



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS - UFGD
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS – FACET
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

Allan Belarmino Rodrigues

**PERFIL FITOQUÍMICO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
ANTIOXIDANTE DE *Ocotea minarum* (Nees & Mart.) Mez.**

Dourados, MS

2017



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS - UFGD
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E TECNOLÓGICAS – FACET
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA AMBIENTAL

Allan Belarmino Rodrigues

**PERFIL FITOQUÍMICO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E
ANTIOXIDANTE DE *Ocotea minarum* (Nees & Mart.) Mez.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia Ambiental.

Orientadora: Profa. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira.

Dourados, MS

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

R696p Rodrigues, Allan Belarmino

Perfil fitoquímico, atividade antimicrobiana e antioxidante de *Ocotea minarum* (Nees & Mart.) Mez / Allan Belarmino Rodrigues -- Dourados: UFGD, 2017.

54f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Kelly Mari Pires de Oliveira

Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) - Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. *Ocotea minarum*. 2. atividade antimicrobiana. 3. microdiluição em caldo. 4. atividade antioxidante. 5. peroxidação lipídica. I. Título.

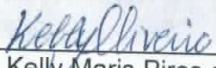
Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitted to reproduction partial desde que citada a fonte.

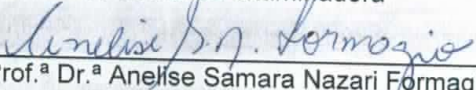


Termo de Aprovação

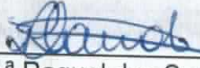
Após apresentação, arguição e apreciação pela banca examinadora, foi emitido o parecer APROVADO, para a dissertação intitulada: "**Perfil fitoquímico, atividade antimicrobiana e antioxidante de *Ocotea minarum* (Nees & Mart.) Mez**", de autoria de **Allan Belarmino Rodrigues**, apresentada ao Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental da Universidade Federal da Grande Dourados.



Prof.^a Dr.^a Kelly Maris Pires de Oliveira
Presidente da banca examinadora



Prof.^a Dr.^a Anelise Samara Nazari Formagio
Membro Examinador (UFGD)



Prof.^a Dr.^a Raquel dos Santos Donatini
Membro Examinador (UFGD)

Dourados/MS, 24 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus pela oportunidade concedida, por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades encontradas.

Aos meus pais, por serem meu ponto seguro, por me darem carinho, incentivo e apoio incondicional para enfrentar meus desafios.

A minha orientadora Prof. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira, pelo suporte prestado, pelas suas correções e incentivos, resultando na conclusão desse trabalho.

A Prof. Dra. Andréia Sangalli que me indicou a planta a ser estudada. Ao Prof. Dr. Jonas Mota e a Profa. Dra. Cláudia Cardoso por ter me ajudado na parte de caracterização química do extrato analisado.

A Profa. Dra. Keli Picoli e ao Prof. Dr. Edson Lucas dos Santos por terem concedido seus laboratórios para realização dos testes antioxidantes.

Em especial a Tamaeh Monteiro e ao grupo GEBBAM por ter me auxiliado em todos os testes antioxidantes realizados. E ao Rafael Henrique pela ajuda nas dúvidas e experimentos. A Ms. Adriana Araújo e Ms. Fabiana Santos pelos ensinamentos e auxílios no laboratório e em todos os testes realizados neste trabalho e ao Laboratório de Microbiologia Aplicada (LMA).

Aos meus amigos e colegas de turma que me ajudaram e incentivaram durante a minha graduação e na conclusão desse trabalho. Especialmente a Bianca Boni por ter se dedicado e me ajudado em momentos difíceis em que passei durante essa fase.

A todos os professores da pós-graduação, que foram de fundamental importância na minha vida acadêmica.

A UFGD, a UEMS, a FUNDECT, Capes e ao CNPq pelo apoio financeiro da pesquisa. E a todos que direta ou indiretamente me ajudaram, me incentivaram, fez parte da minha formação acadêmica, o meu profundo obrigado.

“Vamos à presença Dele com ações de graças;
vamos aclamá-lo com cânticos de louvor.
Pois o Senhor é o grande Deus,
o grande Rei acima de todos os deuses.”

Salmos 95: 2-3

RESUMO

Rodrigues, Allan Belarmino. PERFIL FITOQUÍMICO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE *Ocotea minarum* (Nees & Mart.) Mez., 2017. 60f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental) – Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul – Brasil.

Ocotea minarum é conhecida popularmente como “canelina” ou “canela-vassoura” e pertence a família Lauraceae. Essa espécie é comum em nossa região, característica do bioma Cerrado. O presente estudo foi realizado com o objetivo de determinar o perfil fitoquímico, a atividade antimicrobiana e antioxidante *in vitro* dos extratos obtidos de *Ocotea minarum*. As amostras vegetais foram coletadas na cidade de Dourados, MS, e por meio de triagem fitoquímica, foi observada a presença de compostos fenólicos, flavonoides e taninos condensados. Através da técnica de CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) foram identificados os compostos fenólicos ácido cafeico, ácido p-cumárico, ácido rosmarínico, além dos flavonoides quercetina e luteolina nos extratos etanólico das folhas e casca de *O. minarum*. A concentração inibitória mínima dos extratos para os microrganismos testados foi avaliada pela técnica de microdiluição em caldo. A partir dos ensaios com os radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolína-6-ácido-sulfônico) (ABTS), foi obtido as IC₅₀ dos extratos EEC (extrato etanólico da casca) e EEF (extrato etanólico da folha). A partir dos resultados de atividade antioxidante observados nesses ensaios, foi realizado o ensaio de hemólise oxidativa induzida por 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) seguido da dosagem da produção de malondialdeído (MDA) decorrente da peroxidação lipídica. Os resultados decorrentes desse trabalho demonstraram ação antimicrobiana e antioxidante satisfatórias dos extratos avaliados de *O. minarum*. Atividades estas podem estar correlacionadas com os compostos bioativos identificados no estudo. A espécie pode ser considerada então um ponto de partida para o desenvolvimento de novos produtos com propriedades farmacêuticas.

Abstract

Ocotea minarum is popularly known as "canelina" or "cinnamon-broom" and belongs to the Lauraceae family. This species is common in our region, characteristic of the Cerrado biome. The present study was carried out to determine the phytochemical profile, antimicrobial and antioxidant activity of extracts obtained from *Ocotea minarum*. The plant samples were collected in the city of Dourados, MS, and by means of phytochemical screening, the presence of phenolic compounds, flavonoids and condensed tannins was observed. The phenolic compounds caffeic acid, p-coumaric acid, rosmarinic acid, and the quercetin and luteolin flavonoids in the extracts of the leaves and bark of *O. minarum* were identified using the HPLC technique (High Performance Liquid Chromatography). The minimum inhibitory concentration of the extracts for the tested microorganisms was evaluated by broth microdilution technique. From the free radical scavengers 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazila (DPPH) and 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS), extracts IC50 EEC (ethanolic extract of the bark) and EEF (leaf extract). From the results of antioxidant activity observed in these tests, the 2,2'-azobis (2-amidinopropane) -induced oxidative hemolysis assay (AAPH) was performed, followed by the production of malondialdehyde (MDA) from lipid peroxidation. The results of this work demonstrated satisfactory antimicrobial and antioxidant action of the extracted extracts of *O. minarum*. These activities may be correlated with the bioactive compounds identified in the study. The species can then be considered as a starting point for the development of new products with pharmaceutical properties.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Determinação de compostos fenólicos, flavonóides e taninos condensados presentes nos EEC e EEF de <i>O. minarum</i>	39
Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos extratos das folhas e casca de <i>O. minarum</i> frente a leveduras.....	41
Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CFM) dos extratos das folhas e casca de <i>O. minarum</i> frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	42
Tabela 4. Atividade antioxidante dos EEF e EEC de <i>O. minarum</i>	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Condições ambientais que podem influenciar na produção de metabólitos secundários (Gobbo-Netto & Lopes, 2007).....	14
Figura 2. <i>Ocotea minarum</i> (Fonte: acervo pessoal).....	18
Figura 3. Mecanismos de resistência bacteriana (Fonte: ANVISA).....	19
Figura 4. Mecanismos de resistência fúngica (Fonte: microbiologia.vet.br).....	19
Figura 5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do EEC de <i>O. minarum</i> . A (15 min) ácido cafeico; B (53, 7 min) ácido rosmarínico	39
Figura 6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do EEF de <i>O. minarum</i> . A (15, 1 min) ácido cafeico; B (25, 2 min) ácido p-cumarico; C (53, 7 min) ácido rosmarínico; D (59, 1 min) quercetina; E (59, 7 min) luteolina	39
Figura 7. Compostos identificados na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do extrato etanólico da casca (EEC) e extrato etanólico das Folhas (EEF) de <i>Ocotea minarum</i> (Figuras 2 e 3)	40
Figura 8. Avaliação da hemólise a 10% (He) incubada por 240 min com o padrão antioxidante ácido ascórbico (AA) e os extrato etanólico da casca (EEC) e extrato etanólico das folhas (EEF) de <i>O. minarum</i> nas concentrações de 10, 25, 50, 75, 100 e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Análise Biológica realizada em duplicata e em três experimentos independentes. *P>0,05 vs controle He	44
Figura 9. Avaliação da ação protetora contra hemólise oxidativa do extrato etanólico da casca (EEC) e extrato etanólico das folhas (EEF) de <i>O. minarum</i> e do padrão antioxidante ácido ascórbico (AA) nas concentrações de 10, 25, 50, 75, 100 e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ após incubação de a) 120, b) 180 e c) 240 min comparado com o indutor de hemólise AAPH. Análise Biológica realizada em duplicata e em três experimentos independentes. *P>0,05 vs AAPH	45
Figura 10. Concentração de malondialdeído (MDA) em eritrócitos do extrato etanólico da casca (EEC) e extrato etanólico das folhas (EEF) de <i>O. minarum</i> e do padrão antioxidante ácido ascórbico (AA) nas concentrações de 10, 25, 50, 75, 100 e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ após incubação de a) 120, b) 180 e c) 240 min comparado com o indutor de hemólise AAPH. *P>0,05 vs AAPH.....	46

SUMÁRIO

1. Introdução	13
2. Revisão Bibliográfica.....	14
2.1 Plantas medicinais	14
2.2. Família Lauraceae e gênero Ocotea	16
2.3 Ocotea minarum	17
2.4. Antimicrobianos	18
2.5. Estresse oxidativo e Antioxidantes	20
3. Objetivos	22
3.1. Objetivo Geral.....	22
3.2. Objetivos Específicos.....	22
4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	23
1. Anexo 01.	29
1. Introdução	31
2. Metodologia	32
2.1. Material vegetal.....	32
2.2. Preparo dos extratos vegetais	33
2.3. Determinação de compostos fenólicos	33
2.4. Determinação de flavonóides	33
2.5. Determinação de taninos	34
2.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com detector de arranjo de diodos (DAD)	34
2.7. Atividade Antimicrobiana	34
2.7.1. Microrganismos para os ensaios antimicrobianos	34
2.7.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato	35
2.7.3. Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	35
2.8. Atividade Antioxidante	35
2.8.1. Ensaio de captação do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)	35
2.8.2. Ensaio de captação do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) (ABTS).....	36
2.8.3. Ensaio de hemólise oxidativa induzida por 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH):	37
2.8.4. Dosagem de malondialdeído (MDA) gerado:	37

2.9 Análises estatísticas.....	38
3. Resultados.....	38
3.1. Determinação fitoquímica e perfil cromatográfico	38
3.2. Atividade antimicrobiana	40
3.3 Atividade antioxidante	43
3.3.1 Atividade de sequestro dos radicais DPPH e ABTS	43
3.3.2 Atividade hemolítica	44
3.3.3 Proteção contra hemólise oxidativa.....	44
3.3.4 Dosagem de malondialdeído (MDA)	46
4. Discussão.....	47
5. Conclusão	50
6. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	51

1. Introdução

O Brasil é o país com a maior biodiversidade de flora do planeta, obtendo cerca de 20% das espécies de planta do mundo, estimado um número próximo a 55 mil das 350 a 550 mil espécies existentes (Carvalho et al., 2007; Simões et al., 2007). Diversas dessas plantas têm sido utilizadas na medicina popular para alívio e cura de doenças desde os primórdios da humanidade (Alves et al., 2010), e estima-se que até então, apenas 17% delas já tiveram alguma pesquisa relacionada a suas atividades biológicas (Taffarelo, 2008).

Diversos são os medicamentos desenvolvidos, de modo direto ou indireto, a partir de derivados naturais, como a pilocarpina (*Pilocarpus jaborandi*), a artemisina (*Artemisia annua*), a morfina (*Papaver somniferum*), a quinina (*Cinchona spp*), a atropina (*Atropa belladonna*), a vimblastina e vincristina (*Catharanthus roseus*), o taxol (*Taxus brevifolia*), entre outras diversas drogas (Calixto, 2001).

Em virtude de tais atividades biológicas observadas em plantas, a busca por novas substâncias com potencial antimicrobiano é de fundamental importância socioeconômica, devido aumento de microrganismos com resistência adquirida, os tornando multirresistentes e, conseqüentemente, reduzindo a eficácia das drogas disponíveis para a sociedade (Alvarez et al., 2010). Com isso, as plantas medicinais e seus derivados tem se tornado alvos em potenciais para o desenvolvimento de novas substâncias antimicrobianas (Jalal et al., 2015).

Outra propriedade farmacológica observada em espécies vegetais é a ação antioxidante, que está correlacionada com os metabolitos secundários presentes em sua composição, principalmente os compostos fenólicos. Estes possuem capacidade de estabilizar e capturar radicais livres e metais pró-oxidantes que quando encontrados em excesso no organismo desencadeiam um desequilíbrio redox provocando o estresse oxidativo, que por fim acarretam danos degenerativos a tecidos e biomoléculas celulares (Mohamed et al., 2014; Spencer et al., 2008).

Ademais, estudos já identificaram alcaloides aporfinicos, flavonoides, biflavonóides, cumarinas, sesquiterpenos, nor-sesquiterpenos entre outros compostos nas partes aéreas de *Ocotea minarum* (Nogueira, 2007; Garcez et al., 2005; Vecchiatti et al., 1979). Diante dos fatos, a bioprospecção de insumos vegetais ativos derivados de plantas medicinais conhecidas, tem sido uma alternativa viável para o desenvolvimento de novas drogas antimicrobianas, antioxidantes e outros produtos industriais.

2. Revisão Bibliográfica

2.1 Plantas medicinais

Bioprospecção consiste na avaliação de material biológico encontrado na fauna ou na flora, e com os avanços da engenharia genética e ferramentas tecnológicas para novas pesquisas científicas, tem sido cada vez maior o interesse pela descoberta de insumos bioativos disponíveis na natureza, principalmente em plantas medicinais, para o desenvolvimento de novos produtos e processos farmacêuticos, agroquímicos, cosméticos, alimentícios, fitoquímicos entre outros, tendo em vista a produção em escala comercial (Violante et al., 2012; Newman et al., 2007; Artuso, 2002).

Plantas medicinais são utilizadas pelos seres humanos desde o início da história, onde a busca por substâncias que promovem alívio ou cura de doenças talvez tenha sido a primeira forma de utilização dessas plantas (Veiga-Junior et al., 2005; OMS, 2002). Segundo a OMS, nos países em desenvolvimento as plantas medicinais representam cerca de 85% das iniciativas para cuidados de saúde primários (Brasil, 2006).

A definição do termo planta medicinal segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) é “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, compostos que possam ser utilizados para fins terapêuticos ou que sejam precursores de novos fármacos semissintéticos” (OMS, 2002). Dentre as drogas originadas de plantas medicinais estão os fitoterápicos, que são produtos com finalidade curativa, profilática ou para fins de diagnóstico, comprovados clinicamente (Castellucci et al., 2000) e com forte poder econômico, movimentando no Brasil cerca de 1,1 bilhão de reais por ano (Alves, 2013).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é o principal órgão que rege a regulamentação de plantas medicinais e seus derivados fitoterápicos, tendo como uma de suas funções é registrar o medicamento comprovando sua segurança, eficácia e qualidade antes de submeter a distribuição para população. Outro sistema de consulta sobre plantas medicinais é o DATAVISA, que contém descrições sobre os produtos registrados pela ANVISA como: composição da fórmula, validade do fitoterápico, restrições de venda, entre outras (Carvalho et al., 2008).

Algumas das espécies vegetais utilizadas como fitoterápicos são: *Mikania glomerata* (Guaco) utilizada como expectorante e broncodilatador, *Paullina cupana* (Guaraná) como estimulante do Sistema Nervoso Central, *Tribulus terrestris* como andrógeno, *Ginkgo biloba* como antiagregante plaquetário, *Hypericum perforatum* como antidepressivo, entre outras centenas de espécies (Castro & Albiero, 2016).

