



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
***Rosmarinus officinalis L.*, CULTIVADO EM SISTEMA ORGANICO SOB**
DIFERENTES CONDIÇÕES, FRENTE A BACTÉRIAS CAUSADORAS DE
MASTITE BOVINA

ALBERTO LUIZ WANDERLEY

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM AGRONOMIA

BRASÍLIA/DF

JUL/2015



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
***Rosmarinus officinalis L.*, CULTIVADO EM SISTEMA ORGANICO SOB**
DIFERENTES CONDIÇÕES, FRENTE A BACTÉRIAS CAUSADORAS DE
MASTITE BOVINA

ALBERTO LUIZ WANDERLEY

ORIENTADOR: PROF. DR. JEAN KLEBER DE ABREU MATTOS – FAV - UNB
CO-ORIENTADORA: PROFA. DRA. FRANCELINE REYNAUD – FACULDADE DE
FARMÁCIA - UFRJ

PUBLICAÇÃO nº 97

BRASÍLIA/DF
JUL/2015



UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE AGRONOMIA E MEDICINA VETERINÁRIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
***Rosmarinus officinalis L.*, CULTIVADO EM SISTEMA ORGANICO SOB**
DIFERENTES CONDIÇÕES, FRENTE A BACTÉRIAS CAUSADORAS DE
MASTITE BOVINA

ALBERTO LUIZ WANDERLEY

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO SUBMETIDA AO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRONOMIA, COMO PARTE DOS REQUISITOS NECESSÁRIOS À OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM AGRONOMIA.

APROVADA PELA BANCA EXAMINADORA:

PROF. DR. JEAN KLEBER DE ABREU MATTOS, Dr. – FAV – UNB
Orientador

PROF. MARCIO PIRES- Dr. - UnB
Examinador Externo

Eng. Agrônomo HERMES JANNUZZI, Dr. – Cooperativa dos Produtores
Orgânicos do Distrito Federal.
Examinador Externo

BRASÍLIA/DF, 31 DE JULHO DE 2015.

FICHA CATALOGRAFICA

ALBERTO LUIZ WANDERLEY. Atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L., cultivado em sistema orgânico sob diferentes condições, frente a bactérias causadoras de mastite bovina. Brasília-DF: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2015, 55p. Dissertação de Mestrado. Orientador: Jean Kleber de Abreu Mattos, Dr.

REFERÊNCIA BIBLIOGRÁFICA

WANDERLEY, A. L. Atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L., cultivado em sistema orgânico sob diferentes condições, frente a bactérias causadoras de mastite bovina. Brasília-DF: Faculdade de Agronomia e Medicina Veterinária, Universidade de Brasília, 2015, 55p. Dissertação de Mestrado.

CESSÃO DE DIREITOS

NOME DO AUTOR: Alberto Luiz Wanderley

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Atividade antioxidante e antimicrobiana do óleo essencial de *Rosmarinus officinalis* L., cultivado em sistema orgânico sob diferentes condições, frente a bactérias causadoras de mastite bovina.

GRAU: MESTRE EM AGRONOMIA ANO: 2015

É concedida à Universidade de Brasília permissão para reproduzir cópias desta dissertação de mestrado para única e exclusivamente propósitos acadêmicos e científicos. O autor reserva para si os outros direitos autorais, de publicação. Nenhuma parte desta dissertação de mestrado pode ser reproduzida sem a autorização por escrito do autor. Citações são estimuladas, desde que citada à fonte

Alberto Luiz Wanderley

CPF.: 728.546.696-49

Endereço: Av Genaro de Carvalho, 1201, apto 204. Rio de Janeiro – RJ

Tel: (61) 8189-8829

email: albertolwanderley@gmail.com

DEDICATÓRIA

À Professora Franceline Reynaud,
Primeira e última inspiração deste trabalho.

A quem dedico esta obra.

Aos meus filhos Lucas, Tainá, Julia e Clara,

Por serem meu estímulo permanente rumo à evolução.

Pelos quais me lancei nesta jornada de retorno à academia. Dedico o exemplo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela minha vida, pela crença no invisível e por toda proteção e abundância que me presenteia todos os dias.

Agradeço ao meu pai João e minha mãe Naira por minha existência, minha formação e pelo bom exemplo que representam para minha vida, extensivo a toda a minha família.

Ao meu orientador, o professor Jean Kleber, um verdadeiro mestre na arte de ensinar, que possui uma paciência infinita e a capacidade de acreditar na superação humana. Por toda ajuda e apoio e por acreditar na conclusão deste trabalho.

A minha co-orientadora professora Franceline Reynaud, pelo estímulo para meu ingresso neste curso e por toda dedicação e desprendimento oferecidos a mim durante esta longa e difícil caminhada. Minha gratidão eterna.

A professora Ana Claudia Vieira, coordenadora do Laboratório de Farmacobotânica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro – UFRJ pela sua contribuição na identificação botânica das amostras de *R. officinalis* L.

A Professora Viviane de Oliveira Freitas Lione do Laboratório de Bioensaios Farmacêuticos - LaBioFar da Faculdade de Farmácia da UFRJ pela parceria exitosa na avaliação da atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *R. Officinalis* L.

Ao Professor Lúcio Mendes Cabral, por ceder seu laboratório para a realização das análises fitoquímicas no CG/MS das amostras de óleo essencial, Análises estas fundamentais para a conclusão deste trabalho.

Aos doutorandos em Ciências Farmacêuticas Valério Todaro e Lilian Henriques do Amaral da Faculdade de Farmácia da UFRJ pela realização e

interpretação dos resultados das análises de CG/MS, decisivos para o êxito desta tese. Pela especial e importante ajuda.

Ao Professor José Ricardo Peixoto pela decisiva contribuição na análise estatística do resultado dos experimentos realizados neste trabalho.

Aos amigos da Agreco, que me deram a oportunidade de fazer parte da sua história de sucesso. Em especial, aos amigos Adilson Lunardi, gestor da cooperativa, um exemplo de nova liderança rural e sua companheira Ana Paula Antunes Lunardi, que atua no Centro de Formação em Agroecologia. Ao Eng. agrônomo Sebastião Vanderlinde que é responsável pela execução do projeto "P&D DE UMA CADEIA PRODUTIVA SUSTENTÁVEL DE ÓLEOS ESSENCIAIS ORGÂNICOS" pela fundamental ajuda prestada por ocasião da coleta das amostras de plantas e solo nos campos de *R. officinalis* L.. Assim como, ao Sr. João Augusto de Oliveira (Joca), idealizador deste projeto, pela confiança em mim depositada. E, ainda, ao Eng. agrônomo Marcel Schmidt, pela ajuda prestada no georeferenciamento dos campos de cultivo de *R. officinalis* L.

Ao meu amigo irmão de todas as horas João Canfran Mas, sua companheira Ivone Matias e seus filhos, Felipe, Jorge e Ruan pelo permanente estímulo e por me acolherem no seu lar nas minhas estadias em Brasília durante o período deste curso.

Por fim, aos professores do Curso de Pós-graduação em Agronomia da Universidade de Brasília, na pessoa do seu coordenador, Prof. Ernandes Rodrigues de Alencar, a quem dedico uma especial gratidão pelo seu empenho na conclusão de meu curso e que viabilizou a defesa de minha monografia.

Meu muito obrigado.

Autor

SUMARIO

1.0 INTRODUÇÃO	11
1.1 Planta em estudo	15
1.2 Óleos essenciais	17
1.3 Óleos essenciais no controle de mastite bovina	18
2.0 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3.0 METODOLOGIA	21
3.1 Campo de cultivo e coleta da <i>R. officinalis</i> L.	21
3.1.1 - Área 01- Irvellino Meurer	21
3.1.2- Área 02 -Fernando Monteiro	22
3.1.3 - Área 03 - Selita Wenz Schmidt	24
3.1.4 - Área 04 - Nilson Werner	26
3.1.5 - Área 05 - Osmar Pottmaier Alberton	27
3.2 Análise do solo dos campos de cultivo da <i>R. officinalis</i> L.	29
3.2.1 Análise da textura do solo	29
3.2.2 Determinação do pH e acidez	30
3.2.3 Determinação dos íons presentes no solo	30
3.2.4 Determinação de carbono orgânico	31
3.3 Obtenção do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> L.	32
3.4 Caracterização fitoquímica do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> L.	32
3.5 Análise antioxidante <i>in vitro</i> : atividade sequestradora do radical DPPH	33
3.6 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> L.	34
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	36
4.1 Caracterização dos campos de cultivo de <i>R. officinalis</i> L.	36
4.1.1 Localização geográfica dos campos de cultivo	36
4.1.2 Identificação botânica	36
4.2 Análise do solo dos campos de cultivo da <i>R. officinalis</i> L.	37
4.3 Óleo essencial de <i>R. officinalis</i> L.	40
4.4 Caracterização fitoquímica do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> L.	42
4.5 Atividade antioxidante do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> L.	44
4.6 Atividade antibacteriana do óleo essencial de <i>R. officinalis</i> L.	45
5.0 CONCLUSÃO	49
6.0 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

RESUMO

Plantas de *Rosmarinus officinalis L.*, obtidas de cinco diferentes campos de cultivo experimentais, conduzidos por agricultores familiares sob sistema orgânico de produção em diferentes condições edafoclimáticas na região das encostas da Serra Geral de Santa Catarina, foram testadas quanto às suas características de produtividade e qualidade de seu óleo essencial. As amostras obtidas foram caracterizadas quanto seu perfil fitoquímico e testadas quanto seu potencial antimicrobiano frente cinco cepas de *Staphylococcus aureus* e duas cepas de *Klebsiella pneumoniae*, todas causadoras de mastite bovina e, ainda, avaliado seu potencial antioxidante. E como resultado não foi verificada diferença significativa entre as amostras quanto às características fitoquímicas observadas, as quais resultaram numa ação de inibição também semelhante frente às cepas de bactérias patogênicas testadas. Os resultados apontam para a necessidade do estudo do potencial deste óleo essencial como um agente de controle e profilaxia frente a determinadas cepas de *Staphylococcus aureus*, causadoras de mastite bovina. As características antioxidantes obtidas das diferentes amostras também não diferiram entre si. O que sugere que diferentes condições edafoclimáticas e diferentes condições de cultivo de *Rosmarinus officinalis L.* não alteraram significativamente a composição do óleo essencial obtido, assim como de suas atividades químicas testadas. Fato que sugere um potencial promissor de seu cultivo comercial em sistemas familiares orgânicos de produção visando à produção de óleo essencial.

ABSTRACT

Rosmarinus officinalis L. plants, obtained from five different fields of experimental cultivation conducted by farmers in organic production system in different soil and climatic conditions in the region of the slopes of Serra Geral de Santa Catarina, were tested for their productivity and quality features its essential oil. The various samples obtained were characterized for its phytochemical profile and tested as its antimicrobial potential against five strains of *Staphylococcus aureus* and two strains of *Klebsiella pneumoniae*, all causing bovine mastitis and also as its antioxidant potential. And as a result there was no significant difference between samples for the phytochemical characteristics observed, resulting in an inhibition of action also similar across the tested pathogenic bacteria strains. The result indicates a potential for the study of essential oil agent as a control and prophylaxis against certain strains of *Staphylococcus aureus* causing bovine mastitis. The antioxidant properties obtained from different samples also did not differ. This suggests that different environmental conditions and different *Rosmarinus officinalis* L. cultivation conditions have not significantly altered the composition of the oil obtained as well as the tested chemical activities. Which suggests a promising potential for commercial cultivation in organic family production systems to the essential oil production.

1.0 INTRODUÇÃO GERAL

As plantas, desde os primórdios dos tempos, são fundamentais tanto na alimentação quanto na cura de enfermidades. A utilização delas é uma prática generalizada baseada na crença popular e nas várias formações culturais que as usam como recurso terapêutico. Apesar do emprego empírico, as plantas medicinais continuam a ser usadas pela população e jamais foram completamente substituídas pelos fármacos sintéticos. Acredita-se que entre os motivos que explicam a opção pelo uso delas estão: a insatisfação com a eficácia, o custo elevado e os efeitos indesejáveis dos medicamentos alopáticos, aliados à admiração pelos “produtos naturais”. Tal valorização destas ocasionou um crescimento na procura de informações comprovadas cientificamente sobre segurança e eficácia terapêutica de plantas medicinais (CECHINEL-FILHO; BRESOLIN, 2003).

