

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Faculdade de Farmácia**

**Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia**

**Atividade anti *Listeria monocytogenes* dos monoterpenos e dos sesquiterpenos de óleo essencial de *Heterothalamus psiadioides***

**Kamila Patikowski Cheiran**

**Porto Alegre, junho de 2015.**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL**

**Faculdade de Farmácia**

**Disciplina de Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia**

**Atividade anti *Listeria monocytogenes* dos monoterpenos e dos sesquiterpenos de óleo essencial de *Heterothalamus psiadioides***

**Kamila Patikowski Cheiran**

**Professor Dr. Jeverson Frazzon**

**Orientador**

**Porto Alegre, junho de 2015.**

Dedico esse trabalho a minha família, que sempre com muito carinho e paciência, me incentivou a lutar pelos meus sonhos.

## RESUMO

Os óleos essenciais são produzidos por plantas aromáticas como metabólitos secundários, sendo largamente empregados devido as suas propriedades observadas na natureza, por exemplo, antibacteriana. Sua composição química é complexa, apresentando normalmente terpenóides, mais especificamente monoterpenos ou sesquiterpenos, como compostos majoritários. Na família *Asteraceae*, cujas propriedades bioativas têm sido relatadas, podemos destacar a espécie *Heterothalamus psiadioides*, que apresenta como composto majoritário um monoterpeno ( $\beta$ -pineno). Portanto o objetivo do estudo foi avaliar a ação antibacteriana em *Listeria monocytogenes* da fração do óleo essencial de *H. psiadioides* composta por monoterpenos e por sesquiterpenos e compará-las com a atividade antimicrobiana do mesmo óleo volátil. Para tanto as frações do óleo essencial foram obtidas por meio de cromatografia em coluna de vidro e caracterizadas por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. A atividade antibacteriana foi avaliada por microdiluição em meio de cultura líquido em microplaca. O dano celular causado pelo óleo essencial e pela fração composta por monoterpeno foi avaliado por microcopia eletrônica de varredura. O óleo essencial de *H. psiadioides* e a fração composta por sesquiterpenos, não demonstraram a ação anti *L. monocytogenes*, contudo, a fração composta por monoterpenos demonstrou um desempenho diferente, indicando exibir atividade antibacteriana. Através da microscopia de varredura não foi possível observar alteração morfológica nas células. O presente trabalho fornece informações importantes sobre a ação anti *L. monocytogenes* das frações do óleo essencial e sugere a continuidade nos estudos para avaliação da ação antibacteriana dos monoterpenos separadamente.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Listeria monocytogenes*; *Heterothalamus psiadioides*; Monoterpeno; Sesquiterpeno; Atividade antibacteriana.

## ABSTRACT

The essential oils of aromatic plants are produced as secondary metabolites, being widely used because their properties observed in nature, for example, antibacterial. Their chemical composition is complex, usually presenting terpenoids, specifically monoterpenes or sesquiterpenes as major compounds. In the *Asteraceae* family, whose bioactive properties have been reported, we can highlight the *Heterothalamus psiadioides* species, presenting as major compound one monoterpene ( $\beta$ -pinene). For this reason, aim of the study was to evaluate the antibacterial action on *Listeria monocytogenes* the essential oil fraction of *H. psiadioides* composed of monoterpenes and sesquiterpenes and compare them with the antimicrobial activity of the same volatile oil. The essential oil fractions were obtained by chromatography on a glass column and characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry. The antibacterial activity was evaluated by microdilution on liquid culture medium in microplate. The cellular damage caused by the essential oil and the fraction consisting of monoterpene was evaluated by scanning electron microscopy. The essential oil of *H. psiadioides* and the fraction consisting of sesquiterpenes, not demonstrated the anti *L. monocytogenes* action. However, the fraction composed of monoterpenes showed a different performance, indicating display antibacterial activity. In scanning microscopy was not observed morphological change. This study provides important information about the anti *L. monocytogenes* action of the essential oil fractions and suggests the continuity of studies to evaluate the antibacterial action of monoterpenes separately.

KEY-WORDS: *Listeria monocytogenes*; *Heterothalamus psiadioides*; Monoterpene; Sesquiterpene; Antibacterial activity.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Prof. Jeverson Frazzon, pela oportunidade de realização de iniciação científica, pela orientação deste trabalho, pelos ensinamentos, pelo apoio e pela confiança depositada em mim.

Aos Profs. Miriam Anders Apel e Alexandre Macedo pela assistência e disponibilidade.

Aos meus pais, Ida e Adalberto, que sempre sonharam e participaram de todas as minhas conquistas e que, com muito carinho e dedicação, não mediram esforços para que eu chegasse até esta etapa de minha vida.

Ao meu irmão, Jean, que sempre foi um exemplo para mim, me apoiando nos momentos mais difíceis e me ensinando a levar a vida de uma forma mais serena.

Ao meu namorado, Felipe, por todo amor, carinho e compreensão, e por sempre encontrar uma forma de me fazer sorrir.

Aos meus amigos que sempre torceram por mim e me apoiaram no decorrer desta caminhada.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>8</b>
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>14</b>
2.1. GERAL.....	14
2.2. ESPECÍFICOS.....	14
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>15</b>
3.1. ESTIRPE BACTERIANA E PREPARAÇÃO DO INOCULO.....	15
3.2. ÓLEO ESSENCIAL.....	15
3.3. FRACIONAMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Heterothalamus psiadioides</i> ..	16
3.4. ANÁLISE POR CG-MS DAS FRAÇÕES DE ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Heterothalamus psiadioides</i> .....	16
3.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI <i>Listeria monocytogenes</i> DAS FRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Heterothalamus psiadioides</i> .....	17
3.6. DETERMINAÇÃO DO DANO CELULAR POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM <i>Listeria monocytogenes</i> CAUSADO POR ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Heterothalamus psiadioides</i> E POR FRAÇÃO COMPOSTA POR MONOTERPENOS.....	18
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>20</b>
4.1. PERFIL QUÍMICO DAS FRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Heterothalamus psiadioides</i> .....	20
4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI <i>Listeria monocytogenes</i> DAS FRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Heterothalamus psiadioides</i> .....	24
4.3. AVALIAÇÃO DO DANO CELULAR POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM <i>Listeria monocytogenes</i> CAUSADO POR ÓLEO ESSENCIAL DE <i>Heterothalamus psiadioides</i> E POR FRAÇÃO COMPOSTA POR MONOTERPENOS.....	32
<b>5. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>36</b>

## 1. INTRODUÇÃO

“A ISO (International Standard Organization) define óleos voláteis como os produtos obtidos de partes de plantas através de destilação por arraste a vapor d’água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos” (Simões e Spitzer, 2003).

Os óleos essenciais, assim também chamados os óleos voláteis devido ao aroma agradável e intenso, são produzidos por plantas aromáticas como metabólitos secundários, ou seja, são constituídos por substâncias que não são, necessariamente, essenciais para o organismo, contudo garantem vantagens para sobrevivência e para perpetuação da sua espécie em seu ecossistema (Santos, 2003). Eles têm sido largamente utilizados devido a suas propriedades observadas na natureza, como antibacteriana, antifúngica e anti-inseto. Desse modo, os óleos essenciais tornaram-se comumente empregados na conservação de alimentos e como agentes antimicrobianos, analgésicos, sedativos, anti-inflamatórios, antiespasmódicos e anestésicos locais (Bakkali *et al.*, 2008).

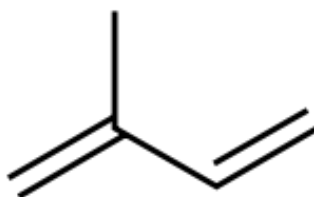
Geralmente, os óleos voláteis são misturas de compostos lipofílicos que apresentam forte odor, tendo aparência de líquido oleoso límpido à temperatura ambiente, sendo raramente coloridos. No entanto, sua principal característica é a volatilidade, diferenciando-se dos óleos fixos (mistura de substâncias lipídicas) que são obtidos regularmente a partir de semente. Além disso, são solúveis em solventes orgânicos, como éter etílico, recebendo a denominação de óleos etéreos (Bruneton, 1999). Apresentam solubilidade em água limitada, requerendo a utilização de solventes, como dimetilsulfóxido (DMSO), para incorporação em meios aquosos.

Em relação à composição química, os óleos essenciais são misturas complexas que podem conter de 20 a 60 componentes em diferentes concentrações, tendo normalmente um composto majoritário, existindo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades, denominados traços.



Frequentemente, as substâncias químicas majoritárias são as responsáveis pelas propriedades biológicas dos óleos voláteis. Segundo Robbers e seus colaboradores, (1997), plantas da mesma espécie, mas cultivadas em diferentes regiões do planeta, em geral apresentam os mesmos componentes, embora as concentrações em que estão presentes podem divergir.

Dentre os compostos mais comumente encontrados nos óleos essenciais estão os terpenos, e dentro desses estão os monoterpenos e os sesquiterpenos. Estes podem ser definidos como substâncias naturais cuja origem biossintética deriva de unidades de isopreno; por este motivo, esses compostos também podem ser chamados de isoprenos. A unidade isoprênica, por sua vez, origina-se biogeneticamente do acetato por via do ácido mevalônico que apresenta cadeias ramificadas com cinco unidades de carbono, contendo duas ligações duplas. Os terpenóides, assim também chamados os terpenos, são formados pela condensação de unidades de isopreno. Em geral, essas ligações ocorrem no sentido *cabeça-calda*, sendo que o número de unidades incorporadas em determinado terpenóide hidrocarbonado insaturado serve como base para a classificação desses compostos. Os monoterpenos são compostos por duas unidades isopreno; já os sesquiterpenos são formados por três unidades (Robbers *et al.*, 1997; Simões e Spitzer, 2003).



**Figura 1. Molécula do isopreno.**

Os terpenóides são biossintetizados a partir do isopentenil-pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil-pirofosfato (DMAPP). Essas moléculas são chamadas de "unidades de isopreno ativos", sendo que ambos derivam da via biossintética do mevalonato. O IPP e o DMAPP formam *trans*-geranil-pirofosfato (C10), a partir do qual formam-se os demais terpenos. Este composto é o precursor dos monoterpenos, compondo a classe mais simples e comum de terpenos encontrados

em óleos essenciais (Tisserand e Young, 2014). Novas ligações *cabeça-calda* entre *trans*-geranil-pirofosfato e isopentenil-pirofosfato resultarão em sesquiterpenos (C15) e diterpenos (C20) (Souza *et al.*, 2011).

