

Óleo essencial das folhas e fruto do eucalipto: avaliação da atividade antimicrobiana e da atividade antioxidante

Eliana Soraia Santos Alves Cidres

Dissertação apresentada à Escola Superior de Tecnologia e Gestão para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química

Orientado por:

Prof^ª. Doutora Ana Maria Alves Queiroz da Silva

Prof^ª. Doutora Joana Andréa Soares Amaral

Dezembro de 2018

Dissertação de Mestrado apresentada à Escola Superior de Tecnologia e Gestão do Instituto Politécnico de Bragança para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química (Decreto-Lei nº 74/2006 com as alterações introduzidas pelo Decreto-Lei nº 107/2008)

O conteúdo da presente Dissertação é exclusivamente da responsabilidade do autor(a):

(Elia Soraia Santos Alves Cidres)

Agradecimentos

A realização da presente Dissertação foi possível graças à disponibilidade e profissionalismo das minhas orientadoras Professora Doutora Ana Maria Queiroz e Professora Doutora Joana Amaral, aos quais manifesto os meus sinceros agradecimentos.

Queria também agradecer à Engenheira Maria João Afonso, do laboratório de processos químicos (LPQ), à Doutora Paula Matos do laboratório de Química analítica (LQA), assim como à Doutora Soraia Falcão do Centro de Investigação de Montanha (CIMO), pela disponibilidade, conhecimentos partilhados e apoio durante o tempo de realização deste trabalho.

Aos meus pais, irmã e restante família, um especial obrigada por acreditarem em mim e sempre me incentivarem a nunca desistir das minhas ambições pessoais.

Um muito obrigada aos meus amigos por me transmitirem a força e apoio nos momentos menos fáceis deste percurso, por caminharem a meu lado e por todos os momentos passados ao longo destes anos.

A todos vocês, um obrigada de coração por fazerem de mim o que sou hoje!

*“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”*

Ricardo Reis

ÍNDICE

ÍNDICE DE FIGURAS	XIII
ÍNDICE DE TABELAS	XV
ABREVIATURAS	XVII
RESUMO	XIX
ABSTRACT	XXI
1. INTRODUÇÃO	3
2. OBJETIVOS	7
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	10
3.1 FAMÍLIA <i>MYRTACEAE</i>	10
3.2 ÓLEOS ESSENCIAIS	12
3.2.1 TERPENOS	12
3.2.2. ÓLEOS ESSENCIAIS DO <i>EUCALYPTUS</i>	14
3.2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO	15
3.2.3.1 HIDRODESTILAÇÃO	16
3.2.3.2 EXTRAÇÃO COM SOLVENTES ORGÂNICOS	16
3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	17
3.3.1 POLIFENÓIS	19
3.3.2 FLAVONOIDES	20
3.3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CAPTADORA DO RADICAL DPPH	23
3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	24
4. MATERIAIS E MÉTODOS	30
4.1 PADRÕES E REAGENTES	30
4.2 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS	30
4.2.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS	30
4.2.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS AMOSTRAS	31
4.2.3 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS AMOSTRAS	32
4.2.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA	33
4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	34
4.3.1 MICRORGANISMOS TESTADOS	34
4.3.2 MÉTODO MACRODILUIÇÃO	34
4.4 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS	36
4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	37
4.5.1 CAPTAÇÃO DO RADICAL DPPH	37
4.5.2 PODER REDUTOR	38
4.5.3 INIBIÇÃO DA DESCOLORAÇÃO DO BETA-CAROTENO	39

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	42
5.1 QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DO ÓLEO ESSENCIAL DO EUCALIPTO	42
5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA	49
5.3 COMPOSTOS BIOATIVOS	52
5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	54
6. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS	62
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição do eucalipto em Portugal	11
Figura 2: Fruto do <i>Eucalyptus globulus</i>	11
Figura 3: Estrutura química do monoterpeneo 1,8- cineol.....	13
Figura 4: Montagem experimental da destilação por hidrodestilação.	16
Figura 5: Extração usando Soxhlet.	17
Figura 6: Grupos de metabolitos secundários	19
Figura 7: Estrutura química do flavonoide.	20
Figura 8: Estruturas básicas dos flavonoides	21
Figura 9: Estrutura básica da antocianina	22
Figura 10: Coloração do radical livre DPPH (1) e do DPPH reduzido (2)	23
Figura 11: Métodos de difusão em disco com <i>Staphylococcus aureus</i>	24
Figura 12: Fruto colhido de árvore para abate na região do Douro (1), Folha de árvore para abate colhida na região do Douro (2), Folha de árvore jovem colhida na região de Viseu (3), Folha de árvore adulta colhida na região de Viseu (4)	30
Figura 13: Aparelho Clevenger para realização da hidrodestilação e uma amostra de óleo essencial extraído guardado num frasco de vidro.....	31
Figura 14: Rotavapor Buchi utilizado na preparação dos extratos.....	32
Figura 15: Diluições feitas para a avaliação da atividade antimicrobiana.....	34
Figura 16: Crescimento do microrganismo após 24h na estufa.....	34
Figura 17: Padrões feitos com ácido gálico para a determinação dos fenóis totais.....	35
Figura 18: Determinação da % de captação do radical DPPH para o extrato da amostra 3.....	36
Figura 19: Determinação do poder redutor para o extrato da folha colhida na região do Douro Litoral.....	37
Figura 20: Cromatograma total do óleo essencial do fruto do eucalipto, estando numerados os picos maioritários conforme o número de composto referido na tabela.1 (α -Pineno (1); α -Felandreno (6); Eucaliptol (9); Aromandendreno (31)).....	43
Figura 21: Cromatograma total do óleo essencial da amostra 1 colhida no Douro litoral do eucalipto, estando numerados os picos maioritários conforme o número de composto referido na tabela 1. (α -Pineno (1); Eucaliptol (9); Aromandendreno (31)).....	44
Figura 22: Cromatograma total do óleo essencial da amostra 3 colhida na região de Viseu, estando numerados os picos maioritários conforme o número de composto referido na tabela 1. (α -Pineno (1); Eucaliptol (9); Aromandendreno (31)).....	45

Figura 23: - Cromatograma total do óleo essencial da amostra 2 do eucalipto, estando numerados os picos maioritários conforme o número de composto referido na tabela 1 (α -Pineno (1); Eucaliptol (9); Aromandendreno (31)).	46
Figura 24: Cromatograma total do óleo comercial 1 do eucalipto.	47
Figura 25: Cromatograma total do OC2.	47
Figura 26: Curva de calibração para a determinação de fenóis.	51
Figura 27: Percentagem de inibição do radical DPPH• de diferentes concentrações de extratos das amostras de folhas e fruto.	54
Figura 28: Poder redutor de diferentes concentrações de extratos das amostras de folhas e fruto do eucalipto.	55
Figura 29: Análise da Inibição da descoloração do β -caroteno de diferentes concentrações de extratos das amostras de folhas e fruto do eucalipto.	56

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Composição química dos óleos essenciais (abundância relativa em %) extraídos das folhas e fruto e dos dois óleos comerciais do eucalipto (média±desvio padrão).....	41
Tabela 2: Concentração mínima bactericida dos vários óleos essenciais do eucalipto usados no presente estudo face aos microorganismos	50
Tabela 3 Determinação dos compostos fenólicos totais nas amostras de <i>Eucalyptus globulus</i>	52
Tabela 4 Resultados da atividade antioxidante (valores de EC50, mg/mL) determinada por diferentes métodos.....	53

ABREVIATURAS

ACR	Atividade captadora de radicais livres
BHA	Butil-hidroxianisol
BHT	Butil-hidroxitolueno
CG	Cromatografia gasosa
CG-MS	Cromatografia gasosa-espectrometria de massa
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazilo
EAG	Equivalentes de Ácido gálico
EC50	Concentração de extrato correspondente a 50% de atividade antioxidante
KI	Índice de Kovats
LDL	Lipoproteínas de baixa densidade
MBC	Concentração mínima bactericida (<i>Minimum bactericidal concentration</i>)
MHB	Caldo Mueller-Hinton
MIC	Concentração mínima inibitória (<i>Minimum inhibitory concentration</i>)
NA	Ágar nutritivo
NB	Caldo nutritivo
OE	Óleo essencial
OC	Óleo comercial
PG	Propilgalato
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive oxygen species</i>)
TBHQ	<i>Terc</i> -butil- hidroxiquinona
TIC	Corrente total de iões

RESUMO

As plantas aromáticas têm vindo a ser cada vez mais investigadas como fonte de propriedades medicinais e farmacêuticas, devido aos diferentes compostos bioativos que produzem. O eucalipto, nomeadamente a espécie *Eucalyptus globulus*, é fonte de matéria-prima para as indústrias madeireira e de celulose, sendo também muito utilizado pelas indústrias farmacêutica e de perfumaria, pela sua viabilidade mundialmente reconhecida enquanto fonte de óleo essencial. Assim, este estudo teve como objetivo proceder à caracterização química de óleos essenciais (OE) de eucalipto (*E. globulus*), a partir de folhas com diferente origem geográfica e nível de desenvolvimento (árvores adultas e jovens) e de frutos, tendo sido estes extraídos em sistema de Clevenger, bem como de OE adquiridos comercialmente. Adicionalmente, efetuou-se a avaliação de propriedades biológicas (atividade antimicrobiana e antioxidante) dos referidos OE.

O composto maioritariamente presente nos OE estudados foi o Eucaliptol (1,8-cineol), apresentando uma maior percentagem nos óleos comerciais (93,3% e 97,0%) comparativamente aos extraídos por hidrodestilação. Destes, o OE do fruto foi o que apresentou o menor teor do composto maioritário (24,1%), sendo o conteúdo similar entre as diferentes amostras de folhas (61,9%, 62,5%, 67,8%). Na avaliação dos fenóis totais dos extratos etanólicos, a folha colhida na região do Douro Litoral foi a que apresentou um teor superior ($136,50 \pm 14,54$ mg EAG/g extrato). Todos os extratos etanólicos demonstraram ter propriedades antioxidantes, sendo a amostra da folha do Douro Litoral a que demonstrou melhores resultados nas diferentes metodologias realizadas, estando de acordo com o seu teor de fenóis totais obtido. Como esperado, verificou-se um valor baixo no teor de fenóis totais dos óleos essenciais (entre $0,97 \pm 0,18$ e $2,35 \pm 0,18$ mg EAG/g óleo). No que respeita à atividade antimicrobiana, os óleos essenciais comerciais e extraídos das folhas apresentaram atividade bactericida face a todos os microrganismos estudados, à exceção de *Pseudomonas aeruginosa*, apresentando o OE do fruto uma atividade antimicrobiana inferior visto que foi a amostra que inibiu menos bactérias.

Conclui-se, desta forma, que o eucalipto pode ser uma potencial fonte de antimicrobianos e antioxidantes naturais de interesse para diferentes indústrias.

Palavras chave: *Eucalyptus globulus*; atividade antioxidante; atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Aromatic plants have been increasingly investigated as a source of medicinal and pharmaceutical properties, due to the different bioactive compounds that they produce. *Eucalyptus*, especially the species *Eucalyptus globulus*, is a source of raw material for the wood and pulp industries and is also widely used by the pharmaceutical and perfumery industries for its globally recognized viability as a source of essential oil. The objective of this study was to characterize the chemical composition of different *E. globulus* essential oils (EO), obtained by hydrodistillation from leaves collected from different geographic origins and level of development (adult and young trees) and fruits, as well as two EO commercially acquired. In addition, the evaluation of biological properties (antimicrobial and antioxidant activity) of the EOs was performed.

The major compound found in all samples was Eucalyptol (1,8-cineol), with the commercial oils presenting higher contents (93,3% and 97,0%) compared to the EO extracted by hydrodistillation. Of these, the EO from the fruit was the one that presented the lowest content of the major compound (24,1%), with the different leaf samples presenting similar amounts (61,9%, 62,5%, 67,8%).

The ethanolic extracts were evaluated for total phenolic compounds content and the leaf sample harvested in the Douro Litoral region was the one that presented the highest content ($136,50 \pm 14,54$ mg EAG / g extract). All the ethanolic extracts showed antioxidant properties, with the Douro Litoral sample being the one that demonstrated better results in the different assayed methodologies, which is in good agreement with its higher phenolics content. As expected, the essential oils presented very low levels of total phenolic compounds (ranging from $0,97 \pm 0,18$ to $2,35 \pm 0,18$ mg GAE /g oil). Regarding the antimicrobial activity, the commercial essential oils and those extracted from the leaves presented bactericidal activity against all the studied microorganisms, with the exception of *Pseudomonas aeruginosa*, with the fruit EO having a lower antimicrobial activity.

In sum, *eucalyptus* can be a potential source of natural antimicrobials and antioxidants interesting to different industries.

Keywords: *Eucalyptus globulus*; antioxidant activity; antimicrobial activity

CAPÍTULO 1

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A natureza disponibiliza ao homem uma larga variedade de plantas com poder medicinal. Atualmente, são conhecidos indícios do uso de plantas medicinais e tóxicas pelas civilizações mais antigas, considerando-se esta uma das práticas remotas mais utilizadas pelo homem para a cura, prevenção e tratamento de doenças (Firmo et al., 2011). Enquanto que os nossos antepassados apenas contavam com o conhecimento empírico, hoje em dia, dispomos de diversas pesquisas científicas que confirmam as propriedades medicinais de várias plantas. Como planta medicinal, considera-se qualquer planta consumida por forma a desempenhar algum tipo de influência farmacológica no homem ou nos animais (Dias, 2013).

As plantas medicinais apresentam grande importância, não só porque são utilizadas como recurso terapêutico pela medicina tradicional e popular, mas também como fonte para o isolamento/extração de compostos para a indústria farmacêutica. No que respeita à utilização de plantas com finalidades medicinais, esta continua a ser frequente em países subdesenvolvidos ou em vias de desenvolvimento, dada a escassez de recursos de grande parte da população desses países. Diversas partes dos vegetais, tais como folhas, caules, raízes, flores, frutos e sementes, podem apresentar propriedades medicinais devido à presença de compostos bioativos. Estes últimos, são frequentemente metabolitos secundários do metabolismo das plantas que podem apresentar diferentes atividades biológicas em humanos, incluindo terpenos, presentes nos óleos essenciais, diversos compostos fenólicos, entre outros (Seyfried et al., 2015).

Em Portugal, principalmente nas áreas rurais e, sobretudo na região nordeste, a medicina popular e as práticas tradicionais são muitas vezes usadas em simultâneo com os sistemas de medicina formalizados e institucionalizados. Para além das plantas medicinais, também muitas plantas aromáticas têm suscitado um enorme interesse por parte dos consumidores, não só por também serem usadas na medicina tradicional, mas sobretudo devido às suas aplicações culinárias, entre outras (Rodrigues, 2013)

Nos últimos anos tem-se verificado também um aumento da informação sobre questões relativas à alimentação, saúde e nutrição. Desta forma, os consumidores têm adquirido mais conhecimentos e tomado consciência acerca dos benefícios e potenciais aplicações de plantas medicinais e aromáticas e seus metabolitos (Dhifi et al., 2016).

No presente, verifica-se um aumento na resistência dos agentes patogénicos em relação aos antibióticos, o que representa uma grande ameaça para a saúde pública, porque reduz a eficácia do tratamento antibiótico aplicado. Dadas as circunstâncias, foi necessário pesquisar e investigar agentes antimicrobianos alternativos para o tratamento de microrganismos patogénicos resistentes (Mulyaningsih, 2010).

A existência da atividade antimicrobiana de plantas é muito importante para que haja um equilíbrio ecológico, já que é uma enorme necessidade para a vida na Terra. Entre as numerosas funções da planta, estas produzem metabolitos secundários, alguns dos quais têm uma atividade antimicrobiana significativa (Matović et al., 2011)

A avaliação da atividade antimicrobiana pode ser considerada uma técnica complexa e pouco exata devido às diferentes variáveis interferentes, como o método de extração da amostra, o meio de cultura, a concentração do inóculo e o método utilizado (difusão em disco, macrodiluição em caldo, microdiluição em caldo, entre outros) (Tajkarimi & Ibrahim, 2010).

CAPÍTULO 2

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

O uso de óleos essenciais encontra-se largamente descrito no que diz respeito a cosméticos e perfumaria, apesar da composição destes óleos ser complexa. Por outro lado, a utilização de plantas medicinais e aromáticas contendo óleos essenciais na medicina tradicional é sobejamente conhecida. Desta forma, surge a necessidade da realização de estudos que permitam uma melhor compreensão das suas propriedades químicas e biológicas, como também dos seus componentes individuais, por forma a validar a sua utilização. Estes estudos podem igualmente contribuir para o desenvolvimento de novas aplicações destes produtos na saúde humana, agricultura e/ou meio ambiente. A nível alimentar, em particular, a utilização de plantas e/ou seus extratos, tem sido sugerida como alternativa aos aditivos sintéticos da indústria química, podendo os óleos essenciais serem explorados neste sentido.

Desta forma, este trabalho tem como objetivos a extração de óleos essenciais do fruto e folhas do *Eucalyptus globulus*, a determinação da sua composição e a avaliação de fenóis totais assim como a atividade antimicrobiana e atividade antioxidante. Serão ainda estudados dois óleos essenciais de eucalipto comerciais e feita a sua comparação com os óleos extraídos.