O mercado mundial de produtos de biotecnologia é crescente, movimentando montantes entre 470 a 780 bilhões de dólares por ano, tendo como um dos setores mais representativos o farmacêutico. Recentemente, tem-se observado um entusiasmo sem precedentes na imprensa brasileira quanto às potencialidades de exploração de recursos naturais, onde são apresentados valores astronômicos para o patrimônio natural, estimado em 2 trilhões de dólares, e um mercado para terapias a base de plantas medicinais que movimenta, hoje, em torno de 500 milhões de dólares somente no Brasil. Cifra esta pequena, se comparada aos valores publicados para a Europa e Estados Unidos, no ano de 2000, foram 8,5 e 6,3 bilhões de dólares, respectivamente. Esses valores indicam um mercado com potencial expansão (SIMÕES e SCHENKEL, 2002).

O Brasil abriga aproximadamente 22% das espécies vegetais do planeta, o que significa uma riqueza de biodiversidade inigualável e, conseqüentemente, uma enorme vantagem competitiva para o país. Considerando a biodiversidade vegetal, a Floresta Amazônica é detentora da maior reserva de plantas medicinais do mundo. Trata-se de matérias-primas que têm despertado interesses, cada vez maiores, de grandes setores da economia, principalmente o farmacêutico, pois a utilização de plantas medicinais para produção de medicamentos apresenta uma melhor relação

custo/benefício quando comparada aos produtos sintéticos. A ação biológica das plantas medicinais é eficaz e apresenta uma baixa toxicidade e efeitos colaterais, além de apresentar um baixo custo de produção e, conseqüentemente, um preço de venda bem menor (BRAZ FILHO, 2010).

Nos últimos anos, vem ocorrendo no Brasil um aumento acentuado no uso de plantas medicinais. Este fato está associado ao consumo pela população rural em geral, mas principalmente, ao consumo associado a programas oficiais de saúde. Além da recomendação do uso, tais programas buscam incentivos à exploração e/ou produção sustentada de plantas medicinais. Trabalhos revelam a adoção de programas de incentivo ao cultivo de plantas medicinais como alternativas de diversificação de produção e de renda complementar nas pequenas propriedades rurais. Neste contexto, a produção de plantas medicinais se insere como uma alternativa econômica interessante para os produtores familiares (SOUZA *et al.*, 2012).

Apesar do citado crescimento no uso de plantas medicinais no Brasil e do conseqüente aumento da demanda por sua produção, nota-se também a carência por dados estatísticos relacionados ao comércio destas plantas. E, adicionalmente verifica-se um elevado desconhecimento por parte dos produtores rurais das técnicas adequadas para a sua produção. Fato este que ocasiona a oferta de matéria-prima de baixa qualidade e sem padronização. O que gera a necessidade da realização de estudos que objetivem a definição desses padrões de produção, por meio de avaliação da influência dos meios de cultivo, assim como das diferentes condições edafo-climáticas e seus efeitos na produção para os diferentes usos pretendidos (SOUZA *et al.*, 2012).

No meio rural, os agricultores familiares são os que geram mais empregos e fortalecem o desenvolvimento local, pois distribuem melhor a renda e fixam o homem no campo. Estes são responsáveis por uma parte significativa da produção nacional, respeitam mais o meio ambiente e, principalmente, potencializam a economia nos municípios onde vivem. Neste sentido, a agricultura familiar começa a ser vista não como um setor secundário, mas como um componente dinâmico do desenvolvimento econômico, onde o seu fortalecimento deve ser tratado como pre-condição para uma sociedade economicamente mais eficiente e socialmente mais

justa. Baseado na experiência dos países que conseguiram se desenvolver durante o século XX, a adoção de uma nova política agrária, com a expansão e o fortalecimento da agricultura familiar, identifica-se como uma excelente estratégia de desenvolvimento rural e local para o Brasil (PREZOTTO, 2010).

Algumas estratégias vem sendo consideradas como prioritárias para amparar e intermediar a adaptação da agricultura familiar às novas exigências do mercado. Mercados orientados para valores como ética, tradição, produção natural e ecológica tem surgido e apresentam um crescimento significativo. O cultivo de plantas aromáticas de uso medicinal ou alimentício e a adoção de sistemas orgânicos de produção são bons exemplos. Atendendo às novas exigências em termos de qualidade e respeitando o meio ambiente, tais alternativas revelam grandes oportunidades da utilização de sistemas de produção adequados para a produção familiar (SOUZA *et al.*, 2012).

Como exemplo do que acabamos de expor, destacamos a região das Encostas da Serra Geral de Santa Catarina que possui uma predominância de seu desenvolvimento rural baseado nas iniciativas de produção, agroindustrialização e organização social típicas da agricultura familiar e que teve sua colonização tipicamente européia, além de apresentar a sua estrutura fundiária com predominância de unidades de produção baseados na economia familiar. Os municípios que compõem o território, situado nas cabeceiras dos rios Braço do Norte e Capivari, são: Santa Rosa de Lima, Rancho Queimado, Anitápolis, Rio Fortuna, Grão Pará e Gravatal. (WEBER *et al.*, 2013).

Uma região característica do bioma da mata atlântica, com relevo bastante ondulado e declivoso com altitudes variando de 250 a 900 metros, clima subtropical, que possui as estações bem definidas e um regime de chuvas distribuído por todo o ano, com uma média pluviométrica superior a 2000 mm anuais. Sua estrutura agrária aliada a riqueza de recursos naturais e de porções remanescentes da Floresta Atlântica contribuem para o fortalecimento do potencial ecológico da região.

E, em contraposição ao cultivo do tabaco, notadamente baseado no uso intensivo de insumos químicos e pesticidas, o qual consistiu na principal atividade econômica desta região nas décadas passadas, surge em 1996 no município de

Santa Rosa de Lima, por iniciativa de 12 famílias uma associação de produtores que priorizou a agricultura orgânica na busca de restabelecer o equilíbrio ecológico natural através de processos e sistemas que valorizam a biodiversidade e a utilização de consórcios e rotação de culturas (WEBER *et al.*, 2013).

Inicialmente as atividades foram concentradas na produção, beneficiamento e comercialização de alimentos orgânicos 'in natura', notadamente culturas olerícolas. E, em seguida, se deu um incremento à agroindustrialização da produção, por meio da implantação do Pronaf Agroindústria, o qual objetivou implantar projetos piloto de agroindústrias rurais de pequeno porte, com vistas a agregação de valor da produção agropecuária familiar. A associação destas agroindústrias com o passar do tempo se consolidou dando lugar a constituição de uma cooperativa: a Cooperagreco (PREZOTTO, 2010).

Neste contexto foi idealizado o projeto: "P&D de uma cadeia produtiva sustentável de óleos essenciais orgânicos", o qual foi vencedor do Prêmio FINEP de Inovação 2011. Este projeto teve como principal objetivo a pesquisa e desenvolvimento tecnológicos visando a implantação e consolidação de uma cadeia produtiva sustentável de óleos essenciais orgânicos na região das Encostas da Serra Geral de Santa Catarina, de forma a incorporar mais produtores no processo de produção de plantas aromáticas orgânicas visando o incremento econômico e social dos envolvidos.

Como atividade prevista no citado projeto, destaca-se a elaboração e validação de sistemas de produção orgânicos de diversas plantas aromáticas em 60 unidades experimentais conduzidas por agricultores familiares com apoio da equipe técnica do projeto. Dentre as espécies de plantas escolhidas, *R. Officinalis* L., popularmente conhecido como alecrim, se destacou por sua boa adaptabilidade e resistência às diferentes condições de cultivo.

1.1 Planta em estudo

A espécie *R. officinalis* L., conhecida popularmente como alecrim, é originária da Região Mediterrânea e cultivada em ambientes que variam do clima tropical ao clima temperado. A planta possui porte subarborescente lenhoso, ereto e ramificado de até 1,5 m de altura. Suas folhas são lineares, coriáceas e muito aromáticas, medindo

1,5 a 4 cm de comprimento por 1 a 3 mm de espessura. Flores azulado-claras, pequenas e de aromas forte e muito agradável (LORENZI, H.; MATOS,F.J., 2006).

O cultivo pode ser feito por meio de mudas preparadas por estaquia ou mergulhia, crescendo bem em solo rico em calcário e em ambientes úmidos de clima ameno. Existem mais de 10 variedades em cultivo no Brasil, todas com o mesmo uso, porém aromas e características sutis diferentes. (LORENZI, H.; MATOS,F.J., 2006).

Planta aromática utilizada na indústria alimentícia pelas propriedades antioxidantes de seus diterpenos. Consiste num estimulante digestivo, para a falta de apetite (inapetência); contra azia; em problemas respiratórios e debilidade cardíaca (cardiotônico). Por suas virtudes tônicas e estimulantes, atua sobre o sistema nervoso (cansaço mental) e cansaço físico. Possui atividade colagoga, diurética, anti-espasmódica (uso interno: vesícula e duodeno), colerética, de proteção hepática, anti-tumoral, anti-depressiva natural, carminativa e vasodilatadora. Também é indicada para uso tópico local, como cicatrizante, antimicrobiana (*Staphylococcus* e *Monilia*) e estimulante do couro cabeludo. (LORENZI, H.; MATOS,F.J., 2006).

A substância extraída de unidades floridas e dessecadas contém entre 10 e 25 ml/kg de um óleo essencial, cujos constituintes principais são o alcanfor, 1-8 cineol, alfa-pineno, borneol e canfeno em proporções variáveis dependendo da origem e do estado vegetativo. Os compostos fenólicos se encontram representados por flavonóides (esteróides do luteol, diosmetol) e flavonas metoxiladas em C-6 e/ou C-7 e por ácidos fenólicos, sobretudo derivados cafeicos: ácido cafeico, ácido clorogênico e rosmarínico. O alecrim caracteriza-se, também, pela presença de diterpenos tricíclicos: ácido carnosólico; carnosol (majoritários); rosmanol; epirosmanol; isorosmanol; rosmarinidifenol; rosmariniquinona; rosmadiol; etc.; assim como pelos triterpenos (ácido ursólico e oleanóico) e amirinas. (BRUNETON, J. 2001).



Figura 1: *R. officinalis L.* na fase do início de sua floração

1.2 Óleos Essenciais

O valor comercial de plantas aromáticas tem refletido qualitativamente e quantitativamente na produção de seu óleo essencial. Este óleo é um produto do metabolismo da célula vegetal, sendo a composição não estável e dependente de diversos fatores que são regulados pelo metabolismo. A acumulação do óleo essencial depende de fases de desenvolvimento da planta. A origem da folha primordial, sua expansão, total maturação e baixa senescência são importantes para a produção do óleo de valor comercial. A ontogenia também afeta a composição do óleo (POVH e ONO, 2006).

Os óleos essenciais comportam uma gama extensa de aplicações, tais como: aromas para alimentos, bebidas e produtos de oral care, fragrâncias para perfumes, cosméticos, detergentes, sabonetes, sabões, repelentes, uso medicinal. Fato que aumenta seu potencial de mercado. Já o cultivo das plantas aromáticas se apresenta adequado aos pequenos produtores familiares da região de abrangência do projeto: "P&D de uma cadeia produtiva sustentável de óleos essenciais orgânicos", que, pelas condições edafoclimáticas e de estrutura fundiária permitem o cultivo de ampla variedade de espécies, possibilitando boa adequação com a demanda dos mercados a serem atingidos (OLIVEIRA, J. 2011).

O mercado de óleos essenciais orgânicos está em expansão e já atinge a expressiva cifra de U\$ 9 bilhões anuais, conforme informação divulgada na Feira Internacional de Produtos Orgânicos - Biofach 2012, ocorrida em Nuremberg. O Brasil se apresenta como importador de óleos essenciais, com compras na casa de U\$ 51 milhões. Com relação às exportações brasileiras este número é bastante superior, sendo registrado cerca de U\$ 131 milhões. O que caracteriza a existência de um mercado crescente a ser explorado neste setor (OLIVEIRA, J. 2011).

