



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS - UFGD
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS – FCBA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Allan Belarmino Rodrigues

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE,
COMPOSIÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DA CASCA
DE CANELA VASSOURA (*Ocotea minarum*).**

Dourados, MS
Novembro, 2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS - UFGD
FACULDADE DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E AMBIENTAIS – FCBA
CURSO DE BIOTECNOLOGIA

Allan Belarmino Rodrigues

**INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE,
COMPOSIÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DA CASCA
DE CANELA VASSOURA (*Ocotea minarum*).**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais para a obtenção do título de Bacharel em Biotecnologia, com orientação da Prof.^a Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira.

Dourados, MS
Novembro, 2014

ALLAN BELARMINO RODRIGUES

“INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E
ANTIOXIDANTE, COMPOSIÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE E
CITOTOXICIDADE DA CASCA DE CANELA VASSOURA (*Ocotea minarum*).”

Aprovado em: __/__/__

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira

Universidade Federal da Grande Dourados

Prof^a. Dra. Alexéia Barufatti Grisólia

Universidade Federal da Grande Dourados

Prof. Dr. Jonas da Silva Mota

Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul

AGRADECIMENTOS

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

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

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

A Prof. Dra. Andréia Sangalli que me apresentou a planta a ser estudada.

Ao Prof. Dr. Jonas por ter me ajudado na parte de caracterização química do extrato analisado.

A Priscila e o Bruno pelos ensinamentos e auxílio no teste de mutagenicidade.

A Bruna, Adriana e Fabi pelos ensinamentos e auxílios no laboratório e em todos os testes realizados neste trabalho.

Ao Vagner, Danny e a Taiane por ajudarem na reta final do trabalho.

Aos meus amigos e colegas de turma que me ajudaram e incentivaram durante a minha graduação e na conclusão desse trabalho.

A todos os professores do curso, que foram de fundamental importância na minha vida acadêmica.

A UFGD, a UEMS, a FUNDECT e ao CNPq pelo apoio financeiro da pesquisa.

E a todos que direta ou indiretamente me ajudaram, me incentivaram, fez parte da minha formação acadêmica, o meu profundo obrigado.

“Vamos à presença Dele com ações de graças;
vamos aclamá-lo com cânticos de louvor.

Pois o Senhor é o grande Deus,
o grande Rei acima de todos os deuses.”

Salmos 95: 2-3

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIMBOLOS

1. INTRODUÇÃO.....	10
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	11
2.1 Cerrado Brasileiro.....	11
2.2 Plantas medicinais e fitoterápicos.....	12
2.3 <i>Ocotea minarum</i>	13
2.4 Atividades tóxicas.....	14
3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS.....	16
3.1 Objetivo Geral.....	16
3.2 Objetivos Específicos.....	16
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	17
5. ANEXOS.....	22
5.1 Artigo.....	22

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$. Atividade Antioxidante (AA) em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato etanólico de *Ocotea minarum*.....29
- Tabela 2.** Concentrações do extrato de *Ocotea minarum* em mg mL^{-1} utilizadas no teste de *Allium cepa*. Média das anomalias cromossômicas (AC). Média do índice mitótico. Valores estatísticos de *p* para o número de alterações. Valores estatísticos de *p* para o índice mitótico.....33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Aspectos morfológicos dos frutos, casca e folhas da <i>Ocotea minarum</i>	14
Figura 2. Cromatograma (254 nm) do extrato etanólico de <i>Ocotea minarum</i> via CLAE (DAD).....	30
Figura 3: Espectros de UV dos picos 6,512-14,859 minutos.....	31
Figura 4: Espectros de UV do ácido strictosidínico.....	31
Figura 5. Índice de germinação das sementes de <i>Allium cepa</i> em resposta ao tratamento etanólico da casca de <i>Ocotea minarum</i> , nas concentrações de 0,2; 0,3 e 0,5 mg mL ⁻¹ , controle positivo (CP) e negativo (CN).....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<i>AcOH</i>	Ácido acético
ATCC	American Type Culture Collection
AC	Anomalia Cromossômica
BHI	Brain Heart Infusion
BHT	Butil-hidroxi-tolueno
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CFM	Concentração Fungicida Mínima
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CLSI	Clinical and Laboratory Standards Institute
CMR	Comprimento Médio das Raízes
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
cm	Centímetros
DAD	Detector de Arranjo de Diodos
DMSO	Dimetilsulfóxido
DPPH	1,1 – difenil – 2 picril – hidrazila
FCBA	Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais
g	Gramas
HPLC	High-performance Liquid Chromatography
IAC	Índice de Anomalias Cromossômicas
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IC50	Índice de citotoxicidade para 50% da população em estudo
IG	Índice de Germinação

IM	Índice Mitótico
Km ²	Quilômetros quadrados
Mg	Miligramas
Min	Minutos
mL	Mililitros
mM	Milimolar
MMA	Ministério do Meio Ambiente
nm	Nanômetros
OMS	Organização Mundial de Saúde
PI	Percentual de Inibição
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SSE	Solução Salina Estéril
TC	Tratamento Contínuo
TD	Tratamento Descontínuo
UFC	Unidade Formadora de Colônias
UFGD	Universidade Federal da Grande Dourados
UV	Espectroscopia UV
V	volume
λ	Comprimento de onda
Ø	Diâmetro
°C	Graus Celsius
µg	Microgramas
µL	Microlitro

1. INTRODUÇÃO

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

A busca por substâncias com potencial antimicrobiano, antioxidante e outras propriedades biológicas, tem se direcionado para os produtos naturais, devido à viabilidade e acessibilidade. As plantas para se adaptar as agressões ocasionadas pelo meio ambiente, produzem diversas substâncias naturais, tais como metabólitos secundários, e grande parte dos medicamentos tem origem a partir destas substâncias orgânicas (Da Silva, 2010; Barbosa, 2008; Croteau et al., 2000; Simões et al., 2000).

Devido à capacidade dos microrganismos adquirirem resistência aos antimicrobianos e as doenças infecciosas estarem ocupando uma posição preocupante no cenário mundial de morbidade e mortalidade, a busca por novas substâncias com atividades biológicas se faz necessário (Ayres et al., 2008; Packer et al., 2007; Lima et al., 2006).

Várias espécies de plantas são utilizadas com fins terapêuticos popularmente e a partir deste conhecimento popular, estudos científicos são necessários para avaliar as ações terapêuticas ou tóxicas de biomoléculas presentes nas plantas (Barbosa, 2008).

Relatos do uso popular medicinal de espécies do gênero *Ocotea*, têm despertado interesse por esta espécie. Alguns relatos do uso popular da casca e folha dessas espécies são *O. pulchella* Mart., para ações estomáquicas e emenagogas; a casca de *O. indecira* Schott, como sudorífica e antirreumática tem sido descritas. (Da Silva, 2010; Marques, 2001). Desta forma, avaliar a *O. minarum*, espécie comum em nossa região, busca de novas biomoléculas com ação farmacológica, antimicrobiana, antioxidantes e verificar sua toxicidade se faz necessário.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Cerrado Brasileiro

O Cerrado abrange uma área com cerca de 2,04 milhões de Km² ocupando 25% do território brasileiro, sendo classificado com o segundo maior bioma do Brasil, ficando atrás apenas da Mata Atlântica. Sua área engloba os Estados de Minas Gerais, Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Bahia, Tocantins, Maranhão, Piauí, Paraná, Rondônia e Mato Grosso do Sul (Santos et al., 2010; Oliveira, 2011; Sano et al., 2008). É encontrado no Cerrado um terço da biodiversidade brasileira e cerca de 5% da flora e fauna mundial, onde há nesse bioma uma diversidade de 160.000 espécies de plantas, fungos e animais (Oliveira, 2011; Silva et al., 2006; Klink et al., 2005).

A flora e a fauna do Cerrado brasileiro têm sido amplamente exploradas pelo conhecimento popular, e esse aproveitamento de plantas medicinais vem crescendo sistematizadamente devido a organizações e associações comunitárias produzirem medicamentos fitoterápicos como: xaropes, pomadas, entre outros. Porém ainda existe grande carência de pesquisas para avaliação de plantas com propriedades biológicas no Cerrado (Souza et al., 2006).

O fato do número de pesquisas com plantas medicinais no Cerrado serem pequenas, se torna preocupante quando dados apontam que esse bioma é o mais ameaçado na atualidade, com uma taxa de desmatamento anual de 0,7% na última década (MMA, 2010) e que menos da metade da sua área original ainda está conservada, pois perdeu muito espaço para atividades de agronegócios (Garcia et al., 2011). Apenas 9,4% da extensão do cerrado são protegidos por lei, assim correndo grande risco de extinção no país (IBAMA, 2009).

Apesar do Brasil possuir a maior diversidade vegetal do mundo as informações sobre plantas medicinais crescem cerca de 8% ao ano (Azevedo, 2008; Guarim-Neto et al., 2003). Apenas 17% de toda biodiversidade mundial possuem estudos quanto a seu potencial para novos fitoterápicos e fitomedicamentos, e em grande maioria, sem profunda investigação sobre seus aspectos farmacológicos e fitoquímicos, abrindo caminhos para uma nova tendência mundial, a utilização de fitoterápicos (Foglio et al., 2006; Hostettmann et al., 2003), pois podem elevar de forma notável a elevação do PIB nacional, visto que cerca de 25% dos medicamentos atuais possuem extratos de plantas em sua composição (Foglio et al., 2006; Soyama, 2007).

