

Maria do Carmo Pereira

Química e atividade biológica de *Microlicia crenulata*
(DC.) Mart: atividade antioxidante e antimicrobiana
para a conservação de alimentos

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2013

Maria do Carmo Pereira

Química e atividade biológica de *Microlicia crenulata*
(DC.) Mart: atividade antioxidante e antimicrobiana
para a conservação de alimentos

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do grau de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. David Lee Nelson

Faculdade de Farmácia da UFMG

Belo Horizonte, MG

2013

P436q

Pereira, Maria do Carmo.

Química e atividade biológica de *Microlicia crenulata* (DC.) Mart. atividade antioxidante e antimicrobiana para a conservação de alimentos / Maria do Carmo Pereira. – 2013.

125 f. : il.

Orientador: David Lee Nelson.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Atividade antimicrobiana – Teses. 2. Antioxidantes – Teses. 3. Alimentos – Conservação – Teses. 4. Agentes antibacterianos – Teses. 5. *Microlicia crenulata* – Teses. I. Nelson, David Lee. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD 664.06



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE FARMÁCIA – DEPARTAMENTO DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA DE ALIMENTOS

MARIA DO CARMO PEREIRA


**Química e atividade biológica de *Microlicia crenulata* (DC.)
Mart.: atividade antioxidante e antimicrobiana para a
conservação de alimentos**

TESE APROVADA EM 25 DE NOVEMBRO DE 2013

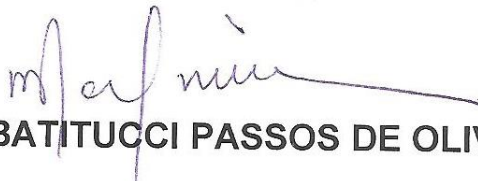
COMISSÃO EXAMINADORA


Dra. ANDRÉA CARRARA GEÖCZE


Dra. ACCÁCIA JÚLIA GUIMARÃES PEREIRA MESSANO


Dr. DAVID LEE NELSON
Orientador e Presidente da Comissão


Dr. GERALDO CÉLIO BRANDÃO


Dra. ROSEANE BATITUCCI PASSOS DE OLIVEIRA

Dedico este trabalho à minha família.

Agradecimentos

Ao professor doutor David Lee Nelson pela orientação deste trabalho;

aos professores doutores Fernão Castro Braga, Rodrigo Maia de Pádua, Maria Aparecida Resende Stoianoff, Geraldo Célio Brandão, Luiz Cláudio Almeida Barbosa, Simone Gonçalves Santos, Maria Auxiliadora Roque de Carvalho, Luiz de Macêdo Farias e Alaíde Braga de Oliveira pela contribuição imprescindível ao desenvolvimento deste trabalho.

à Raquel Geralda Isidório pelo auxílio, incentivo e amizade;

à Ana Diolina Soares Machado pelo incentivo e amizade;

aos amigos e colegas da FAFAR, especialmente do laboratório de fitoquímica, que me acolheram e me ajudaram com suas sugestões e orientações.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	10
RESUMO.....	12
ABSTRACT.....	14
1 INTRODUÇÃO.....	16
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	18
2.1 <i>Microlicia crenulata</i> (DC.) Mart.....	18
2.2 Constituintes químicos e atividade biológica de espécies da família Melastomataceae.....	20
2.3 Metabólitos secundários das plantas.....	22
2.3.1 <u>Flavonoides</u>	24
2.3.2 <u>Taninos</u>	29
2.3.3 <u>Óleos essenciais</u>	33
2.4 Microextração em Fase Sólida.....	37
2.5 Atividade antioxidante.....	39
2.6 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	43
2.6.1 <u>Métodos de difusão</u>	43
2.6.2 <u>Método de diluição em caldo</u>	44
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	46
3.1 Equipamentos utilizados durante o estudo.....	46
3.2 Material diverso.....	47
3.3 Reagentes e solventes.....	47
3.4 Soluções reveladoras para cromatografia em camada delgada preparadas segundo Wagner et al. (1984).....	48
3.5 Material botânico: coleta e identificação.....	48
3.6 Métodos.....	49
3.6.1 <u>Extração do óleo essencial</u>	49
3.6.2 <u>Microextração em fase sólida no modo Headspace (HS-SPME) dos constituintes voláteis</u>	49
3.6.3 <u>Caracterização dos componentes voláteis</u>	50
3.6.4 <u>Extração com Soxhlet e por percolação</u>	51
3.6.5 <u>Monitoramento dos fracionamentos</u>	53
3.6.6 <u>Perfis cromatográficos por CLAE-FR</u>	53
3.6.7 <u>Espectrometria de absorção no infravermelho</u>	54
3.6.8 <u>Fracionamentos do extrato etanólico bruto (EB)</u>	54
3.6.9 <u>Fracionamento de FAE, FB e FD</u>	55
3.6.10 <u>Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i></u>	58
3.6.11 <u>Ensaio biológico</u>	59
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	68
4.1 Rendimento do óleo essencial.....	68
4.2 Composição química dos óleos essenciais e dos voláteis obtidos por HS-SPME.....	68
4.3 Rendimento das extrações com Soxhlet e por percolação.....	71
4.4 Fracionamentos do extrato etanólico bruto (EB).....	72
4.4.1 <u>Fracionamento do extrato bruto por cromatografia em coluna de sílica gel</u>	72

4.4.2	<u>Fracionamento do extrato bruto por extração seriada</u>	73
4.5	Fracionamento da fração acetato de etila (FAE), fração butanólica (FB) e fração diclorometânica (FD).....	78
4.5.1	<u>Fracionamento de FAE</u>	78
4.5.2	<u>Fracionamento de FB</u>	78
4.5.3	<u>Fracionamento cromatográfico de FD</u>	79
4.6	Elucidação estrutural da substância isolada FDI.....	80
4.7	Avaliação da atividade antioxidante <i>in vitro</i>	88
4.7.1	<u>Ensaio do DPPH</u>	88
4.7.2	<u>Ensaio ABTS ou TEAC</u>	90
4.8	Ensaio biológicos.....	91
4.8.1	<u>Ensaio de atividade antibacteriana <i>in vitro</i></u>	91
4.8.2	<u>Ensaio de atividade antifúngica <i>in vitro</i></u>	93
4.8.3	<u>Ensaio de atividade antiprotozoária e de citotoxicidade <i>in vitro</i></u>	100
5	CONCLUSÕES	104
6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	106

LISTA DE TABELAS

1 Atividades biológicas de espécies da família Melastomataceae no Brasil.....	20
2 Flavonoides isolados de amostras de <i>Microlicia</i> D. Don.....	26
3 Taninos hidrolisáveis em plantas da família melastomataceae.....	32
4 Gradiente de eluição utilizado para a obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE-FR.....	54
5 Constituintes voláteis dos óleos essenciais e voláteis obtidos por HS-SPME de <i>M. crenulata</i> identificados por CG-EM.....	69
6 Rendimentos das frações obtidas nas extrações utilizando aparelho de Soxhlet.....	72
7 Fracionamento do extrato etanólico bruto por cromatografia em coluna de sílica gel.....	73
8 Massas (g) das frações resultantes da extração seriada, bem como os solventes utilizados.....	74
9 Fracionamento da fração FAE em coluna de Sephadex LH-20.....	78
10 Fracionamento da fração FB em coluna de Sephadex LH-20.....	79
11 Fracionamento de FD por cromatografia em coluna de sílica gel.....	80
12 Dados espectrofotométricos no ultravioleta obtidos para FDI.....	82
13 Dados de RMN de ¹ H e correlações heteronucleares ¹ H- ¹³ C observadas nos mapas de contornos HSQC e HMBC obtidos para FDI e dados relatados na literatura para acacetina.....	87
14 Dados espectrofotométricos no UV obtidos para FDI e dados relatados na literatura para acacetina.....	87
15 Atividade antioxidante pelo método DPPH de EB e de suas frações expressa em CE ₅₀ (µg/mL) e IAA.....	89
16 Valores de CE ₅₀ e de TEAC para EB e suas frações pelo método ABTS.....	90
17 Diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano para o óleo essencial e para as frações resultantes das extrações em Soxhlet.....	91
18 Concentração Inibitória Mínima do óleo e das frações resultantes das extrações em Soxhlet contra bactérias patogênicas.....	92
19 Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial e das frações resultantes das extrações em Soxhlet contra fungos patogênicos e deteriorantes de alimentos.....	94
20 Concentração Inibitória Mínima do fármaco fluconazol.....	95
21 Concentração Inibitória Mínima das frações resultantes das extrações em Soxhlet e do óleo essencial contra leveduras de relevância clínica.....	95
22 Concentração Inibitória Mínima das frações de EB contra fungos patogênicos de relevância clínica.....	96
23 Concentração Inibitória Mínima de EB e das frações oriundas do fracionamento de FAE e de FB contra fungos patogênicos de relevância clínica.....	98
24 Percentual de redução (% Redução) do crescimento de <i>P. falciparum</i> cloroquina-resistente (W2) na presença de diferentes amostras.....	101
25 Concentração inibitória de 50% do crescimento (CI ₅₀) do clone W2 (cloroquina-resistente) de <i>P. falciparum</i> contra as amostras avaliadas.....	101
26 Valores de CC ₅₀ , CI ₅₀ e índice de seletividade calculado para as amostras....	103

LISTA DE FIGURAS

1 População de <i>M. crenulata</i> e detalhe de partes aéreas no período de intensa floração.....	19
2 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	24
3 Estrutura e numeração básica dos flavonoides.....	25
4 Estruturas dos flavonoides encontrados em <i>M. crenulata</i> por BOMFIM-PATRÍCIO et al. (2001).....	25
5 Estrutura química das agliconas dos flavonoides isolados de diferentes espécies de <i>Microlicia</i> por Bomfim-Patrício et al. (2001).....	28
6 Unidade HHDP (hexahidroxidifenoila).....	30
7 Estrutura química de taninos hidrolisáveis em plantas da família Melastomataceae.....	31
8 Extrator de óleos essenciais tipo Clevenger modificado.....	37
9 Dispositivo de SPME comercializado pela Supelco.....	38
10 Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos mais usados na indústria de alimentos.....	40
11 Estruturas dos tocoferóis.....	40
12 Redução do radical livre DPPH pelo flavonoide antioxidante quercetina.....	42
13 Estabilização do ABTS ^{•+} por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.....	42
14 Resumo dos fracionamentos realizados com o material vegetal colhido no período chuvoso.....	52
15 Fracionamento do extrato bruto por extração seriada. FH (fração hexânica), FD (fração diclorometânica), FAE (fração acetato de etila), FB (fração butanólica), FE (fração etanólica), FEA (fração etanol/água).....	55
16 Mapa da placa conforme concentrações da solução-teste.....	61
17 Modelo ilustrativo de uma placa de 96 poços, sendo a coluna C- o controle negativo, as colunas C1 a C10 as concentrações testadas e a coluna C+ o controle positivo.....	64
18 Cromatogramas do óleo essencial 1, do óleo essencial 2 e dos voláteis obtidos por HS-SPME.....	71
19 Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR, com detecção no UV em $\lambda = 210$ nm, para o extrato bruto e frações de <i>M. crenulata</i> . Condições cromatográficas: vide item 3.6.6.2, pág. 54. EB (extrato bruto), FH (fração hexânica), FD (fração diclorometânica), FAE (fração acetato de etila), FB (fração butanólica), FE (fração etanólica), FEA (fração etanol/água).....	74
20 Perfil cromatográfico de FH a 210 nm e espectro no UV obtido <i>on line</i> pelo detector DAD para o pico 9, com TR = 34,328. FH (fração hexânica).....	75
21 Perfil cromatográfico de FD a 210 nm e espectro no UV obtido <i>on line</i> pelo detector DAD para os picos 9, 10 e 11. FD (fração diclorometânica).....	75
22 Esqueleto básico dos flavonoides.....	76
23 Perfil cromatográfico de FE a 210 nm e espectro de UV dos picos 1, 9 e 11. FE (fração etanólica).....	77
24 Perfil cromatográfico de FEA a 210 nm e espectro de UV do pico 1. FEA (fração etanol/água).....	77
25 Espectros no UV de FDI obtidos com o uso de aditivos.....	82
26 Espectro no IV obtido para FDI.....	83

27 Espectro de RMN de ^1H de FDI (MeOD, 400 MHz).....	84
28 Mapa de contornos HSQC de FDI.....	85
29 Mapa de correlação HMBC obtido para FDI.....	86
30 Experimento bidimensional COSY de FDI (MeOD, 400 MHz).....	86
31 Perfil cromatográfico de FAE11 a 210 nm e espectro de UV dos picos TR = 0,800, TR = 1,264 e TR = 1,684.....	99
32 Espectro no IV obtido para a fração FAE11.....	99

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABTS	Ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)
ACN	Acetonitrila
AcOH	Ácido acético
AMC 30	Amoxicilina + ácido clavulânico 30 µg
ATCC	American Type Culture Collection
BuOH	n-butanol
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CC ₅₀	Concentração citotóxica que inibe em 50% o crescimento das Células
CE ₅₀	Concentração efetiva para 50% de atividade
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CG-DIC	Cromatografia gasosa com detector por ionização em chamas
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CI ₅₀	Concentração inibitória do crescimento de 50 %
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector de arranjo de diodos
CLAE-FR	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
COSY	Correlation Spectroscopy
CPM 30	Cefepima 30 µg
DCM	Diclorometano
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
EB	Extrato Etanólico Bruto
EtOAc	Acetato de etila
EtOH	Etanol
FAE	Fração Acetato de Etila
FB	Fração Butanólica
FD	Fração Diclorometânica
FDI	Substância isolada da Fração Diclorometânica (FD)
FE	Fração Etanólica
FEA	Fração Etanol/Água
FH	Fração Hexânica
FSA	Fração Soxhlet Aquosa
FSAE	Fração Soxhlet Acetato de Etila
FSD	Fração Soxhlet Diclorometânica
FSH	Fração Soxhlet Hexânica
FSM	Fração Soxhlet Metanólica
HS-SPME	Microextração em fase sólida no modo <i>Headspace</i>
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HSQC	Heteronuclear Single Quantum Coherence
HX	<i>n</i> -hexano
IAA	Índice de Atividade Antioxidante
IS	Índice de seletividade
IV	Infravermelho
J	Constante de acoplamento escalar
MeOH	Metanol

MeOD	Metanol deuterado
NCCLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards
OE1	Óleo essencial extraído da planta coletada no final do período de estiagem
OE2	Óleo essencial extraído da planta coletada em período chuvoso
OMS	Organização Mundial da Saúde
PDMS	Polidimetilsiloxano
pLDH	Lactato Desidrogenase de <i>Plasmodium</i>
RMN de ¹³ C	Ressonância magnética nuclear de carbono 13
RMN de ¹ H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
SPME	Microextração em fase sólida
TEAC	Capacidade antioxidante equivalente ao Trolox
TR	Tempo de Retenção
UFC	Unidade Formadora de Colônia
UV	Ultravioleta

RESUMO

Microlicia crenulata (DC.) Mart. (Melastomataceae) possui ocorrência bastante restrita, sendo considerada endêmica do estado de Minas Gerais, Brasil. Até o momento, foi estudada apenas quimicamente para fins taxonômicos. O presente trabalho objetivou obter conhecimentos úteis para a conservação dos alimentos. Os óleos essenciais obtidos por hidrodestilação e voláteis obtidos por HS-SPME das partes aéreas de *M. crenulata* foram avaliados quanto à composição química. As atividades antioxidante, antibacteriana, antifúngica, antiprotozoária e citotóxica *in vitro* de *M. crenulata* também foram estudadas. Para avaliação da atividade antioxidante foram realizados ensaios com DPPH e com ABTS. A atividade antibacteriana foi estimada usando técnica de difusão em disco e microdiluição frente a *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*. A atividade antifúngica foi avaliada por testes *in vitro* (Concentração Inibitória Mínima) contra os fungos: *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida Krusei*, *Candida dubliniensis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* e *Cryptococcus gattii*. A atividade antiprotozoária foi estudada em culturas de *Plasmodium falciparum*, clone W2, resistente à cloroquina, por meio do método pLDH. A atividade citotóxica *in vitro* foi investigada contra a linhagem celular HepG2 A16. O óleo essencial de *M. crenulata* constitui-se de mistura complexa, formada principalmente por compostos terpênicos. A espécie apresenta ligeira variação do rendimento e da composição química do óleo essencial em função dos estágios fenológicos. Os perfis dos compostos voláteis foram diferentes quando a técnica empregada foi hidrodestilação ou HS-SPME. Da fração diclorometânica isolou-se a acacetina, sendo o primeiro relato da ocorrência dessa flavona para o gênero *Microlicia*. *M. crenulata* apresentou considerável atividade antioxidante *in vitro* nos ensaios do DPPH e do ABTS. As frações mais polares apresentaram maior atividade antioxidante e os melhores resultados foram obtidos para a fração etanólica FE. O óleo essencial apresentou moderada atividade inibitória frente a *P. aeruginosa*, *S. cerevisiae* e *A. flavus* e fraca atividade contra *A. niger*, não foi capaz de inibir o crescimento de *B. cereus*, *E. coli* e *S. aureus*, assim como não foi ativo contra as espécies estudadas dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* na maior concentração testada (250 µg/mL). As frações extraídas em aparelho de Soxhlet, fração metanólica e fração aquosa, apresentaram atividade moderada contra as cepas de *P. aeruginosa*. A fração acetato

de etila apresentou fraca atividade contra *P. aeruginosa*. Para *B. cereus*, os resultados obtidos demonstraram que as frações hexânica e diclorometânica apresentaram ação moderada sobre a referida bactéria. Nenhuma das frações testadas apresentou atividade contra *E. coli* e *S. aureus*. As frações hexânica, metanólica e aquosa demonstraram boa atividade contra *S. cerevisiae*. O extrato etanólico bruto obtido por percolação e suas frações apresentaram boa atividade inibitória frente a leveduras. Os melhores resultados de inibição foram contra as espécies de *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *C. gattii* e os componentes responsáveis pela atividade antifúngica podem ser polifenóis, particularmente taninos hidrolisáveis. Com relação à atividade antiplasmódica *in vitro* cinco amostras foram ativas, uma moderadamente ativa, duas pouco ativas e seis inativas. As frações apresentaram atividade antiplasmódica *in vitro* e boa seletividade para o parasita em relação às células HepG2. Em relação às atividades relatadas neste estudo verifica-se a necessidade de prosseguir com o isolamento dos princípios ativos, a fim de constatar se um único composto é o responsável pelas atividades ou se ocorre interação com outros compostos.

Palavras-chave: *Microlicia crenulata*, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e alimentos.

ABSTRACT

Microlicia crenulata (DC.) Mart (Melastomataceae) has a very restricted occurrence, being considered endemic to the state of Minas Gerais, Brazil. To date, the species has been chemically only for taxonomic purposes. This work sought to obtain useful knowledge oils for the preservation of food. The chemical compositions of essential oils extracted by hydrodistillation and of volatile substances extracted by HS-SPME from aerial parts of the *M. crenulata* were evaluated. The *in vitro* antioxidant, antibacterial, antifungal, antiprotozoal and cytotoxic activities of *M. crenulata* were also studied. To evaluate the antioxidant activity, assays were performed with DPPH and ABTS. The antibacterial activity was estimated using the disk diffusion and microdilution techniques against *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Escherichia coli*. The antifungal activity was evaluated *in vitro* (minimum inhibitory concentration) against the fungi *Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida parapsilosis*, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida dubliniensis*, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Cryptococcus neoformans* and *Cryptococcus gattii*. The antiprotozoal activity was studied against the chloroquine-resistant W2 clone of *Plasmodium falciparum* by the pLDH method. The *in vitro* cytotoxic activity was investigated against the HepG2 A16 cell line. The essential oil of *M. crenulata* consisted of a complex mixture, including mainly terpene compounds. There was a slight variation in the yield and chemical composition of the essential oil according to the phenological stages. The profiles of volatile compounds were different when the hydrodistillation and HS-SPME techniques were used. Acacetin was isolated from the dichloromethane fraction, this being the first report of the occurrence of this flavone in the *Microlicia* genus. Considerable antioxidant activity *in vitro* in assays with DPPH and ABTS was observed for *M. crenulata*. The highest antioxidant activities were observed for more polar fractions, and the best results were obtained for the ethanol fraction FE. The essential oil showed moderate inhibitory activity against *P. aeruginosa*, *S. cerevisiae* and *A. flavus* and weak activity against *A. niger*. It was not able to inhibit the growth of *B. cereus*, *E. coli* or *S. aureus*, and was not active against species of *Candida* and *Cryptococcus* at the highest concentration tested (250 µg/mL). Moderate activities against strains of *P. aeruginosa* were observed for fractions extracted by Soxhlet, the methanol fraction and aqueous fraction. The ethyl acetate fraction presented weak activity against *P. aeruginosa*. For *B. cereus*, the results showed that

the hexane and dichlorometane fractions were moderately active against the said bacteria. None of the tested fractions showed activity against *E. coli* and *S. aureus*. Hexane, methanol and aqueous fractions showed good activity against *S. cerevisiae*. The crude ethanol extract obtained by percolation and its fractions showed good inhibitory activity against yeasts. The best results were obtained for the inhibition of *C. glabrata*, *C. dubliniensis* and *C. gattii*, and the components responsible for the antifungal activity may be polyphenols, especially hydrolysable tannins. Regarding the *in vitro* antiplasmodial activity, five samples were active, one was moderately active, two were slightly active and six were inactive. The fractions showed *in vitro* antiplasmodial activity and good selectivity for the parasite in relation to HepG2 cells. Regarding the activities reported in this study there is the need to continue with the isolation of the active principles to ascertain whether a single compound is responsible for the activities or interaction with other compounds occurs.

Keywords: *Microlicia crenulata*, antioxidant activity, antimicrobial activity and food.

1 INTRODUÇÃO

O uso de produtos derivados de plantas como ingredientes funcionais em formulações alimentícias, farmacêuticas, sanitizantes entre outras, tem despertado grande interesse. As plantas representam uma fonte importante para pesquisar novas substâncias e princípios ativos para diversos usos. O estudo fitoquímico de uma espécie vegetal pode revelar a ocorrência de substâncias de interesses diversos para o homem (SANTOS et al., 2004). A literatura apresenta vários relatos atribuindo atividades biológicas aos produtos derivados de plantas, tais como: antioxidante (SCHERER et al, 2009 e RUFINO et al., 2009), antimicrobiana (MONTANARI et al, 2012; OLIVEIRA et al., 2010a e RODRIGUES et al., 2008), antitumoral (RIBEIRO, 2012 e YOSHIDA et al., 2010), anti-inflamatória (IGNOATO et al., 2012), inseticida e repelente (CORRÊA & SALGADO, 2011; RESTELLO et al., 2012), nematocida (WANG et al., 2012), antimalárica (BATISTA et al., 2009; MARIATH et al., 2009 e OLIVEIRA et al., 2009), dentre outras.

Entre os metabólitos secundários de plantas, os óleos voláteis constituem uma fonte rica de compostos biologicamente ativos (SILVA et al., 2010). Segundo Bakkali et al. (2008), aproximadamente três mil óleos essenciais são conhecidos atualmente. Destes, somente cerca de 300 são de importância comercial, especialmente para as indústrias farmacêutica, agrônômica, alimentícia, sanitária e cosmética. Vários estudos citam que os óleos essenciais de plantas apresentam propriedades antioxidantes, antimicrobianos e aromatizantes (OLIVEIRA et al., 2010a; JAKIEMIU, 2008; BUSATTA, 2006). Os compostos antioxidantes ocupam um lugar de destaque para as indústrias de alimentos e farmacêutica. A pesquisa nesse seguimento é importante para obtenção de novos compostos capazes de neutralizar agentes nocivos a sistemas biológicos.

Microlicia crenulata (DC.) Mart. é uma espécie pertencente à família Melastomataceae, sendo o gênero associado às formações campestres, com maior diversidade apresentada nos campos rupestres do Brasil Central (ROMERO, 2003). A espécie despertou interesse devido as suas peculiaridades ecológicas: apresentar alta capacidade competitiva nos locais de sua ocorrência formando povoamentos quase puros e aparentemente não ser predada. Até o presente, a espécie foi estudada apenas quimicamente para fins taxonômicos.

A pesquisa de novos agentes antioxidantes e antimicrobianos é uma via importante para a descoberta de substâncias mais eficazes e menos tóxicas. Nesse contexto, o presente estudo teve por objetivo geral avaliar o potencial antioxidante e antimicrobiano dos metabólitos secundários de *Microlicia crenulata*, com vistas a obter conhecimentos úteis para a conservação de alimentos. Os objetivos específicos foram: (i) estudo da composição química dos óleos essenciais obtidos por hidrodestilação e dos voláteis das partes aéreas obtidos por HS-SPME; (ii) estudo da atividade antioxidante *in vitro* de extrato e frações pelos métodos do DPPH e ABTS; (iii) estudo da atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial e frações.

Oportunamente também foi estudado o potencial antiprotozoário das frações de *M. crenulata* frente a cepas de *Plasmodium falciparum*, um dos agentes etiológicos da malária. Deve-se compreender que existem protozoários que são transmitidos por água e alimentos contaminados, desempenhando importante papel em saúde pública. Dentre esses se destacam: *Cryptosporidium parvum*, *Giardia lamblia*, *Entamoeba histolytica* e *Toxoplasma gondii* (BRASIL, 2010). Considerando que esses parasitas pertencem a um grupo taxonomicamente não muito distante é factível que, se as frações estudadas apresentarem atividade contra *P. falciparum*, possam ser também ativas contra protozoários veiculados por alimentos.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Os primeiros estudos científicos de plantas datam do século XIX. Neste período foram isolados alguns compostos de plantas que se afirmaram como princípios ativos eficazes e de grande relevância para a medicina, a exemplo da cânfora, da quinina, da estriquinina, da morfina e da cocaína (HAMBURGER & HOSTETTMANN, 1991).

O uso de plantas para o tratamento de enfermidades pelos seres humanos é uma prática milenar e, mesmo atualmente, aparece como o principal recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. Na década de 90, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 60 a 85% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados da saúde (VEIGA Jr et al., 2005).

Após 1945, devido ao desenvolvimento da química farmacêutica sintética e o aparecimento dos antibióticos produzidos por fermentação microbiana, houve uma acentuada redução na utilização de plantas medicinais e, evidentemente, uma diminuição expressiva dos investimentos para estudos desta natureza. Nas últimas duas décadas, as pesquisas sobre a atividade de plantas e a bioprospecção de seus respectivos princípios ativos foram intensificadas (CUNHA Jr & SCHEUERMANN, 2005).

2.1 *Microlicia crenulata* (DC.) Mart.

O gênero *Microlicia* insere-se na tribo Microlicieae, que por sua vez, pertence à família Melastomataceae. Esta tribo é fortemente associada às formações rupestres do Brasil Central. Análises cladísticas baseadas na sequência de DNA dentro do cloroplasto rpl16 têm estabelecido seis gêneros pertencentes à tribo: *Chaetostoma*, *Lavoisiera*, *Microlicia*, *Rhynchanthera*, *Stenodon* e *Trembleya* (FRITSCH et al., 2004).

A família Melastomataceae, que pertence à ordem Myrtales, possui distribuição pantropical, com aproximadamente 200 gêneros e 5000 espécies, das quais dois terços são neotropicais. Constitui uma das principais famílias da flora brasileira, com cerca de 70 gêneros e 1000 espécies, presentes nos mais variados ecossistemas (GIULIETTI, et al., 2009). A família Melastomataceae é composta por 11 tribos (CLAUSING & RENNERT, 2001) sendo Melastomeae, Miconieae e Microlicieae consideradas as mais importantes para o Brasil (ROMERO, 2003). Dentro da tribo Microlicieae, o gênero *Microlicia* D. Don compreende aproximadamente 130 espécies (ROMERO, 2013).

O gênero *Microlicia* (*micros* = pequeno, *elikia* = estatura) foi estabelecido por Don (1823). As espécies de *Microlicia* distribuem-se principalmente em Minas Gerais, Bahia e Goiás, com algumas ocorrências no Paraná, São Paulo, Rio de Janeiro, Mato Grosso do Sul e Mato Grosso e em menor número, no Piauí, Maranhão, Pará, Amazonas e Rondônia. Somente três espécies são encontradas no Peru, Bolívia, Venezuela e as Guianas. No Brasil, as espécies ocupam, preferencialmente, os campos rupestres e adjacências, campos de altitude e campos limpos associados a cerrado formando, na maioria das vezes, grandes populações. O gênero atinge sua maior diversidade nos campos rupestres e formações associadas dos estados de Minas Gerais, Goiás e Bahia (ROMERO, 2003).

A espécie deste estudo possui ocorrência bastante restrita, sendo considerada endêmica do estado de Minas Gerais (ROMERO & WOODGYER, 2013). É bastante prolífica nos sítios de ocorrência natural, conformando povoamentos quase puros. Ocupa, geralmente, solos argilo-arenosos e locais onde há maior teor de umidade, porém sem encharcamentos permanentes. Constitui uma lenhosa importantíssima na colonização de ambientes degradados, apresentando, analogamente à sua ocorrência natural, povoamentos bastante densos (TEIXEIRA, 1997).

Microlicia crenulata é um arbusto com altura média entre 0,5-0,8 m, raramente ultrapassando 1,20 m (TEIXEIRA, 1997) (**Figura 1**). Possui uma copa globosa, aspecto mais característico quando de sua ocorrência isolada. Suas folhas são adpressas.



Figura 1 - População de *M. crenulata* e detalhe de partes aéreas no período de intensa floração.

2.2 Constituintes químicos e atividade biológica de espécies da família Melastomataceae

A família Melastomataceae caracteriza-se pela presença de taninos (muito comum), alcalóides (raros), antocianinas, flavonoides (BOMFIM-PATRÍCIO et al., 2001) e triterpenos (CUNHA et al., 2008a). Cassiano et al. (2010) detectaram a presença de alcanos, ácidos carboxílicos, ésteres de metila e diterpenos no extrato hexânico de *Microlicia hatschbachii* Wurdack. Os diterpenos foram identificados como ácido labd-8(17)-en-15-óico e ácido labd-8(17),13-dien-15-óico, sendo este o primeiro relato da presença de diterpenos labdanos em Melastomataceae.

Estudos químicos e biológicos têm sido realizados em espécies de diversos gêneros da família Melastomataceae. Dentre as atividades biológicas observadas, podem-se citar as atividades: antimicrobiana, antiparasitária, antioxidante, atividade citotóxica, anticoagulante, antiúlcera, antidiarréia, anti-inflamatória, antinociceptiva, antipirética (JOFFRY et al., 2012). Apresenta-se o levantamento referente às atividades biológicas de espécies da família Melastomataceae no Brasil (**Tabela 1**).

Tabela 1 - Atividades biológicas de espécies da família Melastomataceae no Brasil

Espécie	Substrato	Atividade	Referência
<i>Marcetia canescens</i>	Extrato hexânico, extrato acetato de etila e extrato metanólico	Antimicrobiana	LEITE et al., 2012b
<i>Marcetia latifolia</i>	Extrato hexânico e extrato acetato de etila	Antimicrobiana	LEITE et al., 2012a
<i>Marcetia macrophylla</i>	Extrato hexânico, extrato acetato de etila e extrato metanólico	Antimicrobiana	LEITE et al., 2012b
<i>Marcetia taxifolia</i>	Extrato hexânico, extrato acetato de etila e extrato metanólico	Antimicrobiana	LEITE et al., 2012b
<i>Miconia albicans</i>	Extrato metanólico e fração butanólica	Antioxidante	PIERONI et al., 2011
	Extrato diclorometânico	Analgésica	VASCONCELOS et al., 2006
	Extrato etanólico	Antimicrobiana	CELLOTO et al., 2003
<i>Miconia cabucu</i>	Extrato clorofórmico	Antimicrobiana	RODRIGUES et al., 2008
	Extrato metanólico	Analgésica	RODRIGUES, 2007

/continua.

Tabela 1 - Atividades biológicas de espécies da família Melastomataceae no Brasil (conclusão)

<i>Miconia fallax</i>	Extrato etanólico, ácido ursólico e ácido oleanólico	Antitumoral	CUNHA et al., 2008b
	Ácidos ursólico e oleanólico	Quimiopreventiva	FURTADO et al., 2008
	Extrato diclorometânico	Tripanomicida	CUNHA et al., 2003a
<i>Miconia ferruginata</i>	Ácido ursólico e ácido oleanólico	Antimicrobiana e inibitória da catepsina B	OLIVEIRA, 2010
<i>Miconia langsdorffii</i>	Extrato etanólico e fração hexano/EtOAc 1:1	Esquitissomicida	CUNHA et al., 2012
	Extrato hidroalcoólico, ácido ursólico e ácido oleanólico	Antileishmania	PEIXOTO et al., 2011
<i>Miconia ligustroides</i>	Ácido ursólico e ácido oleanólico	Antimicrobiana	CUNHA et al., 2010
	Ácido ursólico, ácido oleanólico e ácido urjónico	Tripanomicida	CUNHA et al., 2006
	Extrato hexânico, diclorometânico e etanólico	Analgésico	CUNHA et al., 2003b
<i>Miconia rubiginosa</i>	Extrato metanólico	Antimicrobiana	RODRIGUES et al., 2008
	Fração aquosa	Analgésica no SNC	RODRIGUES, 2007
	Extrato hexânico, extrato diclorometânico e extrato etanólico	Analgésica	SPESSOTO et al., 2003
	Extrato etanólico	Antimicrobiana	CELLOTO et al., 2003
<i>Miconia sellowiana</i>	Ácido ursólico, ácido 2 α -hidroxiursólico e ácido máslico	Tripanomicida	CUNHA et al., 2006
<i>Miconia stenostachya</i>	Extrato metanólico	Antimicrobiana	RODRIGUES et al., 2008
	Extrato diclorometânico	Tripanomicida	CUNHA et al., 2003a
	Extrato etanólico	Antimicrobiana	CELLOTO et al., 2003
<i>Tibouchina stenocarpa</i>	Extrato hexânico, extrato diclorometânico e etanólico	Tripanomicida	CUNHA et al., 2009
	Extrato hexânico, extrato diclorometânico e extrato etanólico	Antimicrobiana	FARIA et al., 2006

Até o momento, não foram encontradas referências a trabalhos de investigação sobre os compostos bioativos de *M. crenulata*. Neste termo, a única investigação relacionada à espécie foi um estudo quimiotaxonômico efetuado por Bomfim-Patricio et al. (2001). Poucos estudos foram realizados com espécies do gênero *Microlicia* (CASSIANO et al., 2010; TOUDAHL et al., 2012) e, nestes, predominam a caracterização química dos constituintes. Dentre outros fatores, o endemismo do gênero pode ter contribuído para a falta de estudos na literatura, seja de natureza biológica ou química.

2.3 Metabólitos secundários das plantas

O metabolismo das plantas tem sido dividido didaticamente em metabolismo primário e secundário, mas, na realidade, não existe uma divisão exata entre estes dois tipos de metabolismo. Admite-se, contudo, que os carboidratos, as proteínas, os lipídios e os ácidos nucleicos, que são comuns aos seres vivos e essenciais para a manutenção das células, são originados do metabolismo primário. E as substâncias originadas a partir de rotas biossintéticas diversas, e que estão restritas a certos grupos taxonômicos, com bioquímica e metabolismo específicos e únicos, são produtos do metabolismo secundário (WINK, 1990).

O grande potencial dos vegetais para fornecer novas substâncias deve-se à incrível capacidade desses organismos em biossintetizar os mais diversos tipos de estruturas moleculares. As propriedades terapêuticas dos vegetais estão especialmente relacionadas com os chamados metabólitos secundários que são compostos micromoleculares evolutivamente selecionados para conferir vantagens adaptativas às plantas (CUNHA Jr & SCHEUERMANN, 2005).

No decorrer da evolução as plantas desenvolveram mecanismos de defesa para sua sobrevivência. Dentre estes, as rotas biossintéticas, conhecidas como metabolismo secundário, produzem substâncias protetoras importantes (SALISBURY & ROSS, 1992). Durante muito tempo, esses compostos foram considerados como resíduos do metabolismo, sem utilidade biológica. Atualmente, sabe-se que tais compostos, definidos como metabólitos secundários, podem ser caracterizados como elementos de diferenciação e especialização celular, atuando, por exemplo, na defesa contra ataque de predadores (herbívoros e microrganismos), na proteção contra os raios UV, em

atração de polinizadores ou de animais dispersores de sementes, proteção contra perda de água e aumento de temperatura, além de sua participação em alelopatias (FABROWSKI, 2002; SIMÕES et al., 2004; HARBONE, 1993; WINK, 1990).

Em várias espécies vegetais, o local da biossíntese dos metabólitos secundários está restrito a um órgão, ao passo que os produtos são acumulados em toda a planta ou em órgãos diferentes, devido a um sistema de transporte intercelular. Nas células, certos mecanismos bioquímicos garantem a condução dos compostos aos compartimentos de estocagem apropriados: os hidrofílicos tendem a ser armazenados nos vacúolos, e os lipofílicos acumulam-se em ductos de células mortas ou ligam-se aos componentes celulares lipofílicos, como membranas, ceras cuticulares e lignina (WINK, 1990). Essa compartimentalização é importante para a sobrevivência do vegetal. Por exemplo, os glicosídeos cianogênicos são estocados nos vacúolos das células epidérmicas; portanto, encontram-se isolados de hidrolases, localizadas nos tecidos do mesófilo adjacente. Somente nas situações em que os tecidos são danificados (por exemplo, durante a mastigação) é que os glicosídeos cianogênicos e as hidrolases interagem, havendo liberação de HCN. Assim, a própria planta produtora fica protegida e utiliza essa estratégia em caso de ataque de herbívoros (SIMÕES et al., 2004).

Segundo Simões et al. (2004), todos os metabólitos secundários são praticamente formados a partir do metabolismo da glicose, via duas rotas principais: o ácido chiquímico e o acetato (**Figura 2**). O ácido chiquímico origina os metabólitos secundários aromáticos, tais como: alcalóides indólicos, quinolínicos, isoquinolínicos, ligninas e lignanas, cumarinas e taninos hidrossolúveis. Os derivados do acetato podem ser formados por três vias diferentes: via do ciclo do ácido cítrico, via do mevalonato e via da condensação do acetato. A via ciclo do ácido cítrico origina os alcalóides pirrolidínicos, tropânicos, pirrolizidínicos, piperidínicos e quinolizidínicos. A via do mevalonato produz os terpenóides e os esteróis. Pela condensação do acetato, formam-se os ácidos graxos e acetogeninas. A combinação de uma unidade de ácido chiquímico e uma ou mais unidades de acetato origina as antraquinonas, flavonoides e os taninos condensados.