CAPÍTULO 3

REVISÃO

BIBLIOGRÁFICA

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 FAMÍLIA *MYRTACEAE*

Myrtaceae é a designação atribuída a uma das famílias de angiospérmicas, isto é, plantas com flor. Esta mesma família possuiu cerca de 150 géneros, que junta mais de 3000 espécies (Almeida, 2016a). Dentro dessas mais de 3000 espécies existe um grupo das mesmas de fácil adaptação ao clima tropical, isto é, podem suportar condições de seca e vivem em ambientes com tendência a que ocorram incêndios. Dada esta informação, o género que se destaca como mais disperso é o género *Eucalyptus*, visto apresentar um crescimento bastante rápido (Almeida, 2016a).

As espécies de eucalipto são compostas por tronco, cascas, flores, frutos e folhas. Os frutos são cápsulas lenhosas que contém numerosas sementes minúsculas que são libertadas através de válvulas que se abrem quando é a altura da maturação (Almeida, 2016b). Em Portugal a espécie mais frequente é a Eucalipto-comum, de nome científico *Eucalyptus globulus*, originária da Tasmânia (Almeida, 2016b).

Em Portugal, nas últimas décadas, tem-se assistido a um aumento significativo das plantações de eucalipto. Segundo o 6º Inventário Nacional Florestal, em 2010 existiam 811 mil hectares de eucalipto plantados em Portugal. De 2005 para 2013, o número de plantas de eucalipto certificadas passou de 11,1 milhões para 28,5 milhões (Goes, 2014).

Na Figura 1 está representado o mapa de Portugal onde se indica a área de plantação de eucalipto.

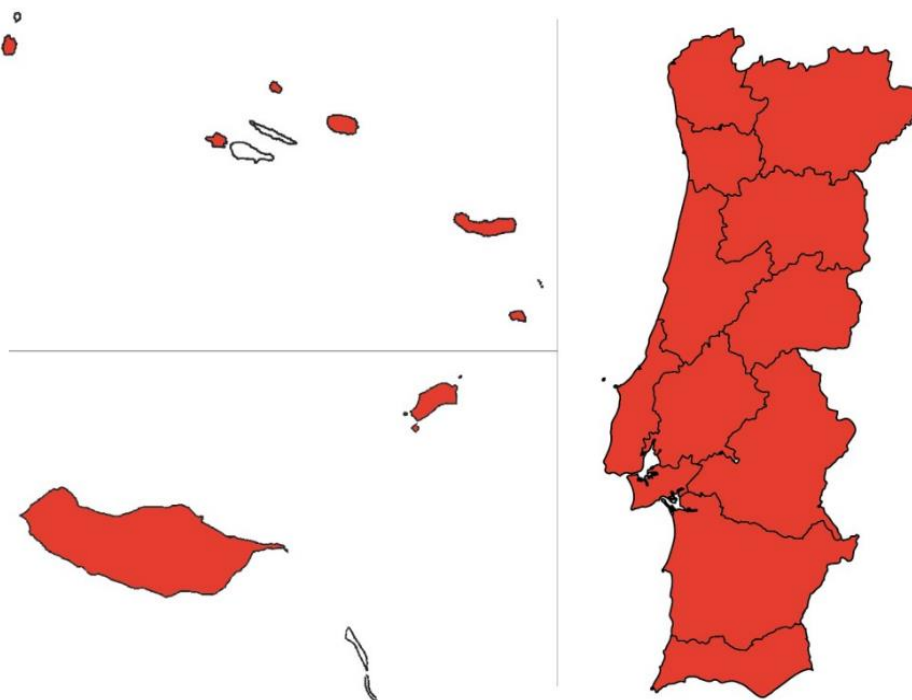


Figura 1- Distribuição do eucalipto em Portugal. (Fonte: “Plantas invasoras em Portugal”, 2013)

No geral, o eucalipto é fonte de matéria-prima para as indústrias madeireira e de celulose, e também para as indústrias farmacêutica e de perfumaria, uma vez que produzem óleos essenciais (Figueiredo et al., 2011).

A espécie *E. globulus* é considerada a principal fonte mundial de óleo de eucalipto, o qual é amplamente utilizado para alívio da tosse, dor de garganta e outras infeções, assim como antisséptico (Mulyaningsih et al., 2011). A planta *E. globulus* também é conhecida por ser rica em compostos bioativos, tais como, óleos essenciais, ácidos fenólicos, flavonóides e taninos (Said et al., 2016).



Figura 2- Fruto do *Eucalyptus globulus*. (Adaptado de: Botanics, 2014)

3.2 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais são misturas complexas de vários componentes voláteis, formados pelo metabolismo secundário de plantas aromáticas e conhecidos pela sua solubilidade em solventes orgânicos apolares e pelo seu aroma agradável e intenso (Malinowski 2010). Esses constituintes dos óleos essenciais, tais como monoterpenos, sesquiterpenos e álcoois, estão geralmente relacionados com a defesa da planta contra pragas, fungos e bactérias. Os óleos essenciais e as plantas aromáticas não só são conhecidos pelos seus variados usos em relação ao sabor e à fragrância, como também são usados com finalidades conservantes, antioxidantes e antimicrobianas (Harkat-Madouri et al., 2015).

A composição química de um óleo volátil, extraído do mesmo órgão de uma mesma espécie vegetal, pode variar com diversos fatores, como por exemplo, com a época da colheita, condições climáticas e de solo (Brum, 2010).

As moléculas que constituem os óleos voláteis podem sofrer degradação, o que pode fazer com que a sua conservação seja difícil. A qualidade dos óleos essenciais pode ser determinada através da medição de alguns índices, tais como o índice de peróxido e de refração, de características físico-químicas como a viscosidade, miscibilidade em álcool, e também através da análise por cromatografia gasosa (CG). Para evitar a deterioração dos óleos essenciais e consequente redução do seu valor comercial, estes devem ser guardados completamente secos com sulfato de sódio anidro e livres de impurezas insolúveis, preferencialmente em frascos âmbar para proteção da luz (Pinto, 2010).

3.2.1 TERPENOS

Os terpenos, também chamados de terpenoides ou isoprenoides, constituem o maior grupo de metabolitos secundários (Oliveira et al., 2014). Alguns terpenos, como as giberelinas, os esteróis e os carotenoides, têm função no crescimento e desenvolvimento vegetal, e podem ser considerados metabolitos primários. No entanto, a maioria dos compostos terpênicos é produto do metabolismo secundário. Uma única planta pode sintetizar

muitos compostos terpênicos diferentes, em diferentes órgãos e em diferentes épocas ao longo do seu desenvolvimento (Silveira, 2012).

Estes originam-se pelas unidades pentacarbonadas condensadas, chamadas também de unidades isoprênicas.

Os compostos terpênicos podem ser classificados conforme o número de unidades de isopreno que estes possuem, isto é:

- Monoterpenos (terpenos com 10 carbonos);
- Sesquiterpenos (terpenos com 15 carbonos);
- Diterpenos (terpenos com 20 carbonos);
- Triterpenos (terpenos com 30 carbonos);
- Tetraterpenos (terpenos com 40 carbonos);
- Politerpenóides (terpenos com mais de 40 carbonos) (Silveira, 2012).

Os monoterpenos são as moléculas mais representativas, constituindo 90% dos óleos essenciais, e possuem grande variedade de estruturas com diversas funções como por exemplo antimicrobiana, hipotensora e anti-inflamatória. Estes compostos têm baixo custo e têm sido amplamente utilizados como aromas e fragrâncias desde o início do século XIX. Hoje em dia estão mais presentes na indústria farmacêutica, desempenhando um importante papel devido ao seu potencial terapêutico (Guimarães et al. 2013).

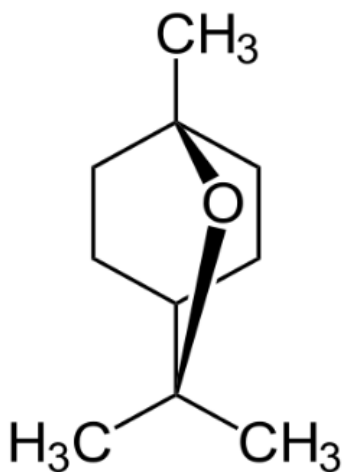


Figura 3 Estrutura química do monoterpene 1,8- cineol (https://commons.wikimedia.org/wiki/File:1,8-Cineol_b.svg)

Muitos destes compostos terpênicos são amplamente utilizados pela indústria como aromatizantes e fragrâncias, tendo também utilidade em produtos de perfumaria e

cosméticos, bem como aditivos alimentares. Na indústria farmacêutica, podem ser usados como adjuvantes ou excipientes para promover uma mais fácil penetração na pele, podendo também ser usados como princípios ativos de medicamentos (Oliveira et al., 2014).

3.2.2. ÓLEOS ESSENCIAIS DO *EUCALYPTUS*

Muitos dos óleos essenciais, principalmente o de eucalipto, têm sido usados para prolongar a vida de prateleira de alimentos, bebidas, produtos farmacêuticos e cosméticos. As propriedades antimicrobianas e antioxidantes que apresentam também têm importância na proteção de plantas (Mulyaningsih, 2010).

O óleo de eucalipto é constituído por uma grande gama de compostos, sendo o monoterpeno 1,8-cineol o composto maioritário, também designado como eucaliptol, o qual é utilizado para fins medicinais e utilizado como ingrediente em produtos farmacêuticos e cosméticos (Mulyaningsih, 2010).

Os óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus* possuem atividades biológicas importantes, tais como propriedades desinfetantes, antissépticas, analgésicas, anti-inflamatórias, expetorantes, antibacterianas e antioxidantes (Marzoug et al., 2011). Como têm estas propriedades, estes óleos são frequentemente utilizados como aromatizantes alimentares, em confeitaria, para produção de detergentes sabões e perfumes, em gotas nasais, em medicamentos para a tosse, como inalante, sendo ainda usados como solventes (Diksha et al., 2012).

O extrato aquoso de *E. globulus* demonstrou ter um efeito antidiabético quando incluído na dieta, sendo este efeito resultante da estimulação da secreção de insulina, provavelmente causada por mais de um componente ativo do extrato, além do 1,8-cineol (Malinowski, 2010).

Relativamente à obtenção de óleos essenciais a partir do fruto do eucalipto, existem já alguns trabalhos científicos realizados nesta temática. Pereira e colaboradores do Departamento de Química da Universidade de Aveiro, realizaram em 2003 um trabalho de investigação que consistiu na determinação da composição química do fruto do *E. globulus*. Os frutos foram submetidos a um procedimento de destilação a vapor para isolar o óleo essencial. A amostra recuperada em água foi extraída com éter etílico, seco

com sulfato de sódio anidro e o solvente removido no evaporador rotativo. Após isolamento do óleo volátil, com um rendimento de 1,57%, foi determinada a sua composição por GC-MS. A análise permitiu a detecção de 46 compostos, dos quais 33 foram identificados. Os principais componentes identificados foram Aromadendreno (25,1%), seguido de α -Felandreno (17,2%), 1,8-cineol (11,7%), Ledeno (5,83%) e Globulol (Pereira et al., 2005).

Na Argélia, (Said et al., 2016) realizaram um estudo para determinar a composição química dos extratos de óleos essenciais do fruto do *Eucalyptus globulus*, analisar a sua atividade antioxidante e também a atividade antibacteriana. A composição química do óleo essencial foi determinada usando a técnica de GC-MS. A análise do óleo essencial permitiu identificar 28 compostos voláteis, em que os sesquiterpenos estavam em maior quantidade (61.2% de compostos sesquiterpenos oxigenados).

3.2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO

A extração é um processo onde é obtido um soluto ou misturas de compostos, neste caso, os óleos essenciais, de uma mistura, utilizando um solvente. O soluto, ou misturas de compostos, podem ser extraídos num meio sólido ou líquido, e o solvente utilizado para a extração pode ser a água, ou um solvente miscível ou imiscível em água. A escolha do solvente que vai ser usado depende do soluto a ser extraído ou das condições (Pereira, 2008).

Os óleos essenciais podem ser obtidos a partir da prensagem do conjunto dos invólucros que envolvem uma semente ou fruto, o chamado pericarpo, como também pelos métodos de destilação por arraste de vapor, hidrodestilação, sendo este o mais utilizado. Outros métodos que podem ser utilizados são a extração com solventes orgânicos e extração com fluídos supercríticos (Pereira, 2010).

Na extração de óleos essenciais, as características químicas podem ser alteradas, em particular dependendo do método utilizado para a realização da mesma. O calor e a pressão utilizados no momento da extração podem, por exemplo, interferir na qualidade final do óleo essencial, porque no momento da extração, as moléculas de um princípio ativo podem ser quebradas e oxidadas em produtos de menor eficácia.

Ao usar diferentes técnicas de extração pode-se obter uma grande variedade de compostos a partir de plantas medicinais e aromáticas (Brum, 2010).

3.2.3.1 HIDRODESTILAÇÃO

A destilação é um processo de separação de misturas líquidas, fundamentado na diferença de composições dos constituintes nas fases líquidas e de vapor em equilíbrio, devido à diferença de volatilidade entre os componentes do líquido (Pereira, 2008).

A extração por hidrodestilação pode ser realizada através de dois métodos (Pereira, 2008). Na destilação do tipo Clevenger, a matriz é imersa em água destilada e o processo é realizado à temperatura de ebulição da mistura. A mistura de vapor com o soluto após aquecimento a 100°C para a formação do mesmo, é submetida a uma condensação, separando-se de seguida os compostos insolúveis na água por uma decantação (Brum, 2010). Na destilação por arrastamento por vapor, o vapor de água atravessa a matriz arrastando os compostos voláteis, sendo a separação semelhante à destilação de Clevenger (Pereira, 2008). A figura 4 representa um exemplo de uma montagem experimental da destilação por hidrodestilação.

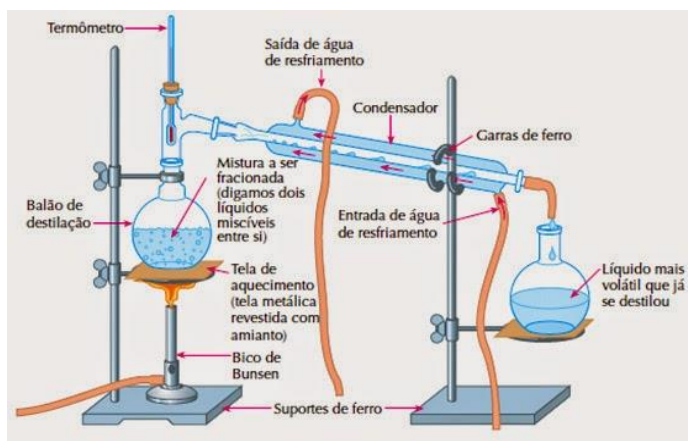


Figura 4. Montagem experimental da destilação por hidrodestilação.

Fonte: (Muniz, 2015)

3.2.3.2 EXTRAÇÃO COM SOLVENTES ORGÂNICOS

As extrações com solventes orgânicos podem utilizar uma larga variedade de solventes com polaridades distintas tais como os álcoois metílico, etílico e propílico, hexano, clorofórmio, acetato de etilo, acetona e água. São técnicas que são aplicadas normalmente

nas indústrias química, farmacêutica e de alimentos para a produção de extratos diversos. Os óleos vegetais obtidos em laboratório são produzidos tradicionalmente através da extração Soxhlet (Brum, 2010). Na Figura 5, está representado um esquema de uma montagem deste tipo de extração, contendo o extrator soxhlet.

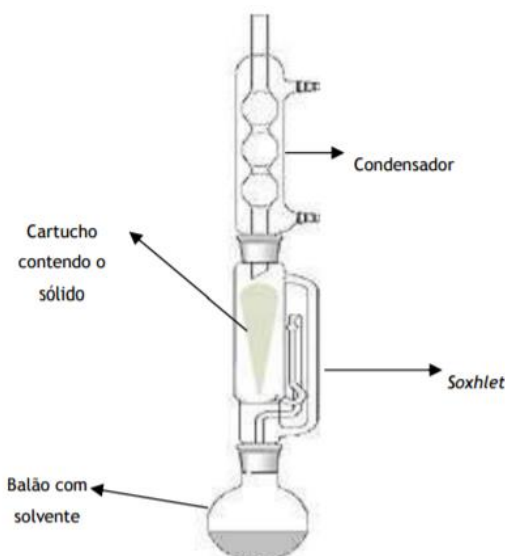


Figura 5. Extração usando Soxhlet. (Pereira, 2008)

3.3 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Os antioxidantes podem ser definidos como substâncias que bloqueiam o efeito danoso dos radicais livres e incluem uma diversidade de compostos tais como vitaminas, minerais, enzimas e outros compostos, como alguns metabolitos secundários de vegetais. Estas substâncias quando estão presentes em alimentos em determinadas concentrações, retardam ou inibem os danos devidos à oxidação, como a rancidez do alimento (Pereira, 2010).

São diversas as substâncias com capacidade antioxidante, podendo estas ser captadores de radicais livres, neutralizadores de oxigênio singlete, inativadores de peróxidos e outras espécies reativas de oxigênio (ROS) e inibidores de enzimas pró-oxidativas (Shahidi, 2015). Os radicais livres que são derivados de oxigênio são conhecidos como ROS, e representam a classe mais importante de radicais livres geradas pelo organismo. Refira-se que, apesar do oxigênio ser essencial para a vida aeróbia, este

pode ser tóxico em determinadas condições, fenómeno este conhecido como “paradoxo do oxigénio” (Ferreira, 2007).

