



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ruta graveolens* Linneau
(RUTACEAE)**

JOSÉ FÁBIO FRANÇA ORLANDA

João Pessoa - PB - Brasil

Agosto/2011



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

TESE DE DOUTORADO

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA
DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Ruta graveolens* Linneau
(RUTACEAE)**

JOSÉ FÁBIO FRANÇA ORLANDA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da UFPB como parte dos requisitos para obtenção do grau de Doutor em Química Analítica.

Orientador (a): Profa. Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento
2º Orientador: Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza

João Pessoa - PB – Brasil

Agosto/2011

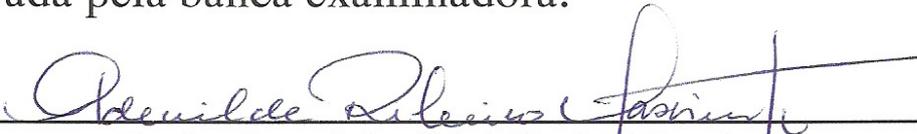
O71e *Orlanda, José Fábio França.*
Estudo da composição química e atividade biológica do
óleo essencial de Ruta graveolens Linneau (RUTACEAE) /
José Fábio França Orlanda.-- João Pessoa, 2011.
105f. : il.
Orientadores: Adenilde Ribeiro Nascimento, Antônio
Gouveia de Souza
Tese (Doutorado) – UFPB/CCEN
1. Química Analítica. 2. Ruta graveolens L. (arruda).
2. Óleo essencial – componentes químicos. 3. Atividade
biológica.

UFPB/BC

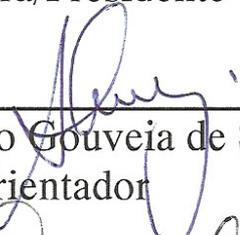
CDU: 543(043)

Estudo da Composição Química e Atividade Biológica do Óleo Essencial de *Ruta graveolens* Linneau (RUTACEAE)

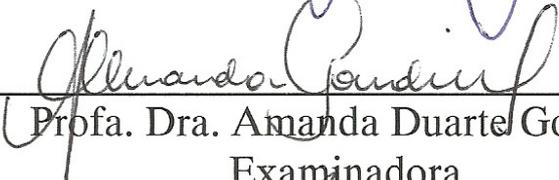
Aprovada pela banca examinadora:



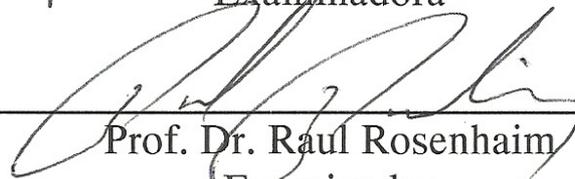
Profa. Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento
Orientadora/Presidente



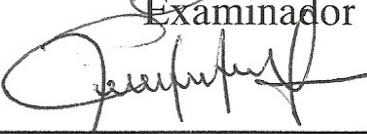
Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza
2º. Orientador



Profa. Dra. Amanda Duarte Gondim
Examinadora



Prof. Dr. Raul Rosenhaim
Examinador



Prof. Dr. Manoel Gabriel Rodrigues Filho
Examinador



Profa. Dra. Antonia Lúcia de Souza
Examinadora

“Não é o desafio com que nos deparamos que determina quem somos e o que estamos nos tornando, mas a maneira como respondemos ao desafio. Somos combatentes idealistas, mas plenamente conscientes. Porque o ter consciência não nos obriga a ter teoria sobre as coisas; só nos obriga a sermos conscientes. Problemas para vencer, liberdade para provar. E enquanto acreditarmos no nosso sonho, nada é por acaso”

Henfil

Dedico este trabalho:

A **Deus**, nosso criador, que incomparável na sua infinita bondade, compreendeu os meus objetivos. Ofereço o meu porvir e peço forças para sempre agir com eficiência em meu trabalho e acerto em minhas decisões.

Aos **Meus Guias de Luz**, que através das forças divinas, nunca me desamparou nesta luta incessante, na busca dos meus objetivos, crescimento como pessoa e na minha realização profissional.

Aos **Meus Pais** (Orlando e Sônia), que não mediram esforços para a educação e bem-estar de seus filhos e que por isso, e tantas outras coisas, tornou este momento realidade...

Aos **Meus Amigos**, em especial a **Katya, Keka e Ezequias**, porque nunca mediram esforços para ajudar-me e por serem não só como amigos, mas meus verdadeiros companheiros de jornada.

A **Minha Orientadora** (Dra. Adenilde) e todos os **Meus Orientandos**, pela força, companheirismo, carinho, incentivo, compreensão e paciência, durante a elaboração desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço a “Deus”, pela vida e força para recomeçar após todas as tempestades.

Aos meus pais, Orlando e Sônia, por terem me mostrado que os caminhos da vida têm de ser trabalhados com amor, dignidade, honestidade e dedicação, não medindo esforços para que nossos sonhos se realizem.

Aos meus pais espirituais, Ailton (*In memorian*) e Geralda, pelo amor incondicional que me traz força e coragem para levar a vida de forma pura e feliz, pela educação espiritual exemplar que me deram durante minha vida e exemplos de honestidade, dignidade e bondade.

Aos meus amigos, Keka, Katya e Ezequias, agradeço pela força, companheirismo, carinho, amor, incentivo, compreensão e paciência, durante os momentos mais difíceis da minha vida.

Agradeço aos meus avós (paternos e maternos), de maneira muito amorosa e especial, pelo amor que eles me dão.

Aos meus irmãos (Wagner, Walber e Fabiane), pelo incentivo, força e carinho.

Em especial, a minha orientadora, Profa. Dra. Adenilde Ribeiro Nascimento pela paciência, humildade, exemplo de mulher forte, justa e guerreira, pela transparência, pelos ensinamentos transmitidos. Por toda a admiração que eu sinto, desenvolver esta pesquisa sob sua orientação, não foi apenas enriquecedor cientificamente, me fez crescer como pessoa, porque ela não é apenas ética e inteligente, ela é uma mulher maravilhosa. Ensinou-me também que não existe tese sem transpiração, sem rasgar papel, sem rabiscos, sem mudar de idéia; que o conhecimento e o sucesso não caem do céu, são o resultado de muito estudo, de muito trabalho, confiança, dedicação e determinação naquilo que se propõe a fazer.

Ao Prof. Dr. Victor Elias Mouchrek Filho, que com total dedicação e competência transmitiu com maestria os ensinamentos e segurança, necessários para a realização desta Tese.

Ao Prof. Dr. João Mouchrek pela amizade, incentivo, força e carinho.

Ao Prof. Dr. Antonio Gouveia de Souza, ainda que distante tem me dado muito incentivo, oportunidades e apoio quando solicitados.

Aos meus amigos do curso de Doutorado da UFPB, pelo incentivo e companheirismo, em particular a Silvo Marinho e Maria Aparecida, que compartilharam esse trajeto, sempre no incentivo mútuo, para que chegássemos até o fim.

Aos meus estudantes de pesquisa do Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABITEC), os de ontem, os de hoje e os de amanhã, pois são eles quem me impulsionam a buscar incessantemente melhorar como ser humano e como profissional, para poder contribuir nas suas formações pessoais e profissionais.

A todo o corpo docente do curso de Pós-Graduação em Química da UFPB e UFMA, que repartiram conosco os seus conhecimentos, colocando em nossas mãos as ferramentas com as quais abriremos novos horizontes, rumo à satisfação plena de nossos ideais profissionais e humanos.

A Universidade Estadual do Maranhão, Campus de Imperatriz, pela oportunidade de mostrar toda a minha capacidade profissional.

Aos amigos, pelo apoio constante e senso de amizade verdadeira.

A todas as pessoas que contribuíram diretamente e indiretamente para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	i
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	v
RESUMO.....	Vi
ABSTRACT.....	vii
CAPÍTULO 1	
1. INTRODUÇÃO.....	02
CAPÍTULO 2	
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	05
2.1. As plantas medicinais.....	05
2.2. A Família Rutaceae.....	06
2.3. <i>Ruta graveolens</i> Linneau (Arruda).....	07
2.4. Óleos essenciais e sua importância.....	11
2.5. Análise dos constituintes químicos dos óleos essenciais...	18
2.6. Aplicações biológicas dos óleos essenciais.....	20
CAPÍTULO 3	
3. OBJETIVOS.....	28
3.1. GERAL.....	28
3.2. ESPECÍFICOS.....	28
CAPÍTULO 4	
4. PARTE EXPERIMENTAL.....	30
4.1. Amostragem.....	30
4.2. Identificação Botânica.....	30
4.3. Extração do óleo essencial de <i>Ruta graveolens</i> L.....	32
4.4. Determinação do rendimento do óleo essencial.....	33
4.5. Determinação do tempo de extração.....	33
4.6 Características físicas do óleo essencial.....	33
4.6.1. Densidade.....	33
4.6.2. Solubilidade em Etanol (70%).....	33
4.6.3. Índice de Refração.....	34
4.6.4. Cor.....	34
4.6.5. Aparência.....	34
4.7. Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS).....	34
4.8. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>Ruta graveolens</i> L.....	36
4.8.1. Microrganismos testados.....	36
4.8.2. Estudo da atividade antibacteriana.....	38
4.8.2.1. Preparo das amostras e controles.....	38
4.8.2.2. Ajuste das suspensões bacterianas.....	39

4.8.2.3. Teste de difusão em Agar.....	39
4.8.2.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) empregando prova de sensibilidade por diluição em caldo.....	40
4.8.3. Avaliação da atividade antifúngica.....	41
4.8.3.1. Padronização dos inóculos.....	41
4.8.3.2. Estudo da atividade contra fungos.....	42
4.8.3.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM).....	43
4.9. Atividade anticolinesterásica.....	44
4.10. Estudo da atividade inseticida no controle de <i>Acanthoscelides obtectus</i> em grãos armazenados de feijão.....	45
4.11. Verificação da atividade larvicida em <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	47
CAPÍTULO 5	
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1. Estudo do tempo de extração do óleo essencial de <i>Ruta graveolens</i> L.....	52
5.2. Características físico-químicas do óleo essencial.....	54
5.3. Identificação dos componentes químicos por CG-MS.....	55
5.4. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de arruda.....	72
5.5. Estudo da atividade anticolinesterásica.....	79
5.6. Atividade bionseticida no controle de <i>Acanthoscelides obtectus</i> Cham.....	81
5.7. Atividade larvicida frente ao <i>Aedes aegypti</i> (Linnaeus, 1762).....	82
CAPÍTULO 6	
6. CONCLUSÃO.....	88
CAPÍTULO 7	
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	90
CAPÍTULO 8	
REFERÊNCIAS.....	92

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

µg	Microgramas
µL	Microlitros
µm	Micrometro
AMDIS	Automated Mass Spectral Deconvolution Mass & Identification System
ATCC	American Type Culture Colection
ATP	Trifosfato de adenosina
BHI	Caldo de infusão de cérebro e coração
CBM	Concentração Bactericida Mínima (CBM)
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CG	Cromatografia Gasosa
CIM	Concentração Mínima Inibitória
CL50	Concentração Letal 50%
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
DMAPP	Difosfato de dimetilalila
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
eV	Eletrovolts
FPP	Difosfato de farnesila
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa
GEDs	Grânulos Elétrons Densos
GGPP	Difosfato de geranil geranila
GPP	Difosfato de geranila
IE	Impacto de elétrons
IPP	Difosfato de isopentenila
IV	Infravermelho
m/m	Relação massa/massa
m/z	Razão massa/carga
MDRs	Bombas de Compostos Multidrogas
MEP	Via do metileritritol fosfato

mm	Milímetro
MS	Espectrometria de Massas
MVA	Via do mevalonato
ND 25°	Índice de refração
OMS	Organização Mundial de Saúde
P.I.C.	Porcentagem de Inibição de Crescimento
PAL	Enzima fenilalanina amonialiase
PCA	Agar padrão de contagem
RMN ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio e de Carbono
RMN ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RNA	Ácido Ribonucleico
SNC	Sistema Nervoso Central
UV	Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. <i>Ruta graveolens</i> Linnaeus (arruda).....	02
Figura 2. Estrutura química dos principais constituintes químicos presentes nas folhas de arruda: (a) quercetina, (b) rutina, (c) psoraleno e (d) alantoína.....	09
Figura 3. Formação dos compostos fenilpropanoídicos (FLORÃO, 2006).....	12
Figura 4. Biossíntese de compostos terpênicos: via clássica (MVA) e via alternativa (MEP) (OWEN e PEÑUELAS, 2005).....	14
Figura 5. Extrator de óleo essencial tipo Clevenger.....	17
Figura 6. Identificação da espécie vegetal em estudo.....	31
Figura 7. Sistema Clevenger modificado para extração de óleo essencial.....	32
Figura 8. Equipamento de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS modelo Shimadzu QP-5000).....	35
Figura 9. Armadilha utilizada para a coleta dos ovos do <i>Aedes aegypti</i> ..	47
Figura 10. Larvas do <i>Aedes aegypti</i> em terceiro estágio de crescimento.....	48
Figura 11. Evolução de extração do óleo essencial de <i>Ruta graveolens</i> L., em função do tempo, a temperatura de 100 °C.....	53
Figura 12. Cromatograma do óleo essencial de <i>Ruta graveolens</i> L.....	55
Figura 13. Compostos identificados na amostra do óleo essencial extraído das folhas de arruda: (a) 2-nonanona, (b) 2-decanona, (c) 2-undecanona, (d) 2-dodecanona, (e) acetato de octila, (f) acetato de pentadecanila e (f) ftalato de etila.....	57
Figura 14. (A) Espectro de massa do 2-nonanona, (B) proposta de identificação pela espectroteca e o programa AMDIS.....	58
Figura 15. Esquema de estabilização por ressonância do sistema n de elétrons da carbonila.....	59
Figura 16. Esquema dos fragmentos provenientes da quebra α do 2-nonanona.....	59

Figura 17. Esquema do rearranjo McLafferty para cetonas alifáticas.....	60
Figura 18. Esquema de estabilização por ressonância do íon acílico.....	60
Figura 19. (A) Espectro de massa do 2-decanona, (B) proposta de identificação pela espectroteca e o programa AMDIS.....	61
Figura 20. (A) Espectro de massa do acetato de octila, (B) proposta de identificação pela espectroteca e o programa AMDIS.....	62
Figura 21. (A) Espectro de massa do 2-undecanona, (B) proposta de identificação pela espectroteca e o programa AMDIS.....	63
Figura 22. (A) Espectro de massa do 2-dodecanona, (B) proposta de identificação pela espectroteca e o programa AMDIS.....	64
Figura 23. (A) Espectro de massa do acetato de pentadecanila, (B) proposta de identificação pela espectroteca e o programa AMDIS..	66
Figura 24. (A) Espectro de massa do ftalato de etila, (B) proposta de identificação pela espectroteca e o programa AMDIS.....	68
Figura 25. (A) Identificação dos constituintes químicos presente no óleo essencial de arruda por CG-MS e (B) mistura dos padrões de cinco componentes na concentração de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ por CG, usando o método do padrão externo.....	70
Figura 26. Susceptibilidade de bactérias patogênicas ao óleo essencial de arruda na concentração de $75,0 \mu\text{g/mL}$	73
Figura 27. Taxa de mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> expostas a seis concentrações diferentes do óleo essencial de arruda, após 24 horas de exposição.....	84
Figura 28. Estimativa da CL_{50} do óleo essencial de arruda pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL_{50} é o ponto de intersecção das duas curvas.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições cromatográficas do CG-MS utilizadas na análise do óleo essencial.....	35
Tabela 2. Microrganismos testados nos ensaios de atividade antimicrobiana.....	37
TABELA 3. Critérios para aceitação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais.....	40
Tabela 4. Propriedades físicas do óleo essencial de <i>Ruta graveolens</i> L.....	54
Tabela 5. Teor dos componentes identificados através do espectro de massas do óleo essencial de arruda.....	56
Tabela 6. Atividade antibacteriana do óleo essencial de arruda frente às bactérias patogênicas.....	73
Tabela 7. Atividade antifúngica do óleo essencial de arruda.....	76
Tabela 8. Atividade anticolinesterásica de óleo essencial de arruda...	79
Tabela 9. Efeito do óleo essencial de arruda em diferentes doses ($\mu\text{L}/20\text{g}$ de feijão) na mortalidade e emergência de adultos de <i>Acanthoscelides obtectus</i>	81
Tabela 10. Mortalidade das larvas do mosquito <i>Aedes aegypti</i> após 24 horas de exposição em diferentes concentrações de óleo essencial de arruda.....	83

Título: Estudo da composição química e atividade biológica do óleo essencial de *Ruta graveolens* Linneau (Rutaceae)

Autor: José Fábio França Orlanda

Orientadores: Profa. Dra. Adenilde Nascimento Ribeiro

Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza

RESUMO

A arruda (*Ruta graveolens* Linneau) é uma planta aromática pertencente à família Rutaceae e popularmente empregada no tratamento de diversas doenças sem a devida comprovação científica. O presente trabalho teve como objetivo a identificação dos componentes químicos presentes no óleo essencial das partes aéreas da arruda e sua possível aplicação em atividade antimicrobiana, anticolinesterase, inseticida em grãos armazenados e larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Os resultados mostraram que o óleo essencial de arruda extraído por hidrodestilação forneceu um rendimento de 1,29%, com a presença de sete componentes identificados por CG-MS. Os compostos 2-nonanona e 2-undecanona foram os componentes majoritários com 39,17 e 47,21%, respectivamente. Na utilização do método por difusão em disco verificou-se que todas as bactérias testadas foram sensíveis ao óleo essencial, com exceção da *Pseudomonas aeruginosa*. O óleo essencial demonstrou ser um eficiente agente antifúngico contra as leveduras do gênero *Cândida* e inativos para o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus Níger*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum*. A atividade anticolinesterásica apresentou baixa ação inibitória. No controle de *Acanthoscelides obtectus*, o óleo apresentou 100% de mortalidade em adultos na concentração de 25,0 µL/20g de feijão. A atividade larvicida frente às larvas do *Aedes aegypti* apresentou atividade larval letal de 50%, na concentração de 61,64 µg mL⁻¹ ao final de 24 horas de monitoramento. Os resultados comprovaram que esta planta apresenta potencial de aplicação em atividades biológicas promissoras.

Palavras-Chave: Óleo essencial. *Ruta graveolens* L. Atividade biológica

Title: Study of chemical composition and biologic activity of *Ruta graveolens* Linneau (Rutaceae)'s essential oil.

Author: José Fábio França Orlanda

Advisors: Profa. Dra. Adenilde Nascimento Ribeiro
Prof. Dr. Antônio Gouveia de Souza

ABSTRACT

The rue (*Ruta graveolens* Linneau) is an aromatic plant belonging to the family Rutaceae and popularly used in the treatment of various diseases without proper scientific evidence. This study aimed to identify the chemical components present in the essential oil of aerial parts of rue and its possible application in antimicrobial activity, anticholinesterase, and stored grain insecticide in the *Aedes aegypti* larvae. The results showed that the essential oil extracted by hydrodistillation of rue provided a yield of 1.29%, with the presence of seven components identified by GC-MS. The compounds 2-nonanone and 2-undecanone were the major components with 39.17 and 47.21% respectively. When using the disk diffusion method showed that all bacteria tested were sensitive to essential oils, with the exception of *Pseudomonas aeruginosa*. The essential oil was shown to be an effective antifungal agent against *Candida* yeasts and inactive for the growth of *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus niger*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* and *Trichophyton rubrum*. The anticholinesterase activity showed low inhibitory activity. In control of *Acanthoscelides obtectus*, the oil showed 100% mortality in adults in the concentration of 25,0 $\mu\text{L}/20\text{g}$ bean. The larvicidal activity against the larvae of *Aedes aegypti* larvae showed lethal activity of 50% at a concentration of 61,64 mg mL^{-1} after 24 hours of monitoring. The results showed that this plant has potential applications in biological activities promising.

Key-words: Essential oil. *Ruta graveolens* L. Biologic Activity

CAPÍTULO 1
INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

O uso de produtos naturais como matéria-prima para a síntese de compostos químicos com atividade biológica tem sido amplamente relatado ao longo dos anos. No Brasil, a biodiversidade é considerada uma fonte de substâncias biologicamente ativas, e sua preservação e estudo é fundamental, seja por sua enorme potencialidade na descoberta de novos fármacos com ação farmacológica, que há muito vem despertando interesse de pesquisadores da área farmacêutica (KORDALI et al., 2008).

A maioria dos fármacos em uso clínico ou são de origem natural ou foram desenvolvidos por síntese química planejada a partir de produtos naturais (BARREIRO e BOLZANI, 2009). Em toda a parte da planta podem ser encontrados princípios ativos importantes, sintetizados pelo metabolismo secundário das plantas que dão origem a uma série de substâncias conhecidas e com diversas aplicações biotecnológicas.

Uma das classes mais importante é a dos óleos essenciais, que são compostos voláteis liberados por algumas plantas que tem como função a sinalização química para a comunicação entre espécies, proteção contra microrganismos, herbívoros e condições ambientais (FREIRE, 2008; NUNES et al 2006).

Os óleos essenciais são uma rica fonte de metabólitos secundários voláteis, comumente associados a importantes atividades biológicas. Entre as plantas produtoras de óleo essencial, destaca-se a representatividade da Família Rutaceae, distribuída em 150 gêneros e conhecida por apresentar grande importância medicinal e econômica.

Dentre os representantes desta família, destaca-se a *Ruta graveolens* Linnaeus, conhecida vulgarmente por arruda, é uma erva aromática utilizada no tratamento fitoterápico da insônia, ansiedade, dores de cabeça, nervosismo, cólicas abdominais e problemas renais sem a devida comprovação científica da sua eficiência e segurança.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a bioatividade do óleo essencial das partes aéreas da arruda, visando identificar os principais constituintes químicos e atividades biológicas através de ensaios antimicrobianos, anticolinesterásico, larvicida e inseticida.

CAPÍTULO 2
REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. As Plantas Medicinais

As práticas terapêuticas utilizando as plantas medicinais sempre exerceram importante papel na busca de melhores condições de saúde pelo homem. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), as plantas medicinais são todas aquelas, silvestres ou cultivadas, que são utilizadas como recurso para prevenir, aliviar, curar e modificar um processo fisiológico normal ou patológico, e ainda como fonte de fármacos e de seus precursores (SANTOS et al., 2011; DUTRA et al., 2009; BRAGA, 2008).

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. O conhecimento das propriedades curativas destas plantas foi adquirido de forma totalmente empírica, e transmitido através do tempo, como a única forma de conhecimento disponível sobre as suas propriedades medicinais (SILVEIRA e OLEA, 2009; SALVAGNINI et al., 2008)

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das atividades terapêuticas dos vegetais, prescritos com freqüência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos (SANTOS et al., 2008).

As plantas são produtoras de substâncias químicas que podem ser úteis no tratamento de uma grande variedade de doenças em homens e animais (MCGAW e ELOFF, 2008). Os seus compostos ativos podem ser originados de dois tipos de metabólitos: primários e secundários. Os metabólitos primários são substâncias amplamente distribuídas na natureza, ocorrendo em praticamente todos os organismos e são originados as custas de energia. Nas plantas superiores estão concentrados em sementes e órgãos de armazenamento sendo

necessários para o desenvolvimento fisiológico, já que possuem papel importante no metabolismo celular básico.

Os metabólitos secundários são compostos derivados biologicamente dos metabólitos primários, apresentam estrutura complexa, baixo peso molecular e são encontrados em concentrações relativamente baixas em determinados grupos de plantas. Frequentemente têm um papel ecológico, como: atrativos para polinizadores representam adaptações químicas à pressão ambiental ou defensores químicos contra microrganismos, insetos e predadores superiores (RAVEN et al., 2007).

As atividades biológicas das plantas medicinais geralmente são atribuídas aos seus metabólitos secundários, que na maioria das vezes, possuem estrutura química complexa com muitos centros quirais, o que determina os mais variados tipos de compostos bioativos com ação farmacológica (AGRA et al., 2007).

Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal, encontram-se as plantas pertencentes à família Rutaceae, que apresentam espécies de importância terapêutica, ecológica e econômica (JANUÁRIO et al., 2009).

2.2. A Família Rutaceae

A família Rutaceae compreende cerca de 150 gêneros e mais de 1600 espécies de portes variados, amplamente distribuídos pelas regiões tropicais e temperadas do globo, sendo mais abundante na América Tropical, sul da África e Austrália (ALBARICI et al., 2010; FERRONATO, 2010). No Brasil são descritas 33 gêneros e aproximadamente 192 espécies (PIRANI et al., 2010).

No sistema de Engler, as Rutaceae fazem parte da ordem Rurales e incluem sete subfamílias, enquanto no rearranjo aqui utilizado e proposto por Kubitzki, os gêneros dessa família se distribuem em cinco subfamílias distintas, das quais a mais importante é a Rutoideae, onde se

encontram os gêneros *Ruta*, *Esenbeckia* e *Cusparia*, que incluem espécies medicinais (DI STASI et al., 2002).

Seus representantes mais comuns estão entre os gêneros *Citrus*, *Ruta*, *Zanthoxylum*, tais como *Citrus reticulata* (tangerina), *Citrus aurantium* (laranja), *Citrus lemon* (limão), *Ruta graveolens* (arruda), *Zanthoxylum rhoifolium* (mamica-de-cadela) (SOUZA e LORENZI, 2005).

Esta família é conhecida por apresentar uma grande diversidade de metabólitos secundários. Os membros são fortemente aromáticos devido à presença de óleos essenciais e possuem importância considerável como fonte de frutas cítricas e ornamentais (DE LA CRUZ, 2008; PERVEEN e QAISER, 2005).

Os óleos essenciais estão presentes em pontos translúcidos (glândulas) em diversas partes da planta, formados por minúsculos reservatórios de essências aromáticas, muitas vezes com odor característico para a espécie, o que tem atraído a atenção de vários grupos de pesquisadores devido à importância química e biológica de muitos destes metabólitos (COSTA et al., 2010).

2.3. *Ruta graveolens* Linnaeus (Arruda)

A arruda (*Ruta graveolens* Linneau), também conhecida como arruda-fedorenta, ruta-de-cheiro-forte, arruda-doméstica e arruda-dos-jardins é uma espécie perene originária da Europa meridional pertencente à família Rutaceae (LORENZI e MATOS, 2002), largamente utilizada como recurso medicinal pela população local em todo o Brasil (AL-QURAINY et al., 2011; SOUZA et al., 2007).

Ruta graveolens Linneau é um arbusto perenifólio de existência longa que se renova a cada ano, com vários talos de 60 cm, muito ramificados e finos. As folhas de 12 a 15 mm de comprimento são alternas com pecíolos compridos e muito divididos. Os folíolos são oblongos e os terminais trasovados. As folhas superiores são pinadas,

de contorno triangular, obtusocrenadas, subcoriáceas, de cor azul esverdeado. As flores são amarelas, em corimbos terminais, sobre pedúnculos subdivididos. Apresenta ovário súpero com muitos óvulos, fruto do tipo capsular com quatro a cinco lobos, arredondados. Os frutos têm a forma de cápsulas arredondadas e as sementes são pardas e rugosas (MEJRI et al., 2010).

Todas as partes da planta estão repletas de pontos transparentes e, as folhas, cobertas por pequenas glândulas que contém óleo com peculiar odor balsâmico, de forte cheiro fétido e ativo, devido ao óleo essencial que encerra de sabor amargo e muito espesso (Figura 1).



Figura 1. *Ruta graveolens* Linnaeus (arruda)

Fonte: VIEIRA (2008) e CORREA JR et al (2006)

Na medicina popular, a *Ruta graveolens* Linneau é tida como uma planta mágica, utilizada pelo homem desde muito tempo em rituais de proteção, principalmente em crianças contra o mal olhado, desordens menstruais, inflamações na pele, câimbras, dor de ouvido e dente.

Ensaio farmacológicos comprovaram seu efeito como antihelmíntica, febrífuga, emenagoga, abortiva, antiparasitária, espasmolítica, fotosensibilizante, cicatrizante, antiinflamatória, antireumática e antiulcerogênica, antihelmíntica e sudorífera (YAMASHITA et al., 2009).