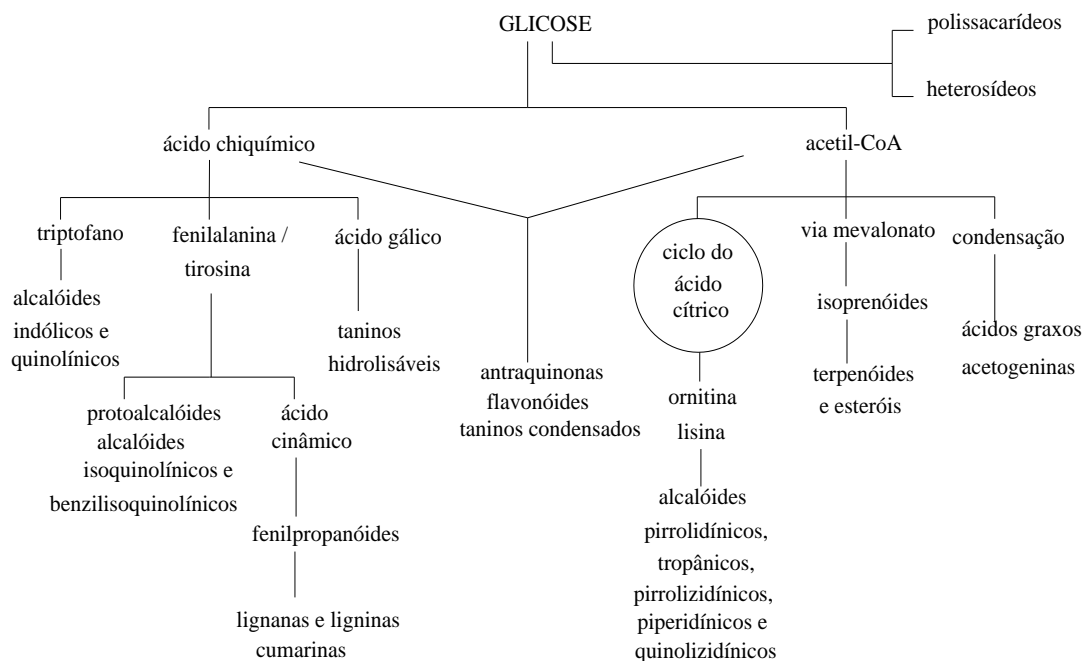


Figura 2 - Ciclo biossintético dos metabólitos secundários (SIMÕES et al., 2004).

Os metabólitos secundários de maior atividade biológica são os óleos essenciais, os ácidos orgânicos, alcalóides, flavonoides, taninos, cumarinas, saponinas, mucilagens, glicosídeos e amidas e, quando induzem respostas fisiológicas em outros organismos, recebem a denominação de princípios ativos. A existência e a distribuição desses compostos são muito variáveis nas espécies vegetais, dependendo de fatores hereditários, ontogênicos (etapas de desenvolvimento) e ambientais (clima, solo e outros) (ROBBERS et al., 1997).

2.3.1 Flavonoides

Os flavonoides são compostos polifenólicos, cuja estrutura básica é o esqueleto de carbono do tipo C6-C3-C6 com quinze átomos de carbono dispostos em três anéis: dois anéis aromáticos (A e B) e um pirano (cadeia heterocíclica C) (**Figura 3**). Podem ser subdivididos em 13 classes: chalconas, dihidrochalconas, auronas, flavonas, flavonóis, dihidroflavonol, flavanonas, flavanol, flavandioli, antocianidina, isoflavonoides, biflavonoides e proantocianidinas (BRAVO, 1998). Estão presentes na maioria das plantas e, por isso, constituem-se como uma das classes de produtos naturais mais abundantes na natureza com mais de oito mil compostos diferentes já identificados (PIETTA, 2000). Podem ocorrer como agliconas, glicosídeos ou como parte de outras estruturas que contenham flavonoides, como as flavonolignanas, porém frequentemente ocorrem como glicosídeos (BEHLING et al., 2004).

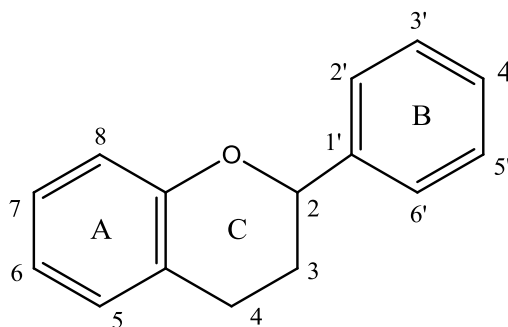


Figura 3 - Estrutura e numeração básica dos flavonoides.

Vários estudos indicam que os flavonoides possuem atividades biológicas como antialérgica, antiviral, anti-inflamatória, vasodilatadora, antioxidante (SHOHAIB et al., 2011 e PIETTA, 2000), antitumoral, antibacteriana, antifúngica, antidiabética e anti-hepatotóxica (SHOHAIB et al., 2011). Segundo relatos de Ross & Kasum (2002) existem diversas atividades biológicas atribuídas aos flavonoides, algumas das quais poderiam ser benéficas ou prejudiciais, dependendo das circunstâncias específicas, sendo necessários mais estudos.

Um estudo quimiotaxonômico realizado por Bomfim-Patrício et al. (2001) com folhas de espécies de Melastomataceae pertencentes aos gêneros *Lavoisiera*, *Microlicia* e *Trembleya*, resultou na identificação de 116 flavonoides, compreendendo 69 flavonóis e 47 flavonas. As espécies de *Microlicia* descritas neste trabalho apresentaram, predominantemente, derivados da classe dos flavonóis, exceto *M. juniperina*, e ausência de compostos 6-oxigenados. Foi observado que o gênero *Microlicia* possui ampla diversidade estrutural de derivados glicosilados da quercetina e do canferol e que *M. crenulata* possui apenas flavonóis glicosilados (quercetina-3-O-glicosídeos e canferol-3-O-glicosídeos) e quercetina (aglicona) (**Figura 4**).

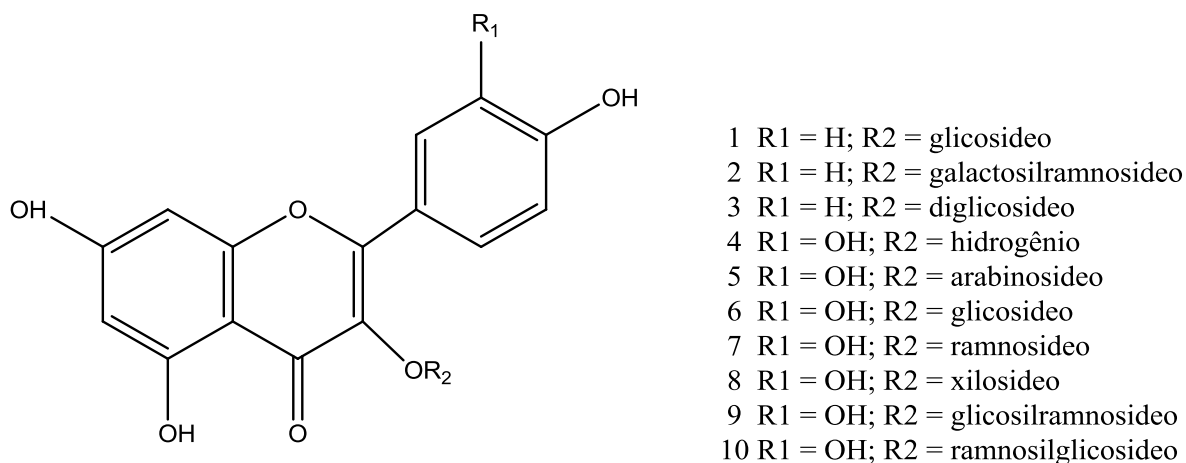


Figura 4 - Estruturas dos flavonoides encontrados em *M. crenulata* por BOMFIM-PATRÍCIO et al. (2001).

Os flavonoides isolados de folhas de diferentes espécies do gênero *Microlicia* por Bomfim-Patricio et al. (2001) estão listados na **Tabela 2**. Na **Figura 5**, somente as estruturas químicas das agliconas correspondentes, apigenina, luteolina, crisoeriol, canferol, quercetina, miricetina, ramnetina e isoramnetina estão representadas.

Tabela 2 - Flavonoides isolados de amostras de *Microlicia* D. Don

Flavonoide	Espécie
Apigenina 7-O-glicosideo	<i>M. avicularis</i> Mart. ex Naud.; <i>M. fulva</i> (Spreng.) Cham.; <i>M. isophylla</i> DC.; <i>M. martiana</i> O. Berg. ex Triana; <i>M. selaginea</i> Naud.
Apigenina 7-O-xilosideo	<i>M. martiana</i> O. Berg. ex Triana
Luteolina 7-O-arabinosideo	<i>M. glandulifera</i> Cogn.; <i>M. juniperina</i> St. Hil.
Crisoeriol	<i>M. macrophylla</i> Naud.
Crisoeriol 7-O-arabinosideo	<i>M. macrophylla</i> Naud.
Crisoeriol 7-O-glicosideo	<i>M. macrophylla</i> Naud.
Canferol	<i>M. confertiflora</i> Naud. var. <i>confertiflora</i> Naud.
Canferol 3-O-arabinosideo	<i>M. fulva</i> (Spreng.) Cham.; <i>M. martiana</i> O. Berg. ex Triana
Canferol 3-O-glicosideo	<i>M. confertiflora</i> Naud. var. <i>confertiflora</i> Naud.; <i>M. crenulata</i> Mart.; <i>M. cuneata</i> Naud.; <i>M. fulva</i> (Spreng.) Cham.; <i>M. glandulifera</i> Cogn.; <i>M. martiana</i> O. Berg. ex Triana.
Canferol 3-O-xilosideo	<i>M. glandulifera</i> Cogn.; <i>M. martiana</i> O. Berg. ex Triana
Canferol 3-O-arabinosilxilosideo	<i>M. polystemma</i> Naud.
Canferol 3-O-glicosilramnosideo	<i>M. glandulifera</i> Cogn.; <i>M. macrophylla</i> Naud.
Canferol 3-O-galactosilramnosideo	<i>M. crenulata</i> Mart.
Canferol 3-O-diglicosideo	<i>M. crenulata</i> Mart.; <i>M. cuneata</i> Naud.
Canferol 3-O-(glicose-xilose)*	<i>M. polystemma</i> Naud.
Canferol 3-O-xilosilglicosideo	<i>M. glandulifera</i> Cogn.; <i>M. isophylla</i> DC
Canferol 3-O-dixilosideo	<i>M. isophylla</i> DC.
Canferol 7-O-arabinosideo	<i>M. selaginea</i> Naud.
Canferol 3,7-di-O-diglicosideo	<i>M. confertiflora</i> Naud. var. <i>confertiflora</i> Naud.
Quercetina	<i>M. crenulata</i> Mart.; <i>M. cuneata</i> Naud.; <i>M. damazioi</i> Brade; <i>M. fulva</i> (Spreng.) Cham.; <i>M. glandulifera</i> Cogn.; <i>M. macrophylla</i> Naud.; <i>M. pulchella</i> Naud.; <i>M. selaginea</i> Naud.
Quercetina 3-O-arabinosideo	<i>M. confertiflora</i> Naud. var. <i>confertiflora</i> Naud.; <i>M. crenulata</i> Mart.; <i>M. cuneata</i> Naud.; <i>M. fulva</i> (Spreng.) Cham.; <i>M. glandulifera</i> Cogn.; <i>M. isophylla</i> DC.; <i>M. macrophylla</i> Naud.; <i>M. martiana</i> O. Berg. ex Triana; <i>M. pulchella</i> Naud.; <i>M. selaginea</i> Naud.
Quercetina 3-O-galactosideo	<i>M. confertiflora</i> Naud. var. <i>laxifolia</i> Cogn.; <i>M. selaginea</i> Naud.

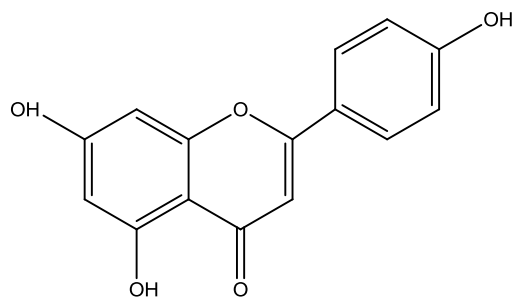
/continua.

Tabela 2 - Flavonoides isolados de amostras de *Microlicia* D. Don (conclusão)

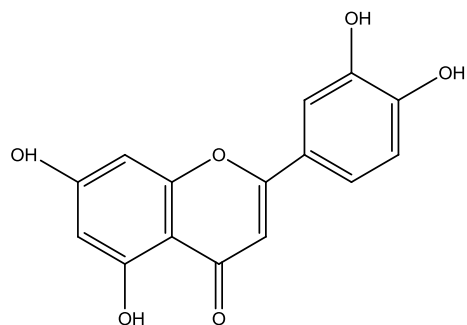
Quercetina 3-O-glicosídeo	<i>M. avicularis</i> Mart. ex Naud.; <i>M. confertiflora</i> Naud. var. <i>confertiflora</i> Naud.; <i>M. confertiflora</i> Naud. var. <i>laxifolia</i> Cogn.; <i>M. crenulata</i> Mart.; <i>M. cuneata</i> Naud.; <i>M. damazioi</i> Brade; <i>M. fulva</i> (Spreng.) Cham.; <i>M. glandulifera</i> Cogn.; <i>M. isophylla</i> DC.; <i>M. macrophylla</i> Naud.; <i>M. martiana</i> O. Berg. ex Triana; <i>M. pulchella</i> Naud.; <i>M. selaginea</i> Naud.
Quercetina 3-O-ramnosídeo	<i>M. crenulata</i> Mart.; <i>M. damazioi</i> Brade; <i>M. fulva</i> (Spreng.) Cham.
Quercetina 3-O-xilosídeo	<i>M. crenulata</i> Mart.; <i>M. fulva</i> (Spreng.) Cham.; <i>M. isophylla</i> DC.; <i>M. martiana</i> O. Berg. ex Triana; <i>M. pulchella</i> Naud.
Quercetina 3-O-arabinosilgalactosídeo	<i>M. glandulifera</i> Cogn.
Quercetina 3-O-arabinosilglicosídeo	<i>M. glandulifera</i> Cogn.
Quercetina 3-O-arabinosilramnosídeo	<i>M. avicularis</i> Mart. ex Naud.
Quercetina 3-O-galactosilglicosídeo	<i>M. selaginea</i> Naud.
Quercetina 3-O-diglicosídeo	<i>M. avicularis</i> Mart. ex Naud.; <i>M. confertiflora</i> Naud. var. <i>laxifolia</i> Cogn.; <i>M. cuneata</i> Naud.; <i>M. glandulifera</i> Cogn.; <i>M. macrophylla</i> Naud.; <i>M. pulchella</i> Naud.
Quercetina 3-O-glicosilramnosídeo	<i>M. crenulata</i> Mart.; <i>M. fulva</i> (Spreng.) Cham.; <i>M. macrophylla</i> Naud.
Quercetina 3-O-glicosilxilosídeo	<i>M. isophylla</i> DC.; <i>M. pulchella</i> Naud.
Quercetina 3-O-diarabinosídeo	<i>M. confertiflora</i> Naud. var. <i>confertiflora</i> Naud.
Quercetina 3-O-ramnosilglicosídeo	<i>M. avicularis</i> Mart. ex Naud.; <i>M. crenulata</i> Mart.; <i>M. cuneata</i> Naud.; <i>M. fulva</i> (Spreng.) Cham.; <i>M. glandulifera</i> Cogn.
Quercetina 3-O-diramnosídeo	<i>M. glandulifera</i> Cogn.; <i>M. polystemma</i> Naud.
Quercetina 3-O-ramnosilxilosídeo	<i>M. pulchella</i> Naud.
Quercetina 3-O-xilosilglicosídeo	<i>M. glandulifera</i> Cogn.
Quercetina 3-O-dixilosídeo	<i>M. glandulifera</i> Cogn.; <i>M. isophylla</i> DC.
Quercetina 7-O-glicosídeo	<i>M. pulchella</i> Naud.
Quercetina 7-O-xilosídeo	<i>M. pulchella</i> Naud.
Quercetina 7,3'-dimetil éter 3,4'-di-O-, (xilose ou glicose)*	<i>M. glandulifera</i> Cogn.
Ramnetina 3-O-glicosídeo	<i>M. selaginea</i> Naud.
Ramnetina 3-O-diglicosídeo	<i>M. selaginea</i> Naud.
Isoramnetina	<i>M. selaginea</i> Naud.
Isoramnetina 3-O-arabinosídeo	<i>M. selaginea</i> Naud.
Isoramnetina 3-O-galactosídeo	<i>M. selaginea</i> Naud.
Isoramnetina 3-O-glicosídeo	<i>M. selaginea</i> Naud.
Miricetina 3-O-glicosídeo	<i>M. fulva</i> (Spreng.) Cham.
Miricetina 3-O-xilosídeo	<i>M. fulva</i> (Spreng.) Cham.

* Posição relativa dos açúcares não determinada.

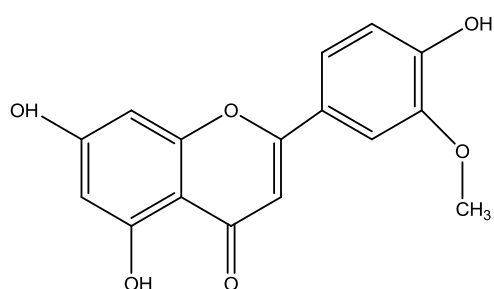
Fonte: Bomfim-Patrício et al. (2001).



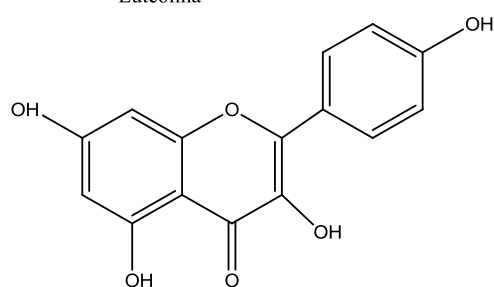
Apigenina



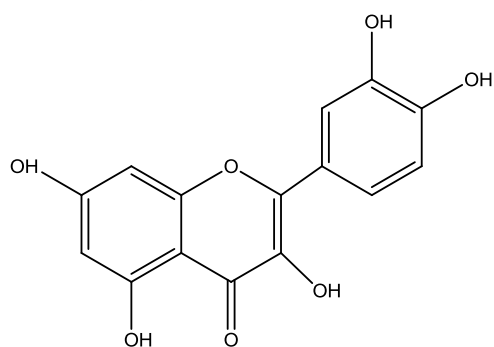
Luteolina



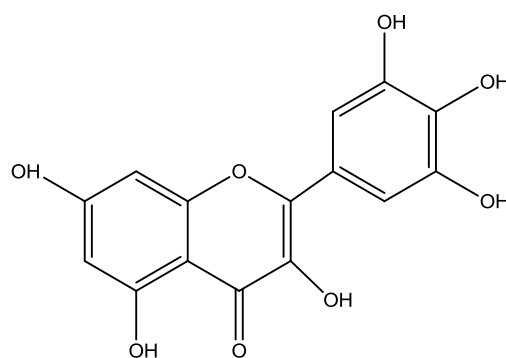
Crisoeriol



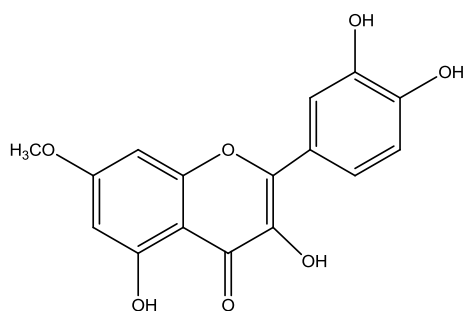
Canferol



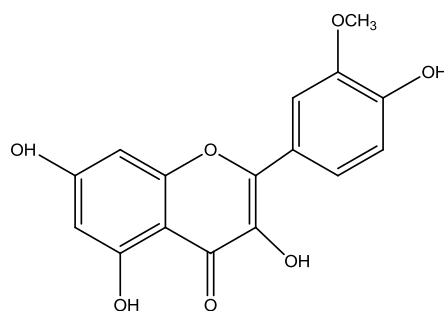
Quercetina



Miricetina



Ramnetina



Isoramnetina

Figura 5 - Estrutura química das agliconas dos flavonoides isolados de diferentes espécies de *Microlicia* por Bomfim-Patrício et al. (2001).

2.3.2 Taninos

O tanino é utilizado desde a antiguidade (cerca de 1500 a.c.) e, atualmente, tem ampla aplicação na medicina e indústria de alimentos. Na Ásia (Japão e China), extratos de plantas que contêm taninos são usados como adstringente contra diarreia, como diurético, contra tumores estomacais e duodenais e como anti-inflamatório e antisséptico. Os taninos podem precipitar metais pesados e alcalóides (exceto morfina), portanto podem ser utilizados em envenenamentos com estas substâncias (KHANBABAEE & VAN REE, 2001).

A sensação adstringente provocada por vinhos, sucos de frutas, chás e outras bebidas está relacionada, em grande parte, aos taninos. Ao precipitar as proteínas ricas em prolina presentes na saliva, ocorre a perda do poder lubrificante (SIMON et al., 2003).

Os taninos são usados na estabilização de cerveja na indústria de alimentos. Sua função é reduzir a concentração de proteínas por meio da precipitação como complexos tanino-proteicos, que são retirados da cerveja por meio da sedimentação ou centrifugação/filtração (BATTESTIN et al., 2004). São utilizados como coagulantes na produção de borracha e como corantes na produção de tintas, inclusive como corantes têxteis (KHANBABAEE & VAN REE, 2001), como coagulantes e floculantes no tratamento de água em barragens e curtimento de couro (PANSERA et al., 2003).

Os taninos representam o quarto constituinte vegetal mais abundante depois da celulose, da hemicelulose e da lignina. Atuam como parte do mecanismo de defesa dos vegetais contra microrganismos, herbívoros e condições ambientais hostis (PINTO et al., 2005).

Taninos são substâncias polifenólicas que podem ser divididos em dois grandes grupos: condensado e hidrolisável. Taninos condensados são formados por meio da condensação de flavan-3-ols (catequinas) e são muitas vezes referidos como proantocianidinas (YOSHIDA et al., 2010).

Dentre os taninos hidrolisáveis encontramos os galotaninos e os elagitaninos. Galotaninos são os taninos hidrolisáveis mais simples em ocorrência, sua estrutura básica corresponde a um núcleo poliol ligado a moléculas de ácido gálico. Apesar da grande variedade de combinações possíveis os galotaninos apresentam um núcleo poliol, de glicose na maioria dos casos, sendo que as hidroxilas podem estar totalmente ou parcialmente substituídas por unidades galoila. Os elagitaninos são formados a partir dos galotaninos, mais especificamente da pentagaloilglicose por um processo de

acoplamento oxidativo de pelo menos duas das espécies galoila, formando as unidades quirais HHDP (hexahidroxi-difenoila) (YOSHIDA et al., 2010). A estrutura molecular do HHDP está apresentada na **Figura 6**.

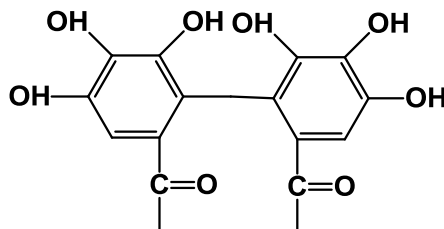


FIGURA 6 - Unidade HHDP (hexahidroxi-difenoila).

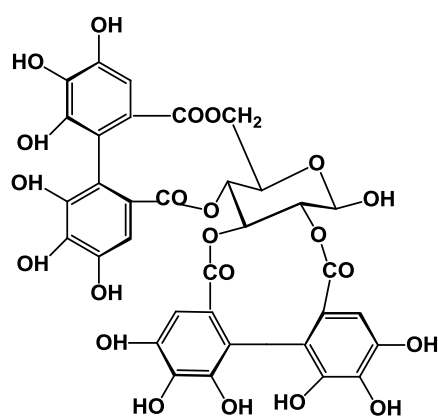
Os elagitaninos produzem ácido elágico após a hidrólise. Os elagitaninos incluem: elagitaninos monoméricos, elagitaninos C-glicosídico com um núcleo de glicose de cadeia aberta, taninos complexos (taninos C-glicosídico condensado com flavan-3-ol), e oligômeros que são produzidos por meio de ligações intermoleculares C-O ou C-C entre monômeros. Ao contrário dos taninos condensados que são comumente encontrados em todo reino vegetal, elagitaninos foram encontrados somente em angiospermas dicotiledôneas. Entre as famílias de plantas ricas em elagitaninos estão Myrtaceae, Lythraceae, Onagraceae, Melastomataceae e Combretaceae. Essas famílias pertencem a ordem Myrtales de acordo com os sistemas de classificação de plantas de Cronquist e APGII (YOSHIDA et al., 2010).

A família Melastomataceae produz oligômeros que são distintos daqueles de qualquer outra família. Ao contrário dos taninos monoméricos hidrolisáveis, as estruturas dos oligômeros são características de uma família ou gênero de plantas, sugerindo que as formas de oligomerização dos monômeros são provavelmente reguladas enzimaticamente de maneira semelhante dentro de cada grupo de plantas (YOSHIDA et al., 2005). Aproximadamente 40% dos elagitaninos oligoméricos já caracterizados foram isolados de espécies de Onagraceae, Lythraceae, Myrtaceae, Trapaceae e Melastomataceae, indicando que estas variedades de plantas são boas fontes naturais destes oligômeros (YOSHIDA et al., 2010).

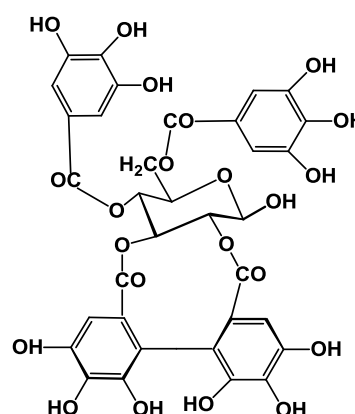
Taninos complexos são caracterizados por uma estrutura de tanino C-glicosídico condensado com flavan-3-ol (catequina ou epicatequina). Ao contrário dos taninos C-glicosídicos, estes taninos foram encontrados em um número bastante limitado de

espécies de plantas pertencentes às famílias Combretaceae, Myrtaceae, Melastomataceae, Fagaceae e Theaceae (YOSHIDA et al., 2010).

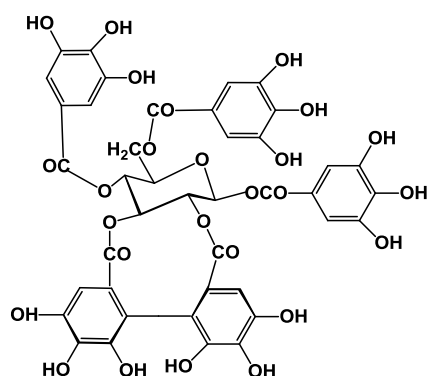
A **Tabela 3** lista vários taninos isolados de diferentes espécies de Melastomataceae, estando representadas somente as estruturas químicas dos monômeros na **Figura 7** (YOSHIDA et al., 2005).



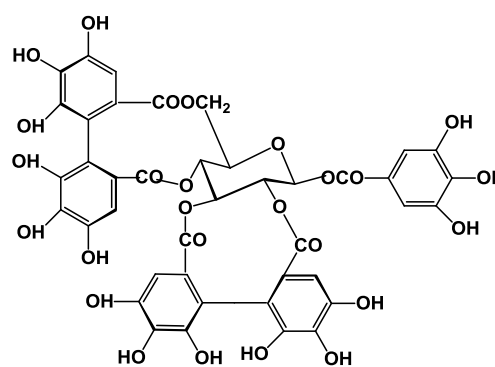
Pedunculagin (PE)



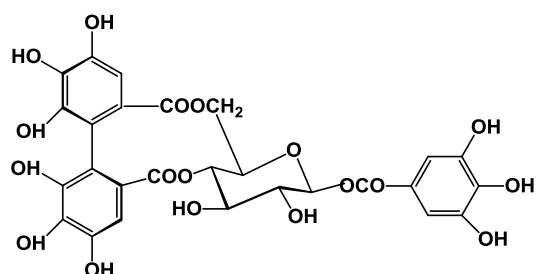
Praecoxin B (PB)



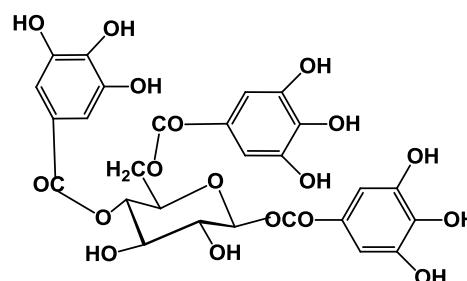
Pterocaryanin C (PC)



Casuarictin (C)



Strictinin (S)



1,4,6-Trigalloylglucose (TG)

Figura 7 - Estrutura química de taninos hidrolisáveis em plantas da família Melastomataceae.

Tabela 3 - Taninos hidrolisáveis em plantas da família melastomataceae (Yoshida et al., 2005)

Compostos	Tipo de estrutura	Monochaetum multiflorum	Melastoma malabathricum	M. normale	Tibouchina semidecandra	T. multiflora	Heterocentron roseum	Medinilla magnifica	Bredia Tuberculata
Monômeros									
Pedunculagin (PE)		+	+	+	+	+			+
Casuarictin (C)		+	+	+	+	+	+		+
Pterocaryanin C (PC)		+	+	+					
Praecoxin B (PB)			+	+	+		+		
Strictinin (S)			+	+	+				
1,4,6-Trigalloylglucose (TG)		+	+	+	+				
Dímeros									
Nobotanin F	PC (4-6)C	+			+	+	+		+
Nobotanin A	PB (4-6)C	+			+	+			+
Nobotanin R	PC (4-6)S	+							
Brediatin B	TG (4-6)C	+							+
Nobotanin B	C (2-4)PC	+	+	+	+	+			+
Nobotanin G	C (2-4)TG		+	+	+	+	+		+
Nobotanin H	C (2-4)PC ^a		+	+					+
Nobotanin I	C (2-4)PC ^b							+	
Nobotanin O	C (2-4)PC	+							+
Medillinin B	PB (4-6)PE					+		+	
Trímeros									
Nobotanin E	PC (4-6)C (2-4)PC	+			+				+
Nobotanin C	PB (4-6)C (2-4)PC				+	+			
Nobotanin L	PB (4-6)C (2-4)PB				+				
Nobotanin M	PB (4-6)C (2-4)TG				+	+			
Nobotanin N	PB (4-6)C (2-4)DG ^c				+				
Nobotanin U	PB (4-6)C (2-4)PC ^a	+							
Nobotanin J	C (2-4)PC (3-1)C	+	+			+	+		
Tetrâmeros									
B Nobotanin K	PC (4-6)C (2-4)PC (3-1)C	+					+		
Nobotanin P	PB (4-6)C (2-4)PC (3-1)C								+
Nobotanin Q	DG (4-6)C (2-4)PC (3-1)C	+							
Nobotanin S	C (2-4)PC (3-1)C (2-4)TG	+							
Nobotanin T	PB (4-6)C (2-4)PC (3-1)S	+							

^a 2,3-Valoneoyl group instead of 2,3-HHDP group; ^b 2,3-Lactonized valoneoyl instead of 2,3-HHDP; ^c DG, -di-O-galloylglucose.

Da espécie *Osbeckia chinensis*, foram identificados três elagitaninos C-glicosídicos, casuarinin, casuariin e epi-punicacortein A, e de *Tibouchina semidecandra*, foram isolados castalagin, vescalagin e casuarinin. Da espécie *Melastoma malabathricum*, foram isolados os taninos complexos stenophyllanin A, malabathrin A, malabathrin E, malabathrin F (YOSHIDA et al., 2010). Yoshida et al. (2005) isolaram e caracterizaram os elagitaninos pentaméricos melastoflorins A, B, C e D das folhas de *Monochaetum multiflorum*.

Segundo Haslam (1996) as propriedades farmacológicas dos taninos são, pelo menos em parte, em virtude de três características gerais: 1. Complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, entre outros); 2. Atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e; 3. Habilidade de complexar com outras moléculas, incluindo macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos.

Várias propriedades biológicas benéficas para a saúde humana têm sido relatadas tanto para os elagitaninos como para as proantocianidinas. A forte afinidade dos taninos por diversos biopolímeros, tais como enzimas, e os efeitos antioxidantes baseados no sequestro de radical são a chave para seus diversos efeitos biológicos. Foram observados efeitos antimicrobianos, antitumoral, inibidor de enzima, e imunomodulador dos elagitaninos de espécies de plantas da ordem Myrtales (YOSHIDA et al., 2010).

2.3.3 Óleos essenciais

O conhecimento sobre óleos essenciais de plantas data de alguns séculos antes da era cristã. A referência histórica de obtenção e utilização desses óleos está ligada, originariamente, a civilizações antigas, com destaque para o Egito, Pérsia, China e Índia. A evolução de conhecimentos técnicos sobre óleos essenciais deu-se em meados do século XVIII, quando se iniciaram estudos para as caracterizações químicas (VITTI & BRITO 2003). Atualmente, é grande o número de plantas conhecidas para a produção de óleos essenciais com viabilidade econômica.

Os óleos essenciais são definidos pela Organização Internacional de Padrões (ISO) como sendo os produtos obtidos de partes de plantas por meio da destilação por arraste com vapor d'água, bem como os produtos obtidos por prensagem dos pericarpos de frutos. Podem ser também chamados de óleos voláteis, óleos etéreos ou essências. Possuem aparência oleosa à temperatura ambiente, advindo, daí, a denominação de óleo. Entretanto, sua principal característica é a volatilidade.

Os óleos voláteis são produzidos no metabolismo secundário das plantas. Sua localização varia de acordo com a família botânica a qual pertence, podendo ocorrer em estruturas secretoras especializadas, tais como canais oleíferos (Apiaceae), bolsas lisígenas ou esquizolisígenas (Pinaceae, Rutaceae), pêlos glandulares (Lamiaceae), células parenquimáticas diferenciadas (Lauraceae, Piperaceae, Poaceae). Podem ser estocados nas flores, folhas, cascas do caule, madeira, raízes, rizomas, frutos ou sementes, podendo variar na sua composição de acordo com a localização em uma mesma espécie (SIMÕES & SPITZER, 2004). Além da variação de acordo com o órgão de localização, outros fatores podem interferir na composição do óleo essencial de uma mesma espécie vegetal, tais como: a época de coleta; condições climáticas e de solo; localização geográfica; ciclo vegetativo da espécie e o processo de obtenção (SIMÕES & SPITZER, 2004).

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente odoríferas e líquidas a temperatura ambiente, cujos componentes incluem hidrocarbonetos (monoterpenos, sesquiterpenos, entre outros) e compostos oxigenados (álcoois, ésteres, éteres, aldeídos, cetonas, lactonas, fenóis, éteres fenólicos, entre outros). Geralmente, um deles é o composto majoritário, havendo outros em menores teores e alguns em baixíssimas quantidades (traços). Quimicamente, estes compostos derivam de terpenóides, originados a partir do ácido mevalônico e do metileritritol fosfato, ou de fenilpropanóides, provindos do ácido chiquímico. Os fenilpropanóides são caracterizados por apresentarem um anel benzênico com uma cadeia lateral de três carbonos. Os terpenóides são classificados pelo número de unidades isoprênicas que possuem, sendo os mais frequentes os monoterpenóides (cerca de 90% dos óleos) e os sesquiterpenos (SIMÕES & SPITZER, 2004).

Toudahl et al. (2012) estudaram a composição química do óleo essencial de *Microlicia graveolens* e identificaram 13 compostos, o que representa 99,8 % de sua composição. O componente majoritário foi o acetato de (+)-trans-pinocarvila (78.9 %), seguido por acetato de (-)-trans-pinocarvila (5.5 %) e β -pineno (3.8 %). O óleo de *M. graveolens* apresenta em menores concentrações os seguintes compostos: β -mirceno, D-limoneno, 1-metil-4(1-acetoxi-1-metil-etil)-ciclohex-2-enol, pinocarvona, 4-terpineol, L-pinocarveol, α -terpineol, acetato de (+)-mirtenila, β -bisaboleno e verbenil propil éter. Até o presente, esse é o único relato na literatura referente à composição química de óleo essencial de alguma espécie do gênero *Microlicia*.

Na natureza, os óleos essenciais desempenham papéis ecológicos importantes na proteção das plantas, por atuarem como antimicrobianos, inseticidas e contra herbívoros. Na fitoterapia, destacam-se pelas suas propriedades antibacterianas, analgésicas, sedativas, expectorantes, estimulantes e estomáquicas (SILVA & CASALI, 2000; CRAVEIRO et al., 1981). Os óleos voláteis são utilizados para conferir aroma e odores especiais a produtos alimentícios e de perfumaria (CRAVEIRO et al. 1981). Servem como uma fonte alternativa de agentes antimicrobianos contra patógenos e/ou deteriorantes em alimentos (OLIVEIRA et al., 2010a; KOTZEKIDOU et al., 2007; SKANDAMIS et al., 2002). Principalmente devido à propriedade antimicrobiana, o uso dos óleos essenciais nas indústrias alimentícia, farmacêutica e cosmética está se difundindo cada vez mais como alternativa aos produtos sintéticos.

O estudo e desenvolvimento das embalagens, especialmente as embalagens ativas, que interagem com o alimento, têm sido de fundamental importância para estender sua vida-de-prateleira (MORAES et al., 2007). Dentre os antimicrobianos utilizados em embalagens têm-se alguns óleos essenciais (BOLTRE et al., 2010; MELO, 2010; OJAGH et al., 2010; ROJAS-GRAÜ et al., 2007). Os compostos ativos, uma vez incorporados nos polímeros e em contato com o alimento, podem migrar lenta e gradualmente, da embalagem para a superfície do alimento, de modo que a atividade antimicrobiana ocorra com maior intensidade onde se faz necessário (COMA, 2008). Apesar das vantagens, a embalagem antimicrobiana não pode alterar negativamente a aparência, odor e sabor dos alimentos. Deve-se considerar, na seleção do agente antimicrobiano, seu mecanismo de inibição, cinética de migração e difusão do agente no alimento, características físico-químicas do alimento, tipo e população de microrganismos, fisiologia do microrganismo-alvo, processo de fabricação do material de embalagem, e processabilidade do material de embalagem e aspectos relacionados à legislação (OLIVEIRA & OLIVEIRA, 2004).