Os antioxidantes são classificados pelo seu mecanismo de ação como antioxidantes primários e secundários. Os antioxidantes primários, como tocoferóis e alguns compostos fenólicos, têm a capacidades de inibir a reação em cadeia da oxidação, atuando como doadores de hidrogénio ou aceitadores de radicais livres, e de gerar radicais mais estáveis. Os antioxidantes secundários, como o ácido ascórbico têm a capacidade de renovar antioxidantes primários repondo o átomo de hidrogénio, impedindo desta maneira que haja o esgotamento de importantes antioxidantes primários (Shahidi, 2015).

Os antioxidantes podem também ter origem sintética ou natural. Os antioxidantes de origem natural são de grande importância, pois comprovou-se que o consumo de alimentos ricos nestes compostos tem benefícios na saúde humana, embora os antioxidantes sintéticos sejam mais baratos e de fácil obtenção (Brum, 2010).

A indústria alimentar tem utilizado antioxidantes sintéticos com o objetivo de reduzir os problemas que ocorrem a partir de processos oxidativos. Porém, alguns destes aditivos contribuem com sabores estranhos e outros são tóxicos, dificultando e restringindo a sua aplicação na alimentação ou em materiais de embalagem (Tiveron, 2010). Os mais utilizados na indústria agroalimentar são o butil-hidroxianisól (BHA), butil-hidroxitolueno (BHT), propil galato (PG) e *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ) (Messias, 2009).

Os antioxidantes também podem ser definidos como enzimáticos e não enzimáticos. Muitos dos antioxidantes não enzimáticos são fornecidos pela alimentação, os quais se podem dividir em várias classes, onde os polifenóis constituem o maior grupo. Entre os antioxidantes alimentares incluem-se vitaminas, como o ácido ascórbico (vitamina C), o α -tocoferol (vitamina E), carotenoides e minerais (Lima 2011). Estes antioxidantes captam radicais livres e inibem a cadeia de iniciação ou interrompem a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas pelos radicais (Silva et al., 2010).

3.3.1 POLIFENÓIS

Os polifenóis ou compostos fenólicos são os metabolitos secundários mais importantes no reino vegetal e as suas quantidades podem variar consoante as diferentes partes das plantas. Estes incluem muitas classes de compostos, tais como, ácidos fenólicos, flavonoides, taninos, lignanas. Os polifenóis são caracterizados por terem um ou mais anéis aromáticos, com um ou mais grupos hidroxilo, e propriedades de oxidação-redução (Santos, 2014).

Os compostos fenólicos são ótimos na eliminação de radicais de oxigénio porque o potencial de redução de eletrões do radical fenólico é menor do que o potencial de redução de eletrões dos radicais de oxigénio. Portanto, os compostos fenólicos podem eliminar intermediários de oxigénio reativos sem gerar outras reações oxidativas (Ainsworth, E. A. & Gillespie, K.M, 2007).

A importância dos polifenóis na nutrição humana, está normalmente relacionada com a saúde e possível prevenção de algumas doenças. Entre os seus efeitos maioritariamente e potencialmente benéficos na saúde destacam-se a atividade anti-inflamatória, antiviral, antimicrobiana e antioxidante (Sobral, 2012).

Existem cerca de cinco mil fenóis identificados, entre eles, destacam-se os flavonoides, ácidos fenólicos, fenóis simples, taninos, ligninas e tocoferóis (Brum, 2010), estando estes metabolitos secundários representados na Figura 6.

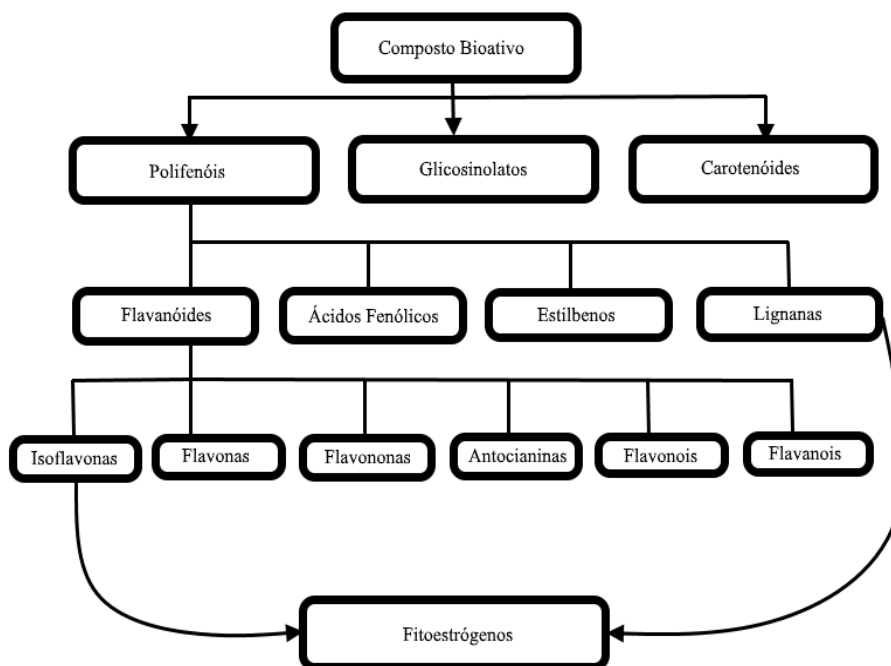


Figura 6. Grupos de metabolitos secundários

(<http://blog.gsuplementos.com.br/o-nome-dado-a-essas-maravilhas-e-compostos-bioativos-voce-conhece/>)

O ensaio Folin–Ciocalteu é o procedimento mais utilizado para determinar o total de compostos fenólicos nos extratos alimentares. Este ensaio é um método de colorimetria baseado em reações de transferência de elétrons entre o reagente Folin-Ciocalteu e os compostos fenólicos. No entanto, este ensaio não é específico para determinações dos compostos fenólicos totais, uma vez que existem outros tipos de compostos que podem estar presentes em grande quantidade nos extratos alimentares de plantas, como por exemplo, açúcares redutores e ácido ascórbico que também podem reduzir o reagente Folin-Ciocalteu, modificando os resultados da determinação dos compostos fenólicos totais (Sanchez-Rangel et al., 2013).

3.3.2 FLAVONOIDES

Os flavonoides constituem a maior classe de compostos fenólicos e são de baixo peso molecular. Estão majoritariamente distribuídos nas folhas, sementes, casca e flores das plantas, tendo já sido identificados mais de 4.000 flavonoides. Nas plantas, a

funcionalidade destes compostos consiste principalmente na proteção contra a radiação ultravioleta, agentes patogénicos e herbívoros (Heim, K. E., Tagliaferro, A. R., 2002).

Os flavonoides são caracterizados pela estrutura C₆-C₃-C₆ com dois anéis fenólicos (A e B) e um anel heterocíclico pirânico (C) que os une. Na Figura 7 está representada a estrutura geral dos flavonoides (Soutinho, 2012).

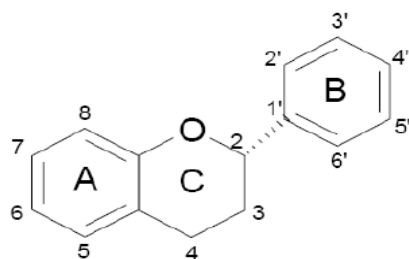


Figura 7. Estrutura química do flavonoide.

Adaptado de (Soutinho, 2012)

Os flavonoides podem ser divididos em várias classes, dependendo da sua estrutura molecular, tais como flavonas, flavonois, flavanonas, flavan-3-óis, antocianinas e isoflavonoides, em que as flavonas, flavonois e os isoflavonoides são predominantes, estando representados na Figura 8.

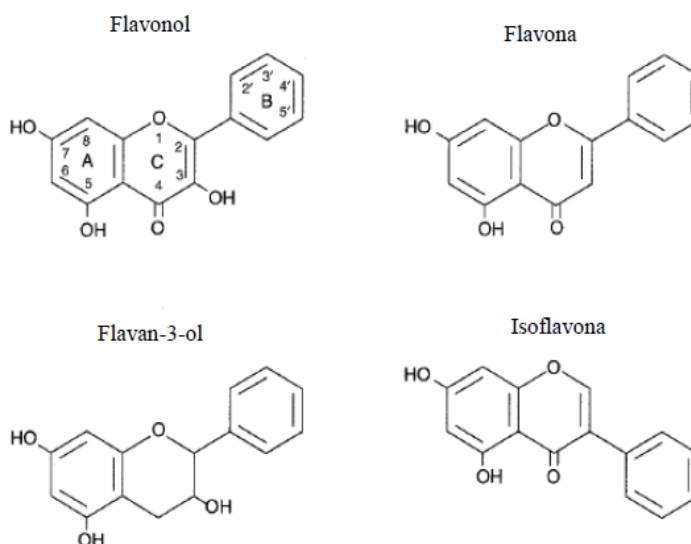


Figura 8. Estruturas básicas dos flavonoides. Fonte: (Rice-Evans, Miller, & Paganga, 1996)

As flavonas e os flavonóis estão presentes nas flores e nas folhas de todas as plantas verdes, e atuam na proteção das células contra o excesso de radiação UV-B. Os isoflavonóides (isoflavonas) apresentam várias atividades biológicas, sendo encontrados principalmente na família das leguminosas.

De entre as propriedades dos flavonoides destacam-se a capacidade de sequestro de radicais livres, uma grande atividade antioxidante na prevenção da oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e inibição de enzimas hidrolíticas e oxidativas (lipoxigenase, cicloxigenase, fosfolipase A2) (Silveira, 2012)

Os flavonoides são bastante comuns na natureza intervindo na atração de polinizadores, e como co- pigmentos das antocianidinas. Podem determinar atividades anti-inflamatórias, anti-microbianas, antitumorais e antidiabéticas, o que faz com que esta classe de compostos fenólicos seja de grande interesse para a indústria farmacêutica (Dourado, 2006). Em contrapartida, alguns flavonoides também foram encontrados *in vitro* como sendo mutagênicos, onde esses efeitos nocivos foram resultado do efeito pró-oxidante, ou seja, foi induzido um stress oxidativo tanto através da criação de espécies reativas de oxigênio, como através da inibição dos sistemas antioxidantes, em vez da ação antioxidante dos flavonoides relacionados, e isso faz com que os efeitos biológicos e farmacológicos de um determinado composto flavonoide variem (Cao,G., Sofic, E.,1997).

As antocianinas são um dos grupos pertencentes aos compostos fenólicos e são responsáveis pela cor de muitas plantas, flores e frutas (Sobral, 2012), nomeadamente pelas cores vermelha, rosa, roxa e azul (Silveira, 2012). Encontram-se distribuídas em frutas e legumes e são uma das principais classes dos flavonoides, contribuindo para a atividade antioxidante destes. Como captadores de radicais livres, podem interagir com sistemas biológicos, inibindo ações que são prejudiciais para o organismo, tal como, na proteção antibacteriana e cardiovascular (Soutinho, 2012). A estrutura básica das antocianinas está representada na Figura 9.

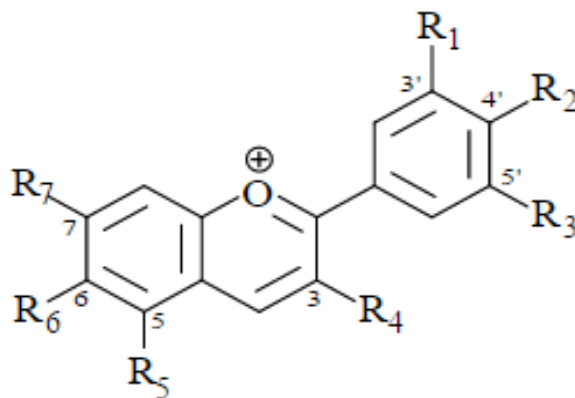


Figura 9. Estrutura básica da antocianina. Fonte (<https://pt.wikipedia.org/wiki/Antocianina>)

3.3.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE CAPTADORA DO RADICAL DPPH

O método do DPPH é um dos métodos mais usados na determinação *in vitro* da atividade antioxidante. O método consiste na avaliação espectrofotométrica de um radical orgânico estável, conhecido como DDHP (2,2-difenil-1-picril-hidrazilo), com uma coloração roxa, sendo lida a sua absorvância a 517 nm. Na existência de um antioxidante ocorre a doação de um átomo de hidrogénio ao átomo de azoto do radical, pois este possui um elétron desemparelhado, formando desta forma DPPH reduzido que tem uma coloração amarela, como se pode observar na Figura 10 (Nicolau, 2013).

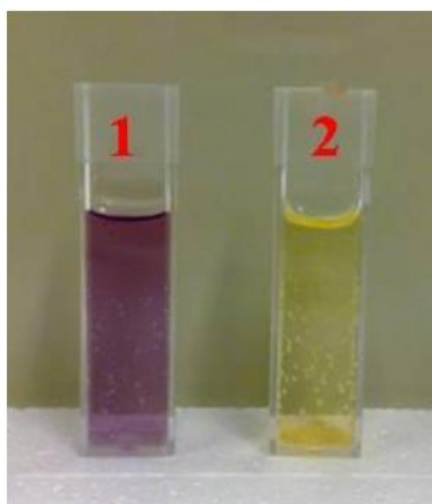


Figura 10. Coloração do radical livre DPPH (1) e do DPPH reduzido (2). (Adaptado de: Nicolau, 2013)

Said e colaboradores (2016) analisaram a atividade antioxidante de extratos do fruto de *E. globulus* usando diferentes metodologias. Os resultados da atividade antioxidante (atividade de captação do radical DPPH, poder redutor e inibição da atividade de peroxidação lipídica) do extrato de óleos essenciais revelaram atividades fracas com valores de IC₅₀ de 27,0 ± 0,2 mg/mL, 32,9 ± 1,8 mg/mL e 4,9 ± 0,2 mg/mL, respectivamente, quando comparados com os do padrão de BHA cujos resultados obtidos foram cerca de 0,05 ± 0,0 mg/mL, 0,03 ± 0,0 mg/mL e 0,5 ± 0,2 mg/MI (Said et al., 2016) .

Boulekbache-Makhlouf e colaboradores (2013), realizaram um estudo que teve como objetivo a determinação de compostos fenólicos totais, a atividade antioxidante e também a atividade antimicrobiana do fruto do eucalipto da Argélia. Concluíram que o teor de humidade da amostra foi 57,14 ± 0,59% e o rendimento de extração foi cerca de 30,83%. O extrato de frutos de *E. globulus* demonstrou ser rico em fenólicos totais e taninos (464,71 ± 1,52 mg equivalentes em ácido gálico (GAE)/g CE, 332,05 ± 9,31 mg GAE/g CE, respectivamente), mas pobre em flavonoides (2,99 ± 0,01 mg QE / g CE) e flavonóis (2,3 ± 0,22 mg QE / g CE). No que respeita a avaliação da atividade antioxidante, observou-se que o fruto apresentou alto poder redutor e atividade moderada de inibição da peroxidação lipídica (Boulekbache-Makhlouf et al., 2013)

3.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A atividade antimicrobiana de óleos essenciais e extratos de plantas vem sendo valorizada há muitos anos. Esta atividade está ligada a muitas aplicações, como a conservação de alimentos crus, produtos farmacêuticos, à medicina alternativa e terapias naturais (Hammer, K.A., Carson C.F., 1999).

Existe uma grande variedade de métodos laboratoriais que podem ser usados para avaliar a atividade antimicrobiana de um extrato ou de um composto puro. Os métodos de difusão em disco e de diluição em caldo ou ágar são os métodos mais conhecidos e usados para este efeito. O método de difusão em disco de ágar é o método mais utilizado em muitos estudos laboratoriais de microbiologia que envolvem testes de atividade antimicrobiana, embora não seja muito apropriado para determinar a concentração mínima inibitória (MIC), devido a ser impossível determinar a quantidade de agente antimicrobiano difundido no ágar. No entanto, este método apresenta

vantagens sobre outros métodos como a facilidade de realização, o baixo custo, a capacidade de testar um grande número de microrganismos e agentes antimicrobianos e a facilidade de interpretação e discussão dos resultados obtidos (Balouiri et al., 2015). Na Figura 11, está representada uma experiência em que foi utilizado o método de difusão em disco, em que a bactéria utilizada se mostrou resistente à substância estudada nos discos onde não se observou a formação de um halo à sua volta.

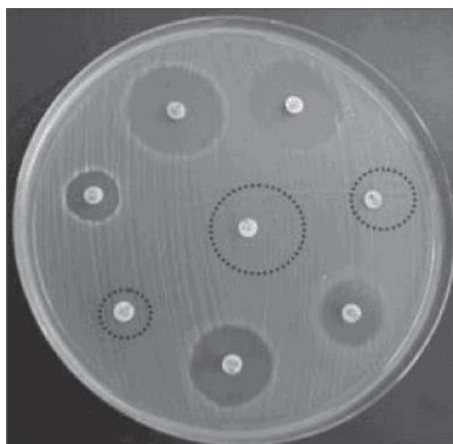


Figura 11. Método de difusão em disco com *Staphylococcus aureus*. (Sejas, et al., 2003)

Os métodos de diluição em ágar são os mais aconselhados para fazer a obtenção dos valores de MIC. Este método dá-nos a possibilidade de estimar a concentração do agente antimicrobiano que foi testado no ágar ou no meio de caldo, usando a macro ou micro diluição. A diluição em ágar deve ter as concentrações desejadas do agente antimicrobiano num meio de ágar fundido (normalmente feito em duplicado), seguido pela inoculação do agente microbiano aplicado sobre a superfície das placas de ágar (inoculação à superfície). A micro ou macro diluição é um dos métodos mais básicos para testar a suscetibilidade do microrganismo. O procedimento envolve a preparação da diluição do agente antimicrobiano (em duplicado) num meio de crescimento líquido feito em tubos com um volume mínimo de 2mL (macro diluição), ou com volumes menores usando 96 poços de uma microplaca (micro diluição) (Balouiri et al., 2015).