De acordo MEJRI et al. (2010), a arruda também é indicada para a normalização do ciclo menstrual, repelente, vermífuga, tratamento da leishmaniose, vermes como o oxiúros, combate de piolhos e outros parasitas.

A composição química da arruda pode variar de acordo com a variedade genética e fatores ambientais. Segundo OLIVEIRA (2011), são encontrados princípios amargos, resinas, gomas, taninos, rutina, psoraleno, quercetina, alcalóides, ácidos orgânicos, alantoína, saponinas triterpênicas e mucilagem (Figura 2).

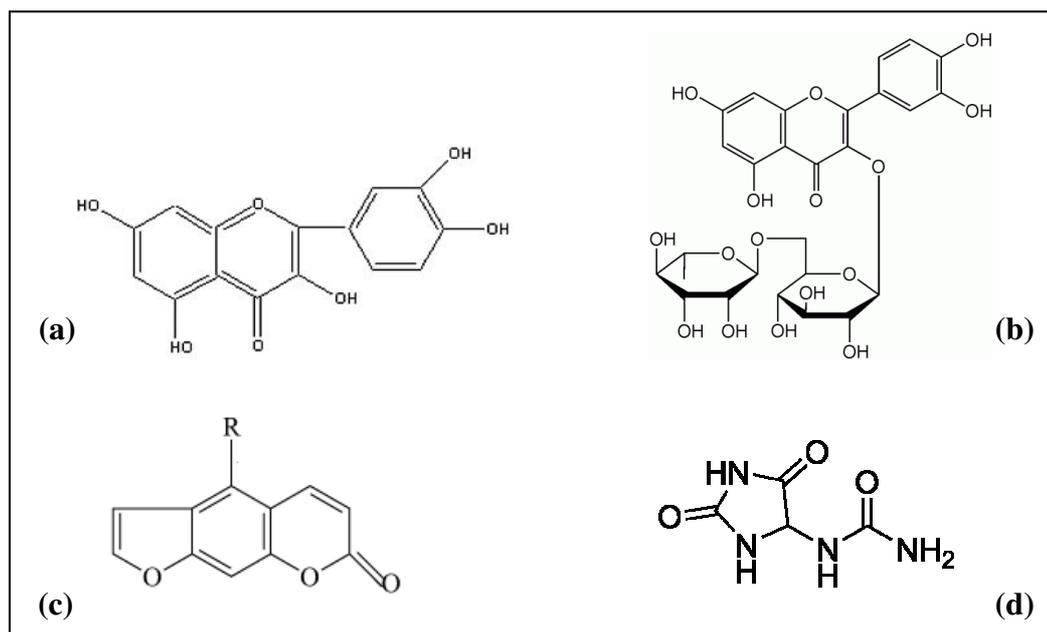


Figura 2. Estrutura química dos principais constituintes químicos presentes nas folhas de arruda: (a) quercetina, (b) rutina, (c) psoraleno e (d) alantoína.

A presença de rutina na composição química facilita a absorção da vitamina C pelo organismo, promove a inibição da aldose-reductase,

combate a fragilidade dos capilares, anticatarata, antidermatítico, antidiabético, antiedêmico, antieritêmico, antihematúrico, antihistamínico, antiinflamatório, antioxidante, antitrombogênico, antitumor, antiviral, prevenção do câncer, protetor capilar, hipotensor, larvistático, pesticida, espasmolítico e vasopressor. A rutina também apresenta atividade antibacteriana e alelopática (SANTOS et al., 2009).

À quercetina são atribuídas as propriedades analgésica, antiHIV, antialérgica, bactericida, antidiabética, carminativa, antigástrica, hepatoprotetora, antihistamínica, antiinflamatória, antioxidante, antiespasmódica, antitumoral, antiviral e larvistático. O psoraleno é empregado em casos de vitiligo e psoríase (DONG et al., 2003; KAMINSKI et al., 2003).

A alantoína é responsável pelo efeito cicatrizante e possui ação anti-irritante auxiliando o sistema de defesa da pele no processo de proliferação de novas células. Apresenta ação hidratante e queratolítica, sendo por esta razão usada no tratamento da psoríase, ictiose e hiperqueratoses (BATISTUZZO et al., 2000). A presença de mucilagem contribui para o efeito emoliente e restaurar a oleosidade perdida devido ao ressecamento da pele (CÂNDIDA, 2003).

O uso interno desta planta é desaconselhado, pois, em grande quantidade, a arruda pode causar hiperemia (abundância de sangue) dos órgãos respiratórios, vômitos, sonolência e convulsões. O efeito considerado anticoncepcional na verdade é abortivo, pois provém da inibição da implantação do óvulo no útero, sendo que a ingestão da infusão preparada com a arruda para esta finalidade é muito perigosa e pode provocar fortes hemorragias (MARTINS et al., 2005).

A arruda é, ainda, muito usada para aliviar dores de cabeça. Segundo os especialistas, isso pode ser explicado ao óleo essencial que contém undecanona, metilnonilcetona e metilheptilcetona, todas essas substâncias possuem propriedades calmantes, que ao serem aspiradas, aliviam as dores e diminuem a ansiedade (OLIVEIRA, 2011; MEJRI et al., 2010).

2.4. Óleos Essenciais e sua Importância

Os óleos essenciais são produtos obtidos tradicionalmente de parte de plantas através de destilação por arraste com vapor d'água, também conhecida por hidrodestilação. São misturas complexas de substâncias voláteis lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas. Também são chamados de óleos etéreos ou essências (GIORDANI et al., 2008). Essas denominações derivam de algumas de suas características físico-químicas, como, por exemplo, a de serem geralmente líquidos de aparência oleosa à temperatura ambiente.

Quimicamente são compostos de hidrocarbonetos terpênicos, alcoóis simples e terpenos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas e compostos contendo enxofre em diferentes concentrações (SIMÕES et al., 2007).

São armazenados em estruturas especializadas como células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae e Poaceae), bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae e Rutaceae), canais oleíferos (Apiaceae), células epidérmicas ou tricomas glandulares (Lamiaceae) não se distribuindo de maneira homogênea na planta. Podem estar concentrados em órgãos anatômicos específicos, como folhas (eucalipto), ramos (alecrim), raízes (vetiver), rizomas (gingibre), flores (rosa), frutos (anis-estrelado), sementes (noz-moscada), madeira (pau-rosa) e casca do caule (canela). O teor varia de acordo com a idade, época do ano, solo ou clima onde a planta vive e podem ser encontrados com maior facilidade nas partes verdes, devido às rotas metabólicas da fotossíntese (BAKKALI et al., 2008).

Dessa forma, estão amplamente distribuídos no reino vegetal, especialmente nas famílias Asteraceae, Lamiaceae, Lauraceae, Myrtaceae, Apiaceae e Rutaceae (FLORÃO, 2006). São raramente encontrados em gimnospermas, com exceção das coníferas, *Pinus densiflora* e *Pinus koraiensis* (HONG et al., 2004).

Nas angiospermas, ocorrem em menor freqüência em monocotiledôneas, podendo citar as famílias Poaceae e Zingiberaceae, como em *Cymbopogon winterianus*, popularmente conhecida como citronela (DUARTE et al., 2007), e *Zingiber officinale*, o gengibre (SCHNITZLER et al., 2007), respectivamente.

Os constituintes químicos dos óleos essenciais podem ser divididos em duas séries, conforme sua origem biossintética: a aromática, constituída pelos fenilpropanóides e a série terpênica. Os fenilpropanóides são constituídos por compostos com uma cadeia lateral de três átomos de carbono derivados de aminoácidos aromáticos, oriundos da via do ácido chiquímico. Nesta via, a partir do ácido chiquímico, é produzido o aminoácido fenilalanina que, por ação da enzima fenilalanina amonialiase (PAL) forma o ácido cinâmico e ácido *p*-cumárico (FLORÃO, 2006). A redução da cadeia lateral destes ácidos leva à formação de alilbenzenos e propenilbenzenos, esqueletos carbônicos dos fenilpropanóides (Figura 3).

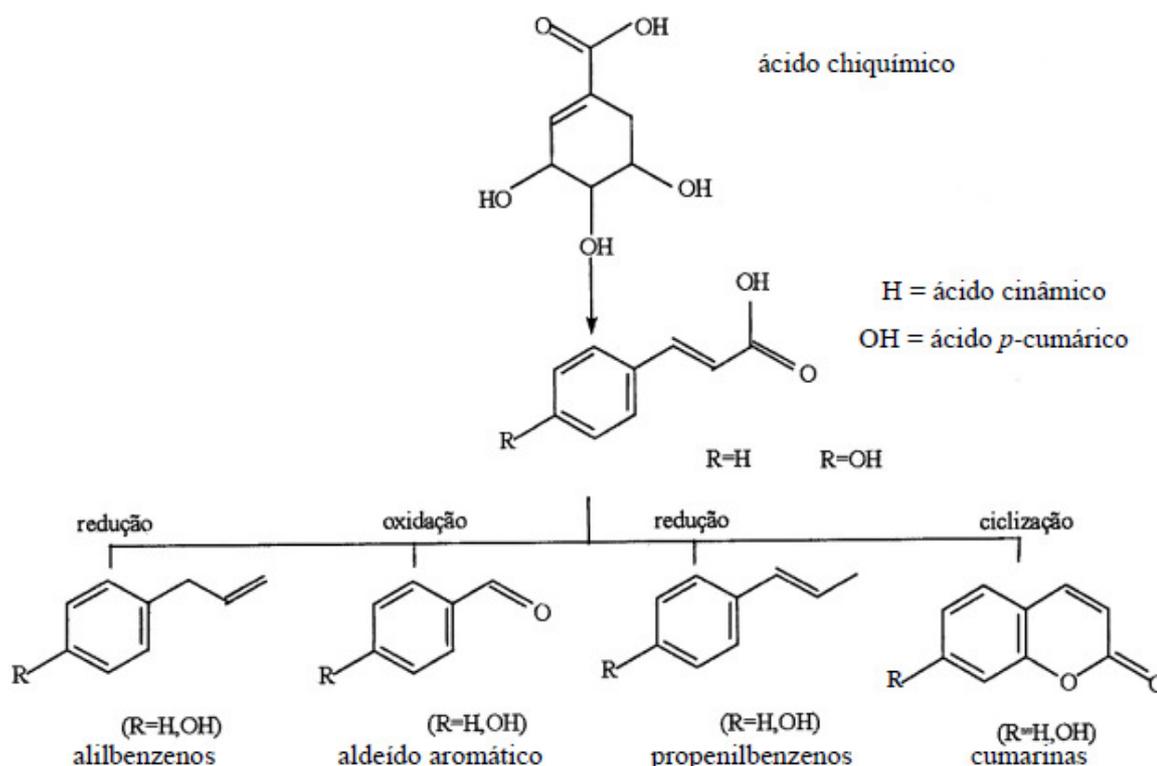


Figura 3. Formação dos compostos fenilpropanoídicos (FLORÃO, 2006).

Os compostos do grupo dos terpenóides são sintetizados pela condensação de unidades pentacarbonadas, o difosfato de isopentenila (IPP) e seu isômero difosfato de dimetilalila (DMAPP).

A formação do IPP pode ocorrer por duas rotas biossintéticas (Figura 4): a via clássica ou via do mevalonato (MVA), responsável pela formação dos sesquiterpenos e triterpenos, que ocorre preferencialmente no citosol e cujos precursores são piruvato e acetilcoenzima A; e a via alternativa ou via do metileritritol fosfato (MEP), que origina os monoterpenos, diterpenos e tetraterpenos, ocorre preferencialmente nos plastídeos e tem como precursores piruvato e gliceraldeído-3-fosfato (AHARONI et al., 2006).

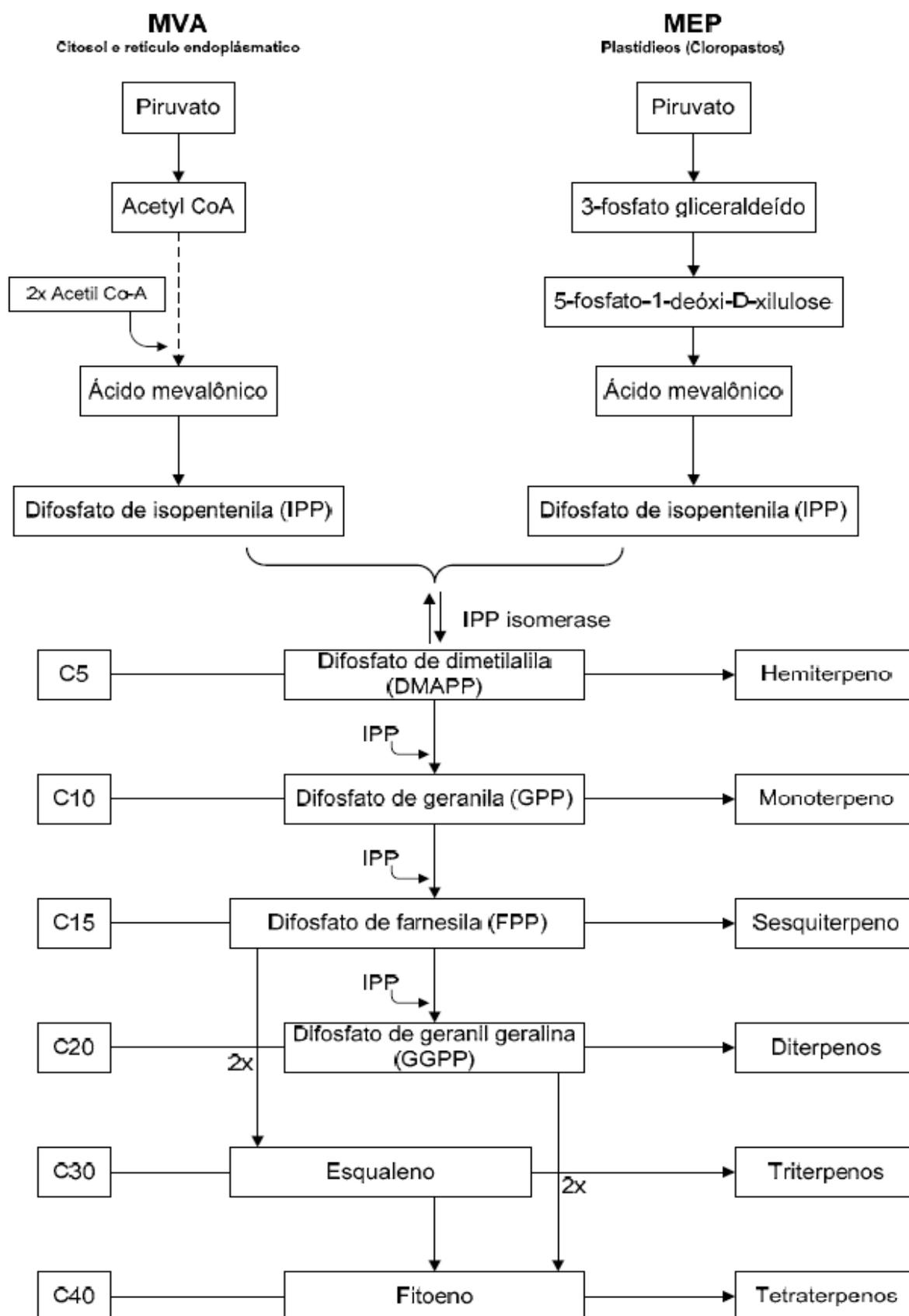


Figura 4. Biossintetismo de compostos terpênicos: via clássica (MVA) e via alternativa (MEP) (OWEN e PEÑUELAS, 2005).

Por muitos anos acreditou-se que todos os organismos sintetizavam IPP apenas pela via do MVA, entretanto, há pouco mais de uma década, pesquisas evidenciaram, em bactérias e células vegetais, a existência da via do MEP (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, 2006). Após a síntese do IPP, este é convertido em seu isômero difosfato de dimetilalila (DMAPP), através da enzima IPP isomerase, a partir daí dá-se início à formação dos terpenos.

A junção de uma molécula de IPP a uma molécula de DMAPP forma o difosfato de geranila (GPP), precursor dos monoterpenos (C_{10}). À medida que são adicionadas unidades de IPP, formam-se o difosfato de farnesila (FPP), precursor dos sesquiterpenos (C_{15}) e o difosfato de geranyl geranila (GGPP), precursor dos diterpenos (C_{20}). Estas estruturas são posteriormente modificadas por enzimas (hidroxilases, desidrogenases, redutases e glicosil, metil e acil transferases), que juntas geram uma série de compostos diferentes e dão origem aos óleos essenciais, terebentinas e resinas. Os triterpenos (C_{30}) são formados pela junção de duas unidades FPP e os tetraterpenos (C_{40}) pela junção de duas unidades GGPP (AHARONI et al., 2006).

Os óleos essenciais estão envolvidos em diversas funções ecológicas no ambiente em que as plantas produtoras estão instaladas, tais como:

a) Defesa contra herbivoria (OWEN e PEÑUELAS, 2005) – pode ser de várias naturezas: 1) Constitutiva, quando a planta produz naturalmente o metabólito secundário, como, por exemplo, a produção do monoterpeneo linalol por *Arabidopsis thaliana* (planta herbácea da família das Brassicaceae), que apresenta atividade repelente sobre o afídio *Myzus persicae* (pulgão-verde-do-pessegeiro) (GERSHENZON e DUDAREVA, 2007); 2) Induzida, quando a planta responde ao ataque por reconhecimento de um eliciador específico do seu herbívoro, o qual estimula uma cascata de sinais que promove a síntese de novo de compostos voláteis atuando como fitoalexinas;

3) Direta, quando a planta reage produzindo voláteis diretamente contra o seu herbívoro, atuando como inibidores ou retardadores de crescimento, causando danos na maturação, reduzindo a capacidade reprodutiva ou levando-os à morte por supressão do apetite ou toxicidade direta e
4) Indireta, em que a planta atrai os inimigos naturais do seu herbívoro, tais como predadores, parasitóides e patógenos, através da emissão de compostos voláteis;

b) Interações mutualísticas – os terpenos atuam como meios de comunicação entre espécies, pois são moléculas de baixo peso molecular, com alta pressão de vapor à temperatura ambiente e atuam em níveis muito específicos. Por exemplo, na relação planta-inseto, podem atuar como sinalizadores, como no caso do hidrocarboneto acíclico (E)- β -farneseno, um feromônio produzido pelos próprios afídios que sinaliza para que sofram metamorfose e deixem a planta hospedeira. Dessa forma, a própria planta ao emitir (E)- β -farneseno repele esses afídios (GERSHENZON e DUDAREVA, 2007);

c) Há indícios de que monoterpenos atuam como termo ou fotoprotetores (OWEN e PEÑUELAS, 2005);

d) Defesa contra microrganismos fitopatogênicos – as plantas aromáticas podem responder à invasão de fitopatógenos produzindo fitoalexinas de caráter lipofílico, que podem atuar em nível molecular tendo como alvo principal a membrana celular desses microrganismos (INOUE et al., 2004), promovendo a perda do controle quimiosmótico;

e) Atração de polinizadores e dispersores de sementes – por serem sésseis, as plantas produzem compostos voláteis que atraem agentes polinizadores e dispersores, fato evidenciado por estudos que comprovam que terpenos são reconhecidos pelo aparelho olfativo dos insetos como em *Manduca sexta* (mariposa da família Sphingidae), que apresenta células receptoras que respondem fortemente a certos monoterpenos e sesquiterpenos oxigenados como o geraniol, (E)-nerolidol e farnesol (GERSHENZON e DUDAREVA, 2007).

Os métodos de extração de óleos essenciais podem ser obtidos através de diferentes processos, dependendo da localização no vegetal, quantidade e das características requeridas para o produto final. Os processos usuais são: prensagem ou expressão; destilação por arraste a vapor; extração com solventes voláteis e CO₂ supercrítico (POURMORTAZAVI e HARJIMIRSADEGHI 2007).

Dentre as técnicas utilizadas, destacam-se a destilação por arraste a vapor e extração com solventes voláteis, por serem de extrema simplicidade, facilidade de execução, bom rendimento e baixo custo (BAKKALI et al., 2008).

A hidrodestilação é o método mais utilizado, dentro deste método o aparelho tipo Clevenger, é o principal aparelho usado em laboratórios, devido ao fácil manejo e baixo custo (Figura 5).



Figura 5. Extrator de óleo essencial tipo Clevenger.

Neste método o material vegetal é imerso em água sob aquecimento até a temperatura de 100 °C, resultando na formação de vapores que arrastam os compostos mais voláteis. A mistura de vapor e soluto passa por um condensador e, após a condensação, os compostos separam-se da fase aquosa por decantação (BIASI e DESCHAMPS, 2009; MEZZOMO, 2008; RAGGI, 2008).

A indústria utiliza, preferencialmente, a extração por vapor d' água por ser reduzido o contato da amostra com a água em relação aos métodos anteriores de arraste por vapor d' água. A extração por vapor de água é semelhante à hidrodestilação, ambas retiram óleos essenciais por arraste a vapor, a diferença entre elas é o modo de preparação do material: na primeira, o material não entra em contato com a água; na segunda o material é depositado na água e os óleos essenciais, por possuírem tensão de vapor mais elevada, são arrastados (KELEN e TEPE 2008; PINO et al. 2006).

2.5. Análise dos Constituintes Químicos dos Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas que podem conter de 20 a 60, ou mais, compostos diferentes nas mais variadas concentrações (BAKKALI et al., 2008). A análise de misturas complexas como os óleos essenciais, requer a aplicação de métodos analíticos modernos e instrumentação adequada que permitam avaliar a qualidade do óleo essencial e garantir a identificação de seus constituintes químicos.

A avaliação qualitativa e quantitativa envolve a utilização de diversas técnicas básicas, que passaram por algumas alterações nos últimos anos, devido essencialmente à modernização da informática (programa de computadores, níveis de automação, forma de integração dos dados obtidos) e da sofisticação dos experimentos que podem ser realizados, resultando na dedução de uma estrutura química coerente.

A análise química de separação e identificação dos constituintes dos óleos essenciais é feita por meio das técnicas de Cromatografia em

Camada Delgada (CCD), Cromatografia em Coluna (CC), Cromatografia Gasosa (CG), Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) e Técnicas Espectroscópicas, dentre as quais as mais freqüentes são: a Espectroscopia na região do ultravioleta (UV), do infravermelho (IV), de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN¹H) e de Carbono (RMN¹³C) e a Espectrometria de Massas (MS), além do uso de bibliotecas contendo informações espectroscópicas e espectrométricas de um grande número de substâncias já conhecidas (SILVERSTEIN, 2007).

A Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massa (GC-MS) por impacto de elétrons (IE) é uma das técnicas mais aplicadas na caracterização de compostos químicos voláteis, devido à simplicidade, precisão e rapidez (AVATO et al., 2005; VÁGI et al., 2005). Esta técnica permite a separação dos constituintes pela cromatografia gasosa, que são introduzidos individualmente em ordem de eluição na câmara de ionização do espectrômetro de massas. O espectro de massas obtido para cada um dos constituintes geralmente indica a massa molecular e o seu padrão de fragmentação. O padrão de fragmentação pode ser comparado eletronicamente com aqueles constantes da biblioteca de espectros de massas. Desse modo, é possível resolver picos cromatográficos parcialmente superpostos. Assim, a espectrometria de massas acoplada à cromatografia gasosa fornece as fragmentações dos componentes individuais separados (TAVARES et al., 2005).

A identificação de componentes de óleos voláteis tem feito o uso de CG e de CG-MS em associação com a determinação do índice de Kovats. Este procedimento vem sendo aplicado com sucesso na identificação de substâncias de estruturas conhecidas porque, em sua maioria, os dados gerados podem ser comparados diretamente com os valores de tempo de retenção (índice de retenção) obtidos em colunas de polaridades diferentes e com os espectros de massas dos constituintes voláteis publicados (ADAMS, 2007).

Além disso, pode-se apresentar o espectro na forma de um gráfico ou uma tabela. O gráfico tem a vantagem de mostrar seqüências

de fragmentação. No espectro de massas por impacto de elétrons, gerado por um computador na forma de um gráfico de barras, a abundância relativa dos picos apresentados como percentagem do pico base (100%), é lançada contra a razão massa/carga (m/z) (SILVERSTEIN, 2007).

Atualmente, a cromatografia gasosa com detector de massas sob condições de impacto de elétrons é o método mais aplicado em laboratórios de pesquisa, uma vez que os espectros obtidos são bem documentados em bibliotecas. A quantificação é possível com o uso de padrão interno, que compensa uma possível baixa recuperação durante o processo de extração e a variação na resposta instrumental.

2.6. Aplicações Biológicas dos Óleos Essencias

A utilização de plantas medicinais tornou-se um recurso terapêutico alternativo de grande aceitação pela população e vem crescendo junto à comunidade médica. São comercialmente importantes para as indústrias farmacêuticas, agronômicas, alimentícias, sanitárias, cosméticas, de perfumes e muitos constituintes podem ser empregados para diversas finalidades (BIZZO et al., 2009).

Os óleos essenciais vêm sendo empregados pelas propriedades antisépticas, preservação de alimentos, antimicrobiano, analgésico, sedativo, antiinflamatório, espasmolítico, alérgicas, reumáticos, artrite e como anestésicos locais. Esses tratamentos são reconhecidos através de experimentações clínicas, em especial por aplicação na pele, via massagens e unguentos, mas ainda existem poucos estudos científicos sobre suas ações biológicas (ARRUDA et al., 2006; NUNES et al 2006).

A literatura relata uma grande variedade de óleos essenciais ativos contra microrganismos patogênicos das mais diversas classes de plantas. Espécies do gênero *Origanum* (SOUZA et al., 2007), *Salvia* (ROTA et al., 2004), *Lavandula* (HANAMANTHAGOUDA et al., 2010), *Mentha* (BOUCHRA et al., 2003), *Eucalyptus* (SARTORELLI et al., 2007) *Citrus* (CHUTIA et al, 2009; Yi et al., 2008) e uma infinidade de outros

gêneros de plantas já apresentaram algum tipo de atividade antimicrobiana em seus óleos essenciais.

Estudos antimicrobianos são de grande relevância, pois, atualmente, um dos desafios para a área médica é a busca de agentes antimicrobianos mais eficazes. A busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de produtos naturais, tem aumentado o interesse das indústrias farmacêuticas, especialmente, em espécies de plantas que são utilizadas na medicina popular no tratamento de infecções sistêmicas em pacientes imuno comprometidos (LIMA et al., 2006a), como portadores de leucemia, linfoma, diabetes mellitus, síndrome da imunodeficiência adquirida (LIMA et al., 2006b), indivíduos que sofreram transplantes ou quimioterapia (LIMA et al., 2006a), resfriados, bronquites, doenças no trato respiratório, gastroenterites, diarréias, infecções urinárias, entre outras (SERRA, 2008).

Na busca por novas substâncias ativas, têm-se desenvolvido métodos de investigação *in vitro* que produzam resultados confiáveis e possam ser reproduzidos e validados. Mas essa tarefa tem sido dificultada pelas peculiaridades que os óleos apresentam: volatilidade, insolubilidade em água e complexidade, características que interferem significativamente nos resultados. Por isso, em testes de susceptibilidade microbiana deve-se levar em consideração a técnica usada, o meio de cultura, os microrganismos e o óleo essencial testado (NASCIMENTO e PINHEIRO, 2007).

Os métodos de seleção atualmente disponíveis para a detecção da atividade antimicrobiana de produtos naturais definem-se em três grupos: os métodos bioautográficos, difusão e de diluição (VALGAS et al., 2007).

Os óleos essenciais de lavanda (*Lavandula officinales*), melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), tomilho (*Thymus vulgaris*) e cravo (*Eugenia caryophyllata*) apresentam atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* (NOVACOS e LAUTH, 2006).

Segundo estudos realizados por EDRIS (2007), o óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* promoveu a inibição do crescimento de microrganismos multiresistentes a drogas como *Staphylococcus aureus*, *Enterococci*, *Klebsiellae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Stenotrophomonas maltophilia*, sua ação bactericida é atribuída ao terpinen-4-ol. A ação antibacteriana de monoterpenos como linalol, 1-8-cineol e limoneno também foram comprovadas, os dois últimos contra *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa* (SONBOLI et al., 2006) e o primeiro contra *Candida albicans*, *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (SONBOLI et al., 2005).

