

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA
CURSO DE BACHARELADO EM QUÍMICA

EDUARDO VINICIUS TEL

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DA PARTE
AÉREA DE *Eugenia uniflora* OBTIDO POR ARRASTE A VAPOR**

TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

PATO BRANCO

2021

EDUARDO VINICIUS TEL

**ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DA PARTE
AÉREA DE *Eugenia uniflora* OBTIDO POR ARRASTE A VAPOR**

**ANTIBACTERIAL ACTIVITY OF ESSENTIAL OIL FROM THE AERIAL
PART OF *EUGENIA UNIFLORA* OBTAINED BY STEAM DISTILLATION**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentada como requisito parcial à obtenção do título de Bacharel em Química, do Departamento de Química, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná.

Orientador: Profa. Dra. Sirlei Dias Teixeira

PATO BRANCO

2021



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Esta licença permite download e compartilhamento do trabalho desde que sejam atribuídos créditos ao(s) autor(es), sem a possibilidade de alterá-lo ou utilizá-lo para fins comerciais. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



Ministério da Educação
**Universidade Tecnológica Federal do
Paraná**

Pato Branco

Departamento de Química

Curso de Bacharelado em Química



TERMO DE APROVAÇÃO

ATIVIDADE ANTIBACTERIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DA PARTE AÉREA DE
Eugenia uniflora OBTIDO POR ARRASTE A VAPOR

por

EDUARDO VINICIUS TEL

Este Trabalho de Conclusão de Curso (TCC) foi apresentado(a) em 02 de dezembro de 2021 às 14 horas como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Química. O candidato foi arguido pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho Aprovado.

Sirlei Dias Teixeira

Prof. Orientadora

Davi Costa Silva

Membro titular

Vanderlei Aparecido de Lima

Membro titular

Nota: O Documento original e assinado pela Banca Examinadora encontra-se no SEI processo 23064.053230/2021-65.

AGRADECIMENTOS

Poucos parágrafos certamente não expressarão toda a gratidão que sinto pela oportunidade de viver e concluir essa jornada acadêmica em um curso e instituição que tanto prezo, mas farei o meu melhor, começando pelo agradecimento a mim por ter mergulhado nessa experiência e nunca ter olhado para trás, mesmo com as dificuldades ao longo do caminho.

Agradeço principalmente a minha irmã Juliana Tel por ser uma fonte inesgotável de amor, parceria e suporte emocional, aos meus pais Ines e Jair Tel tornarem tudo isso possível me apoiando e também auxiliando financeiramente, e aos meus melhores amigos Anderson Justen e Yuri Lucas.

Quanto aos laços formados na instituição, sou grato à Samantha Ohse por ter sido minha maior companheira durante toda a jornada acadêmica, à Kamyla Cavalcante e Juliane Dorta pela amizade e ajuda no desenvolvimento do trabalho, e a todos que de alguma forma contribuíram em minha formação profissional ou pessoal, sejam esses colegas de disciplinas, laboratório, estágio, centro acadêmico ou professores que tive a oportunidade de conhecer por meio de disciplinas e iniciações científicas.

Por fim, agradeço à banca avaliadora do TCC por se fazerem presentes no momento mais importante da minha formação, e à minha orientadora Sirlei Dias Teixeira, por ser uma pessoa tão compreensível, acessível, empática, bondosa e inteligente, compartilhando comigo tamanho conhecimento e experiência que levarei pelo resto da minha carreira.

RESUMO

TEL, Eduardo Vinicius. **Atividade antibacteriana do óleo essencial da parte aérea de *Eugenia uniflora* obtido por arraste a vapor**. 2021. 39. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Pato Branco, 2021.

Eugenia uniflora é uma espécie popularmente conhecida como pitangueira, pertencente à família Myrtaceae e caracterizada como planta alimentícia não convencional (panc). No presente estudo, obtém-se o óleo essencial da parte aérea (galhos finos e folhas) de *E. uniflora* por arraste a vapor e hidrodestilação, calculando o rendimento para cada método de obtenção. A atividade antibacteriana do óleo essencial obtido por arraste a vapor foi analisada por meio das análises de disco-difusão em ágar e microdiluição em caldo, para as bactérias *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* e *S. typhimurium*. Por disco-difusão em ágar, avaliou-se o diâmetro do halo de inibição formado pela amostra em placas de Petri contendo cada suspensão bacteriana. Por microdiluição em caldo, foram realizadas várias diluições do óleo essencial com o objetivo de se estimar a faixa de Concentração Inibitória Mínima (CIM) em cada bioensaio. A pesquisa contribui para uma possível aplicação da parte aérea de pitangueira, ao invés dos frutos, e confere maior visibilidade e valorização para a panc em estudo.

Palavras-chave: Arraste a Vapor. Atividade Antibacteriana. *Eugenia uniflora*. Óleos Essenciais. Panc.

ABSTRACT

TEL, Eduardo Vinicius. **Antibacterial activity of essential oil from the aerial part of *Eugenia uniflora* obtained by steam distillation**. 2021. 39. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química) - Federal Technology University - Parana. Pato Branco, 2021.

Eugenia uniflora is a species popularly known as pitangueira, belonging to the Myrtaceae family and characterized as a non-conventional food plant (panc). In the present study, the essential oil of the aerial part (twigs and leaves) of *E. uniflora* is obtained by steam distillation and hydrodistillation, calculating the yield for each method of obtaining. The antibacterial activity of the essential oil obtained by steam distillation is verified by the methods disk diffusion in agar and microdilution in broth, for the bacteria *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* and *S. typhimurium*. By disk diffusion in agar, the diameter of the inhibition halo formed by the sample in Petri dish containing each bacterial suspension was evaluated. By microdilution in broth, several dilutions of the essential oil were performed in order to estimate the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) range in each bioassay. The research contributes to a possible application of the aerial part of pitangueira, instead of the fruits, and gives greater visibility and appreciation for the studied panc.

Keywords: Antibacterial Activity. Essential Oils. *Eugenia uniflora*. Panc. Steam Distillation.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Modelo de placa para disco-difusão em ágar, sendo 1: Controle Negativo; 2, 3 e 4: amostra de óleo essencial puro em triplicata; 5: Controle Positivo.....	25
Fotografia 1 - Parte aérea (galhos finos e folhas) da espécie <i>E. uniflora</i> (pitangueira)	20
Fotografia 2 - Árvore da espécie <i>E. uniflora</i> (pitangueira)	21
Fotografia 3 - Sistema adaptado para obtenção de óleo essencial por arraste a vapor em laboratório	22
Fotografia 4 - Aparato Clevenger acoplado à manta aquecedora para obtenção de óleo essencial por hidrodestilação em laboratório	23
Fotografia 5 - Material vegetal seco de <i>E. uniflora</i> imerso em água destilada.....	24
Fotografia 6 - Óleo essencial da parte aérea de <i>E. uniflora</i> obtido por arraste a vapor	27
Fotografia 7 - Vials de armazenamento contendo óleo essencial da parte aérea de <i>E. uniflora</i> obtido por hidrodestilação.....	28
Fotografia 8 - Resultados da análise de disco-difusão em ágar para as bactérias <i>B. cereus</i> (1), <i>S. aureus</i> (2), <i>E. coli</i> (3) e <i>S. typhimurium</i> (4).....	29
Fotografia 9 - Resultados da análise de microdiluição em caldo para as bactérias <i>B. cereus</i> (1), <i>S. aureus</i> (2), <i>E. coli</i> (3) e <i>S. typhimurium</i> (4).....	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Diâmetros dos halos de inibição formados na análise de disco-difusão em ágar	30
Tabela 2 - Discussão dos halos de inibição obtidos e comparação com referências	30
Tabela 3 - Comparação dos resultados de CIM obtidos na análise de microdiluição em caldo com valores de referência.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E ACRÔNIMOS

LISTA DE ABREVIATURAS

B. cereus – *Bacillus cereus*

E. coli – *Escherichia coli*

E. uniflora – *Eugenia uniflora*

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

S. typhimurium – *Salmonella typhimurium*

LISTA DE SIGLAS

CG-EM – Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas

OE – Óleo Essencial

LISTA DE ACRÔNIMOS

CIM – Concentração Inibitória Mínima

Panc – Plantas alimentícias não convencionais

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS	13
2.1 GERAL	13
2.2 ESPECÍFICOS	13
3 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3.1 PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS (PANC)	14
3.1.1 <i>Eugenia uniflora</i>	15
3.2 METABÓLITOS	15
3.2.1 Metabólitos Secundários	16
3.3 TERPENOS	17
3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS (OE)	17
3.4.1 Métodos de Obtenção	18
3.4.2 Análises Desenvolvidas	19
4 MATERIAL E MÉTODOS	20
4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL	20
4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	21
4.2.1 Arraste a Vapor	21
4.2.2 Hidrodestilação	22
4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	24
4.3.1 Disco-difusão em Ágar	24
4.3.2 Microdiluição em Caldo	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	27
5.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL	27
5.1.1 Arraste a Vapor	27
5.1.2 Hidrodestilação	28
5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA	29
5.2.1 Disco-difusão em Ágar	29
5.2.2 Microdiluição em Caldo	30
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
REFERÊNCIAS	34

1 INTRODUÇÃO

Os produtos naturais apresentam uma crescente aplicabilidade em diversas áreas presentes na vida cotidiana, tendo em vista suas variadas atividades biológicas. Desse modo, o presente estudo proporciona a ideia do resgate cultural e o aumento da visibilidade de espécies caracterizadas como plantas alimentícias não convencionais (panc).