Apesar da ampla biodiversidade da flora brasileira, o Brasil apresenta baixos índices de competitividade no desenvolvimento de novas drogas vegetais com matéria prima nativa, pois 80% dos insumos ativos são oriundos de importação (Castro & Albiero, 2016; Epharma, 2014). Com isso, órgãos relacionados a agricultura no Brasil estão desenvolvendo métodos para qualificar a produção de medicamentos derivados de matéria vegetal, para tornar o país comercialmente mais competitivo (Souza et al., 2012).

A estimativa para o ano de 2016 era que o Brasil ocupasse a quarta posição no ranking mundial do mercado farmacêutico, perdendo apenas para os EUA, China e Japão. Fato decorrente ao aumento do poder de consumo da população, alterações que facilitaram o acesso aos Medicamentos Isentos de Prescrição (MIPs) e ao envelhecimento populacional, acarretando num maior consumo de medicamentos (Febrifar, 2013).

Com isso, as plantas medicinais podem ser utilizadas na indústria farmacêutica de duas maneiras, sendo a primeira delas o isolamento de compostos químicos que apresentem relevantes atividades biológicas para desenvolvimento de novos fármacos. E a segunda, ocorrendo a utilização da planta inteira ou extratos padronizados, desta maneira a atividade farmacológica ocorre devido ao sinergismo dos metabólitos secundários, compostos ativos, presentes na composição da planta (Zuanazzi & Mayorga, 2010). Para tal, diversas condições abióticas podem influenciar na concentração e qualidade dos metabólitos secundários produzidos nas plantas, conforme ilustrado na figura 1.

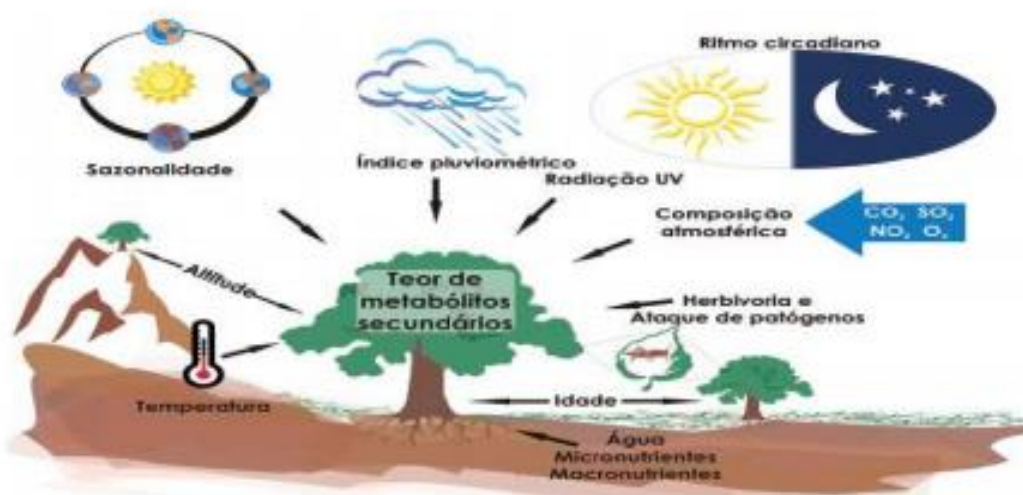


Figura 1. Condições ambientais que podem influenciar na produção de metabólitos secundários (Gobbo-Netto & Lopes, 2007).

2.2. Família Lauraceae e gênero *Ocotea*

A família Lauraceae está entre as famílias mais primitivas e pertence a divisão Magnoliophyta, fato confirmado devido as características morfoanatômicas que a assemelha a outras famílias primitivas como a Idiospermaceae, Calycanthaceae e Hernandiaceae (Cronquist, 1988). Relatos do uso de espécies desta família datam desde 2.800 A. C na Grécia antiga (Barroso et al, 1978).

Conhecida por conter alcaloides em sua composição, Cordell et al (2001) isolaram 425 alcalóides de 189 espécies presentes em 25 gêneros. Alguns destes compostos são conhecidos por suas atividades biológicas, como: a coclaurina, caracterizada por ação anti-HIV (Kashiwada et al. 2005) e a nantenina, bloqueador de contração muscular e translocação de Ca^{2+} (Ribeiro et al. 2003).

No mundo, está distribuída em regiões tropicais e subtropicais, representada por 49 gêneros contendo cerca de 2.500 a 3.000 espécies. No Brasil, estão presentes 25 desses gêneros e cerca de 400 espécies. Dentre elas, algumas muito conhecidas como: o abacate (*Persea americana*), a canela (*Cinnamomum verum*), a canela sassafrás (*Ocotea odorífera*) entre outras (Quinet & Andreato, 2002).

O gênero *Ocotea* possui cerca de 300 a 400 espécies, estando entre os maiores da Lauraceae (Batista et al., 2010; Van Der Werff, 2002). São árvores de porte grande/médio, podendo chegar até 22 m de altura, com frutos grandes e aroma característico. Estão bem distribuídas em todo território nacional, sendo encontradas nos Estados de Minas Gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, São Paulo, Paraná e Goiás (Chaverri et al., 2011). Despertam amplo interesse farmacológico, devido a presença de alcalóides aporfínóides, lignanas e neolignanas encontrados comumente nesse gênero que apresentam variadas atividades biológicas (Zanin et al., 2007).

Alguns estudos já demonstram diversas atividades biológicas de espécies do gênero *Ocotea*, como atividade antimicrobiana de *O. odorífera* (Castro & Lima, 2011), *O. notata* (Costa et al., 2015), *O. quixos* (Bruni et al., 2004); atividade antioxidante de *O. lancifolia* (as Silva et al., 2017), *O. odorífera* (Cansian et al., 2010), *O. bofo* Guerrini et al., 2006); atividade acaricida de *O. aciphylla* (Conceição et al., 2017); atividade anti-inflamatória de *O. quixos* (Destryana et al., 2014; Ballabeni et al., 2010); atividade larvicida de *O. velloziana* (Garcez et al., 2009); atividade cardiovascular de *O. duckei*

(Barbosa-Filho et al., 2008) e atividade antiprotozoária de *O. lancifolia* atividade (Fournet et al., 2007).

Dentre as centenas de espécies do gênero *Ocotea* destacamos a *Ocotea minarum*, planta encontrada abundantemente no Bioma Cerrado, presente no Mato Grosso do Sul, e alvo de nossa pesquisa.

2.3 *Ocotea minarum*

Popularmente conhecida no Brasil como canelinha ou canela vassoura, a *O. minarum* pode atingir de 8 a 12 metros de altura, com frutos grandes e aroma característico (Chaverri et al., 2011). Floresce de abril a junho, agosto, novembro e janeiro e frutifica no período de agosto a dezembro (Moraes, 2005).

Ocotea minarum é uma planta nativa do Brasil, está distribuída geograficamente nos estados de Tocantins, Minas Gerais, São Paulo, Distrito Federal, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul e seus domínios fitogeográficos são característicos dos biomas Mata Atlântica e Cerrado (Quinet et al., 2015).

Em estudos anteriores foram identificados quatorze alcalóides aporfínicos das folhas de *Ocotea minarum*, sendo eles: leucoxilonina, dicentrina, ocoteína, leucoxina, ocopodina, predentina, dicentrinona, tálicinina, ocotominarina, ocominarina, nor-leucoxilonina, iso-oconovina, 4-hidroxicentrina e ocominarona (Vecchiatti et al., 1979).

Garcez et al (2005) isolou dos frutos, cerne e casca compostos como: um novo alcaloide indólico (triptofol-5-O-β-D-glicopiranosídeo), cumarina, flavonoides, biflavonóides, bis-lignana, alquil benzeno e esteroides e sesquiterpenos. Nogueira et al (2007) identificou sesquiterpenos, nor-sesquiterpenos e lactona terpênica inéditos nas folhas de *O. minarum*.

Quanto a atividade antimicrobiana, alguns compostos isolados do extrato hidrometanólico das folhas de *O. minarum* apresentaram moderada atividade antifúngica na concentração de 100 µg mL⁻¹ contra as leveduras *C. albicans*, *C. krusei*, *C. tropicalis* e *Cryptococcus neoformans* (Nogueira et al., 2007). Guterres et al., (2012) avaliou a atividade genotóxica do extrato etanólico das folhas e *O. minarum* por meio da técnica Somatic Mutation And Recombination Test (SMART) em células de asas de *Drosophila melanogaster*, e dentre as concentrações avaliadas não foi identificado genotoxicidade.



Figura 2. *Ocotea minarum* (Fonte: acervo pessoal).

2.4. Antimicrobianos

Infecções microbianas estão aumentando em níveis preocupantes, representando altos índices de morbidade e mortalidade, principalmente nos países em desenvolvimento (Zhang et al., 2009). Fato relacionado pelo uso indiscriminado de drogas pela população, aumentando o desenvolvimento de resistência microbiana e proporcionando menor efetividade dos tratamentos convencionais, além de ocasionar efeitos colaterais (Kacem et al., 2016; Chandrasekar et al., 2011; Centers for disease control and *prevention*, 1999).

Com isso, os produtos naturais despertaram forte interesse na indústria farmacêutica para desenvolvimento de drogas antimicrobianas, estima-se que 48% dos medicamentos utilizados na terapêutica são provenientes, de modo direto ou indireto, de insumos bioativos derivados de plantas medicinais (Carvalho et al., 2007). Para que um

antimicrobiano possa ser considerado ideal, deve conter algumas características, tais como, alvo seletivo e de rápido alcance, estreito espectro de ação de maneira que não afete a microbiota saprófita, bactericida/fungicida, baixo nível de toxicidade, poucas ou nenhuma reação colateral quer seja alérgica ou tóxica, além de manter a estabilidade das concentrações terapêuticas (Katzung, 2007; Black, 2002)

O conhecimento sobre os mecanismos de ação dos antimicrobianos ainda não está totalmente elucidado, porém, em geral, podem ser divididos em cinco modos de ação, sendo eles: (a) inibição de síntese de ácidos nucleicos; (b) inibição de síntese de proteínas; (c) inibição da fisiologia da membrana celular, (d) inibição da síntese da parede celular e (e) alterações em metabolismos celulares (Tortora; Madigan et al., 2010; Trabulsi & Alterthum, 2008; Goodman & Gilman's, 2008).

Os antimicrobianos podem ter duas vias de fato, sendo a primeira delas com ação bacteriostática/fungistática, ou seja, mantendo o microrganismo na fase estacionária (Pankey & Sabath, 2013). Na segunda, a droga exerce ação bactericida/fungicida, atuando nos processos vitais do microrganismo ocasionando a morte celular (Lago, 2011).

Em vista disso, os microrganismos podem corresponder esses mecanismos de ação dos antimicrobianos com diversos mecanismos bioquímico de resistência, como: (I) substituição do sítio de ligação da droga; (II) diminuição da permeabilidade da droga na membrana; (III) alteração do sítio de ligação da droga; (IV) modificação estrutural da droga através de enzimas específicas; (V) aumento da síntese de substrato com o qual a droga compete e (VI) síntese de proteínas protetoras dos ribossomos (VII) bomba de efluxo (Goodman & Gilman's, 2008; Dzidic et al., 2007; Rice & Bonomo, 2005; Jacoby, 2005).

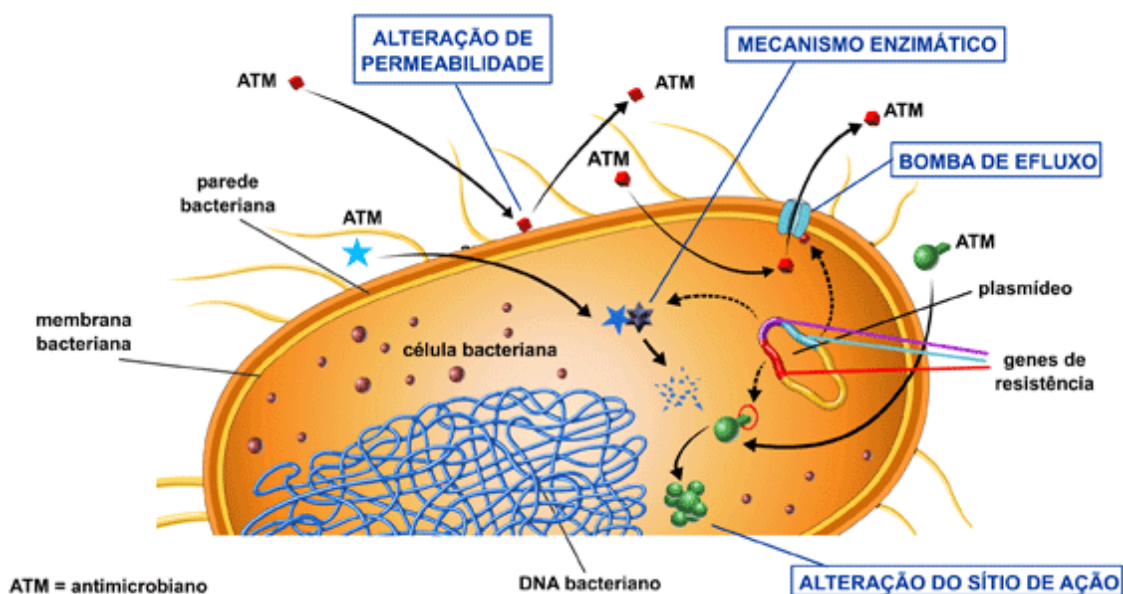


Figura 3. Mecanismos de resistência bacteriana (Fonte: ANVISA).

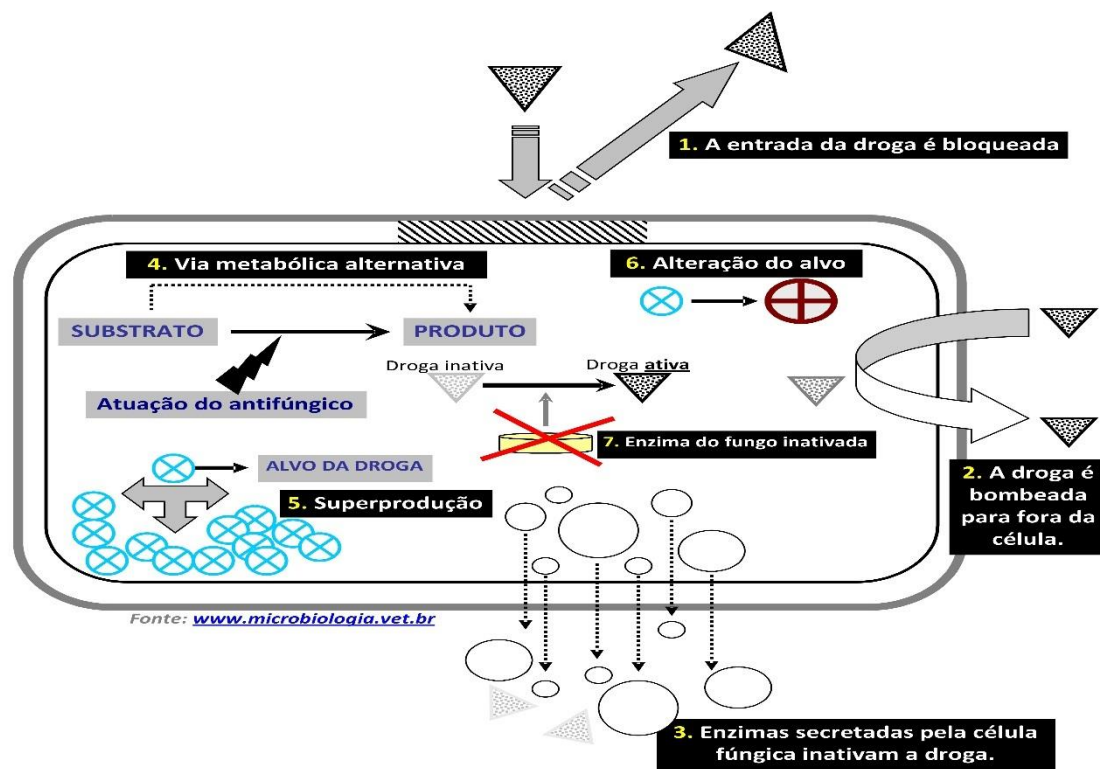


Figura 4. Mecanismos de resistência fúngica (Fonte: microbiologia.vet.br)

2.5. Estresse oxidativo e Antioxidantes

Radicais livres são átomos que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em seu orbital atômico, os tornando altamente reativos e instáveis. Os termos Espécie Reativa de Oxigênio (EROs) e Espécie Reativa de Nitrogênio (ERNs) são utilizados para identificar radicais e não-radicaais que possuem ação oxidantes (Gonçalves et al., 2008). Essas ERs quando em excesso fisiológico podem interagir com moléculas de proteínas, carboidratos celulares, lipídios e ácidos nucleicos causando danos celulares, provocando um desequilíbrio redox acarretando o estresse oxidativo (Valkon et al., 2007) os quais tem como funções biológicas o controle da pressão sanguínea, sinalização celular, regulação e apoptose do sistema imunológico (Simon-Giavarotti *et al.*, 1998).

