno	209	-	0,23	-	-	0,12	0,20	0,14	0,35	0,17	0,07	0,04
SESQUITERPENOS HIDROCARBONADOS												
$\delta$ -elemeno	1298	-	0,46	0,63	0,63	0,64	0,76	0,76	1,11	0,74	0,69	0,52
$\alpha$ -cubebeno	1311	-	0,06	-	-	-	-	0,08	-	-	0,11	0,09
Copaeno	1339	0,17	0,41	-	0,24	0,32	0,24	0,31	0,20	0,87	0,51	0,49
$\alpha$ -bourboneno	1348	-	-	-	-	0,10	0,12	0,16	0,51	-	0,09	0,08
$\beta$ -Cubebeno	1354	-	-	-	-	-	-	-	-	0,33	-	-
$\beta$ -elemeno	1356	0,22	0,65	0,67	0,75	0,53	0,73	2,21	0,77	0,59	0,57	0,46
$\alpha$ -gurjuneno	1364	-	0,12	-	-	0,11	0,15	-	-	-	0,08	0,08
Cariofileno	1384	1,03	2,28	2,59	0,82	2,91	2,31	4,21	2,23	3,79	2,56	2,34
Aloaromadendreno	1404	0,84	1,20	1,30	1,37	1,30	0,90	2,54	0,84	0,77	1,12	0,92
Humuleno	1419	0,44	0,64	0,72	1,13	1,16	0,65	1,85	0,64	0,88	0,70	0,68
$\alpha$ -guaieno	1426	-	-	-	-	-	-	-	-	0,40	0,42	0,48
$\beta$ -copaeno	1443	0,76	0,96	0,86	1,06	1,03	0,76	0,99	0,75	0,91	1,74	1,43
Germacreno-D	1448	0,43	3,80	4,97	4,82	5,62	9,05	7,56	15,60	12,47	6,71	7,30
$\beta$ -selineno	1453	0,38	-	-	0,53	0,46	0,15	0,37	-	-	-	-
Viridifloreno	1462	1,08	1,38	-	1,67	1,66	-	1,53	-	-	2,10	2,03
Germacreno-B	1464	-	2,12	4,74	1,63	2,01	5,17	3,87	9,88	6,07	1,72	2,40
$\alpha$ -muuroleno	1468	0,21	0,32	-	0,34	0,36	0,35	-	-	0,29	0,57	0,57

$\alpha$ -bulneseno	1472	-	0,23	-	0,39	0,47	0,42	4,09	0,57	0,49	0,28	0,30
$\gamma$ -muuroleno	1481	0,74	0,77	-	0,85	0,81	0,69	0,76	0,44	0,80	1,16	1,04
$\delta$ -cadineno	1491	0,62	0,72	-	0,77	0,89	0,72	0,88	0,73	1,03	1,47	1,45
Guaia-1(10),11-dieno	1523	-	0,61	1,07	-	-	1,22	1,07	2,47	1,27	1,11	0,95
SESQUITERPENOS OXIGENADOS												
Espatuleno	1544	28,78	27,34	27,93	22,34	21,47	23,78	18,60	21,09	17,74	16,81	15,97
Viridiflorol	1550	9,99	10,65	10,30	10,93	10,27	8,73	8,25	6,02	7,23	9,25	8,79
Champacol	1559	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,05
Elemol	1560	0,76	0,97	-	1,11	0,99	0,57	-	-	-	-	-
$\beta$ -eudesmol	1567	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1,79
Óxido de cariofileno	1575	1,99	1,09	1,07	1,65	1,47	0,77	1,14	-	-	-	-
Cubenol	1583	0,67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>ent</i> -espatuleno	1593	2,10	1,16	1,40	2,09	2,05	1,88	1,58	2,25	1,62	1,93	1,80
$\tau$ -cadinol	1605	1,58	2,88	2,61	3,40	3,30	2,56	3,10	1,79	3,93	5,95	5,71
Torreyol	1609	-	1,10	0,99	1,35	1,36	-	-	-	1,34	1,66	1,61
Acetato de (-) isolongifolol	1617	5,06	4,86	4,55	6,69	6,54	4,44	5,98	2,78	5,44	7,50	7,87
6- <i>epi</i> -shyobunol	1632	-	-	-	-	-	4,97	-	-	-	-	-
( <i>Z,E</i> ) Farnesol	1634	6,51	-	-	-	-	-	2,45	1,70	1,98	4,30	-
Óxido de aloaromadendreno	1643	-	-	-	-	-	-	-	-	1,01	0,38	0,52
Óxido de aromandendreno	1692	1,68	-	-	-	-	1,10	-	-	-	-	-
Epóxido de isoaromadendreno	1735	-	-	1,10	0,96	-	1,19	0,67	0,70	0,85	-	-