Ainda sobre o Cerrado, estudos demonstraram que a gama e o potencial de compostos bioativos produzidos por espécies desse bioma são maiores que os do bioma da Floresta Amazônica (Gottlieb et al., 1994). Utilizando métodos semelhantes de extração fitoquímica, as espécies do Cerrado apresentam ampla diversidade de compostos em pequenas concentrações e as espécies da Floresta Amazônica apresentam poucos compostos, porém em maiores concentrações (Guterres, 2008; Neto et al., 2003; Kaplan et al., 1994).

2.2 Plantas medicinais e fitoterápicos

O termo planta medicinal é definida pela Organização Mundial da Saúde (OMS) com “todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais órgãos, substâncias que podem ser utilizadas com fins terapêuticos ou que sejam precursores de fármacos semissintéticos” (Veiga Júnior, 2005). Conforme a Portaria nº 6, da Secretaria de Vigilância Sanitária, medicamentos fitoterápicos são obtidos a partir de matéria-prima vegetal com finalidade curativa, profilática ou para fins de diagnóstico, por conta da substância ativa, com benefício para o usuário (Castellucci et al., 2000).

Os fitomedicamentos são utilizados pelos seres humanos desde o início de sua história, onde as mulheres das tribos extraíam os princípios ativos das plantas para tratamentos e/ou cura de doenças (Oliveira, 2011). Com a Química Experimental do século XIX, substâncias sintéticas substituíram em sua maioria o uso de plantas na medicina popular (França et al., 2008). A população rural ou desprovida de recursos, não tinha acesso a essas drogas sintética e como alternativa econômica viável continuavam a utilizar as plantas medicinais (Oliveira, 2011; Veiga Junior, 2008).

O uso de extratos de plantas e suas formas alternativas para tratamentos de doenças tem ganhado destaque na indústria farmacológica, devido um aumento expressivo da resistência de microrganismos a antibióticos e antifúngicos e também a necessidade de novos tratamentos para organismos patógenos (Junior et al., 2009; Mahady, 2005). Com isso, as plantas medicinais são utilizadas para tratamentos simples, baseados em conhecimentos empíricos acumulados, até a fabricação de remédios (Giraldiet al., 2010; Oliveira et al., 2007).

Existem maneiras corretas para o preparo e extração dos princípios ativos de uma planta. Assim para cada parte da planta a ser utilizada ou doença a ser tratada, há uma metodologia de preparo e uso mais adequada e dessa maneira os efeitos colaterais

ocasionados pelos fitoterápicos serão minimizados, desde que na dosagem correta (Arnous et al., 2005; Calixto, 2000). Para utilização das plantas medicinais, alguns critérios podem ser estabelecidos, como: baseadas em quais partes serão utilizadas, baseado nos hábitos, baseado no habitat e ainda baseada no valor terapêutico (Joy et al., 1998).

2.3 Ocotea minarum

A família *Lauraceae* pode ser considerada fundamental para economia de alguns povoados rurais, pois podem ser utilizada como fonte de madeira para construção de móveis e alvenaria, para obtenção de aromas, para obtenção de perfumes, medicamentos caseiros entre outros produtos (Chaverri et al., 2011).

O gênero *Ocotea* está entre os mais expressivos da família *Lauraceae*, contendo cerca de 300 a 400 espécies de plantas (Batista et al., 2010; Van Der Werff, 2002), estão bem distribuídas em todo território nacional e despertam amplo interesse farmacológico, pois alcalóides aporfinóides, lignanas e neolignanas encontrados comumente nesse gênero apresentam variadas atividades biológicas (ZANIN et al., 2007).

Ocotea minarum (Meissn.) Mez., (figura 1.) conhecida popularmente como “canela vassoura” ou “canelinha”, pertence à família *Lauraceae*. É uma árvore de porte médio, podendo chegar até 22 m de altura, com frutos grandes e aroma característico (Chaverri et al., 2011). É nativa do cerrado, ocorrendo nos Estados de Minas gerais, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso, São Paulo, Paraná e Goiás. Muito utilizada na medicina popular como antirreumática, depurativas e sudoríferas (Moraes, 2005).

Em estudos anteriores, foram identificados nas folhas, frutos e casca da *O. minarum*, substâncias de sete classes químicas: alcalóide indólico, flavonóides e biflavonóides, cumarina, sesquiterpeno, esteróides, alquil benzeno e lignana (Garcez, 2005). É válido ressaltar que em extratos brutos, geralmente os constituintes ativos estão em concentrações baixas (SchenkeL et al., 2000).



Figura 1. Aspectos morfológicos dos frutos, casca e folhas da *Ocotea minarum*. Fontes: A - Voucher: D. Sasaki et al. 2000 - Brazil: Mato Grosso. B - Voucher: D. Sasaki et al. 2297 - Brazil: Mato Grosso. C - Voucher: D. Sasaki et al. 2297 - Brazil: Mato Grosso. Disponíveis em: <http://www.kew.org/science/tropamerica/>, acesso em 06/11/2014.

2.4 Atividades tóxicas e citotóxicas

O homem faz uso de plantas medicinais para realizar tratamentos e curar doenças a mais de 50.000 anos, e com experiências e observações, notou-se que os fitoterápicos podem causar alucinações e até mesmo a morte (Oliveira, 2011; Devienne et al., 2004). A prática de utilização de plantas medicinais cresceu notavelmente devido o baixo custo, a facilidade de obtenção, a crença que tudo que é natural é inofensivo e não trás efeitos colaterais (Oliveira et al, 2007).

Uma planta é tóxica quando substâncias de propriedades naturais, físicas, químicas e físico-químicas, alteram o funcionamento orgânico. E assim podendo produzir reações biológicas diversas no homem devido à incompatibilidade vital (Vasconcelo et al, 2009). Substâncias mutagênicas afetem o processo biológico do

organismo, como alterações cromossômicas e na transcrição e duplicação gênica, podendo levar a morte celular. E as substâncias genotóxicas causam danos e lesões no material genético (Poletto et al., 2011).

Para avaliar os efeitos de toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade (Guterres et al., 2012), o ensaio realizado com micronúcleo em medula óssea de roedores é recomendado por agências internacionais (Ribeiro et al., 2003; Tagliati et al., 2008), devido os resultados obtidos serem equivalentes ao contexto humano (Morita et al., 1997). O teste de *Allium cepa* também pode ser utilizado para avaliação toxicológica, pois a semente de *Allium cepa* fica em contato direto com a substância estudada (Macedo et al., 2008).

O princípio ativo requisitado para o uso, nem sempre pode ser extraído com os métodos caseiros utilizados pela população. A toxidade do vegetal pode variar devido a algumas condições ambientais e em relação às dosagens ingeridas (Viveiro, 2011). A maioria dos efeitos colaterais registrados é extrínseca a preparação a preparação do extrato (Calixto, 2000), onde a falta de cuidados durante a coleta e no processamento do material, pois pode haver plantas contaminantes, fungos e bactérias presentes no material vegetal. Assim, podendo resultar em danos ao ser humano após sua utilização (Souza-Moreira et al., 2010; Arnous et al., 2005).

3. OBJETIVOS GERAIS E ESPECÍFICOS

3.1 Objetivo Geral

Investigar a atividade antimicrobiana e antioxidante, identificar a classe de metabólitos secundários presente no extrato e os efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico do extrato etanólico da casca de *Ocotea minarum*.

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a ação do extrato etanólico da casca de *Ocotea minarum* frente a bactérias e leveduras de interesse clínico.
- Avaliar a atividade antioxidante do extrato etanólico da casca de *Ocotea minarum*, *in vitro*, por meio do ensaio 1,1 – difenil – 2 picril – hidrazila (DPPH).
- Identificar a classe de metabólitos secundários presentes no extrato etanólico da casca de *Ocotea minarum*.
- Avaliar a genotoxicidade, citotoxicidade e toxicidade do extrato etanólico da casca de *Ocotea minarum*.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arnous AH, Santos AS, Beininger RPC. (2005). Plantas medicinais de uso caseiro. Conhecimento popular e Interesse por cultivo comunitário. Rev. Espaço para a Saúde, vol. 6, n. 2, p. 1-6.
- Artuso A (2002). Bioprospecting, Benefit Sharing, and Biotechnological Capacity Building. World Development, vol. 30, n. 8, p. 1355-1368.
- Azevedo MAM (2008). Análise da valoração dos impactos ambientais e da demanda de fitoterápicos oriundos do maracujá no Brasil. Rev. FAE, Curitiba, vol.11, n.1, p.19-32.
- Ayres MCC, Brandão MS, Vieira-Júnior GM, Menor JCAS, Silva HB, Soares MJS, Chaves MH (2008). Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos de raiz de *Copernicia prunifera*. Rev. Brasileira de Farmacognosia, vol. 18, n. 1.
- Barbosa DB (2008). Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae). Dissertação apresentada para título de Mestre em Genética e Bioquímica. Uberlândia – MG.
- Batista ANL, Junior JMB, López SN, Furlan M, Cavalheiro AJ, Silva DHS, Bolzani VS (2010). Aromatic compounds from three Brazilian Lauraceae species. Quim. Nova, vol. 33, n. 2, p. 321-323.
- Calixto JB (2000). Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). Brazilian Journal of Medical and Biological Research, vol. 33, p. 179-189.
- Castellucci S, Lima MIS, Nordi N, Marques JGW (2000). Plantas medicinais relatada pela comunidade residente na Estação Ecológica de Jataí, Município de Luís Antônio/SP: uma abordagem etnobotânica. Rev. Bras. Pl. Med., vol. 3, n. 1, p. 51-60.
- Chaverri C, Díaz C, Ciccio JF (2011). Chemical Analysis of Essential Oils from *Ocotea gomezii* W.C. Burger and *Ocotea morae* Gómez-Laur. (Lauraceae) Collected at “Reserva Biológica Alberto M. Brenes” in Costa Rica and their Cytotoxic Activity on Tumor Cell Lines. J. Braz. Chem. Soc., vol. 22, n. 4, p. 741-745.
- Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000). Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Biologists, p. 1250-1318.

