

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção



DISSERTAÇÃO

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTES DO ÓLEO
ESSENCIAL DAS SEMENTES E EXTRATOS DE FOLHAS DA PLANTA**

***Myrocarpus frondosus* Allemão**

Ivandra Ignês de Santi

Pelotas, 2016

IVANDRA IGNÊS DE SANTI

**ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E ANTIOXIDANTES DO ÓLEO
ESSENCIAL DAS SEMENTES E EXTRATOS DE FOLHAS DA PLANTA
Myrocarpus frondosus Allemão**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção do centro de Ciências Química, Farmacêutica e de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciências (Bioquímica e Bioprospecção).

Orientador: Drº Rogério Antonio Freitag

Co-Orientador: Drº Darci Alberto Gatto

Pelotas, 2016

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S235a Santi, Ivandra Ignês de

Atividade antimicrobiana e antioxidantes do óleo essencial das sementes e extratos de folhas da planta *Myrocarpus frondosus* Allemão / Ivandra Ignês de Santi ; Rogério Antonio Freitag, orientador ; Darci Alberto Gatto, coorientador. – Pelotas, 2016.

59 f.

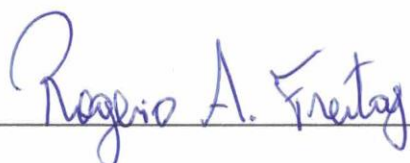
Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 2016.

1. *Myrocarpus frondosus* Allemão. 2. Antioxidantes. 3. Antimicrobianos. I. Freitag, Rogério Antonio, orient. II. Gatto, Darci Alberto, coorient. III. Título.

CDD : 574.192

A banca examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de mestrado intitulada **Atividade Antimicrobiana e Antioxidantes do óleo essencial das sementes e extratos de folhas da planta *Myrocarpus frondosus* Allemão**, de autoria de Ivandra Ignês de Santi.

Comissão Examinadora:



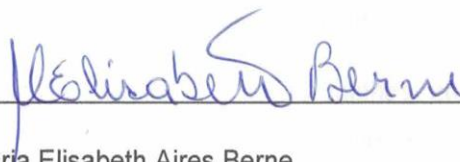
Prof. Drº Rogerio Antonio Freitag

Doutor em Química pela Universidade Federal de Santa Maria – UFSM



Prof. Drª Marlete Brum Cleff

Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal de Rio Grande-FURG



Prof. Drª Maria Elisabeth Aires Berne

Doutora em Parasitologia pela Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG

Dedico esse trabalho a minha família, pelo amor incondicional e principalmente pelo apoio na realização desse.

Aos meu pais, que mesmo distante sempre estiveram me apoiando em todas as minhas decisões.

As minhas irmãs que sempre estiveram presente e ao meu irmão pelo apoio e colaboração na coleta.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pois ele é minha fortaleza.

A minha família, Darci e Paola, pelo apoio, paciência e pelo entendimento na ausência dos últimos meses.

Ao professor Rogério Antonio Freitag, orientador, por ter acolhido como aluna da pós-graduação e por ter me dado a oportunidade, ensinamentos e a confiança na realização deste trabalho.

Ao professor Darci Alberto Gatto, co-orientador, por ter me incentivado sempre na realização desse.

À professora Miriam Galvão pela amizade, ensinamentos e por ter concedido seu laboratório para que pudesse desenvolver a parte experimental microbiológica.

À Patricia Bilhalva, pela amizade, e mesmo terminando o doutorado tirou um tempo para a realização de uma parte experimental no laboratório da Universidade do País Basco.

A meus pais e irmãos que sempre estiveram comigo em qualquer momento, sempre me apoiando e incentivando em todas as minhas decisões.

As Colegas de laboratório, Victoria, Suslin, Taiane, que nesses dois anos de convivência me deram a oportunidade de ter bons momentos e boas risadas, e além disso a amizade. As colegas de laboratório Claudia e Leticia, apesar do pouco tempo também estiveram presente para me ajudar.

Ao professor Paulo Romeu, pelas conversas, e pela demonstração de apoio e carinho nesse período.

Aos colegas de Pós, Silvana e Daniel que sempre estiveram à disposição para qualquer ajuda, e pela amizade.

A todos o meu Muito Obrigado.

RESUMO

SANTI, Ivandra Ignês. Atividade antimicrobiana e antioxidantes do óleo essencial das sementes e extratos de folhas da planta *Myrocarpus frondosus* Allemão. 2016. 59f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Bioprospecção. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, RS, Brasil.

A família Fabaceae é dividida em três subfamílias, entre elas a Faboideae da qual o *Myrocarpus frondosus* Allemão pertence. No Rio Grande do Sul é encontrada nas florestas do Alto Uruguai e Depressão Central. Na medicina popular utiliza-se partes da planta *Myrocarpus frondosus* Allemão para tratar feridas e contusões, como expectorante, e demais alterações do sistema respiratório, anti-inflamatório entre outros usos. Nesse contexto, o presente estudo tem como objetivo avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante dos extratos aquoso e etanólico das folhas e do óleo essencial das sementes, e caracterizar os compostos presentes nos extratos e óleo essencial dessa planta. O teste para a atividade antimicrobiana foi realizado por meio do método de microdiluição em caldo conforme o método CLSI (2003) com adaptações e a atividade antioxidante pelo método ABTS e o teor de compostos fenólicos. O delineamento da composição química dos extratos foi definido por meio de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/DAD) e o óleo essencial por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas (CG/MS). No teste de microdiluição em caldo o óleo, os extratos, e os padrões rutina e trans-cariofileno apresentaram inibição frente todas as bactérias testadas nas concentrações, 1mg/mL à 0,25mg/mL, exceto para *Staphylococcus aureus* na concentração 0,25mg/mL para o óleo essencial e o trans-cariofileno. Os resultados da Concentração Mínima Bactericida (CMB) o óleo essencial teve ação bactericida na concentração de 1mg/mL para todas as bactérias testadas e o trans- cariofileno na mesma concentração apenas para *Listéria monocytogenes*. Em relação a atividade antioxidante o óleo essencial apresentou maior capacidade de redução do radical livre de 40,92% e no Teor dos Compostos Fenólicos (TPC) o extrato etanólico apresentou maior concentração de 12,72%.

Palavras chaves: *Myrocarpus frondosus* Allemão; Antioxidante; Antimicrobiana.

ABSTRACT

SANTI, Ivandra Ignês. Antimicrobial and antioxidant activity of the essential oil from the seeds and leaves of the plant extracts *Myrocarpus frondosus* Allemão. 2016. 59f. Thesis (MA) - Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting Programme. Federal University of Pelotas, Pelotas, RS, Brazil.

The family Fabaceae it is divided into three subfamilies, among them Faboideae in which *Myrocarpus frondosus* Allemão belongs. In Rio Grande of Sul is found in the forests of the Upper Uruguay and Central Depression. In folk medicine it is used plant parts *Myrocarpus frondosus* Allemão to treat wounds and bruises, as an expectorant, and other lesions of the respiratory system, anti-inflammatory among other uses. In this context, the present study aims to evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of aqueous and ethanol extracts of leaves and the essential oil, and characterize the compounds present in the extracts and essential oil of this plant. The test for the antimicrobial activity was conducted by the microdilution broth method according to the CLSI method (2003) with adaptations and the antioxidant activity by ABTS method and the content of phenolic compounds. The design of the chemical composition of the extracts was determined by means of liquid chromatography of high efficiency (CLAE/DAD) and the essential oil by gas chromatography coupled to mass spectrum (CG/MS). In the broth microdilution test in the oil, extracts, and standards rutin and trans-caryophyllene were inhibited across all the bacteria tested in the concentrations 1 mg / ml to 0.25mg / ml, except for *S. aureus* at a concentration 0.25mg / mL for the essential oil and trans-caryophyllene. The results of Minimum Bactericidal Concentration (CMB) the essential oil had bactericidal activity at a concentration of 1mg / ml for all bacteria tested and trans-caryophyllene at the same concentration only for *Listeria monocytogenes*. Regarding the antioxidant activity essential oil showed greater free radical reducing capacity of 40.92% and the content of phenolic compounds (TPC) ethanol extract showed a higher concentration of 12.72%.

Keywords: *Myrocarpus frondosus* Allemão; Antioxidant; Antimicrobial

Lista de figuras

Figura 1	Regiões fisiográficas do rio grande do Sul, salientando os locais onde se encontra a planta <i>Myrocarpus frondosus</i> Allemão	16
Figura 2	Imagens referente a planta <i>Myrocarpus frondosus</i> Allemão	17
Figura 3	Estrutura principal do Nerolidol	17
Figura 4	Ciclo biossintético do metabolito secundário	19
Figura 5	Estrutura do isopreno e monoterpene	19
Figura 6	Estrutura do flavan-3,4-diol	21
Figura 7	Estrutura do ácido elágico	21
Figura 8	Estrutura básica dos flavonoides	22
Figura 9	Estrutura básica dos alcaloides	23
Figura10	Representação das membranas bacterianas G+ e G-	26

Lista de Abreviaturas e Siglas

ABTS	3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico
ATCC	American Type Culture Collection
BHA	Hidroxianisol butilado
BHT	Hidroxitolueno butilado
Cat	Catalase
CG/MS	Cromatografia gasosa acoplada ao Espectro de Massas
CLAE	Cromatografia líquida de alta eficiência
CLSI	Instituto de padronização clínico laboratorial, do inglês Clinical and Laboratory Standards Institute
CMB	Concentração Mínima Bactericida
DAD	Detector de arranjo de diodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2-difenil-1-picrilhidrazida
ESBL	Enzimas beta-lactamases de amplo espectro
FDA	Food and Drug Administration
FRAP	Poder Antioxidante redução do ferro
GPx	Glutathione peroxidase
GR	Glutathione reductase
Gram -	Gram negativo
Gram+	Gram positivo
HPLC	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês High Performance Liquid Chromatography
IPP	Ciclopentanoperhidrofenantreno
MFC	Concentração fungicida mínima, do inglês Minimum Fungicidal Concentration
MIC	Concentração inibitória mínima, do inglês Minimum Inhibitory Concentration
MRSA	<i>Staphylococcus aureus</i> resistente a meticilina, do inglês <i>Methicillin-resistant Staphylococcus aureus</i> .
NCLLS	National Committee for Clinical Laboratory Standards

OMS	Organização Mundial da Saúde
ORAC	Capacidade de Absorbância do Radical Oxigênio
OS	Stress Oxidativo
RNS	Espécies Reativas de Nitrogênio
ROS	Espécies Reativas de Oxigênio
Sod	Superóxido dismutase
TBHQ	Hidroquinona terc butilo
TPC	Teor Fenólicos Totais
TSB	Caldo Soja Trypticaseína
UV	Ultra violeta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 OBJETIVOS.....	14
2.1.Ojetivo Geral.....	14
2.2 Objetivos Especificos.....	14
3 REVISÃO DA LITERATURA.....	15
3.1 Família Fabaceae.....	15
3.2 Metabolismo Secundário das Plantas.....	18
3.2.1 Produtos da via do Mevalonato.....	19
3.2.2.Produtos derivados do Ácido Chiquímico.....	20
3.3 Antimicrobianos.....	23
3.4 Bactérias causadoras de doenças	25
3.5 Atividade Antioxidante.....	28
3.6 Compostos Fenólicos	30
4 ARTIGO.....	31
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	49
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais constituem a maior fonte farmacêutica que existe, e seu uso é tão antigo quanto a vida humana. Antes do século XIX, as plantas eram o principal recurso utilizado na medicina tradicional (MIRPOUR et al., 2015). O uso de substâncias derivadas de plantas, se destaca tanto como agente terapêutico, como matéria prima para síntese de medicamentos. Essa prática valorizada pelo mercado farmacêutico nacional, internacional na pesquisa e desenvolvimento de novos medicamentos. Da mesma forma, quando comparada aos produtos sintéticos, o uso dessas substâncias tem uma melhor relação custo/benefício com consequente, custo de produção e preço de venda mais acessíveis, além de, baixa toxicidade e menores efeitos colaterais, (BRASIL, 2006a; ANDRIO et al., 2010; SOUZA-MOREIRA, SALGADO e PIETRO, 2010; ETHUR et al., 2011; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2011; CORREA Jr., 2014).

Assim, na atualidade muitos cientistas de diferentes áreas estão avaliando medicamentos constituídos de substâncias extraídas das plantas devido a sua elevada eficácia contra agentes patogênicos e o seu uso já comprovado na medicina tradicional (MIRPOUR et al., 2015).

O uso generalizado de medicamentos, principalmente sem prescrição médica, vem levando a perda da eficácia de ação contra os micro-organismos patogênicos. Assim, Fabri (2011) descreve que plantas que apresentam atividade antimicrobiana são de extrema importância, tendo em vista que muitas bactérias apresentam resistência aos antimicrobianos de última geração.

