



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE  
SANTANA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM  
BIOTECNOLOGIA**



**INGRID MEDEIROS DE OLIVEIRA DE JESUS**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE**  
***Vanilla palmarum* E *Lippia alba***

Feira de Santana, BA

2018

**INGRID MEDEIROS DE OLIVEIRA DE JESUS**

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE BIOLÓGICA DE**  
*Vanilla palmarum* E *Lippia alba*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Profa. Dra. Angélica Maria Lucchese  
Co-orientador: Prof. Dr. Misael Silva Ferreira Costa

Feira de Santana, BA

2018

## BANCA EXAMINADORA

*Elinalva Maciel Paulo*

**Dra. Elinalva Maciel Paulo**  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)

*Alice Ferreira da Silva Hughes*

**Dra. Alice Ferreira da Silva Hughes**  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)

*Angélica Maria Lucchese*

**Dra. Angélica Maria Lucchese**  
(Universidade Estadual de Feira de Santana)  
Orientadora e Presidente da Banca

**Feira de Santana – BA  
2018**

### **Ficha Catalográfica – Biblioteca Central Julieta Carteado**

J56c Jesus, Ingrid Medeiros de Oliveira de  
Composição química e atividade biológica de *Vanilla palmarum* e  
*Lippia alba.*/ Ingrid Medeiros de Oliveira de Jesus. – 2018.  
90f.: il.

Orientadora: Angélica Maria Lucchese  
Co-orientador: Misael Silva Ferreira Costa  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Feira de Santana,  
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2018.

1. *Vanilla palmarum*. 2. *Lippia alba*. 3. Óleo essencial. 4. Composição  
química. 5. Dermatófitos. I. Lucchese, Angélica Maria, orient. II. Costa,  
Misael Silva Ferreira, co-orient. III. Universidade Estadual de Feira de  
Santana. IV. Título.

CDU : 582.594.2

ao único digno de receber toda a glória, o Deus  
eterno, a meu esposo e a meus pais dedico.

## **AGRADECIMENTOS**

Ao Rei dos reis, a razão de todas as coisas, por quem vivo, para quem vivo, minha eterna gratidão, que não consigo expressar através de palavras.

A minha mãe simplesmente não sei o que dizer. Meu coração transborda de gratidão, amor e orgulho de ser sua filha. Obrigada por tudo!

A meu pai, meu irmão e à Mariana gostaria de dizer que os amo muito além do que imaginam. Obrigada por sempre torcerem por mim!

A meu esposo, meu eterno namorado e companheiro, só posso dizer que reconheço o quão abençoada sou por tê-lo em minha vida. Amo você, baby.

A minha família, que sempre me deu apoio e incentivo além da conta, meu muito obrigada. Amo vocês.

Aos amigos queridos, que torcem por mim e se alegram comigo, muito obrigada! É claro que as minhas preferidas, Isa e Elisama, merecem atenção especial, né? Nossos encontros e nossas conversas sempre fazem a diferença na minha vida, seja o momento alegre ou triste. Amo vocês.

A meus orientadores, Angélica e Misael, sou grata por terem confiado em mim e por terem ajudado-me a vencer minhas limitações. Que Deus os abençoe!

Sou extremamente grata aos colegas Jade, Iza, Horácio, Juliana e Hianna. Não sei o que seria de mim sem a ajuda que tive de vocês, que disponibilizaram um pouco do seu precioso tempo para compartilhar seus conhecimentos comigo e/ou para me dar bons conselhos. Que vocês recebam mundo afora a mesma gentileza que tiveram comigo!

## RESUMO

*Vanilla palmarum* e *Lippia alba* são plantas que podem ser encontradas no semiárido baiano. Ambas são usadas para fins medicinais por populações locais, de diferentes maneiras. Contudo, *V. palmarum* não é muito estudada em diversos aspectos, tais como a sua composição química e as atividades biológicas que desempenha. *L. alba*, por sua vez, é uma das espécies vegetais mais estudadas, mas, devido à sua variabilidade geográfica, a composição química de seu óleo essencial é bastante variável. Por isso, objetivou-se, neste trabalho, analisar a composição química, a atividade antioxidante e a atividade antidermatofítica dos extratos brutos de *V. palmarum*, bem como a composição química e a atividade antidermatofítica do óleo essencial de *L. alba* cultivada no município de Feira de Santana. Os dermatófitos utilizados foram *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporum gypseum*. Avaliou-se a inibição do crescimento micelial de todos os fungos e foram determinadas as concentrações inibitórias mínimas e fungicidas mínimas dos extratos e do óleo. A atividade antioxidante dos extratos foi avaliada por métodos de sequestro de radicais livres. Os extratos de *V. palmarum* apresentaram atividade antioxidante. Tanto os extratos quanto o óleo essencial apresentaram atividade antidermatofítica. Carvona e limoneno são os compostos majoritários do óleo essencial analisado.

**Palavras-chave:** *Vanilla palmarum*. *Lippia alba*. Extratos. Óleo essencial. Composição química. Dermatófitos.

## ABSTRACT

*Vanilla palmarum* and *Lippia alba* are plants that can be found in the semi-arid region of Bahia. Both are used for medicinal purposes by local populations, in different ways. However, *V. palmarum* is not much studied in several aspects, such as its chemical composition and the biological activities that it performs. *L. alba*, on the other hand, is one of the most studied vegetal species, but, due to its geographical variability, the chemical composition of its essential oil is quite variable. Therefore, the objective of this work was to analyze the chemical composition, antioxidant activity and antidermatophytic activity of the crude extracts of *V. palmarum*, as well as the chemical composition and antidermatophytic activity of the essential oil of *L. alba* cultivated in Feira de Santana. Dermatophytes used were *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* and *Microsporum gypseum*. The inhibition of mycelial growth of all fungi was evaluated and minimum and minimum fungicidal inhibitory concentrations of extracts and oil were determined. The antioxidant activity of the extracts was evaluated by free radical sequestration methods. The extracts of *V. palmarum* presented antioxidant activity. Both the extracts and the essential oil presented antidermatophytic activity. Carvone and limonene are the major compounds of the analyzed essential oil.

**Key-words:** *Vanilla palmarum*. *Lippia alba*. Extracts. Essential oil. Chemical composition. Dermatophytes.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b>	Estrutura química da vanilina.	16
<b>Figura 2</b>	<i>Vanilla palmarum</i> Salzm. ex Lindl.	17
<b>Figura 3</b>	<i>Lippia alba</i> .	19
<b>Figura 4</b>	a) estrutura química do isopreno; b) modelo cabeça-cauda; c) modelo cabeça-cabeça; d) modelo cabeça-meio.	21
<b>Figura 5</b>	Síntese de terpenos resumida.	22
<b>Figura 6</b>	Estrutura básica de um flavonoide.	24
<b>Figura 7</b>	Hidrodestilação.	30
<b>Figura 8</b>	Formas radicalar e não radicalar do DPPH, respectivamente.	32
<b>Figura 9</b>	Estabilização do radical ABTS <sup>•+</sup> por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.	32
<b>Figura 10</b>	A: colônia de <i>T. rubrum</i> ; B: hifas e microconídios de <i>T. rubrum</i> .	35
<b>Figura 11</b>	A: macroconídio de <i>M. gypseum</i> . B: colônia de <i>M. gypseum</i> .	36
<b>Figura 12</b>	Procedimentos para o teste da concentração inibitória mínima dos extratos de <i>V. palmarum</i> , em que a letra “T” representa a triplicata.	54
<b>Figura 13</b>	Procedimentos para o teste da concentração inibitória mínima do óleo essencial de <i>L. alba</i> , em que a letra “T” representa a triplicata.	69
<b>Figura 14</b>	Procedimentos para o teste da concentração fungicida mínima.	70
<b>Figura 15</b>	Compostos majoritários do óleo essencial de <i>L. alba</i> , quimiotipo III.	72

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	Classificação de compostos fenólicos segundo Harbonne e Simmonds (1964).	23
<b>Tabela 2</b>	Teor de fenólicos e flavonoides totais nos extratos metanólicos brutos de <i>V. palmarum</i> expresso em média e desvio padrão de três análises independentes.	55
<b>Tabela 3</b>	Atividade antioxidante <i>in vitro</i> dos extratos metanólicos brutos da folha e do caule de <i>V. palmarum</i> . Resultados expressos em média e desvio padrão de três análises independentes.	55
<b>Tabela 4</b>	Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos dermatófitos diante do extrato metanólico das folhas de <i>Vanilla palmarum</i> .	56
<b>Tabela 5</b>	Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos dermatófitos diante do extrato metanólico do caule de <i>Vanilla palmarum</i> .	56
<b>Tabela 6</b>	Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) e concentração fungicida mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato metanólico bruto das folhas de <i>V. palmarum</i> contra dermatófitos.	56
<b>Tabela 7</b>	Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) e concentração fungicida mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do extrato metanólico bruto do caule de <i>V. palmarum</i> contra dermatófitos.	56
<b>Tabela 8</b>	Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) e concentração fungicida mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do itraconazol contra dermatófitos.	57
<b>Tabela 9</b>	Composição química do óleo essencial de <i>Lippia alba</i> .	71
<b>Tabela 10</b>	Porcentagem de inibição do crescimento micelial de espécies de dermatófitos diante do óleo essencial de <i>L. alba</i> .	73
<b>Tabela 11</b>	Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) e concentração fungicida mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do óleo essencial de <i>Lippia albae</i> do itraconazol frente a dermatófitos.	73

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- ABTS** – 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
- AlCl<sub>3</sub>** – cloreto de alumínio
- BDA** – batata-dextrose-ágar
- CE** – concentração eficiente
- CFM** – concentração fungicida mínima
- CG/DIC** – cromatógrafos a gás com detector de ionização em chama
- CG/EM** – cromatografia gasosa acoplada com espectrometria de massa
- CIM** – concentração inibitória mínima
- CLAE** – cromatografia líquida de alta eficiência
- DIC** – detector de ionização em chama
- DMSO** – dimetilsulfóxido
- DPPH** – 2,2-difenil-1-picril-hidrazila
- EM** – espectrometria de massas
- EMB** – extrato metanólico bruto
- EO** – óleo essencial
- ERO** – espécies reativas de oxigênio
- et al.** – e colaboradores
- FLT** – flavonoides totais
- FT** – fenólicos totais
- g** – grama
- HUEFS** – Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Feira de Santana
- IA<sub>calc</sub>** – índice aritmético calculado
- IA<sub>lit</sub>** – índice aritmético da literatura
- IV** – infravermelho
- MEP** – metileritrol fosfato
- μL** – microlitos
- μg/mL** – microgramas por mililitro
- mg EAG/g** – miligrama de equivalentes de ácido gálico por grama
- mg EQ/g** – miligrama de equivalentes de quercetina por grama
- mg/mL** – miligramas por mililitro

**mm** – milímetro

**MP** – metabólitos primários

**MS** – metabólitos secundários

**MVA** – via do mevalonato

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>** – carbonato de cálcio

**nm**– nanômetros

**OE** – óleo essencial

**SD** – Sabouraud-dextrose

**UFC** – unidades formadoras de colônia

**UV** – ultravioleta

**UV-Vis** – ultravioleta visível

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>14</b>
<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>15</b>
1 ORCHIDACEAE.....	15
<b>1.1 O gênero <i>Vanilla</i></b> .....	<b>16</b>
2 <i>Lippia</i> .....	17
3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS .....	19
<b>3.1 Terpenos</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2 Compostos fenólicos</b> .....	<b>22</b>
<b>3.3 Alcaloides</b> .....	<b>24</b>
4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	25
<b>4.1 Atividade antioxidante</b> .....	<b>25</b>
<b>4.2 Atividade antimicrobiana</b> .....	<b>26</b>
5 EXTRATOS VEGETAIS .....	27
<b>5.1 Métodos para análise da composição química de extratos</b> .....	<b>28</b>
5.1.1 Determinação do teor de fenólicos totais .....	28
5.1.2 Determinação do teor de flavonoides totais .....	29
6 ÓLEOS ESSENCIAIS .....	29
<b>6.1 Método de análise da composição química de óleos essenciais</b> .....	<b>31</b>
7 MÉTODOS PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS E ÓLEOS ESSENCIAIS .....	31
<b>7.1 Teste da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)</b> .....	<b>31</b>
<b>7.2 Teste da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)</b> .....	<b>32</b>
<b>7.3 Testes antimicrobianos</b> .....	<b>33</b>
8 DERMATÓFITOS.....	33
<b>8.1 O gênero <i>Trichophyton</i></b> .....	<b>34</b>
<b>8.2 O gênero <i>Microsporum</i></b> .....	<b>35</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>37</b>

## CAPÍTULO 1

### COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTIDERMATOFÍTICA DE *Vanilla palmarum* .....46

1.1 INTRODUÇÃO .....	47
1.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	48
<b>1.2.1 Coleta do material vegetal</b> .....	48
<b>1.2.2 Obtenção e processamento do extrato bruto</b> .....	48
<b>1.2.3 Análise da composição química</b> .....	49
1.2.3.2 Determinação de fenólicos totais.....	49
1.2.3.3 Determinação do teor de flavonoides totais .....	50
<b>1.2.4 Análise da atividade antioxidante</b> .....	50
1.2.4.1 Teste de sequestro do radical livre DPPH.....	50
1.2.4.2 Teste do sequestro do radical livre ABTS .....	51
<b>1.2.5 Testes antimicrobianos</b> .....	52
1.2.5.1 Microrganismos .....	52
1.2.5.2 Teste de inibição do crescimento micelial.....	52
1.2.5.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM).....	53
1.3 RESULTADOS .....	55
1.4 DISCUSSÃO .....	57
REFERÊNCIAS.....	60

## CAPÍTULO 2

### ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* RICO EM CARVONA FRENTE A DERMATÓFITOS.....63

2.1 INTRODUÇÃO .....	64
2.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	65
<b>2.2.1 Coleta do material vegetal</b> .....	65
<b>2.2.2 Extração do óleo essencial</b> .....	66
<b>2.2.3 Análise da composição química</b> .....	66
<b>2.2.4 Testes antimicrobianos</b> .....	67

2.2.4.1 Microrganismos .....	67
2.2.4.2 Teste de inibição do crescimento micelial.....	67
2.2.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM).....	68
2.3 RESULTADOS .....	71
<b>2.3.1 Composição química do óleo essencial</b> .....	71
<b>2.3.2 Testes antimicrobianos</b> .....	72
2.4 DISCUSSÃO .....	73
REFERÊNCIAS.....	77
<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	<b>82</b>
<b>APÊNDICE A</b> – Perfil cromatográfico do óleo essencial de <i>L. alba</i> obtido por CG/DIC.....	83
<b>APÊNDICE B</b> – Inibição do crescimento micelial dos dermatófitos perante os extratos de <i>V. palmarum</i> e o óleo essencial de <i>L. alba</i> , em diferentes concentrações.....	86

## INTRODUÇÃO GERAL

As plantas desempenham, desde a antiguidade, papel fundamental para a humanidade, pois, além de serem consumidas como alimentos, são fontes importantes de princípios ativos que podem ser utilizadas para diversas finalidades no tratamento de doenças, podendo atuar, entre outras maneiras, como antioxidantes e antimicrobianos. Registros históricos revelam os vegetais como medicamentos comumente empregados nas grandes civilizações (ELUMALAI; ESWARIAH, 2012).