Said e colaboradores (2016) analisaram a atividade antioxidante e a atividade antimicrobiana de extratos do fruto de *E. globulus*. Na análise da atividade antibacteriana foram estudados os microrganismos de referência: *Staphylococcus aureus*, *Bacillus sub-*

tilis, *Listeria innocua*, *E. coli* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados obtidos demonstraram a existência de um efeito de inibição de extratos de óleos essenciais contra todas as bactérias testadas com MIC de 3 e 4 mg/mL. Observou-se também um efeito bactericida, com MBC variando entre 3,6 e 9,0 mg/mL, o que demonstra a sensibilidade de todas as bactérias testadas aos óleos essenciais de frutos de *E. globulus* (Said et al., 2016).

A atividade antimicrobiana de frutos de eucalipto foi igualmente estudada por Boulekbache-Makhlouf et al. (2013). Os valores de MIC do extrato de eucalipto e do ácido tânico foram menores para *B. subtilis* enquanto o ácido gálico era um inibidor mais potente de *S. aureus* e muito menos eficiente contra *B. subtilis*. Deste modo, comprovou-se que o extrato de frutos de *E. globulus* foi eficaz contra as duas estirpes Gram-positivas (*S. aureus*, *B. subtilis*), mas não foi observada qualquer atividade contra a bactéria Gram-negativa *Klebsiella pneumoniae*.

CAPÍTULO 4

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PADRÕES E REAGENTES

Os reagentes 2,2-difenil-1-picril-hidrazilo (DPPH), hidróxido de potássio (85% de grau de pureza) e sulfato de magnésio (99,5%) foram adquiridos à empresa Sigma-Aldrich Chemical Co.; o β -caroteno (95%) foi adquirido através da empresa Cayman Chemicals e o ácido linoleico à Alfa Aesar; o trolox é da marca Acros Organics e o grau de pureza é 97%; o cloreto de sódio (99,5%) e o metanol (99,8%) foram adquiridos à empresa AnalaR Normapur. O padrão usado na determinação de compostos fenólicos totais foi o ácido gálico (98%), da marca Merck e para a determinação de flavonoides totais utilizou-se como padrão a catequina (98%), adquirida na Cayman Chemical. O reagente de Folin-Ciocalteu e o Tween 80 foram adquiridos à Panreac. Para a preparação das soluções de carbonato de sódio (99,8%), nitrito de sódio (99%), cloreto de alumínio (99%), hidróxido de sódio (95%), tampão fosfato de sódio, ferricianeto de potássio (99%), ácido tricloroacético (99,9%), cloreto de ferro (III) (99%), ácido sulfúrico (95%-97%) e ácido clorídrico (37%) foram utilizados reagentes de pureza pró-análise.

4.2 DETERMINAÇÃO DOS COMPOSTOS BIOATIVOS

4.2.1 OBTENÇÃO E PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS

A colheita das amostras de *Eucalyptus globulus* utilizadas neste estudo foi realizada em duas localizações geográficas diferentes (Douro Litoral e Viseu), em diferentes meses do ano (dezembro e janeiro).

A designação das amostras – 1, 2, 3, 4 – foi definida de acordo com a região e época de colheita. Foram colhidas, em dezembro de 2016, no Douro Litoral, folhas de árvores adultas e frutos de eucalipto (Amostra 1 e 4, respetivamente) e em janeiro de 2017, em Viseu, foram colhidas folhas em crescimento e adultas (Amostras 2 e 3, respetivamente).

Todas as amostras foram colhidas e transportadas para o laboratório em sacos de plástico. Parte das amostras 1, 2 e 3 foi triturada num moinho, modelo IKA A11 BASIC,

e armazenada a -20°C num goblé tapado com parafilm e as restantes ficaram à temperatura ambiente para uma necessária utilização futura. A amostra 4 foi liofilizada, triturada e armazenada a -20°C num goblé tapado com parafilm.

Na Figura 12 estão representados os 3 tipos de folhas de árvores de eucalipto colhidas e o fruto.



Figura 12. Fruto colhido de árvore adulta na região do Douro (1), Folha de árvore adulta colhida na região do Douro (2), Folha de árvore jovem colhida na região de Viseu (3), Folha de árvore adulta colhida na região de Viseu (4).

4.2.2 EXTRAÇÃO DO ÓLEO ESSENCIAL DAS AMOSTRAS

Os óleos essenciais das amostras analisadas foram obtidos através do método da hidrodestilação usando um aparelho Clevenger. Para a hidrodestilação colocou-se 75 g de cada amostra triturada num balão de fundo redondo de 1000 mL e adicionou-se 500 mL de água destilada. A amostra foi misturada com a água agitando manualmente o balão e posteriormente o balão foi colocado numa manta de aquecimento para se proceder à extração do óleo essencial. O processo de extração decorreu por um período de aproximadamente 3 horas. No final, o óleo essencial extraído de cada amostra foi recolhido para frascos de vidro aos quais se adicionou sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) para absorver a possível água que possa vir junto com o óleo extraído e de seguida foram guardados no frigorífico.

Na Figura 13 está apresentada a montagem usada para a hidrodestilação bem como uma amostra de óleo essencial extraído.



Figura 13. Aparelho Clevenger para realização da hidrodestilação e uma amostra de óleo essencial extraído guardado num frasco de vidro.

4.2.3 EXTRAÇÃO DE COMPOSTOS FENÓLICOS DAS AMOSTRAS

Todas as amostras utilizadas para a realização deste trabalho foram extraídas com etanol absoluto por ser um solvente polar, dado que os compostos fenólicos são geralmente mais solúveis em solventes menos polares que a água (Rodrigues 2011).

Para a preparação dos extratos, colocou-se dentro de um matraz 2 g de cada amostra triturada e adicionou-se 50 mL de etanol absoluto. Procedeu-se à agitação da mistura durante 1 hora, à temperatura ambiente e 320 rpm. Passada 1 hora de agitação, as amostras foram colocadas num banho de ultrassons (J. P. Selecta, 50 Hz) durante aproximadamente 15 minutos, e de seguida fez-se a filtração com papel de filtro Whatman Nº 4. Os resíduos obtidos foram re-extraídos sob as mesmas condições. De seguida, para cada amostra procedeu-se à junção dos extratos e posterior evaporação do solvente em rotavapor Buchi, a 40 °C e com uma pressão a variar entre 60 e 70 atm. O resíduo que foi obtido foi redissolvido em metanol, tendo-se realizado previamente cálculos para obter uma solução com concentração de 20 mg/mL. A amostra assim preparada, designada por extrato etanólico,

foi utilizada para todas as análises posteriormente realizadas, tais como a avaliação dos compostos fenólicos totais e a avaliação da atividade antioxidante.

Na Figura 14 encontra-se a imagem do rotavapor Buchi utilizado neste trabalho.



Figura 14. Rotavapor Buchi utilizado na preparação dos extratos.

4.2.4 DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA

A determinação da composição química dos óleos essenciais comerciais e do óleo essencial extraído das amostras (fruto e folhas) de *Eucalyptus globulus* foi realizada pela técnica de Cromatografia Gasosa acoplada a detecção por Espectrometria de Massa (GC-MS).

A unidade GC-MS consiste num cromatógrafo a gás Perkin Elmer Autosystem XL, equipado com uma coluna de sílica fundida DB-5 MS (30 m x 0,25 mm x 0,25 μ m; J & W Scientific, Inc.), e interligada a um espectrômetro de massa Perkin-Elmer Turbo-mass (versão de software 6.1.0, Perkin Elmer, Shelton, CT, EUA). A temperatura do forno foi programada, entre 45-175°C, a 3 °C/min, subsequentemente a 15 °C/min até 300 °C, e então mantida a esta temperatura por 10 min; a temperatura do injetor e detetor foi de 280 °C e o volume de amostra injetado foi 1 μ L. A análise foi realizada utilizando hélio como gás de arraste ajustado a uma velocidade linear de 30 cm/s nas seguintes condições: a temperatura da linha de transferência foi de 280 °C e a temperatura da fonte iônica foi 220 °C; com uma razão de split 1:40; energia de ionização 70 eV; faixa de varrimento, 40-300 u; tempo de varrimento 1 s.

As identificações dos compostos foram baseadas na comparação dos espectros obtidos com as da biblioteca espectral de massa NIST e foram confirmados usando índices

de retenção lineares determinados a partir dos tempos de retenção de uma mistura de n-alcenos (C7-C40) analisados em condições idênticas, com comparação com os dados publicados e, quando possível, com compostos padrão comerciais.

A quantificação dos diferentes compostos foi realizada usando valores relativos das áreas dos picos, obtidas diretamente dos valores de corrente total de íões (TIC).

4.3 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

4.3.1 MICRORGANISMOS TESTADOS

A atividade antimicrobiana foi avaliada com os óleos essenciais do eucalipto face aos seguintes microrganismos: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213), *Klebsiella pneumoniae* (ATCC 13883), *Enterobacter aerogenes* (ATCC 13048), *Proteus mirabilis* (ATCC 14153), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Bacillus cereus* (ATCC 10876), *Bacillus subtilis* (ATCC 6633), *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433) e *Candida albicans* (ATCC 2091). Para o crescimento das culturas, estas foram transferidas para tubos com caldo nutritivo durante 24 horas, a 37 °C .

4.3.2 MÉTODO MACRODILUIÇÃO

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais do fruto e folhas do eucalipto foi avaliada pelo método da macrodiluição.

O método da macrodiluição consiste na preparação da diluição do agente antimicrobiano (em duplicado) num meio de crescimento líquido feito em tubos com um volume mínimo de 2 mL.

De início preparou-se num matraz com 100 mL de caldo Muller-Hinton (MHB) e adicionou-se 500 µL de Tween 80, ficando uma solução de MHB a 0,5% Tween 80. Seguidamente procedeu-se à diluição das amostras de óleo essencial (OE) do eucalipto em tubos de ensaio, tendo-se preparado as diluições a 5%, 2,5%, 1,25%, 0,625%, 0,1325%, 0,16% e 0,078%. Para preparar a diluição a 5% de OE pipetou-se 1900 µL de MHB a 0,5% Tween 80 adicionando-se 100 µL de óleo essencial. O passo seguinte foi vortexar muito bem o tubo de ensaio contendo a diluição a 5% e retirar 1000 µL desta solução para outro tubo de ensaio, que já continha 1000 µL de MHB, para preparar a

diluição a 2,5%, de seguida vortexar muito bem o tubo desta diluição e retirar 1000 μ L para o terceiro tubo e assim sucessivamente até à diluição a 0,078%. Após feitas as diluições, foi preparado o inóculo do seguinte modo: primeiramente num tubo de ensaio com caldo nutritivo (Nutritive Broth- NB) ajustou-se o microrganismo à escala de 0,5 McFarland. Seguidamente preparou-se num matraz 60 mL de caldo Muller-Hinton, adicionando-se 400 μ L do inóculo a 0,5 McFarland, sendo depois o matraz bem agitado manualmente. Após o inóculo estar preparado, adicionou-se 1000 μ L do inóculo a cada um dos tubos, incluindo o branco e vortexou-se novamente. Por fim, os tubos foram incubados na estufa a 37 °C durante 24 horas. Depois de realizado o método avaliou-se a concentração mínima bactericida (MBC), que é a concentração que resulta na morte bacteriana.

Na Figura 15 apresenta-se uma imagem de uma das diluições feitas para a avaliação da atividade antimicrobiana e na Figura 16, um exemplo de resultado final após ter sido feito o espalhamento em placas com ágar nutritivo usando a bactéria.



Figura 15. Diluições feitas para a avaliação da atividade antimicrobiana.

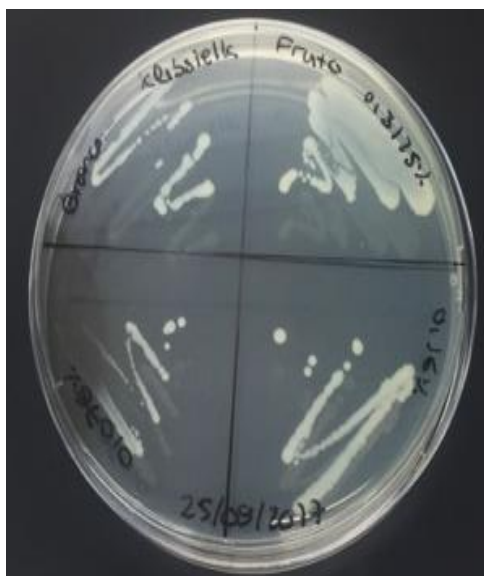


Figura 16. Crescimento do microrganismo após 24h na estufa.

4.4 COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

A determinação do teor de compostos fenólicos totais dos extratos etanólicos e óleos essenciais extraídos das folhas e fruto do eucalipto foi efetuada por um método espectrofotométrico, utilizando o reagente Folin–Ciocalteu. O método espectrofotométrico requer a obtenção de uma curva de calibração para a qual se utilizou uma solução metanólica de ácido gálico, composto fenólico usado como padrão, com concentrações de 0,005; 0,01; 0,05; 0,1; 0,125 e 0,25 mg/mL. Foram preparadas também diluições para obter concentrações de 0,25 mg/mL para os extratos etanólicos das folhas e fruto do eucalipto e concentrações de 5 e 10 mg/mL para os óleos essenciais usados no estudo. Num tubo de ensaio misturou-se 500 µL de extrato etanólico de cada amostra com 2,5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu (1:10 v/v, em água) e 2 mL de carbonato de sódio (75 g/L). Os tubos foram vortexados por 15 segundos e colocados a repousar no escuro durante 30 minutos a 40 °C, dentro de uma estufa, para o desenvolvimento de cor. Em simultâneo, foi preparado um branco contendo 500 µL de metanol, 2,5 mL de Folin-Ciocalteu e 2 mL de carbonato de sódio. Seguidamente, foi medida a absorvância de cada diluição preparada a 765 nm num espectrofotómetro de feixe duplo (Jasco V-530) e calculada a concentração em termos de compostos fenólicos totais utilizando a curva padrão obtida com ácido gálico. Os resultados foram expressos em mg equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/ g extrato). Todos os extratos foram analisados em triplicado.

Na Figura 17 apresenta-se uma imagem com o aspeto final dos padrões feitos com ácido gálico.

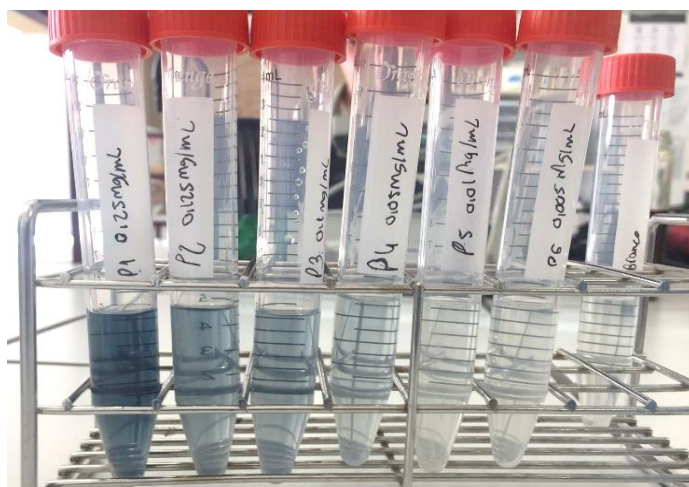


Figura 17. Padrões preparados com ácido gálico para a determinação dos fenóis totais.

4.5 DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.5.1 CAPTAÇÃO DO RADICAL DPPH

A determinação da atividade antioxidante pelo método do DPPH foi realizada por espectrofotometria, tendo-se utilizado Trolox como padrão de referência (com concentrações entre $4,88 \times 10^{-3}$ e $0,625$ mg/mL), tendo sido utilizado metanol como solvente. Para as amostras dos extratos foram preparadas diferentes diluições (0,039; 0,078; 0,156; 0,3125; 0,625; 1,25 e 2,5 mg/ml). Misturou-se 100 μ L de cada uma das diferentes concentrações de extrato com 900 μ L de solução metanólica de DPPH (6×10^{-5} M), colocando-se a mistura obtida no escuro durante 1 hora. Para a preparação do branco de reação, procedeu-se de forma similar utilizando metanol. A redução do radical DPPH foi avaliada através da medição da absorvância a 517 nm. A atividade captadora de radicais livres (ACR) foi calculada em função da percentagem de descoloração de DPPH usando a equação:

$$\% \text{ ACR} = [(\text{Abs DPPH} - \text{Abs Sol}) / \text{Abs DPPH}] \times 100 \quad (1)$$

Onde Abs Sol representa a absorvância da solução na presença de extrato numa determinada concentração e Abs DPPH representa a absorvância da solução de DPPH (branco de reação). A concentração mínima de antioxidante necessária para reduzir em 50% a concentração inicial da atividade captadora de radicais (EC50), foi calculada por interpolação a partir do gráfico de percentagem ACR em função da concentração da amostra. Todos os extratos foram analisados em triplicado.