Os óleos essenciais são conhecidos por suas propriedades medicinais e pela sua fragrância, são utilizados como agentes antimicrobianos e também como conservantes na indústria de processamento de alimentos, sendo assim um objeto de grande estudo. Em especial, destacam-se os óleos voláteis da família Asteraceae, cujas espécies são amplamente pesquisadas devido à presença de compostos com atividade biológica (Fabri *et al.*, 2011; Ferronato *et al.*, 2007; Stefanello *et al.*, 2006; Baratto *et al.*, 2008). Dentro dessa família, podemos destacar a espécie *Heterothalamus psiadioides* Less., conhecida popularmente como “alecrim do campo”, “coralina” e “erva formiga”. Alguns trabalhos demonstraram que o óleo essencial dessa espécie possui propriedades antipirética, anti-inflamatória e antídoto para picada de cobra (Mors *et al.*, 2000). Esta espécie é restrita ao sul do Brasil (Rio Grande do Sul e Santa Catarina), Uruguai e Argentina (Córdoba e San Luis) (Deble *et al.*, 2005), ocorrendo em formações densas, tomando aspecto dominante em locais devastados e em beira de estradas (Alice *et al.*, 1995).

Estudos anteriores com óleo essencial de *H. psiadioides* relataram a presença de monoterpenos e sesquiterpenos (Suyenaga *et al.*, 2004). Outros constituintes também identificados são dois flavonoides, pinostrombina e galangina, (Kerber *et al.*, 1993) e bisaboleno-1,4-endoperóxido (Rücker *et al.*, 1991). Segundo Suyenaga e seus colaboradores (2004) e Schmidt-Silva e seus colaboradores (2012), o composto majoritário encontrado no óleo volátil é o  $\beta$ -pineno. O  $\alpha$ -pineno e o  $\beta$ -pineno são monoterpenos álcool cíclicos amplamente distribuídos no reino vegetal e são os principais constituintes de várias plantas medicinais aromáticas (Moreira *et al.*, 2013). Recentemente, alguns estudos relataram que o óleo essencial de *H. psiadioides* apresenta atividade antimicrobiana e antibiofilme contra diversos micro-organismos, nos quais está inclusa a *Listeria monocytogenes* (Ellwanger, 2013; Negreiros, 2014).

A *Listeria* é um bacilo Gram-positivo, não-esporulado, que se locomove por meio de flagelos e multiplica-se entre -0,4 e 50°C (Faber e Peterkin, 1991). Desta maneira, a *L. monocytogenes*, principal espécie patogênica, pode multiplicar-se lentamente sob temperaturas de refrigeração, ao contrário da maioria dos outros patógenos de origem alimentar (Embarek, 1994; Low e Donachie, 1997). A *Listeria* é um micro-organismo ubíquo, sendo encontrado em diversos ambientes como vegetação deteriorada, solo, silagem, esgoto, fezes de animais, e água. Devido a sua alta resistência a várias condições ambientais, pode ser encontrada tanto em alimentos frescos de origem animal ou vegetal quanto em alimentos processados (McLauchlin *et al.*, 2004). Essa bactéria é mais comumente encontrada nos seguintes alimentos: leite e queijo supostamente pasteurizado (particularmente, variedades curadas e cremosas), carnes frescas ou congeladas, produtos derivados de carne, vegetais frescos, frutos do mar e pescados (Pearson e Marth, 1990; Jay, 2005).

A *L. monocytogenes* é subdivida em 13 sorovares, sendo que os de importância epidemiológica são 1/2a (15 a 25% dos casos), 1/2b (10 a 35% dos casos) e 4b (37 a 64% dos casos). Indivíduos mais susceptíveis a contrair listeriose são fetos e recém-nascidos que se contaminam por meio da mãe durante a gravidez, idosos e pessoas imunocomprometidas. Em adultos, normalmente é uma doença branda, porém em indivíduos imunodeficientes o micro-organismo pode invadir o sistema nervoso central, causando meningite (Martins *et al.*, 2010). A *L. monocytogenes* é especialmente perigosa quando infecta mulheres grávidas, que apresentam sintomatologia leve, parecida com resfriado. O feto, no entanto, pode ser infectado via placenta, resultando, geralmente, em aborto ou bebê natimorto. Em alguns casos, a listeriose é manifestada apenas após algumas semanas depois do nascimento, normalmente como meningite, podendo resultar em danos significativos ao cérebro ou levar a morte (Pamer, 2004; Todd e Notermans, 2011; Montville *et al.*, 2012).

O desenvolvimento de listeriose pode ocorrer em grupos de indivíduos suscetíveis citados anteriormente quando mais de 100 UFC de *L. monocytogenes*/g de alimento for consumido. Após a ingestão, o ácido gástrico reduz o número de

células viáveis, contudo se for ingerido apenas uma pequena quantidade de líquido (aproximadamente 50 mL) ou se houver a presença de alimento lipídico, essa redução pode ser menor. Chegando ao trato intestinal, a *L. monocytogenes* se adere e invade as células mucoides. Isso ocorre, principalmente, no intestino delgado, onde o micro-organismo ataca as células M ou os enterócitos não especializados. Por meio de fagocitose celular, a bactéria é absorvida pela célula epitelial, resultando na formação de um vacúolo (O’Riordan *et al.* 2002). Por meio de uma substância chamada Listeriolisina O, fator mais significativo de virulência dessa espécie, a *L. monocytogenes* rompe o vacúolo celular (Cornelissen *et al.*, 2013). Uma vez no citosol a bactéria multiplica-se rapidamente e invade células adjacentes por meio da proteína de superfície ActA que auxilia na formação da calda de actina, propulsionando o micro-organismo através da membrana citoplasmática. Assim, a partir do trato intestinal, o micro-organismo invade o tecido, incluindo a placenta em mulheres grávidas, podendo se disseminar pela corrente sanguínea, causando septicemia. Ainda, devido a sua presença intracelular nas células fagocitárias do sangue, a *L. monocytogenes* tem acesso ao cérebro, causando meningite (Vázquez-Boland *et al.*, 2001; Seveau *et al.*, 2007).

Nos últimos anos, a listeriose mudou de uma doença de importância muito limitada para uma causa de grande preocupação para indústria de alimentos e para autoridades de saúde (Allerberger e Wagner, 2010). Desde a introdução da vacina contra *Haemophilus influenzae* tipo b (Hib), bactéria causadora de pneumonia e meningite na infância (Organização Mundial da Saúde (OMS), 2013), a listeriose se tornou a terceira causa mais comum de meningite bacteriana (Brouwer *et al.*, 2006). O aumento dos casos de listeriose pode estar relacionado ao aumento do consumo de alimentos refrigerados pré-prontos e, devido às estratégias tecnológicas de conservação de alimentos, mantendo por longos períodos os alimentos em condições de refrigeração. Além disso, devido a *L. monocytogenes* ser capaz de se multiplicar em temperaturas de refrigeração, pode ocorrer aumento do número de bactérias durante a vida útil do alimento na prateleira. Sendo assim, a busca de ferramentas de controle efetivo contra a *L. monocytogenes* tem se tornado cada vez mais relevante em microbiologia de alimentos. Uma das formas, já citadas

anteriormente, é a utilização de óleos essenciais, método comumente empregado na indústria de alimento.

Com base na atividade antibacteriana do óleo essencial de *H. psidioides* já descrita, este estudo teve como objetivo avaliar a ação anti *L. monocytogenes* das frações compostas por monoterpenos e sesquiterpenos de óleo essencial de *H. psidioides*, visto que o controle desta bactéria tem se tornado cada vez mais necessário.

## 2. OBJETOS

### 2.1. GERAL

Avaliar a atividade anti *Listeria monocytogenes in vitro* na fração composta por monoterpenos e na fração composta por sesquiterpenos do óleo essencial produzido pela planta *Heterothalamus psiadioides*.

### 2.2. ESPECÍFICOS

- a) Separar o óleo essencial de *H. psiadioides* em duas frações: monoterpenos e sesquiterpenos.
- b) Determinar a composição química das frações compostas por monoterpenos e por sesquiterpenos de óleo essencial de *H. psiadioides*.
- c) Avaliar a atividade anti *L. monocytogenes* das frações compostas por monoterpenos e por sesquiterpenos de óleo essencial de *H. psiadioides*.
- d) Avaliar o dano celular em *L. monocytogenes* causado pelo óleo essencial de *H. psiadioides* e pela fração de composta por monoterpenos.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. ESTIRPE BACTERIANA E PREPARAÇÃO DO INÓCULO

No presente estudo, foi utilizada uma cepa de *L. monocytogenes* (1/2a) isolada a partir de queijo e fornecida pelo Laboratório Nacional Agropecuário do Rio Grande do Sul (LANAGRO-RS), do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), a cepa foi sorotipificada pelo Instituto Oswaldo Cruz (RJ). Para confirmação da pureza da cultura, realizou-se o método de colocação de Gram e se verificou a característica morfológica das colônias em meio sólido seletivo para *Listeria* (LEB – *Listeria* Enrichment Broth, 2% de Agar).

Antes de cada experimento, as estirpes foram ativadas em cultivo em Caldo Infusão de Cérebro e Coração (BHI), por 24h a 37°C. As culturas foram inoculadas em placa contendo meio seletivo para *Listeria* (LEB, 2% de Agar) e incubadas a 37°C por 24-48h. Para realizar o procedimento experimental, uma ou duas colônias do meio LEB 2% de Agar foram inoculadas em caldo BHI e incubadas a *overnight* por 37°C.

#### 3.2. ÓLEO ESSENCIAL

O óleo essencial de *H. psiadoides* foi fornecido pelo Prof. Geraldo Luiz Gonçalves Soares do Instituto de Biociência da Universidade Federal do Rio Grande Sul (Porto Alegre-RS, Brasil). A espécie de *H. psiadoides* utilizada neste trabalho foi depositada no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande Sul (ICN).