Atualmente, as plantas ainda são usadas como medicamentos por diversos povos. Em muitos casos, esse uso baseia-se apenas em conhecimento empírico, mas há países que registraram as plantas medicinais de seu território em farmacopeias (PETROVSKA, 2012). Nesse sentido, as plantas do semiárido brasileiro recebem atenção especial, pois, além de serem muito utilizadas na medicina tradicional, muitas delas já tiveram parte de seu potencial farmacológico estabelecido, como, por exemplo, *Lippia alba*, a espécie mais conhecida do gênero *Lippia*, sendo utilizada, entre outras coisas, para tratar problemas de pele. Contudo, há espécies pouco estudadas, como *Vanilla palmarum*, por exemplo.

Além de ser utilizada como alimento, ornamento e cosmético, *V. palmarum* é também uma das muitas plantas utilizadas na medicina popular brasileira, sendo empregada para o tratamento de coluna, rins e dor de ouvido (COSTA et al., 2006). No município de Milagres, Bahia, *V. palmarum* é utilizada por alguns moradores no combate a dermatofitoses, mas não há pesquisas que comprovem a sua ação antifúngica.

As dermatofitoses micoses são causadas pelos dermatófitos, um grupo de fungos que invadem tecidos queratinizados (pele, cabelo e unha), onde, pela ação de enzimas queratinolíticas, transformam a queratina em substrato para o seu crescimento. (LAKSHMIPATHY; KANNABIRAN, 2010).

Assim sendo, o presente trabalho dedicou-se a avaliar a atividade biológica e a composição química de duas espécies de ocorrência no semi-árido baiano, *V. palmarum* e *L. alba*, com relatos de uso popular frente a doenças provocadas por dermatófitos. Como objetivos específicos buscou-se: a) investigar a ação frente aos dermatófitos *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporum gypseum* dos extratos metanólicos brutos de folhas e caules de *V. palmarum*; b) avaliar a atividade antioxidante dos extratos de *V. palmarum*; c) determinar o teor de fenólicos e flavonoides nos extratos de *V. palmarum*; d) determinar a ação antimicrobiana frente a *Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton*

*rubrum* e *Microsporium gypseum* do óleo essencial de *L. alba*; d) determinar a composição química do óleo essencial para relacionar a atividade observada.

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1 ORCHIDACEAE

Orchidaceae, da ordem Aspargales, é uma das famílias de angiospermas de maior variedade, com aproximadamente 24.500 espécies catalogadas. Sua distribuição geográfica é ampla, sendo os pólos e as regiões desérticas os únicos lugares onde não é encontrada (SILVA, 2013). Todavia, as regiões neotropicais detêm 73% das espécies dessa família (KOCH; SANTOS; ILKIU-BORGES, 2014).

O Brasil, por sua vez, é considerado o terceiro país mais rico em espécies de Orchidaceae, as quais são observadas em todas as suas formações florestais, com predomínio em florestas úmidas, principalmente na Mata Atlântica (ROMANI, 2006). O Jardim Botânico do Rio de Janeiro documentou 221 gêneros e 2.494 espécies de Orchidaceae espalhados em todo o território brasileiro, estando entre eles o gênero *Vanilla* (ORCHIDACEAE, 2014).

Quanto a sua importância, sabe-se que diversas espécies de Orchidaceae são utilizadas na medicina tradicional com várias finalidades, tais como tratar dores musculares e gastrointestinais e para contracepção, mas não há provas científicas destas ações farmacológicas. A atividade antimicrobiana dessas plantas, no entanto, tem sido estudada com afinco. Foi descoberto, através de testes de disco-difusão, que o extrato aquoso das folhas das espécies *Aerides odorata*, *Acampe papilosa* e *Acampe ochracea* inibe o crescimento de três diferentes cepas de *E. coli* (ampicilina resistente, canamicina resistente e não resistente) (PAUL et al., 2013). *Dendrobium nobile* também se mostrou eficaz contra as bactérias de importância clínica *E. coli*, *S. aureus*, *Salmonella typhi* e *Proteus* sp. (DEVI et al., 2009). Contudo, apesar de o interesse pela atividade antimicrobiana das Orchidaceae ter aumentado nos últimos anos, nem todos os gêneros dessa família foram amplamente estudados nesse sentido.

Outra característica farmacológica, e de grande importância, relacionada às orquídeas é a produção de metabólitos secundários (MS) antioxidantes. As espécies *Dendrobium speciosum* e *Phalaenopsis violacea* já tiveram seu potencial antioxidante descrito (MIHN et al., 2016).

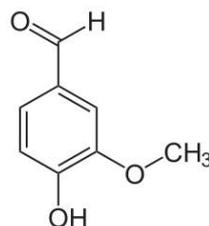
## 1.1 O gênero *Vanilla*

Um dos gêneros de Orchidaceae é o *Vanilla*, que pertence à subfamília Vanilloideae, tribo Vanilleae, subtribo Vanillinae e consiste de aproximadamente 110 espécies (KOYYAPPURATH, 2015).

No Brasil, diversas espécies de *Vanilla* foram documentadas em todas as regiões do país, em diferentes vegetações, mas predominantemente na Amazônia (ORCHIDACEAE, 2014).

Esse gênero é muito importante economicamente, pois é a partir das favas de *Vanilla planifolia* que se obtém a baunilha, a segunda fragrância mais cara do mundo (OSORIO et al., 2012). Os maiores produtores de baunilha são a Índia, Indonésia, Madagascar, México, Reunião das Ilhas e Comoros (SASIKUMAR, 2010). A baunilha é utilizada na fabricação de cosméticos e na indústria alimentícia (AZEEZ, 2008).

Além de ter importância econômica no cenário mundial, popularmente, espécies de *Vanilla* são usadas para fins medicinais. No entanto, não há muitas pesquisas científicas que comprovem as ações benéficas do extrato das partes vegetais de diferentes espécies deste gênero (UCHIDA, 2011). *V. planifolia* é, até o momento, a espécie mais estudada nesse sentido. Sabe-se que a baunilha é uma mistura de compostos, sendo que a vanilina (Figura 1, p. 16) é o fenólico que se encontra em maior concentração nessa mistura. Entretanto, há outros fenóis de igual valor na baunilha, como *p*-hidroxibenzaldeídos, ácidos *p*-hidroxibenzoicos e ácido vanílico, todos eles empregados na indústria farmacêutica (SINHA; VERMA; SHARMA, 2007).



**Figura 1:** Estrutura química da vanilina  
**Fonte:** A autora

Devido à grande quantidade de fenólicos presentes no extrato de baunilha, ele é considerado um poderoso antioxidante, ajudando na prevenção contra o câncer e agindo como

antineoplásico. Pesquisadores detectaram, também, efeito redutor de colesterol na vanilina, que está relacionado ao seu efeito hipotriglicéidêmico ou ao seu efeito regulatório no metabolismo do colesterol (KRISHNASREE; ANDALLU, 2013). Outros estudiosos identificaram na vanilina efeito antibacteriano contra *Escherichia coli* e *Listeria innocua* (AHMED, 2015).

*Vanilla palmarum* (Figura 2, p. 17) foi descrita pela primeira vez em 1832 com o basionímo *Epidendrum palmarum*, mas, no ano de 1840, ela foi transferida para o gênero *Vanilla*. No Brasil, ela pode ser encontrada, entre outros Estados, na Bahia, onde é vista frequentemente na caatinga, sobre *Syagrus coronata*, planta conhecida popularmente como licuri (BASTOS, 2009).



**Figura 2:** *Vanilla palmarum*.

**Fonte:** A autora.

Não são encontrados muitos estudos relacionados à *V. palmarum* na literatura, mas há registros de que esta espécie é empregada na medicina popular para o tratamento de coluna, rins e dor de ouvido, além de ser usada como ornamento, alimento e cosmético (tônico capilar) (COSTA et al., 2006). No município de Milagres, Bahia, *V. palmarum* é utilizada por alguns moradores no combate à dermatofitoses, mas não há pesquisas que comprovem a ação antifúngica de *V. palmarum*.

O gênero *Lippia* é um dos 36 gêneros da família Verbenaceae e o segundo maior deles, apresentando 200 espécies distribuídas pelas Américas do Sul e Central e pela África tropical, sendo que a maior parte dessas espécies (75%) está em território brasileiro (SALIMENA, 2000; VICCINI et al., 2006). Na natureza, as espécies desse gênero caracterizam-se como arbustos ou subarbustos, geralmente ramosos, ou ervas perenes (SALIMENA, 2000; TAIZ; ZEIGER, 2013).

Conhecidas popularmente como alecrim do mato, alecrim do campo, cidreira, alecrim de tabuleiro e alecrim, as espécies de *Lippia* são frequentemente utilizadas na culinária e na medicina tradicional. Nesta última, emprega-se a *Lippia* na forma de decoto ou infusão, para o tratamento, por via oral, de distúrbios respiratórios e gastrointestinais e no combate a infecções em geral (SALIMENA, 2000; PASCUAL et al., 2001). A partir desta informação, muitos estudiosos têm investigado o potencial de espécies de *Lippia* para inibir o crescimento microbiano, sendo *L. alba* a mais estudada. Várias pesquisas comprovaram, por meio de testes *in vitro*, a atividade antifúngica dos óleos essenciais de *Lippia* sp. contra fungos de diversas espécies, como *Aspergillus niger*, *Trichophyton rubrum* e *Candida albicans*, por exemplo.

*Lippia alba* (erva-cidreira) (Figura 3, p. 19) é um arbusto aromático com ampla distribuição nos países da América Central e do Sul, com ocorrência também na Índia e Austrália. É uma das espécies de *Lippia* mais utilizadas na medicina tradicional, com relatos para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, tosse, resfriado, dores e problemas de pele, entre outros (LIMA, 2013; HENNEBELLE et al., 2008; PINTO et al., 2013). Em relação à atividade biológica, é também uma das espécies mais estudadas, em especial a ação antimicrobiana de seu óleo essencial frente a bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis* e fungos, entre os quais os dermatófitos (MACHADO; PEREIRA; BATISTA, 2014; MESA-ARANGO, 2009; HENNEBELLE et al., 2008). A atividade frente a *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporium gypseum* do óleo essencial rico em linalol, bem como seu possível mecanismo de ação, foi previamente descrita (COSTA et al., 2013).

Entretanto, devido a sua ampla distribuição geográfica e variabilidade genética, o óleo essencial de *L. alba* apresenta uma larga variação em sua composição química, dando origem a diferentes quimiotipos, classificados conforme seus componentes majoritários. Sete quimiotipos já foram descritos: quimiotipo I (cital e/ou linalol e/ou E-cariofileno), II (tagetona), III (limoneno e carvona ou dihidrocarvona, piperitona, piperitenona), IV

(mirceno), V ( $\gamma$ -terpineno), VI (cânfora/1,8 cineol) e VII (estragol), que podem apresentar distintas ações biológicas (HENNEBELLE et al., 2008; HENNEBELLE et al., 2006).



**Figura 3:** *Lippia alba*.  
**Fonte:** A autora.

### 3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Nos organismos vivos, o metabolismo celular resulta na síntese de diversas substâncias que variam em composição, função e localização. Este metabolismo é dividido em primário e secundário (DEWICK, 2002).

O metabolismo primário é o responsável pela produção de compostos essenciais ao crescimento e desenvolvimento celular, como os lipídios, carboidratos, aminoácidos, as proteínas e as vitaminas, chamados de metabólitos primários (MP) (BRIZUELA et al., 1998; KUTCHAN, 2001). O metabolismo secundário, por sua vez, resulta em produtos importantes para a interação dos vegetais com o meio ambiente, principalmente pelo fato de que plantas enraizadas no solo não conseguem realizar tal interação através das vias geralmente utilizadas pelos animais. Logo, os metabólitos secundários (MS) encontrados nos vegetais apresentam, em sua maioria, alguma atividade biológica (BRIZUELA et al., 1998; KUTCHAN, 2001).

A produção das várias classes de compostos originados a partir do metabolismo secundário vegetal depende de diversos fatores – ambientais, genéticos, e fisiológicos – o que torna os MS substâncias com estruturas complexas, de composição química muito variada, especialmente no que diz respeito à diversidade de grupos funcionais (RISSATO;

ALMEIDA; SILVA, 2004). Os flavonoides, as cumarinas, os glicosídeos, isoflavonoides, terpenoides, alcaloides, taninos e poliacetilenos são exemplos de substâncias que já foram identificadas em diversas espécies, sendo que alguns deles são característicos de determinadas famílias, gêneros e espécies (COWAN, 1999).

É devido a essa grande diversidade molecular que os vegetais são considerados fontes importantes de matéria-prima para a produção de novas drogas. Dessa forma, pode-se afirmar que os MS beneficiam não apenas às plantas, mas também aos animais e ao homem, ajudando-os no combate a microrganismos, entre outras funções (LORENZI; MATOS, 2002).