Segundo Duarte (2014) além da atividade antimicrobiana tem-se buscado também novas fontes de antioxidantes obtidos a partir de produtos naturais. Da mesma forma, com o aumento da limitação à utilização de antioxidantes sintéticos, devido a sua toxicidade, mostrou que os compostos sintéticos como hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), hidroquinona terc-butilo (TBHQ) podem implicar em riscos para a saúde, que incluem tumor e a carcinogêneos (MOHDALY et al., 2010). Assim, o estudo científico tem centrado para a identificação de novos compostos antioxidantes provenientes de diferentes fontes como árvores, ervas e especiarias, entre outros (SOUZA et al., 2007; DZOVEM et al., 2014).

Segundo Calixto (2005) o Brasil tem destaque por apresentar o maior celeiro da biodiversidade do planeta, apresentando grande potencial para a pesquisa e desenvolvimento de novos produtos oriundos de plantas medicinais. Assim busca-se na natureza, plantas, com intuito de descobrir novos compostos com atividade antimicrobiana e antioxidante.

A planta *Myrocarpus frondosus* Allemão também conhecida popularmente como Cabreúva, é uma planta nativa, encontrada na floresta atlântica, utilizada na medicina para tratar feridas e contusões, como expectorante, e demais lesões do sistema respiratório, anti-inflamatório entre outros usos (DI STASI e HIRMA-LIMA, 2002; STASI et al., 2002).

Nesse contexto, percebe-se a importância das plantas da família Fabaceae, em especial da Cabreúva, para o desenvolvimento de novos medicamentos com atividade antimicrobiana e antioxidante, que são de extrema importância para a indústria farmacêutica e de alimentos.

2 OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial e extrato aquoso e etanólico da planta *Myrocarpus frondosus* Allemão.

Objetivos específicos

Identificar os compostos presentes no óleo essencial das sementes.

Identificar os compostos presentes no extrato aquoso e etanólico das folhas.

Avaliar a atividade antioxidante e o teor dos compostos fenólicos do óleo essencial e extratos aquosos e etanólico de folhas.

Atividade antimicrobiana do óleo essencial e dos extratos aquoso e etanólico frente a bactérias.

3 REVISÃO DE LITERATURA

Família Fabaceae

A Fabaceae é a maior família depois de Asteraceae e Orchidaceae e economicamente é superada apenas pela Apoaceae, possui 727 gêneros e cerca de 19.320 espécies. Ela é uma das famílias que possui as principais fontes de produção de proteína vegetal, na produção de óleos, resinas, perfumes, medicamentos, inseticidas e também madeiras com grande valor comercial no mundo (GUNN, 1984; JUDD, 1999; LEWIS et al., 2005).

No Brasil, essa família ocorre com cerca de 175 gêneros e 1500 espécies da Fabaceae (SOUZA; LORENZI, 2008). Sua distribuição é bastante ampla, encontrada nas zonas tropicais e subtropicais, estendendo-se nas regiões temperadas, e sua maior diversidade é encontrada nos trópicos americanos e africano (RIBEIRO et al., 1999; GASPER et al., 2015).

A família Fabaceae é dividida em três subfamílias: Mimosoideae, Caesalpinioideae e Faboideae (LEWIS et al., 2005). A subfamília Faboideae possui aproximadamente 478 gêneros e 13.800 espécies. Na região de clima temperado são comuns os gêneros herbáceos e nas regiões tropicais os gêneros das lenhosas. A subfamília Faboideae possuem folhas imparipinadas, trifolioladas ou unifolioladas, as flores diclamídeas, corola com prefloração imbricada descendente ou vexilar, dialipétala, estames geralmente em número duplo ao das pétalas, sendo frequentemente nove estames unidos entre si e um livre (androceu diadelfo) ou todos unidos (androceu monadelfo), não vistosos; sementes sem pleurograma, mas com hilo bem desenvolvido (SOUZA; LORENZI, 2008).

A planta *Myrocarpus frondosus* Allemão é uma das espécies que fazem parte da subfamília Faboideae. O gênero *Myrocarpus* foi descrito por Francisco Freire Allemão de Cysneiros em 1847, baseando na presença de flor regular, embrião reto e ocorrência de balsamo no fruto. Assim, o nome é implícito conforme seu prefixo grego "Myron" que significa óleo perfumado (STEARN, 1973). Esse gênero possui quatro espécies nativas (*M. frondosus*, *M. fastigiatus*, *M. leprosus*, *M. venezuelensis*) no Brasil, Paraguai, Argentina e Venezuela. No Brasil o *Myrocarpus frondosus* é distribuído desde o sul da Bahia até o Rio Grande do Sul (Figura 1). No estado do Rio Grande do Sul a planta é encontrada

em florestas estacionais do Alto Uruguai e Depressão Central, a bacia do rio Ibicuí e a submata dos pinhais até altitudes de 600 a 800 m. Prefere solos úmidos, no fundo de vales e base de montanhas. Fornece madeira pesada, resistente e de grande durabilidade, indicada para a construção civil e marcenaria (MARCHIORI, 1997; SOARES-SILVA, 2000; SARTORI et al., 2002; LORENZI, 2008; GASPER et al., 2015).

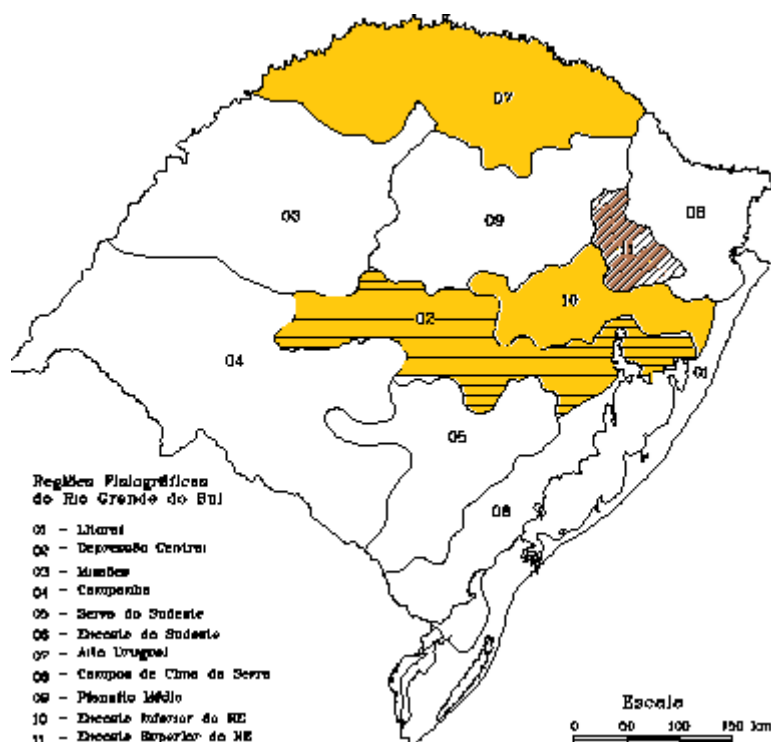


Figura 1 - Regiões fisiografias do Rio Grande do Sul salientando áreas onde se encontra a planta *Myrocarpus frondosus* Allemão. Fonte: GATTO, D.A.2006.

A espécie, também é conhecida pelos nomes comuns como Cabreúva, Cabreúva-parda ou óleo-pardo é uma árvore de grande porte (Figura 2), com tronco reto, cilíndrico, de 60 a 80 cm de diâmetro, copa pouco densa, de ramificação ascendente e folhagem caducifólia, verde-brilhante. A casca tem cor castanho-acinzentada e fissura em denso reticulado muito característico. As folhas, alternas e imparipinadas, apresentam pecíolo e raque sulcadas na face superior e 7 a 9 folíolos alternos, curtamente peciolulados (2 a 3 mm), ovalado-elípticos, com 5 a 7 cm de comprimento por cerca de 2,5 cm de largura, de ápice acuminado pontos translúcidos no limbo (MARCHIORI, 1997).

Segundo Lorenzi & Matos (2002) consideram o uso do *Myrocarpus frondosus* Alemão, similar ao *Myroxylon peruiferum* e sendo este utilizado para as mesmas indicações. Estudos fitoquímicos realizados com a resina do *Myroxylon* identificaram 50-64% de óleo volátil e 20-28% de resina. O óleo volátil contém ingredientes ativos, ésteres dos ácidos benzoico e ciânico, bem como pequenas quantidades de nerolidol e ácidos benzoico e ciânico livres.

Metabolismo Secundário das plantas

As plantas constituem fontes importantes de substâncias químicas naturais que representam um grande potencial de compostos bioativos, devido a sua ampla variedade de metabolitos primários e secundários sintetizados por elas (GOTTLIEB et al., 1996).

Os metabolitos primários desempenham função essencial no vegetal como fotossíntese, respiração e transporte de solutos. Os compostos envolvidos no metabolismo primário são os nucleotídeos, lipídeos, carboidratos e clorofila, e esses se encontram em todo reino vegetal (BERGAMASCHI, 2010). Os metabolitos secundários produzidos por plantas têm um papel fundamental no desenvolvimento da química orgânica sintética moderna (GOTTLIEB et al., 1996), por possuírem elevada capacidade biosintética, tanto em relação ao número de substâncias químicas produzidas quanto à sua diversidade numa mesma espécie (HARBORNE, 1988).

Já foram reconhecidas várias funções das substâncias químicas pertencentes à classe dos metabolitos secundários como, defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção contra raios UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes (WINK, 1990), e participação em alelopatias (HARBORNE, 1988).

A origem de todos os metabolitos secundários podem ser resumidos a partir do metabolismo da glicose, via dos intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato, conforme representado na Figura 4.

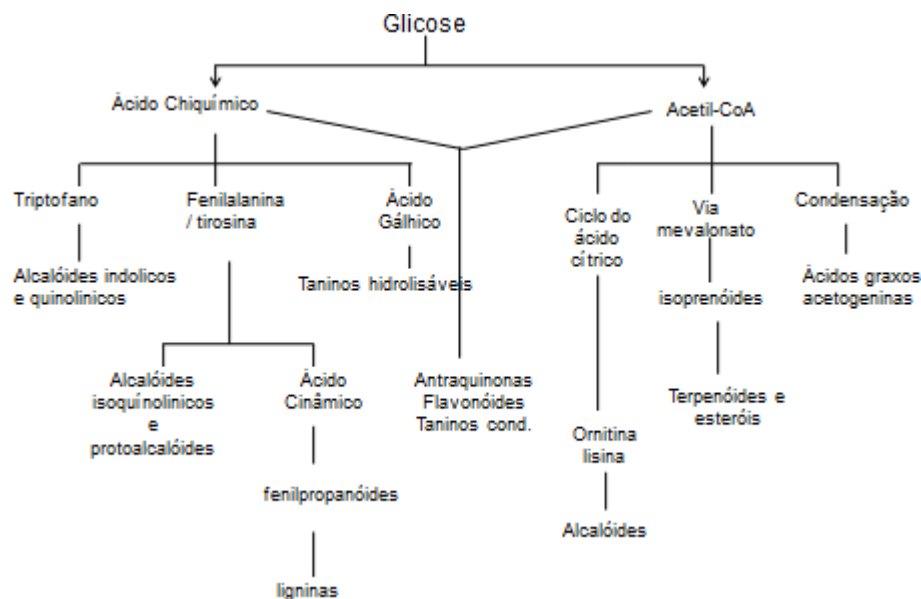


Figura 4 - Ciclo biossintético dos metabolitos secundários. Fonte: SIMÕES et al., 2010.

Produtos da via do Mevalonato

O mevalonato é convertido em isopreno ativo (Figura 5), unidade básica na formação dos terpenos e esteroides (SIMÕES et al., 2010). Os terpenos ou terpenóides é o maior grupo dos metabólitos secundários. Os terpenos têm função bem caracterizada no crescimento e desenvolvimento dos vegetais. Os terpenóides formam uma grande diversidade de estrutura de produtos naturais derivados de C5 isopreno, juntam-se em forma de cabeça-cauda. Estruturas típicas contêm esqueletos de carbono representados por (C5) n , e são classificados como hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15) e diterpenos (C20), triterpenos (C30), e tetraterpenos (C40) (SIMÕES et al., 2010).

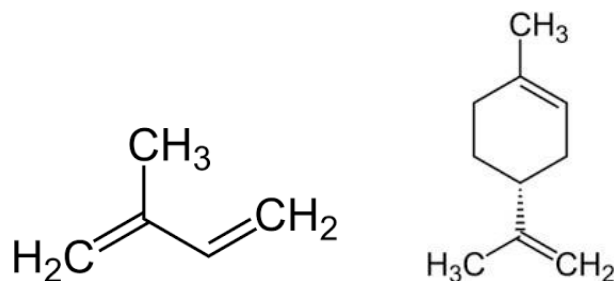


Figura 5: Estrutura de isopreno e monoterpenos. Fonte: CARDOSO, et al., 2001.

Os triterpenóides são montados através da justaposição sucessiva de unidades de ciclopentanoperhidrofenantreno (IPP), que dá origem aos outros

terpenóides. Os esteroides são uma classe de compostos amplamente distribuídos na natureza, ocorre em animais e vegetais e que se caracterizam pelo sistema tetranelar do IPP (SIMÕES et al., 2010). Os terpenóides ocorrem naturalmente e apresentam propriedades anti-inflamatória e antinoceptivas, inibem a agregação plaquetária, entre outras (CALIXTO et al., 2000).

