



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**CONSTITUINTES VOLÁTEIS, FENÓIS TOTAIS, CAPACIDADE ANTI-
OXIDANTE E BIOLÓGICA DE FOLHAS, FLORES E RAIZES DA
Vernonia brasiliiana Less.**

MÁRIO MACHADO MARTINS

UBERLÂNDIA – MG

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**CONSTITUINTES VOLÁTEIS, FENÓIS TOTAIS, CAPACIDADE ANTI-
OXIDANTE E BIOLÓGICA DE FOLHAS, FLORES E RAIZES DA
Vernonia brasiliiana Less.**

MÁRIO MACHADO MARTINS

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação do Instituto de Química, da
Universidade Federal de Uberlândia, como
requisito parcial para a obtenção do título
de MESTRE EM QUÍMICA.

Orientação: Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes

Coorientação: Prof. Dr. Roberto Chang

Coorientação: Prof. Dr. Geraldo Batista de Melo

Uberlândia – MG

2012



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 145/COPGQ.

DATA: 29/06/2012

DISCENTE: Mário Machado Martins

MATRÍCULA: 11012QMI009

TÍTULO DO TRABALHO: Constituintes voláteis, fenois totais, capacidade antioxidante e biológica de folhas, flores e raízes da Vernonia brasiliana Less.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

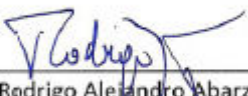
LINHA DE PESQUISA: Química dos Produtos Naturais

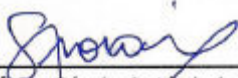
PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Constituintes voláteis, fenois totais, capacidade antioxidante e biológica de folhas, flores e raízes da Vernonia brasiliana Less.

Às nove horas do dia vinte e nove de junho do ano dois mil e doze, no Auditório B do Bloco 50, 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, Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz, do Instituto de Química da UFU e Sérgio Antônio Lemos de Moraes, professor orientador e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa apresentou o candidato 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 01/2010/COPGQ. Em seguida, o presidente da mesa concedeu a palavra ao candidato para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o apresentador. 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 A provou o candidato. Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será Não foi alterado

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 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 10 horas e 50 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.


Profª Dra. Blyeny Hatalita Pereira Alves –
IFET-GO


Prof. Dr. Rodrigo Alejandro Abarza Muñoz –
IQUFU


Orientador: Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes – IQUFU

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por me dar força, coragem e sabedoria para superar mais uma etapa em minha vida.

A minha esposa Laylaine pelo carinho, compreensão e incentivos constantes.

Aos meus pais pelo grande apoio em mais uma etapa vencida.

Ao Professor Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes, pela firme orientação em todos os momentos.

Ao Professor Dr. Roberto Chang por sua coorientação.

Ao Professor Dr. Evandro Afonso do Nascimento, por suas valiosas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Dr. Alberto de Oliveira, por suas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Dr. Geraldo Batista de Melo (Instituto de Ciências Biomédicas-UFU) pelo apoio nas análises biológicas.

Ao Professor Dr. Cláudio Vieira da Silva (Instituto de Ciências Biomédicas-UFU) pelo apoio nas análises biológicas.

Ao Professor Dr. Jimi Naoki Nakajima (Instituto de Ciências Biológicas-UFU) por sua valiosa ajuda no processo de identificação da espécie em estudo.

Ao meu amigo Fabrício, que me apoiou e me ajudou, muito na execução das análises biológicas.

A Mariane, que me ajudou nas análises química.

Aos colegas do laboratório de pesquisa pelo companheirismo e apoio em tantos momentos.

A todas as pessoas que diretamente e indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

SUMÁRIO

1. Introdução	12
1.1. Plantas medicinais	12
1.2. Metabolismo vegetal	12
1.2.1. Compostos fenólicos	14
1.2.2. Flavonóides	15
1.3. Óleos essenciais	16
1.4. A Família Asteraceae	17
1.5. A espécie <i>Vernonia brasiliiana</i>	17
1.6. Atividade antioxidante	19
1.7. Voltametria	20
1.8. Atividade antimicrobiana	20
1.9. Atividade antiprotozoária	21
1.10. Atividade citotóxica	22
2. Objetivos	23
3. Materiais e Métodos	23
3.1. Materiais e equipamentos utilizados	24
3.2. Coleta da amostra	25
3.3. Preparo das amostras	26
3.4. Extração etanólica	26
3.5. Determinação de fenóis totais (FT), pelo método de Folin–Ciocalteu	26
3.6. Determinação de taninos condensados (proantocianidinas)	27
3.7. Análise quantitativa da atividade antioxidante	27
3.8. Voltametria	28
3.9. Extração do óleo essencial	29
3.10. Separação e identificação de compostos voláteis	30
3.11. Quantificação dos compostos voláteis	30
3.12. Teste da atividade antimicrobiana	31
3.12.1. Meios de cultura utilizados	31
3.12.2. Cultivo microbiano	31
3.12.3. Preparo dos óleos essenciais e dos extratos etanólicos	31
3.12.4. Determinação da CIM	32
3.12.4. Determinação da CBM	33

3.13.	Atividade antiprotozoária	33
3.13.1.	<i>Preparo dos meios de cultura</i>	33
3.13.2.	<i>Cultivo dos parasitas</i>	33
3.13.3.	<i>Preparo das amostras</i>	33
3.13.4.	<i>Teste de viabilidade celular</i>	34
3.14.	Atividade citotóxica	36
3.14.1.	<i>Preparo dos meios de cultura</i>	36
3.14.2.	<i>Cultura de células</i>	36
3.14.3.	<i>Preparo das amostras</i>	36
3.14.4.	<i>Teste de viabilidade celular</i>	36
3.15.	Análise estatística	38
4.	Resultados e discussão	38
4.1.	Coleta da espécie e preparo das amostras	38
4.2.	Extração etanólica	39
4.3.	Determinação de fenóis totais, pelo método de Folin-Ciocalteau	39
4.4.	Determinação de Taninos Condensados	41
4.5.	Determinação da atividade antioxidante por DPPH	42
4.6.	Voltametria	47
4.7.	Identificação dos óleos essenciais	49
4.8.	Teste da atividade antimicrobiana	55
4.9.	Atividade antiprotozoária e atividade citotóxica	56
5.	Conclusões	60
6.	Referências Bibliográficas	61

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1:	Reagentes utilizados e suas marcas	24
Tabela 2:	Equipamentos utilizados e suas especificações	25
Tabela 3:	Resultados das extrações das partes da <i>Vernonia brasili- ana</i>	39
Tabela 4:	Resultados do teor de fenóis totais	40
Tabela 5:	Resultados do teor de Taninos Condensados	42
Tabela 6:	Atividade Antioxidante dos extratos	46
Tabela 7:	Potencial de oxidação e carga das amostras de extrato da <i>Vernonia brasili- ana</i>	48
Tabela 8:	Resultado de Atividade Antioxidante e Fenóis Totais	49
Tabela 9:	Componentes do óleo essencial da raiz da <i>Vernonia brasili- ana</i>	50
Tabela 10:	Componentes do óleo essencial da flor da <i>Vernonia brasili- ana</i>	50
Tabela 11:	Componentes do óleo essencial da folha da <i>Vernonia brasili- ana</i>	51
Tabela 12:	Comparação dos óleos essenciais da folha da <i>Vernonia brasili- ana</i>	54
Tabela 13:	Avaliação pela técnica de CIM do extrato etanólico da flor de <i>Vernonia brasili- ana</i>	56
Tabela 14:	Avaliação pela técnica de CIM do extrato etanólico da folha de <i>Vernonia brasili- ana</i>	56
Tabela 15:	Avaliação pela técnica de CIM do extrato etanólico da raiz de <i>Vernonia brasili- ana</i>	57
Tabela 16:	Avaliação pela técnica de CIM do óleo essencial da flor de <i>Vernonia bra- sili- ana</i>	57
Tabela 17:	Avaliação pela técnica de CIM do óleo essencial da folha de <i>Vernonia bra- sili- ana</i>	57
Tabela 18:	Avaliação pela técnica de CIM do óleo essencial da raiz de <i>Vernonia bra- sili- ana</i>	57
Tabela 19:	Resultados da atividade antiprotozoária para os óleos e extratos da folha, flor e raiz da <i>Vernonia brasili- ana</i>	58
Tabela 20:	Resultados da atividade citotóxica para os óleos e extratos da folha, flor e raiz da <i>Vernonia brasili- ana</i>	58

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1:	Representação do mapa metabólico das plantas	13
Figura 2:	Principais fatores que podem influenciar no teor de metabólitos secundários em planta	14
Figura 3:	Estrutura do fenol	14
Figura 4:	Estrutura básica dos flavonoides	15
Figura 5:	Modelo de estrutura de um tanino condensado	16
Figura 6:	Estrutura do isopreno	17
Figura 7:	<i>Vernonia brasiliiana</i> Less.	18
Figura 8:	Principais antioxidantes sintéticos	19
Figura 9:	Montagem para extração contínua utilizando o aparelho de Soxhlet	26
Figura 10:	Esquema da célula eletroquímica utilizada	29
Figura 11:	Aparelho de Clevenger	30
Figura 12:	Valores das concentrações para determinação da CIM	32
Figura 13:	Estrutura da microplaca para o teste de antiprotozoário.....	34
Figura 14:	Estrutura da microplaca para o teste de citotoxicidade	37
Figura 15:	Reação típica do ácido gálico com o íon molibdênio (Reagente de Folin-Ciocalteu)	39
Figura 16:	Curva de calibração do ácido gálico	40
Figura 17:	Reação da vanilina com o tanino condensado	41
Figura 18:	Curva de calibração da catequina	42
Figura 19:	Estrutura do DPPH	43
Figura 20:	Curva de calibração do DPPH	43
Figura 21:	Consumo do DPPH em função das concentrações do extrato da folha	44
Figura 22:	Gráfico para o calculo do CE ₅₀ do extrato da folha	44
Figura 23:	Consumo do DPPH em função das concentrações do extrato da flor	45
Figura 24:	Gráfico para o calculo do CE ₅₀ do extrato da flor	45
Figura 25:	Consumo do DPPH em função das concentrações do extrato da raiz	46
Figura 26:	Gráfico para o calculo do CE ₅₀ do extrato da raiz.....	46
Figura 27:	Voltamograma de pulso diferencial dos extratos da folha, flor e raiz da <i>Vernonia brasiliiana</i> e do BHT.....	48

Lista das principais abreviações e símbolos

ATCC - (do inglês) “*American Type Culture Collection*”

BHA - Butilidroxianisol

BHI - (do inglês) Brain Heart Infusion Broth

BHT - Butilidroxitolueno

CBM- Concentração bactericida mínima

CE₅₀ - Concentração efetiva média

CG - EM- cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas

CIM- Concentração inibitória mínima

CLSI – (do inglês) “*Clinical and Laboratory Standards Institute*”

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA- Ácido desoxirribonucleico

DPPH- 2,2–difênil-1-picrilidrazila.

EAG- Equivalentes de ácido gálico

EC - Equivalentes de catequina

EROs - Espécies reativas de oxigênio

FT- Fenóis totais

HUFU - Herbário da Universidade Federal de Uberlândia

TBHQ- *Tert*-butilidroquinona

UV- Ultravioleta

RESUMO

A espécie *Vernonia brasiliana* Less. conhecida popularmente como assa-peixe, assa-peixe preto, assa-peixe roxo, pau de múquem, pau de muqueca e manjerição de cavalo, é uma planta bastante utilizada na medicina popular. O xarope da raiz combate tosse e gripe; do broto faz-se o chá para o tratamento de doenças nos olhos e liberação das vias respiratórias; as folhas são utilizadas para inibir o reumatismo inflamatório, cólicas hepáticas e em alguns casos de hemorragia. Neste contexto o presente trabalho teve como objetivos: produzir os extratos etanólicos e os óleos essenciais da folha, flor e raiz da *Vernonia brasiliana*; avaliar os teores de compostos fenólicos e proantocianidinas nos extratos, suas atividades antioxidantes, potenciais de oxidação; identificar os compostos voláteis dos óleos essenciais da planta (folhas, flores e raízes); avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos e dos óleos frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli in vitro*, e a atividade antiprotozoária contra o *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania in vitro*. Os extratos etanólicos produzidos da folha, flor e raiz apresentaram teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu de 133 para folha, 127 para flor e 87 para raiz, expresso em miligrama de equivalentes de ácido gálico por grama de amostra. O teor de taninos condensados em miligrama equivalente de catequina por grama de amostra foi de 122 para a flor, 147 para a folha e 109 para raiz. A atividade antioxidante realizada pelo método do DPPH apresentou valores de CE_{50} de 25; 27 e 37 para folhas, raízes e flores, respectivamente. A voltametria de pulso diferencial apresentou os valores de potencial de oxidação (em Volts) versus Ag/AgCl, para os extratos da folha de 0,205; flor 0,232 e raiz 0,199. A voltametria dos extratos também indicou as seguintes cargas em microcoulomb (μC) de 158,2 para folha, 160,3 para flor e 113,2 para raiz. Na composição dos óleos essenciais os compostos com maior porcentagem foram: modheph-2-eno, *alfa*-isocomeno, cipereno, *beta*-isocomeno e *beta*-cariofileno na raiz; ácido palmítico, hex-2-en-1-ol, hexan-1-ol e septacoseno na flor; *trans*-cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, espatulenol e ácido palmítico na folha. Os extratos e os óleos não apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Os extratos da *Vernonia brasiliana* não apresentaram resultados significativos, pois são considerados tóxicos nas concentrações em que apresentaram atividade antitrypanossoma e antileishmaina. Mas os três óleos apresentaram atividade contra o *Trypanosoma cruzi* e a *Leishmania amazonensis* válida, já que não apresenta toxicidade nas concentrações em que demonstraram atividade.

ABSTRACT

The species *Vernonia brasiliiana* Less., a.k.a. assa-peixe, assa-peixe preto, assa-peixe roxo, pau de múquem, pau de muqueca and manjeriço de cavalo, is a very used plant in folk medicine. The root syrup fights against cough and flu; the bud tea is used in eye diseases and respiratory failure; the leaves are used to inhibit inflammatory rheumatism, hepatic colic and some cases of hemorrhage. The objectives of the present work were to produce ethanolic extracts and essential oil of the plant parts (leaves, flower and root) of *Vernonia brasiliiana*. Also, we evaluated the level of phenolic compounds, proanthocyanidins, antioxidant and antimicrobial activity, oxidation potentials level, and identified the compounds of the essential oils. The oils were tested against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli in vitro* bacteria and against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania*, *in vitro* protozoa. The ethanolic extracts presented a total phenol by Folin-Ciocalteu method of 133, 127 and 87 mg of GAE (gallic acid equivalents) per gram of sample, respectively for leaves, flowers and root. The condensed tannins presented values of 122, 147 and 109 mg of catechin equivalents (CE) per gram of sample, respectively for flower, leaves and root. The antioxidant activity by DPPH method presented CE₅₀ values 25, 27 and 37 for leaves, root and flowers, respectively. The differential pulse voltammetry presented values of 0.205, 0.232 and 0.199 volts for oxidation potential and 158.2, 160.3 and 113.2 microcoulombs of charge for leaves, flowers and root, respectively. The compounds with higher percentage identified in the essential oil were: modheph-2-ene, alpha-isocomene, ciperene, beta-isocomene and beta-caryophyllene in the root; palmitic acid, hexan-1-ol and septacosane in the flower; and *trans*-caryophyllene, germacrene D, bicyclogermacrene, spathulenol and palmitic acid in the leaves. There was no evidence of antimicrobial effect for extracts and essential oil against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. The extracts of *Vernonia brasiliiana* were not significant because they are considered toxic at concentrations that were active against antitrypanosoma and antileishmania. However the three oils showed a valid activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*, since it shows no toxicity at concentrations that have shown activity.

1. Introdução

1.1. Plantas medicinais

Uma planta pode ser considerada medicinal quando possui substâncias em uma ou mais partes que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou como precursores de fármacos semissintéticos (PINTO et al., 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 e seus diagnósticos perderam seus significados com o processo de modernização, mas o uso de plantas para curar doenças continuou até os tempos atuais (PINTO, 2008).

Existem vastos programas de farmácias de fitoterápicos, que são produtos exclusivamente a base de plantas medicinais (JESUS, 2008).

Estima-se que cerca de 80% da população brasileira faz uso de produtos de origem natural, basicamente com base em plantas medicinais, que fazem parte da medicina popular e fitoterápica (FOGLIO et al, 2006).

Apesar do alto consumo de plantas medicinais no Brasil, há falta de conhecimento quanto aos compostos presentes e a toxicidade dos mesmos. Um melhor conhecimento sobre as plantas medicinais é de vital importância para a proteção de pacientes submetidos a tratamento por plantas medicinais (PINTO et al., 2005).

Diante disto, este estudo tem uma característica toda especial para o Brasil, por sua vasta extensão de terras, flora riquíssima e pela ameaça de um dos maiores biomas, o cerrado, que apresenta uma grande carga de propriedades farmacológicas promissoras (CARVALHO & RODRIGUES, 2007).

1.2. Metabolismo vegetal

As plantas produzem substâncias essenciais à sua existência e esses produtos são divididos em metabólitos primários e secundários. Existem duas vias metabólicas principais responsáveis pela composição química das plantas. Os metabólitos primários são um conjunto de substâncias necessárias ao desenvolvimento das funções vitais da planta, como crescimento, reprodução e desenvolvimento (como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, nucleotídeos e polímeros derivados). Os metabólitos secundários desempenham outras funções, como a proteção, repelência de herbívoros, atração de insetos, dentre outras funções, mas que garantem a

sobrevivência da planta (ALVES, 2001). Os metabólitos primários e secundários são interconectados entre si.

Para as plantas verdes, o primeiro processo biossintético é a fotossíntese, sendo que uma parcela desses compostos são precursores de uma nova classe de compostos (metabólitos secundários) por meio de reações enzimáticas. Os três principais caminhos sintéticos para a produção dos metabólitos secundários é o do ácido chiquímico, do acetato e dos aminoácidos (Figura 1) (CASTRO et al., 2004).