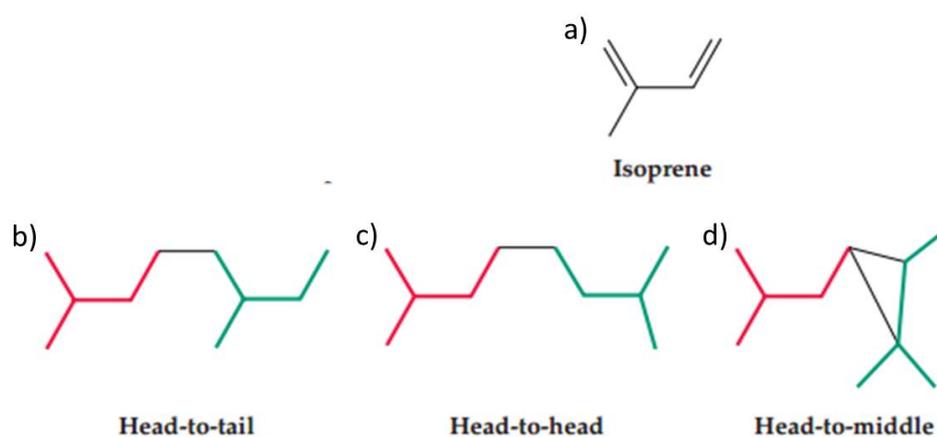
Nas plantas, os MS, também conhecidos como produtos naturais e compostos secundários, possuem funções variadas – atuam como sinalizadores, como suporte estrutural, como pigmentos, na defesa contra patógenos e herbívoros, promovendo a interação do vegetal com outros organismos e como atrativos para polinizadores, podendo, também, estimular ou inibir ações enzimáticas ou até mesmo desempenhar o papel de cofatores de enzimas (TIWARI; RANA, 2015). Contudo, alguns autores afirmam que, apesar de sua funcionalidade, os MS, ao contrário dos MP, não são essenciais às plantas, ou seja, qualquer planta pode se desenvolver e realizar seus processos normalmente na ausência de MS (SPRINGOB; KUTCHAN, 2009). Além disso, sua distribuição é restrita, de maneira que alguns MS são característicos de uma espécie de planta ou de grupos de espécies relacionados (TAIZ et al., 2015).

De acordo com a sua composição química, os MS são separados em três grandes grupos: terpenos, compostos fenólicos e compostos que contêm nitrogênio (alcaloides). Eles são produzidos através das mesmas vias pelas quais as plantas realizam processos essenciais a sua sobrevivência (fotossíntese, glicólise e ciclo do ácido cítrico). Nesses processos, são gerados intermediários biossintéticos que resultam na formação de MS. Os intermediários biossintéticos mais utilizados na biossíntese de MS são a acetil coenzima A (acetil-CoA), o ácido xiquímico, o ácido mevalônico e a 1-deoxixilulose-5-fosfato (KABERA et al., 2014; DIAS, URBAN; ROESSNER, 2012).

### **3.1 Terpenos**

No que diz respeito aos terpenos, trata-se de uma classe de MS muito vasta, sendo a maior classe de produtos naturais de origem vegetal, que tem como unidade estrutural básica isoprenos de cinco carbonos, geralmente ligados uns aos outros obedecendo um arranjo

cabeça-cauda (DEGENHARDT; KÖLLNER GERSHENZON. 2009). Entretanto, os modelos de ligação cabeça-cabeça e cabeça-meio também podem ocorrer (Figura 4, p. 21) (CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2015). Estes MS podem assumir outras configurações, variando em grau de insaturação, oxidação, grupos funcionais e presença de anéis, o que contribui para a diversidade estrutural das classes de terpenos, os quais podem ser encontrados em vegetais (plantas superiores), principalmente, e em alguns insetos e organismos marinhos. São chamados terpenoides os compostos terpênicos que apresentam oxigênio em sua estrutura (ZHANG et al., 2011).



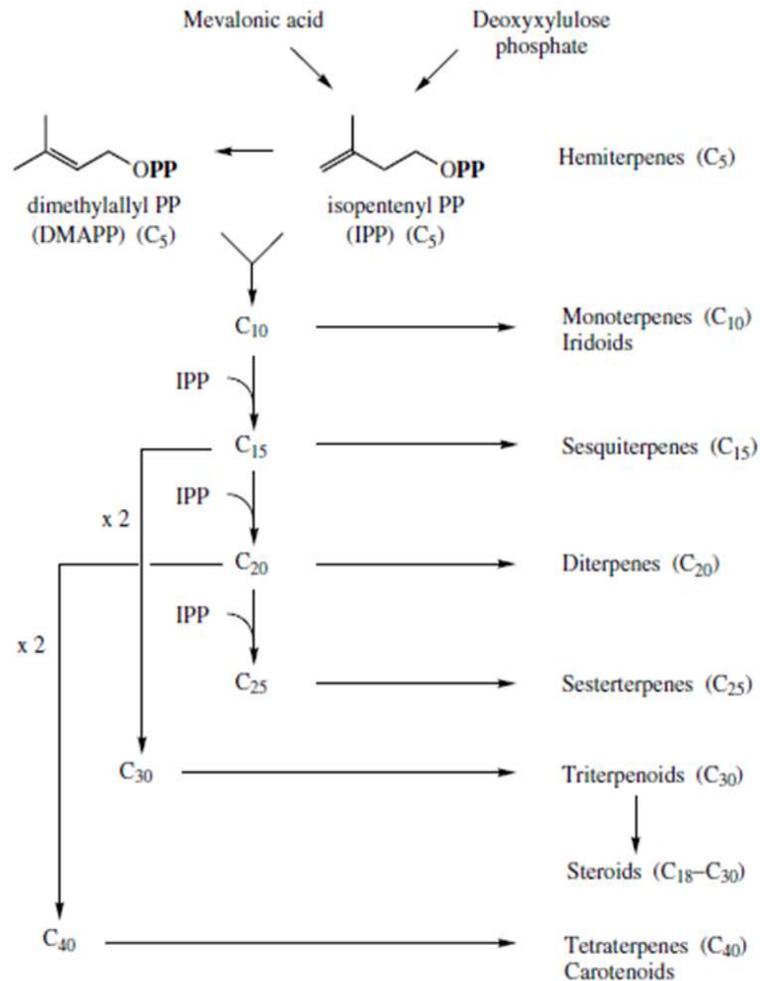
**Figura 4:** a) estrutura química do isopreno; b) modelo cabeça-cauda; c) modelo cabeça-cabeça; d) modelo cabeça-meio.

**Fonte:** CROTEAU; KUTCHAN; LEWIS, 2015.

Nas plantas, duas vias podem, separadamente, promover a biossíntese de terpenos – a via citosólica do mevalonato (MVA) e a via plastidial do metileritrol fosfato (MEP) (RAMAK et al., 2014). Durante muito tempo, achava-se que as partes iniciais da via do MVA eram responsáveis pela síntese de todos os derivados terpenoides. Porém, hoje, sabe-se que a via do MEP, também conhecida como via mevalonato-independente ou via da deoxixilulose fosfato, é mais utilizada na natureza do que a via do MVA (DEWICK, 2002). A classificação dos terpenos ocorre de acordo com a quantidade de unidades isoprenídicas presentes em seu esqueleto (Figura 5, p. 22) (SANTOS, 2012).

No tocante às funções biológicas dos terpenos, nos vegetais, eles atuam como defensores contra herbívoros, pois eles são toxinas deterrentes para insetos e mamíferos, o que promove a sua atividade e a sua comercialização como inseticidas. Os óleos essenciais, formados por terpenos voláteis (monoterpenos e sesquiterpenos), agem como repelentes de insetos através do odor característico que dão às plantas, alertando esses predadores sobre a sua toxicidade. Ademais, alguns terpenos estimulam o crescimento vegetal. Outros, os

esteróis, são componentes constitucionais essenciais às membranas celulares. Outros, ainda, participam do processo de fotossíntese como pigmentos acessórios e protegendo os tecidos fotossintéticos da foto-oxidação. Nesses casos, os terpenos funcionam como MP em vez de MS, o que contradiz a afirmativa de que os MS não são essenciais aos organismos vegetais (TAIZ; ZEIGER, 2006).



**Figura 5:** Síntese de terpenos resumida.  
**Fonte:** DEWICK, 2002.

### 3.2 Compostos fenólicos

Define-se compostos fenólicos como todo produto natural que possui um grupo fenol – um grupo funcional hidroxila (-OH) ligado a um anel aromático. Esses MS são quimicamente heterogêneos, variando quanto à solubilidade – alguns são solúveis somente em solventes orgânicos, outros são solúveis em água, outros são polímeros insolúveis

(ANULIKA et al., 2016). Nos vegetais, a produção dos fenólicos acontece pela via do ácido xiquímico (COOPER; NICOLA, 2014).

A classificação desses compostos varia de autor para autor. Harbonne e Simmonds, por exemplo, separam-nos em grupos baseados na quantidade de carbonos presentes na molécula (Tabela 1, p. 23). Por outro lado, Swain e Bate-Smith agrupam-nos numa relação de compostos comuns e menos comuns, observando a sua ocorrência. Enquanto isso, Ribéreau-Gayon reúne os fenólicos em três famílias, de acordo com a sua distribuição. Estas famílias são: 1) fenóis amplamente distribuídos; 2) fenóis menos amplamente distribuídos; 3) constituintes fenólicos presentes como polímeros (VERMERRIS; NICHOLSON, 2006).

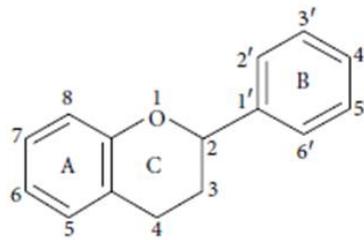
**Tabela 1:** Classificação de compostos fenólicos segundo Harbonne e Simmonds (1964).

<b>Estrutura</b>	<b>Classe</b>
C <sub>6</sub>	Fenólicos simples
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>	Ácidos fenólicos e compostos relacionados
C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>	Acetofeona e ácidos fenilacéticos
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Ácidos cinâmicos, aldeídos cinamil e álcoois cinamil
C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>	Cumarinas, isocumarinas e cromonas
C <sub>15</sub>	Chalconas, auronas e dihidrochalconas
C <sub>15</sub>	Flavanos
C <sub>15</sub>	Flavonas
C <sub>15</sub>	Flavanonas
C <sub>15</sub>	Flavanonóis
C <sub>15</sub>	Antocianidinas
C <sub>15</sub>	Antocianinas
C <sub>30</sub>	Biflavonil
C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub> , C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>	Benzofenonas, xantonas e estilbenos
C <sub>6</sub> , C <sub>10</sub> , C <sub>14</sub>	Quinonas
C <sub>18</sub>	Betacianinas
Liganos, neoliganos	Dímeros ou oligômeros
Lignina	Polímeros
Taninos	Oligômeros ou polímeros
Flobafenos	Polímeros

**Fonte:** VERMERRIS; NICHOLSON, 2006 (adaptado).

Devido à sua diversidade química, os fenólicos podem assumir diversas funções nas plantas, agindo como defensores contra herbívoros e patógenos, dando coloração para camuflagem, atraindo polinizadores, protegendo dos efeitos da radiação ultravioleta (UV) (LIN et al., 2016).

Os flavonoides são polifenóis achados abundantemente em plantas, onde podem apresentar-se na forma livre (agliconas) e como glicosídeos (PINHEIRO; JUSTINO, 2012). Sua estrutura química básica é constituída de um esqueleto com quinze carbonos (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>-C<sub>6</sub>) – dois anéis aromáticos (A e B) ligados por um anel pirano heterocíclico (C) – (Figura 6, p. 24) (KUMAR; PANDEY, 2013).



**Figura 6:** Estrutura básica de um flavonoide.  
**Fonte.** KUMAR; PANDEY, 2013.

No tocante à função dos flavonoides, eles participam da relação planta-animais, visto que eles são responsáveis pela cor, pela fragrância e pelo sabor dos vegetais, atuando, dessa forma, como atrativos ou repelentes de insetos e mamíferos. Além disso, eles também são importantes na relação simbiótica planta-microrganismo, em particular bactérias. Em se tratando da relação planta-planta, os flavonoides exercem função alelopática, que pode ser positiva, contribuindo para o desenvolvimento do organismo vizinho, ou negativa, inibindo a germinação e o crescimento deste. Outro papel importante dos flavonoides é a defesa dos vegetais contra fungos e bactérias patogênicos (MIERZIAK; KOSTYN; KULMAN, 2014).

Em relação às propriedades farmacológicas dos flavonoides, vários estudos evidenciam seu potencial terapêutico como anti-inflamatórios, antioxidantes, antimicrobianos, hepatoprotetores, antineoplásicos e fotoprotetores, bem como seus efeitos antidiabéticos, antiúlcera gastrointestinal, relaxante vascular, antiaterosclerótico, antitrombogênico, cardioprotetor e ansiolítico (TAPAS; SAKARKAR; KAKDE, 2008). Um exemplo de flavonoide com potencial terapêutico é a quercetina, um flavonol que tem sido muito estudado como agente antineoplásico (CAROCHO; FERREIRA, 2013). Entretanto, este MS possui múltiplos benefícios para a saúde humana (ALRAWAIQ; ABDULLAH, 2014).

### 3.3 Alcaloides

Os alcaloides são um grupo de MS também formado pela via do ácido xiquímico e contêm nitrogênio em sua composição química (com exceção dos aminoácidos simples, das proteínas e dos compostos glicosídicos nitrogenados). Eles são produzidos por diferentes organismos, incluindo os humanos (BUCKINGHAM et al., 2010; GUTZEIT; LUDWIG-MÜLLER, 2014). Sua classificação, em relação à estrutura química, separa os alcaloides em alcaloides verdadeiros, protoalcaloides e pseudoalcaloides, sendo os dois primeiros originados a partir de aminoácidos enquanto os últimos não são derivados dessas substâncias

(ANISZEWSKI, 2007). Os alcaloides verdadeiros apresentam nitrogênio entre um anel heterocíclico, ao passo que os protoalcaloides possuem nitrogênio fora de um heterociclo (BENNETT; WALLSGROVE, 1994).

Praticamente todos os alcaloides são tóxicos para humanos, se ingeridos em quantidade não recomendada, mas, ainda assim, muitos deles são utilizados pela medicina, movimentando cerca de 4 bilhões de dólares no mercado mundial (OLIVOTO et al., 2017). A morfina, extraída de espécies do gênero *Papaver*, é um exemplo de alcaloide muito utilizado como analgésico.