O ensaio foi conduzido utilizando óleo essencial, fração do óleo essencial contendo monoterpenos, fração do óleo essencial contendo sesquiterpenos acrescidos com dimetilsulfoxido (DMSO), na proporção de três partes de óleo ou fração do óleo para uma parte de DMSO.

### 3.3. FRACIONAMENTO DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Heterothalamus psiadioides*

O ensaio foi conduzido segundo Kulisic e seus colaboradores (2003) com modificações. O óleo essencial de *H. psiadioides* (1mL) foi fracionado por meio de cromatografia em coluna (40 cm de comprimento; diâmetro de 2 cm) com gel de sílica (21 g, 63-200  $\mu\text{m}$ , poro 60<sup>a</sup>, Aldrich). Utilizou-se pentano (50 mL) para obtenção da fração que continha apenas hidrocarbonetos apolares e éter etílico (50 ml) para obtenção da fração contendo hidrocarbonetos polares (compostos oxigenados). Obteve-se vinte frações com aproximadamente 2 mL, as quais foram analisadas por cromatografia gasosa acoplada a um espectrômetro de massa (CG-EM). Após análise das frações decidiu-se reuni-las em dois grupos: fração predominantemente composta por monoterpenos e fração predominantemente composta por sesquiterpenos.

### 3.4. ANÁLISE POR CG-EM DAS FRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Heterothalamus psiadioides*

Os compostos das frações do óleo essencial de *H. psiadioides* foram analisados por CG/EM. O cromatográfico a gás (Shimadzu GC-17A) utilizado era equipado com uma coluna capilar de sílica fundida DB-5, (30 m x 0,25 mm, revestida com um filme de 0,25  $\mu\text{m}$  de espessura) e o espectrômetro de massa possuía um sistema de quadrupolo EM (QP 5000), operando a 70 eV. As condições analíticas foram as seguintes: temperatura do injetor e do detector ajustadas para 200°C e 250°C, respectivamente; a coluna foi programada com rampa de aquecimento de 60-300°C com variação de 3°C/min, com hélio como gás de arraste e fluxo de 1 mL/min; injeção de 1  $\mu\text{L}$  (solução de pentano ou éter); tempo de corrida de 88 minutos.

Para identificação dos compostos individuais foi comparado o Índice de Kovats (IK) calculado dos compostos com IK tabelado da literatura (Adams, 2001). O IK relaciona o tempo de retenção dos compostos ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos (Simões & Spitzer, 2003). Já a identificação dos espectros de massa foi realizada comparando a fragmentação do íon molecular dos espectros das amostras obtidas com dados de padrões autênticos presentes em



espectroteca de aquisição (NIST 62 e 12 - National Institute of Standards and Technology, Kyoto, JP) e por meio de dados da literatura (Adams, 2001).

### 3.5. DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI *Listeria monocytogenes* das FRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Heterothalamus psiadioides*

Para execução deste ensaio foi realizado microdiluição em meio de cultura líquido em microplaca de poliestireno de 96 poços. Inicialmente, 2% de cultura, *overnight*, de *L. monocytogenes* foram adicionados em meio BHI em cada poço. A seguir realizaram-se dois diferentes ensaios: no primeiro, logo após a inoculação da bactéria, foi adicionado fração de monoterpeno, de sesquiterpeno ou de óleo essencial de *H. psiadioides* diluídos em DMSO; no segundo, aguardou-se que o micro-organismo atingisse a fase exponencial de crescimento (densidade óptica entre 0,300 e 0,400 a 600 nm) e então, neste momento, os compostos foram adicionados. A diluição em série foi realizada a partir de 1% até 0,25% (v/v) em um volume final de 200 µL. As microplacas foram tampadas e incubadas a 37°C por 24 horas. O primeiro ensaio foi realizado em um único dia e em duplicata. No entanto, o segundo ensaio foi realizado em dois dias distintos, sendo que no primeiro dia foi efetuado em triplicata e no segundo dia em duplicata. Os controles negativos (meio de cultura) e positivos (meio de cultura e inóculo) foram apresentados em todos os testes. Com o intuito de averiguar uma eventual influência do DMSO sobre os resultados do ensaio, foi realizado um teste em triplicata com 1% de DMSO em água, na proporção de três partes de DMSO para uma de água.

A fim de observar a multiplicação da *L. monocytogenes* na presença da fração como monoterpeno, sesquiterpeno ou óleo essencial, mediu-se a densidade óptica (DO) do meio de cultura em espectrofotômetro (Epoch, BioTek), no comprimento de onda de 600 nm. Foi realizada a leitura das DOs em diferentes tempos para cada ensaio: no primeiro, mediu-se a DO nos tempos zero, três a nove horas e vinte quatro horas após a adição dos compostos citados; no segundo, logo após o micro-organismo ter atingido a fase exponencial e ter sido adicionado as frações de monoterpeno, sesquiterpeno ou óleo essencial diluídos em DMSO, realizou-se a primeira leitura da DO (tempo zero), seguiu-se medindo a DO de uma a

três horas e, depois, dezoito horas após a adição destes compostos. Objetivando verificar a efetividade da atividade antimicrobiana, 10 µL dos poços contendo 1% da fração como monoterpeno, com sesquiterpeno e do óleo essencial, foram diluídos em 90 µL de solução salina a 0,1% e espalhados com alça de Drigalski sobre a superfície de placas de LEB com 2% de agar e incubadas por 72h a 37°C. Para o primeiro ensaio, a técnica de espalhamento foi realizada com amostras coletadas na hora zero, três, seis e vinte e quatro horas após a adição dos compostos. Já para o segundo ensaio foram coletadas amostras do tempo zero, três e dezoito horas após a adição dos compostos.

### 3.6. DETERMINAÇÃO DO DANO CELULAR POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM *Listeria monocytogenes* CAUSADO POR ÓLEO ESSENCIAL DE *Heterothalamus psiadioides* E FRAÇÃO DE COMPOSTA POR MONOTERPENOS

As células de *L. monocytogenes* forma incubadas *overnight* em meio BHI a 37°C, tendo o objetivo de ativar as células. Na sequência, 2% da cultura bacteriana foi transferida para caldo BHI e incubada a 37°C até atingir a DO entre 0,3 e 0,4. A seguir, transferiu-se para três tubos “ependorfs” uma alíquota desta suspensão bacteriana. No primeiro tubo adicionou-se apenas a cultura de células de *L. monocytogenes* (controle positivo), no segundo adicionou-se 1% de óleo essencial de *H. psiadioides* e no terceiro adicionou-se 1% da fração composta predominantemente por monoterpenos, sendo incubados a 37°C por 2 h. Após esse período, as amostras foram centrifugadas e o sobrenadante foi descartando, sendo logo depois fixadas com glutaraldeído 25% (v/v) em tampão fosfato 0,2M pH 7,4, por 4 dias a temperatura de 4°C/5°C.

Posteriormente, as células foram coletadas após centrifugação, fixadas em lamínula com poli-L-lisina e lavadas três vezes com tampão fosfato 0,1 M. As amostras foram desidratadas em um gradiente de acetona de 30%, 50%, 70%, 90% e 100%, respectivamente. Em seguida, as células foram dessecadas no aparelho de Ponto Crítico (Critical Point Dryer, Balzers CPD030). A última etapa realizada foi a metalização do material com ouro na Metalizadora (Sputter Coater, Balzers

SCD050). Finalmente, a morfologia das células de *L. monocytogenes* foi observada em Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL JSM 6060 (JEOL, Tóqui, Japão).

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1. PERFIL QUÍMICO DAS FRAÇÕES DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Heterothalamus psiadioides*

A composição química da fração com monoterpenos e da fração com sesquiterpenos obtidos por CG-EM são apresentados na Tabela 1 e 2. Os cromatogramas (Figura 2 e 3) indicam a presença de uma mistura complexa de terpenos nas duas frações. A fração composta predominantemente por monoterpenos revela a presença de 20 compostos, sendo que os monoterpenos representam 71,92% dessa fração, tendo o  $\beta$ -pineno como composto majoritário (43,81%). Outros compostos presentes em quantidades expressivas foram  $\delta$ -3-careno (14,92%) e limoneno (10,82%), ambos monoterpenos. Em relação a fração composta prevalentemente por sesquiterpenos, verifica-se a presença de 14 compostos, onde os sesquiterpenos representam 93,59% dessa fração, sendo o ar-curcumeno o composto majoritário (40,12%). Nesta fração, também foram encontrados outros compostos em concentrações significativas, tais como o biciclogermacreno (15,89%) e o  $\gamma$ -muuroleno (15,68%), sendo os dois sesquiterpenos.

**Tabela 1 - Composição química da fração do óleo essencial de *H. psiadioides* composta predominantemente por monoterpenos**

Nº	Componentes	IK <i>cal</i>	IK <i>tab</i>	Percentual de rendimento
<u>Monoterpenos</u>				
1	$\alpha$ -Pineno	930	939	0,59
2	<b><math>\beta</math>-Pineno</b>	<b>978</b>	<b>979</b>	<b>43,81</b>
3	Mirceno	993	990	0,93
4	$\delta^3$ -Careno	1012	1011	14,92
5	p-cimeno	1024	1024	0,75
6	Limoneno	1029	1029	10,82
	Total			71,82
<u>Sesquiterpenos</u>				
7	$\beta$ -Elemeno	1383	1390	1,65

**Tabela 1 - (Continuação)**

8	$\beta$ -Cariofileno	1407	1419	1,15
9	Aromadendreno	1426	1441	1,8
10	Dehidro-aromadendreno	1434	1462	2,36
11	Allo-aromadendreno	1446	1460	3,34
12	$\gamma$ -Gurjuneno	1457	1477	1,06
13	$\gamma$ -Muuroleno	1462	1479	1,09
14	Germacreno D	1466	1481	0,8
15	Ar-Curcumeno+ $\beta$ -Selineno	1470	1480/1490	5,32
16	Valenceno	1473	1496	0,87
17	$\alpha$ -Selineno	1480	1498	4,28
18	$\alpha$ -Muuroleno	1485	1500	0,9
19	$\gamma$ -Cadineno	1496	1513	1,53
20	$\delta$ -Cadineno	1506	1523	2,03
	Total			28,18

IK *cal*, índice de Kovatz calculado; IK *tab*, índice de Kovatz tabelado.