Panc são pouco consumidas e utilizadas no cotidiano, bem como constantemente negligenciadas por grande parte da população, visto que, no Brasil, estima-se a existência de cerca de 3 mil espécies de plantas alimentícias, correspondentes a 10% da flora nativa do país, mas ainda assim, usualmente o cardápio da população se limita a algumas dezenas de espécies. Por conta dessa desvalorização cultural, as panc não apresentam uma ampla aplicação na indústria alimentícia, cosmética, farmacêutica, entre outras.

A presente pesquisa avalia a atividade antibacteriana do óleo essencial obtido da parte aérea (folhas e galhos finos) de *Eugenia uniflora*, popularmente conhecida como pitangueira. Assim, o estudo se justifica porque a espécie se caracteriza como panc, já que, além dos frutos não serem usualmente disponibilizados à venda e praticamente não existirem produtos alimentícios industrializados baseados em pitanga, as folhas e galhos podem ser comestíveis.

O óleo essencial de *E. uniflora* utilizado nas análises microbiológicas foi obtido por arraste a vapor, em um sistema laboratorial que imita a produção industrial em larga escala. A partir da avaliação da atividade antibacteriana, o objetivo da pesquisa foi contribuir para uma maior visibilidade do potencial científico da panc, e despertar interesse da indústria na obtenção de óleos essenciais de espécies regionais.

2 OBJETIVOS

2.1 GERAL

Realizar a obtenção do óleo essencial da parte aérea de *E. uniflora* via arraste a vapor e hidrodestilação, para análise de potencial atividade antibacteriana e posterior análise cromatográfica, conferindo maior visibilidade à planta alimentícia não convencional (panc).

2.2 ESPECÍFICOS

Obter óleo essencial da parte aérea de pitangueira utilizando um sistema de arraste a vapor d'água, para posterior análise cromatográfica;

Avaliar qualitativamente a atividade antibacteriana do óleo essencial obtido via arraste a vapor, analisando o diâmetro do halo de inibição formado com a técnica de disco-difusão em ágar;

Examinar quantitativamente o caráter inibitório do óleo essencial obtido via arraste a vapor com a estimativa da Concentração Inibitória Mínima (CIM), por meio da técnica de microdiluição em caldo;

Obter óleo essencial da parte aérea de pitangueira seca, via hidrodestilação com aparato Clevenger acoplado à manta aquecedora, para posterior análise cromatográfica.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS (PANC)

O Brasil se destaca quando o assunto é a biodiversidade, possui a mais variada flora do mundo, correspondente a 22% das espécies vegetais conhecidas mundialmente (BRASIL, 2017; MYERS *et al.*, 2000). Apesar das diversas políticas e campanhas de preservação ambiental, é notável e alarmante a quantidade de espécies conhecidas que estão em risco de extinção por conta da devastação causada pela urbanização e agropecuária (VALLI; RUSSO; BOLZANI, 2018).

A diminuição da biodiversidade vegetal também se dá por conta da globalização, visto a estimativa de que apenas 20 a 30 espécies correspondem a 90% dos alimentos consumidos mundialmente, enquanto existem pelo menos 3 mil plantas alimentícias apenas no Brasil (CHAVES, 2016). Como resultado dessa monocultura alimentar, além da limitação da dieta brasileira e do desaparecimento de espécies, existem também as consequências na saúde da população, visto o uso excessivo de agrotóxicos e transgênicos (BRASIL, 2014; KELEN *et al.*, 2015).

Na contramão da agricultura convencional, em 2008, o Professor e Biólogo Valdecy Ferreira Kinupp adota a expressão plantas alimentícias não convencionais (panc) para tratar das espécies vegetais que não fazem parte da dieta habitual brasileira, mas que possuem valor nutricional e cultural (KELEN *et al.*, 2015). Usualmente algumas das panc são vistas como plantas invasoras por conta do crescimento espontâneo e independente, quando na verdade deveriam ser vistas como opção para maior diversificação de nossa base alimentar, já que além de ricas em vitaminas essenciais, podem ser facilmente cultivadas (CHAVES, 2016).

Dar visibilidade às panc se faz fundamental por diversos motivos: a valorização cultural de comunidades tradicionais e indígenas que as utilizam na vida cotidiana, a preservação dessas espécies defendendo a rica biodiversidade brasileira, a diversificação da dieta que traz impactos econômicos e hábitos saudáveis, e também um mundo de oportunidades para o estudo das espécies na ciência (CARVALHO *et al.*, 2015; CHAVES, 2016). Dentre as diversas qualidades das panc, vários trabalhos apontam a presença de moléculas antioxidantes, que agem diretamente na diminuição da concentração de radicais livres no organismo, radicais

esses que podem ser responsáveis pelo desencadeamento de doenças degenerativas e envelhecimento das células (HIRATA; SATO; SANTOS, 2004; VIANA *et al.*, 2015).

3.1.1 *Eugenia uniflora*

O presente trabalho fará uso do óleo essencial da parte aérea da espécie *E. uniflora*, uma panc pertencente à família Myrtaceae, é usualmente referida popularmente como pitangueira e pode se dispor na forma de uma pequena árvore ou um denso arbusto. A espécie é principalmente conhecida por seus frutos comestíveis, pitangas, que podem apresentar coloração amarela, alaranjada, vermelha e até mesmo preta. Os frutos apresentam alta perecibilidade, fator esse que dificulta o comércio *in natura*, sendo assim mais utilizado comercialmente em processados como polpas congeladas (SIMINSKI; REIS; CORADIN, 2011).

As folhas da espécie são popularmente utilizadas em chás, estudos relatam um caráter antidiarreico, antipirético, antigripal, estomáquico, hipotensor e hipoglicemiante (AURICCHIO; BACCHI, 2003; DA FONSECA-KRUEL; PEIXOTO, 2004). O extrato alcoólico das folhas também se faz útil na medicina popular, uma vez descrita sua utilização no tratamento de ansiedade, hipertensão arterial, verminose, febres, tosses e bronquites (AURICCHIO *et al.*, 2007; LORENZI; MATOS, 2002 apud AURICCHIO *et al.*, 2007).

Na cosmetologia, o óleo essencial das folhas de pitangueira possui aplicação em diversos produtos como shampoos, perfumes e óleos corporais por conta de seu agradável odor. Porém, várias pesquisas apontam que suas qualidades não estão apenas no aroma, visto que apresentam diversas atividades biológicas importantes como antimicrobiana, antioxidante, antitumor, antinociceptiva, antifúngica e inseticida (AMORIM *et al.*, 2009; COSTA *et al.*, 2010; JUNG *et al.*, 2013; MOURA *et al.*, 2018; OGUNWANDE *et al.*, 2005; VICTORIA *et al.*, 2012).

3.2 METABÓLITOS

As características químicas de uma espécie vegetal estão relacionadas ao seu metaboloma, sendo esse a composição de todas as moléculas presentes no organismo, dentre essas moléculas se destacam os metabólitos primários e

secundários (HALL, 2006). A composição do metabolismo primário é basicamente o mesmo para todos os organismos, sendo esse responsável por prover substâncias que atuam nas diversas funções bioquímicas essenciais para a vida celular, como a respiração, a biossíntese de aminoácidos, desenvolvimento de células e certos mecanismos gerais de defesa (BRAZ FILHO, 2010; ZAYNAB *et al.*, 2019).