O estresse oxidativo é um desequilíbrio caracterizado como uma reação metabólica de desbalanceamento entre espécies reativas de oxigênio (EROs) e de nitrogênio (ERNs) e a ação antioxidante de substâncias exógenas e endógenas (Barnabe

et al., 2008). Dentre as principais EROs estão o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), o superóxido (O_2^-), o óxido nítrico (NO) e a hidroxila (OH \cdot), radical mais prejudicial a saúde e mais abundante no sistema fisiológico. A geração deste abundante radical ocorre devido a interação entre o H_2O_2 em reação com O_2^- , como também pela reação entre O_2^- e NO_2 formando peroxinitrito ($ONOO^-$) que quando decomposto é convertido em NO_2 e OH^- (HALLIWELL & WHITEMAN, 2004). Já as ERNs são o óxido nítrico (NO), cloreto de nitrila (NO_2Cl), peroxinitrito ($ONOO^-$), dióxido de nitrogênio (NO_2), caracterizados como potentes iniciadores da peroxidação lipídica em sistemas biológicos (VASCONCELOS *et al.*, 2007).

As ERs podem ser produzidas por processos endógenos: metabolização do oxigênio, nitrogênio e cloro, realizado pelas organelas citoplasmáticas (Shami & Moreira, 2004), e por fontes exógenas: tabaco, anestésicos, pesticidas, poluição do ar e radiação (Vedana, 2008). Assim, as biomoléculas do organismo quando expostas a oxidação induzida por radicais livres, desencadeiam efeitos deletérios que podem estar relacionados a diversas doenças como: diabetes, câncer, aterosclerose, hipertensão, obesidade, inflamação, Parkinson, Alzheimer, entre outras doenças neurodegenerativas (Barbosa et al., 2008; Finkel & Holbrook, 2000; Knight, 1995).

Para minimizar os efeitos ocasionados pelo acúmulo de ERs, a busca por substâncias antioxidantes ganharam destaque no cenário farmacológico. Essas podem ser consideradas capazes de eliminar, diminuir ou prevenir a oxidação de biomoléculas do organismo, uma vez que, essas substâncias devem estar presentes em menor concentração em relação com o que será oxidado (Bravo, 1998). Os antioxidantes podem ser divididos em seis classes, sendo elas: (I) primários, proporcionam a inativação ou remoção de radicais livres como consequência da doação de um átomo de hidrogênio para estes; (II) sinérgicas: elevam a ação do antioxidante primário; (III) removedores de oxigênio, capturam moléculas de oxigênio; (IV) biológicos, realizam processos enzimáticos endógenos; (V) quelantes, responsáveis pela complexação com íons metálicos que podem catalisar a oxidação lipídica e (VI) mistos, presentes principalmente em plantas (Ramalho & Jorge, 2006).

Existem ainda os antioxidantes endógenos enzimáticos, que incluem a glutatona peroxidase (GPx), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), além da ação indireta da glutatona redutase (Gr). Essas enzimas têm função de combate primário aos radicais livres (Vasconcelos et al., 2007; Halliwell & Gutteridge, 1989), algumas reações proporcionadas são: CAT e GPx, juntamente com a proteína glutatona (GSH), reduzem

o H_2O_2 em H_2O e O_2 ; SOD reduz o O_2^- em H_2O_2 e O_2 e Gr reduz a glutathiona oxidada (Ferreira & Matsubara, 1997). Os endógenos não enzimáticos são o ácido úrico, coenzima-Q, a GSH e a bilirrubina (Schneider & Oliveira, 2004). E por fim, os exógenos não enzimáticos que são provenientes de produtos naturais, em especial frutos e plantas medicinais, os quais podem ser citados: ácido ascórbico, β -caroteno, além dos ácidos fenólicos e flavonoides que são relacionados com a atividade antioxidante presente em plantas medicinais (Poljsak & Dahmane, 2012; Schneider & Oliveira, 2004).

Atualmente, os principais antioxidantes sintéticos utilizados nas indústrias são o o butil-hidroxi-anisol (BHA), butil-hidroxi-tolueno (BHT), propil galato (PG) e butil-hidroquinona-terciária (TBHQ) (RAMALHO & JORGE, 2006), porém estes são questionáveis quanto a possíveis danos colaterais e carcinogênicos resultantes do seu uso constante (Coccimiglio et al., 2016).

3. Objetivos

3.1. Objetivo Geral

- Determinar o perfil fitoquímico, a atividade antimicrobiana e antioxidante de casca e folhas de *Ocotea minarum*.

3.2. Objetivos Específicos

- Quantificar os compostos fenólicos, flavonóides e taninos condensados presentes nos extratos etanólico de casca (EEC) e extrato etanólico das folhas (EEF) de *Ocotea minarum*.
- Avaliar o perfil cromatográfico de EEC e EEF de *O. minarum*, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) com detector de arranjo de diodos (DAD).
- Avaliar a ação antimicrobiana de EEC e EEF e frações de *O. minarum*, por ensaio de microdiluição em caldo frente a leveduras, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.
- Avaliar a ação antioxidante dos EEC e EEF de *Ocotea minarum*, por meio de três reagentes 2,2 – difenil – 1 picril – hidrazila (DPPH), 2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) (ABTS) e 2,2`-azobis (2-amidinopropano) (AAPH).

4. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarez C, labarca J, Salles M. (2010) “Estratégias de prevenção de *Staphylococcus aureus* resistente à meticilina (MRSA) na América Latina”. Brazilian Journal of Infectious Diseases, vol. 14, no. 2, p.108-120.
- Alves CQ, David JM, David JP, Bahia MV, Aguiar RM. (2010) “Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos”. Quimica Nova, vol. 33, no. 10, p. 2202-2210.
- Alves L F. (2013) “Produção de Fitoterápicos no Brasil: Histórias, Problemas e Perspectivas”. UFF. Revista Virtual de Química, vol. 5, no. 3, p. 450-513.
- Artuso A. (2002) “Bioprospecting, Benefit Sharing, and Biotechnological Capacity Building”. World Development, vol. 30, no. 8, p. 1355-1368.
- Ballabeni V, Tognolini M, Giorgio C, Bertoni S, Bruni R, Barocelli E. (2010) “*Ocotea quixos* Lam. essential oil: *In vitro* and *in vivo* investigation on its anti-inflammatory properties”. Fitoterapia, vol. 81, p. 289–295.
- Barbosa-Filho JM, Cunha RM, Dias CS, Athayde- Filho PF, Silva MS, da Cunha EVL, Machado MIL, Craveiro AA, Medeiros IA. (2008) “GC-MS Analysis and cardiovascular activity of the essential oil of *Ocotea duckei*”. Brazilian Journal of Pharmacognosy, vol. 18, no. 1, p. 37-41.
- Barnabe VH, Guimarães MABV. (2008) "Dosagens dos níveis de anti-oxidante enzimáticos e resistência celular ao estresse oxidativo do sêmen de perdizes (*Rynchotus rufescens*) criadas em cativeiros e suplementadas com selênio". Tese (Doutorado em Reprodução Animal) - Universidade de São Paulo.
- Barroso GM, Guimarães EF, Ichaso CLF, Costa CG, Peixoto AL. (1978) “Sistemática das Angiospermas do Brasil”. Ed. São Paulo, EDUSP, vol I. 1a, p. 1978. 255.
- Batista ANL, Junior JMB, López SN, Furlan M, Cavalheiro AJ, Silva DHS, Bolzani VS (2010) “Aromatic compounds from three brazilian lauraceae species”. Quimica Nova, vol. 33, no. 2, p. 321-323.
- Black JG (2002). “Microbiologia: Fundamentos e perspectivas”. Ed. Guanabara Koogan, 4ª ed.
- BRASIL. Ministério da Saúde. (2006) Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 60 p. (Série B. Textos Básicos de Saúde).
- Bravo L. (1998) “Polyphenols: Chemistry, Dietary Sources, Metabolism, and Nutritional Significance”. Nutrition Reviews, vol. 56, no. 11, p. 317–333.
- Bruni R, Medici A, Andreotti E, Fantinc C, Muzzoli M, Dehesad M, Romagnolie C, Sacchettib G. (2004) “Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices”. Food Chemistry, vol. 85,p. 415–421.
- Calixto JB. (2001) “Medicamentos fitoterápicos. In: plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna”. Ed. Argos, chapecó/SC.
- Cansian RL, Mossi AJ, Paroul N, Toniazzo G, Zboralski F, Prichoa FC, Kubiak GB, Lerin LA. (2010) “Antioxidant and antimicrobial activity of cinnamon sassafras

- extracts (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rowher)". PERSPECTIVA, vol. 34, no.127, p. 123-133.
- Carvalho ACB, Balbino EE, Maciel A, Perfeito JPS. (2008) "Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil". Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, vol. 18, no. 2, p. 314-319.
- Carvalho ACB, Nunes DSG, Baratelli TG, Shuqair NSMSAQ, Netto EM. (2007) "Aspectos da legislação no controle dos medicamentos fitoterápicos". T&C Amazônia, vol. 5, no. 11, p. 26-32.
- Castellucci S, Lima MIS, Nordi N, Marques JGW. (2000) "Plantas medicinais relatada pela comunidade residente na Estação Ecológica de Jataí, Município de Luís Antônio/SP: uma abordagem etnobotânica". Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, vol. 3, no. 1, p. 51-60.
- Castro RA, Albiero ALM. (2016) "The raw material market for phytotherapy industry". Revista Fitos, vol, 10, no. 1, p. 1-93.
- Castro RD, Lima EO. (2011) "Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*". Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, vol.13, no.2, p.203-208.
- Chaverri C, Díaz C, Ciccio JF. (2011) "Chemical Analysis of Essential Oils from *Ocotea gomezii* W.C. Burger and *Ocotea morae* Gómez-Laur. (Lauraceae) Collected at "Reserva Biológica Alberto M. Brenes" in Costa Rica and their Cytotoxic Activity on Tumor Cell Lines". Journal of the brazilian chemical society, vol, 22 no. 4.
- Centers for Disease Control and *Prevention*. CDC. *MMWR* (1999);48:621-9.
- Chandrasekar P. (2011) "Management of invasive fungal infections: a role for polyenes". Journal of Antimicrobial Chemotherapy, vol. 66, no. 3, p. 457-465.
- Coccimiglio JMA, Jiang ZH, Gottardo C, Suntres Z. (2016) "Antioxidant, Antibacterial, and Cytotoxic Activities of the Ethanolic *Origanum vulgare* Extract and Its Major Constituents". Oxidative Medicine and Cellular Longevity, vol. 2016, Article ID 1404505, p. 8.
- Conceição RS, Carneiro MMAA, Reis IMA, Branco A, Vieira IJC, Braz-Filho R, Botura MB. (2017) "*In vitro* acaricide activity of *Ocotea aciphylla* (Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fractions". Ticks and Tick-borne Diseases vol. 8, p. 275-282.
- Cordell GA, Quirn-Beattie ML, Farnsworth NR. (2001) "The potential of alkaloids in drug discovery". Phytotherapy Research, vol. 15, p.183-205.
- Costa IFB, Calixto SD, Araujo MH, Konno TUP, Tinoco LW, Guimarães DO, Lasunskiaia EB, Leal IRC, Muzitano MF. (2015) "Antimycobacterial and Nitric Oxide Production Inhibitory Activities of *Ocotea notata* from Brazilian Restinga". Oxidative Medicine and Cellular Longevity, vol. 2015, Article ID 947248, p. 9.
- Cronquist, A. (1998) "The Evolution and classification of flowering plants". 2 nd Ed. New York, New York Botanical Garden 517p.
- Da Silva DT, Herrera R, Batista BF, Heinzmann BM, Labidi J. (2017) "Physicochemical characterization of leaf extracts from *Ocotea lancifolia* and its

- effect against wood-rot fungi”. *International Biodeterioration & Biodegradation*, vol. 117, p. 158-170.
- Destryana RA, Young DG, Woolley CL, Huang TC, Wu HY, Shih WL. (2014) “Antioxidant and Anti-inflammation Activities of *Ocotea*, *Copaiba* and *Blue Cypress* Essential Oils *in Vitro* and *in Vivo*”. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, vol. 91, p. 1531–1542.
- Dzidic S, Suskovic J, Kos B. (2008) “Antibiotic resistance Mechanisms in Bacteria: Biochemical and Genetic Aspects”. *Food Technology Biotechnology*, vol. 46, no. 11, p. 11-21.
- EPHARMA. “Faturamento do setor cresceu 17% no ano passado, 2014”. Disponível em: <http://www.epharma.com.br/>
- FEBRAFAR. “Setor farmacêutico deve fechar o ano de 2013 com alta de dois dígitos e mantém otimismo para 2014. Federação Brasileira das Redes Associativistas de Farmácias”. Disponível em: <http://febrafar.com.br/>
- Ferreira ALA, Matsubara LS. (1997) "Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo". *Revista da Associação Médica Brasileira*, vol. 43, p. 61-68.
- Finkel T, Holbrook NJ. (2000) “Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing,” *Nature*, vol. 408, no. 6809, p. 239–247.
- Fournet A, Ferreira ME, de Arias AR, Guy I, Guinaudeau H, Heinzen H. (2007) “Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*”. *Fitoterapia*, vol. 78, p. 382–384.
- Garcez WS, Garcez FR, da Silva LMGE, Hamerski L. (2009) “Larvicidal activity against *Aedes aegypti* of some plants native to the West-Central region of Brazil”. *Bioresource Technology*, vol. 100, p. 6647–6650.
- Garcez WS, Garcez FR, da Silva LMGE, Shimabukuro AA. (2005) *Journal of the brazilian chemical society*, vol. 16, p. 1382.
- Gobbo-Neto L, Lopes NP. (2007) “Medicinal plants: factors of influence on the content of secondary metabolites”. *Química Nova*, vol. 30, p. 374-381.
- Gonçalves AESS. (2008). “Avaliação da capacidade antioxidante de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C”. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Programa de pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade de São Paulo, São Paulo/SP.
- Goodman & Gilman's. (2008). “Manual of Pharmacology and Therapeutics”. Nova Iorque: McGraw Hill.
- Guerrini A, Sacchetti G, Muzzoli M, Maldonado ME, Medici A, Besco E, Bruni R. (2006) “Composition of the Volatile Fraction of *Ocotea bofo* Kunth (Lauraceae) Calyces by GC-MS and NMR Fingerprinting and Its Antimicrobial and Antioxidant Activity”. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, p. 10-5.
- Guterres ZR. (2008) “Investigação das atividades mutagênicas, antimutagênicas e antioxidante de extratos etanólicos de *Aiouea trinervis*, *nectranda cissiflora*, *Ocotea minarum* (Lauraceae) e dos Alcalóides Triptol, Ocoteína e Dicentrina”. Dissertação apresentada para título de Doutor em Genética e Bioquímica. Uberlândia – MG.