Na Figura 18 apresenta-se uma fotografia com as amostras do extrato da folha colhida na região de Viseu usadas para a determinação da captação do radical DPPH.

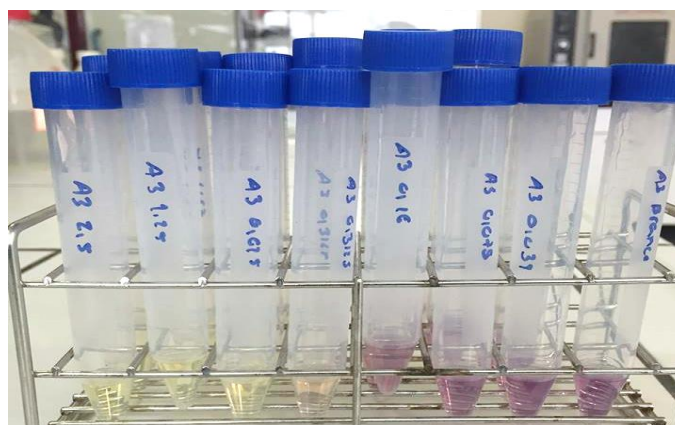


Figura 18. Determinação da % de captação do radical DPPH para o extrato da amostra 3.

4.5.2 PODER REDUTOR

Para a determinação do poder redutor dos extratos foram preparadas diferentes diluições dos extratos das amostras (entre 0,039mg/mL e 2,5 mg/mL). Misturou-se 500 μ L de extrato com 500 μ L de solução tampão de fosfato de sódio (0,2 mol/L a pH=6,6) e 500 μ L de solução a 1% de ferricianeto de potássio. A mistura foi incubada a 50 °C durante 20 minutos e, após arrefecimento, adicionou-se 500 μ L de ácido tricloroacético (10%). Foi retirado 1 mL do sobrenadante para um tubo de ensaio e adicionou-se 1 mL de água desionizada e 0,4 mL de FeCl₃ (0,1%). A absorvância da mistura obtida foi medida a 690 nm num espectrofotómetro de feixe duplo (Jasco V-530,2004). A concentração de extrato correspondente ao EC50 foi calculada a partir do gráfico de absorvância a 690 nm em função da concentração do extrato. Como padrão de referência utilizou-se uma solução de trolox em metanol com concentrações entre 0,0195 mg/mL e 1,25 mg/mL. Todos os extratos foram analisados em triplicado.

Na Figura 19 apresenta-se uma fotografia com as amostras do extrato da folha colhida na região do Douro Litoral usadas para a determinação do poder redutor.

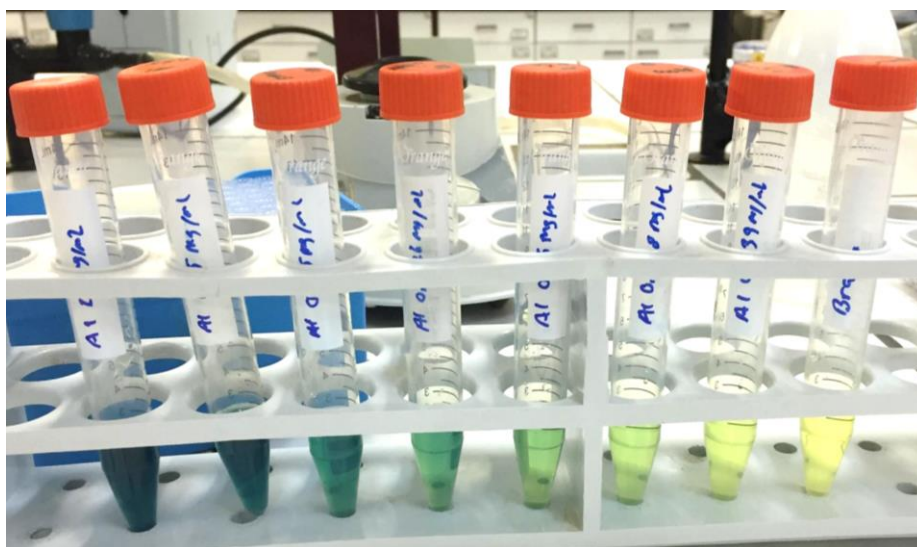


Figura 19. Determinação do poder redutor para o extrato da folha colhida na região do Douro Litoral.

4.5.3 INIBIÇÃO DA DESCOLORAÇÃO DO BETA-CAROTENO

A determinação da inibição da descoloração do β -caroteno realizou-se, tal como nos métodos anteriores, por espectrofotometria. Preparou-se uma solução de β -caroteno (2 mg/mL) em clorofórmio e transferiu-se 2 mL desta solução para um balão de fundo redondo. Procedeu-se à evaporação do solvente em corrente de azoto, adicionando-se de seguida ácido linoleico (40 mg), emulsionante Tween 80 (400 mg) e água destilada (100 mL), agitando-se manualmente muito bem. Seguidamente, transferiram-se 4,8 mL de emulsão obtida para tubos de ensaio contendo 200 μ L das diferentes concentrações de extrato preparadas. Após a adição da emulsão, logo de imediato procedeu-se à homogeneização da mistura e leu-se a absorvância a 470 nm (correspondente ao tempo zero, T₀). Os tubos foram protegidos da luz com folha de alumínio e foram colocados durante 2 horas a incubar a uma temperatura de 50 °C com agitação (100 rpm), e foi medida novamente a absorvância. Foi ainda preparada uma emulsão sem β -caroteno para obtenção do zero de absorvância no espectrofotómetro. A inibição da descoloração do β -caroteno foi calculada utilizando a equação:

$$\% \text{ inibição da descoloração do } \beta\text{-caroteno} = (\text{conteúdo de } \beta\text{-caroteno após 2 h de ensaio} / \text{conteúdo inicial de } \beta\text{-caroteno}) \times 100 \quad (2)$$

A concentração de extrato que origina 50% de atividade antioxidante (EC₅₀) foi calculada por interpolação a partir do gráfico da percentagem de inibição da descoloração do β -caroteno em função da concentração de extrato.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS

E DISCUSSÃO

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são apresentados os resultados obtidos para a composição química dos óleos essenciais do eucalipto (identificação e quantificação), para a determinação do teor de compostos fenólicos, para a atividade antimicrobiana e para a atividade antioxidante.

5.1 QUANTIFICAÇÃO E IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS DO ÓLEO ESSENCIAL DO EUCALIPTO

A análise por GC-MS foi realizada para os óleos essenciais extraídos das 4 amostras (fruto e 3 tipos de folhas, já mencionadas) e para dois óleos comerciais de eucalipto. Esta análise permitiu identificar no total 42 compostos presentes nos diferentes tipos de óleos utilizados neste estudo.

Na Tabela 1 encontra-se a composição química obtida por GC-MS para os diferentes óleos em estudo.

Tabela 1 - Composição química dos óleos essenciais (abundância relativa em %) extraídos das folhas e fruto e dos dois óleos comerciais do eucalipto (média±desvio padrão).

Nº	COMPOSTO	KI	FRUTO	FOLHA DOURO LITORAL	FOLHA ADULTA VISEU	FOLHA JOVEM VISEU	OC1	OC2
1	α -Pinene	932	6,75±0,05	12,6±0,2	10,85±0,32	13,29±0,04	0,186±0,007	0,174±0,007
2	Camphene	946						0,049±0,015
3	Sabinene	969					0,396±0,006	0,344±0,004
4	β -Pinene	974	0,199±0,004	0,24±0,04	0,24±0,02	0,61±0,02	0,215±0,005	0,172±0,002
5	β -Myrcene	988	0,25±0,06		0,12±0,02	0,36±0,02	1,31±0,03	0,53±0,01
6	α -Phellandrene	1002	15,57±0,16			0,054±0,005	0,481±0,007	
7	α -Terpinen	1014	0,83±0,03			0,024±0,007	0,922±0,006	0,007±0,000
8	P-Cymene	1020	1,48±0,02	0,30±0,05	0,15±0,18	0,30±0,02	1,490±0,038	
9	Eucaliptol	1026	24,0±0,4	61,9±1,4	62,5±0,4	67,78±0,19	93,3±0,4	97,0±0,1
10	γ -Terpinene	1054	0,755±0,009	0,085±0,004	0,14±0,02	0,370±0,002	0,054±0,006	
11	Terpinolene	1086	0,14±0,02		0,08±0,04	0,055±0,006		
12	P-cymenene	1089			0,029±0,003			
13	Fenchol	1121			0,014±0,001			
14	α -campholenal	1122			0,014±0,001			
15	Cis-p-mentha-2,8-dien-1-ol	1133						0,033±0,002
16	L-Trans-Pinocarveol	1135		0,56±0,05	0,48±0,06			0,03±0,01
17	Pinocarvone	1160		0,29±0,05	0,237±0,007			

Nº	COMPOSTO	KI	FRUTO	FOLHA NORMAL	FOLHA ADULTA	FOLHA JOVEM	OC1	OC2
18	Borneol	1165			0,10±0,04			
19	Terpinen-4-ol	1174	0,33±0,06	0,151±0,001	0,122±0,003	0,394±0,001		0,077±0,001
20	Cryptone	1183						0,041±0,002
21	α-Terpineol	1186		0,15±0,04	0,19±0,05	0,83±0,02		0,29±0,01
22	Trans-p-mentha- 1(7),8-dien-2-ol	1187		0,477±0,007	0,46±0,04			
23	Trans-carveol	1215			0,06±0,04			0,033±0,001
24	Cis-p-mentha- 1(7),8-dien-2-ol	1227			0,22±0,02			
25	Carvone	1239			0,044±0,001			
26	α-Terpineol acetate	1346	1,48±0,03	3,1±0,2	4,7±0,6	0,91±0,04		
27	Isoledene	1374	0,26±0,01	0,120±0,008	0,123±0,008	0,086±0,005		
28	α-Copaene	1374	0,10±0,02		0,10±0,04	0,127±0,008		
29	α-Gurjunene	1409	2,79±0,05			0,12±0,02		
30	β-Gurjunene	1431	0,319±0,005	0,45±0,04	0,44±0,05	0,103±0,000		
31	Aromandendren e	1439	22,31±0,07	8,4±0,1	7,1±0,5	2,93±0,05		
32	Alloaromadendr ene	1458	2,80±0,01	1,620±0,005	1,6±0,2	0,714±0,002		
33	Valencene	1496	0,94±0,04		0,15±0,01	0,233±0,004		
34	(+)-Ledene = viridifloreno	1496	5,185±0,007		0,14±0,07	0,05±0,02		
35	α-Selinene	1498	0,28±0,01		0,14±0,02	0,088±0,008		
36	γ-Cadinene	1513	0,155±0,005			0,08±0,02		
37	δ-Cadinene	1522	0,32±0,02			0,06±0,03		
38	Epiglobulol		1,65±0,05	0,55±0,02	0,57±0,07			
39	Globulol	1590	0,278±0,007	0,206±0,006	0,254±0,002			
40	Guaiol	1600			0,138±0,003			
42	β-Eudesmol	1649	0,17±0,06		0,14±0,03	0,083±0,003		
Total			89,38	91,11	91,68	89,64	98,37	98,86
identificados (%)								

KI: Índice de Kovats; OC1: óleo comercial 1; OC2: óleo comercial 2

As quantidades dos componentes dos óleos essenciais foram determinadas pelo método de normalização da área dos picos (integração dos picos) dos cromatogramas obtidos. A presença de alguns picos sobrepostos nos cromatogramas obtidos evidencia uma complexidade da mistura. Como exemplo, o cromatograma total do óleo essencial do fruto é apresentado na Figura 20.

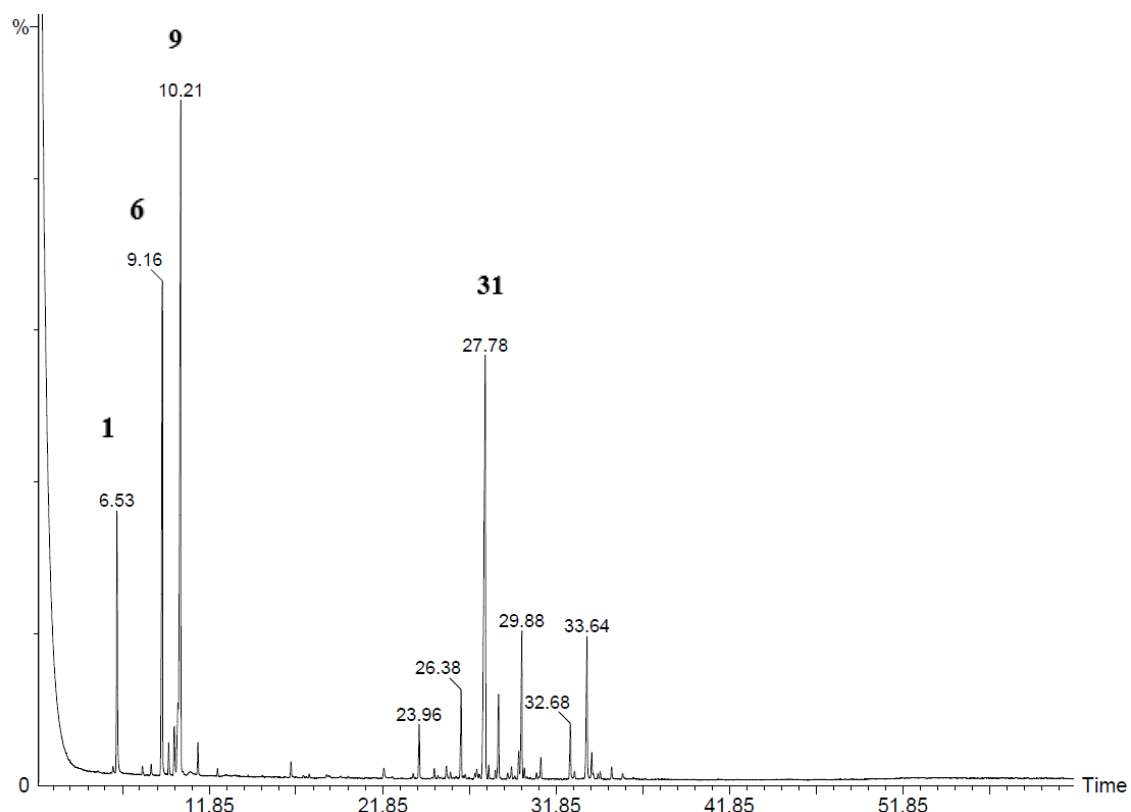


Figura 20. Cromatograma total do óleo essencial do fruto do eucalipto, estando numerados os picos maioritários conforme o número de composto referido na tabela.1 (α -Pineno (1); α -Felandreno (6); Eucaliptol (9); Aromandendreno (31)).

Com esta análise e depois de identificados os compostos, pode-se observar que foram identificados 25 compostos para o óleo extraído do fruto do eucalipto. Os compostos identificados com maior percentagem são o Eucaliptol (1,8-cineol) correspondendo a 24.1%, seguido do Aromandendreno (22,3%), α -Felandreno (15,6%) e α -Pineno (6,8) %, o que indica que este óleo é constituído maioritariamente por hidrocarbonetos sesquiterpenos e monoterpenos.

Para o óleo essencial extraído da folha colhida no Douro Litoral foram identificados 17 compostos. À semelhança do óleo do fruto, verificou-se que o composto maioritário deste óleo é o Eucaliptol (1,8- cineol), apresentando neste caso um valor muito elevado (61,9%), seguindo-se o α -Pineno (12,6 %) e o Aromandendreno (8,4%), sendo este óleo constituído maioritariamente por monoterpenos oxigenados e monoterpenos. Na Figura 21 apresenta-se o cromatograma total obtido para a análise do óleo essencial da folha adulta colhida no Douro Litoral.