IR: índice de retenção da literatura determinado em coluna DB-5



**Figura 2.** Constituintes químicos identificados no óleo essencial das folhas de *C. calophyllum*



**Figura 3.** Teores médios de óleo essencial (%) na biomassa *in natura* de *C. calophyllum*

Em *Rollinia leptopetala*, outra espécie da família Annonaceae, o óleo essencial também apresentou uma mistura de terpenoides, entretanto com predominância dos monoterpenos.<sup>23</sup> Os compostos cuja área é menor que 8% são considerados minoritários.<sup>24</sup>

Nos meses de setembro a novembro o espécime em estudo encontrava-se em pleno florescimento e apresentava tecidos mais novos, fato que interfere na síntese de determinados compostos de modo a aumentar e/ou diminuir a produção de outros.<sup>25</sup> As maiores concentrações relativas de germacreno-D (15,06 %) e germacreno-B (9,88 %) foram observadas no mês de outubro/14, pico da floração da espécie. O germacreno-D tem a função de atrair

polinizadores, pois o seu esqueleto químico se assemelha a feromônios sexuais de insetos, o que explica o aumento da concentração do composto nesse período.<sup>26</sup> Para o viridiflorol, não foram observados grandes variações no teor relativo, apenas um leve decréscimo nos estádios reprodutivos da *C. calophyllum*. Os sesquiterpenos cariofileno (4,21%), aloaromadendreno (2,54%), humuleno (1,85%),  $\beta$ -elemeno (2,21 %) e  $\alpha$ -bulneseno (4,09 %) tiveram os maiores teores relativos no mês de setembro. O (*Z,E*)-farnesol apresentou maior concentração em março (6,51%) e o sesquiterpeno elemol exibiu maior concentração em junho (1,11%). Estas variações nas concentrações dos constituintes químicos são justificadas

levando-se em consideração o estágio fenológico da planta, que é de extrema importância, já que o mesmo influencia na quantidade total de metabólitos produzidos e também em suas proporções relativas.<sup>27</sup>

Para realização das atividades biológicas reuniu-se todos os óleos essenciais extraídos das folhas de *C. calophyllum* nos diferentes meses do ano. Em relação ao ensaio de verificação do sequestro do radical livre DPPH,<sup>28</sup> observou-se um  $EC_{50} = 9,66 \mu\text{g/mL}$  para óleo essencial de folhas de *C. calophyllum*. Comparando-se o valor de  $EC_{50}$

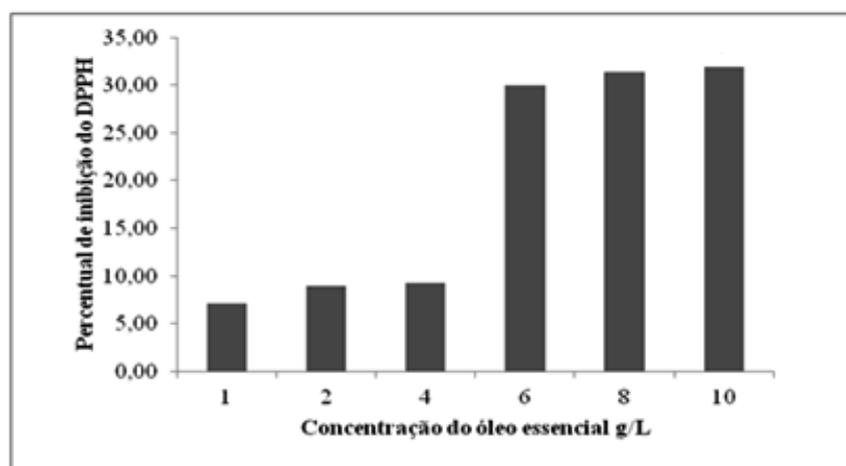
obtido para o óleo essencial de folhas de *C. calophyllum* com o padrão quercetina ( $EC_{50} = 3,13 \mu\text{g/mL}$ ) utilizado, comprovou-se seu baixo potencial antioxidante. Já através do teste com o cátion radical  $ABTS^{+}$  em comparação com trabalhos semelhantes já descritos na literatura,<sup>29</sup> obteve-se para o óleo essencial em estudo um  $EC_{50} = 6,17 \mu\text{M}$  de trolox/g, comprovando deste modo, em comparação com o padrão trolox ( $EC_{50} = 3,02 \mu\text{M}$ ) sua baixa potencialidade como antioxidante (Tabela 2).