Pesquisas sobre caracterização química e descrição de atividades biológicas atribuem os efeitos dos óleos voláteis principalmente aos compostos majoritários (SANTURIO et al., 2007). No entanto, VAN ZYL et al. (2006) apontaram que todos os compostos dos óleos podem interagir de maneira complexa, o que poderia refletir na atividade biológica. Apesar de apresentar várias características benéficas, os efeitos tóxicos que estas substâncias podem ocasionar não podem ser descartados (SIMÕES et al., 2004; FABROWSKI, 2002; ROBBERS et al., 1997).

Santos et. al. (2006), após estudo bibliométrico de 12995 documentos de patentes depositadas nos Estados Unidos entre 1980 até 2003 sobre o tema dos óleos

essenciais, relataram informações interessantes sobre esses compostos. Os depósitos de patentes envolvendo óleos essenciais e compostos terpênicos nas áreas de preparações medicinais contabilizaram 13,95%; para manipulação genética de plantas superiores e microrganismos visando à síntese de terpenos, 8,37%; para tensoativos, 4,04%; para polímeros, 3,32% e para cosméticos, 3,10%. Na mesma pesquisa verificaram que, das patentes listadas, as companhias norte-americanas Procter & Gamble e Colgate-Palmolive possuem, respectivamente, 2,01 e 1,38%; a empresa francesa L'Oréal, 2,01% e a alemã Hoescht 1,09%. Esta informação demonstra uma crescente busca por novas tecnologias para áreas de tensoativos, compostos farmacêuticos e polímeros utilizando-se óleos essenciais e compostos terpênicos.

Os métodos de extração de óleos voláteis variam segundo a sua localização na planta e com a proposta de utilização do mesmo (CHAAR, 2000; ROBBERS et al., 1997). A composição e as características físico-químicas dos óleos essenciais podem variar de acordo com o método de extração utilizado e com as condições operacionais empregadas na extração (ROBBERS et al., 1997).

O arraste por vapor d'água é o método mais empregado por apresentar bom rendimento, ser de baixo custo e de fácil execução. Existem três técnicas de extrações distintas de arraste por vapor d'água. A distinção entre as técnicas é feita pela forma na qual se estabelece o contato entre a amostra e a água, na fase líquida ou de vapor. A primeira técnica chamada de hidrodestilação, a amostra fica imersa na água contida numa caldeira. A segunda, chamada de destilação pela água e vapor, a amostra fica contida em um recipiente logo acima da caldeira, permanecendo, desse modo, separada da água. A terceira, chamada de destilação pelo vapor de água, a amostra é mantida em um recipiente separado e o vapor de água que flui provém de um gerador próprio independente (CHAAR, 2000). O calor do vapor faz com que as paredes celulares se abram. Assim, o óleo que está entre as células evapora juntamente com a água e vai para o tubo de resfriamento. A fase oleosa não se mistura com a fase aquosa. Os óleos essenciais ficam concentrados sobre a camada de água, por serem menos densos, podendo ser facilmente separados. Preferencialmente, esse método tem sido utilizado na extração de óleos de plantas frescas. A farmacopeia Brasileira (edição V) preconiza o uso de um aparelho tipo Clevenger, com algumas modificações. O aparelho de Clevenger é utilizado em produções de pequena escala (**Figura 8**).

A indústria utiliza, preferencialmente, a extração por vapor d'água por ser menor o contato da amostra com a água em relação aos métodos anteriores de arraste por vapor d'água. Nessa técnica, são menos acentuada a hidrólise de ésteres, a oxidação

de componentes voláteis e a polimerização de outros constituintes, em particular dos aldeídos. A água residual desse método de extração é denominada de hidrolato, que normalmente é rica em compostos do óleo essencial solubilizado (CHAAR, 2000).

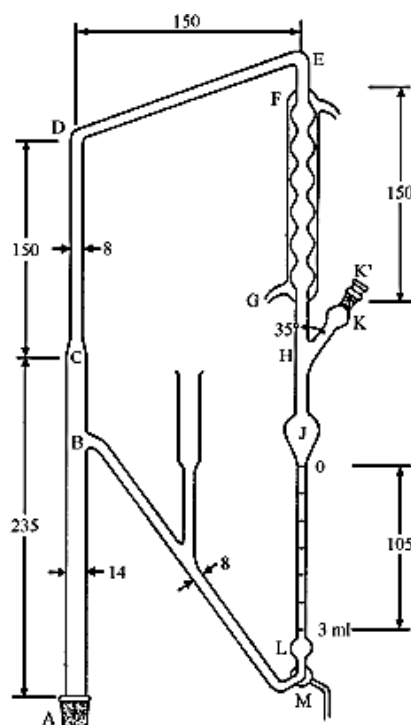


Figura 8 - Extrator de óleos essenciais tipo Clevenger modificado

2.4 Microextração em Fase Sólida

A Microextração em Fase Sólida - SPME (Solid Phase Micro-Extraction) é uma técnica de extração e pré-concentração rápida e simples, não utiliza solventes extratores e dispensa manipulação excessiva de amostra. Tem aplicações em áreas como alimentos, produtos naturais e farmacêuticos, análise ambiental, de água e de solos, análise clínica e forense. Tem elevado poder de concentração (adequando-se com as sensibilidades dos detectores de cromatografia gasosa), é aplicável a muitos tipos de analitos e facilita o transporte do material extraído para o cromatógrafo (QUEIROZ & LANÇAS, 2005; SARTORATTO, 2001; VALENTE & AUGUSTO, 2000).

A teoria de SPME fundamenta-se na cinética de transferência de massa entre fases e na termodinâmica que descreve o equilíbrio de partição do analito entre as fases. Numa extração por SPME, as moléculas do analito têm de se deslocar da matriz e penetrar no recobrimento e, para isto, resistências a transferências de massa devem

ser vencidas, até que se estabeleça um equilíbrio de partição (ou de adsorção, para o caso de recobrimentos sólidos) do analito, entre a fibra e o meio que a envolve (VALENTE & AUGUSTO, 2000).

O dispositivo básico de SPME consiste de uma fibra ótica de sílica fundida de 100 μm de diâmetro, com 10 mm de uma extremidade recoberta com um filme fino de um polímero (polidimetilsiloxano = PDMS, poliacrilato = PA ou Carbowax = Cwx) ou de um sólido adsorvente (carvão ativo microparticulado = Carboxen) (**Figura 9**). As espessuras dos recobrimentos de fibras comerciais variam de 7 μm a 100 μm e seus volumes de 0,03 μL a 0,7 μL . A extração acontece introduzindo-se a seção recoberta na amostra, ou no seu espaço confinante (headspace) acima da amostra. Após a extração, a fibra é removida da amostra e inserida no injetor do cromatógrafo de gás, onde os analitos são termicamente dessorvidos sob fluxo do gás de arraste e carregados para a coluna cromatográfica. Com as dimensões anteriormente mencionadas, as fibras extraem pequenas quantidades de analito, o que facilita sua dessorção e subsequente separação cromatográfica (VALENTE & AUGUSTO, 2000).

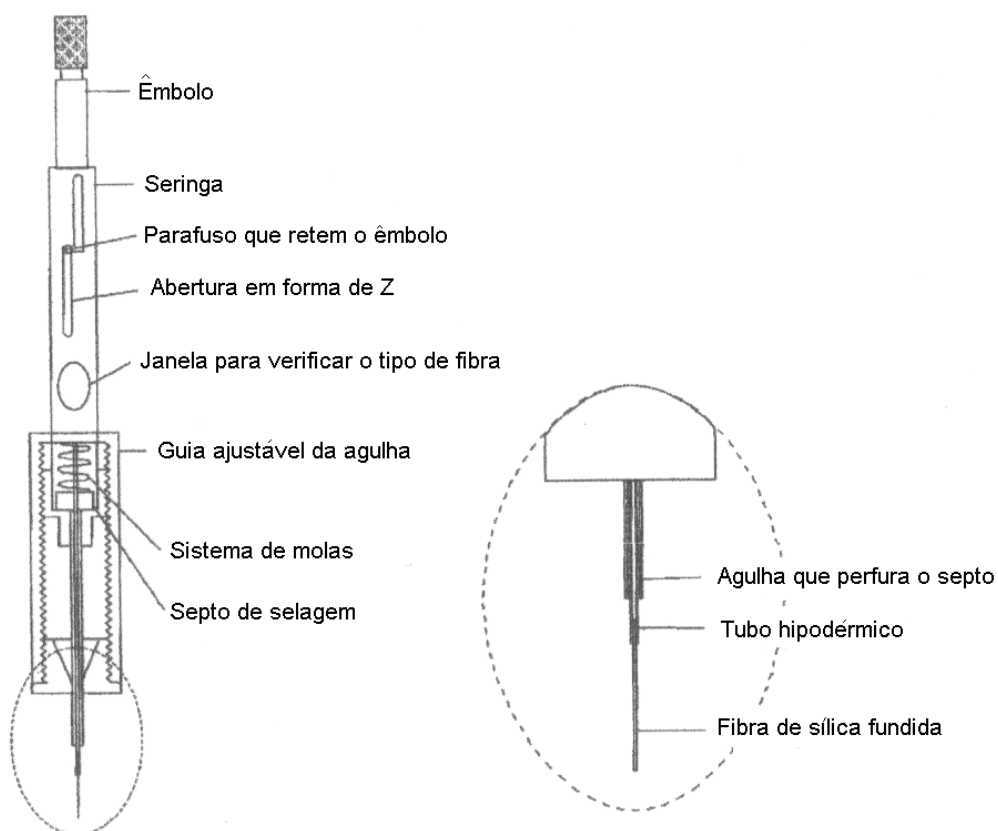


Figura 9 - Dispositivo de SPME comercializado pela Supelco.

2.5 Atividade antioxidante

O estudo da atividade antioxidante de compostos orgânicos tem sido estimulado pela demanda crescente de substâncias com potencial antioxidante pelas indústrias de alimentos, medicamentos e cosméticos. Especificamente, a substituição de antioxidantes sintéticos por antioxidantes naturais tem estimulado pesquisas na área de ciência dos alimentos. Os processos oxidativos, responsáveis por alterações na cor, sabor, textura e valor nutricional dos alimentos, podem ser evitados pela modificação das condições ambientais ou utilização de substâncias antioxidantes, as quais impedem ou diminuem o desencadeamento das reações oxidativas (AMAROWICZ et al., 2004). A propriedade antioxidante pode ser caracterizada como a doação de um elétron, alquilação de metais de transição com função catalítica ou inibição de elementos oxidativos (HALLIWELL, 1999).

A possibilidade de que os antioxidantes sintéticos sejam nocivos ao organismo, somada à rejeição por parte dos consumidores em relação a esses compostos, abrem campo para a pesquisa de novos antioxidantes naturais. Os compostos antioxidantes, quando presentes em pequenas concentrações, retardam a deterioração oxidativa de óleos e gorduras nos alimentos, responsável por odores de ranço e “off-flavours”. Assim, evitam a destruição de nutrientes e, conseqüentemente, o decréscimo na qualidade nutricional, sensorial e de segurança alimentar.

Os antioxidantes sintéticos são usados como aditivos alimentares para prevenir ou retardar a oxidação lipídica. São substâncias que tiveram seu uso aprovado em alimentos após investigações que comprovaram sua segurança dentro de um limite de ingestão diária. Dessa forma, estão sujeitas a legislações específicas de cada país ou normas internacionais (TAKEMOTO et al., 2009). Os antioxidantes sintéticos mais utilizados na indústria brasileira são: butil hidroxianisol (BHA), butil hidroxitolueno (BHT), galato de propila (PG) e *terc*-butil-hidroquinona (TBHQ) (**Figura 10**). O emprego desses antioxidantes tem sido alvo de questionamentos quanto à inocuidade, uma vez que estudos toxicológicos têm demonstrado que o BHA e o BHT se acumulam no organismo podendo causar danos ao fígado e carcinogênese (ITO et al., 1986; WHYSNER et al., 1994).

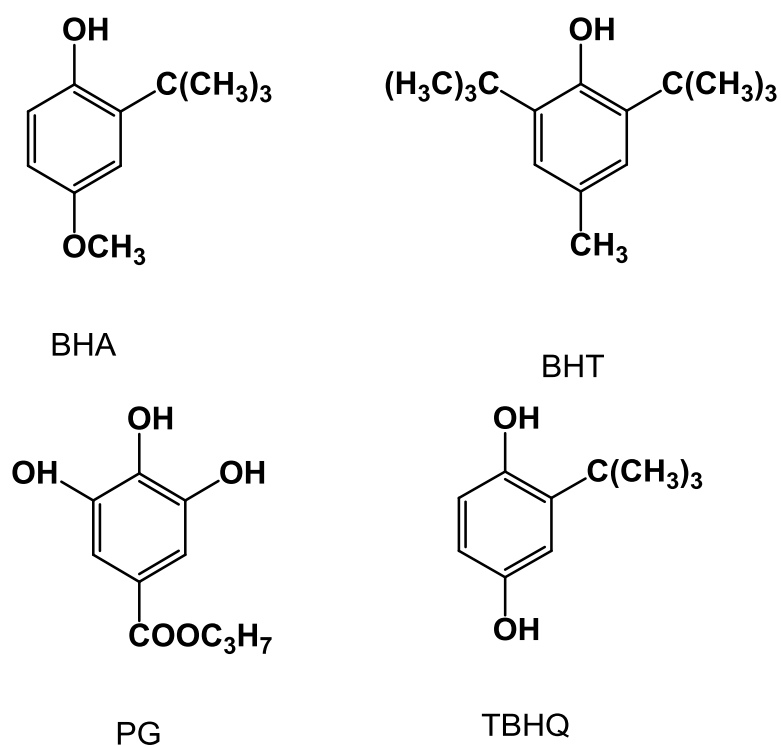
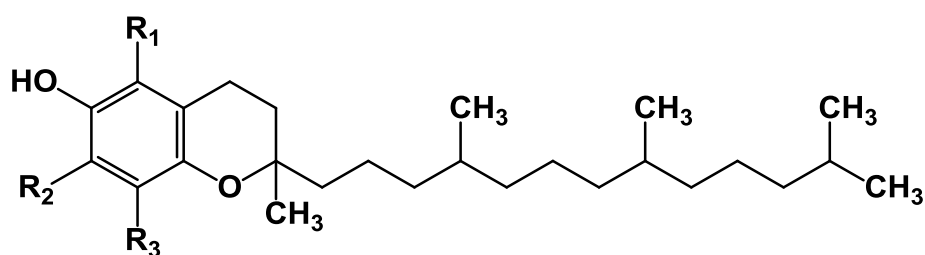


Figura 10 - Estrutura fenólica dos antioxidantes sintéticos mais usados na indústria de alimentos.

Entre os antioxidantes naturais mais utilizados em alimentos podem ser citados os tocoferóis (**Figura 11**), ácidos fenólicos e extratos de plantas como alecrim e sálvia (RAMALHO & JORGE, 2006).



α - tocoferol: R₁ = R₂ = R₃ = CH₃
 β - tocoferol: R₁ = R₃ = CH₃; R₂ = H
 γ - tocoferol: R₁ = H; R₂ = R₃ = CH₃
 δ - tocoferol: R₁ = R₂ = H; R₃ = CH₃

Figura 11 – Estruturas dos tocoferóis.

Para a seleção de um antioxidante devem-se considerar as seguintes propriedades: eficácia em baixas concentrações (0,001 a 0,01%); ausência de efeitos indesejáveis na cor, no odor, no sabor e em outras características do alimento; compatibilidade com o alimento e fácil aplicação; estabilidade nas condições de processo e armazenamento e o composto e seus produtos de oxidação não podem ser tóxicos, mesmo em doses muito maiores das que normalmente seriam ingeridas no alimento. Também, devem ser ponderados outros fatores como legislação, custo e preferência do consumidor por antioxidantes naturais (RAMALHO & JORGE, 2006).

Vários estudos têm relatado a atividade antioxidante de extratos vegetais e sua relação com o conteúdo de compostos fenólicos (SCHERER & GODOY, 2009; MARIUTTI & BRAGAGNOLO, 2007). Esses compostos constituem uma mistura complexa de produtos originados do metabolismo secundário das plantas que diferem em estrutura química e reatividade. Dentre esses, os flavonoides e taninos são substâncias doadoras de elétrons e, portanto, excelentes antioxidantes (GAO et al., 1999). Os compostos fenólicos atuam como antioxidantes em concentrações relativamente baixas, enquanto comportam-se como proantioxidantes em altas concentrações, visto que são susceptíveis à oxidação (ROBARDS, 2003).

A atividade antioxidante pode ser avaliada por metodologias *in vitro* e *in vivo*. Os métodos *in vitro* são avaliações potenciais da atividade antioxidante de um determinado composto puro ou extrato, uma vez que a interação fisiológica entre o organismo e o antioxidante não é analisada, como acontece nos métodos *in vivo*. Quando bem conduzida, a avaliação *in vitro* fornece uma estimativa do potencial antioxidante do composto em análise. Dentre os métodos espectrofotométricos *in vitro* mais utilizados para mensurar a capacidade antioxidante de alimentos, bebidas, extratos de plantas e compostos puros estão os ensaios do DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazil) e do ABTS (ácido 2,2'-azinobis-(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico)) (LI et al., 2012).

O método DPPH baseia-se na redução desse radical na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio em solução alcoólica. O radical, ao capturar os hidrogênios, passa para sua forma estável, mudando a coloração do meio reacional de violeta para amarelo (**Figura 12**). O DPPH é um radical estável e mostra forte banda de absorção em 517 nm (BORGES et al., 2011; POHLIT et al., 2004).

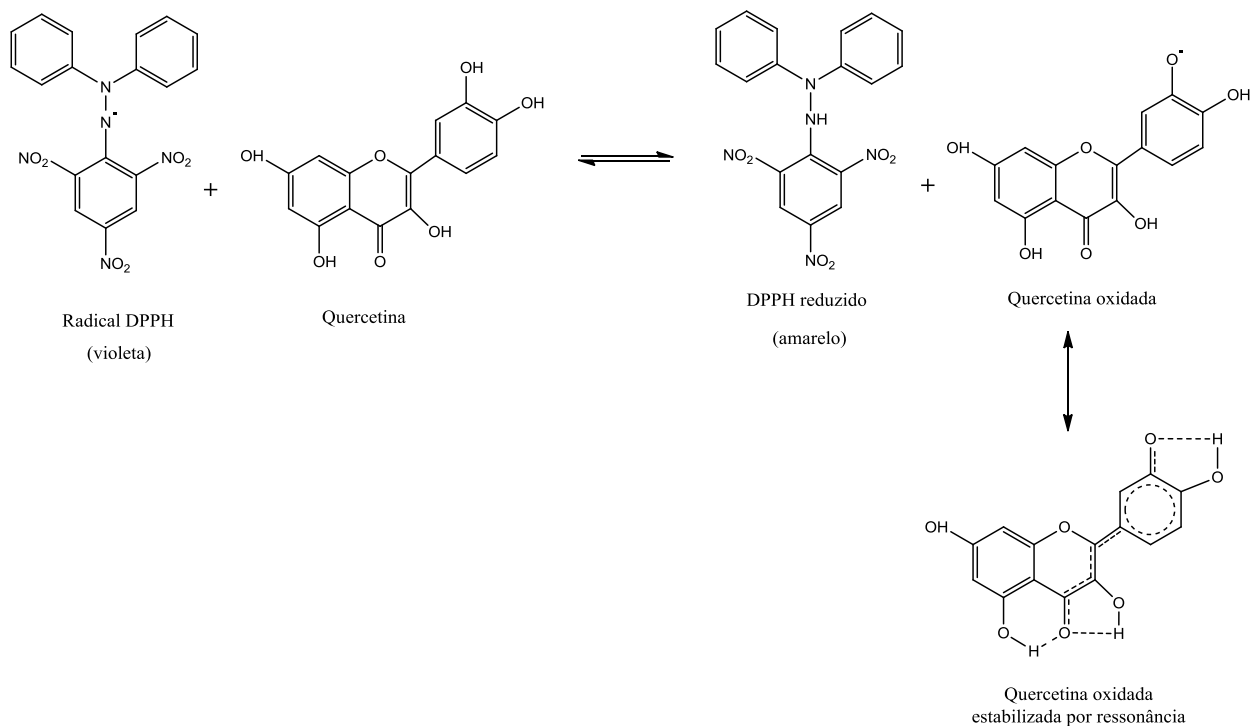


Figura 12 - Redução do radical livre DPPH pelo flavonoide antioxidante quercetina.

O método ABTS ou TEAC, segundo Re et al. (1999), baseia-se na geração do $\text{ABTS}^{\bullet+}$, que apresenta cor azul esverdeado, por meio da reação do ABTS com persulfato de potássio. O radical apresenta máximos de absorção a 415, 645, 734 e 815 nm. Com a adição de um antioxidante, ocorre a redução do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ a ABTS promovendo a perda da coloração do meio reacional (**Figura 13**). Com a extensão da descoloração, a porcentagem de inibição do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ é determinada em função do Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcroman-2-ácido carboxílico), um padrão submetido às mesmas condições de análise do antioxidante. A atividade antioxidante da amostra é dada em μM equivalente de Trolox em um grama de amostra, originando o nome TEAC, capacidade antioxidante equivalente ao Trolox. O método é aplicável ao estudo de antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais.

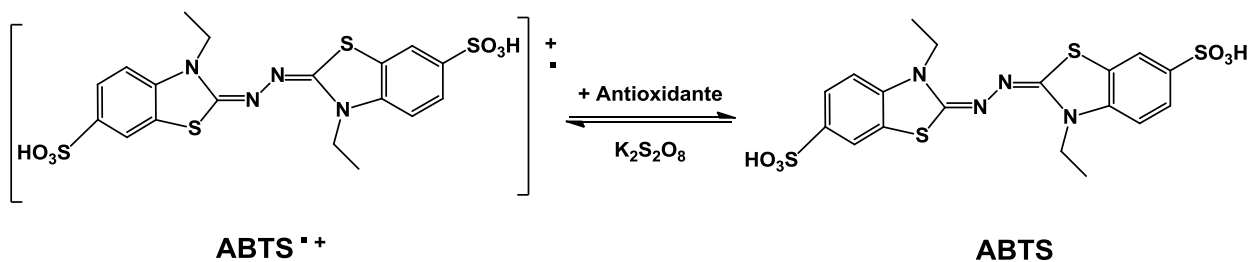


Figura 13- Estabilização do $\text{ABTS}^{\bullet+}$ por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

2.6 Avaliação da atividade antimicrobiana

Dentre as atividades biológicas observadas em espécies da família Melastomataceae, foram descritas as propriedades antimicrobianas, por exemplo, para *Marcetia* DC. (LEITE et al., 2012b), *Miconia* sp. (RODRIGUES et al., 2008), *Melastoma candidum* D. Don (WANG et al., 2008), *Tibouchina stenoscarpa* (FARIA et al., 2006). A atividade antimicrobiana de extratos vegetais é avaliada por meio da determinação da quantidade da amostra necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste; esse valor é conhecido como Concentração Inibitória Mínima (CIM) (PINTO et al., 2003). Existem diversos métodos para avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos vegetais. Os mais conhecidos são: método de difusão em ágar, método de macrodiluição e microdiluição. Contudo, não existe método padronizado para expressar os resultados de testes antimicrobianos de produtos naturais. As variações referentes à determinação da CIM de óleo e extratos de plantas podem ser atribuídas a vários fatores. Dentre eles podem-se citar a técnica aplicada, o microrganismo e a cepa utilizada no teste, a origem da planta, a época da coleta, se o óleo e os extratos foram preparados a partir de plantas frescas ou secas e a quantidade de óleo e extrato testados (FENNEL et al., 2004).

2.6.1 Métodos de difusão

O teste de difusão em ágar é um método físico, no qual um microrganismo é testado contra uma substância biologicamente ativa em meio de cultura sólido e relaciona o tamanho da zona de inibição de crescimento do microrganismo testado com a concentração da amostra ensaiada (PINTO et al., 2003). A aplicação do método de difusão se limita a microrganismos de crescimento rápido, sendo eles aeróbios ou aeróbios facultativos. A avaliação é comparativa frente a um padrão biológico de referência (controle positivo) e a zona ou o halo de inibição de crescimento é medida partindo-se da circunferência do disco ou poço, até a margem onde há crescimento de microrganismos (BARRY & THORNSBERRY, 1991). Como controle positivo, emprega-se um quimioterápico padrão, e como controle negativo o solvente utilizado para a dissolução das amostras (KARAMAN et al., 2003; SPRINGFIELD et al., 2003). As técnicas de aplicação da substância antimicrobiana no método de difusão podem ser por meio de disco, cilindros de aço inoxidável ou vidro e perfuração em ágar (PINTO et al., 2003).

2.6.1.1 Teste de difusão em disco

O teste de difusão em disco consiste na aplicação da solução de agente antimicrobiano em discos de papel de filtro nas diferentes concentrações a serem testadas (OSTROSKY et al., 2008). O método consiste em colocar os discos sobre o meio de cultura sólido previamente inoculado em placas de Petri com diferentes cargas microbianas: 10^8 UFC (Unidade Formadora de Colônia)/mL para bactérias, 10^6 UFC/mL para leveduras e 10^4 UFC/mL para esporo de fungo (KARAMAN et al., 2003). A disposição dos discos deve ser tal que sua distância até a lateral da placa seja maior que 15 mm e de modo a não sobrepor as zonas de inibição. O pH do meio de cultura deve estar entre 7,2 e 7,4, e a profundidade recomendada é de aproximadamente 4 mm (BARRY & THORNSBERRY, 1991).

2.6.1.2 Cilindros de aço inoxidável

Esta técnica de aplicação envolve cilindros de aço inoxidável no meio de cultura solidificado já inoculado e a adição da solução em estudo nos cilindros (OSTROSKY et al., 2008).

2.6.1.3 Perfuração em ágar

Na técnica de perfuração em ágar, a remoção do meio de cultura sólido é realizada com auxílio de cilindros de 6-8 mm de diâmetro para a formação de poços, nos quais é possível aplicação das substâncias a serem analisadas (OSTROSKY et al., 2008).

2.6.2 Método de diluição em caldo

O método de diluição em caldo considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo-teste no meio líquido e a concentração da amostra ensaiada, por meio de macro ou microdiluição.

2.6.2.1 Macrodiluição

A macrodiluição envolve testes em tubos de ensaio, com volume de meio de cultura variando de 1 e 10 mL. É trabalhoso, consome muito tempo, requer muito espaço no laboratório e gera grande quantidade de resíduos (ZGODA & PORTER, 2001; SAHM & WASHINGTON II, 1991).

2.6.2.2 Microdiluição

A microdiluição utiliza microplacas com 96 poços, com volume de meio de cultura entre 0,1 e 0,2 mL. Eloff (1998) utilizando a técnica de diluição em microplacas para averiguar a atividade antimicrobiana em extratos vegetais observou inconvenientes na técnica, tais como células de alguns microrganismos que se aderiam à base do poço, enquanto as de outros permaneciam em suspensão. Além disso, compostos presentes em alguns extratos precipitavam, e a coloração verde da clorofila em concentração muito alta interferia na análise. Contudo, concluiu que o método é barato, demanda pouca quantidade de amostra, pode ser utilizado para grande número de amostras, tem reprodutibilidade e é mais sensível que outros métodos usados na literatura.

Vários fatores afetam a sensibilidade dos métodos de difusão e de diluição, portanto, é necessário conhecer as condições experimentais e fazer a padronização rigorosa na execução do teste. Meios de cultura, disponibilidade de oxigênio, pH, inóculo e condições de incubação são aspectos considerados importantes. O método de diluição em agar é o mais utilizado, devido à simplicidade de execução e ao baixo custo. Na determinação da CIM, o método da microdiluição é bastante utilizado principalmente devido à sua sensibilidade e quantidade mínima de reagentes.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Equipamentos utilizados durante o estudo

Balança analítica Shimadzu, AY220;

bateria segundo Sebelin para extrações por solventes (Soxhlet), Quimis, modelo 308.16;

câmara com luz ultravioleta (UV) $\lambda = 365$ nm para visualização de placas de cromatografia em camada delgada, Prodicil;

cromatógrafo a gás Shimadzu GC-17A equipado com detector de ionização em chama (DIC) e coluna SPB-5 da marca Supelco (30 m x 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 μm), sendo as condições de análise descritas no item métodos;

cromatógrafo a gás Shimadzu GC-17A equipado com coluna de sílica fundida RTX-5 da marca Restek (30 m x 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 μm) e acoplado a espectrômetro de massas Shimadzu GCMS-QP5050A, sendo as condições de análise descritas no item métodos;

espectrofotômetro de absorção no infravermelho, Perkin-Elmer FT-IR, modelo Spectrum One;

espectrofotômetro de absorção no ultravioleta e visível, Perkin Elmer, modelo U-2900;

espectrofotômetro, Micronal B542;

espectrômetro de ressonância magnética nuclear, Bruker Advance DRX400;

estufa ventilada (estufa com circulação de ar forçada para secagem de material vegetal, Fanem modelo 320-SE);

lavadora ultrassônica Unique (modelo USC 1400) e lavadora ultrassônica Thornton (modelo T50);

leitor de microplacas Tecan, modelo Infinite M200 Pro;

liofilizador Freezone, modelo 77500, Labconco;

microcentrífuga, Cientec, modelo CT-14000D;

moinho de facas Marconi, modelo MA-680;

percolador;

sistema de concentração a vácuo Centrivap, Labconco, modelo A50;

sistema de purificação de água Millipore, modelo Milli-Q Plus;

sistema de cromatografia líquida de alta eficiência Waters, modelo 2695, constituído de bomba quaternária modelo L-6200A, injetor automático, detector de arranjo de diodos

(DAD), modelo 2996. O software Empower (Waters) foi utilizado para o processamento dos dados;

sistema de evaporação Büchi composto de banho de água termostaticado (modelo B-480), evaporador rotatório (modelo R-114) e bomba de vácuo (modelo V-700) acoplada a controlador de vácuo (modelo V-850).

3.2 Material diverso

Coluna para CLAE LiChrospher 100 RP-18 (partículas de 5 µm, 125 x 4 mm d.i., Merck) e pré-coluna LiChrospher 100 RP-18 (partículas de 5 µm, Merck);

coluna para CG de sílica fundida RTX-5 da marca Restek (30 m x 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 µm);

coluna para CG SPB-5 da marca Supelco (30 m x 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 µm);

placa de microtitulação, fundo chato, 96 cavidades, em poliestireno, com tampa e estéril (Cral Plast);

fibra de SPME de PDMS, 100 µm (SUPELCO, 57300-U);

sílica gel 60, 63-200 µm, 70-230 mesh para coluna (Sigma-Aldrich);

sílica gel 60G para CCD (Vetec);

sephadex-LH20 (GE Healthcare);

vials de vidro para CLAE com tampas e septos de silicone e politetrafluoretileno;

vials de vidro para CG-EM e CG-DIC com tampa específica e septo;

vidrarias diversas.

3.3 Reagentes e solventes

Solventes de grau P.A.: hexano, diclorometano, acetato de etila (EtOAc), butanol, metanol, acetona, dimetilsulfóxido (DMSO), etanol absoluto, clorofórmio (Synth e Vetec);

Solventes de grau CLAE: Acetonitrila (ACN) e metanol da marca Tédia Brasil;

Ácidos grau P.A: ácido sulfúrico, ácido acético glacial, ácido fórmico;

Anisaldeído, etanol 95%, cloreto de alumínio, 2,2-difenil-1-picrilhidrazil, persulfato de potássio, Trolox e sal diamônio do ácido 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico).

3.4 Soluções reveladoras para cromatografia em camada delgada preparadas segundo Wagner et al. (1984)

Solução de anisaldeído sulfúrico

Foram misturados 0,5 mL de anisaldeído, 10 mL de AcOH glacial, 85 mL de MeOH e 5 mL de ácido sulfúrico a 98% v/v, nessa ordem, sob resfriamento. A solução foi armazenada a 4 °C, até o momento de uso. A placa foi borrifada com a solução e revelada após aquecimento;

Solução de cloreto de alumínio a 5% p/v em MeOH

Dissolveu-se 5 g de cloreto de alumínio em 100 mL de MeOH, sob resfriamento. Essa solução foi armazenada a 4 °C até o momento de uso. As placas foram reveladas borrifando-as com a solução. A fluorescência, observada após secagem ao ar e sob luz UV λ 365 nm, indica a presença de flavonoides;

Solução de Produtos Naturais + Polietilenoglicol (NP/PEG)

Dissolveu-se 0,1 g de ácido difenilbórico 2-aminoetil éster (NP) em 10 mL de metanol para preparo do Reagente de Produtos Naturais (NP). Esta solução foi armazenada, até o momento de uso, sob refrigeração (2-8°C) A solução de polietilenoglicol foi preparada por meio da dissolução de 0,5 g de polietilenoglicol 4000 (PEG) em 10 mL de etanol e armazenada em temperatura ambiente. Para revelação das placas primeiramente era borrifada a solução de NP seguida da de PEG;

Solução de cloreto férrico a 10% em água

Solubilizaram-se 10 g de cloreto férrico em 100 mL de água destilada. A placa foi borrifada com a solução e observada sob luz visível.

3.5 Material botânico: coleta e identificação

O material vegetal de *Microlicia crenulata* (DC.) Mart. foi coletado no município de Itabirito, Minas Gerais em dois períodos distintos: no período chuvoso (fevereiro), com ótimos níveis de crescimento vegetativo e de floração e, no final do período de

estiagem (outubro), com baixo crescimento vegetativo e ausência de floração. Partes aéreas do material vegetal (ramos, folhas e flores) foram colhidas com tesoura, acondicionadas em sacos plásticos e transportadas para o laboratório em recipiente hermético contendo gelo, objetivando-se a redução da atividade fisiológica da planta. A colheita de material foi realizada sem provocar a supressão da planta, tendo sido constatada vigorosa brotação após o corte. A identificação botânica foi realizada pela Dra. Rosana Romero, especialista do gênero. A exsicata encontra-se depositada no herbário da Universidade Federal de Uberlândia/HUFU sob o número de registro 63079.

3.6 Métodos

3.6.1 Extração do óleo essencial

Empregou-se o método de hidrodestilação, utilizando um aparelho de Clevenger modificado acoplado a um balão de 2 L. Foram utilizados 150 g da planta fresca (partes aéreas) e 1000 mL de água. O tempo das extrações foi de 4 horas a partir do momento de ebulição da amostra. Posteriormente, coletou-se o hidrolato, que foi centrifugado a 10000 rpm por 10 minutos. O óleo foi removido com o auxílio de uma pipeta de Pasteur e, subsequentemente, transferido para um Eppendorf, pesado, envolto por parafilme e folha de alumínio e então armazenado em freezer a -20 °C. O experimento foi realizado em triplicata.

A massa de cada óleo foi mensurada em balança analítica e os rendimentos expressos em relação à massa de matéria seca do vegetal. A matéria seca foi determinada pela secagem de três alíquotas de aproximadamente 25 g em estufa com circulação forçada do ar a temperatura de $103 \pm 2^\circ\text{C}$ durante 24 horas (ASABE STANDARDS, 2006).

O óleo essencial, denominado OE1, foi extraído da planta coletada no final do período de estiagem, com baixo crescimento vegetativo e ausência de floração. O óleo essencial extraído da planta coletada em período chuvoso, com ótimos níveis de crescimento vegetativo e de floração foi designado OE2.

3.6.2 Microextração em fase sólida no modo Headspace (HS-SPME) dos constituintes voláteis

Para análise dos voláteis, 1,0 g do material vegetal (planta fresca coletada no final do período de estiagem, com baixo crescimento vegetativo e ausência de floração) foi colocado em vial de 20 mL, de 22x75 mm, ocupando no máximo a metade do frasco. Os vials foram lacrados com tampa específica com septo e a fibra, para a microextração em fase sólida (SPME), foi exposta à fase gasosa acima da planta (*headspace*), a 50°C por 30 minutos. Neste estudo foi utilizada fibra de polidimetilsiloxano de 100 µm (PDMS, 100 µm).

3.6.3 Caracterização dos componentes voláteis

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Análise e Síntese de Agroquímicos, localizado no Departamento de Química da Universidade Federal de Viçosa. As análises qualitativas dos compostos voláteis foram realizadas por meio de cromatografia gasosa associada à espectrometria de massas (CG-EM), empregando-se equipamento da marca Shimadzu, modelo GCMS-QP5050A. Para a identificação dos constituintes químicos, foi utilizada uma coluna capilar de sílica fundida modelo RTX-5 (5% difenil/95% dimetilpolisiloxano) da marca Restek, com 30 m de comprimento, d.i. de 0,25 mm, espessura do filme de 0,25 µm, e hélio como gás carreador. As condições operacionais foram: pressão interna da coluna de 100,2 kPa, razão de split de 1:20 para os óleos essenciais e razão de Split de 1:5 para os voláteis extraído por HS-SPME, fluxo de gás na coluna de 1,8 mLmin⁻¹, temperatura no injetor de 220°C, temperatura no detector ou na interface (CG-EM) de 240°C. A temperatura inicial da coluna foi 40°C por 2 min, seguido de um incremento de 3°C/min até atingir 240°C, sendo mantida por 5 min nessa temperatura. O espectrômetro de massas foi programado para realizar leituras em uma faixa de 30 a 400 u, em intervalos de 0,5 s, com energia de ionização de 70 eV. Foi injetado 1 µL de cada amostra do óleo, na concentração de 10000 ppm, utilizando como solvente diclorometano. Para as análises dos voláteis extraídos por HS-SPME, a fibra foi inserida diretamente no injetor do cromatógrafo a 220°C e mantida por 10 minutos para dessorção dos analitos.

As identificações dos constituintes foram realizadas com base na comparação dos seus espectros de massas com os disponíveis no banco de dados da biblioteca Wiley 7 e também pelos índices de retenção aritméticos calculados para cada constituinte, de acordo com Adams (2007). Para cálculo dos índices de retenção aritméticos, foi injetada no cromatógrafo, nas mesmas condições das amostras, uma mistura de alcanos lineares (C7 a C40).