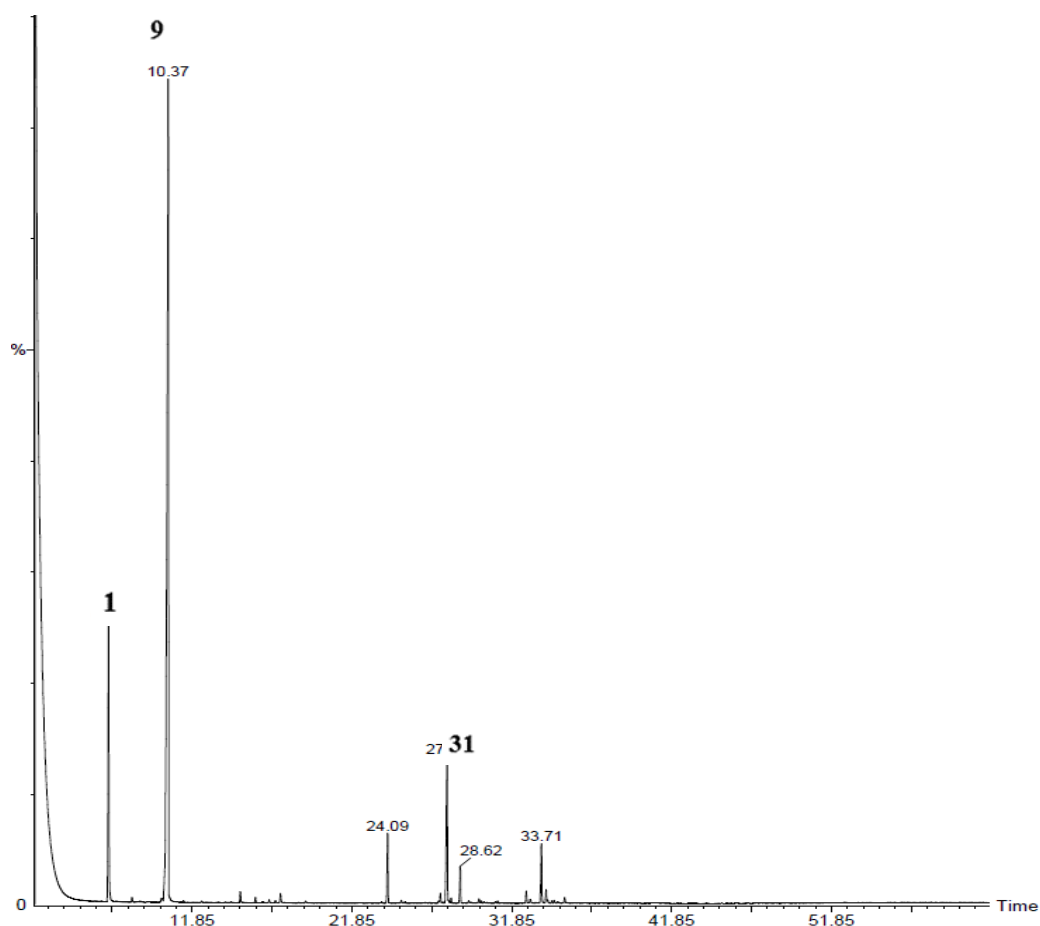


Figura 21. Cromatograma total do óleo essencial da amostra 1 colhida no Douro litoral do eucalipto, estando numerados os picos maioritários conforme o número de composto referido na tabela 1. (α -Pineno (1); Eucaliptol (9); Aromandendreno (31)).

Para o óleo essencial da folha adulta (Amostra 3) colhida em Viseu foram identificados 33 compostos. No que respeita aos compostos maioritários, este óleo apresentou uma composição muito similar à da folha adulta colhida no Douro Litoral, quer do ponto de vista qualitativo quer quantitativo. Os compostos com maior percentagem foram o Eucaliptol (1,8- cineol) (62,5%), α -Pineno (10,9%) e o Aromandendreno (7,1%). O cromatograma total da análise para este óleo está representado na Figura 22, sendo esta amostra composta principalmente por monoterpenos oxigenados, monoterpenos e sesquiterpenos. Os resultados sugerem que a localização geográfica não exercerá uma forte influência no que respeita à composição do óleo essencial da folha de eucalipto adulta.

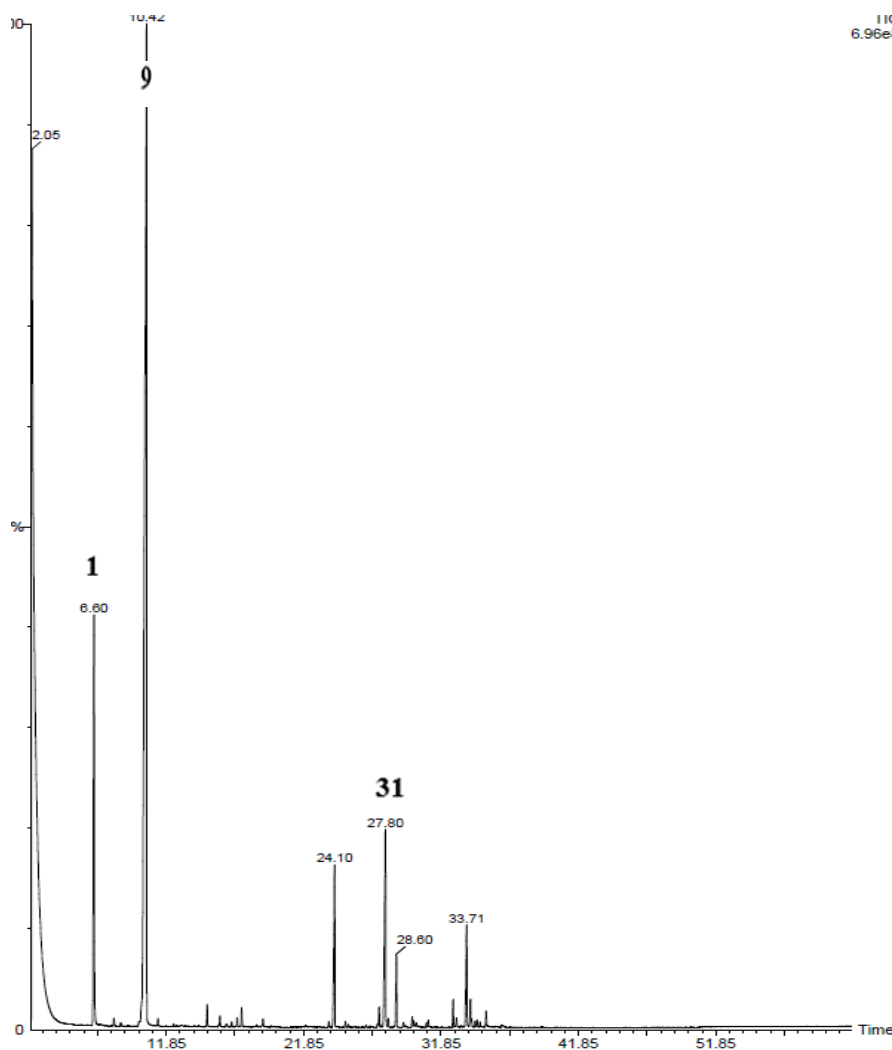


Figura 22. Cromatograma total do óleo essencial da amostra 3 colhida na região de Viseu, estando numerados os picos maioritários conforme o número de composto referido na tabela 1. (α -Pineno (1); Eucaliptol (9); Aromandendreno (31)).

Por forma a avaliar o fator “desenvolvimento/maturação da folha”, foi avaliada a composição do óleo essencial extraído de uma amostra de folhas jovens (Amostra 2), colhida na mesma região geográfica de uma das folhas adultas (Viseu). Na Figura 23 encontra-se o cromatograma total da análise do óleo essencial da “folha pequena”.

Para este óleo foram identificados 24 compostos, onde os compostos presentes em maior percentagem foram também o Eucaliptol (1,8- cineol) (67,8%), α -Pineno (13,3%) e o Aromandendreno (2,9%), sendo os compostos presentes neste óleo essencial na sua maioria classificados como sesquiterpenos e monoterpenos,

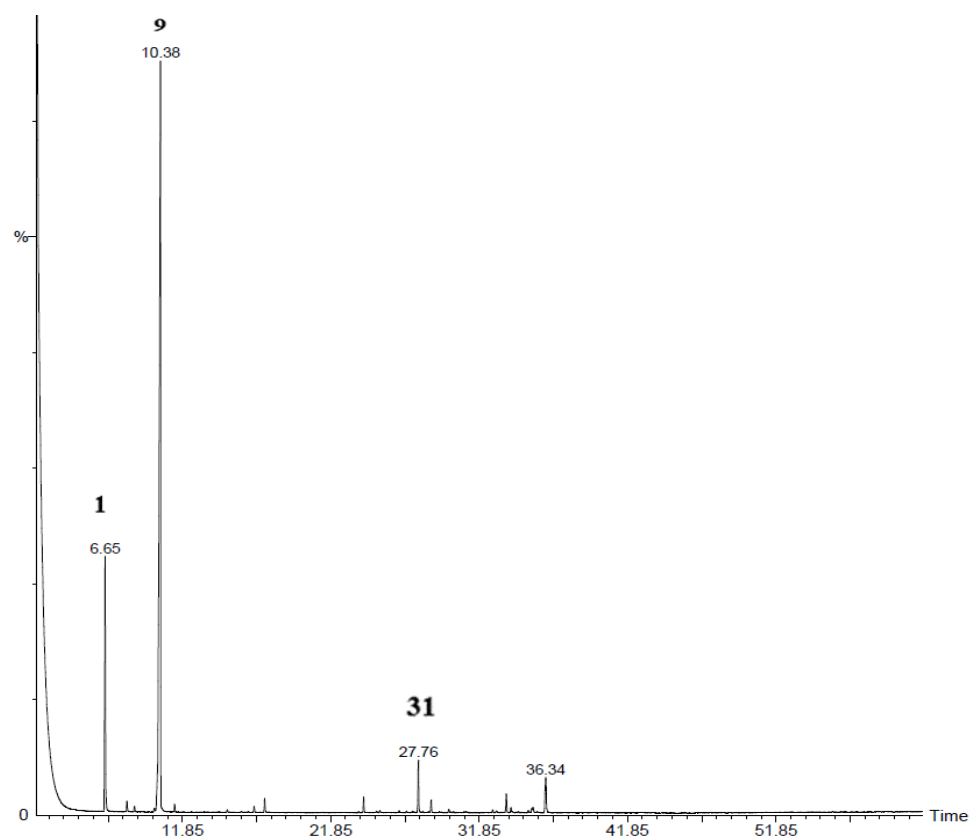


Figura 23. Cromatograma total do óleo essencial da amostra 2 do eucalipto, estando numerados os picos maioritários conforme o número de composto referido na tabela 1 (*α*-Pineno (1); Eucaliptol (9); Aromandendreno (31)).

Para o óleo comercial 1 e comercial 2 foram identificados 9 e 13 compostos, respetivamente.

Para ambos os óleos, o composto com maior percentagem foi o Eucaliptol (1,8-cineol) com uma percentagem de 93,3% para o óleo comercial 1 e uma percentagem de 97.0% para o óleo comercial 2. Assim, verificou-se que o teor deste composto foi muito superior comparativamente ao presente nos óleos essenciais extraídos laboratorialmente utilizando um sistema de Clevenger. Considerando que neste trabalho foram analisadas diferentes amostras por forma a incluir origens geográficas distintas e diferentes períodos de desenvolvimento da folha, os resultados parecem sugerir que as diferenças poderão estar relacionadas com diferentes modos de extração utilizados para a extração do óleo comercial. Os compostos presentes no óleo comercial 1 são classificados maioritariamente como monoterpenos, enquanto para o óleo comercial 2 estão presentes monoterpenos e monoterpenos oxigenados. Nas figuras 24 e 25, estão os cromatogramas totais dos óleos comerciais 1 e 2.

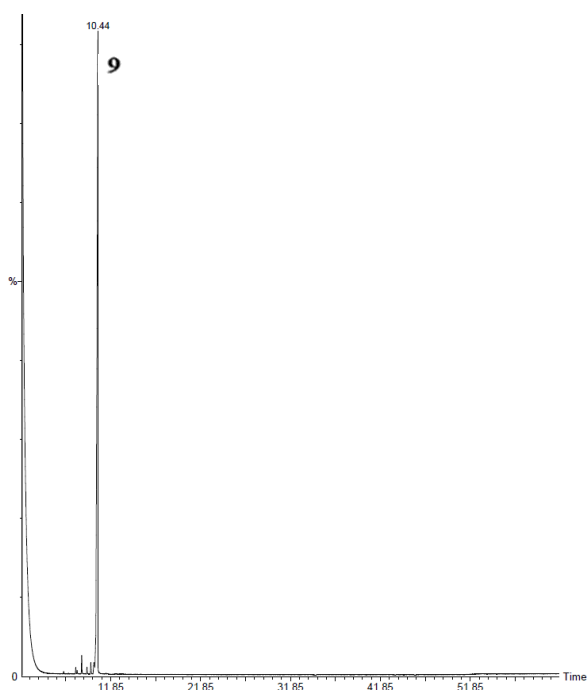


Figura 24. Cromatograma total do óleo comercial 1 do eucalipto.



Figura 25. Cromatograma total do OC2.

Em suma, com esta análise pode-se verificar que o composto presente em maior percentagem em todas as amostras em estudo é o Eucaliptol (1,8-cineol). Pode-se também verificar que os compostos com maior percentagem variam entre o fruto e as folhas, sendo que as percentagens dos compostos maioritários em relação ao fruto são mais altas, à exceção do Aromadendreno, para o qual a percentagem é mais elevada no fruto (22,3%), comparativamente aos valores obtidos para as folhas (8,4%; 7,1% e 2,9%). No fruto existe uma percentagem aproximada entre o Eucaliptol e o Aromadendreno (24,0% e 22,3%), enquanto nas folhas a percentagem de Eucaliptol varia entre os 60% e 68%. No fruto está presente o α -Felandreno com 15,6%, enquanto nas folhas o composto com segunda maior percentagem é o α -Pineno entre 10% e 13%.

No estudo realizado por Pereira et al. (2005) foi estudada a composição química do óleo do fruto do *Eucalyptus globulus*, sendo possível relacionar os resultados obtidos nesse estudo com os obtidos neste trabalho. No trabalho de Pereira et al. os compostos maioritários presentes no fruto são o Aromadendreno com 25,1%, o α -Felandreno com 17,2% e Eucaliptol com 11,7%, coincidindo com os compostos maioritários encontrados para o fruto analisado neste trabalho, encontrando-se, no entanto, em percentagens diferentes. Esta diferença pode estar relacionada com a época da colheita, questões ambientais ou variações genéticas, uma vez que o fruto usado por Pereira foi colhido na região de Aveiro no fim de maio de 2002.

Em relação aos três tipos de folhas em estudo, pode-se concluir que são compostas maioritariamente pelos mesmos 3 compostos (Eucaliptol, Aromadendreno e α -Pineno), sendo a % Eucaliptol > % α -Pinene > % Aromadendreno. No estudo feito por Silvestre et al. (1997), em que foi feita a análise da composição química de folhas de 3 árvores de eucalipto com idades diferentes, verificou-se que os compostos presentes em maior percentagem são os mesmos que neste estudo: Eucaliptol com 63,8%, α -Pineno com 14,0% e Aromadendreno com 2%.

5.2 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana é uma determinação complexa e pode variar devido a diferentes fatores tais como o meio de cultura utilizado, o tamanho e quantidade do inóculo, a metodologia utilizada e a escolha do emulsionante, por exemplo. (Tajkarimi & Ibrahim, 2010). Como já foi referido anteriormente, a avaliação da atividade antimicrobiana no presente estudo foi feita através do método da macrodiluição em caldo usando quatro bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*), cinco Gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterobacter*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*) e uma levedura (*Candida albicans*).

A Tabela 2 apresenta os resultados da concentração mínima bactericida (MBC) obtidos. Pode-se verificar que todos os microrganismos testados se mostraram sensíveis aos óleos essenciais de *Eucalyptus globulus*, à exceção de *Pseudomonas aeruginosa* que apenas mostrou alguma sensibilidade para a amostra de OC2. Verificou-se também que as amostras dos óleos comerciais apresentaram melhores resultados perante a *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis*, *Bacillus cereus* e *Bacillus subtilis*, já os óleos essenciais extraídos dos três tipos de folhas por Clevenger apresentaram melhores resultados face a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis*, *Enterococcus faecalis*, e o óleo essencial extraído do fruto foi a amostra que com menores concentrações foi capaz de inibir o crescimento de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis*. Todas as amostras em estudo tiveram uma boa capacidade inibitória perante a levedura *Candida albicans*.

Os resultados obtidos por Pombal et al. (2014) podem ser comparados com os resultados obtidos neste estudo. Apesar de terem usado um método diferente para a avaliação da atividade antimicrobiana, o método de difusão em ágar, os resultados são muito

semelhantes, uma vez que nesse estudo concluíram que as amostras de folhas colhidas na serra da Gardunha (Portugal) tiveram uma maior inibição no crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*, em relação à *Escherichia coli* a inibição foi moderada, enquanto face à *Pseudomonas aeruginosa* a inibição foi fraca.

Pode-se assim concluir que neste trabalho, as bactérias gram-positivas apresentam de uma forma geral valores de MBC inferiores aos obtidos para as bactérias gram-negativas. Tal poder-se-á dever à estrutura da parede celular das bactérias gram-negativas, as quais apresentam uma membrana externa que pode atuar como uma barreira hidrofílica, impedindo assim a difusão de compostos hidrofóbicos através da camada de lipopolissacarídeos, resultando numa menor suscetibilidade das bactérias gram-negativas (Siqueira et al., 2007).

Tabela 2. Concentração mínima bactericida dos vários óleos essenciais do eucalipto usados no presente estudo face aos microorganismos)

	<i>Escherichia coli</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Klebsiella pneumoniae</i>	<i>Enterobacter aerogenes</i>	<i>Proteus mirabilis</i>	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<i>Bacillus cereus</i>	<i>Bacillus subtilis</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Candida albicans</i>
OC1	0,625%	1,25%	0,625%	1,25%	1,25%	NI	0,625%	0,625%	1,25%	0,3125%
OC2	0,625%	1,25%	0,625%	1,25%	0,625%	5%	0,625%	0,625%	1,25%	0,16%
FOLHA 1	2,5%	0,625%	5%	NI	2,5%	NI	0,3125%	0,3125%	0,625%	0,16%
FOLHA 2	2,5%	0,3125%	1,25%	5%	2,5%	NI	0,3125%	0,625%	0,625%	0,3125%
FOLHA 3	2,5%	0,625%	1,25%	NI	1,25%	NI	0,3125%	0,625%	0,625%	0,160%
FRUTO	NI	0,3125%	5%	NI	5%	NI	0,160%	0,625%	0,3125%	0,3125%

NI-Não inibiu

5.3 COMPOSTOS BIOATIVOS

Neste trabalho, a determinação de fenóis totais foi realizada por espectrofotometria pelo método de Folin-Ciocalteu, onde foi construída uma curva de calibração usando uma solução padrão de ácido gálico, com concentrações definidas de 0,25 a 0,005 mg/mL. Na Figura 26 apresenta-se uma curva de calibração obtida para a determinação de fenóis totais.