Em estudos realizados por WINWARD et al. (2008), observaram que os efeitos de toxicidade foram encontrados em óleos essenciais do gênero *Thymus* contra coliformes fecais no tratamento de desintoxicação de água.

Efeitos citotóxicos são observados *in vitro* contra bactérias patogênicas tanto Gram-positivas quanto Gram-negativas, no DNA e RNA viral (REICHLING et al., 2005), em fungos (KOSALEC et al., 2005), incluindo leveduras (PAULI, 2006).

Existem poucos estudos que evidenciem os mecanismos de ação dos óleos voláteis. De um modo geral, a complexidade da composição química da maioria dos óleos voláteis confere-lhes baixa especificidade (BAKKALI et al., 2008). A atividade biológica não é atribuída a um único mecanismo de ação, uma vez que a grande variedade de grupos químicos presentes permite que haja vários alvos na célula. O caráter lipofílico permite que os óleos voláteis atravessem a membrana plasmática e a mitocôndria dos microrganismos, desestabilizando essas estruturas e tornando-as mais permeáveis, perdendo íons e outros conteúdos celulares. Os compostos fenólicos presentes nos óleos voláteis também atuam desestabilizando a membrana plasmática, interrompendo a bomba de prótons, a transferência de elétrons, o transporte ativo e a coagulação do conteúdo celular.

Estudos comprovaram sua ação sob vários aspectos de forma a provocar citotoxicidade em bactérias, coagulação do citoplasma, além de danos em lipídios e proteínas (Di PASQUA et al., 2006). Nas bactérias a permeabilização das membranas está associada com a perda dos íons e a redução do potencial da membrana, gerando colapso da bomba de prótons e posteriormente a deficiência de energia. Os danos na membrana celular podem conduzir ao extravasamento de macromoléculas acarretando a morte celular (OUSSALAH et al., 2006).

Esse efeito parece estar relacionado com o estado de desenvolvimento celular. Em estado de divisão, as células são mais sensíveis provavelmente pelo fato dos óleos essenciais atingirem com maior facilidade os sítios-alvo e em geral a atividade citotóxica é maior na presença de fenóis, aldeídos e álcoois (SACCHETTI et al., 2005).

Nas células eucarióticas, os óleos essenciais podem provocar despolarização das membranas mitocondriais por decréscimo do potencial da membrana, afetando o ciclo iônico Ca^{++} e outros canais iônicos e redução do gradiente pH, afetando a bomba de próton e a fusão de ATP (trifosfato de adenosina). Essas propriedades citotóxicas são de grande importância na aplicação de óleos essenciais não somente contra certos patógenos humanos ou animais, mas também na preservação de produtos agrícolas, incluindo o controle de ácaros (RIM e JEE, 2006).

Além das atividades antimicrobianas, os óleos essenciais apresentam propriedades antivirais, antidepressivas, relaxantes, sedativas, digestivas, diuréticas, hormonais, inseticidas, repelentes, mucolíticas, expectorantes, desodorantes, antimalárica, anticarcinogênica, anticonvulsivante, antioxidante, gastroprotetora (STEFLITSCH e STEFLITSCH, 2008) e anticolinesterásica (ALBUQUERQUE et al., 2010).

Esta última propriedade é de grande interesse no controle da doença de Alzheimer, patologia neurodegenerativa progressiva, que afeta principalmente a população idosa, responsável por 50 a 60% dos casos de demência em pessoas acima de 65 anos (BARBOSA-FILHO et al., 2006).

O principal sintoma é a perda de memória, à medida que a doença progride aparecem características como déficit na linguagem, depressão, alterações de humor, agitação e psicose. Um dos tratamentos mais promissores para a doença é o aumento do nível do neurotransmissor acetilcolina por meio da inibição da enzima.

Vários estudos têm sido realizados com óleos voláteis de plantas e terpenos isolados, buscando novos tratamentos para o mal de Alzheimer, tendo como alvo principal a inibição da enzima acetilcolinesterase. O óleo essencial de folhas de *Centella asiatica* L. (centella-asiática), tradicionalmente indicada pela medicina Ayurvedica para restauração da juventude, memória e longevidade, é rico em monoterpenos como acetato de bornila, α -pineno, β -pineno e γ -terpineno, com comprovada atividade anticolinesterásica (HOWES e HOUGHTON, 2003).

O óleo essencial extraído de *Salvia lavandulaefolia* (Sálvia) inibiu a enzima em testes *in vitro* como *in vivo*. Alguns monoterpenos isolados como α - e β -pineno, fenchol e fenchona também mostraram-se eficientes na inibição da acetilcolinesterase (MIYAZAWA e YAMAFUJI, 2005).

O uso de extrato de plantas para repelir insetos pragas de grãos armazenados tem sido objeto de muita pesquisa. Fontes importantes de repelentes são os óleos essenciais extraídos de espécies de plantas aromáticas (ISMAN, 2006). Novas substâncias são necessárias para o efetivo controle de pragas, oferecendo maior segurança, seletividade, biodegradabilidade, viabilidade econômica, aplicabilidade em programas integrado de controle de insetos e baixo impacto ambiental.

Entre os extratos vegetais e óleos essenciais que possui destaque na proteção das culturas, destaca-se os que possuem monoterpenos, diterpenos, sesquiterpenos e outros compostos que mostram dissuasão ovicida, larvicida, repelente, antialimentar e efeitos tóxicos em uma grande variedade de insetos (MAO e HENDERSON, 2010).

Essas substâncias causam no inseto a não preferência dos produtos armazenados. Atualmente, repelentes sob a forma de óleos essenciais, em pó ou de destilados têm o potencial na exclusão de pragas de produtos armazenados em grão, e têm sido usadas para impedir a alimentação do inseto e oviposição (LIU et al., 2006).

Os óleos essenciais obtidos de *Mentha pulegium* (poejo) e *Mentha spicata* (hortelã-verde) são muito eficazes como inseticidas. Pequenas quantidades já são suficientes para causar a morte de inúmeros insetos. Os monoterpenos pulegona, mentona e carvona, os principais constituintes do óleo de menta, foram considerados tóxicos para larvas de *Drosophila melanogaster*. Os principais mecanismos de ação atribuídos a terpenos superiores envolvem redução da capacidade reprodutiva, inibição ou retardamento do crescimento, danos na maturação e supressão do apetite, levando os insetos à morte por toxicidade direta ou inanição (VIEGAS JÚNIOR, 2003).

Em alguns países da Ásia, as sementes, raízes e folhas de gengibre, *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae), (ABUBAKAR et al., 2007), Oeste Africano pimenta preta, *Piper thonn* (guineense e Schum) família: Piperaceae (OYEDEJI et al., 2005) e pimenta do jacaré, *Melegueta aframomum* (K. Schum) família: Zingiberaceae) são utilizados para repelir insetos (ABO et al., 2008; ABUBAKAR et al., 2007).

Estudos demonstram bioatividade de óleos essenciais de *Eucalyptus citriodora* e *Cymbopogon nardus* para insetos de grãos armazenados, inibição de fungos fitopatogênicos (VILELA et al., 2009) e atividade bioherbicidas (EL-ROKIEK e EID, 2009).

Diferentes estudos reletam que os óleos essenciais possuem efeito inseticida, fungiestático e herbicida em diversas pragas, incluindo as de grãos armazenados, com efeito na mortalidade, repelência, deterrência na alimentação e oviposição e redução no crescimento (AKOB e EWETE, 2007, KABEH e JALINGO, 2007).

Com isso, os óleos essenciais são considerados possíveis fontes naturais para o desenvolvimento de novos medicamentos (BARREIRO e BOLZANI, 2009). No entanto, grande parte da flora brasileira ainda não foi completamente estudada, sendo uma alternativa promissora para descoberta de novos compostos químicos de interesse farmacêutico.

CAPÍTULO 3 OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. GERAL

Caracterizar os constituintes químicos e avaliar a atividade antimicrobiana, anticolinesterásica, inseticida e larvicida do óleo essencial extraído das partes aéreas de *Ruta graveolens* Linnaeus (arruda).

3.2. ESPECÍFICOS

a) Extrair e quantificar o óleo essencial das partes aéreas de *Ruta graveolens* L. (arruda);

b) Determinar as propriedades físico-químicas do óleo essencial: densidade, índice de refração, solubilidade, cor e aparência;

c) Identificar os constituintes químicos por cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas;

d) Avaliar a atividade antibacteriana e antifúngica do óleo essencial frente aos microrganismos patogênicos;

e) Determinar a concentração mínima inibitória para os ensaios antimicrobianos;

f) Avaliar a atividade anticolinesterásica do óleo essencial de arruda;

g) Verificar a potencialidade do óleo essencial para aplicação em ensaios bioinseticidas no controle de *Acanthoscelides obtectus* em grãos armazenados;

h) Calcular a concentração letal CL_{50} do óleo a partir do teste de toxicidade (atividade contra larvas do mosquito *Aedes aegypti*).

CAPÍTULO 4

PARTE EXPERIMENTAL

4. PARTE EXPERIMENTAL

O presente trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Físico-Química e Microbiologia do Pavilhão Tecnológico da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABITEC) da Universidade Estadual do Maranhão (UEMA), Campus de Imperatriz.

A metodologia adotada envolveu análise cromatográfica dos constituintes químicos de plantas aromáticas, bem como os testes de atividade antimicrobiana, anticolinesterásica, inseticida e larvicida usando o óleo essencial de *Ruta graveolens* Linnaeus (arruda).

4.1. Amostragem

As partes aéreas (mistura de folhas e caules) da espécie vegetal em estudo foram coletadas pela manhã no período de março a agosto de 2007, no sítio localizado na Maioba, Município de Paço de Lumiar (MA). Após a coleta, as plantas foram transportadas até o Laboratório da Universidade Federal do Maranhão (LFQPT-UFMA).

As espécies vegetais foram submetidas às operações de seleção e lavagem, separação das partes da planta (caule e folha) e com descarte dos materiais atacados por praga ou doenças. Em seguida, as amostras foram trituradas e armazenadas em frascos de vidro âmbar para posterior extração dos óleos essenciais.

4.2. Identificação Botânica

A identificação botânica da espécie vegetal em estudo foi realizada empregando exsiccatas. Para preparo das exsiccatas, as folhas coletadas foram tratadas, prensadas e secas individualmente e acondicionados. A temperatura aplicada para secagem foi de,

aproximadamente, 38 °C, por um período de 72 horas. Em seguida, as exsicatas foram enviadas ao herbário da Universidade Estadual do Maranhão, Campus de Imperatriz que efetuou a caracterização botânica da espécie com base nas características físicas do material coletado.

De acordo com a caracterização botânica, a espécie vegetal em estudo, foi identificada pelo Prof. MSc. Marcelo Francisco da Silva, do Departamento de Ciências, como pertencente à família Rutaceae, cujo nome científico é *Ruta graveolens* Linnaeus, conforme características das folhas, flores e galhos da espécie. A exsicata encontra-se depositada no herbário sob o nº 107 (Figura 6).

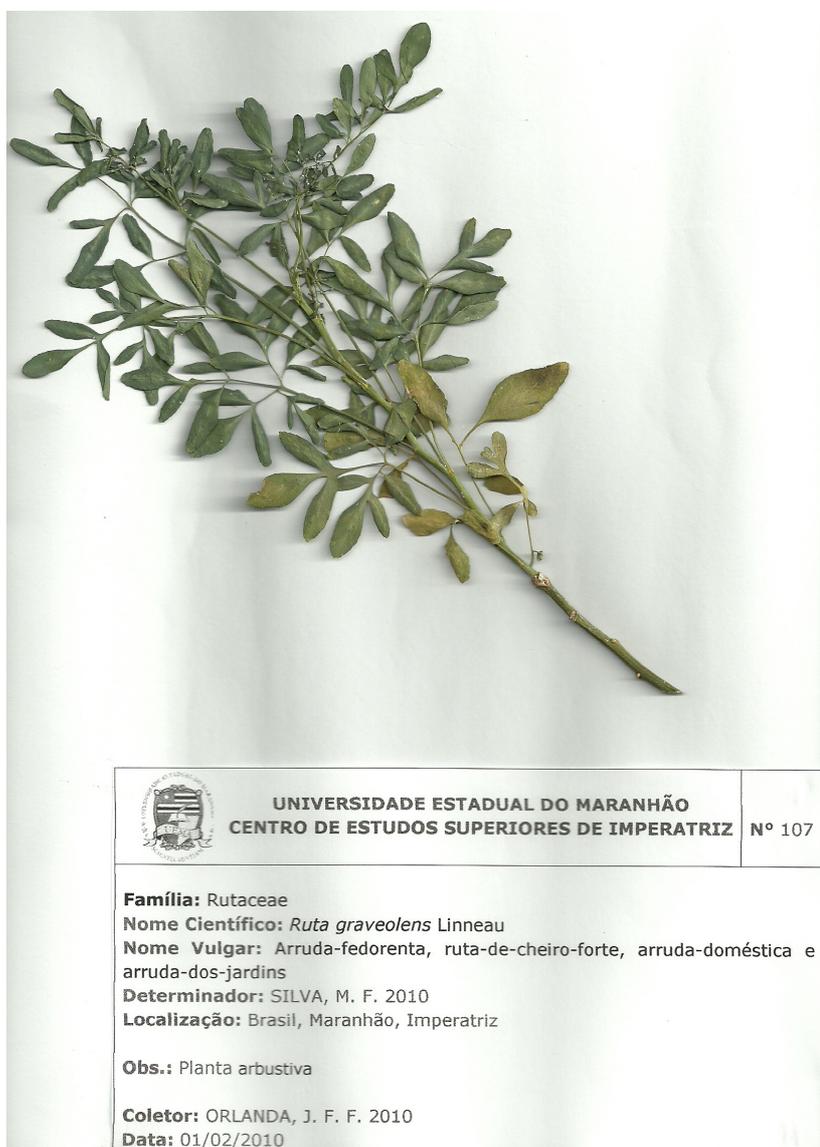


Figura 6. Identificação da espécie vegetal em estudo.

4.3. Extração do óleo essencial de *Ruta graveolens* L.

O óleo essencial foi extraído de 30 gramas de mistura de folhas e caules da espécie *Ruta graveolens* L. com 300 mL de água destilada, por hidrodestilação em um sistema de Clevenger (Figura 7), mantendo-se a temperatura de 100 °C. Posteriormente, o óleo foi seco por meio da percolação em Na₂SO₄ anidro. Essas operações foram realizadas em triplicatas e as amostras foram armazenadas em frascos de vidro âmbar sob refrigeração, para evitar possíveis perdas de constituintes voláteis. Em seguida, esses óleos foram submetidos às análises físicas e químicas.

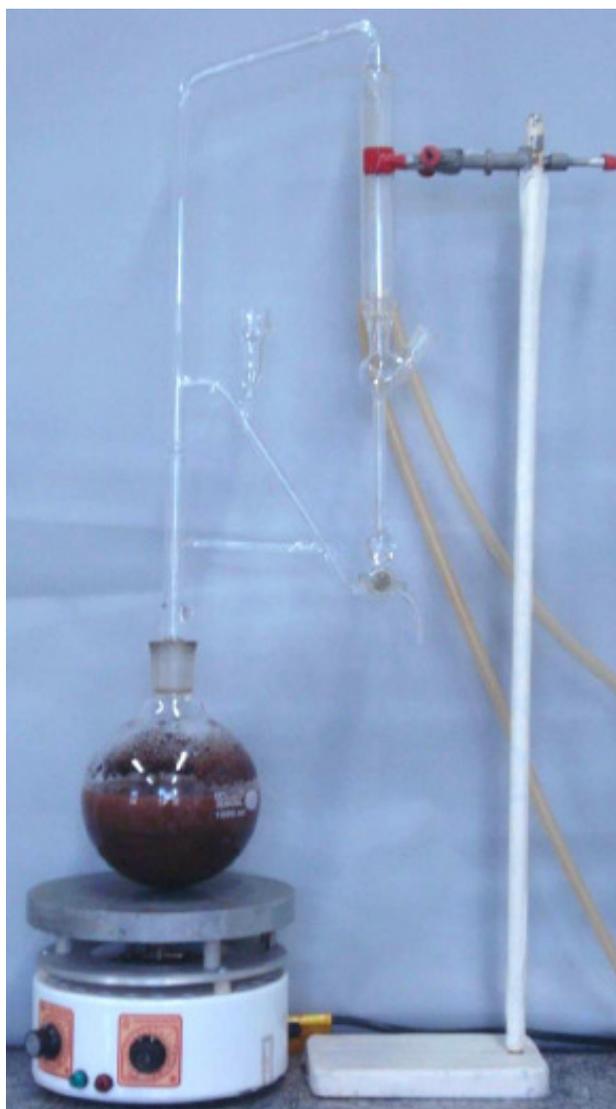


Figura 7. Sistema Clevenger modificado para extração de óleo essencial.

4.4. Determinação do rendimento do óleo essencial

A determinação do rendimento do óleo essencial em % (m/m) corresponde à relação massa/massa pela medida da densidade, observando o volume obtido no próprio sistema de extração.

4.5. Determinação do tempo de extração

O melhor tempo de extração foi determinado em função do rendimento do óleo essencial. Oito extrações foram realizadas nos tempos 0,5 a 8,0 horas. Exceto o tempo, todos os outros parâmetros foram mantidos como descritos anteriormente.

4.6. Características físicas do óleo essencial

Na caracterização das propriedades físicas do óleo essencial de *Ruta graveolens* L. foram realizadas as análises de densidade, índice de refração, solubilidade em etanol a 70%, cor e aparência.

4.6.1. Densidade

Para o cálculo da densidade, utilizou-se um balão picnômetro de 1,0 mL, previamente seco, tarado e aferido, onde se adicionaram as amostras do óleo essencial.

4.6.2. Solubilidade em Etanol (70%)

Para a determinação da solubilidade, utilizou-se uma mistura de etanol em água a 70% (volume/volume). A solubilidade foi feita mantendo-se constante o volume de óleo e adicionando-se proporcionalmente volumes crescentes da mistura alcoólica, até a sua completa solubilização.

4.6.3. Índice de Refração

Para a medida do índice de refração foram utilizados tubos capilares de vidro para adicionar as amostras de óleos diretamente sobre o prisma de Flint do refratômetro, a uma temperatura de 25 °C.

4.6.4. Cor

A técnica proposta é a visual, feita por comparação das cores do óleo essencial com escala de cores conhecidas.

4.6.5. Aparência

A técnica proposta também é a visual, onde se faz uma comparação das essências no que diz respeito a sua transparência ou limpidez.

4.7. Análise por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS)

A identificação da composição química do óleo essencial extraído das folhas e caules de arruda foi feita através da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas. As análises foram realizadas em equipamento CG-MS modelo QP-5000, fabricado pela Shimadzu (Figura 8). As condições de operação do equipamento estão apresentadas na Tabela 1.



Figura 8. Equipamento de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-MS modelo Shimadzu QP-5000).

Tabela 1. Condições cromatográficas do CG/MS utilizadas na análise do óleo essencial.

Equipamento	CG-MS - Shimadzu QP5000
Coluna Cromatográfica	HP-5MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm) Fase estacionária: 5% difenil e 95% dimetil polisiloxano
Impacto Eletrônico	70 eV
Modo de injeção	Split 1:10
Gás de arraste; Vazão	Hélio; Fluxo de 1,0 mL/min
Programação de temperatura	40 °C (5,0 min.) – 240 °C (4 °C/min.) – 240 °C – 300 °C (8 °C/min., 7,5 min.) e linha de transferência 280 °C.
Temperatura do injetor	280 °C
Temperatura da coluna	280 °C
Volume injetado	0,3 µL
Detector de massas	Tipo quadrupolo linear
Varredura	0,5 segundos/scan.

Para a identificação dos compostos detectados na amostra utilizou-se as bases de dados de espectros de massas NIST105, NIST21 EWILEY139. O programa AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution Mass & Identification System) foi utilizado para a interpretação dos espectros de massas quando havia diferenças significativas entre o espectro de massas obtido e o encontrado no banco de dados. O espectro de cada constituinte da amostra foi comparado com cada um dos espectros armazenados no banco de dados do computador.

Após esta comparação, o programa faz uma lista tríplice de compostos com sua respectiva probabilidade de ser ou não um determinado composto. O banco de dados é limitado e, em alguns casos, indica quais seriam os prováveis constituintes, por aproximação.

4.8. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Ruta graveolens* L.

4.8.1. Microrganismos testados

Os microrganismos testados foram cepas padrão ATCC (American Type Culture Collection) recomendadas para testes de suscetibilidade aos antimicrobianos (CLSI, 2009), como mostra a Tabela 2.

Tabela 2. Microrganismos testados nos ensaios de atividade antimicrobiana.

Microrganismos	Características
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 25923)	Bactéria Gram-positiva, agente responsável por várias infecções.
<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	Bactéria Gram-negativa, agente de infecções gastrintestinal e infecções urinárias.
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	Bactéria Gram-negativa, agente de infecções nosocomiais e resistente a uma grande variedade de antimicrobianos.
<i>Salmonella thyphi</i> (ATCC 19430)	Bactéria Gram-negativa, causador da febre tifóide.
<i>Cândida albicans</i> (ATCC 10231)	Fungo leveduriforme, agente de infecções fúngicas oportunistas no trato vaginal e oral.
<i>Cândida tropicalis</i> (ATCC 7349)	Fungo leveduriforme, causador da candidíase.
<i>Cryptococcus neoformans</i> (ATCC 32264)	Fungo leveduriforme, causador de meningoencefalite.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (ATCC 9763)	Fungo leveduriforme, utilizado na produção do pão e cerveja.
<i>Aspergillus flavus</i> (ATCC 9170)	
<i>Aspergillus fumigatus</i> (ATCC 26934)	Fungos leveduriformes, que produzem aflatoxinas (grupo de micotoxinas tóxicas).
<i>Aspergillus níger</i> (ATCC 9092)	
<i>Microsporum gypseum</i> (C115)	
<i>Trichophyton mentagrophytes</i> (ATCC 9972)	Dermatófitos, que provocam micoses superficiais.
<i>Trichophyton rubrum</i> (C137)	

As cepas microbianas foram reconstituídas de acordo com a indicação do fornecedor e as culturas foram padronizadas em 10^8 células/mL, estimadas por comparação ao tubo 0,5 da escala de MacFarland.

4.8.2. Estudo da atividade antibacteriana

O método utilizado para avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Ruta graveolens* L foi baseado na norma M07-A8 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009).

O princípio deste método baseia-se na inoculação em superfície de um ágar de solução padronizada de microrganismo específico. Sobre a fase sólida são colocados discos de papéis impregnados previamente com soluções das amostras que se deseja investigar a atividade antibacteriana. As substâncias impregnadas nos discos de papel difundem-se no meio de cultura e, se a amostra em questão apresentar atividade inibitória sobre o microrganismo testado forma-se um halo de não crescimento ao redor do disco impregnado. Após o período de incubação, respeitadas as condições específicas para o microrganismo, as zonas de inibição são medidas em milímetros (mm) ao redor de cada disco.

4.8.2.1. Preparo das amostras e controles

O óleo essencial foi testado puro e em diferentes concentrações. O emulsificador Tween 80 na concentração 0,5% foi adicionado à solução de óleo essencial com o objetivo de facilitar sua dispersão no meio de cultura (LAHLOU, 2004; BRUNI *et al.*, 2004). O emulsificador Twenn 80 em água destilada estéril na concentração de 0,5% foi utilizado como controle negativo.

Os antibióticos comerciais tetraciclina-TET (30 µg), cloranfenicol-CLO (30 µg), penicilina-PEN (10 µg), cefalotina-CEF (30 µg),

vancomicina-VAN (30 µg) e gentamicina-GEN (30 µg) e clorafenicol foram utilizados como controle positivo.

4.8.2.2. Ajuste das suspensões bacterianas

As cepas bacterianas foram repicadas do estoque para tubos contendo caldo de infusão de cérebro coração (BHI) e incubadas a 37 °C durante 24 h. A partir deste inóculo, as culturas microbianas foram ajustadas em solução salina 0,9% por comparação com a escala 0,5 de MacFarland que corresponde a aproximadamente $1,5 \times 10^8$ células/mL.

4.8.2.3. Teste de difusão em ágar

A difusão em disco foi realizada impregnando 10 µL do óleo essencial de *Ruta graveolens* L, os controles positivos e negativos em discos de papel (6 mm de diâmetro). Aplicando 100 µL de cada suspensão bacteriana previamente ajustada e semeada com o auxílio de alça de Drigalsky sobre a superfície da placa contendo o meio de cultura Mueller-Hinton. O volume do controle negativo foi correspondente ao empregado nas amostras e o antibiótico (controle positivo).

Antes da incubação a 35 ± 1 °C por 24 h as placas permaneceram em repouso por cerca de 30 minutos em temperatura ambiente para permitir a difusão das amostras. Após a incubação, verificou-se o diâmetro do halo de inibição em milímetros considerando o diâmetro dos discos. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados estão apresentados como a média \pm desvio-padrão (DP).

No teste da atividade antimicrobiana foi considerado como resultado final de cada extrato a média das 3 medidas e como suscetível halo igual ou acima de 9 mm de diâmetro de acordo com os critérios de PAREKH e CHANDA (2007), SANTOS *et al.* (2007), HOLETZ *et al.* (2002) e ALVES *et al.* (2000), como mostra a Tabela 3.

TABELA 3. Critérios para aceitação da atividade antimicrobiana de óleos essenciais.

Tamanho do Halo de Inibição (milímetros)	Resultados
Inibição menor que 9 mm	0 (inativo)
Inibição entre 9 a 12 mm	1 (parcialmente ativo)
Inibição entre 13 e 18 mm	2 (ativo)
Inibição acima de 18 mm	3 (muito ativo)

Os resultados foram comparados estatisticamente empregando-se análise de variância (ANOVA) e as diferenças significativas entre as médias foram determinadas pelo teste t de Student considerando um nível de significância de 95%.

4.8.2.4. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) empregando prova de sensibilidade por diluição em caldo

As concentrações de óleos essenciais testados que apresentaram atividade antimicrobiana na avaliação preliminar (halo de inibição igual ou acima de 9 mm) foram submetidos a determinação da concentração mínima inibitória (CIM) pela técnica de disco de difusão em ágar e pela técnica de diluição em caldo (CLSI 2009; SANTOS *et al.*, 2007; LIMA *et al.*, 2006c; BERTINI *et al.*, 2005).

O teste de diluição em caldo é o método padrão para a determinação de níveis de resistência a antimicrobianos. Diluições seriadas de produtos antimicrobianos são feitas em meios líquidos nos quais são inoculadas quantidades padronizadas de microrganismos e incubadas por um tempo determinado. A menor concentração do antimicrobiano que impede a turvação é considerada a concentração inibitória mínima - CIM.

Adicionalmente, a concentração bactericida mínima (CBM) pode ser determinada por uma subcultura do conteúdo dos tubos em um meio

sólido e posteriormente examinando o crescimento microbiano. Embora o teste de diluição em tubo seja satisfatoriamente preciso, o teste é trabalhoso porque diluições seriadas de antibiótico devem ser feitas e, somente um isolado pode ser testado em cada uma destas diluições.

O ensaio de diluição em caldo foi realizado em tubo estéril contendo uma solução, a partir da diluição de 0,8 mL do óleo essencial e 0,08 mL do Tween 80 (agente emulsificante) em um volume de 9,12 mL de caldo BHI, obtendo-se uma solução a 8% em óleo. Em seguida, a partir dessa solução, foi preparada uma série de diluições, variando de 0, 125; 0,25; 0,5; 1; 2 a 4 % do óleo, além da solução controle contendo somente o agente emulsificante e o caldo BHI.

Posteriormente, foi adicionado o inóculo bacteriano previamente preparado conforme descrito no item 4.8.2.2. em tubos de caldo BHI acrescidos de diferentes concentrações do óleo, com posterior incubação a 37 °C por 24 horas. Após o período de incubação, foi realizado o plaqueamento em Agar padrão de contagem (PCA).