- Halliwell B, Gutteridge JMC. (1989) "Free Radical in Biology and Medicine." Oxford University Press, vol. 4, no. 3.
- Halliwell B, Whiteman MB. (2004) "Measuring reactive species and oxidative damage *in vivo* and in cell culture: how should you do it and what do the results mean?" *British Journal of Pharmacology*, vol. 142, no. 2, p. 231-255.
- Jacoby G. (2005) "Mechanisms of resistance to quinolones". *Oxford Journals*, vol. 41, no. 2, p. S120 - S126.
- Jalal TK, Adewale I, Mikail M. (2015) "Evaluation of Antioxidant, Total Phenol and Flavonoid Content and Antimicrobial Activities of *Artocarpus altilis* (Breadfruit) of Underutilized Tropical Fruit Extracts" *Applied Biochemistry and Biotechnology*, vol. 175, p. 3231–3243.
- Kacem NV, Roumy N, Duhail F, Merouane ., Neut P, Christen K, Hostettmann S, Rhouati. (2016) "Chemical composition of the essential oil from Algerian *Genista quadriflora* Munby and determination of its antibacterial and antifungal activities". *Industrial Crops and Products*, vol. 90, p. 87–93.
- Kashiwada Y, Aoshima A, Ikeshiro Y, Chen Y, Furukawa H, Itoigawa M, Fujioka T, Mihashi K, Cosentino LM, Morris-Natschke SL, Lee K. (2005) "Anti-HIV benzylisoquinoline alkaloids and flavonoids from the leaves of *Nelumbo nucifera*, and structure-activity correlations with related alkaloids). *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 13, p. 443-448.
- Katzung B. (2007) "Farmacologia Básica e Clínica". 10ª ed., Brasil: McGraw Hill.
- Knight JA. (1995) "Diseases related to oxygen-derived free radicals". *Annals of Clinical & Laboratory Science*, vol. 25, no. 2, p. 111–121.
- Lago J. (2011) "Mecanismos de Resistência e Seleção de Antibióticos". Lisboa: Ed. Jornadas bioMérieux.
- Madigan MT, Martinko JM. (2010) "Microbiologia de Brock" 12ª ed. São Paulo: Ed. Artmed, p. 1128
- Mohamed AA, Ali SI, EL-Baz FK, Hegazy AK, Kord M A. (2014) "Chemical composition of essential oil and *in vitro* antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts of *Commiphora myrrha* resin". *Industrial Crops and Products*, vol. 57, p. 10–16.
- Moraes PLR. (2005) "Sinopse das Lauráceas nos estados de Goiás e Tocantins, Brasil". *Biota Neotrópica*, vol. 5, p. 1-18.
- Newman DJ, Cragg GM. (2007) "Natural products as sources of new drugs over the last 25 years". *Journal of Natural Products*, vol. 70, p. 461-477.
- Nogueira CR, Garcez FR, Garcez WS, Hamerski L, Vizzotto L. (2007) "30ª Reunião Anual da SBQ, Águas de Lindóia, SP". PN-072.
- ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUD (OMS). Estrategia de la OMS sobre medicina tradicional 2002-2005. Ginebra: OMS, 2002. 74p.
- Pankey G, Sabath L. (2013) "Clinical relevance of bacteriostatic versus bactericidal mechanisms of action in the treatment of Gram positives bacterial infections". *Oxford Journals*, vol. 38, p. 864-865.

- Poljsak B, Dahmane R. (2012) "Free radicals and extrinsic skin aging." *Dermatology Research and Practice*, vol. 2012, p. 135-206.
- Quinet A, Andreato RHP. (2002) "Lauraceae Jussieu na Reserva Ecológica de Macaé de Cima, município de Nova Friburgo. Rio de Janeiro, Brasil". *Rodriguésia*, Rio de Janeiro, p. 53: 59.
- Quinet A, Baitello JB, Moraes PLR, de, Assi, L, Alves FM. (2015) "Lauraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil". Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8471>>.
- Ramalho VC, Jorge N. (2006) "Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos". *Química Nova*, vol.29, no.4, São Paulo.
- Ribeiro RA, Carmo LG, Vladimorova I, Jurkiewicz NH, Jurkiewicz A. (2003) "Nantenine blocks muscle contraction and Ca²⁺ transient induced by noradrenaline and K⁺ in rat vas deferens". *European Journal of Pharmacology*, vol. 470, p. 37-43.
- Rice L, Bonomo, R. (2005) "Genetic and Biochemical mechanisms of bacterial". *Antibiotics in Laboratory Medicine*, Nova Iorque, 5ª ed., p. 441-476.
- Schneider CD, Oliveira AR. (2004) "Radicais livres de oxigênio e exercício: mecanismos de formação e adaptação ao treinamento físico." *Revista Brasileira de Medicina do Esporte*, vol. 10, no. 4.
- Shami NJIE, Moreira EAM (2004) *Revista de Nutrição*, vol. 17, p. 227.
- Simoes CMO, Schenkel EP, Gosman G, Mello JCP, Mentz ILA, Petrovick PR. (2007) "farmacognosia: da planta ao medicamento". Ed. da UFSC/SC; porto alegre: Ed. da UFRGS/RS.
- Simon GKA, Rodrigues L, Rodrigues T, Junqueira VB, Videla LA. (1998) "Liver microsomal parameters related to oxidative stress and antioxidant systems in hyperthyroid rats subjected to acute lindane treatment". *Free Radical Research*, vol. 29, no. 1, p. 35-42.
- Souza MRM, Pereira RGF, Fonseca MCM. (2012) "Comercialização de plantas medicinais no contexto da cadeia produtiva em Minas Gerais". *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, vol. 14.
- Spencer JP, Abd El Mohsen MM, Minihane, AM, Mathers JC. (2008) "Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research". *British Journal of Nutrition*, vol. 99, no. 1, p. 12-22.
- Taffarelo D. (2008) "Extratos de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) Verlot obtidos por processos biotecnológicos: otimização da extração e avaliação farmacológica". Dissertação (mestrado em biotecnologia) 191 f. – Instituto de Ciências Biomédicas, Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia USP/Instituto Butantan/IPT, universidade de São Paulo, São Paulo/SP.
- Tortora GJ, Funke BR, Case CL. (2003) "Microbiologia" 6ª ed. Porto Alegre: Ed. Artmed, p. 827.
- Trabulsi LR, Alterthum F. (2008) "Microbiologia" 5ª ed. São Paulo: Ed. Atheneu, p. 386.
- Valkon M, Leibfritz D, Moncol J, Cronin MTD, Mazur M, Telser J. (2007) "Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease". *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, vol. 39, p. 44-48.

- Van Der Werff, H. (2002). *Ann. Missouri Bot. Gard.* vol. 89, no. 429.
- Vasconcelos SML, Goulart MOF, Moura JBF, Manfredini V, Benfato M. da S, Kubota LT. (2007) "Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação." *Quimica Nova*, vol. 30, no. 5, p. 1323-1338.
- Vecchiatti V, Casagrande C, Ferrari G, Ricca SG. (1979) "Farmaco". *Ed. Sci*, vol. 34, p. 829.
- Vedana MIS. (2008) "Efeito do processamento na atividade antioxidante da uva". Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, Curitiba/PR, p. 85.
- Veiga-Junior VF, Pinto AC, Maciel MA. (2005) "Plantas medicinais: cura segura?". *Química Nova*, vol. 28, no. 3, p. 519-528.
- Violante IMP, Hamerski L, Garcez WS, Batista AL, Chang MR, Pott VJ, Garcez FR (2012) "Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil". *Brazilian Journal of Microbiology*, p. 1302-1308.
- Zanin SM, Lordello ALL (2007). "Alcalóides aporfinoídes do gênero *Ocotea* (*Lauraceae*)". *Química Nova*, vol. 30, p. 92-98.
- Zhang H, Chen H, Niu J et al., (2009) "Role of adaptive immunity in the pathogenesis of *Candida albicans* keratitis," *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, vol. 50, no. 6, pp. 2653–2659.
- Zuanazzi JAS, Mayorga P. (2010) "Fitoprodutos e desenvolvimento econômico". *Quimica Nova*, vol. 33, no. 6, p. 1421-1428.

PERFIL FITOQUÍMICO, ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTE DE *Ocotea minarum* (Nees & Mart.) Mez.

Rodrigues, A. B.; XXX²; XXX³; XXX⁴; Oliveira, K.M.P.⁵

¹ Faculdade de Ciências Exatas e Tecnológicas, UFGD, Dourados – MS, Brasil;

² Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais, UFGD, Dourados – MS, Brasil;

Resumo: *Ocotea minarum* é uma planta nativa do Brasil, comum dos biomas Mata Atlântica e Cerrado. Conhecida popularmente como “canelinha” ou “canela-vassoura”, esta espécie pode atingir de 8 a 12 metros de altura e possui aroma característico. Neste estudo foi determinado o perfil fitoquímico, avaliadas as atividades antimicrobiana e antioxidante dos extratos da casca e folhas de *O. minarum*. Os teores fenólicos, os flavonoides e os taninos foram quantificados pela reação com os reagentes, Folin-Ciocalteu, cloreto de alumínio e vanilina, respectivamente. O perfil químico foi realizado por CLAE-DAD. A atividade antimicrobiana foi investigada pelo método de microdiluição em caldo para determinação a concentração inibitória mínima dos extratos para os microrganismos ensaiados. A atividade antioxidante foi mensurada pela porcentagem de captura dos radicais livres 2,2- difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) e 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) (ABTS), e ensaio de hemólise oxidativa induzida por 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH) seguido da dosagem da produção de malondialdeído (MDA) decorrente da peroxidação lipídica. Foram identificados os ácidos fenólicos: ácido cafeico, ácido p-cumárico e ácido rosmarínico, além dos flavonoides: quercetina e luteolina. O extrato etanólico da folha (EEF) apresentou ação bacteriostática de 1000 µg mL⁻¹ para todas as bactérias Gram-negativas avaliadas (*Salmonella Typhimurium*, *Salmonella Enteritidis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Proteus mirabilis*) e o extrato hexano da casca (EHEC) teve moderada ação antifúngica contra *Candida krusei* e *Cryptococcus gattii* (250 µg mL⁻¹). Obteve-se IC₅₀ de 8,19 ± 1,25 (EEF) e 4,51 ± 0,49 µg mL⁻¹ (EEC) no ensaio com DPPH e 6,25 ± 0,89 (EEF) e 2,87 ± 0,42 µg mL⁻¹ (EEC) no ensaio com ABTS. Até a 3 h de ensaio, os EEC e EEF tiveram ação protetora contra hemólise oxidativa induzida por AAPH, reduzindo a geração de malondialdeído, o que contribui para manutenção da estrutura celular. Diante do apresentado, os extratos de *O. minarum* podem ser avaliados como insumos bioativos para desenvolvimento de novas drogas com propriedades farmacêuticas.

Palavras-Chave: *Ocotea minarum*; antimicrobiano antimicrobiana; microdiluição em caldo; atividade antioxidante; peroxidação lipídica.

Abstract: *Ocotea minarum* is a plant native to Brazil, common to the Atlantic Forest and Cerrado biomes. Popularly known as "canelinha" or "cinnamon-broom", this species can reach 8 to 12 meters in height and has a characteristic aroma. In this study the phytochemical profile was determined, evaluating the antimicrobial and antioxidant activities of the extracts of the bark and leaves of *O. minarum*. The phenolic contents, flavonoids and tannins were quantified by the reaction with the reagents, Folin-Ciocalteu, aluminum chloride and vanillin, respectively. The chemical profile was performed by HPLC-DAD. The antimicrobial activity was investigated by microdilution assay to determine the minimum inhibitory concentration of the extracts for the microorganisms tested. Finally, the antioxidant activity was measured by scavenging of free radicals 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) and 2,2'-azinobis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) free radicals, and protection against hemolysis induced by 2,2'-azobis(2-amidinopropane) dihydrochloride (AAPH), followed by quantification of malondialdehyde (MDA) production from lipid peroxidation. Phenolic acids were identified: caffeic acid, p-coumaric acid and rosmarinic acid, in addition to flavonoids: quercetin and luteolin. The leaf ethanolic extract (EEF) presented a bacteriostatic action of 1000 µg mL⁻¹ for all evaluated Gram-negative bacteria (*Salmonella* Typhimurium, *Salmonella* Enteritidis, *Pseudomonas aeruginosa* and *Proteus mirabilis*) and the hexane extract of the bark (EHEC) had moderate action Antifungal activity against *Candida krusei* and *Cryptococcus gattii* (250 µg mL⁻¹). IC₅₀ was obtained from 8.19 ± 1.25 (EEF) and 4.51 ± 0.49 µg mL⁻¹ (EEC) in the DPPH assay and 6.25 ± 0.89 (EEF) and 2.87 ± 0.42 µg mL⁻¹ (EEC) in the ABTS assay. Up to 3 h of assay, ECS and EPS had protective action against AAPH-induced oxidative hemolysis, reducing the generation of malondialdehyde, which contributes to the maintenance of cellular structure. In view of the presented, the extracts of *O. minarum* can be evaluated as bioactive inputs for the development of new drugs with pharmaceutical properties.

Keywords: *Ocotea minarum*; activity antimicrobial; microdilution assay; activity antioxidant, lipid peroxidation.

1. Introdução

O uso de plantas medicinais como matéria prima para fabricação de produtos com finalidades terapêuticas é comum entre as mais diversas populações, e estima-se que das 60.000 espécies descobertas, menos de 800 tiveram seus potenciais biológicos avaliados (Sajkowska-Koxielewicz et al., 2016; Zurowska, 2001). Sabe-se que plantas com metabólitos secundários como alcaloides, cumarinas, taninos, terpenos e flavonóides presentes em sua composição, tem sido fontes de diversos compostos bioativos benéficos para a saúde humana (Deng et al., 2014).

As infecções microbianas estão crescendo a níveis alarmantes (Catteau et al., 2015; Zhang et al., 2009) em razão das bactérias e leveduras em geral, possuem a capacidade de adquirir e/ou transmitir material genético de resistência, tornando esta constante evolução de microrganismos multirresistentes, um grave problema de tratamento da saúde pública (Kacem et al., 2016; Su et al., 2015; Rossolini et al., 2014; Grundmann et al., 2011). Como alternativas contra patógenos multirresistentes, plantas medicinais estão recebendo foco especial para desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos, devido às suas atividades terapêuticas, menor toxicidade e viabilidade econômica, quando comparadas aos compostos alopáticos tradicionais (Said et al., 2016; Adrar et al., 2016; Auddy et al., 2003).

Outro problema que afeta a saúde pública são os danos degenerativos em tecidos e biomoléculas, ocasionados pelo desequilíbrio de substâncias oxidantes e antioxidantes no organismo, que caracterizam o quadro de estresse oxidativo. O estresse oxidativo é um fator importante para o desencadeamento de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, inflamações, envelhecimento precoce e diabetes (Espindola et al., 2016; Elnakish et al., 2013). Uma opção para a redução desta condição, é o emprego de substâncias antioxidantes que podem atuar na neutralização ou até mesmo na captura das espécies reativas, minimizando os danos oxidativos nos tecidos celulares (Mohamed et al., 2014; Silva et al., 2007). O BHA (hidroxianisol butilado) e o BHT (hidroxitolueno butilado) são os antioxidantes sintéticos mais utilizados, porém são questionados quanto aos seus valores nutricionais e possíveis efeitos mutagênicos, carcinogênicos, tóxicos e sua hepatotoxicidade (Coccimiglio et al., 2016; Jomova & Valko, 2011; Politeo et al., 2007). Já os antioxidantes naturais, de maneira geral, possuem menor toxicidade e são facilmente biodegradáveis, tornando-se assim, uma melhor alternativa para a redução do quadro de estresse oxidativo (Muhammad et al., 2012; Wang et al., 2005).

Espécies de plantas de clima tropical e subtropical despertaram interesse para novas pesquisas pois apresentam propriedades diversas, tais como potentes atividades antimicrobianas e antioxidantes (Mohamed et al., 2013; 2014). Dentre estas plantas, o gênero *Ocotea*, está entre os mais expressivos da família Lauraceae, cerca de 300 a 400 espécies encontradas em regiões tropicais e subtropicais (Batista et al., 2010; Van Der Werff, 2002), estima-se que 120 a 160 espécies estão no Brasil (Baitello, 2001) dispersas nos biomas Mata Atlântica e Cerrado (Quinet et al., 2015). Estudos com espécies deste gênero tem demonstrado várias atividades biológicas, tais como antimicrobianos (Da Silva et al., 2017; Gil et al., 2016; Castro & Lima, 2011; Bruni et al., 2004), antioxidantes (Da Silva et al., 2017; Yamaguchi et al., 2012; Guerrini et al., 2006; Bruni et al., 2004), anti-inflamatória (Destryana et al., 2014) e antiprotozoário (Fournet et al., 2007).

Dentre o gênero *Ocotea*, destaca-se a espécie *Ocotea minarum* (Nees & Mart) Mez., uma árvore de médio porte, conhecida popularmente como “canelinha ou canela vassoura” (Moraes, 2005), caracterizada fitoquimicamente por conter em sua composição alcaloides aporfínicos (Vecchiatti et al., 1979), alcaloides indólicos, cumarina, flavonoides, biflavonóides, bis-lignana, alquil benzeno e esteroides (Garcez et al., 2005) sesquiterpenos, nor-sesquiterpenos e lactona terpênica (Nogueira, 2007). Estudos com *O. minarum* apresentaram moderada atividade antifúngica (Nogueira, 2007) e demonstraram não ter atividade genotóxica (Guterres et al., 2012), porém estudos sobre as propriedades antibacterianas e antioxidantes são escassos na literatura. Portanto, o objetivo do nosso trabalho foi determinar o perfil fitoquímico, avaliar a atividade antifúngica, e pela primeira vez, avaliar a atividade antibacteriana e o potencial antioxidante dos extratos da casca e folhas de *O. minarum*.