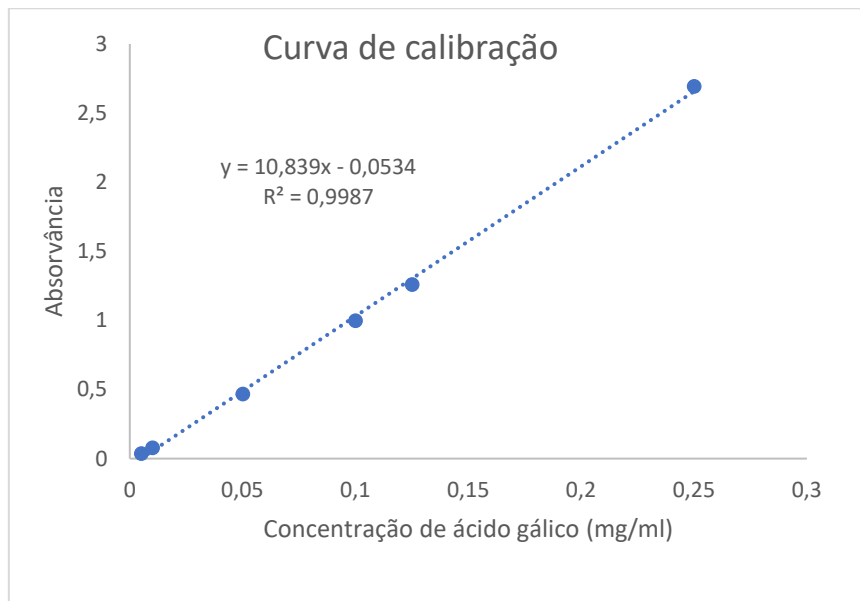


Figura 26. Curva de calibração para a determinação de fenóis totais.

Na Tabela 3 apresenta-se os resultados obtidos para a determinação total de compostos fenólicos. Para esta determinação, foram analisados os extratos das amostras dos três tipos de folhas e do fruto, assim como os óleos essenciais (OE) extraídos das folhas e fruto, bem como os dois tipos de óleos essenciais comerciais.

Tabela 3. Resultados da determinação dos compostos fenólicos totais nas amostras de *Eucalyptus globulus*

AMOSTRAS EXTRATOS	Fenóis totais (mg EAG/g extrato)
AMOSTRA 1	136,50±14,54
AMOSTRA 2	103,53±4,31
AMOSTRA 3	117,77±7,43
FRUTO	84,23±4,12
AMOSTRAS ÓLEOS ESSENCIAIS	Fenóis totais (mg EAG/g óleo)
OE C1	1,01±0,04
OE C2	0,97±0,14
OE AMOSTRA 1	2,33±0,23
OE AMOSTRA 2	1,80±0,12
OE AMOSTRA 3	1,06±0,06
OE FRUTO	2,35±0,18

EAG: equivalentes de ácido gálico; Média ± DP de três determinações

Com os resultados obtidos no presente trabalho, pode-se verificar que entre os três tipos de folhas em estudo, o extrato da folha colhida na região do Douro Litoral contém um teor maior de compostos fenólicos relativamente aos outros dois tipos de folhas e que o extrato do fruto também é rico em fenóis. Em relação aos óleos essenciais, o óleo do fruto é o óleo mais rico em fenóis, seguido do óleo essencial da folha colhida na região do Douro Litoral, sendo que os óleos mais pobres em fenóis são os dois óleos comerciais.

No estudo feito por Boulekbache-Makhlouf et al. (2013), pode-se verificar que foram obtidos valores elevados para o estudo de fenóis totais para os extratos acetónicos do fruto de eucalipto, o mesmo acontece no estudo de Ştefan Dezsi et al. (2015) em relação aos extratos das folhas de eucalipto. Isto significa que as folhas e frutos do *Eucalyptus globulus* são ricos em fenóis (235,87 ± 4,38 mg/g), o que leva a uma atividade antioxidante consideravelmente interessante.

Em relação à avaliação dos fenóis totais para os óleos essenciais, os valores obtidos foram baixos, o que vai de encontro com os resultados obtidos pelo o estudo feito por Charfeddine et al. (2016).

Os fenóis podem ser utilizados como um importante indicador de capacidade antioxidante que pode ser usada como um “indicador” para qualquer produto quando pretendido como uma fonte natural de antioxidantes em alimentos funcionais (Viuda-Martos et al., 2011). Ao fazer-se a avaliação dos fenóis neste estudo, já se pode ter a ideia de que os extratos do eucalipto vão ter uma melhor atividade antioxidante em relação aos óleos essenciais.

5.4 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

A eficácia da atividade antioxidante dos componentes bioativos depende da sua estrutura química e da concentração destes fitoquímicos no alimento. Por sua vez, o teor destes fitoquímicos é amplamente influenciado por fatores genéticos, condições ambientais, grau de maturação da planta, entre outros (Melo et al., 2008).

Os resultados da média e desvio-padrão baseados na capacidade de captação do radical livre 2,2- difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), no poder redutor e na inibição da descoloração do β -caroteno dos extratos etanólicos usados no presente estudo, estão apresentados na Tabela 4. Foi utilizado o Trolox como controlo positivo nos ensaios de avaliação da atividade antioxidante.

Tabela 4 Resultados da atividade antioxidante (valores de EC₅₀, mg/mL) determinada por diferentes métodos.

AMOSTRA	DPPH ^a	PODER REDUTOR ^b	Inibição da descoloração do β -caroteno ^c
TROLOX	0,051±0,002	0,076±0,000	0,643±0,009
AMOSTRA 1	0,130±0,002	0,146±0,003	0,845±0,012
AMOSTRA 2	0,158±0,006	0,185±0,012	2,449±0,172
AMOSTRA 3	0,166±0,012	0,205±0,007	2,045±0,100
FRUTO	0,201±0,002	0,226±0,007	1,151±0,205

Valores expressos como média \pm desvio padrão de três réplicas; ^a EC₅₀ - Concentração para uma captação do radical DPPH de 50%; ^b EC₅₀ - Concentração efetiva na qual a absorvância é 0,5; ^c EC₅₀ - Concentração correspondente a 50% de descoloração em comparação com o sistema de referência (branco).

As amostras dos extratos em estudo mostraram atividade de captação de radicais livres no ensaio do DPPH. De uma forma geral, as amostras dos extratos das folhas do eucalipto em estudo tiveram um valor de EC50 inferior em relação aos valores obtidos para o extrato do fruto, o que vai de acordo com o teor mais elevado de fenóis obtidos no presente estudo. Esses valores confirmam os dados apresentados por diversos estudos, que demonstram que a capacidade antioxidante é dependente do teor de compostos fenólicos presentes (Niki, 2010). Esta análise está representada na Figura 27, assim como se pode observar que conforme as concentrações aumentam, a atividade de captação do radical DPPH aumenta também, o que seria esperado. Neste método, a velocidade da mudança de coloração do rosa para o amarelo diz-nos que quanto maior a concentração testada mais rápida é a reação de coloração e maior é a capacidade antioxidante (Malinowski, 2010).

Segundo o estudo de Amakura et al. (2009) foi feita a análise dos extratos etanólicos de folhas secas, os valores de EC50 foram inferiores em relação aos valores obtidos neste estudo (0,0441 mg/mL).

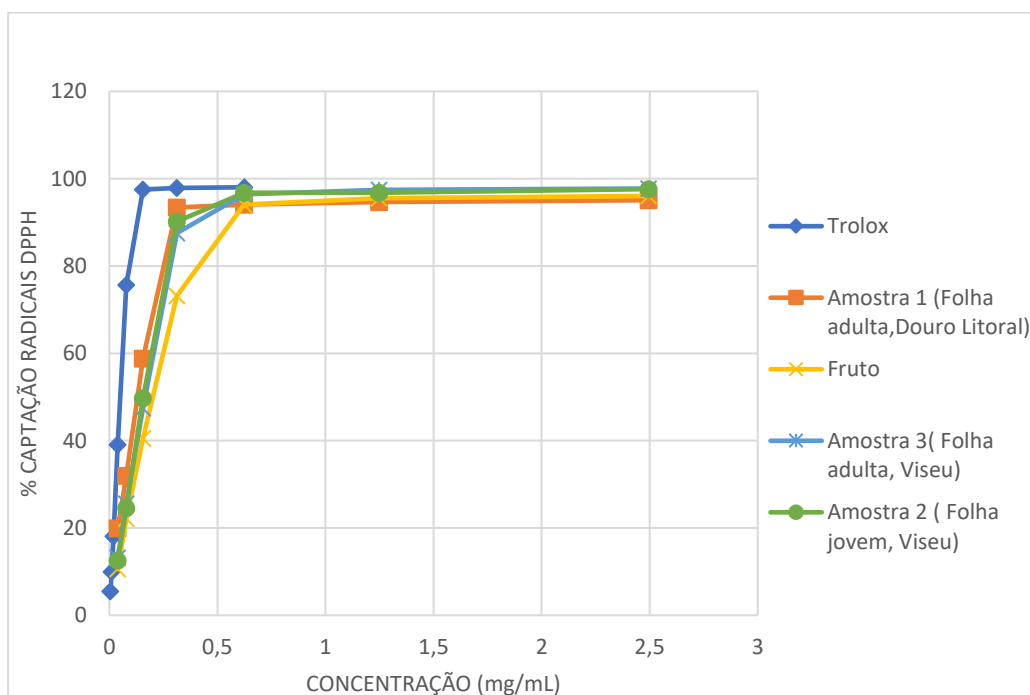


Figura 27. Percentagem de inibição do radical DPPH• de diferentes concentrações de extratos das amostras de folhas e fruto.

No gráfico da Figura 27 pode-se observar que as amostras das folhas têm uma atividade antioxidante superior à amostra do fruto como era expectável devido aos valores obtidos na avaliação do teor dos fenóis (Pessuto et al., 2009), como já foi referido anteriormente. De todas as amostras, a amostra 1 foi a que apresentou um melhor resultado, as amostras 2 e 3 tiveram uma atividade muito similar entre elas. Apesar da colheita destas amostras ter sido feita em zonas geográficas e tempos diferentes, pode-se concluir que esses fatores não fazem com que os valores entre estas três amostras tenham muita discrepância entre elas. Já o extrato do fruto foi o que teve menor atividade.

Os resultados obtidos para o ensaio do poder redutor, para as amostras de folhas e fruto, podem ser visualizados no gráfico da Figura 28.

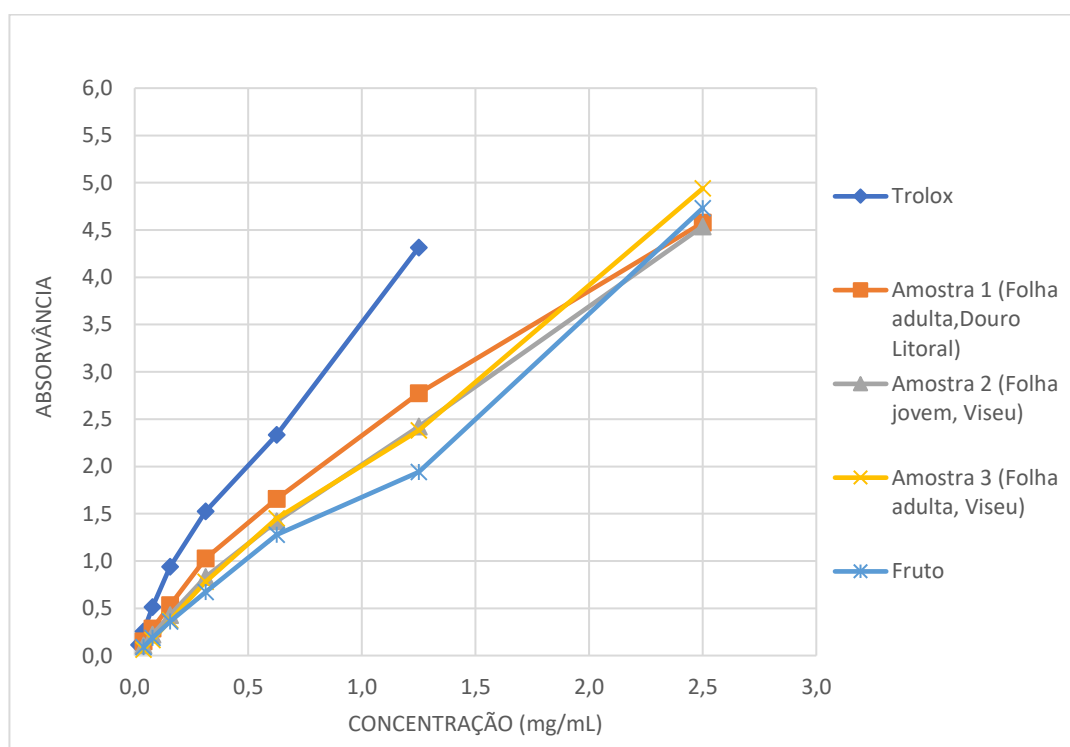


Figura 28. Poder redutor de diferentes concentrações de extratos das amostras de folhas e fruto do eucalipto.

Entre as folhas, pode-se verificar que a que tem melhor atividade é a amostra 1, seguida das amostras 2 e 3, novamente com resultados similares, assim como a amostra que teve uma atividade menor foi o fruto. Observar também que para as amostras atingirem uma concentração efetiva na qual a absorvância é 0,5, não foram necessárias concentrações altas. Segundo o estudo de Said et al., (2016), o valor obtido para o extrato de fruto foi de $32,8 \pm 1,8$ mg/mL tendo sido comparado com o BHA que teve um valor

de $0,03 \pm 0,0$, um valor muito superior ao que foi obtido neste estudo ($0,23 \pm 0,01$). Já no estudo feito por Boulekbache-Makhlouf et al., (2013), o valor obtido pelo método do poder redutor para o extrato do fruto foi de $0,04$ mg/mL. Sendo que este extrato e o BHA mostraram uma significativa atividade em relação ao α -tocopherol que foi usado também como comparação ($0,12$ mg/mL).

O último método utilizado para a avaliação da atividade antioxidante, foi a inibição da descoloração do β -caroteno. Este método permite avaliar a capacidade que uma determinada substância tem de prevenir a oxidação do β -caroteno, protegendo-o dos radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico a 50°C .

Observando a Tabela 5, pode-se verificar que para este método, a amostra 1 foi a que teve o valor de EC50 menor, ou seja, quanto menor é este valor, maior é a atividade antioxidante. Na Figura 29 observa-se também que a amostra da folha 1 e do fruto foram as concentrações mais baixas que atingiram a 50% de descoloração, já as amostras 2 e 3 precisaram de uma concentração mais elevada para atingir a finalidade deste método.

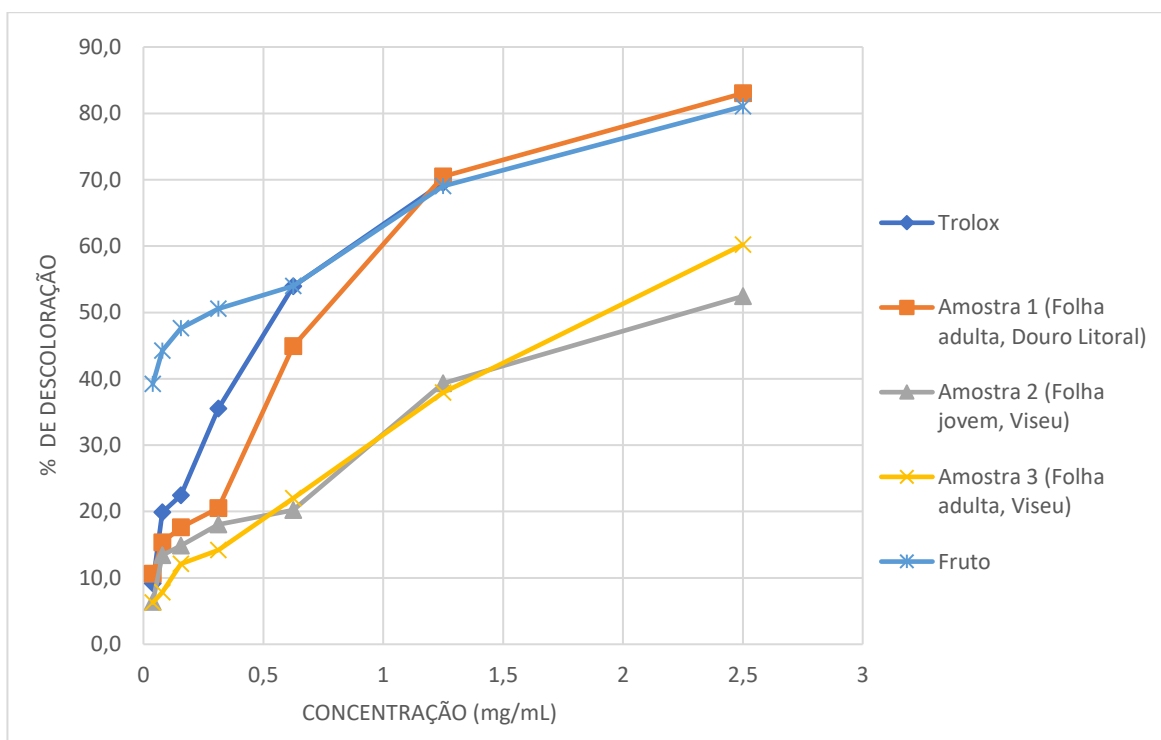


Figura 29. Análise da Inibição da descoloração do β -caroteno de diferentes concentrações de extratos das amostras de folhas e fruto do eucalipto.

