



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

RODRIGO RIBEIRO ROCHA

ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
E AS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E ANTIPROTOZOÁRIA
DO ÓLEO ESSENCIAL E DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE FOLHAS DE
QUALEA GRANDIFLORA E *QUALEA MULTIFLORA* MART.

UBERLÂNDIA
2014

RODRIGO RIBEIRO ROCHA

**ESTUDO DA COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS
E AS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E ANTIPROTOZOÁRIA
DO ÓLEO ESSENCIAL E DE EXTRATOS ETANÓLICOS DE FOLHAS DE
QUALEA GRANDIFLORA E *QUALEA MULTIFLORA* MART.**

Dissertação apresentada ao Programa de
Mestrado em Química, da Universidade
Federal de Uberlândia, como exigência
parcial para a obtenção do título de
Mestre em Química.

Orientador: Prof. Dr. Roberto Chang

UBERLÂNDIA
2014



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em
Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 201/PPQUI.

DATA: 28/8/2014

DISCENTE: Rodrigo Ribeiro Rocha

MATRÍCULA: 11212QMI015

TÍTULO DO TRABALHO: Estudo da composição química dos óleos essenciais e extratos etanólicos de folhas de Qualea grandiflora e Qualea multiflora Mart. e suas atividades antioxidantas, antimicrobiana e antiprotozoária.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Química de Produtos Naturais

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Estudo da composição química do óleo essencial de folhas de Qualea multiflora e Qualea grandiflora Mart. e suas atividades antioxidantas e antimicrobiana.

Às quatorze horas do dia vinte e oito de agosto do ano dois mil e quatorze, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Blyeny Hatalita Pereira Alves, do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Goiás, Welington de Oliveira Cruz e Roberto Chang, do Instituto de Química da UFU, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(a) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será Estudo da Composição Química dos Óleos Essenciais e as atividades antioxidantas, antimicrobiana e antiprotozoária do óleo essencial e de extratos etanólicos de folhas de Qualea Grandiflora e Qualea Multiflora Mart.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 45 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 17 horas e 30 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Blyeny H. Pereira Alves
IFET/Goiás

Prof. Dr. Welington de Oliveira Cruz
IQUFU

Orientador(a): Prof. Dr. Roberto Chang – IQUFU

Universidade Federal de Uberlândia - Avenida João Naves de Ávila, nº 2121, Bairro Santa Mônica - 38.408-144 - Uberlândia - MG
+55 - 34 - 3239-4385 cpgquimica@ufu.br <http://www.cpgquimica.iq.ufu.br>

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e à espiritualidade superior que me auxiliaram e me guiaram na realização desta dissertação, inspirando-me, e dando-me forças e ânimo para a conclusão deste trabalho, o qual tem grande importância para mim e para os meus familiares.

À minha querida e amada família, especialmente aos meus pais José Maria Rocha e Conceição Aparecida Xavier Rocha; aos meus irmãos José Ricardo, Raquel Ribeiro e Regiane Aparecida. Aos meus cunhados Daniel Vinicios da Rocha e Fábio Júnior Pereira; à Maria Sirlene Aparecida Mendes Rocha, á minha tia Regina de Souza Rocha Queiroz, aos sobrinhos e sobrinhas Gabriel Rocha Boaventura, Gabriela Mendes Rocha, Pedro Vitor Mendes Rocha e Rafaela Rocha Pereira, e demais familiares pelo incentivo e apoio incansáveis.

À minha madrinha Luiza de Resende, pelo seu apoio.

Ao meu orientador, Prof. Doutor Roberto Chang, por ter me recebido no grupo de pesquisa, pela orientação, paciência, ajuda, ensinamentos e incentivos.

Ao Prof. Doutor Alberto de Oliveira, pelas suas contribuições.

Ao Prof. Doutor Evandro Afonso do Nascimento, pelas contribuições no desenvolvimento do trabalho e nas análises dos óleos essenciais.

Aos Professores Sérgio Antônio Lemos de Moraes e Francisco José Tôrres de Aquino, pelos conhecimentos compartilhados durante as disciplinas.

Aos colegas, ex-colegas e amigos do Laboratório de Produtos Naturais, pelo apoio, especialmente à Mestre Fabiana Barcelos Furtado, e aos doutorandos Raquel Maria Ferreira de Sousa, Carla de Moura Martins, Mario Machado Martins e Yury Lugo de Oliveira.

Aos alunos de Iniciação Científica, pelo auxílio nas análises, especialmente ao João Afonso da Silva Neto, Gabriella Roquetti Guimarães Aloise e Andressa Mendonça Marincek.

Ao Prof. Doutor Glein Monteiro de Araújo, à técnica do Herbário Uberlandense da Universidade Federal de Uberlândia (HUFU), Lilian Flávia Araújo Oliveira, e à Maria Beatriz da Silva, do Instituto de Biologia da UFU, pela colaboração na identificação do material vegetal depositado no herbário.

Ao Prof. Doutor Rodrigo Alejandro Abarza Munoz, pelo apoio na realização dos ensaios de voltametria de pulso diferencial.

Ao Prof. Doutor Carlos Henrique Gomes Martins, do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca - LaPeMA, pela ajuda na realização das análises de atividade antimicrobiana.

Ao Prof. Doutor Luís Carlos Scalon Cunha, pelos ensinamentos e ajuda na realização de análises antimicrobianas.

Ao Prof. Doutor Cláudio Vieira da Silva, do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU, pelo suporte nas análises de citotoxicidade.

À Paulla Vieira Rodrigues e Mário Machado Martins, pela ajuda na realização das análises de atividade citotóxica no Instituto de Ciências Biomédicas, Laboratório de Tripanosomatídeos da Universidade Federal de Uberlândia.

Ao Prof. Doutor Ricardo Reis Soares da Faculdade de Engenharia Química (FEQ-UFU), pela permissão para a utilização do equipamento de CG/EM (convênio Petrobrás).

Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (IQUFU) e ao programa de Pós-Graduação em Química, por terem aceito e me concedido a oportunidade para frequentar o programa.

À secretaria do programa de pós-graduação Mayta Mamede Negreto Peixoto.

À FAPEMIG pelo apoio financeiro.

Agradeço também aos Diretores da Universidade Federal de Viçosa – Campus Viçosa (UFV) e Campus de Rio Paranaíba (UFV/CRP) e aos Chefes do Instituto de Ciências Agrárias (IAP), que me permitiram cursar a Pós-Graduação sem o prejuízo das minhas funções de trabalho.

Aos meus amigos e colegas Técnicos de Laboratório da Universidade Federal de Viçosa/Campus de Rio Paranaíba: Ana Paula dos Santos, Fábio Martins Campos, Gustavo Ribeiro, Jader Alves Ferreira, Mirlem Gonçalves Rocha, Roberta Gomes Prado, Vander Alencar de Castro, Vitangela Vieira Rocha, Vívian Raquel de Souza Miranda, pela ajuda, apoio e incentivo em sempre continuar.

Às minhas colegas e amigas do Instituto de Ciências Agrárias (IAP) da UFV/CRP, Regiane Victória de Barros Fernandes Botrel e Kátia Rodrigues de Oliveira Rocha pela ajuda, apoio e incentivo.

Agradeço à aluna bolsista da UFV/CRP, Amanda Luiza Teodoro.

Agradeço a todos aqueles que, direta ou indiretamente, me apoiaram na realização do curso de Mestrado.

RESUMO

Este estudo buscou investigar e determinar a composição química dos óleos essenciais das folhas das espécies de *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora* e Mart., avaliou o poder redutor total a partir da análise da voltametria por pulso diferencial, a atividade antimicrobiana frente a bactérias bucais aeróbias, e anaeróbias além de atividade antileishmania e citotoxicidade (células Vero). Verificou-se a atividade antioxidante dos extratos etanólicos de folhas através do método de sequestro de radical DPPH, β -caroteno/ácido linoleico, determinou a quantificação de Fenóis Totais, avaliou o poder redutor total a partir da análise da voltametria por pulso diferencial, atividade antimicrobiana frente a bactérias bucais aeróbias, e anaeróbias além de atividade antileishmania e citotoxicidade (células Vero). Com relação aos constituintes químicos dos óleos essenciais, notou-se a presença das seguintes classes de compostos, para a espécie *Qualea grandiflora*, são os sesquiterpenos oxigenados (36,6%), os monoterpenos oxigenados (12,2%) e aldeídos e ácidos carboxílicos que apresentam 4,9 % cada. Para a espécie *Qualea multiflora* monoterpenos oxigenados (29,3%), álcoois (19,5 %), aldeídos (12,2 %) e cetonas (7,3 %). Não se verificou atividade no ensaio de voltametria por pulso diferencial de amostras de óleo essencial de folhas das duas espécies. Quanto às atividades antioxidantes e o ensaio da quantificação de fenóis totais, verificou-se que os extratos etanólicos de folhas de *Qualea grandiflora* apresentaram melhores resultados de **CE₅₀** para ensaios antioxidantes de DPPH e β -caroteno do que para extratos etanólicos de folhas da espécie *Qualea multiflora*. A voltametria por pulso diferencial concordou com os resultados espectrofotométricos e com a voltametria por pulso diferencial. Para os extratos etanólicos e os óleos essenciais de folhas das duas plantas não foi observada atividade antimicrobiana contra bactérias bucais. Observou-se atividade antileishmania para *Qualea grandiflora* (**IC₅₀** $88 \pm 8 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *Qualea multiflora* (**IC₅₀** $69 \pm 4 \mu\text{g mL}^{-1}$) contra o parasita *Leishmania amazonensis* e baixa citotoxicidade em células Vero, em presença de amostras de óleo essencial de folhas. Não se observou a mesma atividade em extratos etanólicos de folhas. O desenvolvimento deste trabalho elucidou uma parte do conhecimento científico a respeito das espécies em estudo e a possível validação de seu uso medicinal. Futuramente este estudo poderá ajudar nos ensaios, testes, fabricação, comercialização e uso de medicamentos a partir de produtos derivados de plantas medicinais do cerrado, já que muitas delas são usadas na medicina popular. Bem como nos ensaios onde não houve atividade, novos ensaios poderão ser realizados com o intuito de se obter atividades.

Palavras-chave: *Qualea multiflora*. *Qualea grandiflora*. Atividade antioxidante. Atividade antimicrobiana. Antiprotozoária. Óleo essencial. Extrato etanólico. Folhas.

ABSTRACT

The purpose of this study was to assess the chemical composition of the essential oils obtained from leaves of *Qualea grandiflora* Mart. and *Qualea multiflora* Mart.. Was assessed the total reducing power by means of analysis of differential pulse voltammetry, antimicrobial activity toward aerobic and anaerobic oral bacteria, as well as of antileishmanial and cytotoxicity activities (Vero cells). Was also assessed the antioxidant activity of ethanolic extracts obtained from leaves by means of the sequestering of radical DPPH and β -carotene/linoleic acid based methods, and was determined the content of total phenols, was assessed the total reducing power by means of analysis of differential pulse voltammetry, antimicrobial activity toward aerobic and anaerobic oral bacteria, as well as of antileishmanial and cytotoxicity activities (Vero cells). Regarding the chemical constituents of essential oils, was found the presence of the following classes of compounds for *Qualea grandiflora*: oxygenated sesquiterpenes (36.6%), oxygenated monoterpenes (12.2%), and aldehydes and carboxylic acids, each found in around 4.9%. For *Qualea multiflora*, were found the oxygenated monoterpenes (29.3%), alcohols (19.5%), aldehydes (12.2%) and ketones (7.3%). There was no activity in the differential pulse voltammetry experiment of samples of essential oils obtained from leaves of both species. Regarding the antioxidant activity, and the experiment of determining the content of total phenols, the ethanolic extracts obtained from leaves of *Qualea grandiflora* showed better results of CE_{50} for antioxidant experiments of DPPH and β -carotene than the ethanolic extract obtained from leaves of *Qualea multiflora*. The differential pulse voltammetry was according to spectrophotometric results, and to differential pulse voltammetry. There was no antimicrobial activity of ethanolic extracts and essential oils obtained from leaves of both species toward oral bacteria. Was found antileishmanial activity for *Qualea grandiflora* (IC_{50} $88 \pm 8 \mu\text{g mL}^{-1}$) and *Qualea multiflora* (IC_{50} $69 \pm 4 \mu\text{g mL}^{-1}$) toward *Leishmania amazonensis*, and low cytotoxicity of Vero cells, with the presence of essential oils obtained from leaves. There was not found the same activity from ethanolic extracts obtained from leaves. The performing of this work showed a part of scientific knowledge related to the studied species, and the possible validation of their medicinal use. In the future, this study could help in the experimentation, testing, manufacturing, commercialization and use of medicines from products obtained from medicinal plants of the Cerrado, since nowadays, many of them are used in the popular medicine. In the experiments where there was no activity, further testing should be performed seeking to obtain activity.

Key-words: *Qualea multiflora*. *Qualea grandiflora*. Antioxidant activity. Antimicrobial activity. Antiprotozoa. Essential oil. Ethanolic extract. Leaves.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - Biomas do Brasil.....	15
FIGURA 2 - Fitofisionomias do Cerrado.....	17
FIGURA 3 - Tipos de vegetação do Cerrado	17
FIGURA 4 - Aspectos das <i>Qualeas</i>	21
FIGURA 5 - Estrutura de flavonoides isolados de extrato etanólico de folhas de <i>Qualea grandiflora</i>	22
FIGURA 6 - Árvore (a); folhas e tronco (b); fruto de <i>Qualea grandiflora</i> (c)	24
FIGURA 7 - Ramos com folhas e flores de <i>Qualea grandiflora</i>	25
Figura 8 - Árvore (a); folhas e tronco (b); flores (c); frutos da espécie <i>Qualea multiflora</i> (d).....	25
FIGURA 9 - Ramos de <i>Qualea multiflora</i> com suas folhas e flores.....	26
FIGURA 10 - Esquema de unidade de isoprenóides	27
FIGURA 11 - Estrutura de Monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos identificados em plantas do Cerrado	29
FIGURA 12 - Esquema de estruturas químicas de alguns diterpenos, triterpenos e do esteróide acdisona	30
FIGURA 13 - Esquema de mecanismo de redução do radical livre DPPH	32
FIGURA 14 - Esquema da oxidação do ácido linoléico	33
FIGURA 15 - Reação do ácido gálico e a formação do complexo com molibdênio ..	34
FIGURA 16 - Exsicatas de <i>Qualea grandiflora</i> (a) e <i>Qualea multiflora</i> (b)	41
FIGURA 17 - Fluxograma do preparo e obtenção do extrato etanólico a partir de amostras de folhas	43
FIGURA 18 - Aparelhos de destilação do tipo Clevenger para destilação com arraste de vapor	44
FIGURA 19 - Ensaio de voltametria por pulso diferencial, com os eletrodos de trabalho.....	49
FIGURA 20 - Placa de 96 poços	54
FIGURA 21 - Esquema de alguns compostos do óleo essencial de folhas de <i>Q. grandiflora</i> e <i>Q. multiflora</i>	64
FIGURA 22 - Medicamentos tradicionais usados no tratamento de Leishmaniose	68

FIGURA 23 - Amostra do extrato diluída em etanol com concentração de 2000 $\mu\text{g.mL}$, com tampão de perclorato de tetrabutilamônio.....	70
FIGURA 24 - Curva de calibração obtida no ensaio pelo método β -caroteno/ácido linoleico no comprimento de onda 470 nm.....	76
FIGURA 25 - Atividade antioxidante do extrato etanólico de <i>Qualea multiflora</i> pelo método β -caroteno/ácido linoleico	76
FIGURA 26 - Curva de calibração obtida no ensaio pelo método β -caroteno/ácido linoleico no comprimento de onda 470 nm.....	77
FIGURA 27 - Atividade antioxidante do extrato etanólico de <i>Qualea grandiflora</i> pelo método β -caroteno/ácido linoleico	77
FIGURA 28 - Concentração (ppm) dos extratos etanólicos de <i>Qualea grandiflora</i> em função da porcentagem de DPPH	79
FIGURA 29 - Concentração (ppm) dos extratos etanólicos de <i>Qualea multiflora</i> em função da porcentagem DPPH	80
FIGURA 30 - Curva de calibração do ensaio Fenóis Totais.....	82
FIGURA 31 - Voltametria por pulso diferencial. Tampão acetato.....	83
FIGURA 32 - Voltametria por pulso diferencial. Tampão fosfato.....	84

LISTA DE TABELAS

TABELA 1- Características das espécies <i>Qualea grandiflora</i> e <i>Qualea multiflora</i>	23
TABELA 2 - Teor de umidade das folhas para extração de óleo essencial	55
TABELA 3 - Massas e rendimentos de óleos essenciais obtidos por hidrodestilação	55
TABELA 4 - Porcentagem dos compostos dos óleos essenciais de folhas por grupos funcionais	56
TABELA 5 - Compostos identificados presentes nos óleos essenciais de folhas de <i>Qualea grandiflora</i> e <i>Qualea multiflora</i>	59
TABELA 6 - Resultados de óleo essencial do ensaio antimicrobiano contra organismos bucais	65
TABELA 7 - Resultado de citotoxicidade e atividade antileishmania de <i>Q. grandiflora</i> e <i>multiflora</i>	66
TABELA 8 - Umidade das folhas para o extrato etanólico	71
TABELA 9 - Rendimento do extrato etanólico de folhas	71
TABELA 10 - Resultado do ensaio antimicrobiano contra organismos bucais	72
TABELA 11 - Resultados de citotoxicidade e atividade antileishmania.....	74
TABELA 12 - Resultado de CE_{50} de β -caroteno.....	78
TABELA 13 - Resultado CE_{50} do ensaio pelo método do radical DPPH	80
TABELA 14 - Resultados do ensaio de teor de Fenóis Totais de plantas do Piauí comparadas com as duas <i>Qualeas</i>	81
TABELA 15 - Voltametria de extratos de uma planta do cerrado	85
TABELA 16 - Resultados dos ensaios DPPH, β -caroteno, teor de fenóis totais	86
TABELA 17 - Resultado de voltametria por pulso diferencial	87
TABELA 18 - Resultados de CE_{50} do ensaio pelo método do radical DPPH e teor de Fenóis Totais de plantas estudadas no Laboratório de Produtos Naturais da UFU/MG	88
TABELA 19 - Resultados dos ensaios antioxidantes pelo método DPPH e β -caroteno/ácido linoleico e teor de Fenóis Totais dos extratos etanólicos de folhas	89

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BHT	Butilhidróxitolueno
BHI	Brain Heart Infusion
IC₅₀	Concentração citotóxica: 50% de viabilidade celular
CE₅₀	Concentração eficiente. Quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH, β-caroteno em 50%.
CG/EM	Cromatografia gasosa/espectrometria de massas
CIM	Concentração inibitória mínima
CRP	Campus de Rio Paranaíba
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DC	Digluconato de clorexidina
DMSO	Dimetilsulfóxido
DP	Desvio padrão
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EAG	Equivalentes de ácido gálico
FEQ	Faculdade de Engenharia Química
FT	Fenóis totais
HEPES	Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazinaetanosulfônico
HUFU	Herbarium Uberlandense
IA	Índice aritmético
IAP	Instituto de Ciências Agrárias
IR	Índice de retenção
IS	Índice de Seletividade
LaPeMA	Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada
N.I.	Não identificado
ppm	partes por milhão
Potencial	Volts (V)
PBS	Phosphate buffered saline
Q	carga (C)
Q. m.	<i>Qualea multiflora</i>

Q. <i>multiflora</i>	<i>Qualea multiflora</i>
Q. <i>g.</i>	<i>Qualea grandiflora</i>
Q. <i>grandiflora</i>	<i>Qualea grandiflora</i>
TIC	Total ions chromatogram
TR	tempo de retenção
TSB	Tryptone soya broth
u.i.	Unidade de isoprenóide
UFV	Universidade Federal de Viçosa
UV-vis	Ultravioleta na região do visível
UFC	unidade formadora de colônia
β-caroteno	betacaroteno
µg.L⁻¹	micrograma por litro
µg.mL⁻¹	micrograma por mililitro
µC	microCoulomb
µg	micrograma
µA	microamper
L	litro(s)
g	grama

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Cerrado	15
1.2	Plantas medicinais	19
1.3	Caracterização de espécies do gênero <i>Quelea</i>.....	21
1.4	Óleos essenciais.....	26
1.5	Atividade antioxidante	30
1.5.1	<i>O Método de oxidação pelo sistema DPPH.....</i>	31
1.5.2	Método de oxidação pelo sistema β -caroteno/Ácido Linoleico	32
1.5.3	<i>Determinação do teor de Fenóis Totais.....</i>	33
1.5.4	<i>Voltametria por pulso diferencial</i>	34
1.6	Atividade antimicrobiana e produtos naturais.....	35
1.7	Considerações gerais sobre o ecossistema bucal.....	36
1.7.1	<i>Plantas com potencial antimicrobiano sobre microrganismos da cavidade bucal</i>	37
1.8	Atividade biológica contra <i>Leishmania</i>	38
2	OBJETIVOS	39
2.1	Objetivo geral.....	39
2.2	Objetivos específicos	39
3	METODOLOGIA.....	40
3.1	Análises químicas	40
3.2	Coleta, identificação e preparo do material vegetal	40
3.3	Obtenção e preparo do extrato etanólico	41
3.4	Obtenção e extração do óleo essencial por hidrodestilação	44
3.5	Separação, análise e identificação de constituintes dos óleos essenciais por CG/EM.....	45
3.6	Atividade antioxidante dos extratos etanólicos pelo método DPPH e cálculo de CE_{50}.....	45
3.7	Método de oxidação pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico e cálculo de CE_{50}.....	47
3.8	Voltametria por pulso diferencial	47
3.9	Determinação de Fenóis Totais	49
3.10	Determinação da atividade antimicrobiana	49
3.11	Preparo das amostras para o método de microdiluição	50
3.12	Preparo do inóculo	50
3.13	Preparo do fármaco	51
3.14	Controles usados	51
3.15	Métodos da microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima.....	51
3.16	Ensaios de atividade antileishmania	52

3.16.1	<i>Preparo das amostras</i>	52
3.16.2	<i>Teste de viabilidade celular</i>	52
3.16.3	<i>Cultura de células</i>	53
3.16.4	<i>Índice de seletividade</i>	53
3.17	Análise estatística	54
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	55
4.1	Resultados da determinação de umidade de folhas para extração de óleo essencial	55
4.2	Rendimentos dos óleos essenciais	55
4.3	Resultado Cromatografia gasosa	56
4.4	Resultado do ensaio de atividade antimicrobiana de óleo essencial	64
4.5	Resultado de atividade antileishmania dos óleos essenciais	66
4.6	Voltametria por pulso diferencial de óleo essencial	69
4.7	Umidade e rendimento de folhas para extrato etanólico	70
4.8	Resultado do ensaio de atividade antimicrobiana de extrato etanólico	71
4.9	Resultado de atividade antileishmania e citotoxicidade de extratos etanólicos de folhas	74
4.10	Resultados de atividade antioxidante de extratos etanólicos	75
4.10.1	<i>Método de oxidação pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico</i>	75
4.10.2	<i>Método do radical DPPH</i>	78
4.10.3	<i>Resultado do ensaio de Quantificação de Fenóis Totais</i>	81
4.10.4	<i>Voltametria por pulso diferencial</i>	83
5	COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DOS ENSAIOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS E VOLTAMETRIA POR PULSO DIFERENCIAL	86
6	CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS		93
APÊNDICE A - Tempos de retenção obtidos para padrões de alcanos (C8-C30)		106
ANEXO A - Meios de cultura e soluções utilizadas na determinação da atividade antimicrobiana		108
ANEXO B - Meio de cultura utilizado na determinação da atividade citotóxica		111

1 INTRODUÇÃO

1.1 Cerrado

Brasil possui uma área territorial de cerca de 8,5 milhões de quilômetros quadrados compostos pelos biomas Mata Atlântica, Cerrado, Pantanal, Amazônia, Caatinga e Pampa (Figura 1). O território brasileiro apresenta uma grande diversidade de solos e climas que favorecem a riqueza e a variedade de tipos de vegetação e espécies de flora distribuída nos diversos ecossistemas brasileiros (DIAS, 1992).

FIGURA 1 - Biomas do Brasil



Fonte: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2014)

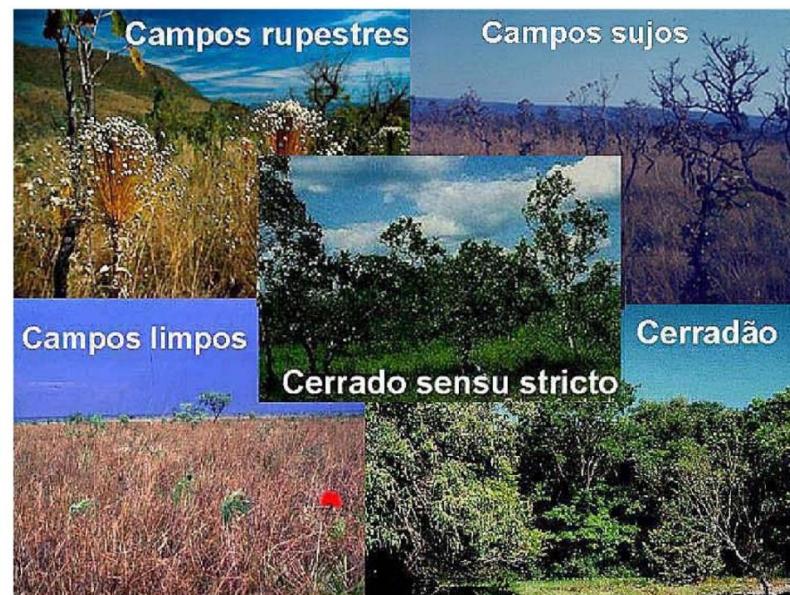
O Cerrado ocupa uma área de cerca de 2.036,448 milhões de hectares, ou aproximadamente 21 a 24% do território nacional, superado, em área, somente pela Amazônia. Assim sendo, é o segundo maior bioma do país, abrangendo os estados de Goiás, Minas Gerais, Tocantins, Piauí, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, e parte

dos estados do Paraná, Bahia, Ceará, Maranhão, Rondônia, Roraima, Amazônia, Pará, São Paulo e o Distrito Federal (BORLAUG, 2002; PINTO, 1994).

No estado de Minas Gerais, a cobertura vegetal pode ser dividida em quatro biomas principais, a saber, Mata Atlântica, Cerrado, Campos de Altitude ou Rupestres e Mata Seca. Diversos fatores, entre eles o clima, o relevo e as bacias hidrográficas, são determinantes na constituição das variadas vegetações mineiras. O Cerrado ocupa as regiões do Alto e Médio Jequitinhonha, Alto e médio São Francisco, Campo das Vertentes, Zona Metalúrgica, Triângulo e Alto Paranaíba, em relevo plano ou suavemente ondulado (MENDONÇA; LINS, 2000).

A alta diversidade biótica nesse território é resultado da abundante diversidade de solos e climas (COUTINHO, 1978; DIAS, 1992). As principais formações do cerrado são constituídas de plantas herbáceas e arbóreas (COUTINHO, 1978; RIZZINI, 1963), as quais respondem diferentemente a numerosos fatores climáticos como a temperatura, o vento, a chuvas, etc. A estrutura do Cerrado compreende basicamente dois grupos: (i) o superior, formado pelas árvores e arbustos; e (ii) o inferior, composto por um tapete de gramíneas. As árvores do Cerrado atingem, em média, dez metros de altura, apresentam casca grossa, com troncos e galhos retorcidos, protegidas às vezes por uma camada de cortiça, troncos, galhos e copas irregulares. Muitas possuem folhas coriáceas (dura como couro), que de tão duras chegam a chocalhar com o vento; em outras, as folhas atingem dimensões enormes e caem ao fim da estação seca. Um exemplo típico desta vegetação ocorre com a *Qualea parviflora* (SOUZA; COIMBRA, 2005), espécie do mesmo gênero que a *Qualea grandiflora* e a *Qualea multiflora*. Observa-se que as folhas de *Qualea multiflora* também secam e caem na estação mais fria do ano. A Figura 2 apresenta as fitofisionomias do cerrado. A Fitofisionomia é característica da vegetação que se encontra em determinado lugar; o aspecto dessa vegetação a particularidade vegetal ou a flora típica de uma região (DICIONÁRIO..., 2014).

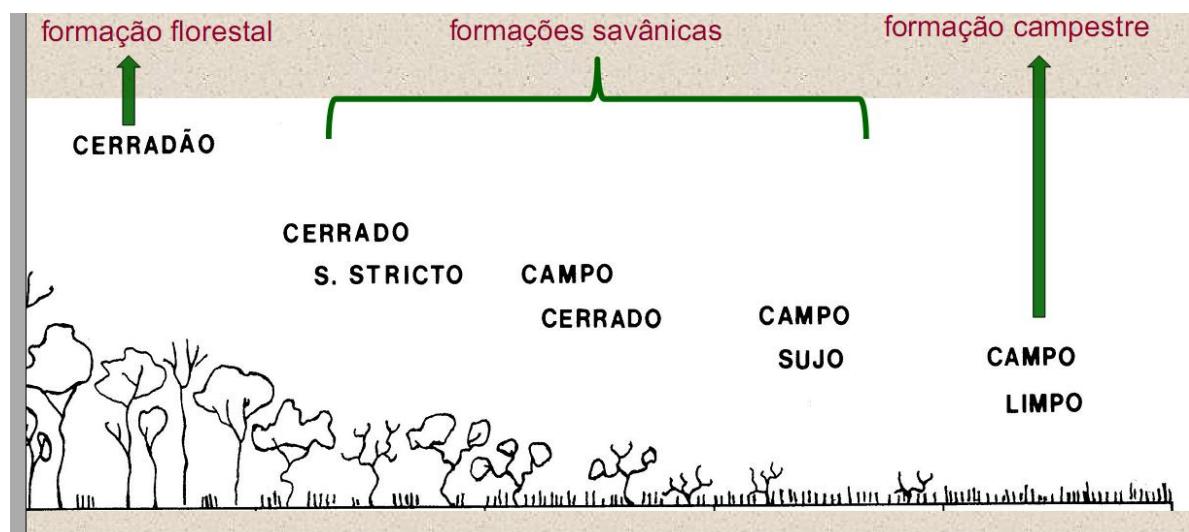
FIGURA 2 - Fitofisionomias do Cerrado



Fonte: Universidade Federal de Viçosa - UFV (2014).