A quantificação dos componentes foi realizada utilizando-se um cromatógrafo a gás com detector de ionização de chamas (CG-DIC) da marca Shimadzu, modelo GC-17A. Foi utilizada uma coluna capilar modelo SPB-5 (5% de difenil/95% dimetilpolisiloxano) da marca Supelco, com 30 m de comprimento, 0,25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura do filme interno, utilizando nitrogênio como gás carreador. As condições operacionais foram: pressão interna da coluna de 113 kPa, razão de split de 1:5, fluxo de gás na coluna de 1,8 mL min⁻¹, temperatura no injetor de 220°C e temperatura no detector de 240°C. A temperatura inicial da coluna foi 40°C por 4 min, seguida por um incremento de 3°C por minuto até atingir 240°C. Foi injetado 1 μL de cada amostra do óleo, na concentração de 10000 ppm, utilizando como solvente diclorometano. Para as análises dos voláteis extraídos por HS-SPME, a fibra foi inserida diretamente no injetor do cromatógrafo a 220°C e mantida por 10 minutos para dessorção dos analitos.

Para quantificar cada constituinte do óleo essencial, foram realizadas integrações das áreas geradas e calculadas pelo programa presente no próprio computador conectado ao CG-DIC, sendo os resultados expressos em percentual proporcional de área. A identificação de cada componente foi feita comparando-se os tempos de retenção, os índices de retenção aritméticos e os cromatogramas gerados no CG-EM e no CG-DIC. Essas análises foram realizadas em duplicatas.

3.6.4 Extração com Soxhlet e por percolação

Somente a planta coletada no período chuvoso foi submetida às técnicas de extração com aparelho de Soxhlet e por percolação. A **Figura 14** apresenta o resumo dos fracionamentos realizados.

As extrações utilizando aparelho de Soxhlet foram realizadas por meio da técnica de extração por refluxo com solventes de crescentes polaridades. Foram confeccionados cartuchos contendo em média 22,85 g da planta fresca (partes aéreas) e os solventes empregados foram hexano, diclorometano, acetato de etila, metanol e água. O tempo de extração para cada solvente foi de seis horas após o primeiro refluxo. O material foi concentrado em evaporador rotatório a 40 °C. O material obtido após extração com água foi liofilizado. As frações foram transferidas para dessecador até completa evaporação dos solventes e, então, armazenadas na geladeira. O processo de extração por Soxhlet foi realizado em triplicata.

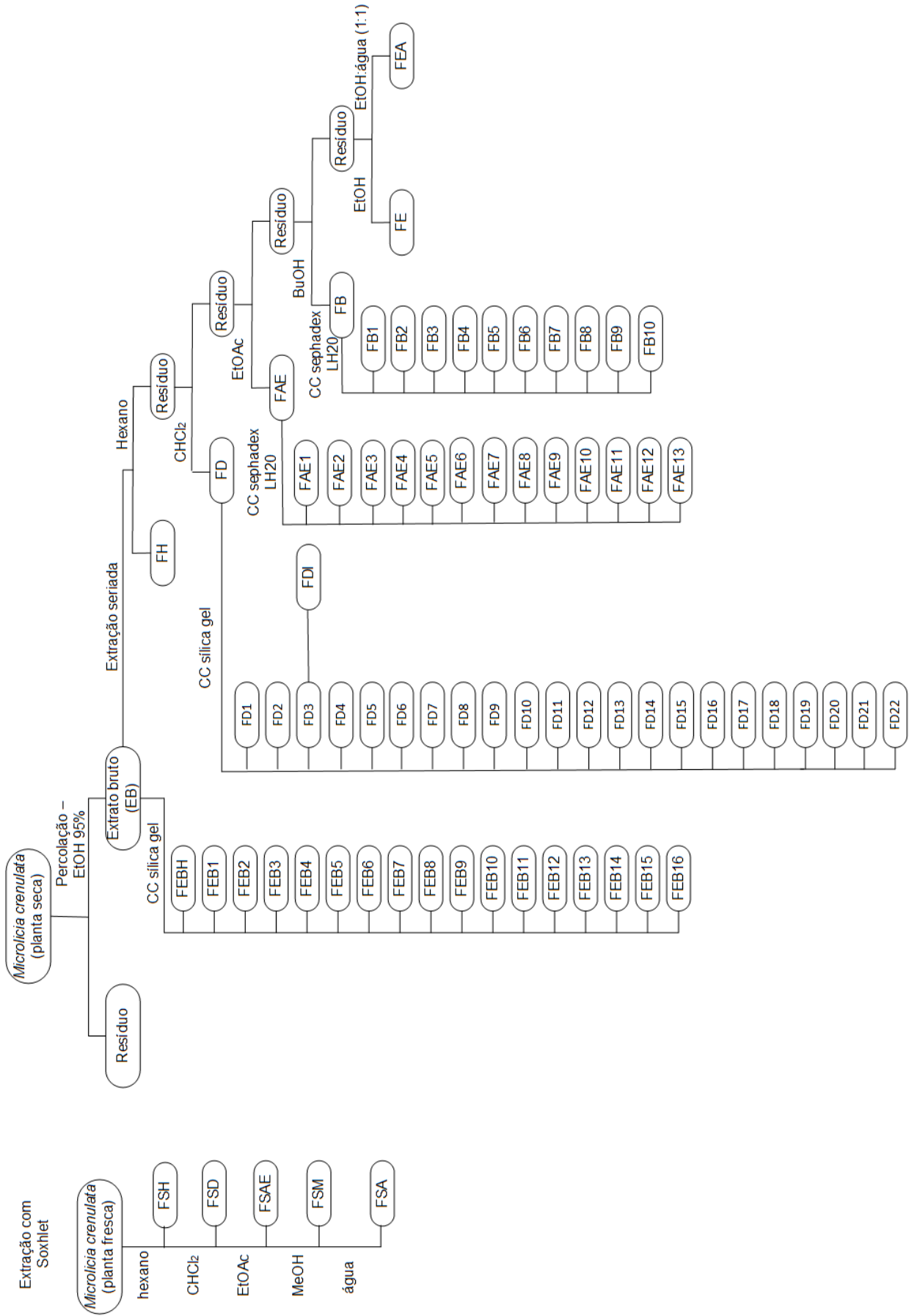


Figura 14 - Resumo dos fracionamentos realizados com o material vegetal colhido no período chuvoso.

Para a extração por percolação, o material vegetal (partes aéreas) foi lavado em água corrente e seco por 72 horas em estufa ventilada regulada a 40 °C. Após a secagem e moagem, em moinho de facas, o material vegetal pulverizado foi submetido à extração por percolação exaustiva com etanol 95%, seguindo-se a concentração em evaporador rotatório a temperatura máxima de 50 °C, sob pressão reduzida. O extrato etanólico bruto (EB) obtido foi transferido para uma cápsula de porcelana previamente pesada e tarada e a cápsula foi mantida em dessecador sob vácuo para eliminação total do solvente.

3.6.5 Monitoramento dos fracionamentos

Os fracionamentos foram monitorados por CCD de sílica gel, observando-se os cromatogramas sob luz visível e ultravioleta a 365 nm, antes e após a revelação com solução de cloreto de alumínio, anisaldeído sulfúrico, cloreto férrico e NP/PEG. Foram utilizados diversos sistemas eluentes. As placas empregadas para as análises foram preparadas manualmente por espalhador.

As frações foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos obtidos por CCD de sílica gel, sendo também obtidos, para o extrato bruto e para as suas frações da extração seriada, perfis por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR), utilizando um detector de arranjo de diodos (DAD).

3.6.6 Perfis cromatográficos por CLAE-FR

As análises cromatográficas foram realizadas no Laboratório de Fitoquímica, Faculdade de Farmácia, UFMG.

3.6.6.1 Preparo das amostras

As amostras foram pesadas em frascos Eppendorf e solubilizadas em MeOH grau CLAE. Foram empregadas concentrações de 2,5 mg/mL para o extrato bruto e 1 mg/mL para as frações. Todas as amostras foram solubilizadas com o auxílio de banho de ultrassom, durante 15 minutos, e então centrifugadas a 10000 rpm por 10 minutos. Os sobrenadantes resultantes foram utilizados para as análises por CLAE sendo injetadas alíquotas de 10 µL do sobrenadante, de modo automático.

3.6.6.2 Condições cromatográficas

Os perfis cromatográficos foram obtidos utilizando-se uma coluna LiChrospher 100 RP-18 (partículas de 5 µm, 125 x 4 mm d.i.), fluxo de 1 mL/min, temperatura da coluna de 40°C e detecção no ultravioleta (UV) no comprimento de onda de 210 nm. Espectros no UV, na faixa de 210 a 400 nm, foram registrados *on-line* para cada pico pelo detector de arranjo de diodos. O gradiente de eluição empregado encontra-se descrito na **Tabela 4** sendo utilizados solventes grau CLAE e água destilada, filtrada em sistema Milli-Q.

Tabela 4 - Gradiente de eluição utilizado para a obtenção dos perfis cromatográficos por CLAE-FR

Tempo (min)	Água (%)	Acetonitrila (%)
0	95	5
60	5	95
65	5	95
70	95	5

3.6.7 Espectrometria de absorção no infravermelho

Para as análises por espectrometria de absorção no infravermelho aproximadamente 1 mg de cada amostra foi diretamente depositada em local específico no espectrofotômetro. As análises foram realizadas no Laboratório de Química Farmacêutica, Faculdade de Farmácia, UFMG.

3.6.8 Fracionamentos do extrato etanólico bruto (EB)

3.6.8.1 *Fracionamento do EB por cromatografia em coluna de sílica gel*

O extrato etanólico bruto (10 g) foi submetido a fracionamento em coluna de sílica gel (200 g, dimensões da coluna empacotada: 43 x 3,8 cm d.i.). Procedeu-se a eluição sequencial com: hexano, hexano:diclorometano (1:1), diclorometano, diclorometano:acetato de etila (1:1), acetato de etila, acetato de etila:metanol (1:1), metanol e metanol:ácido acético glacial (95:5). Foram coletadas frações de 50 mL. As frações foram reunidas de acordo com seus perfis cromatográficos obtidos por CCD de sílica gel.

3.6.8.2 Fracionamento do EB por extração seriada

O extrato etanólico bruto (40 g) foi fracionado por extração seriada utilizando-se os seguintes solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol, etanol e etanol:água (1:1). Na realização do processo, foi adicionado hexano ao EB que após agitação foi deixado em repouso para decantação. Após o tempo de repouso, o sobrenadante foi filtrado em funil sinterizado de porosidade 2. Esse procedimento foi repetido várias vezes. O líquido sobrenadante foi reunido e reservado. Ao resíduo resultante da extração repetiu-se o mesmo procedimento empregando os outros solventes (**Figura 15**). Os líquidos sobrenadantes foram concentrados em evaporador rotatório, sob pressão reduzida, à temperatura máxima de 60°C para butanol e 50°C para os demais solventes. As frações obtidas foram transferidas para frascos previamente tarados e mantidos em dessecador, sob vácuo por, no mínimo, 72 horas para completa eliminação do solvente e então armazenados ao abrigo da luz.

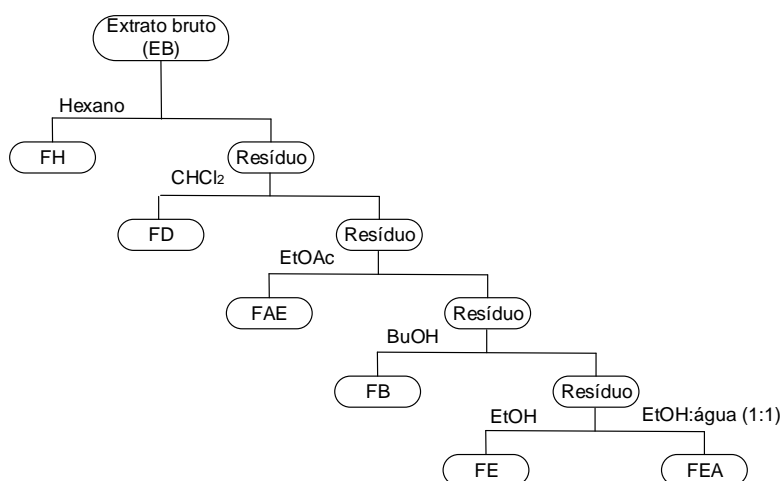


Figura 15 - Fracionamento do extrato bruto por extração seriada. FH (fração hexânica), FD (fração diclorometânica), FAE (fração acetato de etila), FB (fração butanólica), FE (fração etanólica), FEA (fração etanol/água).

3.6.9 Fracionamento de FAE, FB e FD

As frações FAE e FB foram selecionadas para serem fracionadas devido à atividade antifúngica, polaridade e quantidade de massa. A fração FD foi fracionada em coluna de sílica gel por apresentar atividade antiprotzoária.

3.6.9.1 Fracionamento de FAE em coluna de Sephadex LH-20

Uma porção da fração FAE (2,0 g) foi solubilizada em metanol com auxílio de banho de ultrassom, durante 15 min, e em seguida foi centrifugada a 10000 rpm, por 10 minutos. A solução sobrenadante foi adicionada à coluna de Sephadex LH-20 (100 g, dimensões da coluna empacotada: 38 x 3,8 cm d.i.). Procedeu-se a eluição com metanol, sendo recolhidas frações de 10 mL. A análise do perfil cromatográfico por CCD foi realizada empregando-se como eluente acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (62,0:3,0:5,5:4,0). Solução metanólica de cloreto de alumínio 5 % e anisaldeído sulfúrico foram utilizadas como reveladores.

3.6.9.2 Fracionamento de FB em coluna de Sephadex-LH20

Uma porção da fração FB (2,0 g) foi submetida a fracionamento em coluna de Sephadex LH-20 (100 g). Utilizou-se uma coluna de 38 cm de altura e 3,8 cm de diâmetro interno. A respectiva fração foi solubilizada em metanol com auxílio de banho de ultrassom, durante 15 min, e em seguida foi centrifugada a 10000 rpm, por 10 minutos. A solução sobrenadante foi adicionada à coluna de Sephadex LH-20 e procedeu-se a eluição com metanol. Do fracionamento da FB recolheu-se frações de 13 mL. A análise do perfil cromatográfico por CCD foi realizada empregando-se como eluente acetato de etila: ácido fórmico: ácido acético glacial: água (25,0:2,5:2,5:6,5). Solução metanólica de cloreto de alumínio 5% e anisaldeído sulfúrico foram utilizadas como reveladores.

3.6.9.3 Fracionamento de FD por cromatografia em coluna de sílica gel

Uma porção de fração FD (4,0294 g) foi submetida a fracionamento em coluna de sílica gel (100 g, dimensões da coluna empacotada: 53 x 3,8 cm d.i.). Utilizaram-se eluentes de polaridades crescentes como fase móvel. As frações foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico em CCD. As cromatoplasmas foram observadas sob luz visível e ultravioleta a 365 nm, antes e após a revelação com solução metanólica de cloreto de alumínio 5%, anisaldeído sulfúrico e NP/PEG.

3.6.9.3.1 Elucidação estrutural da substância isolada FDI

Com o intuito de elucidar a estrutura da substância isolada da fração FD, denominada FDI, procedeu-se sua análise por espectrofotometria no ultravioleta (UV) com uso de aditivos, no infravermelho (IV) e por ressonância magnética nuclear monodimensional (RMN de ^1H) e bidimensional (HSQC, HMBC e COSY).

Espectrofotometria de absorção no ultravioleta

Os aditivos empregados nas análises por espectrofotometria de absorção no ultravioleta foram preparados segundo procedimento descrito por Mabry et al. (1970).

- Solução de metóxido de sódio: 2,5 g de sódio metálico foram adicionados a 100 mL de metanol.
- Acetato de sódio anidro.
- Solução de cloreto de alumínio a 5% m/v: dissolveram-se 5 g de cloreto de alumínio em 100 mL de metanol, sob resfriamento.
- Solução de ácido clorídrico: adicionaram-se 50 mL de ácido clorídrico concentrado a 40 mL de água, completando-se o volume para 100 mL.
- Ácido bórico: 100 mL de metanol foram saturados com ácido bórico.

Foram obtidos espectros de absorção no ultravioleta para soluções metanólicas da substância isolada, empregando-se como aditivos solução de metóxido de sódio, cloreto de alumínio, ácido clorídrico, acetato de sódio e ácido bórico. Realizou-se varredura de 200 a 500 nm, empregando-se metanol grau CLAE como branco. Inicialmente, foi obtido o espectro do flavonoide em metanol (0,01 mg/mL). Em seguida, adicionaram-se três gotas de metóxido de sódio, sendo realizada uma leitura imediata e outra após 5 min. Descartou-se a solução. Foram adicionadas seis gotas da solução de cloreto de alumínio à solução do flavonoide em metanol. A leitura foi realizada imediatamente. À mesma cubeta, adicionaram-se três gotas da solução de ácido clorídrico. Descartou-se a solução. Adicionou-se, com agitação, um excesso de acetato

de sódio à solução do flavonoide até formar-se uma camada de aproximadamente 2 mm de acetato de sódio no fundo da cubeta. Procedeu-se à leitura imediata e após 5 min. À mesma cubeta, adicionaram-se 5 gotas de solução de ácido bórico (MABRY et al., 1970).

Espectroscopia de ressonância magnética nuclear

Os espectros de RMN foram obtidos para solução do composto FDI em metanol deuterado (MeOD) com gotas de DMSO. Empregou-se tetrametilsilano (TMS) como padrão interno. As análises foram efetuadas no LAREMAR (Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear de Alta Resolução), Departamento de Química, Instituto de Ciências Exatas, UFMG.

3.6.10 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

3.6.10.1 Ensaio do DPPH

A atividade antioxidante foi determinada pelo método DPPH, segundo Henriques et al. (2012). Soluções metanólicas do extrato bruto (EB) e das frações FAE, FB e FEA foram avaliadas nas concentrações de 1,7 a 28,6 µg/mL; as frações FH e FD de 8,5 a 142,8 µg/mL; FE de 0,43 a 7,14 µg/mL e rutina como referência de 0,86 a 14,28 µg/mL. Para a realização do teste, foram utilizadas placas de 96 poços com fundo chato, transparente e com tampa. Todas as soluções das amostras e de rutina, bem como as soluções de DPPH, foram preparadas no dia do teste. A solução de DPPH (300 µMol) foi mantida protegida da luz. Adicionaram-se 40 µL de solução de DPPH (300 µMol) nos poços, exceto no branco onde foram adicionados 40 µL de metanol. O volume final de cada poço foi de 140 µL. Agitou-se por 1 min e incubou-se por 30 min a 37°C, seguindo-se por leitura em espectrofotômetro em λ 517 nm. A rutina foi utilizada como substância de referência da atividade sequestradora de radical livre (controle positivo). Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A porcentagem da atividade antioxidante (%AAO) foi calculada por meio da equação: $\%AAO = [(Abs_0 - Abs_1) / Abs_0] \times 100$, onde Abs_0 é a absorbância do DPPH (média dos poços sem adição de amostra) e Abs_1 é a absorbância da amostra (média da triplicata de cada concentração da amostra). A concentração efetiva para 50% de atividade (CE_{50}) foi calculada por meio da equação da reta obtida da curva de

calibração (concentração da amostra versus %AAO correspondente). Os valores de CE_{50} representam a concentração da amostra que é necessária para captar 50% dos radicais livres DPPH.

A ação antioxidante das amostras foi calculada segundo Scherer & Godoy (2009), sendo expressa pelo Índice de Atividade Antioxidante (IAA), onde tanto a massa de DPPH quanto a massa da amostra utilizada no ensaio foram consideradas para gerar a constante. O IAA foi calculado pela equação: $IAA = \text{massa de DPPH} (\mu\text{g/mL}) / CE_{50} (\mu\text{g/mL})$.

3.6.10.2 Ensaio ABTS ou TEAC

A atividade antioxidante pelo método ABTS foi realizada conforme a metodologia descrita por Re et al. (1999), com modificações. O radical $ABTS^{*+}$ foi preparado a partir da reação de 5 mL de solução de ABTS 7 mM com 88 μL de solução de persulfato de potássio 140 mM, incubados à temperatura ambiente e no escuro, por 16 horas. Transcorrido esse tempo, a mistura foi diluída em etanol até a obtenção de uma solução com absorvância de $0,70 \pm 0,02$, a 734 nm. Soluções etanólicas de EB, FAE, FB, FE e FEA foram avaliadas nas concentrações de 0,39 a 25,0 $\mu\text{g/mL}$ e das frações FH e FD, de 1,95 a 125,0 $\mu\text{g/mL}$. Como solução padrão, utilizou-se o Trolox, análogo hidrossolúvel da vitamina E, nas concentrações de 0,625 a 9,375 $\mu\text{g/mL}$. Todas as soluções das amostras e de Trolox foram preparadas no dia do teste. Para a realização do teste, foram utilizadas placas de 96 poços com fundo chato, transparente e com tampa. Adicionaram-se 5 μL da amostra a 195 μL da solução de $ABTS^{*+}$ nos poços. O volume final de cada poço foi de 200 μL . Realizou-se a leitura após seis minutos da mistura em espectrofotômetro em λ 734 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata. Foram elaboradas curvas de calibração para cada amostra e para o Trolox (concentração versus %AAO correspondente). Os resultados da atividade antioxidante foram expressos como TEAC (Atividade Antioxidante Equivalente ao Trolox) em mM Trolox/g amostra.

3.6.11 Ensaio biológicos

Estudou-se a atividade antimicrobiana *in vitro* do óleo essencial OE2 e das frações de *M. crenulata* frente a microrganismos patogênicos e deteriorantes de alimentos e patogênicos de relevância clínica.

3.6.11.1 Ensaio de atividade antibacteriana *in vitro*

O óleo essencial OE2 e as frações obtidas por extração em aparelho de Soxhlet de *M. crenulata* foram avaliados frente a cepas de microrganismos *American Type Culture Collection* - ATCC: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Bacillus cereus* var. *mycoides* ATCC 11778, *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 e *Escherichia coli* ATCC 25922. Estes procedimentos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG.

O perfil de susceptibilidade às drogas vegetais foi investigado, inicialmente, por meio do teste de sensibilidade a antimicrobianos por difusão em disco de acordo com critérios estabelecidos pelo Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) segundo os documentos M2-A8 (CLSI, 2003b) e M100-S15 (CLSI, 2005). Para os compostos ativos pelo método de difusão em disco, foram determinadas as Concentrações Inibitórias Mínimas pelo método de microdiluição em caldo de acordo com os critérios estabelecidos pelo CLSI segundo os documentos M7-A6 (CLSI, 2003a) e M100-S15 (CLSI, 2005).

3.6.11.1.1 Teste de sensibilidade a antimicrobianos por difusão em disco

As cepas de *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli*, previamente descongeladas por 18–20 h, foram transferidas para caldo Müeller-Hinton e incubadas a 37°C por 18–20 h para atingir o crescimento exponencial. A cultura bacteriana foi ajustada até a escala 0,5 de Mc Farland. Em seguida, com auxílio de “swab” estéril, a cultura foi inoculada de forma homogênea em placa de Petri. Após a secagem da superfície do ágar, os discos foram aplicados sobre o biofilme com auxílio de pinça estéril. Fez-se a aplicação de 10 µL da solução dos compostos por disco. As placas foram incubadas por 18-20 h a 37°C. O halo de inibição de crescimento bacteriano foi quantificado em mm com o auxílio de paquímetro. Paralelamente foram realizados controles dos crescimentos bacterianos e dos solventes utilizados. Todos os ensaios foram realizados em duplicata. Foram utilizados discos contendo os seguintes antimicrobianos: amoxicilina - ácido clavulânico 30 µg (AMC 30) e cefepima 30 µg (CPM 30). A concentração das soluções das drogas testadas foi de 510 µg/mL.

3.6.11.1.2 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

As cepas de *B. cereus* e *P. aeruginosa* foram repicadas em caldo Müller-Hinton e incubadas a 37°C por 12–24 h. Ajustou-se a cultura de acordo com a escala 0,5 de McFarland (10^8 UFC/mL) e fez-se diluição de 1:10 em caldo Müller-Hinton. A solução estoque foi preparada na concentração de 0,02048 g/mL e, então, diluiu-se esta solução 1:10. Foram adicionados 100 µL de caldo Müller-Hinton nos poços da coluna 1 a 10 que foram utilizados conforme o mapa da placa ilustrado na **Figura 16**. Foram adicionados 100 µL da solução estoque diluída nos poços da primeira coluna. Transferiu 100 µL desse primeiro poço para o subsequente e desse para o próximo sucessivamente, até a coluna 10, sempre na mesma linha. Na coluna 10 descartou-se 100 µL de cada solução. Adicionou-se 100 µL de caldo mais bactéria ajustado a todos os poços utilizados das colunas 1 a 10. Para o controle positivo, foram adicionados 200 µL de caldo mais bactéria ajustado nos poços da coluna 11. Como controle negativo, foram adicionados 200 µL de caldo Müller-Hinton na coluna 12. A placa foi incubada a 37°C por 24 h. A leitura foi feita comparando os poços teste com o poço do controle positivo.

Para controle do inóculo, 10 µL do controle positivo foram diluídos em 9,99 mL de salina (diluição 1:1000). Adicionou-se 100 µL dessa solução por placa com ágar Müller-Hinton para aeróbios. Espalhou com alça e incubou a 37°C por 24 h. Para controle da pureza, uma alçada da cultura bacteriana foi adicionada em ágar não seletivo (Müller-Hinton para aeróbios) e incubou a 37°C por 24 h.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
Composto 1	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	C+	C-
Composto 1	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	C+	C-
Composto 2	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	C+	C-
Composto 2	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	C+	C-
Composto 3	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	C+	C-
Composto 3	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	C+	C-
Composto 4	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	C+	C-
Composto 4	512	256	128	64	32	16	8	4	2	1	C+	C-

Figura 16 - Mapa da placa conforme concentrações da solução-teste (µg/mL).

3.6.11.2 Ensaio de atividade antifúngica *in vitro*

O estudo da atividade antifúngica *in vitro* do óleo OE2, do extrato etanólico bruto e das frações de *M. crenulata* foi realizado utilizando o método de microdiluição em caldo para a determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) contra fungos patogênicos ou deterioradores de alimentos e contra patogênicos de relevância clínica. A suscetibilidade a antifúngicos foi avaliada pelo ensaio de microdiluição em caldo de acordo com as normas internacionais estabelecidas pelo CLSI, segundo os documentos M38-A2 (CLSI, 2008a) para fungos filamentosos e M27-A3 (CLSI, 2008b) e M27-S3 (CLSI, 2008c) para fungos leveduriformes.

Microrganismos ATCC e microrganismos isolados clinicamente foram utilizados nos ensaios para determinação das CIMs. Todos os microrganismos pertencem à coleção de microrganismos do Laboratório de Micologia/Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG. Os procedimentos para a avaliação da atividade antifúngica do óleo essencial e das frações foram feitos no Laboratório de Micologia do Instituto de Ciências Biológicas da UFMG sob a supervisão da professora Maria Aparecida de Resende Stoianoff.

3.6.11.2.1 Meios de cultura

Na manutenção das culturas fúngicas e no preparo dos inóculos para determinação das CIMs, foi utilizado o Ágar Sabouraud Dextrose (ASD). O meio Roswell Park Memorial Institute - 1640 (RPMI-1640), tamponado para pH 7,0 com ácido 3-(N-morfolino)-propanossulfônico (MOPS) 0,165 mol/L, foi utilizado na execução da CIM. O Meio Ágar Batata Dextrose (BDA) foi utilizado para obtenção dos esporos usados no inóculo do gênero *Aspergillus*.

3.6.11.2.2 Soluções

Solução salina estéril (0,85% de NaCl) foi usada para obtenção dos inóculos e diluições das suspensões fúngicas para a determinação da CIM.

3.6.11.2.3 Preparo do inóculo fúngico

Os inóculos de leveduras foram preparados como descrito no documento M27-A3 e os inóculos de *Aspergillus* seguindo os procedimentos descritos no documento M38-A2, todos de acordo com as normas internacionais estabelecidas pelo CLSI. As espécies foram subcultivadas em meio específico ASD/BDA, sendo mantidas em tempos e temperaturas específicos. Uma alçada da cultura foi adicionada a 5 mL de solução salina estéril 0,85% para obtenção de uma suspensão. Após homogeneização, ajustou-se a concentração desta suspensão salina no espectrofotômetro a 520 nm, até obter a transmitância específica. O inóculo de cada levedura foi preparado transferindo-se 300 µL da suspensão salina da levedura correspondente para um tubo Falcon estéril com 14,7 mL de RPMI 1640, obtendo-se uma suspensão de 1×10^3 a 1×10^4 ufc/mL (CHAN, 2002). Para diferentes volumes finais de suspensão, efetuou-se procedimento similar sendo calculados os volumes proporcionais ao descrito acima, dependendo das espécies de cada ensaio e da quantidade de amostras testadas.

3.6.11.2.4 Procedimento para a determinação *in vitro* da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A amostra a ser testada foi dissolvida em dimetilsulfóxido (DMSO), e à solução foi adicionado RPMI-1640. Foram feitas diluições seriadas da solução, usando como diluente o próprio RPMI-1640. De cada diluição, alíquotas de 100 µL foram distribuídas em orifícios da placa de microdiluição de 96 poços (poços C1 até C10). Assim, a amostra foi testada em dez concentrações diferentes. Nas colunas correspondentes às concentrações testadas da amostra teste (C1 a C10), foram acrescentados 100 µL de inóculo fúngico. Para o controle positivo, foram adicionados 100 µL de RPMI-1640 e 100 µL de inóculo do fungo correspondente em cada orifício da última coluna (C+). Como controle negativo foram adicionados 100 µL de RPMI-1640 e 100 µL da amostra na menor concentração testada em cada orifício da primeira coluna (C-) (**Figura 17**). O crescimento de microrganismos no controle positivo (coluna C+) exibe a viabilidade da cultura utilizada e seu crescimento foi comparado visualmente, ao crescimento verificado nos poços referentes às diferentes concentrações testadas. No controle negativo (coluna C-), não pode haver crescimento de microrganismos visto que não possui inóculo.

	C-	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	C9	C10	C+
Espécie 1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Espécie 1	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Espécie 2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Espécie 2	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Espécie 3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Espécie 3	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Espécie 4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
Espécie 4	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

Figura 17 - Modelo ilustrativo de uma placa de 96 poços, sendo a coluna C- o controle negativo, as colunas C1 a C10 as concentrações testadas e a coluna C+ o controle positivo.

As placas foram incubadas pelo tempo e na temperatura específicos para cada fungo. A leitura foi realizada visualmente (CLSI, 2008a, b). A CIM foi considerada a menor concentração da amostra teste que inibiu 100% o crescimento microbiano após incubação. Os resultados foram expressos em $\mu\text{g/mL}$. Os experimentos foram realizados em duplicata (WOODS & WASHINGTON, 1995).

3.6.11.2.5 Atividade antifúngica do óleo essencial e das frações resultantes das extrações em Soxhlet

A atividade antifúngica frente a *S. cerevisiae* K1 e aos fungos filamentosos *Aspergillus flavus* IMI 190443 e isolado clínico de *A. niger* foi investigada. As frações resultantes das extrações em Soxhlet foram testadas em três concentrações: 1000 $\mu\text{g/mL}$, 250 $\mu\text{g/mL}$ e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e o óleo essencial OE2 foi testado em dez concentrações que variaram de 1000 a 1,9 $\mu\text{g/mL}$. As leituras foram realizadas após 48 h de incubação.

Estudou-se a atividade antifúngica do óleo essencial OE2 e das frações resultantes das extrações em Soxhlet contra os fungos: *Candida parapsilosis* ATCC 20019, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida Krusei* ATCC 20298, *Candida dubliniensis* Cd28, *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Cryptococcus neoformans* ATCC 24067 e *Cryptococcus gattii* LI 3503. As frações obtidas das extrações e o óleo essencial foram testados nas concentrações: 250 µg/mL, 62,5 µg/mL, 31,25 µg/mL, 15 µg/mL e 7,8 µg/mL. As leituras para espécies de *Candida* foram efetuadas após 48 h e para *Cryptococcus* após 72 h de incubação.

3.6.11.2.6 Atividade antifúngica das frações do extrato etanólico bruto (EB)

Estudou-se a atividade antifúngica das frações do extrato etanólico bruto (EB) oriundas do seu fracionamento em coluna de sílica gel (FEB1 à FEB16) e daquelas provenientes da extração seriada (FH, FD, FAE, FB, FE e FEA) contra os fungos: *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida Krusei* ATCC 20298, *Candida dubliniensis* Cd28, *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Cryptococcus neoformans* ATCC 28957 e *Cryptococcus gattii* ATCC 32608. As frações foram testadas nas concentrações: 256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL e 0,5 µg/mL. As leituras para *Candida* foram efetuadas após 48 h e para *Cryptococcus* após 72 h de incubação.

3.6.11.2.7 Atividade antifúngica de EB e das frações oriundas do fracionamento da fração acetato de etila (FAE) e da fração butanólica (FB)

Estudou-se a atividade antifúngica de EB e das frações resultantes do fracionamento de FAE e FB em coluna de Sephadex LH-20 contra fungos patogênicos de relevância clínica: *Candida parapsilosis* ATCC 22019, *Candida tropicalis* ATCC 750, *Candida Krusei* ATCC 20298, *Candida dubliniensis* IC Cd28, *Candida albicans* ATCC 18804, *Candida glabrata* ATCC 90030, *Cryptococcus neoformans* ATCC 28957 e *Cryptococcus gattii* ATCC 32608. As frações foram testadas nas concentrações: 256 µg/mL, 128 µg/mL, 64 µg/mL, 32 µg/mL, 16 µg/mL, 8 µg/mL, 4 µg/mL, 2 µg/mL, 1 µg/mL e 0,5 µg/mL. As leituras para *Candida* foram efetuadas após 48 h e para *Cryptococcus* após 72 h de incubação.

3.6.11.3 Ensaios de atividade antiprotozoária e de citotoxicidade *in vitro*

Os ensaios biológicos foram realizados no Laboratório de Bioensaios da Faculdade de Farmácia da UFMG por Renata C. de Paula (Mestre em Parasitologia/ICB-UFMG, Doutoranda/PPGCF-UFMG), Maria Fernanda A. Nascimento, (Mestre em Parasitologia/ICB-UFMG) e Luciana Ferreira Soares (Especialista em Microbiologia/ICB-UFMG), bolsistas DTI/CNPq/Rede Malária. Os ensaios biológicos foram realizados no âmbito do projeto PRONEX Rede Malária, com apoio do CNPq e da FAPEMIG sob coordenação da Dra. Alaíde Braga de Oliveira.

3.6.11.3.1 Atividade antiprotozoária

Os testes *in vitro* das amostras foram realizados com hemácias infectadas por *P. falciparum*, clone W2, resistente à cloroquina, por meio do método lactato desidrogenase de *Plasmodium* (pLDH) (Nkhoma *et al.*,2007).

Para incubação parasito-droga, 20 µL de cada diluição dos compostos testados foram colocados em microplacas de 96 poços, em triplicata, onde já se encontravam 180 µL da suspensão de hemácias infectadas (1% hematócrito, 2% de parasitemia), provenientes de um cultivo mantido no Laboratório de Bioensaios. Foram usados controles sem drogas, com hemácias infectadas (controle positivo) ou hemácias não infectadas (controle negativo). As placas com amostras e controles foram incubadas em atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C por 48 h. Após esse período, as microplacas foram congeladas (-20°C por no mínimo 24 h) para promover a lise das hemácias. O lisado celular foi transferido para placas de 96 poços, aos quais foram adicionados 100 µL de reagente Malstat e 25 µL de reagente NBT/PES. Após 1 h de incubação, a absorbância de cada poço das placas foi registrada em espectrofotômetro (540 nm).

No primeiro experimento, foram empregadas duas concentrações das amostras, 25 e 50 µg/mL, cada uma em triplicata, para a avaliação do percentual de redução da parasitemia que foi determinada pelo método pLDH. Os percentuais de redução do crescimento dos parasitos foram calculados a partir da absorbância. Amostras que apresentaram redução da parasitemia maior que 50% nas duas concentrações testadas tiveram suas CI₅₀ determinadas em três experimentos distintos, em seis diferentes concentrações, com triplicatas de cada concentração. Os resultados foram avaliados no programa Origin 8.0 com determinação das curvas dose-resposta traçadas com ajuste sigmoidal. Foram determinadas as concentrações inibitórias do

crescimento de 50% dos parasitos (CI_{50}) em relação aos controles sem drogas. As amostras foram diluídas em DMSO a uma concentração de 50 mg/mL e solubilizaram-se prontamente.

3.6.11.3.2 Citotoxicidade e índice de seletividade

As amostras foram submetidas aos testes de citotoxicidade *in vitro* na linhagem celular HepG2 A16, derivada de um hepatoblastoma primário humano (VAROTTI *et al.*, 2008). As células derivadas da linhagem celular HepG2 foram distribuídas em microplacas de 96 poços (4×10^5 células/100 μ L por poço) e incubadas em estufa de CO_2 à 37°C por 24 h para a adesão das células à placa. Em seguida foram adicionados 100 μ L de meio completo contendo diferentes concentrações dos compostos testados em triplicata. As placas foram incubadas por mais 24h. Ao final deste período, foram adicionados 18 μ L/poço de uma solução brometo 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma), na concentração de 20 mg/mL (DENIZOT & LANG, 1986). Após 1 h e 30 m de incubação com o MTT foram adicionados 100 μ L/poço de DMSO. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 492 nm. A dose letal mínima que inibe em 50% o crescimento das células na presença dos compostos testes e de antimaláricos controles foi determinada em comparação com células cultivadas sem a presença de compostos, considerada 100% de crescimento. Os resultados foram avaliados no programa Origin 8.0 com determinação das curvas dose-resposta traçadas com ajuste sigmoidal. Foram determinadas as concentrações citotóxicas que inibem em 50% o crescimento das células (CC_{50}) em relação aos controles sem drogas. As amostras foram testadas em quatro concentrações, 1, 10, 100 e 1000 μ g/mL.