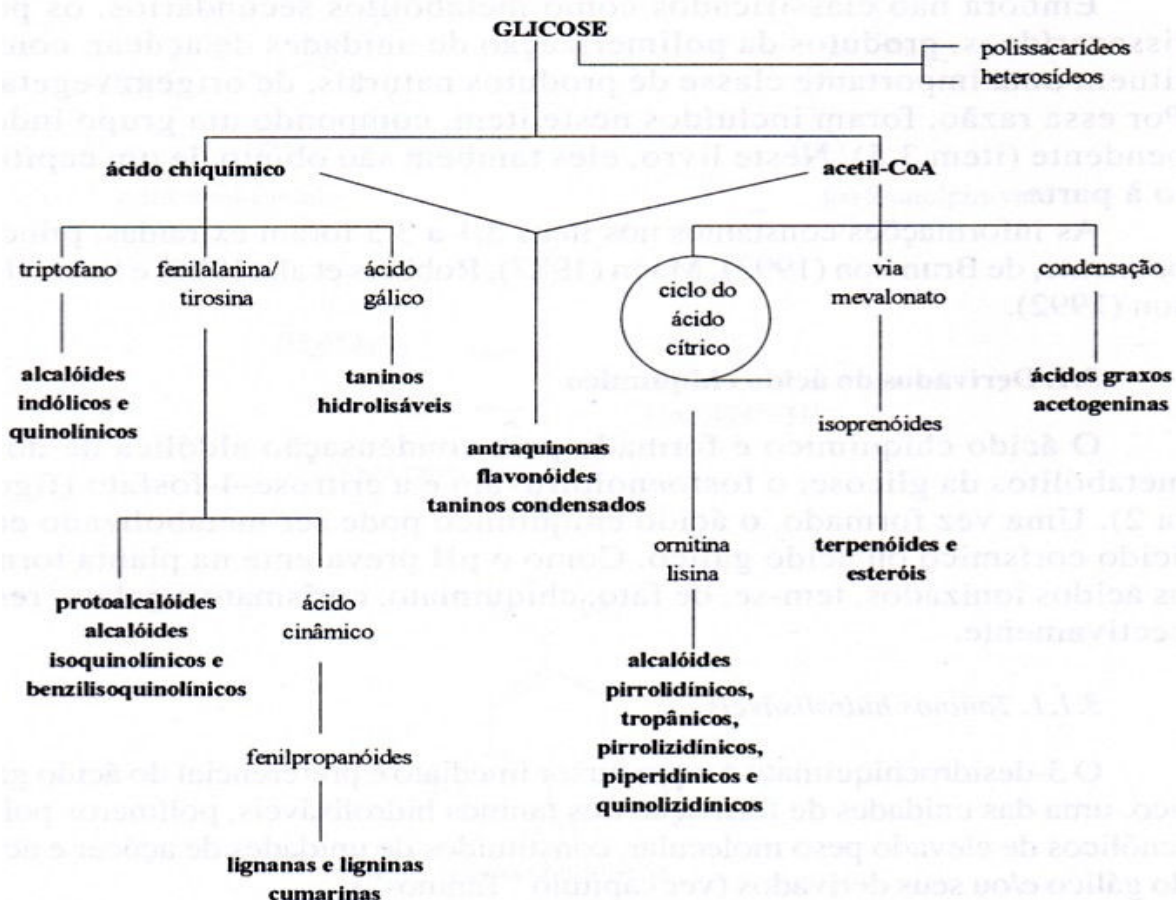


Figura 1: Representação do mapa metabólico das plantas.
Fonte: SANTOS, 2004.

O teor de metabólitos secundários presentes nas plantas são diretamente influenciados por uma lista de fatores exteriores que levam a planta a ter uma concentração maior ou menor (Figura 2) (GOBBO-NETO & LOPES, 2007). Além disso, esses fatores também podem alterar a composição química da planta, uma vez que sua composição também pode ser influenciada por interações do tipo planta-planta, planta-animal e planta-microrganismos (ALVES, 2001).

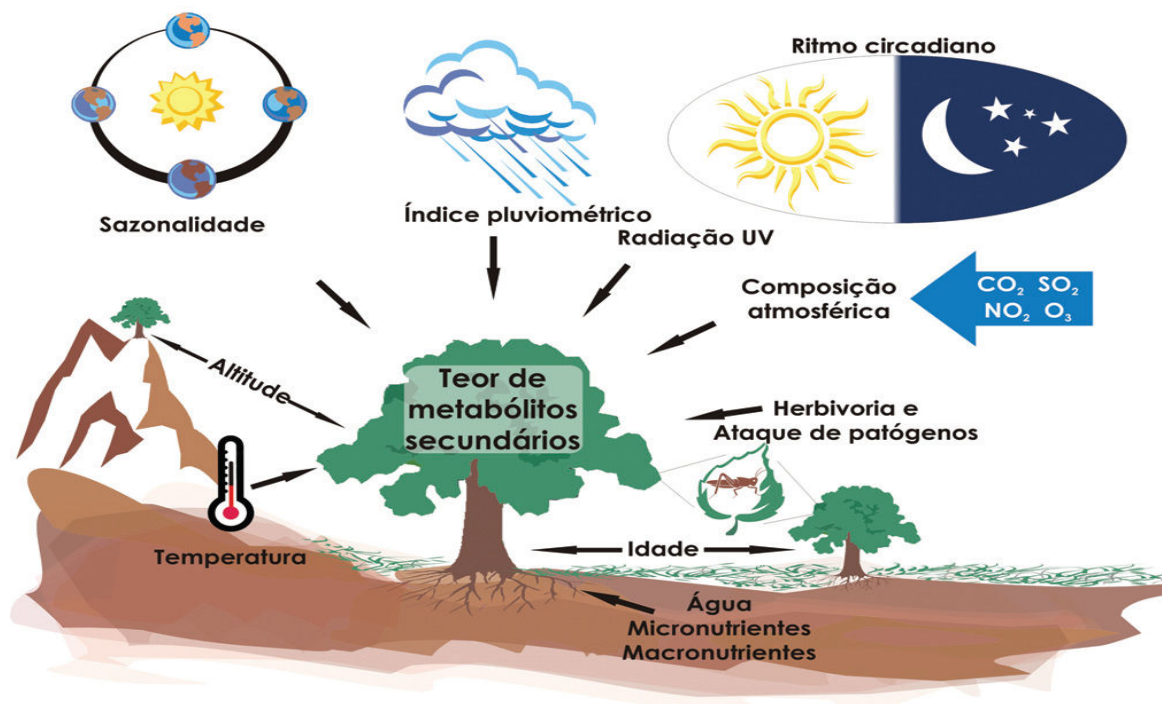


Figura 2: Principais fatores que podem influenciar no teor de metabólitos secundários em planta
 Fonte: GOBBO-NETO & LOPES, 2007.

1.2.1. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são compostos que possuem um ou mais grupos hidroxila ligados a anel aromático (Figura 3), com um ou mais grupos substituintes (como hidroxilas, carboxilas e metoxilas, etc.). Os compostos fenólicos são produzidos por duas vias metabólicas, sendo a rota do chiquimato responsável por aproximadamente 60% dos compostos produzidos pelas plantas e a via do acetato por 40% (CASTRO et al , 2004).

Estudos indicam que os compostos fenólicos podem apresentar efeitos biológicos benéficos como atividade antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana e anticarcinogênica (ABE et al, 2007). Além disto, alguns compostos fenólicos apresentam atividade antisséptica, anestésica, cicatrizante podendo ainda inibir vários processos vitais como respiração, floração, transporte de glicose, síntese de celulose, etc. (CASTRO et al , 2004).

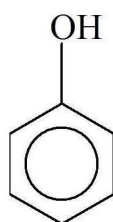


Figura 3: Estrutura do fenol

1.2.2. Flavonóides

Flavonóides são compostos com base em uma estrutura C6-C3-C6 (Figura 4) largamente distribuídos na natureza e a muitos deles se atribui atividade antioxidante, aroma dos alimentos, coloração de flores e defesa das plantas contra raios UV, fungos e bactérias. Os flavonóides podem ser classificados de acordo com as substituições na estrutura básica. Os principais grupos são flavononas, flavonas, isoflavonas, chalconas e antocianidinas (CASTRO et al., 2004).

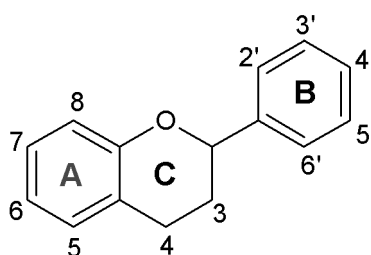


Figura 4: Estrutura básica dos flavonóides.

Estudos já realizados demonstram que os flavonóides possuem propriedades como proteção contra raios ultravioleta, proteção contra microrganismos patogênicos, atividade antioxidante, ação alelopática e inibição de enzimas (MACHADO et al., 2008). Os flavonóides também podem ter ação anti-inflamatória, antialérgica, atividade antitumoral, anti-hepatotóxica, antiulcerogênia, antiplaquetária, antimicrobiana e antiviral (PINTO et al., 2000).

A polimerização de flavonóides como flavan-3-ol e flavan-3,4-diol dá origem aos taninos condensados ou proantocianidinas (Figura 5), que recebem este nome por causa dos pigmentos avermelhados semelhantes aos das antocianidinas (AMORIM et al., 2005). Essa classe de compostos é amplamente encontrada principalmente em plantas de grande porte, podendo estar presentes nas folhas, flores, frutos e raízes (CASTRO et al., 2004).

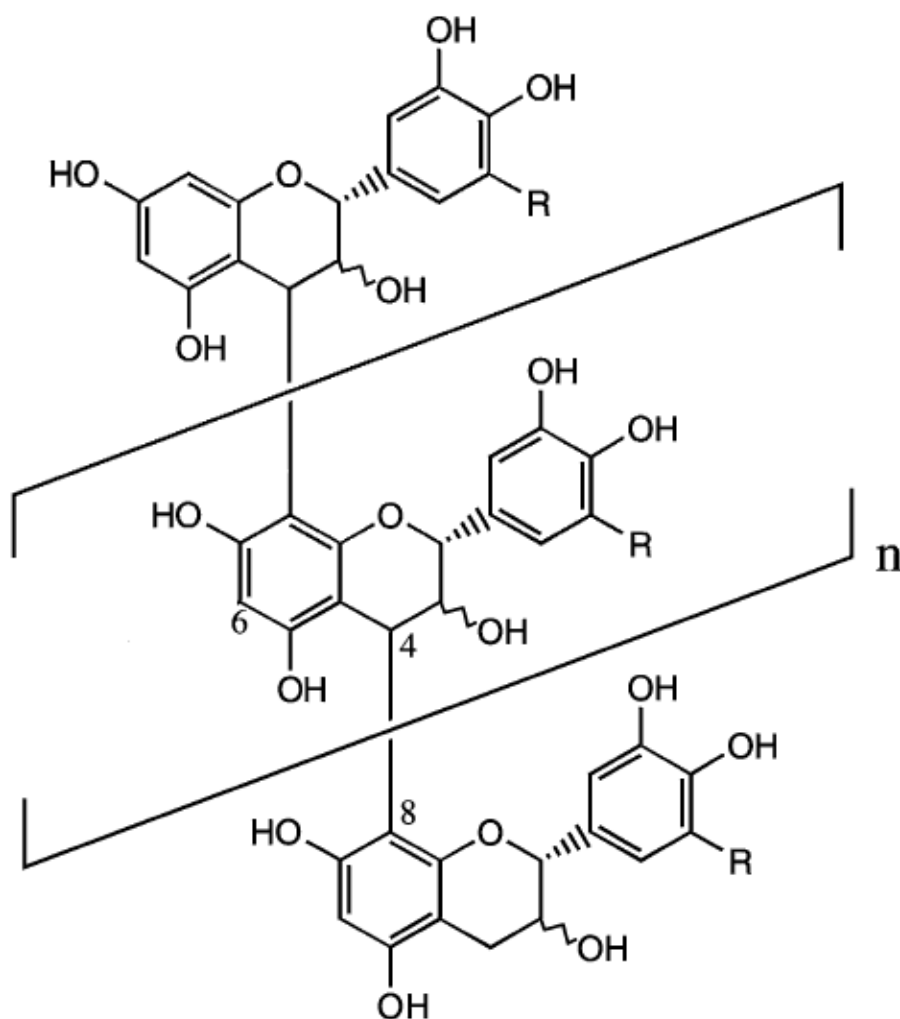


Figura 5: Modelo de estrutura de um tanino condensado.
Fonte: PELL et al., 2001.

1.3. Óleos essenciais

Os óleos essenciais são compostos produzidos nas plantas, na forma de metabólitos secundários, com as funções de atração de insetos para a polinização, de proteção contra herbívoros, como reguladores da taxa de decomposição da matéria orgânica do solo e como agentes antimicrobianos, dentre outros. Óleos essenciais são constituídos por derivados de fenilpropanóides ou de terpenóides, sendo que os mais encontrados são os terpenos, que são formados por unidades de isopreno com C_5 (Figura 6). Os terpenos são classificados de acordo com o número de unidades de isopreno (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).

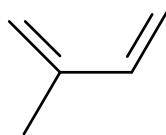


Figura 6: Estrutura do isopreno

Estudos têm revelado que os óleos essenciais são capazes de exercer atividade antioxidante em sistemas biológicos, os quais são causadores de doenças neurodegenerativas como o Mal de Alzheimer (SILVA et al., 2010). Os óleos essenciais 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 (SAMPAIO et al., 2000).

Nas indústrias, os óleos essenciais possuem um papel importante, já que são amplamente utilizados como fragrância em cosméticos, aromatizantes de alimentos, bebidas e produtos de uso doméstico como detergentes, sabões, repelentes de insetos e aromatizantes de ambiente. Os óleos essenciais também são empregados como intermediários sintéticos em perfumes (BRITO, 2007).

1.4. A Família Asteraceae

A família Asteraceae é composta por ervas perenes, subarbustos e arbustos, ervas anuais, lianas e árvores. Por possuir uma alta capacidade de se adaptar ao ambiente, ela pode ser encontrada em diferentes lugares com condições climáticas variadas, desde regiões tropicais, subtropicais até temperadas (EVALDT et al., 2007).

A família Asteraceae possui cerca de 25.000 espécies divididas em 1600 gêneros, sendo a maior família de angiospermas conhecida. No Brasil, existem aproximadamente 1900 espécies com 196 gêneros (HATTORI & NAKAJIMA, 2008), na forma de espécies subarborescentes de fisionomias campestres e savânicas (HATTORI, 2009).

1.5. A espécie *Vernonia brasiliiana*

No Brasil, existem aproximadamente 900 espécies somente do gênero *Vernonia*, da família Asteraceae. A *Vernonia brasiliiana* Less., é conhecida por diferentes nomes populares como assa-peixe, assa-peixe preto, assa-peixe roxo, pau de múquem, pau de muqueca e man-

jerição de cavalo. A *Vernonia brasiliiana* também pode ser encontrada em diferentes herbários, mas identificada incorretamente como *Vernonia scabra* Pers (XAVIER et al., 2003).



Figura 7: *Vernonia brasiliiana* Less.

A *Vernonia brasiliiana* é uma planta bastante utilizada na medicina popular. O xarope da raiz combate tosse e gripe; do broto faz-se o chá para o tratamento de doenças nos olhos e liberação das vias respiratórias (ANDRADE et al., 2000). As folhas são utilizadas para inibir o reumatismo inflamatório, cólicas hepáticas e em alguns casos de hemorragia (FILIZOLA, 2003).

O óleo das folhas apresenta atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter aerogenes*, *Salmonella choleraesuis*, *Klebsiella pneumonas*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*. Este óleo também apresentou potencial de inibição da enzima acetilcolinesterase (MAIA et al., 2010). Também há relato das atividades do extrato das folhas contra o *Plasmodium berghei* e o *Trypanosoma cruzi* (ARIAS et al., 1995).

Nos estudos de Filizola (2003) foram identificadas duas moléculas polifenólicas das folhas da *Vernonia brasiliiana* apresentaram atividade antimicrobiana frente às bactérias *Micrococcus flavus*, *Staphylococcus aureus*, *Candida albicans* e *Candida krusei*. Foram isoladas ainda duas moléculas polifenólicas, com atividade antifúngica. Isolou-se também, um triterpeno (acetato de beta-amirina), sem atividade biológica. No extrato metanólico das folhas, foram identificados polifenóis, terpenóides, açúcares redutores e ausência de cumarinas, fenilpropanoglicosídeos, taninos, saponósidos e alcaloides.

1.6. Atividade antioxidante

Durante a respiração dos seres vivos, moléculas de oxigênio que são adquiridas podem ser parcialmente reduzida, dando origem as espécies reativas de oxigênio (EROs) (GASPAR-RI, 2005).

As espécies reativas de oxigênio como radicais hidroxila ($\cdot\text{OH}$), ânion radical superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e hidroperoxila ($\text{ROO}^{\cdot}$), podem causar danos ao DNA ou oxidar lipídio e proteínas. Os processos de oxidação dos sistemas biológicos causados pelos EROs são indicados como grandes responsáveis pelo envelhecimento e pelas doenças degenerativas, por exemplo, câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e disfunções cerebrais (SOUSA et al., 2007).

Para inibir os processos oxidativos no ser humano e em alimentos industrializados, utilizam-se antioxidantes naturais e/ou sintéticos. Como exemplo dos sintéticos, destacam-se o butilidroxitolueno (BHT), o butilidroxianisol (BHA) e o *tert*-butilidroquinona (TBHQ) (Figura 7). Estudos realizados em animais têm demonstrado que a exposição prolongada a estes compostos podem causar tumores no fígado, pâncreas e em glândulas (JARDINI & FILHO, 2007).

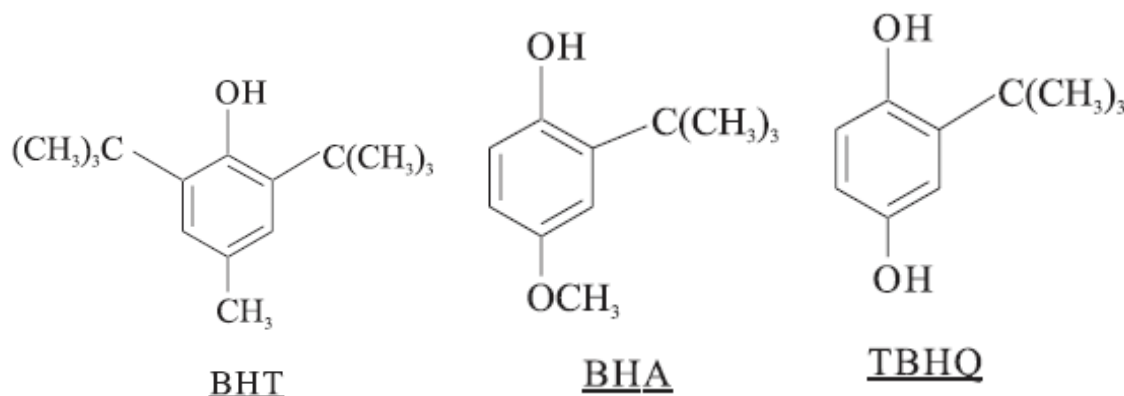


Figura 8: Principais antioxidantes sintéticos.

Os alimentos são as principais fontes de antioxidantes naturais para seres humanos, principalmente frutos, e nestes vegetais podemos destacar os polifenóis, sendo mais de 8.000 estruturas conhecidas. Atividade antioxidante dos polifenóis é devido principalmente às suas propriedades redutoras e sua intensidade antioxidante dependerá fundamentalmente do número e posição das hidroxilas presentes na molécula (MELO et al., 2008).

1.7. Voltametria

Muitas vezes para obter resultados confiáveis na avaliação da atividade antioxidante de alimentos e extratos de plantas é necessário que se utilize mais de um método analítico. Diante desta necessidade a voltametria de pulso diferencial e voltametria cíclica são métodos eletroquímicos interessantes para determinar atividade antioxidante (GIL et al., 2009).

As técnicas voltamétricas utilizam um conjunto de três eletrodos, os quais são conectados a um potenciostato controlado a por um computador. O potenciostato aplica uma diferença de potencial entre o eletrodo de trabalho e o eletrodo de referência. O terceiro eletrodo é o auxiliar, que é responsável em promover uma corrente para o eletrodo de trabalho. Para análise de atividade antioxidante, o eletrodo recomendado é o de carbono vítreo que atua na faixa de potencial de -0,5 V a +1,1 V contra o eletrodo de referência de Ag/AgCl/KCl saturado (ALVES et al., 2004).

Na voltametria, pode-se relacionar 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. Quanto menor o valor do potencial de oxidação significa que a substância terá maior facilidade em doar elétrons, ou seja, a substância tem maior poder antioxidante (ALVES et al., 2010). A carga transferida é diretamente proporcional à concentração dos antioxidantes presentes na amostra (ALVES et al., 2004).