3.2.1 Metabólitos Secundários

A maioria dos compostos orgânicos produzidos pelas plantas não participam diretamente do seu processo de crescimento e desenvolvimento, esses compostos fazem parte do metabolismo secundário e são responsáveis por caracterizar as individualidades das espécies. Durante muito tempo, o estudo desses metabólitos secundários foi dado como insignificante e recebeu pouca atenção por parte dos biólogos vegetais. Entretanto, o estudo das propriedades químicas é de grande importância para os químicos orgânicos desde meados da década de 1850, vindo posteriormente a servir como base para a química orgânica contemporânea (CROTEAU; LEWIS; KUTCHAN, 2000).

O metabolismo secundário é responsável por conferir às plantas características específicas como cor, sabor e odor; também se faz importante em mecanismos de defesa contra insetos, herbívoros, patógenos, etc. (BENNETT; WALLSGROVE, 1994). O estudo desses produtos naturais impulsionou o desenvolvimento de diversas técnicas, como as de separação e elucidação de estruturas; também se apresentaram muito eficazes em inúmeros produtos como perfumes, polímeros, fármacos, corantes, inseticidas, herbicidas e muitos outros (CROTEAU; LEWIS; KUTCHAN, 2000).

Dentre as diversas classes de metabólitos secundários existem os metabólitos secundários voláteis, são compostos facilmente percebidos sensorialmente pelo olfato, além de apresentarem baixo peso molecular (aproximadamente 300 unidades de massa atômica) e alta pressão de vapor, sendo assim facilmente carregados pelo ar ou pela água (SANTOS FILHO, 2010). São distribuídos em variadas classes, onde se destacam os terpenoides, fenilpropanoides, benzenoides, derivados de aminoácidos e derivados de ácidos graxos (DUDAREVA; PICHERSKY, 2008).

3.3 TERPENOS

Os terpenos provavelmente constituem a maior classe de produtos naturais e são popularmente conhecidos por seus compostos e derivados representarem a fração majoritária dos diversos óleos essenciais. Possuindo mais de 20 mil compostos conhecidos, esses metabólitos não apenas possuem grande importância para o desenvolvimento da planta e a interação da mesma com o meio ambiente, como também significativo valor comercial por conta de suas fragrâncias, sabores, ações inseticidas e diversos outros usos (CROTEAU; LEWIS; KUTCHAN, 2000; FELIPE; BICAS, 2017; THOLL, 2006).

Usualmente são moléculas altamente insaturadas, sendo assim facilmente decompostas por calor, luz e oxigênio para produzir compostos de odores indesejados. Possuem inúmeras variações estruturais que são divididas conforme unidades de 5 átomos de carbono derivados do isopentenil pirofosfato ou de seu isômero dimetilalil pirofosfato (DE CASTRO; JIMÉNEZ-CARMONA; FERNÁNDEZ-PÉREZ, 1999; THOLL, 2006).

Faz-se importante destacar algumas classes de terpenos, como os tetraterpenos (C₄₀), também conhecidos como carotenoides, são compostos responsáveis por atribuir coloração às diversas plantas e frutos. Também é relevante citar os monoterpenos (C₁₀) e sesquiterpenos (C₁₅), que são as principais moléculas na composição de óleos essenciais, apresentam alta volatilidade por conta de possuírem massa molecular inferior, e seus derivados oxigenados são altamente odoríferos e responsáveis por aromas característicos (DE CASTRO; JIMÉNEZ-CARMONA; FERNÁNDEZ-PÉREZ, 1999; FELIPE; BICAS, 2017).

3.4 ÓLEOS ESSENCIAIS (OE)

Mais de 17.000 espécies vegetais apresentam óleos essenciais em sua composição, esses são metabólitos secundários odoríferos caracterizados como líquidos voláteis que servem como sinais químicos para regular o papel ecológico de uma planta, fazendo com que a mesma desempenhe importantes funções como se comunicar com outras plantas, repelir predadores, inibir a germinação de sementes e atrair insetos para polinização. Os óleos essenciais podem ser encontrados em

diversas partes das plantas como na flor, folha, rizoma, raiz, semente, fruto e até mesmo madeira (HANIF *et al.*, 2019; SVOBODA; GREENAWAY, 2003).

Podendo representar de 0,01% a 10% do peso da planta, os óleos essenciais são a mistura de mais de 200 compostos, onde a composição se divide entre a fração volátil e os resíduos não voláteis. A fração volátil representa 90-95% do OE e nela estão presentes hidrocarbonetos, monoterpenos, sesquiterpenos, aldeídos alifáticos, álcoois, ésteres e derivados oxigenados; os resíduos não voláteis representam 5-10% do OE e são representados por hidrocarbonetos, esteróis, ácidos graxos, carotenoides, ceras e flavonoides (RAO; PANDEY, 2007).

Possuem ampla aplicação em áreas como a farmacologia, nutrição, agricultura e principalmente cosmetologia, seja na perfumaria ou na aromaterapia, técnica terapêutica que consiste no uso de óleos essenciais para inalações, massagens, banhos e afins (HANIF *et al.*, 2019). Estudos mostram as diversas maneiras de como a aromaterapia pode ser considerada eficaz, um exemplo é a inalação do OE por meio do sistema olfatório, transmitindo sinais que chegam até o córtex olfatório e liberando neurotransmissores, como por exemplo, a serotonina, colaborando assim no tratamento de diversas doenças como ansiedade, depressão e insônia (SÁNCHEZ-VIDAÑA *et al.*, 2017).

3.4.1 Métodos de Obtenção

Devido ao crescente uso dos óleos essenciais, seus métodos de obtenção estão constantemente sendo estudados para que se consigam melhores resultados com um menor tempo e custo. Os métodos de obtenção são divididos em convencionais e inovadores; os métodos convencionais são mais comuns e acessíveis, como a hidrodestilação, arraste por vapor d'água, extração por solventes orgânicos ou prensagem a frio; os métodos inovadores são mais complexos e vêm sendo estudados como alternativas mais modernas, dentre diversos exemplos pode-se citar as extrações: por micro-ondas, por ultrassom e com fluídos supercríticos ou subcríticos (ASBAHANI *et al.*, 2015; DE CASTRO; JIMÉNEZ-CARMONA; FERNÁNDEZ-PÉREZ, 1999).

No processo de hidrodestilação, o método de extração de óleo essencial mais comumente utilizado em laboratórios, o material vegetal fica imerso em água fervente,

o vapor resultante contém água e OE, esse vapor é arrastado até chegar ao condensador, retornando ao estado líquido e fluirá até o separador formando uma mistura heterogênea, visto que a água e OE são, na maioria dos casos, imiscíveis (dependendo da composição). No separador, a água, que fica na parte inferior da mistura por conta da maior densidade, é retornada para o destilador para que o OE possa ser coletado (BUSATO *et al.*, 2014; SOVOVÁ; ALEKSOVSKI, 2006).

O presente trabalho também fará uso da destilação de arraste a vapor d'água, sendo esse o método mais comumente empregado para a obtenção de óleo essencial nas indústrias por se tratar de um sistema simples, eficiente e principalmente econômico em grandes escalas. Nessa técnica, o material vegetal não faz contato direto com a água no estado líquido, sendo então apenas saturado pelo vapor d'água, o restante do processo é muito semelhante ao de hidrodestilação, uma vez que o vapor resultante será condensado, resultando em uma mistura heterogênea de água e OE a serem posteriormente separados (SARTOR, 2009).

3.4.2 Análises Desenvolvidas

Com o objetivo de determinar a potencial atividade antibacteriana do óleo essencial, duas técnicas serão aplicadas: disco-difusão em ágar e microdiluição em caldo. A disco-difusão em ágar é uma simples técnica que possui diversas variações, consiste na difusão de um agente antimicrobiano pela superfície do meio de cultura contendo ágar, avaliando então a influência e eficácia do agente antimicrobiano em inibir a reprodução ou até mesmo matar microrganismos escolhidos para a análise através dos halos de inibição formados (PDS/HPPC, 2015). A microdiluição em caldo é uma técnica que permite avaliar quantitativamente o caráter antimicrobiano da amostra através da estimativa da Concentração Inibitória Mínima (CIM); a verificação da CIM se faz importante para analisar a mínima concentração em que o OE apresenta potencial atividade antimicrobiana, maximizando assim, o aproveitamento deste (DE SOUZA, 2006).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 COLETA DO MATERIAL VEGETAL

A parte aérea da espécie *E. uniflora* (Fotografia 1) foi coletada na Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR) – Campus Pato Branco, às 9 horas da manhã na localização 26°11'50.3"S 52°41'24.9"W, nos dias de verão 12 e 13 de março de 2021. Após coletar o material vegetal de pitangueira (Fotografia 2), o material vegetal foi secado à temperatura ambiente por pouco tempo, até atingir o ponto de murchar, reproduzindo o que é feito na indústria em maior escala, e, em seguida, encaminhado para a obtenção do óleo essencial.