A percentagem relativa de cada componente foi obtida diretamente das áreas pico do cromatograma, considerando 100% a soma de todos os picos avaliados.

**Tabela 2. Composição química da fração do óleo essencial de *H. psiadioides* composta predominantemente por sesquiterpenos**

Nº	Componentes	IK <i>cal</i>	IK <i>tab</i>	Percentual de rendimento
<u>Monoterpenos</u>				
1	$\beta$ -Pineno	973	979	1,41
2	p-cimeno	1023	1024	0,64
3	Limoneno	1027	1029	3,14
4	(E)- $\beta$ -Ocimeno	1047	1050	1,21
	Total			6,4
<u>Sesquiterpenos</u>				
5	$\beta$ -Elemeno	1383	1390	4,3
6	$\beta$ -Cariofileno	1407	1419	1,12
7	$\alpha$ -Humuleno	1440	1454	6,56
8	Allo-aromadendreno	1446	1460	4,91
9	$\gamma$ -Muuroleno	1468	1479	15,68
<b>10</b>	<b>Ar-Curcumeno</b>	<b>1477</b>	<b>1480</b>	<b>40,12</b>
11	Biciclogermacreno	1485	1500	15,89
12	Germacreno A	1491	1509	2,07
13	$\gamma$ -Cadineno	1498	1513	1,3
14	$\delta$ -Cadineno	1508	1523	1,64
	Total			93,59

IK *cal*, índice de Kovatz calculado; IK *tab*, índice de Kovatz tabelado.

A percentagem relativa de cada componente foi obtida diretamente das áreas pico do cromatograma, considerando 100% a soma de todos os picos avaliados.

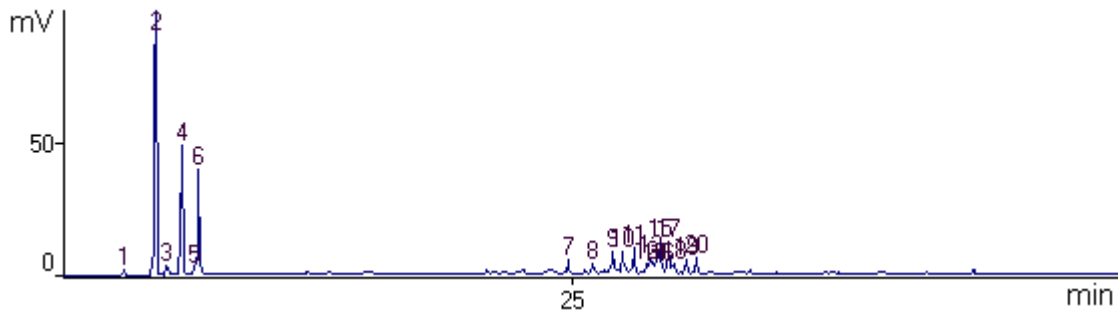


Figura 2. Cromatograma da fração composta predominantemente por monoterpenos.

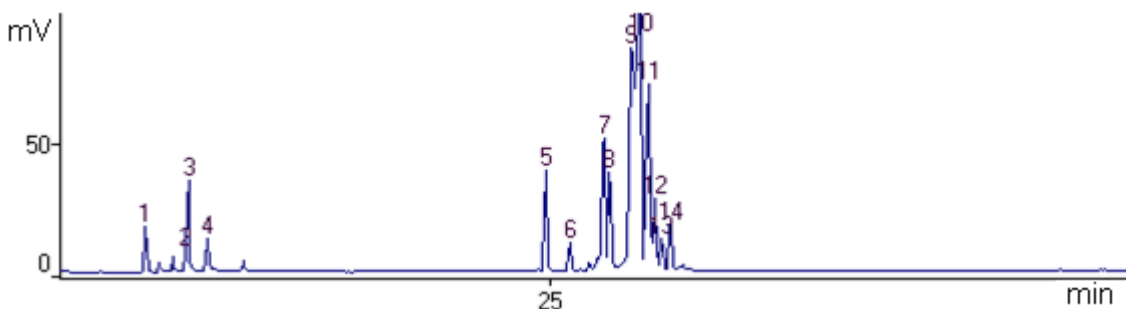


Figura 3. Cromatograma da fração composta predominantemente por sesquiterpenos.

Em consonância com pesquisas anteriores com o óleo volátil de *H. psiadioides* (Suyenaga et al., 2004; Schmidt-Silva et al., 2012; Negreiros, 2014) a maior parte dos compostos identificados no presente estudo também foram descritos nestas literaturas. Entretanto, compostos identificados no referido trabalho, tais como dehidro-aromadendreno e  $\alpha$ -seleneno, não foram relatados em nenhum dos estudos realizados anteriormente. Ainda, o elemento majoritário da fração composta predominantemente por sesquiterpenos, ar-curcumeno, não foi identificado nas pesquisas de Suyenaga e seus colaboradores (2004) e Negreiros (2014). Em contrapartida, não foi identificado nenhum composto oxigenado neste estudo, sendo que esses foram relatados em todos os gêneros de *Heterothalamus* estudados incluindo os autores supracitados.

Vários fatores de variabilidade estão envolvidos nas diferenças encontradas na composição química das frações do óleo essencial de *H. psiadioides*. Segundo Simões e Spitzer (2003), a composição do óleo volátil de uma planta é determinada geneticamente, sendo geralmente específica para um determinado órgão e característica para seu estágio de desenvolvimento, visto que concentração de cada um dos constituintes pode variar durante o desenvolvimento do vegetal. Além disso,

a época de coleta e as condições do solo e ambientais, como temperatura, umidade relativa do ar e duração total de exposição ao sol, são capazes de causar variações significativas (Bruneton, 1999).

A maior parte das publicações que relatam a identificação dos constituintes dos óleos voláteis utiliza a técnica de CG-EM associada ao cálculo de tempo de retenção ou cálculo do índice de Kovatz (IK) para tal fim. O IK é uma técnica que identifica os compostos por meio da comparação de similaridade dos valores dos tempos de retenção dos compostos e/ou dos cromatogramas obtidos experimentalmente ao tempo de retenção de uma série de hidrocarbonetos homólogos (Simões e Spitzer, 2003), os quais estão presentes na literatura e no banco de dados do equipamento.

No entanto, devido à complexidade química dos óleos essenciais, muitas vezes não ocorre a separação completa de todos componentes, prejudicando a correta identificação e quantificação dos compostos (Shellie *et al.*, 2003). Ainda, especialmente no caso dos sesquiterpenos, as análises por CG/EM presentes na literatura não têm se mostrado eficientes, pois esses compostos rearranjam-se facilmente formando fragmentos com  $m/z$  (relação massa/carga) iguais, o que origina espectros que diferem apenas quanto às intensidades relativas dos picos (Brochini *et al.*, 1999).

A ressonância magnética nuclear de carbono-13 (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) é muito usada na elucidação estrutural de compostos orgânicos, inclusive diferenciando os estereoisômeros. Esta técnica espectroscópica é indicada para a identificação de sesquiterpenos, visto que esta classe de substâncias naturais com uma gama muito grande de possibilidades estruturais. As desvantagens da RMN de  $^{13}\text{C}$  são a falta de sensibilidade, o alto custo do equipamento e a existência de poucos dados disponíveis na literatura (Simões e Spitzer, 2003; Brochini *et al.*, 1999). Sendo assim, em trabalhos futuros, poder-se-ia analisar o óleo essencial *H. psidioides* e as frações compostas por mono e sesquiterpenos a fim de complementar as análises realizadas por CG-EM.

Todavia, a grande maioria dos compostos relatados na literatura foram identificados no presente trabalho com exceção dos terpenos oxigenados. Não foi encontrada na bibliografia pesquisada mencionando para tal fato específico.

#### 4.2. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI *L. monocytogenes* DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Heterothalamus psiadioides* E DAS FRAÇÕES COMPOSTA POR MONOTERPENO E POR SESQUITERPENOS

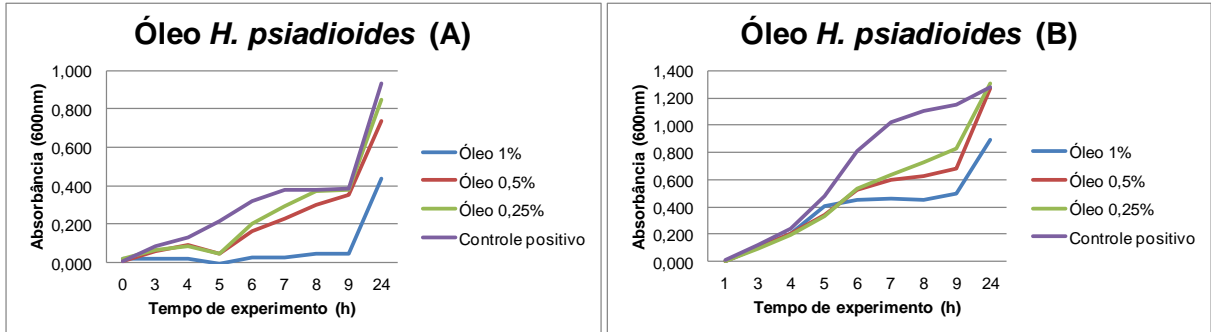
A ação antibacteriana do óleo essencial de *H. psiadioides* e das frações do óleo frente a *L. monocytogenes* foi verificada pelo método de microdiluição, de acordo com o item 3.5.

Os resultados dos testes de atividade antimicrobiana por meio do método de microdiluição e os resultados dos ensaios de presença de células viáveis ou mortas são sumarizados nas figuras mostradas a seguir.

Analisando os resultados obtidos com o óleo essencial de *H. psiadioides* (Gráfico 1), verificou-se que este óleo retarda a multiplicação da *L. monocytogenes* quando comparado ao controle positivo. Este fato foi observado tanto quando o óleo foi adicionado logo após a inoculação das bactérias (Gráfico 1(A)) como quando foi adicionado na fase exponencial de multiplicação (Gráfico 1(B)). Isso pode ser percebido por meio do aumento visível da turbidez do meio de cultura e confirmado pela leitura da DO no espectrofotômetro. Ainda, podemos ressaltar que a diminuição branda da multiplicação é um fator dependente da concentração de óleo essencial adicionado, visto que o teste realizado na concentração de 1% mostrou ser mais efetiva que a de 0,5% e este mais que 0,25%. No entanto, nos dois ensaios, após 24 horas de incubação foi verificado um aumento da DO e conseqüente aumento da multiplicação microbiana.