1.8. Atividade antimicrobiana

Agentes antimicrobianos estão presentes numa grande variedade de plantas (HOLETZ et al., 2002), estimando que 74% dos medicamentos utilizados atualmente tem alguma origem vegetal (KING, 1991). Nesse contexto, além do potencial farmacêutico que pode ser explorado das plantas, suas atividades antimicrobianas podem representar excelentes ferramentas no combate aos microrganismos. Outro caso que merece atenção é o potencial uso para o combate de contaminações alimentares (ANDRADE et al., 2010). Com esta realidade pode-se destacar dois patógenos a *Escherichia coli* e o *Staphylococcus aureus*.

Escherichia coli é uma bactéria gram-negativa encontrada principalmente no intestino dos seres humanos que pode causar infecções intestinais e extra-intestinais (como, infecções

do trato urinário, meningites, infecções intra-abdominais, infecções em feridas e infecções na corrente sanguínea) (SANTOS et al., 2009).

Staphylococcus aureus é uma bactéria gram-positiva precursora de várias doenças, incluindo: enfermidades sistêmicas potencialmente fatais, infecções cutâneas, infecções oportunistas e intoxicação alimentar (XAVIER et al., 2007). Este patógeno é também um dos principais causadores de infecção hospitalar pelo mundo, já que o mesmo consegue sobreviver em ambientes bem hostis e possui uma imensa facilidade em adquirir resistência a antibióticos (LEITE, 2008).

1.9. Atividade antiprotozoária

As doenças infecciosas e parasitárias estão ligadas às condições precárias de moradia, alimentação e higiene. Dentro das doenças parasitárias pode-se destacar a doença de Chagas, que atinge entre 16 e 18 milhões de indivíduos e a Leishmaniose que afeta mais de 12 milhões de pessoas (RANGEL, 2010).

Trypanosoma cruzi é um parasita flagelado causador da doença de Chagas, possui três apresentações morfológicas distintas: epimastigota, tripomastigota e amastigota. O desenvolvimento entre um estágio e outro é um processo complexo, envolvendo muitas mudanças estruturais, antigênicas e fisiológicas (RANGEL, 2010).

A transmissão da doença de Chagas ocorre principalmente pelo inseto triatomíneo hematófago podendo também ocorrer por meio de transfusão sanguínea, transmissão congênita, infecções laboratoriais acidentais, transplante de órgãos e por via oral (WENDEL et al., 1992).

A doença de Chagas apresenta quadros clínicos variáveis sendo que na fase aguda, a qual aparece logo após a infecção, pode levar o indivíduo a óbito por insuficiência cardíaca ou meningite encefalite, principalmente em crianças. Já a fase crônica atinge órgãos internos como o coração, o esôfago, parte do intestino grosso e o sistema nervoso periférico. E após um período assintomático de vários anos, manifestações de comprometimento visceral (sintomas cardíacos que podem levar à morte súbita, megaesôfago, megacólon e lesões no sistema nervoso periférico, ocasionando deservação) podem surgir. (BILATE & CUNHA-NETO, 2008; RANGEL & LAINSON, 2003).

As Leishmanioses são doenças causadas por diferentes espécies do parasita *Leishmania*, sendo estes transmitidos pelas fêmeas de flebotomíneos. No Brasil há por volta de 230 espécies de flebotomíneos (RANGEL & LAINSON, 2003). Anualmente cerca de

dois milhões de pessoas são infectadas pelo parasita *Leishmania*, entre elas, em torno de 500 mil casos evoluem para a forma visceral da doença (MURRAY et al., 2005).

As Leishmanioses podem ocorrer em três formas clínicas principais: cutânea, mucocutânea e visceral. Cada uma dessas formas é associada a espécies particulares do gênero *Leishmania*, já que o próprio sistema imune do hospedeiro também tem um papel importante no desenvolvimento da doença (AMEEN, 2010).

1.10. Atividade citotóxica

Uma vez que existe uma imensa quantidade de substâncias que podem agredir os seres humanos, ocasionando desde irritações à intoxicações graves que podem levar até a óbito. Sendo necessário assim, torna-se necessário averiguar a toxicidade de substâncias que tenham como destino o consumo humano (CRUZ, 2003).

O ensaio de citotoxicidade *in vitro* é o primeiro passo para se avaliar a biocompatibilidade de qualquer substância para o uso biomédico. Após a constatação da não toxicidade, as substâncias podem ser encaminhadas para teste com animais. Tais testes *in vitro* têm como objetivo colocar a substância em contato direto ou indireto com a cultura de células, permitindo avaliar a toxicidade do material (LUGÃO et al., 2003).

2. Objetivos

Este trabalho tem como objetivos:

- Estudar uma planta presente no cerrado brasileiro de uso na medicina popular e que apresentasse poucos estudos;
- Obter os extratos etanólicos e os óleos essenciais das folhas, raízes e flores da *Vernonia brasiliiana*;
- Quantificar o teor de compostos fenólicos nos extratos;
- Determinar a atividade antioxidante nos extratos pelo método do DPPH;
- Medir o potencial de oxidação e a carga por voltametria de pulso;
- Elucidar as estruturas dos compostos voláteis dos óleos;
- Averiguar o teor de taninos condensados presente nos extratos;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos e dos óleos frente às bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli in vitro*;
- Analisar a atividade dos extratos e dos óleos frente aos protozoários *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania in vitro*;
- Medir a citotoxicidade em célula para os extratos e óleos.

3. Materiais e Métodos

Todos os experimentos foram feitos na Universidade Federal de Uberlândia, nos laboratórios de Produtos Naturais (preparo das amostras e análises químicas) do Instituto de Química e nos laboratórios de Microbiologia (atividade antimicrobiana) e Tripanossomatídeos (atividades antiprotozoária e citotóxica) do Instituto de Ciências Biomédicas.

3.1. Materiais e equipamentos utilizados

Os reagentes utilizados nas análises foram de grau analítico (Tabela 1). Os equipamentos utilizados para as análises estão na Tabela 2.

Tabela 1: Reagentes utilizados e suas marcas

Reagente	Marca
Etanol PA	Cromoline
Reagente de Folin-Ciocalteu PA	Cromoline
Metanol PA	Vetec
Carbonato de sódio PA	Reagen
Ácido Gálico PA	Vetec
Vanilina PA	Isofor
Ácido Sulfúrico PA	Vetec
Catequina PA	Sigma Aldrich
2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) PA	Sigma Aldrich
Butilidroxitolueno (BHT) PA	Sigma Aldrich
Cloreto de Potássio PA	Vetec
Ácido Fosfórico PA	Vetec
Hidróxido de sódio PA	Vetec
Diclorometano PA	Vetec
Padrão de alcanos C ₁₀ -C ₄₀	Sigma Aldrich
Dimetilsulfóxido (DMSO) PA	Synth
Caldo Mueller-Hinton	Himedia
Caldo Brain-Heart Infusion (BHI)	Himedia
Meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM)	Sigma Aldrich
Resazurina PA	Acros organics
Soro Fetal Bovino	Invitrogen
Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)piperazin-1-il]etanosulfônico (HEPES)	Sigma Aldrich
Piruvato de sódio PA	Sigma Aldrich
L-glutamina PA	Sigma Aldrich
D-glicose PA	Sigma Aldrich
Bicarbonato de sódio PA	Sigma Aldrich
Penicilina	Invitrogen
Gentamicina	Invitrogen
Estreptomicina	Invitrogen
Phosphate buffered saline (PBS)	Sigma Aldrich
Rochagan	Rochagan
Anfotericina B	Ambisome
Triton X-100	Sigma Aldrich

Tabela 2: Equipamentos utilizados e suas especificações

Equipamento	Especificação
Espectrofotômetro UV-VIS	Hitachi U-2000
Cromatografo gasoso acoplada a espectro de massa	Shimadzu GC17A/QP5000
Cromatografo gasoso acoplada a detector de ionização de chamas	Shimadzu, modelo 2014
Balança analítica	Shimadzu AUW 220D
Balança de luz infravermelha	Kett FD-600
Espectrofotômetro de microplacas	Camberra-Packard
Potenciostato	Drop Sens μ Stat 200

3.2. Coleta da amostra

A planta foi coletada nos meses de maio, junho e julho de 2010 em uma fazenda localizada no município de Monte Alegre de Minas – MG (Latitude: 18°34'56.85"S; Longitude: 49°2'52.61"O) . O material vegetal foi transportado até o Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de Uberlândia, para o preparo e extração das amostras.

O material vegetal foi coletado de dez indivíduos escolhidos aleatoriamente. As plantas foram identificadas como sendo a *Vernonia brasiliiana* Less. no Herbário Uberlandenses pelo Dr. Jimi Naoki Nakajima, especialista em Asteraceae. Uma exsiccata foi depositada sob o número 57604 e as restantes foram arquivadas como duplicatas.

A coleta das amostras da *Vernonia brasiliiana* para a extração dos óleos essenciais foi realizada no dia das extrações durante o período matutino.

3.3. Preparo das amostras

Aproximadamente 1,0 Kg de material vegetal (raízes, folhas e flores) foram secos à temperatura ambiente por 7 dias até umidade menor que 10 %. Para a determinação da umidade utilizou se uma balança de luz infravermelha. Cerca de 1,0 g de cada amostra foi deixada a uma temperatura de 105 ± 2 °C por quinze minutos até que o teor de umidade se mantivesse constante. Após secagem, as amostras foram picadas e moídas em um moinho de bolas de porcelana. Os pós-resultantes foram armazenados em recipientes de polietileno e acondicionados em freezer a -18 ± 5 °C até o momento dos ensaios.

3.4. Extração etanólica

Os extratos foram obtidos em um extrator do tipo Soxhlet. Uma massa inicial de aproximadamente 50,0 gramas de cada amostra seca (raízes, folhas e flores) foram percoladas com etanol PA pelo período de 6 horas (Figura 8).

Logo em seguida cada material foi filtrado e depois concentrado em um evaporador rotatório a 40°C e colocado em um dessecador até que a amostra se encontrasse totalmente seca (peso constante). Em seguida, cada produto foi armazenado em freezer a $-18,0 \pm 5^{\circ}\text{C}$ até o momento dos ensaios. Para cada extrato calculou-se o rendimento medindo-se a massa de extrato produzido (FERRI, 1996).



Figura 9: Montagem para extração contínua utilizando o aparelho de Soxhlet.

3.5. Determinação de fenóis totais (FT) pelo método de *Folin - Ciocalteu*

Uma massa de aproximadamente 12,5 mg do extrato etanólico (raízes, folhas e flor) foi dissolvida em um balão volumétrico de 25,0 mL e o volume final completado com metanol. Desta solução, retirou-se uma alíquota de 0,5 mL que foi transferida para um tubo de en-

saio. Adicionou-se 2,5 mL de uma solução aquosa do reativo Folin-Ciocalteu a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5% recém-preparada. A mistura foi incubada por 5,0 minutos em banho a 50°C, resfriada e posteriormente, mediu-se a absorbância no comprimento de onda de 760 nm, contra um branco. O teor de fenóis totais foi determinado por interpolação da absorbância da amostra com uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10, 20, 40, 60 e 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e os resultados foram expressos como em miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato (JACOBSON et al., 2005; SOUSA et al., 2007; FERRI, 1996).

3.6. Determinação de taninos condensados (proantocianidinas).

Pesou-se em torno de 12,5 mg do extrato etanólico (raízes, folhas e flores), transferiu-se para um balão volumétrico de 25,0 mL, completando-se o volume. Desta solução, retirou-se uma alíquota de 2,0 mL e transferiu-se para um balão volumétrico de 5,0 mL. Neste mesmo balão, adicionou-se 3,0 mL de uma solução de vanilina em ácido sulfúrico 70 %, na concentração de 10,0 mg mL^{-1} . A mistura foi mantida em banho a 50 °C por 15 minutos. A amostra foi esfriada e a absorbância registrada a 500 nm contra um branco. Determinou-se o teor de taninos condensados por interpolação da absorbância das amostras contra uma curva padrão, construída com padrões de catequina (5, 10, 15, 20 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Os resultados são expressos em miligramas de equivalente de catequina (EC) por grama de extrato (MORAIS et al., 2009).

3.7. Análise quantitativa da atividade antioxidante

Preparou-se 50,0 mL de solução estoque de DPPH (2,2-difenil-1-picrilhidrazila) em metanol na concentração de aproximadamente 50,0 mg mL^{-1} , mantida sob refrigeração e protegida da luz. Foram feitas diluições de 10,0 a 50,0 mg mL^{-1} . Uma curva de calibração foi construída a partir dos valores das absorbâncias registrados no comprimento de onda de 517 nm de todas as soluções (10 a 50 mg mL^{-1}), contra um branco. As medidas de absorbância foram efetuadas em triplicata.

A atividade antioxidante do extrato foi determinada usando-se o radical livre DPPH. Preparou-se uma solução do extrato (folha, flor e raiz) a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol. A partir desta solução foram realizadas diluições nas seguintes concentrações: 415, 330, 245, 160 e 75 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para cada uma destas diluições, tomou-se uma alíquota de 0,30 mL da amostra a testar e adicionou se 3,70 mL de solução de DPPH (de concentração 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol).

Também, foi feito um branco nas mesmas condições, mas sem o DPPH. Após a adição do radical DPPH, as soluções foram deixadas em repouso e suas absorbâncias registradas no comprimento de onda de 517 nm durante uma hora, em intervalos de cinco minutos em cada leitura. A porcentagem de atividade antioxidante (AA) foi determinada pela equação 1:

$$\text{DPPH}_{\text{sequestrado}}(\%) = \frac{AbvC1 - (AbvA - AbvC2) \times 100}{AbvC1} \quad (\text{equação 1})$$

Onde:

AbvC1 corresponde à absorbância do controle 1 (0,30 mL de metanol + 3,70 mL de DPPH·); AbvA corresponde a absorbância da amostra ao final de 60 minutos e AbvC2 corresponde a absorbância do controle 2 (0,30 mL de amostra + 3,70 mL de metanol).

A concentração efetiva média (CE_{50}), que representa a concentração de amostra necessária para sequestrar 50 % dos radicais de DPPH, foi calculada plotando-se a porcentagem de DPPH sequestrado versus as concentrações dos extratos de cada amostra (ARGOLO et al., 2004).

3.8. Voltametria

O ensaio por voltametria de pulso diferencial foi realizado no potenciostato Drop Sens μ Stat 200 e software Drop View 1.0, para a aquisição dos dados. Foi utilizada uma célula eletroquímica, conforme mostrado na Figura 9, na qual continha um sistema com três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar).

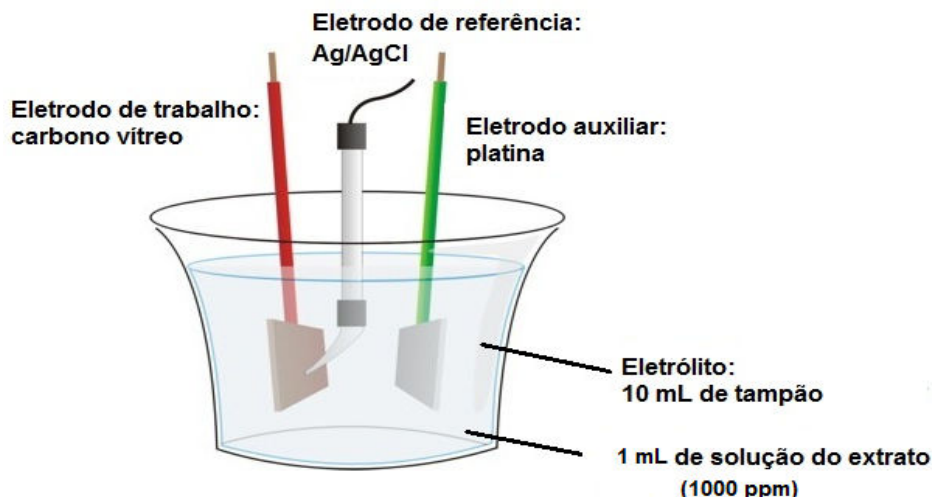


Figura 10: Esquema da célula eletroquímica utilizada.

O eletrodo de trabalho utilizado foi o de carbono vítreo, o de referência de Ag/AgCl(saturado em KCl) e o auxiliar um fio de platina. O eletrólito constituiu de 10,0 mL de solução tampão fosfato 0,2 mol L⁻¹, pH 7,0 contendo KCl 0,5 mol L⁻¹. Utilizou-se 1 mL de solução de extrato de 1000 ppm. A velocidade de varredura de 25 mV s⁻¹ com faixa de potencial entre -0,3 a 1,0 V.

3.9. Extração do óleo essencial

O material vegetal fresco (raízes, folhas e flores) foi submetido à extração dos óleos essenciais por hidrodestilação em um aparelho de Clevenger (Figura 10) (MORAIS et al., 2009). Para cada extração, utilizou-se cerca de 50,0 g de amostra com 500,0 mL de água destilada em um balão volumétrico adequado. O material foi extraído por 4,0 horas e o óleo foi recolhido em um funil de separação e lavado com 3 frações de 5,0 mL de diclorometano. Os produtos foram secos com sulfato de magnésio anidro e guardados em frascos lacrados de cor âmbar e armazenados em freezer a $-18,0 \pm 5$ °C até o momento de sua utilização.



Figura 11: Aparelho de Clevenger

3.10. Separação e identificação de compostos voláteis

A separação e identificação dos constituintes voláteis dos óleos essenciais foram obtidas por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas (CG-EM). O programa de temperatura foi de 60-240 °C (3°C /min.); injetor no modo splitless a 220°C; hélio a fluxo constante de 17 mL/min. O detector de massas com energia de impacto de 70 eV e foram captados fragmentos de 40 a 650 Daltons; Interface a 240 °C; temperatura da fonte de íons de 240°C; Volume injetado de 1,0 microlitro. A identificação dos compostos foi feita por comparação com bibliotecas de espectros de massas da Wiley (7, 139 e 229), Nist (27 e 147) e por índices de Kovat. Utilizou-se uma mistura de padrões de alcanos C₁₀-C₄₀, para a obtenção dos índices de Kovat (ADAMS, 2001; FRANCO et al., 2004).

3.11. Quantificação dos compostos voláteis

A quantificação dos constituintes voláteis foi realizada por cromatografia gasosa acoplada a um detector de ionização de chama (CG-DIC). O programa de temperatura foi de 60-240 °C (3°C /min.); injetor no modo splitless a 220°C ; nitrogênio como gás de arraste. O detector de DIC opera com os gases de queima oxigênio e hidrogênio; temperatura do detector 240 °C. Um microlitro da amostra, dissolvido em diclorometano, foi injetado. Utilizou-se uma mistura de padrões de alcanos C₁₀-C₄₀ , para a obtenção dos índices de Kovat (ADAMS, 2001; OLIVEIRA et al., 2008). A concentração de cada componente correspondeu à área de seu pico no cromatograma.

3.12. Teste da atividade antimicrobiana

Os experimentos foram realizados seguindo as instruções do manual do Instituto de Padrões Clínicos e Laboratoriais (CLSI) de 2006.

3.12.1. Meios de cultura utilizados

Os meios de cultura utilizados para determinação da atividade antimicrobiana pelo método da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e o método da Concentração Bactericida Mínima (CBM) são do tipo caldo Mueller-Hinton e caldo BHI. O preparo dos meios seguiu a indicação do fabricante.