Da Silva LMGE (2010). Estudo químico biomonitorado por ensaio com larvas *Aedes aegypti* das espécies *Ocotea velloziana* (Meins.) Mez. E *Aiouea trinervis* (Meisn.). Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Campo Grande – MS.

Devienne KF, Raddi MSG, Pozetti GL (2004). Das plantas medicinais aos fitofármacos. Rev. Bras. Pl. Med., vol. 6, n. 3, p.11-14.

Foglio MA, Queiroga AL, Sousa LMO, Ferreira RA (2006). Plantas medicinais como fonte de recursos terapêuticos: um modelo multidisciplinar. Divisão de Fitoquímica, CPQBA/UNICAMP.

França ISX, Souza JÁ, Baptista RS, Britto VRS (2008). Medicina Popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. Rev. Bras. Enferm. vol. 61, n. 2, p. 201-208.

Garcez WS, Garcez FR, Silva LMGE, Shimabukuro AA (2005). Indole Alkaloid and other Constituents from *Ocotea minarum*. J. Braz. Chem. Soc., vol. 16, n. 6B, p. 1382-1386.

Garcia FN, Ferreira LG, Leite JF (2011). Áreas protegidas no bioma cerrado: fragmentos vegetacionais sob forte pressão. Anais XV Simpósio Brasileiro de sensoriamento remoto – SBSR, Curitiba, PR, Brasil, INEPE p.4086.

Giraldi M, Hanasaki N (2010). Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão de Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. Acta. bot. Bras., vol. 24, n. 2, p. 395-406.

Guarim Neto G, Morais RG (2003). Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. Acta bot. bras. vol. 17, n. 4, p. 561-584.

Guterres ZR (2008). Investigação das atividades mutagênicas, antimutagenicas e antioxidante de extratos etanólicos de *Aiouea trinervis*, *nectranda cissiflora*, *Ocotea minarum* (Lauraceae) e dos Alcalóides Triptol, Ocoteína e Dicentrina. Dissertação apresentada para título de Doutor em Genética e Bioquímica. Uberlândia – MG.

Gottlieb OR, Borin MRMB (1994). The diversity of plants. Where is it? Why is it there? What will it become? Anais da Academia Brasileira de Ciências 66 (Supl. 1 - Parte I): p. 205-210.

Hostettmann KEF, Queiroz PCV (2003). A importância das plantas medicinais: Princípios ativos de plantas superiores. Série de textos da Escola de Verão em Química-IV, São Carlos, SP, Ed. UFSCar, p. 152.

IBAMA. Unidades de Conservação. IBAMA, 2009. Disponível em: <http://www.ibama.gov.br/zoneamentoambiental/ucs/>. Acesso em: 11/2014.

Joy PP, Thomas J, Mathew S, Skaria BP (1998). Medicinal plants. Kerala: Kerala Agricultural University/Aromatic and Medicinal Plant Research Station.

Junior IFS, Filho VC, Xacchino SA, Lima JCS, Martins DTO (2009). Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. Rev. Journal of Pharmacognosy vol. 19, n. 1B, p. 242-248.

Kaplan MAC, Figueiredo MR, Gottlieb OR (1994). Chemical diversity of plants from Brazilian Cerrados. Anais da Academia Brasileira de Ciências 66 (Supl. 1 - parte I), p. 50-55.

Klink CA, Machado RB (2005). A conservação do cerrado brasileiro. Mega diversidade, vol. 1, n. 1, p. 147-155.

Lima MRF, Ximenes CPA, Luna JS, Sant'Ana AEG (2006). The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. Rev. Bras. Farmacogn. vol. 16, p. 300-306.

Macedo MFS, Sisenando HAAACN, Queiroz JDF, Argolo ACC, Saturnino ACRD, Coelho LCBB, Medeiros SRB (2008). Determining the genotoxicity of an aqueous infusion of *Bauhinia monandra* leaves. Rev. Bras. de Farmacognosia, vol. 18, p. 509-16.

Mahady GB (2005). Medicinal plants for the prevention and treatment of bacterial infections. Curr Pharm. Des. vol. 11, p. 2405-2427.

Marques CA (2001). Importância econômica da família *Lauraceae* Lindl. Rev. Floresta e Ambiente. vol. 8, n. 1, p. 195-206.

MMA. Plano de Ação para Prevenção e Controle do Desmatamento e das Queimadas no Cerrado: Conservação e Desenvolvimento. Brasília, 2010.

Moraes PLR (2005). Biota Neotrop. vol. 5, n. 1.

Morita T, Asano N, Sasaki YF, Sato S, Shimanada H, Sutou S, Suzuki T, Wakata A, Sofuni T, Hayashi M (1997). Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens. Mutation Research, vol. 389, p.3-122.

Newman DJ, Cragg GM (2007). Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. J. Nat. Prod. vol. 70, p. 461-477.

Oliveira HWC (2011). Cerrado e Plantas Medicinais: Algumas reflexões sobre o uso e a conservação. Planatina – DF.

Oliveira ALS, Figueiredo ADL (2007). Prospecção fitoquímica das folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosae). Rev. Bras. Biociências, vol. 5, supl. 2, p. 384-386.

Packer JF, Luz MMS (2007). Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. Rev Bras Farmacogn vol. 17, p. 102-107.

POletto PO, Diniz AP, Bernadon B, Zan RA, Ramos LJ, Meneguetti DUO (2011). Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris rariflora* (Mart. Ex Benth. J. F. Macbr: *Fabaceae*), timbó amazônico, através do teste micronúcleo em *Allium cepa*. Ver. Pesquisa & Criação, vol. 10, n. 1, p. 163-175.

Ribeiro LR, Salvatori DM, Marques EK (2003). Mutagênese ambiental. Rio Grande do Sul: Ulbra, p. 355.

Sano EE, Rosa R, Brito JLS, Ferreira LG (2008). Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. Pesquisa Agropecuária Brasileira, vol. 43, n. 1, p.153-156.

Santos MA, Barbieri AF, Carvalho JAM, Machado CJ (2010). O Cerrado Brasileiro: notas para estudo. Belo Horizonte: UFMG/Cedeplar.

Schenkel EP, Gosmann G, Petrovick PR (2000). Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos. In: Simões, C. M. O.; Schenkel, E .P.; Gosmann, G. M.; Mello, J. C. P.; Mentz, L. A.; Petrovick, P. R., orgs. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 2.ed. Florianópolis. UFSC; Porto Alegre: UFRGS, cap.15, p. 291-320.

Silva JF, Fariñas MR, Felfili JM, Klink CA (2006). Spatial heterogeneity, land use and conservation in the cerrado region of the Brazil. J. Biogeogr., vol. 33, p. 536-548.

Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (org.) (2000). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre/Florianópolis: Editora Universidade/UFRGS. Editora da UFSC, p. 323-354.

Souza-Moreira TM, Salgado HRN, Pietro RCCR (2010). O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. Rev. Bras. Farmacogn., vol. 20, n. 3, p. 435-440.

- Souza CD, Felfili JM (2006). Uso de plantas medicinais na região de Alto Paraíso de Goiás, GO, Brasil. *Acta bot. bras.* vol. 20, n. 1, p. 135-142.
- Soyama P (2007). Plantas medicinais são pouco exploradas pelos dentistas, *Ciência e Cultura*. São Paulo, vol. 59, n. 1, p. 12-13.
- Tagliati CA, Silva RP, Féres CAO, Jorge RM, Rocha AO, Braga FC (2008). Acute and chronic toxicological studies of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina®. *Rev. Bras. de Farmacognosia*, vol.18, p. 676-82.
- Van Der Werff, H. (2002). *Ann. Missouri Bot. Gard.* vol. 89, n. 429.
- Vasconcelo J, Vieira JGP, Vieira EPP (2009). Plantas tóxicas: conhecer para prevenir. *Rev. Científica da UFPA*, vol. 7, n. 1.
- Veiga Junior VF, Pinto AC (2005). Plantas medicinais: cura segura? *Química Nova*, vol. 28, n. 3, p. 519-528.
- Veiga Junior VF (2008). Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. *Rev. Bras. Farmacogn.*, vol. 18, n. 2, p. 308-313.
- Violante IMP, Hamerski L, Garcez WS, Batista AL, Chang MR, Pott VJ, Garcez FR (2012). Antimicrobial activity of some medicinal plants from the cerrado of the central-western region of Brazil. *Brazilian Journal of Microbiology*, p. 1302-1308.
- Viveiro AA (2011). Atividades de campo como estratégia para a educação ambiental: potencialidades do Jardim Botânico de Bauru-SP. In: Matheus, C. E. *Educação ambiental: múltiplos olhares e saberes*. São Carlos: CRHEA/USP.
- Zanin SM, Lordello ALL (2007). Alcalóides aporfinoídes do gênero *Ocotea* (*Lauraceae*). *Química Nova*, vol. 30, p. 92-98.

5. ANEXOS

5.1 ARTIGO

INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL ANTIMICROBIANO E ANTIOXIDANTE, COMPOSIÇÃO QUÍMICA, TOXICIDADE E CITOTOXICIDADE DA CASCA DE CANELA VASSOURA (*Ocotea minarum*).**XXX¹, XXX², XXX³**

Universidade Federal da Grande Dourados, UFGD - Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais.
Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, UEMS – Centro de Pesquisa em Biodiversidade - CPBIO
Rodovia Dourados – Itaum Km 12. 798000-000 Dourados MS.