**Gráfico 1 - Densidades óticas a 600 nm dos ensaios realizados com óleo essencial de *Heterothalamus psiadioides***



(A) Experimento em que o óleo foi adicionado logo após a inoculação da *Listeria monocytogenes*; (B) Experimento em que o óleo foi adicionado na fase exponencial de multiplicação da bactéria.

A fim de verificar se o aumento da DO ocorreu devido a presença de células viáveis ou mortas, procedeu-se a técnica de espalhamento em placa de meio de cultura sólido LEB com uma alíquota do ensaio realizado com 1% de óleo. Na Figura 4, teste onde o óleo foi adicionado logo após a inoculação da *L. monocytogenes*, pode-se perceber que após seis horas de incubação há um aumento da multiplicação da bactéria. Já na Figura 5, ensaio em que óleo foi adicionado na fase exponencial de multiplicação do micro-organismo, observa-se também que não ocorreu diminuição da multiplicação após adição do óleo.



**Figura 4 - Ensaio no qual óleo foi adicionado logo após a inoculação da *Listeria monocytogenes***

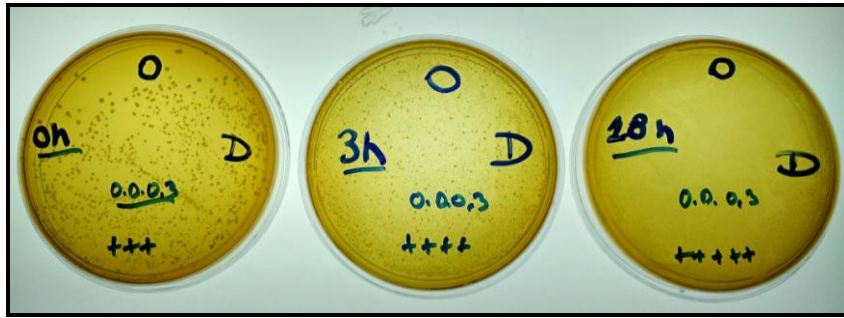
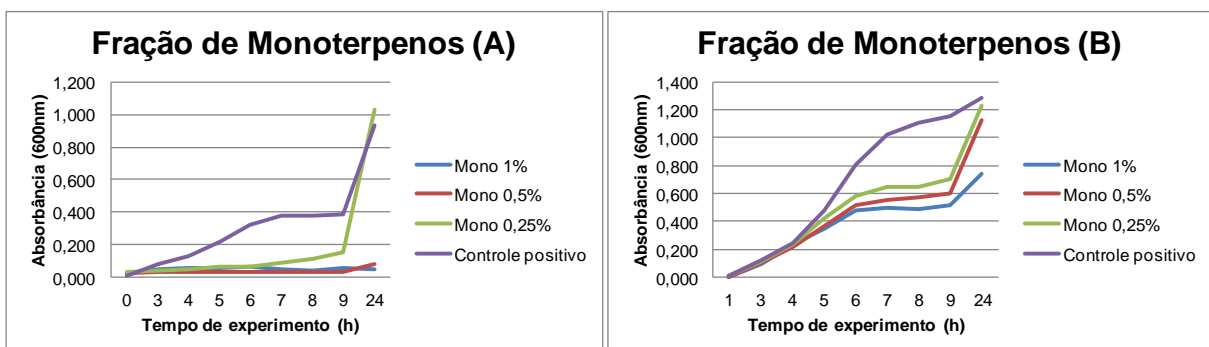


Figura 5 - Ensaio em que óleo foi adicionado na fase exponencial de multiplicação da *Listeria monocytogenes*

A fração contendo predominantemente monoterpenos apresentou resultados diferentes do óleo essencial (Gráfico 2(A) e (B)). Os dados do ensaio em que a fração com monoterpenos é adicionada logo após a inoculação da *L. monocytogenes* (Gráfico 2(A)) mostram que na concentração de 1% e 0,5% não houve aumento da DO, mas na concentração de 0,25% ocorreu aumento após 24 horas de experimento, mostrando que a inibição da atividade antibacteriana dessa fração também é dependente da concentração utilizada. Já no gráfico 2 (B) do experimento em que a referida fração foi adicionada na fase exponencial de multiplicação, verifica-se um comportamento semelhante ao óleo essencial, onde ocorre aparentemente um retardamento da multiplicação, comparado ao controle positivo, mas que após 24 horas de experimento há aumento da DO.

Gráficos 2 - Densidades óticas a 600 nm dos ensaios realizados com a fração composta predominantemente por monoterpenos



(A) Experimento em que a fração com monoterpenos foi adicionada logo após a inoculação da *Listeria monocytogenes*; (B) Experimento em que a fração com monoterpenos foi adicionada na fase exponencial de multiplicação do micro-organismo.

Como realizado no ensaio com óleo essencial *H. psiadioides*, verificou-se a presença de células viáveis por meio da técnica de espalhamento em meio sólido LEB com uma alíquota do teste realizado com 1% da fração com monoterpenos. Observou-se, inicialmente, no teste onde a fração com monoterpenos é adicionada logo após a inoculação (Figura 6) que havia presença de algumas bactérias viáveis, mas que após três horas de incubação não havia mais a presença de células vivas. Já no ensaio onde essa mesma fração foi adicionada na fase exponencial de multiplicação (Figura 7), verifica-se que ocorreu morte bacteriana, mostrando que a DO continuou aumento devido a presença de células mortas.



Figura 6 - Ensaio no qual a fração composta por monoterpenos foi adicionada logo após a inoculação da *Listeria monocytogenes*

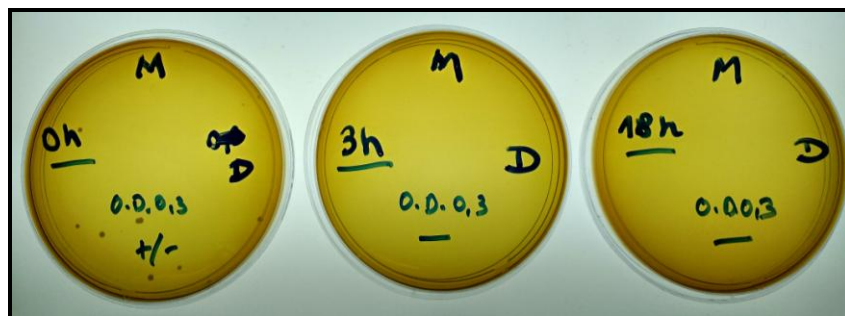
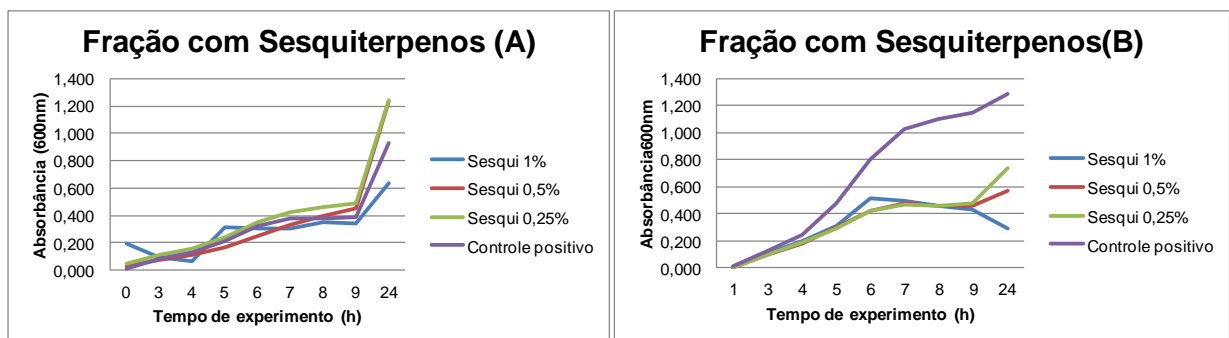


Figura 7 - Ensaio em que a fração composta por monoterpenos foi adicionada na fase exponencial de multiplicação da *Listeria monocytogenes*

Os resultados da atividade antibacteriana da fração contendo predominantemente sesquiterpenos são apresentados no Gráfico 3. No primeiro gráfico (Gráfico 3(A)) estão presentes as DOs do ensaio em que esta fração foi adicionada logo após a inoculação das bactérias. Podemos observar que os valores

das DOs de todas as concentrações utilizadas são muito próximos do valor da DO do padrão positivo durante as primeiras horas do experimento, diferindo após 24h quando se verificou que as concentrações 0,5% e 0,25% ficaram acima do controle positivo e a concentração de 1% ficou abaixo. Já no segundo gráfico (Gráfico 3(B)), ensaio em que a fração de sesquiterpenos foi adicionada na fase exponencial de multiplicação da *L. monocytogenes*, verificou-se que as densidades óticas de todas as concentrações utilizadas estavam muito próximas, mas bem abaixo dos valores do controle positivo. Contudo, após 24 horas de experimento, observou-se que DO do meio com 1% de sesquiterpenos havia diminuído enquanto as outras concentrações aumentaram. Os resultados, ao fim dos experimentos, sugerem que a atividade antibacteriana da fração de sesquiterpenos é dependente da concentração empregada no teste.

**Gráfico 3 - Densidades óticas a 600nm dos ensaios realizados com a fração composta predominantemente por sesquiterpenos**



(A) Experimento em que a fração com sesquiterpenos foi adicionada logo após a inoculação da *Listeria monocytogenes*; (B) Experimento em que a fração com sesquiterpenos foi adicionada na fase exponencial de multiplicação da bactéria.