1.3 Óleos Essenciais no controle de mastite bovina

Entre as infecções de bovinos, a mastite é um dos problemas mais freqüentes e importantes na produção de leite. A Mastite é designada como uma inflamação da glândula mamária, sendo, na maioria dos casos, causada por bactérias, resultando em perdas na lactação e trazendo prejuízos econômicos para a indústria leiteira. O aumento nos custos da produção leiteira está associado à eliminação de animais, tratamentos, redução na qualidade do leite ou mesmo seu descarte. Com isso, a perda econômica mundial já foi estimada em US \$ 35 bilhões anuais (BENEDETTE et al., 2008).

A prevalência da mastite está relacionada, principalmente, ao manejo antes, durante e após a ordenha. Isso explica a importância da conscientização do ordenhador, dos procedimentos adequados de ordenha, incluindo as formas corretas de higienização e desinfecção do ambiente, do animal, do profissional e de todos os utensílios utilizados na ordenha (COSER et al., 2012). Além disso, a mastite é uma das principais causas do uso de antibióticos em vacas leiteiras.

A extensiva utilização de agentes antimicrobianos está associada como risco de indução de resistência aos agentes antibacterianos, a redução das taxas de cura após tratamento de mastite clínica, bem como a transmissão de resistência das bactérias aos seres humanos, através da cadeia alimentar (SOLIMAN et al., 2012). Devido a estes problemas, o uso de compostos derivados de plantas configura-se como alternativa para o controle da mastite em vacas leiteiras (PERINI, 2013).

O presente estudo foi realizado para avaliar o potencial de controle sobre agentes patogênicos causadores de mastite bovina. Para isso foram selecionados 05 diferentes campos de cultivo experimentais de *R. officinalis L* do citado projeto para sua caracterização e coleta de plantas visando a extração de seu óleo essencial para verificação de seu perfil fitoquímico e de sua atividade antimicrobiana e antioxidante.

A atividade anti-microbiana foi testada frente a 5 cepas de *Staphylococcus aureus* e 2 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, bactérias causadoras de mastite bovina. Já a atividade antioxidante foi testada *in vitro* pelo método de determinação da atividade sequestradora do radical DPPH.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar as atividades antioxidantes e antimicrobiana de amostras de óleo essencial de *R. officinalis* L. cultivados através de sistema orgânico de produção em diferentes condições edafoclimáticas, frente a cepas de *Staphylococcus aureus* e *Klebsiella pneumoniae*, causadoras de mastite bovina.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar cinco diferentes campos de cultivo experimentais de *R. officinalis* L., localizados na região das Encostas da Serra Geral do Estado de Santa Catarina, nos municípios de Santa Rosa de Lima e Anitápolis;
- Realizar a identificação botânica de amostras de *R. officinalis* L., cultivadas através de sistema orgânico de produção em cinco localidades distintas;
- Realizar estudo fitoquímico dos diferentes óleos essenciais de *R. officinalis* L. por meio de cromatografia gasosa acoplada a espectro de massa (CG/EM);
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de *R. officinalis* L., obtidos dos cinco diferentes campos de cultivo frente a cinco cepas de *Staphylococcus aureus* e duas cepas de *Klebsiella pneumoniae*, causadoras de mastite bovina através do Teste de Difusão em Discos;
- Analisar a ação antioxidante *in vitro* das diferentes amostras de óleos essenciais obtidos pelo método de determinação da atividade sequestradora do radical DPPH.

3.0 METODOLOGIA

As plantas de *R. officinalis* L. utilizadas neste estudo foram cultivadas sob sistema orgânico de produção por agricultores familiares associados à Cooperagreco, que se prontificaram a participar do projeto, através da implementação de campos experimentais em suas propriedades, localizadas na região das Encostas da Serra Geral de Santa Catarina.

3.1 Campo de cultivo e coleta da *R. Officinalis* L.

Por ocasião da visita técnica ocorrida no dia 03 de dezembro de 2014, quando foram realizadas as coletas das plantas de *R. officinalis* L. e do solo dos campos de cultivo experimentais para a realização das análises programadas, Também foram levantados os dados relacionados ao sistema orgânico de produção utilizado nos cinco campos experimentais escolhidos para este trabalho de pesquisa, os quais serão descritos a seguir.

3.1.1 - Área 01- Irvellino Meurer

- Localização: Rio da prata
- Município: Anitápolis/SC:
- Coordenadas geográficas: 27° 48' 03,48"S e 49° 08' 25,47"W
- Altitude do Campo: 664,15 m
- Classificação do solo: gleissolo húmico, areno argiloso como pode ser verificado na Tabela 2, na análise de textura, com características típicas de solos localizados próximos a cursos d'água, porém sem impedimentos físicos;
- Fertilidade do solo: caracterizava-se por ser cultivado com olerícolas como horta doméstica e, portanto, recebeu adubação orgânica com frequência. Possuía, em conseqüência um nível de fertilidade mediano, sendo propício para o cultivo de culturas anuais, como *R. officinalis* L. Esta evidência pode ser confirmada na Tabela

3, onde o nível de fósforo se apresentava elevado, assim como os níveis de cálcio e magnésio, porém apresentando uma relação Ca:Mg, próxima a 2:1, não muito favorável.

- Preparo do solo: por se tratar de uma área localizada contígua a casa do produtor, seu preparo se deu como uma horta doméstica, onde foram realizados a limpeza e revolvimento manual do terreno, assim como as demais atividades;

- Controle de Invasoras: foram realizadas 04 capinas no experimento

- Adubação de plantio: composto orgânico produzido a partir da mistura de esterco de curral, esterco de aves e grama fermentado e curtido. Foi utilizado 50 g por planta no plantio.

- Adubação de cobertura: foram realizadas duas adubações com o composto orgânico descrito na quantidade de 30 g por planta em cada adubação.

- Irrigação: foram feitas regas localizadas nas mudas na fase de pegamento logo após o transplante. O restante do cultivo foi conduzido sem irrigação.

- Informações sobre a cultura: devido à ocorrência de forte estiagem na fase de pegamento das mudas, ocorreram perdas ocasionadas por déficit hídrico, resultando na diminuição do estande inicial, apesar das regas realizadas.

- Fitossanidade: de maneira geral as plantas se apresentaram com boa condição fitossanitária, o que possibilitou seu cultivo sem a necessidade de ações de controle.

- Avaliação do campo de cultivo: comprometimento do estande devido a perdas na fase de pegamento, porém algumas plantas apresentaram um bom desenvolvimento vegetativo, que se mostrou irregular por todo o experimento, apesar da boa sanidade.

3.1.2- Área 02 -Fernando Monteiro

- Localização: Rio do Ouro

- Município: Anitápolis/SC

- Coordenadas geográficas: 27° 54' 53,46"S e 49° 06' 41,68"W
- Altitude do Campo: 621,37 m
- Classificação do solo: latossolo amarelo distrófico, de textura argilosa como pode ser verificado na Tabela 2, com características típicas dos solos de meia encosta desta região montanhosa de mata atlântica. Ou seja, medianamente rasos, porém com boa permeabilidade e sem impedimentos físicos;
- Fertilidade do solo: como se tratava de solo localizado numa pastagem, pouco manejada e não cultivada, possuía um nível de fertilidade muito baixo, característico de solos nativos, não sendo propício para o cultivo de culturas anuais, como *R. officinalis* L. Esta evidência pode ser confirmada na Tabela 3, que apresentou o nível de cálcio em 1,4 cmol₂/dm³ e o nível de magnésio em 0,5 cmol₂/dm³, ou seja, muito baixos. Apresentou o nível de Al⁺⁺⁺ em 5,5 cmol₂/dm³, o que resulta numa saturação de 71,4% deste íon. Com efeito, apresenta uma saturação por bases de somente 18%. O que o caracteriza como um solo inapto para o cultivo de plantas cultivadas e, em especial, inapto para o cultivo de *R. officinalis* L., como pode ser percebido pelo baixo desenvolvimento das plantas ali cultivadas.
- Preparo do solo: o experimento foi instalado numa porção de uma área de pastagem, sendo realizada a limpeza mecânica do terreno por meio de uma gradagem pesada precedida de subsolagem do terreno.
- Controle de Invasoras: Foram realizadas capinas manuais no experimento
- Adubação de plantio: cama de aviário oriunda da produção de frangos de corte orgânicos da Cooperagreco. Foi utilizado 50 g por cova deste material.
- Adubação de cobertura: foram realizadas duas adubações com cama de aviário na quantidade de 50 g por planta em cada adubação.
- Irrigação: o cultivo foi conduzido sem irrigação.
- Informações sobre a cultura: devido à ocorrência de forte estiagem na fase de pegamento das mudas, ocorreram perdas ocasionadas por déficit hídrico resultando na diminuição do estande inicial.

- Fitossanidade: de maneira geral as plantas se apresentaram com boa condição fitossanitária, o que possibilitou seu cultivo sem a necessidade de ações de controle.
- Avaliação do campo de cultivo: o campo apresentou muitas falhas de pegamento. As plantas apresentaram baixo desenvolvimento vegetativo e crescimento irregular com clorose generalizada e sintomas de deficiência nutricional e hídrica. As plantas no início de sua floração já estavam começando a secar. E apesar de existirem plantas presentes na área, o que revela a forte adaptabilidade do *R. officinalis* L. à condições desfavoráveis de cultivo, também demonstra que a cultura possui uma exigência mediana em relação aos níveis de fertilidade de solo para que se obtenha êxito no seu cultivo com finalidade comercial.

3.1.3 - Área 03 - Selita Wenz Schmidt

- Localização: Águas Mornas
- Município: Santa Rosa de Lima/SC:
- Coordenadas geográficas: 28° 01' 21,86"S e 49° 06' 30,42"W
- Altitude do Campo: 330,10 m
- Classificação do Solo: Gleissolo húmico, de textura média, como pode ser comprovado na Tabela 2, com características típicas de solos de baixada localizados próximos a cursos d'água, porém sem impedimentos físicos;

Fertilidade do solo: devido ao campo situar-se numa área de cultivo comercial de olerícolas, o solo recebeu adubação orgânica, calagem e correção mineral com frequência. Possuía, em consequência, um nível de fertilidade bom, sendo propício para o cultivo de culturas anuais, como é o caso de *R. officinalis* L. Esta evidência pode ser confirmada na Tabela 3, que apresenta o nível de fósforo em 121 mg/dm³, ou seja, elevado, assim como os níveis de cálcio e magnésio, respectivamente em 5,0 cmol₂/dm³ e em 1,0 cmol₂/dm³, uma relação Ca:Mg, em 5:1, muito favorável à disponibilização do íon cálcio para as plantas. Apresentava ainda, o nível de Al⁺⁺⁺ em 0,1 cmol₂/dm³, o que resulta numa saturação de somente 2,5% deste íon, característica de solos corrigidos com calagem. Com efeito, apresentou uma saturação por bases de 72%.

- Preparo do solo: o terreno foi limpo e o solo revolvido por meio da utilização da enxada rotativa de um micro-trator.
- Controle de Invasoras: por se tratar de uma área altamente infestada por plantas invasoras, típica de campos de olerícolas, foram realizadas capinas regulares do terreno toda vez que as plantas de *R. officinalis* L. sofreram concorrência destas invasoras.
- Adubação de plantio: cama de aviário oriunda da produção de frangos de corte orgânicos da Cooperagreco. Foi utilizado 50 g por cova deste material.
- Adubação de cobertura: foram realizadas duas adubações com cama de aviário na quantidade de 50 g por planta em cada adubação.
- Irrigação: foram realizadas regas localizadas nas mudas na fase de pegamento logo após o transplante. O restante do cultivo foi conduzido sem irrigação.
- Informações sobre a cultura: devido à ocorrência de forte estiagem na fase de pegamento das mudas, ocorreram algumas falhas, o que resultou numa redução do estande, apesar das regas. As plantas apresentaram um bom desenvolvimento vegetativo, porém irregular, com plantas atingindo um porte de até 1,50 m de altura, apesar da forte concorrência com plantas invasoras verificada no dia da coleta de amostras.
- Fitossanidade: de maneira geral as plantas se apresentaram com boa condição fitossanitária, o que possibilitou seu cultivo sem a necessidade de ações de controle.
- Avaliação do campo de cultivo: campo de cultivo com percentagem elevada de pegamento, apresentando plantas com desenvolvimento vegetativo bom, porém irregulares. Com forte pressão de concorrência de plantas invasoras. O que sugere uma correlação positiva entre a disponibilidade de nutrientes e o desenvolvimento das plantas de *R. officinalis* L..