A Figura 3 apresenta tipos de cerrado de acordo com Coutinho (1978).

FIGURA 3-Tipos de vegetação do Cerrado



Fonte: Coutinho (1978)

O Cerrado abriga uma flora que ultrapassa 12 mil espécies, das quais parte significativa apresenta valor alimentício e/ou medicinal (DEUS, 2011; PEREIRA et al., 2012). Apesar da importância ecológica e econômica, esse espaço vem sendo gradativamente devastado devido, principalmente, à ocupação e utilização desordenadas dos recursos nele contidos, o que leva a um processo de degradação

do seu quadro natural. Segundo Machado et al. (2004), caso não sejam tomadas medidas racionais de aproveitamento, o bioma poderá desaparecer até 2030. Algumas visões mais otimistas sugerem que esse ambiente pode encolher em torno de 8 %, com perdas de aproximadamente 160 mil quilômetros quadrados até 2050 (SASSINE, 2013).

Além das alterações causadas pelos fatores humanos no meio em que estão inseridos, resultantes da ampliação das áreas para plantio, seja para produção de grãos para exportação ou para o consumo interno, as alterações são também resultantes dos fatores ambientais de mudanças climáticas, tais como as secas prolongadas ou chuvas em excesso e/ou mal distribuídas, e de invernos mais quentes ou mais secos, que influenciam na perda de vegetação típica do Cerrado. Com isso, muitas plantas que eventualmente possuam potencial medicinal e farmacológico, não poderão ser testadas e usadas como matéria prima para o estudo e para a produção de fármacos pelas indústrias especializadas.

Neste horizonte de expectativas, acredita-se que ainda há muito a ser estudado com relação às plantas medicinais do Cerrado, pois, o bioma tem uma característica especial, seja por sua vasta extensão de terras, flora e fauna, seja pela ameaça de devastação, o que pode representar uma enorme perda de uma grande carga de propriedades farmacológicas promissoras (CARVALHO; RODRIGUES, 2007).

A conversão das áreas naturais do Cerrado em campos agrícolas, especialmente em canaviais, e o represamento das águas, tem reduzido bastante o ambiente, sem que ocorra o conhecimento das espécies existentes e seus constituintes químicos, principalmente, quando comparada à diversidade e à área ocupada.

O fraco conhecimento da flora da savana brasileira acarreta uma grande perda de conhecimento sobre o uso medicinal das plantas, uma vez que se estima que cerca de 40 % do bioma já foi devastado, e que o Cerrado possui somente cerca de 1,5 % de sua extensão protegida por lei. O Cerrado é, no entanto, a vegetação que está sob maior risco de extinção no país (GUARIM NETO; MORAIS, 2003).

Em um estudo realizado no Triângulo Mineiro sobre seis veredas, cinco das quais situadas no município de Uberlândia/MG e outra no município de Uberaba/MG (OLIVEIRA, 2005), foram catalogadas 435 espécies de 197 gêneros pertencentes a

62 famílias, das quais muitas ainda são pouco estudas e outras ainda nem foram estudadas.

As espécies, objeto deste estudo, são exemplares do Cerrado e, como tal, devem ser preservadas, pois há poucos estudos sobre elas, sendo, portanto, importante a conservação desses indivíduos, bem como de todo o bioma. A revisão de literatura sobre o tema indicou que, até a atualidade, ainda não foram encontrados trabalhos que abordam sobre a composição química dos óleos essenciais, e há poucos nos quais foi avaliada a atividades biológicas de *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora*, espécies citadas, inclusive, em Hiruma-Lima et al. (2006) e Santos et al. (2011).

Contudo, a possível produção de fármacos a partir de óleos essenciais de plantas, bem como a sua comercialização, poderão contribuir para o conhecimento e possível introdução de novos produtos no mercado, a partir da flora local. Deste modo, o presente trabalho é relevante na medida em que poderá servir para novas aplicações dos recursos vegetais presentes no Cerrado.

1.2 Plantas medicinais

Uma planta pode ser considerada medicinal quando possui substâncias em uma ou mais partes que podem ser aproveitadas para fins terapêuticos, ou como precursores de fármacos semissintéticos (PINTO; MACIEL; VEIGA JÚNIOR, 2005).

A história do uso de plantas no tratamento de enfermidades é tão antiga quanto a história da humanidade. A medicina popular e o conhecimento da flora medicinal, passada pelos ancestrais, bem como seus diagnósticos perderam seus significados com o processo de modernização, mas o uso informal e frequente de plantas para curar doenças continua até os tempos atuais (PINTO, 2008).

Na China, há registros com mais de 5 mil anos sobre recursos naturais utilizados em tratamentos terapêuticos. O sistema medicinal chinês baseia-se na mistura de diferentes plantas e até mesmo de produtos de origem animal ou mineral para que os compostos neles presentes interajam entre si, promovendo sinergias e consequente cura da doença alva do tratamento (ELVIN-LEWIS, 2001; YONG; LING, 2006).

Diante desse panorama, é possível pensar na fitoterapia como sendo uma alternativa e complemento para os tradicionais tratamentos de doenças. Nesse

sentido, existem programas de farmácia de fitoterápicos que são produzidos exclusivamente à base de plantas medicinais (JESUS, 2008), e que são muito procurados e bem recebidos pela população. Estima-se que, no Brasil, cerca de 80 % da população faz uso de produtos de origem natural, com base em plantas medicinais (FOGLIO et al., 2006).

Apesar deste alto consumo de plantas medicinais, ainda prevalece a falta de conhecimento quanto aos seus compostos e sua toxicidade, embora saiba-se que é importante para a proteção de pacientes submetidos ao tratamento com recurso a essas plantas (PINTO; MACIEL; VEIGA JÚNIOR, 2005).

Folhas e raízes de plantas sempre foram utilizadas para a obtenção de bebidas. Muitas são objetos de pesquisas com potencial para a produção de princípios ativos que poderão servir de novos fármacos e/ou precursores de novos fármacos. Estudos, no entanto, partem deste conhecimento, o qual pode ser comprovado ou não por pesquisas científicas, tal é o caso do uso do “boldo” em uma comunidade da Paraíba e em outras do país. Esta, não tem informação sobre os riscos do uso de bebidas obtidas dessa planta, os quais podem refletir-se em efeitos colaterais tais como a intoxicação. Nesse sentido, Oliveira e Gonçalves (2006) afirmam que o desconhecimento por parte da população sobre a toxicidade de espécies habitualmente utilizadas pode resultar em graves problemas à saúde dos seus usuários, pelo que faz-se necessário desenvolver ações socioeducativas.

Outro exemplo é o chá das folhas de erva-mate, rico em cafeína e compostos fenólicos, largamente usado como bebida em todo mundo. Este chá é capaz de reduzir as células de câncer do cólon em 50%, em decorrência dos compostos fenólicos e da atividade antioxidante dos compostos quimioprotetores nele existentes (DE MEJÍA et al., 2010).

Ayres et al. (2008), referem que a casca e folhas de *Qualea grandiflora* têm efeitos medicinais, e os frutos resultam em matéria tintorial amarela. A infusão ou decocção das folhas de *Q. grandiflora* é usada no tratamento de diarréia com sangue, cólicas intestinais e contra amebíase.

Carvalho et al. (2008), pesquisando sobre plantas medicinais, referem que foram encontrados 512 medicamentos fitoterápicos registrados no Brasil, sendo a maioria de plantas não nativas da América do Sul. Segundo Iacono (2014), Brasil possui aproximadamente 3000 plantas com potencial de cura; o que torna

necessário desenvolver mais pesquisas envolvendo plantas medicinais com uso popular difundido.

1.3 Caracterização de espécies do gênero *Qualea*

a) Gênero *Qualea*

O gênero *Qualea* pertence à família das Vochysiaceae. Apresenta duas subfamílias, seis gêneros e aproximadamente 200 espécies de árvores tropicais, das quais três são comuns no cerrado brasileiro, nomeadamente, *Q. grandiflora*, *Q. multiflora* e *Q. parviflora*. Os habitantes locais usam *Qualea grandiflora* e *Q. multiflora* como fontes de cura na medicina popular para úlceras externas, doenças gástricas e inflamações (SANTOS, 2006; SANTOS et al., 2011).

De acordo com Ayres et al. (2008), foram identificados, na família das Vochysiaceae, alguns compostos orgânicos tais como flavonoides, triterpenos, esteroides, taninos, benzoquinonas e antraquinonas. Nasser et al. (2013) relatou que foram realizados estudos fitoquímicos com o gênero *Qualea*, onde foram identificados ácidos graxos, polissacarídeos, taninos, compostos pirogálicos, catequínicos, flavonoides, terpenoides e derivados do ácido elágico.

A Figura 4 ilustra folhas, frutos e sementes do gênero *Qualea*.

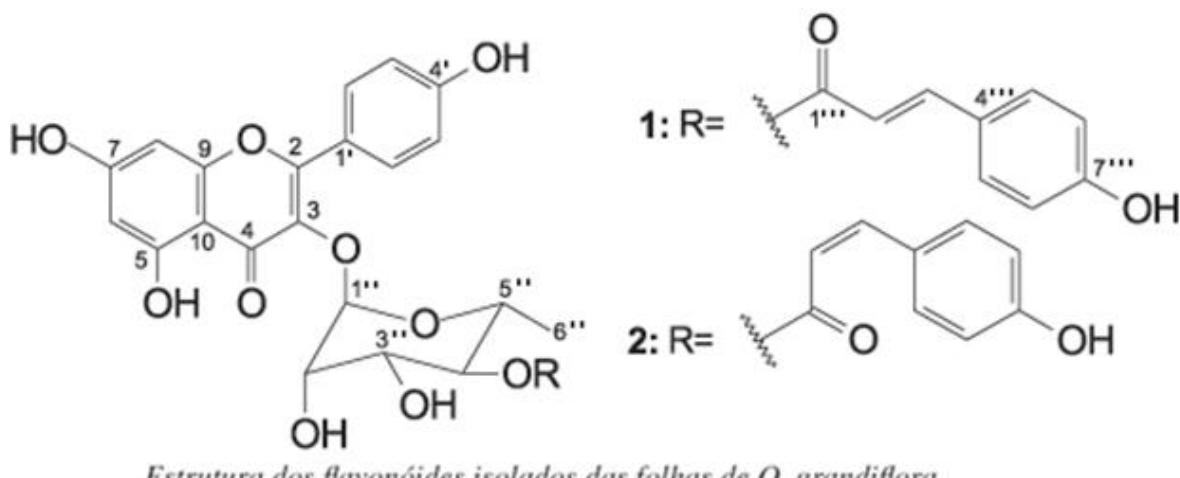
FIGURA 4 - Aspectos das *Qualeas*



Fonte: Herbários Online (2014)

A Figura 5 ilustra a estrutura de flavonóides isolados de extratos etanólicos de folhas de *Q. grandiflora* (AYRES et al., 2008).

FIGURA 5- Estrutura de flavonoides isolados de extrato etanólico de folhas de *Qualea grandiflora*



Fonte: O autor.

b) As espécies *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora* Mart.

Segundo Silva Júnior (2010), *Qualea* é a latinização do nome popular qualé, e *grandiflora*, do latim *grandis* = grande, enquanto que *flora* = flor, ou seja, uma planta que tem flor grande. O nome pau-terra é em referência à madeira frágil.

A espécie *Q. grandiflora*, também conhecida como Ariauá (PA), pau-terra-do-campo, pau-terra-do-cerrado, e pau-terra-folha-grande é uma árvore ornamental, com ramos em geral grossos, troncos tortuosos e casca áspera. Pode ser encontrada desde a Amazônia até São Paulo, Minas Gerais, Goiás e Mato Grosso do Sul, podendo alcançar 20 metros de altura, com tronco tortuoso e casca grossa.

A espécie *Q. multiflora* é uma árvore que pode alcançar 4 a 6 metros de altura, com 15 a 25 cm de diâmetro, de grande distribuição pelo Cerrado, embora pode ser encontrada em outros Estados. É vulgarmente conhecida como pau-terra-liso, boizinho, pau-terra, bagre, cinzeiro. Possui porte arbustivo-arbóreo e é utilizada na medicina popular para o tratamento de úlceras, gastrites, amebíase, diarreia com sangue, cólicas intestinais e inflamações (LORENZI, 2002).

A espécie *Q. grandiflora* possui flores amarelas e, além das folhas, produz frutos maiores do que as da espécie *Q. multiflora*. As flores da espécie *Qualea multiflora*, por sua vez, são amarelas e brancas com pintas vermelhas, por isso *multiflora* (HERBÁRIO..., 2014).

Segundo Silva Júnior (2010), a floração da *Qualea grandiflora* inicia-se na época das chuvas, momento em que ocorre o brotamento das novas folhas, normalmente, de setembro a outubro. O processo de maturação dos frutos demora quase um ano, depois do qual as folhas caem, e as sementes são espalhadas pelo vento. Os frutos secos podem ser usados no artesanato local e, por ser uma planta melífera, a goma pode ser utilizada na alimentação animal. Os frutos verdes e as raízes podem ser usados como corantes de cor amarela. Popularmente, as infusões de casca podem ser usadas para curar feridas e inflamações, enquanto que as folhas podem ser usadas para tratar diarréias, cólicas e amebas.

De acordo com Almeida et al. (1998), a casca, entrecasca e as folhas de *Q. grandiflora* são usadas como adstringente, antidiarreico e para a higienização de úlceras externas e inflamações.

Algumas características diferentes entre as duas espécies de *Qualeas* são apresentadas na Tabela 1.

TABELA 1- Características das espécies *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora*

Espécies e características	<i>Qualea grandiflora</i>	<i>Qualea multiflora</i>
Altura (m)	7 a 12 chegando a 20	4 a 6
Diâmetro do tronco (cm)	30 a 40	15 a 25
Densidade da madeira (g.cm ⁻³).	0,69 (moderadamente pesada)	0,66 (macia)
Folha (cm)	10 a 15	5 a 10 de comprimento por 2 a 4 de largura
Floração	Novembro a Janeiro	Novembro a Dezembro
Maturação dos frutos	Agosto a setembro	Julho a Agosto
Distribuição	PA, AM, AC, MA, PI, CE, BA, MT, GO, MG, SP, PR	MA, PI, BA, MT, GO, DF, MG, SP, RJ, PR

Fonte: Lorenzi (2002) e Silva Júnior (2010)

A espécie *Qualea grandiflora* pode ser considerada caducifólia, pois perde as suas folhas durante a estação seca. A brotação, a floração e a frutificação

normalmente ocorrem na estação chuvosa, período de grande disponibilidade de água no solo, embora a maturação dos frutos ocorra no final do período seco.

Segundo o Ministério do Meio Ambiente (BRASIL, 2011) a espécie *Qualea grandiflora* é uma árvore encontrada em fitofisionomia ou habitat tais como borda de mata de galeria, borda de mata ciliar, cerradão, cerrado (senso estrito), campo sujo, campo com murundus, savanas amazônicas e carrasco. A espécie *Qualea multiflora*, por seu turno, é encontrada em fitofisionomia ou habitat denominados borda de mata de galeria, cerradão (senso estrito), vereda, campo com murundus.

Conforme Hiruma-Lima et al. (2006), a *Qualea grandiflora* apresenta atividade contra úlceras gástricas e apresentou na prospecção fitoquímica nos extratos hidroalcólicos, taninos, terpenoides, catequinas, fitoesteroides e saponinas. Além disso, extratos crus e frações dessa espécie também possuem atividade antimicrobiana (ALVES et al., 2000) e anticonvulsionante (GASPI et al., 2006).

Estudos desenvolvidos com *Qualea multiflora* por Souza et al. (1984) demonstraram que extratos desta espécie são capazes de matar ovos e formas adultas de *Schistossoma mansoni*.

De acordo com Bonacorsi (2009), várias espécies do Cerrado, entre elas a *Qualea grandiflora* e *Q. multiflora*, possuem propriedades antioxidantes e as outras espécies do cerrado apresentaram atividade anti-*H pylori*.

As Figuras de 6 a 9 ilustram partes das plantas que foram objeto de estudo. As Figuras 6 e 7 ilustram o caule, folhas, flores e frutos da espécie *Q. grandiflora*.

FIGURA 6 - Árvore (a); folhas e tronco (b); fruto de *Qualea grandiflora* (c)



Fonte: O autor.

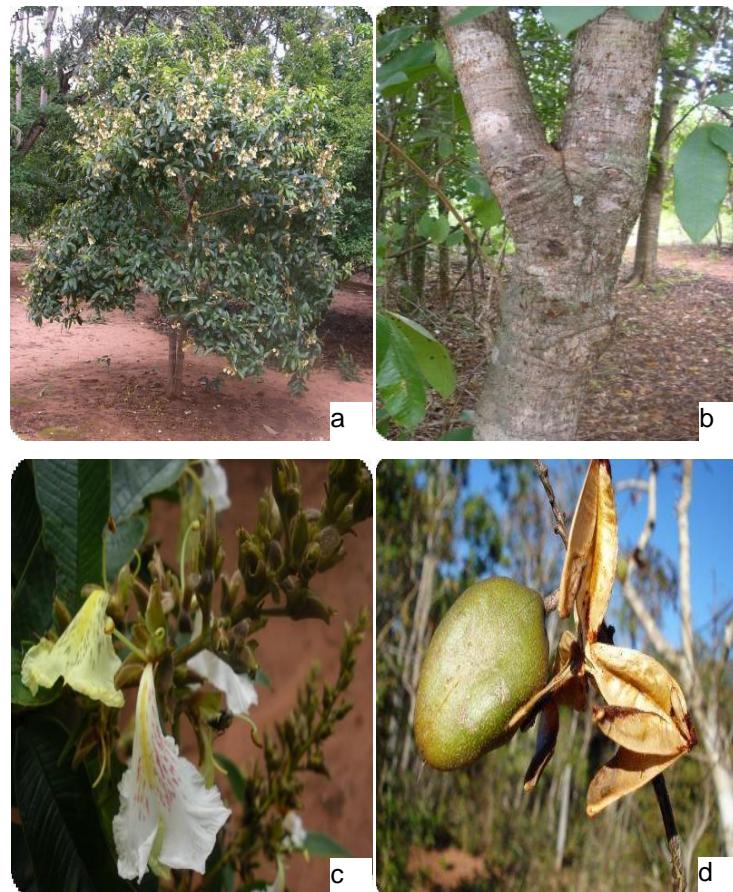
FIGURA 7 - Ramos com folhas e flores de *Qualea grandiflora*



Fonte: O autor.

São ilustradas na Figura 8 partes da planta *Qualea multiflora*, árvore, tronco, folhas, flores e frutos.

FIGURA 8 – Árvore (a); folhas e tronco (b); flores (c); frutos da espécie *Qualea multiflora* (d)



Fonte: Timblindim... (2014)

Na Figura 9, são ilustradas ramos com folhas e flores da *Q. multiflora*.

FIGURA 9 - Ramos de *Qualea multiflora* com suas folhas e flores

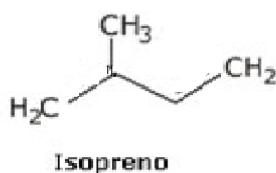


Fonte: O autor.

1.4 Óleos essenciais

Óleos essenciais são compostos orgânicos voláteis, responsáveis pela fragrância de inúmeras plantas. São líquidos oleosos que contêm aroma intenso, e que são produzidos nas plantas na forma de metabólitos secundários. Podem ser extraídos de flores, folhas, frutos, sementes, raízes, rizomas e caules, têm funções de atração de insetos para a polinização, proteção contra herbívoros, atuam como reguladores da taxa de decomposição da matéria orgânica do solo e como agentes antimicrobianos. Esses óleos são constituídos principalmente por derivados de fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo que os mais encontrados são os terpenos, formados por unidades de isoprenóides com C_5 (Figura 10). Os terpenos são classificados de acordo com o número de unidades isoprenóides (u.i.) como, monoterpenos (C_{10} , duas u.i.), sesquiterpenos (C_{15} , três u.i.), diterpenos (C_{20} , quatro u.i.), triterpenos (C_{30} , seis u.i.) e tetraterpenos (C_{40} , oito u.i.) (CASTRO et al., 2004).

FIGURA 10 - Esquema de unidade de isoprenóides



Fonte: O autor.

A obtenção dos óleos essenciais das plantas é feita principalmente através da técnica de arraste a vapor e pela prensagem do pericarpo de frutos cítricos. Consistem de mono e sesquiterpenos, além de fenilpropanoides, metabólitos que conferem suas características organolépticas (BIZZO; HOVELL; RESENDE, 2009).

Na fitoterapia, os óleos voláteis destacam-se pelas suas propriedades antibacterianas, analgésicas, sedativas, expectorantes, estimulantes e estomáquicas. O maior problema do desenvolvimento da agroindústria produtora de óleos essenciais é a concorrência com produtos sintéticos. Todavia, a indústria alimentícia, a qual mais necessita destes óleos, tem vindo a substituir os produtos sintéticos por naturais em função das exigências do mercado (DI STASI, 1996).

Brasil é o terceiro maior mercado mundial do setor de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos, e os óleos essenciais são a matéria prima amplamente utilizada como fragrância em cosméticos, aromatizantes em alimentos, bebidas e produtos de uso doméstico como detergentes, sabões, repelentes de insetos e aromatizantes de ambiente. Além disso, os óleos essenciais podem ser empregados como intermediários sintéticos em perfumes (BRITO, 2007) e pelas indústrias de alimento, química e medicamentos (SOUZA et al., 2010). No entanto, o desenvolvimento da indústria brasileira de cosméticos é derivado do aumento na produção e consumo de óleo essencial no país.

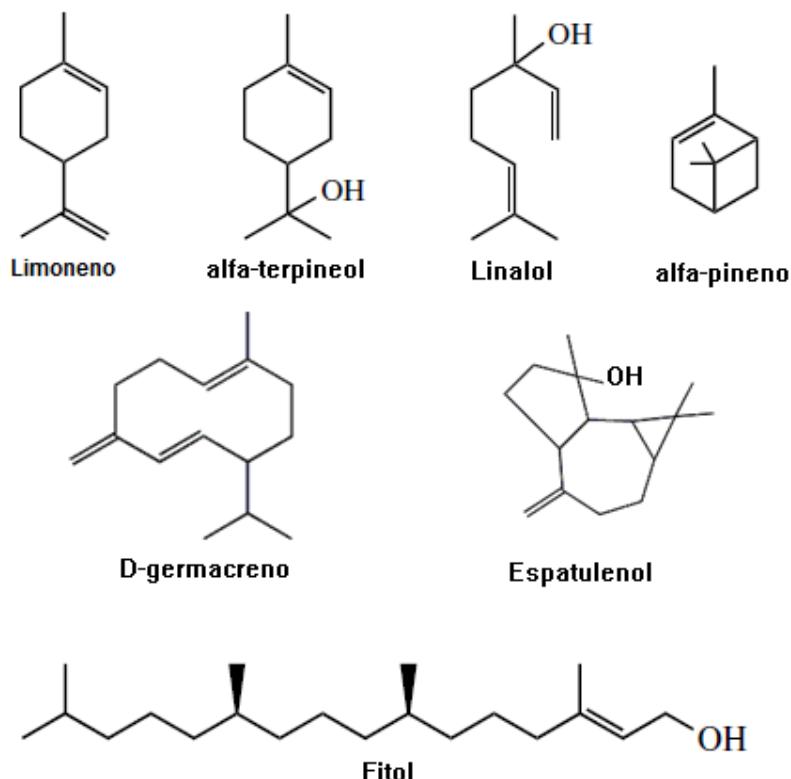
Porém, a maior parte da produção de óleo no Brasil é proveniente de óleos essenciais de cítricos, subprodutos da indústria de sucos, contribuindo com 5 % do total de óleos importados, e ocupando um lugar de destaque entre os grandes exportadores internacionais (BIZZO; HOVELL; RESENDE, 2009). Farmacologia, botânica, microbiologia, fitopatologia, alimentos e preservação são algumas das diferentes áreas em que esses óleos podem ser aplicados.

A composição química do óleo essencial de uma planta depende de uma série de parâmetros, tais como as condições ambientais, estação de coleta, procedimento de extração, condições de armazenamento das plantas coletadas até a extração, etc. (SEVERO et al., 2009). A análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/EM) é indispensável para a avaliação qualitativa e quantitativa do óleo essencial (DAFERRA; ZIOGAS; POLISSIOU, 2000).

Alguns estudos têm revelado que os óleos essenciais são capazes de exercer atividade antioxidante em sistemas biológicos, e que, portanto, podem atuar no combate de doenças neurodegenerativas tais como o “Mal de Alzheimer” (SILVA et al., 2010). Ademais, possuem uma rica variedade de compostos com atividades antimicrobiana, antifúngica em sistemas biológicos, além da capacidade de repelir insetos transmissores de doenças como, a dengue e Chagas (SIANI et al., 2000). Apresentam atividade antimicrobiana a um grande número de bactérias incluindo espécies resistentes a antibióticos e antifúngicos (SILVA, 2005) e podem apresentar ação contra bactérias Gram-negativas e Gram-positivas (STIEVEN; MOREIRA; SILVA, 2009).

Vários monoterpenos como, por exemplo, limoneno, *alfa*-terpineol, *alfa*-pineno e linalol; sesquiterpenos como espatulenol e o diterpeno fitol, têm sido identificados em análises de óleos essenciais de folhas, frutos, casca e madeira de plantas do Cerrado (Figura11). Os principais constituintes terpênicos isolados nesses óleos foram monoterpenos e sesquiterpenos (CUNHA et al., 2013; LONDE, 2004; MARTINS, 2012; ROCHA, 2011).

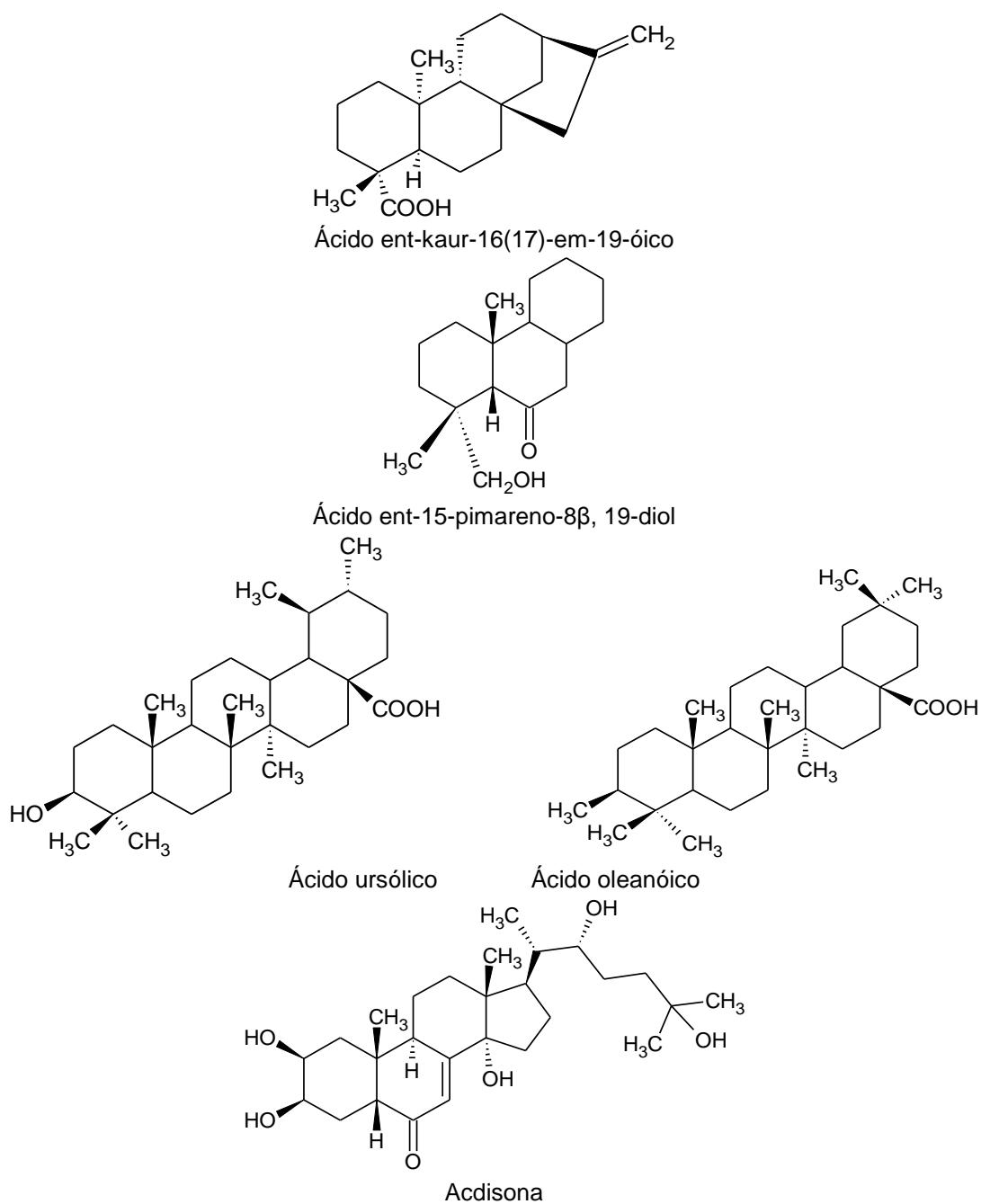
FIGURA 11 - Estrutura de Monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos identificados em plantas do Cerrado



Fonte: Cunha et al. (2013), Londe (2004), Martins (2012) e Rocha (2011).