Assim como foi feito o teste de espalhamento em meio sólido LEB com uma alíquota dos ensaios contendo 1% óleo de *H. psiadioides* e 1% da fração de monoterpenos, também se realizou o mesmo teste com a fração de sesquiterpenos a 1%. Na Figura 8, ensaio no qual foi adicionada a fração de sesquiterpenos logo após a inoculação do micro-organismo, verifica-se que, inicialmente, havia a presença de bactérias, mas que após 3 horas a população bacteriana diminuiu e voltou a aumentar após 6 horas de experimento. Já na Figura 9, teste em que a

fração já citada foi adicionada na fase exponencial de multiplicação da *L. monocytogenes*, verifica-se que mesmo a DO estando abaixo da DO do controle positivo há contínua multiplicação bacteriana, pois houve aumento do número de colônias com o passar do tempo.

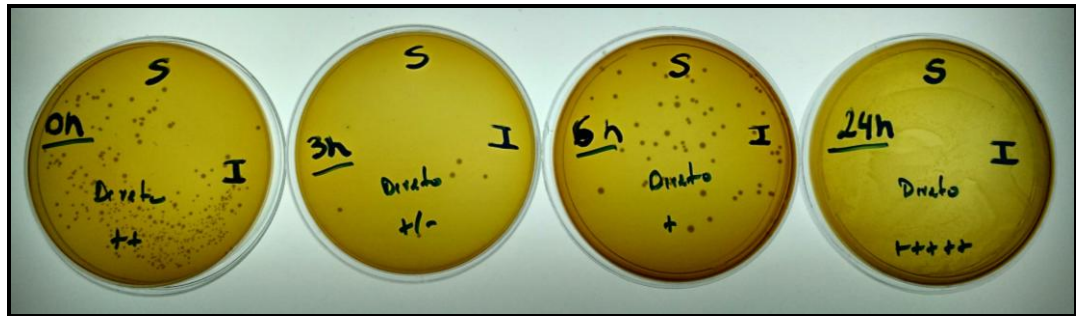


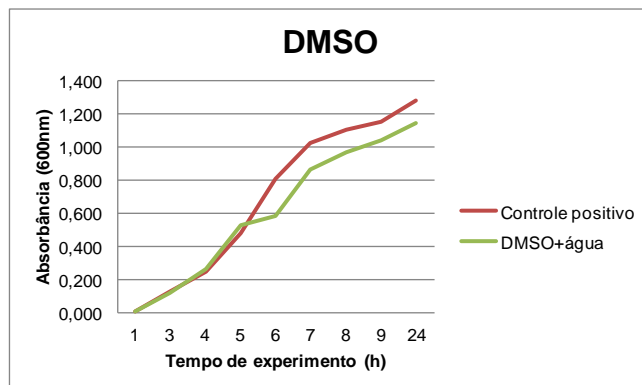
Figura 8 - Ensaio no qual a fração composta por sesquiterpenos foi adicionada logo após a inoculação da *Listeria monocytogenes*.



Figura 9 - Ensaio em que a fração composta por sesquiterpenos foi adicionada na fase exponencial de multiplicação da *Listeria monocytogenes*

No estudo em que se avaliou se o DMSO apresentava atividade antibacteriana, pode-se observar que este composto não demonstra ação contra *L. monocytogenes* (Gráfico 4). Observa-se no gráfico que o aumento da DO do ensaio com DMSO a 1% segue praticamente o mesmo padrão de aumento da DO do controle negativo. Pirbalouti *et al* (2013) utilizou 5% de DMSO como solvente para incorporar o óleo essencial de *Artemisia chamaemelifolia* em meio de cultura líquido. Quando o DMSO foi empregado isoladamente no meio de cultura, ele não apresentou atividade antimicrobiana.

**Gráfico 4 - Densidade ótica a 600 nm dos ensaios realizados com DMSO e água**



Mourey e Canillac (2002) avaliaram a diferença na atividade antibacteriana de seis compostos ( $\alpha$  and  $\beta$ -pineno, R- e S-limoneno, 1,8-cineol, borneol) frente a *L. monocytogenes* sorovares 4b e 1/2c. Neste estudo, os autores observaram que quando o  $\alpha$ -pineno, o  $\beta$  pineno e o limoneno eram testados separadamente apresentavam maior atividade bacteriostática que o óleo essencial de cipreste e de pinho, sendo que o óleo de cipreste contém majoritariamente 45% de limoneno, 24%  $\beta$ -pineno e 2%  $\alpha$ -pineno e o óleo de pinho apresenta de 14% a 20% de limoneno e de 12% a 14% de cineol. Assim, concluíram que poderia ocorrer um efeito antagônico com a atividade antimicrobiana, ou seja, que o efeito de outros compostos presentes nos óleos voláteis ou a combinações dos diferentes componentes estudados seria menor quando aplicados em conjunto do que quando aplicados individualmente. No presente estudo, verificou-se que o óleo essencial de *H. psiadioides* e a que a fração composta predominantemente por sesquiterpenos, quando avaliados pela metodologia adotada, não demonstraram ação anti *L. monocytogenes*. Contudo, a fração majoritariamente composta por monoterpenos demonstrou um desempenho diferente dos anteriores, indicando exibir atividade antibacteriana. Por conseguinte, nessa pesquisa demonstrou-se que os sesquiterpenos e/ou eventuais componentes não identificados por CG-EM têm efeito negativo sobre a atividade antibacteriana do óleo essencial de *H. psiadioides*.

Em estudo realizado por Leite e seus colaboradores (2007), o  $\beta$ -pineno mostrou-se efetivo na inibição de cepas de bactérias Gram-positivas. Canillac e Mourey (2004) relataram que o óleo essencial de *Picea excelsa*, composta por  $\alpha$ -

pineno (26,41%),  $\beta$ -pineno (16,33%), limoneno (10,9%) e campeno (8,5%), apresentou ação bactericida na concentração de 0,2-0,3% (v/v), emulsionada em Tween 80, contra  $10^5$ - $10^7$  células de *L. monocytogenes*, sendo que após 100 minutos de exposição obteve-se uma taxa de sobrevivência das células de 0,1%. Assim, no presente trabalho, observou-se que, em consonância com os trabalhos supracitados, a atividade anti *L. monocytogenes* talvez esteja relacionada ao sinergismo entre as porcentagens dos monoterpenos presentes na fração majoritariamente composta por esta classe de terpenos. Em estudos futuros, poderia se investigar se a predominância do  $\beta$ -pineno favorece a atividade antibacteriana, conforme indícios apurados no contexto desse trabalho. Isso poderia ser investigado por meio de ensaios em que se avaliasse a atividade anti *L. monocytogenes* dos compostos majoritários separadamente e das diferentes combinações desses compostos.

Estudos com diversos óleos essenciais têm relatado que o efeito bactericida e/ou bacteriostático contra *L. monocytogenes* e outras bactérias são dependentes da concentração utilizada (Kim *et al.*,1995; Burt, 2004; Mazzarrino *et al.*,2015). Smith-Palmer e seus colaboradores (1998) estabeleceram concentrações bacteriostáticas e bactericidas de 21 óleos essenciais contra patógenos de origem alimentar mais predominantes, como *L. monocytogenes*. Os autores constataram que para o óleo essencial de *Myristica fragrans* (noz moscada), composta majoritariamente por sabineno (28,61%),  $\beta$ -pineno (10,26 %) e  $\alpha$ -pineno (9,72%) (Gupta *et al.*, 2013), a concentração bacteriostática para a bactéria em questão era menor que 0,01% de óleo e que a concentração bactericida era de 0,05% de óleo, ou seja, para o óleo essencial ter efeito bactericida era preciso aumentar a concentração em no mínimo 5 vezes. Mourey e Canillac (2002), quando testaram os compostos  $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno e limoneno separadamente, demonstraram que para ter ação bactericida era necessário aumentar a concentração em 10 vezes para  $\alpha$ -pineno, 19 vezes para  $\beta$ -pineno e de 4 a 7 vezes para limoneno. Como anteriormente citado, podemos observar nos gráficos mostrados anteriormente que conforme aumentava a concentração do óleo essencial ou da fração utilizada a DO diminuía, mesmo que minimamente.

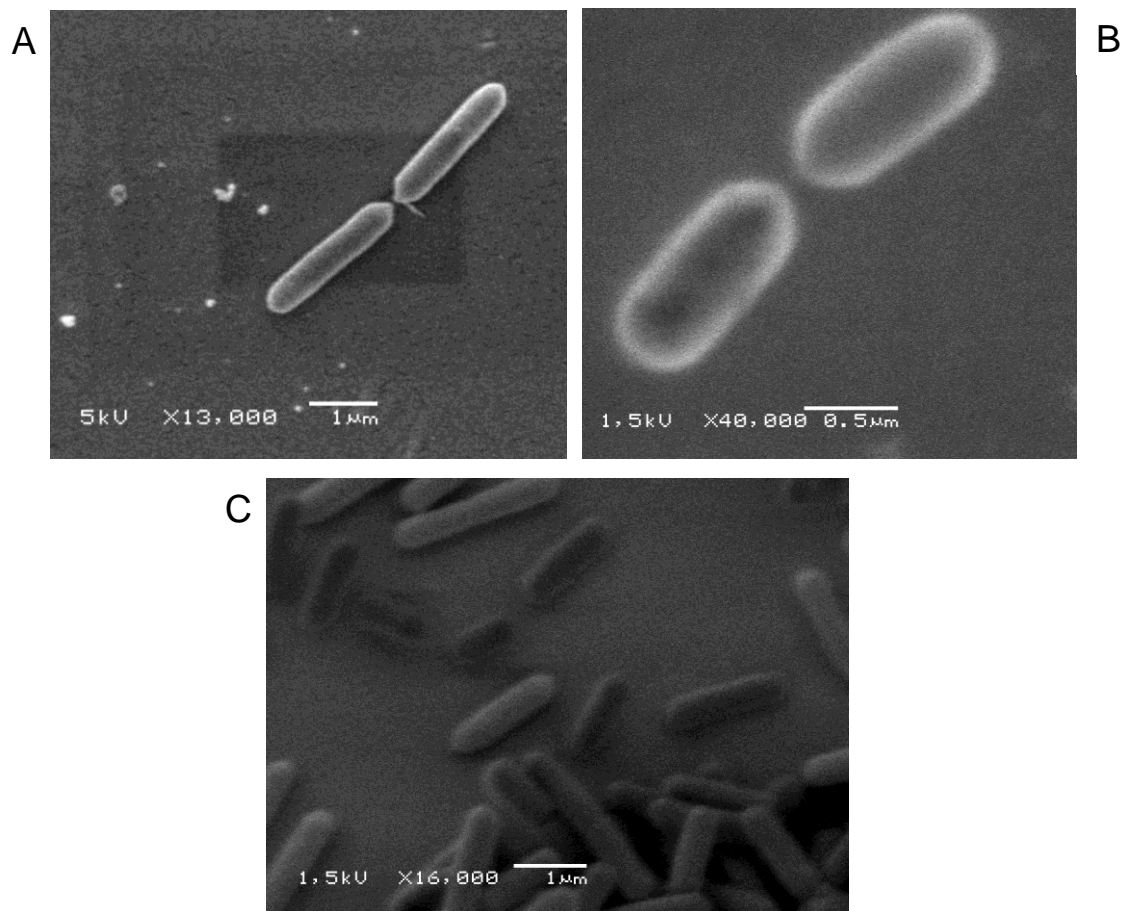
A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais pode ser explicada pela natureza lipofílica dos monoterpenos presentes nesses óleos (Cristani *et al.*, 2007). Sikkema e seus colaboradores (1994) observaram que o efeito dos hidrocarbonetos cíclicos sobre as propriedades estruturais e funcionais das membranas biológicas estava diretamente relacionado com a acumulação destes compostos nas membranas, o que provocaria perda da sua integridade. Por sua vez, Cristani e seus colaboradores (2007) propuseram em um estudo que a atividade antibacteriana dos monoterpenos estudados (timol, carvacrol, p-cymeno e  $\gamma$ -terpineno), pelo menos parcialmente, era devido sua penetração e consequente perturbação da fração lipídica das membranas plasmáticas, afetando permeabilidade da membrana celular. Além disso, evidenciou que estes compostos podem ser capazes de permear através das membranas celulares e interagir com componentes intracelulares críticos para a atividade antibacteriana.