3.1.4 - Área 04 - Nilson Werner

- Localização: Campo do Rio Bravo
- Município: Santa Rosa de Lima/SC:
- Coordenadas geográficas: 28° 00' 20,12"S e 49° 02' 36,71"W
- Altitude do Campo: 720,63 m
- Classificação do solo: Latossolo bruno úmico, textura média como pode ser comprovado na Tabela 2, com características típicas de solos bem drenados e com elevado teor de matéria orgânica e que não apresentam impedimentos físicos;
- Fertilidade do solo: o campo experimental de cultivo de *R. officinalis* L. foi estabelecido numa borda de uma área de cultivo de culturas anuais, tipicamente de cereais e, portanto, caracterizava-se por possuir um perfil de fertilidade mediano, compatível com solos agrícolas cultivados. Sendo apto para o cultivo de culturas anuais. Esta evidência pode ser confirmada na Tabela 3, que apresentou o nível de fósforo em 22,2 mg/dm³, ou seja, médio, e também apresentou os níveis de cálcio e magnésio, respectivamente em 4,2 cmol₂/dm³ e em 1,3 cmol₂/dm³, uma relação Ca:Mg, em 3:1, favorável à disponibilização do íon cálcio para as plantas. Apresentou ainda o nível de Al⁺⁺⁺ em 0,2 cmol₂/dm³, o que resultou numa saturação de somente 3,3% deste íon, característica de solos corrigidos com calagem. Com efeito, apresentou uma saturação por bases de 58%.
- Preparo do solo: limpeza e revolvimento mecânico do solo
- Controle de Invasoras: foram realizadas capinas regulares na área do experimento, o qual apresentou baixa incidência de invasoras por ocasião da coleta das amostras de *R. officinalis* L.
- Adubação de plantio: cama de aviário oriunda da produção de frangos de corte orgânicos da Cooperagrecó. Foi utilizado 50 g por cova deste material.
- Adubação de cobertura: foram realizadas duas adubações com cama de aviário na quantidade de 50 g por planta em cada adubação.
- Irrigação: foram realizadas regas localizadas nas mudas na fase de pegamento logo após o transplante. O restante do cultivo foi conduzido sem irrigação.

- Informações sobre a cultura: devido à ocorrência de forte estiagem na fase de pegamento das mudas, ocorreram algumas perdas ocasionadas por déficit hídrico, fato que não comprometeu o estande inicial.
- Fitossanidade: de maneira geral as plantas se apresentaram com boa condição fitossanitária, o que possibilitou seu cultivo sem a necessidade de ações de controle.
- Avaliação do campo de cultivo: este campo experimental apresentou bom pegamento das mudas, com o desenvolvimento mediano e homogêneo das plantas de *R. officinalis* L., apresentando bom aspecto fitossanitário, o que evidenciou uma boa condução do cultivo.

3.1.5 - Área 05 - Osmar Pottmaier Alberton

- Localização: Pitinga
- Município: Santa Rosa de Lima/SC:
- Coordenadas geográficas: 28° 00' 41,51"S e 49° 04' 33,69"W
- Altitude do Campo: 663,19 m
- Classificação do solo: Latossolo bruno úmico, com textura argilosa como pode ser comprovado na Tabela 2, com características típicas de solos medianamente bem drenados e com elevado teor de matéria orgânica, porém sem impedimentos físicos;
- Fertilidade do solo: devido ao campo situar-se numa área de cultivo comercial de olerícolas, o solo recebeu adubação orgânica, calagem e correção mineral com frequência. E, em consequência, apresentou um nível de fertilidade alta, sendo propício para o cultivo de culturas anuais, como é o caso de *R. officinalis* L. Esta evidência pode ser confirmada na Tabela 3, que apresentou o nível de fósforo em 92,4 mg/dm³, ou seja, elevado, assim como os níveis de cálcio e magnésio, respectivamente em 8,8 cmol₂/dm³ e em 1,7 cmol₂/dm³, com uma relação Ca:Mg, em 5:1, muito favorável à disponibilização do íon cálcio para as plantas. Apresentou ainda o nível de Al⁺⁺⁺ em 0,0 cmol₂/dm³, o que o tornou indisponível, característica de solos corrigidos com elevadas doses de calagem. Com efeito, apresentou uma saturação por bases de 81%.

- Preparo do solo: foram realizados a limpeza e revolvimento mecânico do solo
- Controle de Invasoras: foram realizadas capinas regulares na área do experimento, o qual apresentou baixa incidência de invasoras por ocasião da coleta das amostras de *R. officinalis* L.
- Adubação de plantio: cama de aviário oriunda da produção de frangos de corte orgânicos da Cooperagreco. Foi utilizado 50 g por cova deste material.
- Adubação de cobertura: foram realizadas duas adubações com cama de aviário na quantidade de 50 g por planta em cada adubação.
- Irrigação: Foram realizadas regas localizadas nas mudas na fase de pegamento logo após o transplante. O restante do cultivo foi conduzido sem irrigação.
- Informações sobre a cultura: devido à ocorrência de forte estiagem na fase de pegamento das mudas, ocorreram algumas perdas ocasionadas por déficit hídrico, fato que não comprometeu o estande inicial.
- Fitossanidade: de maneira geral as plantas se apresentaram com boa condição fitossanitária, o que possibilitou seu cultivo sem a necessidade de ações de controle.
- Avaliação do campo de cultivo: este campo experimental apresentou bom pegamento das mudas, com o desenvolvimento mediano e homogêneo das plantas de *R. officinalis* L., apresentando bom aspecto fitossanitário, o que evidenciou uma boa condução do cultivo.

A data de plantio de todos os cinco campos de cultivo foi em Janeiro de 2014 e a coleta das plantas foi realizada no dia 03 de dezembro de 2014, quando foram coletados ramos da porção do terço superior plantas em estágio inicial de floração. As amostras foram identificadas no Laboratório de Farmacobotânica da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio de Janeiro - UFRJ, onde foram preparadas exsiccatas, as quais foram registradas e depositadas no Herbário do Departamento de Botânica, do Instituto de Biologia da mesma Universidade, após confirmação pela Profa. Dra. Ana Claudia Vieira do Departamento de Produtos Naturais e Alimentos da Faculdade de Farmácia da UFRJ.

A colheita dos ramos de *R. officinalis* L objetivando a produção de óleo essencial deve ser realizada no início de sua floração, que foi justamente a fase do cultivo onde foram coletadas as amostras de ramos para análise dos aspectos quantitativos e qualitativos sobre a produção de óleo essencial.

Após a secagem das plantas, as folhas foram manualmente separadas. O percentual de folhas presente em cada amostra determinado gravimetricamente através da diferença do peso total da planta seca, e o peso das respectivas folhas.

3.2 Análise do solo dos campos de cultivo de *R. officinalis* L.

Para cada campo de cultivo experimental com aproximadamente 350 metros quadrados foram coletadas 03 sub-amostras de solo na profundidade de 0 a 20 cm de profundidade, sendo descartadas as impurezas e materiais superficiais, resultando numa amostra composta representativa para cada área de cultivo. As amostras foram analisadas quanto ao seu pH, acidez, determinação de íons, carbono orgânico e textura. Estas análises foram realizadas no Laboratório Soloquímica Análises de Solo, localizado em Brasília - DF.

As diferentes amostras de solo foram submetidas à secagem em estufa de circulação de ar forçada, sob a temperatura de 40°C. Foram espalhadas sobre uma folha de papel e destorroadas manualmente com rolo de madeira sobre sola grossa. Em seguida foram separadas das frações do solo por tamisação e homogeneização da fração < 2 mm, denominada “terra fina seca ao ar” (TFSA), a qual foi usada nas determinações de macro e micronutrientes do solo e de sua textura.

3.2.1 Análise da textura do solo

A textura do solo foi determinada pelo Método do Densímetro, o qual baseia-se na velocidade de queda das partículas que compõem o solo. Após a adição de um dispersante químico (NaOH), fixou-se um tempo único para a determinação da densidade da solução que se admite ser a concentração total de argila. As frações areia grossa e fina foram separadas por tamisação, secas em estufa e pesadas para obtenção dos respectivos percentuais. O silte corresponde ao complemento para 1000 g/kg, foi obtido por diferença das outras frações em relação à amostra inicial. A areia retida na peneira de 0,053 mm, foi lavada, seca à 100 °C e pesada. Separou-se a areia grossa da areia fina, com auxílio de uma peneira de 0,20 mm. A areia fina é obtida por diferença entre areia total e areia grossa ou através de pesagem.

3.2.2 Determinação do pH e acidez

O pH, em água e em KCl, das amostras foi determinado por meio de medição eletroquímica da concentração efetiva de íons H⁺ na solução do solo, por meio de eletrodo combinado, imerso nas seguintes suspensões

- solo:água na proporção de 1:2,5 para o determinar o pH em água;
- solo:sal na proporção de 1,0:1,0, sendo 1 normal a solução de KCl, para determinação do pH em KCl.

A medição da acidez potencial, a qual é representada pela soma dos íons H⁺ e Al³⁺, foi determinada através da titulação de acetato de cálcio (pH 7,0) com uma solução padronizada de NaOH 0,025 N.

3.2.3 Determinação dos íons presentes no solo

Os íons cálcio, magnésio e o alumínio trocável (Ca²⁺, Mg²⁺, Al³⁺, respectivamente) foram extraídos utilizando-se uma solução de KCl 1 M. Titulando-se, numa fração do extrato, o Al³⁺ com NaOH 0,01 M, na presença de azul-de-bromotimol como indicador. Numa outra fração do extrato, o Ca²⁺ e Mg²⁺ foram

determinados por espectrofotometria de absorção atômica, utilizando um espectrofotômetro marca Thermo Scientific, modelo ICE 3000 SERIES.

Para a extração de Fósforo, Potássio e Sódio (P^+ , K^+ , Na^+ , respectivamente) e micronutrientes, foi utilizada uma solução extratora de Mehlich 1, também chamada de solução duplo-ácida ou de Carolina do Norte. Esta solução é constituída por uma mistura de HCl 0,05 N e H_2SO_4 0,025 N(6,23:1). O emprego dessa solução baseia-se na solubilização dos íons P^+ , K^+ e Na^+ pelo efeito de pH, entre 2 e 3.

A concentração do P^+ da amostra de solo foi determinada com auxílio de espectrocolorímetro, marca Biospectro, modelos SP-22, por meio da confecção de curva de calibração, obtendo-se o comprimento de onda de 660 nm. Já as concentrações de K^+ e Na^+ foram analisadas em fotômetro de chama, marca Micronal, modelo B-262.

Já a determinação da concentração dos níveis de Cobre, Ferro, Manganês, Zinco, Cádmio, Cromo e Níquel foi realizada em um espectrofotômetro de absorção atômica, marca Thermo Scientific, modelo ICE 3000 SERIES, cujos espectros são padronizados e lidos diretamente no equipamento.

O íon Boro foi extraído com utilização de água aquecida ao ponto de fervura através de banho-maria, e sua concentração foi determinada com auxílio de espectrocolorímetro, marca Biospectro, modelos SP-22, usando curcumina ou azometina H como indicador, com os comprimentos de onda de 420 nm e 540 nm respectivamente. O Enxofre foi determinado de forma indireta através da extração de sulfato por meio do fosfato monocálcico monohidratado e a posterior quantificação colorimétrica do Enxofre no mesmo espectrocolorímetro, da turbidez formada pela precipitação de sulfato pelo cloreto de bário.

3.2.4 Determinação de Carbono Orgânico

A concentração de Carbono Orgânico presente nas amostras de solo foi obtida por meio do Método Walkley-Black. Este método prevê a oxidação da matéria orgânica do solo por solução de Dicromato de Potássio ($K_2Cr_2O_7$) em presença de H_2SO_4 .