## 4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

### 4.1 Atividade antioxidante

A atividade antioxidante de um composto químico é determinada pela sua capacidade de minimizar os danos causados pelo estresse oxidativo, impedindo a formação de radicais livres e outras espécies reativas de oxigênio (ERO) geradas pela transferência de elétrons realizada pelas células. Esses danos ocorrem porque os radicais livres – espécies químicas que possuem um ou mais elétrons desemparelhados em sua última camada eletrônica – são altamente reativos, podendo reagir com qualquer molécula que entrar em contato com eles (ANGELO; JORGE, 2007; DELMONDES et al., 2013).

Naturalmente, todos os organismos vivos produzem substâncias antioxidantes. No entanto, nem sempre a produção endógena desses antioxidantes é suficiente para a manutenção do organismo e para evitar a formação de radicais livres e EROs. Logo, é necessário que se busque antioxidantes de fontes exógenas. Assim, devido ao fato de serem ricos em substâncias antioxidantes, principalmente compostos fenólicos, os vegetais representam uma fonte exógena dessas substâncias e devem estar entre os alimentos consumidos diariamente pelo homem (OLIVEIRA et al., 2009).

Deve-se evidenciar que várias espécies da família Orchidaceae foram estudadas no tocante à atividade antioxidante que seus extratos brutos desempenham. O extrato bruto das folhas de *Phalaenopsis* sp., por exemplo, reduziu a formação de radicais livres em 50%, no teste de sequestro do DPPH, numa concentração de 8,01 mg/mL (NGUYEN et al. 2018). A fração metanólica do extrato da raiz de *Luisia zeylanica*, por sua vez, desempenhou a mesma

ação, porém numa concentração muito menor (150 µg/mL) (SOHAG; HOQUE; HUDA, 2017).

A atividade antioxidante dessas espécies deve-se ao fato de que os fenólicos nelas presentes atuam interrompendo a formação de radicais livres através da doação de elétrons ou de hidrogênio para estes radicais, conferindo assim a eles estabilidade termodinâmica. Devido a esse fator, os fenólicos são importantes para a prevenção de diversas patologias, entre elas o câncer (ANGELO; JORGE, 2007; DELMONDES et al., 2013).

## 4.2 Atividade antimicrobiana

Atualmente, a medicina tem lidado com um problema de saúde pública a nível mundial – a resistência aos antimicrobianos convencionais. No Reino Unido, por exemplo, a cepa bacteriana MRSA de *Staphylococcus aureus* meticilina-resistente é a de maior incidência. Diante disso, a indústria farmacêutica tem buscado desenvolver novas drogas que ajam em sítios de ação diferentes daqueles usados pelas drogas clássicas. Assim, os produtos naturais advindos de plantas medicinais têm recebido bastante atenção e são frequentes objetos de estudo (CUSHNIE; LAMB, 2005).

Numa pesquisa realizada em 2008, foi detectada a atividade antimicrobiana de flavonoides extraídos das espécies vegetais *Viscum album*, *Prunus armeniaca*, *G. fissurensis* e *C. hypoleucum* contra a produção da enzima β-lactamase de amplo espectro pela bactéria *Klebsiella pneumoniae*. Entre os flavonoides citados na pesquisa estão o canferol, a quercetina e a naringenina (ÖZÇELİK et al., 2008).

Outros estudos demonstram que alguns terpenos também exercem atividade antimicrobiana. Saponinas isoladas a partir do extrato metanólico das folhas de *Anabasis articulata* apresentaram atividade antifúngica contra *Candida albicans* (MAATALAH et al., 2012).

Quanto aos alcaloides, seu potencial como antimicrobiano é esclarecido a partir da investigação das propriedades antibacterianas de alcaloides presentes na parte aérea de *Sida acuta*, que inibiram o crescimento de uma variedade de bactérias de importância clínica, tais como *S. aureus* e *E. coli* (KAROU et al., 2005).

Os trabalhos citados anteriormente não foram os únicos a obter resultados satisfatórios quanto ao potencial farmacológico dos MS de origem vegetal, revelando que eles são, portanto, princípios ativos riquíssimos. Contudo, ainda há muito que investigar, pois diversas

espécies vegetais não foram analisadas até então. Sabe-se que a vanilina, presente nas espécies do gênero *Vanilla*, é eficaz contra bactérias como *E. coli* e *Listeria innocua* e que outras espécies da família Orchidaceae, como *Dendrobium nobile*, por exemplo, também têm propriedades antimicrobianas (FITZGERALD et al., 2004; MARASINI; JOSHI, 2012). Porém, não há estudos que indicam o potencial antimicrobiano de *V. palmarum*. O óleo essencial de *L. alba* (quimiotipo citral) no entanto, demonstrou atividade antifúngica contra os dermatófitos *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*, numa concentração inibitória mínima de 125 µg/mL para o primeiro e de 31,25 µg/mL para o segundo (TANGARIFE-CASTAÑO et al., 2012). Vale ressaltar que os quimiotipos de *L. alba* são amplamente estudados em diversas frentes de análise.

## 5 EXTRATOS VEGETAIS

Os MS podem ser produzidos em diferentes órgãos vegetais, nos quais permanecem armazenados. Para extrair essas substâncias, as principais técnicas de extração que podem ser usadas são a extração com auxílio de solvente (sólido-líquido), a extração a vapor ou a extração com uso de fluido supercrítico (VEGGI, 2009).

Entretanto, dessas três técnicas, a extração sólido-líquido é a mais comum nos processos industriais. Ela consiste na extração de uma matéria sólida, de compostos solúveis, por um solvente líquido conhecido (AGUILERA, 2003). Ao entrar em contato com as células vegetais, o solvente dissolve o extrato, produzindo uma solução concentrada, formada por solvente e por soluto extraído. Porém, é difícil obter a extração completa das substâncias, visto que parte do extrato permanece retido nas partículas contínuas da matéria-prima vegetal (GAMSE, 2002).

Diversos fatores podem influenciar na extração sólido-líquido, o que impõe a necessidade de se avaliar desde a matéria-prima (vegetal) a ser utilizada ao melhor solvente para a extração das substâncias desejadas (GAMSE, 2002).

O preparo da matéria-prima é um ponto chave do processo. A moagem do material é de grande valia, pois ela aumenta a sua superfície de contato, permitindo que o solvente tenha melhor acesso à matriz sólida, o que também diminui o tempo de extração. A seletividade do solvente e a temperatura de extração também devem ser observadas, pois altas temperaturas contribuem para a melhor solubilidade das substâncias, aumentando assim, a taxa de transferência de massa, entretanto, pode causar a degradação dos compostos termosensíveis. A

secagem do material em condições não degradativas também é um ponto importante porque a água presente no material pode competir com o solvente, afetando a taxa de transferência de massa. Em se tratando do solvente, é preciso considerar, além da sua seletividade, a densidade, a volatilidade, o ponto de ebulição, a viscosidade, a inflamabilidade, a toxicidade e o custo (VEGGI, 2009). O metanol é um dos solventes mais utilizados para a extração de MS, principalmente de compostos fenólicos (PESCHEL et al., 2006).

## 5.1 Métodos para análise da composição química de extratos

### 5.1.1 Determinação do teor de fenólicos totais

O teor de fenólicos totais presentes numa amostra pode ser quantificado através do método de espectroscopia na região do visível que utiliza o reagente de Folin-Ciocalteu. Esse método é o mais utilizado na determinação de fenóis totais, pois ele requer poucos reagentes, todos comercialmente acessíveis, é de baixo custo e pode ser facilmente reproduzido (VIEIRA et al., 2015).

Dois ácidos compõem o reagente de Folin-Ciocalteu: o ácido fosfomolibdico e o ácido fosfotúngstico. Neles, o molibdênio e o tungstênio estão no estado de oxidação  $6^+$ , ambos apresentando cor amarela. Porém, quando submetidos à ação de substâncias redutoras, como compostos fenólicos, por exemplo, sob condições alcalinas, eles sofrem uma reação de oxirredução que dá origem ao complexo molibdênio-tungstênio de coloração azul (SOUSA et al., 2007). Neste complexo, o estado de oxidação dos metais encontra-se entre 5 e 6. Através da coloração, é possível determinar a concentração de substâncias redutoras na amostra.

A reação de oxirredução ocorre entre o fenolato (agente redutor) e o complexo molibdênio-tungstênio (agente oxidante) (DO RIO, 1996). A cor do meio reacional é controlada pela quantidade de grupos potencialmente oxidáveis, seja grupos hidroxila ou não. Por isso, utiliza-se uma curva padrão de ácido gálico para expressar os resultados em miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama de extrato (mg EAG/g) (SILVA et al., 2010). A solução alcalina mais indicada como meio reacional é a solução de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (REZENDE, 2010).

### 5.1.2 Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais presentes em extratos vegetais pode ser determinado pelo método colorimétrico de complexação com cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ), que utiliza a espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta visível (UV-Vis) (MARQUES et al., 2012).

O princípio desse método se baseia na capacidade do cátion  $\text{Al}^{3+}$  de formar complexos estáveis com as hidroxilas livres dos flavonoides, provocando, assim, a extensão do sistema conjugado de maneira que sua absorção máxima se desloca para regiões de maior comprimento de onda (BURIOL et al., 2009; MARQUES et al., 2012).

O complexo flavonoide- $\text{Al}^{3+}$  apresenta coloração amarela, que varia em intensidade a depender da concentração de flavonoides na amostra (PEIXOTO SOBRINHO et al., 2012).

## 6 ÓLEOS ESSENCIAIS

Os óleos essenciais (OEs) são misturas voláteis de diferentes MS – principalmente da classe dos terpenos. Em sua composição, predominam os mono e os sesquiterpenos, mas compostos não-terpênicos também podem ser encontrados. O número e a concentração desses compostos variam, contudo, de espécie para espécie, de maneira que um óleo pode apresentar diferentes metabólitos em sua composição (BAKKALI et al., 2008).

A produção de OEs ocorre em diferentes órgãos de plantas aromáticas, onde são secretados e armazenados em estruturas especializadas que diferem em morfologia, função e distribuição. Tais estruturas encontram-se na superfície dos órgãos vegetais e/ou em seus tecidos, nos quais desempenham o papel de minimizadores do risco de autotoxicidade (SUZARTE; SALGUEIRO, 2015).

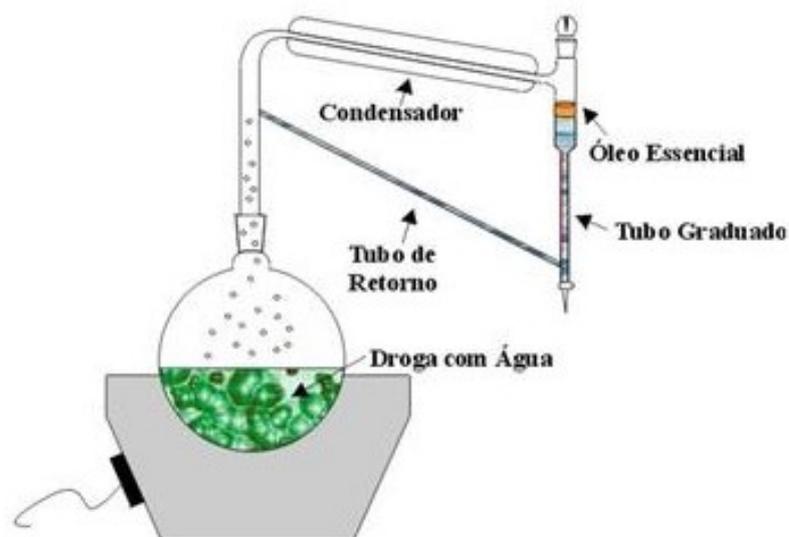
Quanto às propriedades físico-químicas dos OEs, eles são insolúveis em água, apresentando-se em estado líquido e incolores à temperatura ambiente. Eles possuem odor característico e, por isso, são amplamente usados na indústria de cosméticos, perfumaria e na aromaterapia (DHIFI et al., 2016).

A variabilidade dos OEs depende de diversos fatores, tais como a sazonalidade, o grau de desenvolvimento da planta, a genética e o meio ambiente. Todos estes fatores influenciam não somente no teor de compostos secundários nos OEs, mas também nas funções biológicas que eles desempenharão no vegetal (DHIFI et al., 2016). Sabe-se que os OEs atuam na defesa

das plantas contra microrganismos, como atrativos para dispersores de sementes e de pólen, como inseticidas, como repelentes de insetos e diminuindo a herbivoria (BAKKALI et al., 2008).

Diante das muitas funções que os OEs desempenham no organismo vegetal, a comunidade científica passou a investigar a possibilidade de essas substâncias produzirem efeitos farmacológicos benéficos para os seres humanos. Assim, os OEs são bastante estudados e, através de métodos padronizados, tem-se descoberto que OEs produzidos por diferentes espécies podem atuar, entre outras maneiras, como antioxidantes, antibacterianos, antifúngicos e anti-inflamatórios. O OE de *Lippia origanoides*, por exemplo, mostrou-se eficaz contra o fungo *Aspergillus flavus* (SILVA et al., 2012).

É válido destacar que o termo “óleo essencial” foi usado pela primeira vez no século XVI por Paracelsus Von Hohenheim, que nomeou o componente efetivo de uma droga como *Quinta essentia* (BURT, 2004). Atualmente, pode-se extrair OEs por meio de técnicas diferenciadas, tais como a destilação a vapor, a destilação destrutiva e a hidrodifusão. Entretanto, a hidrodestilação (Figura 7, p. 30) é a técnica de extração mais utilizada (LI et al., 2014). Nela, a água, na qual a biomassa é imersa e submetida à fervura, entra em contato com a célula vegetal, abrindo seus poros e liberando o OE das glândulas. Os vapores de água e óleo gerados condensam-se por resfriamento em condensador e escoam para o recipiente de coleta, no qual água e óleo líquidos podem ser separados por uma substância higroscópica ou por densidade (NORA; BORGES, 2017).