Para as amostras consideradas ativas foi calculado o índice de seletividade que é dado pela razão entre o valor obtido de CC_{50} para células HepG2 e o valor de CI_{50} para *P. falciparum*. Por meio do índice de seletividade é possível inferir se a amostra possui um efeito direcionado apenas ao parasito ou se sua ação ocorre devido a sua toxicidade para quaisquer tipos celulares.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Rendimento do óleo essencial

O óleo essencial possui coloração amarela clara e acentuado odor aromático produzido pelos componentes voláteis. O óleo essencial OE1, obtido por hidrodestilação a partir da planta colhida no final do período de estiagem com baixo crescimento vegetativo e ausência de floração, apresentou um rendimento de $0,94 \pm 0,1\%$ com base na massa de matéria seca (b.s.). Para a planta coletada em período chuvoso, com ótimos níveis de crescimento vegetativo e de floração, o teor do óleo essencial OE2 obtido por hidrodestilação foi $0,68 \pm 0,1\%$ (b.s.). Esses resultados mostram que o teor de óleo essencial foi influenciado pela época de colheita, ocorrendo em maior quantidade na planta colhida no final do período de estiagem. Esta variação no teor de óleos não é incomum como já foi relatado anteriormente para outras espécies (BARBOSA et al., 2007).

4.2 Composição química dos óleos essenciais e dos voláteis obtidos por HS-SPME

Com o intuito de avaliar a composição das substâncias mais voláteis produzidas por *M. crenulata*, uma análise dos voláteis utilizando HS-SPME também foi realizada e comparada com a composição dos óleos extraídos por hidrodestilação. Os constituintes identificados em ambos os procedimentos estão apresentados na **Tabela 5**. Por meio do índice de retenção aritmético e pela similaridade dos espectros de massas, foi possível identificar 29 constituintes do óleo essencial OE1, totalizando 58,45% da área total do cromatograma e 27 constituintes do óleo essencial OE2, totalizando 46,97%. Na análise por HS-SPME foram identificados 23 constituintes, totalizando 88,71%.

Os óleos essenciais são produtos do metabolismo secundário das plantas, podendo apresentar grandes variações em termos de quantidade e composição de acordo com fatores como: parte da planta (FONSCECA et al., 2006), época de colheita (SILVA et al., 2005), local de cultivo (GEOCZE, 2011) e disponibilidade de nutrientes (MARTINS et al, 2006 e 2007), ataque de patógenos e/ou pragas, etc. Neste sentido,

constatou-se que *M. crenulata* apresenta ligeira variação do rendimento e da composição química do óleo essencial em função dos estágios fenológicos.

Tabela 5 - Constituintes voláteis dos óleos essenciais e voláteis obtidos por HS-SPME de *M. crenulata* identificados por CG-EM¹

Constituintes	IR ²	OE1	OE2	Voláteis obtidos por HS-SPME
Monoterpenos hidrocarbonetos		5,16	9,00	74,84
α-Tujeno	925	-	-	0,33
α-Pineno	930	0,22	0,55	5,72
Canfeno	945	-	-	0,47
Tuja-2,4(10)-dieno	951	0,24	0,63	0,22
Sabineno	971	t	t	-
β-Pineno	973	3,63	6,23	61,65
Mirceno	992	-	-	0,24
α-Terpineno	1015	-	-	0,50
o-Cimeno	1023	0,43	0,84	2,81
Limoneno	1027	0,34	0,48	1,82
γ-Terpineno	1058	0,30	0,27	0,77
Terpinoleno	1088	-	-	0,31
Monoterpenos oxigenados		34,55	23,04	7,25
Óxido de cis-linalol (furanóide)	1071	1,71	1,79	-
Óxido de trans-Linalol (furanóide)	1087	1,49	1,49	-
Linalol	1100	0,49	0,45	-
Trans-Pinocarveol	1137	8,87	6,34	1,62
Sabinacetona	1157	0,27	-	0,19
Pinocarvona	1161	2,03	1,67	2,39
p-Menta-1,5-dien-8-ol	1167	2,04	0,65	-
cis-Pinocanfona	1173	-	-	0,88
Terpinen-4-ol	1176	1,80	0,97	0,64
p-Cimen-8-ol	1186	0,57	0,51	-
α-Terpineol	1191	7,48	3,77	-
Mirtenal	1195	7,80 (mirtenol	5,40 (mirtenol	1,30
Mirtenol	1197	+ mirtenal)	+ mirtenal)	-
Verbenona	1209	-	-	0,23
Sesquiterpenos hidrocarbonetos		2,41	1,03	2,31
α-Copaeno	1376	0,25	0,25	0,29
Trans-Cariofileno	1419	1,18	0,51	1,60
γ-Muuroleno	1478	0,62	0,27	0,42
δ-Cadineno	1525	0,36	-	-
Sesquiterpeno oxigenado		3,58	1,23	3,74
Óxido de Cariofileno	1585	3,58	1,23	3,74
Fenilpropanóides		1,01	1,38	-
Cinamato de isobutila	1630	0,31	0,26	-
(E)-Cinamato de isoamila	1745	0,70	1,12	-
Outros compostos		11,74	11,29	0,57
Benzaldeído	958	10,07	9,63	-
Benzeno acetaldeído	1043	0,53	0,50	-
Acetofenona	1065	1,14	1,16	-
Octanoato de etila	1200	-	-	0,57
Total dos constituintes identificados		58,45	46,97	88,71

¹Médias de duas repetições; ²Índices de retenção calculados; t: quantidades traços (< 0,1%); - ausente; OE1: óleo essencial da planta coletada no final do período de estiagem; OE2: óleo essencial extraído da planta coletada em período chuvoso.

O óleo essencial de *M. crenulata* contém compostos alifáticos, aromáticos, monoterpenos, sesquiterpenos e fenilpropanóides. Nota-se que, dentre os constituintes identificados, o óleo apresentou como classe majoritária monoterpenos oxigenados. Toudahl et al. (2012) estudaram a composição química do óleo essencial de *Microlicia graveolens* e identificaram 13 compostos, o que representa 99,8% de sua composição. O componente majoritário de *M. graveolens* foi o acetato de (+)-trans-pinocarvila (78,9%), seguido por acetato de (-)-trans-pinocarvila (5,5%) e β -pineno (3,8%). Pode-se observar a ocorrência dos constituintes β -pineno, limoneno, pinocarvona, terpinen-4-ol, trans-pinocarveol e α -terpineol nas espécies *M. crenulata* e *M. graveolens*.

A técnica HS-SPME concentra os analitos que possuem maior volatilidade e afinidade pela fibra, fazendo com que compostos voláteis presentes em quantidades não detectáveis por métodos convencionais, sejam detectados. A fibra de PDMS utilizada nesse experimento tem baixa polaridade e, conseqüentemente, tem mais afinidade por analitos menos polares. O composto β -pineno, um hidrocarboneto de baixa polaridade e de baixo peso, apresentou maior área percentual relativa, enquanto compostos mais polares, como o trans-pinocarveol, tiveram menor área percentual relativa nessa análise. Nota-se que HS-SPME fornece dados complementares para a identificação dos constituintes de uma planta.

Os perfis dos compostos voláteis foram diferentes quando a técnica empregada foi hidrodestilação ou HS-SPME. Essa divergência pode ser consequência de diversos fatores que diferenciam as duas técnicas. A hidrodestilação é um processo exaustivo de extração, enquanto que a HS-SPME é um processo de equilíbrio. As diferenças encontradas entre os perfis dos compostos voláteis podem também estar associadas a transformações químicas e formação de artefatos durante a hidrodestilação. De acordo com Simões & Spitzer (2004), a água, o pH e a temperatura podem provocar a hidrólise de ésteres, rearranjos, isomerizações e oxidações durante o processo de destilação. Diferenças de composição podem ser observadas nos cromatogramas apresentados na **Figura 18**.

De acordo com os resultados obtidos e, tendo em vista a complexidade química do óleo essencial, verifica-se a necessidade da continuidade dos estudos, uma vez que alguns dos constituintes não identificados estão presentes em quantidade considerável.

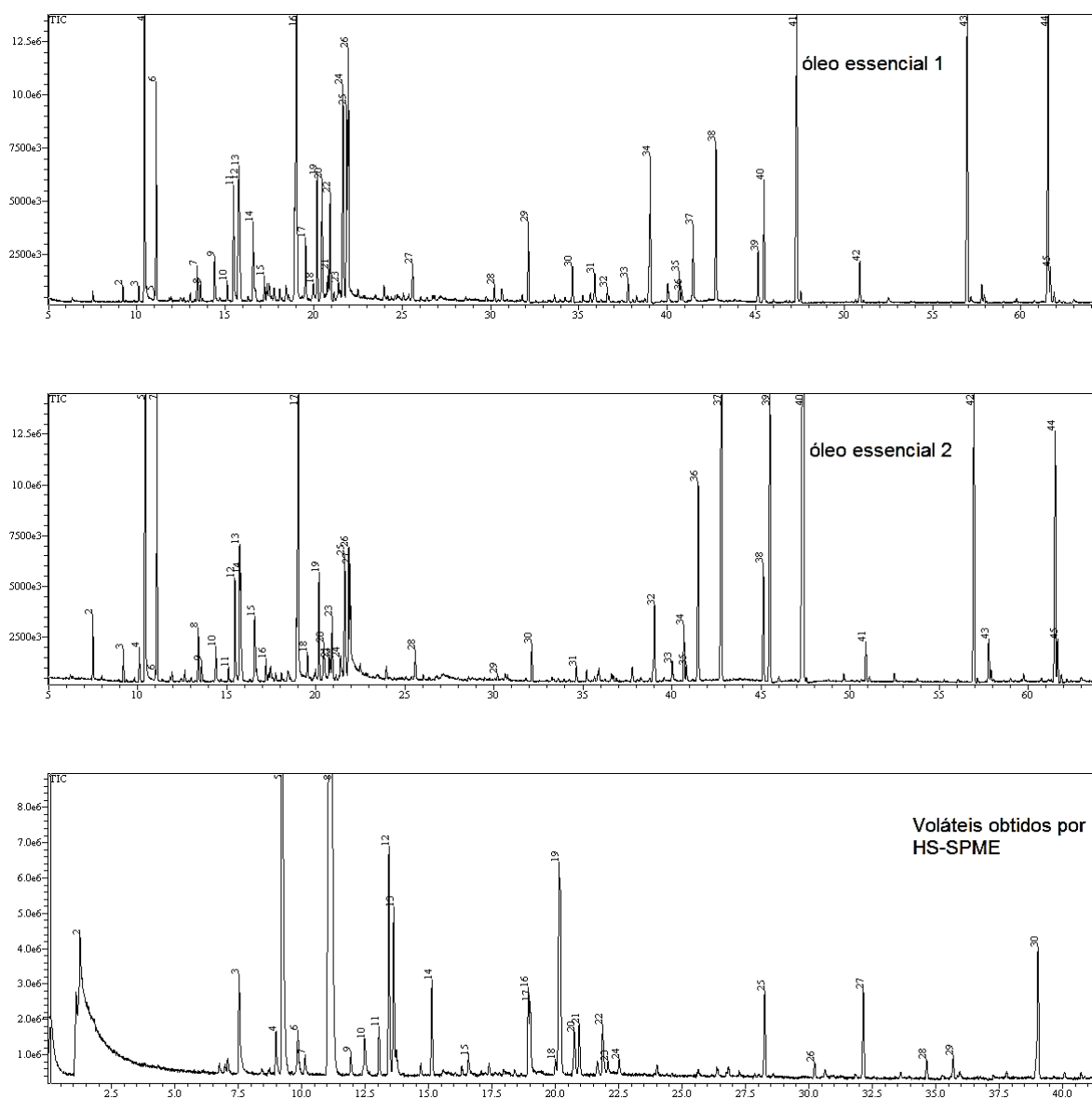


Figura 18 - Cromatogramas do óleo essencial 1, do óleo essencial 2 e dos voláteis obtidos por HS-SPME.

4.3 Rendimento das extrações com Soxhlet e por percolação

Os rendimentos das frações resultantes das extrações empregando aparelho de Soxhlet encontram-se na **Tabela 6**. Observa-se que os rendimentos são baixos, entretanto deve-se considerar que nas extrações com Soxhlet foram utilizadas plantas frescas, com grande percentual de água.

Tabela 6 - Rendimentos das frações obtidas nas extrações utilizando aparelho de Soxhlet

Fração	Rendimento (%)
FSH	4,64
FSD	3,29
FSAE	3,16
FSM	3,18
FSA	2,30

FSH (fração soxhlet hexânica), FSD (fração soxhlet diclorometânica), FSAE (fração soxhlet acetato de etila), FSM (fração soxhlet metanólica), FSA (fração soxhlet aquosa).

A extração por percolação foi realizada com material vegetal seco e pulverizado (562,96 g). Foram obtidos, ao final do processo, 191,9 g do extrato etanólico bruto, o que correspondeu a um rendimento extrativo de 34,09%. O extrato etanólico bruto foi denominado de EB.

A extração com o aparelho de Soxhlet foi realizada em um período de seis horas para cada solvente e na temperatura do ponto de ebulição do solvente. Na extração por percolação, empregou-se temperaturas menores, reduzindo assim a possibilidade de decomposição térmica dos componentes presentes no extrato.

4.4 Fracionamentos do extrato etanólico bruto (EB)

4.4.1 Fracionamento do extrato bruto por cromatografia em coluna de sílica gel

Uma porção de EB foi fracionada em coluna de sílica gel, utilizando-se eluentes de polaridades crescentes e, deste fracionamento, foram obtidas dezessete frações que foram agrupadas de acordo com seus perfis cromatográficos em CCD de sílica gel (Tabela 7).

Tabela 7 - Fracionamento do extrato etanólico bruto por cromatografia em coluna de sílica gel

Fração	Eluente	Volume (mL)	Massa (g)	Rendimento (%)
FEBH	HX	400	0,0184	0,18
FEB1	HX:DCM (1:1)	500	0,4153	4,15
FEB2	HX:DCM (1:1)	500	0,1769	1,77
FEB3	DCM	500	0,0392	0,39
FEB4	DCM	550	0,0627	0,63
FEB5	DCM:EtOAc (1:1)	100	0,9936	9,94
FEB6	DCM:EtOAc (1:1)	300	0,8643	8,64
FEB7	DCM:EtOAc (1:1)	400	0,3157	3,16
FEB8	DCM:EtOAc (1:1)	1050	0,2943	2,94
FEB9	EtOAc	650	0,4003	4,00
FEB10	EtOAc	300	0,1503	1,50
FEB11	EtOAc	300	0,1095	1,10
FEB12	EtOAc:MeOH (1:1)	50	1,2754	12,75
FEB13	EtOAc:MeOH (1:1)	250	2,6477	26,48
FEB14	EtOAc:MeOH (1:1)	100	0,4904	4,90
FEB15	EtOAc:MeOH (1:1)	250	0,3723	3,72
FEB16	MeOH	300	0,1980	1,98

4.4.2 Fracionamento do extrato bruto por extração seriada

Foram feitas diversas tentativas de partição do extrato bruto (EB) com solventes imiscíveis em funil de separação. Contudo, o EB não se solubilizou o suficiente para tornar possível a separação por partição. O EB foi fracionado por meio da extração seriada, utilizando-se os solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila, butanol, etanol e etanol:água (1:1).

O fracionamento preliminar de EB teve como objetivo obter frações de complexidade menor, para avaliação nos ensaios biológicos. Na **Tabela 8**, encontram-se listados os solventes utilizados, as frações obtidas e suas respectivas massas. A água destilada utilizada foi filtrada em sistema Milli-Q.

Tabela 8 - Massas (g) das frações resultantes da extração seriada, bem como os solventes utilizados

Fração	Solvente	Volume (L)	Massa (g)	Rendimento (%)
FH	HX	4,0	9,0061	22,52
FD	DCM	4,0	7,7849	19,46
FAE	EtOAc	4,0	7,9782	17,95
FB	BuOH	4,0	7,6265	19,07
FE	EtOH 95%	1,0	0,9993	2,50
FEA	H ₂ O/EtOH 1:1	0,1	0,6934	1,73

FH (fração hexânica), FD (fração diclorometânica), FAE (fração acetato de etila), FB (fração butanólica), FE (fração etanólica), FEA (fração etanol/água).

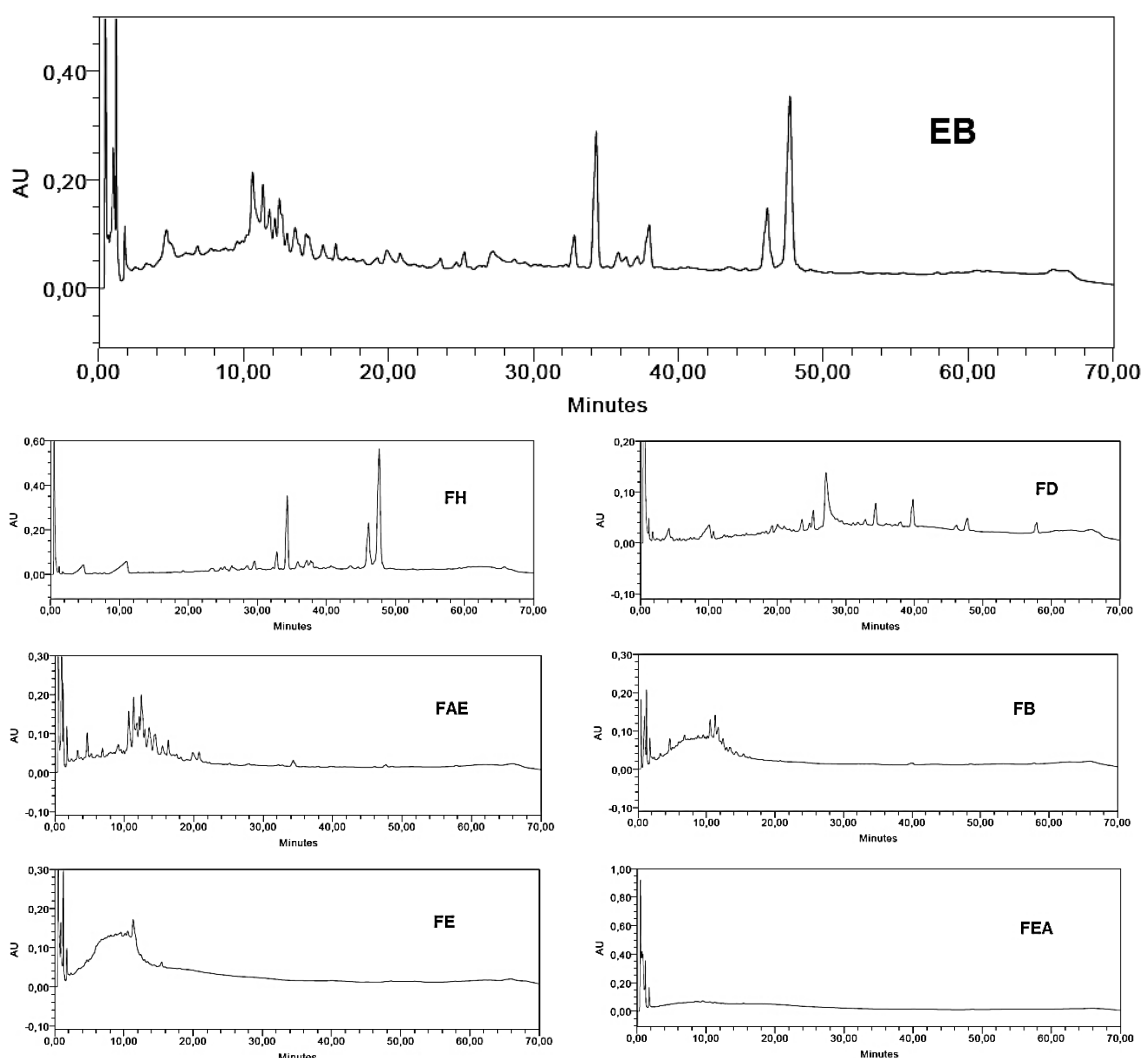


Figura 19 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR, com detecção no UV em $\lambda = 210$ nm, para o extrato bruto e frações de *M. crenulata*. Condições cromatográficas: vide item 3.6.6.2, pág. 54. EB (extrato bruto), FH (fração hexânica), FD (fração diclorometânica), FAE (fração acetato de etila), FB (fração butanólica), FE (fração etanólica), FEA (fração etanol/água).

As análises por cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa (CLAE-FR) e detecção de arranjo de diodos (DAD), utilizando gradiente linear de água e acetonitrila, permitiram avaliar qualitativamente a composição química de EB assim como das frações oriundas de seu fracionamento por extração seriada (**Figura 19**). Substâncias de elevada polaridade (tempo de retenção (TR) inferior a 2 minutos) foram detectadas em todas as frações. Provavelmente, a filtração realizada na extração seriada não foi eficiente, visto que foram detectados compostos de elevada polaridade na fração hexânica FH e na fração diclorometânica FD. A fração FH apresentou picos que exibiram espectros com máximos na região do UV entre 210-220 nm e entre 260-280 nm, com cromóforos típicos de ácidos fenólicos (**Figura 20**).

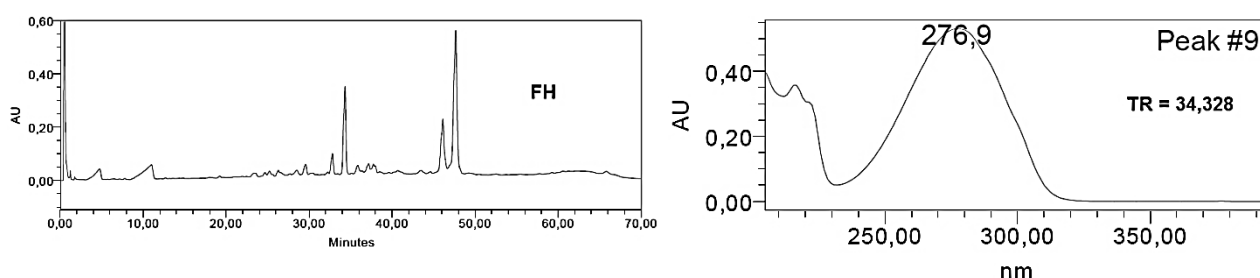


Figura 20 - Perfil cromatográfico de FH a 210 nm e espectro no UV obtido *on line* pelo detector DAD para o pico 9, com TR = 34,328. Condições cromatográficas: vide item 3.6.6.2, pág. 54. FH (fração hexânica).

Nota-se no cromatograma de FD, **Figura 21**, vários picos com cromóforos típicos de substâncias fenólicas sugerindo a presença de ácidos fenólicos como os picos com TR = 25,267 e TR = 34,377. O pico com TR em 27,101 apresenta espectro de absorção no UV em metanol típico de flavonoide.

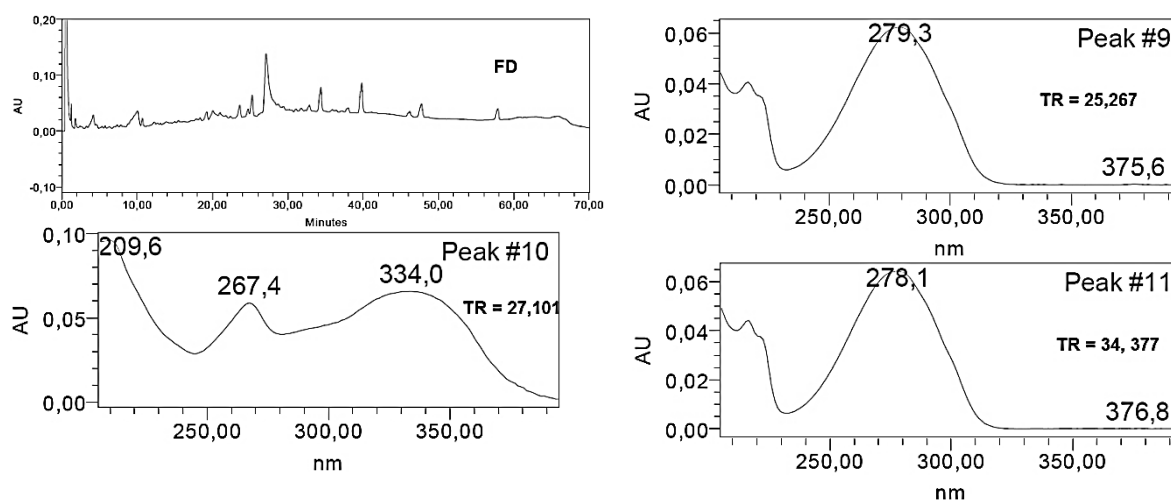


Figura 21 - Perfil cromatográfico de FD a 210 nm e espectro no UV obtido *on line* pelo detector DAD para os picos 9, 10 e 11. Condições cromatográficas: vide item 3.6.6.2, pág. 54. FD (fração diclorometânica).

Os espectros no UV de flavonas e flavonóis em metanol exibem dois máximos de absorção na região entre λ 240 a 400 nm. Estes picos são comumente denominados de banda I (λ 300–380 nm) e banda II (λ 240–280 nm). A banda I está associada à absorção do anel B (sistema cinamoíla) e a banda II à absorção devida ao anel A (sistema benzoíla) (**Figura 22**). As flavonas apresentam comprimento de onda de absorção da banda I abaixo de 350 nm (λ 304-350 nm). Ao contrário, 3-hidroxi-flavonas (flavonóis) apresentam comprimento de onda de absorção da banda I maior (λ 352-385 nm). No entanto, flavonóis com o grupo 3-hidroxi-substituído (metilado ou glicosilado) exibem a banda I na região de λ 328 a 357 nm (MABRY et al., 1970)

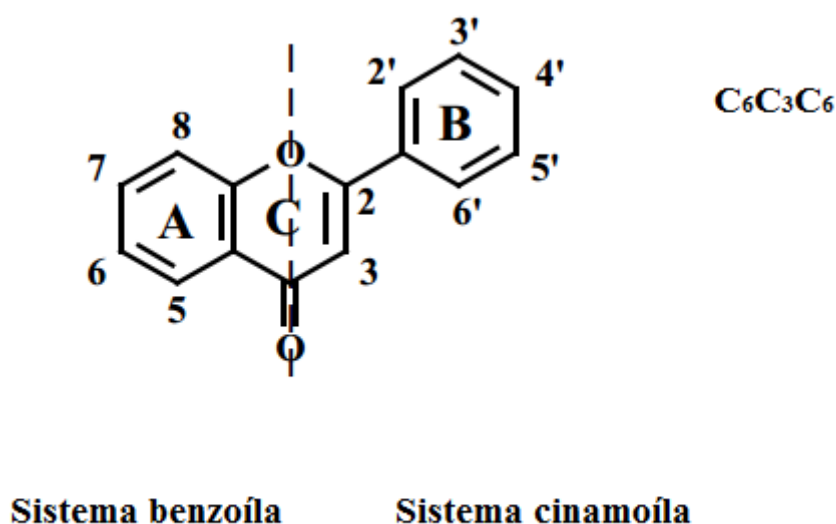


Figura 22 - Esqueleto básico dos flavonoides.

O valor máximo de absorção da banda I permite diferenciar flavonas de 3-hidroxi-flavonas (flavonóis) (MABRY et al., 1970). Pode-se dizer que o pico com TR 27,101 é típico de flavona ou flavonol com o grupo 3-hidroxi-substituído (**Figura 21**).

Nas análises cromatográficas da fração acetato de etila FAE, observou-se que os picos com TR compreendidos entre 10,652 e 20,773 minutos apresentaram perfil espectral característico de flavonoides, sendo compatíveis com flavonas ou flavonóis. Para a fração butanólica FB os picos com TR compreendidos entre 9,530 e 13,421 minutos parecem ser de flavonas ou flavonóis.

No perfil cromatográfico da fração etanólica FE, **Figura 23**, os picos 9 e 11 são compatíveis com flavonóis, visto que apresentam o comprimento de onda de absorção

da banda I superior a 352 nm. Já a polaridade e os espectros de absorção no UV dos picos com TR inferiores a 2 min sugerem ser de taninos.

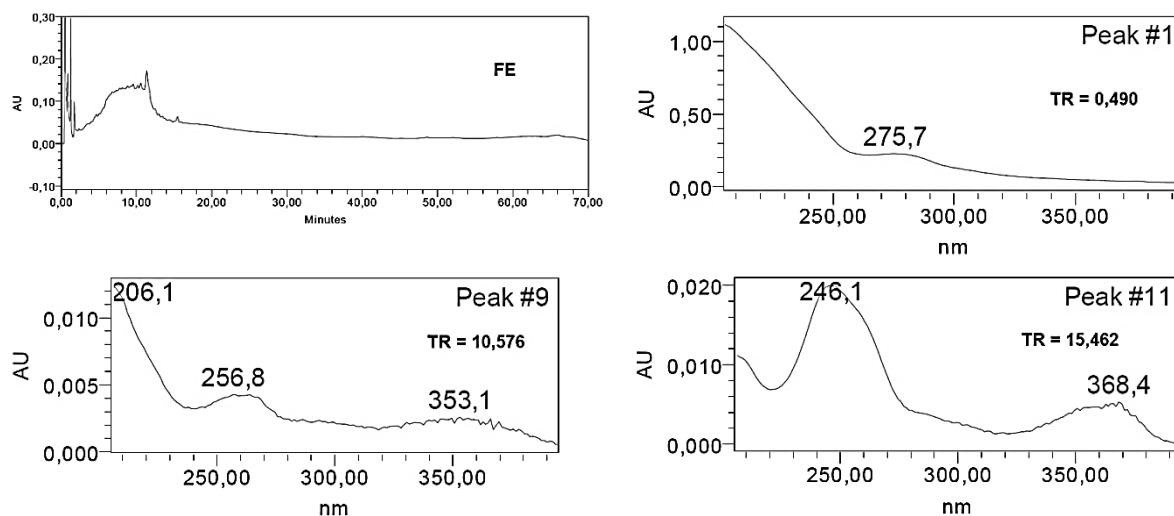


Figura 23 - Perfil cromatográfico de FE a 210 nm e espectro de UV dos picos 1, 9 e 11. Condições cromatográficas: vide item 3.6.6.2, pág. 54. FE (fração etanólica).

No perfil cromatográfico de FEA a polaridade e os espectros de absorção no UV dos picos da fração FEA sugerem ser de taninos (**Figura 24**).

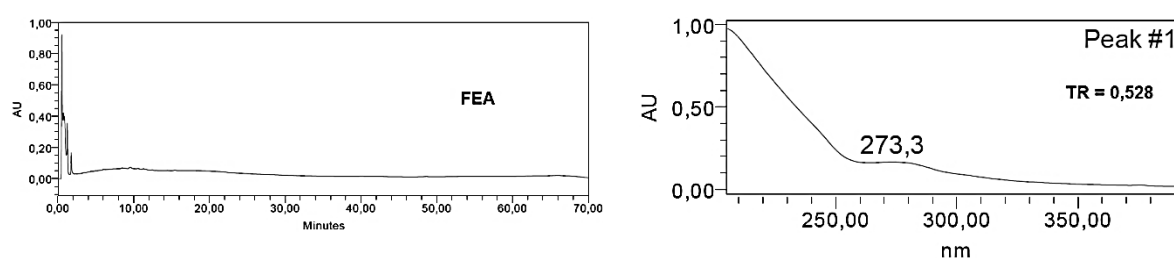


Figura 24 - Perfil cromatográfico de FEA a 210 nm e espectro de UV do pico 1. Condições cromatográficas: vide item 3.6.6.2, pág. 54. FEA (fração etanol/água).

As análises por CLAE-FR permitiram direcionar as etapas dos fracionamentos cromatográficos posteriores. As frações FAE e FB foram selecionadas para serem refracionadas em coluna de Sephadex LH-20 pelo fato de terem apresentado bons resultados nos testes antifúngicos, polaridade dos compostos menor que FE e FEA e quantidade suficiente de massa para as análises. A fração FD foi refracionada porque apresentou atividade antiprotozoária.

4.5 Fracionamento da fração acetato de etila (FAE), fração butanólica (FB) e fração diclorometânica (FD)

4.5.1 Fracionamento de FAE

Do fracionamento de 2,0 g de FAE em coluna de Sephadex LH-20 foram coletadas 162 frações, gerando 13 grupos de frações reunidas (**Tabela 9**).

Tabela 9 - Fracionamento de FAE em coluna de Sephadex LH-20

Sub-frações	Frações reunidas	Volume de metanol (mL)	Massa (g)	Rendimento (%)
FAE1	1-25	250	0,7640	38,15
FAE2	26-33	80	0,4971	24,82
FAE3	34-38	50	0,0758	3,78
FAE4	39-45	70	0,0648	3,24
FAE5	46-49	40	0,0332	1,66
FAE6	50-58	90	0,0907	4,53
FAE7	59-63	50	0,0477	2,38
FAE8	64-73	100	0,0635	3,17
FAE9	74-91	180	0,0883	4,41
FAE10	92-99	80	0,0196	0,98
FAE11	100-131	320	0,0351	1,75
FAE12	132-140	90	0,0103	0,51
FAE13	141-162	220	0,0260	1,30
Total		1620	1,8161	90,70

4.5.2 Fracionamento de FB

Do fracionamento de 2,0 g de FB, coletou-se 84 frações que foram reunidas em 10 subfrações de FB (**Tabela 10**).

Tabela 10 - Fracionamento de FB em coluna de Sephadex LH-20

Sub-frações	Frações reunidas	Volume de metanol (mL)	Massa (g)	Rendimento (%)
FB1	1-9	117	0,0846	4,23
FB2	10-13	52	0,0599	3,00
FB3	14-18	65	0,4127	20,64
FB4	19-20	26	0,2219	11,10
FB5	21-25	65	0,4504	22,52
FB6	26-37	156	0,0964	4,82
FB7	38-47	130	0,0563	2,82
FB8	48-57	130	0,0420	2,10
FB9	58-64	91	0,0274	1,37
FB10	64-84	273	0,0473	2,37
Total		1105	1,4989	74,95

4.5.3 Fracionamento cromatográfico de FD

Uma porção de FD foi fracionada em coluna de sílica gel utilizando-se eluentes de polaridades crescentes. Os perfis cromatográficos foram monitorados por CCD de sílica gel e aquelas frações apresentando perfis semelhantes foram reunidas. As frações e suas respectivas massas encontram-se listadas na **Tabela 11**.

A evaporação lenta do solvente da fração FD3 (eluída com DCM:ETOAC (2:1)), à temperatura ambiente, resultou na cristalização de um sólido de cor amarelada. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado com pipeta de Pasteur e transferido para outro recipiente. Foi adicionado diclorometano ao frasco que continha o precipitado. Após repouso para decantação do precipitado, o solvente foi removido. Esse procedimento foi repetido até obtenção de um composto puro denominado FDI. O sólido isolado FDI foi cromatografado em CCD usando como eluente clorofórmio, acetona e ácido fórmico na proporção 75,0:16,5:8,5. NP/PEG foi empregado como revelador e observou-se o aparecimento de fluorescência (UV 365 nm). A análise de FDI por CCD de sílica gel indicou valor de R_f igual a 0,67, maior que o observado para quercetina e rutina.

Tabela 11 - Fracionamento de FD por cromatografia em coluna de sílica gel

Fração	Eluente	Volume (mL)	Massa (g)	Rendimento (%)
FD1	DCM	1400	0,1084	2,69
FD2	DCM:ETOAC (2:1)	250	0,1113	2,76
FD3	DCM:ETOAC (2:1)	550	0,2641	6,55
FD4	DCM:ETOAC (2:1)	350	0,1824	4,53
FD5	DCM:ETOAC (2:1)	250	0,1111	2,76
FD6	DCM:ETOAC (2:1) e	300 e		
	DCM:ETOAC (1:2)	250	0,1508	3,74
FD7	DCM:ETOAC (1:2)	350	0,2076	5,15
FD8	DCM:ETOAC (1:2)	300	0,1166	2,89
FD9	DCM:ETOAC (1:2) e	300 e		
	EtOAc	400	0,2922	7,25
FD10	EtOAc	350	0,2203	5,47
FD11	EtOAc	350	0,1234	3,06
FD12	EtOAc	250	0,0632	1,57
FD13	EtOAc	500	0,0752	1,87
FD14	EtOAc e	250 e		
	EtOAc: MeOH (2:1)	300	0,0512	1,27
FD15	EtOAc: MeOH (2:1)	150	0,1048	2,60
FD16	EtOAc: MeOH (2:1)	400	0,7610	18,89
FD17	EtOAc: MeOH (2:1)	850	0,1889	4,69
FD18	EtOAc: MeOH (2:1)	550	0,0479	1,19
FD19	EtOAc: MeOH (2:1) e	200 e		
	EtOAc: MeOH (1:2)	600	0,0419	1,04
FD20	EtOAc: MeOH (1:2)	300	0,2337	5,80
FD21	EtOAc: MeOH (2:1) e	450 e		
	MeOH	200	0,0660	1,64
FD22	MeOH	400	0,0892	2,21

4.6 Elucidação estrutural da substância isolada FDI

A elucidação estrutural da substância isolada FDI foi realizada a partir de dados espectroscópicos no ultravioleta (UV), no infravermelho (IV) e ressonância magnética

nuclear monodimensional (RMN de ^1H) e bidimensional (HSQC, HMBC e COSY). A análise dos espectros no UV obtidos com o uso de aditivos de deslocamento permitiu chegar às conclusões detalhadas no texto a seguir.

O espectro no UV de FDI em metanol apresentou bandas intensas com máximos de absorção em 268,5 e 327,0 nm (**Figura 25**). O comprimento de onda de absorção máximo da banda I em 327 nm indica tratar-se de uma flavona ou flavonol com o grupo 3-hidroxi-substituído.

Como pode ser observado na **Figura 25** e na **Tabela 12**, houve deslocamento batocrômico de ambas as bandas após adição de MeONa, evidenciando a natureza fenólica de FDI. O deslocamento batocrômico com redução da intensidade da banda I indica ausência de hidroxila livre em C4'. A alteração da curva no ultravioleta com o tempo é um bom indicador da presença de grupamentos álcali-sensíveis, entretanto não houve degradação após 5 minutos de adição de MeONa.

O cloreto de alumínio (AlCl_3) forma complexos estáveis com hidroxilas das posições C3 e/ou C5 de flavonas e flavonóis que não regeneram após a adição de HCl. Por outro lado, a instabilidade do complexo após adição de HCl indica presença de sistema *orto*-dihidroxilado. Observa-se que não houve regeneração da curva após a adição de HCl e que os valores de λ máximo se mantiveram, indicando presença de hidroxila nas posições C3 e/ou C5 (**Figura 25** e **Tabela 12**).