Entre os triterpenos e esteroides de origem vegetal de importância estão as saponinas. São glicosídeos que se dissolvem em água e diminuem a tensão superficial desta; portanto ao sacudir a solução, se forma uma espuma abundante e relativamente estável. Por hidrólise das saponinas se obtém carboidratos e uma aglicona, chamada sapogenina, da qual tem um esqueleto esteroidal (SIMÕES et al., 2010). São utilizadas na farmacologia para a síntese parcial dos hormônios esteroidais (ROBBERS et al., 1997).

Os óleos voláteis são misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, odoríferas e líquidas, derivados de plantas aromáticas (TEUSCHER, 1990). São conhecidos aproximadamente 3000 óleos essenciais sendo que 300 são comercialmente importantes para uso farmacêutico, alimentos, cosméticos e indústrias de perfume (PERREIRA et al., 2014).

Os óleos voláteis localizam-se em órgãos diferentes, dependendo da família. Embora todos os órgãos de uma planta possam acumular óleos voláteis, sua composição pode variar segundo a localização, por exemplo, podem-se obter óleos em diferentes órgãos de uma mesma planta e estes apresentarem composição química, caracteres físico-químicos e odores bem distintos. Quimicamente a maioria dos óleos voláteis são constituídos de derivados fenilpropanóides ou de terpenóides sendo esse mais frequentes (SIMÕES et al., 2010; PERREIRA et al., 2014) e como característica principal a volatilidade, diferenciando, assim, dos óleos fixos (SIMÕES et al., 2010).

Produtos derivados do ácido chiquímico

Os taninos são substâncias fenólicas de caráter adstringente e solúvel em água que derivam do ácido gálico. Classificam-se em hidrolisáveis (Figura 7) e condensados. Os condensados, também denominados proantocianidina, estão distribuídos em plantas lenhosas, são oligômeros e polímeros formados a partir de policondensação de duas ou mais unidades de flavan-3,4-diol (Figura 6). São encontrados em gimnospermas e difundida entre as angiospermas. Os

hidrolisáveis ocorrem em dicotiledôneas herbáceas e lenhosas, são caracterizados pela presença de um oligo ou poliésteres de açúcar e de um número variável de moléculas de ácidos fenólicos (HARBONE, 1998; BRUNETON, 2001; SIMÕES et al., 2010).

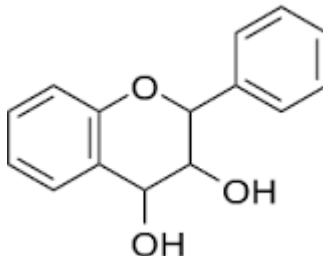


Figura 6: Estrutura do flavan-3,4-diol. Fonte: www.google.com.br/Imagens

Plantas ricas em taninos são usadas na medicina tradicional no tratamento de diversas moléstias, como diarreia, reumatismo, hemorragias, queimaduras, problemas estomacais, renais e processos inflamatórios (HALSAM, 1996). A ligação entre os agrupamentos fenólicos dos taninos e macromoléculas, está na ligação hidrofóbica ou ligações de hidrogênio. Essa capacidade de combinar-se com macromoléculas explica a capacidade deles precipitarem celulose, pectinas e proteínas. A complexação entre taninos e proteínas é a base para suas propriedades como fatores de controle de insetos, fungos e bactérias tanto quanto para suas atividades farmacológicas (HARBONE, 1998; COSTA, 2002).

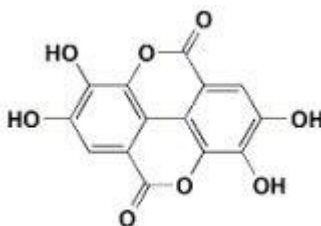


Figura 7: Estrutura Química do ácido elágico (Tanino hidrolisável).

Fonte: www.goole.com.br/Imagens

Os flavonoides que derivam do ácido chiquímico (Figura 8) representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural e são amplamente distribuídos no reino vegetal (SIMÕES et al., 2010).

Diversas funções são atribuídas aos flavonoides nas plantas, entre as quais: proteção dos vegetais contra incidência de raios ultravioleta e visível,

proteção contra insetos, fungos, vírus e bactérias, além de atração de animais com finalidade de polinização, controle da ação de hormônios vegetais, agentes alelopáticos, inibidores de enzima, e além disso, os flavonoides possuem importância farmacológica, resultado em propriedades atribuídas a alguns representantes da classe, como por exemplo: antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antiviral, anticoagulante, antibacteriana, espasmolítica e para hipertensão (HARBORNE, 1989; HARBORNE e WILIAMS, 2000; CAPASSO, 2003; ZUANAZZI, 2007; SIMÕES et al., 2010).

Os flavonoides por possuírem ações biológicas que previnem acidente vascular, são utilizados pela indústria farmacêutica na preparação de agentes vasodilatadores, como a rutina e diosmina (CALIXTO, 2000). A rutina (quercetina-3-rutinosídeo) um flavonoide encontrado em diversas plantas, inclusive na família Faboideae, é muito promissora na produção dos medicamentos que combatem ao envelhecimento e as doenças degenerativas e como agentes vasodilatadores (GONÇALVES, et al., 2010).

Os flavonoides se diferem, dependendo da localização do órgão que se encontra. São responsáveis pela coloração de flores, frutos e folhas de algumas espécies. O interesse econômico destes compostos químicos, também se dá pela presença de cor, que permite que estes sejam usados como pigmentos. (ZUANAZZI, 2007; SIMÕES et al., 2010).

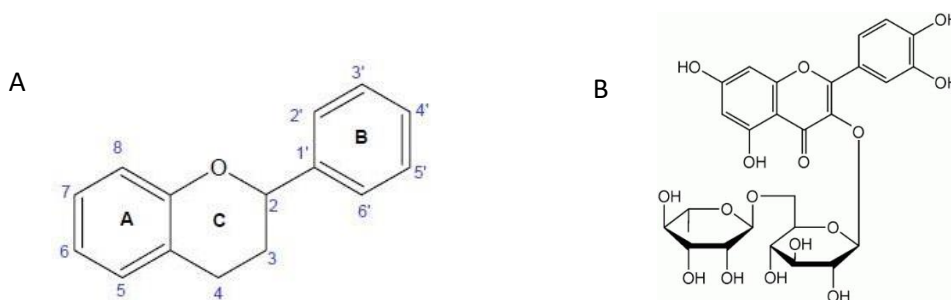


Figura 8: Estrutura básica dos flavonoides (A) e Rutina (B). Fonte: CARDOSO, et al., 2001.

Alcaloides são compostos nitrogenados farmacologicamente ativos e são encontrados predominantemente em angiospermas. Os alcaloides contendo um átomo de nitrogênio em um anel heterocíclico são chamados de alcaloides verdadeiros e são classificados de acordo com o sistema anelar presente na molécula (Figura 9).

Devido ao seu amargor e toxicidade, atuam como repelentes de herbívoros. Algumas espécies são tóxicas para o homem como, por exemplo, a beladona, que serve de alimento para coelhos, os quais possuem sistema enzimático passível de hidrolisar a atropina em produtos desprovidos de toxicidade. Diversos alcaloides são utilizados em terapêutica atualmente, pura ou em associação, e também na forma de derivados. Outros são utilizados como matéria-prima para a síntese de fármacos (SIMÕES et al., 2010).

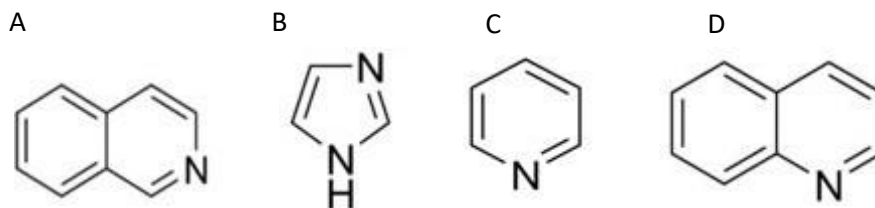


Figura 9: Estruturas básicas dos Alcaloides (isoquinolina, imidazol, piridina, quinolina).

Fonte: CARDOSO et al., 2001.

Os glicosídeos cianogênicos fazem parte dos compostos nitrogenados (TAIZ e ZEIGER, 2004), com função de proteção e são encontrados nos vegetais. Os glicosídeos cianogênicos podem-se hidrolisar formando ácido cianídrico e substâncias voláteis altamente tóxicas (SIMÕES et al., 2010).

Algumas plantas da família das Leguminosas (Fabaceae) sintetizam inibidores de alfa-amilase e outras espécies produzem lecitinas, proteínas defensivas que se ligam a carboidratos ou proteínas contendo carboidratos (TAIZ e ZEIGER, 2004).

A família Fabaceae é conhecida pela ocorrência de flavonoides, taninos condensados (SABUDAK et al., 2009) alguns glicosídeos cianogênicos, cristais de proteínas e grãos de amido (DEWICK, 1994, CORDELL, 1981; JUDD, 1999; CHEW et al., 2009).

Antimicrobianos

As bactérias foram identificadas pela primeira vez por van Leeuwenhoek em torno de 1670, e somente no século XIX surgiu a possibilidade desses microrganismos serem causadores de processos infecciosos. Na segunda metade do século XIX, cientistas como Robert Koch identificaram como microrganismos causadores da tuberculose e cólera. Em 1910, o primeiro antibiótico

de origem sintética, salvarsan, foi desenvolvido por Ehrlich, e a proflavina, um agente muito utilizado na segunda Guerra Mundial para tratar feridas profundas, foi introduzido em 1934. Já Gerard Domagk em 1934 descobriu o corante vermelho prontossil, que apresentava atividade *in vivo* contra infecções causadas por *Streptococcus*. O prontossil, um pro-fármaco, que originou a nova classe de antibióticos sintéticos, como as sulfas ou sulfonamidas (GUIMARÃES et al., 2010).

Em 1929, a penicilina G ou benzilpenicilina foi o primeiro antibiótico proveniente de fungos, a ser descoberto por Alexandre Fleming, onde fungos produziam substâncias capazes de controlar a proliferação bacteriana. Essa descoberta do agente antimicrobiano foi introduzida como agente terapêutico a partir de 1940, tendo uma atividade superior às sulfas. Nos anos de 1940 – 1960 outros antibióticos foram descobertos oriundos de produtos naturais microbianos: β -lactâmicos (cefalosporinas), aminoglicosídeos (estreptomicina), tetraciclina (clortetraciclina), macrolídeos (eritromicina), peptídeos (vancomicina), entre outros (cloranfenicol, rifamicina B, clindamicina e polimixina) e três derivados sintéticos: isoniazida, trimetopim e metronidazol, sendo a maioria para o tratamento de bactérias Gram positivas. Atualmente a maior parte desses antibióticos ainda são usados (GUIMARÃES et al., 2010; LEWIS, 2013).

Entre 1960-1980, antibióticos semissintéticos foram introduzidos para o tratamento de bactérias Gram positivas e Gram negativas, obtidos a partir de protótipos naturais microbianos, como derivados β -lactâmicos, análogos da tetraciclina e derivados aminoglicosídicos. E nos anos 1980-2000 houve uma queda na identificação de novos antibióticos e ao mesmo tempo um aumento na resistência bacteriana. Neste período introduziu-se a classe das fluoroquinolonas sintéticas a partir do ácido nalidixico, e de protótipos naturais como imipinem, e análogos da eritromicina e a introdução de dois derivados semissintéticos de produtos naturais microbianos, quinupristina e dalfopristina, aprovada para o tratamento das infecções causadas por *Enterococcus faecium* resistente à vancomicina no ano de 1999 pelo FDA (Food and Drug Administration) (GUIMARÃES et al., 2010).

O teixobactein, é o mais novo composto isolado a partir de microorganismo de solo, mostrou-se eficiente para bactérias Gram +, e apresentou baixa toxicidade. Os resultados mostraram eficácia frente a *Staphylococcus aureus* resistente a metilina (MRSA), *Micobacterium tuberculosis* (LING et al., 2015).

A resistência das bactérias às drogas específicas era pouco frequente no início da era da antibioticoterapia. Já no início da ampla utilização de vários antimicrobianos na década de 1950 até a década de 1960, houve o surgimento de resistência aos antimicrobianos, e nas décadas de 1980 e 1990 com o surgimento de novas formas de resistência e a disseminação de microrganismos multirresistentes, tem havido o aparecimento de novas formas de resistência das bactérias frente aos antimicrobianos (TAVARES, 2000), isso devido ao uso indiscriminado e/ou inadequado de antibióticos que tem favorecido a predominância de espécies bacterianas cada vez mais resistentes (DEL FIOLE et al., 2010; DALL'AGNOL et al., 2003). Outro fator que pode estar relacionado a resistência, é o fenômeno ecológico que ocorre em resposta da bactéria frente a um amplo uso de antibióticos e sua presença no meio ambiente (MADIGAN et al., 2012; GUIMARÃES et al., 2010; GALES et al., 2009).