* Artigo estruturado segundo normas da Revista Journal of Medicinal Plants Research.

RESUMO

Ocotea minarum (*Lauraceae*) conhecida popularmente como canela vassoura, é empregada na medicina popular para o tratamento de diversas doenças, como propriedades antirreumática e sudorífera. O objetivo do trabalho foi investigar a atividade antimicrobiana pelo teste de microdiluição em caldo, avaliar a atividade antioxidante pelo ensaio com o radical DPPH, identificar a classe dos metabólitos secundários por cromatografia líquida de alta eficiência e os efeitos citotóxico e tóxico pelo teste de *Allium cepa* do extrato etanólico da casca de *Ocotea minarum*. O extrato etanólico da casca da *O. minarum* apresentou atividade antimicrobiana frente à *Candida tropicalis* ATCC 750 com ação inibitória de 256 $\mu\text{g mL}^{-1}$, porém quando testado frente a bactérias e isolados clínicos de *C. tropicalis*, o extrato não apresentou resultados de atividade antimicrobiana. O extrato apresentou elevada atividade antioxidante com IC50 de 25,94 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O perfil fitoquímico indicou presença de fenóis (31,29 mg g^{-1}), flavonoides (16,52 mg g^{-1}) e taninos (6,52 mg g^{-1}) e os espectros de UV apresentaram semelhança com a classe de alcalóide indólicos. Não foi detectada toxicidade e citotoxicidade por meio da técnica de *Allium cepa*. Assim esse estudo pode ser um ponto de partida para novas pesquisas para o desenvolvimento de novos agentes antioxidantes.

Palavras-chave: canela vassoura, medicina popular atividade antimicrobiana, alcalóide indólicos.

Abstract: *Ocotea minarum* (Lauraceae) popularly known as “canaleta vassoura”, is used in popular medicine to treat various diseases such as antirreumática and sudorífera properties. The objective was to investigate the antimicrobial activity by microbroth dilution assay to evaluate the antioxidant activity by DPPH test, identify secondary metabolites by liquid chromatography high efficiency and cytotoxic and toxic effects by *Allium cepa* test the ethanol bark extract's *Ocotea minarum*. The ethanol extract from the bark of *O. minarum* presented antimicrobial activity against *Candida tropicalis* ATCC 750 with an inhibitory effect of 256 mg L⁻¹, but when tested against clinical isolates of *C. tropicalis*, the extract did not present results of antimicrobial activity. The extract showed high antioxidant activity with IC₅₀ 25.94 mg L⁻¹. The phytochemical profile indicated the presence of phenol (31.29 mg g⁻¹), flavonoids (16.52 mg g⁻¹) and tannins (6.52 mg g⁻¹) and two UV spectra peaks were similar to the spectrum strictosidinic acid, which is an indole alkaloid with analgesic and antirepáticas activities. There was no toxicity and cytotoxicity by *Allium cepa* technique. Thus, this study could be a starting point for further research for development of new antioxidants.

KEYWORDS: “canaleta vassoura”, antimicrobial activity, popular medicine, strictosidinic acid.

1. INTRODUÇÃO

A busca por substâncias com potencial antimicrobiano, antioxidante e outras propriedades biológicas, tem se direcionado para os produtos naturais, devido à viabilidade e acessibilidade. As plantas para se adaptarem as agressões ocasionadas pelo meio ambiente, produzem diversas substâncias bioativas, tais como metabólitos secundários, e grande parte dos medicamentos tem origem a partir destas (Da Silva, 2010; Barbosa, 2008; Croteau et al., 2000).

Várias espécies de plantas são utilizadas com fins terapêuticos e a partir deste conhecimento popular, estudos científicos das propriedades medicinais de plantas são importantes para direcionar a busca por novas substâncias com atividades biológicas (Aires et al., 2008).

Com o aumento das doenças infecciosas que ocupam uma posição preocupante no cenário mundial de morbidade e mortalidade devido à capacidade dos microrganismos adquirirem resistência aos antimicrobianos (Packer et al., 2007; Lima et al., 2006) e as doenças relacionadas ao estresse oxidativo, levou ao estudo de plantas

de diversos biomas. O Bioma cerrado ainda é pouco explorado, mas já mostrou ser rico em componentes bioativos (Batista et al. 2010; Júnior et al., 2009).

Comum ao bioma Cerrado brasileiro, as espécies do gênero *Ocotea* são empregadas na medicina popular como antirreumática, depurativas e sudoríferas (Guterres et al., 2012; Moraes, 2005). Alguns relatos do uso popular dessas espécies são: a casca e folha de *O. pulchella* Mart., para ações estomáquicas, emenagogas; a casca de *O. indecira* Schott, como sudorífica e antirreumática (Da Silva, 2010; Marques, 2001).

Alguns metabólitos secundários encontrados no gênero *Ocotea* como os alcaloides, lignanas e neolignanas (Funasaki et al., 2009; Zanin et al., 2007), podem apresentar atividades biológicas e farmacológicas, como citotóxicas (Garcez et al., 2011; Hoet et al., 2004), anti-inflamatória (Zschocke et al., 2000).

Os extratos de plantas medicinais são excelentes fontes de biomoléculas e representa uma nova fonte de estudos, desta forma, o objetivo do trabalho foi investigar a atividade antimicrobiana e antioxidante, identificar as classes dos metabólitos secundários presentes no extrato e os efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico do extrato etanólico da casca de *Ocotea minarum*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e extração

As cascas de *Ocotea minarum* foram coletadas na fazenda “Mata dos Macacos”, nos pontos S 22° 08' 47.2" / W 054° 54' 54.1" na cidade de Dourados, MS - Brasil. A amostra da espécie foi identificada pela Prof. Dra. Zefa Valdivia Pereira, da Faculdade de Ciências Biológicas e Ambientais (FCBA) da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD).

As cascas de *O. minarum* foram secas em estufa de ar circulante à uma temperatura de 30° C por 10 dias e pulverizado em moinho de facas. O material vegetal seco passou por três extrações com 900 mL de álcool etílico absoluto, a temperatura ambiente com agitações ocasionais. Após 72 h foi filtrado em papel filtro, o extrato vegetal foi concentrado em rota-evaporador (Rotaevapor R – 215) à 35° C. Foi liofilizado (ValuPump VLP80 Savan) e armazenado sob refrigeração de 4° C até sua utilização para os testes biológicos.

2.2 A triagem de microrganismos para atividade antimicrobiana

Os microrganismos utilizados para os testes de atividades biológicas foram provenientes da *American Type Culture Collection* (ATCC, Rockville, MD, USA): *Candida albicans* (90028), *Candida tropicalis* (750), *Candida glabrata* (2001), *Candida krusei* (6558), *Pseudomonas aeruginosa* (27853), *Escherichia coli* (25922), *Staphylococcus aureus* (29213). Foram utilizadas espécies de *Candida tropicalis* isoladas da clinica medica pelo grupo de pesquisa. As leveduras foram armazenadas em caldo Sabouraud Dextrose (Difco) com 20% de glicerol e as bactérias em caldo Brain Heart Infusion (BHI, Himedia) com 20% de glicerol e mantidos em freezer -80°C. Somente a ATCC *P. aeruginosa* foi armazenada em ágar nutriente (Himedia) e mantida em temperatura de 4°C.

2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato

Os ensaios de susceptibilidade foram realizados por meio da técnica de microdiluição em caldo, de acordo com as diretrizes do *Clinical and Laboratory Standarts Institute* (CLSI, 2014) com algumas adaptações (Panghal et al., 2011) para utilização de produtos naturais, no caso, extrato etanólico da planta. O fluconazol foi utilizado como antifúngico e a ampicilina antibiótico de referência padrão, respectivamente. A concentração inibitória mínima (CIM) foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços (Nunclon, Delta, Nunc A/S, Roskilde, Denmark).

O extrato etanólico foi dissolvido em Dimetilsulfoxido (DMSO, Sigma-Aldrich), em seguida, diluições sucessivas (1: 2) do extrato foram realizadas na microplaca de 96 poços como concentração inicial de 2048 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e final de 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para preparar o inóculo, os microrganismos foram suspensos em solução salina estéril (SSE), onde foram ajustadas na concentração de 0,5 de McFarland (10^8 UFC mL^{-1}). Para as leveduras foi utilizado o meio de cultivo RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) para as bactéria foi utilizado caldo Müller Hinton (Himedia). As placas foram encubadas por 24 h a 35 °C para as bactérias e por 48 h a 37° para leveduras.

Foi adicionado 100 μL do meio de cultivo em todos os poços das colunas de 3 a 12 e 200 μL na coluna 1. Logo após, adicionou-se 100 μL do extrato nos poços das colunas 2 e 3. Foi realizado diluições seriadas partindo da coluna 3, homogeneizando e retirando 100 μL da mistura (meio + extrato) e adicionando ao poço da coluna seguinte,

repetir até a coluna 11. Foram desprezados os 100 μL restantes. Finalmente foi colocado 100 μL do microrganismo nas colunas 2 a 12. O poço 12 foi utilizado como controle positivo, obtinha apenas meio e o microrganismo e o poço 1 como controle negativo pois tinha, apenas meio de cultura. A concentração inibitória mínima foi considerada como a menor concentração do extrato no qual os microrganismos não apresentaram crescimento visível após incubação. O teste foi realizado em duplicata e em dois momentos diferentes.