Como exemplos de diterpenos podem ser citados os ácidos ent-15-pimareno- 8β , 19-diol e ácido ent-kaur-16(17)-en-19-óico com atividade biológica, exibindo valores de concentração inibitória mínima (CIM) que variam de 1 a 10 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e triterpenos como os ácidos ursólico e oleanólico, que são importantes protótipos para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para uso farmacológico (CUNHA et al., 2007; PORTO, 2009). Além disso, os triterpenos ácidos oleanólico e ursólico possuem interessante atividade tripanocida (CUNHA et al., 2006). Os esteróides são formados a partir dos triterpenos e participam da formação das membranas celulares na planta. A acdisona é um esteróide que possui função protetora contra insetos (GARCÍA; CARRIL, 2009). Algumas estruturas são apresentadas na Figura 12.

FIGURA 12 - Esquema de estruturas químicas de alguns diterpenos, triterpenos e do esteróide acdisona



Fonte: O autor

1.5 Atividade antioxidante

Os compostos antioxidantes atuam inibindo e/ou diminuindo os efeitos desencadeados pelos radicais livres e são importantes no combate aos processos oxidativos porque são menores os danos ao DNA e às macromoléculas, amenizando

assim os problemas cumulativos que podem levar a doenças como câncer, cardiopatias e cataratas (MAIA; SOUSA; LIMA, 2007).

Como os óleos voláteis de plantas são bastante conhecidos e utilizados desde a antiguidade por suas propriedades biológicas, antifúngica e antioxidante, a sua atividade tem sido bastante estudada (HAY; WATERMAN, 1993). Diante da tendência do mercado em utilizar produtos naturais, os óleos essenciais estão sendo cada vez mais explorados como agentes antioxidantes, com o intuito de propiciar o desenvolvimento de técnicas que possam reduzir os efeitos colaterais de substâncias oxidantes e radicais causadores de danos à saúde.

Existem evidências de que muitos compostos antioxidantes sintéticos bastante utilizados na indústria podem promover o desenvolvimento de células tumorais, o que tem levado a um aumento crescente na procura de similares naturais. Dentre os similares, destacam-se os compostos derivados de óleos voláteis constituídos por substâncias terpênicas (BOTTERWECK et al., 2000; SOUZA et al., 2007). Aliado a isso, há o grande interesse das indústrias farmacêuticas, alimentícia e cosmética, na utilização de novos constituintes voláteis capazes de proteger os sistemas biológicos; especialmente, membranas lipídicas, dos danos produzidos pelo estresse oxidativo, considerado uma das principais causas do envelhecimento, das doenças degenerativas e do câncer (SOUZA et al., 2007).

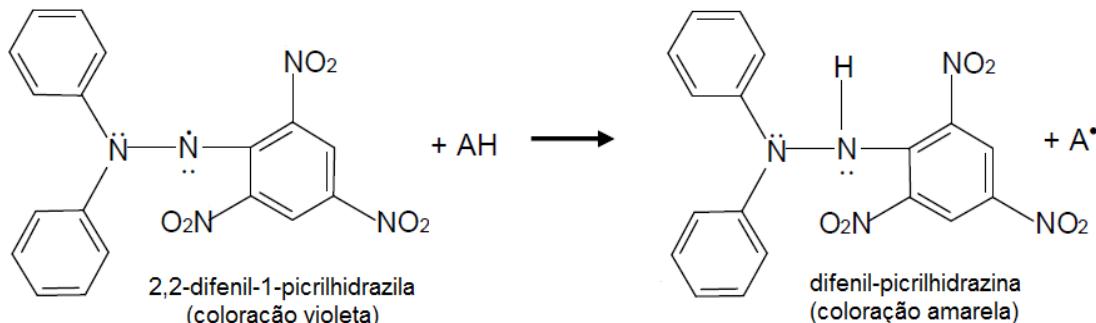
Em função da grande diversidade química dos constituintes naturais vários ensaios têm sido desenvolvidos para avaliar a sua capacidade antioxidante. Entre os métodos existentes, destacam-se os ensaios com o 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), β -caroteno/ácido linoleico e a voltametria por pulso diferencial.

1.5.1 O Método de oxidação pelo sistema DPPH

O DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um radical livre comercializado por reagir com compostos que apresentam atividade antioxidante, convertendo-o para a forma reduzida. A redução dos radicais DPPH pode ser acompanhada em uma faixa de comprimento de onda na região visível do espectro a 517 - 518 nm, pela diminuição da absorbância da solução metanólica de DPPH, que é inicialmente violeta e torna-se amarela à medida que a amostra sequestra os radicais livres (ABDILLE et al., 2005). Assim, quanto maior for a atividade antioxidante, menor será a coloração violeta da solução, ou seja, menor será a concentração de DPPH

residual após certo tempo. A Figura 13 ilustra um mecanismo provável, quando o radical DPPH reage com um antioxidante doador de hidrogênio, formando a molécula de difenil-picrilhidrazina (coloração amarela) e outro(s) antioxidante(s) mais estável(is), que poderá(ão) não causar males e ser(em) eliminado(s) do organismo.

FIGURA 13 - Esquema de mecanismo de redução do radical livre DPPH



Fonte: O autor

A capacidade antioxidante dos extratos ocorre devido aos constituintes ácidos (fenóis) e as suas propriedades redutoras, cuja intensidade da ação antioxidante depende fundamentalmente do número e da posição das hidroxilas presentes na molécula (MELO et al., 2008). As hidroxilas fenólicas por reação radicalar doam elétrons através do hidrogênio para os radicais DPPH, que são, por sua vez, estabilizados. Com a reação, radicais fenolatos e fenoxila são formados; entretanto, são espécies bastante estabilizadas por efeitos de ressonância. As estruturas radicalares podem reagir entre si e com os radicais DPPH.

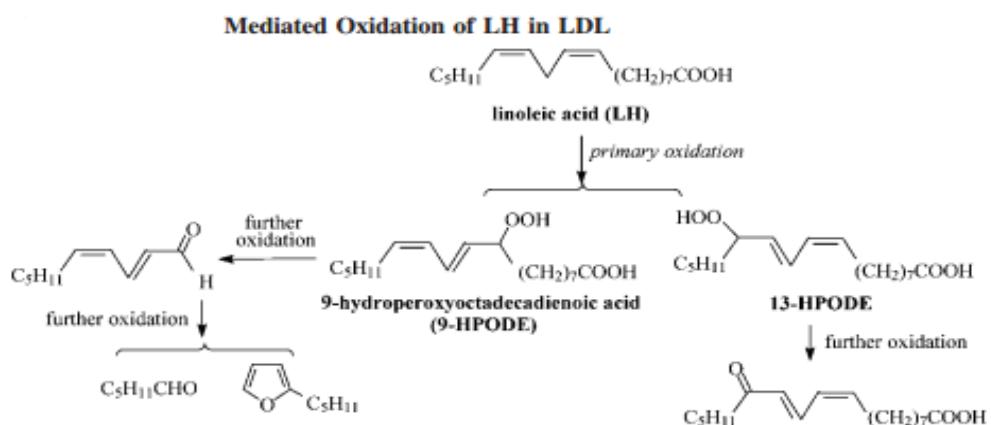
A capacidade dos extratos etanólicos das folhas em sequestrar o radical livre DPPH foi analisada com base na metodologia descrita por FONTE, com modificações, monitorando-se o consumo desse radical pelas amostras através da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações.

1.5.2 Método de oxidação pelo sistema β -caroteno/Ácido Linoleico

No sistema β -caroteno/ácido linoleico, utiliza-se o ácido linoleico que reage com água saturada de oxigênio, originando radicais livres que, por sua vez, oxidarão o β -caroteno e resultarão no descoloramento da solução (observado por medidas espectrofotométricas a 470 nm). Quando o β -caroteno se encontra na presença de compostos com atividade antioxidante, os radicais livres gerados serão inibidos por

ambos, resultando em menor descoramento (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Trata-se, portanto, de um ensaio espectrofotométrico baseado na oxidação (descoloração) do β -caroteno induzida pelos produtos da degradação oxidativa do ácido linoleico (SILVA; BORGES; FERREIRA, 1999), ou seja, o método avalia a atividade de inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). A Figura 14 ilustra uma proposta de mecanismo de peroxidação do ácido linoleico.

FIGURA 14 - Esquema da oxidação do ácido linoléico



Fonte: Liu (2010)

1.5.3 Determinação do teor de Fenóis Totais

A determinação do teor de Fenóis Totais presentes nos extratos etanólicos das folhas foi realizada por meio de espectroscopia na região do visível, utilizando-se o método de Folin–Ciocalteau (SINGLETON; ROSSI, 1965; SOUSA et al., 2007), que contém uma mistura de ácidos fosfomolibídico e fosfotungstico, com formação de um complexo de coloração azul de absorção máxima em 760 nm na presença de um agente redutor.

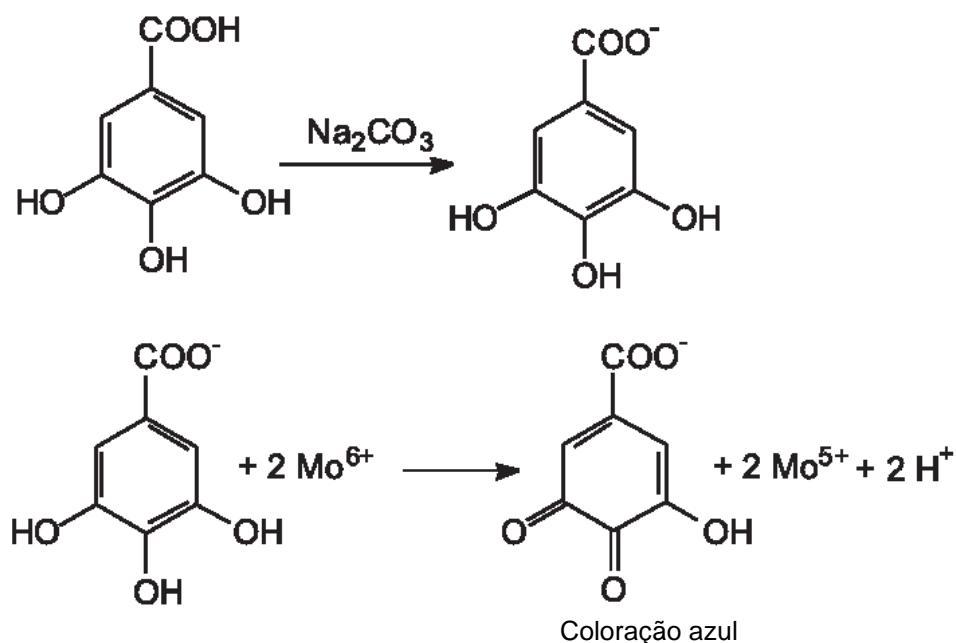
O ensaio de quantificação de Fenóis Totais é um ensaio espectrofotométrico realizado em equipamento espetrômetro UV-vis e lido em um comprimento de onda de 760 nm. A alteração da coloração é um indicativo de reação. A coloração final é azul, indicativa da complexação com o molibdênio, e o reagente de Folin–Ciocalteau é constituído de ácidos fosfomolibídico e fosfotunguístico.

Para este procedimento, é usado o ácido gálico como padrão pelo fato de ter grupos orgânicos fenólicos. A unidade usada é miligrama de equivalente-grama de

ácido gálico por grama de extrato etanólico (mg de EAG/g de extrato EtOH). Acredita-se que os compostos dos extratos etanólicos tenham grupos fenólicos.

Na Figura 15 é ilustrada uma possibilidade de reação do reagente de Folin com o ácido gálico, o qual é desprotonado inicialmente em presença do carbonato de sódio reagindo com o íon molibdênio, levando a formação de uma quinona. Usa-se o carbonato de sódio pelo fato de ser uma base fraca, pois, de contrário o hidróxido de sódio poderia retirar os hidrogênios dos grupos hidroxila, não sendo interessante esse tipo de reação.

FIGURA 15 - Reação do ácido gálico e a formação do complexo com molibdênio



Fonte: Oliveira et al. (2009)

1.5.4 Voltametria por pulso diferencial

Huang, Gao e Hageman (2004), na voltametria cíclica o potencial de oxidação de um composto é caracterizado como o parâmetro de seu poder redutor. Portanto, quanto maior for o seu potencial de oxidação, menor será o poder redutor. Assim, compostos orgânicos que são antioxidantes podem ser chamados de agentes redutores. Dessa maneira, a avaliação do poder redutor de um composto ou grupo de compostos por voltametria cíclica reflete a sua atividade antioxidante.

Muitas vezes, para obter resultados confiáveis na avaliação da atividade antioxidante de alimentos e extratos de plantas, é necessário utilizar mais de um

método analítico. Diante desta necessidade, a voltametria por pulso diferencial e a voltametria cíclica são métodos eletroquímicos interessantes para determinar a atividade antioxidante (GIL et al., 2009).

Na voltametria de pulso diferencial, pulsos de amplitude fixos sobrepostos a uma rampa de potencial crescente são aplicados ao eletrodo de trabalho.

1.6 Atividade antimicrobiana e produtos naturais

No Brasil, pesquisas sobre produtos naturais e atividade antimicrobiana vêm crescendo nos últimos anos. Entretanto, poucos dados referentes a espécies nativas e exóticas estão disponíveis. Esse baixo índice de registro é consequência da disseminação restrita dos resultados de pesquisa, geralmente apresentados em eventos científicos locais ou regionais, cuja maior parte dos estudos são testes isolados com uma ou poucas espécies, e geralmente baseada em informações etnofarmacológicas, diferentemente de pesquisas que abrangem a flora de uma região definida, onde várias famílias botânicas são estudadas (DUARTE, 2006).

Atualmente, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, 25 % dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas. De fato, os produtos naturais estão envolvidos no desenvolvimento de aproximadamente 44% de todos os novos fármacos. Em algumas áreas, como aquelas que envolvem doenças como o câncer e doenças infecciosas, em torno de 60 % dos fármacos são de origem natural (NEWMAN; CRAGG, 2007; NEWMAN; CRAGG; SNADER, 2003).

Assim, as plantas representam um vasto arsenal na busca de produtos naturais biologicamente ativos, visto que produzem e acumulam substâncias com atividades farmacológicas significativas, dentre as quais antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antibiótica e antiparasitária (AHMAD; AQIL; OWAIS, 2006; YUNES; CALIXTO, 2001).

As atividades antimicrobianas de compostos naturais, incluindo os óleos essenciais oriundos das plantas, têm sido reconhecidas popularmente durante anos, mas só recentemente os estudos científicos vêm confirmado essas propriedades. Vários grupos de pesquisadores estudam a atividade biológica de plantas medicinais de diversas regiões do mundo, orientados pelo uso popular das espécies nativas. Por outro lado, os microrganismos que causam prejuízos à saúde humana estão se

tornando resistentes à maioria dos antimicrobianos conhecidos, o que incentiva ainda mais a procura por antibióticos de ocorrência natural (DUARTE, 2006).

Nesse sentido, muitas plantas apresentam atividade antimicrobiana e poderão ser usadas na produção de matérias para higiene corporal e bucal. As bactérias bucais têm uma flora bem complexa, sendo que muitas delas podem levar a outros problemas no organismo.

1.7 Considerações gerais sobre o ecossistema bucal

A cavidade bucal possui estruturas anatômicas distintas, sendo compreendidas basicamente por um tecido duro (dente) e por tecidos moles como mucosas alveolares, ceratinizada e a língua. A mucosa bucal é caracterizada por contínua descamação das células epiteliais, que permite a rápida eliminação de bactérias aderidas na mucosa (MARCOTTE; LAVOIE, 1998). Portanto, a renovação constante das superfícies por descamação previne o acúmulo de microrganismos. Entretanto, os dentes apresentam uma superfície dura não-descamativa que favorece o desenvolvimento de grandes depósitos bacterianos.

Durante a vida, todas as superfícies do corpo são expostas à colonização por uma grande variedade de microrganismos (LINDHE, 1999). Vários compartimentos orgânicos do corpo humano abrigam uma série de microrganismos que infectam esses locais, mesmo no estado saudável, constituindo a microbiota própria de cada local. O motivo da não existência de uma microbiota única em todas as partes do corpo deve-se, inicialmente, ao fato de cada região ser um habitat diferente, com condições ambientais diferentes, pois as composições teciduais, os nutrientes necessários para todos os microrganismos, teores de umidade, pH, taxas de oxigênio, receptores para aderência bacteriana, entre outros, são diferentes em cada parte do corpo. Com isso, os microrganismos colonizam certa região e adaptam-se às suas condições ecológicas (LORENZO, 2004).

A microbiologia bucal, entretanto, é uma das mais complexas de todo o corpo humano. Mais de 700 espécies bacterianas já foram detectadas através de métodos moleculares, das quais somente 40% foram cultivadas em laboratório (AAS et al., 2005). Os microrganismos são encontrados na saliva em populações não aderidas e em comunidades organizadas, dentro de uma matriz complexa de produtos extracelulares microbianos e compostos salivares, crescendo nas superfícies do

esmalte dental conhecida como biofilme (MARSH, 2005), e podendo estar aderidos nas superfícies do dente e língua.

Após a limpeza dos dentes, macromoléculas hidrofóbicas são aderidas pelas superfícies, formando um filme condicionante denominado película adquirida. Esse filme é composto por uma variedade de glicoproteínas salivares (mucinas), anticorpos, peptídeos e outras moléculas orgânicas (CLARK; BAMMANN; GIBBONS, 1978). A película altera a carga e a energia livre de superfície, aumentando a eficiência da adesão bacteriana (LINDHE, 1999). A firme aderência de bactérias à superfície dental revestida pela película salivar é o primeiro passo essencial para a formação do biofilme dental (Placa Dental) (MARSH, 2005).

1.7.1 Plantas com potencial antimicrobiano sobre microrganismos da cavidade bucal

A cárie dentária é uma patologia oral bacteriana frequente, causada por um biofilme constituído por microrganismos presentes na superfície do dente (ALLAKER; DOUGLAS, 2009; AMBROSIO et al., 2008). É uma doença que tem sido associada à *Streptococcus* spp., principalmente *Streptococcus mutans*, *S. sobrinus* e *Lactobacillus* spp. (CHUNG et al., 2006; HIRASAWA; TAKADA, 2002). Várias substâncias antimicrobianas, como a ampicilina, a clorexidina, sanguinarina, metronidazol e antissépticos de amônio quaternário e fenólicos têm sido muito eficazes na prevenção da cárie dentária (TSUI; WONG; RABIE, 2008). No entanto, vários efeitos adversos como a coloração do dente, o aumento da formação de cálculos, diarreia e desordem na flora oral e intestinal têm sido associados ao uso de tais compostos (CHUNG et al., 2006; MORE et al., 2008). Estes inconvenientes no tratamento de problemas de saúde bucal justificam a busca por novos e eficazes agentes anticariogênicos, que podem ser empregados na prevenção da cárie.

A busca de substâncias com atividades antimicrobianas tem direcionado a atenção sobre os produtos naturais e, entre estes, os derivados das plantas superiores têm despertado a investigação para o potencial da flora brasileira nos últimos anos (ALMEIDA et al., 1998; CUNHA et al., 2007; MICHELIN et al., 2005; RATES, 2001; SUFFREDINI et al., 2004).

Inúmeras substâncias naturais, principalmente as obtidas de vegetais, têm sido testadas com o objetivo de avaliar a ação da atividade antimicrobiana contra os

microrganismos do biofilme da placa dentária, constituindo assim um vasto campo de pesquisas ainda a ser explorado (BERNARDES et al., 2010; PEREIRA et al., 2006; PORTO et al., 2009). Portanto, os extratos naturais de plantas podem apresentar outras atividades biológicas, como por exemplo, atividade antileishmania contra o parasita *Leishmania amazonensis*.

1.8 Atividade biológica contra *Leishmania*

Segundo World Health Organization - WHO (2007) a Leishmaniose é um grupo de doenças parasitárias de distribuição global transmitida ao homem pela picada de cerca de 30 espécies de flebotomídeos (mosquito-palha) infectados por protozoários do gênero *Leishmania*. Calcula-se que dois milhões de novos casos ocorrem a cada ano em todo o mundo, dos quais 1,5 milhão são casos de *Leishmaniose tegumentar*.

A Leishmaniose é uma doença crônica transmitida pelo mosquito e comum em cães e humanos. Muitos animais são sacrificados devido aos efeitos da doença e ao fato de possibilitarem a sua transmissão. É uma doença grave para o homem, de manifestação cutânea ou visceral, e com alto índice de letalidade quando não tratada, principalmente em crianças, idosos e pessoas com outras doenças crônicas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

O presente trabalho foi realizado com o objetivo de determinar a composição química dos óleos essenciais das folhas de *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora*. Foram também avaliadas a atividade antioxidante, pelo método analítico da voltametria por pulso diferencial, e as atividades biológicas (antimicrobiana e antileishmania) e citotoxicidade para células Vero. Usando amostras de extrato etanólico de folhas, foi determinada a atividade antioxidante pela reação com DPPH, pela reação de oxidação pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico e pela avaliação do poder redutor total, além da avaliação da atividade antimicrobiana contra as bactérias bucais, atividade antileishmania e citotoxicidade.

2.2 Objetivos específicos

- a) Analisar os constituintes presentes no óleo essencial das folhas de *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora*;
- b) Avaliar a atividade antimicrobiana do óleo essencial e extrato etanólico contra as bactérias bucais aeróbias e anaeróbias;
- c) Avaliar a atividade antileishmania do óleo essencial e extrato etanólico contra *Leishmania amazonensis*;
- d) Determinar a atividade antioxidante dos extratos em etanol 95% de folhas de *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* pelo sequestro do radical DPPH e pelo sistema betacaroteno/ácido linoleico;
- e) Determinar o poder redutor total a partir da análise da voltametria por pulso diferencial do óleo essencial e do extrato etanólico de folhas de *Q. grandiflora* e *Q. multiflora*; e
- f) Comparar os resultados das espécies em estudo com outras plantas do cerrado.

3 METODOLOGIA

Foram feitos ensaios químicos e biológicos usando óleos essenciais de folhas e extratos etanólicos de folhas. Os ensaios foram realizados na UFU Campus Santa Mônica e Umuarama e na Universidade de Franca.

3.1 Análises químicas

As análises químicas e ensaios feitos foram extração de óleo essencial de e extrato etanólico de folhas, atividade antioxidante pelo método do radical DPPH e pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, quantificação do teor de fenóis totais realizados no Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia (UFU), no Laboratório de Produtos Naturais do Instituto de Química – IQUFU, e na Faculdade de Engenharia Química (FEQ) que estão instalados no Campus Santa Mônica da Universidade Federal de Uberlândia. Os experimentos de voltametria por pulso diferencial foram feitos em um equipamento cedido pelo Professor Dr. Rodrigo Alejandro Abraza Munoz, do IQUFU.

Foram exceções os ensaios microbianos, que foram feitos Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA) da Universidade de Franca (UNIFRAN).

Os ensaios de atividade antiprotozoária contra *Leishmania amazonensis* e as análises de atividade citotóxica foram realizados no Instituto de Ciências Biomédicas, no Laboratório de Tripanosomatídeos, com o suporte do Professor Dr. Cláudio Vieira da Silva, do Instituto de Ciências Biomédicas – Campus Umuarama, e com ajuda da aluna de iniciação Paulla Vieira Rodrigues.

3.2 Coleta, identificação e preparo do material vegetal

As folhas de *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora* foram coletadas de modo aleatório e de indivíduos diferentes próximas à rodovia MG 230 ($19^{\circ} 13' 39,06''$ S; $46^{\circ} 12' 30,95''$ O), no município de Rio Paranaíba-MG,. Em seguida, foram preparadas, identificadas e depositadas as exsicatas, com o devido registro no Herbário Uberlandense (HUFU) sob os seguintes números: *Qualea grandiflora*

HUFU 66.895 e *Qualea multiflora* HUFU 66.896. A Figura 14 ilustra as exsicatas de ramos das duas plantas.

FIGURA 16 - Exsicatas de *Qualea grandiflora* (a) e *Qualea multiflora* (b)



Fonte: O autor

Note-se que o material fresco (folhas) das duas espécies foi coletado no mesmo período do ano, no mês de setembro de 2013, para a extração dos óleos essenciais e obtenção do extrato etanólico. As folhas destinadas à preparação dos extratos foram secas em estufa a 35 °C por 3 a 4 dias e, posteriormente, trituradas em moinho de facas.

Do material coletado fez-se a determinação da umidade utilizando uma balança de luz infravermelha da marca Kett, modelo FD-600, sendo que aproximadamente 1,0 g de amostra foi mantida a uma temperatura de 105 ± 5 °C por quinze minutos até que o teor de umidade permanecesse constante.

3.3 Obtenção e preparo do extrato etanólico

Para a obtenção e preparo do extrato etanólico usou-se aproximadamente 400 gramas de folhas de *Qualea grandiflora* e de *Qualea multiflora*. Esta quantidade foi previamente posta a secar em estufa até possuir menos de 8% de umidade, e posteriormente triturada. As folhas secas e trituradas foram colocadas em erlenmeyer, adicionou-se etanol PA 95% até cobrir o material. Macerou-se por aproximadamente três semanas (tempo total) e o conteúdo foi retirado e armazenado em frascos âmbar, momento em que foi acrescentada uma nova quantidade de etanol ao material que estava no erlenmeyer (aproximadamente três dedos acima do material vegetal folhoso). Repetiu-se o processo por mais um

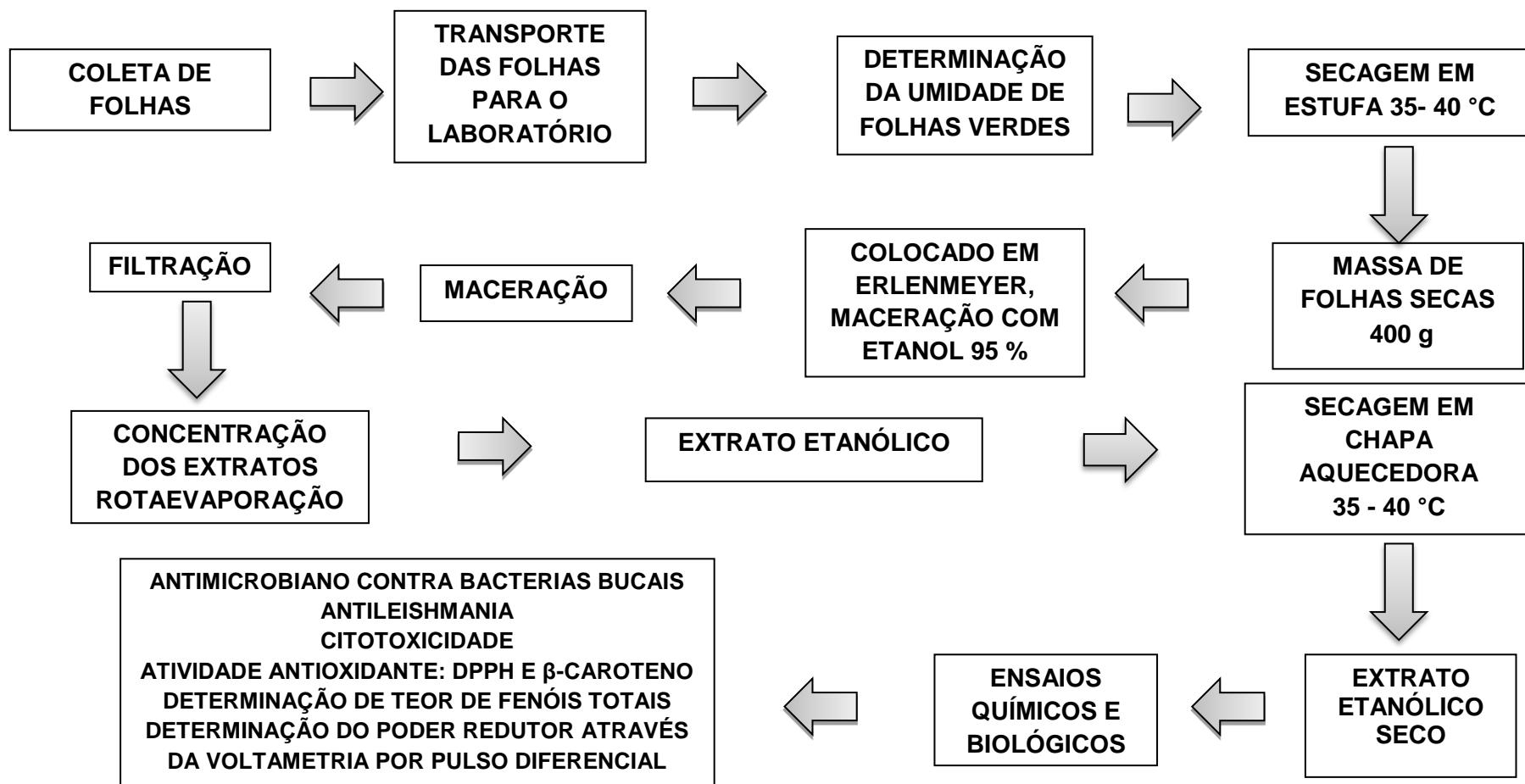
intervalo de tempo até o extrato clarear, momento em que cessaram as macerações. Ao final desse procedimento, foi efetuada uma filtração simples dos extratos utilizando filtro de papel quantitativo, e concentrados em um evaporador rotativo sob pressão reduzida para eliminar no máximo possível o excesso de etanol. Grande parte do solvente foi recuperado nesse processo. Os frascos contendo os extratos foram deixados em uma chapa aquecedora à temperatura de 35 a 40 °C, para permitir a evaporação do etanol que ainda restava e a obtenção do extrato etanólico seco. O rendimento dos extratos foi em seguida calculado.