**Tabela 2.** Resultados dos ensaios das atividades antioxidantes (DPPH e  $ABTS^{+}$ ) do óleo essencial de folhas de *C. calophyllum*

Ensaio	$EC_{50}$
Atividade antioxidante DPPH ( $EC_{50} \mu\text{g/mL}$ )	$9,66 \pm 0,31$
Atividade antioxidante ABTS ( $\mu\text{M}$ de trolox/g)	$6,17 \pm 0,38$
Quercetina	$3,13 \mu\text{g/mL}$
Trolox	$3,02 \mu\text{M}$

O potencial antioxidante de óleos essenciais tem sido bastante estudado,<sup>30</sup> e a baixa atividade antioxidante demonstrada pelo óleo essencial de folhas de *C. calophyllum* pode ser explicada pela baixa

concentração de compostos com este potencial. Os percentuais de inibição dos radicais livres pelo método DPPH para o óleo essencial de folhas de *C. calophyllum* podem ser observadas na Figura 4.



**Figura 4.** Percentual de inibição do radical livre DPPH de diferentes concentrações do óleo essencial de folhas de *C. calophyllum*

O óleo analisado proporcionou uma porcentagem máxima de atividade antioxidante de 34,3% na concentração de 10 g/L. O óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*) exibiu 95,6% de inibição do radical DPPH na concentração 10 g/L, efeito antioxidante bastante superior ao encontrado neste estudo, atribuído à sua composição química, composta majoritariamente por eugenol.<sup>31</sup> O óleo essencial de *Lippia grandis* apresentou um comportamento semelhante ao exibido pela *C. calophyllum*, inibindo 39,2% do radical em uma concentração de 11,3 g/L.<sup>32</sup> O óleo essencial nas concentrações testadas de 1 a 10 g/L exibiu baixo potencial antioxidante, inibindo menos de 40% do radical livre DPPH.<sup>33</sup>

Embora os dois métodos utilizados para avaliar a atividade antioxidante neste trabalho empreguem basicamente o mesmo princípio,<sup>34</sup> cada método só fornece uma estimativa da capacidade antioxidante de acordo com as condições e reagentes

utilizados. Alguns autores sugerem ainda que o método ABTS é mais compatível para determinação da capacidade antioxidante mais completa de óleos, pois corrobora o uso de solvente suficientemente apolar para dissolver amostras lipídicas. O DPPH também pode ser usado para ranquear as amostras de óleos quanto à capacidade antioxidante, porém não exibe resultados quantitativos e representativos desta capacidade.<sup>35</sup>

Em suma, o óleo essencial analisado não possui em sua composição compostos com reconhecida atividade antioxidante em quantidades significativas, exceto a presença de  $\beta$ -cariofileno que associado com compostos fenólicos têm seu potencial antioxidante aumentado através do efeito sinérgico.<sup>36</sup>

O potencial antibacteriano do óleo essencial das folhas de *C. calophyllum* também foi avaliado frente a alguns micro-organismos anaeróbicos e aeróbicos orais (Tabela 3).