3.12.2. Cultivo microbiano

As amostras das bactérias *Staphylococcus aureus* ATCC (25923) e *Escherichia coli* ATCC (25922) foram mantidas em estoque no laboratório de Microbiologia e foram reativadas em caldo BHI e incubadas no período noturno. Ajustaram-se suas concentrações com adição de alíquotas de solução salina a 0,85%, até turbidez de 0,5 na escala McFarland, ou seja, contendo de 1×10^8 a 2×10^8 bactérias por mililitro, a 35 °C.

3.12.3. Preparo dos óleos essenciais e dos extratos etanólicos

Os extratos etanólicos e dos óleos essenciais foram diluídos em DMSO para uma concentração-mãe inicial de $5.120 \mu\text{g ml}^{-1}$ (extratos etanólicos) ou para uma concentração-mãe de $20.480 \mu\text{g ml}^{-1}$ (óleos essenciais) antes do teste sendo passado através de filtros de ponta de seringa estéreis de $0,45 \mu\text{m}$ em uma capela de fluxo laminar.

As diferentes concentrações da amostra foram preparadas na hora, partindo-se da concentração-mãe e diluindo-se com solvente, também previamente filtrado.

3.12.4. Determinação da CIM

Um conjunto de tubos com 4,0 mL de meio de cultura em caldo BHI foi preparado seguindo as instruções do fabricante e mantido em estufa a 35°C por uma noite. Adicionou-se a estes tubos 0,5 mL da amostra testada em cada uma das concentrações conforme a Figura 11.

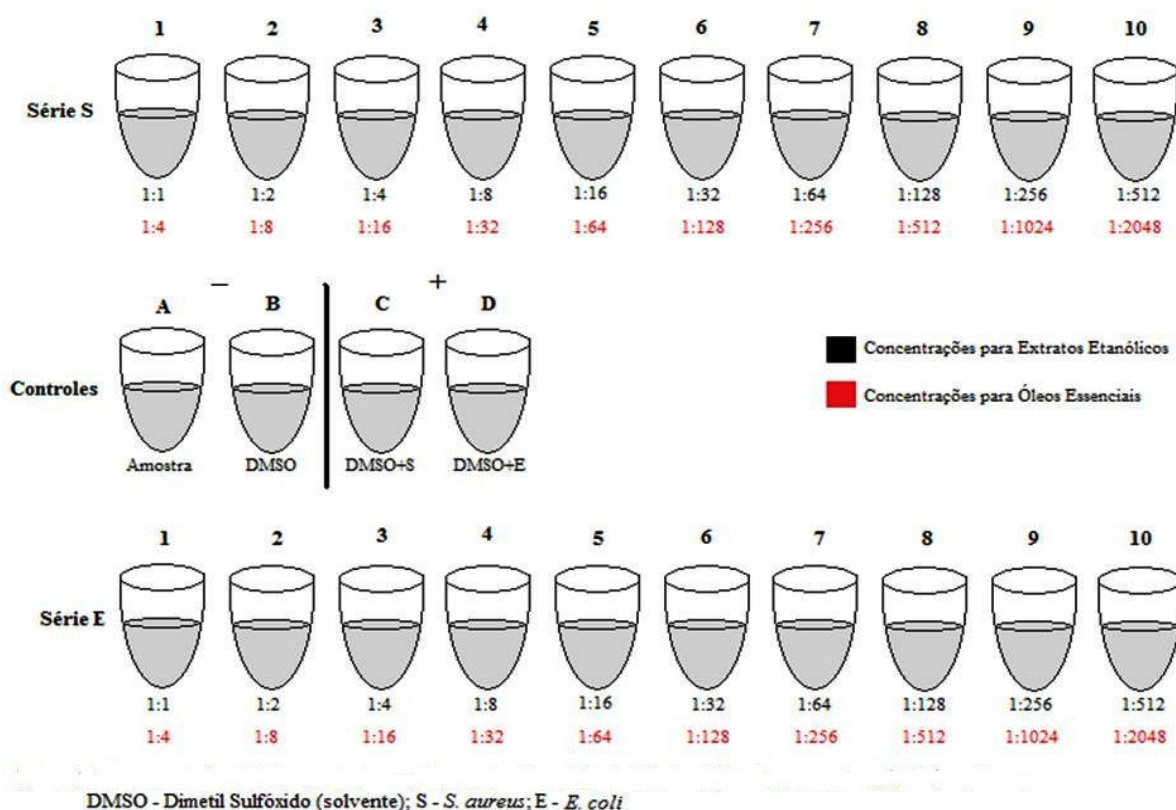


Figura 12: Valores das concentrações para determinação da CIM ($\mu\text{g ml}^{-1}$).

Os tubos de 1 a 10 (das séries E e S) continham concentrações variadas das amostras testadas (óleo essencial ou extrato etanólico). Os tubos A e B contendo meio BHI foram usados como controles negativos, adicionando-se apenas a amostra testada (A) e no tubo (B) o solvente DMSO. Para controle positivo (tubos C e D) foi adicionado uma alíquota de 0,5 mL de DMSO, sem amostra, mas com as amostras bacterianas de *S. aureus* (tubo C) e *E. coli* (tubo D).

Em ambas as concentrações testadas (óleos e extratos) foram adicionadas 0,5mL da solução bacteriana (ajustada para a turbidez de 0,5 na escala de McFarland) em duas séries: série S de *Staphylococcus aureus* ATCC (25923) e série E de *Escherichia coli* ATCC (25922).

3.12.5. Determinação da CMB

A concentração bactericida mínima (CBM) é caracterizada pela menor concentração da amostra capaz de matar mais de 99,9% do inócuo inicial de bactérias. Tal teste foi aplicado nos casos em que o CIM não foi totalmente conclusivo (ausência de crescimento, mas com potencial manutenção de viabilidade e turvação do meio decorrente da amostra testada).

Para a determinação do CBM, uma alçada de cada tubo, próximo das concentrações em dúvida, foi repicado em um tubo contendo apenas 4 mL de meio BHI. A leitura dos resultados considerava como CBM aquela concentração em que não houve nenhum crescimento após incubação por uma noite.

3.13. Atividade antiprotozoária

3.13.1. Preparo dos meios de cultura

O meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina (2 mM), D-glicose (4500 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).

O caldo *Brain-Heart Infusion* (BHI) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. O caldo foi suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e L-glutamina (2 mM).

3.13.2. Cultivo dos parasitas

A forma tripomastigota de cultura de tecido da cepa G de *Trypanosoma cruzi* foi obtida e mantida em células Vero em DMEM à 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂.

O estágio promastigotas de *Leishmania amazonensis* da cepa PH8 cultivado em BHI à temperatura de 25°C.

3.13.3. Preparo das amostras

Para o teste com *Trypanosoma cruzi* as amostras de óleos essenciais e extratos da *Vernonia brasiliensis* foram dissolvidos em metanol e diluídos com DMEM, até que se formou uma

solução mãe de $1.280 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os óleos essenciais e $640 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os extratos. A concentração final de metanol da solução mãe não excedeu 3%.

Para o teste com *Leishmania amazonensis* as amostras de óleos essenciais e extratos da *Vernonia brasiliana* foram dissolvidos em metanol e diluídos com BHI, até que se formou uma solução mãe de $1.280 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os óleos essenciais e $640 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os extratos. A concentração final de metanol da solução mãe não excedeu 3%.

3.13.4. Teste de viabilidade celular

O teste de viabilidade celular foi realizado por microdiluição em placa de 96 poços, a partir da solução mãe e se fazendo a diluição com meio de cultura DMEM (para o *Trypanosoma cruzi*) e BHI (para a *Leishmania amazonensis*) até que obtivessem as concentrações a serem testadas. O volume final de cada poço foi de $100 \mu\text{L}$, sendo $20 \mu\text{L}$ de inoculo (solução a 1.10^8 parasitas por mL) com $80 \mu\text{L}$ das concentrações das amostras. A estrutura da placa de 96 poços está na expressa na Figura 12.

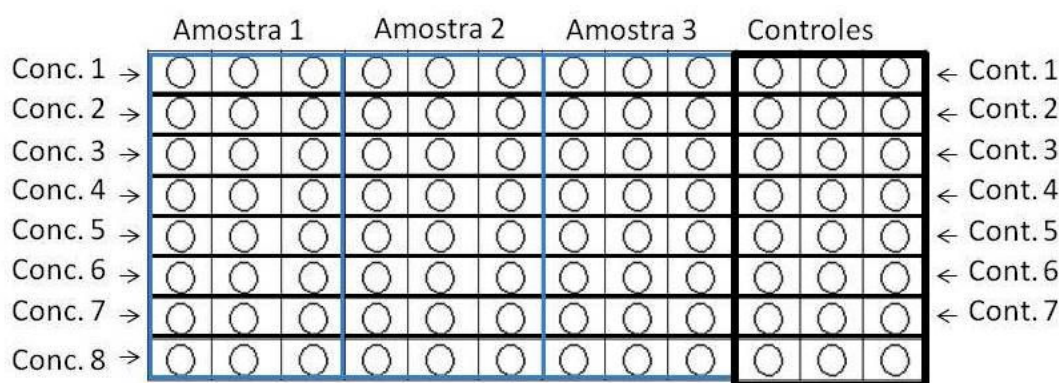


Figura 13: Estrutura da placa para o teste de antiprotzoário.

Onde:

Amostras testadas:

- Amostra 1: extrato ou óleo essencial da folha.
- Amostra 2: extrato ou óleo essencial da flor.
- Amostra 3: extrato ou óleo essencial da raiz.

Controles:

- Cont. 1: controle positivo (crescimento);
- Cont. 2: controle de metanol 3%;

- Cont. 3: controle negativo (morte) com 1 μ L de solução de Rochagan à 0,5 mg mL⁻¹ para o *Trypanosoma cruzi* e 1 μ L de solução de Anfotericina B à 0,5 mg mL⁻¹ para a *Leishmania amazonensis*;
- Cont. 4: controle do meio de cultura sem parasita;
- Cont. 5: controle da amostra da folha sem parasita;
- Cont. 6: controle da amostra da flor sem parasita;
- Cont. 7: controle da amostra da raiz sem parasita;

Concentrações testadas:

- Conc. 1: 512 μ g mL⁻¹ para extrato ou 1.024 μ g mL⁻¹ para o óleo essencial;
- Conc. 2: 256 μ g mL⁻¹ para extrato ou 512 μ g mL⁻¹ para o óleo essencial;
- Conc. 3: 128 μ g mL⁻¹ para extrato ou 256 μ g mL⁻¹ para o óleo essencial;
- Conc. 4: 64 μ g mL⁻¹ para extrato ou 128 μ g mL⁻¹ para o óleo essencial;
- Conc. 5: 32 μ g mL⁻¹ para extrato ou 64 μ g mL⁻¹ para o óleo essencial;
- Conc. 6: 16 μ g mL⁻¹ para extrato ou 32 μ g mL⁻¹ para o óleo essencial;
- Conc. 7: 8 μ g mL⁻¹ para extrato ou 16 μ g mL⁻¹ para o óleo essencial;
- Conc. 8: 4 μ g mL⁻¹ para extrato ou 8 μ g mL⁻¹ para o óleo essencial;

Após ser preparada a placa de *Trypanosoma cruzi*, ela foi incubada por 48 horas a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Em seguida adicionou-se 4 μ L em cada poço de uma solução reveladora de resazurina a 3 mM em PBS (phosphate buffered saline) (GÓMEZ-BARRIO et al., 2006) e seguiu-se com nova incubação por 24 horas à 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Em seguida, foi realizada a leitura a 594 nm em um espectrofotômetro de microplaca.

A placa de *Leishmania amazonensis*, foi incubada por 48 horas a 25°C. Em seguida adicionou-se 2 μ L em cada poço de uma solução reveladora de resazurina a 3 mM em PBS (GÓMEZ-BARRIO et al., 2006) e seguiu-se com nova incubação por 24 horas a 25°C. Em seguida, foi realizada a leitura a 594 nm em um espectrofotômetro de microplaca.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, a partir dos resultados das absorbâncias, a viabilidade foi calculada em função do controle positivo, construindo-se um gráfico que através de sua interpolação linear foi calculado o CE₅₀(concentração em que 50% das células estão vivas) (KOELLA & HUBER, 1993).

3.14. Atividade citotóxica

3.14.1. Preparo do meio de cultura

O meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. O meio 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).

3.14.2. Cultura de células

A cultura da célula Vero ATCC CCL 81 (fibroblastos de rim de macaco verde da África) e células RAW 264.7 ATCC TIB 71 (macrófagos murinos peritoniais de linhagem celular) foram mantidas em DMEM, a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂.

3.14.3. Preparo das amostras

As amostras de óleos essenciais e extratos da *Vernonia brasiliiana* foram dissolvidos em metanol e diluídos com DMEM, até que se formou uma solução mãe de 1.280 µg mL⁻¹ para os óleos essenciais e 640 µg mL⁻¹ para os extratos. A concentração final de metanol da solução mãe não excedeu 3%.

3.14.4. Teste de viabilidade celular

Para avaliação da citotoxicidade utilizou-se o método de diluição em microplaca. Na realização de cada teste independente da célula, foi preparada uma solução contendo 1.10⁶ células em 10 mL de meio DMEM suplementado, desta foi pipetado 100 µL para cada poço da análise, a placa então foi incubada por 6 horas a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂, permitindo que as células aderissem ao fundo do poço.

Depois de aderidas, o meio de cultura de cada poço foi retirado e em seguida adicionou-se as concentrações das amostras a serem testadas, partindo da solução mãe em DMEM. O volume final de cada poço foi de 100 µL e a concentração de células presentes em cada poço foi de 1.10⁴ células. A estrutura da placa de 96 poços com as concentrações e os controles está expressa na Figura 13.

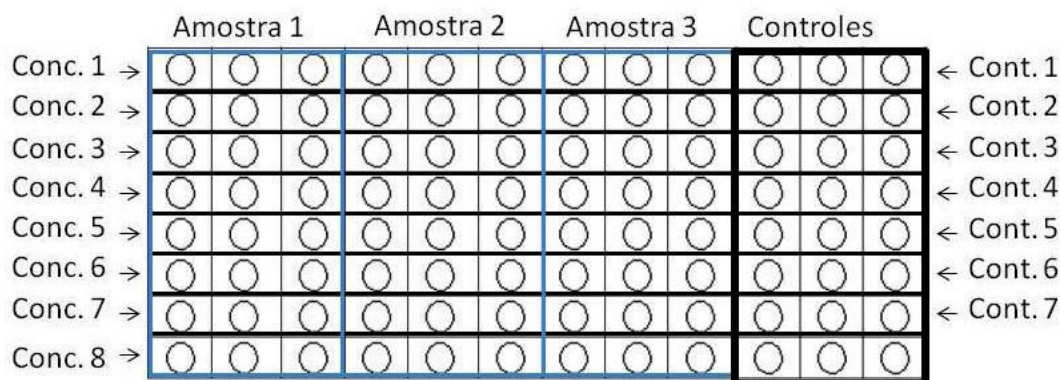


Figura 14: Estrutura da placa para o teste de citotoxicidade.

Onde:

Amostras testadas:

- Amostra 1: extrato ou óleo essencial da folha.
- Amostra 2: extrato ou óleo essencial da flor.
- Amostra 3: extrato ou óleo essencial da raiz.

Controles:

- Cont. 1: controle positivo (crescimento);
- Cont. 2: controle de metanol 3%;
- Cont. 3: controle negativo (morte) com 30 μL de solução de Triton X-100 a 0,5% para lise celular;
- Cont. 4: controle do meio de cultura sem célula;
- Cont. 5: controle da amostra da folha sem célula;
- Cont. 6: controle da amostra da flor sem célula;
- Cont. 7: controle da amostra da raiz sem célula;

Concentrações testadas:

- Conc. 1: 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para extrato ou 1.024 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo essencial;
- Conc. 2: 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para extrato ou 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo essencial;
- Conc. 3: 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para extrato ou 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo essencial;
- Conc. 4: 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para extrato ou 128 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo essencial;
- Conc. 5: 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para extrato ou 64 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo essencial;
- Conc. 6: 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para extrato ou 32 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo essencial;
- Conc. 7: 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para extrato ou 16 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo essencial;
- Conc. 8: 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para extrato ou 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o óleo essencial;

Após ser preparada, a placa foi incubada por 48 horas a 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Em seguida adicionou-se a solução reveladora de resazurina a 3 mM em PBS (GÓMEZ-BARRIO et al., 2006), sendo 10 µL em cada poço da placa de células Vero e 4 µL para a placa de células RAW 264.7. Novamente foram incubadas por 24 horas à 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Depois foi realizada leitura a 594 nm em um espectrofotômetro de microplaca.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, e a partir dos resultados das absorbâncias, a viabilidade celular foi calculada em função do controle positivo e construído-se um gráfico que através de sua interpolação linear foi calculado o CE₅₀ (concentração em que 50% das células estão vivas) (KOELLA & HUBER, 1993).

3.15. Análise estatística

Todos os resultados das análises químicas foram obtido a partir da media das três repetições (n = 3) com o seu desvio padrão. Para as análises de antiprotozoária e citotóxica os testes foram realizados em triplicata e com a media das absorbâncias foi construída o gráfico para o calculo o CE₅₀. Todos os dados das analise biológicas (antioxidante DPPH, Antiprotozoária e citotóxica) foram submetidos ao tratamento estatístico ANOVA com o nível de significância de 5%, pelo método de Tukey no programa GraphPad Prism 5.

4. Resultados e discussão

4.1. Coleta da espécie e preparo das amostras

A espécie amostral utilizada para o preparo dos extratos da folha, flor e raiz foram coletadas e desidratadas à temperatura ambiente, até obter uma umidade inferior a 10%. Em seguida o material foi picado e triturado em um moinho de bolas de porcelana até se obter um pó, que foi armazenado em recipientes de vidros com tampa de polietileno e acondicionado em freezer a $-18 \pm 5^\circ\text{C}$ até o momento das análises. As amostras vegetais da *Vernonia brasili-ana* para obtenção dos óleos essenciais foram coletadas no período matutino e a extração do óleo essencial foi realizada no dia da coleta.

4.2. Extração Etanólica

Os extratos da folha, flor e raiz da *Vernonia brasiliiana* foram obtidos no aparelho de Soxhlet utilizando etanol como solvente. O cálculo do rendimento é apresentado na Tabela 3.

Tabela 3: Resultados das extrações das partes da *Vernonia brasiliiana*

	Extrato produzido com 50,0 g de amostra (g)	Rendimento em porcentagem (%)	Rendimento (g de extra- to/g de amostra)
Flor	3,6	7,1	0,1
Folha	5,2	10,3	0,1
Raiz	2,2	4,3	0,04

A tabela indica que a folha da *Vernonia brasiliiana* possui um rendimento superior às demais partes e que a raiz possui o menor rendimento. Estes dados indicam que a folha apresenta maior número de extrativos solúveis ao solvente da extração, comparado com as demais partes da planta.

4.3. Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.

Na análise do teor de compostos fenólicos totais foi adotado o método de Folin-Ciocalteu, o qual se fundamenta no processo de redução dos ácidos fosfomolibídico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) e fosfotungístico ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$). Quando em presença de substâncias fenólicas a cor da solução muda de amarelo para azul (Figura 14) e pode ser quantificado em espectrofotômetro (MESSERSCHMIDT et al., 2011).