Os ensaios químicos e biológicos foram realizados usando-se o extrato etanólico de folhas das duas espécies de plantas. Foram realizados os ensaios antioxidantes pelos métodos DPPH, métodos de sequestro de radical pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, e quantificação do teor Fenóis Totais, além da voltametria por pulso diferencial. Os ensaios biológicos realizados foram o teste da atividade antimicrobiana contra as bactérias bucais, atividade antileishmania contra *Leishmania amazonensis* e citotoxicidade em células Vero.

A Figura 17 ilustra as etapas do preparo dos extratos etanólicos a partir de amostras de folhas.

FIGURA 17 - Fluxograma do preparo e obtenção do extrato etanólico a partir de amostras de folhas

PREPARO DE EXTRATO ETANÓLICO DE FOLHAS



Fonte: O autor

3.4 Obtenção e extração do óleo essencial por hidrodestilação

Trezentos gramas de folhas frescas de *Qualea grandiflora* e de *Qualea multiflora* foram lavadas e cortadas e submetidas à extração por hidrodestilação, utilizando o aparelho tipo Clevenger, por um período de 4 horas (MORAIS et al., 2009), como ilustra a Figura 18.

FIGURA 18 - Aparelhos de destilação do tipo Clevenger para destilação com arraste de vapor



Fonte: O autor.

Para a obtenção do óleo essencial, 300 g de folhas trituradas foram colocadas em balão de fundo redondo com em água, posto em manta aquecedora em sistema de arraste de vapor com o auxílio do aparelho modificado Clevenger. A água contida no Clevenger foi recolhida em um funil de separação, sendo usado diclorometano para extraír o óleo da água e algum traço de óleo essencial que esteja na vidraria. Pelo fato de haver diferença de polaridade e densidade, foi possível extraír e recolher o diclorometano com o óleo essencial, o qual foi filtrado e posto para evaporar, a uma temperatura controlada de aproximadamente 35°C para não volatilizar compostos do óleo essencial.

Para a extração do óleo essencial, o extrato foi submetido à partição líquido-líquido em funil de separação, realizando-se três lavagens do extrato com três porções de 5,0 a 10,0 mL de diclorometano. As frações orgânicas foram reunidas e

secadas, e o solvente foi evaporado à temperatura ambiente. O óleo foi recolhido e condicionado em um frasco e mantido sob-refrigeração à temperatura de $-18,0 \pm 5$ °C até o momento das análises e ensaios biológicos. Após a evaporação do diclorometano, a massa obtida do óleo essencial resultante foi pesada em uma balança analítica e a percentagem correspondente de óleo essencial de folhas extraído foi calculada em relação à massa da amostra utilizada inicialmente, desconsiderando-se a porcentagem de umidade de folhas verdes para não ser considerada como massa de óleo essencial.

3.5 Separação, análise e identificação de constituintes dos óleos essenciais por CG/EM

A separação e identificação dos constituintes voláteis por cromatografia a gás, acoplada à espectrometria (CG/EM) de massas, foram realizadas em um aparelho da marca Shimadzu, modelo GC17A/QP5010. O programa de temperatura usado em uma coluna DB-5 (supelco SPB-5) de 30 m de comprimento, 25 mm de diâmetro interno e 0,25 μm de espessura de filme, e a rampa de aquecimento foi de 60 a 246 °C ($3\text{ }^{\circ}\text{C min}^{-1}$); injetor no modo split 1:20 a 220 °C; com gás de arraste Hélio em fluxo de $1,0\text{ mL}\text{.min}^{-1}$. A temperatura da interface, fonte de íons e detector foi de 220 a 240 °C. O volume de $1,0\text{ }\mu\text{L}$ de amostra de óleo essencial diluído em diclorometano na concentração de 10 mg/mL foi injetada, e a identificação dos compostos foi feita por meio das bibliotecas de espectros de massas Wiley (7, 139, e SHIM2205/ ADAMS). Foi usado Índice Aritmético (IA) de referência e comparado com o Índice Aritmético calculado. O detector de massas operou com energia de impacto de 70 eV e foram captados os fragmentos de 40 a 650 Da (ADAMS, 2007).

3.6 Atividade antioxidante dos extratos etanólicos pelo método DPPH e cálculo de CE_{50}

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante dos extratos etanólicos foi feita de acordo com a metodologia descrita por Hsiao et al. (2003) e Morais et al. (2009), monitorando-se o consumo do radical livre DPPH pelas amostras através da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações. Estas medidas foram feitas em um espectrofotômetro UV-vis, no comprimento de

onda 517 nm, e que tem como controle positivo um padrão (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; SOUSA et al., 2007).

As medidas da concentração efetiva (**CE₅₀**), que representam a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH, foram calculadas plotando a porcentagem de DPPH_{remanescente} (50%) versus as concentrações dos extratos de cada amostra (ARGOLO et al., 2004; LIU, 2010).

Para o ensaio de DPPH, foi preparada uma solução de DDPH em metanol 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ envolvidas em papel alumínio e abrigadas da luminosidade para não degradar.

Foram preparadas concentrações e diluições diferentes de extratos etanólicos de folhas de modo a serem usados nos ensaios químicos antioxidantes. A concentração foi de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para a espécie *Qualea grandiflora* e 800 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ para *Qualea multiflora*, feito em solvente metanol e usado o banho ultrassônico para facilitar a dissolução do extrato no solvente. As concentrações foram diferentes porque é necessário que o **CE₅₀** esteja entre a maior e a menor concentração das amostras.

Para *Qualea grandiflora* e *Q. multiflora*, as concentrações das diluições dos extratos etanólicos brutos feitas em metanol foram as seguintes, 100% (solução inicial) obtendo posteriormente as concentrações, 83%, 66%, 49%, 32%, 15%. Para o preparo de cada amostra lida era usado um volume da solução diluída acrescido de metanol.

Foi usada a solução de DPPH em metanol e colocada em cubeta, 2,8 mL de solução de DPPH e 0,2 mL de solução de extrato em cada uma das diluições. Para o branco foi usado o solvente metanol. As medidas das absorvâncias foram feitas das reações entre 0,2 mL das diluições das amostras e 2,8 mL da solução estoque de DPPH ($C = 40 \mu\text{g.mL}^{-1}$), realizadas à 517 nm, a cada 5 min. até completar 1 h, totalizando 6 horas em todas as 6 amostras. A mistura de metanol (2,8 mL) e solução em metanol do extrato (0,2 mL) foi utilizada como branco. À medida que a solução se tornava mais amarelada, poderia ser indicativo de que provavelmente uma reação tenha ocorrido entre o radical livre e os compostos fenólicos presentes no extrato etanólico de folhas.

3.7 Método de oxidação pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico e cálculo de CE_{50}

A atividade antioxidante foi determinada de acordo com o método descrito por Jayaprakasha, Singh e Sakariah (2001). Primeiramente, 0,2 mg de β -caroteno em 1,0 mL de clorofórmio, 20 mg de ácido linoleico e 200 mg de Tween-40 foram misturados. O clorofórmio foi removido utilizando gás nitrogênio e, na mistura resultante, foram adicionados 50,0 mL de água saturada de oxigênio. Alíquotas (4,0 mL) da emulsão foram pipetadas em diferentes tubos de ensaio contendo 0,20 mL dos extratos em metanol em diferentes concentrações. Um controle contendo 0,20 mL de metanol e 5,0 mL da emulsão foi preparado. Os tubos foram mantidos a 50 °C em banho aquecido. A absorbância foi lida no comprimento de onda de 470 nm, e as leituras foram feitas em intervalos de 5 min em um ensaio de duração de 180 min. Uma mistura preparada sem β -caroteno foi usada como branco. O experimento foi feito em triplicata e a atividade antioxidante dos extratos foi avaliada em termos de branqueamento de β -caroteno utilizando a seguinte equação 1:

$$\text{Atividade antioxidante} = [1 - (A_o - A_t) / (A^0_o - A^0_t)] \times 100$$

Onde A_o e A^0_o são as absorbâncias medidas no tempo zero de incubação da amostra de teste e do controle, respectivamente, e A_t e A^0_t são as absorbâncias medidas para a amostra de teste e o controle, respectivamente, após incubação de 180 min. A concentração do extrato fornecendo 50 % de inibição (CE_{50}) foi calculada a partir do gráfico de porcentagem de inibição contra a concentração do extrato.

3.8 Voltametria por pulso diferencial

Uma célula de voltametria consiste de um eletrodo de trabalho, um eletrodo de referência e um eletrodo auxiliar, que são imersos em uma solução. Nessa técnica, o potencial é aplicado em uma taxa controlada (velocidade de varredura) e a corrente, que é produzida por oxidação ou a redução de uma molécula eletroquimicamente ativa na superfície do eletrodo, é registrada continuamente (HUANG; GAO; HAGEMAN, 2004).

No ensaio por voltametria por pulso diferencial, foi necessária a utilização de um potenciómetro conectado a um software para a aquisição dos dados, controlado por um computador. Foi utilizada uma célula eletroquímica, contendo um sistema com três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar). O eletrodo de trabalho usado foi de carbono vítreo; o de referência de Ag/AgCl (saturado em cloreto de potássio - KCl) e o eletrodo auxiliar de platina. O potenciómetro aplica uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o de referência. O terceiro eletrodo é o auxiliar, que é responsável em promover uma corrente para extremidade de cada um dos condutores fixados nos polos de um gerador elétrico.

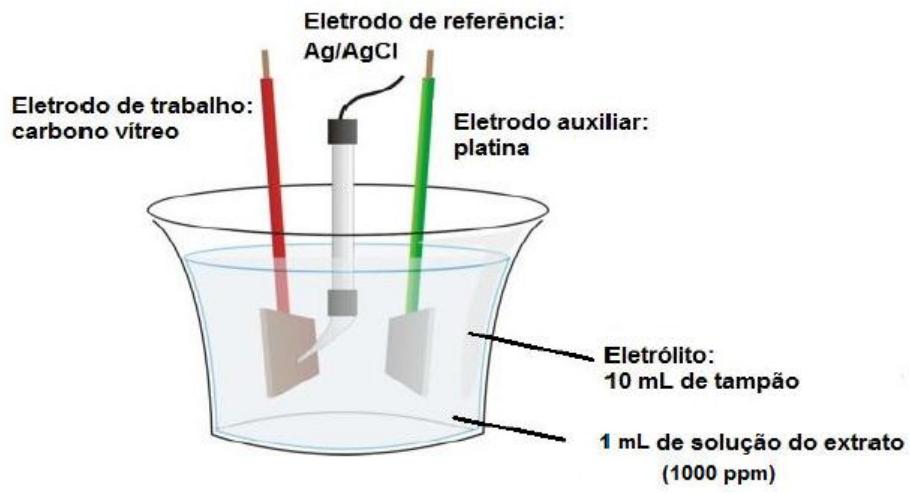
Para análise de atividade antioxidante, o eletrodo de carbono vítreo que foi utilizado atua na faixa de potencial de -0,3 V a +1,0 V, podendo chegar a 1,5 V contra o eletrodo de referência de Ag/AgCl/KCl saturado (ALVES et al., 2004). A velocidade de varredura foi de 50 mV s⁻¹.

Os eletrólitos utilizados constituíam de 10 mL de solução tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,0 contendo KCl 0,5 mol L⁻¹ como eletrólito suporte e 10 mL de solução tampão acetato 0,2 mol L⁻¹, pH 4,5 contendo KCl 0,5 mol.L⁻¹ como eletrólito suporte. Utilizou-se 1 mL de solução de extrato de 1000 µg.mL⁻¹ em metanol. Em tampões e pH diferentes, os comportamentos das amostras podem também diferir.

Foram utilizados dois eletrólitos diferentes tendo em vista a polaridade das amostras usadas, extratos etanólicos e óleo essencial de folhas. Para as primeiras amostras foram usados o tampão fosfato e o acetato, que são dissolvidos em água destilada. Para a segunda amostra usou-se o tampão PTBA (percloreto de terabutilamônio) dissolvido em etanol, tendo em vista a solubilidade das amostras.

A Figura 19 ilustra um esquema do ensaio de voltametria por pulso diferencial, ensaio que foi realizado com amostras de extrato etanólico e óleo essencial de folhas de *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora*.

FIGURA 19 - Ensaio de voltametria por pulso diferencial, com os eletrodos de trabalho



Fonte: Martins (2012)

3.9 Determinação de Fenóis Totais

Para a determinação de Fenóis Totais, uma alíquota contendo 25 mg de amostra foi dissolvida em metanol, transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume final completado com o mesmo solvente. Para a reação colorimétrica, uma alíquota de 0,5 mL da solução metanólica do extrato foi misturada com 2,5 mL de solução aquosa do reativo Folin-Ciocalteau 10 % e 2 mL de solução de carbonato de sódio 7,5 %. A mistura foi incubada por 5 min em banho aquecido, a 50 °C, e posteriormente a absorvância foi medida no comprimento de onda 760 nm. Foi preparada uma solução contendo metanol e todos os demais reagentes com exceção da amostra analisada (branco). O teor de Fenóis Totais foi determinado empregando-se a equação da reta obtida pela curva de calibração, construída com padrões de ácido gálico (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) e expressos como mg de EAG (miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato).

3.10 Determinação da atividade antimicrobiana

O ensaio para a determinação da atividade antimicrobiana foi realizado usando amostras de óleo essencial e extratos etanólico de folhas de *Qualea grandiflora* e de *Qualea multiflora*.

A atividade antimicrobiana foi determinada utilizando o método da microdiluição em caldo para que fosse determinada a concentração inibitória mínima

(CIM), definida como a menor concentração de compostos que produz uma redução de 80% no crescimento visível em comparação com o controle. As análises de atividade antimicrobiana foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA) da Universidade de Franca, com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins e do Prof. Dr. Luis Carlos Scalón Cunha.

Os microorganismos utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana, foram as seguintes cepas padrão provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC). As aeróbicas foram *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43717), e as anaeróbicas: *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 48417).

3.11 Preparo das amostras para o método de microdiluição

Para a realização da microdiluição em placa de 96 poços, todas as amostras foram preparadas com concentrações de $8000 \mu\text{g.mL}^{-1}$ (8000 ppm). Para obter esta concentração, foram dissolvidas 2 mg de cada amostra em

250 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Foram retirados 125 μL da solução de partida e acrescentados a 1875 μL de caldo TSB, obtendo-se uma solução mãe para microrganismos aeróbicos de concentração $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Para a obtenção da solução-mãe para microrganismos anaeróbicos, foram retirados 162,5 μL da solução de partida que foram acrescentados a 2437,5 μL de caldo Schaedler suplementado, sendo obtida também uma solução de concentração $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.12 Preparo do inóculo

Utilizando uma alça de platina esterilizada, culturas de 24 h dos microrganismos aeróbicos crescidos no meio Ágar triptona de soja, enriquecido com 5% de sangue de carneiro, foram transferidas para uma solução salina. Este procedimento foi também utilizado para a preparação das bactérias anaeróbicas com crescimento de 72 h em Ágar Schaedler. Padronizou-se o inóculo fazendo a comparação deste com o tubo 0,5 ($1,5 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$) para bactérias na escala Mc Farland. Esta preparação do inóculo foi realizada para todas as bactérias.

3.13 Preparo do fármaco

Para a validação da técnica foi utilizado o digluconato de clorexidina. Pesou-se 1 mg do fármaco e diluiu-se-lhe em 10 mL de água destilada esterilizada, obtendo-se uma concentração final de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$. Em seguida, 1 mL dessa solução foi transferida para um tubo contendo 4 mL de caldo Schaedler suplementado. Essa diluição resultou em concentração de $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ e foi considerada como solução estoque para realização da técnica. Foi levada em consideração a potência de 100% do fármaco.

3.14 Controles usados

Para a determinação de atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição em placa de 96 poços, foi utilizado como controle positivo o digluconato de clorexidina. Para o método de microdiluição em caldo, as concentrações de digluconato de clorexidina variaram de $0,0115 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ a $5,9 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Ainda foram realizados os seguintes controles: esterilidade dos caldos TSB e Schaedler; controle da cultura; esterilidade da clorexidina; esterilidade dos extratos brutos e óleos essenciais e controle do DMSO (5 a 1%).

3.15 Métodos da microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima

Os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar, de acordo com as normas vigentes. As vidrarias, ponteiras e os meios de cultura foram esterilizados. Para a determinação da concentração mínima foram utilizadas microplacas estéreis com 96 poços. Cada poço recebeu inóculo, caldo triptona soja ou caldo Schaedler e amostra das soluções preparadas. O volume final em cada poço foi de 100 μL para os microrganismos aeróbicos e 200 μL para os anaeróbicos.

Avaliou-se as amostras das soluções nas concentrações de 400 a $0,195 \text{ } \mu\text{g.mL}^{-1}$ e determinada a concentração mínima de cada amostra capaz de inibir o crescimento dos microrganismos.

As placas que continham bactérias aeróbicas foram vedadas e fechadas usando parafilme e incubadas a uma temperatura de 36 °C por um período de 24 h em microaerofilia pelo sistema de chama/vela. Após a incubação, foram adicionados em cada poço da placa 30 µL de resazurina preparada em solução aquosa (0,01%). Este sistema revelador permitiu a observação imediata da atividade antimicrobiana da amostra, sendo que a cor azul representou a ausência de crescimento e a cor vermelha, indicou a presença de crescimento bacteriano. Os microrganismos anaeróbicos foram incubados por 48 a 72 h em câmara de anaerobiose, a 36 °C. Em seguida, foi utilizado o mesmo revelador (resazurina) para a determinação das CIMs para os microrganismos anaeróbicos. Todas as amostras foram testadas em triplicata.

3.16 Ensaios de atividade antileishmania

3.16.1 Preparo das amostras

Para o teste com o parasita *Leishmania amazonensis*, as amostras foram dissolvidas em metanol e diluídos com BHI até a formação de uma solução-mãe de 640 µg.mL⁻¹. A concentração final de metanol da solução-mãe não excedeu 3%.

3.16.2 Teste de viabilidade celular

O teste de viabilidade celular foi realizado por microdiluição em placa de 96 poços a partir da solução-mãe, sendo feitas as diluições com meio de cultura BHI (Caldo BHI- Brain Heart Infusion) para a *Leishmania amazonensis*. A partir dele, foram obtidas as concentrações a serem testadas. O volume final de cada poço foi de 100 µL, sendo 20 µL de inoculo (solução com 1.10⁸ parasitas em 2 mL) com 80 µL de concentração das amostras.

A placa de *Leishmania amazonensis* foi incubada por 48 horas a 25 °C. Em seguida, adicionados 2 µL em cada poço de uma solução reveladora de resazurina, a 3 mM em PBS (Phosphate Buffered Saline) (GÓMEZ-BARRIO et al., 2006) e novamente incubado nas mesmas condições. Em seguida, foi realizada a leitura da absorbância a 594 nm em um espectrofotômetro de microplaca.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata (triplicata da triplicata). A partir dos resultados das absorbâncias, a viabilidade celular foi calculada em função do controle positivo, e a partir desses, foi construído um gráfico de dose-resposta com regressão não-linear para o cálculo do **IC₅₀** (concentração em que 50% dos parasitas foram inibidos) (CHIBALE et al., 2007).

3.16.3 Cultura de células

Esse ensaio foi realizado com o objetivo de verificar a citotoxicidade em células dos extratos etanólicos e óleos essenciais de folhas. A cultura de células Vero ATCC CCL 81(fibroblastos de rim de macaco verde da África) foi mantida em DMEM (Meio de cultura, Dulbecco's Modified Eagle's Medium), a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂.

3.16.4 Índice de seletividade

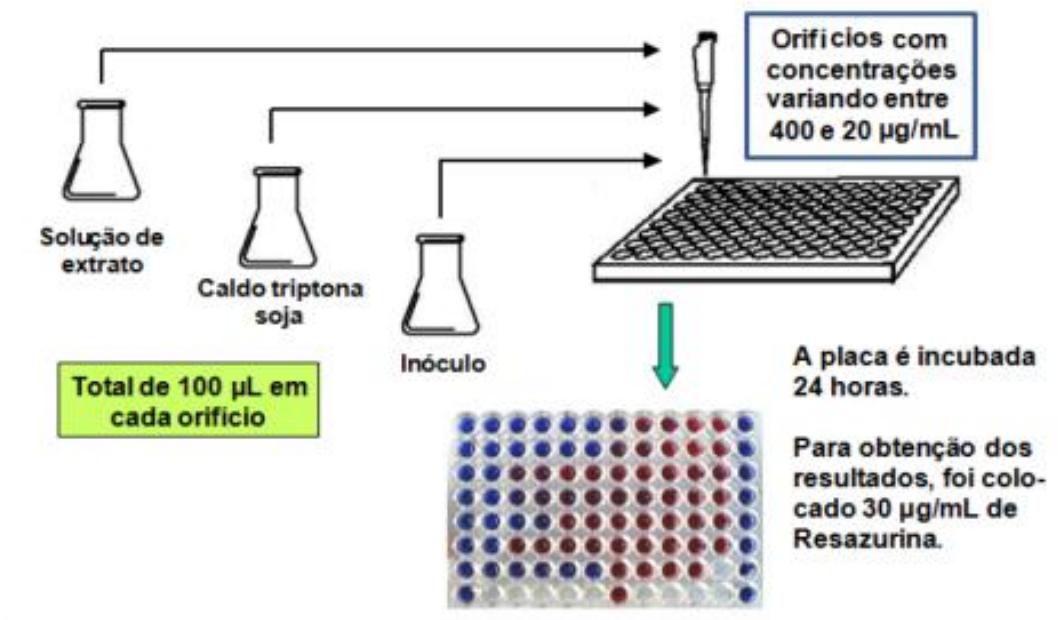
A partir de ensaios *in vitro* foi possível calcular a concentração citotóxica das células Vero e a capacidade de inibição de 50 % do parasita para o cálculo do índice de seletividade (IS).

Nakamura et al. (2006) descrevem um procedimento para calcular o índice de seletividade como sendo a razão entre a citotoxicidade das células analisadas pelo IC₅₀. O valor obtido está associado a uma maior e melhor seletividade para o protozoário usado no ensaio do que toxicidade para as células.

A partir de valores conhecidos de CC₅₀ e de IC₅₀ foi calculado o índice de seletividade (IS), utilizando a seguinte equação:

$$\text{Equação 2 : IS} = \text{CC}_{50} \text{ células Vero} / \text{IC}_{50} \text{ } Leishmania \text{ } amazonensis$$

FIGURA 20 - Placa de 96 poços



Fonte: Cunha (2013)

3.17 Análise estatística

Todas as determinações foram feitas em triplicata e os resultados obtidos foram a média aritmética com o desvio padrão. As médias foram comparadas pelo teste de Student para ensaios DPPH, β -betacaroteno e quantificação de fenóis totais, enquanto que o teste de Tukey foi utilizado para comparar médias do ensaio antileishmania e citotoxicidade ao nível de 5 % de probabilidade. Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados para denotar diferença estatística significativa.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Resultados da determinação de umidade de folhas para extração de óleo essencial

Foram utilizadas folhas verdes para determinar a umidade de folhas frescas e desconsiderando a massa de água para não ser considerada como óleo essencial.

Na Tabela 2 apresentam-se os valores de umidade de folhas para extração de óleo essencial.

TABELA 2 - Teor de umidade das folhas para extração de óleo essencial

AMOSTRAS	UMIDADE DE FOLHAS (%) +DP
<i>Qualea grandiflora</i>	47,17 ± 5,58 ^a
<i>Qualea multiflora</i>	55,07 ± 2,77 ^a

Fonte: O autor

* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Student a 5% de significância. Os dados são apresentados como média, ± desvio padrão para testes realizados em triplicata. Diferenças significativas ($p <$ ou igual 0,05) são indicadas com diferentes letras em cada coluna.

Os valores de umidade foram estatisticamente semelhantes.

4.2 Rendimentos dos óleos essenciais

A Tabela 3 apresenta valores das massas e porcentagens de óleos essenciais de folhas extraídos para as duas espécies de plantas.

TABELA 3 - Massas e rendimentos de óleos essenciais obtidos por hidrodestilação

Massa de óleo essencial (Três extrações)	<i>Qualea grandiflora</i>	<i>Qualea multiflora</i>
Massa (g)	$4,89 \times 10^{-3} \pm 0,74 \times 10^{-3}$	$4,58 \times 10^{-3} \pm 1,80 \times 10^{-3}$
Rendimento (%)	$2,16 \times 10^{-3}$	$1,96 \times 10^{-3}$

Fonte: O autor

* Médias seguidas da mesma letra não diferem entre si pelo teste de Student a 5% de significância. Os dados são apresentados como média, ± desvio padrão para testes realizados em triplicata. Diferenças significativas ($p <$ ou igual 0,05) são indicadas com diferentes letras em cada coluna.

O rendimento de óleo essencial foi baixo se comparado com outras plantas (Tabela 3), porém, se o material vegetal folhoso estivesse seco, provavelmente o rendimento seria ainda menor, pois acredita-se que há perda de muitos compostos à medida que a folha seca. Espécies de plantas como o eucalipto têm melhores rendimentos de óleo essencial, podendo chegar até 1% em massa, de acordo com Vieira (2004).

4.3 Resultado da cromatografia gasosa

Os compostos dos óleos essenciais foram analisados de acordo com as bibliotecas Wiley (ADAMS, 2007). A Tabela 4 apresenta a classificação, por grupos funcionais, dos componentes do óleo essencial de folhas de *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora*.

TABELA 4 - Porcentagem dos compostos dos óleos essenciais de folhas por grupos funcionais

Grupos funcionais	<i>Q. multiflora (%)</i>	<i>Q. grandiflora (%)</i>
Álcool	19,5	2,4
Aldeído	12,2	4,9
Ácido carboxílico	-	4,9
Éster	2,4	2,4
Éter cíclico	-	2,4
Cetona	7,3	2,4
Monoterpeno	-	2,4
Monoterpeno oxigenado	29,3	12,2
Sesquiterpeno	-	2,4
Sesquiterpeno oxigenado	4,9	36,6
Diterpeno oxigenado	2,4	4,9
N.I.	19,5	22
Nitrila	2,4	-
Total	99,99	99,99

Fonte: O autor

N.I. = não identificado.

NI: Não identificado

Na espécie *Qualea grandiflora*, os compostos majoritários foram os sesquiterpenos oxigenados (36,6%), os monoterpenos oxigenados (12,2%) e ainda

os aldeídos, ácidos carboxílicos e diterpenos oxigenados que apresentam 4,9 % cada um.

Na espécie *Qualea multiflora*, os compostos majoritários foram os monoterpenos oxigenados (29,3%). Destacam-se também os álcoois (19,5 %), aldeídos (12,2 %) e cetonas (7,3 %). Acredita-se que muitos desses compostos presentes em óleos essenciais individualmente ou em sinergismo podem ser usados como antioxidantes, antimicrobianos, antiprotozoários, bem como em outros ensaios químicos e biológicos. Segundo Lima et al. (2008) óleos essenciais são um tipo de metabolitos secundários podem apresentar efeitos fungicidas, inseticidas e bactericidas.

De acordo com Pereira et al. (2008) sinergismo está associada a discussão em fitoquímica e cita como sendo a interação entre os óleos essenciais podem representar uma boa alternativa para potencializar a ação desses óleos, porém, muito ainda precisa ser melhor esclarecido. Comenta que sinergismo entre alguns tipos de óleos pode melhorar a atividade bactericida. Silva (2010) cita que em casos de sinergismo foi possível verificar inibições de crescimento bacteriano de forma superior se comparadas com as drogas testadas isoladamente. Verificou-se que os resultados apresentaram um bom potencial de uso dos produtos naturais como coadjuvante no tratamento de doenças infecciosas.

Os monoterpenoides e sesquiterpenoides são produzidos por muitas plantas e são metabólitos sujeitos a fatores internos e externos como luminosidade, temperatura, tipo de solo, stress hídrico e outros (CARDOSO et al., 2001).

Já os álcoois possuem atividade bactericida, atuando potencialmente como agentes desnaturantes de proteínas (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1988).

Segundo Fabri et al. (2012), o linalol é um monoterpeno encontrado em óleos essenciais de uma planta, *Mitracarpus frigidus*. Esse composto tem atividade biológica, antioxidante, anti-inflamatória, anestésica e antitumoral. O linalol é um dos compostos majoritários nessa planta, bem como é encontrado nas duas espécies em estudo, é encontrado nos óleos das duas espécies de plantas de estudo. O linalol é usado como fixador de perfumes, além de ser o composto principal do óleo e alfavaca.

Arruda et al. (2005) citam em seu estudo que o nerolidol, que é um sesquiterpeno usado como aromatizante e nos dias atuais existem testes com essa substância para ser utilizados como ativador de penetração na pele de certos tipos

de drogas. O nerolidol inibiu o crescimento de protozoários, dentre eles *Leishmania amazonensis*. Esse composto está presente nos óleos essenciais de *Qualea grandiflora* (13,18 %) e *Qualea multiflora* (2,08 %)

Nerolidol apresentou potencial antioxidante em métodos *in vitro* podendo levar a proteção de biomoléculas contra os possíveis danos causados por radicais livres, podendo existir, também, uma possível atuação em sistemas de defesa. Os autores acreditam ser necessário haver novos ensaios para elucidar com mais clareza os mecanismos de atuação nas atividades antioxidantes (NOGUEIRA NETO; SOUSA; FREITAS, 2013).