4.8.3. Avaliação da atividade antifúngica

Os testes de atividade antifúngica foram conduzidos utilizando o método do disco difusão proposto pela CLSI (2009).

4.8.3.1. Padronização dos inóculos

Os fungos testes foram cultivados em placas de Petri contendo ágar Sabouraud a 25 ± 1 °C (estufa BOD, TECNAL, TE-391) por 72 horas. Para todos os fungos, a exceção do *Aspergillus niger*, a cultura foi lavada com cerca de 3 mL de solução salina estéril (0,9% m/v) adicionada de Tween 80 (0,1% v/v) e pérolas de vidro.

Após a adição de salina estéril foi feita uma leve raspagem com alça de níquel-cromo, de forma a remover apenas os esporos dos fungos evitando assim, a transferência de fragmentos de ágar e de hifas.

A suspensão fúngica (3 mL) foi coletada com ponteiros estéreis acopladas a micropipeta automática (1000 µL) e transferida para os tubos contendo 7 mL de solução salina. Estes tubos foram agitados em aparelho tipo vórtex (Phoenix AP56) por 1 minuto.

A turbidez das suspensões padrão dos fungos foram padronizadas em espectrofotômetro (FEMTO 800XI) em comprimento de onda de 580 nm utilizando como branco salina estéril 0,9% com Tween 80 (0,1%) e pérolas de vidro (CLSI, 2009).

A partir das suspensões padrão foram feitas diluições de 10^{-3} para todos os fungos e dessas retiradas 1000 µL com micropipeta automática que foram semeadas pelo método de pour-plate (SHADOMY e ESPINEL-INGROFF, 2000).

4.8.3.2. Estudo da atividade contra fungos

Os testes de sensibilidade foram realizados de acordo com a norma M07-A8 do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2009).

Para a determinação da atividade antifúngica do óleo essencial de *Ruta graveolens* L. foi utilizado meio Sabouraud dextrose (Difco Laboratories Ltda – Detroit/USA). O mesmo foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. O meio de cultura foi esterilizado em autoclave por 20 minutos a uma temperatura de 121 °C e uma atmosfera de pressão. O meio foi retirado da autoclave e resfriado até atingir 50 °C, momento no qual foram adicionados e misturados perfeitamente o óleo essencial de arruda. Para cada concentração de óleo essencial de arruda foram preparados 100 mL de meio de cultura Sabouraud. As concentrações avaliadas foram de 0,5 a 10% (v/v). Foram empregadas placas de Petri (10 x 90 mm) nas quais foram depositados 15 mL de meio de cultivo, o mesmo permaneceu na câmara de fluxo laminar até total solidificação.

Uma vez solidificado, o meio foi inoculado com discos de micélio (1,5 mm) retirados das culturas. As placas de Petri contendo meio Sabouraud sem adição do óleo essencial foram utilizadas como testemunhas (controle do desenvolvimento do fungo). Para todos os tratamentos foram empregadas quatro repetições. As placas foram incubadas em B.O.D. a temperatura de $36 \pm 0,5$ °C, sem luminosidade, até a verificação do desenvolvimento das colônias na placa controle sem adição do óleo essencial.

O desenvolvimento do fungo foi analisado diariamente durante 10 dias, através de duas medições perpendiculares do diâmetro das colônias, obtendo-se assim, o diâmetro médio para cada placa de Petri. Esses dados foram convertidos em velocidade média de crescimento micelial. Determinou-se a porcentagem de inibição de crescimento (P.I.C.) dos tratamentos em relação à testemunha, utilizando-se a Equação:

$$\text{P.I.C.} = \frac{(\text{Diâmetro da testemunha} - \text{Diâmetro do tratamento}) \times 100}{\text{Diâmetro da testemunha}}$$

Os dados obtidos foram tabulados para análise de resultados pelo teste F na análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey com 5% de probabilidade, utilizando o "software" SAS- Statistical Analyses System.

4.8.3.3. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)

A concentração mínima inibitória (CIM) do óleo essencial foi determinada usando técnicas de microdiluição, de acordo com as normas do CLSI (2009).

O ensaio de diluição em caldo foi realizado em tubo estéril contendo uma solução, a partir da diluição de 0,8 mL do óleo essencial e 0,08 mL do Tween 80 (agente emulsificante) em um volume de 9,12 mL de caldo BHI, obtendo-se uma solução a 8% em óleo. Em seguida, a partir

dessa solução, foi preparada uma série de diluições, variando de 0, 125; 0,25; 0,5; 1; 2 a 4 % do óleo, além da solução controle contendo somente o agente emulsificante e o caldo BHI.

Posteriormente, foi adicionado o inóculo fúngico previamente preparado conforme descrito no item 4.8.3.1 em tubos de caldo BHI acrescidos de diferentes concentrações do óleo, com posterior incubação a 35 °C para leveduras e fungos filamentosos e a 28 - 30 °C para dermatófitos durante 48 h para leveduras, e para os demais fungos, de acordo com o crescimento do fungo controle. Após o período de incubação, foi realizado o plaqueamento em contagem meio Sabouraud dextrose (Difco Laboratories Ltda – Detroit/USA).

A CIM foi definida como a mais baixa concentração do material testado que inibe totalmente o crescimento visual dos fungos comparado ao grupo controle, analisado em triplicata.

A concentração inibitória mínima é considerada a menor em que se observou a inibição do crescimento fúngico. O óleo essencial que apresentara um CIM menor que 75 µg/mL a atividade antifúngica é considerada forte, entre 75 a 150 µg/mL possuem atividade antifúngica moderada, entre 150 a 250 µg/mL, fraca e maior que 250 µg/mL inativo (CLSI, 2009).

4.9. Atividade anticolinesterásica

Os ensaios de atividade anticolinesterásica foram realizados empregando 5 µL de óleo essencial de arruda e diluídas em metanol para se obter 200 µg em 5 µL. Para a realização do ensaio foram preparadas previamente as seguintes soluções: Solução A Tris/HCl 50 mM, pH=8; Solução B: Tris/HCl 50mM, pH=8, com 0,1% de albumina bovina fração V; e Solução C: Tris/HCl 50mM, pH=8, com 0,1 M de NaCl e 0,02 M de MgCl₂ .6H₂O. Para cada cavidade da placa foram adicionados 25µL de iodeto de acetilticolina 15 mM, 125 µL de 5,5'-ditiobis-(2-nitrobenzóico) 3 mM na solução (C), 50 µL da solução (B) e 25µL da amostra do óleo

diluída 10 vezes na solução (A). Após esse preparo, foi medida a absorvância a 405 nm em Espectrofotômetro Femto 800 XI a cada 30 segundos por três vezes. Em seguida, foram adicionados 25 µL da enzima acetilcolinesterase ($0,22 \text{ U mL}^{-1}$) e a absorvância medida novamente a cada 10 minutos por 2 vezes (RHEE *et al.*, 2001).

A porcentagem de inibição da acetilcolinesterase foi calculada através da comparação das velocidades de reação (hidrólise do substrato) das amostras em relação ao branco (10% de MeOH na solução A, atividade total AChE = 100%).

4.10. Estudo da atividade inseticida no controle de *Acanthoscelides obtectus* em grãos armazenados de feijão

Os grãos de feijão limpos e secos, utilizados para a criação e bioensaios com *Acanthoscelides obtectus*, foram acondicionados em sacos plásticos e mantidos em freezer sob temperatura de $-10 \text{ }^{\circ}\text{C}$, durante sete dias, para eliminação de eventuais infestações de insetos provenientes do campo. Após este período no freezer, os grãos foram transferidos para frascos de vidro e mantidos no laboratório à temperatura ambiente durante dez dias com a finalidade de atingirem o equilíbrio higroscópico e equilíbrio da umidade dos grãos.

A criação dos insetos de grãos armazenados foi iniciada a partir da coleta dos grãos infestados e mantidos em laboratório, utilizando-se frascos de vidros de 1 litro, com tampa com vários furos por onde entrar o ar para garantir a sobrevivência dos insetos. A criação tem como objetivo obter insetos em quantidade e idade adequada para utilização nos testes.

As espécies do gênero *Acanthoscelides obtectus* foram identificadas com base, principalmente, no exame da terminália feminina, mediante a observação das dimensões, morfologia do acúleo, padrão cromático do corpo e das asas, para os quais se empregaram trabalhos taxonômicos e chaves de identificação (ZUCCHI, 2000).

Após a identificação, os insetos foram criados em grãos de feijão à temperatura de $24,7 \pm 0,7$ °C, umidade relativa de $77,4 \pm 5,5\%$ e fotofase de 12 horas, acondicionados em recipientes de vidro, fechados com tampa plástica perfurada e revestida internamente com tecido fino para permitir as trocas gasosas.

Os insetos foram confinados durante 15 dias para efetuarem a postura e os recipientes estocados até a emergência, de modo a assegurar a quantidade de adultos necessários para a execução dos experimentos.

A atividade inseticida do óleo essencial de arruda foi verificada empregando diferentes concentrações em 20 gramas de feijão à temperatura de $24,8 \pm 0,8$ °C, umidade relativa de $79,2 \pm 4,4\%$ e fotofase de 12 horas. Os grãos foram colocados no interior de recipientes de plástico e impregnados com óleo essencial de arruda em diferentes concentrações, com auxílio de pipetador automático e os recipientes agitados manualmente durante dois minutos.

Cada parcela de 20 g de grãos foi acondicionada em recipiente de plástico, com tampa perfurada, permitindo trocas gasosas com o exterior e infestada com oito adultos de *Acanthoscelides obtectus* com 0 a 15 dias de idade. Decorridos cinco dias do confinamento, efetuou-se a contagem dos insetos vivos e mortos, descartando-os em seguida.

Os adultos emergidos foram quantificados e descartados em avaliações diárias, a partir do trigésimo quinto dia do confinamento até o término da emergência (cinco dias consecutivos sem emergência). O experimento foi conduzido no delineamento inteiramente casualizado, constando de oito tratamentos e cinco repetições.

Os resultados de mortalidade foram analisados estatisticamente sem transformação, submetidos à análise de variância, e as médias comparadas pelo teste de Tukey ($P = 0,05$).

4.11. Verificação da atividade larvicida em *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

Os ensaios larvicidas em laboratório foram montados com *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762) e realizados no Laboratório de Biotecnologia Ambiental (LABITEC). Como os ovos do *Aedes aegypti* não são postos diretamente na água, mas sim milímetros acima de sua superfície, principalmente em recipientes artificiais, foi preparada uma armadilha simples para coleta desses ovos. Para tanto, foram utilizados jarros de plástico para planta, de aproximadamente 500 mL, semi-preenchidos com água e um pedaço de madeira de dimensões aproximadamente 20 x 5 cm com uma parte imersa e outra não. A fêmea do *Aedes aegypti*, deposita seus ovos na parte imediatamente superior à lâmina d'água, na parte da madeira ainda úmida, mas fora da água do jarro (Figura 9).



Figura 9. Armadilha utilizada para a coleta dos ovos do *Aedes aegypti*.

Os ovos do *Aedes aegypti* foram imersos numa bacia plástica, de formato retangular, com cerca de 3 litros de água mineral para a eclosão. Após a imersão dos ovos, 0,5 g de ração de rato foi adicionado à água

para auxiliar no crescimento das larvas. Todo o material foi mantido no interior de uma gaiola de madeira e coberta com uma tela de tecido, apropriada para insetos, a fim de evitar a contaminação por ovos de outras espécies de mosquito. Após a eclosão, as larvas foram acompanhadas até que atingissem o 3º estágio do desenvolvimento, quando então foram utilizadas nos ensaios de atividade larvicida. Foram necessários de quatro a cinco dias para que as larvas atingissem o tamanho ideal para os ensaios.

Os testes de toxicidade foram realizados empregando as larvas selecionadas no terceiro estágio (Figura 10) foram transferidas para um béquer contendo 20 mL de água mineral (26 a 28 °C). As larvas foram capturadas utilizando-se uma pipeta de Pasteur. Cada teste foi feito em quintuplicata para cada concentração testada. Os controles positivos foram realizados com o organofosforado temephos em larvas do *Aedes aegypti*, na concentração utilizada pela Vigilância Sanitária que é de 100 mg L⁻¹. Os controles negativos foram realizados com 20 mL de água mineral (26 a 28 °C) contendo 0,04% de Tween. As larvas foram expostas às soluções por 24 horas, sendo monitoradas de hora em hora. Ao fim dos períodos registrou-se a mortalidade.



Figura 10. Larvas do *Aedes aegypti* em terceiro estágio de crescimento.

Para o preparo da solução teste, pesou-se 20 mg do óleo essencial em um recipiente (do tipo eppendorf), para cada mililitro da solução teste e, em seguida, foi adicionada uma gota de solvente do tipo Tween 80 sobre o óleo, fazendo-se então a homogeneização. A seguir, utilizando-se uma pipeta automática, foi adicionado um mililitro de água destilada fazendo-se nova homogeneização.

Esta solução foi então transferida para o béquer contendo as larvas separadas para o teste, de acordo com as concentrações pré-estabelecidas após testes iniciais.

Após os testes, seguindo as normas padrões foi montada uma tabela com os valores das seis concentrações, log das mesmas, o número de larvas mortas após 24 horas (média dos cinco pontos), número de larvas vivas após 24 horas (média dos cinco pontos), o acumulado de mortos (soma das células de mortos abaixo) e o acumulado de vivos (soma das células de vivos acima).

A análise estatística dos dados foi realizada de acordo com o método de REED-MUENCH (1938), o qual parte do princípio de que um animal que sobreviva a certa dose, também irá sobreviver em qualquer outra dose menor que aquela, conseqüentemente, o animal que morrer com certa dose, também irá morrer em doses maiores que aquela. A partir de uma tabela contendo os dados de mortalidade para cada concentração testada, é construído um gráfico onde se observa uma curva para o acúmulo de animais mortos em cada concentração e outra curva para o acúmulo de sobreviventes. O ponto de intercessão entre as curvas é a Concentração Letal 50% (CL_{50}), pois nesse ponto o número de animais sobreviventes é igual ao número de animais mortos (COLEGATE e MOLYNEUX, 1993).

O intervalo de confiança foi calculado segundo o método de PIZZI (1950) no qual se constrói um gráfico do percentual de mortos *versus* logaritmo (log) da dose. A seguir determina-se o valor de "R", que é a diferença entre o log da dose que mata 75% das larvas e o log da dose que mata 25% das larvas. Calcula-se também a variável "h" que

consiste na média das diferenças dos valores de log das doses. Com esses dados determina-se o log do erro padrão (SE), através da seguinte fórmula: $(SE)^2 = 0,79 \times h \times R/20$. Finalmente, o valor do intervalo de confiança é igual 2×10^{SE} .

CAPÍTULO 5

RESULTADOS E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Estudo do tempo de extração do óleo essencial de *Ruta graveolens* L.

A determinação do óleo essencial de *Ruta graveolens* L. foi realizado pelo processo de hidrodestilação por arraste de vapor d'água (aparelho de Clevenger modificado), fundamentado na tensão de vapor mais elevada do óleo em relação à água. O rendimento do óleo extraído foi calculado para a relação massa do óleo, medida por sua densidade a partir do volume de óleo obtido no sistema de extração, dividido pela massa fresca da amostra. O rendimento (R) de óleo obtido de cada amostra foi então calculado pela fórmula:

$$\% \text{ de Rendimento} = \frac{\text{Volume do Óleo Essencial (mL)} \times \text{Densidade}}{\text{Massa (g)}} \times 100$$

Em que:

R = Rendimento em porcentagem (%);

Volume do Óleo = Volume de óleo em mL;

Densidade = Massa de um mL de óleo em g;

Massa = Massa fresca de folhas em g.

De acordo com a Figura 11, pode se observar que o rendimento máximo do óleo extraído foi verificado no tempo de extração de 4,0 horas, obtendo-se um volume de óleo essencial igual a 0,44 mL para uma massa fixada em 30 g para 300 mL de água destilada a temperatura de 100 °C. O rendimento obtido foi de 1,29% ± 0,02 (CV=13,90%; n = 10). Dessa forma, propõe-se que o tempo ideal seja de 4,0 horas, que corresponde ao rendimento máximo de extração.

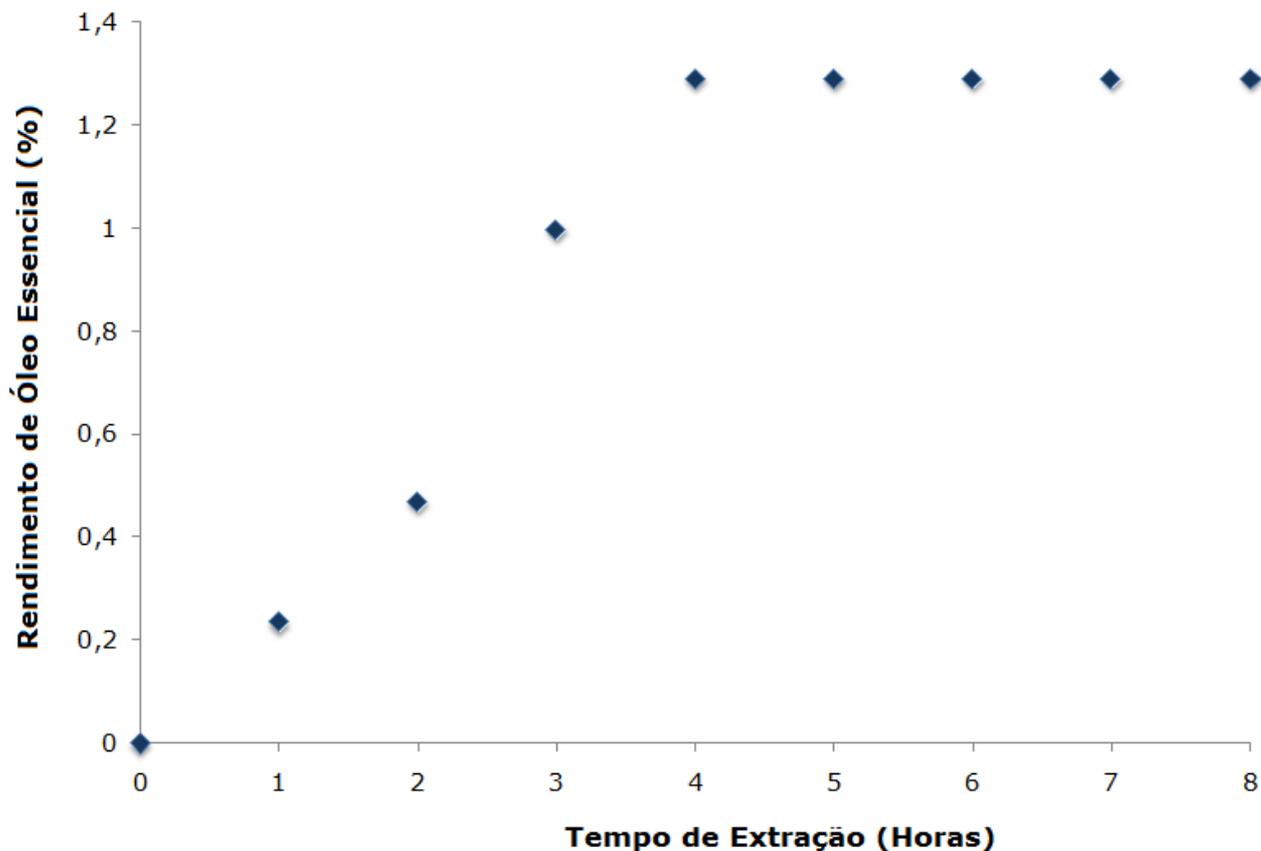


Figura 11. Evolução de extração do óleo essencial de *Ruta graveolens* L., em função do tempo, a temperatura de 100 °C.

Avaliando a Figura 11, é possível observar o comportamento ascendente nas primeiras quatro horas de extração. Este fator é atribuído ao óleo essencial acumulado em células oleosas específicas, diferente de outras estruturas de armazenamento mais frágeis, como pêlos glandulares, tricomas e glândulas epidérmias. Estas células são estruturas especiais, de parede celular lignificada, que estão presentes no tecido parenquimatoso localizado na lâmina e nas bordas da folha. O fato das células estarem em tecido mais interno na planta e possuírem paredes lignificadas podem indicar que o aumento do tempo de extração possa ocasionar maiores teores do óleo essencial de arruda.

Nas extrações a partir de quatro horas, a curva do perfil de concentração do óleo essencial de arruda apresentou comportamento

constante (Figura 11). Para extraí-lo é necessário quebrar as resistências da planta à transferência de massa, aumentando o tempo de extração. Sendo assim, não foram testados tempos superiores a 8 horas de extração, devido à significativa redução de custos, pois, ultrapassando este limite de horas, o gasto de água e energia torna a extração mais cara.

Estes resultados diferem aos obtidos por GINA et al. (2008), que obteve rendimento de 0,1% do óleo essencial de arruda empregando hidrodestilação das partes aéreas (caule e folhas) da planta por um período de 4 horas de extração.

Em estudos realizados por DE FEO et al. (2002), a hidrodestilação das partes aéreas secas de *R. graveolens* apresentou rendimento de extração de 0,74% de óleo essencial com a presença de cheiro bastante intenso e penetrante.

5.2. Características físicas do óleo essencial

O óleo essencial de arruda apresentou odor forte e pungente característico com uma coloração verde clara intensa. Os parâmetros físicos do óleo essencial extraído das partes aéreas da arruda são apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Propriedades físicas do óleo essencial de *Ruta graveolens* L.

Características Físicas	Óleo Essencial ^(a)	Óleo Essencial ^(b)
Aparência	Límpida	Límpida
Cor	Verde Claro	Amarelo Claro
Densidade (g mL ⁻¹)	0,88	-
Índice de refração (ND 25°)	1,01	-
Rendimento (%)	1,29	0,74
Solubilidade em álcool a 70% (v/v)	1:1	1:1

(a) Esta pesquisa

(b) DE FEO et al. (2002)

Comparando os valores obtidos com os estudos realizados por MEJRI et al. (2010) e DE FEO et al. (2002), pode-se observar que há uma similaridade entre os parâmetros analisados. As pequenas diferenças nos valores encontrados podem ser atribuídas a fatores tais como: época de coleta, diferentes tipos de solo, condições e tempo de armazenamento. O grau de interferência nas características químicas e físicas dos óleos essenciais depende também das condições de temperatura, luminosidade e umidade do ar às quais o material vegetal é submetido.

5.3. Identificação dos componentes químicos por CG-MS

A composição química das amostras de óleos essenciais de folhas frescas de *Ruta graveolens* L. foi determinada empregando cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa (CG-MS), com identificação dos constituintes principais que são apresentados na Figura 12 em ordem crescente de tempo de retenção.

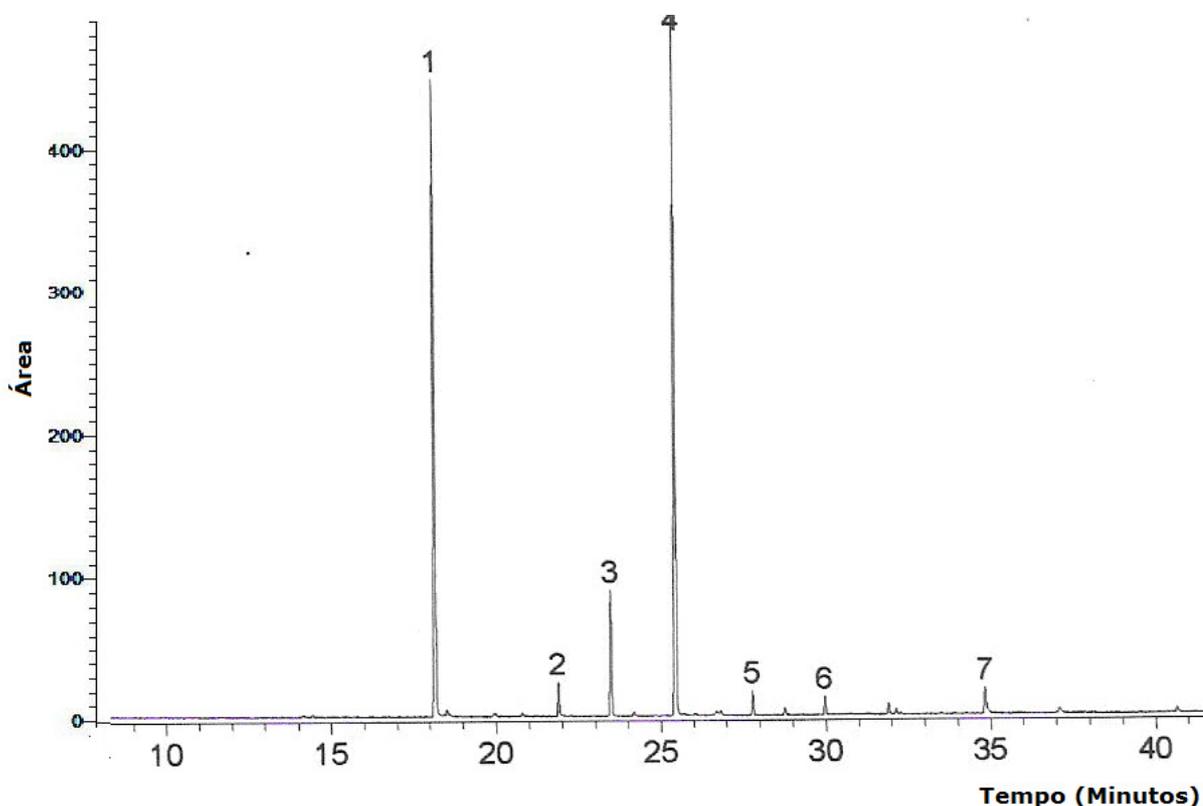


Figura 12. Cromatograma do óleo essencial de *Ruta graveolens* L.

A identificação dos constituintes químicos foi baseada em (i) na comparação do espectro de massa da substância com um sistema de banco de dados para CG-MS (NIST105, NIST21 EWILEY139 e o programa AMDIS - Automated Mass Spectral Deconvolution Mass & Identification System) e (ii) no índice de retenção de cada composto químico.

De acordo com a metodologia utilizada foi possível identificar os constituintes químicos presentes no óleo essencial de arruda. A classe metilcetônica ou monoterpenóides está representada por quatro compostos: 2-nonanona, 2-decanona, 2-undecanona e 2-dodecanona. Além destes compostos foram identificados os ésteres, acetato de octila, ftalato de etila e acetato de pentadecanila, como mostra a Tabela 5.

Tabela 5. Teor dos componentes identificados através do espectro de massas do óleo essencial de arruda.

Pico ¹	t _{RET} ² (Minutos)	Nome do Composto ³	%A ⁴
01	18,15	2-Nonanona	39,17
02	21,89	2-Decanona	2,03
03	23,48	Acetato de octila	7,31
04	25,45	2-Undecanona	47,21
05	27,79	2-Dodecanona	1,53
06	29,97	Acetato de pentadecanila	1,02
07	34,83	Ftalato de etila	1,73

¹Número do pico pela ordem de eluição da coluna.

²t_{RET} = Tempo de retenção do composto na coluna em minutos.

³Nome mais comum do composto identificado.

⁴%A = Porcentagem de área normalizada a qual indica a distribuição relativa dos compostos na amostra.

O cromatograma do óleo essencial de arruda mostra dois picos mais intensos definidos como majoritários, com tempos de retenção em 18,15 e 25,45 minutos (picos 01 e 04), correspondente aos compostos 2-nonanona e 2-undecanona respectivamente.

Os compostos 2-nonanona e 2-undecanona (metilcetonas) identificados no óleo essencial, segundo a literatura apresentam propriedades comprovadas como: bactericida, fungicida, aleloquímicos, antioxidante, inseticida, repelente, alelopático, expectorantes, antivirais, descongestionantes hepáticos, estimulantes da circulação e do sistema nervoso central (SNC) (DE FEO et al., 2002; BERNARDO et al., 2002).