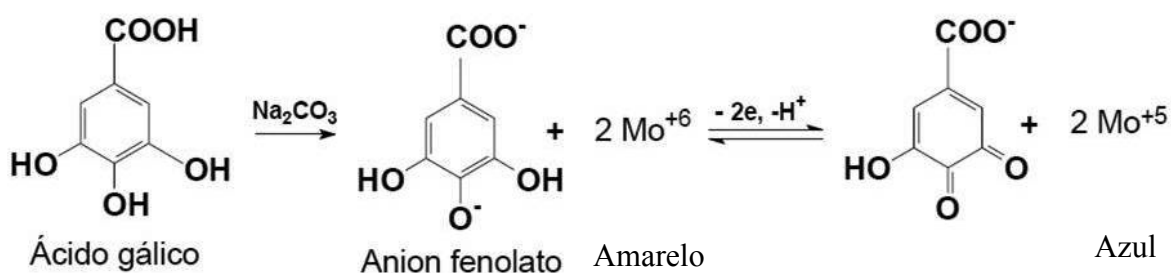


Figura 15: Reação típica do ácido gálico com o íon molibdênio (Reagente de Folin-Ciocalteu).
Fonte: OLIVEIRA, 2008.

Para o cálculo do teor de fenóis totais (FT) foi construída uma curva de calibração de ácido gálico (Figura 15), a partir de concentrações conhecidas de ácido gálico, em função do consumo do reagente Folin-Ciocalteu.

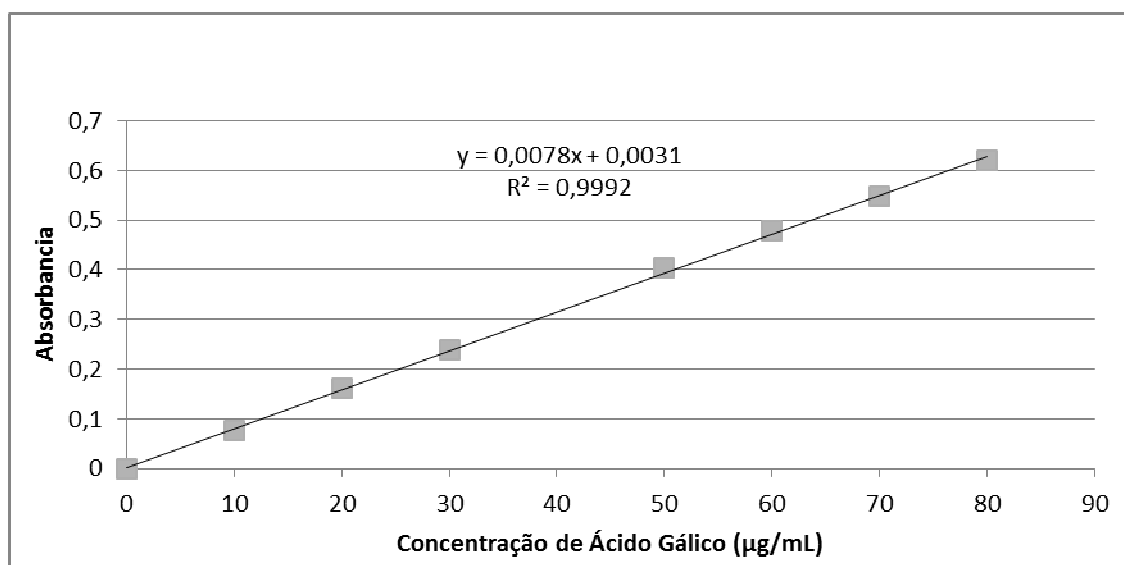


Figura 16: Curva de calibração do ácido gálico.

A partir da curva de calibração de ácido gálico foi calculado o teor de fenóis totais, através da interpolação das absorbâncias das três amostras de extratos, sendo expressos os resultados em miligrama de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de amostra (Tabela 4).

Tabela 4: Resultados do teor de fenóis totais (n = 3)

Extratos	mg de EAG g ⁻¹ da amostra
Flor	127 ± 3
Folha	133 ± 3
Raiz	87 ± 1

Os resultados de FT apontaram as folhas da *Vernonia brasiliiana* com maior teor de compostos fenólicos que as demais partes da planta. O teor de fenóis presentes nas raízes foi o menor com 87 mg de EAG g⁻¹, já o extrato das flores apresentou valores muito próximo aos valores das folhas.

O resultado de FT para o extrato etanólico da folha da *Vernonia brasiliiana* (133 mg de EAG g⁻¹ de extrato) foi maior que o do extrato etanólico das folhas da *Vernonia blumeoides* que apresentou o teor de fenóis totais igual à 110 mg de EAG g⁻¹ de extrato (ALIYU et al., 2011).

Ao se comparar a folha da *Vernonia amygdalina* com a *Vernonia brasiliiana* constata-se que o teor de fenóis totais presentes na folha da *Vernonia brasiliiana* (1.367 mg de EAG em 100 g de material vegetal seco) é maior que o das folhas da *Vernonia amygdalina* (397,48 mg de EAG em 100 g de material vegetal seco) (OWOLABI et al., 2008).

4.4. Determinação de Taninos Condensados

Para a determinação da quantidade de taninos condensados presentes nos extratos da folha, flor e raiz da *Vernonia brasiliana* foi adotado o método da vanilina, em que se baseia na reação da vanilina com os taninos formando um complexo vermelho (Figura 16), que pode ser quantificado (PELL et al., 2001).

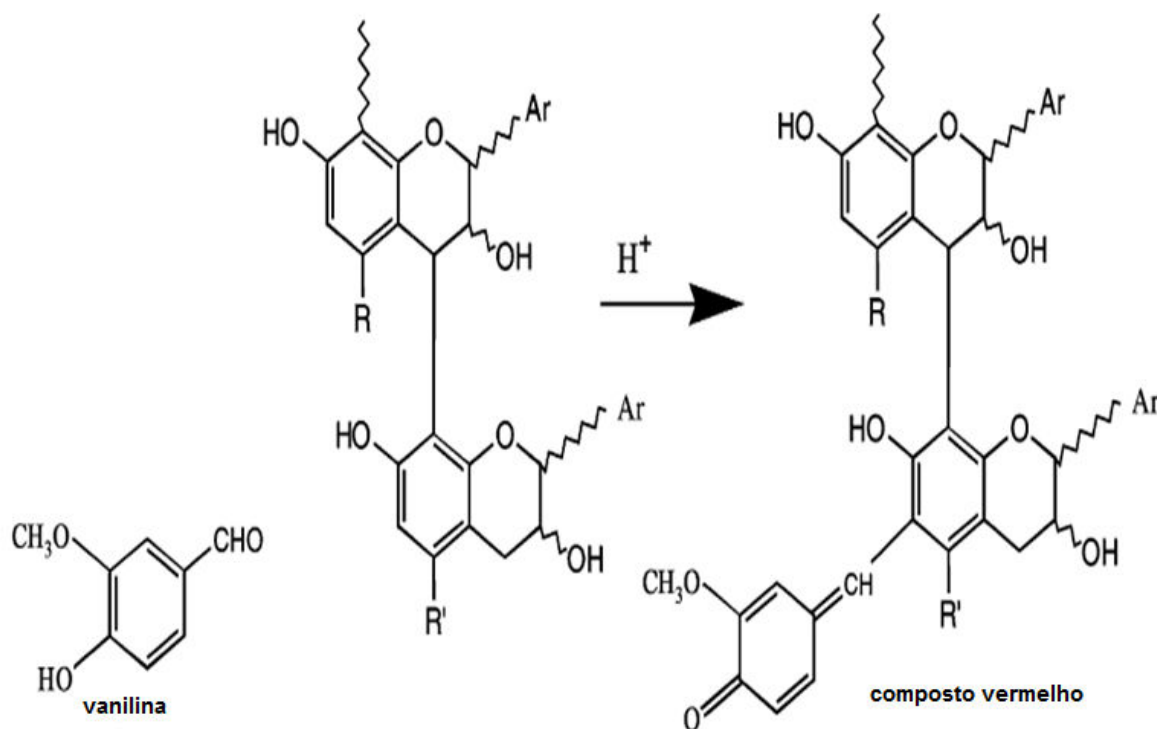


Figura 17: Reação da vanilina com o tanino condensado.
Fonte: PELL et al., 2001.

Para a quantificação do teor de taninos condensados foi construída uma curva de calibração, com concentrações conhecidas de catequina (Figura 17).

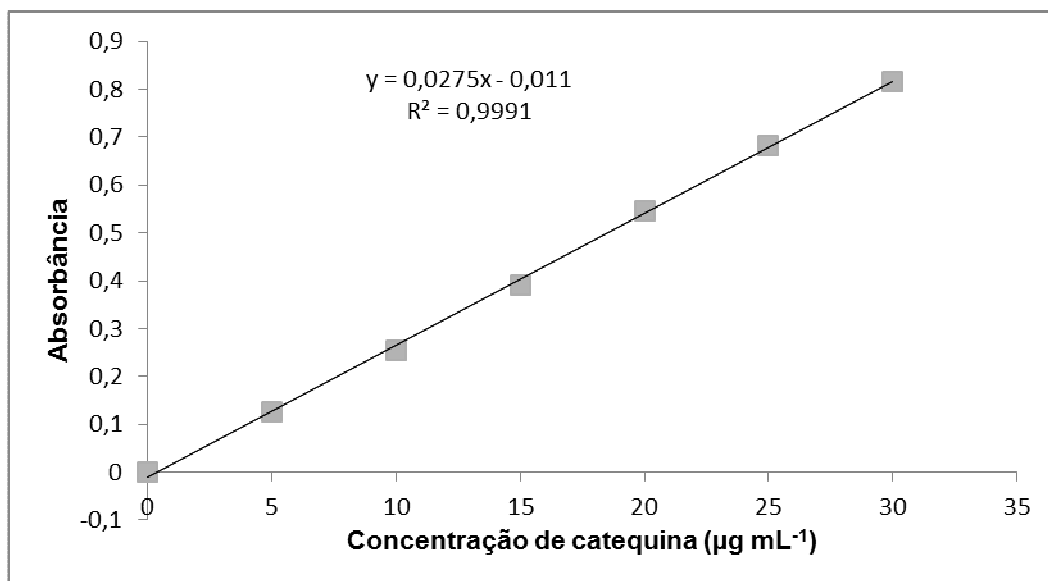


Figura 18: Curva de calibração da catequina.

As absorbâncias obtidas das amostras de extratos no método da vanilina foram interpoladas na curva da catequina, expressando-se o resultado da concentração de taninos condensados em miligramas de equivalentes de catequina por grama de amostra, como exposto na tabela 5.

Tabela 5: Resultados do teor de Taninos Condensados (n=3)

Extratos	mg de EC g ⁻¹ da amostra
Flor	122 ± 1
Folha	147 ± 3
Raiz	110 ± 3

Os resultados da Tabela 5 mostram que o extrato da folha tem o maior teor de taninos condensados seguido do extrato da flor e por último o da raiz.

A quantificação do teor de taninos condensados é um tipo de teste pouco utilizado, sendo assim não se encontrou análises com o teor de taninos condensados para outras espécies de *Vernonia*. Na literatura foram relatados apenas testes que indicam a presença de taninos no extrato etanólico das folhas da *Vernonia blumeoides* (ALIYU et al., 2011).

4.5. Determinação da atividade antioxidante por DPPH

Na avaliação da atividade antioxidante analisa-se a capacidade da amostra em sequestrar o radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) (cor violeta) (Figura 18) que absorve em 517 nm e que quando reduzido forma 2,2-difenil-1-picril-hidrazina (cor amarela). Esta

mudança de coloração é acompanhada através de leitura da absorbância no espectrofotômetro UV-Visível (BERSET et al. 1995).

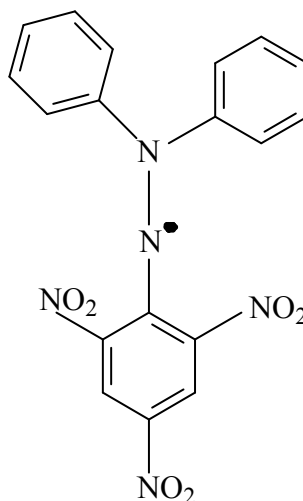


Figura 19: Estrutura do DPPH.
Fonte: OLIVEIRA, 2008

Para realizar o cálculo da atividade antioxidante foi construída uma curva de calibração com a concentração do DPPH versus suas absorbâncias (Figura 19).

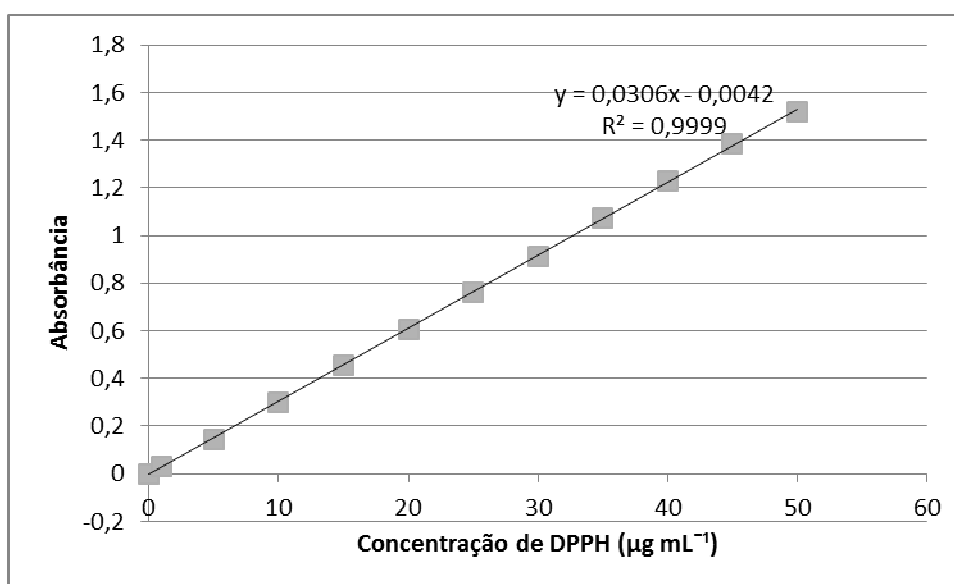


Figura20: Curva de calibração com DPPH.

A partir da curva de calibração com DPPH, foram construídos os gráficos de consumo do DPPH em função do tempo para cada concentração testada dos extratos (Figuras 20, 22 e 24). Também foi calculado o CE_{50} (concentração efetiva média) (Figuras 21, 23 e 25), que é expresso em concentração ($\mu\text{g mL}^{-1}$) necessária para consumir 50% do radical DPPH (Tabela 6) (ARGOLO et al., 2004).

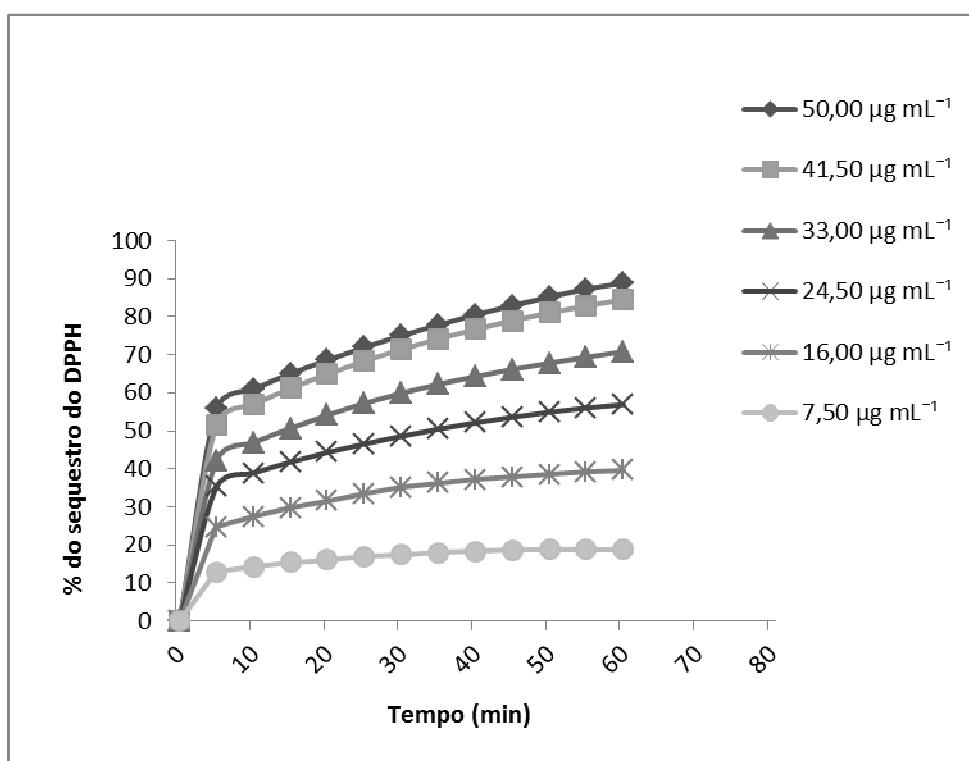


Figura 21: Consumo do DPPH em função da concentração do extrato da folha.

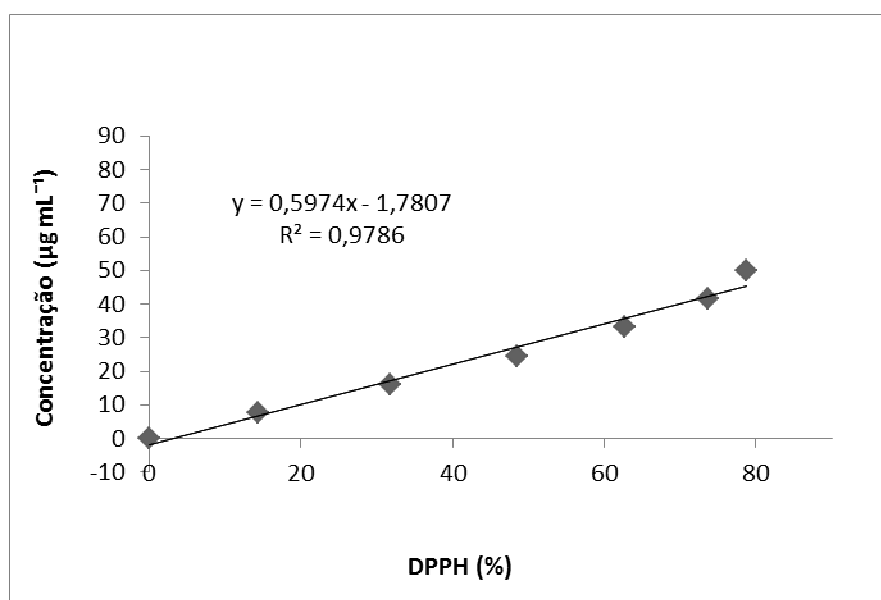


Figura 22: Gráfico para o cálculo do CE_{50} do extrato da folha referente a uma das medidas.