**Figura 7:** Hidrodestilação.  
**Fonte:** ÓLEOS ESSENCIAIS.

## 6.1 Método de análise da composição química de óleos essenciais

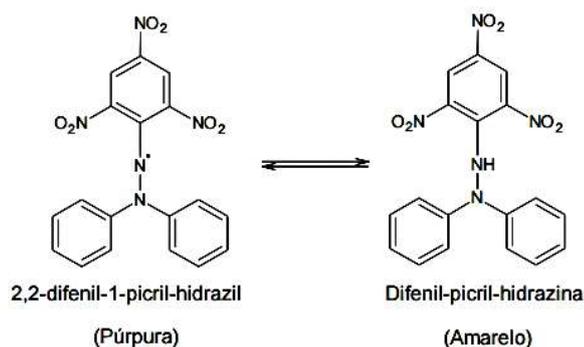
Há muito que os ensaios espectrométricos têm sido utilizados para detectar metabólitos secundários isolados. Porém, métodos de alta acurácia e sensibilidade, capazes de analisar misturas complexas, foram desenvolvidos com o passar dos anos. A cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) é um deles (LISEC et al., 2006).

Usada em diversas áreas da ciência e da tecnologia, a cromatografia gasosa (CG) é capaz de quantificar os componentes presentes numa mistura, mas essa capacidade é ambígua e reduzida. Além disso, esse método é incapaz de estabelecer a natureza e a estrutura química desses componentes, de modo que se faz necessário o uso de testes espectrométricos. A espectrometria de massas (EM) é, por sua vez, o sistema mais adequado para isso, pois, através do espectro de massas por ela captado, são fornecidas informações sobre o peso molecular e a composição das substâncias. A depender da resolução do espectrômetro utilizado, os grupos funcionais, a geometria e a isomeria espacial dos compostos também poderão ser detectados (GUO, 2014).

## 7 MÉTODOS PARA ANÁLISE DA ATIVIDADE BIOLÓGICA DE EXTRATOS E ÓLEOS ESSENCIAIS

### 7.1 Teste da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

O 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH•) é um radical livre estável de coloração púrpura que reage com compostos doadores de hidrogênio. Este radical, quando submetido à ação de um agente antioxidante ou uma espécie radicalar, sofre redução a 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H) (Figura 8, p. 32), que apresenta coloração amarela. O DPPH-H absorve energia a um comprimento de onda menor que aquele no qual o DPPH• absorve. Portanto, quanto maior for a concentração de antioxidantes no meio menor será a absorbância da mistura (OLIVEIRA et al., 2009).



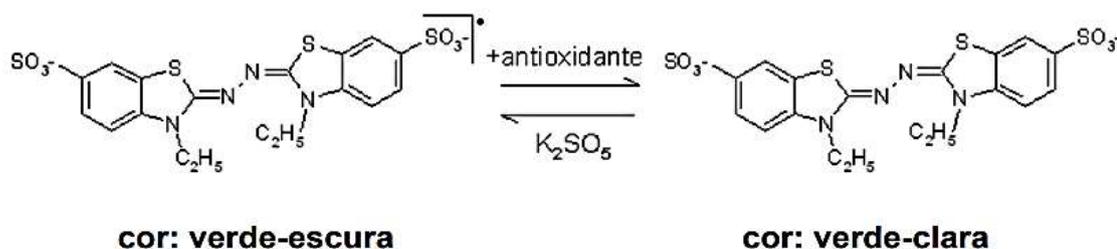
**Figura 8:** Formas radicalar e não radicalar do DPPH, respectivamente.

**Fonte:** NUNES et al., 2012.

Os resultados obtidos a partir da leitura da absorbância da mistura levam à determinação da porcentagem de atividade antioxidante (%AA) – quantidade de DPPH consumido pelo antioxidante. Calcula-se, então, o valor da concentração eficiente para diminuir em 50% a concentração de DPPH inicial ( $CE_{50}$ ). A  $CE_{50}$  é inversamente proporcional à concentração de DPPH na mistura, ou seja, quanto menor a  $CE_{50}$ , maior o consumo de DPPH no meio (SOUSA et al., 2007).

## 7.2 Teste da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS)

O teste da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS) (Figura 9, p. 32) segue o mesmo princípio utilizado pelo teste feito com o radical livre DPPH, ou seja, ele é baseado na transferência de um elétron para o radical. O resultado visível desse teste é a diminuição da intensidade da cor no meio reacional (MOHARRAM; YOUSSEF, 2014).



**Figura 9:** Estabilização do radical  $ABTS^+$  por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.

**Fonte:** EMBRAPA, 2007.

O objetivo do ensaio de ABTS é estabelecer a capacidade de uma substância para seqüestrar o radical ABTS gerado numa fase aquosa. O resultado obtido é comparado a um padrão de Trolox, um análogo da vitamina E solúvel em água e é dado em mol de equivalentes de Trolox por mL. A reação entre o antioxidante e o ABTS é mensurada por meio de espectrofotometria em comprimento de onda de 734 nm. Calcula-se, então, o valor da concentração eficiente para diminuir em 50% a concentração de ABTS inicial ( $CE_{50}$ ). (SHALABY; SHANAB, 2013; HIDALGO; ALMAJANO, 2017).

### 7.3 Testes antimicrobianos

Os testes laboratoriais de atividade antimicrobiana são realizados com a finalidade de prever a sensibilidade *in vitro* de determinado microrganismo. O teste de inibição do crescimento micelial é uma das maneiras de analisar a ação de antimicrobianos contra fungos filamentosos. Esse teste, feito, geralmente, em cinco repetições, consiste na semeadura do fungo em estudo em meio de cultura sólido contendo a substância a ser testada numa concentração previamente estabelecida. O resultado do teste é calculado em percentagem, conforme a fórmula de Edington, em que a média dos diâmetros das colônias submetidas ao antimicrobiano é comparada à média de um controle negativo (meio sem antimicrobiano) (EDINGTON; KHEW; BARRON, 1971).

Contudo, mesmo tendo a sua metodologia padronizada, o teste de inibição do crescimento micelial não é suficiente para fornecer resultados definitivos, devendo este ser associado ao teste de microdiluição, no qual várias concentrações do antimicrobiano em análise são distribuídas em placas ou tubos contendo meio caldo ou ágar, onde o microrganismo teste é inoculado (NCCLS, 2003; CLSI, 2012). Após um período determinado de incubação a 35°C, as placas são analisadas e se determina a concentração inibitória mínima (CIM) do agente antimicrobiano – menor concentração de agente antimicrobiano capaz de inibir o crescimento visível do microrganismo (NCCLS, 2002).

## 8 DERMATÓFITOS

Os dermatófitos são um grupo de fungos queratinofílicos que invadem tecidos queratinizados (pele, cabelo e unha), onde formam colônias e transformam a queratina em

substrato. Estes fungos são distribuídos em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. O habitat natural deles é o solo, mas, devido à especificidade adquirida no decorrer da evolução, eles podem infectar tecidos de animais e humanos, o que os leva para três diferentes classificações ecológicas. A primeira delas é a de fungos geófilos, que engloba as espécies exclusivamente do solo. A segunda, por sua vez, é a de fungos zoófilos, na qual se enquadram as espécies capazes de infectar animais. E a terceira é a de fungos antropófilos – aqueles que infectam seres humanos. Na verdade, zoófilos e antropófilos podem infectar tanto animais quanto humanos. *T. mentagrophytes* e *M. canis* são exemplos de zoófilos transmitidos via animal-homem. *T. rubrum*, *T. tonsurans*, *M. gypseum* e *E. floccosum* são exemplos de antropófilos transmitidos via homem-homem (LAKSHMIPATHY; KANNABIRAN, 2010).

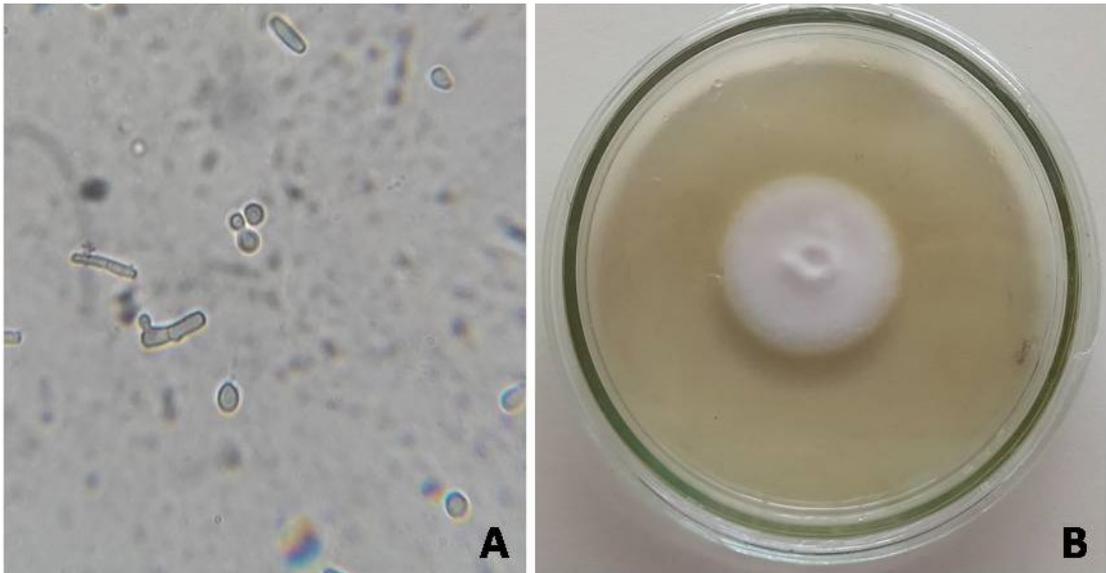
Geralmente, esses fungos colonizam a parte morta do extrato córneo, do cabelo e das unhas, onde se desenvolvem produzindo hifas e artroconídios importantes para o diagnóstico das dermatofitoses. Ao alojar-se no tecido alvo, esses patógenos produzem enzimas queratinolíticas, para quebrar a queratina e transformá-la em substrato para seu crescimento (HAYETTE; SACHELI, 2015). Essas enzimas estão associadas à patogenicidade dos dermatófitos. Um estudo realizado com *M. canis* isolado de cães e gatos comprovou que a atividade as proteases queratinolíticas era maior nos animais sintomáticos e induziam infecção crônica nas cobaias. Acredita-se que a penetração dos dermatófitos na pele do hospedeiro também seja auxiliada por proteases (PERES et al., 2010).

O tratamento das dermatofitoses é feito com drogas das classes das alilaminas e dos azóis, principalmente itraconazol e terbinafina. Frequentemente opta-se pelo uso combinado de antifúngicos tópicos e orais. Porém, há relatos de resistência a essas drogas, com recidivas recorrentes após a interrupção do tratamento (PERES et al., 2010).

### **8.1 O gênero *Trichophyton***

Vinte e quatro espécies integram o gênero *Trichophyton*, algumas das quais são nutricionalmente exigentes, como *T. mentagrophytes* e *T. tonsurans*, por exemplo, que requerem a presença de aminoácidos no meio de cultura (metionina para o primeiro e ornitina, citrulina e arginina para o segundo), que servirão como fonte de nitrogênio. Macroscopicamente, as unidades formadoras de colônia (UFC) de *Trichophyton* sp. possuem aspecto pulverulento, aveludado ou ceroso (Figura 10b, p. 35). Os microconídios predominam

nas espécies desse gênero, mostrando-se globosos, piriformes ou sésseis, com pigmentação lateral reversa, dispostos individualmente ou em grupos ao longo das hifas (Figura 10a, p. 35). Raros macroconídios podem ser observados microscopicamente. Tanto as exigências nutricionais quanto a pigmentação das espécies desse gênero são características utilizadas para o seu diagnóstico (SUGANTHI, 2017; WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).

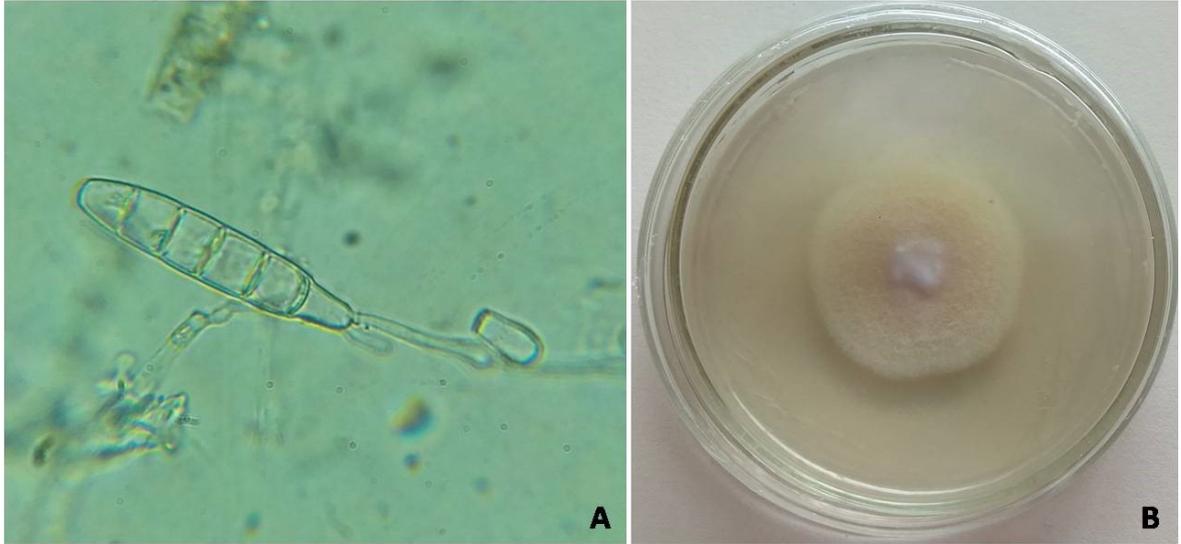


**Figura 10:** A: Hifa e microconídios de *T. mentagrophytes*; B: Colônia de *T. mentagrophytes*.

**Fonte:** A autora.

## 8.2 O gênero *Microsporum*

Das 16 espécies do gênero *Microsporum*, *M. canis*, que é capaz de se alojar no cabelo e na pele glabra, é a de maior relevância. Sua reprodução ocorre via macroconídios, principalmente. Estes são multiseptados, com parede grossa e superfície áspera (Figura 11, p. 36). As UFC são aveludadas ou pulverulentas, com pigmentação marrom ou branca (Figura 11b, p. 36) (SUGANTHI, 2017; WEITZMAN; SUMMERBELL, 1995).