O fenômeno genético está relacionado a existência de genes nos microrganismos que codificam um dos diferentes mecanismos bioquímicos que impedem a ação das drogas. Essa resistência pode ser originada por mutações que ocorrem entre o processo de divisão celular e resultam em erros de cópias na sequência de bases que formam o DNA cromossômico. Esses microrganismos são considerados de alta capacidade de adaptações como a exposição a agentes químicos potentes (MADIGAN et al., 2012).

Bactérias de Importância Clínica e Resistência

As bactérias Gram + e Gram - se diferenciam pela sua composição da parede celular. A G + possui uma camada composta de peptidoglicano que confere rigidez à parede celular que atinge de 15 a 50% da célula e nas G – não ultrapassa à 5% (Figura 10). A diferença nas sensibilidades das bactérias frente a extratos e óleos pode estar relacionado com a estrutura das paredes celulares desses microrganismos, responsáveis pela manutenção da forma bacteriana,

tendo assim um papel importante na divisão celular (RANG et. al.,1997; VARGAS et al., 2004).

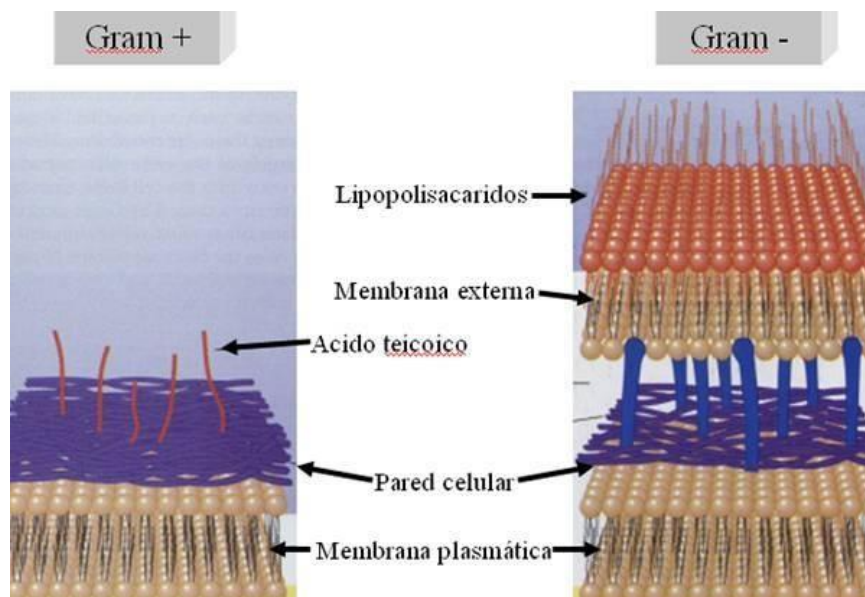


Figura 10- Representação das membranas bacterianas Gram positiva e Gram negativa.

Fonte: www.google.com.br/Imagens

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que mais de 60% das doenças de origem alimentar são provocadas por agentes microbianos relacionados a produtos alimentícios, com isso vários estudos têm sido realizados com patógenos relacionados à alimentos contaminados, como espécies de *Salmonella*, *Staphylococcus*, *Escherichia coli* e *Listéria* (ALVARENGA et al., 2007; REGO et al., 2001).

O gênero *Salmonella* pertence à família *Enterobacteriaceae*, definido como bastonetes gram-negativos não esporogênicos. Em humanos, a espécie mais comumente envolvidas em doenças é a *S. entérica* que tem como habitat humanos e animais, são responsáveis pelas salmoneloses humanas, sendo um dos principais agentes de doenças de origem alimentar. Em humanos com o sistema imunológico comprometido, a mesma pode invadir a corrente sanguínea e causar infecções graves (SILVA, 2007; BARBOSA, 2010; SILVA, 2010).

O sorotipo *typhimurium* faz parte do grupo mais comum pertencente à *S. entérica* e foi caracterizado pela importância na transmissão de salmoneloses de animais para humanos (SILVA, 2007).

A *Escherichia coli* faz parte do grupo dos coliformes totais e termotolerantes, estão presente na microbiota normal do intestino de humanos e animais. Sendo responsável pela causa frequente de infecções hospitalares do trato urinário, septicemia, e também está associado a infecções intra-abdominais como peritonite. A *E. coli* é também um dos principais agentes causadores de infecção de origem alimentar em todo o mundo (WHO, 2014; SILVA, 2007).

A resistência da *E.coli* se desenvolve por meio de mutações, que é o caso da resistência à fluoroquinolonas, ou por incorporação de elementos genéticos moveis, resistente a penicilinas de amplo espectro e as cefalosporinas (terceira geração) que é conferida por enzimas beta-lactamases de amplo espectro (ESBL). As quinolonas, um dos grupos antibacterianos também são utilizados para o tratamento de infecções do sistema urinário, na qual *E. coli* é uma das causas mais comum (WHO, 2014).

Cepas de *E. coli* que tem ESBL são resistentes geralmente a vários outros medicamentos antimicrobianos. Aos carbapenems, por exemplo, que seriam uma das opções para tratamento em infecções graves, recentemente houve relatos de resistência à *E. coli* mediado pelo lactamases, que confere resistência a todos fármacos disponíveis beta-lactâmicos (WHO, 2014).

Staphylococcus pertence à família Micrococcaceae, juntamente como os gêneros *Stomatococcus*, *Micrococcus* e *Planococcus*. *S. aureus*, é a principal espécie deste gênero, tem forma esférica e formam grupos com aspecto de cachos de uva. É encontrado na microbiota normal, nas fossas nasais, virilha e axilas. O *S. aureus* é um importante patógeno envolvido na etiologia das infecções humanas, como pneumonia, endocardites e sepses (MENEGOTTO e PICOLI, 2007).

Quando a penicilina foi introduzida para o tratamento de infecções por *S. aureus*, a resistência já tinha sido desenvolvida durante a década de 1940. Resistência esta mediada pela produção de uma enzima beta lactamase, que inativa o medicamento, como a penicilina, amoxicilina e ampicilina. Porém cepas de *S. aureus* resistentes a esses medicamentos estáveis a penicilinase adquiriram um novo gene, que codifica para uma nova proteína de ligação a penicilina, e essas cepas são denominadas *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA). As primeiras cepas MRSA surgiram na década de 1960. E muitas dessas cepas MRSA mantiveram susceptibilidade a um certo número de

agentes antimicrobianos não beta-lactâmicos. Para cepas multirresistentes o último recurso foram os glicopeptídeos como a vancomicina e teicoplanina (WHO, 2014).

Listéria monocytogenes é um bacilo anaeróbio facultativo resistente a sucessivos congelamentos e descongelamentos. Pode infectar adultos saudáveis, que podem apresentar sintomas parecidos como a gripe ou não apresentar sintomas. A listeriose invasiva infecta principalmente pacientes imunocomprometidos como idosos, gestantes, recém-nascido entre outros. Os casos mais graves da listeriose invasiva são meningites, septicemias (CATAO, et al., 2001; REIS et al., 2011).

Atividade Antioxidante

O organismo possui diferentes mecanismos de defesa antioxidante para combater o excesso de radicais livres, esses quando em excesso, levam a saturação de enzimas protetoras (antioxidantes enzimáticos) tais como catalase (Cat), superóxido dismutase (Sod), glutatona redutase (GR) e glutatona-peroxidase (GPx) e isto levaria a destruição e morte celular (BERGAMASCHI, 2010; ROBARDS et al., 2002).

Os antioxidantes são divididos em grupos primários ou interruptor de cadeia e secundários ou preventivos. Os primários são capazes de retardar ou inibir a etapa inicial da cadeia, cedendo um hidrogênio a um radical lipídico livre e assumindo a forma de radical estável, ou inibindo a etapa de propagação ao reagir com radicais peroxila ou alcóxila (ROBARDS et al, 2002). Os secundários reduzem o processo de iniciação, utilizando agentes quelantes de metais (BERGAMASCHI, 2010).

Os radicais livres são controlados nos seres vivos por compostos de origem endógena (ex: superóxido dismutase) ou provenientes da dieta como a vitamina A, C e E, os flavonoides e carotenoides, que promovem ação protetora contra os processos oxidativos que ocorrem no organismo. Quando há limitação na disponibilidade desses antioxidantes podem ocorrer lesões oxidativas de caráter acumulativo, assim os antioxidantes têm como função estabilizar ou desativar os radicais livres antes de atacar os alvos biológicos da célula (SOUSA et al., 2007; BERGAMASCHI, 2010).

O stress oxidativo (OS) é o responsável pelo aumento na produção de espécies reativas de oxigênio e espécies reativas de nitrogênio (ROS/RNS). Em situações patológicas essa produção pode aumentar, resultando em diminuição nos níveis das enzimas antioxidantes e uma elevada produção de ERO (ALARCON & DENICOLA, 2013; PAWLAK et al., 1998).

As espécies reativas do oxigênio (ROS) tais como o ânion superóxido ($O_2\cdot^-$), radical hidroxila ($OH\cdot$), e hidroperoxila ($ROO\cdot$) causam danos ao DNA ou podem oxidar lipídios e proteínas. Entre as espécies, o radical hidroxila é mais reativo na indução de lesões nas moléculas celulares. Além disso, o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), apesar de não ser considerado um radical livre, é capaz de atravessar a membrana nuclear e induzir danos à molécula de DNA (ANDERSON, 2000; SOUSA et al., 2007).

Recentemente novas espécies de radicais foram identificadas, agora centrada em nitrogênio, denominada RNS, derivados do radical Óxido Nítrico ($NO\cdot$), também chamado de monóxido de nitrogênio. As ROS e RNS contribuem para o desenvolvimento de várias patologias, incluindo doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, tumor e envelhecimento (DUARTE et al., 2014; FABRI et al., 2011; ALARCON & DENICOLA, 2013).

Diferentes ensaios químicos *in vitro* tem sido desenvolvido para determinar a capacidade antioxidante de produtos naturais incluindo o ORAC, DPPH, ABTS, FRAP, e o mais recente ensaio baseado em nanotecnologia, que utiliza nanopartículas para avaliar a atividade antioxidante (ALARCON & DENICOLA, 2013).

Estes métodos podem ser baseados na captura do radical peroxila (ORAC, TRAP), poder de redução do metal (FRAP; CUPRAC), captura do radical hidroxila (método de desoxirribose), captura do radical orgânico (ABTS, DPPH), quantificação de produtos formados durante a peroxidação de lipídios (TBARS, oxidação do LDL, co-oxidação do β -caroteno) (FRANKEL e MEYER, 2000; SÁNCHEZ-MORENO, 2002; ARUOMA, 2003). Em alimentos os antioxidantes são usados para inibir ou retardar a oxidação desses, além disso impedem a perda de cor, sabor e vitaminas, proporcionando a estabilização de moléculas envolvidas nessas características (FAUSTINO et al., 2010).

Compostos Fenólicos

Entre os compostos naturais com potencial antioxidantes estão os compostos fenólicos como os flavonoides, que possuem capacidade de capturar e neutralizar espécies oxidantes como o peróxido e hidroxila. Além disso os flavonoides apresentam capacidade de se ligar a íons metálicos, formação de quelatos, atividade sequestradora de radicais livres, inibição enzimática das lipoxigenases, cicloxigenases, NADPH-oxigenase, xantina-oxigenase e fosfolipase, e estimulação das enzimas catalase e superóxido-dismutase que possuem atividade antioxidante (ZUANAZZI, 2007).

Os compostos fenólicos têm recebido muita atenção, por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase *in vitro* (SOUSA et al., 2007). São os principais agentes que podem doar hidrogênio aos radicais livres e assim quebrar a cadeia de lipídeo, na primeira etapa de oxidação, isso se deve pelo elevado potencial dos compostos fenólicos de varrer os radicais pelos seus grupos fenólicos hidroxilo. Também são conhecidos pela capacidade de prevenir a deterioração oxidativa de ácidos graxos e são usados na conservação de alimentos. Compostos antioxidantes muitos usados na conservação como o butil-hidroxi-anisol e butil-hidroxi-tolueno (BHA e BHT) sintéticos mostram ser tóxicos e/ ou mutagênicos, uma alternativa seria antioxidante provenientes de plantas (OUARIACHI et al., 2011).

4. Artigo

Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the oil and plant extract *Myrocarpus frondosus* Allemão

Ivandra Ignês de Santi^{1*}, Darci Alberto Gatto², Miriam Ribeiro Galvão Machado³, Patrícia Bilhalva⁴, Rogerio Antonio Freitag¹

¹Natural Products Research Laboratory. Graduate Program in Biochemistry and Bioprospecting. Federal University of Pelotas, Pelotas - RS, Brasil.

² Postgraduate Program Materials Science and Engineering. Federal University of Pelotas, Pelotas – RS, Brasil.

³Center for Chemical Sciences, Pharmaceutical and Food. Federal University of Pelotas, Pelotas – RS, Brasil.

⁴Chemical and Environmental Engineering Department, University of the Basque Country (UPV / EHU), San Sebastian – Espanha.