3.3 Obtenção do óleo essencial de *R. officinalis* L.

Após a coleta das amostras das plantas de *R. officinalis* L. de cada um dos 5 campos de cultivos do estudo, foram determinadas a massa fresca total da parte aérea, a qual foi composta por caules e folhas mais pecíolos. Para a determinação da massa seca total, o material foi lavado, cortado em pequenos pedaços e seco em estufa com circulação de ar à temperatura de 30° C (o óleo essencial é volátil em temperaturas superiores), até obtenção de massa seca constante. A seguir, o material seco foi submetido a hidrodestilação, utilizando-se aparelho tipo “Clevenger” até a não observação de condensação de óleo. O óleo foi separado da fase aquosa e armazenado em recipiente de vidro opaco, mantendo-se à temperatura de -20 °C até o momento da utilização. O cálculo do rendimento foi determinado em mL.100g⁻¹ de massa seca (MS).

3.4 Caracterização fitoquímica do óleo essencial de *R. officinalis* L.

A caracterização fitoquímica do óleo essencial foi obtida por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG/MS), utilizando um cromatógrafo gasoso HP 6890 equipado com uma coluna capilar (30 m x 0,25 mm, espessura filme 0,25 µm), interfaciado com um detector seletivo de massas HP 5973 operando com energia de ionização de 70 eV. O gás de arraste foi o Hélio, com uma vazão de 0,7 mL.min⁻¹, o volume de injeção foi de 1 µL de solução do óleo em diclorometano com uma taxa de divisor de fluxo de 1:100, temperaturas do injetor e fonte de íons de 250 °C e 280 °C, respectivamente. A temperatura foi programada de 80 °C à 180 °C, com aumento de 3 °C.m⁻¹, de 180 °C à 300°C, com aumento de 10 °C.m⁻¹, ao atingir a temperatura de 300 °C, a qual foi mantida por 10 min. A identificação dos constituintes dos óleos foi realizada com base nos índices de retenção e por comparação dos dados dos espectros com aqueles constantes nas bibliotecas utilizando um índice de similaridade de 80 %.

3.5 Análise antioxidante *in vitro*: atividade sequestradora do radical DPPH

As diferentes amostras de óleo essencial de *R. officinalis* L. foram avaliadas quanto à atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH. No teste de DPPH, a habilidade do óleo essencial agir como doador de átomos de H⁺ ou elétrons na transformação do DPPH na forma reduzida de DPPH-H (difenílpicrilhidrazina) é medida através de espectroscopia de UV. O DPPH é um radical livre, estável em temperatura ambiente, que produz uma solução violeta em metanol. Na presença de componentes antioxidantes, o DPPH é reduzido, produzindo uma solução metanólica transparente.

A atividade antioxidante dos diferentes óleos essenciais foi determinada pela capacidade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), conforme descrito por BRAN-WILLIAMS et al. (1995). Este método tem como base a redução da absorvância na região visível (comprimento de onda de 517 nm) do radical DPPH por antioxidantes (BRAN-WILLIAMS et al., 1995; LU e FOO, 2001).

Para a avaliação da atividade antioxidante, foram preparadas soluções metanólicas de cada óleo essencial na concentração de 1mg.mL⁻¹, as quais diluídas sequencialmente (0.25 a 12.5 µg.mL⁻¹). Em seguida, 500 µL das soluções metanólicas em diferentes concentrações foram adicionadas em 1 mL da solução de DPPH (0.1 mM). Após homogeneização, as amostras foram incubadas protegidas da luz em temperatura ambiente durante 30 min. A absorvâncias das amostras foi determinada contra um branco no comprimento de onda de 517 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e o percentual do radical DPPH nas amostras foi calculado de acordo com a equação 1:

$$\text{DPPH}(\%) = 100 \times [(A_{\text{amostra}} - A_{\text{branco}}) / A_{\text{controle negativo}}] \quad \text{Equação 1}$$

Sendo: DPPH: o reagente 2,2-difenil-1-picril-hidrazil; A_{amostra} : a absorvância da amostra (com DPPH); A_{branco} : a absorvância do branco (sem DPPH) e $A_{\text{controle negativo}}$: a absorvância do controle negativo (100% de DPPH)

A percentagem de atividade antioxidante correspondente à quantidade de DPPH consumida pelo antioxidante, sendo que a quantidade de antioxidante

necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% foi denominada de concentração efetiva (CE₅₀). Quanto maior o consumo de DPPH por uma amostra, menor é sua CE₅₀ e maior a sua atividade antioxidante.

3.6 Atividade antimicrobiana do óleo essencial de *R.officinalis* L frente a cinco cepas de *Staphylococcus aureus* e duas cepas de *Klebsiella pneumoniae*, causadoras de mastite bovina

A avaliação da atividade antimicrobiana dos diferentes óleos essenciais de *R. Officinalis* L. frente a cepas de Mastite bovina em cultura bacteriana foi determinada através do Teste de Difusão em Discos, de acordo com o protocolo estabelecido pela padronização do Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI, 2010). Estas análises foram realizadas em parceria com a Profa. Dra. Viviane de Oliveira Freitas Lione do Laboratório de Bioensaios Farmacêuticos - LaBioFar da Faculdade de Farmácia da UFRJ.

Para o estudo foram utilizadas 5 cepas de *Staphylococcus aureus* e 2 cepas de *Klebsiella pneumoniae*, isoladas de infecções subclínicas de mastite em matrizes leiteiras. Essas cepas foram gentilmente fornecidas pela EMBRAPA - GADO DE LEITE, Juiz de Fora, MG. As bactérias foram cultivadas no meio contendo bactopectonas (1%); extrato de lêvedo (1%); cloreto de sódio (0,38%); NaHPO₄.2H₂O (0,11%) e (2%) de ágar-ágar para a preparação de meio sólido, que foi autoclavado à 120°C sobre a pressão de 1 atm, durante 30 minutos. O controle biológico assim como condições de crescimento, seguiu a padronização do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010).

Foi realizado um teste qualitativo, denominado Teste de Difusão em Disco. Para este um volume de 10 µl das amostras de cada óleo essencial foram adicionadas a discos de papel Whatman nº1 (5 mm de diâmetro, Larboclin) e colocados sobre o meio Mueller Hinton Agar (Himedia), em placa previamente inoculada com as diferentes cepas bacterianas para realização dos ensaios. Antibacterianos de uso clínicos (vancomicina e ciprofloxacina) foram utilizados como controles positivos, enquanto que o DMSO e óleo de girassol foram utilizados como controle negativo em condições idênticas das amostras de óleo essencial testadas.

Culturas bacterianas com 5 horas de crescimento à 37°C ($1,0 \times 10^9$ UFC/mL) foram diluídas 1:100 em solução salina 0,85%. Em seguida, 400µl da solução contendo a cepa bacteriana diluída foi pipetado e espalhado em uma placa com meio de cultura de Mueller Hinton Agar. O espalhamento foi realizado com uma alça de Drigalsky de modo que as colônias ficassem distribuídas homoganeamente, ocupando assim toda a superfície do meio de cultura. As placas de Petri foram incubadas à 37°C por 30 minutos. Após esse tempo, os discos embebidos com as cinco diferentes amostras de óleo essencial de *R. officinalis* L. foram depositadas com o auxílio de uma pinça estéril sobre a superfície do meio sólido semeado. As placas foram reincubadas em estufa a temperatura de 37°C por um período de 24 horas.

A sensibilidade foi determinada através da leitura das placas e constatação da presença ou ausência do halo de inibição. A interpretação dos resultados ocorreu através da medição do diâmetro do halo de inibição de crescimento, onde halos maiores ou iguais a 9 mm são considerados halos de inibição significativos, de acordo com o protocolo estabelecido pela padronização do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2010). Foram realizados no mínimo três ensaios e em duplicata e os resultados são expressos como média e desvio padrão de todos os experimentos.

A análise estatística dos dados foi realizada utilizando-se o software SISVAR 5.1 e as médias foram comparadas utilizando-se o teste de Scott-Knott a 5%.

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Caracterização dos campos de cultivo de *R. officinalis* L.

4.1.1 Localização geográfica dos campos de cultivo

A latitude, longitude, elevação do terreno medidas por meio de leitura direta em equipamento GPS e seus respectivos valores estão apresentados na Tabela 1. Na qual pode ser verificado uma variação entre 330 m a 720 m de altitude. O que caracteriza condições climáticas diversas entre os campos de cultivo.

Tabela 1: Localização dos 5 campos de cultivo orgânico de *R. officinalis* L., localizados na região da Encosta da Serra Geral do Estado de Santa Catarina

Am	Localização	Latitude	Longitude	Altitude
01	Anitápolis	27° 48' 03,48"S	49° 08' 25,47"W	664,15 m
02	Anitápolis	27° 54' 53,46"S	49° 06' 41,68"W	621,37 m
03	Santa Rosa de Lima	28° 01' 21,86"S	49° 06' 30,42"W	330,10 m
04	Santa Rosa de Lima	28° 00' 20,12"S	49° 02' 36,71"W	720,63 m
05	Santa Rosa de Lima	28° 00' 41,51"S	49° 04' 33,69"W	663,19 m

4.1.2 Identificação botânica

Ramos de plantas em floração de *R. officinalis*, (Figura 2) dos 5 diferentes campos selecionados para o estudo, foram analisados por análise macroscópica e microscópica, as 5 diferentes amostras de *R. officinalis* L. e as amostras foram identificadas como sendo da mesma espécie.

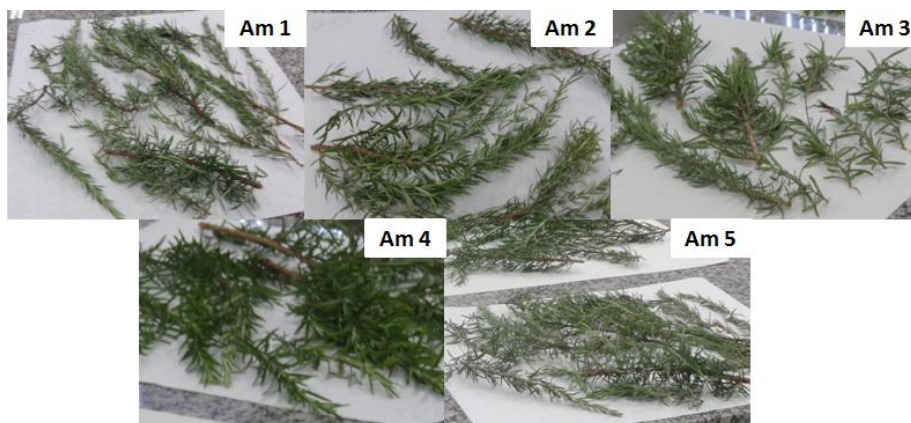


Figura 2: Ramos de *R. officinalis* L. dos 5 diferentes campos selecionados para o estudo

4.2 Análise do solo dos campos de cultivo de *R. officinalis* L.

Na Tabela 2 pode ser visualizada a caracterização física das 5 amostras de solo quanto a composição granulométrica, apresentando especificamente a composição de argila, areia e silte.

Tabela 2: Análise física das amostras de solo coletadas nos 5 campos de cultivo orgânico de *R. officinalis* L., localizados na região da Encosta da Serra Geral do Estado de Santa Catarina

Composição Granulométrica	Am1	Am 2	Am3	Am 4	Am5
Argila g/kg	200	450	350	350	425
Areia g/kg	775	300	400	425	375
Silte g/kg	25	250	250	225	200

Foram identificados diferentes tipos de solos entre os 05 campos de cultivo, destacando-se gleissolo úmico eutrófico de textura média presente nas Am1 e Am3, com os percentuais de argila de 20% e 35% respectivamente, como pode ser verificado na **Tabela 2**. Já os campos 4 (Am 4) e 5 (Am 5) são formados por latossolos brunos úmicos de texturas média e argilosa, respectivamente. A área 2 (Am 2) é formada por um latossolo vermelho-amarelo álico de textura argilosa e corresponde ao único campo de cultivo estabelecido num solo pouco manejado e ocupado por pastagem, sendo os demais campos estabelecidos em áreas agrícolas. Entretanto, apesar da diversidade de solos e percentual de argila, os cinco campos de cultivo foram instalados em terrenos bem drenados e com características físicas favoráveis ao cultivo de *R. officinalis* L..