Segundo Madyastha e Srivatsan (1998) e Wichtel (2002) o composto *alfa*-terpineol pode ser usado na indústria de perfumes, cosméticos, sabão e em agentes antissépticos.

Álcoois possuem atividade bactericida atuando potencialmente como agentes desnaturantes de proteínas (PELCZAR; CHAN; KRIEG, 1988). É possível que o (Z)-hex-3-en-1-ol composto tenha atuado na atividade antileishmania nos óleos de folhas de *Qualea multiflora* em que este composto está presente em alta porcentagem.

A Tabela 5 apresenta os compostos identificados dos óleos essenciais de folhas, extraídos pelo método de destilação por arraste de vapor. São apresentados os compostos das duas espécies de plantas: a *Qualea grandiflora* e a *Qualea multiflora*.

TABELA 5 – Compostos identificados presentes nos óleos essenciais de folhas de *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora*

(continua)

		TR		IA referência		IA calculado		Composição % TIC	
Compostos <i>Qualea</i> <i>grandiflora</i>	Compostos <i>Qualea</i> <i>multiflora</i>	Q.g.	Q.m.	Q.g.	Q.m.	Q.g.	Q.m.	Q.g.	Q.m.
Furfural	Furfural	3,95	4,00	828b	831a	833	836	1,76	0,81
(Z)-Hex-3-en-1-ol	(Z)-Hex-3-en-1-ol	4,32	4,34	850b	850b	854	855	1,86	13,16
-	Hexan-1-ol	-	4,62	-	863b	-	862	-	1,13
-	Benzaldeído	-	6,97	-	961 ^a	-	965	-	1,16
-	Heptan-1-ol	-	7,24	-	974 ^a	-	975	-	0,76
Fenilacetraldeído	Fenilacetraldeído	9,63	9,66	1042 ^a	1042 ^a	1045	1046	7,32	16,85
-	Octanol	-	10,73	-	1068 ^a	-	1075	-	2,2
Óxido de <i>cis</i> -linalol	Óxido de <i>cis</i> -linalol	10,73	10,81	1076 ^a	1077 ^a	1075	1077	1,44	2,2
Óxido de <i>trans</i> -linalol	Óxido de <i>trans</i> -linalol	11,37	11,49	1084 ^b	1088 ^a	1092	1095	1,35	3,15
Linalol	Linalol	11,79	11,81	1102 ^a	1102 ^a	1103	1103	1,04	10,31
-	Nonanal	-	11,94	-	1105 ^a	-	1106	-	1,29
-	Hotrienol	-	12,05	-	1104 ^a	-	1109	-	1,67
-	(Z)-3-Nonen-1-ol	-	14,21	-	1156 ^a	-	1160	-	0,72
-	N.I.	-	14,34	-	-	-	1163	-	2,05
-	Nonanol	-	14,96	-	1173 ^a	-	1178	-	1,01
Alfa-terpineol	Alfa-terpineol	15,73	15,75	1186 ^b	1191 ^a	1196	1197	4,7	3,76
Gama-terpineol	-	16,04	-	1199 ^b	-	1203	-	0,94	-
2-borneno	-	17,35	-	-	-	1233	-	0,97	0,79
N.I.	-	25,03	-	-	-	1409	-	1,00	-
N.I.	-	26,00	-	-	-	1433	-	0,99	-
N.I.	-	26,99	-	-	-	1456	1160	1,74	0,72

TABELA 5 – Compostos identificados presentes nos óleos essenciais de folhas de *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora*

(continuação)

Compostos <i>Qualea</i> <i>grandiflora</i>	Compostos <i>Qualea</i> <i>multiflora</i>	TR		IA referência		IA calculado		Composição % TIC	
		Q.g.	Q.m.	Q.g.	Q.m.	Q.g.	Q.m.	Q.g.	Q.m.
Óxido de cabreuva B	-	27,33	-	1462 ^b	-	1464	-	1,57	-
Óxido de cabreuva D	-	28,04	-	1479 ^b	-	1481	-	2,12	-
N.I.	-	29,39	-	-	-	1514	-	0,62	-
-	Mirtenol	-	16,12	-	1198 ^a	-	1205	-	0,87
N.I.		29,52	-	-	-	1517	-	1,31	-
-	Beta-ciclocitral	-	17,06	-	1223 ^a	-	1226	-	1,19
N.I.		30,41		-	-	1540	-	1,12	-
-	Nerol	-	17,48	-	1229 ^a	-	1236	-	2,12
-	Geraniol	-	18,59	-	1256 ^a	-	1261	-	2,29
Benzoato de 3- (<i>Z</i>)- hexenil	Benzoato de 3 (<i>Z</i>)-hexenila	31,99	31,89	1568 ^a	1572 ^a	1577	1577	3,37	1,2
-	(<i>E</i>)-decen-2-al		18,71		1263 ^a	-	1264	-	3,89
N.I.	-	32,11	-	-	-	1582	-	4,89	-
Sesquiterpeno oxigenado	-	32,83	-	-	-	1600	-	3,02	-
Vitispirano	Vitispirano	19,51	19,53	1272 ^a	1272 ^a	1282	1282	4,77	3,46
-	(<i>E,E</i>)-decadien- 2,4-al	-	21,19	-	1317 ^a	-	1320	-	1,35
Sesquiterpeno oxigenado	-	33,50	-	-	-	1618	-	1,9	-
-	(<i>E</i>)-undecen-2- al	-	23,20	-	1368 ^a	-	1367	-	0,98
Sesquiterpeno oxigenado	-	33,65		-		1622		1,74	-

TABELA 5 – Compostos identificados presentes nos óleos essenciais de folhas de *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora*

										(continuação)
		TR		IA referência		IA calculado		Composição % TIC		
Compostos <i>Qualea</i> <i>grandiflora</i>	Compostos <i>Qualea</i> <i>multiflora</i>	Q.g.	Q.m.	Q.g.	Q.m.	Q.g.	Q.m.	Q.g.	Q.m.	
-	(<i>E</i>) Beta-damascenona	-	24,23	-	1386 ^a	-	1391	-	1,11	
Sesquiterpeno oxigenado	-	34,16	-	-	-	1635	-	1,54	-	
-	N.I.	-	25,71	-	-	-	1426	-	0,67	
Sesquiterpeno oxigenado	-	34,17	-	-	-	1650	-	2,45	-	
-	N.I.	-	26,23	-	-	-	1438	-	0,9	
Óxido de <i>Alfa</i> -bisabolol B	-	35,17	-	1656 ^b	-	1662	-	2,24	-	
-	N.I.	-	26,88	-	-	-	1454	-	1,16	
N.I.	-	35,64	-	-	-	1674	-	1,65	-	
-	Geranil-acetona	-	27,04	-	1458 ^a	-	1458	-	0,79	
Cadaleno	-	35,87	-	1675 ^b	-	1680	-	1,75	-	
-	Dodecanol	-	27,96	-	1473 ^a	-	1479	-	1,4	
Guaia-3,10(14)-dien-11-ol	-	36,00	-	1676 ^b	-	1684	-	2,01	-	
-	Tridecan-2-ona	-	28,78	-	1495 ^b	-	1499	-	0,69	
<i>Epi</i> - <i>alfa</i> -bisabolol	-	36,21	-	1683 ^b	-	1689	-	1,96	-	
-	N.I.	-	30,10	-	-	-	1532	-	0,79	
<i>Alfa</i> -bisabolol	-	36,30	-	1685 ^b	-	1692	-	2,32	-	
(2 <i>E</i> ,6 <i>Z</i>)-farnesol	-	36,80	-	1714 ^b	-	1707	-	1,64	-	
(<i>E</i>)-nerolidol	(<i>E</i>)-nerolidol	31,55	31,54	1569 ^a	1566 ^a	1568	1568	13,18	2,08	
Sesquiterpeno oxigenado	-	37,39	-	-	-	1721	-	1,67	-	

TABELA 5 – Compostos identificados presentes nos óleos essenciais de folhas de *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora*

										(continuação)
		TR		IA referência		IA calculado		Composição % TIC		
Compostos <i>Qualea</i> <i>grandiflora</i>	Compostos <i>Qualea</i> <i>multiflora</i>	Q.g.	Q.m.	Q.g.	Q.m.	Q.g.	Q.m.	Q.g.	Q.m.	
-	Cianeto de Farnesil	-	32,09	-	-	-	-	1581	-	2,23
(2E,6E)-farnesol	-	37,71	-	1742 ^b	-	1730	-	4,79	-	-
-	Tetradecadien-4,9 ol-1	-	35,07	-	-	-	1659	-	2,25	
Ácido tetradecanóico		39,28	-	1775 ^a		1773		1,78	-	-
-	N.I.	-	35,28	-	-	-	1665	-	2,17	
Hexahidrofarnesil acetona	-	41,84	-	1845 ^a	-	1845	-	2,62	-	-
-	2-Pentadecanona	-	36,65	-	1697 ^b	-	1701	-	0,72	
Ácido n-Hexadecanóico	-	46,06	-	1971 ^a	-	1970	-	3,34	-	-
-	N.I.	-	37,75	-	-	-	1731	-	1,16	
(E,E)-Geranil linalool	-	48,06	-	2026 ^b	-	2032	-	1,01	-	-
-	N.I.	-	41,89	-	-	-	1847		2,32	
N.I.	-	57,69	-	-	-	2356		0,87		
Fitol	Fitol	50,68	50,72	2111 ^a	2115 ^a	2115	2117	1,62	1,39	
-	-	-	-	-	-	-	-	99,98	100	
-	Octanol	-	10,73	-	1068 ^a	-	1075	-	2,2	
Óxido de <i>cis</i> -linalol	Óxido de <i>cis</i> -linalol	10,73	10,81	1076 ^a	1077 ^a	1075	1077	1,44	2,2	
Óxido de <i>trans</i> -Linalol	Óxido de <i>trans</i> -Linalol	11,37	11,49	1084 ^b	1088 ^a	1092	1095	1,35	3,15	

TABELA 5 – Compostos identificados presentes nos óleos essenciais de folhas de *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora*

										(continuação)	
				TR		IA referência		IA calculado		Composição % TIC	
Compostos <i>Qualea grandiflora</i>		Compostos <i>Qualea multiflora</i>		Q.g.	Q.m.	Q.g.	Q.m.	Q.g.	Q.m.	Q.g.	Q.m.
Linalol		Linalol		11,79	11,81	1102 ^a	1102 ^a	1103	1103	1,04	10,31
-		Nonanal		-	11,94	-	1105 ^a	-	1106	-	1,29
-		Hotrienol		-	12,05	-	1104 ^a	-	1109	-	1,67
-	(Z)-3-Nonen-1-ol			-	14,21	-	1156 ^a	-	1160	-	0,72
-	N.I.			-	14,34	-	-	-	1163	-	2,05
-	Nonanol			-	14,96	-	1173 ^a	-	1178	-	1,01
Alfa-terpineol	Alfa-terpineol	15,73	15,75	1186 ^b	1191 ^a	1196	1197	4,7	3,76		
Gama-terpineol	-	16,04	-	1199 ^b	-	1203	-	0,94	-		
2-borneno	-	17,35	-	-	-	1233	-	0,97	0,79		
N.I.	-	25,03	-	-	-	-	1409	-	1,00	-	

Fonte: O autor

Composição química do óleo essencial de folhas de *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora*

N.I. = não identificado; **TIC** = total ions chromatogram; **IA** = índice aritmético (planilha Excel); **TR** = tempo de retenção em min.

^a NIST Livro de Química na Web: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

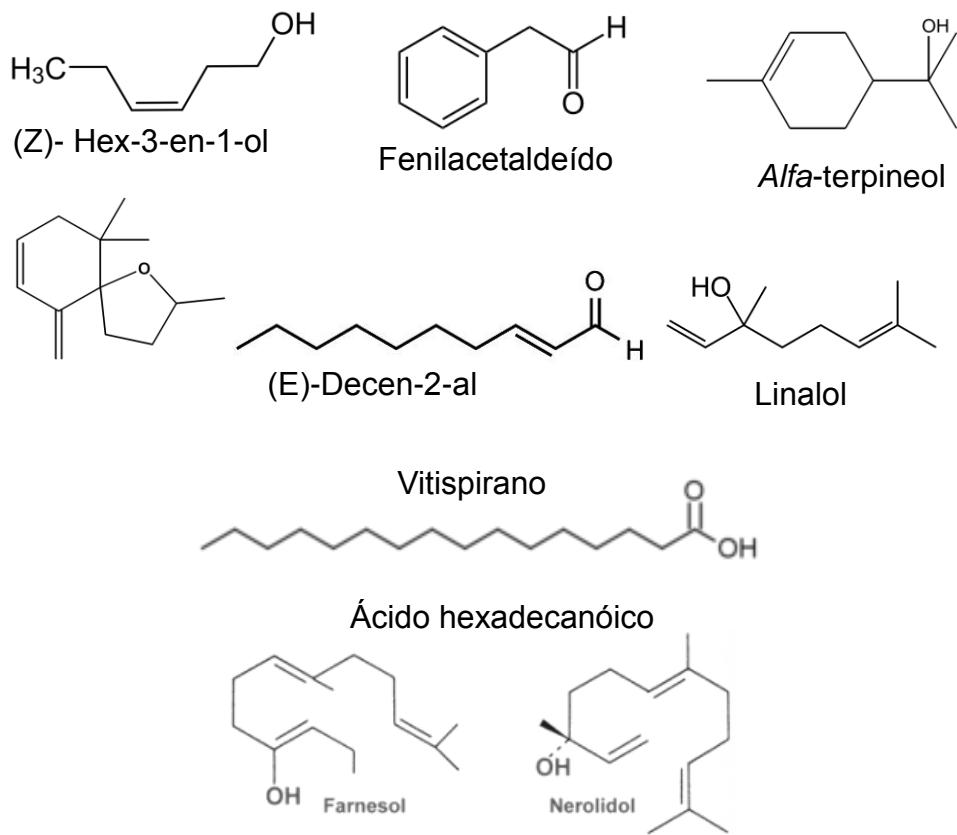
^b Adams (2007)

^c Similaridade

^d Comparação de espectros

De acordo com a Tabela 5, alguns dos compostos em maior porcentagem em área para a espécie *Qualea grandiflora* alguns em maior área são: fenilacetaldeído (7,32 %), vitispirano (4,77 %), (*E*)- nerolidol (13,18 %), benzoato de 3-*Z*-hexenil (3,37 %). E para a espécie *Qualea multiflora* são: (*Z*)-hex-3-en-1-ol (13,16 %), fenilacetaldeído (16,85 %), linalol (10,13 %), alfa-terpineol (3,76 %) e (*E*)-decen-2-al (3,89 %).

FIGURA 21 - Esquema de alguns compostos do óleo essencial de folhas de *Q. grandiflora* e *Q. multiflora*



Fonte: O autor

4.4 Resultado do ensaio de atividade antimicrobiana de óleo essencial

A Tabela 6 ilustra os resultados obtidos nos ensaios antimicrobianos contra organismos bucais testados com o óleo essencial de folhas. Não se observou atividade biológica para os óleos essenciais de folhas.

TABELA 6 - Resultados de óleo essencial do ensaio antimicrobiano contra organismos bucais

Espécie	<i>Qualea grandiflora</i>	<i>Qualea multiflora</i>	Clorexidina	Metronidazol <i>B. thetaio</i> 29741 ATCC
<i>P. nigrescens</i> ATCC 33563	>400	>400	-	2,95
<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	>400	>400	-	-
<i>A. Naeslund</i> <i>ii</i> ATCC 19039	>400	>400	-	-
<i>P. gengivalis</i> ATCC 32277	*	*	-	-
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	>400	>400	0,922	-
<i>S. mitis</i> ATCC 49456	>400	>400	3,688	-
<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	>400	>400	0,922	-
<i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	>400	>400	0,922	-

Fonte: O autor

Valor de referência: Rio e Récio 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

*Não houve crescimento

Contrações das amostras testadas: 0,195 a 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Contração de clorexidina: 0,115 a 59 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Contração do metronidazol: Faixa CIM: 0,5 – 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Rios e Recio (2005), referem que as atividades antimicrobianas com CIMs abaixo de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ são consideradas ativas. Nesta pesquisa, os resultados para a atividade antimicrobiana foram maiores do que 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, sendo elevados se comparados com os dados da literatura.

Segundo Martins (2012) destaca-se atividade antimicrobiana de óleo essencial de folha da planta *Vernonia brasiliiana* frente à bactéria *S. aureus* (ATCC 25923).

Rocha (2011) verificou que óleos essenciais de *Campomanesia pubescens* tiveram inibição contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. Os óleos essenciais de frutos e folhas possuem melhor efeito antimicrobiano frente bactérias anaeróbias. Os bons resultados da atividade antimicrobiana podem ser usados na produção de agentes terapêuticos usados contra doenças bucais.

Cunha et al. (2013) os óleos essenciais de folhas e cascas de *Cassia bakeriana* apresentaram atividade antimicrobiana contra bactérias bucais aeróbicas e anaeróbicas, dentre eles *Streptococcus mutans*, causador de cáries dentárias. Alguns compostos presentes nos óleos essenciais em maior e menor quantidade e o sinergismo entre eles podem ser responsáveis pelos efeitos inibitórios. Os autores acreditam que os componentes químicos presentes nos óleos essenciais torna-os interessantes para futuros estudos e criação de novos agentes antimicrobianos.

Esses ensaios microbiológicos realizados para as amostras de plantas aqui estudadas não apresentaram resultados satisfatórios, mas novos ensaios microbiológicos poderão ser feitos em trabalhos futuros, usando outras bactérias no intuito de se obterem atividades biológicas.

4.5 Resultado de atividade antileishmania dos óleos essenciais

Na Tabela 7 são apresentados os resultados do ensaio antiprotozoário, usando-se o parasita *Leishmania amazonensis* e resultados de citotoxicidade com células Vero.

TABELA 7 - Resultado de citotoxicidade e atividade antileishmania de *Q. grandiflora* e *multiflora*

Amostra	Citotoxicidade Célula Vero IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	<i>Leishmania amazonenses</i> IC_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>Q. grandiflora</i>	>512	88 \pm 8
<i>Q. multiflora</i>	>512	69 \pm 4
Anfotericina B	-	0,288 \pm 0,006

Fonte: O autor

Os testes indicaram que os óleos essenciais de folhas, 69 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de óleo de *Qualea multiflora* ou 88 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de óleo de *Qualea grandiflora* são as concentrações

necessárias para inibir a ação de 50% do parasita. No entanto, quando se compara os resultados para citotóxica usando células Vero, constata-se que quanto maior for o valor de **IC₅₀** menor será a toxicidade, e quanto menores for o valor de **IC₅₀**, melhor será a ação antileishmania da amostra, ou seja, amostras de óleo essencial de *Qualea multiflora* têm melhor resposta contra o parasita, sendo necessária baixa concentração da amostra quando comparada com amostras de óleo essencial de folhas de *Qualea grandiflora*.

Assim, a capacidade de inibição do parasita com os óleos essenciais de folhas tem eficácia, mas não tanto quanto com a droga-controle, na qual o resultado é mais promissor.

Nakamura et al. (2006) referem que extratos hidroalcoólicos e frações de folhas de *Piper regnellii* (Miq) C. DC. var. *pallescens* (C. DC) Yunck apresentaram atividade antileishmania. Descreve uma forma de calcular o índice de seletividade razão do valor de concentração citotóxica das células pelo **IC₅₀** do protozoário. Apresenta a toxicidade do extrato bruto acetato (9,1) e a fase hexânica (6,4) sendo menos tóxica para as células analisadas do que para o protozoário.

Nesse mesmo sentido os valores de IS para as espécies *Q. grandiflora* e *multiflora* são, respectivamente, > 5,82 e > 7,4 vezes menos tóxicas para as células Vero e mais tóxicas para *Leishmania amazonensis*. A espécie *Qualea multiflora* teve uma melhor atividade contra o protozoário *Leishmania amazonensis* quando comparada com a *grandiflora*. As amostras de óleo essencial de *Q. multiflora* são aproximadamente 1,3 vezes mais tóxicas para o parasita analisado do que para óleos de *Q. grandiflora*.

Silva et al. (2009), nos óleos essenciais de folhas de *Licaria canella* encontraram-se compostos químicos da família dos benzenóides. Óleo essencial de folhas dessa espécie foi mais ativo contra cepas de *Leishmania amazonensis*, o valor de **IC₅₀** encontrado foi de 19 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e menos tóxica em cultura de macrógagos quando compradas *Aniba canellila* **IC₅₀** 40 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

Conforme Martins (2012) testou-se a atividade antileishmania contra *Leishmania amazonensis* usando óleos essenciais de folhas de *Vernonia brasiliiana* e o valor de **IC₅₀** encontrado foi 210 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Os óleos essenciais das duas espécies estudadas têm indicativos de resultados melhores na atividade antileishmania do que óleos de *Vernonia brasiliiana*.

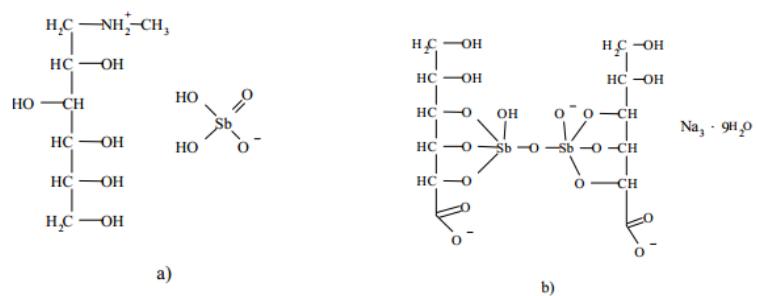
Já para o ensaio com as células Vero, relacionadas com a citotoxicidade, quanto maior o valor de **IC₅₀**, melhor será o resultado, indicando que essas amostras têm baixa citotoxicidade perante tais células.

A atividade antiparasitária de óleos essenciais de plantas do cerrado é citada na literatura e dependendo da composição química do óleo essencial, se for mais rico em um ou outro composto pode ter um poder maior ou menor de atividade contra a *Leishmania*.

Fabri et al. (2012), óleos essenciais das partes aéreas de *Mitracarpus frigidus* apresentaram moderada atividade antibacteriana contra algumas bactérias, forte efeito antifúngico e expressiva atividade antileishmania contra as formas *Leishmania major* e *Leishmania amazonensis*.

De acordo com Costa (1998) os medicamentos tradicionais usados no tratamento de Leishmaniose são tóxicos e tem efeitos colaterais são constituídos de diamidinas aromáticas e anfotericina B. Por isso derivado de produtos naturais poderão ser excelentes alternativas para evitar os efeitos desagradáveis dos medicamentos comuns. No caso das amostras (extratos e óleos) de plantas usadas, não foram tóxicas frente a células Vero, contrariando o trabalho de Santos et al. (2011), cita que extratos polares e apolares de *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora* são tóxicos *in vitro*. A Figura 22 apresenta alguns tradicionais medicamentos utilizados contra Leishmaniose.

FIGURA 22 - Medicamentos tradicionais usados no tratamento de Leishmaniose



Medicamentos usados atualmente contra a leishmaniose; a) antimoniato de meglumine e b) estibogluconato de sódio.

Fonte: Costa (1998)

Futuramente, poderão ser isolados compostos/substâncias do óleo essencial de folhas das espécies em estudo para se descobrir mais precisamente qual ou quais compostos químicos possuem atividade antileishmania.

4.6 Voltametria por pulso diferencial de óleo essencial

No ensaio de voltametria de óleo essencial de folhas de *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora* não foi observada atividade antioxidante por voltametria por pulso diferencial por não haver substâncias eletroativas.

Chaar (2000) realizou o ensaio eletroquímico de óleo essencial de *Aniba dukei K.* usando a técnica da voltametria cíclica. Foi usado o eletrodo de carbono vítreo, e as seguintes condições: potencial inicial + 1,20 V, potencial final 0,20 V, velocidade de varredura 50 mV s⁻¹ e mistura de etanol/tampão Britton-Robson e pH: 3,3. No ensaio testou-se usando outros reagentes também. Usando essa técnica verificou-se que o linalol é um composto que não apresentou atividade eletroquímica. O linalol é um dos composto majoritário no óleo essencial de folha de *Qualea multiflora* (10,3 %) e também tem porcentagem no óleo de folhas de *Qualea grandiflora* (1,04 %).

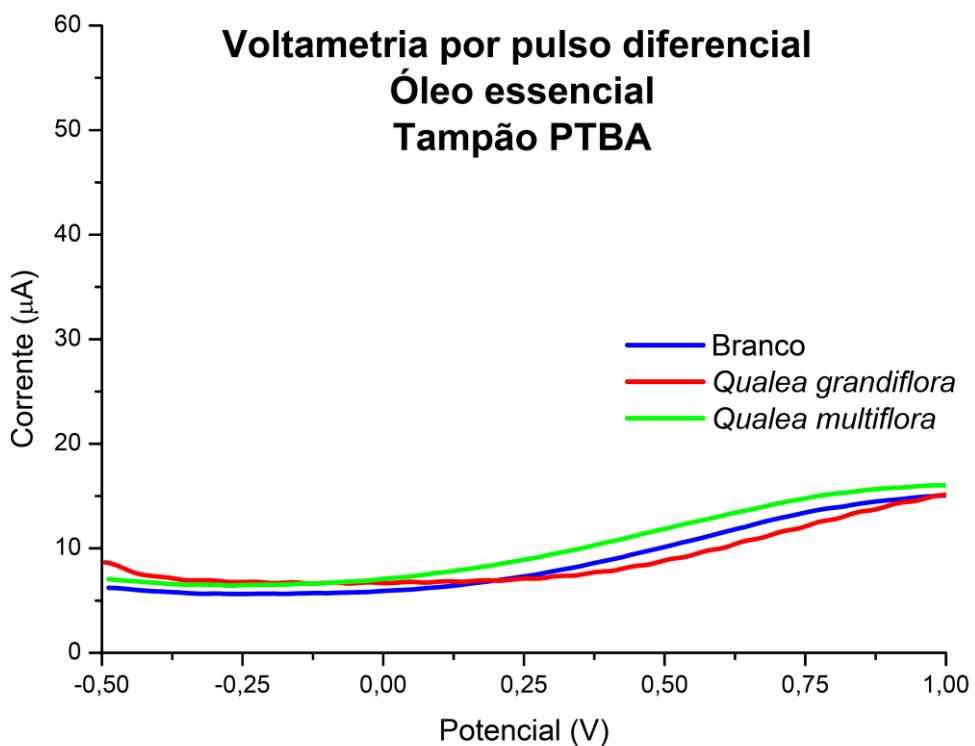
De acordo com Marinho (2010), o estudo apresentou boa resposta voltamétrica (voltametria cíclica) usando eletrodo de carbono vítreo para análise do eugenol no óleo essencial de *Pimenta dioica Lndl.*

Ribeiro (2009) cita em seu estudo que a técnica de voltametria por pulso é muito seletiva quando é feita a comparação com a voltametria cíclica, além disso, a voltametria por pulso diferencial é mais vantajosa podendo ter determinar amostras em baixas concentrações tendo um limite de detecção baixo, de 10⁻⁷ a 10⁻⁸ mol.L⁻¹

Não foram encontrados trabalhos sobre voltametria por pulso diferencial de óleos essenciais de folhas de plantas, por isso foi usado os ensaios realizados com voltametria cíclica para realizar a comparação.

A Figura 23 apresenta o gráfico de voltametria por pulso diferencial de óleo essencial de folhas de *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora*, da mesma forma que foi realizado para os extratos com a diferença que utilizamos o tampão de perclorato de tetrabutilamonio (PTBA) 0,1 mol em etanol. As amostras de óleo foram diluídas em etanol com concentração de 2000 µg mL. E foi adicionado 10 mL do tampão e 1 mL da amostra.

FIGURA 23 - Amostra do extrato diluída em etanol com concentração de 2000 $\mu\text{g.mL}$, com tampão de perclorato de tetrabutilamônio



Fonte: O autor

Através da voltametria por pulso diferencial não foram observadas as espécies eletroativas no óleo essencial. Em trabalhos na literatura sobre o assunto foi verificado que o linanol, por exemplo, presente no óleo da *Q. multiflora* e *Q. grandiflora* não apresentaram espécies eletroativas na voltametria cíclica. Não foram observados picos nesse voltamograma e as curvas estão na mesma linha de base, bem próximas a curva que representa o branco.

4.7 Umidade e rendimento de folhas para extrato etanólico

As porcentagens de umidade de folhas que foram usadas para a obtenção do extrato etanólico das mesmas estão indicadas na Tabela 8.

TABELA 8 - Umidade das folhas para o extrato etanólico

FOLHAS PARA EXTRATO ETANÓLICO	UMIDADE (%)
<i>Q. grandiflora</i>	$5,70 \pm 2,82$
<i>Q. multiflora</i>	$5,0 \pm 0,50$

Fonte: O autor

A Tabela 9 apresenta os rendimentos dos extratos etanólicos obtidos para as duas espécies estudadas. Para o ensaio de extrato etanólico, foram usados aproximadamente 400 gramas de folhas previamente secas em estufa, trituradas e maceradas em etanol.