2.4 Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)

Alíquotas da placa de microdiluição do CIM foram transferidas para uma placa de Petri contendo ágar Sabouraud Dextrose (Difco), para avaliação da ação fungicida e para avaliação bactericida foram transferidas alíquotas para uma placa de Petri contendo ágar Müeller Hinton (Himedia). As placas foram incubadas a 37° C por 48 horas para avaliação fungicida e a 35° C por 24 horas para avaliação bactericida. A CFM e CBM foram definidas como a menor concentração capaz de inibir o crescimento de colônias (Bagiu et al., 2012).

2.5 Ensaio antioxidante com o radical livre DPPH

O teste antioxidante com o radical livre DPPH (1,1 – difenil – 2 picril – hidrazila) foi realizado na amostra empregando solução preparada de DPPH a 0,004 % em metanol. A amostra foi analisada empregando diferentes concentrações de 0,2 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A cada 0,5 mL da solução preparada foram adicionados 1 mL da solução de DPPH. Para o branco foi utilizado o solvente de solubilização das amostras (etanol). Através das absorbâncias foi calculado o percentual de inibição (PI) (Mokbel et al., 2006). As concentrações e o PI foram empregados para obter a concentração máxima inibitória de 50 % (IC50) de cada amostra. Todos os testes foram realizados em triplicata e a leitura foi realizada em espectrofotômetro (Biospectro) no comprimento de onda de 517 nm.

2.6 Triagem fitoquímica

Foram realizados testes para rastrear as seguintes classes de substâncias: alcalóides (Wall et al., 1954, Costa, 1982), esteroides e triterpenóides (Wall et al., 1954),

flavonoides (Wall et al.,1954), ácidos orgânicos (Merck, 1980), fenóis e taninos (Wall et al.,1954).

Considerando que os compostos fenóis, flavonóides e taninos apresentaram maiores concentrações, estes foram quantificados. Para calcular a concentração de flavonóides foi preparada uma curva analítica (2,5-125,0 µg) empregando a quercetina como padrão, para fenóis foi preparada uma curva analítica (1,0- 40,0 µg) empregando o ácido gálico como padrão e a quantificação de taninos condensados foi feita por meio de curva de calibração externa (1,0-20,0 µg), empregando-se a catequina como padrão. O procedimento experimental realizado com o padrão foi o mesmo utilizado para as amostras. Com estes dados foi feita a regressão linear e foi obtida a equação da reta, a qual teve seus dados empregados no cálculo das amostras reais. Todos os testes foram realizados em triplicata.

2.7 Análise do extrato via cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), com detector de arranjo de diodos (DAD).

Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência (CLAE) modelo: SHIMADZU LC6A, detector de arranjo de diodos (DAD), com varredura entre 200-800 nm. Coluna Phenomenex C-18 (Ø 4,6 mm x || 250 mm, diâmetro da partícula 10 µm) e pré-coluna (25 mm x 3 mm) de mesma fase da coluna. Eluição realizada em sistema gradiente: MeOH/H₂O de 5 a 100% metanol, levando 15 minutos para atingir 100% de metanol, 100% de metanol por 5 minutos e 5 minutos para voltar à condição inicial. Tempo de análise foi de 25 min. Vazão de fluxo da bomba de 1 mL/min e volume injetado de 5 µL. As amostras foram filtradas com um micro-filtro de 0,20 µm.

2.8 Teste de *Allium cepa*

2.8.1 Avaliação de fitotoxicidade

No teste de avaliação de toxicidade, submeteram-se sementes de *Allium cepa*, do tipo baia periforme, a um tratamento contínuo onde os parâmetros analisados foram o comprimento médio das raízes das sementes (CMR) e o índice de germinação (IG). Para esse teste, cerca de 100 sementes foram distribuídas em placas de Petri de vidro (100 x 15 mm), tendo como substrato uma folha de papel filtro umedecida com as concentrações de 0,2; 0,3 e 0,5 mg mL⁻¹ do extrato de *Ocotea minarum*, permanecendo

por 5 dias em temperatura ambiente. E para o controle negativo (CN) as sementes foram germinadas apenas em água destilada e no controle positivo (CP) em Ciclofosfamida 0,1 % (Baxter). As raízes foram medidas com o auxílio de uma régua por cinco dias. O CMR foi determinado pela média do tamanho das raízes para cada uma das amostras e o IG pela média de raízes germinadas por dia em cada tratamento.

2.8.2 Avaliação da citotoxicidade

Sementes de *Allium cepa*, do tipo baia periforme foram submetidas ao tratamento descontínuo. Cerca de 100 sementes de *Allium cepa* foram distribuídas em placas de Petri de vidro (100 x 15 mm) tendo como substrato uma folha de papel filtro umedecida com água destilada à temperatura ambiente por 5 dias. As raízes foram tratadas nas concentrações de 0,2; 0,3 e 0,5 mg mL⁻¹. Para os controles foi utilizado as mesmas condições do tratamento contínuo. Após o período de 24 horas, as raízes foram coletadas e fixadas em Carnoy, por 6 a 8 horas em temperatura ambiente. Para a montagem das lâminas, as raízes de *Allium cepa* foram coradas com Reativo de Schiff por 2 horas e Carmin Acético 2 %. A leitura das lâminas foi realizada em microscopia óptica com o aumento de 400x. Para a análise da atividade citotóxica do extrato foi investigado anormalidades cromossômicas (AC) e o índice mitótico (IM) nas células de raízes das sementes de *A. cepa*. Foram analisadas 5 lâminas por tratamento e contadas 1.000 células por lâmina, totalizando 5.000 células por tratamento (Fiskesjö, 1985).

2.10 Análise estatística

Para a comparação dos resultados dos testes de toxicidade, citotoxicidade e genotoxicidade entre os grupos experimentais foi utilizado o teste de Mann-Whitney pelo programa Bioestat. As diferenças foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

3. RESULTADOS

O extrato etanólico da casca da *Ocotea minarum* foi testado para avaliar suas atividades biológicas. Os resultados obtidos para atividades antimicrobianas com o teste de concentração inibitória mínima são apresentados na tabela 1.

Microrganismos/ Origem	<i>Ocotea minarum</i>		Ampicilina*	Fluconazol**
	CIM	CFM/CBM	CIM	CIM
<i>Candida albicans</i> ATCC 90028	< 2054	< 2054	NA	1
<i>Candida glabrata</i> ATCC 2001	< 2054	< 2054	NA	32
<i>Candida krusei</i> ATCC 6558	< 2054	< 2054	NA	16
<i>Candida tropicalis</i> ATCC 750	256	512	NA	2
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27853	< 2054	< 2054	8	NA
<i>Escherichia coli</i> ATCC 25922	< 2054	< 2054	1	NA
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 29213	< 2054	< 2054	128	NA
<i>Candida tropicalis</i> Urina	< 2054	< 2054	NA	1
<i>Candida tropicalis</i> Swab nasal	< 2054	< 2054	NA	1
<i>Candida tropicalis</i> Swab nasal	< 2054	< 2054	NA	4
<i>Candida tropicalis</i> Secreção traqueal	< 2054	< 2054	NA	1
<i>Candida tropicalis</i> ^(R) Urina	< 2054	< 2054	NA	32
<i>Candida tropicalis</i> ^(R) Ponta de cateter	< 2054	< 2054	NA	32
Atividade Antioxidante IC ₅₀	25,94			

* antibiótico padrão recomendado pelo CLSI. ** antifúngico padrão recomendado pelo CLSI. – inibição ausente. (R) microrganismo resistente. NA – não analisado.

Tabela 1: Concentração Inibitória Mínima (CIM); Concentração Fungicida Mínima (CFM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) em $\mu\text{g mL}^{-1}$. Atividade Antioxidante (AA) em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do extrato etanólico de *Ocotea minarum*.

Candida tropicalis ATCC 750 apresentou concentração inibitória mínima de 254 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e para concentração fungicida mínima de 512 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Para os demais microrganismos testados, o extrato etanólico de *Ocotea minarum* não apresentou atividade antimicrobiana dentro das concentrações avaliadas.

A atividade antioxidante foi determinada pelo ensaio com o radical DPPH, e apresentou um elevado índice de atividade antioxidante com uma IC₅₀ de 25,94 $\mu\text{g mL}^{-1}$, conforme apresentado na tabela 1.

No rastreamento das substâncias químicas presentes no extrato etanólico de *Ocotea minarum*, a espécie apresentou fenóis (31,29 mg/g), flavonoides (16,52 mg/g) e taninos (6,56 mg/g).

O perfil cromatográfico do extrato etanólico da casca da *Ocotea minarum*, os espectros UV dos picos 6,512 – 14,859 minutos e os espectros de UV do ácido strictosidínico estão representados na figura 2, figura 3 e figura 4, respectivamente.