**Tabela 3.** Efeito inibidor do óleo essencial de folhas de *C. calophyllum* frente às bactérias aeróbias e anaeróbias

	Micro-organismos	Concentração Inibitória Mínima (CIM) – $\mu\text{g/mL}$	Dicloridrato de clorexidina (CIM) – $\mu\text{g/mL}$
Aeróbios	<i>Streptococcus mutans</i> <sup>a</sup> (ATCC 25175)	400	0,922
	<i>Streptococcus mitis</i> <sup>a</sup> (ATCC 49456)	100	1,844
	<i>Streptococcus sanguinis</i> <sup>a</sup> (ATCC 10556)	400	0,922
	<i>Streptococcus sobrinus</i> <sup>a</sup> (ATCC 33478)	400	0,922
Anaeróbio	<i>Bacteroides fragilis</i> <sup>b</sup> (ATCC 25285)	400	0,737

<sup>a</sup>Bactéria gram-positiva; <sup>b</sup>Bactéria gram-negativa; Dicloridrato de clorexidina (controle positivo)

O óleo essencial estudado apresentou moderada atividade inibitória frente a todas as bactérias avaliadas. É reportado na literatura<sup>37</sup> que amostras que exibiram valores de CIM inferiores a 100  $\mu\text{g/mL}$  tiveram atividade antibacteriana considerada

boa; de 100 a 500  $\mu\text{g/mL}$  moderada; de 500 a 1000  $\mu\text{g/mL}$  fraca e acima de 1000  $\mu\text{g/mL}$  inativa.

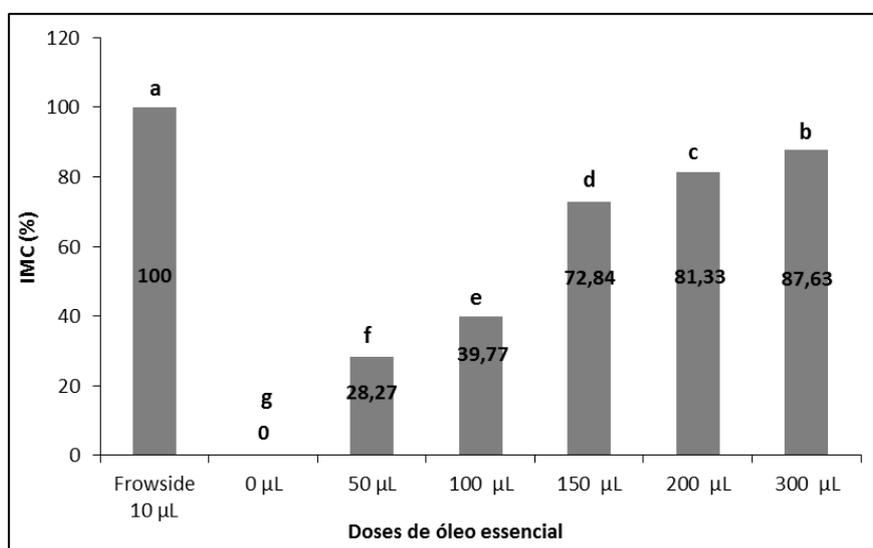
*Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis*,

*Streptococcus sobrinus* e *Bacteroides fragilis* apresentam patogenicidade frente ao esmalte dos dentes e tecido gengival estando diretamente ligadas a cárie e doenças periodontais. A placa bacteriana é definida como um biofilme de micro-organismos, contidos em matriz orgânica formada por substâncias da saliva e da dieta do hospedeiro e por polímeros bacterianos.<sup>38</sup>

A moderada atividade antibacteriana exibida pelo óleo essencial estudado pode ser explicada pela presença de metabólitos secundários, como monoterpenos e sesquiterpenos. Vários mecanismos são

propostos para explicar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais. Entende-se que a inibição do crescimento microbiano pela ação de óleos essenciais é devida ao dano direto causado à integridade da membrana celular pelos componentes lipofílicos do óleo essencial, o que afeta diretamente a manutenção do pH celular e o equilíbrio de íons inorgânicos.<sup>39</sup>

Os resultados da atividade antifúngica do óleo essencial de folhas de *C. calophyllum* sobre o crescimento micelial de *S. sclerotiorum* podem ser observados na Figura 5.