Fotografia 1 - Parte aérea (galhos finos e folhas) da espécie *E. uniflora* (pitangueira)
Fonte: Autoria própria (2021)



**Fotografia 2 - Árvore da espécie *E. uniflora* (pitangueira)
Fonte: Autoria própria (2021)**

4.2 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

Os processos de obtenção de óleo essencial de *E. uniflora* ocorreram no laboratório de Química Orgânica da UTFPR e foram realizados em triplicata para cada método, para posterior avaliação cromatográfica que será discutida em um artigo. Além das triplicatas a serem futuramente avaliadas por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM), foi extraído um volume maior de OE por arraste a vapor, para avaliação da atividade antibacteriana.

4.2.1 Arraste a Vapor

A maior parte do material vegetal de *E. uniflora* foi utilizada na obtenção de óleo essencial por arraste a vapor d'água fazendo uso de um sistema adaptado para laboratório (Fotografia 3), que reproduzia em pequena escala a forma de obtenção de OE mais comumente empregada nas indústrias. Para cada replicata se fez uso de 150

g da parte aérea de pitangueira, que ficaram em contato com o vapor de 2 L de água destilada em ebulição (cerca de 100 °C), aquecida em fogão convencional.



Fotografia 3 - Sistema adaptado para obtenção de óleo essencial por arraste a vapor em laboratório
Fonte: Autorial própria (2021)

A obtenção ocorria por 1 hora e 30 minutos, o óleo essencial era arrastado pelo vapor d'água até chegar no topo do sistema, onde, condensado por cubos de gelo, escoava até o funil de destilação. Ao final de cada extração, apesar da proposta da reproduzir condições industriais, se fez necessário o emprego de éter etílico para dissolver e carregar o OE, e também filtração com sulfato de sódio anidro para retirada de água, por conta do baixo volume de óleo essencial obtido.

4.2.2 Hidrodestilação

A outra parte do material vegetal coletado foi seca em estufa a 40 °C, e então utilizada na obtenção de óleo essencial por hidrodestilação com aparato Clevenger

acoplado à manta aquecedora (Fotografia 4). Para cada replicata fez-se uso de 40 g de material vegetal imerso em 650 mL de água destilada fervente (Fotografia 5). A obtenção ocorreu por 2 horas de ebulição, e após o tempo, o OE foi coletado utilizando uma pipeta de Pasteur para evitar perdas, também foram empregados éter etílico e sulfato de sódio anidro para maximizar a quantidade e qualidade da amostra obtida.



Fotografia 4 - Aparato Clevenger acoplado à manta aquecedora para obtenção de óleo essencial por hidrodestilação em laboratório
Fonte: Autoria própria (2021)



**Fotografia 5 - Material vegetal seco de *E. uniflora* imerso em água destilada
Fonte: Autoria própria (2021)**

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

A avaliação da atividade antibacteriana da amostra foi crucial para verificar uma possível aplicação do óleo essencial da parte aérea de pitangueira, seja na indústria alimentícia, farmacêutica ou cosmetologia. As bactérias avaliadas foram: as gram-positivas *Bacillus cereus* ATCC 10876 e *Staphylococcus aureus* ATCC 25923; e as gram-negativas *Escherichia coli* ATCC 25922, *Salmonella typhimurium* ATCC 0028. Duas técnicas foram empregadas, sendo essas a disco-difusão em ágar e microdiluição em caldo.

4.3.1 Disco-difusão em Ágar

A metodologia utilizada foi baseada e adaptada de referências (MANAFI *et al.*, 2010; SAVI, 2018), consistiu inicialmente no cultivo das bactérias em ágar Mueller-

Hinton e incubação das mesmas em estufa microbiológica por 24 h na temperatura de 36 °C, objetivando a obtenção de culturas ativas. Após a reativação, as cepas foram inoculadas individualmente em tubos de ensaio, contendo solução salina 0,9% esterilizada, até atingirem a concentração 0,5 da escala McFarland ($\pm 1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹).

A seguir, o volume de 100 µL da suspensão bacteriana foi inserido em placa de Petri contendo ágar Mueller-Hinton e espalhado uniformemente sobre toda a placa utilizando um swab esterilizado. Na sequência, o volume de 10 µL do óleo essencial puro (1 mg mL⁻¹) foi impregnado em discos de 5 mm, os quais foram colocados sobre o meio de cultura inoculado com bactéria seguindo o modelo (Figura 1), e, avaliando então, se o OE apresentou um efeito inibitório sobre a bactéria.

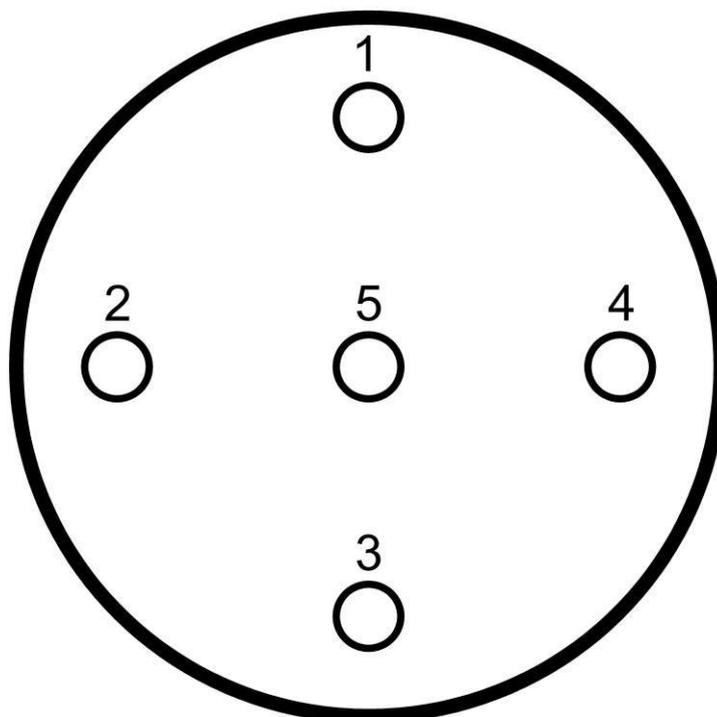


Figura 1 - Modelo de placa para disco-difusão em ágar, sendo 1: Controle Negativo; 2, 3 e 4: amostra de óleo essencial puro em triplicata; 5: Controle Positivo
Fonte: Autoria própria (2021)

Como controle positivo foi utilizado o antimicrobiano padrão clorexidina, também definida como biguanida catiônica, na concentração 1 mg mL⁻¹. Quanto ao controle negativo, foi utilizada solução salina 0,9% esterilizada.

Em seguida, as placas foram vedadas e incubadas em estufa microbiológica por 24 h, em temperatura 36 °C. Após este período, foi realizada a medição do diâmetro dos halos de inibição com uso do paquímetro, obtendo resultados expressos

em mm. Utilizando o valor de diâmetro do halo de inibição, os microrganismos foram classificados em: sensíveis, quando maior que 3 mm ou até 3 mm menor do que o controle positivo; moderadamente sensíveis, quando maior que 2 mm, porém menor que o controle positivo por mais de 3 mm; resistentes, quando menor que 2 mm (OSTROSKY *et al.*, 2008).

4.3.2 Microdiluição em Caldo

Com o resultado positivo obtido para a determinação qualitativa da atividade antibacteriana utilizando a disco-difusão em ágar, a microdiluição em caldo, também baseada e adaptada de referências (DE ARAUJO; LONGO, 2016; DE AZEVEDO, 2018), foi utilizada como uma análise quantitativa para estimar a CIM do óleo essencial. A técnica foi realizada em microplaca ELISA de 96 poços com fundo “U”, onde, numa linha preenchida, cada poço continha o volume de 50 µL de caldo Mueller-Hinton, 20 µL de inóculo e 50 µL de amostra avaliada.

Nos poços 1 a 6, a amostra avaliada foi o óleo essencial em diferentes concentrações (1; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,01 mg mL⁻¹), diluído em solução salina 0,9% esterilizada e com adição de 10% do volume do OE em dimetilsulfóxido (DMSO) para solubilização. Já nos poços 7 a 9, a amostra avaliada foi o controle positivo clorexidina (biguanida catiônica) 1 mg mL⁻¹, enquanto nos poços 10 a 12 a amostra avaliada foi o controle negativo solução salina 0,9% esterilizada.