Artigo formatado conforme normas da revista Fitoterapia



Chemical composition, antioxidant and antimicrobial activity of the oil and plant extract *Myrocarpus frondosus* Allemão

Ivandra Ignês de Santi¹, Darci Alberto Gatto², Miriam Ribeiro Galvão Machado³, Patrícia Bilhalva⁴, Rogério Antônio Freitag¹

Abstract

The study aimed to evaluate the chemical profile of aqueous and ethanol extracts and essential oil of plants *Myrocarpus frondosus* Allemão, and the sensitivity of strains *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella typhimurium* and *Listéria monocytogenes* the extracts and essential oil through the method microdilution Clinical and Laboratory Standards Institute, the antioxidant activity by the ABTS method, and the content of phenolic compounds. For the preparation of extracts from plant leaves were used with ethanol and water, then separate the chemical identification of compounds was performed by high-performance liquid chromatography (CLAE-DAD) and gas chromatography coupled to mass spectrum (CG/MS). With the chemical analysis of the extracts obtained the presence of the major compound, rutin, and oil major compound was found germacrene B. In the broth microdilution test oil and extracts showed inhibition forward all the bacteria tested in the concentrations 1 mg / ml to 0.25mg / ml, except for *S. aureus* at a concentration 0.25mg / ml of the essential oil and trans-caryophyllene. The results of Minimum Bactericidal Concentration (CMB) the essential oil had bactericidal activity at a concentration of 1mg / ml for all bacteria tested and trans-caryophyllene at the same concentration only for *Listeria monocytogenes*. In relation to the essential oil antioxidant activity showed higher radical reduction capacity of 40.92% and the content of phenolic compounds (TPC) ethanol extract showed more 12.72%. The *in vitro* results support the conclusion that the essential oil is very promising both in antimicrobial action as antioxidant activity and the leaf extracts on antioxidant activity.

Keywords: *Myrocarpus frondosus* Allemão; Antimicrobial; Antioxidant

1. Introduction

Medicinal plants have the largest pharmaceutical source that exists and the use of them is as old as human life. Before the nineteenth century, the plants were the main resource used in traditional medicine [1]. The use of herbal substances stands out both as a therapeutic agent as raw material for synthesis of drugs. This practice valued by the national pharmaceutical market internationaland research and development of new drugs [2-7].

So today many scientists from different areas are using substances extracted from medicinal plants due to its high efficacy against pathogens and its use already proven in traditional medicine [1].

However, the widespread use of drugs, especially non-prescription, has led to loss of effectiveness of action against pathogenic microorganisms [7]. Therefore, Fabri [8] describes that plants that have antibacterial activity are extremely important, given that many bacteria are resistant to the latest antibiotics.

According to Duarte [9] in addition to antimicrobial activity have also been sought new sources of antioxidants derived from natural products. Moreover, with increasing restriction of the use synthetic antioxidants due to its toxicity reported recently that might involve many risks to health, including cancer [10]. Thus, the scientific study has focused for the identification of novel antioxidant compounds from different sources, such as trees, herbs and spices, among others [11-12].

According Calixto [13] Brazil has highlighted to present the largest storehouse of biodiversity on the planet, with great potential for research and development of new products from medicinal plants. So if looking in nature, plants, aiming to discover new compounds with antimicrobial and antioxidant activity.

Folk medicine using parts of *Myrocarpus frondosus* Allemão plant, to treat wounds and bruises, as an expectorant, and other lesions of the respiratory system, anti-inflammatory among other uses [14-15].

In this context, this study aims to evaluate the antimicrobial activity, antioxidant of aqueous and ethanol extracts of leaves, and essential oil from plant seeds *Myrocarpus frondosus* Allemão (Cabreúva) and these extremely important for pharmaceutical and food industry and identify main chemical constituents

present in aqueous and alcoholic extracts of the leaves and the essential oil of the seeds.

2. Materials and Methods

Plant Material

The leaves and seeds were collected on the upper slopes of the Northeast in the state of Rio Grande of Sul. In the anatomy laboratory of wood, the material was dried at 35°C in air circulation greenhouse and stored in climate – controlled chamber. For identify the species, plant samples were sent to the Herbarium of Forest Engineering at the Federal University of Santa Maria – UFSM, and identified and cataloged under number HDCF nº 6215.

Preparation of Extracts: Aqueous and Ethanol

For obtaining the aqueous raw extract were used 25g of crushed dry leaves in knife mills and 100mL of distilled water. The plant sample and solvent were placed in a container with 500mL and kept under constant stirring, heating plate with an oil bath at a temperature of 60°C for 24 hours. The process was repeated until obtaining a clear extract. In the end of extraction, the extract was frozen at -80°C for subsequent lyophilization thereby obtaining the dry extract. For obtaining the ethanol extract followed by the same extraction procedure as above, the solvent used was ethanol. Already the ethanol extract it evaporated in rotaevaporator to obtain the dry extract. The dried samples were placed in small vials hermetically sealed for later use in chromatographic analysis and *in vitro* tests.

Essential Oil Extraction

The essential oil was extracted by hydrodistillation method. Was weight 100g of the previously crushed seed in a blender along with 1500mL distilled water and added to a flask attached to Clevenger apparatus. The extraction was performed as described in the Brazilian Pharmacopoeia [16].

Chemical Analysis

For the identification of metabolites present in the essential oil the same were subjected to chromatographic analysis in equipment GC / MS, brand Shimadzu QP2010, equipped with a splitter split/splitless. With a Rtx-5MS Restek (30 mx 0,25 mm x 0 25 microns) capillary column under the following chromatographic conditions: Helium gas carrier obtained by electron impact fragments to a power of 70 eV rate of 1.2 ml / min, 1:50 split flow and the volume of injected sample of 1 ul. Programmed oven temperature: initial temperature was 40 ° C with a heating ramp of 10 ° C / min to 280 ° C and remained stable at that temperature for 10 minutes. Subsequently the temperature was increased at a rate of 10 ° C / minute to 300 ° C for a total time of 41 minutes with a injector temperature 250 ° C, the interface temperature 300 ° C, the compounds were analyzed; NIST08 using GC / MS library.

The ethanol and aqueous extracts were analyzed by HPLC-DAD (Shimadzu). The reverse phase chromatography was conducted with Phenomenex C-18 column (4.6 mm x 250 mm), using as mobile phase A (2% acetic acid) and B (methanol) at a flow rate 0.8 ml / min and injection volume of 40 µL according to the elution method and Piglet gradient Evaristo and Leitão [17] slightly modified. The extracts were conducted in triplicate, for the presence of rutin and confirmation of the presence of this substance was given by comparison of retention times and absorption spectra (in the range of 230 to 400 nm) peaks. Rutin standard curve was prepared ranging from 5 to 40 µg/mL for quantification.

Microorganisms

The antimicrobial activity of the extracts, oil and caryophyllene oxide were individually tested with four patterns strains: *Escherichia coli* ATCC25922, *Staphylococcus aureus* ATCC25923, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644 and *Salmonella tyhimurium* ATCC 13311.

Chemical standards

The standards used were the Trans-Caryophyllene, ≥98,5% 001,321,406 lot and Rutin Hydrated, ≥94%, BCBH0339V lot, purchased from Sigma-Aldrich.

Preparation of the inoculum

In a test tube, containing saline 0.85% to prepare suspensions of the test strains that were standardized according to Mac Farland 0.5 range, corresponding roughly to the concentration of $1,5 \times 10^8$ Colony Forming Units (CFU/mL). For standardize the optical density of the inoculum was read in a spectrophotometer at a wavelength $\lambda = 625\text{nm}$ in an absorbance of 0.08 - 0.10 according to NCCLS (2003) with modifications [18].

Determination of minimum inhibitory concentration (MIC)

The broth susceptibility test was performed using the method NCCLS (2003) with modifications, for the determination of MIC. All tests were conducted in trypticase soy broth (TSB). To perform the antimicrobial activity, two standards were used, rutin, major compound of the extracts and the trans-caryophyllene only major compound of essential oil available for purchase. Samples and standards were diluted in DMSO with the initial concentration of 1mg / ml. Prepared a bacterial suspension with a concentration of 5×10^5 CFU / mL. In a total volume of 100 μl of the suspension of standardized microorganisms they were inoculated into each well, and then added to 100 μl of the sample solution. The plates were incubated at 37°C for a period of 24h. The MIC was calculated as the highest dilution showing complete inhibition of standard strain used.

The inhibition of control were used antibiotics against Gram + and Gram - positive and negative control and in microdilution method was used dimethylsulfoxide (DMSO).

Determination of minimal bactericidal concentration (MBC)

The results of the MIC, the wells showing complete absence of growth in each well were identified and 10 μl of each well were transferred to a Mueller Hinton Agar plates and incubated at 37°C for 24 hours. The complete absence of growth was considered as the minimum bactericidal concentration.

Antioxidant activity

For the determination of total phenols used the method described by Lachman [19]. Was defined, also the antioxidant capacity of the samples, and

thus extract the oil capacity and reduce ABTS radical according to the spectrophotometric method [20].

The radical ABTS is obtained after the reaction ABTS (0,0192g) of potassium persulfate (5 ml) incubated at room temperature ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) and in the dark for 24 hours. Once the ABTS radicals formed diluted with ethanol to obtain an absorbance ranging from 149 (0.70 ± 0.2) to 734 nm (wavelength of maximum absorption) in a UV spectrophotometer. The first absorption is measured is ethanol which is white then an ABTS radical being measured time zero (T_0) and A_{734} . Then the last 6 minutes is measured by diluting 20 μL of DMSO in 2 mL of ABTS radical time of six minutes. For samples prepared from the extracts 20 mg of sample is diluted in 10 ml of DMSO then add 20 ml of diluting the sample in 2 ml of ABTS radical was generated by absorbance A_{734} was determined continuously 6 as minutes after dilution.

Content of total phenolic

For the test was used 2,5 ml of phenol reagent of Folin-Ciocalteu and 5 ml of Na_2CO_3 solution with a concentration of 20% is used, it was added to 0,5 ml aqueous solution at concentration 20 mg in 10 mL of DMSO. The mixture remained 1 hour at 50°C before measuring the absorbance at 750 nm. It was measured with a spectrophotometer of UV. The absorption of the developed blue color is measured at 750 nm and the total phenols content was determined from the calibration curve of standard solutions of gallic acid (1-20 mg / l) and expressed as mg gallic acid (Eq: 1)equivalents (GAE).

$$\text{Eq: 1} \quad \text{gallic acid equivalents } c_{\text{GAE}}, \text{ mg/L} = \frac{A^{750}}{9.9486 \times 10^{-4}}$$

$$\text{Eq: 2} \quad \text{TPC}\% = \frac{c_{\text{GAE}}}{c_0} \times 100$$

Statistical analysis

Each test was performed in triplicate and the mean values were calculated. The data were reported as mean $\pm$ standard deviation (SD).

3. Results and discussion

Chemical composition of the extracts and essential oil

In the Chromatogram analysis of aqueous and ethanolic extracts of leaves (Figure 1 and 2) was identified as the compound rutin (quercetin-3-rutinoside). The aqueous extract showed a concentration of 12.56 mg / g of rutin and the ethanol extract 11,66mg / g of rutin, a very similar concentration of the extracts. Rutin is found in many plants of the family Fabaceae [21-22], composed much appreciated by the pharmaceutical and cosmetic industries. Promising in the production of drugs to combat aging and degenerative diseases [23] and its main vasodilator function and antioxidant activity [24].

The essential oil chemical analysis by GC / MS, fourteen compounds were identified, the B germacrene the major compound with 39.28% of the total oil compounds, followed by beta-copaene, beta-pinene, and Caryophyllene (Table 2) relating to the peaks compounds were represented in the Chromatogram 2 (Figure 2). The germacrene B, coapene beta, beta-pinene and Caryophyllene were classified as terpenes and essential oils were found in several families. Terpenes have a capacity of elimination of free radicals, thus gives them the high antioxidant capacity, moreover, has demonstrated a broad spectrum of antimicrobial activity against fungi and bacterial isolates [25-27].

Antimicrobial activity of extracts, essential oil, rutin and trans-Caryophyllene

The results of the broth susceptibility test to determine the minimal inhibitory concentration (MIC), all compounds showed inhibition at concentrations of 1 mg / ml to 0.25mg / ml for all bacteria tested except for the essential oil and trans-Caryophyllene the concentration 0.25 mg / ml for *Staphylococcus aureus*. The compounds found in the essential oil are classified as terpenes, and these are

recognized by the antibacterial and antioxidant activity [28] and compound rutin present in the extracts are known for their antioxidant activity. So far there are no studies in the literature reporting antimicrobial activity of plant *M. frondosus* against these bacteria.

The compounds found in the essential oil are classified as terpenes, and these are recognized by the antibacterial and antioxidant activity [28]. So far, there are no studies in the literature reporting antimicrobial activity of plant *M. frondosus* against these bacteria.

The MBC is defined as the lowest concentration of oil and / or extract resulting in the death of 99.9% of the inoculum. The results of Minimum Bactericidal Concentration (CMB) demonstrated that the essential oil had bactericidal activity at a concentration of 1mg / ml for all bacteria tested and trans-caryophyllene at the same concentration only for *Listeria monocytogenes*.