**Figura 5.** Percentual de inibição micelial de *Sclerotinia sclerotiorum* de diferentes concentrações do óleo essencial de *C. calophyllum*. As médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Scott-Knott

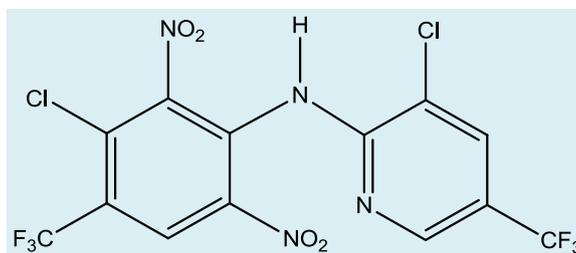
Em relação à percentagem de inibição do crescimento micelial (PIC), ao se comparar as concentrações utilizadas do óleo essencial em estudo verifica-se que as concentrações diferiram de forma significativa estatisticamente entre si e os resultados indicaram um efeito mais elevado na maior dosagem de 300 µL com 87,63% de inibição em relação às menores dosagens de 50 µL e 100 µL com apenas 28,27% e 39,77% de inibição, respectivamente. A dose de 150 µL apresentou leve inibição de 72,84% e a de 200 µL apresentou moderada inibição com 81,33%. Deste modo, a concentração de 300

µL se mostra mais eficaz dentre as demais concentrações avaliadas.

A análise por variância e o teste de médias por Scott-Knott foram utilizados para avaliar a melhor dose de óleo essencial capaz de levar a inibição do fungo em estudo. Pode ser observado que todas as letras são diferentes, mostrando que a dose do óleo essencial influencia diretamente no crescimento do fungo. A letra “a” foi a dose que alcançou 100% de inibição utilizando o controle positivo, a letra “b” representa a melhor dose de óleo essencial para o combate deste

fungo, a “f” a pior dose de óleo essencial para o combate, e a letra “g” refere-se ao branco que não recebeu nenhum tipo de tratamento.

Nesta avaliação, todos os resultados de PIC foram comparados com o controle positivo o fungicida *Frownicide* 500 SC (Figura 6) na concentração de 10 µL a qual apresentou inibição micelial de 100%.



**Figura 6.** Estrutura química do princípio ativo fluazinam presente na formulação do fungicida *Frownicide* 500 SC

A atividade antifúngica exibida pelo óleo essencial de folhas de *C. calophyllum* pode estar relacionada à presença do espatulenol, composto majoritário presente no OE ou pelo sinergismo entre os compostos presentes que possuem atividade antifúngica.<sup>40</sup>

Os resultados encontrados no presente trabalho são semelhantes aos encontrados no estudo realizado sobre a investigação do potencial antifúngico do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*), em que foi relatada a tendência de aumento nos índices de inibição do desenvolvimento micelial com o aumento das concentrações testadas.<sup>41</sup>

A potencialidade de óleos essenciais extraídos de espécies vegetais no controle de fitopatógenos têm despertado o interesse de pesquisadores de diversas áreas,<sup>42</sup> e dentro deste contexto o óleo essencial estudado destacou-se como promissor fungicida natural frente ao fungo *Sclerotinia sclerotiorum* (mofo branco).

#### 4. Conclusão

Os dados obtidos neste trabalho revelaram diferenças na composição química do óleo essencial de folhas de *C. calophyllum* nos vários meses avaliados. Os compostos majoritários espatulenol, viridiflorol e

germacreno-D identificados no óleo essencial de folhas de *C. calophyllum*, estiveram presentes em todo o período analisado, porém as suas proporções relativas variaram possivelmente devido à influência de fatores bióticos e abióticos. Os compostos minoritários presentes no óleo essencial de folhas de *C. calophyllum* em todo o período estudado foram: criptona, β-elemeno, cariofileno, aloaromadendreno, humuleno, ent-espatulenol, τ-cadinol e acetato de (-)-isolongifolol.

Vários são os fatores que atuam na produção de certos metabólitos pela planta, por exemplo, nutrição do solo, intensidade luminosa, ação de insetos e micro-organismos.

Através dos ensaios das atividades antioxidantes (DPPH e ABTS<sup>+</sup>), foi evidenciada a baixa atividade antioxidante do óleo essencial de folhas de *C. calophyllum*, fato diretamente relacionado à baixa concentração de metabólitos secundários capazes de reagir e neutralizar os radicais livres.

O óleo essencial estudado apresentou ainda moderada atividade antibacteriana frente à *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus sobrinus* e *Bacteroides fragilis*, bactérias responsáveis pela cárie e doenças periodontais.