A avaliação da atividade antioxidante no presente estudo só foi feita com os extratos das folhas e frutos do *Eucalyptus globulus*. Foi feita uma análise para o método

do DPPH para uma amostra de óleo essencial, mas verificou-se que mesmo para concentrações elevadas a atividade antioxidante foi diminuta. Este facto pode dever-se à composição química do óleo essencial, uma vez que este apresentou um teor de fenóis totais muito baixo e a capacidade de reduzir radicais livres depende dos compostos antioxidantes presentes e da sua concentração.

Por último, refira-se que vários autores relatam os efeitos positivos na área medicinal, farmacêutica e cosmética entre outras, dos extratos do eucalipto, nomeadamente as propriedades antioxidante, sendo que são também grandes vantagens na indústria alimentar para evitar a oxidação lipídica e retardar o desenvolvimento de sabores não desejados em alimentos. O interesse pela investigação de antioxidantes de origem natural tem aumentado consideravelmente na última década, originando assim, a substituição dos antioxidantes sintéticos visto que estes têm propriedades tóxicas e cancerígenas (Cristina & Jorge 2006).

CAPÍTULO 6

CONCLUSÃO E

PERSPETIVAS

FUTURAS

6. CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

Com a realização deste trabalho pretendeu-se estudar a composição química dos óleos essenciais extraídos por Clevenger e de dois óleos comerciais, assim como a determinação do teor dos fenóis e flavonoides e a avaliação das atividades antimicrobiana e antioxidante.

Segundo os resultados deste trabalho pode-se concluir que os teores de compostos fenólicos podem ter uma grande influência nos valores obtidos para a atividade antioxidante dos extratos de eucalipto em estudo.

Em relação à composição química dos óleos essenciais em estudo, foram identificados no total 42 compostos, em que os compostos maioritários para todas as amostras analisadas foram o Eucaliptol (1,8 cineol), Aromandendreno, α -Felandreno, α -Pireno e α -Terpineol acetato.

Os óleos essenciais comerciais (n=2) e extraídos das folhas (n=3) apresentaram atividade inibitória no crescimento de todos os microrganismos estudados à exceção de *P. aeruginosa*, que apenas mostrou alguma sensibilidade para a amostra de OC2. De uma forma geral, o óleo essencial do fruto foi a amostra que inibiu o menor número de bactérias, contudo foi a amostra que apresentou o valor mais baixo da MBC para as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Enterococcus faecalis*. Todas as amostras apresentaram uma boa capacidade inibitória perante a levedura *Candida albicans*.

Entre as metodologias estudadas para avaliar a atividade antioxidante, o método da redução do radical DPPH forneceu os melhores resultados sendo que este foi o método que obteve os valores de EC50 mais baixos. O extrato etanólico das folhas apresentou alta capacidade antioxidante no teste da redução do DPPH. O óleo essencial foi ineficaz em reduzir este radical.

Sendo assim conclui-se que o eucalipto pode ser usado como uma potencial fonte de óleo essencial e de antioxidantes naturais de fácil acesso com possível uso na indústria farmacêutica e cosmética, entre outras. Nomeadamente na área da indústria alimentar, estes antioxidantes naturais podem ser uma mais valia para evitar a oxidação lipídica e

retardar o desenvolvimento de sabores não desejados em alimentos. O interesse pela investigação de antioxidantes de origem natural tem aumentado consideravelmente na última década, com vista à substituição dos antioxidantes sintéticos.

Para trabalhos futuros propõe-se uma avaliação sazonal destes óleos para verificar possíveis modificações na constituição e rendimento ao longo das estações do ano, assim como a identificação dos compostos fenólicos presentes nos óleos e extratos.

CAPÍTULO 7

REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Almeida, R., 2016. *Eucalyptus globulus* (Eucalipto-comum). Available at: <http://knoow.net/ciencterravida/botanica/eucalyptus-globulus-eucalipto-comum/>.
- Almeida, S., 2016. *Myrtaceae*, família. *Eucalyptus globulus* (Eucalipto-comum). Available at: <http://knoow.net/ciencterravida/biologia/myrtaceae-familia/>.
- Amakura, Y. et al., 2009. Marker constituents of the natural antioxidant *Eucalyptus* leaf extract for the evaluation of food additives. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 73(5), pp.1060–1065.
- Boulekbache-Makhlouf, L., Slimani, S. & Madani, K., 2013. Total phenolic content, antioxidant and antibacterial activities of fruits of *Eucalyptus globulus* cultivated in Algeria. *Industrial Crops and Products*, 41(1), pp.85–89.
- Brum, L.F.W., 2010. Obtenção e avaliação de extratos de folhas de eucalipto (*Eucalyptus dives*) como potenciais antioxidantes em alimentos. Dissertação de mestrado em Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Charfeddine, B. et al., 2016. Physical, antioxidant and antimicrobial properties of chitosan films containing *Eucalyptus globulus* essential oil. *LWT - Food Science and Technology*, 68, pp.356–364.
- Cristina, V. & Jorge, N., 2006. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29(4), pp.755–760.
- Dias, P.C.M.S., 2013. Utilização de produtos naturais em aromaterapia. Dissertação de mestrado em Farmácia e Química de Produtos Naturais, Instituto Politécnico de Bragança.
- Diksha, Navdeep Kaur Gill, Rajesh Kumar, K.L.D., 2012. Study on contents and chemical constituents of the essential oil of the leaves of *Eucalyptus globulus labill.* *International journal of universal pharmacy and life sciences*, 2(4), pp.264–269.
- Elizabeth A Ainsworth & Kelly M Gillespie, 2007. Estimation of total phenolic content and other oxidation substrates in plant tissues using Folin–Ciocalteu reagent. *Nature Protocol*, 2(4), pp.875–877.

- Fereidoon Shahidi, Y.Z., 2015. Measurement of antioxidant activity. Elsevier Science, 18, pp.757–781.
- Figueiredo, A. Cristina, Luis G. Pedro, José G. Barroso, H., Trindade, João Sanches, C. & Oliveira, M.C., 2011. Óleos essenciais da espécie *Eucalyptus.*, p.5.
- Firmo, W.D.C.A. et al., 2011. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. *Cad. Pesq.*, 18(n. especial), pp.90–95.
- Goes, A., 2014. Produção de plantas de Eucalipto em Portugal. p.27. Available at: <http://www.icnf.pt/portal/florestas/gf/ps/resource/doc/reunioes-e-eventos/celipa>.
- Guimarães, A.G., Quintans, J.S.S. & Quintans-Júnior, L.J., 2013. Monoterpenes with Analgesic Activity — A Systematic Review. *Phytotherapy research*, 27, pp.1
- Guohua Cao, Emin Sofic, R.L.P., 1997. Antioxidant and pro-oxidant behavior of flavonoids: structure-activity relationships. Elsevier Science, 22(5), pp.749–760.
- Isabel CFR Ferreira, R.M.A., 2007. Stress Oxidativo, Antioxidantes e Fitoquímicos, Bragança.
- Juan Carlos Sanchez-Rangel, Jorge Benavides, J. Basilio Heredia, L.C.-Z. & Daniel A. Jacobo-Velázquez, 2013. The Folin-Ciocalteu assay revisited: Improvement of its specificity for total phenolic content determination. *The Royal Society of Chemistry*, (5), pp.5990–5999.
- K.A.Hammer, C.F. Carson, T.V.R., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. *Journal of Applied Microbiology*, (86), pp.985–990.
- Kelly E. Heim, Anthony R. Tagliaferro, D.J.B., 2002. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships, p.13.
- Lila Harkat-Madouri, Boudria Asmaa, Khodir Madani, Zakia Bey-Ould Si Said, Peggy Rigou, Daniel Grenier, Hanane Allalou, Hocine Remini, Abdennour Adjaoud, L.B.-M., 2015. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of essential oil of *Eucalyptus globulus* from Algeria. Elsevier, p.7.

- Lima, K.S.P., 2011. Avaliação da Atividade Antioxidante e Antimutagénica em Diferentes Infusões Medicinais: Barbas de milho, Carqueja, Dente de Leão, Folhas de Oliveira e Urtiga-Branca. Dissertação de mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar Faculdade de Ciências e Tecnologia e Universidade Nova de Lisboa.
- Luís, Â. et al., 2016. Chemical composition, antioxidant, antibacterial and anti-quorum sensing activities of *Eucalyptus globulus* and *Eucalyptus radiata* essential oils. *Industrial Crops and Products*, 79, pp.274–282.
- M.M.Tajkarimi, S.A.Ibrahim, D.O.C., 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control*, pp.1199–1218.
- Malinowski, L.R.L., 2010. Morfoanatomia, fitoquímica e atividades biológicas de folhas jovens de *eucalyptus globulus labill.* subespécie *bicostata* (*maiden et al.*) *j. b. kirkpat., myrtaceae.* Universidade Federal do Panamá.
- Mariana Oliveira de Sousa Pereira, 2010. Estudo Comparativo de Métodos de Avaliação da Capacidade Antioxidante de Compostos Bioativos. Dissertação de mestrado em Engenharia Alimentar, Universidade Técnica de Lisboa.
- Marília Lordêlo Cardoso Silva, Renata Silva Costa, Andréa dos Santos Santana, M.G.B.K., 2010. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais.
- Marlange Almeida Oliveira, Alysson André Oliveira Barreto, Lucindo José Quintans Júnior, A.G.G., 2014. Terpenes Application As Agents Analgesics: a Exploration Technology. *Revista Gestão, Inovação e Tecnologias*, 4(4), pp.1292–1298.
- Marzoug, H.N. Ben et al., 2011. *Eucalyptus oleosa* essential oils: Chemical composition and antimicrobial and antioxidant activities of the oils from different plant parts (stems, leaves, flowers and fruits). *Molecules*, 16(2), pp.1695–1709.
- Matović, M., Bojović, B., & Jušković, M., 2011. Composition and Antimicrobial Activity of *Juniperus Communis L.* Physiological Metabolites from Serbia. *International Journal of Life Science and Medical Research*, p.5–8.
- Melo, E.D.A. et al., 2008. Capacidade antioxidante de frutas. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44, p.9.

- Messias, K.L.D.S., 2009. Dossiê Antioxidantes. *Food Ingredients Brasil*, 6, pp.16–31.
- Mounyr Balouiri, Moulay Sadiki, S.K.I., 2015. Methods for in vitro evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6(2), pp.71–79.
- Mulyaningsih, S. et al., 2011. Antibacterial activity of essential oils from *Eucalyptus* and of selected components against multidrug-resistant bacterial pathogens. *Pharmaceutical biology*, 49(9), pp.893–899.
- Mulyaningsih, S., 2010. Plant-derived antimicrobial agents and their synergistic interaction against drug-sensitive and -resistant pathogens. *Faculties for the Natural Sciences and Mathematics the Ruperto-Carola University of Heidelberg, Germany*.
- Nicolau, D.M.P., 2013. Atividade antioxidante de extratos de plantas. *Universidade da beira Interior*.
- Niki, E., 2010. Free Radical Biology & Medicine Assessment of Antioxidant Capacity in vitro and in vivo. *Free Radical Biology and medicine*, 49(4), pp.503–515.
- Pereira, A.M. da S., 2008. Produção de Sabões Líquidos com Aroma e Esfoliante a partir de Óleos Usados da cantina da FEUP. *Dissertação de mestrado em Engenharia Química, Faculdade de Engenharia, Universidade do Porto*.
- Pereira, J.L., 2010. Composição química dos óleos essenciais de espécies de *Eucalyptus L'Hert (Myrtaceae)*. *Dissertação de mestrado em Agroquímica. Universidade Federal de Viçosa*.
- Pereira, S.I. et al., 2005. Chemical composition of the essential oil distilled from the fruits of *Eucalyptus globulus* grown in Portugal., (20), pp.407–409.
- Pessuto, M.B. et al., 2009. Atividade antioxidante de extratos e taninos condensados das folhas de *Maytenus ilicifolia Mart. ex Reiss.*, (January), pp.4–9.
- Pinto, D.M.L., 2010. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial e do extrato de *Mintostachys setosa (Briq.) Epling*. *Dissertação de mestrado, Universidade de São Paulo*.
- Pombal, S. et al., 2014. Evaluation of the antibacterial activity of the essential oil and antioxidant activity of aqueous extracts of the *Eucalyptus globulus Labill* leaves. 3(11), pp.356–366.

- Rodrigo Strohmayr Dourado, 2006. Isolamento de compostos secundários em extratos de caules e folhas de *Hypericum cordatum* (Vell. Conc.) N. Robson (Clusiaceae). Dissertação de mestrado em biodiversidade vegetal e meio ambiente, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente do Estado de São Paulo.
- Rodrigues, A.I.C., 2011. Produção e caracterização da capacidade antioxidante de gelo suplementado com extrato de *Fucus spiralis*. Dissertação de mestrado em Biotecnologia dos Recursos Marinhos, Escola Superior de Turismo e Tecnologia do Mar e o Instituto Politécnico de Leiria.
- Rodrigues, S.C.P., 2013. Desenvolvimento de hidrogéis à base de extratos de *Crataegus monogyna* Jacq.: caracterização química e bioatividade dos extratos e formulações finais Sandra. Instituto Politécnico de Bragança.
- Santos, M.P. Dos, 2014. Extração e caracterização de extratos de *Jatropha gossypifolia* L. Avaliação da sua atividade antimicrobiana e antioxidante. Dissertação de mestrado em Engenharia Química e Biológica, Instituto Superior de Engenharia de Lisboa.
- Seyfried, M., Soldera-Silva, A., Bovo, F., Stevan-Hancke, F.R., Maurer, J.B.B., Zawadzki, S.F., 2015. Pectinas de plantas medicinais: características estruturais e atividades imunomoduladoras, Curitiba, Brasil.
- Sheila Mello da Silveira, 2012. Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante de extratos vegetais e óleos essenciais e aplicação do óleo essencial de louro (*L. nobilis*) como agente conservador natural em embutido cárneo fresco. Dissertação de doutoramento em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina.
- Silvestre, A.J.D. et al., 1997. Analysis of the variation of the essential oil composition of *Eucalyptus globulus* Labill. from Portugal using multivariate statistical analysis. *Industrial Crops and Products*, 6(1), pp.27–33.
- Siqueira, A.A. et al., 2007. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Eucalyptus globulus*: Uma alternativa aos antibióticos convencionais. *Revista do centro universitário vila velha*, 8(2), pp.199–214.
- Sobral, A., 2012. Efeito do solvente nas propriedades antioxidantes e no conteúdo em compostos fenólicos de extratos de frutos e folhas de *Rubus*. Dissertação de Mestrado

em Engenharia Biológica, Universidade do Algarve.

Soutinho, S.M.A., 2012. Avaliação dos compostos fenólicos e da actividade antioxidante de frutos vermelhos produzidos em modo biológico. Dissertação de mestrado em Qualidade e Tecnologia Alimentar, Instituto Politécnico de Viseu, Escola Superior Agrária de Viseu.

Ştefan Dezsi et al., 2015. Antimicrobial and antioxidant activities and phenolic profile of *Eucalyptus globulus* Labill. and *Corymbia ficifolia* (F. Muell.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson leaves. *Molecules*, 20(3), pp.4720–4734.

Susana I. Pereira, Carmen S. R. Freire, Carlos Pascoal Neto, Armando J. D. Silvestre Silva, A.M.S., 2005. Chemical composition of the essential oil distilled from the fruits of *Eucalyptus globulus* grown in Portugal. *Flavour and fragrance journal*, (20), pp.407–409.

Tiveron, A.P., 2010. Atividade antioxidante e composição fenólica de legumes e verduras consumidos no Brasil. Dissertação de mestrado em Ciências, Universidade de São Paulo.

Viuda-Martos, M. et al., 2011. Antioxidant properties of pomegranate (*Punica granatum* L.) bagasses obtained as co-product in the juice extraction. *Food Research International journal*, 44(5), pp.1217–1223.

Wissal Dhifi, Sana Bellili, Sabrine Jazi, Nada Bahloul, W.M., 2016. Essential Oils Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review.

Zakia Bey-Ould Si Saida, Hayate Haddadi-Guemghara, Lila Boulekbache-Makhloufa, Peggy Rigoub, Hocine Reminia, Abdennour Adjaouda, Nabyla Khaled Khoudjaa, K.M., 2016. Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistilled extract of *Eucalyptus globulus* fruits. *Elsevier Science*, 89, pp.167–177.