As estruturas químicas dos compostos majoritários e minoritários identificados no óleo essencial de arruda são mostradas na Figura 13.

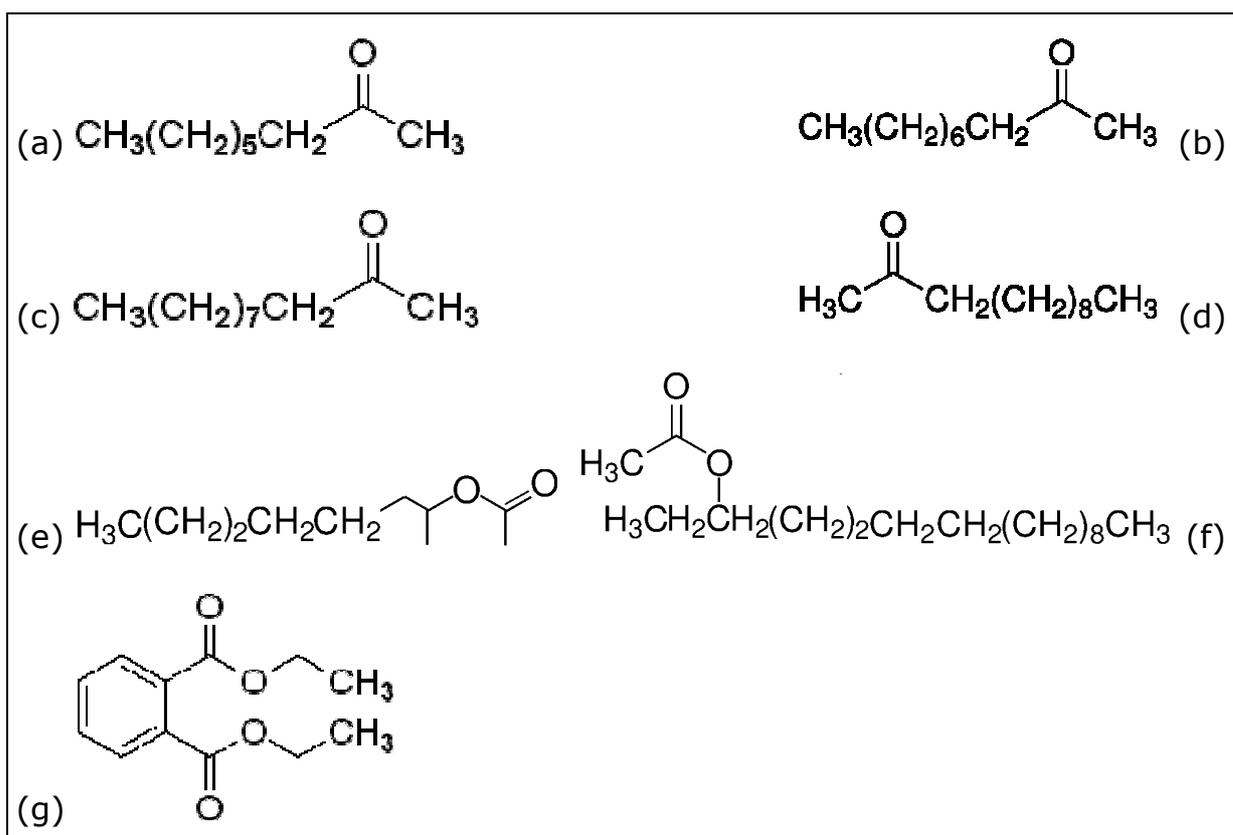


Figura 13. Compostos identificados na amostra do óleo essencial extraído das folhas de arruda: (a) 2-nonanona, (b) 2-decanona, (c) 2-undecanona, (d) 2-dodecanona, (e) acetato de octila, (f) acetato de pentadecanila e (g) ftalato de etila.

A seguir estão relacionados os espectros de massas dos picos apresentados na Figura 12 e as respectivas propostas de identificação através da comparação com os dados da espectroteca NIST105, NIST21 EWILEY139 e o programa AMDIS (Automated Mass Spectral Deconvolution Mass & Identification System).

A Figura 14 mostra os espectros de massas do pico 01 (Figura 12), analisado pela espectroteca, chegou-se à conclusão que se tratava da substância 2-nonanona de fórmula $C_9H_{18}O$ e massa molar igual a $142,24 \text{ g mol}^{-1}$.

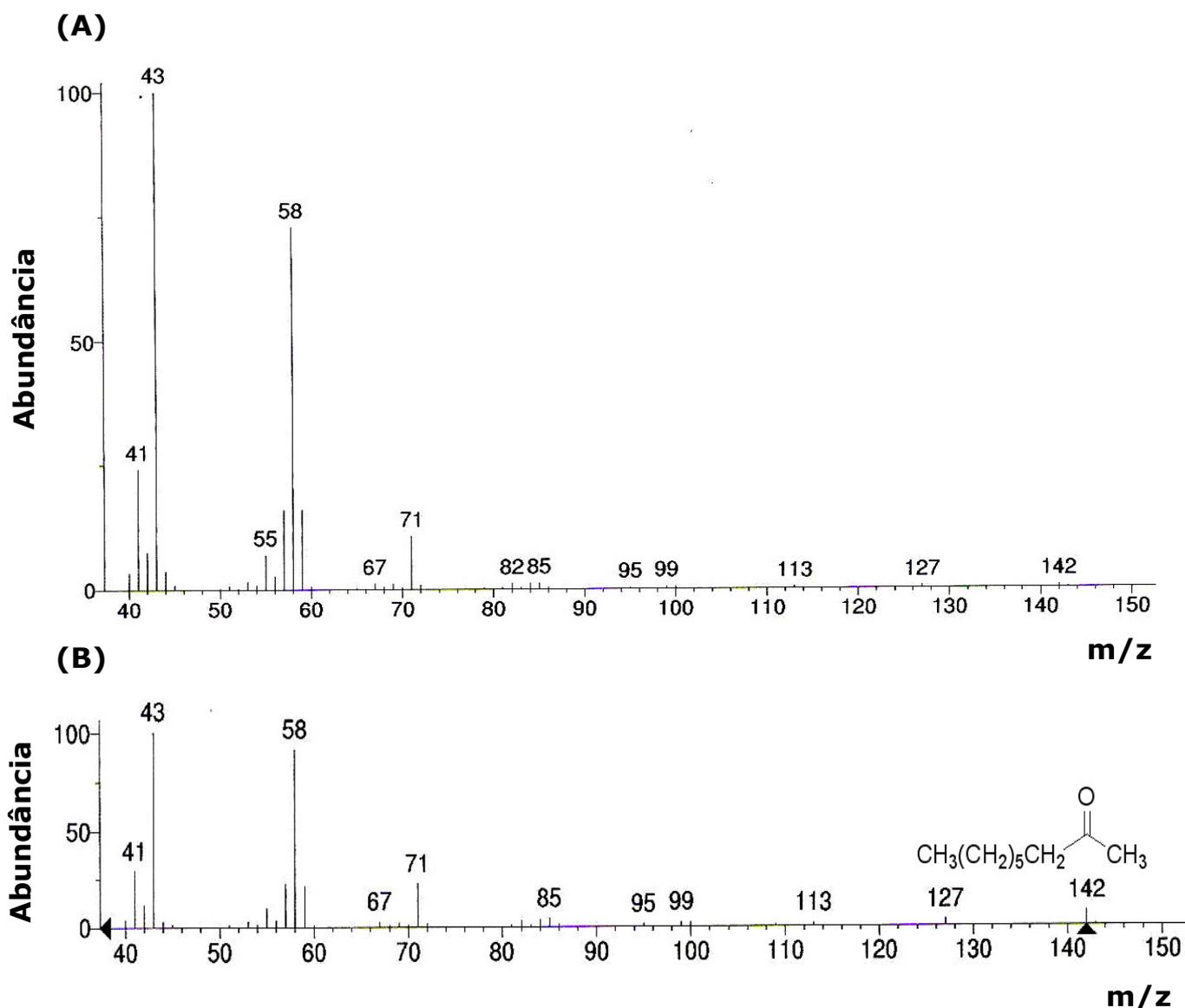


Figura 14. (A) Espectro de massa do 2-nonanona, (B) proposta de identificação pela espectroteca e o programa AMDIS.

O fragmento m/z 58 é resultante do rearranjo McLafferty seguido de um segundo rearranjo de hidrogênio com perda de uma molécula neutra de eteno (Figura 17):

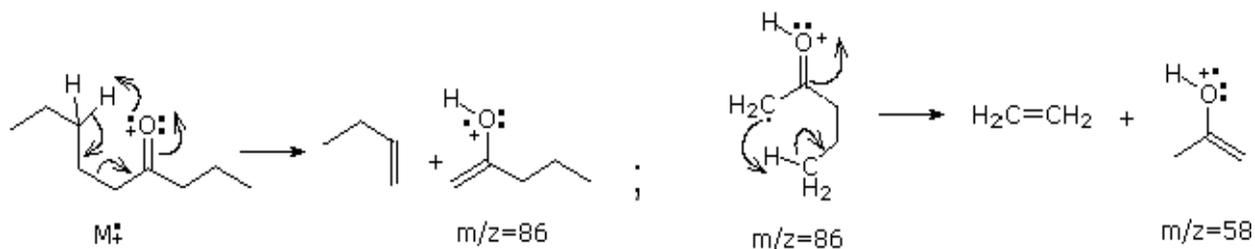


Figura 17. Esquema do rearranjo McLafferty para cetonas alifáticas.

Segundo SILVERSTEIN et al. (2007), os picos de fragmentos das cetonas alifáticas resultam da quebra das ligações C-C adjacentes ao átomo de oxigênio. A carga permanece no íon acílio por ressonância (Figura 18).

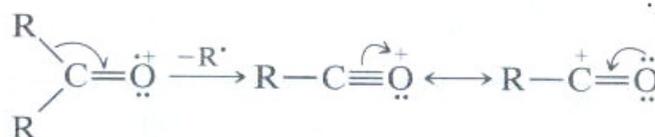


Figura 18. Esquema de estabilização por ressonância do íon acílico.

O pico 02 da Figura 12 foi identificado, segundo a espectroteca e a literatura (ADAMS, 2007), como sendo o 2-decanona de fórmula $C_{10}H_{20}O$ e massa molecular correspondente a 156 g mol^{-1} (Figura 19).

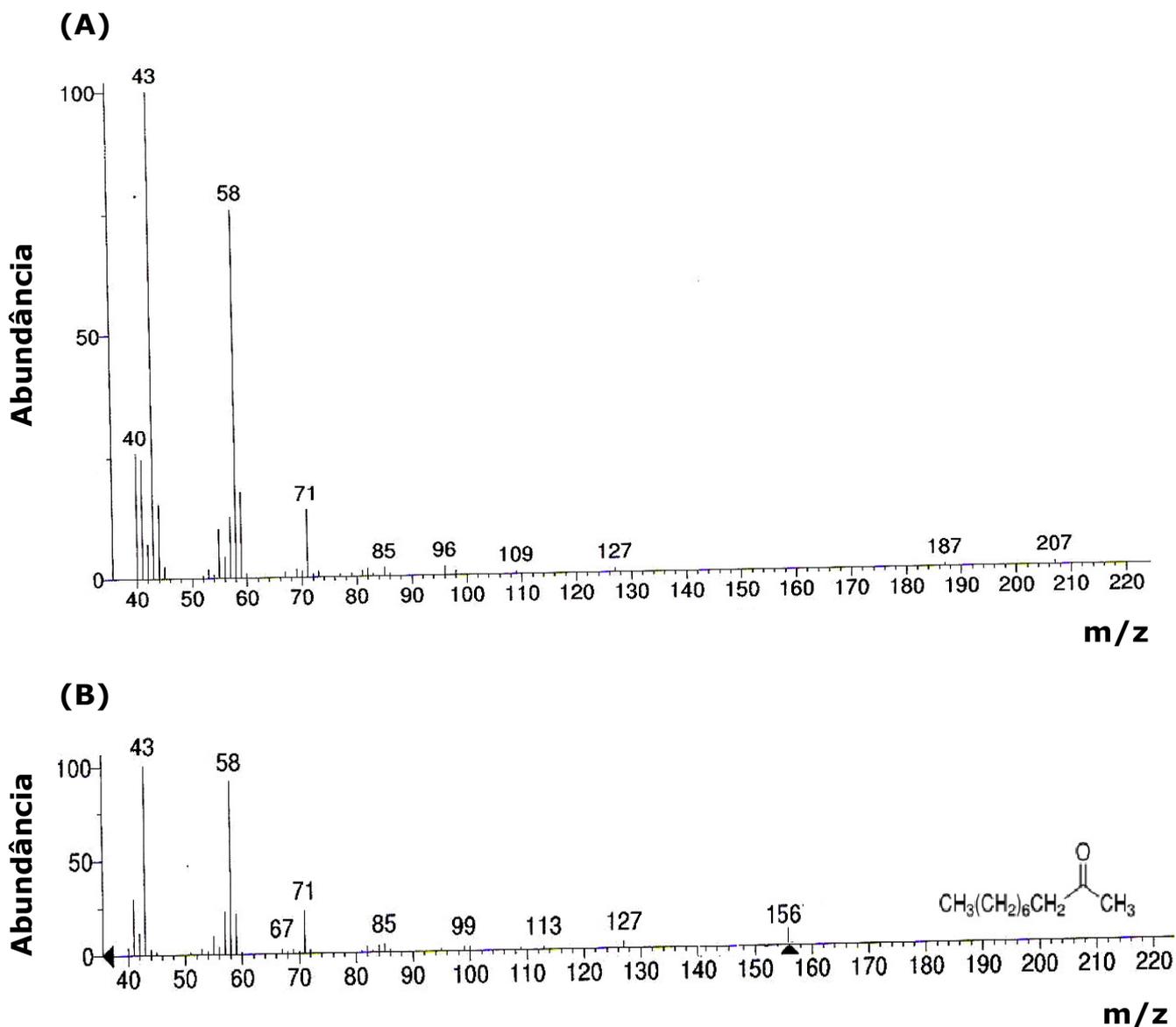


Figura 19. (A) Espectro de massa do 2-decanona, (B) proposta de identificação pela espectroteca e o programa AMDIS.

O pico 03 da Figura 12 foi identificado, segundo a espectroteca e a literatura (ADAMS, 2007), como sendo o acetato de octila de fórmula $\text{C}_{10}\text{H}_{20}\text{O}_2$ e massa molecular correspondente a $172,0 \text{ g mol}^{-1}$ (Figura 20).

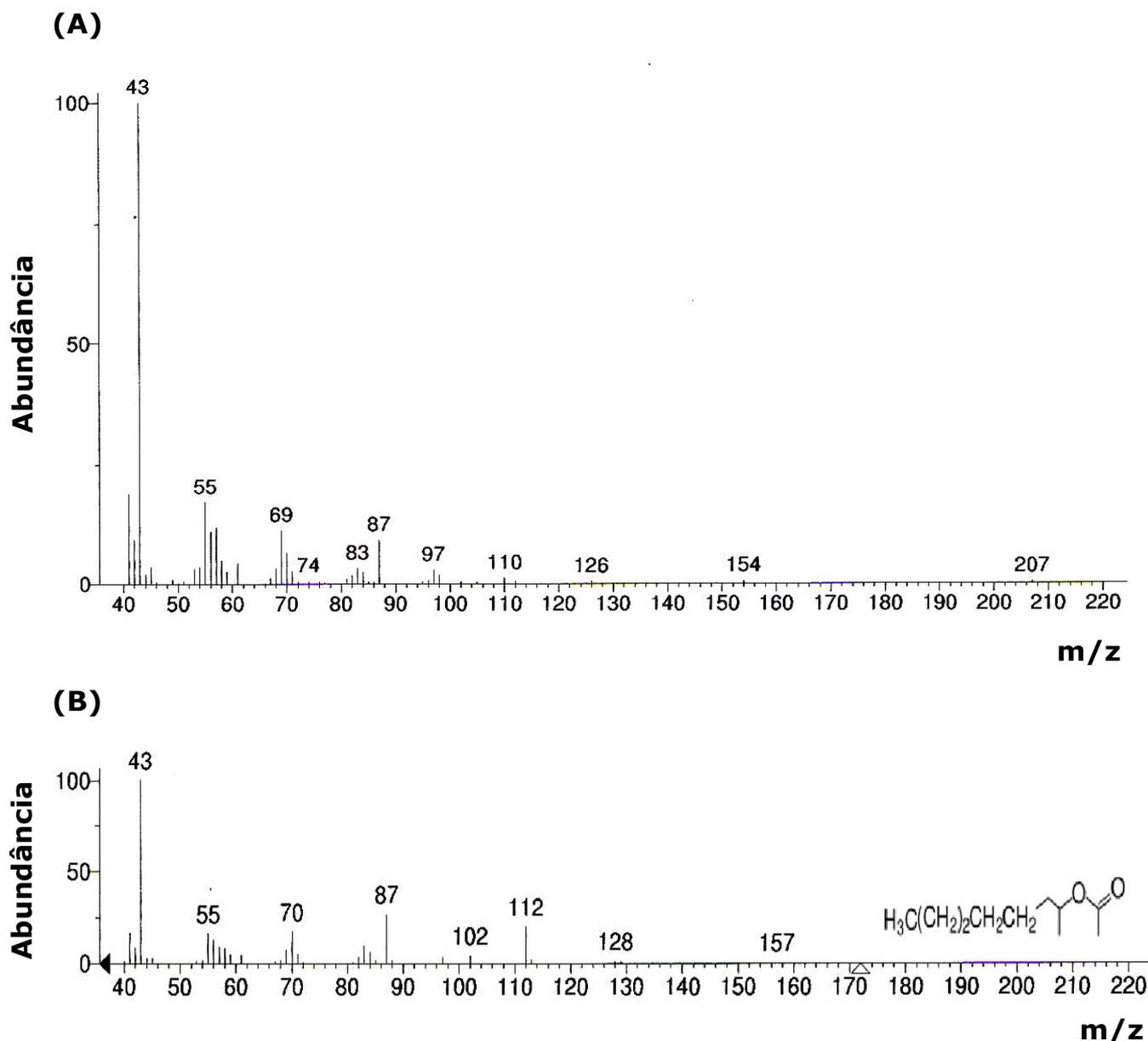


Figura 20. (A) Espectro de massa do acetato de octila, **(B)** proposta de identificação pela espectroteca e o programa AMDIS.

Os ésteres alifáticos apresentam pico do íon molecular dos ésteres de metila de um ácido alifático de cadeia linear. O pico do íon molecular é pouco intenso na faixa de massa entre m/z 130 e 200, aproximadamente, tornando-se mais intenso acima dessa região. Os ésteres de cadeia acíla maior apresentam seqüência de fragmento dos ésteres de metila de ácido de cadeia linear correspondente. A quebra sucessiva das ligações C-C dá origem a íon alquila (m/z 87).

Aparecem aglomerados hidrocarbônicos em intervalos de 14 unidades de massa, apresentando em cada um deles um pico intenso em $C_nH_{2n-1}O^{2+}$. O pico em m/z 87, corresponde formalmente ao íon $[CH_2CH_2COOCH_3]^+$, é sempre mais intenso dos que os homólogos (SILVERSTEIN et al., 2007).

De acordo com o banco de dados da espectroteca e espectro de massa padrão constante na literatura (ADAMS, 2007), o pico 04 da Figura 12 corresponde ao 2-undecanona, $C_{11}H_{22}O$ com massa molecular correspondente a $170,0 \text{ g mol}^{-1}$ e evidenciado pela presença do íon molecular $m/z=170$ observado no espectro de massa da Figura 21.

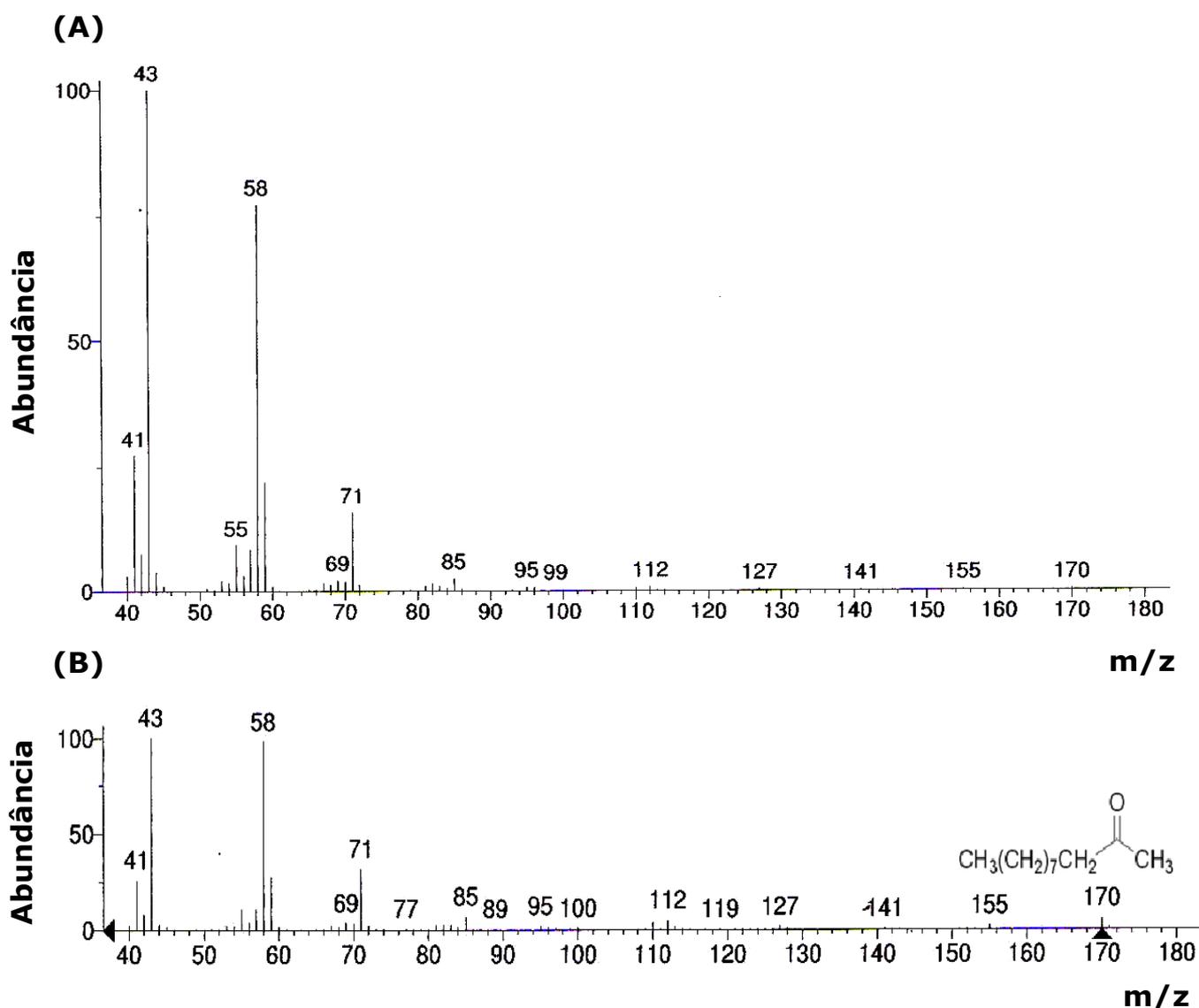


Figura 21. (A) Espectro de massa do 2-undecanona, **(B)** proposta de identificação pela espectroteca e o programa AMDIS.

Esse composto metil-cetônico apresenta pico molecular m/z 170 [M^+] e pico característico em m/z 43 e 71 [M^+] referente à perda de eliminação do grupo alquila (SILVERSTEIN et al., 2007).

O pico 05 da Figura 12 foi identificado como sendo o 2-dodecanona de fórmula $C_{12}H_{24}O$ e massa molecular correspondente a $184,0 \text{ g mol}^{-1}$ (Figura 22), segundo a espectroteca e a literatura (ADAMS, 2007).

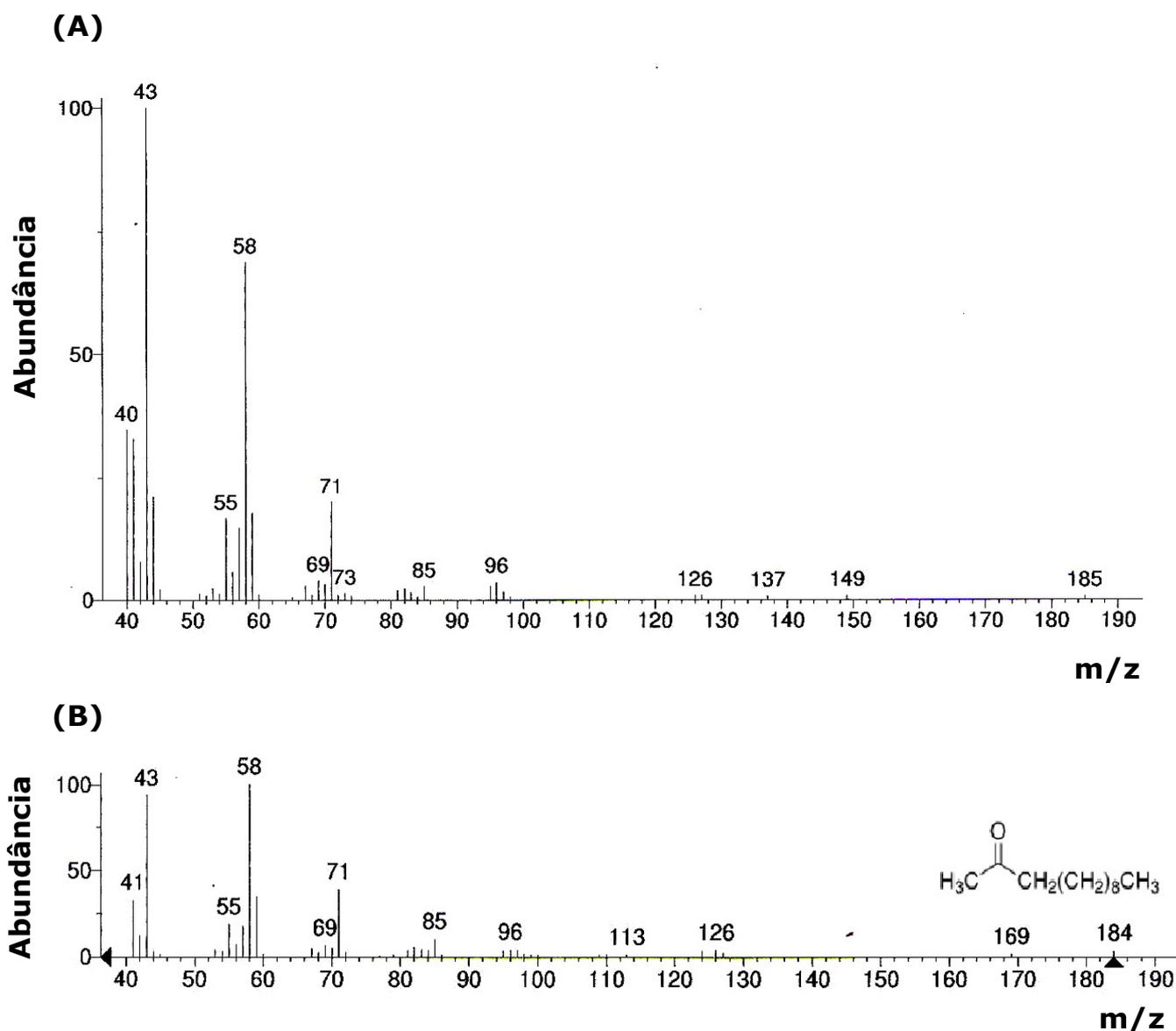


Figura 22. (A) Espectro de massa do 2-dodecanona, **(B)** proposta de identificação pela espectroteca e o programa AMDIS.

De acordo com o banco de dados da espectroteca e espectro de massa padrão constante na literatura (ADAMS, 2007), o pico 06 da Figura 12 corresponde ao acetato de pentadecanila ($C_{17}H_{32}O_2$) e massa molecular de $268,0 \text{ g mol}^{-1}$ (Figura 23).