Em adição, quando avaliada a atividade antifúngica do óleo essencial obtido das folhas de *C. calophyllum*, observou-se um máximo de inibição do crescimento micelial de 87,63%, que indica seu promissor potencial fungicida frente ao fungo *S. sclerotiorum* (mofo branco).

Em suma, o óleo essencial extraído das folhas de *C. calophyllum*, espécie ocorrente no sudoeste goiano, exibiu baixa atividade antioxidante, porém, demonstrou promissora atividade antifúngica e moderada atividade antibacteriana, podendo ser considerado como uma fonte alternativa de produtos naturais bioativos.

## Agradecimentos

CAPES, FAPEG, UniRV e IF goiano pelo apoio financeiro.

## Referências Bibliográficas

- <sup>1</sup> Krinski, D.; Massaroli, A.; Machado, M. Potencial inseticida de plantas da família Annonaceae. *Revista Brasileira de Fruticultura* **2014**, *36*, 225. [CrossRef]
- <sup>2</sup> Lopes, J. C.; Mello-Silva, R. Diversidade e caracterização das Annonaceae do Brasil. *Revista Brasileira de Fruticultura* **2014**, *36*, 125. [CrossRef]
- <sup>3</sup> Formagio, A. S. N.; Masetto, T. E.; Baldivia, D. S.; Vieira, M. C.; Zárate, N. A. H.; Pereira, Z. V. Potencial alelopático de cinco espécies da família Annonaceae. *Revista brasileira de Biociências* **2010**, *8*, 349. [Link]
- <sup>4</sup> Fenner, R.; Betti, A. H.; Mentz, L. A.; Rates, S. M. K. Plantas utilizadas na medicina popular brasileira com potencial atividade antifúngica. *Revista Brasileira Ciências Farmacêuticas* **2006**, *42*, 369. [CrossRef]
- <sup>5</sup> Vila Verde, G. M.; Paula, J. R.; Carneiro, D. M. Levantamento etnobotânico das plantas medicinais do Cerrado utilizadas pela população de Mossamedes (GO). *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2003**, *13*, 64. [CrossRef]
- <sup>6</sup> Sousa, O. V.; Del-Vechio-Vieira, G.; Amaral, M. P. H.; Pinho, J. J. R. G.; Yamamoto, C. H.; Alves, M. S. Efeitos atinocectivo e anti-inflamatório do extrato etanólico das folhas de *Duguetia lanceolata* St. –Hil. (Annonaceae). *Latin American Journal of Pharmacy* **2008**, *27*, 398. [CrossRef]
- <sup>7</sup> Siebra, C. A.; Nardin, J. M.; Florão, A.; Rocha, F. H.; Bastos, D. Z.; Oliveira, B. H.; Weffort-Santos, A. M. Potencial anti-inflamatório de *Annona glabra*, Annonaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2009**, *19*, 82. [CrossRef]
- <sup>8</sup> Elias, M. A. D. S.; *Dissertação de Mestrado*, Universidade Federal de Goiás, Brasil, 2010. [Link]
- <sup>9</sup> Séguineau, C.; Richomme, P.; Fournet, A.; Guinaudeau, H.; Bruneton, J. Isoquinoline alkaloids from *Cardiopetalum calophyllum*. *Planta Medica* **1991**, *57*, 581. [CrossRef] [PubMed]
- <sup>10</sup> Costa, M. S.; Pereira, M. J. B.; Oliveira, S. S.; Souza, P. T.; Dall’oglio, E. L.; Alves, T. C. Anonáceas provocam mortalidade em larvas de *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) (Diptera:Culicidae). *Revista Brasileira de Biociências* **2013**, *11*, 184. [Link]
- <sup>11</sup> Coelho, A. A. M.; Paula, J. E.; Espíndola, L. S. Atividade larvicida de extratos vegetais sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera:Culicidae), em condições de laboratório. *BioAssay* **2009**, *4*, 1. [CrossRef]
- <sup>12</sup> Fournet, A.; Barrios, A. A.; Muñoz, V. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. *Journal Ethnopharmacology* **1994**, *41*, 19. [PubMed]
- <sup>13</sup> Xavier, M. N.; Alves, C. C. F.; Casal, C. M.; Santos, N. H. Chemical composition of the volatile oil of *Cardiopetalum calophyllum* collected in the Cerrado area. *Ciência Rural* **2016**, *46*, 1. [CrossRef]
- <sup>14</sup> Siqueira, C. A. T.; Oliani, J.; Sartoratto, A.; Queiroga, C. L.; Moreno, P. R. H.; Reimão, J. Q.; Tempone, A. G.; Fischer, D. C. H. Chemical constituents of the volatil oil from leaves of *Annona coriácea* and in vitro antiprotozoal activity. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2011**, *21*, 33. [CrossRef]