Os compostos têrpenicos mais frequentes nos óleos essenciais são monoterpenos, correspondendo a cerca de 90% dos óleos voláteis, e sesquiterpenos (Simões e Spitzer, 2003). No entanto, mesmo havendo diversos trabalhos com sesquiterpenos, principalmente com sesquiterpenos oxigenados (Wu-Li-Ji *et al.*, 2012; Suresh *et al.*, 2013; Yang *et al.*, 2014), não foi encontrado nenhum trabalho que relatasse atividade antimicrobiana com óleos essenciais que tivesse como compostos majoritários os mesmos referidos neste estudo.

#### 4.3. AVALIAÇÃO DO DANO CELULAR POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA EM *Listeria monocytogenes* CAUSADO POR ÓLEO ESSENCIAL DE *Heterothalamus psiadioides* E POR FRAÇÃO COMPOSTA POR MONOTERPENOS

As células bacterianas tratadas tanto com óleo essencial de *H. psiadioides* quanto com a fração de monoterpenos não apresentaram alterações morfológicas visíveis quando comparadas às células não tratadas (Figura 10).





**Figura 10 - Imagens da microscopia de varredura de células de *Listeria monocytogenes* não tratadas e tratadas**

(A) Células não tratadas, aumento x13.000; (B) Células tratadas com óleo essencial de *Heterothalamus psiadioides*, aumento de x40.000; (C) Células tratadas com fração composta por monoterpenos, aumento de x16.000.

Como observado na figura acima, não foi observado nenhum dano nas células, este pode ter ocorrido devido ao baixo tempo de exposição do micro-organismo aos agentes utilizados. Ainda, podemos considerar que a baixa resolução das fotos pode mascarar algum dano inicial das células. No entanto, não foi possível obter uma resolução melhor, pois quando se aumentava a emissão do feixe de elétrons ocorria dano no material devido à geração de calor na área de incidência do feixe de elétrons. Esse dano causado pelo Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) pode ser em virtude de características inapropriadas decorrentes do preparo da amostra, como porcentagem baixa do fixador glutaraldeído, dessecação incompleta do material e metalização apenas com ouro, por exemplo. De acordo

com Egerton e Malac (2004) a presença de água causa grandes danos de radiação pelo MEV em amostras biológicas e orgânicas devido à ionização das moléculas de água e geração de radicais livres. Ainda, segundo Castro (2001), para amostras mais sensíveis, como materiais biológicos, pode-se aplicar uma camada de carbono, evaporado em alto vácuo, antes da cobertura com ouro, para evitar danos causados pelo feixe de elétrons.

Desta forma, em trabalhos futuros poder-se-ia aumentar o tempo de exposição do micro-organismo ao óleo essencial de *H. psiadioides* e à fração de monoterpenos, visto que acreditamos que deste modo visualizar-se-ia o dano causado por esses agentes. Ainda, poderia alterar o protocolo de preparação das amostras, a fim de tornar o material de análise mais resistente. Assim, aumentando o feixe de elétrons a resolução das fotos também aumentaria e desta maneira seria possível melhorar a visualizar a membrana celular das células de *L. monocytogenes*.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

A composição química da fração do óleo essencial de *H. psiadioides* composta predominantemente por monoterpenos apresentou como composto majoritário o  $\beta$ -pineno, o qual os dados da literatura pesquisa apontaram como sendo um dos responsáveis pela atividade antibacteriana em diversos óleos voláteis. Já na fração composta predominantemente por sesquiterpenos o composto majoritário foi o Ar-curcumeno, não sendo encontrado nenhum estudo que relatasse atividade antimicrobiana com óleos essenciais que tivesse esse composto majoritário. Em trabalhos futuros, a técnica de RMN de C<sup>13</sup> poderia ser utilizada na análise tanto do óleo essencial quando das frações de mono e sesquiterpenos com o objetivo de complementar a análise realizada por CG-EM.

O óleo essencial de *H. psiadioides* e a fração composta predominante por sesquiterpenos, quando avaliados pela metodologia adotada, não apresentaram atividade anti *L. monocytogenes*. No entanto, a fração majoritariamente composta por monoterpenos demonstrou um comportamento diferente, indicando exibir atividade antibacteriana, fato que nos levou a pensar que sesquiterpenos e/ou eventuais compostos não identificados têm efeito antagônico sobre a atividade antibacteriana do óleo essencial de *H. psiadioides*. Em projetos futuros, poderia se investigar se a predominância do  $\beta$ -pineno favorece a atividade anti *L. monocytogenes*.

Não foi possível visualizar o dano celular por MEV causado em *L. monocytogenes* pelo óleo essencial de *H. psiadioides* e pela fração composta por monoterpenos, possivelmente pelo pouco tempo de exposição a esses agentes e/ou em virtude da baixa resolução e ampliação das fotografias. Assim, em trabalhos futuros, a preparação da amostra poderia ser modificada a fim de obter uma resolução melhor das fotos e uma melhor visualização da membrana celular das células de *L. monocytogene*.

## REFERÊNCIAS

Adams, R.P. *Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry*. 4 Ed. Editora Alluredbooks, 2001.

Alice, C.B.; Siqueira, N.C.S.; Mentz, L.A.; Silva, G.A.A.B.; José, K.F.D. *Plantas Medicinais de Uso Popular: atlas farmacognóstico*. 1 Ed. Canoas: Editora ULBRA, 1995.

Allerberger, F.; Wagner, M. Listeriosis: a resurgent foodborne infection. *European Society of Clinical Microbiology and Infectious Diseases*, v.16, n.1, p.16-23, 2010.

Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, v.46, n. 2, p.446-475, 2008.

Baratto, L.; Lang, K.L.; Vanz, D.C.; Reginatto, F.H.; Oliveira, J.B.; Falkenberg, M. Investigação das atividades alelopática e antimicrobiana de *Mikania laevigata* (Asteraceae) obtida de cultivos hidropônico e tradicional. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.18, n.4, p.577-582, 2008.

Brochini, C.B.; N nuez, C.V.; Moreira, I.C.; Roque, N.F. Identificação de componentes de óleos voláteis: análise espectroscópica de misturas de sesquiterpenos. *Química nova*, v.22, n.1, p.37-40, 1999.

Brouwer, M. C.; Van de Beek, D.; Heckenberg, S.G.B.; Spanjaard, L.; Gans, J. Community-acquired *Listeria monocytogenes* meningitis in adults. *Clinical Infectious Diseases*, v.43, n.10, p.1233-1238, 2006.

Bruneton, J. *Pharmacognosy, Phytochemistry, Medicinal Plants*. 2 Ed. Paris: Editora Intercept, 1999.

Burt, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods - a review. *International Journal of Food Microbiology*, v. 94, n.3, p. 223-253, 2004.

Canillac, N. e Mourey A. Effects of several environmental factors on the anti-*Listeria monocytogenes* activity of an essential oil of *Picea excels*. *International Journal of Food Microbiology*, v.92, n.1, p.95– 103, 2004.

Castro, L. A. S., Processamento de mostras para microscopia eletrônica de varredura. Pelotas, *Embrapa Clima Temperado*, Documento 93, 2001.

Cornelissen, C.N.; Fisher, B.D.; Harvey, A.H. *Lippincott's Illustrated Reviews: Microbiology*. 3 Ed. Philadelphia: Editora Lippincott Williams & Wilkins, 2013.

Cristani, M.; D'Arrigo, M.; Mandalari, G.; Castelli, F.; Sarpietro, M.G.; Micieli, D.; Venuti, V.; Bisignano, G.; Saija, A.; Trombetta, D. Interaction of four monoterpenes contained in essential oils with model membranes: implications for their antibacterial activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.55, n.15, p.6300-6308, 2007.

Deble, L.P.; Oliveira, A.S.; Marchiori, J.N.C. O gênero *Heterothalamus* Lessing e táxones afins. *Balduinia: Revista do Herbário do Departamento de Ciências Florestais*, n.1, p.1-20, 2005.

Egerton, R.F.; Li, P.; Malac, M. Radiation damage in the TEM and SEM. *International Wuhan Symposium on Advanced Electron Microscopy/ Micron*, v.35, n.6, p.399-409, 2004.