A composição química do solo dos 5 campos de cultivo, no que tange a pH, acidez, íons presentes, carbono orgânico, capacidade de troca catiônica (CTC), saturação por Al^{3+} e Na^{+} , das diferentes amostras de solo pode ser observada na Tabela 3.

Tabela 3: Análise Química das amostras de solo coletadas nos 5 campos de cultivo orgânico de *R. officinalis* L., localizados na região da Encosta da Serra Geral do Estado de Santa Catarina.

Análise Química	Am 1	Am 2	Am 3	Am 4	Am5
pH em H ₂ O	5,00	4,30	6,00	5,60	5,80
Acidez(cmol ₂ /dm ³)	5,40	9,70	2,50	4,30	2,70
P ⁺ (mg/dm ³)	104	7,90	121	22,20	92,40
Ca ²⁺ (cmol ₂ /dm ³)	5,30	1,40	5,00	4,20	8,80
Mg ²⁺ (cmol ₂ /dm ³)	2,30	0,50	1,00	1,30	1,70
K ⁺ (cmol ₂ /dm ³)	0,54	0,24	0,33	0,33	0,61
Na ⁺ (cmol ₂ /dm ³)	0,07	0,06	0,06	0,06	0,09
Al ³⁺ (cmol ₂ /dm ³)	0,30	5,50	0,10	0,20	0,00
B (mg/dm ³)	0,18	0,20	0,23	0,43	0,48
Cu ²⁺ (mg/dm ³)	2,84	1,37	1,28	0,62	0,92
Fe ²⁺ (mg/dm ³)	295	91,40	52,70	803	127
Mn ²⁺ (mg/dm ³)	45,10	70,10	73,10	34,60	121
Zn ²⁺ (mg/dm ³)	26,30	5,70	18,20	5,40	33,60
S ⁺ (mg/dm ³)	3,90	5,20	4,70	6,60	5,80
Soma bases (cmol ₂ /dm ³)	8,21	2,20	6,39	5,89	11,20
CTC* (cmol ₂ /dm ³)	13,60	11,90	8,89	10,20	13,90
V – Sat por bases (%)	60	18	72	58	81
Saturação por Al ³⁺ (%)	3,50	71,40	1,50	3,30	0,00
Saturação por Na ⁺ (%)	0,90	2,70	0,90	1,00	0,80
Carbono orgânico (g/kg)	16,20	27,90	17,70	33,50	32,90
Matéria Orgânica (g/kg)	27,90	48	30,40	57,60	56,60

*CTC: Capacidade de troca catiônica

Quanto ao aspecto de fertilidade os campos de cultivo podem ser diferenciados em três perfis distintos, ou seja, de baixa, média e alta fertilidade, em função das características analíticas evidenciadas na **Tabela 3**, juntamente com os aspectos relacionados ao manejo de fertilidade, histórico da área e nível de correção dos solos.

O solo com baixa fertilidade foi encontrado no campo de cultivo 2 e corresponde a um terreno anteriormente ocupado com pastagem com níveis de fertilidade equivalentes dos solos ocupados por vegetação nativa. Esta evidência pode ser confirmada na **Tabela 3**, que apresenta o nível de cálcio em $1,4 \text{ cmol}_2/\text{dm}^3$ e o nível de magnésio em $0,5 \text{ cmol}_2/\text{dm}^3$, ou seja, muito baixos. Apresenta o nível de Al em $5,5 \text{ cmol}_2/\text{dm}^3$, o que resulta numa saturação de 71,4% deste íon. Com efeito, apresenta uma saturação por bases de somente 18%. O que o caracteriza como um solo inapto para o cultivo de plantas cultivadas e, em especial, inapto para o cultivo de *R. officinalis* L, como pode ser percebido pelo baixo desenvolvimento das plantas ali cultivadas.

Já nos campos de cultivo 01, 03 e 04 (Am 1, Am 3 e Am4), que correspondem a áreas de uso agrícola, possuem um perfil mediano de fertilidade. Os níveis de cálcio variam de 4 a $5 \text{ cmol}_2/\text{dm}^3$ e o magnésio se apresenta acima de $1,0 \text{ cmol}_2/\text{dm}^3$, com níveis de alumínio trocável variando de 0,1 a $0,3 \text{ cmol}_2/\text{dm}^3$. Já o nível de fósforo varia de 22,2 ppm no campo de cultivo 04 a 121 ppm no campo de cultivo 03. Características próprias de solos corrigidos com calagem, e que os torna aptos para o cultivo de plantas anuais como *R. officinalis* L, como pode ser comprovado pelo bom desenvolvimento das plantas nestes campos de cultivo.

Por fim, foi encontrado no campo de cultivo 05 (Am 5) um perfil de fertilidade alta, com o nível de fósforo em $92,4 \text{ mg}/\text{dm}^3$, assim como os níveis de cálcio e magnésio, respectivamente em $8,8 \text{ cmol}_2/\text{dm}^3$ e em $1,7 \text{ cmol}_2/\text{dm}^3$, uma relação Ca:Mg, em 5:1, muito favorável à disponibilização do íon cálcio para as plantas. Apresentou ausência de Al^{3+} característica de solos corrigidos com elevadas doses de calagem. Com efeito, apresentou uma saturação por bases de 81%. Porém o desenvolvimento das plantas foi equivalente ao campo 04 (Am 4), indicando que níveis elevados de nutrientes não resultaram em melhor desenvolvimento das plantas de *R. officinalis* L comparado a solos com níveis medianos de fertilidade.

Abdelaziz et al (2007), estudaram a influência do composto, de microrganismos eficientes e fertilizantes NPK, no crescimento, composição química e produção de óleo essencial do alecrim. Concluíram que o composto e os microrganismos eficientes poderiam substituir fertilizantes convencionais no cultivo do alecrim, minimizando a poluição ambiental com esses compostos.

Bernstein et al (2007), estudaram o efeito da irrigação e o uso de efluente urbano nas características do óleo essencial do alecrim e concluíram que a irrigação com o efluente tratado, comparado com a água potável, não influenciou no desenvolvimento na produção de biomassa, na porcentagem de folhas de biomassa total, no efeito oxidante do óleo essencial e nos índices de compostos anti oxidantes fenólicos selecionados.

Moretti et al (1998), estudaram a absorção de ferro na produção e composição do óleo de alecrim cultivado em solos calcáreos do norte da Sardênia (Itália). As altas concentrações de verbenona no óleo essencial, devidas ao tratamento com ferro, aumentam seu valor para a indústria de perfumaria.

4.3 Óleo essencial de *R. officinalis* L.

Após a coleta das plantas de cada campo de cultivo, foi determinada a massa fresca total da parte aérea, constituída por caules e folhas mais pecíolos. Para a determinação da massa seca total, o material foi seco em estufa com circulação de ar à temperatura de 30°C até obtenção de massa seca constante. Os resultados da perda por dessecação de diferentes amostras de *R. Officinalis* L pode ser analisada na **Tabela 4**.

Tabela 4: Perda por dessecação de amostras de *R. Officinalis* L. coletadas em 5 campos de cultivo orgânico, localizados na região da Encosta da Serra Geral do Estado de Santa Catarina.

Amostra	Peso fresco (g)	Peso seco (g)	Perda por dessecação (g)	Umidade (%)	Média	SD
1.1	101,04	33,30	67,74	67,04		
1.2	102,98	34,40	68,58	66,60	67,84	1,782
1.3	115,64	34,83	80,81	69,88		
2.1	101,66	48,42	53,24	52,37		
2.2	101,94	44,60	57,34	56,25	54,40	1,945
2.3	104,82	47,61	57,21	54,58		
3.1	102,81	40,02	62,79	61,07		
3.2	116,88	47,95	68,93	58,98	60,42	1,251
3.3	111,22	43,15	68,07	61,20		
4.1	102,2	38,26	63,94	62,56		
4.2	116,88	47,95	68,93	58,98	60,91	1,812
4.3	111,22	43,15	68,07	61,20		
5.1	119	43,31	75,69	63,61		
5.2	118,32	40,42	77,9	65,84	65,51	1,768
5.3	121,96	40,13	81,83	67,10		

* SD = desvio padrão

A porcentagem de folhas presentes nas amostras está apresentada na Figura 3.

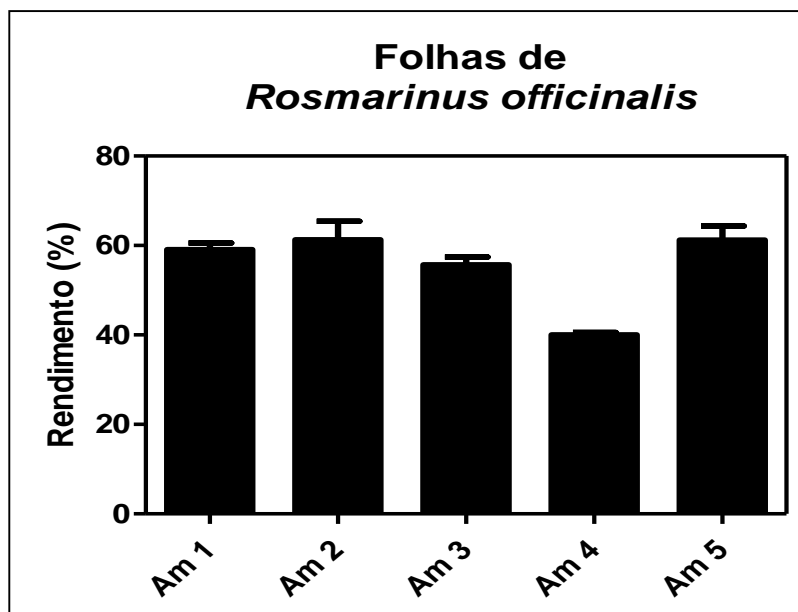


Figura 3: Porcentagem de folhas presentes nas amostras de *R. Officinalis* L. coletadas de 5 campos de cultivo orgânico, localizados na região da Encosta da Serra Geral do Estado de Santa Catarina.

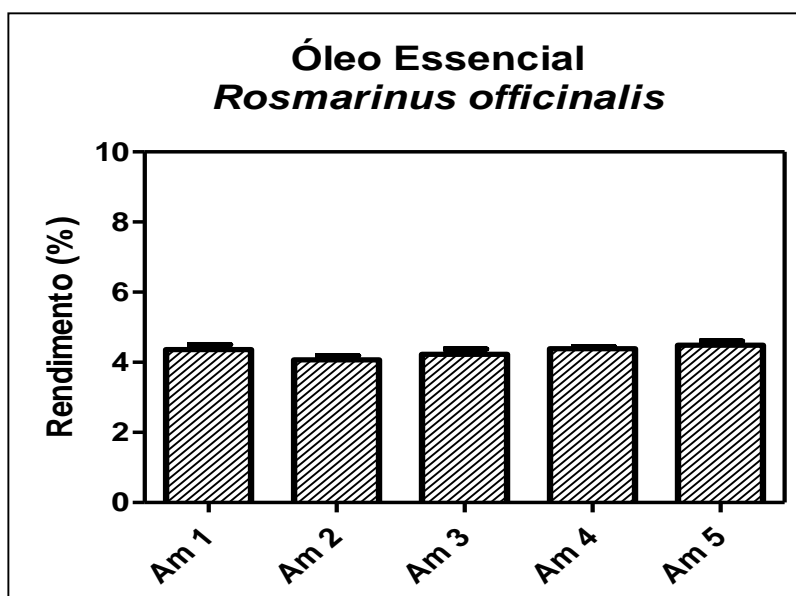


Figura 4: Rendimento do óleo essencial de *R. Officinalis* obtidos de amostras de 5 campos de cultivo orgânico, localizados na região da Encosta da Serra Geral do Estado de Santa Catarina.

Através da hidrodestilação, a composição do óleo essencial pode ser influenciada pelo contato com a água, tempo de extração e velocidade de

aquecimento. Para a obtenção do óleo essencial *R. Officinalis* L., foram utilizados os parâmetros descritos por Prins et al. (2006) sendo, um aquecimento lento com início de ebulição aos 60 min, e o tempo de extração foi fixado em 90 min. Este tempo de 90 min favoreceu a obtenção de um volume representativo de óleo essencial (0,8 à 1,3 mL).