O acetato de sódio (AcONa) é uma base fraca que é capaz de ionizar hidroxilas de caráter ácido acentuado, ou seja, permite identificar a presença de hidroxilas nas posições C3, C7 e C4'. É usado principalmente para detectar a presença de um grupo 7-hidroxila livre. Flavonas e flavonóis contendo hidroxila livre na posição C7 apresentam deslocamento batocrômico entre 5 e 20 nm na banda II. Com a adição de AcONa observou-se deslocamento batocrômico de 7,5 nm na banda II, sugerindo a presença de hidroxila livre em C7 (**Figura 25** e **Tabela 12**). Não houve alteração da curva após 5 minutos de adição de acetato de sódio, portanto pode-se concluir que o flavonoide não possui grupos álcali-sensíveis (6,7 ou 7,8-di-OH). Com a adição de AcONa/ H_3BO_3 um deslocamento batocrômico de 12 a 36 nm na banda I (relativo ao espectro em metanol) indicaria a presença de grupos *orto*-dihidroxilado. Não houve deslocamentos significantes das bandas em relação ao espectro em metanol (**Figura 25**), o que indica que o composto em questão não possui grupo *orto*-dihidroxilado.

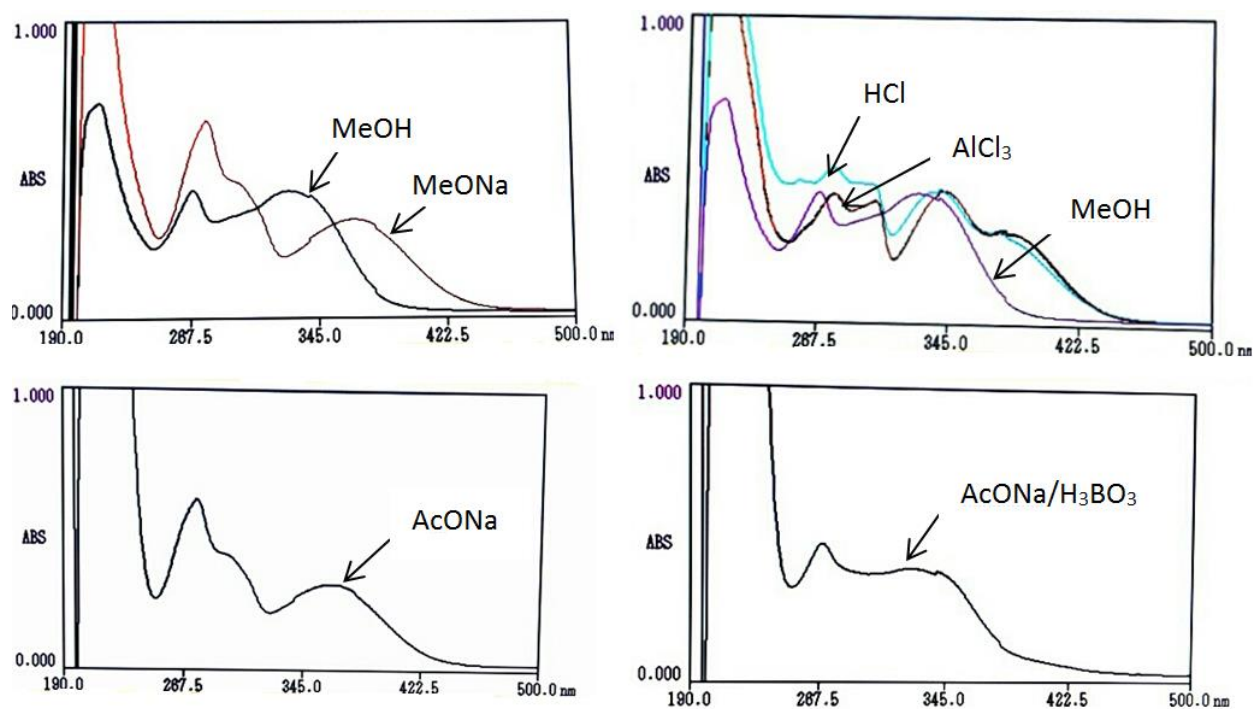


Figura 25 - Espectros no UV de FDI obtidos com o uso de aditivos.

Tabela 12 - Dados espectrofotométricos no ultravioleta obtidos para FDI

Solvente / aditivo	λ_{max} (em nm)
MeOH	268,5; 327
MeONa	276; 364,5
AlCl_3	277; 301; 340,5; 379
$\text{AlCl}_3 + \text{HCl}$	277; 300; 340; 378
MeOH / AcONa	276; 359
AcONa / H_3BO_3	270; 327

A análise dos espectros de absorção no ultravioleta, empregando-se aditivos, sugere que FDI seja uma flavona substituída em C4'.

O espectro de absorção na região do infravermelho registrado para FDI (**Figura 26**) apresenta uma banda em 3151 cm^{-1} , característica de estiramento de O-H. As bandas de absorção em 2916 e 2850 cm^{-1} foram atribuídas a estiramento de C-H alifático. A banda em 1651 cm^{-1} foi atribuída a estiramento de carbonila α,β -insaturada. A baixa intensidade de absorção da mesma indica uma ligação de hidrogênio intramolecular, confirmando a presença de OH em C5, sugerida pela análise dos espectros de absorção no ultravioleta. A natureza aromática da substância ficou evidenciada pela presença de bandas de absorção em 1604 , 1560 , 1505 e 1428 cm^{-1} ,

atribuídas a estiramento C=C de anel aromático. As bandas fortes em 1237 cm^{-1} (estiramento assimétrico) e em 1032 cm^{-1} (estiramento simétrico) indicaram a presença de ligação C-O de éter fenilalquílico (PAVIA et al., 2012).

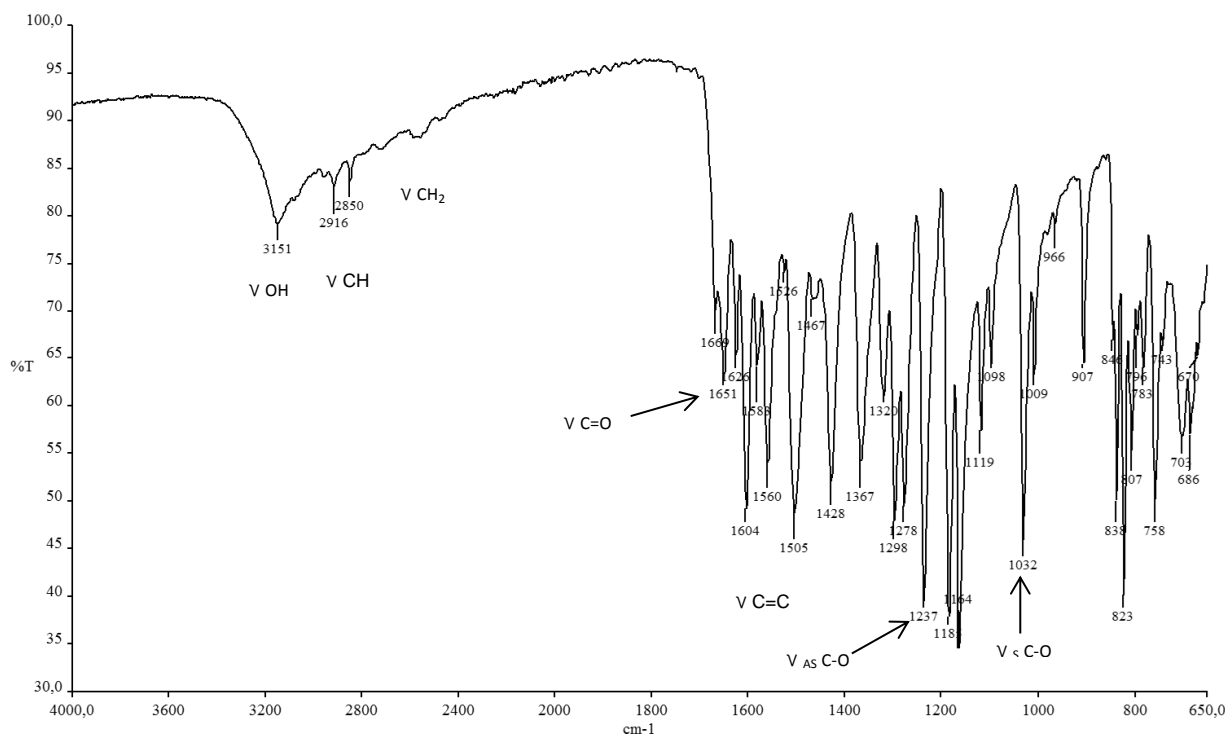


Figura 26 - Espectro no IV obtido para FDI.

No espectro de RMN de ^1H de FDI (**Figura 27**), os dupletos centrados em δ 7,97 e δ 7,11 ppm apresentam valor de acoplamento escalar característico de acoplamento *orto* ($J = 8,8\text{ Hz}$), característico de sistema de spins $\text{AA}'\text{BB}'$ e típico de anel B de flavonoide *p*-substituído. O sinal em δ 7,97 ppm foi atribuído a H2' e H6' e o sinal em δ 7,11 ppm a H3' e H5'. O simpleto em δ 6,68 ppm (1H, s, H3) foi atribuído ao hidrogênio ligado a C3. Foram observados os simpletos δ 6,48 (1H, s, H8) e δ 6,22 (1H, s, H6) atribuídos aos hidrogênios em C8 e C6, respectivamente. O simpleto, com integração de 3H, referente a hidrogênios de grupo metoxila em δ 3,89 (3H, s, 4'-OCH₃) foi atribuído a 4'-OCH₃. Essa análise dos dados ratifica as informações obtidas a partir dos dados espectrofotométricos no UV de FDI.

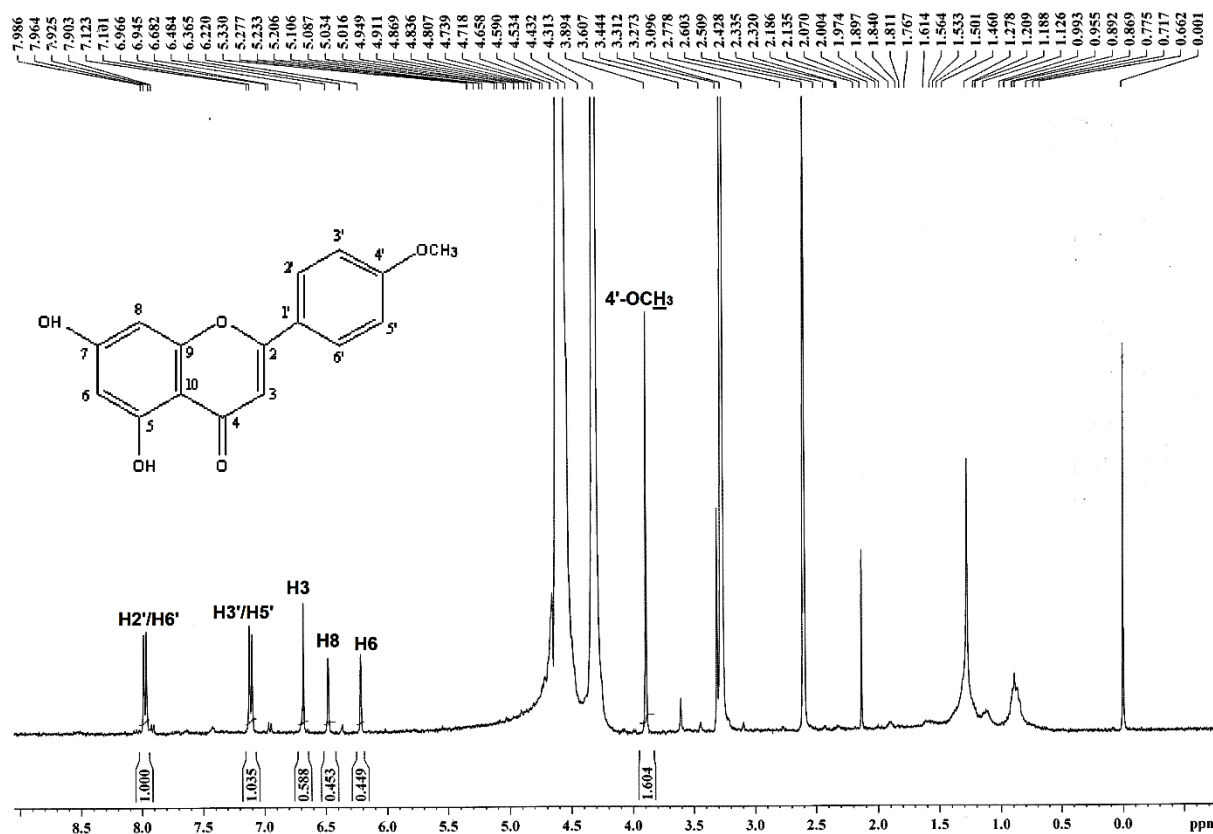


Figura 27 - Espectro de RMN de ¹H de FDI (MeOD, 400 MHz).

Por meio dos espectros de correlação foram observadas as conectividades entre carbonos e seus respectivos hidrogênios (HSQC), entre hidrogênios vizinhos (COSY) e entre hidrogênios e carbonos vizinhos a longa distância (HMBC). Não foi possível obter espectro de RMN de ¹³C para FDI. Portanto, os valores de deslocamento químico dos carbonos hidrogenados foram obtidos indiretamente a partir dos mapas de contornos HSQC e HMBC apresentados nas **Figuras 28 e 29**.

No mapa de contornos HSQC (**Figura 28**), os dupletos centrados em δ 7,97 ppm (H2' e H6') e δ 7,11 ppm (H3' e H5') apresentaram manchas de correlação com os sinais de carbono em δ 128,1 ppm (C2' e C6') e δ 114,3 ppm (C3' e C5'), respectivamente. Observou-se mancha de correlação entre o sinal do hidrogênio em δ 6,68 ppm e o sinal de carbono em δ 103,9 ppm, confirmando a atribuição de C3. Os sinais correspondentes aos hidrogênios em δ 6,48 e 6,22 ppm encontram-se sobrepostos no mapa de contornos HSQC, correlacionados a carbonos com sinais em 94,1 ppm (C8) e δ 98,9 ppm (C6), respectivamente. Observa-se contorno de correlação entre o sinal dos hidrogênios de grupo metoxila (4'-OCH₃) em δ 3,89 ppm e o sinal de carbono em δ 55 ppm (4'-OCH₃).

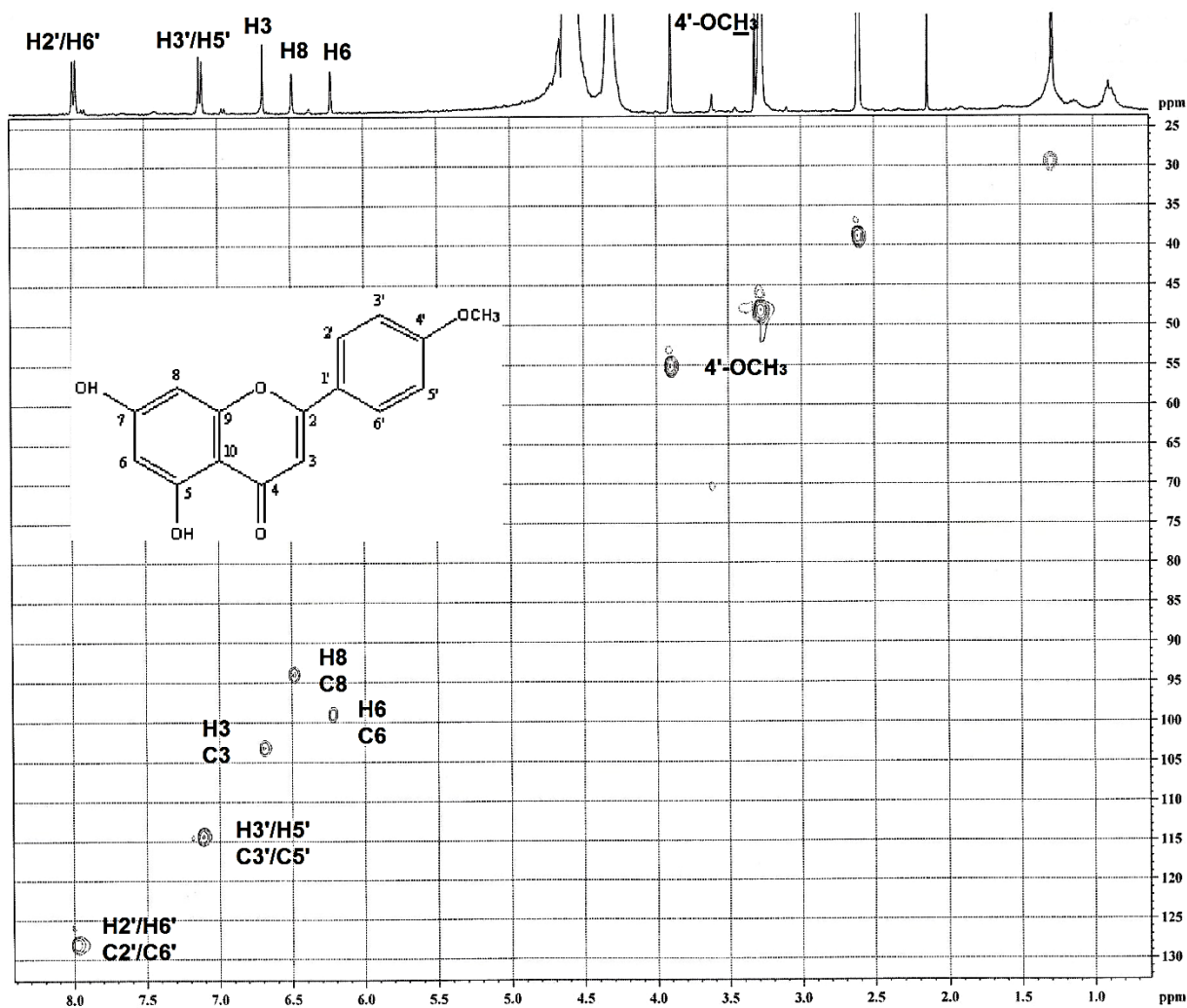


Figura 28 - Mapa de contornos HSQC de FDI.

O mapa de correlações heteronuclear HMBC (**Figura 29**) mostrou uma correlação a três ligações (3J) dos hidrogênios H2' e H6' (δ 7,97) com o carbono C4' (δ 162,8), e a duas ligações (2J) dos hidrogênios H3' e H5' (δ 7,11) com o mesmo, confirmando o deslocamento químico do C4'. Observa-se correlação (3J) entre o sinal dos hidrogênios do grupo metoxila (4'-OCH₃) em δ 3,89 ppm e o sinal de carbono em δ 162,8 ppm (C4'). Existem as correlações (3J) de H2' com C6' e H6' com C2' e, igualmente, H3' com C5' e vice versa. Também, houve a correlação (3J) do C1' (δ 123,3) com H3' e H5'. Outras correlações foram do C6 (δ 98,9) com H8 (δ 6,48, 3J), C8 (δ 94,1) com H6 (δ 6,22, 3J), C9 (δ 157,8) com H8 (δ 6,48, 2J), C10 (δ 104,0) com H3 (δ 6,68, 3J) e C2 (δ 163,8) com H3 (2J).

O espectro COSY confirmou o padrão de substituição do anel B, demonstrando a correlação entre os hidrogênios do referido anel (**Figura 30**).

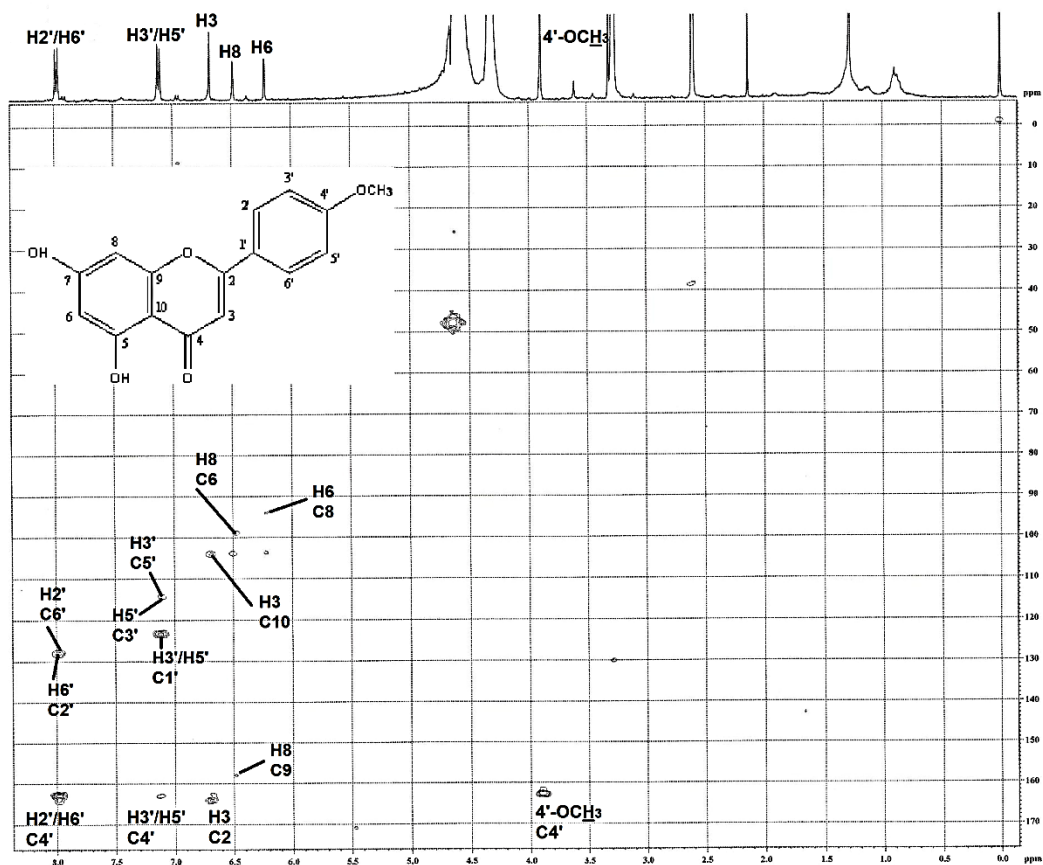


Figura 29 - Mapa de correlação HMBC obtido para FDI.

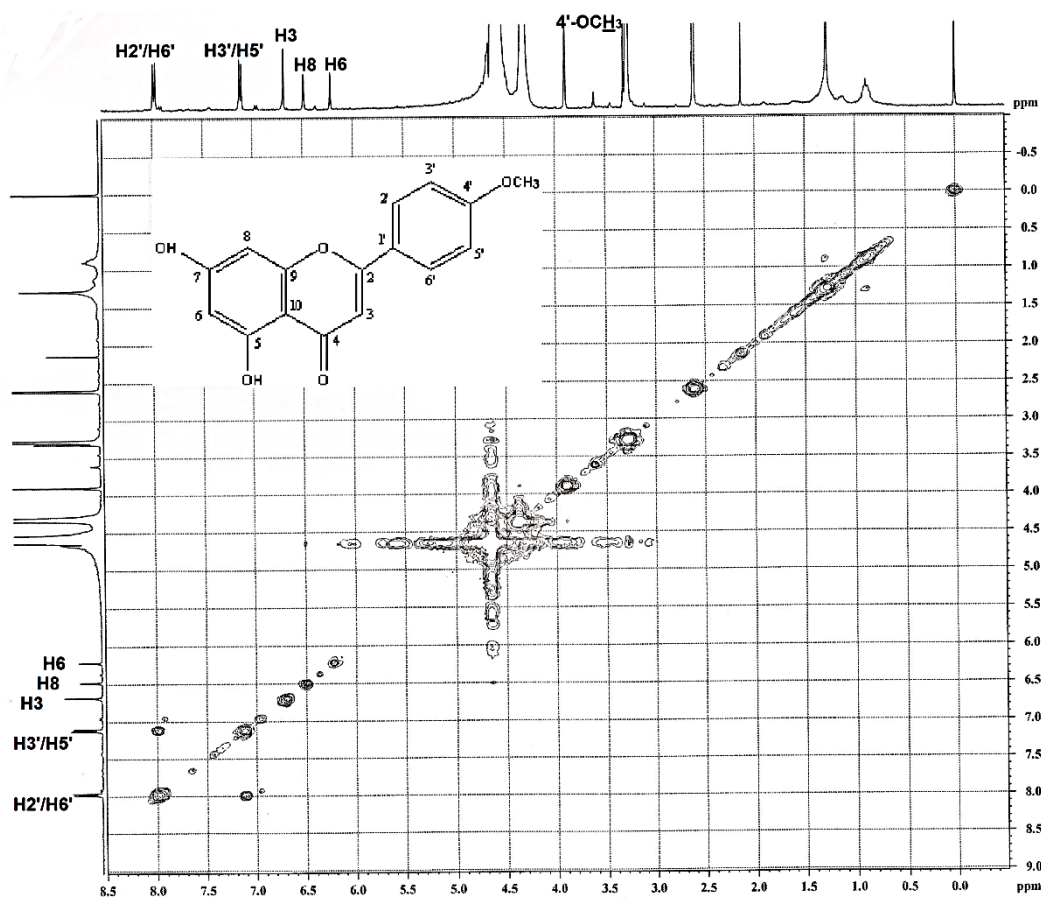


Figura 30 - Experimento bidimensional COSY de FDI (MeOD, 400 MHz).

Os dados de RMN de ^1H e as correlações entre ^1H - ^{13}C observadas nos mapas de contornos HSQC e HMBC obtidos para FDI e os valores encontrados na literatura para acacetina estão apresentados na **Tabela 13**. Os dados espectrofotométricos no ultravioleta obtidos para FDI e os dados relatados na literatura para acacetina estão apresentados na **Tabela 14**.

Tabela 13 - Dados de RMN de ^1H e correlações heteronucleares ^1H - ^{13}C observadas nos mapas de contornos HSQC e HMBC obtidos para FDI e dados relatados na literatura para acacetina

C/H	FDI ^1H (δ ppm)	FDI ^{13}C (δ ppm)*	Acacetina ^1H (δ ppm)**	Acacetina ^{13}C (δ ppm)**
2		163,8		167,7 ¹ ; 163,2 ²
4'		162,8		165,5 ¹ ; 162,3 ²
9		157,8		159,3 ¹ ; 157,3 ²
2'	7,97 (d, $J = 8,8$ Hz)	128,1	7,82 (d, $J = 8$ Hz) ¹ ; 8,03 (d, $J = 2,1$ Hz) ²	127,6 ¹ ; 128,3 ²
6'	7,97 (d, $J = 8,8$ Hz)	128,1	7,82 (d, $J = 8$ Hz) ¹ ; 8,03 (d, $J = 2,1$ Hz) ²	127,6 ¹ ; 128,3 ²
1'		123,3		126,5 ¹ ; 122,8 ²
3'	7,11 (d, $J = 8,8$ Hz)	114,3	7,01 (d, $J = 8$ Hz) ¹ ; 7,11 (d, $J = 2,1$ Hz) ²	114,5 ¹ ; 114,6 ²
5'	7,11 (d, $J = 8,8$ Hz)	114,3	7,01 (d, $J = 8$ Hz) ¹ ; 7,11 (d, $J = 2,1$ Hz) ²	114,5 ¹ ; 114,6 ²
10		104,0		103,6 ²
3	6,68	103,9	6,56 ¹ ; 6,85 ²	104,1 ¹ ; 103,5 ²
6	6,22	98,9	6,30 ¹ ; 6,19 ²	100,1 ¹ ; 98,9 ²
8	6,48	94,1	6,45 ¹ ; 6,49 ²	95,0 ¹ ; 94,0 ²
4'-OCH ₃	3,89	55	3,89 ¹ ; 3,71 ²	55,8 ¹ ; 55,5 ²

*Dados aproximados obtidos dos mapas de correlação heteronuclear HSQC e HMBC de FDI (MeOD com gotas de DMSO, 400MHz).

** $^1\text{RMN } ^1\text{H}$ (CDCl₃, 400 MHz) e RMN ^{13}C (CDCl₃, 100 MHz) (CASTILLO et al., 2013); $^2\text{RMN } ^1\text{H}$ (DMSO-d₆, 500 MHz) e RMN ^{13}C (DMSO-d₆, 125 MHz) (PINZON et al., 2011).

Tabela 14 - Dados espectrofotométricos no UV obtidos para FDI e dados relatados na literatura para acacetina

Solvente / aditivo	FDI λ_{max} (em nm)	Acacetina* λ_{max} (em nm)
MeOH	268,5; 327	269; 327
MeONa	276; 364,5	276; 364
AlCl ₃	277; 301; 340,5; 379	277; 302; 344; 382
AlCl ₃ + HCl	277; 300; 340; 378	279; 300; 338; 379
MeOH / AcONa	276; 359	276; 358
AcONa / H ₃ BO ₃	270; 327	269; 331

*Fonte: Mabry et al. (1970).

Com base nas informações obtidas das técnicas espectroscópicas empregadas, identificou-se a substância isolada FDI como acacetina. Esta é a primeira vez que se descreve a presença dessa flavona no gênero *Microlicia*. No estudo quimiotaxonômico realizado por Bomfim-Patricio et al. (2001) com 33 espécies dos gêneros *Lavoisiera*, *Microlicia* e *Trembleya*, principais gêneros da tribo *Microlicieae*, não foi observada a presença de acacetina. Nesse mesmo estudo os autores relatam que *M. crenulata* apresenta apenas flavonóis.

Segundo os relatos de Lehane & Saliba (2008), o flavonoide acacetina possui atividade antiplasmódica. Pinzon et al. (2011) relatam que a acacetina é um agente antifúngico com potência comparável à anfotericina B contra *C. glabrata* e *C. tropicalis*. É um promissor agente para o tratamento de fibrilação atrial (WU et al., 2011), apresenta atividade leishmanicida moderada (SILVA Filho et al., 2009) e inibe moderadamente a atividade da aromatase (CI₅₀ 18,7 µM) (ZHAO et al., 2008).

4.7 Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

4.7.1 Ensaio do DPPH

O método para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais pelo modelo de DPPH em microescala desenvolvido por Henriques et al. (2012) apresenta-se como excelente opção para a triagem da atividade antioxidante de derivados de plantas, por ser de fácil e rápida execução, requerer pequena massa de analitos e custo reduzido. O extrato etanólico bruto (EB) e suas frações provenientes da extração seriada foram testados quanto à atividade sequestradora de radical livre. As substâncias que têm facilidade em sequestrar radicais livres têm propriedades antioxidantes. O teste foi realizado com DPPH e rutina como padrão positivo. A rutina possui atividade antioxidante comprovada (AFANAS'EV et al., 1989). Sendo assim, ela pode ser usada como parâmetro para a comparação das atividades encontradas para as frações analisadas. Calculou-se a CE₅₀ de cada amostra e, posteriormente, o índice de atividade antioxidante (IAA). Esses valores estão apresentados na **Tabela 15**.

Tabela 15 - Atividade antioxidante pelo método DPPH de EB e de suas frações expressa em CE₅₀ (µg/mL) e IAA

Amostras	CE ₅₀ (µg/mL)	IAA
FE	6,13 ± 0,18	5,60 ± 0,17 ^a
Rutina	8,58 ± 0,23	4,00 ± 0,10 ^b
FB	10,27 ± 0,05	3,34 ± 0,01 ^c
FEA	10,63 ± 0,14	3,22 ± 0,04 ^c
FAE	10,65 ± 0,19	3,22 ± 0,06 ^c
EB	15,39 ± 0,04	2,23 ± 0,01 ^d
FD	186,70 ± 6,36	0,18 ± 0,01 ^e
FH	496,70 ± 38,88	0,07 ± 0,01 ^e

Os valores expressam a média ± desvio padrão das triplicatas. Letras diferentes correspondem diferenças significativas ($p < 0,05$). CE₅₀ (concentração efetiva para 50% de atividade) e IAA (índice de atividade antioxidante). EB (extrato bruto), FH (fração hexânica), FD (fração diclorometânica), FAE (fração acetato de etila), FB (fração butanólica), FE (fração etanólica), FEA (fração etanol/água).

Fez-se análise estatística e as diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$ (ANOVA / teste de Tukey). Observa-se que a fração FE apresentou o maior valor de IAA, seguido pela rutina. Não houve diferença significativa no valor de IAA, entre FB, FEA e FAE, no entanto apresentaram IAA significativamente maior que EB. As frações FD e FH apresentaram um valor de IAA significativamente menor.

Scherer & Godoy (2009) estabeleceram uma classificação para a ação antioxidante de materiais vegetais, sendo considerada uma ação antioxidante fraca quando o IAA $< 0,5$, ação moderada quando o IAA estiver entre 0,5 e 1,0, ação antioxidante forte quando o IAA for de 1,0 a 2,0 e ação muito forte para um valor de IAA $> 2,0$. As informações da **Tabela 15** revelam que as frações FH e FD apresentaram um valor de CE₅₀ muito alto e, conseqüentemente, um valor de IAA muito baixo, indicando fraca ação antioxidante (IAA $< 0,5$). O extrato bruto e as demais frações apresentaram ação antioxidante muito forte (IAA $> 2,0$), destacando-se a fração FE com IAA de 5,60 ± 0,17.

As atividades antioxidantes das frações FE e FEA podem estar relacionadas à presença de compostos fenólicos, particularmente de taninos hidrolisáveis. As frações FAE e FB possuem flavonoides e taninos, moléculas que exibem atividade antioxidante. A maioria dos compostos antioxidantes possui uma base molecular semelhante, ou seja, pelo menos um anel aromático e um grupo hidroxila, incluindo os ácidos fenólicos, flavonoides e isoflavonoides, ésteres de galato, taninos hidrolisáveis, etc (MARIUTTI & BRAGAGNOLO, 2007). A rutina apresentou um valor de IAA de

4,00 ± 0,10. Entretanto, Sherer & Godoy (2009) obtiveram um valor de 6,4 ± 0,3 para a referida substância. É possível que essa diferença de valores se deva ao grau de pureza da rutina utilizada nas análises.

4.7.2 Ensaio ABTS ou TEAC

Os resultados da atividade antioxidante empregando o método ABTS estão apresentados na **Tabela 16**. Os melhores resultados foram obtidos com a fração etanólica FE.

Em ambos os testes (DPPH e ABTS), verifica-se menor atividade antioxidante para as frações menos polares (FD e FH) e maior atividade para as frações mais polares, indicando que as substâncias com maior atividade antioxidante se encontram nas frações mais polares. As diferenças observadas podem estar relacionadas com a natureza e quantidade dos compostos presentes nas amostras.

Não foram encontrados estudos de atividade antioxidante para *M. crenulata*, entretanto existem diversos estudos de atividade antioxidante com plantas da família Melastomataceae. Pierone et al. (2011) estudaram potencial antioxidante de *Miconia albicans* (Sw.) Triana e observaram que a fração butanólica e o extrato metanólico apresentaram atividades antioxidantes consideráveis. Alnajjar et al. (2012) relataram a atividade antioxidante dos extratos aquoso e metanólico de *Melastoma malabathricum* empregando os métodos DPPH, ABTS e FRAP (Poder Antioxidante de Redução do Ferro).

Tabela 16 - Valores de CE₅₀ e de TEAC para EB e suas frações pelo método ABTS

Amostras	CE ₅₀ (µg/mL)	TEAC (mM Trolox / g amostra)
FE	7,31 ± 0,21	2,31 ± 0,06 ^a
FAE	7,61 ± 0,02	2,22 ± 0,01 ^b
FB	8,50 ± 0,05	1,99 ± 0,01 ^c
EB	12,28 ± 0,10	1,37 ± 0,01 ^d
FEA	23,42 ± 0,77	0,72 ± 0,02 ^e
FD	349,16 ± 8,00	0,11 ± 0,01 ^f
FH	153,67 ± 10,34	0,05 ± 0,00 ^f

Os valores expressam a média ± desvio padrão das triplicatas. Letras diferentes correspondem diferenças significativas ($p < 0,05$). CE₅₀ (concentração efetiva para 50% de atividade) e TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao Trolox). EB (extrato bruto), FH (fração hexânica), FD (fração diclorometânica), FAE (fração acetato de etila), FB (fração butanólica), FE (fração etanólica), FEA (fração etanol/água).

4.8 Ensaio biológicos

4.8.1 Ensaio de atividade antibacteriana *in vitro*

O óleo essencial OE2 e as frações obtidas por extração em aparelho de Soxhlet foram avaliados quanto à atividade antibacteriana, utilizando o teste de sensibilidade a antimicrobianos por difusão em disco. Esse procedimento foi utilizado como triagem inicial da avaliação do potencial antimicrobiano.

O óleo essencial OE2 e todas as frações avaliadas pelo teste de difusão em disco não foram capazes de inibir o crescimento de *E. coli* e de *S. aureus* (Tabela 17). O óleo essencial e todas as frações testadas foram capazes de inibir o crescimento de *P. aeruginosa*. Observa-se que as frações FSH e FSD apresentaram atividade antimicrobiana frente a *B. cereus*.

Tabela 17 - Diâmetro dos halos de inibição do crescimento bacteriano para o óleo essencial e para as frações resultantes das extrações em Soxhlet

Disco de antimicrobianos ou amostra	Diâmetro do halo de inibição (mm)			
	<i>B. cereus</i> var. <i>mycoides</i> ATCC 11778	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853	<i>E. coli</i> ATCC 25922	<i>S. aureus</i> ATCC 25923
AMC 30	NT	NT	26,32	32,56
CPM 30	8,49	27,16	NT	NT
FSH	7,67	9,95	-	-
FSD	6,86	7,16	-	-
FSAE	-	8,28	-	-
FSM	-	8,09	-	-
FSA	-	7,29	-	-
OE2	-	8,25	-	-

- Ausência de halo; AMC 30: Amoxicilina - ácido clavulânico 30 µg; CPM 30: Cefepima 30 µg; NT indica não testado. FSH (fração soxhlet hexânica), FSD (fração soxhlet diclorometânica), FSAE (fração soxhlet acetato de etila), FSM (fração soxhlet metanólica), FSA (fração soxhlet aquosa), OE2 (óleo essencial extraído da planta coletada em período chuvoso).

Para as amostras ativas pelo método de difusão em disco foram determinadas as CIMs pelo método de microdiluição em caldo. Os resultados encontram-se na Tabela 18. A atividade antimicrobiana das amostras foi estabelecida de acordo com a

concentração inibitória mínima (CIM). Extratos e frações vegetais são considerados com boa atividade inibitória se apresentam $CIM \leq 100 \mu\text{g/mL}$; atividade inibitória moderada de $100 < CIM \leq 500 \mu\text{g/mL}$; atividade fraca de $500 < CIM \leq 1000 \mu\text{g/mL}$ e inativos para $CIM > 1000 \mu\text{g/mL}$ (AYRES et al., 2008; TANAKA et al., 2005).