The 10% DMSO used as a control, there was growth of microorganism, thus confirming that the diluent does not interfere with the tests.

Phenolic content Total (TPC) and antioxidant activity

In Table 03, one can observe the presence of phenolic compounds in ethanolic extracts of leaves in a concentration greater than the aqueous. But the essential oil concentration was lower. The concentration of phenolic compounds found in species of the same family may vary due to the extraction method, environmental stress, local collection period and the studied plant [21-22; 29-31]. These phenolic compounds are effective as secondary metabolites and free radical scavengers and antioxidants [32].

The oil tested the antioxidant activity, has a capacity of inhibition of 40.92% (Figure 3), this can be explained by the presence of terpenes, these being responsible for the antioxidant activity [33]. In extracts, inhibition was lower compared to the essential oil (Table 4). The antioxidant activity of the extracts may be related to the presence of rutin, one flavonoid, recognized for antioxidant activity and found in different concentrations in plants of the same family of *M. frondosus* [21-22;31]. The antioxidant activity of an extract or essential oil may vary depending on the antioxidant performance, the pro-oxidants, and the concentration of the mixture of chemical compounds [34].

4 Conclusion

The methodology used in this study allowed the identification of rutin in the extracts of leaves and germacrene B in the essential oil as major compounds. The results of this study clearly show that the essential oil had a *Myrocarpus frondosus* Allemão antioxidant activity in relation to the extracts which can be useful both in the pharmaceutical industry as food. In the antimicrobial activity, both as essential oil extracts appear to be promising, against Gram positive bacteria and Gram negative. However, additional studies are needed to isolate and identify active compounds, and in vivo studies to understand the mechanism of action as pharmacological agents.

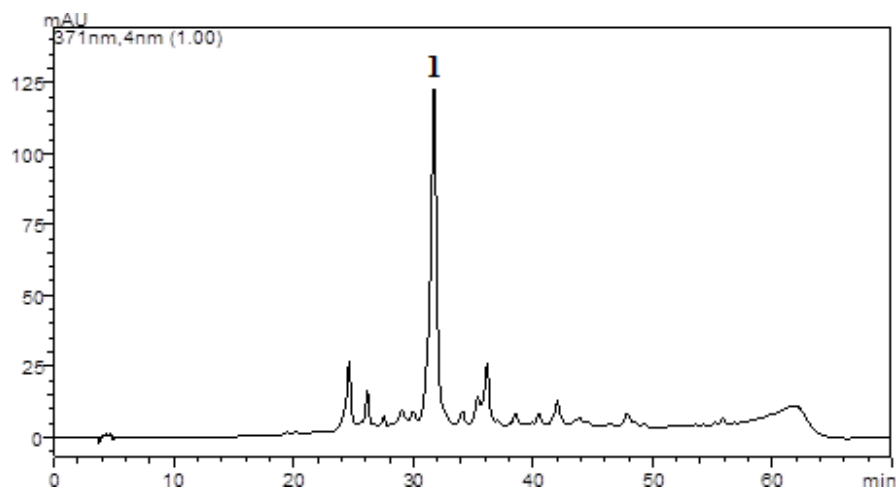


Fig. 1. Chromatogram representing the wavelength of 371 nm, the quantification of rutin in the ethanol extract of the leaves of the plant *Myrocarpus frondosus* Allemão by HPLC-DAD. Pico: 1 - Rutin.

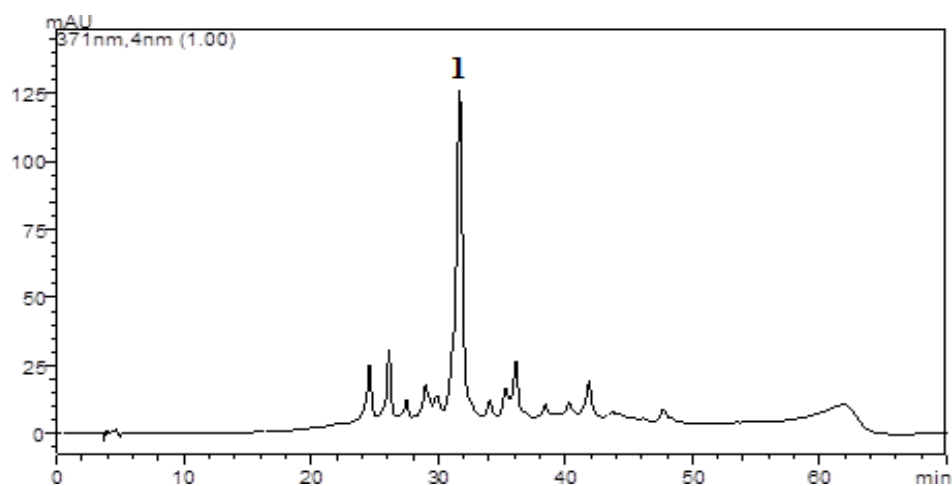


Fig. 2. Chromatogram representing the wavelength of 371nm, the quantification of rutin in the aqueous extract from the leaves *Myrocarpus frondosus* Allemao by HPLC-DAD. Peak: 1 - Rutin

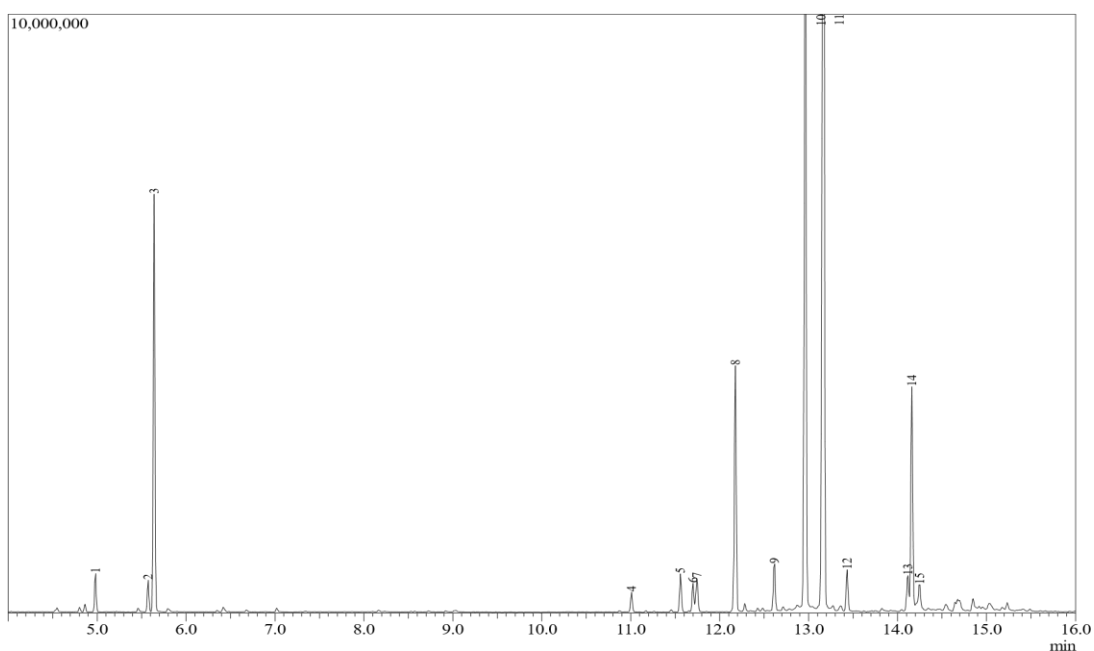


Fig. 3. Chromatogram representing the peaks relating to the essential oil compounds from plant seeds *Myrocarpus frondosus* Allemão by GC / MS.

Table 2

Essential oil chemicals of *Myrocarpus frondosus* Allemão plant performed by GC/MS.

Nº PICO	NOME DO COMPOSTO	Área%	R.Time
1	alpha-Pinene	1.01	4.981
2	beta-Phellandrene	0.83	5.574
3	beta-Pinene	11.03	5.641
4	gamma-Elemene	0.56	11.008
5	Copaene	1.13	11.559
6	(-)-beta-Bourbonene	0.86	11.700
7	beta-Elemene	1.12	11.743
8	Caryophyllene	7.51	12.175
9	Humulene	1.57	12.614
10	beta-Copaene	24.51	12.963
11	Germacrene B	39.28	13.166
12	delta-Cadinene	1.23	13.432
13	gamma-Murolene	1.28	14.114
14	Spathulenol	7.03	14.160
15	ND	1.05	14.246
		100.00	

Table 3

Broth microdilution test of Gram-positive and Gram-negative front of the extracts, essential oil, rutin and trans-caryophyllene

strains standards samples	Concentration (mg/mL)	E.c		S.a		L.m		S.t	
		MIC	CBM	MIC	CBM	MIC	CBM	MIC	CBM
EAF	1,0	-	+	-	-	-	-	-	-
	0,5	-	+	-	+	-	+	-	+
	0,25	-	+	-	+	-	+	-	+
EEF	1,0	-	+	-	+	-	+	-	+
	0,5	-	+	-	+	-	+	-	+
	0,25	-	+	-	+	-	+	-	+
RU	1,0	-	+	-	+	-	-	-	+
	0,5	-	+	-	+	-	+	-	+
	0,25	-	+	-	+	-	+	-	+
OE	1,0	-	-	-	-	-	-	-	-
	0,5	-	+	-	+	-	+	-	+
	0,25	-	+	+	+	-	+	-	+
TC	1,0	-	+	-	+	-	-	-	+
	0,5	-	+	-	+	-	+	-	+
	0,25	-	+	+	+	-	+	-	+

Inhibited growth (-); bacterial growth (+); MIC: Minimum Inhibitory Concentration; CBM: Minimum Bactericidal Concentration; E.c: *Escherichia coli*; S.a: *Staphylococcus aureus*; L.m: *Listeria monocytogenes*; S.t: *Salmonella thymurium*; EAF: aqueous extract of leaves; EEF: ethanol extract of leaves; RU: Rutin; OE: Óil essential; TC: *Trans-cariofillene*.

Table 4

Quantification of phenolic compounds from aqueous and ethanol extracts of leaves and essential oil from plant seeds *Myrocarpus frondosus* Allemão.

Galic acid equivalents mg/L		TOTAL PHENOLIC CONTENT (TPC%)	
	C GAE	Weight of oil (mg/L)	TPC %
1FA	198,979	2000	9,949
2FE	254,478	2000	12,724
5OE	120,221	2000	6,011

Where: FA: Aqueous extract of leaves; DE: ethanolic extract of leaves; EO: Essential oil from the seeds.

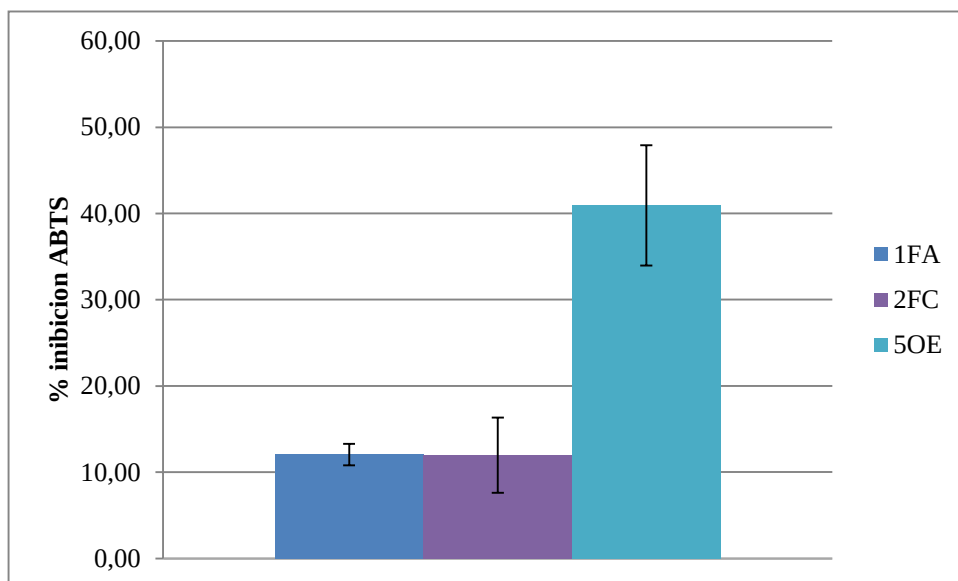


Fig. 4. Graph representing the antioxidant activity by ABTS method of leaf extracts and essential oil from the seeds of *Myrcarpus frondosus* Allemão plant. Where: 1AF: Aqueous extract of leaves; 2FE: ethanolic extract of leaves; 5e: Essential oil from the seeds.