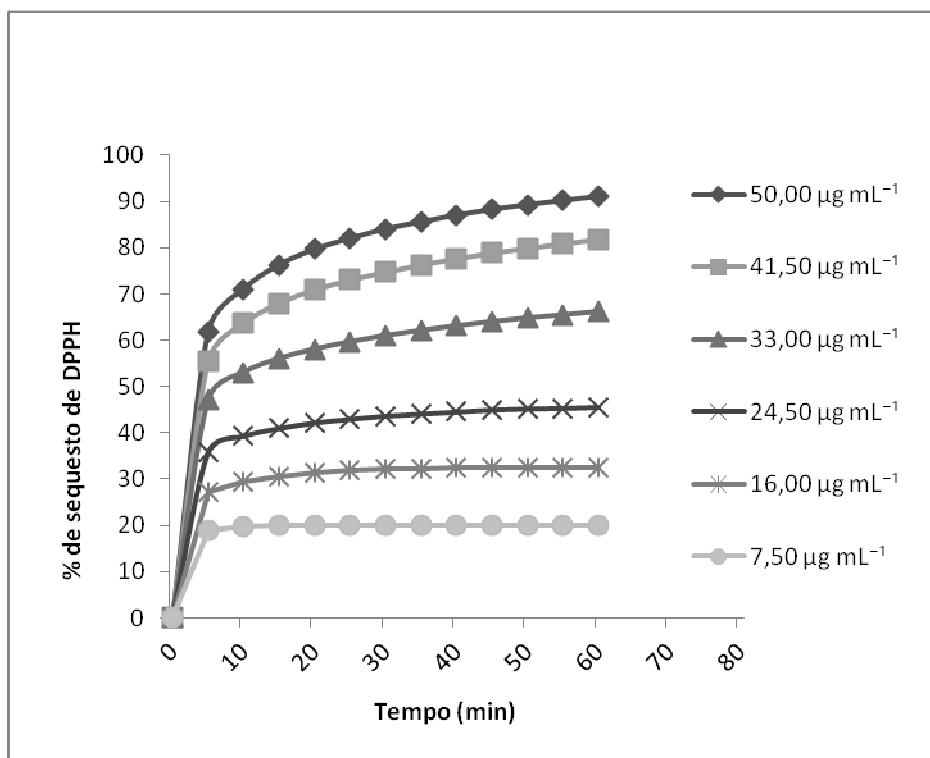


Figura 23: Consumo do DPPH em função da concentração do extrato da flor.

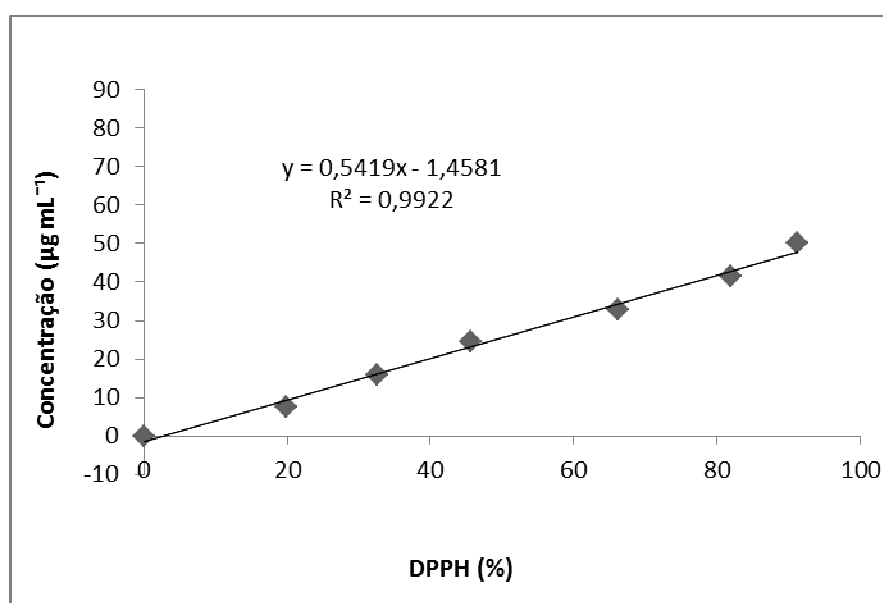


Figura 24: Gráfico para o cálculo do CE_{50} do extrato da flor referente a uma das medidas.

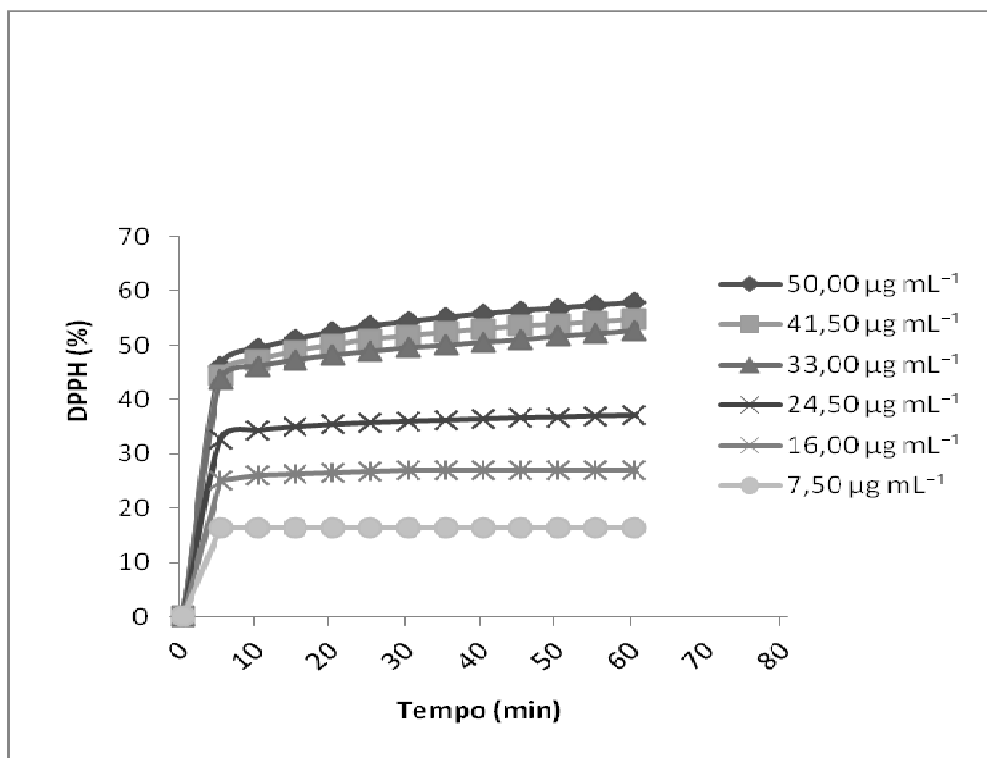


Figura 25: Consumo do DPPH em função da concentração do extrato da raiz.

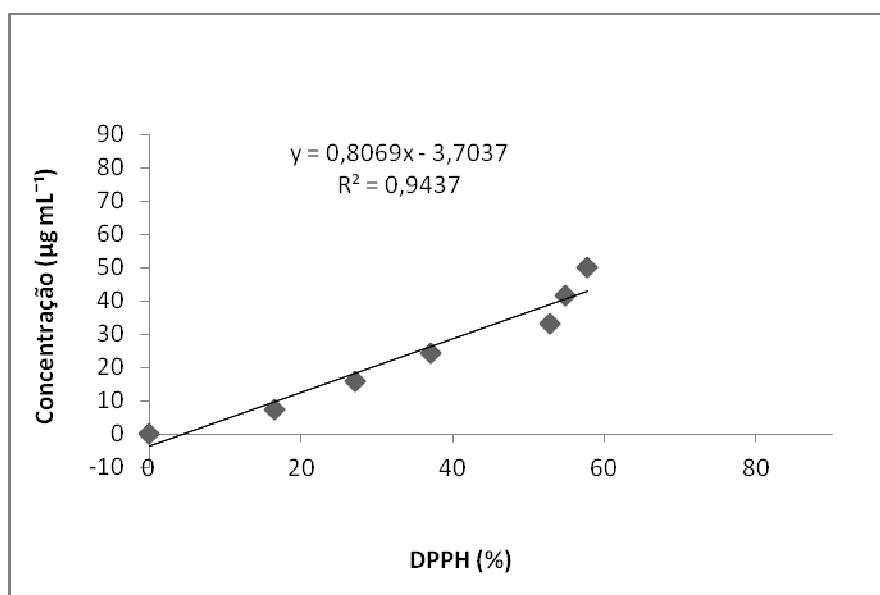


Figura 26: Gráfico para o cálculo do CE_{50} do extrato da raiz referente a uma das medidas.

Tabela 6: Atividade Antioxidante dos extratos (n = 3)

Amostras	CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
Folha	25 ± 2
Flor	28 ± 3
Raiz	38 ± 1
BHT*	$7,3 \pm 0,3$

* Antioxidante padrão testado.

Os resultados apresentados na Tabela 6 mostram que os extratos da folha e flor da *Vernonia brasiliiana* não apresentam diferença significativa na atividade antioxidante, considerando-se a margem de erro e são mais efetivos que o extrato da raiz. Quanto menor o valor do CE_{50} maior é a atividade antioxidante da amostra, pois foi necessária uma menor concentração da amostra para consumir 50% do radical DPPH.

O antioxidante sintético BHT testado possui o CE_{50} igual a $7,3 \mu\text{g mL}^{-1}$. O valor do CE_{50} para os extratos da folha, flor e raiz foram superiores ao do BHT, mas estes valores são significativos já que não são compostos puros e sim extratos. Pesquisas futuras devem investigar quais compostos são responsáveis pela expressiva atividade antioxidante dos extratos considerados.

Ao comparar a atividade antioxidante do extrato da folha da *Vernonia brasiliiana* com outras espécies de *Vernonia* já estudadas, verifica-se que ela possui maior atividade que o extrato aquoso da folha da *Vernonia amygdalina*, com CE_{50} igual a $600 \mu\text{g mL}^{-1}$ (YOURS et al., 2012), maior também que o extrato metanólico da folha da *Vernonia condensata* Baker, com CE_{50} de $56 \mu\text{g mL}^{-1}$ (DOUTRA et al., 2011) e menor atividade que o extrato etanólico da folha da *Vernonia polyanthes* Less com CE_{50} de $10,54 \mu\text{g mL}^{-1}$ (ALVES & SOUSA, 2010). Estes dados capacitam o extrato da folha da *Vernonia brasiliiana* como um antioxidante promissor se comparado com as outras *Vernonias* até então estudadas.

4.6. Voltametria

Na voltametria cíclica o potencial de oxidação de um composto é caracterizado como o parâmetro de seu poder redutor, portanto, quanto maior o seu potencial de oxidação menor será o poder redutor. Assim, compostos orgânicos que são antioxidantes podem ser chamados de agentes redutores. Desta maneira, a avaliação do poder redutor de um composto ou grupo de compostos por voltametria cíclica, reflete a atividade antioxidante destes (HUANG et al., 2004).

O voltamograma por pulso diferencial obtido para as amostras dos extratos da folha, flor e raiz da *Vernonia brasiliiana* e o do BHT é apresentado na Figura 26. A Tabela 7 mostra os dados referentes a essa figura.

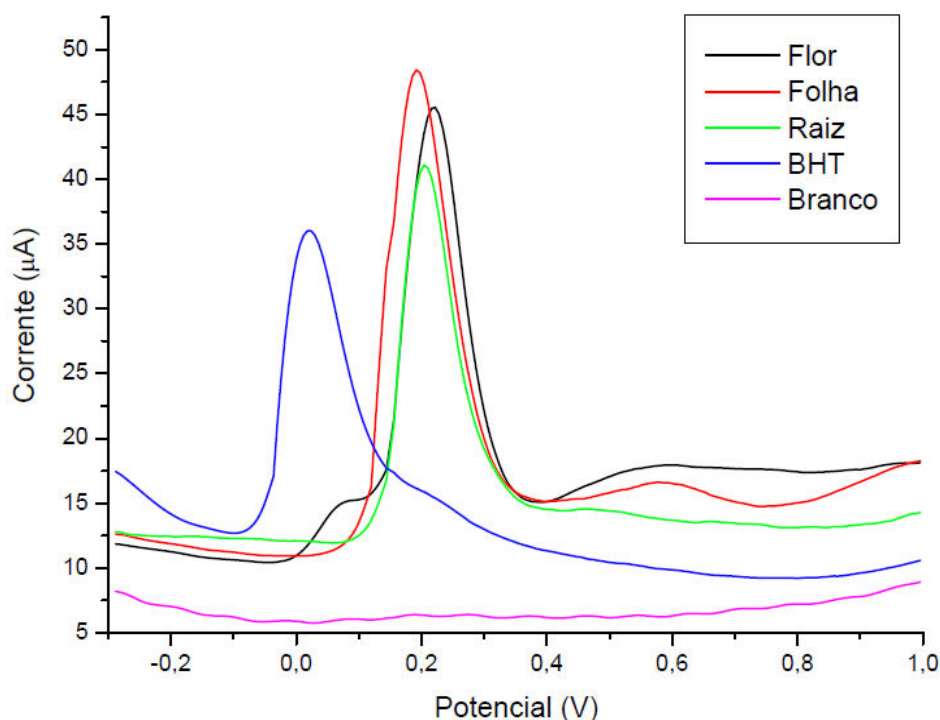


Figura 27: Voltamograma de pulso diferencial dos extratos de folha, flor e raiz da *Vernonia brasiliiana* e do antioxidante BHT.

Na Tabela 7 são mostrados os valores de potencial de oxidação (E_p) e a carga (Q). A carga é definida pela área do pico de oxidação e é relacionada à concentração de espécie. Isto sugere que quanto maior o valor de Q , maior é a quantidade de compostos antioxidantes, mas o valor de Q também depende do coeficiente de difusão da substância (ALVES et. al., 2004).

Tabela 7: Potencial de oxidação e carga das amostras de extrato da *Vernonia brasiliiana* ($n=3$)

Extratos	E_p (V)	Q (μC)
Folha	$0,205 \pm 0,012$	158 ± 9
Flor	$0,232 \pm 0,013$	160 ± 8
Raiz	$0,199 \pm 0,006$	113 ± 13
BHT*	$0,028 \pm 0,003$	105 ± 13

*Antioxidante padrão testado.

No voltamograma, observa-se que nas amostras testadas, o maior potencial de oxidação foi o da flor seguido da folha e a raiz, mas todos estão na mesma região de potencial com pouca variação. Para o extrato da flor foi visualizado a formação de um pequeno pico com potencial de oxidação de $0,071 \pm 0,002$, indicando que esta amostra possui mais uma classe de compostos com grande potencial antioxidante.

De acordo com os valores, os extratos da flor e folha possuem o potencial de oxidação muito próximo, além de valores de carga praticamente iguais. Este fato foi observado também

na atividade antioxidante por DPPH em que a folha e a flor apresentam valores próximos de CE_{50} e na concentração de fenóis totais com valores também próximos (Tabela 8).

Tabela 8: Resultado de atividade antioxidante, fenóis totais e carga

Amostras	CE_{50} ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	Fenóis Totais (mg	Q (μC)
		EAG por g de amostra)	
Folha	25 $\pm$ 2	133 $\pm$ 3	158 $\pm$ 9
Flor	28 $\pm$ 3	127 $\pm$ 3	160 $\pm$ 8
Raiz	37,6 $\pm$ 0,7	87 $\pm$ 1	113 $\pm$ 13
BHT*	7,3 $\pm$ 0,3	-	105 $\pm$ 13

*Antioxidante padrão testado.

Ao se comparar os valores de potencial de oxidação, o extrato da raiz possui o menor valor, ou seja, seus compostos têm um maior poder antioxidante em relação aos extratos da folha e flor, mas sua carga é a menor entre eles, ou seja, deve possuir uma menor concentração de compostos antioxidantes do que os outros extratos. Esta situação foi visualizada na atividade antioxidante por DPPH do extrato da raiz que apresentou maior valor de CE_{50} e na análise de fenóis totais que apresentou resultado baixo em relação os outros extratos testados. Isto se deve ao fato que a atividade antioxidante pelo método do DPPH está relacionada com a concentração de compostos antioxidantes presentes na amostra que reage com DPPH. Dessa forma, mesmo com uma menor quantidade de compostos antioxidantes (menor Q), o extrato da raiz deve possuir compostos com maior poder antioxidante que as demais partes testadas da planta.

O BHT é um antioxidante sintético muito utilizado. O seu potencial de oxidação é de 0,028 V, se comparado com os extratos da *Vernonia brasiliensis* é baixo, mas a uma concentração de 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ os extratos demonstraram possuir uma maior carga que o BHT. Este fato pode ter ocorrido por causa da diferença dos coeficiente de difusão (FREIRE et al., 2008).

4.7. Identificação dos óleos

As amostras de óleo essencial da folha, flor e raiz da *Vernonia brasiliensis* foram extraídas e apresentaram rendimento inferior a 1%. Elas foram injetadas no CG-EM para identificação dos constituintes voláteis. No processo de identificação utilizaram-se as bibliotecas de espectro de massa e os índices de Kovat. Para quantificação de cada constituinte usou-se a área correspondente do cromatograma obtido no cromatógrafo com detector de ionização de chama (DIC) que é mais preciso.

Os resultados da identificação (CG-EM) e a porcentagem (CG-DIC) de cada constituinte volátil da folha, flor e raiz da *Vernonia brasiliiana* estão expressos nas Tabelas 9, 10 e 11.