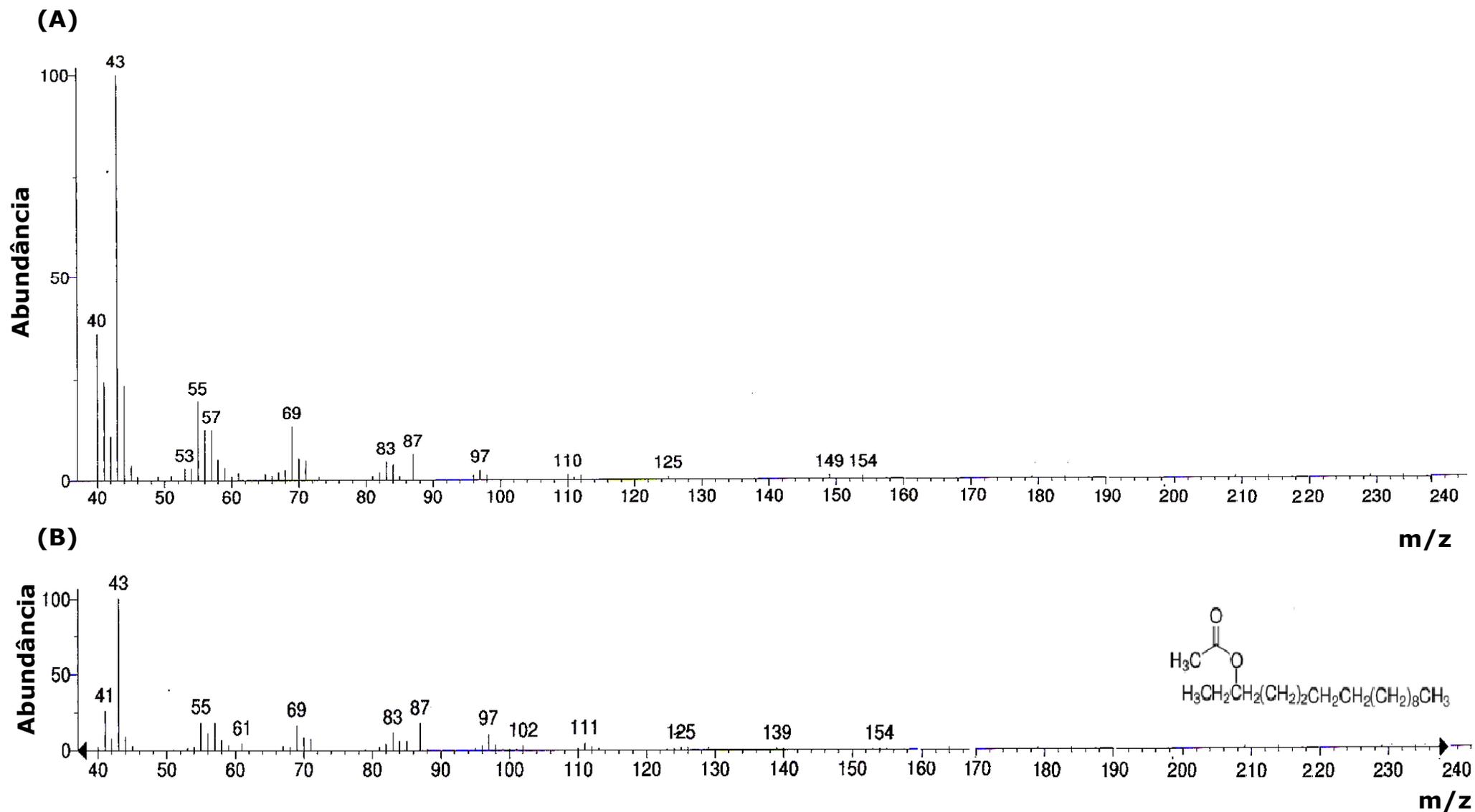


Figura 23. (A) Espectro de massa do acetato de pentadecanila, (B) proposta de identificação pela espectroteca e o programa AMDIS.

A Figura 24 refere-se ao espectro de massa do pico 07 observado na Figura 12, foi identificado como sendo ftalado de etila de fórmula $C_{12}H_{14}O_4$ e massa molecular $222,0 \text{ g mol}^{-1}$ (ADAMS, 2007).

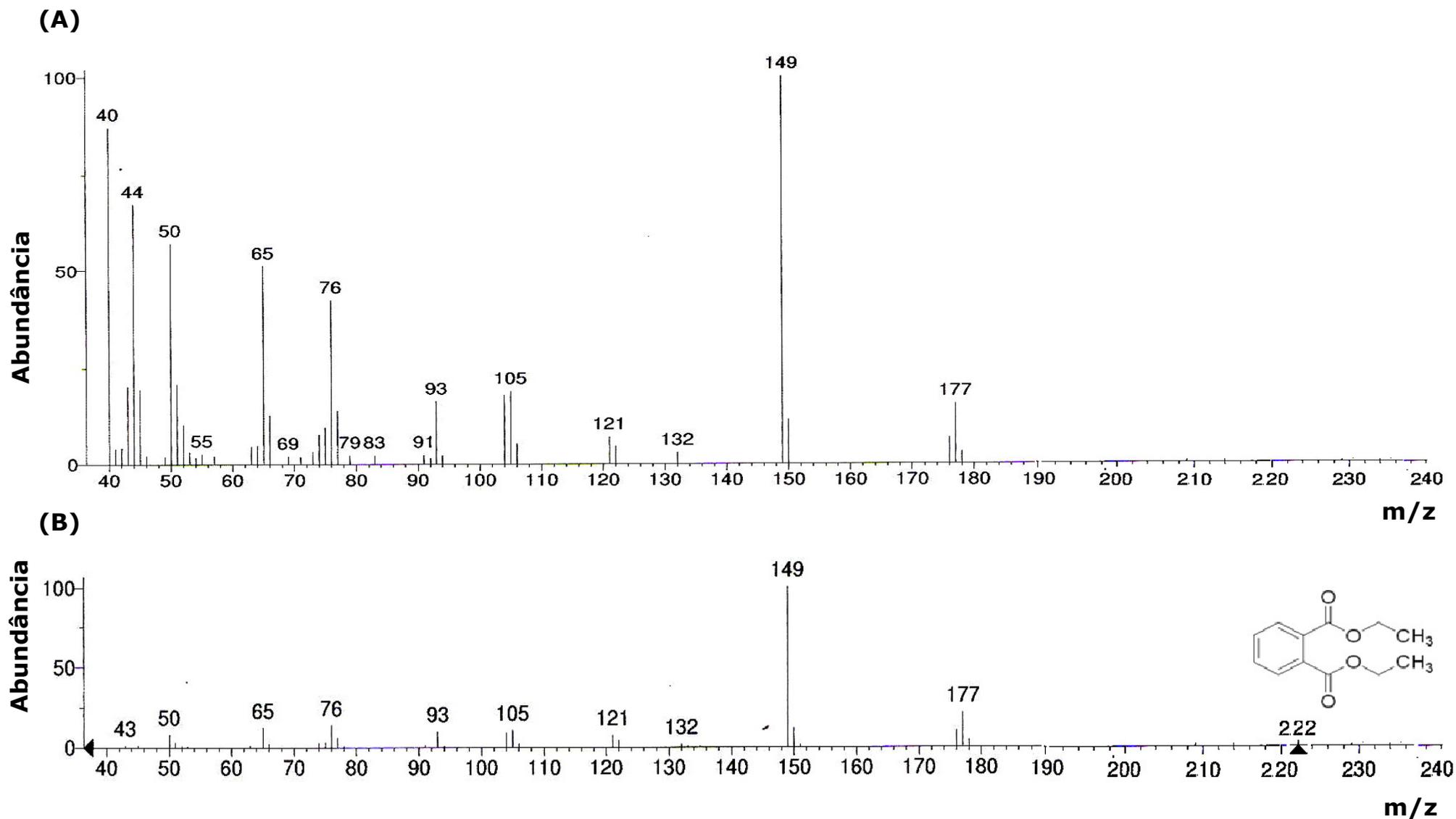


Figura 24. (A) Espectro de massa do ftalato de etila, **(B)** proposta de identificação pela espectroteca e o programa AMDIS.

O pico do íon molecular das cetonaromáticos é intenso. A quebra alquil-cetonas ocorre na ligação β ao anel, conformação de um fragmento característico $\text{ArC}\equiv\text{O}^+$ (m/z 105 quando Ar = fenila), que usualmente leva ao pico base. Um pico forte e característico, de massa 149, ocorre em todos os ésteres do ácido ftálico, a partir do éster de dietila. Esse pico não é importante nos ésteres de dimetila, etila e metila do ácido ftálico e tereftálicos, que dão os picos esperados em M-R, M-2R, M-CO₂R e M-2CO₂R. O fragmento m/z 149 de um anidrido ftálico protonado é provavelmente formado por duas quebras de ligação éster envolvendo o rearranjo de 2 átomos de hidrogênio e, depois, rearranjo do outro átomo de hidrogênio, seguida pela eliminação da água (SILVERSTEIN et al., 2007).

Já o pico m/z 99 [M-29] é atribuído à saída do grupo etil (FERREIRA et al., 2001). O pico em m/z 41 é atribuído ao fragmento C_3H_5^+ formado durante a clivagem da ligação carbono-carbono, acompanhado de perda de hidrogênio. O pico em m/z 69 refere-se ao fragmento C_5H_9^+ , resultante de clivagem alílica (SILVERSTEIN et al., 2007). O referido espectro mostra ainda o pico em m/z 121 [M-15] que é referente à perda do grupo metila, enquanto que o pico em m/z 93 pode ser decorrente da estrutura C_7H_9^+ que é formada por isomerização, seguida de clivagem alílica.

O emprego de substâncias padrão externo como referência auxiliou na confirmação da identificação dos compostos voláteis 2-nonanona (t_R = 18,15 minutos), 2-decanona (t_R = 21,89), 2-undecanona (t_R = 25,45), 2-dodecanona (t_R = 27,79) e ftalato de etila (t_R = 29,97) presentes no óleo essencial de arruda, como mostra a Figura 25. Os compostos voláteis acetato de octila e acetato de pentadecanilina foram identificados somente por GC-MS, utilizados para a proposta de identificação através dos respectivos espectros de massas.

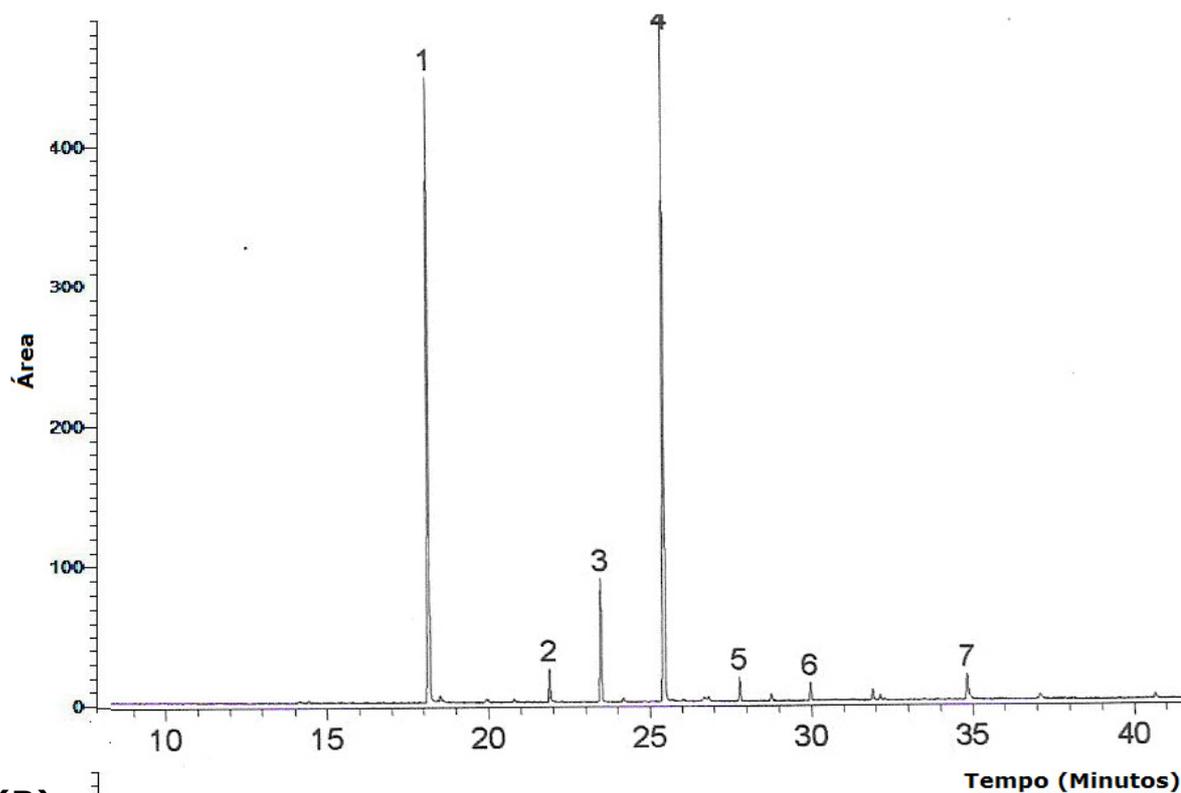
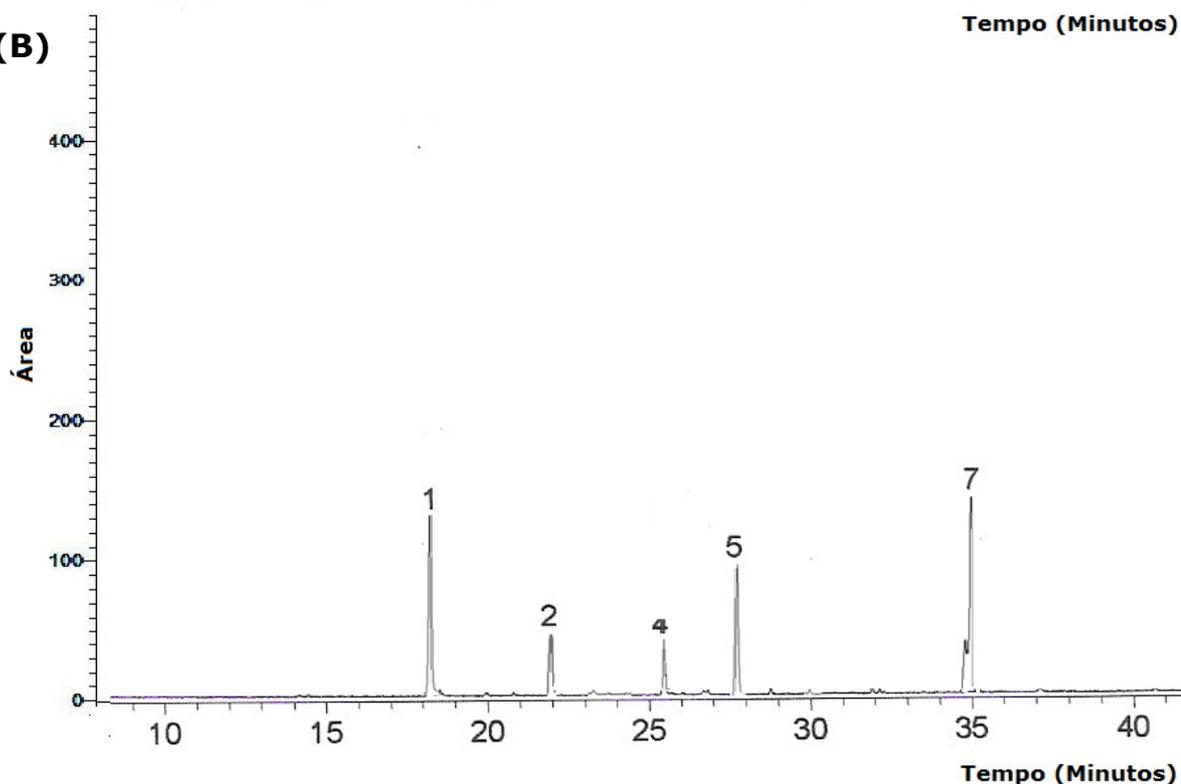
(A)**(B)**

Figura 25. (A) Identificação dos constituintes químicos presente no óleo essencial de arruda por CG-MS e **(B)** mistura dos padrões de cinco componentes na concentração de 5,0 µg mL⁻¹ por CG, usando o método do padrão externo.

Comparando os dois cromatogramas foi possível confirmar a identificação dos constituintes químicos presentes no óleo essencial de arruda, por meio da sobreposição dos picos cromatográficos dos componentes voláteis e da mistura dos padrões na concentração de $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ por CG, usando o método do padrão externo (Figura 25). A técnica é baseada no aumento da área do pico do cromatograma, em função do aumento da concentração da solução padrão permitindo a análise simultânea dos cinco compostos com um tempo de análise de 36 minutos, não havendo sobreposição dos picos cromatográficos.

Estudos realizados por GINA et al. (2008), o óleo essencial de arruda apresentou quatorze componentes identificados, sendo 83,4% dos compostos identificados como compostos alifáticos, principalmente cetonas. Neste estudo foram encontrados a série 2-ona desde C-8 a C-13, com predominância de membros ímpares, sendo o mais abundante o 2-undecanona (43,0%) e o 2-nonanona (33,5%). Em menor concentração foram identificados os hidrocarbonetos insaturados: geijereno (0,2%) e pregeijereno (6,0%), os compostos aromáticos: trans-anetol (3,5%) e isomaturina (1,3%).

De acordo com DE FEO et al. (2002) e RUSTAIYAN (2002), a composição química de óleo essencial de arruda que cresce nos Andes Venezuelanos (Mérida), apresentou como compostos majoritários o 2-undecanona (43,0%) e 2-nonanona (33,5%).

O óleo venezuelano não apresentou compostos terpênicos e somente a presença de compostos alifáticos (83,4%), principalmente os cetônicos (toda a série 2-ona a partir de C-8 até C-13 junto com pequenas quantidades de alcoóis, aldeídos, ésteres, hidrocarbonetos insaturados: geijereno e pregeijereno (6,2%) e dos compostos aromáticos: trans-anetol e isomaturina (4,8%).

Em contrapartida, um estudo realizado empregando as partes aéreas de *Ruta chalepensis* L. (espécie de arruda nativas do Mediterrâneo e sudoeste da Ásia) mostrou diferenças significativas na composição química do óleo essencial. Os componentes majoritários encontrados

foram acetato de 2-metil-octanol (44,0%) e β -felandreno (10,7%). Enquanto que o 2-nonano e 2-undecano foram encontrados em pequena quantidade, resultando em uma composição muito diferente dos outros óleos descritos na literatura (TZAKOU e COULADIS, 2001).

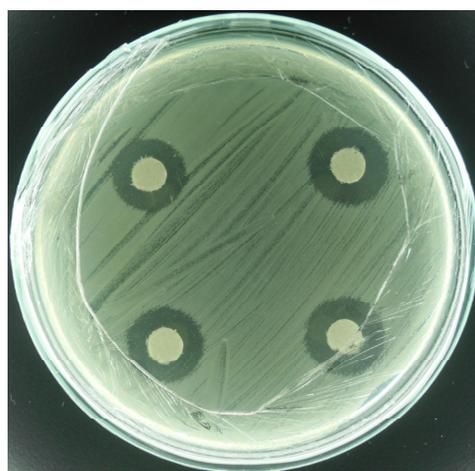
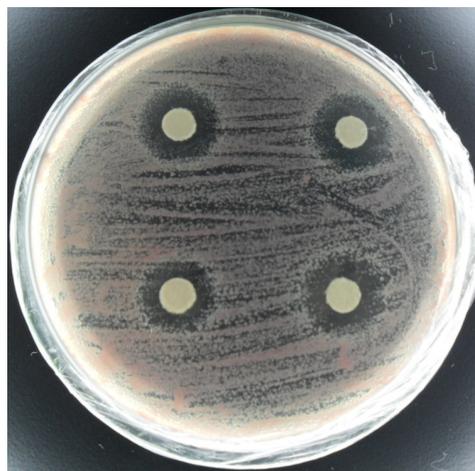
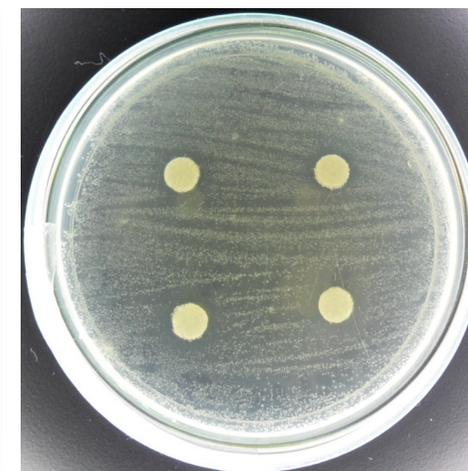
5.4. Atividade antimicrobiana do óleo essencial de arruda.

De acordo com os diâmetros dos halos observados, a atividade antimicrobiana foi classificada segundo PAREKH e CHANDA (2007) e SANTOS *et al.* (2007) como: inativo, para halos com diâmetros inferiores a 9 mm ou semelhante ao observado para os respectivos controles negativos; parcialmente ativo, para halos com diâmetros entre 9 e 12 mm; ativo, quando o diâmetro de inibição variar entre 13 a 18 mm e muito ativo quando o tamanho do halo observado ficar acima de 18 mm. A atividade antimicrobiana foi considerada muito ativa quando o halo de inibição observado foi igual ou superior ao observado para o controle positivo.

Os resultados da atividade antibacteriana do óleo essencial de arruda estão apresentados na Tabela 6, com a média dos halos de inibição em milímetro \pm desvio-padrão (DP).

Tabela 6. Atividade antibacteriana do óleo essencial de arruda frente às bactérias patogênicas.

Cepas Bacterianas	Halos de Inibição (mm)	Classificação	Concentração Inibitória Mínima (MIC)		Coeficiente de Variação (%)
			% (v/v)	µg/mL	
<i>S. aureus</i> (ATCC 25923)	22,00 ± 0,06	Ativo	0,125	1,0	0,24
<i>E. coli</i> (ATCC 25922)	17,70 ± 0,04	Parcialmente ativo	0,25	1,0	0,80
<i>S. typhi</i> (ATCC 566K)	12,40 ± 0,03	Parcialmente ativo	0,25	1,0	0,37
<i>P. aeruginosa</i> (ATCC 10145)	8,30 ± 0,05	Inativo	0,75	75,0	0,37

*S. aureus* (ATCC 25923)*E. coli* (ATCC 25922)*S. typhi* (ATCC 566K)*P. aeruginosa* (ATCC 10145)**Figura 26.** Susceptibilidade de bactérias patogênicas ao óleo essencial de arruda na concentração de 75,0 µg/mL.

Segundo a classificação proposta na Tabela 6, o óleo essencial de arruda inibiu fortemente o crescimento da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e parcialmente ativo para as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* e *Salmonella typhi*. Das bactérias avaliadas a *Pseudomonas aeruginosa* apresentou atividade antimicrobiana inativa, em função tamanho do halo de inibição formado ficar abaixo de 9 mm (Figura 26).

A *Pseudomonas aeruginosa* foi o microrganismo que se mostrou menos vulnerável frente ao óleo essencial de arruda, classificado como inibições satisfatórias. Esta bactéria é tida na literatura como a menos susceptível aos óleos essenciais (BURT, 2004).

Em relação às atividades antibacterianas, o óleo essencial de arruda foi mais eficaz contra a bactéria Gram-positiva do que contra as Gram-negativas, apresentando resultados semelhantes à maioria das investigações do potencial antimicrobiano de voláteis. De acordo com REICHLING et al. (2005), as bactérias Gram-negativas são resistentes a um grande número de antibióticos devido à presença de uma membrana externa envolvendo a parede celular, que dificulta a passagem de compostos hidrofóbicos. Apresentam grande capacidade de resistência aos antimicrobianos devido às mutações genéticas. Possuem também uma membrana que restringe a entrada de compostos anfipáticos, as chamadas Bombas de Compostos Multidroga (MDRs) (TEGOS et al., 2002).

A ação antimicrobiana de óleos essenciais é ocasionada por efeitos tóxicos contra a membrana citoplasmática dos microrganismos. Em muitos casos, tem-se indicado que sua atividade é devido à presença de monoterpenos, que parecem exercer danos à membrana e seu caráter lipofílico causa partição de suas estruturas, resultando em expansão, aumento de fluidez e inibição de enzimas (DI PASQUA et al., 2007).

A hidrofobicidade dessas moléculas as possibilita se particionarem nas membranas celulares dos microrganismos, alterando suas funções e as deixando mais permeáveis. Sendo assim, o efeito como

perturbação da membrana citoplasmática, ruptura do fluxo de elétrons, alteração no transporte de moléculas através da membrana, inibição de atividade de certas enzimas e coagulação do conteúdo citoplasmático são alguns mecanismos envolvidos na promoção do poder antimicrobiano dos óleos essenciais descritos na literatura (COX, 2000).

Apesar de, na maioria dos casos, a literatura relatar que compostos fenólicos como timol, carvacrol, eugenol, anetol, entre outros (BAKKALI et al., 2008; BURT, 2004) possuem atividade mais efetiva contra microrganismos, o óleo essencial de arruda não são ricos nesses compostos. Os compostos metil cetônicos (2-nonanona e 2-undecanona) e os compostos minoritários presente na composição química, são os principais responsáveis pelas atividades biológicas. A atividade é devido à possibilidade de várias formas de interações sinérgicas e antagônicas de vários componentes químicos, isso pode explicar a sua ação antimicrobiana frente a organismos cujos mecanismos de defesa são diferentes.

Os resultados são promissores para o seguimento das investigações dos óleos essenciais desta espécie frente aos microrganismos testados a fim de determinar a concentração inibitória mínima e realizar testes pré-clínicos e clínicos. A menor concentração inibitória (MIC) encontrada foi 0,125 % para a *Staphylococcus aureus*, 0,25% para *Escherichia coli* e *Salmonella typhi*; e 0,75% para *Pseudomonas aeruginosa*, como mostra a Tabela 6.

Observando a Tabela 6, pode-se constatar que o óleo em estudo se apresenta como agente antimicrobiano em potencial, já que as CIM correspondentes a cada %v/v são baixas variando entre 1 a 2 µg/mL com exceção da cepa padrão de *Pseudomonas aeruginosa* que necessitou de 75 µg/mL para se tornar sensível ao óleo.

A determinação da sensibilidade fúngica ao óleo essencial de arruda foi analisada através da determinação da formação de halos de inibição em milímetros (mm), estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7. Atividade antifúngica do óleo essencial de arruda.

Cepas Fúngicas	Halos de Inibição (mm)	Classificação	Concentração Inibitória Mínima (MIC)		Coeficiente de Variação (%)
			% (v/v)	µg/mL	
<i>C. albicans</i> (ATCC 10231)	14,17 ± 0,04	Ativo	0,25	1,0	0,50
<i>C. tropicalis</i> (ATCC 7349)	13,78 ± 0,07	Ativo	0,75	5,0	0,30
<i>C. glabrata</i> (ATCC 30070)	13,21 ± 0,05	Ativo	0,75	5,0	0,30
<i>S. cerevisiae</i> (ATCC 9763)	7,30 ± 0,04	Inativo	4,0	250	0,78
<i>A. flavus</i> (ATCC 9170)	3,60 ± 0,07	Inativo	4,0	250	0,14
<i>A. fumigatus</i> (ATCC 26934)	3,40 ± 0,04	Inativo	4,0	250	0,12
<i>A. niger</i> (ATCC 9092)	3,70 ± 0,04	Inativo	4,0	250	0,95
<i>M. gypseum</i> (C115)	8,91 ± 0,04	Inativo	3,0	240	0,46
<i>T. mentagrophytes</i> (ATCC 9972)	8,66 ± 0,07	Inativo	4,0	300	0,58
<i>T. rubrum</i> (C137)	7,97 ± 0,04	Inativo	3,0	240	0,57
<i>C. neoformans</i> (ATCC 32264)	8,20 ± 0,04	Inativo	2,0	150,0	0,32

De acordo com os testes da atividade antifúngica apresentados na Tabela 7, foi constatado que a *C. albicans* apresentou maior sensibilidade comparada com a cepa de *C. tropicalis* e *C. glabarata* com halos de inibição variando entre 13 a 15 mm.