Os resultados do presente estudo indicaram que o óleo OE2 e as frações testadas FSM e FSA foram capazes de inibir o crescimento de *P. aeruginosa* (Gram-negativa), com valor de CIM de $128 \mu\text{g/mL}$. A fração FSAE apresentou valor de CIM de $512 \mu\text{g/mL}$. Já as frações FSH e FSD não mostraram 100% de inibição na maior concentração testada no ensaio por microdiluição em caldo. Para *B. cereus* (Gram-positiva), os resultados obtidos demonstraram que as frações FSH e FSD apresentaram ação moderada sobre a referida bactéria, sendo capaz de inibir seu crescimento com valor de CIM de $128 \mu\text{g/mL}$.

Tabela 18 - Concentração Inibitória Mínima do óleo e das frações resultantes das extrações em Soxhlet contra bactérias patogênicas (CIM em $\mu\text{g/mL}$)

Bactéria	CIM					
	FSH	FSD	FSAE	FSM	FSA	OE2
<i>P. aeruginosa</i>	> 512	> 512	512	128	128	128
<i>B. cereus</i>	128	128	NT	NT	NT	NT

CIM indica menor concentração da amostra que inibiu 100% o crescimento microbiano; > Indica que a amostra não apresentou atividade de 100% de inibição na maior concentração testada; NT indica não testado. FSH (fração soxhlet hexânica), FSD (fração soxhlet diclorometânica), FSAE (fração soxhlet acetato de etila), FSM (fração soxhlet metanólica), FSA (fração soxhlet aquosa), OE2 (óleo essencial extraído da planta coletada em período chuvoso).

Entre os compostos identificados no óleo essencial, limoneno e linalol foram anteriormente referidos como tendo atividade antimicrobiana (MAZZANTI et al., 1998). Fabri et al. (2012) estudaram a atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Mitracarpus frigidus*, óleo rico em linalol (29,29%). O óleo essencial de *M. frigidus* exibiu atividade antibacteriana moderada contra *S. aureus*, *B. cereus* e *P. aeruginosa* (CIM $250 \mu\text{g/mL}$). Conforme consta na RESOLUÇÃO-RDC Nº 3/2012, o linalol e o limoneno podem causar reações alérgicas de contato entre os consumidores sensíveis a fragrâncias e aromas. Dessa forma, a presença dessas substâncias na formulação de produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes deve ser indicada na rotulagem do produto quando sua concentração exceder 0,001% nos produtos sem enxágue e 0,01% em produtos com enxágue (BRASIL, 2012).

P. aeruginosa é uma bactéria ubiqüitária e faz parte da microbiota humana. Raramente se torna a causa de infecções comunitárias em indivíduos saudáveis, entretanto, em ambientes hospitalares esta bactéria torna-se um agente infeccioso importante (PAVIANI et al., 2004). *P. aeruginosa* e *B. cereus* são exemplos de bactérias patogênicas encontradas em biofilmes microbianos na indústria de alimentos. Esses microrganismos podem se aderir a resíduos orgânicos e inorgânicos presentes na superfície de equipamentos e utensílios, caso o processo de higienização seja executado de forma incorreta (OLIVEIRA et al., 2010b). Os microrganismos aderidos ao biofilme apresentam maior resistência à ação de agentes físicos e químicos.

O controle de biofilmes microbianos é de grande importância para a indústria de alimentos, visto que estes podem causar prejuízos econômicos ou problemas de saúde pública. Alternativas não convencionais de sanitização vêm sendo estudadas. Neste contexto, óleos essenciais de condimentos, plantas aromáticas e medicinais vem sendo pesquisados quanto à atividade antibacteriana em biofilmes. Oliveira et al. (2010a) observaram que os óleos essenciais de *Cymbopogon citratus* (capim-limão) e *Cymbopogon nardus* (citronela), isoladamente ou em combinação, são novas alternativas para a desinfecção de superfícies em aço inoxidável contaminadas por *Listeria monocytogenes*. Chorianopoulos et al. (2008) verificaram que o óleo essencial de *Satureja thymbra* (1%) apresenta efeito bactericida suficiente no biofilme bacteriano formado em aço inoxidável. Apesar dos resultados promissores, estes pesquisadores mencionam a necessidade de mais estudos sobre o uso de óleos essenciais como sanitizantes.

4.8.2 Ensaio de atividade antifúngica *in vitro*

4.8.2.1 Atividade antifúngica do óleo essencial e das frações resultantes das extrações em Soxhlet

A atividade antifúngica do óleo essencial OE2 e das frações resultantes das extrações em Soxhlet foram investigadas. O objetivo foi verificar a presença de compostos que possam apresentar efeitos inibitórios sobre fungos patogênicos e deteriorantes de alimentos. Os resultados estão apresentados na **Tabela 19**.

Tabela 19 - Concentração Inibitória Mínima do óleo essencial e das frações resultantes das extrações em Soxhlet contra fungos patogênicos e deteriorantes de alimentos (CIM em µg/mL)

Fração	CIM		
	<i>A. niger</i>	<i>A. flavus</i>	<i>S. cerevisiae</i>
FSH	> 1000	> 1000	< 62,5
FSD	> 1000	> 1000	Entre 250 e 1000
FSAE	> 1000	> 1000	Entre 62,5 e 250
FSM	> 1000	> 1000	< 62,5
FSA	> 1000	> 1000	< 62,5
OE2	Entre 500 e 1000	Entre 250 e 500	Entre 250 e 500

CIM indica menor concentração da amostra que inibiu 100% o crescimento microbiano; > Indica que a amostra não apresentou atividade de 100% de inibição na maior concentração testada, < Indica que a referida concentração foi a concentração mínima testada e que nessa concentração a amostra teve atividade de 100% de inibição. FSH (fração soxhlet hexânica), FSD (fração soxhlet diclorometânica), FSAE (fração soxhlet acetato de etila), FSM (fração soxhlet metanólica), FSA (fração soxhlet aquosa), OE2 (óleo essencial extraído da planta coletada em período chuvoso).

Em relação aos fungos *A. flavus* e *A. niger*, somente o óleo essencial OE2 apresentou atividade inibitória. O óleo apresentou fraca atividade inibitória com relação ao *A. niger* e, em relação ao fungo *A. flavus*, apresentou moderada atividade inibitória. Esta observação evidencia o fato de que o óleo possui substâncias que contribuíram para a inibição do crescimento de *A. flavus* e *A. niger*.

Observou-se que as frações FSH, FSM e FSA foram efetivas contra *S. cerevisiae* com CIM menor que 62,5 µg/mL. Como 62,5 µg/mL foi a menor concentração testada para as frações, é possível que elas apresentem um CIM muito menor para a referida levedura. *S. cerevisiae* é utilizada para as mais diversas finalidades em alimentos: produção de bebidas, pães, álcool e etc. Contudo, as espécies do gênero *Saccharomyces* são leveduras de intensa atividade fermentativa que muitas vezes estão envolvidas em alterações indesejáveis em alimentos como frutas, maionese, mel, vinagre, laticínios (leite, manteiga, etc) e produtos fermentados (FRANCO & LANDGRAF, 2002).

As frações da planta apresentaram potencial antifúngico contra leveduras, o que motivou as análises contra espécies dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus*. Assim sendo, foi investigada a atividade antifúngica do óleo essencial e das frações contra fungos de relevância clínica. As atividades antifúngicas obtidas pelo método de microdiluição em caldo, expressa com CIM, para o fármaco fluconazol estão apresentadas na **Tabela 20** e para as frações e o óleo, na **Tabela 21**.

As leveduras do gênero *Candida* têm grande importância pela alta frequência com que infectam e colonizam o hospedeiro humano. Espécies de *Candida* residem

como comensais, fazendo parte da microbiota normal dos indivíduos saudáveis. Todavia, quando há uma ruptura no balanço normal da microbiota ou o sistema imune do hospedeiro encontra-se comprometido, as espécies do gênero *Candida* tendem a manifestações agressivas, tornando-se patogênicas (BARBEDO & SGARBI, 2010).

Cryptococcus spp são mundialmente reconhecidos como importantes patógenos fúngicos oportunistas, incidindo com maior frequência sobre indivíduos com síndrome de imunodeficiência adquirida. *Cryptococcus neoformans* é o principal agente causador da meningoencefalite fúngica em indivíduos imunocomprometidos (LIN, 2009).

Tabela 20 - Concentração Inibitória Mínima do fármaco fluconazol (CIM em µg/mL)

Espécie	Fluconazol
<i>S. cerevisiae</i> K1	4
<i>A. niger</i>	< 64
<i>A. flavus</i> IMI 190443	> 64
<i>C. albicans</i> ATCC 18804	2
<i>C. krusei</i> ATCC 20298	32
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019	1
<i>C. tropicalis</i> ATCC 750	2
<i>C. glabrata</i> ATCC 90030	1
<i>C. dubliniensis</i> Cd28	0,1
<i>C. neoformans</i> ATCC 24067	16
<i>C. gattii</i> LI 3503	8
<i>C. gattii</i> ATCC 32608	8

CIM para o fluconazol definido como a concentração mínima necessária para inibir o crescimento fúngico em 50%.

Tabela 21 - Concentração Inibitória Mínima das frações resultantes das extrações em Soxhlet e do óleo essencial contra leveduras de relevância clínica (CIM em µg/mL)

FRAÇÃO / CIM	<i>Candida spp</i>						<i>Cryptococcus spp.</i>	
	<i>C. albicans</i> (ATCC 18804)	<i>C. krusei</i> (ATCC 20298)	<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 20019)	<i>C. tropicalis</i> (ATCC 750)	<i>C. glabrata</i> (ATCC 90030)	<i>C. dubliniensis</i> (Cd28)	<i>C. neoformans</i> (ATCC 24067)	<i>C. gattii</i> (LI 3503)
OE2	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250
FSH	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	> 250	250	125
FSD	> 250	> 250	> 250	> 250	250	> 250	250	250
FSAE	250	62,5	62,5	250	31,25	250	62,5	125
FSM	62,5	62,5	31,25	250	15	62,5	31,25	31,25
FSA	62,5	62,5	31,25	125	7,8	62,5	31,25	31,25

CIM indica menor concentração da amostra que inibiu 100% o crescimento microbiano; > Indica que a amostra não apresentou atividade de 100% de inibição na maior concentração testada. FSH (fração soxhlet hexânica), FSD (fração soxhlet diclorometânica), FSAE (fração soxhlet acetato de etila), FSM (fração soxhlet metanólica), FSA (fração soxhlet aquosa), OE2 (óleo essencial extraído da planta coletada em período chuvoso).

Pode-se observar que o óleo essencial não teve 100% de ação inibitória na maior concentração testada. Os melhores resultados de inibição foram observados contra *C. glabrata* e a levedura menos susceptível foi *C. tropicalis*. Verifica-se que a FSA foi a mais ativa, portanto pode-se inferir que os compostos ativos contra as leveduras são muito polares.

4.8.2.2 Atividade antifúngica das frações do extrato etanólico bruto (EB)

As frações oriundas do fracionamento do extrato etanólico bruto (EB) em coluna de sílica gel e aquelas procedentes do fracionamento de EB por extração seriada tiveram a atividade antifúngica avaliada. Os resultados da atividade antifúngica mostram que a CIM variou de > 256 a 4 µg/mL, sendo que FE apresentou melhores resultados de inibição (**Tabela 22**).

Tabela 22 - Concentração Inibitória Mínima das frações de EB contra fungos patogênicos de relevância clínica (CIM em µg/mL)

FRAÇÃO / CIM	<i>Candida</i> spp						<i>Cryptococcus</i> spp.	
	<i>C. albicans</i> (ATCC 18804)	<i>C. krusei</i> (ATCC 20298)	<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	<i>C. tropicalis</i> (ATCC 750)	<i>C. glabrata</i> (ATCC 90030)	<i>C. dubliniensis</i> (Cd28)	<i>C. neoformans</i> (ATCC 28957)	<i>C. gattii</i> (ATCC 32608)
FEB1	> 256	> 256	> 256	> 256	128	128	128	128
FEB2	64	64	128	64	128	128	128	128
FEB3	> 256	> 256	> 256	>256	64	64	64	64
FEB4	128	64	128	64	64	64	64	64
FEB5	64	64	128	64	64	64	64	64
FEB6	64	64	128	128	64	64	64	64
FEB7	128	64	128	128	64	64	64	64
FEB8	64	64	128	64	64	64	64	64
FEB9	128	128	128	128	64	64	128	128
FEB10	128	64	128	128	64	64	64	128
FEB11	128	128	128	128	64	64	64	64
FEB12	64	64	64	64	32	64	32	32
FEB13	32	32	64	64	32	64	32	32
FEB14	64	64	128	64	64	64	128	64
FEB15	128	64	128	64	64	64	64	64
FEB16	64	64	64	128	32	64	64	64
FH	64	64	128	64	64	64	64	64
FD	64	64	128	64	64	64	64	64
FAE	32	32	64	64	16	64	32	32
FB	32	16	32	32	8	32	16	16
FE	16	8	16	32	4	32	8	8
FEA	32	16	32	64	32	64	16	16

CIM indica menor concentração da amostra que inibiu 100% o crescimento microbiano; > Indica que a amostra não teve atividade de 100% de inibição na maior concentração testada.

Nota-se pela comparação dos resultados relacionados na **Tabela 21** com os da **Tabela 22** que as frações resultantes das extrações em Soxhlet foram menos ativas contra leveduras, indicando que este tipo de fracionamento foi menos eficiente na extração de compostos com atividade antifúngica. A extração via percolação apresenta menor risco de reações químicas e formação de artefatos.

As frações oriundas da extração seriada foram mais ativas contra as leveduras. Pode-se inferir que os compostos ativos ficaram retidos na sílica quando EB foi fracionado em coluna de sílica gel. As frações FB, FE e FEA foram mais efetivas na inibição do crescimento das leveduras. Entretanto, as frações FAE e FB foram selecionadas para serem refracionadas devido à polaridade e à quantidade de massa.

4.8.2.3 Atividade antifúngica do extrato bruto (EB) e das frações oriundas do fracionamento da fração acetato de etila (FAE) e da fração butanólica (FB)

Todas as frações oriundas do fracionamento de FAE e de FB apresentaram atividade antifúngica (**Tabela 23**). Para *C. albicans* a CIM variou de 64 a 128 µg/mL; para *C. krusei* variou de 16 a 128 µg/mL; para *C. parapsilosis* variou de 32 a 128 µg/mL; para *C. glabrata* variou de 4 a 64 µg/mL; para *C. dubliniensis* variou de 8 a 64 µg/mL; para *C. neoformans* variou de 16 a 128 µg/mL e para *C. gattii* variou de 4 a 64 µg/mL. Os melhores resultados de inibição foram contra as espécies de *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *C. gattii* e a fração com melhor resultado de inibição foi FAE11.

Os espectros de UV sugerem que as substâncias presentes em FAE11 são taninos (**Figura 31**), o que pode também ser observado pelo espectro de IV (**Figura 32**). O espectro de absorção na região do infravermelho obtido para a fração FAE11 (**Figura 32**) apresenta uma banda larga em 3238 cm⁻¹, característica de estiramento de O-H. Pode-se observar um pico acentuado em 2923 cm⁻¹, indicando estiramento de C-H alifático. O caráter aromático ficou evidenciado pela presença de três bandas na região entre 1606, 1512 e 1446 cm⁻¹, características de estiramento C=C de aromáticos. Observa-se que a amostra contém ésteres aromáticos devido ao sinal da banda característica do grupo carbonila conjugada: vibração de estiramento C=O em 1712 cm⁻¹ e C-O em 1309 e 1178 cm⁻¹.

Nota-se pelo espectro de IV que os picos são característicos de estruturas e grupos funcionais presentes nos taninos hidrolisáveis. A análise por CCD de sílica gel da fração FAE11, após revelação com cloreto férrico, resultou no surgimento de

manchas de coloração azul. Segundo Cunha (2005), os taninos hidrolisáveis apresentam coloração azul com esse revelador.

Tabela 23 - Concentração Inibitória Mínima de EB e das frações oriundas do fracionamento de FAE e de FB contra fungos patogênicos de relevância clínica (CIM em µg/mL)

FRAÇÃO / CIM	<i>Candida</i> spp					<i>Cryptococcus</i> spp.	
	<i>C. albicans</i> (ATCC 18804)	<i>C. krusei</i> (ATCC 20298)	<i>C. parapsilosis</i> (ATCC 22019)	<i>C. glabrata</i> (ATCC 90030)	<i>C. dubliniensis</i> (Cd28)	<i>C. neoformans</i> (ATCC 28957)	<i>C. gattii</i> (ATCC 32608)
EB	64	32	64	32	32	16	32
FAE1	64	128	NT	64	64	64	64
FAE2	64	128	NT	64	64	64	64
FAE3	64	64	128	32	64	64	32
FAE4	64	32	128	32	64	64	32
FAE5	64	64	128	32	64	64	32
FAE6	64	64	128	32	64	64	64
FAE7	64	64	128	32	64	64	64
FAE8	64	32	128	16	64	64	32
FAE9	128	64	64	8	64	64	32
FAE10	128	32	64	8	32	64	16
FAE11	64	16	32	4	8	32	4
FAE12	128	32	64	8	16	64	8
FAE13	128	16	32	4	8	128	8
FB1	64	32	NT	16	32	16	16
FB2	64	32	NT	32	64	16	16
FB3	64	128	NT	64	64	64	64
FB4	64	64	NT	64	64	32	64
FB5	64	128	NT	64	64	64	64
FB6	64	64	NT	64	64	64	64
FB7	64	64	NT	32	64	64	16
FB8	64	32	NT	32	64	64	4
FB9	64	64	NT	32	64	16	8
FB10	64	32	NT	16	64	64	8

CIM indica menor concentração da amostra que inibiu 100% o crescimento microbiano; NT indica não testado (principal fator foi a não viabilidade da cultura fúngica).

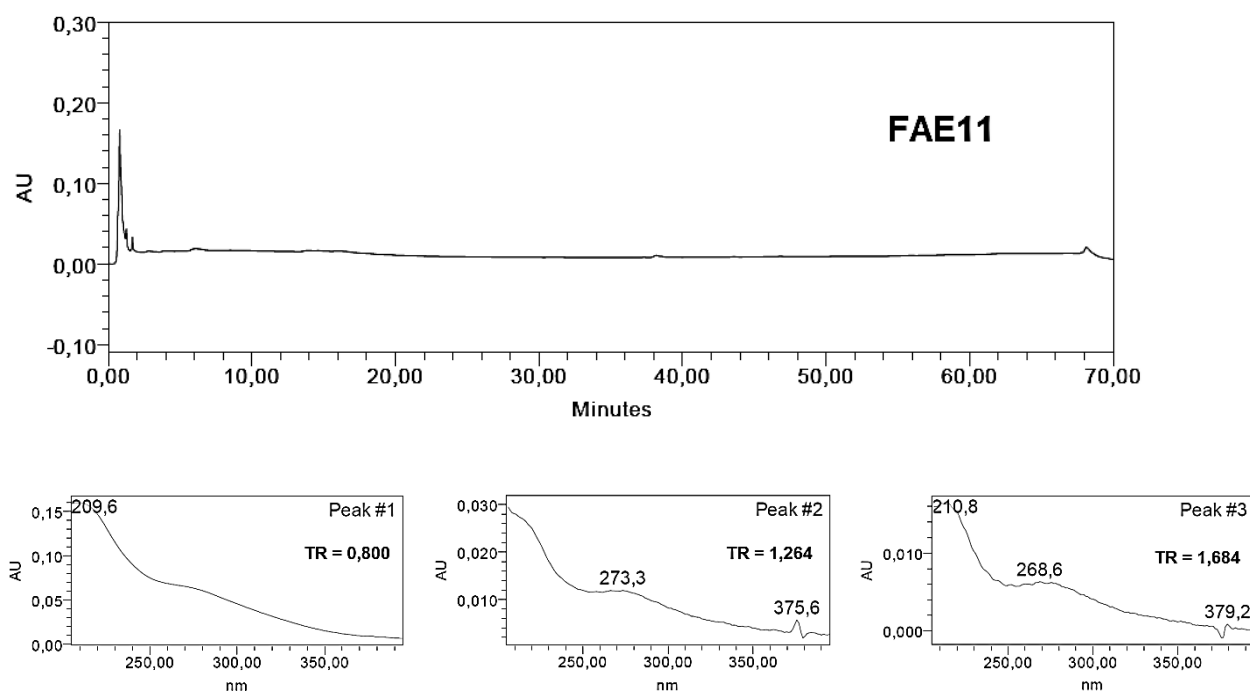


Figura 31 - Perfil cromatográfico de FAE11 a 210 nm e espectro de UV dos picos TR = 0,800, TR = 1,264 e TR = 1,684. Condições cromatográficas: vide item 3.6.6.2, pág. 54.

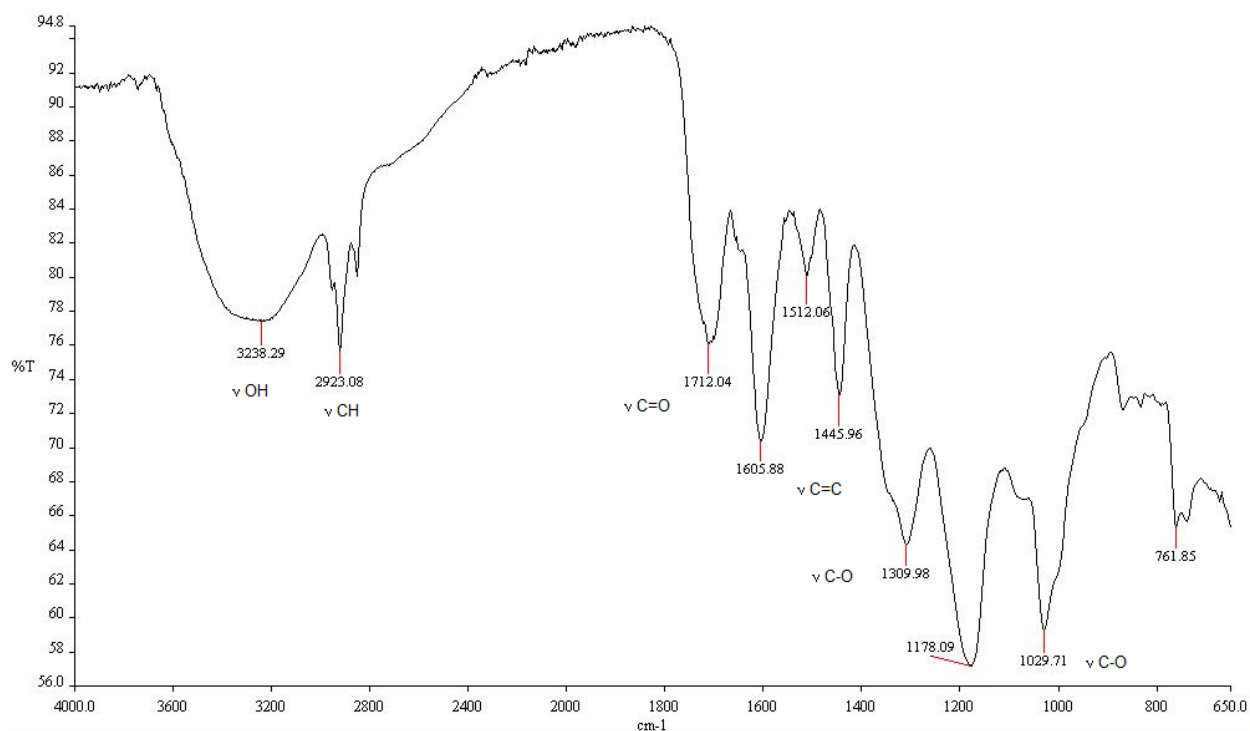


Figura 32 - Espectro no IV obtido para a fração FAE11.

Os componentes da fração FAE11 responsáveis pela atividade antifúngica podem ser polifenóis, particularmente taninos hidrolisáveis. Segundo os relatos de SIMÕES et al. (2004), existem três hipóteses para o mecanismo de ação antimicrobiana dos taninos: inibem as enzimas de bactérias e fungos e/ou complexam-

se com os substratos destas enzimas; agem sobre as membranas celulares dos microrganismos, modificando o seu metabolismo; complexam com íons metálicos, diminuindo, assim, a disponibilidade de íons essenciais para o metabolismo dos microrganismos.

Os taninos apresentam grande variabilidade de estruturas, tanto taninos condensados como hidrolisáveis, alta reatividade de suas subunidades com materiais oxidativos e complexação com macromoléculas o que torna o processo de isolamento, identificação e quantificação bastante complexo (MONTEIRO et al., 2005). A presença de compostos da classe dos taninos em *M. crenulata* demonstra a importância desta espécie, visto que esses compostos possuem diversas atividades biológicas e são amplamente utilizados nas indústrias.

A levedura *C. albicans* é a mais comum em infecções fúngicas oportunistas e a comparação dos resultados da CIM em relação às outras cepas testadas revela a dificuldade de se encontrar substância com atividade contra esta espécie. Os resultados de ensaio de atividade contra *C. glabrata* e *C. gattii* sugerem novas possibilidades de encontrar substâncias que podem ser utilizadas em formulações terapêuticas para o tratamento de infecções causadas por estas leveduras.

A literatura relata propriedades antimicrobianas de algumas espécies da família Melastomataceae, como por exemplo, *Marsetia* DC. (LEITE et al., 2012b), *Miconia* sp. (RODRIGUES et al., 2008), *Melastoma candidum* D. Don (WANG et al., 2008), *Tibouchina stenoscarpa* (FARIA et al., 2006). Contudo, este é o primeiro relato sobre a atividade antimicrobiana de espécie do gênero *Microlicia*.

4.8.3 Ensaio de atividade antiprotozoária e de citotoxicidade in vitro

4.8.3.1 Atividade antiprotozoária

Procederam-se aos ensaios com as frações de *M. crenulata* frente a cepas de *P. falciparum*, sendo esse protozoário pertencente a um grupo taxonomicamente não muito distante de outros que são veiculados por alimentos. As amostras de *M. crenulata* foram avaliadas em dois experimentos independentes e os resultados encontram-se resumidos nas **Tabelas 24 e 25**. Em uma triagem inicial, as amostras foram testadas em duas concentrações, 25 e 50 µg/mL.

De acordo com os resultados, as amostras foram classificadas como: **Muito ativas** - valores de CI_{50} abaixo de 1 µg/mL; **Ativas** - valores de CI_{50} de 1 até 15 µg/mL;

Moderadamente ativas - valores de CI_{50} entre 15,1 e 25 $\mu\text{g/mL}$; **Pouco ativas** - valores de CI_{50} entre 25,1 e 50 $\mu\text{g/mL}$; **Inativas** - CI_{50} acima de 50 $\mu\text{g/mL}$.

Tabela 24 - Percentual de redução (% Redução) do crescimento de *P. falciparum* cloroquina-resistente (W2) na presença de diferentes amostras

Conc. $\mu\text{g/mL}$	% Redução													
	FH	FD	FAE	FB	FE	FEA	FEB1	FEB2	FEB3	FEB6	FEB7	FEB8	FEB9	FEB10
50	79	80	25	24	27	33	9	5	79	98	85	79	81	87
25	37	68	14	19	6	22	5	2	44	87	82	77	55	65

Tabela 25 - Concentração inibitória de 50% do crescimento (CI_{50}) do clone W2 (cloroquina-resistente) de *P. falciparum* contra as amostras avaliadas

Amostras	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$) contra <i>P. falciparum</i> (cepa W2)	Classificação
FH	Entre 25 e 50	Pouco ativa
FD	12,74 \pm 1,23	Ativa
FAE	> 50	Inativa
FB	> 50	Inativa
FE	> 50	Inativa
FEA	> 50	Inativa
FEB1	> 50	Inativa
FEB2	> 50	Inativa
FEB3	Entre 25 e 50	Pouco ativa
FEB6	14,72 \pm 1,86	Ativa
FEB7	14,47 \pm 2,91	Ativa
FEB8	14,77 \pm 0,72	Ativa
FEB9	15,13 \pm 1,21	Moderadamente ativa
FEB10	14,98 \pm 1,47	Ativa
Cloroquina	0,132 \pm 0,015	Muito ativa

Entre quatorze amostras avaliadas, cinco foram ativas, uma moderadamente ativa, duas pouco ativas e seis inativas (**Tabela 25**). A cloroquina foi utilizada como antimalárico padrão, sendo considerada muito ativa com valor de $CI_{50} = 0,132 \mu\text{g/mL}$.

Apesar desses valores serem altos em comparação à cloroquina, o resultando é interessante por não se tratar de uma substância pura e ainda assim ser considerada ativa. Esse estudo permitiu evidenciar pela primeira vez a atividade antimalárica *in vitro* das frações de uma planta do gênero *Microlicia*. De acordo com Lehane & Saliba (2008) a flavona acacetina, isolada da fração diclorometânica (FD), possui atividade antiplasmódica.

Estudos de substâncias extraídas da flora e da fauna (bioprodutos) que possam ser utilizadas como matéria-prima no desenvolvimento de fitoterápicos para o tratamento de doenças é uma recomendação da Organização Mundial da Saúde (LIMA et al. 2012). A malária é uma doença parasitária provocada por protozoários do gênero *Plasmodium*. É transmitida para humanos pela picada de mosquito fêmea infectado do gênero *Anopheles*. Existem cinco espécies que infectam o homem: *Plasmodium falciparum*, *P. vivax*, *P. ovale*, *P. malariae* e *P. knowlesi*. Desses, os dois primeiros são os mais importantes. *P. falciparum* é o mais mortal enquanto *P. vivax* provoca muitos casos, mas poucas mortes (WHO, 2012).

De acordo com a OMS, a malária representa um problema mundial de saúde pública, uma vez que afeta milhões de pessoas nas regiões tropicais e subtropicais do planeta. Apesar da redução no número de casos e mortes por malária nos últimos anos, a OMS estima que 216 milhões de casos de malária ocorreram no mundo em 2010, desses 34 milhões (16%) aconteceram fora da África, sendo que 18,1 milhões (53%) foram devido a *P. falciparum*. A OMS também estima que 655000 mortes incidiram no mundo, dessas 46000 (7%) ocorreram fora da África (WHO, 2012).

A existência de cepas de *P. falciparum* resistente às drogas antimaláricas usuais tem justificado a incessante busca por novos medicamentos que tenham baixo custo, que sejam eficazes e com toxicidade reduzida (RIDDER et al., 2008). Historicamente, as plantas são fontes de fármacos antimaláricos. A quinina, um alcalóide extraído da casca da *Cinchona spp*, constituiu um modelo para síntese da cloroquina, um dos fármacos que mais foi empregado no tratamento da malária. A artemisinina, isolada da planta chinesa *Artemisia annua* L., e seus derivados semi-sintéticos são utilizados na quimioterapia antimalárica (BATISTA et al., 2009). Outro exemplo é a atovaquona, um análogo do lapachol, que é frequente em espécies de *Tabebuia* (BATISTA et al., 2009). Mariath et al. (2009) relatam que, das plantas da família Melastomataceae do continente americano analisadas quanto a atividade antimalárica, o extrato de *Miconia prasina* foi inativa, enquanto *Miconia racemosa* apresentou atividade. Omulokoli et al. (1997) pesquisaram a atividade antimalárica de plantas do continente africano e

constataram que *Dissotis brazzae* Cogn. (Melastomataceae) apresentou valor de $CI_{50} \leq 10 \mu\text{g/mL}$ frente a cepas de *P. falciparum* ENT36 (cloroquina-resistente).

4.8.3.2 Citotoxicidade e índice de seletividade

Os valores da concentração citotóxica que inibe 50% do crescimento (CC_{50}) de células HepG2 e do índice de seletividade (IS) calculados para as amostras estão apresentados na **Tabela 26**. Um valor de IS elevado sugere maior segurança da amostra, considerando que ela terá maior seletividade pelo parasita do que para a célula HepG2. As frações que possuem uma alta seletividade, com valores de $IS \geq 10$, seriam alternativas mais seguras para novas opções terapêuticas (LENTA et al., 2007; VONTHRON-SÉNÉCHEAU et al., 2003).

Tabela 26 - Valores de CC_{50} , CI_{50} e índice de seletividade calculado para as amostras

Amostra	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	IS
FD	220,56 \pm 10,47	12,74 \pm 1,23	17,31
FEB6	212,42 \pm 13,16	14,72 \pm 1,86	14,43
FEB7	228,05 \pm 73,49	14,47 \pm 2,91	15,76
FEB8	255,57 \pm 33,24	14,77 \pm 0,72	17,30
FEB9	291,25 \pm 14,75	15,13 \pm 1,21	19,25
FEB10	333,20 \pm 19,52	14,98 \pm 1,47	22,24
Cloroquina	164,68 \pm 13,31	0,132 \pm 0,015	1247,56

Observa-se que os valores de IS variaram de 14,43 a 22,24 para *P. falciparum* podendo, portanto, serem consideradas frações com maior seletividade pelo parasita do que para as células HepG2. O flavonoide acacetina foi isolado da fração FD. HSU et al. (2004) observaram que a acacetina inibi a proliferação de células HepG2 bloqueando a progressão e ciclo celular e induzindo a apoptose.

5 CONCLUSÕES

O óleo essencial de *M. crenulata* constitui-se de mistura complexa, formada principalmente por compostos terpênicos. A espécie apresenta ligeira variação do rendimento e da composição química do óleo essencial em função dos estágios fenológicos. Há necessidade da continuidade dos estudos, visto que alguns dos constituintes não identificados estão presentes em quantidade considerável.

Os perfis dos compostos voláteis foram diferentes quando a técnica empregada foi hidrodestilação ou HS-SPME. Essa divergência pode ser consequência de diversos fatores que diferenciam as duas técnicas.

O flavonoide isolado da fração diclorometânica de *M. crenulata* foi identificado como acacetina, sendo o primeiro relato da ocorrência dessa flavona para o gênero *Microlicia*.

M. crenulata apresentou considerável atividade antioxidante *in vitro* nos ensaios do DPPH e do ABTS. Os melhores resultados foram obtidos para a fração etanólica FE.

O óleo essencial apresentou moderada atividade inibitória frente a *P. aeruginosa*, *S. cerevisiae* e *A. flavus* e fraca atividade contra *A. niger*. Não foi capaz de inibir o crescimento de *B. cereus*, *E. coli* e *S. aureus*, assim como não foi ativo contra as espécies estudadas dos gêneros *Candida* e *Cryptococcus* na maior concentração testada (250 µg/mL).

As frações extraídas em aparelho de Soxhlet, fração metanólica e fração aquosa, apresentaram atividade moderada contra as cepas de *P. aeruginosa*. A fração acetato de etila apresentou fraca atividade contra *P. aeruginosa*. Para a bactéria *B. cereus*, os resultados obtidos demonstraram que as frações hexânica e diclorometânica apresentaram ação moderada sobre a referida bactéria. Nenhuma das frações testadas apresentou atividade contra *E. coli* e *S. aureus*.

As frações hexânica, metanólica e aquosa demonstraram boa atividade contra *S. cerevisiae*.

O extrato etanólico bruto e suas frações apresentaram boa atividade inibitória frente a leveduras. Os melhores resultados de inibição foram contra as espécies de *C. glabrata*, *C. dubliniensis* e *C. gattii* e a fração com melhor resultado de inibição foi FAE11. Os componentes da fração FAE11 responsáveis pela atividade antifúngica podem ser polifenóis, particularmente taninos hidrolisáveis.

Com relação à atividade antiplasmódica *in vitro*, entre quatorze amostras avaliadas cinco foram ativas, uma moderadamente ativa, duas pouco ativas e seis inativas. Apesar dos valores serem altos em comparação à cloroquina, o resultado é interessante por não se tratar de uma substância pura e ainda assim ser considerada ativa. As frações apresentaram atividade antiplasmódica *in vitro* e boa seletividade para o parasita em relação às células HepG2. Os resultados obtidos indicam que a espécie apresenta promissor potencial antimalárico, merecendo estudos mais detalhados sobre a sua composição química, com vistas ao isolamento de compostos ativos e elucidação de seu mecanismo de ação.

Em relação às atividades relatadas neste estudo verifica-se a necessidade de prosseguir com o isolamento dos princípios ativos, a fim de constatar se um único composto é o responsável pelas atividades ou se ocorre interação com outros compostos.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oils by Gas Chromatography/Mass Spectroscopy**. 4.ed. Carol Stream, IL: Allured Publishing Corporation, 2007. 804p.

AFANAS'EV, I. B.; DOROZHKO, A. I.; BRODSKII, A. V.; KOSTYUK, V. A.; PATAPOVITCH, A. I., Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochem. Pharmacol.**, v. 38, n. 11, p. 1763-1769, 1989.

ALNAJAR, Z. A. A.; ABDULLA, M. A.; ALI, H. M.; ALSHAWSH, M. A.; HADI, A. H. Acute toxicity evaluation, antibacterial, antioxidant and immunomodulatory effects of *Melastoma malabathricum*. **Molecules**, v. 17, p. 3547-3559, 2012.

AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J. A. Free radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chem.**, v. 84, n. 4, p. 551-562, 2004.

ASABE STANDARDS. American Society of Agricultural and Biological Engineers. **Moisture measurement – forages**. ASAE S358.2 FEB03. Adopted and published by: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2006. 608p.

AYRES, M. C. C.; BRANDÃO, M. S.; VIEIRA-JÚNIOR, G. M.; MENOR, J. C. A. S.; SILVA, H. B.; SOARES, M. J. S.; CHAVES, M. H. Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos da raiz de *Copernicia prunifera*. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 1, p. 90-97. 2008.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. **Food Chem. Toxicol.**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BARBEDO, L.S.; SGARBI, D. B. G. Candidíase. **J. Bras. Doenças Sex. Transm.** v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; CLEMENTE, A. D.; PAULA, V. F.; ISMAIL, F. M. D. Composition of volatile oils from *Schinus terebinthifolius* Raddi. **Quim. Nova**, v. 30, n. 8, p. 1959-1965, 2007.

BARRY, A. L.; THORNSBERRY, C. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: BALOWS, A.; HAUSER, W. J.; HERMANN, K. L.; ISENBERG, H. D.; SHAMODY, H. J. **Manual of clinical microbiology**. 5. ed. Washington: American Society for Microbiology, 1991. p. 1117-1125.