Ellwanger, J. Activity of essential oil from *Heterothalamus psiadioides* Less (Asteraceae) against *Listeria monocytogenes* strains. Porto Alegre: 2013. Trabalho de conclusão de curso. Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Embarek, P.K.B., Presence, detection and growth of *Listeria monocytogenes* in seafoods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, v.23, n.1, p.17-34, 1994.

Farber, J.M. e Peterkin, P.I., *Listeria monocytogenes*, a Food-Borne Pathogen. *Microbiological Reviews*, v.55, n.3, p.476-511, 1991.

Fabri, R.L.; Nogueira, M.S.; Dutra, L.B.; Bouzada, M.L.M.; Scio, E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.13, n.2, p.183-189, 2011.

Ferronato, R.; Marchesan, E.D.; Pezenti, E.; Bednarski, F.; Onofre, S.B. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais produzidos por *Baccharis dracunculifolia* D.C. e *Baccharis uncinella* D.C. (Asteraceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.17, n.2, p.224-230, 2007.

Forsythe, S.J. *Microbiologia da segurança dos alimentos*. 2 Ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2013.

Guptaa, A.D; Bansalb, V.K; Babuc, V.; Maithila, N. Chemistry, antioxidant and antimicrobial potential of nutmeg (*Myristica fragrans* Houtt). *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, v.11, n.1, p.25-31, 2013.

Jay, J.M. *Microbiologia de Alimentos*. 6 Ed. Porto Alegre: Editora Artmed, 2005.

Kerber, V.A.; Miguel, O.G.; Moreira, E.A. Flavonoids from *Heterothalamus psiadioides*. *Fitoterapia* 2, p.185-186, 1993.

Kim, J.; Marshall, M.R.; Wei, C. Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v.43, n.11, p.2839-2845, 1995.

Kulisic, T.; Radonic, A.; Katalinic, V.; Milos, M. Use of different methods for testing antioxidative activity of oregano essential oil. *Food Chemistry*, v. 85, n.4, p.633–640, 2004.

Leite, A.M.; Lima, E.O.; Souza, E.L.; Diniz, M.F.F.M.; Trajano, V.N.; Medeiros, I.A. Inhibitory effect of  $\beta$ -pinene,  $\alpha$ -pinene and eugenol on the growth of potential infectious endocarditis causing Gram-positive bacteria. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.43, n.1, p.121-126, 2007.

Low, J.C. e Donachie, W., A Review of *Listeria monocytogenes* and Listeriosis. *The Veterinary Journal*, v.153, n.1, p.9-29, 1997.

Martins, S. I.; Faria, F.C.C.; Miguel, M.C.A.L.; Dias, M.P.S.C.; Cardoso, F.L.L.; Magalhães, A.C.G.; Mascarenhas, L.A.; Nouér, S.A.; Barbosae, A.V.; Vallim, D.C.; Hofer, E.; Rebello, R.F.; Riley, L.W.; Moreira, B.M. A cluster of *Listeria monocytogenes* infections in hospitalized adults. *American Journal of Infection Control*, v.38, n.9, p.e31-e36, 2010.

Mazzarrino, G.; Paparella, A.; Chaves-López, C.; Faberi, A.; Sergi, M.; Sigismondi, C.; Compagnone, D.; Serio, A. Salmonella enterica and *Listeria monocytogenes* inactivation dynamics after treatment with selected essential oils. *Food Control*, v.50, p.794-803, 2015

McLauchlin, J.; Mitchell, R.T.; Smerdon W.J.; Jewell, K. *Listeria monocytogenes* and listeriosis: a review of hazard characterisation for use in microbiological risk assessment of foods. *International Journal of Food Microbiology*, v.92,n.1, p.15-33, 2004.

Montville, T.J.; Matthews, K.R.;Kniel, K.E. *Food Microbiology an Introduction*. 3 Ed. Washington: Editora ASM, 2012.

Moreira, I.J.A.; Serafini, M.R.; Junior, W.L.; Ribeiro, E.A.N; Filho, V.J.S.; Junior, D.B.P.; Araújo, A.A.S; Júnior, L.J.Q.; Santos, M.R.V. Prospecção tecnológica da utilização do beta-pineno. *Revista de gestão, inovação e tecnologias*, v.3, n.2, p.186-194, 2013.

Mors, W.B.; Rizzini, C.T.; Pereira, N.A. *Medicinal Plants of Brazil*. ? Ed. Algonac: Editora Referenc Publications, 2000.

Mourey, A e Canillac, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. *Food Control*, v.13, n.4-5, p.289-292, 2002.

Negreiros, M. O. Avaliação da atividade antimicrobiana e antibiofilme de óleos essenciais de *Heterothalamus* sp. sobre *Enterococcus faecalis*. Porto Alegre: 2014. Dissertação (Mestrado em Microbiologia Agrícola e do Ambiente)- Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

O'Riordan M., Yi C.H., Gonzales R., Lee K.D., Portnoy D.A. Innate recognition of bacteria by a macrophage cytosolic surveillance pathway. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v.99, n.21, p.13861-13866, 2002.

World Health Organization position papers: 27 SEPTEMBER 2013, 88<sup>th</sup>. N. 39, p.413–428. <http://www.who.int/wer/2013/wer8839.pdf> ACESSADO EM 05 DE ABRIL DE 2015.

Pamer, E.G., Immune responses to *Listeria monocytogenes*. *Nature Reviews Immunology*, v.4, n.1, p. 812- 823, 2004.

Pearson, L. J. e Marth, E. H., *Listeria monocytogenes* – Threat to a safe food supply: a review. *Journal of Dairy Science*, v.73, n.4, p.912-928, 1990.

Pirbalouti, A.G.; Fioznehad, M.; Craker, L.; Arbarzadeh, M. Essential oil compositions, antibacterial and antioxidant activities of various populations of *Artemisia chamaemelifolia* at two phenological stages. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 23, n.6, p.861–869, 2013.

Robbers, J.E.; Speedie, M.K.; Tyler, V.E. *Farmacognosia e Farmacobiotechnologia*. 1Ed. São Paulo: Editora Premier, 1997.

Rücker G, Walter RD, Manns D, Mayer R. Antimalarial activity of some natural peroxides. *Planta Médica*, v.57, n. 3, p. 295-296, 1991.

Santos, R.I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A. Petrovick, P.R. (Ed). *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. 5 Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS e UFSC, 2003.

Schmidt-Silva, V. Potencial alelopático do óleo essencial de espécies de *Heterothalamus* Less. (Asteraceae) nativas no Rio Grande do Sul. Porto Alegre: 2012. Tese (Doutorado em Botânica)- Instituto de Biociências, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Seveau, S., Pizarro-Cerda, J., Cossart, P. Molecular mechanisms exploited by *Listeria monocytogenes* during host cell invasion. *Microbes and Infection*, v.9, n.10, p. 1167-1175, 2007.

Shellie, R.A.; Marriott, F. J.; Huie, C.W. Comprehensive two-dimensional gas chromatography (GC x GC) and GC x GC-quadrupole MS analysis of Asian and

American ginseng. *Journal of Separation Science*, v. 26, n. 12-13, p. 1185-1192, 2003.

Sikkema, J.; Bont, J.A.M.; Poolman, B. Interactions of cyclic hydrocarbons with biological membranes. *The Journal of Biological Chemistry*, v.269, n.11, p.8022-8028, 1994.

Simões, C.M.O. e Spitzer, V. Óleos voláteis. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Gosmann, G.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A. Petrovick, P.R. (Ed). *Farmacognosia da Planta ao Medicamento*. 5 Ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS e UFSC, 2003.

Smith-Palmer, A.; Stewart, J.; Fyfe, L. Antimicrobial properties of plant essential oils and essences against five important food-borne pathogens. *Applied Microbiology*, v.26, n.2, p.118–122, 1998.

Souza, G.H.B.; Mello, J.C.P; Lopes, N.P. *Farmacognosia: coletânea científica*. 1 Ed. Ouro Preto: Editora da UFOP, 2011.

Stefanello, M.E.A.; Salvador, M.J.; Ito, I.Y.; Macari,P.A.T. Avaliação da atividade antimicrobiana e citotóxica de extratos de *Gochnatia polymorpha* ssp *floccosa*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.16, n.4, p.525-530, 2006.

Suresh, G.; Poornima B.; Babu, S.K.; Yadav, P.A.; Rao, M.S.A.; Siva, B.; Prasad, K.R.; Nayak, V.L.; Ramakrishna, S. Cytotoxic sesquiterpenes from *Hedychium spicatum*: Isolation, structure elucidation and structure–activity relationship studies. *Fitoterapia*, v.86, p.100-107, 2013.

Suyenaga, E.S.; Apel, M.A.; Chaves, C.G.; Zuanazzi, J.A.; Henriques A.T. Essential oil composition of *Heterothalamus psiadioides* Less. *Biochemical Systematics and Ecology*, v.32, n.1, p.83-86, 2004.

Tisserand, R. e Young R. *Essential Oil Safety: A Guide for Health Care Professionals*. 2 Ed. London: Editora Elsevier, 2014.

Todd, E.C.D. e Notermans, S. Surveillance of listeriosis and its causative pathogen, *Listeria monocytogenes*. *Food Control*, v.22, n.9., p. 1484-1490, 2011.

Vázquez-Boland, J. A., Kuhn M., Berche P., Chakraborty,T., Domínguez-Bernal, G., Goebel, W., González-Zorn B., Wehland, J., Kreft, J. *Listeria* Pathogenesis and Molecular Virulence Determinants. *Clinical Microbiology Reviews*, v.14, n. 3, p.584–640, 2001.

Wu-Li-Ji, AO; Wang, Qing-Hu; Si-Qin; Mu-Dan; Sa-Ren-Tu-Ya; Dai, Na-Yin-Tai; Du-Ri-Si-Ha-La-Tu. The structural elucidation and antimicrobial activities of two new sesquiterpenes from *Syringa pinnatifolia* Hemsl. *Chinese Journal of Natural Medicines*, v.10, n.6, p.477–480, 2012.



Yang, X.; Wang, C.; Yang, J; Wan, D.; Lin, Q.; Yang, G.; Mei, Z.; Feng, Y. Antimicrobial sesquiterpenes from the Chinese medicinal plant, *Chloranthus angustifolius*. *Tetrahedron Letters*, v.55, n.41, p.5632–5634, 2014.