Tabela 9: Componentes do óleo essencial da raiz da *Vernonia brasiliiana*

Tr* (min)	Composto	%(DIC)	IK**
30,965	silfiperfol-5-eno	0,95	1354
32,049	silfiperfol-5-eno 7-epi	3,46	1381
33,067	cicloisosativeno	2,25	1403
33,386	<i>alfa</i> -copaeno	0,89	1411
33,833	modheph-2-eno	9,22	1421
34,226	<i>alfa</i> -isocomeno	16,36	1430
34,812	cipereno	10,20	1445
35,258	<i>beta</i> -isocomeno	10,93	1454
35,640	<i>beta</i> -cariofileno	11,11	1464
36,464	n.i.	0,91	1484
37,084	<i>alfa</i> -humuleno	5,79	1498
37,350	n.i.	0,81	1505
37,865	<i>alfa</i> -curcumeno	8,01	1516
38,517	<i>beta</i> -selineno	2,60	1532
38,873	<i>alfa</i> -selineno	2,76	1540
39,824	n.i.	1,31	1562
42,738	oxido de cariofileno	0,96	1630
47,178	n.i.	2,19	1736
48,141	n.i.	0,93	1779
56,092	ácido palmítico	5,61	1946
75,246	n.i.	2,74	2396
Teor de sesquiterpenos		84,53	
Teor de sesquiterpenos oxigenados		0,96	
Teor de ácidos carboxílicos		5,61	

*Tempo de retenção

** Índice de Kovats calculado

Tabela 10: Componentes do óleo essencial da flor da *Vernonia brasiliiana*

Tr* (min)	Composto	%(DIC)	IK**
3,646	n.i	2,47	712
6,022	hexan-1-al	1,54	768
7,361	4-hidroxi-2-metilpentan-2-ona	0,63	800
7,792	trans-hex-1-en-2-al	3,97	810
7,884	hex-3-en-1-ol	1,60	812
8,236	hex-2-en-1-ol	6,11	820
8,296	hexan-1-ol	4,24	822
9,179	heptan-2-ona	1,56	843
9,636	heptan-1-al	1,47	853
11,126	hept-3-en-2-ona	0,79	888
13,077	oct-1-en-3-ol	2,38	934
13,437	octan-3-ona	1,50	943
14,230	octan-1-al	0,76	961
16,398	feniletan-1-al	0,62	1012
19,283	nonan-1-al	2,19	1080
19,943	feniletan-1-ol	2,44	1096

23,954	2-metoxi-4-metilfenol	0,62	1190
24,404	decan-1-al	3,57	1200
26,029	4-metilveratrol	1,76	1239
29,936	n.i.	0,81	1331
32,021	eugenol	2,01	1380
33,803	<i>beta</i> -burboneno	0,82	1421
35,474	<i>trans</i> -cariofileno	0,99	1461
37,015	<i>alfa</i> -humuleno	0,83	1497
38,175	germacreno D	0,98	1524
38,679	tridecan-1-al	1,21	1536
40,621	n.i.	0,74	1582
42,383	espatulenol	1,21	1623
42,724	óxido de cariofileno	1,87	1631
42,969	tetradecan-1-al	0,90	1637
45,512	tetradecan-1-ol	3,82	1697
47,043	pentadecan-1-al	2,26	1733
47,171	n.i.	3,03	1736
47,816	n.i.	0,75	1751
50,495	acetato de tetradecila	1,21	1814
51,948	6,10,14-trimetilpentadecan-2-ona	1,55	1848
53,185	hexadecan-1-ol	0,82	1877
56,020	ácido palmítico	8,36	1944
56,886	isobutirato de tetradecila	2,61	1964
57,078	palmitato de etila	0,73	1969
57,290	nonadecano	0,62	1974
61,262	fitol	0,68	2067
64,391	heneicosano	0,80	2141
69,100	tricosano	2,34	2251
75,147	pentacosano	3,87	2393
82,934	septacosano	4,85	2577
93,102	alcano	3,70	2816
98,842	alcano	2,10	2951
106,514	alcano	3,29	3131
Teor de monoterpenos		2,10	
Teor de sesquiterpenos		3,62	
Teor de sesquiterpenos oxigenados		2,62	
Teor de diterpenos		0,58	
Teor de alcoóis		21,41	
Teor de aldeídos		18,49	
Teor de ésteres		3,82	
Teor de éteres		1,50	
Teor de cetonas		6,03	
Teor de alcanos		21,57	

*Tempo de retenção

** Índice de Kovats calculado

Tabela 11: Componentes do óleo essencial da folha da *Vernonia brasiliiana*

Tr* (min)	Composto	%(DIC)	IK**
7,978	hex-3-en-1-ol	2,68	814
8,325	hexan-1-ol	0,71	822
11,421	<i>alfa</i> -pineno	1,02	895
13,184	sabineno	0,92	937
13,451	<i>beta</i> -pineno	0,82	943
14,390	acetato de hex-3-en-1-ol	0,59	965
24,543	safranal	0,96	1204

28,677	tridec-1-eno	2,49	1301
31,711	1,1,3-trimetil-cicoundecano	3,75	1372
33,375	<i>alfa</i> -copaeno	2,39	1411
33,894	<i>beta</i> -bourboneno	4,30	1424
35,671	<i>trans</i> -cariofileno	8,69	1465
35,900	<i>beta</i> -gurjuneno	0,61	1471
37,128	<i>alfa</i> -humuleno	4,79	1500
37,443	alo-aromadendreno	2,05	1507
37,940	<i>gama</i> -gurjuneno	0,81	1519
38,425	germacreno D	10,41	1530
38,741	isômero do E,E- <i>alfa</i> -farneseno	1,08	1538
39,026	biciclogermacreno	6,07	1544
39,878	<i>delta</i> -cadineno	1,89	1564
40,596	tridec-11-in-1-ol	2,04	1581
41,386	n.i.	0,63	1600
42,547	espatulenol	5,72	1627
42,853	óxido de cariofileno	4,70	1634
43,173	salvial-4(14)-en-1-ona	0,61	1642
43,649	sesquiterpeno oxigenado	1,01	1653
43,879	epóxido de humuleno II	1,13	1658
44,384	sesquiterpeno oxigenado + 1,10-diepi-cubenol	0,91	1670
44,733	sesquiterpeno oxigenado	0,69	1678
44,917	epoxi-alo-aromadendreno + tau-muurolol + <i>alfa</i> -muurolol	3,19	1683
45,503	<i>alfa</i> -cadinol	2,25	1697
46,189	<i>trans</i> -hexadec-14-en-1-al	4,20	1713
46,868	eudesma-4(15),7-dien-1-beta-ol	2,48	1729
47,096	pentadecanal	1,39	1734
47,220	n.i.	0,61	1737
48,624	octadec-1-eno	2,70	1770
53,155	n.i.	0,74	1876
56,200	ácido palmítico	5,24	1948
62,424	ácido linolênico	2,73	2094
Teor de monoterpenos		3,72	
Teor de sesquiterpenos		43,09	
Teor de sesquiterpenos oxigenados		22,63	
Teor de aldeídos		5,59	
Teor de alcoóis		5,43	
Teor de ésteres		0,59	
Teor de ácidos carboxílicos		7,97	
Teor de alcanos		6,24	
Teor de alcenos		2,70	

*Tempo de retenção

** Índice de Kovats calculado

Os resultados apresentados nas Tabelas 9, 10 e 11 indicam que os óleos possuem uma vasta diversidade de compostos. Na Tabela 9 aponta como sendo os compostos majoritários do óleo essencial da raiz, o modheph-2-eno (9,22 %), *alfa*-isocomeno (16,36%), cipereno (10,20%), *beta*-isocomeno (10,93%) e *beta*-cariofileno (11,15%). Para o óleo essencial da flor a Tabela 10 indica como majoritários o ácido palmítico (8,36 %), hex-2-en-1-ol (6,11%), o hexan-1-ol (4,24%) e septacosano (4,85%). No óleo essencial da folha, os resultados da Tabela 11 demonstram como compostos majoritários o *trans*-cariofileno (8,69%), germacreno D (10,41%), biciclogermacreno (6,07%), espatulenol (5,72%) e ácido palmítico (5,24%).

Dentre os compostos majoritários destacam-se o *alfa*-isocomeno, *beta*-isocomeno, o modheph-2-eno e o cipereno que são pouco encontrados na natureza (MARÍN, 2011; CHAUHAN et al., 2011). Estudos já revelaram que o óleo essencial da raiz da *Chrysactinia mexicana*, que possui como compostos majoritários o *alfa*-isocomeno e o modheph-2-eno apresentaram atividade antimicrobiana contra *Streptococcus pneumoniae* (CAMPOS et al., 2011). Desta forma, o óleo essencial da raiz da *Vernonia brasiliiana* pode ser considerado um antimicrobiano promissor contra *Streptococcus pneumoniae*.

Analisando a Tabela 9 que apresenta os compostos do óleo essencial da raiz da *Vernonia brasiliiana* observa-se que 85% dos compostos encontrados são sesquiterpenos. Já para os constituintes da flor presentes (Tabela 10) destacam-se os alcoóis com 21,41%, alcanos com 21,57% e aldeídos com 18,49%. Para o óleo essencial da folha (Tabela 11) se sobressai os teores dos sesquiterpenos com 43,09% e sesquiterpenos oxigenados 22,63%. Se comparado com as folhas da *Vernonia remotiflora* que possui um teor total de sesquiterpenos de 92 % dos constituintes (MAIA et al., 2010), o teor de sesquiterpenos totais da *Vernonia brasiliiana* (65,72%) é relativamente inferior.

A composição química do óleo essencial da folha da *Vernonia brasiliiana* já foi estudada previamente por Maia e colaboradores (2010). Adotando 1,1% área como mínima de corte para comparar as duas identificações, observa-se a presença de vários compostos não encontrados por Maia e colaboradores (2010), além de outros compostos abaixo da faixa de corte, também encontrados (Tabela 12).

Tabela 12: Comparação dos óleos essenciais da folha da *Vernonia brasiliiana*

Composto	* <i>V. brasiliiana</i> (%)	** <i>V. brasiliiana</i> (%)
hex-3-en-1-ol	2,68	-
hexan-1-ol	0,71	-
<i>alfa</i> -pineno	1,02	2,8
sabineno	0,92	-
<i>beta</i> -pineno	0,82	-
acetato de hex-3-en-1-ila	0,59	-
safranal	0,96	-
tridec-1-eno	2,49	-
1,1,3-trimetil-cicoundecano	3,75	-
<i>alfa</i> -copaeno	2,39	5,2
<i>beta</i> -bourboneno	4,30	-
<i>trans</i> -cariofileno	8,69	36,7
<i>beta</i> -gurjuneno	0,61	-
<i>alfa</i> -humuleno	4,79	11,7
alo-aromadendreno	2,05	1,7
<i>gama</i> -gurjuneno	0,81	-
germacreno D	10,41	35,5
isômero do E,E- <i>alfa</i> -farneseno	1,08	-
biciclogermacreno	6,07	1,1
<i>delta</i> -cadineno	1,89	1,5
tridec-11-in-1-ol	2,04	-
espatulenol	5,72	-
óxido de cariofileno	4,70	-
salvial-4(14)-en-1-ona	0,61	-
sesquiterpeno oxigenado	1,01	-
epóxido de humuleno II	1,13	-
sesquiterpeno oxigenado + 1,10-diepi-cubenol	0,91	-
epoxi-alo-aromadendreno + tau-muurolol + <i>alfa</i> -muurolol	3,19	-
<i>alfa</i> -cadinol	2,25	-
<i>trans</i> -hexadec-14-en-1-al	4,20	-
eudesma-4(15),7-dien-1-beta-ol	2,48	-
pentadecanal	1,39	-
octadec-1-eno	2,70	-
ácido palmítico	5,24	-
ácido linolênico	2,73	-

*Porcentagem por CG-DIC para óleo essencial da *Vernonia brasiliiana* identificada neste trabalho.

** Porcentagem por CG-DIC para óleo essencial da *Vernonia brasiliiana* identificada no trabalho de MAIA et al., 2010.

Ao comparar o óleo essencial das folhas da *Vernonia brasiliiana* com o da *Vernonia remotiflora* (MAIA et al., 2010), foram identificados os seguintes compostos em comum com suas respectivas porcentagens: *alfa*-pineno (1,02% e 0,1%), *beta*-pineno(0,82% e 0,7%), *alfa*-

copaeno (2,39% e 1,6%), *beta*-bourboneno (4,3% e 0,8%), *trans*-cariofileno (8,69% e 42,2%), *alfa*-humuleno (4,79% e 7,9%), alo-aromadendreno (2,05% e 2,9%), germacreno D (10,41% e 4,06%), biciclogermacreno (6,07% e 20,00%) e o óxido de cariofileno (4,70% e 3,8%). Nestas duas espécies o biciclogermacreno e o *trans*-cariofileno foram os compostos majoritários. Nas folhas de *Vernonia brasiliana* foram encontrados três monoterpenos que também estão presentes na composição do óleo das folhas da *Vernonia amygdalina*, o *alfa*-pineno, sabineno e beta-pineno, sendo estes encontrados com maior porcentagem na *Vernonia amygdalina* com valores de 4,93%, 2,79% e 14,54%, respectivamente. Na *Vernonia brasiliana* suas porcentagens foram de 1,02%, 0,92% e 0,82%, respectivamente (HASSANALI & ASAWALAM, 2006).

As espécies *Vernonia scorpiodes* e *Vernonia brasiliana* apresentaram na composição dos óleos essenciais da folha alguns composto em comum, o *alfa*-copaeno (3,1% e 2,39%), *beta*-bourboneno (0,5% e 4,3%), *trans*-cariofileno (30,6% e 8,69%), *alfa*-humuleno (3,1% e 4,79%), alo-aromadendreno (2,7% e 2,05%), germacreno D (27,3% e 10,4%), biciclogermacreno (8,5% e 6,07%), óxido de cariofileno (2,4% e 4,7%) e *alfa*-cadinol (0,9% e 2,25%) (SILVEIRA et al., 2007). Estas duas espécies apresentaram como compostos majoritários o *trans*-cariofileno, germacreno D e o biciclogermacreno, sendo que os três são encontrados na *Vernonia scorpiodes* com teores superiores ao da *Vernonia brasiliana*.

Não foram encontrados na literatura estudos da análise de óleos essenciais de raízes e flores de *Vernonia brasiliana* e nem de outras espécies de *Vernonia* para que pudesse comparar.

4.8. Teste da atividade antimicrobiana

Experimentos prévios conduzidos apenas com DMSO e as amostras bacterianas, mostraram que tanto *Escherichia coli* quanto *Staphylococcus aureus* são capazes de se multiplicar normalmente em concentração superiores a 10% de DMSO. Sendo assim, as amostras de extratos etanólicos e os óleos essenciais da *Vernonia brasiliana*, foram dissolvidos em DMSO de maneira que a solução final testada não superasse 10% de DMSO.

Nas Tabelas 13 a 18 são apresentados os resultados das seis amostras testadas (três extratos etanólicos e três óleos essenciais da *Vernonia brasiliana*). Para os extratos, a concentração máxima testada foi de 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para os óleos essenciais a concentração máxima foi 2048 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A escolha de concentrações mais altas de óleo essencial, comparado com o a extratos etanólicos foi tomada em decorrência da literatura científica mostrar em diversos

momentos que os óleos essenciais só possuem atividades antimicrobianas em concentrações bastante elevadas (PRABUSEENIVASAN et al., 2006; CHANTHAPHON et al., 2007; SANTURIO et al., 2011).

Na Tabela 13 são mostrados os resultados condensados dos testes com o extrato etanólico da flor de *Vernonia brasiliiana*. Foi de fácil verificação o crescimento bacteriano mesmo na presença das mais altas concentrações testadas ($512 \mu\text{g mL}^{-1}$), indicando resistência ao preparado etanólico dessa flor.

Tabela 13: Avaliação pela técnica de CIM do extrato etanólico da flor de *Vernonia brasiliiana*

Microrganismo Padrão	Concentrações em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato etanólico de flor de <i>Vernonia brasiliiana</i>										Controle			
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	A	B	C	D
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-		+

+: Crescimento bacteriano evidente;

-: Ausência de crescimento bacteriano evidente

Controle A: BHI + Amostra; B: BHI + DMSO; C: BHI + DMSO + *S. aureus*; D: BHI + DMSO + *E. coli*

Na Tabela 14 são apresentados os resultados dos testes com o extrato etanólico da folha de *Vernonia brasiliiana*. Tanto as bactérias *S. aureus* como as *E. coli* cresceram em todas as concentrações dos extratos etanólicos da folha.

Tabela 14: Avaliação pela técnica de CIM do extrato etanólico da folha de *Vernonia brasiliiana*

Microrganismo Padrão	Concentrações em $\mu\text{g mL}^{-1}$ extrato etanólico de folha de <i>Vernonia brasiliiana</i>										Controle			
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	A	B	C	D
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-		+

+: Crescimento bacteriano evidente;

-: Ausência de crescimento bacteriano evidente

Controle A: BHI + Amostra; B: BHI + DMSO; C: BHI + DMSO + *S. aureus*; D: BHI + DMSO + *E. coli*

A Tabela 15 apresenta a análise do extrato etanólico obtido da raiz da planta. A raiz é um dos órgãos da planta que mais pode ser afetada por estresses físicos, químicos e biológicos. E é por este estresse que a planta pode desencadear um sistema de defesa bioquímica capaz de alterar sua composição química produzindo componentes antimicrobianos (GLEBA et al., 1999). No entanto, no presente estudo, nenhuma das 10 concentrações testadas do extrato etanólico de raiz foi eficiente em impedir a multiplicação das bactérias.

Tabela 15: Avaliação pela técnica de CIM do extrato etanólico da raiz de *Vernonia brasiliiana*

Microrganismo Padrão	Concentrações em $\mu\text{g mL}^{-1}$ extrato raiz de folha de <i>Vernonia brasiliiana</i>										Controle			
	1	2	4	8	16	32	64	128	256	512	A	B	C	D
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-		+

+: Crescimento bacteriano evidente;

-: Ausência de crescimento bacteriano evidente

Controle A: BHI + Amostra; B: BHI + DMSO; C: BHI + DMSO + *S. aureus*; D: BHI + DMSO + *E. coli*

As Tabelas 16, 17 e 18 apresentam as atividades anti-estafilococos e anti-escherichia dos óleos essenciais de flor, folha e raiz, respectivamente.

Em decorrência da turvação do caldo BHI pela adição dos óleos essenciais, a leitura dos resultados pela técnica de CIM foi comprometida. Foi necessário utilizar a metodologia de CBM para a obtenção de resultados confiáveis.

Tabela 16: Avaliação pela técnica de CIM do óleo essencial da flor de *Vernonia brasiliiana*

Microrganismo Padrão	Concentrações em $\mu\text{g mL}^{-1}$ óleo essencial de flor de <i>Vernonia brasiliiana</i>										Controle			
	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	A	B	C	D
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-		+

+: Crescimento bacteriano evidente;

-: Ausência de crescimento bacteriano evidente

Controle A: BHI + Amostra; B: BHI + DMSO; C: BHI + DMSO + *S. aureus*; D: BHI + DMSO + *E. coli*

Tabela 17: Avaliação pela técnica de CIM do óleo essencial da folha de *Vernonia brasiliiana*

Microrganismo Padrão	Concentrações em $\mu\text{g mL}^{-1}$ óleo essencial de folha de <i>Vernonia brasiliiana</i>										Controle			
	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	A	B	C	D
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-		+

+: Crescimento bacteriano evidente;

-: Ausência de crescimento bacteriano evidente

Controle A: BHI + Amostra; B: BHI + DMSO; C: BHI + DMSO + *S. aureus*; D: BHI + DMSO + *E. coli*

Tabela 18: Avaliação pela técnica de CIM do óleo essencial da raiz de *Vernonia brasiliiana*

Microrganismo Padrão	Concentrações em $\mu\text{g mL}^{-1}$ óleo essencial de raiz de <i>Vernonia brasiliiana</i>										Controle			
	4	8	16	32	64	128	256	512	1024	2048	A	B	C	D
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-		+

+: Crescimento bacteriano evidente;

-: Ausência de crescimento bacteriano evidente

Controle A: BHI + Amostra; B: BHI + DMSO; C: BHI + DMSO + *S. aureus*; D: BHI + DMSO + *E. coli*

Em todos os óleos testados, a leitura dos resultados pela metodologia de CIM pareceu indicar uma redução no crescimento bacteriano em comparação ao controle de crescimento.

No entanto, quando as amostras foram submetidas à CMB constatou-se que houve multiplicação das duas bactérias testadas.

Deve-se destacar o resultado da atividade antimicrobiana com a bactéria *S. aureus* para o óleo essencial da folha, que apresentou resultado negativo, mas em estudo previamente realizado por Maia e colaboradores (2010) foi constatado a inibição do crescimento da *S. aureus* com uma concentração de 100 µg mL⁻¹.

4.9. Teste da Atividade Antiprotozoária e Atividade Citotóxica

Os resultados CE₅₀ das atividades antiprotozoária e citotóxica das amostras de óleo essencial e extrato da *Vernonia brasiliensis* foram obtidos a partir dos gráficos de viabilidade celular (Tabela 19 e 20).

Tabela 19: Resultados da atividade antiprotozoária para os óleos e extratos da folha, flor e raiz da *Vernonia brasiliensis*.

Amostras	CE ₅₀ (µg mL ⁻¹)	CE ₅₀ (µg mL ⁻¹)
	<i>Trypanosoma cruzi</i>	<i>Leishmania amazonensis</i>
Extrato da folha	84	150
Extrato da flor	346	292
Extrato da raiz	>512	>512
Óleo essencial da folha	211	210
Óleo essencial da flor	174	191
Óleo essencial da raiz	101	239

Tabela 20: Resultados da atividade citotóxica para os óleos e extratos da folha, flor e raiz da *Vernonia brasiliensis*.

Amostras	CE ₅₀ (µg mL ⁻¹)	CE ₅₀ (µg mL ⁻¹)
	Célula Vero	Célula RAW 264.7
Extrato da folha	57	126
Extrato da flor	349	220
Extrato da raiz	>512	>512
Óleo essencial da folha	378	406
Óleo essencial da flor	321	530
Óleo essencial da raiz	434	404

Analisando a Tabela 19 conclui-se que entre os extratos testados o da folha destaca-se com a melhor atividade contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*, pois seu CE₅₀ é menor que as demais partes. Isto significa que é necessária uma menor concentração para se

inibir 50% dos parasitas em teste. Entre os óleos essenciais o da raiz apresentou melhor atividade anti-trippanossoma e o que demonstrou maior atividade anti-leishmania foi o óleo essencial da flor.