**Figura 11:** A: Macroconídio de *M. gypseum*. B: Colônia de *M. gypseum*.

**Fonte:** A autora

## REFERÊNCIAS

- AGUILERA, J.M. Solid-Liquid extraction. In: TZIA, C.; LIADAKIS, J. **Extraction Optimization in Food Engineering**, CRC Press, cap. 2, p.35-53, 2003.
- AHMED, A. **A study on antibacterial activities of essential oils from most commonly used spices in Zanzibar against milk spoilage bacteria**. 2015. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciência em Saúde Pública e Segurança Alimentar). Sokoine University of Agriculture, Morogoro. 2015.
- ALRAWAIQ, N. S.; ABDULLAH, A. A review of flavonoid quercetin: metabolism, bioactivity and antioxidant properties. **International Journal of PharmTech Research**, v. 6, n. 3, p. 933-941, 2014.
- ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.
- ANISZEWSKI, T. **Alkaloids – secrets of life**: alkaloid chemistry, biological significance, applications and ecological role. Amsterdam: Elsevier, 2007, 335 p.
- ANULIKA, N. P. et al. The chemistry of natural product: plant secondary metabolites. **International Journal Of Technology Enhancements And Emerging Engineering Research**, v. 4, n. 8, p. 1-8, 2016.
- AZEEZ, S. Vanilla. In: PARTHASARATY, V. A.; CHEMPAKAM, B.; ZACHARIAH, T. J. **Chemistry of species**. CABI International, p. 287-311, 2008.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BASTOS, C. A. **A família Orchidaceae no município de Morro do Chapéu, Bahia, Brasil**. 2009. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Botânica). Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, 2009.
- BENNETT, R. N.; WALLSGROVE, R. M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Phytologist**, v. 127, n. 4, p. 617-633, 1994.
- BRIZUELA, M. A. et al. Basidiomicetos: nueva fuente de metabolitos secundarios (Revisión). **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 15, p. 69-74, 1998.
- BUCKINGHAM, J. et al. **Dictionary of Alkaloids**. 2. ed. Boca Raton: CRC Press, 2010, 2264 p.

BURIOL, L. et al. Chemical composition and biological activity of oil propolis extract: An alternative to ethanolic extract. **Quimica Nova**, v. 32, n. 2, p. 296-302, 2009.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v. 94, p. 223-253, 2004.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. The role of phenolic compounds in the fight against cancer – a review. **Anti-cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 13, n. 8, p. 1236-1258, 2013.

CLSI. **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Ninth Edition. CLSI document M07-A9. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2012.

COOPER, R.; NICOLA, G. **Natural products chemistry: sources, separation, and structures**. Boca Raton: CRC Press, 2014.

COSTA, D. C. M. et al. Inhibitory effect of linalool-rich essential oil from *Lippia alba* on the peptidase and keratinase activities of dermatophytes. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, p. 1-6, 2013.

COSTA, L. C. B. et al. Levantamento preliminar das espécies vegetais com potencial econômico no Parque Municipal da Boa Esperança, Ilhéus, Bahia, Brasil. **Acta Farmacéutica Bonaerense**, v.25, n. 2, p 184-191, 2006.

COWAN, M. M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 12, p. 564–582, oct., 1999.

CROTEAU, R.; KUTCHAN, T. M.; LEWIS, N. G. Natural Products (Secondary Metabolites). In: BUCHANAN, B. GRUISSEM, W.; JONES, R. **Biochemistry and Molecular Biology of Plants**. 2. ed. United States of America: Wiley, 2015.

CUSHNIE, T. P. T; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v.26, n. 5, p. 343-356, 2005.

DEGENHARDT, J.; KÖLLNER, T. G.; GERSHEZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v. 70, n. 15-16, p. 1621-1637, oct.-nov., 2009.

DELMONDES, P. H. et al. Substâncias antioxidantes presentes nos vegetais. **Revista Eletrônica Interdisciplinar Univar**, Barra do Garças, v. 1 n. 9, p. 1-5, 2013.

DEVI, P. U. et al. Antitumor and antimicrobial activities and inhibition of *in-vitro* lipid peroxidation by *Dendrobium nobile*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 10, p. 2289-2293, 2009.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**, 3. ed. Joh Wiley and Sons Ltd.: Chichester, 2002.

DHIFI, W. et al. Essential Oils' Chemical Characterization and Investigation of Some Biological Activities: A Critical Review. **Molecules**, v. 3, n. 25, 2016.

DIAS, D. A.; URBAN, S.; ROESSNER, U. A historical overview of natural products and drug discovery. **Metabolites**, v. 2, n. 2, p. 303-336, apr, 2012.

DO RIO, R. G. W. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. 1996. 81f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 1996.

EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, n. 1, p. 42-44, jan., 1971.

ELUMALAI, A.; ESWARIAH, M. C. Herbalism – a review. **International Journal of Phytotherapy**, v. 2, n. 2, p. 96-105, 2012.

EMBRAPA. **Comunicado Técnico 128**. Fortaleza: EMBRAPA, 2007.

FITZGERALD, D. J. et al. Mode of antimicrobial action of vanillin against *Escherichia coli*, *Lactobacillus plantarum* and *Listeria innocua*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 104-113, 2004.

GAMSE, T. **Liquid-liquid extraction and solid-liquid extraction**. Institute of Thermal Process and Environmental Engineering, Graz University of Technology, 2002.

GUO, X. **Advances in Gas Chromatography**. InTech, 2014.

GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 353-367, 2008.

GUTZEIT, H. O.; LUDWIG-MÜLLER, J. **Plant Natural Products: Synthesis, Biological Functions and Practical Applications**. Weinheim: Wiley-Blackwell, 2014.

HAYETTE, M.; SACHELI, R. Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. **Current Fungal Infection Report**, v. 9, n. 3, p. 164-179, 2015.

HENNEBELLE, T. et al. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 211-222, 2008.

HIDALGO, G.; ALMAJANO, M. P. Red fruits: extraction of antioxidants, phenolic content, and radical scavenging determination: a review. **Antioxidants**, v. 6, n. 7, 2017.

KABERA, J. N. et al. Plant Secondary Metabolites: Biosynthesis, Classification, Function and Pharmacological Properties. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, n. 7, p. 377-392, 2014.

KAROU, D. et al. Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acuta*. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, n. 12, p. 1452-1457, 2005.

KRISHNASREE, V.; ANDALLU, B. Radical scavenging activity of vanilla (*Vanilla fragrans*) pods and commercial vanilla essence. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 3, n. 11, 2013.

KOCH, A. K.; SANTOS, J. U. M.; ILKIU-BORGES, A. L. Sinopse das Orchidaceae holoepifitas e hemiepifitas da Floresta Nacional de Caxiuana, PA, Brasil. **Hoehnea**, v. 41, n. 1, p. 129-148, 2014.

KOYYAPPURATH, S. **Etude histo-pathologique et moléculaire de la résistance des vanilliers (*Vanilla* spp., Orchidaceae) à *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis-vanillae*, agent de la pourriture des racines et des tiges**. 2015. 227f. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal). Faculdade de Ciências e Tecnologias – Universidade da Reunião, Reunião, 2015.

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, 2013.

KUTCHAN, T. M. Ecological arsenal and developmental dispatcher: the paradigm of secondary metabolism. **Plant Physiology**, v. 125, n. 1, p. 58-60, 2001.

LAKSHMIPATHY, D. T.; KANNABIRAN, K. Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment. **Natural Science**, v. 2, n. 7, p. 726-731, 2010.

LI, Y. et al. **Essential Oils as Reagents in Green Chemistry**. Springer, 2014.

LIMA, P. S. S. **Efeito do complexo de inclusão contendo betaciclodextrina e óleo essencial de *Lippia grata* (Verbenaceae) na nocicepção orofacial em modelos experimentais**. 2013. 66f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – UEFS, Feira de Santana, 2013.

LIN, D. et al. An overview of plant phenolic compounds and their importance in human nutrition and management of type 2 diabetes. **Molecules**, v. 21, n. 10, p. 1374-1393, 2016.

LISEC, J. et al. Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. **Nature Protocol**, v. 1, n. 1, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas Cultivadas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2002.

MAATALAH, M. B. et al. Antimicrobial activity of the alkaloids and saponin extracts of *Anabasis articulata*. **Journal of Biotechnology and Pharmaceutical Research**, v. 3, n. 3, p. 54-57, 2012.

MACHADO, T. F.; PEREIRA, R. C. A.; BATISTA, V. C. V. Seasonal variability of the antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia alba*. **Revista Ciência Agrônômica**, Fortaleza, v. 45, n. 3, p. 515-519, 2014 .

MARASINI, R.; JOSHI, S. Antibacterial and antifungal activity of medicinal orchids growing in Nepal. **Journal of Nepal Chemical Society**, v. 29, p. 104-109, 2012.

MARQUES, G. S. et al. Avaliação de procedimentos para quantificação espectrofotométrica de flavonoides totais em folhas de *Bauhinia forficata* Link. **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 517-522, 2012.

MESA-ARANGO, A. C. et al. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. Rio de Janeiro: **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 6, 2009.

MIHN, T. N. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Phalaenopsis* orchid hybrids. **Antioxidants**, v. 5, n. 3, 2016.

MIERZIAK, J.; KOSTYN, K.; KULMA, A. Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. **Molecules**, v. 19, n. 10, p. 16240-16265, 2014.

MOHARRAM, H. A.; YOUSSEF, M. M. Methods for Determining the Antioxidant Activity: A Review. **Alexandria Journal of Food Science and Technology**, v. 11, n. 1, p. 31-42, 2014.

NCCLS. **Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests**; Approved Standard— Eighth Edition. NCCLS document M2-A8. Pennsylvania: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003.

NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos**; Norma Aprovada. Documento M38-A. Pensilvânia: Clinical and Laboratory Standards Institute 2002.

NGUYEN, H. C. et al. Antioxidant activities of the methanol extracts of various parts of *Phalaenopsis* orchids with white, yellow, and purple flowers. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 46, n. 2, 2018.

NORA, F. M. D.; BORGES, C. D. Ultrasound pretreatment as an alternative to improve essential oils extraction. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 47, n. 9, 2017.

NUNES, X. P. et al. Biological oxidations and antioxidant activity of natural products. **INTECH Open Access Publisher**, 2012.

ÓLEOS ESSENCIAIS. Núcleo de Estudos e Pesquisas de Plantas Medicinais. Disponível em: <<http://www.neplame.univasf.edu.br/oacuteteleos-essenciais.html>>. Acesso em: 18 jun. 2018.

OLIVEIRA, A. C. D. et al. Vegetals as natural sources of antioxidants. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVOTO, T. et al. Plant secondary metabolites and its dynamical systems of induction in response to environmental factors: a review. **African Journal of Agricultural Research**, v. 12, n. 2, p. 71-84, 2017.

ORCHIDACEAE. In: **Flora do Brasil 2020 em construção**. 2014. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB12347>>. Acesso em: 1 Jun. 2018.

OSORIO, A. I. et al. Effect of organic substrate composition, fertilizer dose, and microbial inoculation on *Vanilla* plant nutrient uptake and growth. **Acta Horticulturae**, v. 964, p. 135-142, 2012.

ÖZÇELİK, B. et al. Antimicrobial activity of flavonoids against extended spectrum  $\beta$ -lactamase (ESBL)-producing *Klebsiella pneumoniae*. **Phytotherapy Research**, v. 7, p. 1151-1157, 2008.

PASCUAL, M. E. et al. *Lippia*: traditional uses, chemistry and pharmacology: a review. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 76, p. 201-214, 2001.

PAUL, P. et al. Antimicrobial efficacy of orchid extracts as potential inhibitors of antibiotic resistant strains of *Escherichia coli*. **Asian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 6, n. 3, p. 108-111, 2013.

- PEIXOTO SOBRINHO, T. J. S. et al. Teor de flavonóides totais em produtos contendo pata-de-vaca (*Bauhinia* L.) comercializados em farmácias de Recife/PE. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, n. 4, p. 586-591, 2012.
- PERES, N. T. A. et al. Dermatófitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5 p. 657-667, 2010.
- PESCHEL, W. et al. An industrial approach in the search of natural antioxidants from vegetable and fruit wastes. **Food Chemistry**, v.97, 137-150, 2006.
- PETROVSKA, B. B. Historical review os medicinal plats' usage. **Pharmacognosy Review**, v. 6, n. 11, p. 1-5, 2012.
- PINHEIRO, P. F.; JUSTINO, G. C. Structural analysis of flavonoids and related compounds - a review of spectroscopic applications. In: RAO, V. **Phytochemicals** -a global perspective of their role in nutrition and health. Rijeka: Intech, 2012.
- PINTO, C. P. et al. Antimicrobial activity of *Lippia* species from the brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, Artical ID614501, 2013, 5 p.
- RAMAK, P. et al. Biosynthesis, regulation and properties of plant monoterpenoids. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 8, n. 29, p. 983-991, 2014.
- REZENDE, L. C. **Avaliação da atividade antioxidante e composição química de seis frutas tropicais consumidas na Bahia**. 2010. 118f. Tese (Doutorado em Química) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2010
- RISSATO, S.; ALMEIDA, M.V.; SILVA, L.C. Estudo do óleo essencial de *Eugenia uniflora* como subsídio para aplicação como fitofármaco. **Salusvita**, v. 23, n. 2, p. 209- 222, 2004.
- ROMANI, R. P. **A família Orchidaceae no Parque Estadual da Ilha do Cardoso, Cananéia, SP**. 2006. 219f. Dissertação (Mestrado em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente) – Instituto de Botânica da Secretaria de Estado do Meio Ambiente, São Paulo, 2006.
- SALIMENA, F. R. G. **Revisão taxonômica de *Lippia* sect. *Rhodolippia* Schauer (Verbenaceae)**. 2000. 562f. Tese (Doutorado em Botânica) – USP, São Paulo, 2000.
- SANTOS, R.A.F. **Avaliação das propriedades biológicas dos derivados sintéticos do  $\beta$ -sitosterol e triterpenos**. 2012, 106f. Dissertação (Mestrado em Química) – Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2012.