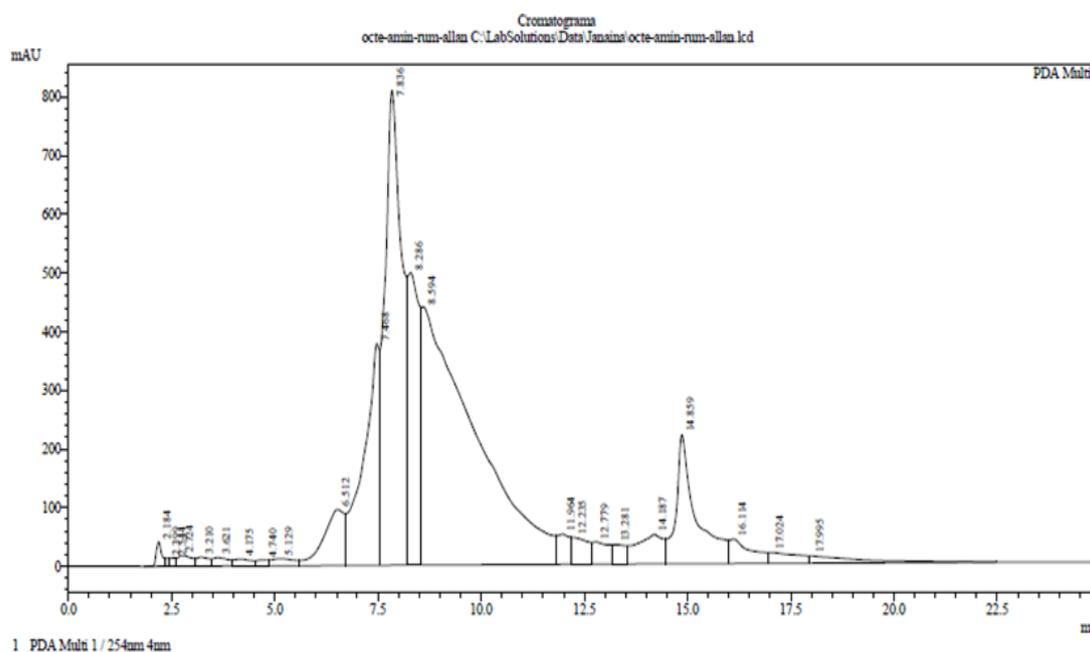


Figura 2. Cromatograma (254 nm) do extrato etanólico de *Ocotea minarum* via CLAE.

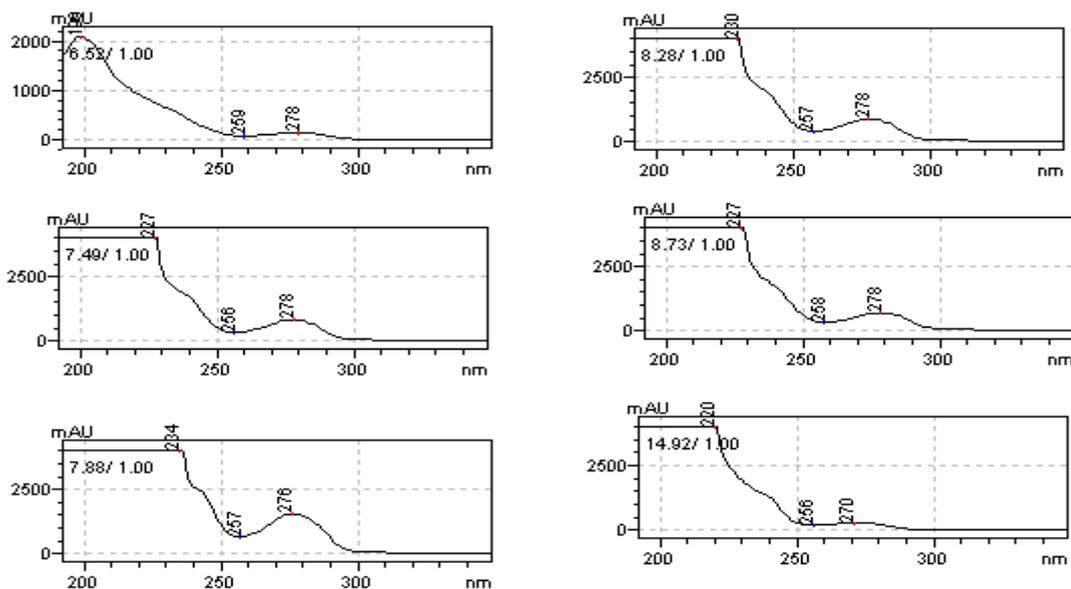
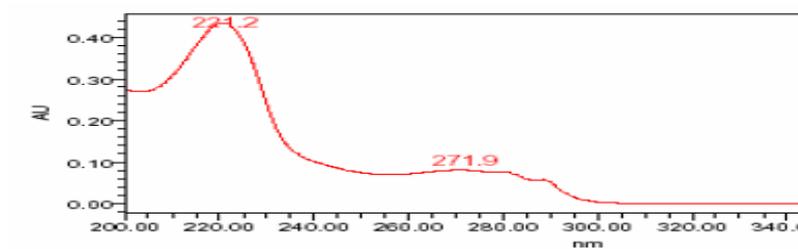


Figura 3: Espectros de UV dos picos 6,512-14,859 minutos.



(Farias, 2006)

Figura 4: Espectros de UV do ácido strictosidínico.

No tratamento contínuo (TC) houve uma redução no índice de germinação das sementes, porém sem diferença significativa quando comparado com o controle negativo, figura 5.

O comprimento das raízes das sementes de *Allium cepa*, no tratamento contínuo, foi afetado conforme aumentava a concentração do extrato etanólico de *Ocotea minarum*, demonstrando inibição no desenvolvimento das raízes. Na figura 05, estão os índices de germinação das sementes de *Allium cepa* no tratamento contínuo com extrato etanólico de *Ocotea minarum*, que foram de 52,77% para a concentração de 0,2 mg mL⁻¹, de 45,74% para a de 0,3 mg mL⁻¹ e de 42,70% para a concentração de 0,5 mg mL⁻¹. O IG para o controle negativo foi de 56,97% e para o controle positivo foi de 60,63%.

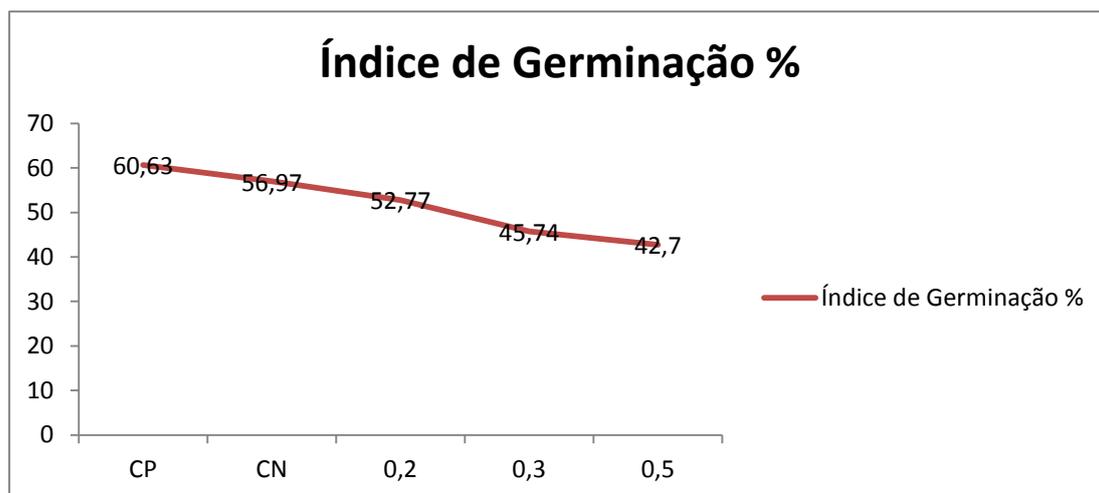


Figura 5. Índice de germinação das sementes de *Allium cepa* em resposta ao tratamento etanólico da casca de *Ocotea minarum*, nas concentrações de 0,2; 0,3 e 0,5 mg mL⁻¹, controle positivo (CP) e negativo (CN).

O tratamento descontínuo (TD) nenhuma das concentrações analisadas do extrato apresentou diferença estatística significativa em relação ao número de alterações cromossômicas quando comparadas com controle negativo.

Para o índice mitótico as concentrações de 0,2 e 0,3 mg mL⁻¹ do extrato não apresentaram diferença significativa em relação ao controle negativo, somente a concentração de 0,5 mg mL⁻¹, tabela 2, apresentou diferença significativa ao controle negativo.

Os valores de *p* para o número de anomalias cromossômicas, quando comparados com o controle negativo, mostraram que o extrato de *Ocotea minarum* não apresentou citotoxicidade para as células vegetais. Porém, no índice mitótico na concentração de 0,5 mg mL⁻¹, apresentou genotoxicidade para a célula vegetal, tabela 2.

Concentrações	0,2	0,3	0,5	CP	CN
Nº de alterações	0,6	0,8	0,8	9,6	0,4
Índice Mitótico	4,76	4,92	2,94	0,78	5,47
Valores de p - CN (nº de alterações)	0,3008	0,2324	0,3008	0,0045	-
Valores de p - CN (índice mitótico)	0,1253	0,2324	0,0236*	-	0,0045*

CP – Controle Positivo; CN – Controle Negativo. *Valor significativo de $p < 0,05$. Valor não significativo $p > 0,05$.

Tabela 2. Concentrações do extrato de *Ocotea minarum* em mg mL⁻¹ utilizadas no teste de *Allium cepa*. Índice de anomalias cromossômicas (IAC). Índice mitótico (IM). Valores estatísticos de p para o número de alterações. Valores estatísticos de p para o índice mitótico.

Para o controle positivo com Ciclofosfamida 0,1 % (Baxter), notou-se um alto nível de anomalias cromossômicas, assim demonstrando citotoxicidade para as células vegetais. E para o controle negativo com apenas água destilada, ocorreram anomalias cromossômicas mínimas.

As anomalias cromossômicas encontradas nas concentrações testadas no tratamento descontínuo foram C-metáfase, telófase com ponte cromossômica, telófases com quebras cromossômicas e anáfase com ponte cromossômica. No controle negativo foram observadas quebras e pontes cromossômicas. E no controle positivo, alterações como ponte cromossômica, micronúcleo, C-metáfase, células binucleada e multipolar.