Considerando sua resistência frente a antifúngicos comercializados atualmente, essas infecções são com frequência de difícil tratamento. O óleo essencial obtido das partes aéreas de *Ruta graveolens* L. apresentou resultados interessantes para investigações posteriores, apresentando inibição classificada como ativa

As três linhagens fúngicas investigadas demonstraram ser susceptíveis ao óleo essencial de arruda. A menor concentração inibitória encontrada foi 0,25% para *C. albicans* e 0,75% para *C. tropicalis* e *C. glabarata* (Tabela 7). Em relação a análise estatística do tamanho dos halos das cepas fúngicas testadas, houve diferenças significativas entre as cepas.

Em estudos realizados por NOGUEIRA et al. (2008), avaliando a ação antifúngica de o óleo essencial de *Ruta graveolens* na concentração de 4% observaram que todas as cepas de *Cândida* testadas apresentaram inibição com formação de halos de inibição entre 10 a 13 mm diâmetro.

O óleo essencial de arruda não foi eficiente para inibir o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus* e *Aspergillus níger* com halos de inibição entre 3,4 a 7,30 mm, como mostra a Tabela 7. A concentração inibitória mínima foi de 4%, necessitando de 250 µg/mL para se tornar sensível ao óleo.

A ação de óleos essenciais e de seus constituintes promovem degradação da parede celular, alteração na membrana plasmática e nas proteínas de membrana, no fluxo de elétrons e na coagulação do citoplasma de fungos (LUO et al., 2004).

São poucos os estudos que relatam o mecanismo de ação de óleos essenciais na inibição do crescimento e na produção de micotoxinas. A alteração ocorre na permeabilidade da célula, devido às alterações da membrana plasmática que resulta na diminuição dos micélios e formação

de vesículas nas membranas vinculadas no interior das células. Além disso, também foi observada alteração nas membranas de organelas, principalmente das mitocôndrias, e ainda é importante relatar a deleção e destruição dos GEDs (grânulos elétrons densos).

A estrutura e função da membrana plasmática na célula fúngica é essencial para a sobrevivência do fungo, visto que a ocorrência de alterações na síntese ou manutenção da membrana celular resulta geralmente em letalidade. Alguns autores colocam que pode ser consequência da interferência na biossíntese de ergosterol ou uma interação direta com o ergosterol, na alteração do perfil dos ácidos graxos da membrana plasmática, na função da H^+ /ATPase presentes na membrana plasmática, no efluxo de K^+ pela membrana, entre outros fatores (BORELI et al., 2008).

Essas ações são justificadas pela presença de monoterpenos na constituição química, promovendo atividade microbiana por desencadear efeitos tóxicos na estrutura e na função das membranas das células dos microrganismos, como alterações na fluidez e permeabilidade e interação com componentes internos da célula, ações estas, explicadas principalmente pelo caráter lipofílico destas substâncias (TROMBETA et al., 2005).

A baixa atividade antifúngica contra os dermatófitos empregando o óleo essencial de arruda pode estar relacionada com a alta resistência fúngica das cepas em estudo. O óleo essencial em estudo apresentou como fraco agente antifúngico, no controle de *T. mentagrophytes* que necessitou de 300 $\mu\text{g/mL}$ e 240 $\mu\text{g/mL}$ de *M. gypseum* e *T. rubrum* para se tornar sensível ao óleo (Tabela 7).

Os resultados *in vitro* apresentados na Tabela 7 mostram que o óleo essencial de arruda apresentou baixo potencial no controle de *C. neoformans*. A maior resistência dos microrganismos patogênicos é um resultado que não surpreende, e esse fato pode ser uma indicação, de que esses fungos apresentam certos níveis de resistência natural aos

compostos. Nesse estudo foram utilizados 150 µg/mL para se tornar sensível ao óleo.

Entretanto, outras pesquisas são necessárias para obtenção de mais informações sobre a aplicação dos óleos essenciais como agentes antimicrobianos em alimentos e na medicina. Espera-se que o presente trabalho dê suporte à aplicação do óleo essencial de arruda como agente antimicrobiano para serem usados na produção de fitoterápicos.

5.5. Estudo da atividade anticolinesterásica

A atividade anticolinesterásica do óleo essencial de arruda nos resultados *in vitro* apresentou ação inibitória baixa, por apresentarem inibições abaixo de 40% sobre a enzima acetilcolinesterase nas concentrações de 5,0 a 200,0 µg/mL (Tabela 8).

Tabela 8. Atividade anticolinesterásica de óleo essencial de arruda.

Concentrações (µg/mL)	% de Inibição	Classificação
5,0	0,05 ± 0,08	Inativo
25,0	2,47 ± 0,08	Inativo
50,0	6,33 ± 0,05	Inativo
75,0	7,11 ± 0,06	Inativo
100,0	8,23 ± 0,04	Inativo
125,0	10,84 ± 0,07	Inativo
150,0	11,98 ± 0,09	Inativo
170,0	12,03 ± 0,04	Inativo
200,0	14,63 ± 0,08	Inativo
Controle	82,0 ± 0,06	-

Segundo SAVELEV et al. (2003), em seu estudo com o óleo volátil de *Salvia lavandulaefolia* e seus compostos terpênicos isolados, demonstraram que as atividades anticolinesterásicas dos compostos majoritários testados isoladamente nas concentrações encontradas no óleo não foram tão fortes como a proporcionada pelo óleo bruto. Por isso, também é importante ressaltar aqueles compostos cuja ausência de atividade foi comprovada, o que pode auxiliar na compreensão das relações antagonísticas entre os compostos presentes nos óleos voláteis.

Estudos realizados por BARBOSA FILHO et al. (2006) enumeram uma série de compostos já testados quanto ao seu potencial anticolinesterásico, entre os quais os terpenos cânfora, geraniol, linalol, γ -terpineno e terpineol mostraram-se inativos.

Muitos destes compostos não constituem o óleo essencial de *Ruta graveolens* L., porém a inibição da enzima acetilcolinesterase não está relacionada aos teores destes constituintes. Com base estudos anteriores, é reforçada a hipótese de que a inibição da enzima em maior ou menor grau esteja relacionada à ação sinérgica ou antagônica entre os constituintes do óleo.

SAVELEV et al. (2003) sugerem ainda, em seu estudo, que a diluição entre os compostos pode reduzir a inibição da enzima acetilcolinesterase por bloqueio da entrada do substrato no sítio de ligação da enzima e que o período de incubação pode reduzir a atividade de inibidores reversíveis.

Em estudos realizados por SOUZA (2007), que realizou testes empregando os óleos voláteis de populações de *Eupatorium laevigatum* (*C. laevigata*) provenientes de diferentes localidades no Rio Grande do Sul quanto à inibição da enzima acetilcolinesterase, pelo método qualitativo de bioautografia em camada delgada, e observou que o óleo oriundo de Caraá, cujo teor do monoterpeneo α -pineno (6,5%) foi maior, apresentou maior inibição da enzima em relação ao óleo de Canela, cujo teor do mesmo foi equivalente a 0,1%. No mesmo estudo, a laevigatina isolada foi testada pelo mesmo ensaio e revelou-se fracamente ativa. Isso sugeriu

que a atividade exercida pelo óleo volátil de *C. laevigata* oriundo do Rio Grande do Sul não pode ser atribuída à presença desse composto isoladamente.

5.6. Atividade bioinseticida do óleo essencial de arruda no controle de *Acanthoscelides obtectus* Cham.

Na Tabela 08 estão apresentados os resultados do potencial inseticida do óleo de arruda em diferentes concentrações contra *Acanthoscelides obtectus* Cham.

Tabela 9. Efeito do óleo essencial de arruda em diferentes doses ($\mu\text{L}/20\text{g}$ de feijão) na mortalidade e emergência de adultos de *Acanthoscelides obtectus*.

Doses $\mu\text{L}/20\text{g}$ de feijão	Mortalidade (%)	Emergência (%)	Redução da Emergência (%)
0,5	0,0 \pm 0,00	75,64 \pm 0,00	-
1,0	0,0 \pm 0,00	63,06 \pm 0,00	-
2,5	0,0 \pm 0,00	44,11 \pm 0,00	-
5,0	87,6 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	100,0
25,0	100,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	100,0
50,0	100,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	100,0
75,0	100,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	100,0
100,0	100,0 \pm 0,00	0,0 \pm 0,00	100,0
Testemunha	0,0 \pm 0,00	4,80 \pm 1,58	-

De acordo com a Tabela 9, pode-se verificar que o óleo essencial de arruda acima da dose de 25 µL/20g de feijão apresentou maior toxicidade aguda, causando 100% de mortalidade em adultos *Acanthoscelides obtectus* em grãos de feijão. Na concentração de 0,5 µL/20g de feijão não apresentou mortalidade dos insetos em estudo, permitindo porcentagem de emergência de 75,64%.

A eficiência na mortalidade dos insetos adultos pode estar relacionada com o efeito decorrente das ações de contato e ingestão, pois essas características geralmente estão presentes em óleos essenciais (LEE et al., 2003; HUANG et al., 2000). As investigações prévias em relação ao potencial inseticida de óleos essenciais têm mostrado, em geral, que essa toxicidade, constatada para os óleos essenciais de diferentes plantas, sobre pragas de grãos armazenados está relacionada aos componentes majoritários.

Portanto, a toxicidade observada neste trabalho, para o óleo essencial de arruda pode estar relacionada com a presença de 2-nonanona e 2-undecanona (metil-cetonas), principais componentes majoritários de reconhecida eficácia como inseticida. Além disso, sem deixar de levar em consideração o provável efeito sinérgico ou antagônico resultante de outros componentes, presentes no óleo em menor porcentagem.

Com base nos resultados obtidos, existe a possibilidade do uso do óleo essencial de arruda para o controle de insetos em grãos armazenados. Mas, requer maiores investigações à cerca do custo/benefício desta prática e novos estudos são necessários antes de seu uso sistemático.

5.7. Atividade larvicida frente ao *Aedes aegypti* (Linnaeus, 1762)

A atividade larvicida do óleo essencial de *Ruta graveolens* L. extraído das partes aéreas foi testada em seis concentrações diferentes: 20, 50, 70, 90, 100 e 120 µg mL⁻¹, sendo *n* é o número de larvas do

mosquito *Aedes aegypti* utilizadas no ensaio larvicida para cada concentração (totalizando 10 larvas por ensaio).

Para cada concentração os testes foram realizados em quintuplicata. Os dados sobre o número de larvas vivas e de larvas mortas foram encontrados através de uma média das cinco repetições para cada uma das seis concentrações testadas (Tabela 10).

Tabela 10. Mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* após 24 horas de exposição em diferentes concentrações de óleo essencial de arruda.

Dose ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Log dose	Mortos	Vivos	Acumul. mortos	Acumul. vivos	Mortalidade (%)
20	1,3010	1	9	3	19	10
50	1,6989	7	3	6	8	70
70	1,8451	10	0	12	0	100
90	1,9542	10	0	26	0	100
100	2,0000	10	0	34	0	100
120	2,0791	10	0	42	0	100

Número de larvas ($n = 10$).

De acordo com a Tabela 10, a concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ do óleo essencial de arruda apresentou a menor atividade larvicida, matando, em média, uma larva, o que corresponde a 10% de mortalidade. A partir da concentração de $70 \mu\text{g mL}^{-1}$ do óleo essencial a atividade larvicida foi constante, provocando a morte de 100% dos indivíduos testados, ou seja, 10 larvas.

A taxa de percentagem da mortalidade das larvas frente o óleo é mostrada na Figura 27, mostrando-se constante a partir do Log dose 1,8451 (concentração $70 \mu\text{g mL}^{-1}$).

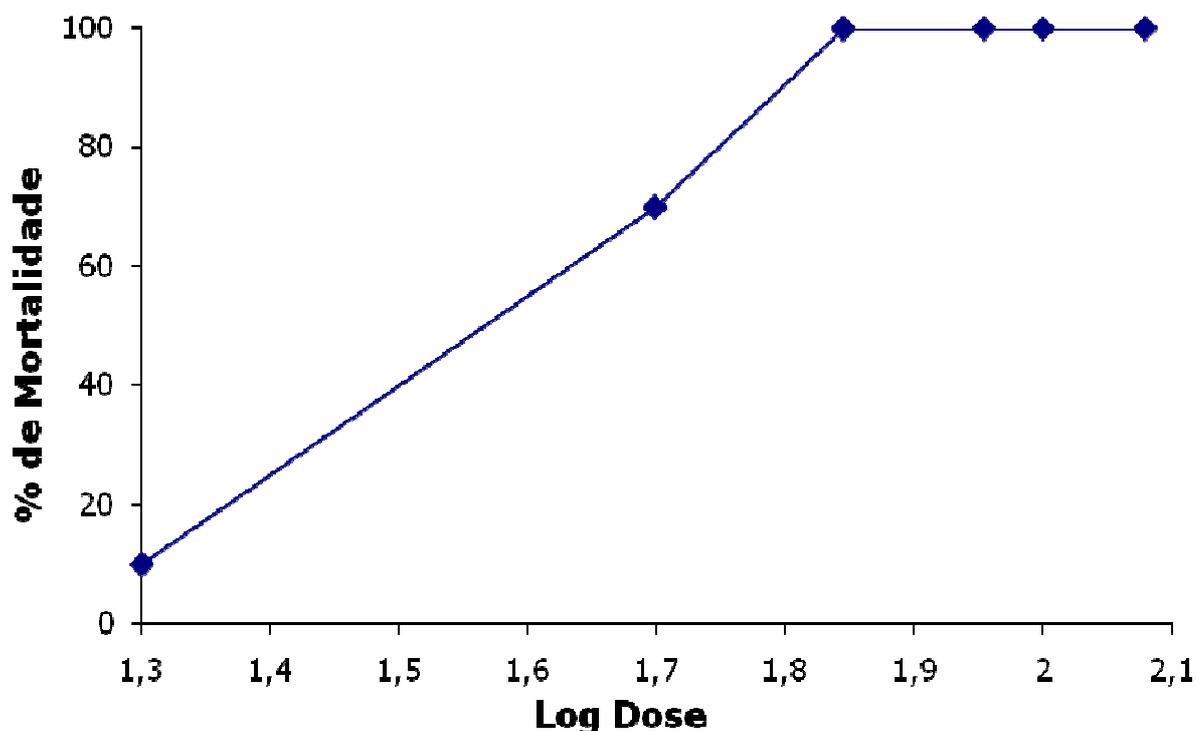


Figura 27. Taxa de mortalidade das larvas do mosquito *Aedes aegypti* expostas a seis concentrações diferentes do óleo essencial de arruda, após 24 horas de exposição.

A Figura 27 mostra que a Concentração Letal 50% (CL_{50}), concentração na qual cinquenta por cento das larvas testadas morrem, foi encontrada próxima ao Log dose 1,8451 (acima da concentração de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$). De acordo com CHENG et al. (2003) valores de $CL_{50} < 100 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados ativos.

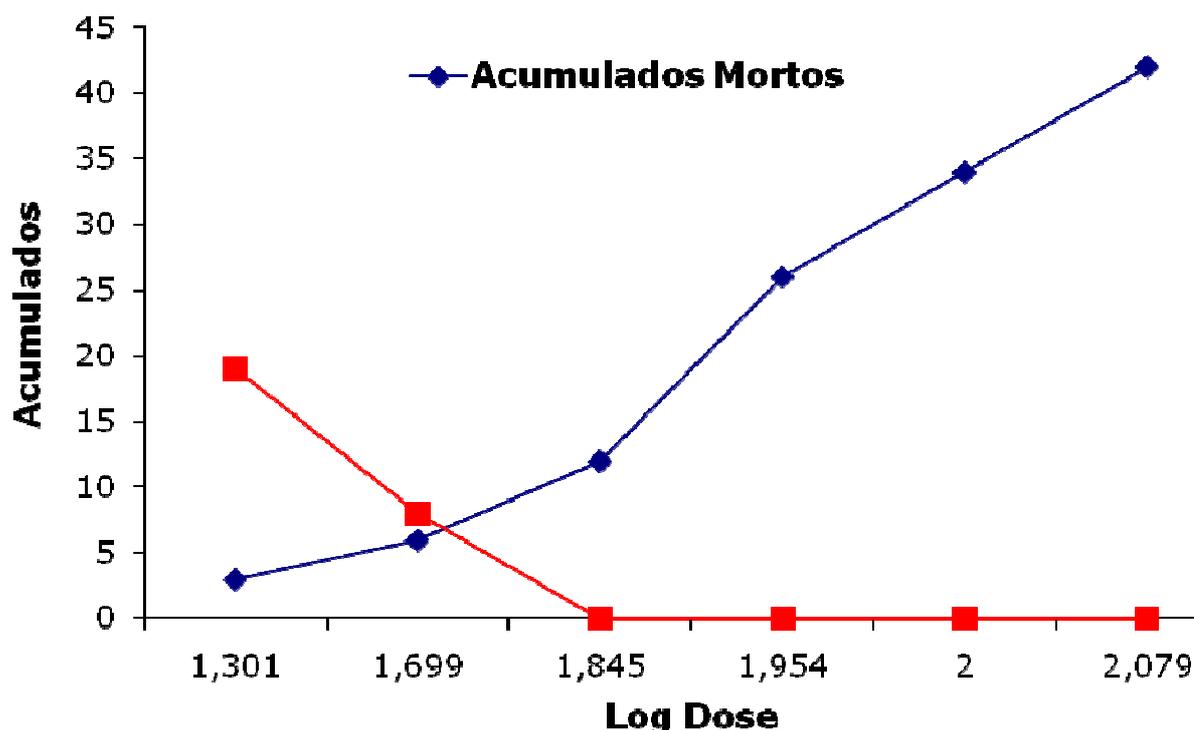


Figura 28. Estimativa da CL_{50} do óleo essencial de arruda pelo método Reed-Muench a partir do acumulado de larvas mortas e vivas em função do logaritmo decimal da dose aplicada. A CL_{50} é o ponto de intersecção das duas curvas.

A dose letal 50% para o óleo essencial de arruda foi calculada através da intersecção das curvas de indivíduos acumulados mortos e indivíduos acumulados vivos (Figura 28), tendo como resultado a concentração de $61,641 \mu\text{g mL}^{-1}$ com um intervalo de confiança de $1,72 \mu\text{g mL}^{-1}$.

A atividade larvicida do óleo essencial de arruda contra o *Aedes aegypti* é devido à presença de compostos terpênicos, alcoóis e aldeídos (LUCIA et al., 2007; LEE, 2006; PANELLA et al., 2005). Os óleos essenciais podem atuar também em enzimas digestivas e neurológicas bem como interagir com o tegumento do inseto (ISMAN, 2006).

De acordo com KIM et al. (2003) demonstraram a importância da relação entre a estrutura química e atividade biológica dos compostos;

reportando que quanto maior a lipofilicidade, maior a penetração no tegumento do inseto.

FURTADO et al. (2005) reportaram em seu estudo a ação larvicida de óleos contendo limoneno, linalol e eugenol frente ao mosquito *Aedes aegypti*. Na ocasião esses compostos foram confirmados como majoritários e apresentaram menores atividades quando testados isoladamente (como ocorreu no presente trabalho). Os autores também sugerem a possibilidade de outros compostos serem responsáveis pela atividade larvicida do óleo essencial ou ainda a existência de um sinergismo entre o composto majoritário e outros componentes do óleo, existentes em menor fração.

Os resultados obtidos no presente estudo poderão contribuir com o controle e a redução da infestação por *Aedes aegypti* em áreas urbanas ou rurais levando-se em consideração a eficácia na mortalidade de larvas, a facilidade de obtenção e preparo dos óleos essenciais sobre o uso de plantas aromáticas com potencial para o desenvolvimento de produtos biotecnológicos.

Além disso, esse estudo confirma a importância do saber popular como base do conhecimento científico e mostram a importância da necessidade de novas alternativas usando produtos de origem natural, especialmente se levarmos em conta que estes podem minimizar a dependência aos inseticidas químicos sintéticos.

CAPÍTULO 6
CONCLUSÃO

6. CONCLUSÃO

Levando em consideração os resultados obtidos, podemos relacionar as seguintes conclusões acerca deste trabalho:

a) As folhas e caules de *Ruta graveolens* L. forneceram um óleo essencial cujo rendimento foi 1,291%, um valor considerável para extração por hidrodestilação.

b) A caracterização por CG-EM possibilitou a identificação de seis componentes do óleo, sendo que o 2-nonanona e 2-undecanona foram os componentes majoritários com 39,17 e 47,21%, respectivamente.

c) Através do método de difusão em disco verificou-se que, a exceção da *Pseudomonas aeruginosa*, todas as bactérias testadas foram mais sensíveis ao óleo essencial das partes áreas das folhas de arruda.

d) O óleo essencial de arruda demonstrou ser um eficiente agente antifúngico contra as leveduras *Cândida albicans*, *Cândida tropicalis* e *Cândida glabarata*.

e) Os resultados *in vitro* do óleo essencial contra os fungos *Saccharomyces cerevisiae*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus Níger*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton mentagrophytes* e *Trichophyton rubrum* não foi eficiente para inibir o crescimento.

f) A atividade anticolinesterásica do óleo essencial de arruda nos resultados *in vitro* apresentou baixa ação inibitória (inibições abaixo de 40%).

g) O óleo essencial extraído das folhas de arruda demonstrou-se um eficiente agente bioinseticida no controle de *Acanthoscelides obtectus* em grãos armazenados, com a porcentagem de 100% mortalidade em adultos com a concentração de 25 µL/20g de feijão.

h) A atividade larvicida do óleo essencial das folhas de *Ruta graveolens* L. frente às larvas do *Aedes aegypti* apresentou atividade larval letal de 50%, na concentração de 61,641 µg mL⁻¹ ao final de 24 horas de monitoramento.

CAPÍTULO 7

PERSPECTIVAS FUTURAS

7. PERSPECTIVAS FUTURAS

- a) Estudos relacionados com a toxicidade da planta;
- b) Realizar a extração do óleo essencial com fluido supercrítico e verificar possíveis alterações na composição química, no rendimento e propriedades físicas;
- c) Estudos das metodologias eletroquímicas para as determinações qualitativas e quantitativas dos outros componentes dos óleos essenciais;
- d) Avaliações da ação do óleo essencial de arruda frente outras bactérias oriundas dos mais diversos tipos de ambientes contaminados;
- e) Investigar a possibilidade de aplicação em insetos resistentes que infestam os grãos armazenados;
- f) Isolar e testar como agentes larvicidas outros componentes do óleo essencial de arruda;
- g) Investigar o efeito residual do óleo essencial das folhas no ambiente (persistência larvicida);
- h) Testar o óleo em diferentes intervalos de temperatura para verificar se há resposta no monitoramento das larvas do mosquito *Aedes aegypti*;
- i) Testar o hidrolato do óleo essencial de arruda como agente inseticida contra insetos em grãos armazenados e larvicida do mosquito *Aedes aegypti*.

CAPÍTULO 8

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS

ABO, K. A.; FRED-JAIYESIMI, A. A.; JAIYESIMI, A. E. A. Ethnobotanical studies of medicinal plants used in the management of diabetes mellitus in South Western Nigeria. **Journal of Ethnopharmacology**, v.115, p.67-71, 2008.

ABUBAKAR, M. S.; MUSA, A. M.; AHMED, A.; HUSSAINI, I. M. The perception and practice of traditional medicine in the treatment of cancers and inflammations by the Hausa and Fulani tribes of Northern Nigeria. **Journal of Ethnopharmacology**, v.111, p.625-629, 2007.

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. 4.ed. Carol Stream, Illinois: Allured, 2007.

AGRA, M. F; FRANÇA, P.F; BARBOSA-FILHO, J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Rev Bras Farmacogn** 17: 114-140, 2007.

AHARONI, A.; JONGSMA, M. A.; KIM, T. Y.; RI, M. B.; GIRI, A. P.; VERSTAPPEN, F. W. A.; SCHWAB, W.; BOUWMEESTER, W. A. Metabolic engineering of terpenoid biosynthesis in plants. **Phytochemistry Reviews**. 5: 49-58. 2006.

AKOB, C. A.; EWETE, F. K. The efficacy of ashes of four locally used plant materials against *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae) in Cameroon. **International Journal of Tropical Insect Science**. v.27, p.21-26, 2007.

ALBARICI, T. R.; VIEIRA, P. C., FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G.; PIRANI, J. R. Cumarinas e alcaloides de *Rauia resinosa* (Rutaceae). **Química Nova**, Vol. 33, No. 10, 2130-2134, 2010.

ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; SANTOS, H. S. dos; SOUZA, E. B. de, SILVA, R. M. da; SILVA, J. E.; MENEZES, A. de; PESSOA, O. D. L.; BRAZ-FILHO, R.; COSTA, S. M. O. Composição química volátil e não-volátil de *Eupatorium ballotifolium* Kunth, Asteraceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy** 20(4): 615-620, Ago./Set, 2010.

AL-QURAINY, A.; KHAN, S.; ALI, M. A.; FAHAD, M.; AL-HEMAID, MOHAMED, T.; ASHRAF, M. Authentication of *Ruta graveolens* and its adulterant using internal transcribed spacer (ITS) sequences of nuclear ribosomal DNA. **Pak. J. Bot.**, 43(3): 1613-1620, 2011.

ALVES, M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M. Biological screening of brasilian medicinal plants. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000.

ARRUDA, T. A.; ANTUNES, R. M. P.; CATÃO, R. M. R.; LIMA, E. O.; SOUSA, D. P.; NUNES, X. P.; PEREIRA, M. S. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, E. V. L. Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.16, p.307-311, 2006.

AVATO, P.; FORTUNATO, I. M.; RUTA, C.; D'ELIA, R. Glandular hair and essential oils in micropopagated plants of *Salvia officinalis* L. **Plant Science**, 2005.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, B.; IDAOMAR, M.. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**. 46: 446-475, 2008.

BARBOSA-FILHO, J. M.; MEDEIROS, K.C.P.; DINIZ, M. F. F. M.; BATISTA, L. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; ALMEIDA, J. R. G. S.; QUINTANS-JÚNIOR, L. J. Natural products inhibitors of the enzyme acetylcholinesterase. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 16(2): 258-285, 2006.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, pp. 679-688, 2009.

BATISTUZZO, J. A. O.; ITAYA, M.; ETO, Y. **Formulário médico-farmacêutico**, Tecnopress, 2000.

BERNARDO, L. C.; DE OLIVEIRA, M. B.; DA SILVA, C. R.; DANTAS, F. J.; DE MATROS, J. C.; CALDEIRA DE ARAÚJO, A.; MOURA, R. S.; BERNARDO FILHO, M. Biological effects of rutin on the survival of *Escherichia coli* AB1157 and on the electrophoretic mobility of plasmid PUC9.1 DNA. **Cell. Mol. Biol**, n.48, n.5, p.517-520, 2002.

BERTINI, L. M.; PERERIRA, F. A.; OLIVEIRA, C. L. L.; MENEZES, E. A.; MORAIS, S. M.; CUHA, F. A.; CAVALCANTI, E. Perfil de sensibilidade de bactérias frente a óleos essenciais de algumas plantas do nordeste do Brasil. **Infarma**, v.17, n.3/4, p.80-83, 2005.

BIASI, L. A.; DECHAMPS, C. **Plantas aromáticas do cultivo à produção de óleo essencial**. 1 ed. Layer Studio Grafico e Editora Ltda, Curitiba, 2009. 160 p.

BIZZO, H. R., HOVELL, A. M. C., REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, pp. 588-594, 2009.

BORELI, C.; SCHALLER, M.; NIEWERTH, M.; NOCKER, K.; BAASNER, B. Modes of action of the new arylguanidine abafungin beyond Interference with ergosterol biosynthesis and in vitro activity against medically important fungi. **Chemotherapy**, v.54, n.4, p.245-259, 2008.