SASIKUMAR, S. Vanilla breeding: a review. **Agricultural Reviews**, v. 31, n. 2, p. 139-144, 2010.

SHALABY, E. A.; SHANAB, S. M. M. Comparison of DPPH and ABTS assays for determining antioxidant potential of water and methanol extracts of *Spirulina platensis*. **Indian Journal of Geo-Marine Sciences**, v. 42, n. 5, p. 556-564, 2013.

SINHA, A. K.; VERMA, S. C.; SHARMA, U. K. Development and validation of an RP-HPLC method for quantitative determination of vanillin and related phenolic compounds in *Vanilla planifolia*. **Journal of Separation Science**, v. 30, p. 15-20, 2007.

SILVA, T. L. V. **Orchidaceae no município de Jacobina, Bahia, Brasil**. 2013. 45f. (Monografia) – Universidade Federal da Bahia, Salvador.

SILVA, F. S. **Estudo fitoquímico e farmacológico de *Lippia thymoides* Mart. & Schauer (Verbenaceae)**. 2012. 143f. Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Estadual de Feira de Santana (UEFS) – Feira de Santana, 2012.

SILVA, M. L. C. et al. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 31, n. 3, p. 669-682, 2010.

SOHAG, S. I.; HOQUE, M. M.; HUDA, M. K. Phytochemical screening and antioxidant activity of rare medicinal orchid *Luisia zeylanica* Lindl. **Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry**, v. 6, n. 4, p. 688-692, 2017.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quimica Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SPRINGOB, K.; KUTCHAN, T. M. Introduction to the Different Classes of Natural Products. In: OSBOURN, A. E.; LANZOTTI, V. **Plant-derived Natural Products: Synthesis, Function and Application**. New York: Springer, 2009.

SUGANTHI, M. Pathogenesis and clinical significance of dermatophytes: a comprehensive review. **Innovations in Pharmaceuticals and Pharmacotherapy**, v. 4, n. 1, p. 62-70, 2017.

SUZARTE, M.; SALGUEIRO, L. Essential oil chemistry. In: SOUSA, D. P. de. **Bioactive Essential Oils and Cancer**. Switzerland: Springer, 2015.

TAIZ, L. et al. **Plant Physiology and Development**. 6. ed. Sunderland: Sinauer, 2015.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Plant Physiology**. 4. ed. Sunderland: Sinauer Associations, 2006.

TANGARIFE-CASTAÑO, V. et al. Antifungal activity of *Verbenaceae* and *Labiatae* families essential oils. **Pharmacology Online**, v. 1, p. 133-145, 2012.

TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as nutraceuticals: a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 1089-1099, 2008.

TIWARI, R.; RANA, S. C. Plant secondary metabolites: a review. **International Journal of Engineering Research and General Science**, v. 3, n. 5, 2015.

UCHIDA, J. Y. Farm and Forestry Production and Marketing Profile for *Vanilla* (*Vanilla planifolia*). In: ELEVITCH, C. R. **Specialty Crops for Pacific Island Agroforestry**. Holualoa: Permanent Agriculture Resources (PAR), 2011.

VEGGI, P. C. **Obtenção de extratos vegetais por diferentes métodos de extração: estudo experimental e simulação dos processos**. 2009. 165 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2009.

VERMERRIS, W.; NICHOLSON, R. **Phenolic compound biochemistry**. Dordrecht: Springer, 2006.

VICCINI, L. F. et al. Chromosome numbers in the genus *Lippia* (Verbenaceae). **Plant Systematics and Evolution**, v. 256, p. 171-178, 2006.

VIEIRA, L. M. et al. Fenóis totais, atividade antioxidante e inibição da enzima tirosinase de extratos de *Myracrodruon urundeuva* Fr. All. (Anacardiaceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, p. 521-527, 2015.

WEITZMAN, I.; SUMMERBELL, R. C. The dermatophytes. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 8, n. 2, p. 240-259, 1995.

ZHANG, H. et al. Plant terpenes. In: PEZZUTO, J. M.; KATO, M. J. **Phytochemistry and Pharmacognosy**. Paris: Encyclopedia of Life Support Systems 2011.

## **CAPÍTULO 1**

### **COMPOSIÇÃO QUÍMICA, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ATIVIDADE ANTIDERMATOFÍTICA DE *Vanilla palmarum***

## 1.1 INTRODUÇÃO

O uso de vegetais para o tratamento de doenças é uma prática que se perpetuou através das gerações. Não se sabe exatamente em que ponto da história o homem passou a utilizar as plantas com essa finalidade, mas é dito que esse hábito confunde-se com o surgimento do próprio homem – escrituras de antigas civilizações relatam essa prática entre 4000 e 5000 a.C. (HOSSEINZADEH et al., 2015).

Através de métodos padronizados, comprovou-se que os vegetais podem atuar, entre outras maneiras, como antioxidantes, inibindo a formação de radicais livres e de espécies reativas de oxigênio, e como antimicrobianos (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011; SILVA; FERNADES JÚNIOR, 2010). Várias espécies da família Orchidaceae foram estudadas no tocante à atividade antioxidante que seus extratos brutos desempenham. O extrato bruto das folhas de *Phalaenopsis* sp., por exemplo, reduziu a formação de radicais livres em 50%, no teste de sequestro do radical livre DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), numa concentração de 8,01 mg/mL (NGUYEN et al. 2018).

Um composto antioxidante possui a capacidade de impedir a formação de radicais livres e de outras espécies reativas de oxigênio (ERO) no organismo. A formação desses radicais e ERO é um processo natural do organismo humano, porém indesejado, visto que ele leva ao estresse oxidativo, o qual está associado a desordens a nível celular e pode provocar doenças como o câncer (ANGELO; JORGE, 2007; DELMONDES et al., 2013). Apesar de o organismo humano produzir antioxidantes naturalmente, ele não os produz em quantidade suficiente, devendo o homem, portanto, consumir antioxidantes de fontes exógenas, e os vegetais, por serem ricos em compostos fenólicos, metabólitos secundários que atuam como poderosos antioxidantes, são a principal fonte (OLIVEIRA et al., 2009).

No que concerne à atividade antimicrobiana dos vegetais, muitos se mostraram bons antimicrobianos em testes *in vitro*, inibindo o crescimento de diferentes espécies de bactérias e fungos, inclusive dermatófitos, fungos que provocam micoses superficiais.

As micoses superficiais conhecidas como dermatofitoses ou *Tinea* são provocadas por um grupo de fungos especializados classificados em três gêneros. São eles *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. As proteases queratinolíticas desses fungos são as enzimas responsáveis pela transformação da queratina dos tecidos do hospedeiro (pele, pelos e unhas) em alimento para eles próprios. (LAKSHMIPATHY; KANNABIRAN, 2010).

A ocorrência das dermatofitoses é mundial. Porém, de todos os dermatófitos, *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes* são os mais incidentes nas regiões Sul e Sudeste

do Brasil, país no qual a prevalência de dermatofitoses é de aproximadamente 23% (PIRES et al., 2014; CORTEZ et al., 2012; PERES et al., 2010). O tratamento dessas infecções é frequentemente associado à resistência aos antifúngicos convencionais, que podem ser de uso oral ou tópico, além de provocarem efeitos adversos agressivos, tais como hepatotoxicidade, distúrbios gastrointestinais e leucopenia. Esses efeitos estão relacionados à toxicidade do antifúngico perante as células do hospedeiro, as quais possuem algumas similaridades com as células dos patógenos. Diante disso, tem-se buscado o desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes e menos agressivos para o tratamento das dermatofitoses. Nesse sentido, os produtos naturais de origem vegetal despertam grande interesse (GUPTA; COOPER, 2008; LANA et al., 2016; BOUCHARA, MIGNO, CHATUVERDI, 2017).

*Vanilla palmarum*, uma Orchidaceae do gênero *Vanilla*, conhecida popularmente como bananinha do licurizeiro, vista frequentemente na caatinga sobre *Syagrus coronata* (licuri), está entre as várias plantas empregadas na medicina popular para o tratamento de infecções (BASTOS, 2009). Essa espécie é utilizada por moradores de Milagres, cidade do interior do Estado da Bahia, para tratar micoses de pele (dermatofitoses). Contudo, não há estudos científicos que comprovem as atividades biológicas de *V. palmarum*, ou indiquem sua composição química. Por isso, o objetivo deste trabalho foi investigar a composição química dos extratos metanólicos de *V. palmarum*, determinar a sua atividade antifúngica contra dermatófitos e a atividade antioxidante.

## 1.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 1.2.1 Coleta do material vegetal

A espécie foi coletada na região de Feira de Santana, no campus da Universidade Estadual de Feira de Santana, no período de janeiro a março de 2016, e o material fértil foi herborizado e depositado, em forma de exsicata, no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS), com o número de tombo 220952.

### 1.2.2 Obtenção e processamento do extrato bruto

Os órgãos vegetais (folhas, caules, raízes, flores e/ou frutos) foram separados, secos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Depois de pulverizados separadamente, em moinho de facas, as folhas e o caule de *V. palmarum* foram submetidos à extração em metanol por maceração assistida por ultrassom, em recipientes de vidro, por cinco vezes consecutivas. Os extratos foram concentrados em evaporadores rotatórios, sob pressão reduzida, em temperaturas entre 40 e 45 °C. O resíduo de solvente foi retirado por evaporação em capela de exaustão.

A massa total de folhas secas maceradas foi de 1.013,62 g. A massa total de caule seco macerado foi de 731,08 g. O rendimento do extrato foi avaliado em porcentagem (m/m).

### 1.2.3 Análise da composição química

#### 1.2.3.2 Determinação de fenólicos totais

A quantidade de fenólicos totais nos extratos metanólicos brutos da folha e do caule de *V. palmarum* foi determinada pelo método que utiliza o reagente Folin-Ciocalteu, descrito por Peres et al. (2009), com algumas modificações. Primeiramente, uma solução mãe em triplicata de cada extrato foi preparada com 0,04 g de extrato de caule e 0,02 g de extrato de folha para 10 mL de metanol espectroscópico. A partir disso, novas triplicatas foram feitas em tubos de ensaio, cada uma contendo 100 µL da solução mãe. Em seguida, foi adicionado 1 mL de água deionizada às triplicatas, mais 200 µL do reagente Folin-Ciocalteu. Depois de homogeneizadas, as triplicatas foram deixadas em repouso durante 5 minutos, ao abrigo da luz. Passado este tempo, foram adicionados 600 µL de solução de carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ) a 15% mais 5 mL de água deionizada.

As amostras foram agitadas em vortex e deixadas em repouso durante 90 minutos, ao abrigo da luz. Depois disso, utilizando cubetas de vidro, fez-se a leitura da absorbância das triplicatas em espectrofotômetro UV-1800 Shimadzu, no comprimento de onda de 750 nm, tendo como branco todos os reagentes utilizados no método, com exceção do extrato. Os resultados obtidos foram expressos como miligramas de equivalentes de ácido gálico (EAG) por grama de extrato (mg EAG/g) através da interpolação da absorbância das amostras contra uma curva de calibração de ácido gálico. A curva de calibração foi construída a partir de soluções de ácido gálico nas concentrações de 50, 100, 150, 200, 250 e 300 µg/mL. A equação da curva de calibração do ácido gálico é  $y = 0,002x + 0,011$ , com coeficiente de

determinação igual a  $R^2 = 0,992$ , sendo “x” a concentração de ácido gálico e “y” a absorvância resultante da leitura a 750 nm.

### 1.2.3.3 Determinação do teor de flavonoides totais

O teor de flavonoides totais dos extratos brutos das folhas e do caule de *V. palmarum* foi determinado pelo método colorimétrico de complexação com cloreto de alumínio ( $AlCl_3$ ), que utiliza a espectrofotometria de absorção na região do ultravioleta visível (UV-Vis), segundo a descrição de Woisky (1996).

Primeiramente, duas soluções mãe foram confeccionadas em triplicata, uma contendo 0,01 g de extrato metanólico bruto das folhas e outra contendo 0,02 g de extrato metanólico bruto do caule, cada uma com 10 mL de metanol. Em seguida, 1.500  $\mu$ L de cada uma foram colocados em tubos, também em triplicata. A essa quantidade foram adicionados 200  $\mu$ L de solução metanólica de  $AlCl_3$  a 5% mais 3.400  $\mu$ L de solução metanólica de ácido acético a 5%. Por fim, 100  $\mu$ L de solução metanólica de DPPH foram adicionados. A mistura foi agitada em vortex e deixada em repouso durante 30 minutos, ao abrigo da luz. A leitura da absorvância foi feita a 425 nm. Os resultados obtidos foram expressos em miligramas de equivalente de quercetina por grama de extrato (mg EQ/g) através da interpolação da absorvância das amostras contra uma curva de calibração de quercetina. A curva de calibração foi construída a partir de soluções de quercetina nas concentrações de 8, 14, 20, 26, 32 e 45  $\mu$ g/mL. A equação da curva de calibração da quercetina é  $y = 0,021x - 0,034$ , com coeficiente de determinação igual a  $R^2 = 0,997$  sendo “x” a concentração de quercetina e “y” a absorvância resultante da leitura a 425 nm.

## 1.2.4 Análise da atividade antioxidante

### 1.2.4.1 Teste de sequestro do radical livre DPPH

Soluções mães de EMB a 0,01 g/10 mL foram confeccionadas em triplicata, para cada extrato de *V. palmarum*. Destas soluções, diferentes volumes em microlitros (500 a 800  $\mu$ L) foram pipetados, aumentando de 50 em 50  $\mu$ L, e dispostos em tubos de ensaio. A essas alíquotas, por sua vez, adicionou-se o volume necessário de metanol para completar 1 mL de

amostra em cada tubo. Em seguida, adicionou-se 2 mL de solução metanólica de DPPH, agitou-se em vortex e, após repouso de 30 minutos, leu-se a absorbância da amostra em espectrofotômetro a 517 nm. Sete amostras com diferentes concentrações (0,5 a 0,8 mg/mL) foram analisadas.