As microplacas foram vedadas e incubadas a 36 °C por 22 h, após esse período, foi aplicado o método colorimétrico utilizando resazurina sódica 0,01%, adicionando um volume de 10 µL dessa solução em cada poço e aguardando o período de 1 h para realizar a leitura visual dos resultados. A coloração azul caracterizou inatividade bacteriana, enquanto a coloração rosa caracterizou atividade bacteriana, fez-se a visualização da cor de cada poço, sendo possível então estimar a CIM do óleo essencial da parte aérea de pitangueira para cada uma das bactérias.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL

5.1.1 Arraste a Vapor

A obtenção de óleo essencial por arraste a vapor foi bem sucedida, em cada replicata se obteve um volume aproximado de 1,2 mL de OE com coloração amarelo-escuro (Fotografia 6), sendo o rendimento cerca de 8 mL de OE por quilo de material vegetal. Ao fim do processo, a amostra obtida era tratada com éter etílico e sulfato de sódio anidro, armazenada em *vials* e resfriada em geladeira até emprego em análises.



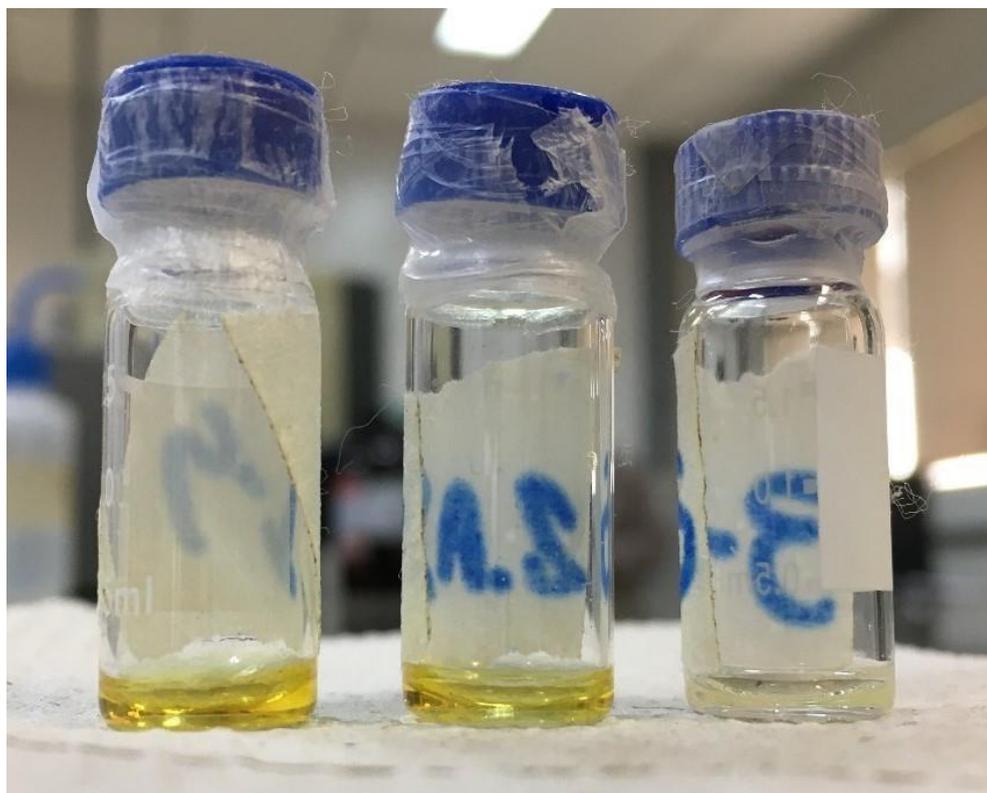
Fotografia 6 - Óleo essencial da parte aérea de *E. uniflora* obtido por arraste a vapor

Fonte: Autoria própria (2021)

5.1.2 Hidrodestilação

Por hidrodestilação, a obtenção de óleo essencial também foi bem sucedida, apresentando um volume obtido aproximado de 0,4 mL de OE por replicata, com coloração amarelo-claro e rendimento cerca de 10 mL de OE por quilo de material vegetal seco. O rendimento médio de 10 mL kg⁻¹ se assemelha com (LOREGIAN, 2013), que extraiu OE das folhas de pitangueira por hidrodestilação em Clevenger e obteve um óleo alaranjado com rendimento 14,78 mL kg⁻¹.

Assim como na obtenção por arraste a vapor, ao fim do processo a amostra obtida era tratada com éter etílico e sulfato de sódio anidro, armazenada em *vials* (Fotografia 7), e, resfriada em geladeira até emprego em análises. Vale ressaltar que, apesar do maior rendimento apresentado na obtenção por hidrodestilação, no presente trabalho optou-se por avaliar apenas a atividade antibacteriana do OE obtido por arraste a vapor, que imita condições industriais de larga escala.

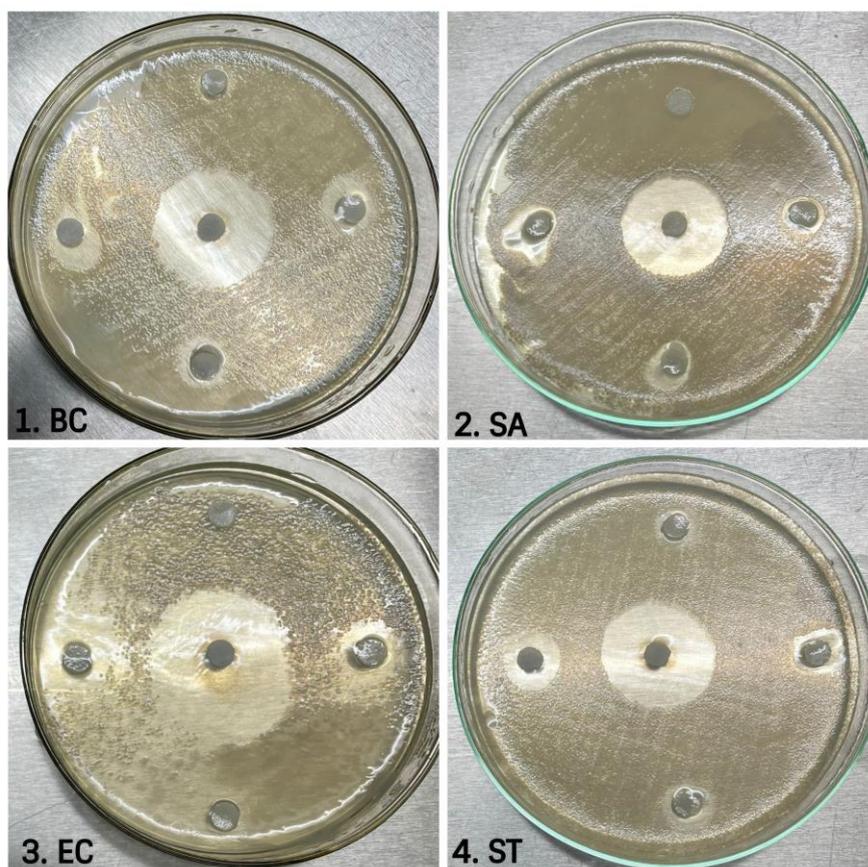


**Fotografia 7 - Vials de armazenamento contendo óleo essencial da parte aérea de *E. uniflora* obtido por hidrodestilação
Fonte: Autoria própria (2021)**

5.2 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIBACTERIANA

5.2.1 Disco-difusão em Ágar

Na Fotografia 8 estão presentes as placas de Petri contendo os resultados da análise de disco-difusão em ágar do óleo essencial da parte aérea de pitangueira para as bactérias *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* e *S. typhimurium*. Pode-se observar na Tabela 1 os valores de diâmetro de halo de inibição para os discos das placas com diferentes bactérias, impregnados com OE, em triplicata, ou clorexidina (controle positivo). Enquanto que, na Tabela 2, os resultados obtidos de halo de inibição médio são comparados com valores de referência, e usados para classificar as bactérias entre sensíveis, moderadamente sensíveis e resistentes quanto ao OE.