4.4 Caracterização fitoquímica do óleo essencial de *R. officinalis* L.

A identificação e a porcentagem de cada componente químico identificado estão demonstradas na Tabela 5.

Tabela 5: Composição química e porcentagem dos compostos presentes nas diferentes amostras do Óleo essencial de *R. officinalis* L. obtidas de 05 campos de cultivo distintos localizados na região da Encosta da Serra Geral do Estado de Santa Catarina

Composto	TR*	Composição do Óleo essencial de <i>R. officinalis</i> L. (%)				
		Am 1	Am 2	Am 3	Am 4	Am 5
<i>Monoterpenos</i>						
γ -terpineno	10.46	1.29	1.09	1.47	1.82	1.47
Linalol	12.06	3.97	3.27	1.60	1.04	3.27
Borneol	14.92	3.13	3.91	3.48	3.11	1.61
α -pineno	14.16	25.42	27.94	30.45	27.14	25.93
α -terpineol	15.99	2.46	2.22	2.77	1.87	3.09
1,8-cineol	9.52	33.04	30.94	35.42	35.20	32.92
% total	-	69.31	69.37	75.19	70.18	68.29
<i>Sesquiterpenos</i>						
Cariophyllene	6.82	23.63	24.03	16.09	23.31	16.47
Verbenona	16.86	4.75	4.00	4.95	3.96	6.87
farneseno	11.61	1.03	1.13	1.07	1.43	2.15
% total	-	29.41	29.16	22.11	28.7	25.49
<i>Outros</i>						
3-octanone	20.22	1.28	1.47	2.70	1.12	6.22

Analisando os resultados apresentados, verifica-se a presença 10 compostos diferentes, sendo 6 pertencente a classe dos Monoterpenos e 3 Sesquiterpenos e 1 outro componente. Considerando o grupo químico dos componentes, todas as diferentes amostras Am 1, Am 2, Am 3, Am 4 e Am 5 apresentam uma maior porcentagem de compostos pertencentes a classe dos Monoterpenos, sendo 69.31, 69.37, 75.19, 70.18 e 68.29 %, respectivamente. Dentre os compostos pertencentes a esta classe, o 1,8-cineol e α -pineno foram os compostos majoritários, apresentando uma variação de concentração de 30.94 à 35.42 %; e 25.42 à 30.45%, respectivamente.

As diferentes amostras do óleo essencial apresentaram pequena variação na sua composição, a qual pode estar relacionada a diferenças no solo de cultivo das plantas de *R. officinalis* L. Entretanto, esta diferença na concentração dos constituintes dos óleos não é estatisticamente significativa. Estes resultados estão em acordo com os resultados obtidos por Hussain et al. (2010) e ainda Celik et al. (2007), os quais também identificaram 1,8-cineol e α -pineno como compostos majoritários.

Flaminio et al (2002), estudaram o potencial produtivo de dois diferentes ecotipos de alecrim cultivados na Toscana (Itália), e encontraram diferenças significativas na produção de matéria seca. O conteúdo de óleo essencial foi similar, mas a maior diferença foi no teor de 1,8 cineol (6,6% e 37,9%) em Cevoli e Lunigiana, respectivamente, os dois ecotipos. O ecotipo Cevoli foi classificado como do quimiotipo alfa-pineno, sendo ainda o mais conveniente para a extração de óleo pela abundância de folhas e flores.

Boutekdjiret et al (1999), estudaram a variação da composição do alecrim algeriano em função do ciclo de vida da planta e concluíram que o melhor estágio para a colheita é no pleno florescimento.

4.5 Atividade antioxidante do óleo essencial de *R. officinalis* L.

Os resultados obtidos após a determinação da atividade antioxidante das diferentes amostras de óleo essencial de *R. officinalis* L. estão apresentados no **Tabela 6**. Quanto menor o valor do CE₅₀ maior a atividade antioxidante.

Tabela 6: Atividade antioxidante expressa em CE₅₀ (µg.ml⁻¹) das diferentes amostras de óleo essencial de *R. officinalis* L. obtidas de 05 campos de cultivo distintos localizados na região da Encosta da Serra Geral do Estado de Santa Catarina, pelo método do sequestro do radical livre DPPH.

Óleo essencial <i>R. officinalis</i> L	CE₅₀ (µg.ml⁻¹)
Am 1	33.44± 1.573
Am 2	35.31± 0.851
Am 3	36.43± 2.316
Am 4	34.75± 1,283
Am 5	35.29± 3,212

Analisando os resultados do CE₅₀ das diferentes amostras de óleo essencial de *R. officinalis* L. obtidas de 05 campos de cultivo distintos, obtidos pelo método do sequestro do radical livre DPPH, verifica-se uma atividade antioxidante variando de 33.44 à 36.43 µg.ml⁻¹. Valores semelhantes (36.0µg.ml⁻¹) foram encontrados por Mata et al. (2007).

Sabe-se que a atividade antioxidante de um óleo essencial está primeiramente relacionada à genética da planta e as condições edafoclimáticas do crescimento da mesma; e como segundo parâmetro, no processo de extração do óleo. Com base nos resultados obtidos, pode-se dizer que as diferentes condições edafoclimáticas do cultivo da *R. officinalis* L, não apresentaram influência na atividade antioxidante das diferentes amostras de óleo essencial.

Zaouali et al (2010), estudaram o óleo essencial de duas variedades de alecrim (*Troglodytorum* e *Typicus*) nas atividades antimicrobiana e antioxidante. As variedades eram nativas de diferentes bioclimas da Tunísia. As duas variedades

eram do quimiótipo 1,8 cineol/cânfora. O óleo da variedade *Troglodytorum* mostrou um efeito bactericida maior. A atividade antioxidante foi encontrada nos óleos da variedade *Troglodytorum* e em uma população da variedade *Typicus* do bioclima semiárido superior

Erkan et al. (2008), encontraram que o extrato de alecrim apresentou índice de fenólicos mais elevado que *Nigella sativa* L., o que explicaria a atividade antioxidante maior do extrato de alecrim.

4.6 Atividade antibacteriana do óleo essencial de *R. officinalis* L. frente a cinco cepas de *Staphylococcus aureus* e duas cepas de *Klebsiella pneumoniae*, causadoras de mastite bovina

Na Tabela 7 encontra-se a reação média geral de sete culturas de bactérias causadoras de mastite bovina frente a cinco amostras de óleo essencial de *R. officinalis* L. Observa-se que houve diferença estatística para a reação geral das cepas de bactéria testadas mediante análise dos dados do halo de inibição em meio de cultura em placa de Petri, onde as cepas de *Staphylococcus aureus* S1, S2 e S3 apresentaram maior sensibilidade aos tratamentos com óleo essencial.

Tabela 7. Reação média geral de sete culturas de bactérias causadoras de mastite bovina a cinco amostras de óleo essencial de *R. officinalis* L.

Bactérias/Óleo	Halo de inibição médio (mm)
K2	8,53 a
K1	9,60 a
S5	9,67 a
S4	9,80 a
S3	10,60 b
S2	10,87 b
S1	11,00 b

Obs. médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Tabela 8. Efeito médio geral de cinco amostras de óleo essencial de *R. officinalis* L. sobre sete culturas de bactérias causadoras de mastite bovina

Bactérias/Óleo	Halo de inibição médio (mm)
Am2	9,38 a
Am1	9,76 a
Am3	10,04 a
Am5	10,28 a
Am4	10,57 a

Obs. médias seguidas pelas mesmas letras, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knott a 5%.

Na Tabela 8 observamos que o efeito médio geral de cinco amostras de óleo essencial de *R. officinalis* L. sobre sete culturas de bactérias causadoras de mastite bovina, não tendo sido registrado efeito de tratamento.

Tabela 9. Reação média de sete culturas de bactérias causadoras de mastite bovina frente a cinco amostras de óleo essencial de *R. officinalis* L. Halo de inibição em mm.

Bactérias/Óleo	Am1	Am2	Am3	Am4	Am5
K1	9,33aA	9,00aA	10,00aA	9,66aA	10,00aA
K2	9,00aA	8,33aA	8,33aA	8,33aA	8,66aA
S1	10,33aA	11,00aA	11,00aA	11,33aA	11,33aA
S2	10,00aA	11,00aA	10,66aA	11,66aA	11,00aA
S3	10,33aA	10,33aA	10,00aA	11,00aA	11,33aA
S4	9,66aA	9,66aA	9,33aA	10,00aA	10,33aA
S5	7,00 aB	9,00 aB	11,00aA	10,00aA	11,33aA

Obs. médias seguidas pelas mesmas letras, minúsculas nas colunas e maiúsculas nas linhas, não diferem estatisticamente pelo teste de Scott-Knotta 5%.

Na Tabela 9 observa-se uma interação para a cepa de bactéria S5 apenas com as amostras de óleo essencial 1 e 2 havendo diferença estatística no halo de inibição do crescimento bacteriano em agar.

Em relação ao óleo essencial de *R. officinalis* L. Tirumalasetty et al. (2014) obtiveram que *Staphylococcus aureus* e *E. coli* apresentaram halo de inibição semelhante seguido por *Pseudomonas aeruginosa*.

Pintore et al (2002), estudaram a composição química e a atividade antimicrobiana do alecrim quimiotipo alfa-pineno/verbenona/acetato de bornila, de

duas procedências e verificaram que bactérias gram-positivas eram mais sensíveis que as gram-negativas.

Gachkar et al. (2007) compararam a atividade antimicrobiana de alecrim e de cominho contra *E. coli*, *S. aureus* e *L. monocitogenes*, em relação ao óleo de tomilho tomado como referência. O óleo do quimiotipo alfa-pineno/linalol do alecrim apresentou melhores resultados que o óleo de cominho. Os óleos essenciais de alecrim e de cominho podem ser considerados potentes agentes da preservação de alimentos.

Inatani et al. (2005) estudaram a composição e a atividade antimicrobiana do alecrim. Os principais componentes do óleo essencial: alfa pineno, 1,8 cineol, cânfora, verbenona e borneol. O *S. aureus* foi a bactéria mais sensível ao óleo de alecrim.

Mangena & Muyram (1999) testaram 41 cepas microbianas com o óleo essencial de alecrim por difusão em agar (meio nutriente e antibiótico). A eficiência antimicrobiana esteve dependente das características do óleo e das cepas.

Abutbul et al. (2004), testaram 16 acessos de alecrim, cujos extratos foram difundidos em agar. O extrato de acetato de etila, do acesso 1, apresentou os melhores resultados; administrado via alimento o extrato seco reduziu significativamente a taxa de mortalidade em tilápias.

Angioni et al (2004), coletaram amostras de alecrim em diferentes latitudes e longitudes da Sardênia (Itália). Os principais componentes do óleo essencial eram alfa-pineno, borneol, canfeno, cânfora, verbenona e bornilacetato. A atividade antimicrobiana do alecrim da Sardênia, mostrou-se fraca e induziu o crescimento de *Fusarium graminearum*.

Celiktas et al (2007) determinaram a variação da atividade antimicrobiana do óleo essencial do alecrim, incluindo *S. aureus* e *K. pneumoniae*. Os resultados indicaram que as bactérias testadas eram sensíveis aos óleos essenciais. Atividade antimicrobiana variou, de acordo com a procedência e a estação.

Dias et al. (2000), estudaram a atividade antiulcerogênica do extrato hidroalcoólico cru de alecrim. Obtiveram que o composto apresenta substâncias ativas que incrementam grupos sulfidril não proteicos na mucosa.

5.0 CONCLUSÃO

Não foi observada diferença significativa entre as amostras de óleo essencial quanto às características fitoquímicas observadas, as quais resultaram numa importante ação de inibição também semelhante frente às cepas de bactérias patogénicas testadas.

Os resultados apontam para a importância do estudo do potencial deste óleo essencial como um agente de controle e profilaxia frente a determinadas cepas de *Staphylococcus aureus*, causadoras da mastite bovina.

As características antioxidantes obtidas das diferentes amostras também não diferiram entre si.

Os resultados sugerem que diferentes condições edafoclimáticas e diferentes condições de cultivo de *R. officinalis* L. não alteraram significativamente a composição do óleo essencial obtido assim como as atividades químicas e biológicas testadas.