TABELA 9 - Rendimento do extrato etanólico de folhas

PLANTA	Rendimento Extrato etanólico (%)
<i>Qualea grandiflora</i>	$11,78 \pm 0,52$
<i>Qualea multiflora</i>	$11,43 \pm 0,41$

Fonte: O autor

As duas espécies estudadas apresentaram valores de 11,78 % e 11,43 % de rendimento, respectivamente para as espécies *Qualea grandiflora* e *multiflora*, mostrando que possuem compostos de natureza relativamente similares e de solubilidade aproximada para o etanol.

4.8 Do ensaio de atividade antimicrobiana de extrato etanólico

A Tabela 10 mostra os resultados obtidos nos ensaios antimicrobianos contra microrganismos bucais testados com extrato etanólico de folhas.

TABELA 10 - Resultado do ensaio antimicrobiano contra organismos bucais

Espécie	Qualea grandiflora	Qualea multiflora	Clorexidina	Metronidazol B. thetaio 29741 ATCC
<i>P. nigrescens</i> 33563 ATCC	>400	>400	-	2,95
<i>B. fragilis</i> 25285 ATCC	>400	>400	-	-
<i>A. naeslundii</i> 19039 ATCC	>400	>400	-	-
<i>P. gengivalis</i> 32277 ATCC	*	*	-	-
<i>S. mutans</i> 25175 ATCC	>400	>400	0,922	-
<i>S. mitis</i> 49456 ATCC	>400	>400	3,688	-
<i>S. sanguinis</i> 10556 ATCC	>400	>400	0,922	-
<i>S. sobrinus</i> 33478 ATCC	>400	>400	0,922	-

Fonte: Rios e Recio (2005), valores de referencia de CIM abaixo de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

*Não houve crescimento

Contrações das amostras testadas: 0,195 a 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Contração de clorexidina: 0,115 a 59 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Contração do metronidazol: Faixa CIM: 0,5 – 4 $\mu\text{g.mL}^{-1}$

Não se verificou atividade biológica para os extratos etanólicos de folhas nas concentrações verificadas e contra as bactérias utilizadas.

Como foi citado anteriormente, para extratos brutos de produtos naturais, somente atividades antimicrobianas com CIM abaixo de 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ são consideradas ativas. A partir de resultados para atividade antimicrobiana obtiveram-se valores maiores do que 400 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ (RIOS; RECIO, 2005).

Ayres et al. (2008), extratos metanólicos de cascas de *Qualea grandiflora* têm ação antibacteriana sobre *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Pseudomonas*

aeruginosa. Já extratos etanólicos de folhas de *Q. grandiflora* possuem ação antibacteriana sobre o *Staphylococcus epidermidis*.

Aquino et al. (2013) extratos de folhas de *Cordiera sissilis* e partições mostraram relevante atividade antimicrobiana contra microorganismos aeróbicos e anaeróbicos, sendo expressiva contra *Porphyromonas gingivalis*, um dos principais agentes de doenças periodontais.

De acordo com Mazzolin et al. (2010, 2013) extratos metanólicos de cascas de *Qualea parviflora* apresentaram ação gastroprotetora testadas em estômagos de ratos. As lesões foram criadas usando etanol, ácido clorídrico, etc. Os extratos também demonstram atividade anti-*Helicobacter pylori* e efeito antidiarreico (inibição da diarreia) que foi acompanhada com uma ação anti-hemorrágica, efeito antiespasmódico, além disso, extratos de *Qualea parviflora* apresentaram prevenção de lesões inflamatórias intestinais.

Martins, M. M. (2012) verificou que extratos de folha, flor e raiz da planta *Vernonia brasiliiana* não apresentaram atividade antimicrobiana frente *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (ATCC25922).

Martins, C. M. (2012) houve atividade antimicrobiana em participação cicloexano da casca interna da espécie *Kielmeyera coriacea*, sendo a fração mais ativa frente a três microrganismos bucais *S. mutans*, *S. sanguinis* e *A. naeslundii* podendo ser promissora no tratamento de problemas bucais. Já a atividade antimicrobiana dos extratos e partições de folhas e casca interna pode ser explicada pelos altos teores de compostos fenólicos agindo com os sesquiterpenos oxigenados.

Nasser et al. (2013), os extratos apolares de cascas e princípios ativos isolados de *Qualea grandiflora*, *Qualea multiflora* e *Qualea parviflora*, são mais eficazes e promissores nos ensaios de atividade antimicrobiana, devido à lipofilicidade. Desses extratos apolares, das três espécies, foram isolados esteróides e triterpenos.

De acordo com Santos et al. (2013) muitas plantas medicinais podem ser tóxicas a humanos. Extratos metanólicos de cascas de *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora* não demonstraram ser mutagênicos, não induziram danos ao DNA, em ensaio micronúcleos *in vivo* em ratos albinos Swiss de seis semanas. Os autores acreditam que estes testes não são satisfatórios para uso humano e novos ensaios deverão ser realizados usando células de outros sistemas biológicos.

Os ensaios microbiológicos feitos usando as plantas *Q. grandiflora* e *Q. multiflora* não apresentaram atividade antibacteriana, mas em trabalhos futuros ensaios biológicos poderão ser feitos, usando outras espécies de bactérias, amostras (extratos e óleos essenciais) de concentrações diferentes e até outras partes das plantas estudadas com o intuito de obter atividades biológicas.

4.9 Resultado de atividade antileishmania e citotoxicidade de extratos etanólicos de folhas

Na Tabela 11 são apresentados os resultados do ensaio antiprotozoário usando o parasita *Leishmania amazonensis* e resultados de citotoxicidade com células Vero; foram usadas amostras de extratos etanólicos de folhas das duas espécies de plantas.

TABELA 11 - Resultados de citotoxicidade e atividade antileishmania

Amostra	IC ₅₀ ($\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$) Célula Vero	IC ₅₀ ($\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$) <i>Leishmania amazonenses</i>
<i>Q. grandiflora</i>	>512	>512
<i>Q. multiflora</i>	>512	>512
Anfotericina B	-	0,288 \pm 0,006

Fonte: O autor

Como pode se ver, quanto menor for o valor de IC₅₀, melhor é a ação antileishmania da amostra, ou seja, as amostras de extrato etanólico de folhas de *Qualea grandiflora* e *multiflora* não apresentaram atividade contra o parasita *Leishmania amazonensis*. Comparado à droga-controle, o resultado não é promissor, pois não tem tanta eficácia quanto os óleos essenciais de folhas, apresentados em parte anterior. Provavelmente a composição química dos extratos etanólicos e óleos essenciais de folhas são diferentes.

Martins, M. M. (2012) testou a atividade antileishmania contra *Leishmania amazonensis* usando-se extratos etanólicos de folhas de *Vernonia brasiliiana*, sendo que os valores de IC₅₀ encontrados foi respectivamente de 150 $\mu\text{g}\text{mL}^{-1}$. Este teste indica que o extrato etanólico dessa planta, nessa atividade biológica, possui resultados mais promissores que as duas espécies estudadas de *Qualea*.

Para o ensaio com as Células Vero, estando relacionadas com a citotoxicidade, quanto maior for o valor de **IC₅₀**, melhor será o resultado, indicando que as amostras têm baixa citotoxicidade perante as células analisadas.

Souza et al. (2011), testou extratos e frações obtidas da casca do fruto do bacurizeiro, uma árvore nativa da Amazônia, que possui alta ocorrência na região nordeste e tem os frutos muito usados pela população. Neste caso, a população carente usa a graxa produzida a partir das sementes de bacuri (fruto) para tratamentos de problemas de pele, dores e algumas inflamações. Os testes revelaram que os ensaios feitos com extratos etanólicos, extratos aquosos, frações hexânicas e frações acetato de etila apresentavam atividades antileishmania *in vitro*; a fração hexânica demostrava atividade seletiva e específica à *Leishmania amazonensis*. Já o extrato aquoso apresentou-se com citotoxicidade elevada.

Experimentos futuros poderão ser realizados isolando-se compostos químicos dos extratos etanólicos de folhas das duas *Qualeas* para se descobrirem quais compostos possuem atividade antileishmania.

4.10 Resultados de atividade antioxidante de extratos etanólicos

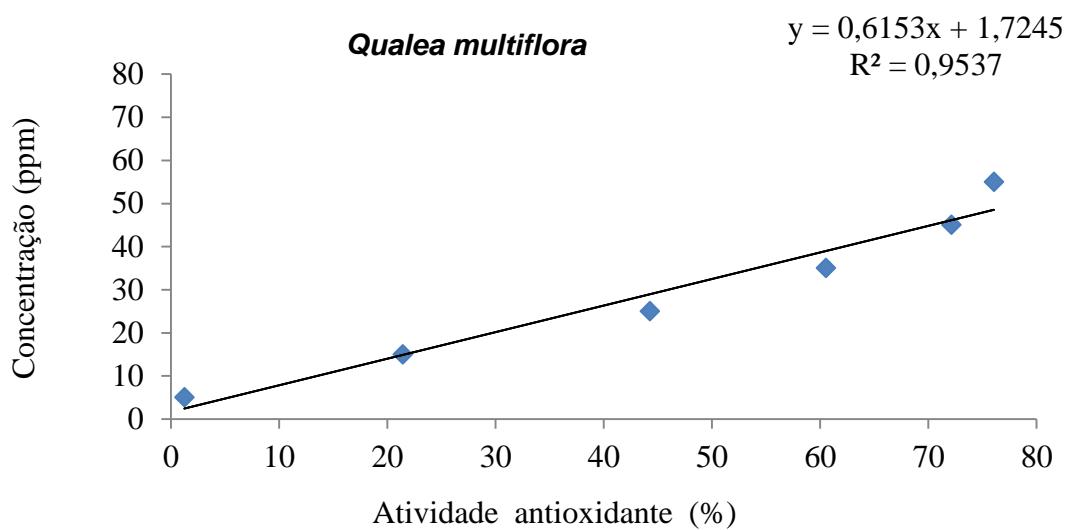
Os ensaios antioxidantes foram feitos usando-se amostras de extrato etanólico de folhas das duas espécies de plantas.

4.10.1 Método de oxidação pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico

O ensaio pelo método do sequestro de radical β -caroteno/ácido linoleico é espectrofotométrico. Usam-se os extratos etanólicos de folhas das duas espécies de plantas na presença de solução em clorofórmio do antioxidante β -caroteno, na presença de emulsões com o ácido linoleico e na de Tween 40 em água saturada de oxigênio. As leituras foram feitas no equipamento UV-vis, em comprimento de onda 470 nm, na região visível. A partir das leituras, os resultados foram lançados em planilha do programa do Microsoft Excel e calculados os valores de **CE₅₀** do DPPH e betacaroteno, de acordo com a equação e a curva de calibração da amostra de planta. Sendo que inicialmente são apresentadas as figuras referentes ao ensaio pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico e posteriormente para o métodos do radical DPPH.

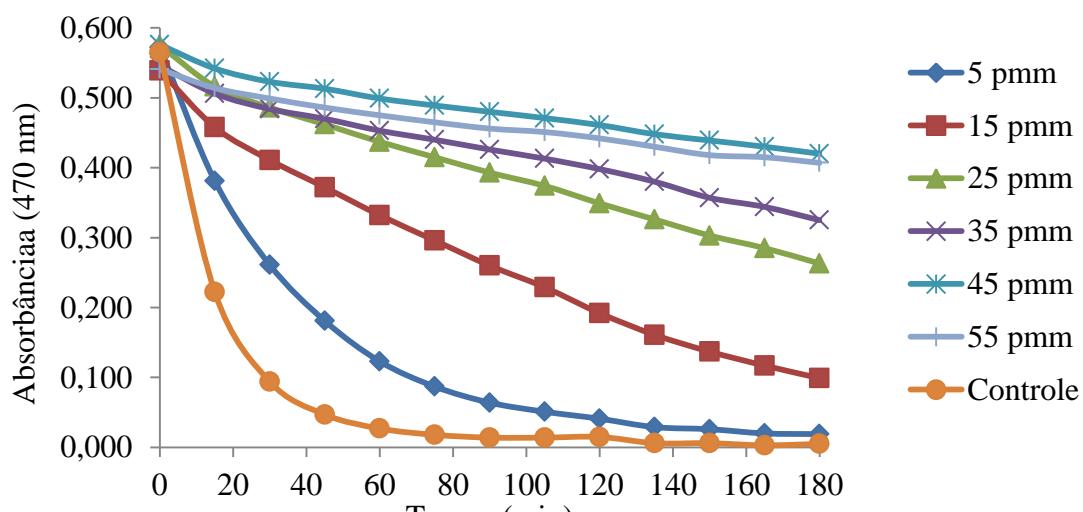
São apresentadas as Figuras do ensaio pelo método analisado em questão.

FIGURA 24 - Curva de calibração obtida no ensaio pelo método β -caroteno/ácido linoleico no comprimento de onda 470 nm



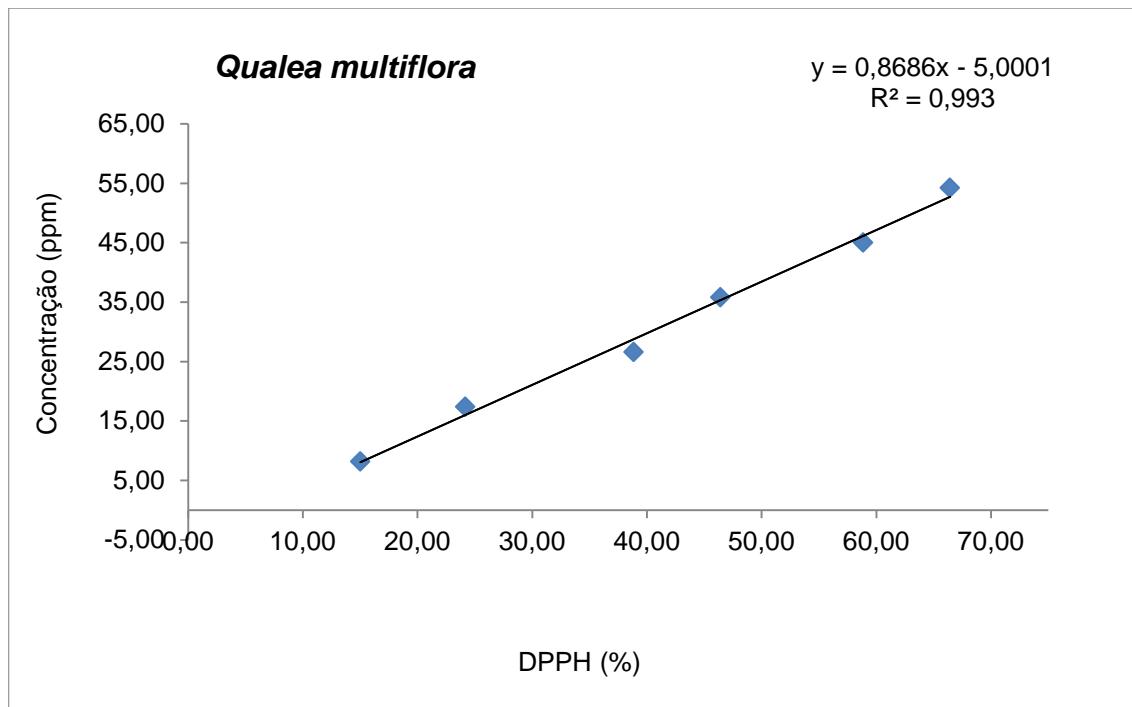
Fonte: O autor

FIGURA 25 - Atividade antioxidante do extrato etanólico de *Qualea multiflora* pelo método β -caroteno/ácido linoleico



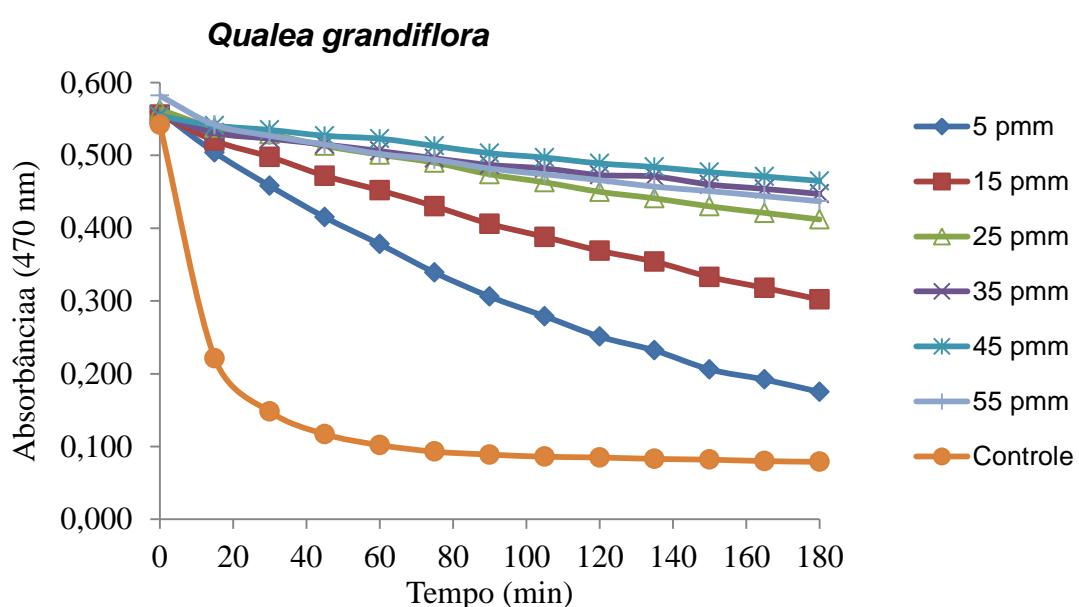
Fonte: O autor

FIGURA 26 - Curva de calibração obtida no ensaio pelo método β -caroteno/ácido linoleico no comprimento de onda 470 nm



Fonte: O autor

FIGURA 27 - Atividade antioxidante do extrato etanólico de *Qualea grandiflora* pelo método β -caroteno/ácido linoleico



Fonte: O autor

Para o ensaio antioxidante pelo método de sequestro de radical pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, os resultados são apresentados na Tabela 12.

TABELA 12 - Resultado de CE_{50} de β -caroteno

Espécies	β -caroteno/ácido linoleico $CE_{50} \pm DP$ ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)
<i>Qualea grandiflora</i>	$22,10 \pm 1,92^a$
<i>Qualea multiflora</i>	$32,85 \pm 3,13^b$

Fonte: O autor

Os dados são apresentados como média, \pm desvio padrão para testes realizados em triplicata. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são indicadas com diferentes letras em cada coluna. CE_{50} : concentração eficiente; β -caroteno: betacaroteno.

Observa-se que o valor de CE_{50} é menor para *Q. Grandiflora*, indicando melhor atividade antioxidante. Quando comparado com resultados de outras espécies esses valores podem ser considerados mais ou menos efetivos, pois há variação dependendo das espécies e das condições ambientais em que o vegetal se encontra.

De acordo com Ribeiro et al. (2011), foram feitos extratos etanólicos de folhas de cinco espécies de *Protium*, uma planta da Amazônia, e verificou-se que os extratos etanólicos foram pouco efetivos a inibição da oxidação pelo método β -caroteno/ácido linoleico. Os mesmos extratos analisados foram bastante efetivos em inibir o radical livre DPPH.

Duarte-Almeida et al. (2006) referem-se sobre a inibição da oxidação de extratos metanólicos de frutas, tais como acerola, morango, amora e açaí. Eles constataram que a acerola, pelo fato de ter concentrações elevadas de ácido ascórbico, apresentou atividade pró-oxidante, que leva ao stress oxidativo provavelmente através da criação de espécies reativas de oxigênio ou através da inibição dos sistemas antioxidantes. Os demais extratos metanólicos das outras frutas apresentaram atividade antioxidante por apresentarem concentrações de compostos fenólicos.

4.10.2 Método do radical DPPH

Foi usada a seguinte equação para o cálculo, mostrado na equação 2 abaixo:

$$\text{Equação 3: \% DPPH}_{\text{REM}} = \frac{[\text{DPPH}]_{T=0} - ([\text{DPPH}]_{T=60} - \text{BRANCO})}{[\text{DPPH}]_{T=0}} \times 100$$

Onde:

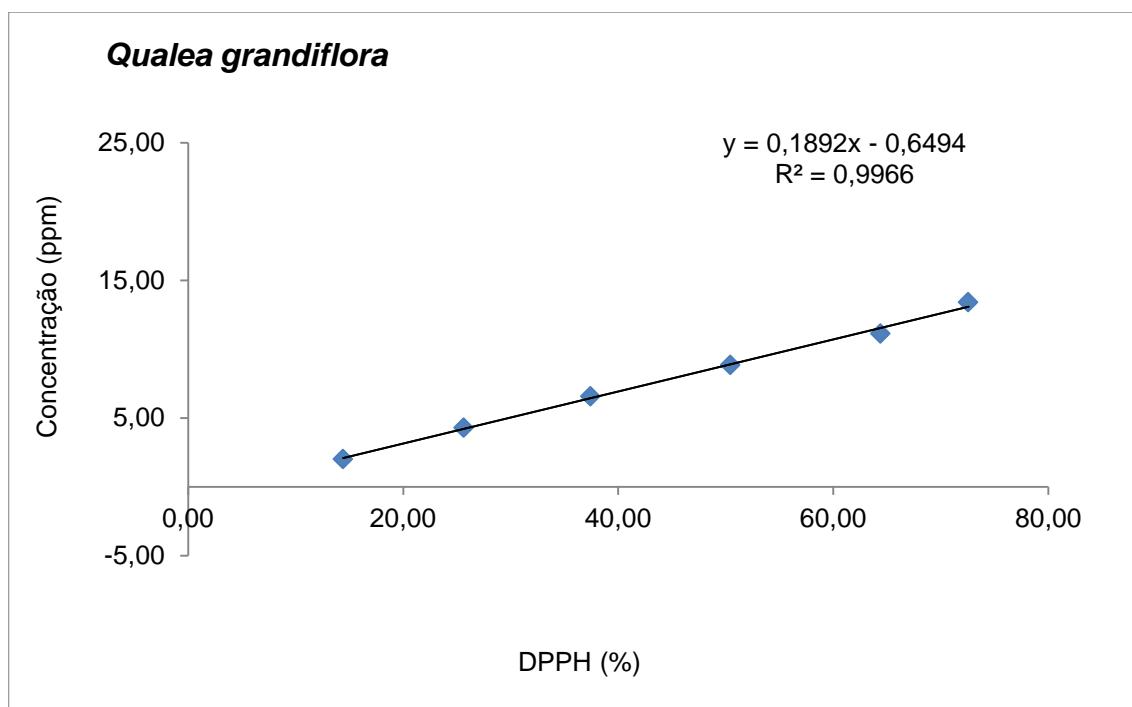
$[\text{DPPH}]_{T=60}$: Absorvância do DPPH após a reação com o extrato;

$[\text{DPPH}]_{T=0}$: Absorvância do DPPH sem o extrato

BRANCO: Absorvância do extrato em metanol.

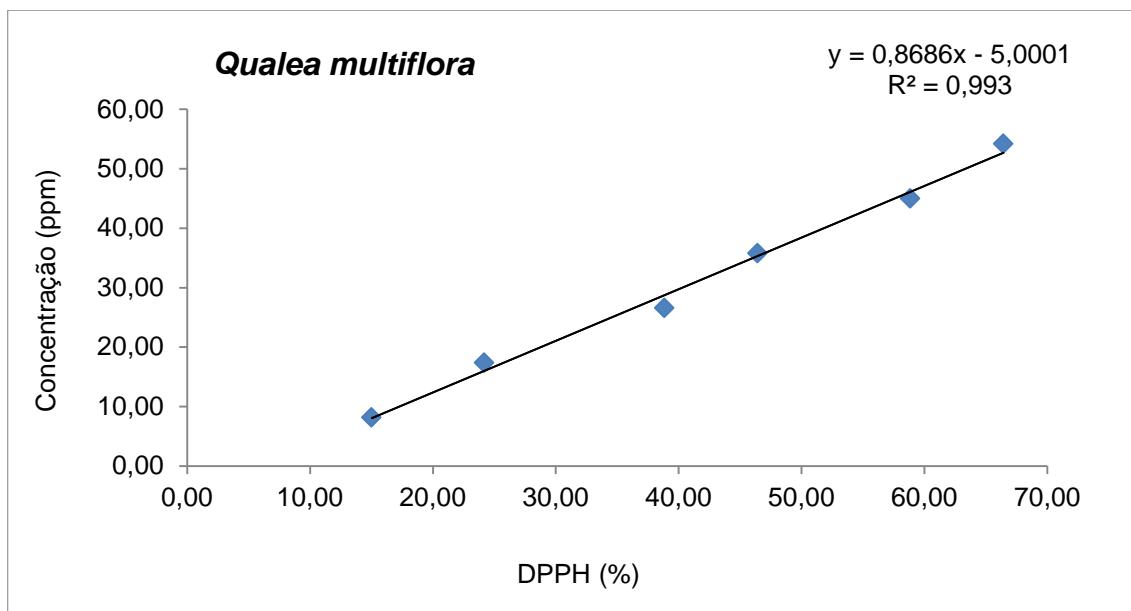
A concentração eficiente, ou seja, a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE_{50}), foi determinada a partir de uma curva linear de primeira ordem, obtida, plotando-se no eixo das ordenadas, as concentrações da amostra ($\mu\text{g mL}^{-1}$), e no eixo das abscissas, a porcentagem de DPPH remanescente (% DPPH_{REM}).

FIGURA 28 - Concentração (ppm) dos extratos etanólicos de *Qualea grandiflora* em função da porcentagem de DPPH



Fonte: O autor

FIGURA 29 - Concentração (ppm) dos extratos etanólicos de *Qualea multiflora* em função da porcentagem DPPH



Fonte: O autor

Para o ensaio antioxidante pelo método DDPH, foram encontrados os seguintes resultados para os extratos etanólicos das espécies apresentados na Tabela 13. O resultado de **CE₅₀** dos extratos etanólicos de folhas de *Qualea grandiflora* indica um maior sequestro de radicais livres por meio desse método pelos compostos presentes no extrato da amostra.

TABELA 13 - Resultado **CE₅₀** do ensaio pelo método do radical DPPH

Espécies	CE₅₀ (µg mL⁻¹)
<i>Qualea grandiflora</i> *	$8,53 \pm 0,31$
<i>Qualea multiflora</i> *	$35,81 \pm 2,37$
<i>Campomanesia pubescens</i>	$6,6 \pm 1,6$
<i>Inga laurina</i>	$10,43 \pm 0,85$
<i>Kielmeyera coriácea</i>	$10,6 \pm 0,7$
<i>Vernonia Brasiliana</i> Less	25 ± 2

Fonte: Furtado (2014), Martins, C. M. (2012), Martins, M. M. (2012) e Rocha (2011).

*Espécies estudadas

Pelo método do radical DPPH acredita-se que substâncias polares que sejam verificadas nesse ensaio. Observa-se que os valores de CE_{50} de DPPH das plantas estudadas no grupo de Laboratório de Produtos Naturais são maiores ou menores do que os valores de CE_{50} das duas *Qualeas*. Observa-se que o valor de CE_{50} é menor para *Qualea grandiflora* indicando uma melhor atividade antioxidante para os extratos etanólicos de folhas quando comparados com os valores de CE_{50} da *Qualea multiflora*.

4.10.3 Resultado do ensaio de Quantificação de Fenóis Totais

Para o ensaio de Quantificação do Teor Fenóis Totais, foram encontrados os seguintes resultados: $164,07 \pm 7,88$ mg de EAG/g extrato para *Q. grandiflora* e $134,91 \pm 4,72$ mg de EAG/g extrato etanólicos de folhas para *Q. multiflora*. Sousa et al. (2007) pesquisaram algumas plantas do estado do Piauí, cujos valores de fenóis totais de extratos etanólicos estão demonstrados na Tabela 14.

TABELA 14 - Resultados do ensaio de teor de Fenóis Totais de plantas do Piauí comparadas com as duas *Qualeas*

Amostras (folhas)	FT mg de EAG/g de extrato EtOH \pm DP
<i>T. brasiliensis</i>	$667,90 \pm 10,92$
<i>C. macrophyllum</i>	$483,63 \pm 26,00$
<i>T. fagifolia</i>	$439,38 \pm 3,15$
<i>Q. grandiflora</i>	$394,90 \pm 3,20$
<i>Qualea grandiflora</i> *	$164,07 \pm 7,88$
<i>Qualea multiflora</i> *	$134,91 \pm 4,72$

Fonte: Sousa et al. (2007) e o autor

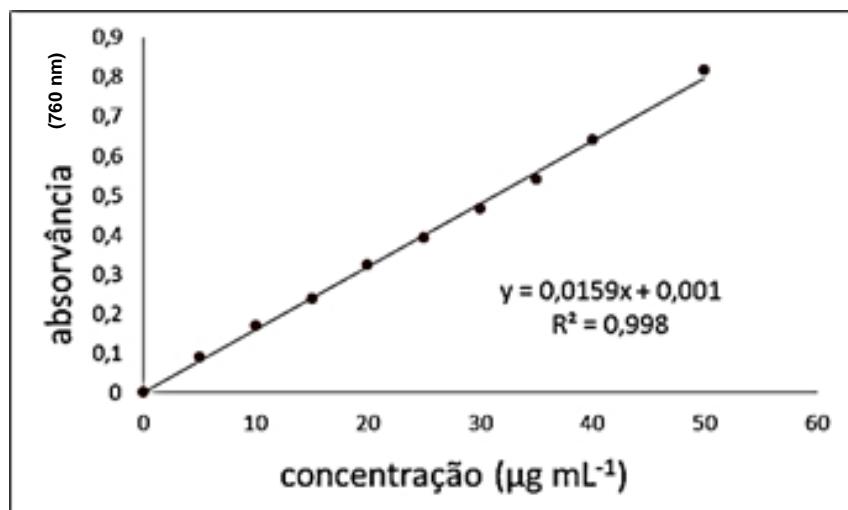
*Espécies estudadas

De acordo com os resultados do ensaio de fenóis totais, obtidos para amostras de folhas de plantas a partir do valor de miligramas de equivalentes de ácido gálico por gramas de extrato etanólico de folhas, nota-se que todas as amostras têm resultados promissores para o ensaio químico de quantificação de fenóis totais.