Fotografia 8 - Resultados da análise de disco-difusão em ágar para as bactérias *B. cereus* (1), *S. aureus* (2), *E. coli* (3) e *S. typhimurium* (4)
Fonte: Autoria própria (2021)

Tabela 1 - Diâmetros dos halos de inibição formados na análise de disco-difusão em ágar

Linhagem bacteriana	Zona de Inibição (mm)			
	Replicata 1 (esquerda)	Replicata 2 (baixo)	Replicata 3 (direita)	Controle Positivo (meio)
<i>B. cereus</i>	12,9	9,50	11,8	25,2
<i>S. aureus</i>	12,2	11,1	8,80	22,1
<i>E. coli</i>	15,3	-	14,1	27,7
<i>S. typhimurium</i>	13,8	10,5	11,4	23,7

Fonte: Autoria própria (2021)

Tabela 2 - Discussão dos halos de inibição obtidos e comparação com referências

Linhagem bacteriana	Diâmetro de halo de inibição médio (mm)	Classificação da bactéria ao OE	Diâmetro de halo de referência / Tipo de amostra de pitangueira
<i>B. cereus</i>	11,4	Sensível	15,0 mm / Extrato etanólico das folhas (FIÚZA <i>et al.</i> , 2008)
<i>S. aureus</i>	10,7	Sensível	26,0 mm / OE das folhas obtido por hidrodestilação (VICTORIA <i>et al.</i> , 2012)
<i>E. coli</i>	14,7	Sensível	10,0 mm / OE das folhas obtido por hidrodestilação (VICTORIA <i>et al.</i> , 2012)
<i>S. typhimurium</i>	11,9	Sensível	19,0 mm / Extrato metanólico das folhas (BOUZADA <i>et al.</i> , 2009)

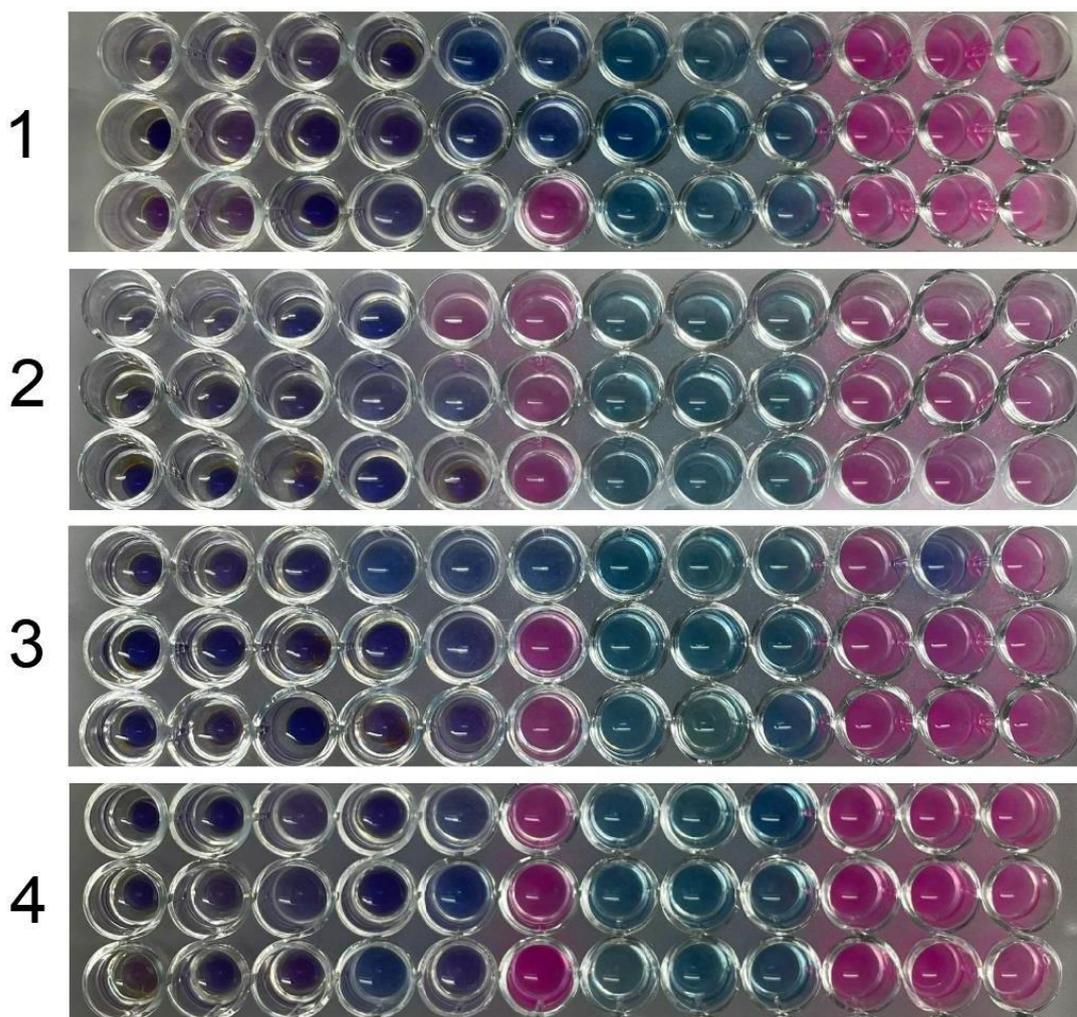
Fonte: Autoria própria (2021)

Os dados obtidos mostram que o óleo essencial da parte aérea de pitangueira não é gram-específico, uma vez que apresentou zona de halo de inibição contra todas as bactérias, sendo elas 2 gram-positivas (*B. cereus* e *S. aureus*) e 2 gram-negativas (*E. Coli* e *S. typhimurium*). Com os resultados qualitativos satisfatórios, sendo esses referentes à confirmação do caráter antibacteriano da amostra, seguiu-se para a análise quantitativa de microdiluição em caldo, para estimativa da CIM do OE para cada bactéria.

5.2.2 Microdiluição em Caldo

Na Fotografia 9 está presente a última etapa da análise de microdiluição em caldo, exibindo as colorações obtidas para cada poço após aplicação da resazurina

sódica 0,01%, onde a coloração azul caracteriza inatividade bacteriana e a coloração rosa caracteriza atividade bacteriana. Embora não tenha afetado diretamente o resultado da análise, uma possível interferência se deu pela evaporação de parte do óleo essencial nos poços de maior concentração, mesmo em microplaca embalada com papel filme, isso se deve à elevada volatilidade da amostra e temperatura de incubação de 36 °C.



Fotografia 9 - Resultados da análise de microdiluição em caldo para as bactérias *B. cereus* (1), *S. aureus* (2), *E. coli* (3) e *S. typhimurium* (4)

Fonte: Autoria própria (2021)

Fazendo a leitura visual da coloração de cada poço, observa-se ensaios bem sucedidos para o controle positivo (poços 7 a 9) e controle negativo (poços 10 a 12), uma vez que, apresentaram as colorações azul e rosa. Com o intuito de estimar a CIM do óleo essencial da parte aérea de pitangueira para cada bactéria, avaliou-se a

coloração dos poços 1 a 6, contendo OE nas concentrações 1,0; 0,8; 0,6; 0,4; 0,2 e 0,01 mg mL⁻¹, respectivamente. Os resultados obtidos e valores de referência para cada bactéria estão presentes na Tabela 3.

Tabela 3 - Comparação dos resultados de CIM obtidos na análise de microdiluição em caldo com valores de referência

Bactéria analisada	Faixa estimativa da CIM do OE	CIM de referência / Tipo de amostra de pitangueira
<i>B. cereus</i>	0~0,01 mg mL ⁻¹	0,04 mg mL ⁻¹ / OE das folhas obtido por hidrodestilação (OGUNWANDE <i>et al.</i> , 2005)
<i>S. aureus</i>	0,01~0,2 mg mL ⁻¹	0,16 mg mL ⁻¹ / OE das folhas obtido por hidrodestilação (OGUNWANDE <i>et al.</i> , 2005)
<i>E. coli</i>	0,01~0,2 mg mL ⁻¹	0,5 mg mL ⁻¹ / Extrato hidroalcoólico das folhas (HOLETZ <i>et al.</i> , 2002)
<i>S. typhimurium</i>	0,01~0,2 mg mL ⁻¹	0,033 mg mL ⁻¹ / OE das folhas obtido por hidrodestilação (BECKER <i>et al.</i> , 2017)

Fonte: Autoria própria (2021)

Os resultados obtidos foram satisfatórios, mostrando a efetividade do óleo essencial estudado na inibição de bactérias em pelo menos 5 das 6 concentrações avaliadas. A bactéria que apresentou o melhor resultado foi *B. cereus*, uma vez que o OE foi capaz de inibi-la até mesmo em 2 dos 3 dos poços de concentração 0,01 mg mL⁻¹. Em um possível futuro estudo, se faria interessante a avaliação de pontos dentro das faixas estimativas apresentadas, obtendo então um resultado pontual de CIM para cada bactéria.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A obtenção de óleo essencial da parte aérea de *E. uniflora* por arraste a vapor e hidrodestilação foi bem sucedida, com valores de rendimento médio 8 e 10 mL kg⁻¹, respectivamente. O estudo da atividade antibacteriana do óleo essencial obtido por arraste a vapor apresentou bons resultados, mostrando eficiência na inibição das quatro espécies de bactérias estudadas, sendo essas *B. cereus*, *S. aureus*, *E. coli* e *S. typhimurium*.