BOTELHO, M. A.; NOGUEIRA, N. A. P.; BASTOS, G. M.; FONSECA, S. G. C.; LEMOS, T. L. G.; MATOS, F. J. A.; MONTENEGRO, D.; HEUKELBACH, J.; RAO, V. S.; BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. **Brazilian journal of medical and biological research** 40: 349-356. 2007.

BOUCHRA, C.; ACHOURI, M.; IDRISSE, H. L. M.; HMAMOUCHE, M. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea* Pers. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, pp. 165-169, 2003.

BRAGA, T. V. **Avaliação da atividade farmacológica de *Cissus verticillata* Nicolson & C. E. Jarvis subsp *verticillata* como antioxidante, antifúngico, hipoglicemiante e cicatrizante.** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto, 2008.

BRUNI, R.; MEDICI, A.; ANDREOTTI, E.; FANTIN, C.; MUZZOLI, M.; DEHESA, M.; ROMAGNOLI, C.; SACCHETTI, G. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm (Lauraceae) flower calices. **Food Chem.**, v. 85, p. 415-421, 2004.

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

CÂNDIDA, M. Revista diversa, v.27, dezembro/janeiro 2003. Belo Horizonte, MG: Universitária, UFMG. 2003-. Anual. Disponível em: <www.ufmg.br/diversa.htm>. Acesso em: 10 jan. 2009.

CHENG, S. S. et al., Bioactivity of selected plant essential oils against the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* larvae. **Bioresource Technology**. n.89, p. 99-102, 2003.

CHUTIA, M.; BHUYAN, P. D.; SARMA, T. C.; BORUAH, P. Antifungal activity and chemical composition of Citrus reticulata Blanco essential oil against phytopathogens from North East India. **LWT – Food Science and Technology**, v. 42, n. 3, pp. 777-780, 2009.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). **Performance standards for antimicrobial disk and dilution susceptibility tests for bacteria isolated from animals; approved standard.** 4^a ed. Wayne, Pennsylvania: CLSI, 99p., 2009.

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. Bioactive natural products: detection, isolation, an structural determination. **Boca Raton**: CRC, 1993.

COSTA, J. F. O.; JUIZ, P.; PEDRO, A. S.; DAVID, J. P. DE L.; DAVID, J. M.; GIULIETTI, A. M.; FRANÇA, F.; SANTOS, R. R. DOS; SOARES, M. B. P. Immunomodulatory and antibacterial activities of extracts from Rutaceae species. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy** 20(4): 502-505, Ago./Set. 2010.

COX, S. D.; MANN, C. M.; MARKHAM, J. L.; BELL, H. C.; GUSTAFSON, J. E.; WARMINGTON, J. R.; WYLLIE, S. G. The mode of antimicrobial action of essential oil of *Melaleuca alternifolia* (tea tree oil). **Journal. Applied. Microbiology.** v.88, p.170-175, 2000.

DE FEO, V.; DE SIMONE; F; SENATORE, F. Potential allelochemicals from the essential oil of *Ruta graveolens*. **Phytochemistry.** 2002; 61: 573-578.

DE LA CRUZ, M. G. **Plantas Medicinais de Mato Grosso:** a farmacopéia popular dos raizeiros. Cuiabá: Carlini & Caniato Editorial, 2008.

DI PASQUA, R.; HOSKINS, N.; BETTS, G.; MAURIELLO, G. Changes in membrane fatty acids composition of microbial cells induced by addition of thymol, carvacrol, limonene, cinnamaldehyde, and eugenol in the growing media. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, p. 2745- 2749, 2006.

DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; SOUZA-BRITO, A. R. B.; MARIOT, A.; SANTOS, C. M. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica.** 2. ed. rev. e ampl. - São Paulo: Editora UNESP, 2002.

DONG, N. T.; BAE, K.; KIM, Y. H.; HWANG, G. S.; HEO, O. S.; KIM, S. E.; KANG, J. S. Quantitative determination of psoralen and angelicin from some medicinal herbs by high performance liquid chromatography. **Archives of Pharmacal Research.** v. 26, n. 07. p. 516-520, 2003.

DUARTE, M. C.; LEME, E. E.; DELARMELENA, C.; SOARES, A. A.; FIGUEIRA, G. M.; SARTORATTO, A. Activity of essential oils from Brazilian medicinal plants on *Escherichia coli*. **Journal of ethnopharmacology** 111: 197-202, 2007.

DUTRA, R. C.; BRAGA, F. G.; COIMBRA, E. S.; SILVA, A. D.; BARBOSA, N. R. Atividades antimicrobiana e leishmanicida das sementes de *Pterodon emarginatus* Vogel. **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy** 19(2A): 429-435, Abr./Jun. 2009.

EDRIS, A. E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**. 21: 308-323, 2007.

EL-ROKIEK, K.G.; EID, R.A. Allelopathic effects of *Eucalyptus Citriodora* On Amaryllis And Associated Grassy Weed. **Planta Daninha**, v.27, p.887-899, 2009.

FERREIRA, M. J. P. Computer-aid method for identification of components in essential oils by ^{13}C NMR spectroscopy. **Analytica Chimica Acta**, n. 447, p. 125-134, 2001.

FERRONATTO, R. **Análise química e antimicrobiana do óleo essencial de *Helietta apiculata* Benth. (Rutaceae)**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Comunitária Regional de Chapecó, em Mestre em Ciências Ambientais. Chapecó - SC, fevereiro, 2010.

FLORÃO, A. **Avaliação de atividades biológicas de óleos essenciais de quatro espécies de *Baccharis*, Asteraceae**. Dissertação apresentada como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas Universidade Federal do Paraná, 2006.

FURTADO, R. F.; LIMA, M. G. A.; ANDRADE NETO, M.; BEZERRA, J. N. S.; SILVA, M. G. Atividade larvicida de óleos essenciais contra *Aedes aegypti* L. (Diptera: Culicidae). **Neotropical Entomology**, 34:5, 843-847, Sep.-Oct. 2005.

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature chemical biology** 3(7): 408-414, 2007.

GINA, M.; ROJAS, L.; USUBILLAGA, A. Estudio del aceite esencial de *Ruta graveolens* L. que crece en el Estado Mérida, Venezuela. **Rev Fac Farm**. 2008; 50 (1): 7-9.

GIORDANI, R.; HADEF, Y.; KALOUSTIAN, J. Compositions and antifungal activities of essential oils of some Algerian aromatic plants. **Fitoterapia**, v. 79, p. 199-203, 2008.

HANAMATHAGOUDA, M. S.; KAKKAMELI, S. B.; NAIK, P. M.; NAGELLA, P.; SEETHARAMAREDDY, H. R.; MURTHY, H. N. Essential oils of *Lavandula bipinnata* and their antimicrobial activities. **Food Chemistry**, v. 118, pp. 836-839, 2010.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ D. A. G.; NAKAMURA C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97(7), 1027-1031, 2002.

HONG, E. J.; NA, K. J.; CHOI, I. G.; CHOI, K. C.; JEUNG, E. B. Antibacterial and antifungal effects of essential oils from coniferous trees. **Biological and pharmaceutical bulletin** 27: 863-866, 2004.

HOWES, M. J. R.; HOUGHTON, P. J. Plants used in Chinese and Indian traditional medicine for improvement of memory and cognitive function. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**. 75: 513-527, 2003.

HUANG, Y.; LAM, S. L.; HO, S. H. Bioactivities of essential oil from *Ellateria cardamomum* (L.) Maton. to *Sitophilus zeamais* Motschulsky and *Tribolium castaneum* (Herbst). **Journal of Stored Products Research**, v.36, p.107-117, 2000.

INOUE, Y.; SGIRAIISHI, A.; HADA, T.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H.; SHIMADA, J. The antibacterial effects of terpene alcohols on *Staphylococcus aureus* and their mode of action. **FEMS microbiology letters** 237: 325-331, 2004.

ISMAN, M. B. Botanical insecticides, deterrents, and repellents in modern agriculture and an increasingly regulated world. **Annual Review of Entomology**, 51: 45-66, 2006.

JANUÁRIO, A. H.; VIEIRA, P. V.; DA SILVA, M. F. DAS G. F.; FERNANDES, J. B.; SILVA, J. J. DE B.; CONSERVA, L. M. Alcaloides β -indolopiridoquinazolínicos de *Esenbeckia grandiflora* Mart. (Rutaceae). **Química Nova**, Vol. 32, No. 8, 2034-2038, 2009.

KABEH, J. D.; JALINGO, M. G. D. S. S. Pesticidal effect of bitter leaf plant *Vernonia amygdalina* (Compositae) leaves and pirimiphos-methyl on larvae of *Callosobruchus maculatus* (Coleoptera: Bruchidae) and *Sitophilus zeamais* (Coleoptera: Curculionidae). **International Journal of Agriculture and Biology**, p.452-454, 2007.

KAMINSKI, M.; KARTANOWICZ, R.; KAMINSKI, M. M.; KROLICKA, A.; SIDWA GORYCKA, M.; LOJKOWSKA, E.; GORZEN, W. HPLC-DAD in identification and quantification of selected coumarins in crude extracts from plant cultures of *Ammi majus* and *Ruta graveolens*. **Journal of Separation Science**. v. 26, n. 14, p. 1287-1291, 2003.

KELEN, M.; TEPE, B. Chemical composition, antioxidant and antimicrobial properties of the essential oils of three *Salvia* species from Turkish flora. **Bioresource Technology** 99: 4096-4104, 2008.

KIM, E. H.; KIM, H. K.; CHOI, D. H.; AHN, Y. J. A acaricidal activity of clove bud oil compounds against *Tyrophagus putrescentiae* (Acari: Acaridae). **Applied Entomology and Zoology**, 38(2): 261-266, 2003.

KORDALI, S.; CAKIR, A.; OZER, H.; CAKMAKCI, R.; KESDEK, M.; METE, E. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from *Turkish Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and α -cymene. **Bioresource Technology**, doi: 10.1016/j.biortech.2008.04.048, 2008.

KOSALEC, I.; PEPELJNJAK, S.; KUSTRAK, D. Antifungal activity of fluid extract and essential oil from anise fruits (*Pimpinella anisum* L., Apiaceae). **Acta Pharm.**, v. 55, p. 377-385, 2005.

LAHLOU, M. Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. **Flavour and fragrance journal** 19: 159-165, 2004.

LEE, H. S.; PETERSON, C. J.; COATS, J. R. Fumigation toxicity of monoterpenoids to several stored product insects. **Journal of Stored Products Research**, v.39, p.77-85, 2003.

LEE, H.S. Mosquito larvicidal activity of aromatic medicinal planta oils against *Aedes aegypti* and *Culex pipiens pallens*. **J. Am. Mosq. Control Assoc.**, 22:292-295, 2006.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia** 16: 197-201, 2006a.

LIMA, I. O.; OLIVEIRA, R. A. G.; LIMA, E. O.; FARIAS, N. M. P.; SOUZA, E. L. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**. 16(2):197-201, 2006b.

LIMA, M. E. L.; CORDEIRO, I.; YOUNG, M. C. M.; SOBRAL, M. E. G.; MORENO, P. R. H. Antimicrobial activity of essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) R. L. Landrum (Myrtaceae) native from São Paulo State - Brazil. **Pharmacology on line**. 3:589:593, 2006c.

LIU, C. H.; MISHRA, A. K.; TAN, R. X. Repellent, insecticidal and phytotoxic activities of isoeugenol from *Inula racemosa*. **Crop Protection**, v.25, p.508-511, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil**. Nova Odessa, SP. Instituto Plantarum, 2002.

LUCIA, A.; GONZÁLEZ, A.P.; SACCACINI, E.; LICASTRO, S.; ZERBA, E.; MASUH, H. Larvicidal effect of *Eucalyptus grandis* essential oil and turpentine and their major components on *A. aegypti* larvae. **J Am Mosq Control Assoc**, 23:293-303, 2007.

LUO, M.; JIANG, L. K.; HUANG, Y. X.; ZUO, G. L. Effects of citral on *Aspergillus flavus* Spores by quasi-elastic light scattering and multiplet microanalysis techniques. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 46, n. 4, p. 277-283, 2004.

MAO, L.; HENDERSON, G. Evaluation of potential use of nootkatone against maize weevil (*Sitophilus zeamais* Motschulsky) and rice weevil [*S. oryzae* (L.)] (Coleoptera:Curculionidae). **Journal of Stored Products Research**, v.46, p.129-132, 2010.

MARTINS, A. G. et al. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais, alimentares e tóxicas da Ilha do Combu, Município de Belém, Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, Rio de Janeiro, v. 86, n. 1, p. 21-30, 2005.

McGAW, L. J.; ELOFF, J. N. Ethnoveterinary use of southern African plants and scientific evaluation of their medicinal properties. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, p. 559-574, 2008.

MEJRI, J.; ABDERRABBA, M.; MEJRI, M. Chemical composition of the essential oil of *Ruta chalepensis* L: Influence of drying, hydro-distillation duration and plant parts. **Industrial Crops and Products**. 32: 671-673, 2010.

MEZZOMO, N. **Óleo de amêndoa de pêsego: avaliação da técnica de extração, da qualidade dos extratos e parâmetros para ampliação de escala**. Dissertação de mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, 136 p. Florianópolis, 2008.

MIYAZAWA, M.; YAMAFUJI, C. Inhibition of acetylcholinesterase activity by bicyclic monoterpenoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 53: 1765-1768, 2005.

NASCIMENTO, E. A.; PINHEIRO, A. L. Análise dos constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* cheil. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 6, n. 1, pp. 63-70, 2007.

NOGUEIRA, J. C. R.; DINIZ, M.F.M.; LIMA, E. O. Atividade antimicrobiana *in vitro* de produtos vegetais em otite externa aguda. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**. Vol. 74, p.118-124, 2008.

NOVACOS, R.; LAUTH, R. A. T. Atividade Antimicrobiana Sinérgica entre óleos essenciais de Lavanda (*Lavandula officinalis*), Melaleuca (*Melaleuca alternifolia*), Cedro (*Juniperus virginiana*), Tomilho (*Thymus vulgaris*) e Cravo (*Eugenia caryophyllata*). **Revista Analytica**, n. 21, fev./mar., 2006.

NUNES, X. P.; MAIA, G. L. A.; ALMEIDA, JR. G. S.; PEREIRA, F. O.; LIMA, E. O. Antimicrobial activity of the essential oil of *Sida cordifolia* L. **Revista Brasileira Farmacognosia**, v.16, p.642-644, 2006.

OLIVEIRA, A. L. T. T. L. *Ruta graveolens* L. (Arruda). Curitiba, 2011. Disponível em: http://www.esalq.usp.br/siesalq/pm/monografia_ruta_graveolens.pdf. Acesso em: 20 jun. 2011.

OUSSALAH, M.; CAILLET, S.; LACROIX, M. Mechanism of action of Spanish oregano, Chinese cinnamon, and savory essential oils against cell membranes and walls of *Escherichia coli* O157:H7 and *Listeria monocytogenes*. **J. Food Prot.**, v. 69, p. 1046–1055, 2006.

OWEN, S. M.; PEÑUELAS, J. Opportunistic emissions of volatile isoprenoids. **Trends in plant science** 10 (9): 420-426, 2005.

OYEDEJI, O. A.; ADENIJI, B. A.; AJAYI, O.; KONIG, W. A. Essential oil composition of *Piper guineense* and its antimicrobial activity: Another chemotype from Nigeria. **Phytotherapy Research**, v.19, p 362-364, 2005.

PANELLA, N. A.; DOLAN, M. C.; KARCHESY, J. J.; XIONG, Y.; PERALTA-CRUZ, J.; KHASAWNEH, M. Use of novel compounds for pest control: insecticidal and acaricidal activity of essential oils components from heartwood of Alaska yellow cedar. **J Med Entomol**, 42:352-8, 2005.

PAREKH, J.; CHANDA, S. V. *In vitro* antimicrobial activity and phytochemical analysis of some Indian medicinal plants. **Turk J. Biol.** v.31, p.53-58. 2007.

PAULI, A. Anticandidal low molecular compounds from higher plants with special reference to compounds from essential oils. **Med. Res. Rev.**, v. 26, p. 223–268, 2006.

PERVEEN, A.; QAISER M. Pollen Flora of Pakistan -XIV. Rutaceae. **Pakistan Journal of Botany**, Paquistão, v. 37, n.3, p. 495-501, 2005.

PINO, J. A.; MARBOT, R.; PAYO, A.; CHAO, D.; HERRERA, P. Aromatic plants from western Cuba VII. Composition of the leaf oils of *Psidium wrightii* Krug et Urb., *Lantana involucrata* L., *Cinnamomum montanum* (Sw.) Berchtold et J. Persl. And *Caesalpinia violaceae* (Mill.) Standley. **Journal of Essential Oil Research** **18**: 170-174, 2006.

PIRANI, J. R.; GROppo, M. EM CATÁLOGO DE ESPÉCIES DE PLANTAS E FUNGOS DO BRASIL; FORZZA, R. C.; LEITMAN, P. M.; COSTA, A.; DE CARVALHO JR., A. A.; PEIXOTO, A. L.; WALTER, B. M. T.; BICUDO, C.; ZAPPI, D.; DA COSTA, D. P.; LLERAS, E.; MARTINELLI, G.; DE LIMA, H. C.; PRADO, J.; STEHMANN, J. R.; BAUMGRATZ, J. F. A.; PIRANI, J. R.; SYLVESTRE, L. S.; MAIA, L. C.; LOHMANN, L. G.; PAGANUCCI, L.; SILVEIRA, M.; NADRUZ, M.; MAMEDE, M. C. H.; BASTOS, M. N. C.; MORIM, M. P.; BARBOSA, M. R.; MENEZES, M.; HOPKINS, M.; SECCO, R.; CAVALCANTI, T.; SOUZA, V. C., ORGS. **Jardim Botânico do Rio de Janeiro**: Rio de Janeiro, p. 1592-1600, 2010.

PIZZI, M. Sampling variation of the fifty percent end-point, determined by the Reed-Muench (Behrens) Method. **Human Biol.**, 22, 151-190, 1950.

POURMORTAZAVI, S. M.; HARJIMIRSADEGHI, S. S. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. **Journal of chromatography A** 1166: 2-24, 2007.

RAGGI, L. **Estudo da composição química e das atividades biológicas de óleos voláteis de espécies de Lauraceae, em diferentes épocas do ano**. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente). Secretaria do Meio Ambiente - Instituto de Botânica de São Paulo, São Paulo, 67 p., 2008.

RAVEN, P. H.; EVERT, R. F.; EICHHORN, S. E. **Biologia Vegetal**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2007.

REED, L. J.; MUENCH, H. A simple method of estimating fifty per cent end-points. **Amer. J. Hyg.**, **27**:493-7, 1938.

REICHLING, J.; KOCH, C.; STAHL-BISKUP, E.; SOJKA, C.; SCHNITZLER, P. Virucidal activity of a beta-triketone-rich essential oil of *Leptospermum scoparium* (manuka oil) against HSV-1 and HSV-2 in cell culture. **Planta Med.**, v. 71, p. 1123-1127, 2005.

RHEE, I. K.; MEENT, M.; INGKANINAN, K.; VERPOORTE, R. Screening for acetylcholinesterase inhibitors from Amaryllidaceae using silica gel thin layer chromatography in combination with bioactivity staining. **Journal of chromatography** 915 : 217-223, 2001.

RIM, I. S.; JEE, C. H. Acaricidal effects of herb essential oils against *Dermatophagoides farinae* and *D. pteronyssinus* (Acari: Pyroglyphidae) and quantitative analysis of a herb *Mentha pulegium* (pennyroyal). **Korean Journal of Parasitology**, 44: 133-138, 2006.

RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M. Early steps in isoprenoids biosynthesis: multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells. **Phytochemistry Reviews**. 5: 1-15, 2006.

ROTA, C.; CARRAMINARA, J. J.; BURILLO, J.; HERRERA, A. In vitro antimicrobial activity of essential oils from aromatic plants against selected foodborne pathogens. **Journal of Food Protection**, v. 67, pp. 1252-1256, 2004.

RUSTAIYAN, A; KHOSSRAVI; M.; SULTANI-LOTFABADIF, Y. M. Constituents of the essential oil of *Ruta chalepensis* from Iran. **J. Essent. Oil Res.** 2002; 14: 378-379.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in food. **Food Chem.**, v. 91, p. 621-632, 2005.

SALVAGNINI, L. E.; OLIVEIRA, J. R. S.; SANTOS, L. E. dos; MOREIRA, R. R.; PIETRO, R. C. L. R. Avaliação da Atividade Antibacteriana de folhas de *Myrtus communis* L. (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia Brazilian Journal of Pharmacognosy** 18(2): 241-244, Abr./Jun. 2008.

SANTOS, L. M.; SENS, R. C. V.; DIAS, J. F. G.; BALESTRIM, L; KALEGARI, M; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. Avaliação da atividade alelopática de *Ruta graveolens* L. (Rutaceae) na germinação e crescimento de sementes de *Lactuca sativa* cv. Babá. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v.10, n.1, Jan. - Jun./2009 - ISSN 1518-5192.

SANTOS, M. R. A; LIMA, M. R; FERREIRA, M. G. R. Uso de plantas medicinais pela população de Ariquemes, em Rondônia. **Horticultura Brasileira**, 26: 244-250, 2008.

SANTOS, S. C.; FERREIRA, F. S.; ROSSI-ALVA, J. C.; FERNANDEZ, L. G. Atividade antimicrobiana *in vitro* do extrato de *Abarema cochiliocarpus* (Gomes) Barnaby & Grimes. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, n.2, p.215-219. 2007.

SANTOS, V. L.; SOUZA, M. F. V.; BATISTA, L. M.; SILVA, B. A.; LIMA, M .S.; SOUZA, A. M. F.; BARBOSA, F. C.; CATÃO, R. M. R. Avaliação da atividade antimicrobiana de *Maytenus rigida* Mart. (Celastraceae). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.13, n.1, p.68-72, 2011.

SARTORELLI, P.; MARQUIORETO, A. D.; AMARAL-BAROLI, A.; LIMA, M. E.; MORENO, P. R. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oils from two species of *Eucalyptus*. **Phytother**, v. 21, pp. 231-233, 2007.

SARTÓRIO, M. L; TRINDADE, C.; RESENDE, P.; MACHADO, J. R. **Cultivo de plantas medicinais**. Viçosa, MG: Aprenda Fácil. 260p., 2000.

SAVELEV, S.; OKELLO, E.; PERRY, N. S. L.; WILKINS, R. M.; PERRY, E. K. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenóides in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. **Pharmacology, biochemistry and behavior** 75: 661-668, 2003.

SCHNITZLER, P.; KOCH, C.; REICHLING, J. Susceptibility of drug-resistant clinical HSV-1 strains to essential oils of Ginger, Thyme, Hyssop and Sandalwood. **Antimicrobial agents and chemotherapy** 51: 1859-1862, 2007.

SERRA, J. L. **Efeito inibitório do óleo essencial do Eucalyptus sp frente a diferentes cepas de Escherichia coli e Staphylococcus aureus**. São Luís, Universidade Federal do Maranhão, Monografia de Graduação. 2008, 53p.

SHADOMY, S.; ESPINELL-INGROFF, F. Methods for bioassay of antifungal agents in biologic fluids. In: O' LEARY W. (Ed) **Practical Handbook of Microbiology**. CRC Press, 2000. p. 631-641.

SILVEIRA, L. M. S. et al. Metodologias de atividade antimicrobiana aplicadas a extratos de plantas: comparação entre duas técnicas de ágar difusão. **Revista Brasileira de Farmácia**, v.90, n.2, p.124-8, 2009.

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER F.X.; KIEMLE D.J. **Identificação Espectrométrica de Compostos Orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro, Livros Técnicos e Científicos S.A., 2007. 490p.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; PETROVICK, L. A. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 2007.

SONBOLI, A.; BABAKHANI, B.; MEHRABIAN, A. R. Antimicrobial activity and composition of six constituents of essential oil from *Salvia*. **Zeitschrift für Naturforschung**. 61: 160-164, 2006.

SONBOLI, A.; EFTEKHAR, F.; YOUSEFZADI, M.; KANANI, M. R. Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Grammosciadium platycarpum* Boiss. from Iran. **Zeitschrift für Naturforschung**. 60: 30-34, 2005.

SOUZA, E. L.; STAMFORD, T. L. M.; LIMA, E. O.; TRAJANO, V. N. Effectiveness of *Origanum vulgare* L. Essential oil to inhibit the growth of food spoiling yeasts. **Food Control**, v. 18, pp. 409-413, 2007.

SOUZA, T. J. T. **Determinação da composição química e avaliação preliminar das atividades antioxidante e anticolinesterásica dos óleos voláteis de espécies de Eupatorium L. (Asteraceae).** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** 2. ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 2005. 703 p.

STEFLITSCH, W.; STEFLITSCH, M. Clinical aromatherapy. **Journal of Men's Health**, v. 5, n. 1, pp. 74-85, 2008.

TAVARES, E. S; JULIÃO, L. S; LOPES, D; BIZZO, H. R; LAGE, C. L. S; LEITÃO, S. G. Análise do óleo essencial de folhas de três quimiotipos de *Lippia alba* (Mill.) N. E. Br. (Verbenaceae) cultivados em condições semelhantes. **Rev Bras Farmacogn** 15: 1-5, 2005.

TEGOS, G; STERMITZ, F. R.; LOMOVSKAYA, O. Multidrug pump inhibitor uncover remarkable activity of plant antimicrobials. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.46, p.3133-3141, 2002.

TROMBETA, D.; CASTELLI, F.; SARPIETRO, M. G.; VENUTI, V.; CRISTANI, M.; DANIELE, C. S.; MAZZANTI, G.; BISIGNANANO, G. Mechanisms of Antibacterial Action of Three Monoterpenes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, n.6, p. 2474-2478, 2005.

TZAKOU, O; COULADIS M. Essential oil of *Ruta chalepensis* L. from Greece. **J Essent Oil Res.** 2001; 13: 258-259.

VÁGI, E.; SIMÁNDI, B.; SUHAJDA, A.; HÉTHELVI, É. Essential oil composition and antimicrobial activity of *Origanum majorana* L., extracts obtained with ethyl alcohol and supercritical carbondioxide. **Food Research International**, 38, p. 51-57, 2005.

VALGAS, C.; SOUZA, S. M.; SMÂNIA, E. F.; SMÂNIA, J. Screening methods to determine antibacterial activity of natural products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 38, p. 369-380, 2007.

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

VIEIRA, M. J. **Análise do setor de plantas medicinais e fitoterápicos - como alternativa de desenvolvimento regional para o estado de Santa Catarina**. Dissertação de Mestrado em Desenvolvimento Regional – Programa de Mestrado em Desenvolvimento Regional, UNC, Canoinhas. 2008. 112 p

VILELA, G. R.; ALMEIDA, G. S.; D_ARCE, M. A. B. R.; MORAES, M. H. D.; BRITO, J. O., SILVA, M. F. G. F.; SILVA, S. C. ; PIEDADE, S. M. S.; CALORI - DOMINGUES, M. A.; GLORIA, E. M. Activity of essential oil its major compounds 1,8 - cineole from Eucalyptus globules, against the storage fungi *Aspergillus avus* and *Aspergillus parasiticus*. **Journal. Of Stored Products Research**, v.45, p.108-111, 2009.

WINWARD, G. P.; AVERY, L. M.; STEPHENSON, T.; JEFFERSON, B. Essential oils for the disinfection of grey water. **Water Research**, v. 42, pp. 2260-2268, 2008.

YAMASHITA, O. M.; FERNANDES NETO, E.; CAMPOS, O. R.; GUIMARÃES, S. C. Fatores que afetam a germinação de sementes e emergência de plântulas de arruda (*Ruta graveolens* L.). **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, v.11, n.2, p.202-208, 2009.

YI, Z.; YU, Y.; LIANG, Y.; ZENG, B. In vitro antioxidant and antimicrobial activities of the extract of *Pericarpium Citri Reticulatae* of a new Citrus cultivar and its mains flavonoids. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, n. 4, pp. 597-603, 2008.

ZUCCHI, R. A. **Moscas-das-frutas de importância econômica do Brasil**: conhecimento básico e aplicado. Ribeirão Preto: FAPESP-Holos, 2000.