BATISTA, R.; SILVA JÚNIOR, A. J.; OLIVEIRA, A. B. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytomedicines. Part II. Non-Alkaloidal Natural Products. **Molecules**, v. 14, p. 3037-3072, 2009.

BATTESTIN, V.; MATSUDA, L. K.; MACEDO, G. A. Fontes e aplicações de taninos e tanases em alimentos. **Alim. Nutr.**, v. 15, n. 1, p. 63-72, 2004.

BEHLING, E. B.; SENDÃO, M. C.; FRANCESCATO, H. D. C.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alim. Nutr.**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BOLTRE, D. A.; SOARES, N. F. F.; ESPITIA, P. J. P.; SOUSA, S.; RENHE, I. R. T. Avaliação de filme incorporado com óleo essencial de orégano para conservação de pizza pronta. **Rev. Ceres**, Viçosa, v. 57, n. 3, p. 283-291, 2010.

BORGARI, T. F.; PEREIRA, G. R.; BRANDÃO, G. C.; OLIVEIRA, A. B.; SOUZA FILHO, J. D. Síntese de derivados triazólicos com potencial atividade antimalárica a partir do lupeol. **Orbital Elec. J. Chem.**, v. 4, suppl. 1, p. 21-22, 2012.

BORGES, L. L.; LÚCIO, T. C.; GIL, E. S.; BARBOSA, E. F. Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais. **Enciclopedia Biosfera**, v. 7, n. 12, p. 1-20, 2011.

BOMFIM-PATRÍCIO, M. C.; SALATINO, A.; MARTINS, A. B.; WURDACK, J. J.; SALATINO, M. L. F. Flavonoids of *Lavoisiera*, *Microlicia* and *Trembleya*

(Melastomataceae) and their taxonomic meaning. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 29, p. 711-726. 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução-RDC n. 3 de 18 de janeiro de 2012. Aprova o Regulamento Técnico “Listas de substâncias que os produtos de higiene pessoal, cosméticos e perfumes não devem conter exceto nas condições e com as restrições estabelecidas”. **Diário oficial**, Edição extra - Seção 1. Brasília, 18 janeiro 2012, p. 2-11.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual integrado de vigilância, prevenção e controle de doenças transmitidas por alimentos**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010. 158p. (Serie A. Normas e manuais técnicos).

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutritional significance. **Nutr. Rev.**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BUSATTA, C. **Caracterização química e atividade antimicrobiana *in vitro* e em alimentos dos extratos de orégano e manjerona**. Erechim: Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai das Missões. 2006. 93p. (Dissertação, Mestrado em Engenharia de Alimentos).

CASSIANO, D. S. A.; VIEIRA, I. J. C.; BRAZ-FILHO, R. Diterpenos labdanos isolados de *Microlicia hatschbachii* Wurdack (Melastomataceae). **33ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química**. Águas de Lindóia. 2010.

CASTILLO, L.; DÍAZ, M.; GONZÁLEZ-COLOMA, A.; ROSSINI, C. Differential activity against aphid settling of flavones obtained from *Clytostoma callistegioides* (Bignoniaceae). **Ind. Crops Prod.**, v. 44, p. 618-621, 2013.

CELOTTO, A. C.; NAZARIO, D. Z.; SPESSOTO M. A ; MARTINS, C. H. G.; CUNHA, W. R. Evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species. **Braz. J. Microbiol.**, v. 34, p. 339-340, 2003.

CHAN, M. M. Y. Antimicrobial effect of resveratrol on dermatophytes and bacterial pathogens of the skin. **Biochem. Pharmacol.**, v. 63, n. 2, p. 99-104, 2002.

CHAAR, J. S. **Estudos analíticos e modificação por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba duckei* Kostermans**. São Paulo: Universidade de São Paulo. 2000. 124p. (Tese, Doutorado em Química Analítica).

CHORIANOPOULOS, N. G.; GIAOURIS, E. D.; SKANDAMIS, P. N.; HAROUTOUNIAN, S. A.; NYCHAS, G. J. Disinfectant test against monoculture and mixed-culture biofilms composed of technological, spoilage and pathogenic bacteria: bactericidal effect of essential oil and hydrosol of *Satureja thymbra* and comparison with standard acid–base sanitizers. **J. of Appl. Microbiol.**, v. 104, n. 6, p. 1586–1596, 2008.

CLAUSING, G.; RENNER, S. S. Molecular phylogenetics of Melastomataceae and Memecylaceae: implications for character evolution. **Amer. J. of Bot.**, v. 88, n. 3, p. 486-498, 2001.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS). **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standard - sixth edition**. CLSI/NCCLS document M7-A6. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania. 2003a.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS). **Performance standards for antimicrobial disk susceptibility tests; approved standard - eighth edition**. CLSI/NCCLS document M2-A8. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania. 2003b.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI/NCCLS). **Performance standards for antimicrobial susceptibility testing; fifteenth informational supplement**. CLSI document M100-S15. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania. 2005.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi; Approved Standard-second edition**. CLSI document M38-A2. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, 2008a.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; approved standard-third edition.** CLSI document M27-A3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, 2008b.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). **Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts; third informational supplement.** CLSI document M27-S3. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, Pennsylvania, 2008c.

COMA, V. Bioactive packaging technologies for extendend shelf life of meat-based products. **Meat Science**, v.78, n. 1-2, p. 90-103, 2008.

CORRÊA, J. C. R.; SALGADO, H. R. N. Atividade inseticida das plantas e aplicações: revisão. **Rev. Bras. Pl. Med. Botucatu**, v. 13, n. 4, p. 500-506, 2011.

CRAVEIRO, A. A.; FERNANDES, A. G.; ANDRADE, C. H. S.; MATOS, F. J. A.; ALENCAR, J. W.; MACHADO, M. I. L. **Óleos essenciais de plantas do nordeste.** Fortaleza: UFC, 1981. 210p.

CUNHA, A. P. (coord.) **Farmacognosia e fitoquímica.** Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2005.

CUNHA Jr, A.; SCHEUERMANN, G. N. Perspectivas para a utilização de produtos de origem vegetal como aditivos alternativos na alimentação de aves. In: FÓRUM INTERNACIONAL DE AVICULTURA, 1., 2005, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: [s.n.], 2005. p. 166-174. Ave Expo Américas 2005.

CUNHA, N. L.; UCHÔA, C. J. M.; CINTRA, L. S.; SOUZA, H. C.; PEIXOTO, J. A.; SILVA, C. P.; MAGALHÃES, L. G.; GIMENEZ, V. M. M.; GROppo, M.; RODRIGUES, V.; SILVA FILHO, A. A.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; PAULETTI, P. M.; JANUÁRIO, A. H. In vitro schistosomicidal activity of some brazilian cerrado species and their isolated compounds. **Evid. Based. Complement. Alternat. Med.**, v. 2012, 8p. 2012.

CUNHA, W. R.; MATOS, G. X. de; SOUZA, M. G. M.; TOZANTTI, M. G.; ANDRADE e SILVA, M. L.; MATINS, C. H. G.; SILVA, R. da; SILVA FILHO, A. A. da. Evaluation of the antibacterial activity of the methylene chloride extract of *Miconia ligustroides*, isolated triterpenes acids, and usolic acids derivatives. **Pharm. Biol.**, v. 48, n. 2, p. 166-169, 2010.

CUNHA, W. R.; SANTOS, F. M.; PEIXOTO, J. A.; VENEZIANI, R. C. S.; CROTTI, A. E. M.; SILVA, M. L. A.; SILVA FILHO, A. A.; ALBUQUERQUE, S.; TURATTI, I. C. C.; BASTOS, J. K. Screening of plant extracts from the Brazilian Cerrado for their *in vitro* trypanocidal activity. **Pharm. Biol.**, v. 47, n. 8, p. 744-749, 2009.

CUNHA, W. R.; ARANTES, G. M.; FERREIRA, D. S.; LUCARINI, R.; SILVA, M. L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA FILHO, A. A.; CROTTI, A. E. M.; ARAÚJO, A. R. B. Hypoglycemic effect of *Leandra lacunosa* in normal and alloxan-induced diabetic rats. **Fitoterapia**, v. 79, p. 356-360. 2008a.

CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; SANTOS, F. M.; MONTENEGRO, I. M.; OLIVEIRA, A. R. A.; TAVARES, H. R.; SANTOS, H. S. L.; BIZÁRIO, J. C. D. In vitro inhibition of tumor cell growth by *Miconia fallax*. **Pharm. Biol.**, v. 46, p. 292-294, 2008b.

CUNHA, W. R.; CREVELIN, E. J.; ARANTES, G. M.; CROTTI, A. E. M.; SILVA, M. L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; ALBUQUERQUE, S.; FERREIRA, D. S. A Study of the trypanocidal activity of Triterpene acids isolated from *Miconia* species. **Phytother. Res.**, v. 20, p. 474-478, 2006.

CUNHA, W. R.; MARTINS, C.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E. M.; ALBUQUERQUE, S. In vitro trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. **Planta Med.**, v. 69, p. 470-472, 2003a.

CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; TURATTI, I. C. C.; FERREIRA, D. S.; BETARELLO, H. L. Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustroides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. **Rev. Bras. Farm.**, v. 84, n. 2, p. 47-49, 2003b.

DENIZOT, F.; LANG, R. Rapid colorimetric assay for cell growth and survival modifications to the tetrazolium dye procedure giving improved sensitivity and reliability. **J. Immunol. Methods**, v. 89, p.271-277, 1986.

DON, D. An illustration of the natural family of plants called Melastomataceae. Memoirs Wernerian Society. v. 4, p. 276-329. 1823.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria, **Planta Med.**, v. 64, n. 8, p. 711–713, 1998.

FABRI, R. L.; COIMBRA, E. S.; ALMEIDA, A. C.; SIQUEIRA, E. P. Essential oil of *Mitracarpus frigidus* as a potent source of bioactive compounds. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 84, n. 4, p. 1073-1080, 2012.

FABROWSKI, F. J.. ***Eucaliptus smithii* R. T. BAKER (Myrtaceae) como espécie produtora de óleo essencial no sul do Brasil**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 2002, 225p. (Tese, Doutorado em Engenharia Florestal).

FARIA, A. U.; SILVA, M. L. A.; MARTINS, C. H. G.; FURTADO, N. A. J. C.; VINHOLIS, A. H. C.; CUNHA, W. R. Atividade antimicrobiana in vitro de extratos brutos de *Tibouchina stenoscarpa* (melastomataceae) frente a microrganismos da cavidade bucal. **29ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química. Águas de Lindóia, 2006**.

Farmacopeia brasileira. 5. ed. Volume 1. Brasília: ANVISA/FIOCRUZ, 2010. 545p.

FENNELL, C. W.; LINDSEY, K. L.; McGAW, L. J.; SPARG, S. G.; STAFFORD, G. I.; ELGORASHI, E. E., GRACE, O. M.; van Staden, J. Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: pharmacological screening and toxicology. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, p. 205-217, 2004.

FONSCECA, M. C. M.; BARBOSA, L. C. A.; NASCIMENTO, E. A.; CASALI, V. W. D. Essential oil from leaves and flowers of *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini (Asteraceae). **J. Essent. Oil Res.**, v. 18, n. 3, p. 345-347, 2006.

FRANCO, B. D. G. M.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Editora Atheneu, 2002. 182p.

FRITSCH, P. W.; ALMEDA, F.; RENNER, S. S.; MARTINS, A. B.; CRUZ, B. C. Phylogeny and circumscription of the near-endemic Brazilian tribe Microlicieae (Melastomataceae). **Amer. J. of Bot.**, v. 91, p. 1105-1114, 2004.

FURTADO, R. A.; RODRIGUES, E. P.; ARAÚJO, F. R. R.; OLIVEIRA, W. L.; FURTADO, M. A.; CASTRO, M. B.; CUNHA, W. R.; TAVARES, D. C. Ursolic acid and oleanoic acid suppress preneoplastic lesions induced by 1,2-dimethylhydrazine in rat colon. **Toxicol. Pathol.**, v. 36, p. 576-580, 2008.

GAO, Z.; HUANG, K.; YANG, X.; SU, H. Free radical scavenging and antioxidant activities of flavonoids extracted from the radix of *Scutellaria baicalensis* Georgi. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1472, p. 643-650, 1999.

GIULIETTI, A. M., RAPINI, A.; ANDRADE, M. J. G.; QUEIROZ, L. P.; SILVA, J. M. C. (ORG.) **Plantas raras do Brasil**. Belo Horizonte: Conservação Internacional, 2009. 496p.

GEOCZE, K. C. **Análise exploratória de carotenóides, óleos essenciais e triacilglicerídios do pequi (Caryocar brasiliense Camb.) de municípios brasileiros situados no bioma cerrado**. Viçosa: Universidade Federal de Viçosa. 2011. 201p. (Tese, Doutorado em agroquímica).

HALLIWELL, B. Antioxidant defence mechanisms: from the beginning to the end (of the beginning). **Free Rad. Res.**, v. 31, p. 261-272, 1999.

HAMBURGER, M.; HOSTETTMANN, K. Bioactivity in plants: The link between phytochemistry and medicine. **Phytochemistry**. v. 30, n. 12, p. 3864-3874, 1991.

HARBONE, J. B. **Ecological biochemistry**. 4. ed. London: Academic Press, 1993. 318p.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **J. Nat. Prod.**, v. 59, p. 205-215, 1996.

HENRIQUES, B. O.; BRAGA, F. C.; CASTILHO, R. O. Avaliação da atividade antioxidante em modelo de DPPH de produtos naturais em microescala. In: **XXII Simpósio de Plantas Medicinais do Brasil**, Bento Gonçalves, 2012.

HSU, Y.; KUO, P.; LIN, C. Acacetin inhibits the proliferation of Hep G2 by blocking cell cycle progression and inducing apoptosis. **Biochem. Pharmacol.**, v. 67, p. 823-829, 2004.

IGNOATO, M. C.; FABRÃO, R. M.; SCHUQUEL, I. T. A.; BOTELHO, M. F. P.; SANTIN, S. M. O. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade anti-inflamatória de *Aeschynomene fluminensis* Vell. (Fabaceae). **Quim. Nova**, v. 35, n. 11, p. 2241-2244, 2012.

ITO, N.; HIROSE, M.; FUKUSHIMA, S.; TSUDA, H.; SHIRAI, T.; TATEMATSU, M. Studies on antioxidants: Their carcinogenic and modifying effects on chemical carcinogenesis. **Food Chem. Toxicol.**, v. 24, p. 1071-1082, 1986.

JAKIEMIU, E. A. R. **Uma contribuição ao estudo do óleo essencial e do extrato de tomilho (*Thymus vulgaris* L.)**. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. 2008. 89p. (Dissertação, Mestrado em Tecnologia de Alimentos).

JOFFRY, S. MOHD.; YOB, N. J.; ROFIEE, M. S.; AFFANDI, M. M. R. MEOR MOHD.; SUHAILI, Z.; OTHMAN, F.; AKIM, A. MD.; DESA, M. N. M.; ZAKARIA, Z. A. *Melastoma malabathricum* (L.) Smith ethnomedicinal uses, chemical constituents, and pharmacological properties: A review. **Evid.-based Complement. Alternat. Med.**, 2012. 48p.

KARAMAN, İ.; ŞAHİN, F.; GÜLLÜCE, M.; ÖĞÜTÇÜ, H.; ŞENGÜL, M.; ADIGÜZEL, A. Antimicrobial activity of aqueous and methanol extracts of *Juniperus oxycedrus* L. **J. Ethnopharmacol.**, v. 85, p. 231-235, 2003.

KHANBABAE, K.; Van REE, T. Tannins: classification and definition. **Nat. Prod. Rep.**, v. 18, p. 641-649, 2001

KOTZEKIDOU, P.; GIANNAKIDIS, P.; BOULMATIS, A. Antimicrobial activity of some plant extracts and essential oil against foodborn pathogens *in vitro* and on the fate of inoculated pathogens in chocolate. **Food Sci. Technol.**, London, 2007.

LEHANE, A. M.; SALIBA, K. Common dietary flavonoids inhibit the growth of the intraerythrocytic malaria parasite. **BMC Research.**, v. 1, n. 26, p. 1-5, 2008.

LEITE, T. C. C.; MARTINEZ, S. T.; UETANABARO, A. P. T.; SILVA, T. R. S.; BRANCO, A. The flavonol calycopterin from the antimicrobial ethyl acetate extract of *Marcetia latifolia*. **Chem. Nat. Comp.**, v. 48, n. 3, p. 474-476, 2012a.

LEITE, T. C. C.; SENNA, A. R.; SILVA, T. R. S.; SANTOS, A. K. A.; UETANABARO, A. P. T.; BRANCO, A. Antimicrobial activity of *Marcetia* DC species (Melastomataceae) and analysis of its flavonoids by reverse phase-high performance liquid chromatography coupled-diode array detector. **Pharmacogn. Mag.**, v. 8, n. 31, p. 209-214, 2012b

LENTA, B. N.; VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C.; SOH, R. F.; TANTANGMO, F.; NGOUELA, S.; KAISER, M.; TSAMO, E.; ANTON, R.; WENIGER, B. In vitro antiprotozoal activities and cytotoxicity of some selected Cameroonian medicinal plants. **J. Ethnopharmac.**, v. 111, p. 8-12, 2007.

LI, W. J.; CHENG, X. L.; LIU, J.; LIN, R. C.; WANG, G. L.; DU, S. S.; LIU, Z. L. Phenolic Compounds and Antioxidant Activities of *Liriope muscari*. **Molecules**, v.17, p. 1797-1808, 2012.

LIMA, A. B.; OLIVEIRA, A. B.; VIANA, G. H. R.; SILVA L. M.; VAROTTI, F. P. **Avaliação de produtos naturais para quimioterapia antimalárica. 64ª Reunião anual SBPC. São Luís, 2012.**

Lin, X. Cryptococcus neoformans: Morphogenesis, infection, and evolution. **Infection, Genetics and Evolution.** v. 9, n. 4, p. 401–416, 2009.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970, 354p.

MARIATH, I. R.; FALCÃO, H. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SOUSA, L. C. F.; TOMAZ, A. C. A.; BATISTA, L. M.; DINIZ, M. F. F. M.; ATHAYDE-FILHO, P. F. TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L. Plants of the American continent with antimalarial activity. **Rev. Bras. Farmacogn.** V. 19, n. 1a, p. 158-159, 2009.

MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: Antioxidantes naturais da família Lamiaceae. Aplicação em Produtos alimentícios. **Braz J. Food Technol**, v. 10, n. 2, p. 96- 103, 2007.

MARTINS, F. T.; SANTOS, M. H.; POLO, M.; BARBOSA, L. C. A. Chemical variation in the essential oil of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit, under cultivation conditions. **Quim. Nova**, v. 29, n. 6, p 1203-1209, 2006.

MARTINS, F. T.; SANTOS, M. H.; POLO, M.; BARBOSA, L. C. A. Effects of the interactions among macronutrients, plant age and photoperiod in the composition of *Hyptis suaveolens* (L.) Poit essential oil from Alfenas (MG), Brazil. **Flavour Fragr. J.**, v. 22, n. 2, p. 123-129, 2007.

MAZZANTI, G.; BATTINELLI, L.; SALVATORE, G. Antimicrobial properties of the linalol-rich essential oil of *Hyssopus officinalis* L. var *decumbens* (Lamiaceae). **Flav. Fragr. J.**, v. 13, n. 5, p. 289-294, 1998.

MELO, A. A. M. **Efeito de filme ativo incorporado com óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.) na conservação de carne de frango resfriada**. Goiânia: Universidade Federal de Goiás. 2010. 67p. (Dissertação, mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos).

MONTANARI, R. M.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; SILVA, C. J.; ANDRADE, N. J.; ISMAIL, F. M. D.; BARBOSA, M. C. A. Exposure to Anacardiaceae Volatile Oils and Their Constituents Induces Lipid Peroxidation within Food-Borne Bacteria Cells. **Molecules**, v. 17, p. 9728-9740, 2012.

MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P.; ARAÚJO, E. L. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Quim. Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-8996, 2005

MORAES, A. R. F.; GOUVEIA, L. E. R.; SOARES, N. F. F.; SANTOS, M. M. S.; GONÇALVES, M. P. J. C. Desenvolvimento e avaliação de filme antimicrobiano na conservação de manteiga. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 27, supl. 1, p. 33-36, 2007.

NKHOMA, S.; NOLYNEUX, M.; WARD, S. *In vitro* antimalarial susceptibility profile and *prcr*/*pfmdr-1* genotypes of *Plasmodium falciparum* field isolates from Malawi. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 76, n. 6, p. 1107-1112, 2007.

OJAGH, S. M.; REZAEI, M.; RAZAVI, S. H.; HOSSEINI, S. M. H. Development and evaluation of a novel biodegradable film made from chitosan and cinnamon essential oil with low affinity toward water. **Food Chem.**, v. 122, n. 1, p. 161-166, 2010.

OLIVEIRA, G. S. Estudo fitoquímico e avaliação das atividades antimicrobiana, citotóxica e inibitória das catepsinas B e K de *Miconia ferruginata* (Melastomataceae). Anápolis: Universidade Estadual de Goiás. 2010. 80p. (Dissertação, mestrado em Ciências Moleculares).

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; CARDOSO, M. G.; ALVES, E.; PICCOLI, R. H. Disinfectant action of *Cymbopogon* sp. essential oils in different phases of biofilm formation by *Listeria monocytogenes* on stainless steel surface. **Food Control**, v. 21, n. 4, p. 549-553, 2010a.

OLIVEIRA, M. M. M.; BRUGNERA, D. F.; PICCOLI, R. H. Biofilmes microbianos na indústria de alimentos: uma revisão. **Rev Inst Adolfo Lutz**, v. 69, n. 3, p. 277-284, 2010b.

OLIVEIRA, A. B.; DOLABELA, M. F.; BRAGA, F. C.; JÁCOME, R. L. R. P.; VAROTTI, F. P.; PÓVOA, M. M. Plant-derived antimalarial agents: new leads and efficient phytomedicines. Part I. Alkaloids. **An. Acad. Bras. Cienc.**, v. 81, n. 4, p. 715-740, 2009.

OLIVEIRA, L. M.; OLIVEIRA, P. A. P. L. V. Revisão: principais agentes antimicrobianos utilizados em embalagens plásticas. **Braz. J. Food Technol.**, v. 7, n. 2, p. 161-165, 2004.

OMULOKOLI, E.; KHAN, B.; CHHABRA, S. C. Antiplasmodial activity of four Kenyan medicinal plants. **J. Ethnopharm.**, v. 56, p. 133-137, 1997.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 18, n. 2, p. 301-307, 2008.

PANSERA M. R.; SANTOS, A. C. A.; PAESE, K.; WASUM, R.; ROSSATO, M. ROTA, L. D.; PAULETTI, G. F.; SERAFINI, L. A. Análise de taninos totais em plantas aromáticas e medicinais cultivadas no Nordeste do Rio Grande do Sul. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 13, n. 1, p. 17-22, 2003.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4. ed. São Paulo: Cengage Learning, 2012. 700p.

PAVIANI, E. R.; STADNIK, C. B.; HEINEK, I. Estudo da epidemiologia e perfil de sensibilidade da *Pseudomonas aeruginosa*. **Infarma**, v. 15, n. 11-12, p. 66-70, 2004.

PEIXOTO, J. A.; SILVA, M. L. A.; CROTTI, A. E. M.; VENEZIANI, R. C. S.; GIMENEZ, V. M. M.; JANUÁRIO, A. H.; GROppo, M.; MAGALHÃES, L. G.; SANTOS, F. F.; ALBUQUERQUE, S.; SILVA FILHO, A. A.; CUNHA, W. R. Antileishmanial activity of the hydroalcoholic extract of *Miconia langsdorffii*, Isolated compounds, and semi-synthetic derivatives. **Molecules**, v. 16, p. 1825-1883, 2011.

PIERONI, L. G.; REZENDE, F. M.; VALDECIR, F. X.; DOKKEDAL, A. L. Antioxidant activity and total phenols from the methanolic extract of *Miconia albicans* (Sw.) Triana leaves. **Molecules**, v. 16, p. 9439-9450, 2011.

PIETTA, G. Flavonoids as antioxidants. **J. Nat. Prod.**, v. 63, p.1035-1042, 2000.

PINTO, G. A. S.; COURI, S.; LEITE, S. G. F.; BRITO, E. S. Tanase: conceitos, produção e aplicação. **Bol. Cent. Pesq. Proc. Alim.** v. 23, n. 2, p. 435-462, 2005.

PINTO, T. J. A.; KANEKO, T. M.; OHARA, M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2003. 325p.

PINZON, L. C.; UY, M. M.; SZE, K. H.; WANG, M. CHU, I. K. Isolation and characterization of antimicrobial, anti-inflammatory and chemopreventive flavones from *Premna odorata* Blanco. **J. Med. Plants Research.**, v. 5, n. 13, p. 2729-2735, 2011.

POHLIT, A. M.; PINTO, A. C. S.; MACARI, P. Comparação da atividade antioxidante de 4-nerolidilcatecol, catecol e derivados acetilados. **XXVI Reunião Anual sobre Evolução, Sistemática e Ecologia Micromoleculares**. Instituto de Química, Universidade Federal Fluminense, Rio de Janeiro, 2004.

QUEIROZ, M. E. C.; LANÇAS, F. M. Análise de fármacos em material biológico: acoplamento microextração em fase sólida “no tubo” e cromatografia líquida de alta eficiência. **Quím. Nova**, v. 28, n. 5, p. 880-886, 2005.

RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Quim Nova**, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radic. Biol. Med.**, v. 26, n. 9-10, p. 1231–1237, 1999.

RESTELLO, R. M.; MENEGATT, C.; MOSSI, A. J. Efeito do óleo essencial de *Tagetes patula* L. (Asteraceae) sobre *Sitophilus zeamais* Motschulsky (Coleoptera, Curculionidae). **Rev. Bras. Entomol.**, v. 53, n. 2, p. 304-307, 2009.

RIBEIRO, A. F. C. **Avaliação das atividades antiinflamatória, antiangiogênica e antitumoral de extratos da *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlot**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais. 2012. 92 p. (Tese, Doutorado em Ciência Animal).

RIDDER, S.; KOOY, F. V. D.; VERPOORTE, R. Review - *Artemisia annua* as a self-reliant treatment for malaria in developing countries. **J. Ethnopharmacol.**, v. 120, n. 3, p. 302–314, 2008.

ROBARDS, K. Strategies for the determination of bioactive phenols in plants, fruit and vegetables. **Journal of Chromatography A**, v. 1000, p. 657-691, 2003.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Farmacognosia e farmacotecnologia**. São Paulo: Premier, 1997. 372p.

RODRIGUES, J.; MICHELIN, D. C.; RINALDO, D.; ZOCOLO, G. J.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; SALGADO, H. R. N. Antimicrobial activity of *Miconia* species (Melastomataceae). **J. Med. Food**. v. 11, n. 1, p. 120-126, 2008.

RODRIGUES, J. **Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção química-farmacológica em plantas superiores: *Miconia* spp.** Araraquara: Universidade Estadual Paulista. 2007. 154p. (Dissertação, mestrado em química).

ROJAS-GRAÜ, M. A.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; OLSEN, C.; FRIEDMAN, M.; HENIKA, P. R.; MARTÍN-BELLOSO, O.; PAN, Z.; MCHUGH, T. H. Effects of plant essential oils and oil compounds on mechanical, barrier and antimicrobial properties of alginate–apple puree edible films. **J. Food Eng.**, v. 81, n. 3, p. 634-641, 2007.

ROMERO, R. Taxonomic notes in *Microlicia* (Melastomataceae, Microlicieae). **Phytotaxa**, v. 110, n. 1, p. 48-54, 2013.

ROMERO, R. Revisão taxonômica de *Microlicia* sect. *Chaetostomoides* (Melastomataceae). **Rev. Bras. Bot.**, v. 26, n. 4, p. 429-435, 2003.

ROMERO, R.; WOODGYER, E. *Microlicia* in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2013. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB9787>. Acesso em 05 de maio de 2013.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects, and safety. **Annu. Rev. Nutr.**, v. 22, p. 19-34, 2002.

RUFINO, M. S. M.; FERNANDES, F. A. N.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S. Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. **Food Chem.**, v. 114, p. 693-695, 2009.

SAHM, D. F.; WASHINGTON II, J. A. Antibacterial susceptibility tests: Dilution methods. In: BALOWS, A.; HAUSER, W. J.; HERMANN, K. L.; ISENBERG, H. D.; SHAMODY, H. J. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, 1991. p. 1105-1116.

SALISBURY, F. B.; ROSS, C. W.; **Plant physiology**. 4. ed., Belmont: Wadsworth, 1992. 682p.

SANTOS, A. S.; BIZZO, H. R.; ANTUNES, A. M. S.; D'AVILA, I. A. A proteção patentária na utilização de óleos essenciais e compostos terpênicos para o desenvolvimento tecnológico e industrial. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 8, n. 4, p. 14-22, 2006.

SANTOS, B. R.; PAIVA, R.; CASTRO, E. M.; CARDOSO, M. G. Aspectos da anatomia e do óleo essencial em folhas de pindaíba (*Xylopiá brasiliensis* Spreng.). **Ciênc. Agrotec.**, v. 28, n. 2, p. 345-349, 2004.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P. MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciênc. Rural**, Santa Maria, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.

SARTORATTO, A. **Análise de constituintes voláteis de plantas aromáticas por microextração em fase sólida acoplada a cromatografia gasosa (SPME/CG)**. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Química. 2001. 86p. (Dissertação, Mestrado em Química).

SCHERER, R.; GODOY, H. T. Antioxidant activity index (AAI) by the 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chem.**, v. 112, p. 654-658, 2009.

SHOSHAIB, T.; SHAFIQUE, M.; DHANYA, N.; DIVAKAR, M. C. Importance of flavonoides in therapeutics. **Hygeia.J.D.Med.**, v. 3, p. 1-18, 2011.

SILVA, C. J.; BARBOSA, L. C. A.; DEMUNER, A. J.; MONTANARI, R. M.; PINHEIRO, A. L.; DIAS, I.; ANDRADE, N. J. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of Myrtaceae species planted in Brazil. **Quim. Nova**, v. 33, n. 1, p. 104-108, 2010.

SILVA, F.; SANTOS, R. H. S.; ANDRADE, N. J.; BARBOSA, L. C. A.; CASALI, V. W. D.; LIMA, R. R.; Passarinho, R. V. M. Basil conservation affected by cropping season, harvest time and storage period. **Pesq. Agropec. Bras.**, v. 40, n. 4, p. 323-328, 2005.

SILVA, F.; CASALI, V. W. D. **Plantas medicinais e aromáticas: Pós -colheita e óleos essenciais**. Viçosa: Editora UFV, 2000. 135p.

SILVA FILHO, A. A.; RESENDE, D. O.; FUKUI, M. J.; SANTOS, F. F.; PUALETTI, P. M.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L.A.; GREGÓRIO, L. E.; BASTOS, J. K. NANAYAKKARA, N. P. D. *In vitro* antileishmanial, antiplasmodial and cytotoxic activities of phenolics and triterpenoids from *Baccharis dracunculifolia* D. C. (Asteraceae). **Fitoterapia**, v. 80, p. 478-82, 2009.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004.1102p.

SIMÕES, C. M. O.; SPITZER, V. Óleos voláteis. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICKS, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5.ed. Porto Alegre/ Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004.

SIMON, C.; BARATHIEU, K.; LAGUERRE, M.; SCHMITTER, J-M.; FOUQUET, E.; PIANET, I.; DUFOURC, E. J. Three-dimensional structure and dynamics of wine tannin-

saliva protein complexes. A multitechnique approach. **Biochemistry**, v. 42, n. 35, p. 10385-10395, 2003.

SKANDAMIS, P.; TSIGARIDA, E.; NYCHAS, G. J. E. The effect of oregano essential oil on survival /death of *Salmonella typhimurium* in meat stored at 5° C under aerobic, VP/MAP conditions. **Food Microbiol.**, v. 19, p. 97-103, 2002.

SPESSOTO, M. A.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E. M.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R. Evaluation of the analgesic activity of extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). **Phytomedicine**, v. 10, p. 606-609, 2003.

SPRINGFIELD, E. P.; AMABEOKU, G.; WEITZ, F.; MABUSELA, W.; JOHNSON, Q. An assessment of two *Carpobrotus* species extracts as potential antimicrobial agents. **Phytomedicine**, v.10, n. 5, p.434-439, 2003.

TAKEMOTO, E.; FILHO, J. T.; GODOY, H. T. Validação de metodologia para a determinação simultânea dos antioxidantes sintéticos em óleos vegetais, margarinas e gorduras hidrogenadas por CLAE/UV. **Quim. Nova**, v. 32, n. 5, p. 1189-1194, 2009.

TANAKA, J. C. A.; SILVA, C. C.; DIAS FILHO, B. D.; NAKAMURA, C. V.; CARVALHO, J. E.; FOGGIO, M. A. Constituintes químicos de *Luehea divaricata* Mart. (Tiliaceae). **Quim. Nova**, v. 28, n. 5, p. 834-837, 2005.

TEIXEIRA, W. A. **Estudo de fatores ambientais atuantes na colonização vegetal espontânea de uma área minerada de ferro**. Belo Horizonte: Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. 1997. 108p. (Dissertação, Mestrado em Ecologia, conservação e manejo de vida silvestre).

TOUDAHL, A. B.; FILHO, S. A. V., SOUZA, G. H. B.; MORAIS, L. D.; dos SANTOS, O. D. H.; JÜGER, A. K. Chemical composition of the essential oil from *Microlicia graveolens* growing wild in Minas Gerais. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 22, n. 3, p. 680-681, 2012.

VALENTE, A. L. P.; AUGUSTO, F. Microextração por fase sólida. **Quím. Nova**, v. 23, n. 4, p. 523-530, 2000.

VAN ZYL, R. L.; SEATLHOLO, S. T.; VAN VUUREN, S. F.; VILJOEN, A. M. The biological activities of 20 nature identical essential oil constituents. **J. Essent.Oil Res.**, v. 18, p. 129-133, 2006.

VAROTTI, F. D; BOTELHO, A. C. C; ANDRADE, A. A; PAULA, R. C; FAGUNDES, E. M. S; VALVERDE, A; MAYER, L M U; MENDONÇA, J. S; SOUZA, M. V. N; BOECHAT, N; KRETTLI, A. U. Synthesis, antimalarial activity, and intracellular targets of MEFAS, a new hybrid compound derived from mefloquine and artesunate. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 52, n. 11, p. 3868–3874, 2008.

VASCONCELOS, M. A. L.; ROYO, V. A.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E. M.; SILVA, M. L. A.; CARVALHO, J. C. T.; BASTOS, J. K.; CUNHA, W. R. In vivo analgesic and anti-inflammatory activities of ursolic acid and oleanolic acid from *Miconia albicans* (Melastomataceae). **Z. Naturforsch.**, v. 61, p. 477-482, 2006.

VEIGA Jr, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quím. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VITTI, A. M. S.; BRITO, O. J. **Óleo essencial de eucalipto**. Piracicaba: ESALQ, 2003. 26p. (Documentos Florestais).

VONTHRON-SÉNÉCHEAU, C.; WENIGER, B.; QUATTARA, M.; BI, F. T.; KAMENAN, A.; LOBSTEIN, A., BRUN, R.; ANTON, R. In vitro antiplasmodial activity and cytotoxicity of ethnobotanically selected Ivorian plants. **J. Ethnopharmac.**, v. 87, p. 221-225, 2003.

WAGNER, H.; BLADT, S.; ZGAINSKY, E.M. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer-Verlag, 1984. 320 p.

WANG, K.; LUO, C.; LIU, H.; XU, J.; SUN, W.; ZHOU, L. Nematicidal activity of the alkaloids from *Macleaya cordata* against certain nematodes. **Afr. J. Agric. Res.**, v. 7, n. 44, p. 5925-5929, 2012.

WANG, YC.; HSU, HW.; LIAO, WL. Antibacterial activity of *Melastoma candidum* D. Don. **LWT-Food Sci. Technol.**, v. 41, p. 1793-1798, 2008.

WHO (World Health Organization). Defeating malaria in Asia, the Pacific, Americas, Middle East and Europe. **Progress & Impact Series**, n. 9, 2 v., 2012.

WHYSNER, J.; WANG, C. X.; ZANG, E.; LATROPOULOS, M. J.; WILLIAMS, G. M. Dose response of promotion by butylated hydroxyanisole in chemically initiated tumours of the rat forestomach. **Food Chem. Toxicol.**, v. 32, n. 3, p. 215-222, 1994.

WINK, M. Physiology of secondary product formation in plants. In: CHARLWOOD, B. V.; RHODES, M. J. C. Ed. **Secondary products from plant tissue culture**. Oxford: Clarendon Press, 1990. p. 23-41.

WOODS, G. L.; WASHINGTON, J. A. Antibacterial susceptibility tests: dilution and disk diffusion methods. In: MURRAY, P. R.; PFALLER, M. A.; TENOVER, F. C.; YOLKEN, R. H. (ed.). **Manual of clinical microbiology**. 6 ed. Washington: American society for microbiology, 1995. p. 1327-1341.

WU, H.; WU, W.; SUN, H.; QUI, G.; WANG, H.; WANG, P.; YALAMANCHILI, H. K.; WANG, J.; TSE, H.; LAU, C.; VANHOUTTE, P. M.; LI, G. Acacetin causes a frequency- and use-dependent blockade of hKv1.5 channels by binding to the S6 domain. **J. Mol. Cel. Cardiology**, v. 51, p. 966-973, 2011.

YOSHIDA, T.; AMAKURA, Y.; YOSHIMURA, M. Structural features and biological properties of ellagitannins in some plant families of the order Myrtales. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 11, p. 79-106, 2010.

YOSHIDA, T.; ITO, H.; Hipolito, I. J. Pentameric ellagitannin oligomers in melastomataceous plants—chemotaxonomic significance. **Phytochemistry**. v. 66, p. 1972–1983, 2005.

ZHAO, J.; DASMAHAPATRA, A. K.; KHAN, S. I.; KAN, I. A. Anti-aromatase activity of the constituents from damiana (*Turnera diffusa*). **J. Ethnopharmac.**, v. 120, p. 387-389, 2008.

ZGODA, J. R.; PORTER, J. R. A convenient microdilution method for screening natural products against bacteria and fungi. **Pharm. Biol.**, v. 39, n. 3, p. 221-225, 2001.