Por disco-difusão em ágar, destaca-se a formação de halos de inibição facilmente observáveis, com os respectivos diâmetros de 11,4; 10,7; 14,7 e 11,9 mm. Quanto à microdiluição em caldo, as microplacas desenvolveram nítidas colorações e foram determinadas faixas estimativas com baixos valores de CIM, apontando o caráter altamente antibacteriano do óleo essencial da parte aérea de pitangueira.

Apesar do óleo essencial ter se mostrado ativo na inibição das quatro bactérias estudadas, evidencia-se um maior halo de inibição para a bactéria *E. coli* e uma menor CIM para a bactéria *B. cereus*. Sabendo que a maior fonte de contaminação por essas bactérias são alimentos, é possível sugerir o emprego do OE da parte aérea de pitangueira na indústria alimentícia ou farmacêutica, atuando diretamente contra as espécies.

Um fator que dificulta o emprego de óleos essenciais em análises antimicrobianas é o baixo volume de amostra adquirido para sua obtenção. O estudo se faz importante uma vez que, além de trazer aplicação para as folhas e galhos finos de *E. uniflora*, ao invés dos frutos, também confere maior visibilidade à panc, concorrendo para maior valorização da espécie, além de preservar e dar continuidade ao conhecimento popular envolvendo plantas alimentícias não convencionais.

REFERÊNCIAS

AMORIM, A. C. L.; LIMA, C. K. F.; HOVELL, A. M. C.; MIRANDA, A. L. P.; REZENDE, C. M. **Antinociceptive and hypothermic evaluation of the leaf essential oil and isolated terpenoids from *Eugenia uniflora* L. (Brazilian Pitanga)**. *Phytomedicine*, v. 16, n. 10, p. 923–928, 2009.

ASBAHANI, A. E.; MILADI, K.; BADRI, W.; SALA, M; ADDI, E. H. A.; CASABIANCA, H.; MOUSADIK, A. E.; HARTMANN, D.; JILALE, A.; RENAUD, F. N. R.; ELAISSARI, A. **Essential oils: From extraction to encapsulation**. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 483, n. 1–2, p. 220–243, 2015.

AURICCHIO, M. T.; BACCHI, E. M. **Atividades Antimicrobiana e Antioxidante e Toxicidade de *Eugenia uniflora***. *Latin American Journal of Pharmacy*, v. 26, n. 1, p. 76–81, 2007.

AURICCHIO, M. T.; BUGNO, A.; BARROS, S. B. M.; BACCHI, E. M. **Folhas de *Eugenia uniflora* L. (pitanga: propriedades farmacobotânicas, químicas e farmacológicas)**. *Revista do Instituto Adolfo Lutz*, v. 62, n. 1, p. 55–61, 2003.

BECKER, N. A.; VOLCÃO, L. M.; CAMARGO, T. M.; FREITAG, R. A.; RIBEIRO, G. A. **Biological properties of *Eugenia uniflora* L. essential oil: phytochemistry composition and antimicrobial activity against gram negative bacteria**. *Vittalle*, v. 29, n. 1, p. 22–30, 2017.

BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. **Secondary metabolites in plant defence mechanisms**. *New Phytologist*, v. 127, n. 4, p. 617–633, 1994.

BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; NOGUEIRA, M.; KONNO, T. U. P.; DUARTE, G. G.; SCIO, E. **Antibacterial, cytotoxic and phytochemical screening of some traditional medicinal plants in Brazil**. *Pharmaceutical Biology*, v. 47, n. 1, p. 44–52, 2009.

BRASIL. **GUIA ALIMENTAR PARA A POPULAÇÃO BRASILEIRA**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_alimentar_populacao_brasileira_2e_d.pdf. Acesso em: 06 nov. 2021.

BRASIL. **Plantas para o Futuro**. Ministério do Meio Ambiente, 2017. Disponível em: <https://antigo.mma.gov.br/biodiversidade/conservacao-e-promocao-do-uso-da-diversidade-genetica/plantas-para-o-futuro.html>. Acesso em: 06 nov. 2021.

BRAZ FILHO, R. **Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente**. Química Nova, v. 33, n. 1, p. 229–239, 2010.

BUSATO, N. V.; SILVEIRA, J. C.; DA COSTA, A. O. S.; DA COSTA JUNIOR, E. F. **Estratégias de modelagem da extração de óleos essenciais por hidrodestilação e destilação a vapor**. Ciência Rural, v. 44, n. 9, p. 1574–1582, 2014.

CARVALHO, M. S. S.; CARDOSO, M. G.; RESENDE, L. V.; GOMES, M. S.; ALBUQUERQUE, L. R. M.; GOMES, A. C. S.; SALES, T. A.; CAMARGO, K. C.; NELSON, D. L.; COSTA, G. M.; ESPÓSITO, M. A.; LIMA E SILVA, L. F. **Phytochemical Screening, Extraction of Essential Oils and Antioxidant Activity of Five Species of Unconventional Vegetables**. American Journal of Plant Sciences, v. 06, n. 16, p. 2632–2639, 2015.

CHAVES, M. S. **PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS EM COMUNIDADES RIBEIRINHAS NA AMAZÔNIA**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa, 2016. Disponível em: <https://www.locus.ufv.br/handle/123456789/8252>. Acesso em: 06 nov. 2021.

COSTA, D. P.; ALVES FILHO, E. G.; SILVA, L. M. A.; SANTOS, S. C.; PASSOS, X. S.; SILVA, M. R. R.; SERAPHIN, J. C.; FERRI, P. H. **Influence of fruit biotypes on the chemical composition and antifungal activity of the essential oils of *Eugenia uniflora* leaves**. Journal of the Brazilian Chemical Society, v. 21, n. 5, p. 851–858, 2010.

CROTEAU, R.; LEWIS, N. G.; KUTCHAN, T. M. **Natural Products (Secondary Metabolites)**. American Society of Plant Physiologists, p. 1250–1318, 2000.

DA FONSECA-KRUEL, V. S.; PEIXOTO, A. L. **Etnobotânica na Reserva Extrativista Marinha de Arraial do Cabo, RJ, Brasil**. Acta Botanica Brasilica, v. 18, n. 1, p. 177–190, 2004.

DE ARAUJO, M. M.; LONGO, P. L. **Teste da ação antibacteriana in vitro de óleo essencial comercial de *Origanum vulgare* (orégano) diante das cepas de *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus***. Arquivos do Instituto Biológico, v. 83, p. 1–7, 2016.

DE AZEVEDO, T. D. **PROPRIEDADES NUTRICIONAIS, ANTIOXIDANTES, ANTIMICROBIANAS E TOXICIDADE PRELIMINAR DO PEIXINHO DA HORTA (*Stachys byzantina* K. Koch)**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2018. Disponível em: <https://acervodigital.ufpr.br/handle/1884/58899>. Acesso em: 06 nov. 2021.

DE CASTRO, M. D. L.; JIMÉNEZ-CARMONA, M. M.; FERNÁNDEZ-PÉREZ, V. **Towards more rational techniques for the isolation of valuable essential oils from plants**. Trends in Analytical Chemistry, v. 18, n. 11, p. 708–716, 1999.

DE SOUZA, E. L. **POTENCIAL ANTIMICROBIANO DO ÓLEO ESSENCIAL DE ORÉGANO (*Origanum vulgare* L.): UMA ABORDAGEM PARA USO EM SISTEMAS DE CONSERVAÇÃO DE ALIMENTOS**. Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2006. Disponível em: <https://repositorio.ufpe.br/handle/123456789/8821>. Acesso em: 06 nov. 2021.

DUDAREVA, N.; PICHERSKY, E. **Metabolic engineering of plant volatiles**. Current Opinion in Biotechnology, v. 19, n. 2, p. 181–189, 2008.