References

- [1] Mirpour, M., Siahmazgi, Z. G., & Kiasaraie, M. S. Antibacterial activity of clove, gall nut methanolic and ethanolic extracts on *Streptococcus mutans* PTCC 1683 and *Streptococcus salivarius* PTCC 1448. *Journal of oral biology and craniofacial research*, v.5(1), p.7-10. 2015.
- [2] Andrião, M.A., Pereira, F.C.S., Martins, M.I.E.G., Sacramento, L.V.S., Estimativas de custo de produção e rentabilidade de plantas medicinais: carqueja no município de Cajuru, Estado de São Paulo. *Informações Econômicas*, v.40, p.16-26. 2010.
- [3] Souza-Moreno, T.M., Salgado, H.R.N., Pietro, R.C.L.R., O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v.20, p.435-440. 2010.
- [4] Ethur, L.Z., Jobim, J.C., Ritter, J.G., Oliveira, G., Trindade, B.S., Comércio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaqui-RS. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, v.13, p.121-128. 2011
- [5] Correa, Jr., C. As plantas medicinais, aromáticas e condimentares e a agricultura familiar. *Horticultura Brasileira*, v.32, p.376. 2014.
- [6] BRASIL 2006a – Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e fitoterápicos. Série B. Textos Básicos de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde. 60p.
- [7] World Health Organization (WHO) - The world medicines situation, Traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva. 12p. 2011.
- [8] Fabri, R. L., Nogueira, M. S., Dutra, L. B., Bouzada, M. L. M., & Scio, E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. *Revista Brasileira de Plantas Medicinales, Botucatu (13). Pág*, 183- 189. 2011.
- [9] Duarte, A. F. S., Hirota, B. C. K., De Oliveira, V. B., Campos, R., Murakami, F. S., Miguel, M. D., & Miguel, O. G. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato etanólico bruto e frações orgânicas obtidas a partir da casca do caule da espécie *Guettarda uruguensis* Cham. & Scthdl.(Rubiaceae). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*,35(4).2015.
- [10] Mohdaly, A. A. A., Sarhan, M. A., Mahmoud, A., Ramadan, M. F., & Smetanska, I. Antioxidant efficacy of potato peels and sugar beet pulp extracts in vegetable oils protection. *Food chemistry*, v.123(4), p.1019-1026. 2010.
- [11] Sousa, C. D. M., Silva, H. R., Vieira-Jr, G. M., Ayres, M. C. C., Costa, C. D., Araújo, D. S., ... & Chaves, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v.30(2), p.351-355. 2007.

- [12] Dzoyem, J. P., McGaw, L. J., & Eloff, J. N. In vitro antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated Fabaceae tree species leads to potentially useful extracts in animal health and productivity. **BMC complementary and alternative medicine**, v.14(1), p.1. 2014.
- [13] Calixto, J.B., Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. *Journal of Ethnopharmacology*, v.100, p.131-134. 2005.
- [14] Stasi, L.C.D; Hirma-Lima, C.A. Plantas medicinais na Amazônia e na mata atlântica. Editora Unesp. 2ª edição ver. e amp., p.303, 2002.
- [15] Di Stasi, L.C.; Oliveira, G.P.; Carvalhaes, M.A.; Queiroz-Junior, M.; Tien, O.S.; Kakinami, S.H. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. *Fitoterapia*, v.73, p. 69-91. 2002.
- [16] BRASIL, Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. v.2. 546p. Brasília, 2010.
- [17] Evaristo, I.M.; Leitão, M.C. Identificação e quantificação por DAD-HPLC, da fracção fenólica contida em folhas de *Quercus suber* L. *Silva Lusitana*. V.9, p.135-141. 2001.
- [18] NCCLS. National Committee for Clinical Laboratory Standards. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria that grow aerobically. 6ª ed. Wayne, Pennsylvania, 2003.
- [19] Lachman, J., K. Hamouz, M. Ľbulc, M. Orsák And P. Dvořák. Differences in phenolic content and antioxidant activity in yellow and purple-fleshed potatoes grown in the Czech Republic. *Plant Soil Environment*, 54, 1, 1-6. 2008.
- [20] Gülçin, I., E. Kireççi, E. Akkemik, F. Topal And O.Hisar. Antioxidant and antimicrobial activities of an aquatic plant: duckweed (*Lemna minor* L.). *Turkish Journal of Biology*, 34 (2): 175:188, 2010.
- [21] Bakasso, S., Lamien-Meda, A., Lamien, C. E., Kiendrebeogo, M., Millogo, J., Ouedraogo, A. G., & Nacoulma, O. G. Polyphenol contents and antioxidant activities of five Indigofera species (Fabaceae) from Burkina Faso. *Pakistan journal of biological sciences: PJBS*, 11(11), 1429-1435, 2008.
- [22] Chew, Y. L., Goh, J. K., & Lim, Y. Y. Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in Peninsular Malaysia. *Food Chemistry*, 116(1), 13-18. 2009.
- [23] Gonçalves, A. C., Vieira, A., Reis, C. A. F., & Carvalho, D. D. Conservação de *Dimorphandra mollis* Benth.(Fabaceae) baseada na estrutura genética de populações naturais. *Revista Árvore, Viçosa, MG*, 34, 95-101. 2010.

- [24] Mansor, L. L., Menezes, F. S., Leitão, G. G., Reis, A. S., Santos, T. C. D., Coube, C. S., & Leitão, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. *Phytotherapy research*, 15(2), 127-130. 2001.
- [23] Singh, G., Marimuthu, P., De Heluani, C. S., Catalan, C. A. Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(1), 174-181. 2006.
- [25] Oyedeji, O. A., & Afolayan, A. J. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Centella asiatica*. Growing in South Africa. *Pharmaceutical Biology*, 43(3), 249-252, 2005.
- [26] Singh, G., Marimuthu, P., De Heluani, C. S., & Catalan, C. A. Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components. *Journal of agricultural and food chemistry*, 54(1), 174-181, 2006.
- [27] Rashid, S., Rather, M. A., Shah, W. A., & Bhat, B. A. Chemical composition, antimicrobial, cytotoxic and antioxidant activities of the essential oil of *Artemisia indica* Willd. *Food chemistry*, 138(1), 693-700, 2013.
- [28] Ortega-Ramirez, L. A., Rodriguez-Garcia, I., Leyva, J. M., Cruz-Valenzuela, M. R., Silva-Espinoza, B. A., Gonzalez-Aguilar, G. A., Ayala-Zavala, J. F. Potential of medicinal plants as antimicrobial and antioxidant agents in food industry: a hypothesis. *Journal of food science*, 79(2), R129-R137. 2014.
- [29] Sabudak, T., Ozturk, M., Goren, A. C., Kolak, U., & Topcu, G. Fatty acids and other lipid composition of five *Trifolium* species with antioxidant activity. *Pharmaceutical Biology*, 47(2), 137-141. 2009.
- [30] Madrid, A. M., Espinoza, L. J., Mellado, M. A., Osorio, M. E., Montenegro, I. J., Jara, C. E. Evaluation of the antioxidant capacity of *Psoralea glandulosa* L. (Fabaceae) extracts. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 57(3), 1328-1332, 2012.
- [31] Dong, Y., Shi, H., Yang, H., Peng, Y., Wang, M., & Li, X. Antioxidant phenolic compounds from the stems of *Entada phaseoloides*. *Chemistry & biodiversity*, 9(1), 68-79, 2012.
- [32] Berber, A., Zengin, G., Aktumsek, A., Sanda, M. A., & Uysal, T. Antioxidant capacity and fatty acid composition of different parts of *Adenocarpus complicatus* (Fabaceae) from Turkey. *Revista de Biología Tropical*, 62(1), 349-358, 2014.
- [33] Nam, S., Jang, H. W., & Shibamoto, T. Antioxidant activities of extracts from teas prepared from medicinal plants, *Morus alba* L., *Camellia sinensis* L., and *Cudrania tricuspidata*, and their volatile components. *Journal of agricultural and food chemistry*, 60(36), 9097-9105. 2012.

[34] Riachi, L. G., & De Maria, C. A. Peppermint antioxidants revisited. *Food chemistry*, 176, 72-81, 2015.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A obtenção dos extratos e identificação dos compostos químicos por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) permitiu a caracterização do composto Rutina.

A obtenção do óleo essencial e identificação dos compostos químicos por cromatografia gasosa (CG/MS) ligada ao espectro de massas permitiu a caracterização de quatorze substâncias químicas.

No teste de microdiluição em caldo pode-se observar que o óleo essencial os extratos e os padrões foram eficazes frente as bactérias testadas.

No teor dos compostos fenólicos, os extratos das folhas apresentaram a maior concentração frente ao óleo essencial.

A atividade antioxidante pelo método ABTS, o óleo essencial apresentou a maior inibição na formação de radicais livres em relação aos extratos etanólico e aquoso das folhas.

Sugestões

Para dar continuidade a este trabalho, mais estudos devem ser realizados com a Cabreúva, como avaliar a eclodibilidade larvar de ovos de *Ancylostoma spp*, dos extratos das folhas e cascas, e óleo essencial das sementes. Identificar os compostos presentes no extrato aquoso e etanólico das cascas pelo método de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência. Além disso, tem-se necessidade de avaliar segurança quanto a citotoxicidade dos extratos e óleo essencial.

Da mesma forma, deve-se avaliar o potencial alelopático dos extratos aquosos de folhas e cascas da planta *Myrocarpus frondosus* Allemão na germinação e crescimento inicial de *Allium cepa*, por meio de bioensaios laboratoriais, contribuindo para ampliar o conhecimento da alelopatia dessa espécie nativa.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVARENGA, A. L., SCHWAN, R. F., DIAS, D. R., SCHWAN-ESTRADA, K. R. F., & BRAVO-MARTINS, C. E. C. Atividade antimicrobiana de extratos vegetais sobre bactérias patogênicas humanas. **Rev Bras Pl Med**, 9(4), 86-91. 2007.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, v.350, n.1, p.103-108, 2000.

ANDRIÃO, M.A., PEREIRA, F.C.S., MARTINS, M.I.E.G., SACRAMENTO, L.V.S., Estimativas de custo de produção e rentabilidade de plantas medicinais: carqueja no município de Cajuru, Estado de São Paulo. **Informações Econômicas**, v.40, p.16-26. 2010.

ARUOMA, O.I. Methodological characterizations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, v.9-20, p.523-524, 2003.

BARBOSA, L. N. **Propriedade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne de hambúrguer bovino e teste de aceitação**. 2010. 107f. Dissertação (Mestrado em Biologia de Parasitas e Micro-organismos) Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, São Paulo.

BERGAMASCHI, K.B. **Capacidade antioxidante e composição química de resíduos vegetais visando seu aproveitamento**. 2010. 96p. Dissertação (Mestrado Ciências – Ciências e Tecnologia de Alimentos), Universidade de São Paulo, Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz”. Piracicaba, SP.

BRASIL 2006a – Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. Política Nacional de Plantas Medicinais e fitoterápicos. **Série B. Textos Básicos de Saúde**. Brasília: Ministério da Saúde. 60p.

BRASIL, Farmacopeia Brasileira. Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. v.2. 546p. Brasília, 2010.

BRUNETON, J. **Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas medicinales**. Editora Acribia. 2º ed. Parte 2, p. 227-400 Espanha, 2001.

CALIXTO, J.B., Twenty-five years of research on medicinal plants in Latin America: a personal review. **Journal of Ethnofarmacology**, v.100, p.131-134. 2005.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agentes). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CAPASSO, F. Phytotherapy: a quick reference to herbal medicine. **Springer Science & Business Media**. 2003.

CATÃO, R.M.R; CEBALLOS,B. S. O. *Listéria spp.*, Coliformes Totais e Fecais e *E. coli* no leite cru, pasteurizado de uma indústria de laticínios, no estado da Paraíba (Brasil). **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v.21, p.281-287,set-dez, 2001.

CHEW, Y. L., GOH, J. K., & LIM, Y. Y. Assessment of in vitro antioxidant capacity and polyphenolic composition of selected medicinal herbs from Leguminosae family in *Peninsular Malaysia*. **Food Chemistry**,116(1), 13-18. 2009.

CORDELL, G.A. The alkaloids, a approach. New Yorkd. **Jhon Wiley and Sons**, p.450-462, 1981.

CORREA, Jr., C. As plantas medicinais, aromáticas e condimentares e a agricultura familiar. **Horticultura Brasileira**, v.32, p.376. 2014.

COSTA, A.F., **Farmacognosia**. Volume 1, 6ª edição. Fundação Calouste Gulbenkian, Lisboa. 2002.

DALL'AGNOL, R., FERRAZ, A., BERNARDI, A. P., ALBRING, D., NÖR, C., SARMENTO, L., ... & SCHAPOVAL, E. E. S. Antimicrobial activity of some *Hypericum* species. **Phytomedicine**, v.10(6), p.511-516. 2003.

DEL FIOL, F.S.; LOPES, L.C.; TOLEDO, M.I.; BARBERATO-FILHO, S. Perfil de prescrições e uso de antibióticos em infecções comunitárias. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 43, n. 1, p. 68-72, 2010.

DEWICK, P.M. Isoflavonoids. In: Harbone, J.B. (Ed) **The flavonoids: Advances in Research since 1986**. London Ed. Chapman & Hall, p.117-237, 1994.

DZOYEM, J. P., MCGAW, L. J., & ELOFF, J. N. In vitro antibacterial, antioxidant and cytotoxic activity of acetone leaf extracts of nine under-investigated Fabaceae tree species leads to potentially useful extracts in animal health and productivity. **BMC complementary and alternative medicine**, v.14(1), p.1. 2014.