Os resultados sugerem um potencial promissor de seu cultivo comercial em sistemas familiares orgânicos de produção visando à produção de óleo essencial.

6.0 REFERÊNCIAS

ABDELAZIZ,M.E., POKLUDA,R., ABDELWAHAB, M.M. Influence of compost, microorganisms and NPK fertilizer upon growth, chemical composition, and essential oil production of *R. officinalis* L. Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca, v 35, n. 1 p. 86-90. 2007.

ABUTBUL,S., GOLAN-GOLDHIRSH,A., BARAZANI,O., ZILBERG,D.Use of *R. officinalis* as a treatment against *Streptococcus iniae* in tilapia (*Oreochromis* sp.) AquacultureV. 238, n. 1–4, p. 97–105. 2004.

ANGIONI. A. ,BARRA, A. , CERETI, E., BARILE, D. , COÏSSON J.D. , ARLORIO, M. ,DESSI, S., CORONEO, V. ; CABRAS, P.Chemical Composition, Plant Genetic Differences, Antimicrobial and Antifungal Activity Investigation of the Essential Oil of *R. officinalis* L. J. Agric. Food Chem., , 52 (11), pp 3530–3535. **2004**

BENEDETTE, M. F.; SILVA, D., ROCHA, F. P. C.; SANTOS, D. A. N; COSTA, E. A. D.; Mastite Bovina, Revista científica eletrônica de medicina veterinária, ano VI, n. 11, 2008.

BEN FARHAT, M., CHAOUCH-HAMADA, R., SOTOMAYOR, J.A., LANDOULSI, A., JORDÁN, M. Antioxidant potential of *Salvia officinalis* L. residues as affected by the harvesting time. **Industrial Crops and Products**, v. 54, p. 78-85, 2014.

BEN FARHAT, M., LANDOULSI, A., CHAOUCH-HAMADA, R., SOTOMAYOR, J.A. JORDÁN, M. Characterization and quantification os phenolic compounds and antioxidant properties of *Salvia species* growing in different habitats. Ind. Crops and Products, v. 49, p. 904-914, 2013.

BERNSTEIN, N, CHAIMOVITCH, D; DUDAI, N.Effect of Irrigation with Secondary Treated Effluent on Essential Oil, Antioxidant Activity, and Phenolic Compounds in Oregano and Rosemary Agronomy Journal Vol. 101 No. 1, p. 1-10. 2007.

BOUTEKEDJIRET,C., BELABBES,R., BENTAHAR,F. & BESSIERE,J.M. Study of *R. officinalis* L. Essential Oil Yield and Composition as a Function of the Plant Life Cycle Journal of Essential Oil Research, v. 11, n. 2, p. 238-240.1999.

BOZIN, B., MIMICA-DUKIC, N., SAMOJLIK, I., JOVIN, E. Antimicrobial and antioxidant properties of Rosemary and sage (*R. officinalis* L. and *Salvia officinalis* L., Lamiaceae) essential oils. **J. Agric Food Chem.**, v. 55, p. 7879-7885, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluated antioxidant activity. **Food Sci. Technol.**, v. 28, p. 25-30, 1995.

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

BRUNETON, J. Farmagognosia, fitoquímica. Plantas Medicinales. Ed.1, Acribia S.A./Zaragosa, Espanha, 2.ed, 1099p., 2001.

CECHINEL-FILHO, V. BRESOLIN, T.M.B. et al. **Ciências farmacêuticas: contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos.** Itajaí: Univali, 2003.

CELIK TAS, O.Y., KOCABAS, E.E.H., BEDIR, E., VARDAR SUKAN, F., OZEK, T., BASER, K.H.C. Antomicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *R. officinalis*, depending on location and seasonal variations. **Food Chem.**, v. 100, p. 553-559, 2007.

CELIK TAS, O.Y., KOCABAS,E.E.H., BEDIR,E., SUKAN,F.V., OZEK,T., BASER, K.H.C. Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *R. officinalis*, depending on location and seasonal variations Food Chemistry, v. 100, n. 2, , p. 553–559. 2007.

COSER, S. M; LOPES, M.A.; COSTA, G.M., Mastite Bovina: controle e prevenção, Boletim Técnico - n.º 93 - p. 1-30 ano 2012

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Test for Bacteria That Grow aerobically. Approved Standard M07-A8. CLSI, Wayne, PA, 2009.

CUVELIER, M.E., BERSET, C., RICHARD, H. Antioxidant constituents in sage (*Salvia officinalis*). **J. Agric Food Chem.**, v. 42, p. 665-669, 1994.

DECKER, E.A., WELCH, B. Role of ferritin as a lipid oxidation catalyst in muscle food. **J. Agric Food Chem.**, v. 38, p. 674-677, 1990.

DIAS, P.C., FOGLIO, M.A., POSSENTI, A., CARVALHO, J.E. Antiulcerogenic activity of crude hydroalcoholic extract of *R. officinalis* L. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 69, n. 1, p. 57–62. 2000.

ERKAN, N., AYRANCI, G., AYRANCI, E. Antioxidant activities of rosemary (*R. officinalis* L.) extract, blackseed (*Nigella sativa* L.) essential oil, carnosic acid, rosmarinic acid and sesamol. *Food Chemistry*, v. 110, n. 1, p. 76–82. 2008. *European Pharmacopeia*, 4th ed.; Council of Europe: Strasbourg Cedex, France, 2002; Vol. 2.8.12, pp 183–184.

FLAMINI, G., CIONI, P.L., MORELLI, I., MACCHIA, M. ; CECCARINI, L. Main Agronomic–Productive Characteristics of Two Ecotypes of *R. officinalis* L. and Chemical Composition of Their Essential Oils. *J. Agric. Food Chem.*, v. 50, n.12, p. 3512–3517. **2002.**

GACHKAR, L., YADEGARI, D., REZAEI, M.B., THAGUIZADEH, M., ASTANEH, S.A., RASOOLI, I. Chemical and biological characteristics of *Cuminum cyminum* and *R. officinalis* essential oils. *Food Chemistry*, v. 102, n. 3, p. 898–904. 2007.

GULÇIN, I. Antioxidant activity of caffeic acid (3,4-dihydroxycinnamic acid). **Toxicol.**, v. 217, p. 213-220, 2006.

HENTZ, S.M. ; SANTIN, N.C. Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) contra *Salmonella* sp. *Evidência-Ciência e Biotecnologia* – editora.unoesc.edu.br, Joaçaba, v.7, n.2, p.93-100, jul/dez. 2007.

HUSSAIN, A.I. ; ANWAR, F. ; CHATHA, S.A.S. ; JABBAR, A. ; MAHBOOB, S. ; NIGAM, P.S. *R. officinalis* essential oil : antiproliferative, antioxidant and antibacterial activities. *Brazilian Journal of Microbiology*, v. 41, p. 1017-1078, 2010.

INATANI,R., NAKATANI,N. ; FUWA,H. Antioxidative Effect of the Constituents of Rosemary (*R. officinalis* L.) and Their Derivatives. *Agricultural and Biological Chemistry*, v. 47, n. 3, p. 521-528.1983.

LORENZI, H ; MATOS, F.J. *Plantas Medicinais do Brasil : Nativas e Exóticas Cultivadas*.1.ed. Nova Odessa :Instituto Plantarum, 512p., 2006.

LU, Y. ; FOO, L.Y. Antioxidant activities of polyphenols from sage (*Salvia officinalis*). **Food Chem.**, v. 75, p. 197-202, 2001.

MANGENA, T., MUYIMA, N. Y. O. Comparative evaluation of the antimicrobial activities of essential oils of *Artemisia afra*, *Pteronia incana* and *R. officinalis* on selected bacteria and yeast strains letters in *Applied Microbiology*, v. 28, n. 4 p. 291–296. 1999.

MATA, A. T. et al. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of five plants used as Portuguese food spices. **Food Chemistry**, Lisbon, v. 103, n. 3, p. 778-786, 2007.

MAY, A.; SUGUINO, E.; MARTINS, A.N.; BARATA, L.E.S.; PINHEIRO, M.Q. Produção de biomassa e óleo essencial de alecrim (*R. officinalis* L.) em função da altura e intervalo entre cortes *Rev. Bras. Pl. Med.*, Botucatu, v.12, n.2, p.195-200, 2010.

MEZIANE-ASSAMI, D., TOMAO, V., RUIZ, K., MEKLATI, B.Y., CHEMAT, F. Geographical Differentiation of Rosemary Based on GC/MS and Fast HPLC Analyses *Food Analytical Methods*, V. 6, n. 1, pp 282-288 2013.

MORETTI, M.D.L., PEANA, A.T., PASSINO, G.S., BAZZONI, A.; SOLINAS, V. Effects of Iron on Yield and Composition of *R. officinalis* L. Essential Oil *Journal of Essential Oil Research*, v.10, n.1, p. 43-49. 1998.

OLIVEIRA, J., P&D de uma cadeia produtiva sustentável de óleos essenciais orgânicos: Convênio nº 01-13-0189-00 CFAE-Finep. Finep, Brasília/DF, 14 p., 2011.

PERINI, S. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus agalactiae* isolados de mastite bovina (Dissertação de Mestrado) UFLA, 2013, 70pp.

PINTORE, G., USAI, M., BRADESI, P., JULIANO, C., BOATTO, G., TOMI, F., CHESSA, M., CERRI, R.; CASANOVA, J. Chemical composition and antimicrobial activity of *R. officinalis* L. oils from Sardinia and Corsica. *Flavour and Fragrance Journal*, v. 17, n. 1, p. 15–19, 2002.

POVH, J.A. ; ONO, E.O. Rendimento de óleo essencial de *Salvia officinalis* L. sob ação de reguladores vegetais. **Acta Sci. Biol. Sci.**, v. 28, p. 189-193, 2006.

PREZOTTO, L. L. Programa de Agroindustrialização da Produção da Agricultura Familiar : Experiência da Rede Agreco de Agroindústrias da Agricultura Familiar. MDA, Brasília/DF, 33 p., 2010.

RIBEIRO, G.F., DINIZ, R.C. Plantas aromáticas e medicinais: cultivo e utilização. Londrina: IAPAR, 2008.

SANTOYO, S.; CAVERO, S.; JAIME, L.; IBAÑEZ, E.; SEÑORÁNS, F.J.; REGLERO, G. Chemical Composition and Antimicrobial Activity of *R. officinalis* L. Essential Oil Obtained via Supercritical Fluid Extraction. *Journal of Food Protection*, n. 4, p.790-795.2005.

SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais : a necessária interação da indústria com a acadêmica. **Rev. Bras. de Farmacognosia**, v. 12, p. 35-40, 2002.

SINGLETON, V.L., ROSSI, JR, J.A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagentes. **Am. J. Enol. Vitic.**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SOUZA, M.R.M.; PEREIRA, R.G.F.; FONSECA, M.C.M. ;Comercialização de plantas medicinais no contexto da cadeia produtiva em Minas Gerais.Rev. Bras. Pl. Med., Botucatu, v.14, n.esp., p.242-245, 2012.

WEBER, Diego; BESKOW, Günter Timm; GIOVANAZ, Marcos Antônio; LUNARDI,Adilson Maia; LUNARDI, Sibebe Maia; BATISTA, Katia; A experiência da COOPERAGRECO: Desenvolvimento regional dasEncostas da Serra Geral Catarinense. Resumos do VIII Congresso Brasileiro de Agroecologia – Porto Alegre/RS – 25 a 28/11/2013. Cadernos de Agroecologia – ISSN 2236-7934 – Vol 8, No. 2, Nov 2013.

YUNES, R. A.; PEDROSA, R. C.; CECHINEL FILHO, V.; Fármacos e fitoterápicos: a necessidade do desenvolvimento de fitoterápicos e fitofármacos no Brasil. **Química Nova**, v.24, n. 1, p.147-152, 2001.

ZAOUALI,Y., BOUZAINÉ,T., BOUSSAID,M.Essential oils composition in two *R. officinalis* L. varieties and incidence for antimicrobial and antioxidant activities.Food and Chemical Toxicologyv. 48, n. 11, p 3144–3152.2010.