2. Metodologia

2.1. Material vegetal

As cascas e folhas de *Ocotea minarum* foram coletadas na fazenda “Mata dos Macacos”, (S 22° 08` 47.2" / W 054° 54` 54.1") na cidade de Dourados, MS - Brasil. Amostras da espécie foram identificadas pela Prof. Dra. Zefa Valdivia Pereira e depositadas no Herbário da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) sob o registro 5275 DDMS.

2.2. Preparo dos extratos vegetais

Cascas (246,80 g) e folhas (237,28 g) foram higienizados e secas em estufa de ar circulante à 40 °C por 10 dias para casca e 6 dias para folhas, posteriormente pulverizado em moinho de facas. O material vegetal passou por extração com 800 mL de álcool etílico 80% à temperatura ambiente com agitações a cada 24 h. Após 72 h, foi filtrado em papel filtro, concentrado em rotaevaporador à 35 °C e liofilizado, obtendo-se os extratos etanólico da casca (EEC) e das folhas (EEF) de *O. minarum*.

Para o preparo das partições líquido-líquido utilizou-se 4 g dos EEC (18 g) e EEF (14,7 g). Foram utilizados solventes de polaridade crescente (hexano e acetato de etila), assim obtendo: extrato hidroetanólico (EHIC; EHIF), extrato hexano (EHEC; EHEF) e extrato acetato de etila (EAC; EAF) da casca e folhas de *O. minarum*, respectivamente (Matos, 2009).

2.3. Determinação de compostos fenólicos

Compostos fenólicos foram avaliados conforme descrito por Djeridane et al. (Djeridane et al., 2006). A cada 100 µL de amostra dos EEC e EEF a 100 µg mL⁻¹, foi adicionado 500 µL de reagente Folin-Ciocalteu e 1 mL de água destilada e incubadas a temperatura ambiente durante 1 min. Foi adicionado a esta solução 1,5 mL de carbonato de sódio (Na₂CO₃) a 20% e incubadas por 2 h no escuro a temperatura ambiente. A leitura da absorbância foi realizada a 760 nm. Os resultados foram expressos como miligramas equivalentes de ácido gálico (mg/EAG) por grama de extrato.

2.4. Determinação de flavonóides

A quantificação de flavonóides foi realizada pelo método de descrito por (Lin & Tang, 2007). Foi preparada uma solução dos EEC e EEF na concentração de 100 µg mL⁻¹, e uma alíquota de 500 µL desta solução foi acrescentada com 1,5 mL de álcool a 95%, 0,1 mL de cloreto de alumínio hexahidrato (AlCl₃) 10%, 0,1 mL de acetato de potássio (CH₃COOK) 1M, e 2,8 mL de água deionizada. Incubados a temperatura ambiente por 40 min e posteriormente realizada a leitura em espectrofotômetro, com comprimento de onda de 415 nm. Os resultados foram expressos como miligramas equivalentes de quercetina (mg/EQ) por grama de extrato.

2.5. Determinação de taninos

Os taninos foram quantificados utilizando a reação de vanilina de acordo com (Broadhurst & Jones, 1978) e adaptada por (Agostini-Costa et al., 1999). Para isto, 5 mL do reagente recém preparado de vanilina (vanilina-HCL-metanol/4:10:86) foi adicionado em cada tubo de ensaio e foi acrescentado 1 mL dos EEC e EEF a 100 µg mL⁻¹ em cada tubo, com agitação durante 30 seg. A reação foi mantida em repouso por 15 min e fez-se a leitura da absorbância a 490 nm. Os resultados foram expressos em miligramas equivalentes de catequina (mg/ECA) por grama de extrato.

Todos os testes aplicados foram realizados em triplicatas.

2.6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), com detector de arranjo de diodos (DAD)

A análise dos EEC e EEF em CLAE foram realizadas num modelo Shimadzu®, equipado com uma coluna C18 Phenomenex Gemini (25 cm x 4,6 mm x 5 µm). Os solventes utilizados foram eluídos em água e metanol. A vazão de fluxo foi de 1 mL min⁻¹, com detector de DAD foi monitorado entre 200-800 nm. Fase móvel de acetronitrila (eluente B), fluxo de 1 mL min⁻¹ a 25 °C e o volume de injeção de 10 µL. Foi aplicado: 0 min 5% B, 45 min 15% B, 55 min 30% B, 60 min 50% B, 65 min 100% B (Kumaran & Karunakaran, 2013).

2.7. Atividade Antimicrobiana

2.7.1. Microrganismos para os ensaios antimicrobianos

Os microrganismos utilizados para os testes de atividades antimicrobianas foram provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA), sendo as leveduras: *Candida albicans* (90028), *Candida glabrata* (2001), *Candida krusei* (6558), *Candida tropicalis* (750), *Candida parapsilosis* (22019) *Candida dubliniensis* (MYA-646) *Cryptococcus gattii* (56990) *Cryptococcus neoformans* (32045) *Rhodotorula glutinis* (2527) e *Rhodotorula mucilaginosa* (64684). Bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (25923), *Staphylococcus epidermidis* (12228), *Bacillus cereus* (11778). Bactérias Gram-negativas: *Salmonella Typhimurium* (14028), *Salmonella Enteritidis* (13076), *Pseudomonas aeruginosa* (27853) e *Proteus mirabilis* (35659).

Para preparo dos inóculos, os microrganismos foram suspensos em solução salina estéril (0,9% NaCl) e ajustados em espectrofotômetro. Para as leveduras, 90%

(± 2) de transmitância a 530 nm, correspondendo uma suspensão de 0,5 a $2,5 \times 10^6$ UFC mL⁻¹. Para as bactérias 0,110 ($\pm 0,005$) de absorvância a 625 nm, correspondendo a $1,5 \times 10^8$ UFC mL⁻¹.

2.7.2. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato

O ensaio de susceptibilidade foi realizado por meio da técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standards Institute*. Para as leveduras seguiu as normas do documento M27-A3 (CLSI, 2008) e para bactérias o documento M07-A9 (CLSI, 2012) com algumas modificações para utilização de extratos vegetais.

Os EEC, EEF, EHIC, EHEC, EAC, EHIF, EHEF e EAF foram dissolvidos em dimetilsulfoxido (DMSO), em seguida, diluições sucessivas (1:2) do extrato foram realizadas na microplaca de 96 poços com concentrações testadas de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 1,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Como controle de esterilidade dos extratos, nos poços da coluna 1 da microplaca foi adicionado 100 μL do meio de cultura e 50 μL dos extratos.

A quantidade de inóculo adicionado nas placas foi de 10 μL para bactérias e de 100 μL para leveduras. Os meios de cultivo utilizados foram RPMI-1640 para leveduras e caldo Müller Hinton para bactérias. As microplacas foram incubadas a 35 °C por 48 h (*Candida* sp.), 72 h (*Cryptococcus* sp. e *Rhodotorula* sp.) e a 37 °C por 24 h para as bactérias. O fluconazol foi utilizado como antifúngico e a ampicilina como antibiótico controle. Os experimentos foram realizados em triplicada em três momentos distintos.

2.7.3. Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Alíquotas da placa de microdiluição do CIM foram transferidas para uma placa de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose ou ágar Müller Hinton para avaliação da atividade fungicida e bactericida, respectivamente. As placas foram incubadas a 35 °C por 48h (*Candida* sp.), 72 h (*Cryptococcus* sp. e *Rhodotorula* sp.) e a 37 °C por 24 h para as bactérias. A CFM e CBM foram definidas como a menor concentração capaz de inibir o crescimento de colônias (Bagiu et al., 2012).

2.8. Atividade Antioxidante

2.8.1. Ensaio de captação do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

A atividade antioxidante do EEC e EEF foi avaliada utilizando-se a técnica

descrita por (Sharma & Jha, 2012) de captura do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Para isto, 1800 µL de solução etanólica de DPPH (0,11 mM) foi incubado com 200 µL dos controles positivos, ácido ascórbico (AA) e hidroxibutiltolueno (BHT) ou dos EEC e EEF, nas concentrações 0,1, 1, 5, 10, 50, 100, 500, 1000 e 2000 µg mL⁻¹ em etanol 80 %. Após 30 min de incubação à temperatura ambiente e ao abrigo da luz, foram realizadas leituras em espectrofotômetro a 517 nm, onde a absorbância de cada amostra foi transformada em % de captação de radical livre de acordo com a fórmula (2). Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

$$\text{Inibição do radical livre DPPH (\%)} = \frac{(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra})}{\text{Abs controle}} \times 100 \quad (2)$$

2.8.2. Ensaio de captação do radical 2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) (ABTS)

Foi avaliada a capacidade de captura do radical 2,2'- azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico) (ABTS) dos EEC e EEF conforme método descrito por (Re & Pellegrini, 1999). Como controle positivo, foram utilizados o AA e o BHT. A solução estoque de ABTS foi preparada a partir de uma solução de etanol P.A com persulfato de potássio, em um período prévio de 12 a 16 h, mantida a temperatura ambiente e ao abrigo da luz. O radical ABTS foi diluído em etanol P.A até atingir absorbância de $0,70 \pm 0,05$ a 734 nm, e foi incubado em uma reação de 6 min com as soluções previamente preparadas dos extratos e dos controles nas mesmas concentrações avaliadas no ensaio antioxidante anterior. Os volumes de reagente foram 1980 µL do radical ABTS para 20 µL de solução amostra e as leituras ocorreram em espectrofotômetro a 734 nm. Os resultados foram expressos em % de captação de radical livre de acordo com a fórmula (3). Foram realizados três experimentos independentes em duplicata.

$$\text{Inibição do radical livre ABTS (\%)} = \frac{(\text{Abs controle} - \text{Abs amostra})}{\text{Abs controle}} \times 100 \quad (3)$$

2.8.3. Ensaio de hemólise oxidativa induzida por 2,2'-azobis (2-amidinopropano) (AAPH):

A proteção dos EEC e EEF contra peroxidação lipídica foi avaliada pela técnica de hemólise oxidativa induzida por 2,2-azobis 2-amidinopropano dihidroclorido, (Sigma-Aldrich) (AAPH), descrita por Valente et al., (2011). Para isto, após a aprovação do Comitê de ética em pesquisa (CEP) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) com o processo de nº 5160, foram coletados 25 mL de sangue total periférico de um único indivíduo adulto, saudável e não fumante, e armazenados em tubos contendo anticoagulante citrato de sódio. A partir desta amostra, foi preparada uma solução de hemácias a 10% em solução fisiológica (NaCl, 0,9%).

Os EEC e EEF foram avaliados nas seguintes concentrações: 10, 25, 50, 75, 100 e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo inicialmente preparados em uma solução estoque de 50 mg mL^{-1} , de maneira que o diluente do extrato interferisse o mínimo possível no ensaio. A solução eritrocitária foi incubada com água destilada (indução de hemólise total), com soro fisiológico (hemólise nula), com uma solução do diluente do extrato na maior concentração testada (controle solvente) e com o indutor de hemólise AAPH (50 mM). Juntamente, o (AA) foi inserido como controle positivo, nas mesmas concentrações dos extratos. H_2O

Posteriormente, foram incubados a 37°C em tubos de acrílico em duplicata para as quatro horas de experimento, onde foram adicionadas as soluções tratamento ou os controles, seguido da solução de hemácias a 10 % por 30 minutos, posteriormente adicionou-se a solução de AAPH (nos grupos de tratamento com indução de hemólise) ou a solução fisiológica (nos grupos de tratamento sem indução de hemólise). Em seguida as amostras continuaram incubadas em banho-maria a 37°C durante 4 horas, e os tubos foram homogeneizados de forma constante durante o experimento. Para cada hora de análise, uma duplicata foi retirada, centrifugada e o sobrenadante pipetado em cubetas previamente preenchidas com solução fisiológica para posterior leitura em espectrofotômetro a 540 nm. Foram realizados três experimentos independentes em duplicata e aplicados de acordo com a fórmula 4.

$$\text{Hemólise (\%)} = \frac{\text{Abs amostra}}{\text{Média Abs hemólise total}} \times 100 \quad (4)$$

2.8.4. Dosagem de malondialdeído (MDA) gerado:

Após o período de incubação dos eritrócitos com AAPH, como descrito

anteriormente, uma alíquota de 500 µL do sobrenadante restante (dos grupos analisados com AAPH) foram acrescidos de 1 mL de ácido tiobarbitúrico 20 mM (TBA, Merck) e incubados em banho-maria a 96 °C por 45 minutos. Após o término da incubação, os tubos foram então inseridos em um banho de gelo por 15 minutos para a interrupção da reação. Em seguida, 4 mL de butanol foram adicionados nos tubos, com posterior agitação em vórtex seguidos de centrifugação a 3000 rpm por 5 minutos, de acordo com o método descrito por (Campos et al., 2014). A leitura da absorbância do sobrenadante foi realizada em espectrofotômetro a 532 nm. O conteúdo de MDA foi expresso em nmol mL⁻¹, obtido a partir da fórmula 5.

$$\text{MDA} = \frac{\text{Abs amostra} (20 \times 220,32)}{\text{Abs controle}} (5)$$

2.9 Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média. A comparação múltipla de resultados foi realizada pela análise de variância (ANOVA) seguida do teste de *Dunnet* para a comparação entre mais de dois grupos experimentais. A comparação entre dois grupos experimentais foi realizada pelo teste de *Newman-Keuls*. As análises estatísticas foram realizadas com auxílio do programa estatístico GraphPad Prism 5. Os dados foram considerados significantes quando P<0,05.

3. Resultados

3.1. Determinação fitoquímica e perfil cromatográfico

A determinação dos índices de compostos fenólicos, flavonoides e taninos presentes no EEC foram maiores, seguido do EEF, como demonstrado na Tabela 1.

Tabela 1. Determinação de compostos fenólicos, flavonóides e taninos condensados presentes nos EEC e EEF de *O. minarum*.

	Compostos Fenólicos	Flavonóides	Taninos Condensados
Amostras	(mg EAG g⁻¹)	(mg EQ g⁻¹)	(mg ECA g⁻¹)
EEC	156,4 ±3,1	72,1 ±1,6	16,1 ±0,2
EEF	134,5 ±2,3	78,5 ±1,4	12,9 ±0,1

Extrato Etanólico da Casca (EEC); Extrato Etanólico da Folha (EEF); EAG: Equivalente de Ácido Gálico; EQ: Equivalente de Quercetina; ECA: Equivalente de Catequina.

Na análise do perfil cromatográfico foram detectados ácido cafeico (15 min) e ácido rosmarínico (53,7 min) no EEC por CLAE (Figura 1). No EEF de *O. minarum* foi detectado Ácido cafeico (15,1 min), ácido p-cumárico (25,2 min), ácido rosmarínico (53,7 min), quercetina (59,1 min) e luteolina (59,7 min) (Figura 2).