4. DISCUSSÃO

As plantas possuem compostos secundários com extensa gama de substâncias químicas com potenciais antimicrobianos, devido à ampla pressão exercida pelos patógenos antimicrobianos do meio ambiente (Ferreira et al., 2013; Silva et al., 2009). A família *Lauraceae* possui vários gêneros utilizados para tratamentos de doenças na medicina popular e neste estudo avaliamos o potencial antimicrobiano, antioxidante, composição química, toxicidade e a citotoxicidade da casca da espécie *Ocotea minarum*.

Extratos vegetais com a concentração inibitória mínima abaixo de 100 µg mL⁻¹ são considerados promissores (Rios et al., 2005). Se a atividade antimicrobiana do extrato testado no CIM for inferior a 100 µg mL⁻¹, sua atividade é considerada boa, se a

atividade antimicrobiana estiver na gama de 100 a 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sua atividade é considerada mediana, e quando for entre 500 a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a atividade antimicrobiana é fraca, e superior a 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a ação do extrato vegetal analisado é considerada inativa (Araújo et al., 2011; Holetz et al., 2002).

O extrato etanólico da casca da *Ocotea minarum* teve atividade antimicrobiana mediana para *Candida tropicalis* ATCC 750 (256 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Realizado a concentração inibitória mínima do extrato etanólico de *O. minarum* com isolados clínicos de *Candida tropicalis*, este não apresentou ação antimicrobiana.

Estudos têm sido realizados com isolados fúngicos e bacterianos, porém ainda é necessário realizar mais testes com microrganismos de interesse clínico, para avaliar o real potencial antimicrobiano de novas drogas estudadas (Negri et al., 2014; silva et al., 2009). Com nossos resultados reiteramos a necessidade de que a atividade antimicrobiana deva se utilizar as ATCC apenas para uma triagem da ação antimicrobiana e que se positiva deva ser realizada o ensaio com mais isolados clínicos sensíveis e resistentes aos agentes antimicrobianos para maior segurança dos resultados.

O extrato etanólico da casca da *Ocotea minarum* não apresentou atividade antimicrobiana para os demais microrganismos testados no trabalho. Os microrganismos apresentam diferenças estruturais que podem impedir a ação dos compostos bioativos do extrato vegetal (Koneman et al., 1999, Ayres et al., 2008). E ainda para as condições de obtenção do extrato, procedimentos e solventes, podem interferir na extração das substâncias químicas presentes na planta (Ferreira et al., 2013). Fatores como sazonalidade, idade da planta, temperatura, radiação UV, disponibilidade de água entre outros fatores, podem influenciar na concentração dos compostos ativos da planta (Barbosa, 2008; Gobbo-Netto et al., 2007; Ayres et al., 2008).

Os radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (EROs), provocam o estresse oxidativo, que pode danificar os sistemas biológicos, ocasionando o desenvolvimento de doenças, como câncer, mal de Alzheimer, acelera o processo de envelhecimento (Tabata et al., 2008). O extrato etanólico da casca de *Ocotea minarum*, demonstrou um IC50 de 25,94 $\mu\text{g mL}^{-1}$, apresentando uma boa atividade antioxidante quando comparado a antioxidantes comerciais como o ácido ascórbico com IC50 de 2,15 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e o Butil-hidroxi-tolueno (BTH) com IC50 de 5,37 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Silvestri, 2010).

Sete ervas medicinais tiveram sua atividade antioxidante avaliada, sendo a com melhor IC50 o Capim Santo, obtendo o resultado de 24,42 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Azevedo et al.,

2011). Num estudo da atividade antioxidante de cinco plantas, a IC₅₀ variou de 27,59 a 111,14 µg mL⁻¹, esses resultados mostraram-se comparáveis ao controle positivo, a rutina (IC₅₀ = 27,80 µg mL⁻¹) e o ácido gálico (IC₅₀ = 24,27 µg mL⁻¹) (Sousa et al., 2007).

A atividade antioxidante pode estar correlacionada com a alta concentração de fenóis e flavonoides e algumas classes de alcalóides que são sequestradores de radicais livres (Vale et al., 2011; Azevedo et al., 2011; Khalaf et al., 2008). Em alguns estudos *in vitro*, notou-se que a atividade antioxidante de flavonóides e dos compostos fenólicos são maiores que a das vitaminas E e C (Nascimento et al., 2011; Neves et al., 2008; Alves et al., 2007). Resultados observados podem indicar que o ácido strictosidínico, composto identificado em nosso extrato, pode estar relacionado com a atividade antioxidante apresentada com o extrato etanólico da *O. minarum*.

A atividade antioxidante, dos compostos fenólicos e algumas classes de alcalóides, é proporcionada devida sua tendência de quelar metais, acreditando-se que a fonte de compostos fenólicos mais importantes é a dos taninos. A ação antioxidante dessa classe é devido à inibição da peroxidação-lipídica, o número e a posição do grupo hidroxila, e a inativação de sistemas enzimáticos dos microrganismos envolvidos na produção de energia e componentes estruturais (Azevedo et al., 2011; Michalak, 2006; Porte et al., 2001).

A análise dos espectros de UV indica que as substâncias presentes em nosso extrato são todas da mesma classe, pois apresentam espectros de UV semelhantes, e as substâncias mais isoladas do gênero desta espécie são da classe dos alcalóides, das lignanas e neolignanas (Funasaki et al. 2009, Zanin et al., 2007, Silva et al. 2002). Para a espécie *Ocotea minaum* a literatura relata o isolamento de alcaloides indólicos, flavonoides, alquil fenóis e terpenos (Garcez et al 2005), também foram isolados da espécie ácidos orgânicos (Nogueira et al, 2007).

Os espectros de UV dos picos 6,512-14,859 minutos são semelhantes ao espectro do ácido strictosidínico. Com isso podemos inferir que os componentes apresentados no cromatograma são da classe dos alcaloides indólicos que já foram isolados na espécie (Farias, 2006). O ácido strictosidínico é descrito na literatura com atividades analgésicas e antipiréticas (Farias, 2006; Nascimento, 2005).

Uma substância ou um agente é considerado tóxico quando promove uma redução superior a 50 % no índice de germinação das sementes de *Allium cepa* em relação ao controle negativo (Fiskesjö, 1985). Assim, afirmando com o tratamento

contínuo que o extrato etanólico da casca de *Ocotea minarum* não possui potencial de toxicidade para as células vegetais por meio deste.

A atividade citotóxica de uma substância pode ser demonstrada pelo aumento ou diminuição do índice mitótico dos organismos quando expostos a essa substância (Carvalho et al., 2005). Com o tratamento descontínuo vemos que não há efeito de genotoxicidade no extrato etanólico da casca de *Ocotea minarum* nas concentrações de 0,2 e 0,3 mg mL⁻¹. A concentração de 0,5 mg mL⁻¹ teve o índice mitótico afetado significativamente pela concentração específica.

Num estudo com extrato etanólico de *Ocotea minarum*, não foi apresentado efeito genotóxico direto ou indireto frente ao teste SMART com Linhagens de *Drosophila melanogaster* e Cruzamentos (Guterres et al., 2012). Em análise química realizada com o extrato etanólico de *Ocotea minarum* compostos ácidos do tipo sesquiterpenos foram identificados, sugerindo que a ausência de genotoxicidade desse extrato é devido a estes compostos (Gueterres et al., 2012).

5. CONCLUSÃO

O trabalho contribui para novos conhecimentos referentes a propriedades antimicrobianas, antioxidantes e tóxicas de espécie do Cerrado brasileiro, a *Ocotea minarum*. O extrato etanólico dessa planta, não resultou em atividade antimicrobiana, pois não apresentou inibição de crescimento frente a bactérias e isolados clínicos de *Candida tropicalis*. Porém estudos futuros devem ser realizados com essa planta voltado para atividade antioxidante, pois teve uma boa ação antioxidante no ensaio com radical livre DPPH, e não apresentou toxicidade no teste realizado no trabalho. Assim esse estudo pode ser um ponto de partida para novas pesquisas para o desenvolvimento de novos agentes antioxidantes.

6. AGRADECIMENTOS

A Universidade Federal da Grande Dourados e a Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul e a FUNDECT e ao CNPq pelo apoio financeiro.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Alves CQ, Brandão HN, David JM, David JP, Lima LS (2007). Avaliação da atividade antioxidante de flavonóides. *Diálogos e ciência – Rev. da rede ensino FTC*, vol. 5, n. 12, p. 7- 8.

Araújo MG, Hilário F, Nogueira LG, Vilegas W, Santos LC, Bauab TM (2011). Chemical constituents of the methanolic extract of leaves of *Leiothrix spiralis* Ruhland and their antimicrobial activity. *Molecules*, vol. 16, p.10479-10490.

Azevedo RRS, Almeida VGA, Silva EMF, Silva AL, Gomes NRS, Matias TMS, Souza LIO, Santos AF (2011). Potencial antioxidante e antibacteriano do extrato etanólico de plantas usadas como chás. *Rev. Semente*, vol. 6, n. 6, p. 240-249.

Ayres MCC, Brandão MS, Vieira-Júnior GM, Menor JCAS, Silva HB, Soares MJS, Chaves MH (2008). Atividade antibacteriana de plantas úteis e constituintes químicos de raiz de *Copernicia prunifera*. *Rev. Brasileira de Farmacognosia*, vol. 18, n. 1.

Bagiu RV, Vlaicu B, Butnariu M (2012). Chemical composition and in vitro antifungal activity screening of the *Allium ursinum* L. (Liliaceae). *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 13, p. 1426-1436.