Observa-se que umas das plantas estudadas por Sousa et al. (2007) é a *Q. grandiflora* e o fato de obter um resultado diferente pode estar relacionado à localização da planta no estado do Piauí - na região Nordeste do país -, ou ainda à época de coleta e até mesmo a quantidade de precipitação de chuvas durante o ano. Muitos desses fatores podem alterar os metabólitos das plantas, levando a um comportamento diferente, mesmo sendo a mesma espécie planta. A metodologia usada por Sousa et al. (2007) foi uma adaptação da metodologia do reagente de Folin Ciocalteau com volumes diferentes das soluções utilizadas. Além de concentração diferente das soluções tal como carbonato de sódio a 15 % bem como maior tempo de reação, duas horas, para depois ser lido em espectrofotômetro.

A Figura 30 mostra a curva de calibração traçada a partir das absorbâncias obtidas para as amostras de extrato etanólico em estudo em diferentes concentrações para o ensaio de quantificação de fenóis totais.

FIGURA 30 - Curva de calibração do ensaio Fenóis Totais



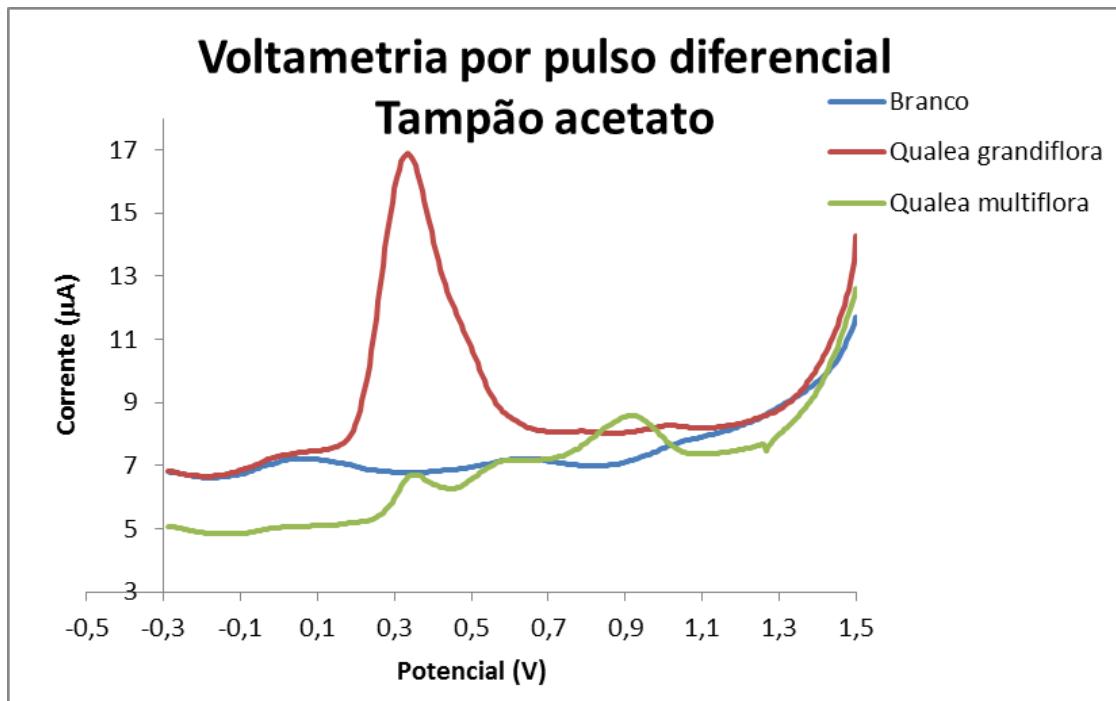
Fonte: O autor

A partir dos valores de absorbância medidos das amostras em 760 nm e empregando-se a equação da reta obtida pela curva de calibração do ácido gálico, foram obtidos os teores de fenóis totais, expressos em miligrama e equivalente de ácido gálico por grama de amostra.

4.10.4 Voltametria por pulso diferencial

São apresentadas as Figuras 31 e 32 referentes ao ensaio de voltametria: o potencial (V) em função da corrente (μA) para extratos etanólicos das duas espécies de plantas. De acordo com a legenda, pode-se observar que os picos em vermelho são da espécie *Qualea grandiflora* e os picos em verde são da *Qualea multiflora*.

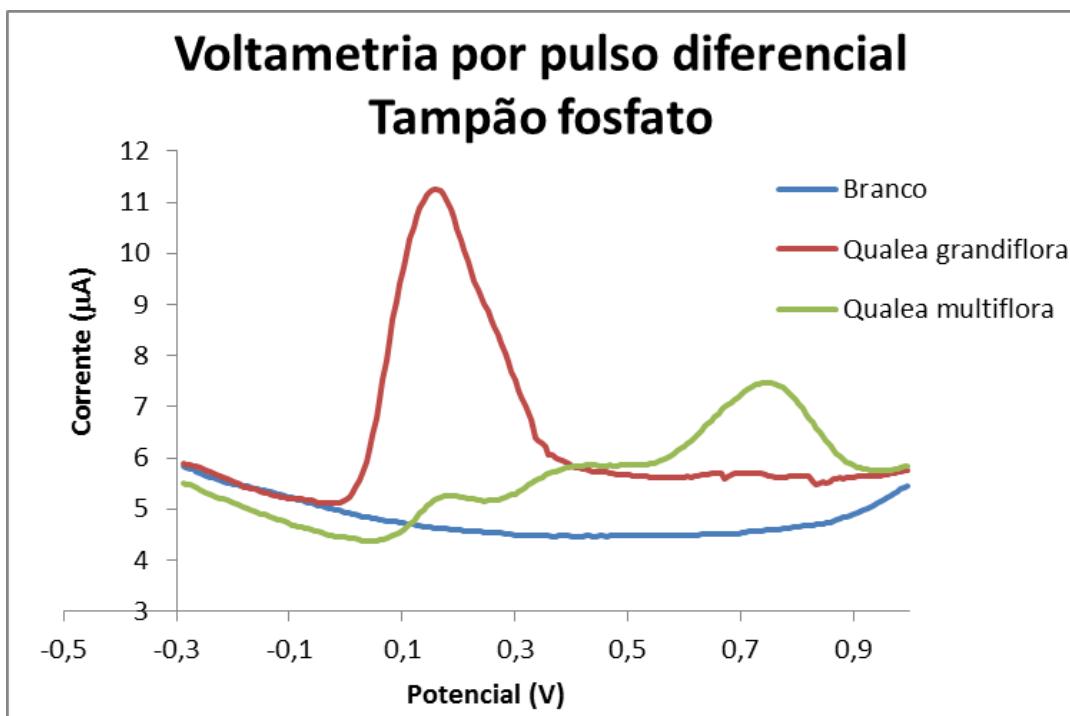
FIGURA 31 - Voltametria por pulso diferencial. Tampão acetato



Fonte: O autor

Para a espécies *Qualea multiflora* foram observados dois picos, por isso houve dois valores diferentes para esse espécies nos dois tampões testados. Os tampões diferentes usados foram importantes para identificar a presença de picos diferentes na espécie *Qualea multiflora*.

FIGURA 32 - Voltametria por pulso diferencial. Tampão fosfato



Fonte: O autor

Além disso, inicialmente foi utilizado o tampão acetato (tampão A) em uma janela de potencial menor e posteriormente foi feita a análise dos mesmos extratos etanólicos usando-se o tampão fosfato (tampão B). Verificou-se que no (tampão B) haviam outros picos que não foram observados no primeiro. Voltou-se ao tampão A e ampliou-se a janela de potencial, em que foi possível verificar os demais picos apresentados pela amostra de extrato etanólico de folhas.

De igual modo, foi possível observar que a corrente é maior para a *Qualea grandiflora* e que a *Qualea multiflora* apresentou picos de correntes em outros potenciais, demonstrando que possui compostos diferentes, eletroquimicamente oxidáveis da *grandiflora*. Esse comportamento pode ser observado em ambos os tampões.

A voltametria relaciona o potencial de oxidação e a intensidade de corrente ou a carga com a atividade antioxidante, sendo mais sensíveis que os demais métodos espectrofotométricos. O potencial de oxidação de uma amostra é o pico de corrente no processo de oxidação do material. Assim, quanto menor o valor do potencial de oxidação, a substância terá maior facilidade em doar elétrons, ou seja, a substância tem maior poder antioxidante (ALVES et al., 2010). Nesse sentido, a carga

transferida é diretamente proporcional à concentração dos antioxidantes presentes na amostra (ALVES et al., 2004).

Os extratos etanólicos de *Qualea grandiflora* apresentaram menor potencial e possuem uma classe de compostos que oxidam mais quando comparada à espécie *Qualea multiflora*.

Conforme Martins, M. M. (2012) são apresentados na Tabela 15 os valores de potencial e carga da espécie de planta *Vernonia brasiliiana* no ensaio de voltametria por pulso diferencial de extratos etanólicos.

TABELA 15 - Voltametria de extratos de uma planta do cerrado

Voltametria		
Amostra de folhas de planta do cerrado	*Potencial (V)	Carga (Q) (μ C)
BHT	0,028 \pm 0,003	105 \pm 13
<i>Vernonia brasiliiana</i> Less	0,205 \pm 0,012	158 \pm 9
<i>Qualea grandiflora</i>**	0,158 \pm 0,003	41,07 \pm 0,9
<i>Qualea multiflora</i>**	0,186 \pm 0,009 0,754 \pm 0,003	10,5 \pm 0,3

Fonte: Martins, M. M. (2012).

BHT: Antioxidante Padrão

*Tampão fosfato

** Plantas estudadas

Alves et al. (2004) sugerem que, quanto maior o valor de carga(Q), maior poderá ser a quantidade de compostos antioxidantes. Sendo assim e observando os valores acima, os autores indicam que quanto maior o poder de oxidação menor será o seu poder redutor. A espécie de planta *Vernonia brasiliiana* citada na Tabela 15 tem uma capacidade antioxidante melhor, há um comportamento melhor que a *Qualea grandiflora* e que possui um valor de carga (Q) menor. Já a espécie *Qualea multiflora* tem uma carga menor se comparada com a planta *Q. grandiflora*.

**5 COMPARAÇÃO DOS RESULTADOS DOS ENSAIOS
ESPECTROFOTOMÉTRICOS E VOLTAMETRIA POR PULSO
DIFERENCIAL**

A Tabela 16 apresenta os resultados dos ensaios antioxidantes pelos métodos DPPH, betacaroteno/ácido linoleico, quantificação de fenóis totais e voltametria por pulso diferencial.

TABELA 16 - Resultados dos ensaios DPPH, β -caroteno, teor de fenóis totais

	DPPH CE_{50} + DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	β -caroteno CE_{50} + DP ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Fenóis totais + DP (mg de EAG/g extrato)
BHT*	6,5 \pm 0,2	-	-
<i>Q. grandiflora</i>	8,53 \pm 0,31 ^b	22,10 \pm 1,92 ^b	164,07 \pm 7,88 ^b
<i>Q. multiflora</i>	35,81 \pm 3,13 ^a	32,85 \pm 3,13 ^a	134,91 \pm 4,72 ^a

Fonte: O autor

*Antioxidante Padrão

Os dados são apresentados como média, \pm desvio padrão para testes realizados em triplicata.

Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são indicadas com diferentes letras em cada coluna. CE_{50} : concentração eficiente; **FT**: fenóis totais.

O ensaio antioxidante de DPPH mede a capacidade de radical instável de DDPH que reage com 50 por cento (CE_{50}) dos componentes do extrato etanólico para evitar a oxidação e para levar a estabilização do radical formado de DPPH. Acredita-se que a grande maioria dos compostos orgânicos presentes no extrato etanólico de folhas seja formada por compostos fenólicos, o que levaria a uma maior e melhor estabilização (os pares de elétrons das hidroxilas estabilizam o anel aromático), devido, dentre outros fatores, à ressonância.

Quanto menor o valor de CE_{50} , maior será a atividade antioxidante. Se tomarmos como base o antioxidante sintético, o BHT, quanto mais próximo do valor de CE_{50} do ensaio em questão, ou seja, do valor do BHT, melhor será a atividade antioxidante. Se o valor de CE_{50} no ensaio antioxidante de DPPH for menor, maior deverá ser o resultado na quantificação de Fenóis Totais. Quanto maior o valor do

ensaio de Fenóis Totais, maior poderá ser a atividade antioxidante do material que está sendo analisado.

De acordo com Ayres et al. (2008), foram isolados flavonóides de extratos etanólicos de folhas; essa condição pode justificar a atividade antioxidante desses extratos.

Os valores de **CE₅₀** para o ensaio de DPPH em que há uma diferença entre as plantas *Qualea grandiflora* e *multiflora*. Se fosse seguir um mesmo padrão para os ensaios pelo método do sistema betacaroteno/ ácido linoleico, verifica-se que a diferença entre os valores de **CE₅₀** das duas *Qualeas* não é tão grande a diferença. Isso poderia estar relacionado a classe de compostos que são verificadas em cada ensaio. Substâncias mais polares no ensaio de DPPH e menos polares no ensaio betacaroteno/ácido linoleiro.

A Tabela mostra os resultados de voltametria por pulso diferencial.

TABELA 17 - Resultado de voltametria por pulso diferencial

	Tampão acetato		Tampão fosfato	
	Carga (μC)	Potencial (V)	Carga (μC)	Potencial (V)
BHT*	-	-	105 ± 13	0,028 ± 0,003
Q. <i>grandiflora</i>	60,7 ± 2,9	0,366 ± 0,006	41,7 ± 0,9	0,158 ± 0,003
Q. multiflora	2,80 ± 0,05 6,10 ± 0,05	0,344 ± 0,003 0,914 ± 0,007	1,30 ± 0,05 10,5 ± 0,4	0,186 ± 0,009 0,754 ± 0,003

Fonte: O autor

*Antioxidante Padrão

Os valores de carga foram maiores para a espécie *Q. grandiflora* do que para *Q. multiflora*. A carga é definida pela área do pico de oxidação, maior pico para *Q. grandiflora*. Quanto maior for a carga, maior será a quantidade de compostos que oxidam no potencial analisado e, portanto, maior a atividade antioxidante para *Q. grandiflora*. Os ensaios antioxidantes deram o mesmo indicativo de resultado para a espécie *Q. grandiflora*.

Segundo Reis et al. (2009) métodos eletroquímicos, como a voltametria, surgem como boa alternativa para a determinação de atividade antioxidante e elucidação de mecanismos redox de produtos naturais e seus extratos vegetais.

Conforme Furtado (2014), Martins, C. M. (2012), Martins, M. M. (2012) e Rocha (2011), (Tabela 18) os valores de atividade antioxidante com DPPH para algumas espécies do Cerrado variam de espécie para espécie e são diferenciados uma vez que essa atividade depende dos compostos presentes que, por sua vez, dependem da natureza das espécies de plantas, embora haja casos os quais há uma correlação entre os resultados de atividade antioxidante e conteúdo de Fenóis Totais.

TABELA 18 - Resultados de CE_{50} do ensaio pelo método do radical DPPH e teor de Fenóis Totais de plantas estudadas no Laboratório de Produtos Naturais da UFU/MG

Plantas do cerrado	CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Teor de Fenóis totais (mg EAG/ g extrato)
<i>Qualea grandiflora</i>	8,53+0,31	164,07 \pm 7,88 ^a
<i>Qualea multiflora</i>	35,81 \pm 2,37	134,91 \pm 4,72 ^b
<i>Campomanesia pubescens</i>	6,6 \pm 1,6	115,0 \pm 1,8
<i>Inga laurina</i>	10,43 \pm 0,85	255,38 \pm 0,29
<i>Vernonia Brasiliiana</i> Less	25 \pm 2	133,3 \pm 3
<i>Kielmeyera coriacea</i>	10,6 \pm 0,7	309 \pm 4

Fonte: Furtado (2014), Martins, C. M. (2012), Martins, M. M. (2012) e Rocha (2011).

*a e b espécies estudadas

De acordo com a Tabela 18, pode-se observar que a espécie com o menor e melhor valor de CE_{50} é a *Campomanesia pubescens*, tendo melhor resultado quando comparada com a *Qualea grandiflora*. Isso pode estar relacionado ao fato de serem plantas diferentes, pois a quantidade e a natureza dos compostos polifenólicos produzidos é diferente. Quando se compara os valores do resultado de quantificação de fenóis totais, o melhor valor é da planta *Kielmeyera coriacea*, porém todas as plantas são de espécies diferentes. De acordo com Aquino et al. (2013), extratos etanólicos de folhas de *Cordiera sessilis* apresentaram os seguintes valores de CE_{50} e fenóis totais expresso em mg de EAG/g de amostra: $38,9 \pm 2,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $35,2 \pm 0,5$

mg de EAG/g_{extrato}. Menores valores de CE₅₀ são considerados ativos. A presença de compostos fenólicos demostram uma correlação positiva da atividade antioxidante observada nos extratos etanólicos de folhas.

Na Tabela 19 são citados os resultado dos ensaios espectrofotométricos dos extratos etanólicos de folhas duas espécies de plantas estudadas.

TABELA 19 - Resultados dos ensaios antioxidantes pelo método DPPH e β-caroteno/ácido linoleico e teor de Fenóis Totais dos extratos etanólicos de folhas

Espécies	Atividade antioxidante CE ₅₀ (μg mL ⁻¹)		Fenóis totais mg de EAG/ g extrato
	DPPH	β- caroteno/ácido linoleico	
<i>Qualea grandiflora</i>	8,53+0,31 ^b	22,10 ± 1,92 ^b	164,07 ± 7,88 ^b
<i>Qualea multiflora</i>	35,81 ± 2,37 ^a	32,85 ± 3,13 ^a	134,91 ± 4,72 ^a

Fonte: O autor

Os dados são apresentados como média, ± desvio padrão para testes realizados em triplicata. Diferenças significativas (p ≤ 0,05) são indicadas com diferentes letras em cada coluna. CE₅₀: concentração eficiente; FT: fenóis totais.

De acordo com Sousa et al. (2007), o valor de CE₅₀ é de 50,16 μg.mL⁻¹. O fato de o resultado ser diferente ao achado nesta pesquisa pode estar relacionado à localização de onde as amostras de folha foram coletadas (Piauí). Acredita-se que as diferenças dos resultados para os ensaios químicos semelhantes podem estar associadas ao clima, solo, precipitação de chuvas em regiões diferentes. Essas também podem ter relação com a produção e quantidade de metabólitos secundários. Para a região de Cerrado do Alto Paranaíba e Triângulo Mineiro, o valor de CE₅₀ para o ensaio antioxidante de DPPH para extrato etanólico de folhas de *Qualea grandiflora* foi de 8,53 ± 0,31μg.mL⁻¹, enquanto que para a espécie *Qualea multiflora* foi de 35,81 ± 2,37μg.mL⁻¹. O valor de CE₅₀ de DPPH, para a espécie *grandiflora* assemelha-se aos valores do mesmo ensaio químico, se comparadas com as plantas da Tabela 18.

Para o ensaio antioxidante pelo método β-caroteno/ácido linoleico, o CE₅₀ para extrato etanólicos de *Qualea grandiflora* poderia ser menor, comparando-se com o CE₅₀ para o ensaio com radical DPPH. Isso pode ocorrer devido à classe

diferente de compostos verificados. Acredita-se que para o ensaio com o DPPH ocorre a oxidação frente a compostos polares e no ensaio pelo método betacaroteno/ácido linoleico em compostos apolares. Quanto maior o valor de quantificação de Fenóis Totais, maior será a atividade antioxidante da amostra, no caso de extratos etanólicos de folhas das espécies *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora*. Sendo assim, para esse ensaio químico, os resultados são mais promissores para extratos etanólicos de folhas de *Q. grandiflora*.

Os resultados dessa pesquisa complementam informações sobre as duas plantas objetos de estudo bem como a família e ao gênero que elas pertencem. Dessa plantas, poderá haver o isolamento e a síntese de compostos das partes que apresentaram atividades, bem como testes usando outras partes das mesmas, isso para serem usados como matéria prima para fabricação de medicamentos, com testes prévios antes de poder serem consumidos por seres humanos.

6 CONCLUSÕES

O ensaio antioxidante pelo método do radical DPPH e pelo método β -caroteno/ácido linoleico, e a quantificação de fenóis totais resultaram em uma condição antioxidante mais promissora para a espécie *Qualea grandiflora* do que para extratos etanólicos de folhas de *Qualea multiflora*. Os extratos etanólicos de *Qualea multiflora* e de *Qualea grandiflora* apresentaram boas atividades antioxidantes, devido à possibilidade de presença de compostos fenólicos presentes nas amostras.

Os óleos essenciais mostraram potencial de atividade antileishmania contra *Leishmania amazonensis*, sendo que o óleo essencial das partes aéreas da planta foi mais promissor para a espécie *Qualea multiflora* do que para *Qualea grandiflora*. Os extratos etanólicos não apresentaram atividade antiprotozoária. Nesse sentido, quanto menor for o valor de IC_{50} mais promissores e melhores serão os resultados da atividade. Para a citotoxicidade células Vero, os valores são elevados, indicando que há uma menor toxicidade dos óleos essenciais e extratos etanólicos de folhas de duas espécies de *Qualeas*. Os óleos da espécie *Q. multiflora* apresentaram melhores resultados para atividade antileishmania e baixa citotoxicidade para células Vero que óleos de *Q. grandiflora*.

Os óleos essenciais foram menos tóxicos para as células Vero e mais tóxicos para o parasita *Leishmania amazonensis*. Não houve atividade no ensaio de voltametria por pulso diferencial de óleo essencial de folhas. Dessa forma, foram observados atividades nos ensaios realizados com as duas espécies de *Qualeas*, havendo possibilidades de investigações mais aprofundadas desta espécie. Poderá ser realizado futuramente novo ensaio de atividade antimicrobiana com microrganismos diferentes e concentrações diferentes das amostras testadas inicialmente. Isso para verificar se há atividade antimicrobiana frente aos óleos essenciais e extratos etanólicos.

Esse trabalho de dissertação se faz pertinente na medida em que compara atividades químicas e biológicas de extratos etanólicos de folhas e óleos essenciais de duas plantas de mesmo gênero e família, porém de espécies diferentes, pois complementa estudos já existentes dessas plantas e de outras plantas do cerrado brasileiro. Sua importância se dá na elucidação e na comprovação de atividades já

citadas em outros estudos, mas, sobretudo, por acrescentar informações e conhecimentos de plantas do gênero *Qualea* e da família Vochysiaceae.

O rendimento dos óleos essenciais de folhas de *Qualea grandiflora* e *Qualea multiflora* foi baixo, e foram majoritários os seguintes grupos funcionais para *Qualea multiflora*: monoterpenos oxigenados, álcoois, aldeídos e cetonas. Para a espécie *Qualea grandiflora*, os compostos de maior número são os sesquiterpenos oxigenados, os monoterpenos oxigenados, aldeídos e ácidos carboxílicos.

Os óleos essenciais e extratos etanólicos não apresentaram atividade antimicrobiana, contra as bactérias bucais. Os compostos presentes nas amostras, aquelas que tiverem atividade podem ser sintetizados ou serem usados como precursores de drogas mais eficazes para o combate à doenças.

Os extratos etanólicos apresentaram boa atividade antioxidante, com bom potencial fenólico. Os ensaios de atividade antioxidante, fenóis totais apresentaram boa concordância entre si e com a voltametria de pulso diferencial.

Contudo, a espécie *Qualea grandiflora* apresentou melhores resultados de atividade antioxidante, quantificação de fenóis totais, voltametria por pulso diferencial, quando comparada com a espécie *Q. multiflora*. Mas, as duas espécies possuem valores baixos de rendimento dos óleos essenciais. Os ensaios espectrofotométricos concordaram com a voltametria por pulso diferencial indicando melhores atividades para a espécie *Q. grandiflora* quando comparada com a *Q. multiflora*. Em aspecto de óleo essencial a espécie *Qualea multiflora* teve melhor atividade frente à atividade antileishmania quando comparada com a *Qualea grandiflora*.

REFERÊNCIAS

- AAS, J. A.; PASTER, B. J.; STOKES, L. N.; OLSEN, I.; DEWHIRT, F. E. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **Journal of Clinical Microbiology**, Oslo, v. 43, n. 11, p. 5721-5732, Nov. 2005.
- ABDILLE, M. H.; SINGH, R. P.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. **Food Chemistry**, Washington, v. 90, n. 4, p. 891-896, May 2005.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4th ed. Illinois: Allured, 2007. 804 p.
- AHMAD, I.; AQIL, F.; OWAIS, M. **Modern phytomedicine**: turning medicinal plants into drugs. Weinheim: Wiley-VCH, 2006. 384 p.
- ALLAKER, R. P.; DOUGLAS, C. W. Novel antimicrobial therapies for dental plaque-related diseases. **International Journal of Antimicrobial Agents**, Bethesda, v. 33, n. 1, p. 8-13, Jan. 2009.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA, 1998. 464 p.
- ALVES, A. A.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 6, p. 980-985, set. 2004.
- ALVES, C. Q.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMANIA, E. F. A.; SMÂNIA JÚNIOR, A.; ZANI, C. L. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substrato orgânicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, T. M. A.; GANDRA, P. G.; MACEDO, D. V.; KUBOTA, L. T. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 95, n. 3, p. 367-373, May/June 2000.
- AMBROSIO, S. R.; FURTADO, N. A. J. C.; OLIVEIRA, D. C. R. de; COSTA, F. B. da; MARTINS, C. H. G.; CARVALHO, T. C. de; PORTO, T. S.; VENEZIANI, R. C. S. Antimicrobial activity of kaurane diterpenes against oral pathogens. **Zeitschrift für Naturforschung (C)**, Leipzig, v. 63, n. 5/6, p. 326-330, 2008.
- AQUINO, F. J. T.; CANELHAS, B. B.; CUNHA, L. C. S.; SOUZA, L. C.; BARROS, T. T.; OLIVEIRA, A.; MORAIS, S. A. L.; CHANG, R.; NASCIMENTO, E. A.; SOUZA, M. G. M.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Essencial oil composition and extractcts of cordiera sessilis (Vell.) Kuntzer with antioxidant and antimicrobial activity. **Latin America Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 32, n. 3, p. 371-377, 2013.

ARGOLO, A. C. C.; SANT'ANA, A. E. G.; PLETSCH, M.; COELHO, L. C. B. B. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**, Essex, v. 95, n. 2, p. 229-233, 2004.

ARRUDA, D. A.; ALEXANDRI, F. L. d'; KATZIN, A. M.; ULIANA, S. R. B. Antileishmanial activity of the terpene nerolidol. **Antimicrobial Agentes and Chemotherapy**, Bethesda, v. 49, n. 5, p. 1679-1687, May 2005.

AYRES, M. C. C.; ESCÓRIO, S. P.; COSTA, D. A.; CHAVES, M. H.; VIEIRA JÚNIOR, G. M.; CAVALHEIRO, A. J. Constituintes químicos das folhas de *Qualea grandiflora*: atribuição dos dados de RMN de dois flavonóides glicosilados acilados diastereoisoméricos. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 6, p. 1481-1484, 2008.

BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, Feb. 2008.

BERNARDES, W. A.; LUCARINI, R.; TOZATTI, M. G.; SOUZA, M. G. M.; PAULETTI, P. M. A.; GROPPY, M.; CUNHA, W. R. Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against oral pathogens: relevance of carnosic acid and carnosol. **Chemistry & Biodiversity**, Weinheim, v. 7, n. 7, p. 1835-1840, 2010.

BIZZO, H. R.; HOVELL, A. M. C.; RESENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BONACORSI, C. **Atividade anti-*Helicobacter pylori* e potencial antioxidante de espécies vegetais do Cerrado brasileiro**. 2009. 217 f. Tese (Doutorado em Biociências e Biotecnologia Aplicadas à Farmácia) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2009.

BORLAUG, N. E. Feeding a world of 10 billion people: themiracle ahead. In: BAILEY, R. (Ed.). **Global warming and other eco-myths**. Chicago: Institute Roseville, 2002. p. 29-60.

BOTTERWECK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOHM, R. A.; KLEINJANS, J.; BRANDT, P. A. van den. Intake of butylated hydroxyanisole and butylated hydroxytoluene and stomach cancer risk: results from analyses in the Netherlands cohort study. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 38, n. 7, p. 599-605, July 2000.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, London, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Guia de campo: 500 espécies de vegetação de Cerrado**. Brasília, 2011. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/estruturas/sbf2008_df/_publicacao/148_publicacao14022012101832.pdf>. Acesso em: 10 abr. 2014.

BRITO, A. M. G. **Avaliação da atividade antileishmanial dos óleos essenciais das plantas *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf., *Eucalyptus citriodora* Hook., *Mentha arvensis* L., *Mentha piperita* L.** 2007. 75 p. Dissertação (Mestrado em Saúde e Ambiente) - Universidade Tiradentes, Aracaju, 2007.

CARDOSO, M. G.; SHAN, A. Y. K. V.; PINTO, J. E. B. P.; DELU FILHO, N.; BERTOLUCC, S. K. V. **Metabólitos secundários vegetais:** visão geral, química e medicinal. Lavras: UFLA, 2001. v. 1, 81 p.