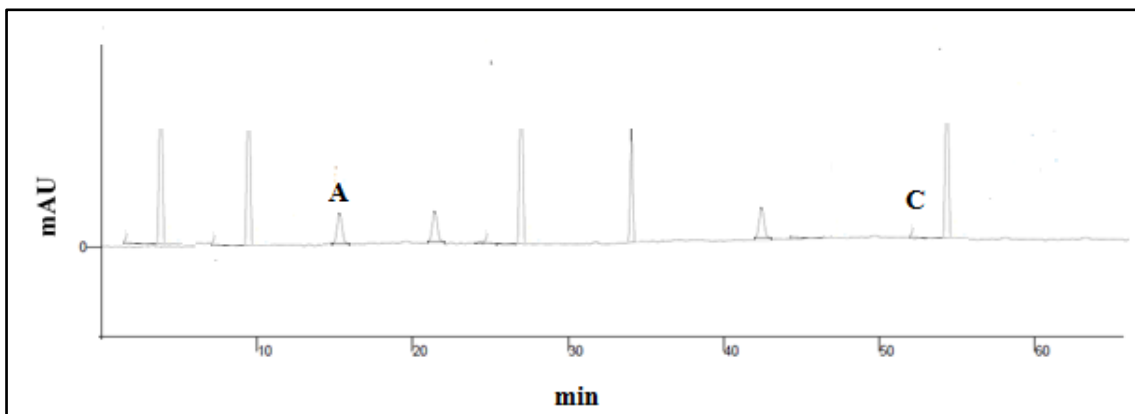


Figura 5. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do EEC de *Ocotea minarum*. A (15 min) ácido cafeico; C (53, 7 min) ácido rosmarínico;

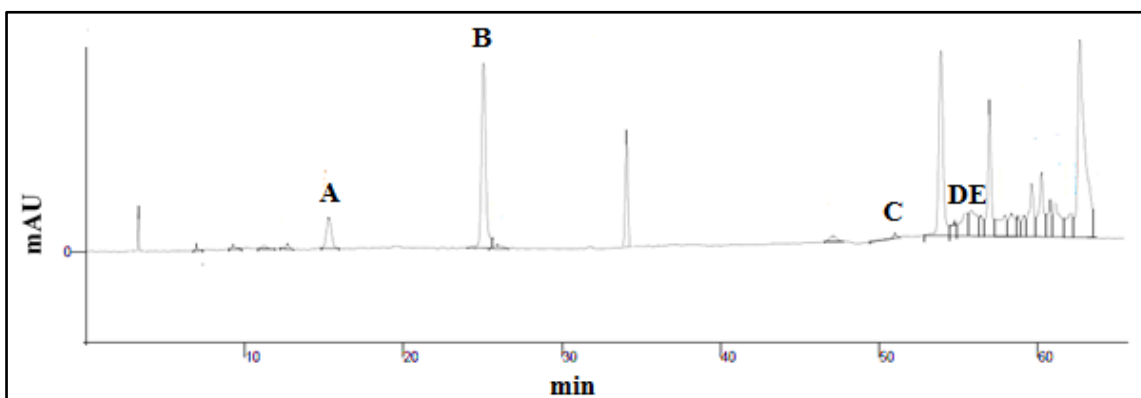


Figura 6. Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do EEF de *Ocotea minarum*. A (15, 1 min) ácido cafeico; B (25, 2 min) ácido p-cumárico; C (53, 7 min) ácido rosmarínico; D (59, 1 min) quercetina; E (59, 7 min) luteolina;

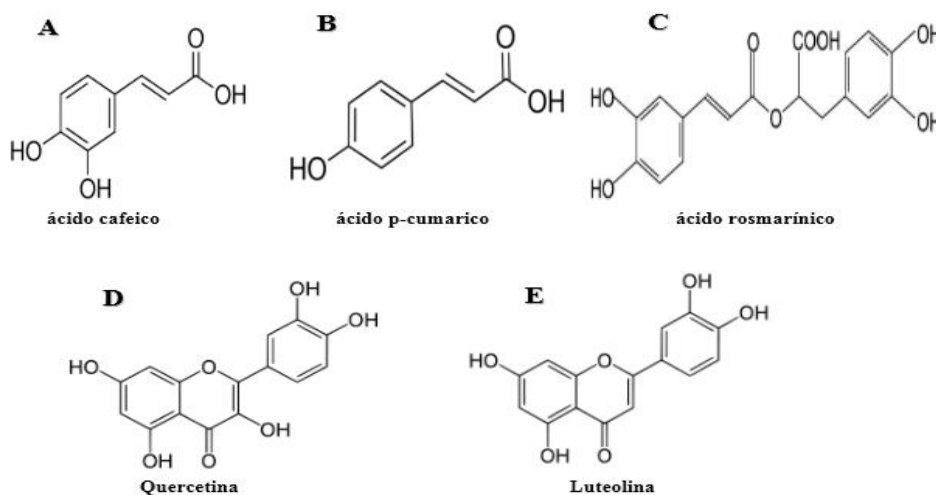


Figura 7. Compostos identificados na Cromatografia Líquida de Alta Eficiência do extrato etanólico da casca (EEC) e extrato etanólico das Folhas (EEF) de *Ocotea minarum* (Figuras 2 e 3).

3.2. Atividade antimicrobiana

Nesse estudo, todos os extratos avaliados apresentaram atividade antimicrobiana contra leveduras, bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Tabelas 2 e 3). O EHEC foi efetivo contra todas as leveduras avaliadas, como exceção para *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula mucilaginosa*. OS EEF, EHIF e EHEC tiveram ação fungistática e fungicida frente a *C. krusei* (Tabela 2).

O EHIC apresentou ação bacteriostática e bactericida contra as bactérias Gram-positivas avaliadas. O EEF apresentou atividade antibacteriana de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para todas as bactérias Gram-negativas avaliadas (Tabela 3).

De acordo com os resultados, pode-se notar ação fungicida para leveduras e bactericida para bactérias Gram-positivas. Para bactérias Gram-negativas foi evidenciado somente ação bacteriostática e nenhum dos extratos avaliados foi efetivo contra *Rhodotorula glutinis* e *Rhodotorula mucilaginosa*. No contexto geral, os extratos derivados das folhas tiveram melhor atividade antimicrobiana quando comparado com os extratos da casca de *O. minarum* (Tabelas 2 e 3).

Tabela 2. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Fungicida Mínima (CFM) dos extratos das folhas e casca de *O. minarum* frente a leveduras.

Extratos	EEF ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		EAF ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		EHEF ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		EHIF ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		EEC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		EAC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		EHEC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		EHIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		FLU ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM		
<i>Candida albicans</i>	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	-	-	-	2
<i>Candida glabrata</i>	500	-	500	500	-	-	-	-	-	-	-	-	-	500	500	-	-	8
<i>Candida krusei</i>	250	500	125	-	-	-	125	250	500	-	250	-	250	250	250	-	-	32
<i>Candida tropicalis</i>	-	-	500	-	-	-	1000	1000	500	1000	1000	-	250	250	1000	-	-	1
<i>Candida parapsilosis</i>	250	-	500	-	-	-	-	-	250	-	1000	-	500	500	-	-	-	2
<i>Candida dubliniensis</i>	250	1000	500	500	-	-	-	-	500	1000	250	-	1000	-	-	-	-	0,25
<i>Cryptococcus gattii</i>	500	-	250	-	-	-	-	-	500	-	1000	-	250	-	-	-	-	
<i>Cryptococcus neoformans</i>	500	-	125	-	-	-	-	-	500	-	500	-	62,5	-	-	-	-	
<i>Rhodotorula glutinis</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	

Extrato Etanólico da Folha (EEF); Extrato Acetato de Etila da Folha (EAF); Extrato Hexano da Folha (EHEF); Extrato Hidroalcolico da Folha (EHIF); Extrato Etanólico da Casca (EEC)
Extrato Acetato de Etila da Casca (EAC); Extrato Hexano da Casca (EHEC); Extrato Hidroalcolico da Casca (EHIC); Fluconazol (FLU).

Microrganismos provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC).

(-) Sem atividade nas concentrações testadas. Análise Biológica realizada em duplicata e em três experimentos independentes.

Tabela 3. Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CFM) dos extratos das folhas e casca de *O. minarum* frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

Extratos	EEF ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		EAF ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		EHEF ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		EHIF ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		EEC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		EAC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		EHEC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		EHIC ($\mu\text{g mL}^{-1}$)		AMP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM	CBM	CIM
<i>Staphylococcus aureus</i>	500	-	125	500	1000	-	+	-	500	-	250	-	500	-	125	1000	32
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	1000	-	250	-	-	-	500	-	1000	-	250	-	1000	-	125	1000	64
<i>Bacillus cereus</i>	250	-	62,5	250	1000	-	125	1000	500	500	500	-	500	-	62,5	500	32
<i>Salmonella Typhimurium</i>	1000	-	1000	-	-	-	-	-	-	-	-	-	1000	-	-	-	32
<i>Salmonella Enteritidis</i>	1000	-	1000	-	1000	-	1000	-	1000	-	-	-	1000	-	1000	-	32
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1000	-	-	-	1000	-	1000	-	-	-	1000	-	500	-	1000	-	-
<i>Proteus mirabilis</i>	1000	-	1000	-	-	-	-	-	-	-	1000	-	-	-	1000	-	32

Extrato Etanólico da Folha (EEF); Extrato Acetato de Etila da Folha (EAF); Extrato Hexano da Folha (EHEF); Extrato Hidroalcoólico da Folha (EHIF); Extrato Etanólico da Casca (EEC) Extrato Acetato de Etila da Casca (EAC); Extrato Hexano da Casca (EHEC); Extrato Hidroalcoólico da Casca (EHIC); Ampicilina (AMP).

Microrganismos provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC).

(-) Sem atividade nas concentrações testadas. Análise Biológica realizada em duplicata e em três experimentos independentes.

3.3 Atividade antioxidante

3.3.1 Atividade de sequestro dos radicais DPPH e ABTS

No ensaio com DPPH, o EEC apresentou IC_{50} e a atividade máxima similar ao composto natural, AA. Em relação ao antioxidante sintético, BHT, o EEC apresentou valores superiores de captura de radical livre de aproximadamente 50 % (Tabela 4). Já o EEF obteve IC_{50} mais elevado que a dos padrões avaliados e atividade máxima igual à do BHT.

No ensaio com ABTS, o EEC demonstrou atividade antioxidante relativamente menor que o AA e melhor ação antioxidante que o BHT. O EEF teve a IC_{50} e a atividade máxima semelhante ao BHT. Neste contexto, deve ser levado em conta que o AA e o BHT são compostos isolados, e os extratos avaliados são compostos brutos, que além dos compostos antioxidantes, possuem diversos outros em sua composição e seu potencial antioxidante deve ser atribuído aos metabólitos secundários. A partir destes resultados, observou-se que o EEC teve melhor atividade antioxidante que o EEF em ambos os ensaios avaliados.

Tabela 4. Atividade antioxidante dos EEF e EEC de *O. minarum*.

	DPPH			ABTS		
	IC_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$	Atividade máxima $\mu\text{g mL}^{-1}$	%	IC_{50} $\mu\text{g mL}^{-1}$	Atividade máxima $\mu\text{g mL}^{-1}$	%
AA	$4,36 \pm 1,63$	10	95,58	$1,16 \pm 0,14$	5	99,61
BHT	$6,07 \pm 0,79$	50	86,13	$6,42 \pm 0,43$	50	97,88
EEF	$8,19 \pm 1,25$	50	90,12	$6,25 \pm 0,89$	50	95,59
EEC	$4,51 \pm 0,49$	10	83,93	$2,87 \pm 0,42$	10	94,32

AA (ácido ascórbico); BHT (hidroxibutiltolueno); DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil); ABTS (2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido-sulfônico)); IC_{50} , concentração necessária para capturar 50% dos radicais livres da reação. EEF (extrato etanólico da folha); EEC (extrato etanólico da casca).

3.3.2 Atividade hemolítica

Depois de observada a atividade antioxidante nos ensaios DPPH e ABTS, avaliou-se os efeitos tóxicos dos EEC e EEF em eritrócitos humanos. Após incubação de 240 min (Figura 4), o padrão antioxidante AA não induziu hemólise nas concentrações avaliadas, comportamento semelhante ao avaliado por Cerqueira et al., (2007), onde nas doses avaliadas o AA apresentou efeito apenas antioxidante, entretanto quando avaliado em doses maiores seu efeito passa a ser pró-oxidante. Já os EEC e EEF não induziram à hemólise nas menores concentrações, porém nas concentrações mais elevadas, apresentou potencial pró-oxidante.

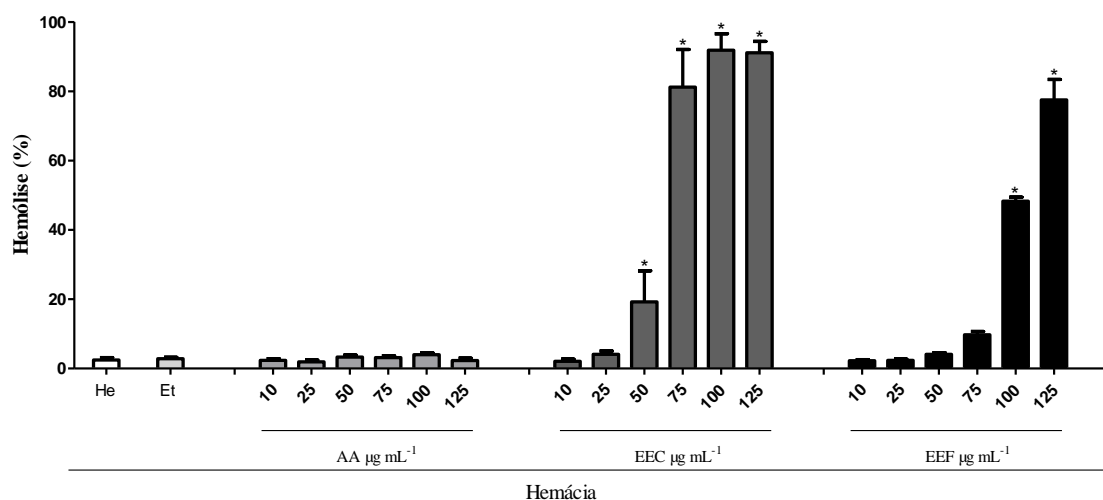


Figura 8. Avaliação da hemólise a 10% (He) incubada por 240 min com o padrão antioxidante ácido ascórbico (AA) e os extrato etanólico da casca (EEC) e extrato etanólico das folhas (EEF) de *O. minarum* nas concentrações de 10, 25, 50, 75, 100 e 125 µg mL⁻¹. *P>0,05 vs controle He.

3.3.3 Proteção contra hemólise oxidativa

Após a avaliação da toxicidade dos extratos em eritrócitos humanos, verificou-se a atividade protetora do EEC e EEF nos eritrócitos induzida à hemólise oxidativa, e foi observado seu comportamento de forma dose não dependente, nas concentrações de 10 – 100 µg mL⁻¹, além de que a proteção foi maior até 180 min de incubação (Figura 5b).

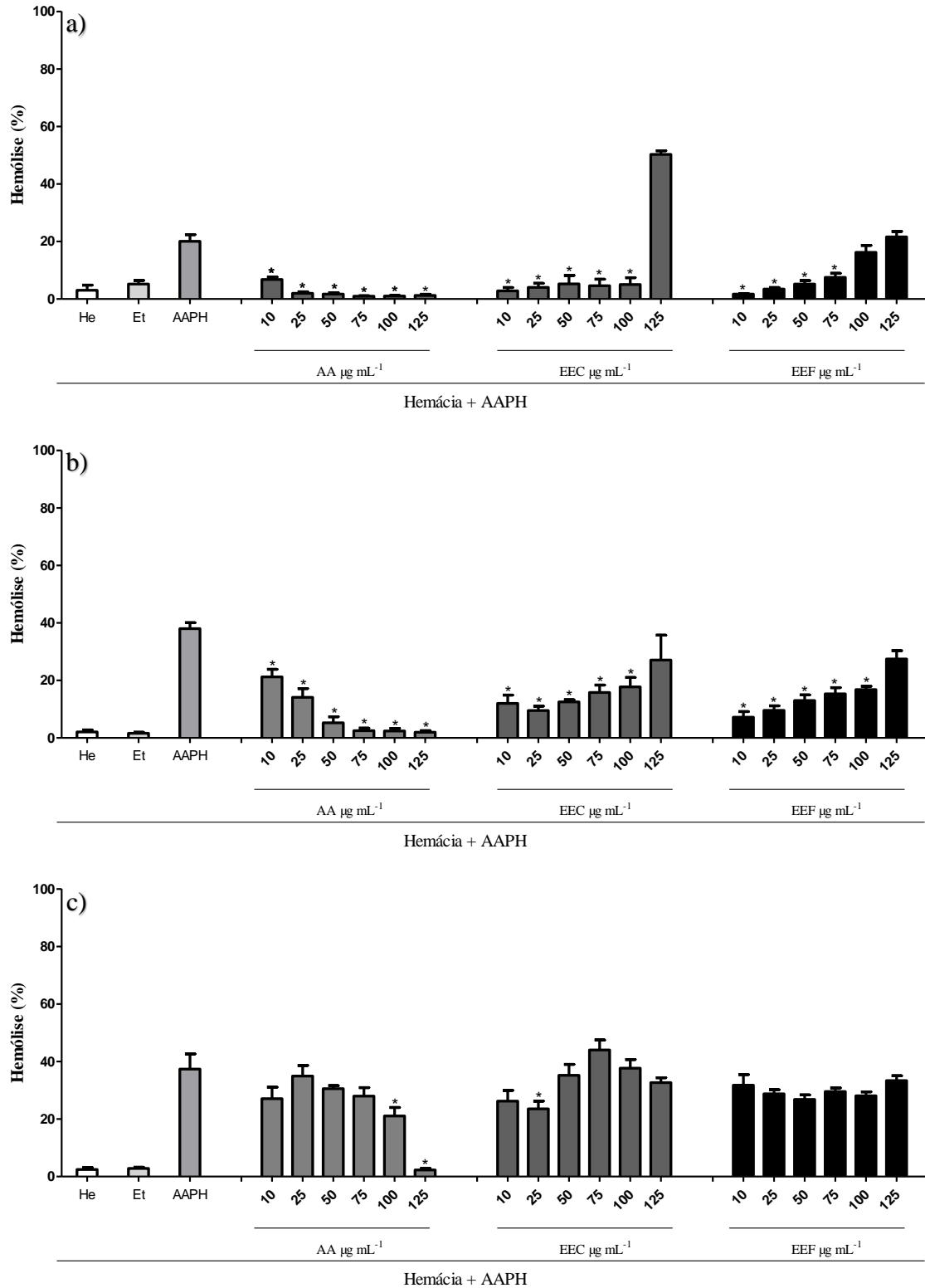
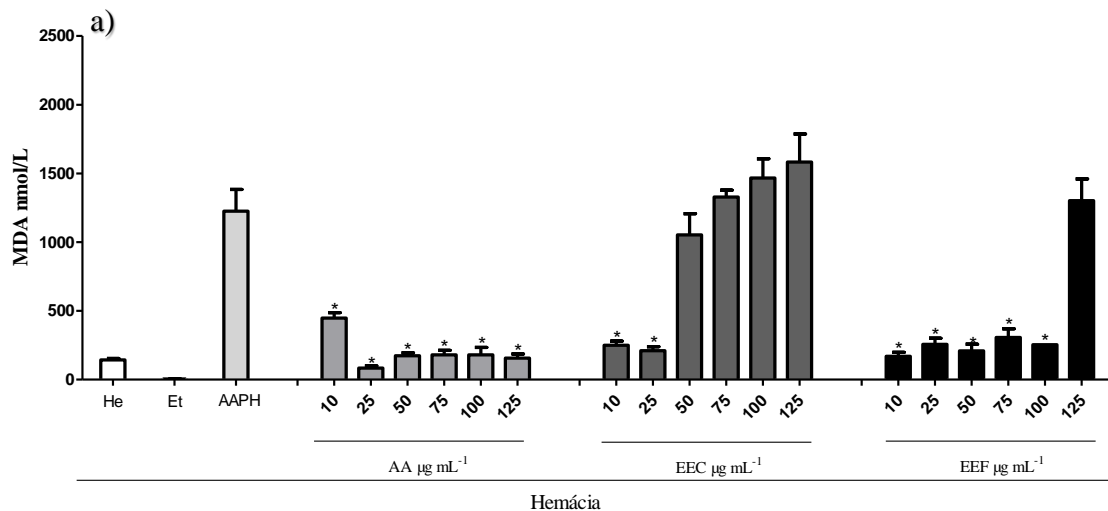