DI STASI, L.C.; OLIVEIRA, G.P.; CARVALHAES, M.A.; QUEIROZ-JUNIOR, M.; TIEN, O.S.; KAKINAMI, S.H. Medicinal plants popularly used in the Brazilian Tropical Atlantic Forest. **Fitoterapia**, v.73, p. 69-91. 2002.

DUARTE, A. F. S., HIROTA, B. C. K., DE OLIVEIRA, V. B., CAMPOS, R., MURAKAMI, F. S., MIGUEL, M. D., & MIGUEL, O. G. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana do extrato etanólico bruto e frações orgânicas obtidas a partir da casca do caule da espécie *Guettarda uruguensis* Cham. & Schtdl.(Rubiaceae). **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**,35(4). 2015.

ETHUR, L.Z., JOBIM, J.C., RITTER, J.G., OLIVEIRA, G., TRINDADE, B.S., Comercio formal e perfil de consumidores de plantas medicinais e fitoterápicos no município de Itaquí-RS. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.13, p.121-128. 2011.

FABRI, R. L., NOGUEIRA, M. S., DUTRA, L. B., BOUZADA, M. L. M., & SCIO, E. Potencial antioxidante e antimicrobiano de espécies da família Asteraceae. **Revista Brasileira de Plantas Medicinales, Botucatu** (13). Pág, 183-189. 2011.

FAUSTINO, H., GIL, N., BAPTISTA, C., & DUARTE, A. P. Antioxidant activity of lignin phenolic compounds extracted from kraft and sulphite black liquors. **Molecules**, v.15(12), p.9308-9322. 2010.

FRANKEL, E.N.; MEYER, A.S. The problem of using one dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.80, p.1925-1941, 2000.

GALES, A.C.; SADER, H.S.; RIBEIRO, J.; ZOCCOLI, C.; BARTH, A.; PIGNATARI, A.C. Antimicrobial Susceptibility of gram-Positive Bacteria Isolated in Brazilian Hospitals participating in the SENTRY Program (2005-2008). **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**. V.13, p.90-98. 2009.

GASPER, A. L. D., UHLMANN, A., VIBRANS, A. C., & SEVEGNANI, L. Structural variation of seasonal deciduous forest in Santa Catarina state and its relationship with altitude and climate. **Ciência Florestal**, v.25(1), p.77-89. 2015.

GONÇALVES, A. C., VIEIRA, A., REIS, C. A. F., & CARVALHO, D. D. Conservação de *Dimorphandra mollis* Benth.(Fabaceae) baseada na estrutura genética de populações naturais. **Revista Árvore**, Viçosa, MG, 34, 95-101. 2010.

GOTTLIEB, O.R., KAPLAN, M.A., BORIN, M.R. **Biodiversidade: um Enfoque Químico-Biológico**; Editora UERJ; Rio de Janeiro, RJ, 1996.

GUIMARÃES, D.O.; MOMESSO, L.S.; PUPO, M.T. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas para a descoberta e desenvolvimento de novos agentes. **Química Nova**, v. 33, p.667-679. 2010.

GUNN, C.R. Fruits and seeds of genera in the subfamily Mimosoideae (Fabaceae). Technical Bulletin, **United States Department of Agriculture** 1681:1-194. 1984.

HALSAN, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v.59, p.205-215, 1996.

HARBONE, J.B. **Introduction to ecological biochemistry**. 3ª edição. London: Academic, 1988.

HARBONE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, v.55, p.481-504, 2000.

JUDD, W.S., CAMPBELL, C.S., KELLOGG, E.A. & STEVENS, P.F. **Plant systematics: a phylogenetic approach**. Sinauer associates. Inc., 464 p. 1999.

LEWIS, G., SCHRIRE, B., MACKINDER, B. & LOCK, M. *Legumes of the world*. Kew, **Royal Botanic Gardens**. 577p, 2005.

LEWIS, K., Platforms for antibiotic Discovery. **Nature Reviews**, Massachusetts, vol 12, p. 371-387. 2013.

LING, L.L.; SCNEIDER, T.; PEOLPLES, A.J.; SPOERING, A.L.; ENGELS, I.; CONLON, B.P.; MUELLER, A.; SCHABERLE, T.F.; HUGHES, D.E.; EDPSTEIN, S.; JONES, M.; LAZARIDES, L.; STEADMAN, V.A.; COHEN, D.R.; FELIX, C.R.; FETTERMAN, K.A.; MILLETT, W.P.; NITTI, A.G.; ZULLO, A.M.; CHAO CHEN & KIM LEWIS. A new antibiotic kills pathogens without detectable resistance. **Nature**, v.517. 2015.

LÓPEZ-ALARCÓN, C., & DENICOLA, A. Evaluating the antioxidant capacity of natural products: A review on chemical and cellular-based assays. **Analytica chimica acta**, 763, 1-10. 2013.

LORENZI, H. **Árvores Brasileiras: Manual de Identificação e Cultivo de Plantas Arbóreas Nativas do Brasil**. V.1, 5. ed. Nova Odessa: Plantarum, V.1, 384p. 2008.

LORENZI, H; MATOS. F.J.A. **Plantas medicinais do Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2002.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P.; Brock Biology of Microorganisms, 13 ed. San Francisco: **Pearson Education**, 1152p. 2012.

MARCHIORI. J.N.C., **Dendrologia das Angiospermas: Leguminosas**. Santa Maria, Editora UFSM, 200p. 1997.

MENEGOTTO, F.R. & PICOLI, S.U. *Staphylococcus aureus* oxacilina resistente (MRSA): incidência de cepas adquiridas na comunidade (CA-MRSA) e importância da pesquisa e descolonização em hospital. **Ver. Bras. Anal Clin.**, v. 39, n. 2, p. 147-50, 2007.

MIRPOUR, M., SIAHMAZGI, Z. G., & KIASARAIE, M. S. Antibacterial activity of clove, gall nut methanolic and ethanolic extracts on *Streptococcus mutans* PTCC 1683 and *Streptococcus salivarius* PTCC 1448. **Journal of oral biology and craniofacial research**, v.5(1), p.7-10. 2015.

MOHDALY, A. A. A., SARHAN, M. A., MAHMOUD, A., RAMADAN, M. F., & SMETANSKA, I. Antioxidant efficacy of potato peels and sugar beet pulp extracts in vegetable oils protection. **Food chemistry**, v.123(4), p.1019-1026. 2010.

OURIACHI, E. E.M; TOMI, P.; BOUYANZER, A.; HAMMOUTI, B.; DESJOBERT, J.M.; COSTA, J.; PAOLINI, J. Chemical composition and antioxidante activity of essential oils and solvente extracts of *Ptychotis verticillata* from Morocco. **Food and chemical Toxicology**. V.49, p. 533-536. 2011.

OYEDEJI, O. A., & AFOLAYAN, A. J. Chemical composition and antibacterial activity of the essential oil of *Centella asiatica*. Growing in South Africa. **Pharmaceutical Biology**, 43(3), 249-252. 2005.

PEREIRA, V., DIAS, C., VASCONCELOS, M. C., ROSA, E., & SAAVEDRA, M. J. Antibacterial activity and synergistic effects between *Eucalyptus globulus* leaf residues (essential oils and extracts) and antibiotics against several isolates of respiratory tract infections (*Pseudomonas aeruginosa*). **Industrial Crops and Products**, 52, 1-7. 2014.

PAWLAK, W.; KEDZIORA, J.; ZOLYNSKI, K.; KEDZIORA-KOMATOWSKA, K.; BLASZAZYK, J.; WITKNOWSKI, P. & ZICLENIEWSKI, J. Effect of long term bed rest in man on enzymatic antioxidative defence and lipid peroxidation in eritrocytes, **J. Gravit. Physiol.** V.1: 163-4, 1998.

RANG, H.P.; DALE, M.M.; RITTER, J.M. **Farmacologia**, 3ª edição. Guanabarra Koogan, Rio de Janeiro, 692p. 1997.

REIS, F. B., DE SOUZA, V. M., THOMAZ, M. R., FERNANDES, L. P., DE OLIVEIRA, W. P., & DE MARTINIS, E. C. Use of *Carnobacterium maltaromaticum* cultures and hydroalcoholic extract of *Lippia sidoides* Cham. against *Listeria monocytogenes* in fish model systems. **International journal of food microbiology**, 146(3), 228-234. 2011.

REGO, J. C., STAMFORD, T. L. M., PIRES, E. M. F., & DA SILVA JR, E. A. **Proposta de um programa de boas práticas de manipulação e processamento de alimentos para unidades de alimentação e nutrição. QUALIDADE E SEGURANÇA DE ALIMENTOS EM UNIDADES DE ALIMENTAÇÃO E NUTRIÇÃO**, 60. 2001.

RIBEIRO, J.E.L. da S. et al. **Flora da Reserva Ducke: Guia de identificação das Plantas Vasculares de uma Floresta de Terra-Firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA. 396-397 p. 1999.

ROBARDS, K.; ANTOLOVICH, M.; PRENZLER, P. D.; PATSALIDES, E.; MCDONALD, S. Methods for testing antioxidant activity. **The Analyst**. v.127, p. 183-198, 2002.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**. Editora Williams & Wiilkins. p. 137- 141, Maryland - United States of America, 1997.

SABUDAK, T., OZTURK, M., GOREN, A. C., KOLAK, U., & TOPCU, G. Fatty acids and other lipid composition of five *Trifolium* species with antioxidant activity. **Pharmaceutical Biology**, 47(2), 137-141. 2009.

SÁNCHEZ-MORENO, C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Science and Technology International**, v.8, p.121-137, 2002.

SARTORI, A.L.B. & TOZZI, A.M.G.A. Comparative leaflet anatomy in *Myrocarpus* Allemão, *Myroxylon* L.f. and *Myrospermum* Jacq. (Leguminosae-Papilionoideae-Sophoreae) species. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.140, p.249-259. 2002.

SARTORI, A. L., DE AZEVEDO TOZZI, A. N. A., & MARIA, G. Comparative leaflet anatomy in *Myrocarpus* Allemão, *Myroxylon* L. f and *Myrospermum* Jacq.(Leguminosae-Papilionoideae-Sophoreae) species. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v.140(3), p.249-259. 2002.

SILVA, J.P.L. Óleo essencial de orégano: interferência da composição química na atividade frente a *Salmonella Enteritidis*. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, v. 30, p. 136-141. 2010.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 552p. 2007.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; MELLO, J.C.P.; GOSMANN,G.; MENTZ,L.A.; PETROVICZ, P.R.: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 6 ed.- Porto Alegre: Ed da UFRGS; Florianópolis: Ed da UFSC, 2010.

SINGH, G., MARIMUTHU, P., DE HELUANI, C. S., & CATALAN, C. A. Antioxidant and biocidal activities of *Carum nigrum* (seed) essential oil, oleoresin, and their selected components. **Journal of agricultural and food chemistry**, 54(1), 174-181, 2006.

SOARES-SILVA, L. H.; SILVA, F. C. Arboreal flora of the Godoy Forest State Park, Londrina, PR. Brazil. **EDINB. J. BOT.** v.57(1), p.107-120, 2000.

SOUSA, C. D. M., SILVA, H. R., VIEIRA-JR, G. M., AYRES, M. C. C., COSTA, C. D., ARAÚJO, D. S., ... & CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química nova**, v.30(2), p.351-355. 2007.

SOUZA, V.C.; LORENZI, H. **Botânica Sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2. Ed. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum, 2008.

SOUZA-MOREIRA, T.M., SALGADO, H.R.N., PIETRO, R.C.L.R., O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.20, p.435-440. 2010.

STASI, L.C.D; HIRMA-LIMA, C.A. **Plantas medicinais na Amazônia e na mata atlântica**. Editora Unesp. 2ª edição ver. e amp., p.303, 2002.

STEARN, W.T.. Redwood Press Limited Trowbridge, Wiltshire. Systematics: a phylogenetic approach. Sinauer Associates, Sunderland. **Botanical Latin**. 1973.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 3ª edição. Porto Alegre: Artmed, 719p. 2004.

TAVARES, W. **Manual de antibioticos e quimioterapicos antiinfecciosos**. 3ª ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

TEUSCHER, E. **Pharmazeutische Biologie**. Braunschweig: Vieweg, 1990.

VADLAPUDI, V. Absence of anti fungicidal activity of few Indian medicinal plants methanolic extracts. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v.2, p.393-395. 2012.

VARGAS, A.C.; LOGUERCIO, A.P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcoólico de própolis. **Ciência Rural**, v.34, n.1, p.159-163, 2004.

ZUANAZZI, J. A. S. **Farmacognosia da Planta ao medicamento**. Ed. da UFSC. 3ª edição, p. 499 - 517, Santa Catarina, 2007.

WINK, M. **Physiology of secundar product formation in plants**. In: CHARLWOOD, B.V.; RHODES, M.J.C. Secondary products from plants tissue culture. Oxford: Clarendon, 1990.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Antimicrobial resistance: global report on surveillance. **World Health Organization**. 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) - **The world medicines situation, Traditional medicines: global situation, issues and challenges**. Geneva. 12p. 2011.