- <sup>15</sup> Adams, R. P.; *Identification of essential oil componentes by gas chromatography quadrupole mass spectroscopy*, Allured: Card Stream I L, 2001.
- <sup>16</sup> Mensor, L. L.; Menezes, F. S.; Leitão, G. G.; Reis, A. S.; Santos, T. C.; Coube, C. S.; Leitão, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy Research* **2001**, *15*, 127. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>17</sup> Re, R.; Pellegrini, N.; Proteggente, A.; Pannala, A.; Yang, M.; Rice-Evans, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine* **1999**, *26*, 1231. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>18</sup> Oliveira, A. C.; Valentim, I. B.; Goulart, M. O. F.; Silva, C. A.; Bechara, E. J. H.; Trevisan, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidante. *Química Nova* **2009**, *32*, 689. [[CrossRef](#)]
- <sup>19</sup> Rios, J. L.; Recio, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal Ethnopharmacology* **2005**, *100*, 80. [[CrossRef](#)]
- <sup>20</sup> NCCLS. The National Committee for Clinical Laboratory Standards. The Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that Grow Aerobically; Approved Standard. 6<sup>a</sup> ed. NCCLS document M7-A6. Wayne (PA): NCCLS; 2003.
- <sup>21</sup> Silva, A. C.; Sales, N. L. P.; Araújo, A. V.; Junior, C. F. C. Efeito in vitro de compostos de plantas sobre o fungo *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. isolado do maracujazeiro. *Ciência e Agrotecnologia* **2009**, *33*, 1853. [[CrossRef](#)]
- <sup>22</sup> Garcia, R. A.; Juliatti, F. C.; Barbosa, K. A. G.; Cassemiro, T. A. Antifungal activity of vegetable oils and extracts against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Bioscience Journal* **2012**, *28*, 48. [[Link](#)]
- <sup>23</sup> Costa, V. C. O.; Tavares, J. F.; Agra, M. F.; Falcão-Silva, V. S.; Facanali, R.; Vieira, M. A. R.; Marques, M. O. M.; Siqueira-Júnior, J. P.; Silva, M. S. Composição química e modulação da resistência bacteriana a drogas do óleo essencial das folhas de *Rollinia leptopetala* R. E. Fries. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2008**, *18*, 245. [[CrossRef](#)]
- <sup>24</sup> Stefanello, M. E. A.; Cervi, A. C.; Wisniewski, J. A.; Simionatto, E. L. Composição e variação sazonal do óleo essencial de *Myrcia obtecta* (O. Berg) Kiaersk. var. *obtecta*, Myrtaceae. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2010**, *20*, 82. [[CrossRef](#)]
- <sup>25</sup> Gobbo-Neto, L.; Lopes, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova* **2007**, *30*, 374. [[CrossRef](#)]
- <sup>26</sup> Castro, D. P.; Cardoso, M. G.; Morais, J. C.; Santos, N. M.; Baliza, D. P. Não-preferência de *Spodoptera frugiperda* (Lepidoptera:Noctuidae) por óleos essenciais de *Achillea millefolium* L. e *Thymus vulgaris* L. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* **2006**, *8*, 27. [[Link](#)]
- <sup>27</sup> Bowers, M. D.; Stamp, N. E. Effects of plant age, genotype, and herbivory on Plantago performance and chemistry. *Ecology* **1993**, *74*, 1778. [[CrossRef](#)]
- <sup>28</sup> Cansian, R. L.; Mossi, A. J.; Oliveira, D.; Toniazzo, G.; Treichel, H.; Paroul, N.; Astolfi, V.; Serafini, L. A. Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. *Linaloolifera fujita*). *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2010**, *30*, 378. [[CrossRef](#)]
- <sup>29</sup> Soares, M.; Welter, L.; Gonzaga, L.; Lima, A.; Mancini-Filho, J.; Fett, R. Avaliação da atividade antioxidante e identificação dos ácidos fenólicos presentes no bagaço de maçã cv. Gala. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* **2008**, *28*, 727. [[CrossRef](#)]
- <sup>30</sup> Simionatto, E.; Bonani, V. F. L.; Morel, A. F.; Poppi, N. R.; Júnior, J. L. R.; Stuker, C. Z.; Peruzzo, G. M.; Peres, M. T. L. P.; Hess, S. C. Chemical composition and evaluation of antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of *Croton urucurana* Baillon (Euphorbiaceae) stem bark. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **2007**, *18*, 879. [[CrossRef](#)]
- <sup>31</sup> Silvestri, J. D. F.; Paroul, N.; Czyewski, E.; Lerin, L.; Rotava, I.; Cansian, R. L.; Mossi, A.; Toniazzo, G.; Oliveira, D.; Treichel, H. Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *Revista Ceres* **2010**, *57*, 589. [[CrossRef](#)]
- <sup>32</sup> Damasceno, E. I.; Silva, J. K. R.; Andrade, H. A.; Sousa, J. C.; Maia, J. G. S. Antioxidant