CARVALHO, A. C. B.; BALBINO, E. E.; MACIEL, A.; PERFEITO, J. P. S. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 18, n. 2, p. 314-319, abr./jun. 2008.

CARVALHO, D. A.; RODRIGUES, V. E. G. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio dos cerrados na região do Alto Rio Grande, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 9, n. 2, p. 17-35, 2007.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais:** metabólitos secundários. Viçosa, MG: UFV, 2004. v. 1, 113 p.

CHAAR, J. da S. **Estudos analíticos e modificação química por acetilação do linalol contido no óleo essencial da espécie *Aniba dukei kotermans*.** 2000. 150 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade de São Paulo, São Carlos, 2000.

CHIBALE, K.; CHOUTEAU, F.; LATEGAN, C. A.; MAHARAJ, V. J.; PILLAY, P.; SMITH, P. J.; VLEGGAAAR, R. Antiplasmodial hirsutinolides from *Vernonia staehelinoides* and their utilization towards a simplified pharmacophore. **Phytochemistry**, Saint Paul, v. 68, p. 1200-1205, Apr. 2007.

CHUNG, J. Y.; CHOO, J. H.; LEE, M. H.; HWANG, J. K. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. **Phytomedicine**, New Delhi, v. 13, n. 4, p. 261-266, 2006.

CLARK, W. B.; BAMMANN, L. L.; GIBBONS, R. J. Comparative estimates of bacterial affinities and adsorption sites on hydroxyapatite surfaces. **Infection and Immunity**, Washington, v. 19, n. 3, p. 846-853, 1978.

COSTA, M. C. A. **Relações entre a estrutura química de neolignanas e a sua atividade anti-leishmaniose, envolvendo cálculos de solvatação.** 1998. 183 f. Tese (Doutorado em Ciências Moleculares) - Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 1998.

COUTINHO, L. M. O conceito de cerrado. **Revista Brasileira de Botânica**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 17-23, 1978.

CUNHA, L. C. S. **Estudo fitoquímico, atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica da espécie *Cassia bakeriana* Craib.** 2013. 285 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

CUNHA, L. C. S.; MORAIS, S. A. L.; MARTINS, M. M.; MARTINS, C. H. G.; CHANG, R.; AQUINO, F. J. T.; OLIVEIRA, A.; MORAES, T. S.; MACHADO, F. C.; SILVA, C. V.; NASCIMENTO, E. A. Antibacterial activity of triterpene acids and semi synthetic derivatives against oral pathogens. **Zeitschrift für Naturforschung**, Leipzig, v. 62, n. 9/10, p. 668-672, 2007.

CUNHA, L. C. S.; SILVA, M. L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; VINHÓLIS, A. H. C.; MARTINS, C. H. G.; CUNHA, W. R. Chemical composition, cytotoxic and antimicrobial activity of essential oils from *Cassia bakeriana* Craib. against aerobic and anaerobic oral pathogens. **Molecules**, Basel, v. 18, n. 4, p. 4588-4598, 2013.

CUNHA, W. R.; CREVELIN, E. J.; ARANTES, G. M.; CROTTI, A. E. M.; SILVA, M. L.; FURTADO, N. A. J.; ALBUQUERQUE, S.; FERREIRA, S. S. A study of trypanocidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species. **Phytotherapy Research**, London, v. 20, n. 6, p. 474-478, 2006.

DAFERERA, D. J.; ZIOGAS, B. N.; POLISSIOU, M. G. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 48, n. 6, p. 2576-2581, June 2000.

DE MEJÍA, E. G.; SONG, Y. S.; HECK, C. I.; RAMÍREZ-MARES, M. Yerba mate tea (*Ilex paraguariensis*): Phenolics, antioxidant capacity and in vitro inhibition of colon cancer cell proliferation. **Journal of Functional Foods**, New York, v. 2, n. 1, p. 23-34, 2010.

DEUS, M. J. **Guia de campo: vegetação do cerrado 500 espécies**. Brasília: MMA/SBF, 2011. 532 p.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência: um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Fundação UNESP, 1996. 213 p.

DIAS, B. F. S. **Alternativas de desenvolvimento dos cerrados: manejo e conservação dos recursos naturais renováveis**. Brasília: Fundação Pró-Natureza, 1992. 97 p.

DICIONÁRIO online de português. Disponível em:
<http://www.dicio.com.br/fitofionomia/>. Acesso em: 27 set. 2014.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **MultiCiência**, São Carlos, v. 7, n. 10, p. 1-16, 2006.

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β-caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, abr./jun. 2006.

ELVIN-LEWIS, M. Should we be concerned about herbal remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 75, n. 2, p. 141-164, May 2001.

FABRI, R. L.; COIMBRA, E. S.; ALMEIDA, A. C.; SIQUEIRA, E. P.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L.; SCIO, E. Essential oil of *Mitracarpus frigidus* as a potente source of bioactive compunds. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 4, p. 1073-1080, dez. 2012.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F. **Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos**: um modelo multidisciplinar. São Paulo: Multiciênciia, 2006. 8 p.

FURTADO, F. B. **Estudo químico, análise do óleo essencial e atividades biológicas de *Inga laurina* (Sw.) Willd.** 2014. 101 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2014.

GARCÍA, A. A.; CARRIL, E. P. U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca**. Serie Fisiología Vegetal, Madrid, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GASPI, F. O. G.; FOGLIO, M. A.; CARVALHO, J. E.; MORENO, R. A. Pharmacological activities investigation of crude extracts and fractions from *Qualea grandiflora* Mart. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 107, n. 1, p. 19-24, Aug. 2006.

GIL, E. S.; REIS, N. S.; MENEGHATTI, R.; SERRANO, S. H. P. Métodos eletroquímicos usados para avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 28, n. 6, p. 949-953, 2009.

GÓMEZ-BARRIO, A.; VEJA, C.; ESCARIO, J. A.; ROLÓN, M. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, Berlin, v. 99, n. 2, p. 103-107, July 2006.

GUARIM NETO, G.; MORAIS, R. G. D. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.

HAY, R. K. M.; WATERMAN, G. P. **Volatile oil crops**: their biology, biochemistry and production. London: J. Willey, 1995. 200 p.

HERBÁRIO digital de Pirenópolis. Disponível em:
<http://www.pirenopolis.tur.br/meioambiente/herbariodigital/Vochysiaceae/Qualea/multiflora>. Acesso em: 27 set. 2014.

HERBÁRIOS ONLINE. Disponível em:
<http://www.qualea.com.br/2012/06/herbarios-online/>. Acesso em: 29 mar. 2014.

HIRASAWA, M.; TAKADA, K. Susceptibility of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* to cell wall inhibitors and development of a novel selective medium for *S. sobrinus*. **Caries Research**, Basel, v. 36, n. 3, p. 155-160, 2002.

HIRUMA-LIMA, C. A.; SANTOS, L. C.; KUSHIMA, H.; PELLIZZON, C. H.; SILVEIRA, G. G.; VASCONCELOS, P. C.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. *Qualea grandiflora*, a Brazilian “Cerrado” medicinal plant present an important antiulcer activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 104, n. 1/2, p. 207-2014, Mar. 2006.

HSIAO, G.; SHEN, M. Y.; LIN, K. H.; LAN, M. H.; WU, L. Y.; CHOU, D. S.; LIN, C. H.; SU, C. H.; SHEU, J. R. Antioxidative and hepatoprotective effects of *Antrodia camphorata* extract. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Taipei, v. 51, n. 11, p. 3302-3308, 2003.

HUANG, T.; GAO, P.; HAGEMAN, M. J. Rapid screening of antioxidants in pharmaceutical formulation development using cyclic voltammetry: potential and limitations. **Current Drug Discovery Technologies**, Beijing, v. 1, n. 2, p. 173-179, 2004.

IACONO, F. L. **HMA - Hospital de Medicina Alternativa, Goiânia, GO**: histórico. Disponível em: <<http://fernandoloiacono.blogspot.com.br/2012/01/hma-hospital-de-medicina-alternativa.html>>. Acesso em: 15 set. 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169>. Acesso em: 24 mar. 2014.

JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models in vitro. **Food Chemistry**, Oxford, v. 73, n. 3, p. 285-290, 2001.

JESUS, A. M. **Saberes populares em plantas medicinais**. Rio de Janeiro: Centro Universitário Augusto Motta, 2008. 68 p.

LIMA, R. K.; CARDOSO, M. G.; MORAES, J. C.; VIEIRA, S. S.; MELO, B. A.; FILGUEIRAS, C. C. Composição dos óleos essenciais de anil-estrelado *Illicium verum* L. e de capim-limão *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf: avaliação do efeito repelente sobre *Brevidoryne brassicae* (L.) (Hemiptera: Aphididae). **BioAssay**, Lavras, v. 3 n. 8, p. 1-6, 2008.

LINDHE, J. **Tratado de periodontia clínica e implantologia oral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999. 720 p.

LIU, Z. Q. Chemical methods to evaluate antioxidant ability. **Chemical Reviews**, Washington, v. 110, n. 10, p. 5675-5691, 2010.

LONDE, G. B. **Análise química da *Cecropia adenopus* (Embaúba)**. 2004. 84 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras**: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002. 351 p.

LORENZO, J. L. de. **Microbiologia para o estudante de odontologia**. São Paulo: Atheneu, 2004. 671 p.

MACHADO, R. B.; RAMOS NETO, M. B.; PEREIRA, P. G. P.; CALDAS, E. F.; GONÇALVES, D. A.; SANTOS, N. S.; TABOR, K.; STEININGER, M. **Estimativas de perda da área do Cerrado brasileiro**: relatório técnico. Brasília: Conservação Internacional, 2004. 10 p.

MADYASTHA, K. M.; SRIVATSAN, V. Biotransformations of alpha-terpineol in the rat: its effects on the liver microsomal cytochrome P-450 system. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 41, n. 1, p. 17-25, 1988.

MAIA, G. A.; SOUSA, P. H. M.; LIMA, A. S. **Processamento de sucos de frutas tropicais**. Fortaleza: UFC, 2007. 320 p.

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, New York, v. 62, n. 1, p. 71-109, Mar. 1998.

MARINHO, S. C. **Estudo químico, avaliação eletroquímica e atividade larvicida do óleo essencial das folhas da *Pimenta dioica* frente *Aeds aegypti* (Linnaeus, 1762)**. 2010. 124 f. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2010.

MARSH, P. D. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life style. **Journal of Clinical Periodontology**, Copenhagen, v. 32, n. 6, p. 7-15, 2005. Supplement.

MARTINS, C. M. **Estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie *Kielmeyera coriacea*. 2012. 117 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.**

MARTINS, M. M. **Constituintes voláteis, fenóis totais, capacidade antioxidantes e biológica de folhas, flores e raízes da *Vernonia brasiliiana* Less.** 2012. 67 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

MAZZOLIN, L. P.; KIGUTI, L. R. A.; MAIA, E. O.; FERNANDES, L. T. L.; ROCHA, L. R. M.; VILEGAS, W.; PUPO, A. S.; DI STASI, L. C.; HIRUMA-LIMA, C. A. *Qualea parviflora* Mart.: an integrative study to validate the gastroprotective, antidiarrheal, antihemorragic and mutagenic action. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 127, p. 50-514, Feb. 2010.

MAZZOLIN, L. P.; NASSER, A. L. M.; MORAES, T. M.; SANTOS, R. C.; NISHIJIMA, C. M.; SANTOS, F. V.; VARANDA, E. A.; BAUAB, T. M.; ROCHA, L. R. M.; DI STASI, L. C.; VIELGAS, W.; HIRUMA-LIMA, C. A. Antidiarrheal and intestinal antiinflammatory activities of a methanolic extract of *Qualea parviflora* Mart. In a experimental models. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 150, p. 1016-1023, Dec. 2013.

MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, Recife, v. 44, n. 2, p. 193-201, abr./jun. 2008.

MENDONÇA, M. P.; LINS, L. V. **Lista Vermelha das espécies ameaçadas de extinção da flora de Minas Gerais**. Belo Horizonte: Fundação Biodiversitas; Fundação Zoobotânica de Belo Horizonte, 2000. 157 p.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F.; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, n. 4, p. 316-320, 2005.

MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T. D.; NASCIMENTO, P. M. D.; NASCIMENTO, E. A. D.; CHANG, R. Compostos bioativos e atividade antioxidante do café conilon submetido à diferentes grau de torra. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 2, p. 327-331, 2009.

MORE, G.; TSHIKALANGE, T. E.; LALL, N.; BOTHA, F.; MEYR, J. J. M. Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 119, n. 3, p. 473-477, 2008.

NAKAMURA, C. V.; SANTOS, A. O.; VENDRAMENTTO, M. C.; LUIZE, P. S.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n. 1, p. 61-66, jan./mar. 2006.

NASSER, A. L.; PAVAN, F. R.; BORALLE, N.; ZOCOLO, G. J.; SANTOS, L. C.; MACCHI, M. R. R.; LEITE, C. Q. F.; VILEGAS, W. Esteróides e Triterpenos de espécies de *Qualea*: bioatividade sobre *Mycobacterium tuberculosis*. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 34, n. 4, p. 513-517, 2013.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 66, n. 7, p. 1022-1037, 2003.

NOGUEIRA NETO, J. D.; SOUSA, D. P.; FREITAS, R. M. Avaliação do potencial antioxidante *in vitro* do nerolidol. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 34, n. 1, p. 125-130, 2013.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, G. C. **Perfil florístico e distribuição das espécies vegetais, com relação ao gradiente de umidade do solo, em seis veredas no Triângulo Mineiro**. 2005. 67 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2005.

OLIVEIRA, F. Q. E.; GONÇALVES, L. A. Conhecimento sobre plantas medicinais e fitoterápicos e potencial de toxicidade por usuários de Belo Horizonte, Minas Gerais. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v. 3, n. 2, p. 36-41, 2006. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/REF/article/viewFile/2074/2016>>. Acesso em: 28 set. 2014.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Control of microorganisms by physical agents. **Microbiology**, New York, v. 134, p. 469-509, 1988.

PEREIRA, A. A.; PEREIRA, M. S. V.; SAMPAIO, F. C.; SAMPAIO, M. C. C.; ALVES, P. M.; ARAÚJO, C. R. F.; HIGINO, J. S. Caracterização química e efeito inibitório de óleos essenciais sobre o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 3, p. 887-893, maio/jun. 2008.

PEREIRA, J. V.; FERNANDES, S. S. L.; SANGALLI, A.; MUSSURY, R. M. Efeito antibacteriano e antiaderente *in vitro* do extrato da *Punica granatum* Linn. sobre microrganismos do biofilme dental. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 16, n. 1, p. 88-93, jan./mar. 2006.

PEREIRA, Z. V.; CARDOSO, M. G.; ABREU, L. R.; MORAIS, A. R.; GUIMARÃES, L. G. L.; SALGADO, A. P. S. P. Usos múltiplos de espécies nativas do bioma Cerrado no assentamento Lagoa Grande, Dourados, Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Agroecologia**, Porto Alegre, v. 7, n. 2, p. 126-136, 2012.

PHILLIPS, M. A.; CROTEAU, R. B. Resin-based defenses in conifers. **Trends in Plant Science**, Oxford, v. 4, n. 5, p. 184-190, May 1999.

PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M.; VEIGA JUNIOR, V. F. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 519-528, maio/jun. 2005.

PINTO, L. N. **Plantas medicinais utilizadas por comunidade do município de Igarapé-Miri**. 2008. 98 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal do Pará, Belém, 2008.

PINTO, M. N. **Cerrado**: caracterização, ocupação e perspectivas. 2. ed. Brasília: UNB; SEMATEC, 1994. 681 p.

PORTO, D. D. **Papel do alcalóide branquicerina na resposta ao estresse por radiação ultravioleta e dano mecânico em *Psychotria brachyceras* Müll Arg.** 2009. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PORTO, T.; RANGEL, R.; FURTADO, N.; CARVALHO, T. de; MARTINS, C.; VENEZIANI, R.; COSTA, F. da; VINHOLIS, A.; CUNHA, W.; HELENO, V.; AMBROSIO, S. Pimarane-type diterpenes: antimicrobial activity against oral pathogens. **Molecules**, Basel, v. 14, n. 1, p. 191-199, 2009.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, Elmsford, v. 39, n. 5, p. 603-613, 2001.

REIS, N. S.; SERRANO, S. H. P.; MENEGHATTI, R.; GIL, E. de S. Métodos eletroquímicos usados para a avaliação da atividade antioxidante de produtos naturais. **Latin America Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 28, n. 6, p. 949-953, 2009.

RIBEIRO, E. M.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; SIANI, A. C.; LIMA, E. S.; GUIMARÃES, A. C. Avaliação da atividade antioxidante de cinco espécies de *Protium* pelos métodos do DPPH e β-caroteno/Ácido Linoléico. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 34., 2011, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis: SBQ, 2011. 1 CD-ROM.

RIBEIRO, J. D. **Estudo analítico e avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial da espécie *Pimenta dioica* Lindl.** 2009. 93 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2009.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 100, n. 1, p. 80-84, 2005.

RIZZINI, C. T. A flora do cerrado, análise florística das savanas centrais. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 1., 1963, São Paulo. **Anais...** São Paulo: E. Blücher, 1963. p. 125-177.

ROCHA, E. O. **Avaliação dos constituintes fenólicos e voláteis, atividade antioxidante e antimicrobiana de *Campomanesia pubescens* (DC.) O. BERG (gabiroba).** 2011. 81 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

SANTOS, F. V. **Avaliação de mutagenicidade *in vitro* e *in vivo* de compostos obtidos a partir de plantas de cerrado nativo.** 2006. 167 f. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2006.

SANTOS, F. V.; ANDREO, M.; NASSER, A. L. M.; MOREIRA, L. M.; VILEGAS, W.; CÓLUS, I. M. S.; VARANDA, E. A. Absence of mutagenicity of plantas used to treat gastrointestinal disorders. **Archives of Biological Science**, Belgrade, v. 65, n. 1, p. 191-195, 2013.

SANTOS, F. V.; BISO, F. I.; MOREIRA, L. M.; SANTOS, V. J. S. V.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Genotoxicity of polar and apolar extracts obtained from *Qualea multiflora* and *Qualea grandiflora*. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 138, n. 1, p. 105-110, Oct. 2011.

SASSINE, V. J. **Cidades**: cerrado perderá 10 DFs até 2050. Disponível em: <<http://www.ascom.ufg.br/pages/12602>>. Acesso em: 26 mar. 2013.

SEVERO, J.; GALARÇA, S. P.; AIRES, R. F.; CANTILLANO, R. F. F.; ROMBALDI, C. V.; SILVA, J. A. Avaliação de compostos fenólicos, antocianinas, vitamina C e capacidade antioxidante em mirtilo armazenado em atmosfera controlada. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 52, n. 1, p. 65-70, Jan. 2009.

SIANI, A. C.; SAMPAIO, A. L. F.; SOUSA, M. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais: potencial anti-inflamatório. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília, ano 3, n. 16, p. 38-43, 2000.

SILVA, C. P. **Poiretia latifolia** e **Poiretia tetraphylla**: estudo dos óleos voláteis e atividades biológicas preliminares. 2005. 120 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

SILVA, F. A. M.; BORGES, M. F. M.; FERREIRA, M. A. Métodos para avaliação do grau de oxidação lipídica e da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 22, n. 1, p. 95-103, 1999.

SILVA, J. R. A.; CARMO, D. F. M.; REIS, E. M.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; SILVA, B. O. da; FERREIRA, J. L. P.; AMARAL, A. C. F. Chemical and biological evaluation of essencial oils with economic value from Lauraceae Species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 20, n. 6, p. 1071-1076, 2009.

SILVA, J. R. A.; ALCANTRA, J. M.; YAMAGUCHI, K. K. L.; VIEIRA JUNIOR, V. F. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae). **Acta Amazônica**, Manaus, v. 40, n. 3, p. 567-572, set. 2010.

SILVA, N. C. C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. 2010. 69 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

SILVA JÚNIOR, M. C. **100 árvores do cerrado**: guia de campo. Brasília: Rede de Sementes do Cerrado, 2010. 278 p.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Clorimetry of total Phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acids reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, p. 144-158, 1965.

- SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.
- SOUZA, A. C.; CARVALHO, F. A. A.; CARNEIRO, S. M. P.; CHAVES, M. H.; SOUSA, C. M. M. Avaliação de extratos e frações obtidas da casca do fruto de *Platonia insignis* Mart. (bacuri) sobre *Leishmania amazonensis*. In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 20.; SEMINÁRIO EM DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO E INOVAÇÃO, 3., 2011, Teresina. **Anais...** Teresina: UFPI, 2011. 1 CD-ROM.
- SOUZA, C. P.; AZEVEDO, M. L.; LOIPES, J. L.; SARTI, S. J.; SANTOS-FILHO, D.; LOPES, J. N.; VICHNEWSKI, W.; NASI, A. M.; LEITÃO-FILHO, H. F. Chemoprophylaxis of *schistosomiasis*: Molluscacidal activity of natural products: assays with adult snails and oviposition. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, Rio de Janeiro, v. 56, p. 333-338, 1984.
- SOUZA, J. P.; COIMBRA, F. G. Estrutura populacional e distribuição espacial de *Qualea parviflora* Mart. em um cerrado Sensu Stricto. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 21, n. 2, p. 65-70, maio/ago. 2005.
- SOUZA, S. A. M.; MEIRA, M. R.; FIGUEIREDO, L. S.; MARTINS, E. R. Óleos essenciais: aspectos econômicos e sustentáveis. **Enciclopédia Biosfera**, Goiânia, v. 6, n. 10, p. 1-11, 2010.
- SOUZA, T. J. T.; APEL, M. A.; BORDIGNON, S.; MATZENBACHER, N. I.; ZUANAZZI, J. Â. S.; HENRIQUES, A. T. Composição química e atividade antioxidante do óleo volátil de *Eupatorium polystachyum* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 368-372, 2007.
- STIEVEN, A. C.; MOREIRA, J. J. S.; SILVA, C. F. Óleos essenciais de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess): avaliação das atividades microbiana e antioxidante. **Eclética Química**, Araraquara, v. 34, n. 3, p. 7-13, 2009.
- SUFFREDINI, I. B.; SADER, H. S.; GONÇALVES, A. G.; REIS, A. O.; GALES, A. C.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 37, n. 3, p. 379-384, 2004.
- TIMBLINDIM Campo Grande MS, Brasil. Disponível em: <<http://timblindim.wordpress.com/arvores/pau-terra-do-campo/>>. Acesso em: 27 set. 2014.
- TSUI, V. W. K.; WONG, R. W. K.; RABIE, A. B. M. The inhibitory effects of naringin on the growth of periodontal pathogens in vitro. **Phytotherapy Research**, London, v. 22, n. 3, p. 401-406, 2008.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE VIÇOSA. **Biblioteca digital de teses e dissertações da UFV**. Disponível em:
<http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_busca/arquivo.php?codArquivo=500>. Acesso em: 27 set. 2014.

VIEIRA, I. G. **Estudos caracteres silviculturais e de produção de óleos essenciais de progenies de CORYMBIA CITRIODORA (HOOK) K.D. Hill & L. A. S. Johnson procedente de Anhembi SP Brasil, Ex. Atherton QLD - Austrália**. 2004. 80 p. Dissertação (Mestrado em Recursos Florestais) - Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”, Piracicaba, 2004.

WICHTEL, M. **Teedrogen und Phytopharmaka**. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2002. 706 p.

WORLD HEALTH ORGANIZATION . **Control of the Leishmaniasis**. Geneva, 2007. 158 p. (Technical Reports Series, 703).

YONG, L.; LING, Y. Early metabolism evaluation making traditional Chinese medicine effective and safe therapeutics. **Journal of Zhejiang University**, Hangzhou, v. 7, n. 2, p. 99-106, Feb. 2006.

YUNES, R. A.; CALIXTO, J. B. **Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**. Chapecó: Argos, 2001. 523 p.

APÊNDICE A - Tempos de retenção obtidos para padrões de alcanos (C8-C30)

Tabela 1 – Tempos de retenção obtidos para padrões de alcanos (C8-C30).

Alcano	Tempo de retenção (min.)
octano (C8)	3,29
nonano (C9)	5,15
decano (C10)	7,95
undecano (C11)	11,66
dodecano (C12)	15,90
tridecano (C13)	20,30
tetradecano (C14)	24,63
pentadecano (C15)	28,83
hexadecano (C16)	32,82
heptadecano (C17)	36,62
octadecano (C18)	40,27
nonadecano (C19)	43,74
eicosano (C20)	47,05
heneicosano (C21)	50,21
docosano (C22)	53,23
tricosano (C23)	56,13
tetracosano (C24)	58,91
pentacosano (C25)	61,59
hexacosano (C26)	64,39
heptacosano (C27)	67,75
octacosano (C28)	69,55
nonacosano (C29)	71,78
triacontano (C30)	74,16

$$IA(x) = 100 (11) + 100 \frac{15,89 - 11,66}{15,90 - 11,66}$$

$$IA(x) = 1200$$

Exemplo do cálculo do índice aritmético:
Tempo de retenção do composto desconhecido: 15,89

O valor do IA calculado é então comparado a valores de índice aritmético disponíveis na literatura (ADAMS, 2007; NIST, 2010; PHEROBASE, 2003) para o composto que apresentou alto índice de similaridade com o espectro de massas da amostra desconhecida. Se os valores forem iguais ou próximos, a amostra é considerada identificada.

ANEXO A - Meios de cultura e soluções utilizadas na determinação da atividade antimicrobiana

Os meios de cultura utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo, para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foram: Caldo Schaedler e Ágar Schaedler suplementado para bactérias anaeróbicas e caldo triptona de soja (TSB) e Ágar sangue para bactérias aeróbicas, descritos abaixo.

O termo “suplementado”, encontrado no decorrer do texto, deve ser considerado como a adição de 1 mL de solução de Hemia a uma concentração de 5 mg mL⁻¹ e 1 mL de menadione, a uma concentração de 1 mg mL⁻¹ para cada 1 L de meio de cultura.

Caldo Schaedler (BD®)

Composição:

Digestão Pancreática de Caseína	8,2g
Digestão Peptídica de Tecido Animal	2,5g
Digestão Papaínica de farelo de soja	1,0g
Dextrose	5,8g
Extrato de Levedura	5,0g
Cloreto de Sódio	1,7g
Fosfato dipotássio	0,8g
Hemina	0,01g
Cystina	0,4g
TRIS (hidroximetil) aminometano	3,0g

Preparação: Dissolveram-se aproximadamente 28,4 g desta composição em 1 L de água destilada, a qual foi homogeneizada e autoclavada por 15 min a 121 ± 1 °C. Após autoclavagem, a solução foi suplementada com 1 mL de solução de Hemia a 5 mg mL⁻¹ e 1 mL de solução de menadione a 1 mg mL⁻¹.

Caldo triptona de soja TSB (BD®)

Composição:

Peptona de Caseína.....	17,0g
Peptona de soja.....	3,0g
Glicose.....	2,5g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Hidrogenofosfato dipotássico.....	2,5g

Preparação: Dissolveram-se 30 g desta composição em 1 L de água destilada, a qual foi homogeneizada e autoclavada por 20 min a 121 ± 1 °C.

Base para ágar sangue (BD®)

Composição:

Infusão de músculo cardíaco	2,0g
Digestão pancreática de caseína	13,0g
Extrato de levedura	5,0g
Cloreto de sódio.....	5,0g
Agar	15,0g

Preparação: Dissolveram-se 40 g desta composição em 1 L de água destilada. A solução resultante foi aquecida e homogeneizada até a dissolução do pó e autoclavada por 15 min., a 121 °C. Após autoclavagem, a base foi resfriada de 45 a 50 °C e adicionada uma solução de 5% de sangue desfibrinado de carneiro. 25 mL dessa mistura foram colocados em placas de petri.

Ágar Schaedler (BD®)

Composição:

Digestão pancreática de caseína.....	8,2g
Digestão peptídica de tecido animal.....	2,5g
Digestão papaínica de farelo de soja.....	1,0g
Dextrose.....	5,8g
Extrato de levedura.....	5,0g
Cloreto de sódio.....	1,7g
Fosfato dipotássio.....	0,8g
Hemina.....	0,4g
LCytina.....	0,4g

TRIS.....	3,0g
Ágar.....	13,0g

Preparação: Dissolveram-se aproximadamente 41,9 g desta composição em 1 L de água destilada. A solução resultante foi aquecida e homogeneizada até a completa dissolução do pó e autoclavada por 15 min a 121 °C. Logo em seguida, a solução foi suplementada com 1 mL de solução de Hemina (5 mg mL^{-1}), 1 mL de solução de menadione (1 mg mL^{-1}) e com solução 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Em seguida, foram distribuídos 30 mL da solução resultante em placas de petri.

Solução de Hemina

Dissolveu-se 0,5 g de Hemina em 10 mL de solução NaOH a 1 N e adicionaram-se 90 mL de água destilada esterilizada. Após obter a solução na concentração final de 5 mg mL^{-1} , foi filtrada em membrana filtrante de $0,22 \mu\text{m}$ de porosidade para um tubo esterilizado.

Solução Menadione

Dissolveu-se em frasco esterilizado 0,1 g de menadione em 100 mL de etanol absoluto, obtendo-se uma solução na concentração de 1 mg mL^{-1} .

ANEXO B - Meio de cultura utilizado na determinação da atividade citotóxica

O meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. Foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina (2 mM), D-glicose (4.500 mg L⁻¹), bicarbonato de sódio (2.000 mg L⁻¹), HEPES (2.380 mg L⁻¹), piruvato de sódio (1.100 mg L⁻¹), penicilina (60 mg L⁻¹), gentamicina (40 mg L⁻¹) e estreptomicina (10 mg L⁻¹).