Barbosa DB (2008). Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill. (*Anacardiaceae*). Dissertação apresentada para título de Mestre em Genética e Bioquímica. Uberlândia – MG.

Batista ANL, Junior JMB, López SN, Furlan M, Cavalheiro AJ, Silva DHS, Bolzani VS (2010). Aromatic compounds from three brazilian lauraceae species. *Quim. Nova*, vol. 33, n. 2, p. 321-323.

Carvalho RO, Pozo RM, Lobo DJ, Lichtenfels AJ, Martins-Junior HA, Bustilho JO, Saiki M, Sato IM, Saldiva PH (2005). Diesel emissions significantly influence composition and mutagenicity of the ambient particles: a case study in São Paulo, Brazil. *Environmental Research*, vol. 98, p. 1-7.

Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI). (2014). Information Technology Security of *In Vitro* Diagnostic Instruments and Software Systems; approved standard – Second Edition (AUTO11-A2).; Wayne, Pennsylvania, USA.

COSTA AF (1982). Farmacognosia. 3 ed. Lisboa. Fundação Calouste Guibenkian, vol. 3, p. 1032.

Croteau R, Kutchan TM, Lewis NG (2000). Natural products (secondary metabolites). In: Buchanan, Biochemistry & Molecular Biology of Plants. American Society of Plant Biologists, p. 1250-1318.

Da Silva LMGE (2010). Estudo químico biomonitorado por ensaio com larvas *Aedes aegypti* das espécies *Ocotea velloziana* (Meins.) Mez. E *Aiouea trinervis* (Meisn.). Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Campo Grande – MS.

Farias FM (2006). *Psychotria myriantha* Mull Arg. (*Rubiaceae*): caracterização dos alcalóides e avaliação das atividades antiqumiotóxica e sobre o sistema nervoso central. Tese apresentada ao programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre.

Ferreira MRA, Santiago RR, Langassner SMZ, Mello JCP, Svidzinski TIE, Soares LAL (2013). Antifungal activity of medicinal plants from Northeastern Brazil. J. Med. Plants Res. vol. 7, n. 40, p. 3008-3013.

Fiskesjö G (1985). The *Allium* test: a standard in environmental monitoring. Hereditas, vol. 102, p. 99-112.

Funasaki M, Lordello ALL, Viana AM, Catarina CC, Floh EIS, Yoshida M, Kato MJ (2009). Neolignans and sesquiterpenes from leaves and embryogenic cultures of *Ocotea Catharinensis* (*Lauraceae*). Journal of the Brazilian Chemical Society, vol. 20, p. 853-859.

Garcez WS, Garcez FR, Silva LMGE, Shimabukuro AA (2005). Indole Alkaloid and other Constituents from *Ocotea minarum*. J. Braz. Chem. Soc., vol. 16, n. 6B, p. 1382-1386.

Garcez FR, Silva AFG, Garcez WS, Linck G, Matos MC, Santos EC, Queiroz LM (2011). Cytotoxic aporphine alkaloids from *Ocotea acutifolia*. *Planta Médica*, vol. 77, p. 383-387.

Gobbo-Netto JMC, Lopes NP (2007). Plantas Mediciniais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. *Química Nova*, vol. 30, n. 2, p. 347-381.

Guterres ZR, Silva AFG, Camargo MJ, Nogueira CR, Garcez FR, Garcez WS, Spanó MA (2012). Atividade genotóxica de extratos etanólicos de plantas do gênero *Ocotea*. *Rev. Bras. Bioci.*, Porto Alegre, vol. 10, n. 2, p. 157-163.

Hoet S, Stévigny C, Block S, Opperdoes F, Colson P, Baldeyrou B, Lansiaux A, Bailly C, Quetinleclercq J (2004). Alkaloids from *Cassytha filiformis* and related aporphines: antitrypanosomal activity, cytotoxicity, and Interaction with DNA and topoisomerases. *Planta Medica*, vol. 70, p. 407-413.

Holetz FB, Passini GL, Sanches NR, Cortez DPG, Nakamura CV, Filho BPD (2002). Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. *Memorial Institute Oswaldo Cruz*, vol. 97, p. 1027-1031.

Junior IFS, Filho VC, Xacchino SA, Lima JCS, Martins, DTO (2009). Antimicrobial screening of some medicinal plants from Mato Grosso Cerrado. *Rev. Journal of Pharmacognosy* vol. 19, n. 1B, p. 242-248.

Khalaf NA, Shakya AK, Al-Othman A, El-Egbar Z, Farah H (2008). Antioxidant Activity of Some Common Plants. *Turk J Biol.* vol. 32, p. 51-55.

Koneman EW; Allen SE, Janda WM, Schreckenberger PD, Winn WC (1999). *Diagnóstico Microbiológico Texto y Atlas Color*. 5. ed. Buenos Ayres: Panamericana.

Lima MRF, Ximenes CPA, Luna JS, Sant'Ana AEG (2006). The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. *Rev. Bras. Farmacogn.* vol. 16, p. 300-306.

Marques CA (2001). Importância econômica da família *Lauraceae* Lindl. *Rev. Floresta e Ambiente*. vol. 8, n. 1, p. 195-206.

Merck E (1980). *Reactivos de coloración para cromatografía en capa fina y en papel*. Darmstaadt: Merck, p. 76.

Michalak A (2006). Phenolic compounds and their antioxidant activity in plants growing under heavy metal stress. Polish J. of Environ. Stud. vol. 15, n. 4, p. 523-530.

Mokbel MS, Hashinaga F (2006). Evaluation of the antioxidant activity of extracts from buntan (*Citrus grandis* Osbeck) fruit tissues. Food Chemistry, vol. 94, p.529-534.

Moraes PLR (2005). Biota Neotrop. vol. 5, n. 1.

Nascimento CA, Lião LM, Morais L, Kato L, Oliveira CMA (2005). Alcalóides indólicos monoterpênicos glicosilados de *Palicourea coriacea* (Rubiaceae). Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão da UFG; XII Seminário de Pesquisa e Pós-graduação da UFG; Anais eletrônicos.

Negri M, Salci TP, Shinobu-Mesquita CS, Capoci IRG, Svidzinski TIE, Kioshima ES (2014). Early State Research on Antifungal Natural Products. Molecules vol. 19, p. 2925-2956.

Neves LC, Alencar SM, Carpes ST (2008). Determinação da atividade antioxidante e do teor de compostos fenólicos e flavonóides totais em amostras de pólen apícola de *Apis mellifera*. Braz. J. Food Technol., vol. 2, n. 15.

Packer JF, Luz MMS (2007). Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. Rev Bras Farmacogn vol. 17, p. 102-107.

Panghal M, Kaushal V, Yadav J (2011). In vitro antimicrobial activity of ten medical plants against clinical isolates of oral cancer cases. Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials, vol.10, p. 21-3.

Porte A, Godoy RLO (2001). Alecrim (*Rosmarinus offi cinallis* L.): Propriedades antimicrobiana e química do óleo essencial. Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (B. CEPPA), Curitiba, vol. 19, n. 2, p. 193-210.

Rios JL, Recio M (2005). Medicinal plants and antimicrobial plants. Journal of Ethnopharmacology, vol. 100, p. 80-4.

Romero CD, Chopin SF, Buck G, Garcia M, Bixby L (2005). Antibacterial properties of common herbal remedies of the southwest. Journal of Ethnopharmacology, vol. 99, n. 2, p. 253-7.

Silva FM, Paula JE, Espindola LS (2009). Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. *Mycoses* vol. 52, p. 511-517.

Silva IG, Lacerda CDG, Barbosa-Filho JM, Silva MS, Cunha, EVL (2002). Coclaurine from *Ocotea duckei*. *Biochemical Systematics and Ecology*, vol. 30, p. 881-883.

Silvestri JDF, Paroul N, Czyewski E, Lerin L, Rotava I, Cansian RL, Mossi A, ToniazzoG, Oliveira D, Treichel H (2010). Perfil da composição química e atividades antibacteriana e antioxidante do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). *Revista Ceres*, vol. 57, n. 5, p. 589-594.

Sousa CDM, Silva HR, Viega-Jr GM, Ayres MCC, Costa CLS, Araújo DS, Cavalcante LCD, Barros EDS, Araújo PBM, Brandão MS, Chaves MH (2007). Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. *Química nova*, vol. 30, n. 2, p. 351-355.

Tabata H, Katsube T, Tsuma T, Ohta Y, Imawaka N, Utsumi T (2008). Isolation and evaluation of the radical-scavenging activity of the antioxidants in the leaves of an edible plant, *Mallotus japonicas*. *Food Chemistry*, vol. 109, p. 64-71.

Vale VV, Orlanda JFF (2011). Atividade antimicrobiana do extrato bruto etanólico das partes aéreas de *Euphorbia tirucalli* Linneau (Euphorbiaceae). *Scientia Plena*, vol. 7. n. 4.

Zanin SM, Lordello ALL (2007). Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (*Lauraceae*). *Química Nova*, vol. 30, p. 92-98.

Zschocke S, Drewes SE, Paulus K, Bauer R, Van Standen J (2000a.) Analytical and pharmacological investigation of *Ocotea bullata* (black stinkwood) bark and leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 71, p.219-230.

Wall ME, Krider MM, Krewson CF, Eddy CR, Willaman JJ, Corell DS, Gentry HS (1954). Steroidal sapogenins VII. Survey of plants for steroidal sapogenins and other constituents. *Journal of the American Pharmaceutical Association*, vol. 43, n. 1, p. 1-7.