- capacity and larvicidal activity of essential oil and extracts from *Lippia grandis*. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2011**, *21*, 1. [[CrossRef](#)]
- <sup>33</sup> Hassimoto, N. M.; Genovese, M. I.; Lajolo, F. M. Antioxidant activity of dietary fruits, vegetables, and commercial frozen fruit pulps. *Journal Agriculture Food Chemistry* **2005**, *53*, 2928. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>34</sup> Vasco, C.; Ruales, J.; Kamal-Eldin, A. Total phenolic compounds and antioxidant capacities of major fruits from Ecuador. *Food Chemistry* **2008**, *111*, 816. [[CrossRef](#)]
- <sup>35</sup> Castelo-Branco, V. N.; Torres, A. G. Capacidade antioxidante total de óleos vegetais comestíveis: determinantes químicos e sua relação com a qualidade dos óleos. *Revista de Nutrição* **2011**, *24*, 173. [[CrossRef](#)]
- <sup>36</sup> Shahidi, F.; Janitha, P. K.; Wanasundara, P. D. Phenolic antioxidants. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **1992**, *32*, 67. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>37</sup> Holetz, F. B.; Pessini, G. L.; Sanches, N. R.; Cortez, D. A. G.; Nakamura, C. V.; Dias, F. B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* **2002**, *97*, 1027. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- <sup>38</sup> Pereira, J. V.; Pereira, M. S. V.; Sampaio, F. C.; Sampaio, M. C. C.; Alves, P. M.; Araújo, C. R. F.; Higino, J. S. Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. *Revista Brasileira de Farmacognosia* **2006**, *16*, 88. [[CrossRef](#)]
- <sup>39</sup> Peter K. V (Ed.). Handbook of herbs and spices. V.2. Cambridge: Woodhead Publishing Limited; 2004.
- <sup>40</sup> Chao, S. C.; Young, D. G. Screening for inhibitory activity of essential oils on selected bacteria, fungi and viruses. *Journal Essentials Oil Research* **2000**, *12*, 630. [[CrossRef](#)]
- <sup>41</sup> Pereira, M. C.; Vilela, G. R.; Costa, L. M. A. S.; Silva, R. G.; Fernandes, A. F.; Fonseca, E. W. N.; Picolli, R. H. Inibição do desenvolvimento fúngico através da utilização de óleos essenciais de condimentos. *Ciência e Agrotecnologia* **2006**, *30*, 731. [[CrossRef](#)]
- <sup>42</sup> Fonseca, M. C. M.; Lehner, M. S.; Gonçalves, M. G.; Paula Júnior, T. J.; Silva, A. F.; Bonfim, F. P. G.; Prado, A. L. Potencial de óleos essenciais de plantas medicinais no controle de fitopatógenos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais* **2015**, *17*, 45. [[CrossRef](#)]