Figura 9. Avaliação da ação protetora contra hemólise oxidativa do extrato etanólico da casca (EEC) e extrato etanólico das folhas (EEF) de *O. minarum* e do padrão antioxidante ácido ascórbico (AA) nas concentrações de 10, 25, 50, 75, 100 e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ após incubação de a) 120, b) 180 e c) 240 min comparado com o indutor de hemólise AAPH. * $P > 0,05$ vs AAPH.

3.3.4 Dosagem de malondialdeído (MDA)

A confirmação da hemólise oxidativa por indução de peroxidação lipídica foi avaliada através da geração de malondialdeído (MDA) até o tempo de 240 min nas diferentes concentrações (10 -125 $\mu\text{g mL}^{-1}$) dos EEC e EEF e do antioxidante padrão AA. No tempo de 120 min, quando comparados com o grupo controle AAPH, os eritrócitos incubados com EEC apresentaram redução aproximadamente de 80 e 83 % de geração de MDA nas concentrações 10 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, e os incubados com EEF nas concentrações de 10, 25, 50, 75 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentaram redução aproximada de 87, 80, 84, 76 e 80%, respectivamente. Assim, a atividade de redução descritos para EEC e EEF tiveram resultado similar ao AA, utilizado como padrão antioxidante.

Além disso, no tempo de 180 min somente o EEF demonstrou menor geração de MDA, aproximadamente 45, 40, 40 e 36% nas respectivas concentrações de 10, 25, 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. E no tempo de 240 min, apenas a concentração de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ apresentou diferença estatística em relação grupo AAPH, com redução de 47%.



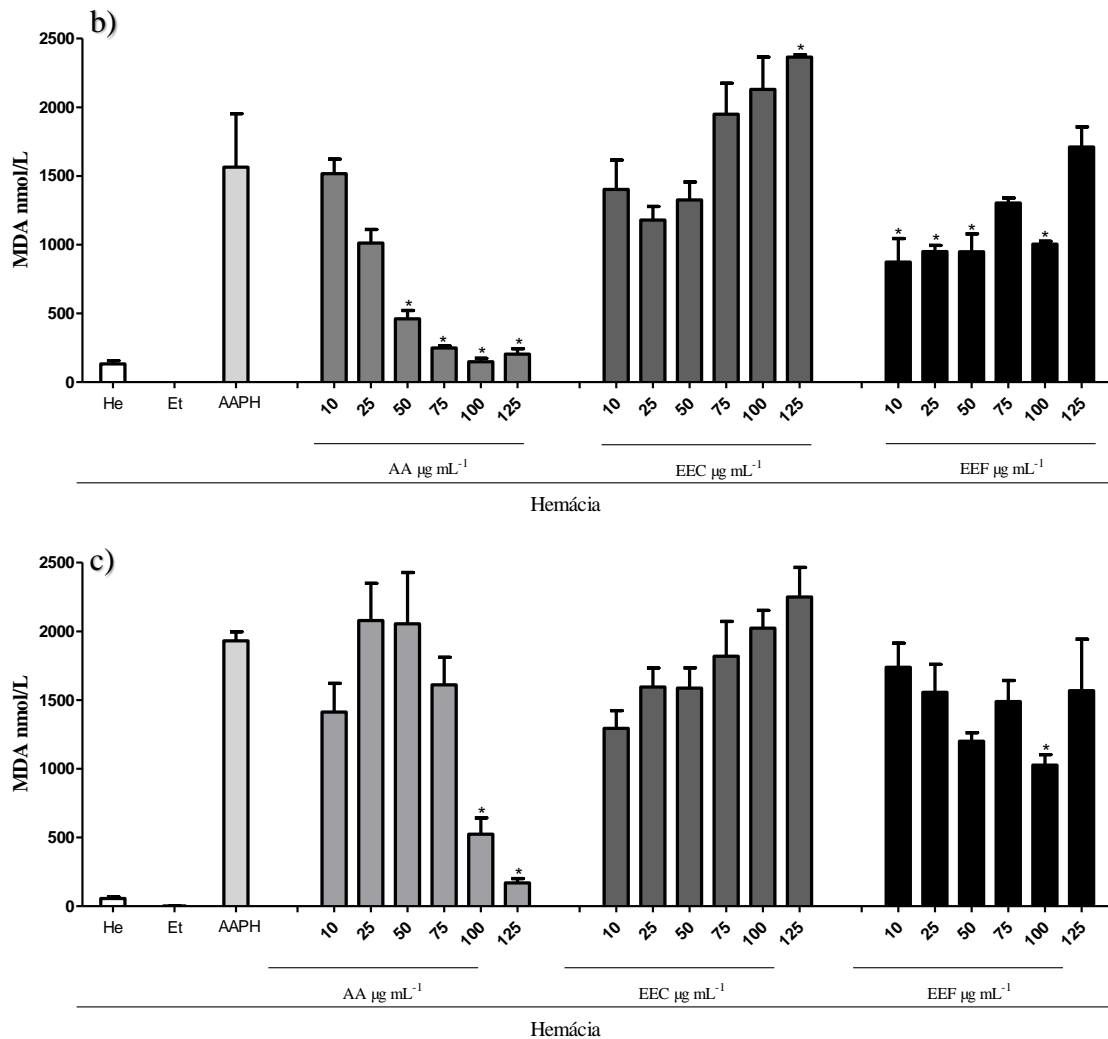


Figura 10. Concentração de malondialdeído (MDA) em eritrócitos do extrato etanólico da casca (EEC) e extrato etanólico das folhas (EEF) de *O. minarum* e do padrão antioxidante ácido ascórbico (AA) nas concentrações de 10, 25, 50, 75, 100 e 125 µg mL⁻¹ após incubação de a) 120, b) 180 e c) 240 min comparado com o indutor de hemólise AAPH. *P>0,05 vs AAPH.

4. Discussão

Compostos fenólicos e flavonóides estão entre as principais classes de metabólitos secundários das plantas e estudos têm demonstrado sua capacidade de ação antibacteriana, antifúngica e antioxidante (Daglia, 2012; Nogueira, 2007). Os índices de compostos fenólicos, flavonóides e taninos dos extratos de *O. minarum* foram similares aos encontrados por Silva et al. em outra espécie de *Ocotea* (da Silva et al., 2017). Nas análises por CLAE dos EEC e EEF os compostos ácido cafeico e o ácido p-cumárico identificados já foram relacionados com atividade antioxidante e antimicrobiana de plantas (Broinizi et al., 2007; Ramalho & Jorge, 2006). Os flavonoides quercetina e luteolina foram associados a atividade antimicrobiana, por conseguir penetrar nas membranas fosfolípídicas celulares devido sua hidrofobicidade (Alvesalo et al., 2006;

Daglia, 2012) e ação antioxidante por suas propriedades estabilizadora de ferro e quelante de íons (Sorata et al., 1984; Behling et al., 2004). Assim, pode-se atribuir o potencial antioxidante e antimicrobiana dos nossos extratos aos compostos químicos identificados.

Os extratos de *O. minarum* demonstraram atividade antimicrobiana, em que inibiram o crescimento de 15 entre os 17 microrganismos avaliados no ensaio de microdiluição em caldo. Os microrganismos possuem diversos mecanismos de defesa como: os Gram-positivos possuem apenas uma camada lipopolissacarídeo-fosfolipídica, assim conferindo maior sensibilidade de penetração de substâncias antibióticas, já os Gram-negativos possuem dupla camada de lipopolissacarídeo-fosfolipídica, dificultando a passagem de moléculas para o interior da célula bacteriana (Caumo et al., 2010), há também os mecanismos de efluxo de pequenas moléculas, inativação de enzimas e a perda de porinas na membrana plasmática (Walsh, 2000; Fisher, 2005; Alekshun & Levy, 2007). E algumas leveduras, como *Cryptococcus* sp. e *Rhodotorula* sp., são encapsuladas, o que as conferem maior proteção (Santos et al., 2005).

De acordo com Morales et al. (2008) são considerados diferentes parâmetros de atividade antimicrobiana: CIM inferior a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ - ativa; CIM de 100 a $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ - moderada; CIM de 500 a $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ - atividade antimicrobiana fraca; CIM acima de $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ - inativa.

Estudos com extratos do gênero *Ocotea* já apresentaram atividade antifúngica, como Souza et al. demonstrou atividade antifúngica do extrato metanólico das partes aéreas de *Ocotea odorífera* para *Saccharomyces cerevisiae* (Souza et al., 2004). Guerrini et al. em seu estudo com óleo essencial das flores de *Ocotea bofo* apresentou ação contra *Saccharomyces cerevisiae*, *Rhodotorula glutinis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Yarrowia lypolytica* e *Candida albicans* (Guerrini et al., 2006). E com base nos critérios adotados, o EHEC apresentou boa atividade antifúngica contra *Cryptococcus neoformans* e moderada contra *C. tropicalis*, *Cryptococcus gattii* e *C. krusei*. *Cryptococcus neoformans* pode ter resistência adquirida ao fluconazol e *C. krusei* é intrinsecamente resistente ao mesmo antifúngico e frequentemente é isolada de infecções oportunistas e invasivas ocasionadas por espécies de *Candida* (Colombo et al., 2002).

Para os Gram-positivos, os EAF e EHC apresentaram boa atividade antibacteriana para *Bacillus cereus* e atividade moderada para *S. aureus* e *S. epidermidis*. Bruni et al. com o óleo essencial das flores de *Ocotea quixos* demonstrou

atividade antibacteriana para *S. aureus* e *E. faecalis* (Bruni et al., 2004). Gil et al. demonstrou em seu estudo ação do óleo essencial das folhas de *Ocotea caudata* frente a *B. subtilis* e *S. aureus* (Gil et al., 2016). Para as bactérias Gram-negativas os EEC e EEF de *O. minarum* não apresentaram ação antibacteriana ativa conforme os critérios adotados para avaliação. Portanto, provavelmente os extratos estão atuando na parede celular, ligações peptidoglicano, dos Gram-positivos e não teve boa atividade nos Gram-negativos devido apresentarem dupla camada de lipopolissacarídeo-fosfolipídica, conferindo menor sensibilidade e dificultando a ação de antibióticos no interior celular.

A atividade antimicrobiana apresentada pelos EEC e EEF de *O. minarum* ocorre provavelmente devido a presença dos sesquiterpenos: ácido lanceólico, ácido curcumen-12-óico, ácido -E-exo-abergamoten-12-óico, lactona terpênica lolilideo e nor-sesquiterpeno presentes na estrutura da *O. minarum* (Garcez et al., 2005; Nogueira et al., 2007). E pela primeira vez está sendo descrito na literatura a atividade antibacteriana dessa espécie. Assim, estes extratos podem ser considerados promissores para o processo de desenvolvimento de novos fármacos antimicrobianos.

Paralelamente, os ácidos fenólicos (ácido cafeico e ácido p-cumárico) e o flavonoide (quercetina) identificados neste estudo também estão associados a atividade antioxidante devido sua ação direta na captura de radicais livres (Singh & Chauhan, 2014; Behling et al., 2004; Sorata et al., 1984). O balanço redox no corpo é regulado por mecanismos endógenos e exógenos, nos quais o excesso de radicais livres é um fator fundamental para a causa de inúmeras doenças, como diabetes, envelhecimento precoce, aterosclerose, doenças cardiovasculares entre outras (Espíndola et al., 2016). Por consequência, tem-se aumentado a busca por agentes antioxidantes naturais, para substituir os antioxidantes sintéticos que podem apresentar efeitos prejudiciais à saúde humana (Jandú et al., 2013).

Os EEC e EEF de *O. minarum* demonstraram promissora atividade antioxidante nos testes DPPH e ABTS, quando comparados ao AA e o BHT, antioxidantes de referência. Yamaguchi et al avaliaram as atividades antioxidantes, por método de DPPH, de cinco espécies do gênero *Ocotea*: *O. ceanothifolia*, *O. leucoxydon*, *O. minor*, *O. nigrescens* e *O. splendens*, se destacando a *O. minor* com IC_{50} de $8,21 \pm 0,66 \mu\text{g mL}^{-1}$ para folhas e IC_{50} de $9,08 \pm 0,51 \mu\text{g mL}^{-1}$ para galhos (Yamaguchi et al., 2012) e Silva et al avaliaram a atividade antioxidante das folhas de *O. lancifolia* e obteve do extrato bruto IC_{50} de $1100 \pm 0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ pelo ensaio com DPPH e IC_{50} de $9,31 \pm 0,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ no ensaio com ABTS (Silva et al., 2017). Destryana et al não observaram nenhuma

atividade antioxidante do óleo essencial das folhas de *O. quixos* (Destryana et al., 2014). Neste contexto, pode-se ver que os EEC e EEF de *O. minarum* demonstraram melhor potencial antioxidante em relação a outras espécies do gênero *Ocotea*.

A partir dos resultados obtidos nos ensaios de DPPH e ABTS, avaliou-se os efeitos dos EEC e EEF em eritrócitos humanos. Embora os EEC e EEF nas maiores concentrações tenham induzido aos altos índices de hemólise, houve redução da peroxidação lipídica induzida por AAPH, protegendo os eritrócitos de lise celular de forma semelhante ao AA em baixas concentrações. A peroxidação da membrana fosfolipídica é induzida pelas espécies reativas, em especial as de oxigênio e de nitrogênio, provocando lise e morte celular, e como subproduto desta reação, é gerado o malondialdeído (Kuliaviene et al., 2013; Chiste et al., 2014), sendo este um produto tóxico que leva a liberação de ácidos insaturados e a fragmentação de fosfolipídios, ocasionando mutações e ruptura celular (Wang et al., 2014). O EEC e EEF reduziram a geração de malondialdeído, o que contribui para manutenção da estrutura celular, quando em baixas concentrações.

5. Conclusão

Em suma, os extratos e frações de *O. minarum* demonstraram atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e leveduras, assim podendo ser uma alternativa para novos fármacos antimicrobianos ou até mesmo desinfetantes. Além disso, os extratos de *O. minarum* poderiam ser considerados possíveis substitutos para alguns antioxidantes sintéticos, considerando a capacitação de eliminação dos radicais livres e proteção contra peroxidação lipídica. Com isso, testes *in vivo* com extratos de *O. minarum* serão realizados para o desenvolvimento de novos produtos antimicrobianos e/ou antioxidantes.

6. REFÊRENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adrar, N., Oukil, N., Bedjou., F., 2016. Antioxidant and antibacterial activities of *Thymus numidicus* and *Salvia officinalis* essential oils alone or in combination. *Industrial Crops and Products*, 88, 112–119.
- Agostini-Costa, T. S., Garriti, D. S., Lima, L., Freire, S., Abreu, F. A. P., Feitosa, T., 1999. Avaliação de metodologias para determinação de taninos no suco de caju” *Boletim CEPPA*, 17, 167-176.
- Alvesalo, J., Vuorela, H., Tammela, P., Leinonen, M., Saikku, P., Vuorela, P., 2006. Inhibitory effect of dietary phenolic compounds on *Chlamydia pneumoniae* in cell cultures. *Biochemical Pharmacology*, 71, 735-741.
- Alekshun, M. N., Levy, B. S., 2007. Molecular mechanisms of antibacterial multidrug resistance. *Cell*, 128, 1037–1050.
- Auddy, B., Ferreira, M., Blasina, F., Lafon, L., Arredondo, F., Dajas, F., Tripathi, P. C., Seal, T., Mukherjee, B., 2003. Screening of antioxidant activity of three Indian medicinal plants, traditionally used for the management of neurodegenerative diseases. *Journal of Ethnopharmacology*, 84, 131–138.
- Bagiu, R. V., Vlaicu, B., Butnariu, M., 2012. Chemical composition and *in vitro* antifungal activity screening of the *Allium ursinum* L. (Liliaceae). *International Journal of Molecular Sciences*, 13, 1426-1436.
- Baitello, J. B., 2001. NOVAS ESPÉCIES DE LAURACEAE PARA A FLORA BRASILEIRA. *Acta Botanica Brasilica*, 15, 445-450.
- Batista, A. N. L., Junior, J. M. B., López, S. N., Furlan, M., Cavalheiro, A. J., Silva, D. H. S., Bolzani, V. S., 2010. Aromatic compounds from three brazilian lauraceae species. *Quimica Nova*, 33, 321-323.
- Behling, E. B., Sendão, M. C., Francescato, H. D. C., Antunes, L. M. G., Bianchi, M. de L. P., 2004. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. *Alimentos e Nutrição Araraquara*, 15, 285-292.
- Broadhurst, R. B., Jones, W. T., 1978. Analysis of condensed tannins using acidified vanillin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 29, 788-794.
- Broinizi, P. R. B., Andrade-Wartha, E. R. S., de Oliveira e Silva, A. M., Novoa, A. J. V., Torres, R. P., Azeredo, H. M. C., Alves, R. E., Mancini-Filho, J., 2007. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 27, 902-908.
- Bruni, R., Medici, A., Andreotti, E., Fantin, C., Muzzoli, M., Dehesad, M., Romagnolie, C., Sacchettib, G., 2004. Chemical composition and biological activities of Ishpingo essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. *Food Chemistry*, 85, 415–421.
- Campos, J. F., dos Santos, U. P., Macorini, L. F., de Melo, A. M., Balestieri, J. B., Paredes-Gamero, E. J., Cardoso, C. A., de Souza, K. P., dos Santos, E. L., 2014. Antimicrobial, antioxidant and cytotoxic activities of propolis from *Melipona orbignyi* (Hymenoptera, Apidae). *Food Chemistry and Toxicology*, 65, 374-380.
- Castro, R. D., Lima, E. O., 2011. Atividade antifúngica dos óleos essenciais de sassafrás (*Ocotea odorifera* Vell.) e alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) sobre o gênero *Candida*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 13, 203-208.

- Catteau, L., Bambeke, F. V., Quetin-Leclercq, J., 2015. Preliminary evidences of the direct and indirect antimicrobial activity of 12 plants used in traditional medicine in Africa. *Phytochemistry Reviews*, 14, 975–991.
- Caumo, K., Duarte, M., Cargnin, S. T., Ribeiro, V. B., Tasca, T., Macedo, A. J., 2010. Resistência bacteriana no meio ambiente e implicações na clínica hospitalar. *Revista Liberato*, 11, 89- 188.
- Cerqueira, F. M., Medeiros, M. H. G., Augusto, O., 2007 “Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas”. *Química nova*, 30, 441-449.
- Chiste´, R. C., Freitas, M., Mercadante, A. Z., Fernandes, E., 2014. Carotenoids inhibit lipid peroxidation and hemoglobin oxidation, but not the depletion of glutathione induced by ROS in human erythrocytes. *Life Sciences*, 99, 52-60.
- CLSI. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically* (2012). Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- CLSI. *Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts*, (2008). Approved Standard – Third Edition. CLSI document M27-A3. Wayne, PA: Clinical and Laboratory Standards Institute.
- Colombo, A. L., Matta, D., Almeida, L. P., Robert, R., 2002. Fluconazole susceptibility of Brazilian *Candida* isolates assessed by a disk diffusion method. *The Brazilian Journal of Infectious Diseases*, 6, 118-23.
- Coccimiglio, J. M. A., Jiang, Z. H., Gottardo, C., Suntres, Z., 2016. Antioxidant, Antibacterial, and Cytotoxic Activities of the Ethanolic *Origanum vulgare* Extract and Its Major Constituents. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, Article ID 1404505, 8.
- Da Silva, D. T., Herrera, R., Batista, B. F., Heinzmann, B. M., Labidi, J., 2017 Physicochemical characterization of leaf extracts from *Ocotea lancifolia* and its effect against wood-rot fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 117, 158-170.
- Daglia, M., 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23, 174–181.
- Deng, Y., Yang, G., Yue, J., Qian, B., Liu, Z., Wang, D., Zhong, Y., Zhao, Y., 2014. Influences of ripening stages and extracting solvents on the polyphenolic compounds, antimicrobial and antioxidant activities of blue berry leaf extracts. *Food Control*, 38, 184–191.
- Destryana, R. A., Young, D. G., Woolley, C. L., Huang, T. C., Wu, H. Y., Shih, W. L., 2014. Antioxidant and Anti-inflammation Activities of *Ocotea*, *Copaiba* and *Blue Cypress* Essential Oils *in Vitro* and *in Vivo*. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 91, 1531–1542.
- Djeridane, A., Yousfi, M., Nadjemi, B., Boutassouna, D., Stocker, P., Vidal, N., 2006. Antioxidant activity of some Algerian medicinal plants extracts containing phenolic compounds. *Food Chemistry*, 97, 654-660.
- Elnakish, M. T., Hassanain, H. H., Janssen, P. M., Angelos, M. G., Khan, M., 2013. Emerging role of oxidative stress in metabolic syndrome and cardiovascular diseases: important role of Rac/NADPH oxidase. *The Journal of Pathology*, 231, 290–300.

- Espindola, P. P. T., da Rocha, P. S., Carollo, C. A., Schmitz, W. O., Pereira, Z. V., Vieira, M. C., dos Santos, E. L., Souza, K. de P., 2016. Antioxidant and Antihyperlipidemic Effects of *Campomanesia adamantium* O. Berg Root. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 8.
- Fisher, J. F., Meroueh, S. O., Mobashery, S., 2005. Bacterial resistance to β -lactam antibiotics: compelling opportunism, compelling opportunity. *Chemical Reviews*, 105, 395 - 424.
- Fournet, A., Ferreira, M. E., de Arias, A. R., Guy, I., Guinaudeau, H., Heinzen, H., 2007. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. *Fitoterapia*, 78, 382–384.
- Garcez, W. S., Garcez, F. R., da Silva, L. M. G. E., Shimabukuro, A. A., 2005. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16, 1382.
- Gil, E., Luis E., Cuca, W. A., 2016. Delgado. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of the leaves of *Ocotea caudata* (Nees) Mez (Lauraceae) from Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 15, 258 – 263.
- Grundmann, H., de Kraker, M., Davey, P., 2011. Clinical impact of antimicrobial resistance: design matters. *The Lancet Infectious Diseases*, 11, 344.
- Guerrini, A., Sacchetti, G., Muzzoli, M., Maldonado, M. E., Medici, A., Besco, E., Bruni, R., 2006. Composition of the Volatile Fraction of *Ocotea bofo* Kunth (Lauraceae) Calyces by GC-MS and NMR Fingerprinting and Its Antimicrobial and Antioxidant Activity. *Journal Agricultural and Food Chemistry*, 10-5.
- Guterres, Z. R., 2008. Investigação das atividades mutagênicas, antimutagênicas e antioxidante de extratos etanólicos de *Aiouea trinervis*, *nectranda cissiflora*, *Ocotea minarum* (Lauraceae) e dos Alcalóides Triptol, Ocoteína e Dicentrina. Dissertação apresentada para título de Doutor em Genética e Bioquímica. Uberlândia – MG.
- Jandú, J. J. B., da Silva, L. C. N., Pereira, A. de P. C., de Souza, R. M., da Silva Jr, C. A., de Figueiredo, R. C. B. Q., de Araújo, J. M., Correia, M. T. dos S., da Silva, M. V., 2013. *Myracrodruon urundeuva* bark: an antimicrobial, antioxidant and non-cytotoxic agent. *Journal of Medicinal Plants Research*, 7, 413-418.
- Jomova, K., Valko, M., 2011. Advances in metal-induced oxidative stress and human disease. *Toxicology*, 283, 65– 87.
- Kacem, N. V., Roumy, N., Duhal, F., Merouane, C., Neut, P., Christen, K., Hostettmann, S., Rhouati., 2016. Chemical composition of the essential oil from Algerian *Genista quadriflora* Munby and determination of its antibacterial and antifungal activities. *Industrial Crops and Products*, 90, 87–93.
- Kuliaviene, I., Gulbinas, A., Cremers, J., Pundzius, J., Kupcinskas, L., Dambrauskas, Z., Jansen, E., 2013. Fatty acids of erythrocyte membrane in acute pancreatitis patients. *World Journal of Gastroenterology*, 19, 78-84.
- Kumaran, A., Karunakaran, R. J., 2006. Antioxidant and free radical scavenging activity of an aqueous extract of *Coleus aromaticus*. *Food Chemistry*, 97, 109 – 114.
- Lin, J. Y., Tang, C. Y., 2007. Determination of total phenolic and flavonoid contents in selected fruits and vegetables, as well as their stimulatory effects on mouse splenocyte proliferation. *Food Chemistry*, 101, 140-147.

- Matos, F. J. de A., 2009. Introdução a Fitoquímica Experimental. Edições UFC, Fortaleza, Brazil, 3^a edition.
- Moraes, P. L. R., 2005. Sinopse das Lauráceas nos estados de Goiás e Tocantins, Brasil. *Biota Neotrópica*, 5, 1-18.
- Mohamed, A. A., Ali, S. I., El-Baz, F. K., 2013. Antioxidant and antibacterial activities of crude extracts and essential oils of *Syzygium cumini* leaves. *PLoS One*, 8, e60269.
- Mohamed, A. A., Ali, S. I., EL-Baz, F. K., Hegazy, A. K., Kord, M. A., 2014. Chemical composition of essential oil and in vitro antioxidant and antimicrobial activities of crude extracts of *Commiphora myrrha* resin. *Industrial Crops and Products*, 57, 10–16.
- Morales, G., Paredes, A., Sierra, P., Loyola, L. A., 2008. Antimicrobial activity of three baccharis species used in the traditional medicine of Northern Chile,” *Molecules*, 13, 790–794.
- Muhammad, R., Nasir, R., Iftikhar, H. B., Ameer, F. Z., Muhammad, S., Muhammad, Z., 2012. Antioxidant, antimicrobial and cytotoxicity studies of *Russelia equisetiformis*. *African Journal of Microbiology Research*, 6, 5700–5707.
- Nogueira, C. R., Garcez, F. R., Garcez, W. S., Hamerski, L., Vizzotto, L., 2007. 30^a Reunião Anual da SBQ, Águas de Lindóia, SP. PN-072.
- Politeo, O., Jukic, M., Milos, M., 2007. Chemical composition and antioxidant capacity of free volatile aglycones from basil (*Ocimum basilicum* L.) compared with its essential oil. *Food Chemistry*, 101, 379-85.
- Quinet, A., Baitello, J. B., Moraes, P. L. R., de, Assi, L., Alves, F. M., 2015. Lauraceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil”. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB8471>>.
- Ramalho, V. C., Jorge, N., 2006. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. *Química Nova*, 29, São Paulo
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical and Biology Medicine*, 26, 1231-1237.
- Rodrigues, T. S., Guimarães, S. F., Rodrigues-das-Dôres, R. G., Gabriel, J. V., 2011. Métodos de secagem e rendimento dos extratos de folhas de *Plectranthus barbatus* (boldo-da-terra) e *P. ornatus* (boldo-miúdo). *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 13, 587-590.
- Rossolini, G. M., Arena, F., Pecile, P., Pollini, S., 2014. Update on the antibiotic resistance crisis. *Current Opinion in Pharmacology*, 18, 56–60.
- Said, Z. B. S., Haddadi-Guemghar, H., Boulekbache-Makhlouf, L., Rigou, P., Reminia, H., Adjaoud, A., Khoudja, N. K., Madani, K., 2016. Essential oils composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrodistilled extract of *Eucalyptus globulus* fruits. *Industrial Crops and Products*, 89, 167–175.
- Sajkowska-Kozielewicz, J. J., Kozielewicz, P., Barnes, N P., Wawer, |I., Paradowska, K., 2016. Antioxidant, Cytotoxic, and Antiproliferative Activities and Total Polyphenol Contents of the Extracts of *Geissospermum reticulatum* Bark. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016, 8.

- Santos Jr, I. D., Souza, I. A. M., Borges, R. G., de Souza, L. B. S., de Santana, W. L., Coutinho, H. D. M., 2005. General traits of action, treatment and fungal resistance to fluconazol. *Scientia Medica*, Porto Alegre: PUCRS, 15.
- Sharma, P., Jha, A. B., Dubey, R. S., Pessaraki, M., 2012. Reactive Oxygen species, oxidative damage, and antioxidative defense mechanism in plants under stressful conditions. *Journal of Botany*, 2012, 1-26.
- Silva, E. M., Souza, J. N. S., Rogez, H., Rees, J. F., Larondelle, Y., 2007. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, 101, 1012–1018.
- Singh, P. P., Chauhan, S. M., 2014. Activity-guided isolation of antioxidants from the leaves of *Terminalia arjuna*. *Natural Product Research*, 28, 760–763.
- Sorata, Y., Takahama, U., Kimura, M., 1984. Protective effect of quercetin and rutin on the photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. *Biochimica et Biophysica Acta*, 799, 313-317.
- Souza, G. C., Haas, A.P.S., von Poser, G.L., Schapoval, E.E.S., Elisabetsky, E., 2004. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 90, 135–143.
- Su, P. W., Yang, C. H., Yang, J. F., Su, p. Y., Chuang, L. Y., 2015. Antibacterial Activities and Antibacterial Mechanism of *Polygonum cuspidatum* Extracts against Nosocomial Drug-Resistant Pathogens. *Molecules*, 20, 11119-11130.
- Valente, M. J., Baltazar, A. F., Henrique, R., Estevinho, L., Carvalho, M., 2011. Biological activities of Portuguese propolis: Protection against free radical-induced erythrocyte damage and inhibition of human renal cancer cell growth *in vitro*. *Food and Chemical Toxicology*, 49, 86–92.
- Van Der Werff H., 2002. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 89, 429.
- Vecchiotti, V., Casagrande. C., Ferrari, G., Ricca, S. G., 1979. *Farmaco. Ed. Sci*, 34, 829.
- Walsh, C., 2000. Molecular mechanisms that confer antibacterial drug resistance. *Nature*, 406, 775 – 781.
- Wang, Y., Chun, O. K., Song, W. O., 2013. Plasma and Dietary Antioxidant Status as Cardiovascular Disease Risk Factors: A Review of Human Studies. *Nutrients*, 5, 2969–3004.
- Yamaguchi, K. K. L., Alcantara, J. M., Veiga Junior, V. F., Investigação do potencial antioxidante anticolinester sico de 20 espécies da família Lauraceae. *Acta amaz nica*, 42, 541 – 546.
- Zhang, H., Chen, H., Niu, J., Wang, Y., Xie, L., 2009. Role of adaptive immunity in the pathogenesis of *Candida albicans* keratitis. *Investigative Ophthalmology and Visual Science*, 50, 2653–2659.
- Żurowska, K., 2001. *Ziołolecznictwo amazońskie i andyjskie*. Tower Press, Gdańsk.