A Tabela 20 mostra os resultados de citotoxicidade dos extratos e dos óleos essenciais. Entre os extratos destaca-se o da folha como sendo o mais tóxico, pois possui menor valor de CE_{50} , isto indica que a uma baixa concentração consegue-se inibir 50% das células. O extrato da raiz apresentou a menor toxicidade entre os extratos testados. Para os óleos essenciais o da flor demonstrou ser o mais tóxico para a célula Vero e o da raiz o mais tóxico para a célula RAW.

Ao se relacionar os valores de CE_{50} das Tabelas 19 e 20 observa-se que os extratos não apresentaram resultados promissores para nenhuma atividade antiprotozoária, isto é justificado pelo fato das amostras apresentarem toxicidade com concentrações inferiores aos da atividade antiprotozoária. Já os óleos essenciais apresentaram resultados promissores contra os dois protozoários testados, pois além dos valores de CE_{50} serem baixos, sua toxicidade se dá a uma concentração muito alta, validando a atividade.

Comparando a atividade contra *Leishmania amazonensis* o extrato etanólico da folha da *Vernonia brasiliiana* apresenta CE_{50} maior que o do extrato metanólico da folha da *Vernonia polyanthes* (CE_{50} 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (COIMBRA et al., 2007). Portanto, a *Vernonia brasiliiana* apresenta menor atividade anti-leishmania.

Quando se analisa na Tabela 19 observa-se que o extrato etanólico da folha da *Vernonia brasiliiana* possui menor atividade contra *Trypanossoma cruzi* do que os extratos metanólicos das folhas da *Vernonia leopoldii* (CE_{50} 9,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (MATHEEUSSEN et al., 2012) e a *Vernonia schimperi* (CE_{50} 38,47 $\mu\text{g mL}^{-1}$) (ABEDEL-SATTAR et al., 2010).

Não foram encontrados estudos que relatam a atividade do óleo essencial de espécies do gênero *Vernonia* contra o *Trypanossoma cruzi* e a *Leishmania amazonensis*, para que se possam comparar os resultados.

5. Conclusões

Os extratos etanólicos da folha, flor e raiz da *Vernonia brasiliiana* apresentaram um teor de compostos fenólicos superior aos de outros espécimes de *Vernonia* já estudadas. Os extratos das folhas e das flores demonstraram possuir atividades antioxidantes muito próximas pelo método do DPPH. Este fato foi evidenciado também na análise dos extratos por voltametria de pulso diferencial, em que indicou concentrações aproximadas de compostos antioxidantes entre os dois extratos.

Na identificação dos compostos voláteis dos óleos da folha, flor e raiz da *Vernonia brasiliiana*, encontrou-se uma vasta variedade de compostos. Ao comparar a identificação do óleo da folha com a literatura, deparou-se com vários compostos que ainda não foram relatados na composição da folha.

As atividades antimicrobianas para os óleos e os extratos da folha, flor e raiz da *Vernonia brasiliiana* não apresentaram nenhum resultado positivo contrariando o estudo já publicado que demonstra atividade promissora para o óleo da folha de *Vernonia brasiliiana* frente ao *Staphylococcus aureus*.

Os extratos da *Vernonia brasiliiana* não apresentaram resultados significativos em relação à atividade antiprotozoária, pois foram tóxicos nas concentrações em que apresentaram atividade anti-tripanosossoma e anti-leishmania.

Os três óleos apresentaram atividade contra o *Trypanosoma cruzi* e a *Leishmania amazonensis*, já que não apresenta toxicidade nestas concentrações. Estes resultados abrem a oportunidade da busca de compostos com princípios ativos para o tratamento da doença de Chagas e da Leishmaniose em estudos futuros.

Diante dos resultados principalmente para atividade antioxidante, estudos posteriores poderão ser realizados com os extratos. Além de novos testes biológicos, em busca de compostos ativos contra organismos patogênicos.

6. Referências Bibliográficas

- ABE, L. T.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M.; MOTA, R. V. Compostos fenólicos e capacidade antioxidante de cultivares de uvas *Vitis labrusca* L. e *Vitis vinifera* L. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 394-400, 2007.
- ABEDEL-SATTAR, E.; MAES, L.; SALAMA, M. M. In vitro activities of plant extracts from Saudi Arabia against malaria, leishmaniasis, sleeping sickness and chagas disease. **Phytotherapy Research**, v. 24, p. 1322-1328, 2010.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/ quadrupole mass spectroscopy**. Carol Stream, USA, Allured Publishing Corporation, p. 456. 2001.
- ALIYU, A. B.; MUSA, A. M.; OYEWALE, A. O.; IBRAHIM, M. A.; BULUS, T. Phenolics content and antioxidant capacity of extracts and fractions of *Vernonia blumeoides* (Asteraceae). **International Journal of Biological Chemistry**, v. 5, n. 6, p. 352-359, 2011.
- ALVES, A. A.; MACEDO, D. V.; KUBOTA, L. T.; GANDRA, P. G. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 980-985, 2004.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substrato orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010.
- ALVES, G. A. D.; SOUSA, O. V. Atividade biológicas dos extratos das folhas de assa-peixe (*Vernonia polyanthes* Less. – Asteraceae). In: XV Seminário de Iniciação Científica. **Anais**. Juiz de Fora, 2010.
- ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Química Nova na Escola**, n. 3, p. 10-15, 2001.
- AMEEN, M.; Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clinical and experimental dermatology**, v. 35, n. 7, p. 699–705, 2010.
- AMORIM, E. L. C.; ARAÚJO, E. L.; MONTEIRO, J. M.; ALBUQUERQUE, U. P. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.
- ANDRADE, B. S. B.; VILELLA, T.; MELLO, U.; NORD, N.; SILVA, F. A. C.; REIS, S. L. A. Plantas medicinais e tóxicas. In: III Simpósio sobre recursos naturais e socioeconômicos do pantanal. **Anais**, Corumbá, 2000.
- ANDRADE, N. J.; DIAS, I.; PINHEIRO, A. L.; MONTANARI, R. M.; DEMUNER, A. J.; BARBOSA, L. C. A. ; SILVA, C. J. Chemical composition and antibacterial activities from the essential oils of Myrtaceae species planted in Brazil. **Química Nova**, v. 33, v. 1, 2010

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

ARIAS, A. R.; INCHAUSTI, A.; FOURNET, A.; FERRO, E.; RODRIGUEZ, E.; ASCURRA, M.; ACOSTA, N. Mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some Paraguayan Asteraceae. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 45, p. 35-41, 1995.

BERSET, C.; CUVELIER, M. E.; BRAND-WILLIAMS, W. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BILATE, A. M.; CUNHA-NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: current concepts of an old disease. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.50, n.2, p.67-74, 2008.

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.

CAMPOS, B. M. G.; CIRIO, A. T.; GALINDO, V. M. R.; ARANDA, R. S.; TORRES, N. W.; PÉREZ-LÓPEZ, L. A. Activity against *Streptococcus pneumoniae* of the essential oil and 5-(3-buten-1-ynyl)-2,2'-bithienyl isolated from *Chrysactinia mexicana* roots. **Natural Product Communications**, v. 6, n. 7, p. 1035-1043, 2011.

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 Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, 17-35, 2007.

CASTRO, H. G.; FERREIRA, F. A.; SILVA, D. J. H.; MOSQUIM, P. R. **Contribuição ao estudo das plantas medicinais metabólitos secundários**, 2.ed., p. 113, 2004.

CHANTHAPHON, S.; CHANTHACHUM, S.; HONGPATTARAKERE, T. Antimicrobial activities of essential oils and crude extracts from tropical Citrus spp. against food-related microorganisms. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, v. 30, p. 125-131, 2008.

CHAUHAN, A.; YADAV, A.; CHANDAN, S. C.; VERMA, R. S.; PADALIA, R. C. Chemical investigation of the root essential oil of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertonii. **Current Bioactive Compounds**, v. 7, n. 4, p. 281-286, 2011.

CLSI. *Clinical and Laboratory Standards Institute Quality Manual; Third Edition*. M100-S18. Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. **2006**. Disponível em: <<http://www.clsi.org/Content/NavigationMenu/Resources/QualityManualThirdEdition.pdf>> Acesso em: 30 de abril. 2010.

COIMBRA, E. S.; SCIO, E.; BRAGA, F. G.; MOREIRA, F. O.; MATOS, M. O.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, p. 396-402, 2007.

CRUZ, A. S. **Teste de citotoxicidade *in vitro* como alternativa ao teste *in vivo* de Draize na avaliação de produtos cosméticos**. 2003. 107 p. Tese (Doutorado em Ciência Farmacêutica) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

DOUTRA, L. B.; SCIO, E.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; NOGUEIRA, M. S. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família da Asteraceae. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n.2, p. 183-189, 2011.

EVALDT, A. C. P.; CANCELLI, R. R.; BAUERMANN, S. G. Contribuição à morfologia da família Asteraceae martinov. no Rio Grande do Sul. **Pesquisas Botânica**, n. 58, 347-374, 2007.

FERRI, P. H. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: DI STASI, L.C. **Plantas medicinais: arte e ciência – um guia de estudo interdisciplinar**. São Paulo: Fundação Editora Unesp, 1996. Cap.10, p. 129-156.

FILIZOLA, L. R. S. **Estudo farmacognóstico de *Vernonia brasiliiana* (L.) Druce (Asteraceae) e determinação de sua atividade biológica**. 2003. Dissertação (Mestrado em Ciência Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

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

FRANCO, M. R. B.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; LANÇAS, F. M. Compostos voláteis de três cultivares de manga (*Mangifera indica* L.). **Ciência Tecnologia de Alimentos**, v. 24, n. 2, p. 165-169, 2004.

FREIRE, C.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARROS, L.; VILAS-BOAS, M.; BAPTISTA, P.; FALCÃO, S. Antioxidant activity of *Agaricus sp.* mushrooms by chemical, biochemical and electrochemical assays. **Food Chemistry**, v. 111, p. 61-66, 2008.

GASPARRI, S. **Estudo das atividades antioxidante e mutagênica/antimutagênica induzidas pelo extrato vegetal da *Costus spicatus***. 2005. 79 p. Dissertação (Mestrado em Diagnóstico Genético e Molecular) – Universidade Luterana do Brasil, Canoas.

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**, v. 28, n. 6, p. 949-953, 2009.

GLEBA, D.; BORISJUK, N. V.; BORISJUK, L. G.; KNEER, R.; POULEV, A.; SKARZHINSKAYA, M.; DUSHENKOV, S.; LOGENDRA, S.; GLEBA, Y. Y.; RASKIN, A. I. Use of plant roots for phytoremediation and molecular farming. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 96, n. 11, 1999.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v.30, n. 2, 374-381, 2007.

- 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**, v. 99, p. 103-107, 2006.
- HASSANALI, A.; ASAWALAM, E. F. Constituents of the essential oil of *Vernonia amygdalina* as maize weevil protectants. **Tropical and Subtropical Agroecosystems**, v. 6, n. 2, p. 95-102, 2006
- HATTORI, E. K. O.; NAKAJIMA, J. N. A família Asteraceae na Estação de Pesquisa e Desenvolvimento Ambiental Galheiro, Perdizes, Minas Gerais, Brasil. **Rodriguésia**, v. 59, n. 4, p. 687-749, 2008.
- HATTORI, E. K. O. **Asteraceae da Estação Ecológica do Panga, Uberlândia, Minas Gerais**. 2009. 169 p. Dissertação (Mestrado em ecologia e conservação de recursos naturais) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.
- HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002.
- HUANG, T.; HAGEMAN, M. J.; GAO, P. Rapid screening of antioxidants in pharmaceutical formulation development using cyclic voltammetry – potential and limitations. **Current Drug Discovery Technologies**, v. 1, n. 2, p. 1570-1638, 2004.
- JACOBSON, T. K. B.; GARCIA, J.; SANTOS, S. C.; DUARTE, J. B.; FARIAS, G. J.; KLIEMAN, H. J. Influência de fatores edáficos na produção de fenóis totais e taninos de duas espécies de barbatimão (*Stryphnodendron spp.*). **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 35, n. 3, p. 163-169, 2005.
- JARDINI, F. A.; FILHO, J. M. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, n.1, p. 137-147, 2007.
- JAYAPRAKASHA, G. K.; SAKARIAH, K. K.; SINGH, R. P. Antioxidant of grape seed (*Vitis vinifera*) extract on peroxidation models in vitro. **Food Chemistry**, n. 73, 285-290, 2001.
- JESUS, A. M. **Saberes Populares em Plantas Medicinais**. Rio de Janeiro: Centro Universitário Augusto Motta, 2008.
- KING, S. R. The Source of our cures: A new pharmaceutical company wants to provide reciprocal benefits and recognize the value of indigenous. **Cultural Survival Quarterly**, v. 15, n. 3, p. 19-22, 1991.
- KOELLA, J. C.; HUBER, W. A comparison of three methods of estimating EC₅₀ in studies of drug resistance of malaria parasites. **Acta Tropica**, v. 55, p. 257-261, 1993.
- LEITE, G. B. **Análise de portadores assintomáticos de *Staphylococcus aureus* no Hospital Universitário de Brasília**. 2008. 102 p. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília.

LUGÃO, A. B.; CRUZ, A. S.; ROGERO, S. O.; IKEDA, T. I. Teste *in vitro* de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V.M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1, p. 33-39, 2008.

MAIA, A. I. V.; SOUZA, E. B.; MENEZES, J. E. S. A.; TORRES, M. C. M.; CAVALCANTE, M. G. B.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; PESSOA, O. D.; COSTA, S. M. O.; NOGUEIRA, V. L. R.; MELO, V. M. O. Óleos essenciais das folhas de *Vernonia remotiflora* e *Vernonia brasiliensis*: composição química e atividade biológica. **Química Nova**, v. 33, n. 3, 584-586, 2010.

MARÍN, L. U. R. Riqueza química del género Stevia. **Revista Latinoamericana de Química**, v. 38, p. 5, 2011.

MESSERSCHMIDT, A.; MAES, L.; AL-MUSAYEIB, N. M.; COS, P.; MOTHANA, R. A. In vitro antiplasmodial, antileishmanial and antitrypanosomal activities of selected medicinal plants used in the traditional Arabian Peninsular region. **BioMed Central Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n.1, 2012.

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

MESSERSEHMIDT, I.; PERALTA-ZAMORA, P.; GALLICE, W. C. Caracterização espectroscópica multivariada do potencial antioxidante de vinhos. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 397- 403, 2011.

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

MURRAY, H.W.; BERMAN, J.D.; DAVIES, C.R.; SARAVIA, N.G. Advances in leishmaniasis. **The Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561-1577, 2005.

OLIVEIRA, A. C. **Capacidade antioxidante de farinhas de resíduos de frutas tropicais**. 2008. p. 88. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Alagoas, Maceió.

OLIVEIRA, J.; TRIGO, J. R.; ZOGHBI, M. G. B. Composição química dos óleos essenciais de *Hyptis suaveolens* (L.) Poit.: uma espécie de ocorrência natural no nordeste paraense. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 89, n. 1, p. 6-9, 2008.

OWOLABI, M. A.; OLATUNJI, J. O.; OYEKANMI, O. O.; JAJA, S. I. Evaluation of the antioxidant activity and lipid peroxidation of the leaves of *Vernonia amygdalina*. **Journal of Complementary and Integrative Medicine**, v. 5, n. 1, p. 1-17, 2008.

- PELL, A. N.; MBUGUA, D. M.; SCHOFIELD, P. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, p. 21-40, 2001.
- PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M.; JUNIOR, V. F. V. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.
- PINTO, A. S.; LOPES, R. M.; OLIVEIRA, T. T.; NAGEM, T. J. Flavonóides. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 17, p. 18-22, 2000.
- 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.
- PRABUSEENIVASAN, S.; JAYAKUMAR, M.; IGNACIMUTHU, S. In vitro antibacterial activity of some plant essential oils. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n. 36, 2006.
- RANGEL, E. F.; LAINSON, R. Ecologia das leishmanioses. In: RANGEL, E. F.; LAINSON. **Flebotomíneos do Brasil**. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2003. p. 291-309.
- RANGEL, E. T. **Atividade antiprotzoária, antifúngica e citotóxica de extratos de plantas do bioma Cerrado, com ênfase em *Leishmania (Leishmania) chagasi***. 2010. 131 p. Tese (Doutorado em Ciência da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília.
- SAMPAIO, A. L. F.; SIANI, A. C.; HENRIQUES, M. G. M. O.; SOUSA, M. C.; RAMOS, M. F. S. Óleos essenciais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, n. 16, p. 38-43, 2000.
- SANTOS, A. C. M.; ZIDKO, A. C. M.; GALES, A. C.; PIGNATARI, A. C. C.; SILVA, R. M. A virulência de *Escherichia coli* patogênica extra-intestinal (ExPEC) em relação à idade e ao sexo do hospedeiro. **O Mundo da Saúde**, v. 33, n. 4, p. 392-400, 2009.
- SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2004, 5 ed., p.1102.
- SANTURIO, D. F.; SOARES, I. H.; VIÉGAS, J.; ROSSATTO, L.; POZZO, M. D.; COSTA, M. M.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos frente a *Staphylococcus spp* isolados de mastite caprina. **Ciência Rural**, v. 41, n. 4, 2011.
- SILVA, J. R. A.; ALCÂNTARA, J. M.; YAMAGUCHI, K. L.; JUNIOR, V. F. V. Composição química e atividade biológica dos óleos essenciais das folhas e caules de *Rhodostemonodaphne parvifolia* Madriñán (Lauraceae). **Acta Amazônica**, v. 40, n. 3, p. 567-572, 2010.
- SILVEIRA, E. R.; NUNES, E. P.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; PESSOA, O. D. L.; NASCIMENTO, R. F.; LEMOS, T. L. G. Chemical composition of the essential oil from *Vernonia scorpioides* (Asteraceae). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, p. 249-250, 2007.
- SOUSA, C. M. de M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; AYRES, C. C. COSTA, L. S.; ARAÚJO, D. S.; CALVACANTE, 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**, v. 30, n. 2, p. 351- 355, 2007.

XAVIER, C. A. C.; OPORTO, C. F. O.; SILVEIRA, I. A.; ABRANTES, M. R.; SILVA, M. P. Prevalência de *Staphylococcus aureus* em manipuladores de alimentos das creches municipais da cidade de Natal/RN. **Revista Brasileira de Análise Clínicas**, v. 39, n. 3, p. 165-168, 2007.

XAVIER, H. S.; FILIZOLA, L. R. S.; RANDAU, K. P.; PIMENTEL, R. M. M. Anatomia dos órgãos vegetativos de *Vernonia brasiliiana* (L.) Druce. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 22, n.4, 299-303, 2003.

WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M. E.; RASSI, A. Chagas disease (*American trypanosomiasis*): Its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil 92. São Paulo, Brazil: Editorial SBT Brazil; 1992. p. 103.

YOURS, A. H. N.; BEH, B. K.; ALITHEEN, N. B.; YEAP, S. K.; HO, W. Y.; LIANG, W. S. *In vitro* and *in vivo* antioxidant activity of *Vernonia amygdalina* water extract. **African Journal of Biotechnology**, v. 11, n. 17, p. 4090-4094, 2012.