FELIPE, L. O.; BICAS, J. L. **Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais**. Química Nova na Escola, v. 39, n. 2, p. 120–130, 2017.

FIÚZA, T. S.; SABÓIA-MORAIS, S. M. T.; PAULA, J. R.; TRESVENZOL, L. M. F.; PIMENTA, F. C. **Evaluation of antimicrobial activity of the crude ethanol extract of *Eugenia uniflora* L. leaves**. Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada, v. 29, n. 3, p. 245–250, 2008.

HALL, R. D. **Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic**. New Phytologist, v. 169, n. 3, p. 453–468, 2006.

HANIF, M. A.; NISAR, S.; KHAN, G. S.; MUSHTAQ, Z.; ZUBAIR, M. **Essential Oils**. Springer International Publishing, p. 3–17, 2019

HIRATA, L. L.; SATO, M. E. O.; SANTOS, C. A. M. **Radicais Livres e o Envelhecimento Cutâneo**. Acta Farmacéutica Bonaerense, v. 23, n. 3, p. 418–424, 2004.

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. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 97, n. 7, p. 1027–1031, 2002.

JUNG, P. H.; DA SILVEIRA, A. C.; NIERI, E. M.; POTRICH, M.; DA SILVA, E. R. L.; REFATTI, M. **Atividade inseticida de *Eugenia uniflora* L. e *Melia azedarach* L. sobre *Atta laevigata* Smith.** Floresta e Ambiente, v. 20, n. 2, p. 191–196, 2013.

KELEN, M. E. B.; NOUHUYS, I. S. V.; KEHL, L. C.; BRACK, P.; DA SILVA, D. B. **PLANTAS ALIMENTÍCIAS NÃO CONVENCIONAIS (PANCs) HORTALIÇAS ESPONTÂNEAS E NATIVAS.** Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2015. Disponível em: <https://www.ufrgs.br/viveiroscomunitarios/wp-content/uploads/2015/11/Cartilha-15.11-online.pdf>. Acesso em: 6 nov. 2021.

LOREGIAN, A. **COMPARAÇÃO ENTRE DOIS MÉTODOS DE EXTRAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE PLANTAS DO HORTO DE PLANTAS MEDICINAIS DO GRUPO PET.** Pato Branco: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2013. Disponível em: <http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/856>. Acesso em: 6 nov. 2021.

MANAFI, H.; SHAFAGHAT, A.; MAZLOOMIFAR, A.; KASHANAKI, R. **Antimicrobial activity and volatile constituents of essential oils from leaf and stem of *Stachys byzantina* C.Koch.** Journal of Essential Oil-Bearing Plants, v. 13, n. 3, p. 371–376, 2010.

MOURA, G. S.; DE OLIVEIRA, I. J.; BONOME, L. T. S.; FRANZENER, G. ***Eugenia uniflora* L.: potential uses as a bioactive plant.** Arquivos do Instituto Biológico, v. 85, 2018.

MYERS, N.; MITTERMELER, R. A.; MITTERMELER, C. G.; DA FONSECA, G. A. B.; KENT, J. **Biodiversity hotspots for conservation priorities.** Nature, v. 403, n. 6772, p. 853–858, 2000.

OGUNWANDE, I. A.; OLAWORE, N. O.; EKUNDAYO, O.; WALKER, T. M.; SCHMIDT, J. M.; SETZER, W. N. **Studies on the essential oils composition, antibacterial and cytotoxicity of *Eugenia uniflora* L.** International Journal of Aromatherapy, v. 15, n. 3, p. 147–152, 2005.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. **Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da Concentração Mínima Inibitória (CMI) de plantas medicinais.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 18, n. 2, p. 301–307, 2008.

PDS/HPPC, Programa de Desenvolvimento Setorial de Higiene Pessoal, Perfumaria e Cosméticos. **GUIA DE MICROBIOLOGIA: CONTROLE MICROBIOLÓGICO NA INDÚSTRIA DE HIGIENE PESSOAL, PERFUMARIA E COSMÉTICOS**. ABDI, ABIHPEC, SEBRAE, 2015. Disponível em: <https://abihpec.org.br/guia-microbiologia/files/assets/basic-html/page1.html>. Acesso em: 06 nov. 2021.

RAO, V. P. S.; PANDEY, D. **EXTRACTION OF ESSENTIAL OIL AND ITS APPLICATIONS**. Rourkela: National Institute of Technology Rourkela, 2007. Disponível em: <http://ethesis.nitrkl.ac.in/4292/>. Acesso em: 06 nov. 2021.

SÁNCHEZ-VIDAÑA, D. I.; NGAI, S. P.; HE, W.; CHOW, J. K.; LAU, B. W.; TSANG, H. W. **The Effectiveness of Aromatherapy for Depressive Symptoms: A Systematic Review**. Evidence-based Complementary and Alternative Medicine, v. 2017, n. 8, p. 1–21, 2017.

SANTOS FILHO, F. C. **ANÁLISE DOS CONSTITUINTES FIXOS E VOLÁTEIS DE FUNGOS ENDOFÍTICOS DOS GÊNEROS *Penicillium* E *Xylaria* E DE SUAS PLANTAS HOSPEDEIRAS**. São Carlos: Universidade Federal de São Carlos, 2010. Disponível em: <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/6474>. Acesso em: 06 nov. 2021.

SARTOR, R. B. **MODELAGEM, SIMULAÇÃO E OTIMIZAÇÃO DE UMA UNIDADE INDUSTRIAL DE EXTRAÇÃO DE ÓLEOS ESSENCIAIS POR ARRASTE A VAPOR**. Porto Alegre: Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2009. Disponível em: <https://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/21924>. Acesso em: 06 nov. 2021.

SAVI, A. **CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA, POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE DE POLISSACARÍDEO EXTRAÍDO DE CARÁ-MOELA (*Discorea bulbifera*)**. Pato Branco: Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2018. Disponível em: <https://repositorio.utfpr.edu.br/jspui/handle/1/3164>. Acesso em: 06 nov. 2021.

SIMINSKI, A.; REIS, A.; CORADIN, L. **Espécies Nativas da Flora Brasileira de Valor Econômico Atual ou Potencial: Plantas para o Futuro - Região Sul**. Ministério do Meio Ambiente, 2011. Disponível em: encurtador.com.br/dmoM7. Acesso em: 06 nov. 2021.

SOVOVÁ, H.; ALEKSOVSKI, S. A. **Mathematical model for hydrodistillation of essential oils**. Flavour and Fragrance Journal, v. 21, n. 6, p. 881–889, 2006.

SVOBODA, K. P.; GREENAWAY, R. I. **Investigation of volatile oil glands of *Satureja hortensis* L. (summer savory) and phytochemical comparison of different varieties.** International Journal of Aromatherapy, v. 13, n. 4, p. 196–202, 2003.

THOLL, D. **Terpene synthases and the regulation, diversity and biological roles of terpene metabolism.** Current Opinion in Plant Biology, v. 9, n. 3, p. 297–304, 2006.

VALLI, M.; RUSSO, H. M.; BOLZANI, V. S. **The potential contribution of the natural products from Brazilian biodiversity to bioeconomy.** Anais da Academia Brasileira de Ciências, v. 90, n. 1, p. 763–778, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170653>. Acesso em: 6 nov. 2021.

VIANA, M. M. S.; CARLOS, L. A.; SILVA, E. C.; PEREIRA, S. M. F.; OLIVEIRA, D. B.; ASSIS, M. L. V. **Composição fitoquímica e potencial antioxidante de hortaliças não convencionais.** Horticultura Brasileira, v. 33, n. 4, p. 504–509, 2015.

VICTORIA, F. N.; LENARDÃO, E. J.; SAVEGNAGO, L.; PERIN, G.; JACOB, R. G.; ALVES, D.; DA SILVA, W. P.; DA MOTTA, A. S.; NASCENTE, P. S. **Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: Antioxidant and antimicrobial properties.** Food and Chemical Toxicology, v. 50, n. 8, p. 2668–2674, 2012.

WUERGES, K. L.; GANDRA, E. A. **Atividade Antimicrobiana do Óleo Essencial e Extratos de Folhas e Frutos de Pitanga (*Eugenia uniflora* L.): Uma Revisão.** Ciências Exatas e Naturais, v. 18, n. 1, 2016.

ZAYNAB, M.; FATIMA, M.; SHARIF, Y.; ZAFAR, M. H.; ALI, H.; KHAN, K. A. **Role of primary metabolites in plant defense against pathogens.** Microbial Pathogenesis, v. 137, 2019.