Metanol puro foi usado como branco. A absorbância da solução de DPPH foi observada e o seu valor foi aplicado no cálculo do sequestro do radical livre DPPH. A inibição do radical foi dada em porcentagem e, com os valores obtidos em cada amostra triplicata, foram construídos gráficos de dispersão nos quais os valores de  $R^2$  são maiores que 0,9. A  $CE_{50}$  final (mg/mL) de cada extrato foi calculada como sendo a média das triplicatas de cada extrato. A comparação entre as médias de cada tratamento foi realizada a análise de variância pelo teste de Tukey, que foi conduzido utilizando-se programa de análises estatísticas Sisvar. O teste foi realizado de acordo com Sousa et al. (2007). Foram utilizados trolox e ácido ascórbico como padrões.

#### 1.2.4.2 Teste do sequestro do radical livre ABTS

Soluções mães de EMB a 0,03 g/5 mL foram confeccionadas em triplicata, para cada extrato de *V. palmarum*. Destas soluções, foram pipetados diferentes volumes, em microlitros (375 a 1000  $\mu$ L), aumentando de 125 em 125  $\mu$ L, os quais foram distribuídos em tubos Falcon. A essas concentrações, por sua vez, adicionou-se o volume necessário de metanol para completar 1 mL de amostra em cada tubo, exceto no que já havia 1 mL de amostra. Em seguida, foram retirados 30  $\mu$ L de cada tubo, os quais foram depositados, separadamente, em tubos de ensaio. Por fim, adicionou-se 3 mL de solução etanólica de ABTS, e, após repouso de 6 minutos, leu-se a absorbância da amostra em espectrofotômetro num comprimento de onda de 734 nm.

Seis amostras com diferentes concentrações (2,25 a 6 mg/mL). A leitura do branco foi realizada com etanol. A absorbância do controle da solução de ABTS foi de 0,718. O sequestro do radical ABTS foi analisado em porcentagem e, com os valores obtidos em cada unidade da triplicata, foram construídos gráficos de dispersão, nos quais os valores de  $R^2$  são maiores que 0,9. A  $CE_{50}$  final (mg/mL) de cada extrato foi calculada como sendo a média das triplicatas de cada extrato. A comparação entre as médias de cada tratamento foi realizada a análise de variância pelo teste de Tukey, que foi conduzido utilizando-se programa de análises

estatísticas Sisvar. O teste foi realizado de acordo com as instruções da EMBRAPA (2007), com adaptações, e o padrão utilizado foi o trolox.

### 1.2.5 Testes antimicrobianos

#### 1.2.5.1 Microrganismos

As espécies de dermatófitos testadas (*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporum gypseum*) foram isoladas de material clínico e identificadas como agentes de micoses cutâneas (pele, pelos e unhas). Todos os dermatófitos citados foram cedidos pela Coleção de Culturas URM do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, na qual as linhagens estão registradas com os códigos 6272, 4727 e 6199, respectivamente. Os dermatófitos foram preservados em meio batata-dextrose-ágar (BDA).

#### 1.2.5.2 Teste de inibição do crescimento micelial

O teste de inibição do crescimento micelial foi realizado segundo a metodologia indicada por Edgington, Khew e Barron (1971), com algumas modificações. Soluções de extrato e DMSO foram preparadas de maneira que as concentrações finais fossem 1 mg/mL, 2 mg/mL, 4 mg/mL e 8 mg/mL, em 100 mL de meio de cultura BDA. A mistura extrato-meio de cultura foi, então, distribuída em cinco placas de Petri estéreis, cada uma contendo 20 mL da mistura. As placas contendo a mistura permaneceram expostas à luz ultravioleta por duas horas, para que ela viesse a se solidificar e para que se evitasse a contaminação desta. Passado esse tempo, foi inoculado, em cada placa, um plug micelial de 6 mm de diâmetro.

Depois de inoculados, os dermatófitos foram incubados em estufa à temperatura de 28°C, e, após 48 horas, o crescimento das colônias foi acompanhado até o sétimo dia, tendo seu diâmetro medido diariamente com régua. Também foram semeados os controles negativos (meio de cultura sem extrato) e os controles positivos (meio de cultura com itraconazol). Para cada tratamento, foram feitas cinco repetições.

No sétimo dia, foi calculada a média dos diâmetros das colônias de cada dermatófito e os resultados foram empregados na fórmula de Edington, para o cálculo da porcentagem de

inibição do crescimento micelial, da seguinte maneira:  $I = (MC_n - MT) \times 100 / MC_n$ , em que I é a porcentagem de inibição,  $MC_n$  é a média dos diâmetros dos controles negativos e MT é a média dos diâmetros do tratamento em análise.

Para comparação entre as médias de cada tratamento, foi realizada a análise de variância pelo teste de Tukey, que foi conduzido utilizando-se programa de análises estatísticas Sisvar.

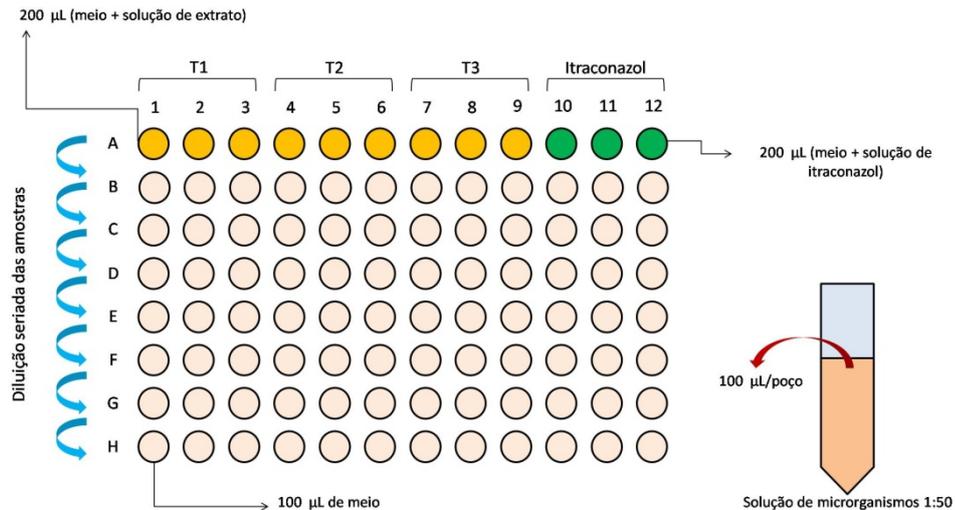
#### 1.2.5.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM)

Para a determinação da CIM dos extratos brutos, foi utilizado o ensaio de susceptibilidade por microdiluição em caldo recomendado pelo NCCLS (2002).

Para a preparação do inóculo, as amostras fúngicas foram cultivadas em placas de petri contendo BDA e incubadas a 35° C por sete dias. Passado este tempo, as colônias fúngicas foram raspadas com o auxílio de canudo estéril e o raspado foi transferido para tubo estéril contendo 5 mL de solução salina a 0,85%. Depois de agitá-la em vortex, deixou-se a mistura de esporangiosporos e fragmentos de hifas em repouso por 20 minutos e, em seguida, transferiu-se o sobrenadante para tubos para colorímetro estéreis. A suspensão foi ajustada para uma absorbância entre 0,09 e 0,17, na leitura em colorímetro. 1 mL dessa suspensão foi diluído em 49 mL de meio caldo Sabouraud-dextrose (SD), de modo a obter uma concentração final entre  $0,4 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  UFC/mL, numa suspensão 1:50 de microrganismo. Essa concentração foi conferida por meio da semeadura de 10 µL do inóculo preparado em meio BDA e contagem do número de colônias.

Os testes foram realizados em meio de cultura caldo SD. Triplicatas de 80 mg de cada extrato foram dissolvidas em 800 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida, adicionou-se 1200 µL de água destilada ao extrato dissolvido, formando, portanto, uma solução de extrato de 40 mg/mL. Essa solução foi esterilizada por filtração através da membrana de acetato celulose (0,22 µm).

Nas microplacas de 96 poços, 100 µL de caldo SD foram colocados em cada poço. Em seguida, as soluções de extrato estéreis foram testadas em triplicata, de maneira que 300 µL de cada solução fossem distribuídos nos primeiros poços (100 µL em cada). A partir dos primeiros poços, foram feitas diluições para os poços seguintes (Figura 12, p. 54). Por fim, cada poço recebeu 100 µL de suspensão de microrganismo.



**Figura 12:** Procedimentos para o teste da concentração inibitória mínima dos extratos de *V. palmarum*, em que a letra “T” representa a triplicata.

**Fonte:** A autora.

A concentração inicial de extrato nos primeiros poços foi de 500 µg/mL. Itraconazol em *pellet*, preparado numa solução com 400 µL de DMSO e 600 µL de água destilada autoclavada, foi utilizado como controle positivo, na concentração inicial de 110 µg/mL, para as espécies de *Trichophyton* e 550 µg/mL para *M. gypseum*. Foram realizados também controles de viabilidade dos microrganismos testados e do meio de cultura. Também foi testada a CIM da solução de DMSO-água na mesma concentração utilizada com os extratos (40%), para eliminar a possibilidade de interferência do DMSO nos resultados. A esterilidade das soluções de extrato e do caldo SD utilizados foi verificada através da inoculação de todos eles em microplaca. A pesagem do itraconazol em *pellet* foi realizada mediante a multiplicação da concentração inicial desejada pelo fator de correção 4,55, cálculo necessário para se obter o valor real de princípio ativo presente na forma farmacêutica em que este se encontra.

As placas foram incubadas a 35°C durante 72 horas. Passado esse período, para análise qualitativa do crescimento microbiano nos poços de ensaio, foram adicionados 50 µL do revelador resazurina em cada poço, na concentração final de 0,005 mg/poço. A CIM foi definida como a menor concentração, nas triplicatas, em que não se observou crescimento microbiano. A CIM final foi obtida pelo cálculo da média aritmética e desvio padrão de todas as triplicatas.

Para confirmar a atividade fungicida, foi determinada a concentração fungicida mínima (CFM) da solução de extrato testada, e também do itraconazol, para cada poço do teste de CIM que não apresentou crescimento microbiano. Para isso, placas de Petri contendo

meio de cultura BDA foram divididas em pequenos quadrados identificados com a letra e o número correspondente ao poço do qual foi realizada a semeadura. 5  $\mu$ L do conteúdo de cada poço foram semeados dentro dos limites do respectivo quadrado. As placas foram incubadas nas mesmas condições usadas no teste da CIM. A CFM foi definida como a menor concentração sem crescimento microbiano, calculada pela média aritmética e desvio padrão de todas as triplicatas.

### 1.3 RESULTADOS

O rendimento do EMB das folhas foi de 6,75% (68,41 g) e o rendimento do EMB do caule foi de 6,7% (49 g). O teor de fenólicos e flavonoides totais dos extratos metanólicos brutos das folhas e do caule de *V. palmarum* está descrito na Tabela 2 (p. 55).

**Tabela 2:** Teor de fenólicos e flavonoides totais nos extratos metanólicos brutos de *V. palmarum* expresso em média e desvio padrão de três análises independentes.

<b>Amostra</b>	<b>FT (mg EAG/g)</b>	<b>FLT (mg EQ/g)</b>
EMB folha	50,87 $\pm$ 0,64	31,15 $\pm$ 2,29
EMB caule	47 $\pm$ 6,97	16,58 $\pm$ 0,46

EMB, extrato metanólico bruto; FT, fenólicos totais; mg EAG/g, miligramas de equivalentes de ácido gálico por grama; FLT, flavonóides totais; mg EQ/g, miligramas de equivalentes de quercetina por grama.

Os resultados do teste da atividade antioxidante pelo sequestro do radical livre DPPH e do teste da atividade antioxidante pelo sequestro do radical livre ABTS estão descritos na Tabela 3 (p. 55).

**Tabela 3:** Atividade antioxidante *in vitro* dos extratos metanólicos brutos da folha e do caule de *V. palmarum*.

<b>Amostra</b>	<b>Sequestro de DPPH (CE<sub>50</sub>, mg/mL)</b>	<b>Sequestro de ABTS (CE<sub>50</sub>, mg/mL)</b>
EMB folha	0,67a	5,96a
EMB caule	0,69a	4,53b
Trolox	0,008b	0,18c
Ácido ascórbico	0,005b	NT

EMB, extrato metanólico bruto; CE<sub>50</sub>, concentração que sequestrou 50% do radical DPPH; NT, não testado. Nas colunas, médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente.

Quanto à atividade antidermatofítica, o extrato do caule mostrou-se mais eficaz na inibição do crescimento micelial de todos os dematófitos (Apêndice B), em todas as concentrações utilizadas, conforme mostrado nas Tabelas 4 e 5 (p. 56).

**Tabela 4:** Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos dermatófitos diante do extrato metanólico das folhas de *Vanilla palmarum*.

Dermatófito	Inibição do crescimento micelial (%)				Itraconazol 32 µg/mL
	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL	8 mg/mL	
<i>T. mentagrophytes</i>	1,03a	25,3b	53,14c	59,89c	71,81d
<i>T. rubrum</i>	13,46a	48,94b	68,8c	74,93c	71,94c
<i>M. gypseum</i>	6,87a	15,34a	63,6b	68,59b	24,86c

Nas linhas, médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente.

**Tabela 5:** Porcentagem de inibição do crescimento micelial dos dermatófitos diante do extrato metanólico do caule de *Vanilla palmarum*.

Dermatófito	Inibição do crescimento micelial (%)				Itraconazol 32 µg/mL
	1 mg/mL	2 mg/mL	4 mg/mL	8 mg/mL	
<i>T. mentagrophytes</i>	4,19a	35,84b	60,87c	61,23c	71,81d
<i>T. rubrum</i>	22,22a	54,77b	65,2c	74,07c	71,94c
<i>M. gypseum</i>	11,5a	26,05b	65,9c	67,83c	24,86b

Nas linhas, médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente.

A CIM e a CFM do extrato das folhas e do caule e do itraconazol contra os dermatófitos testados estão descritos nas Tabelas 6, 7 (p. 56) e 8 (p. 57), respectivamente. O DMSO inibiu o crescimento de todos os fungos apenas na concentração máxima (40%), com efeito fungistático perante todos os dermatófitos. Em relação à CIM, ambos os extratos tiveram efeito fungistático para *T. mentagrophytes* e fungicida para *T. rubrum* e *M. gypseum*. O itraconazol foi fungistático para todos os fungos.

**Tabela 6:** Concentração inibitória mínima (µg/mL) e concentração fungicida mínima (µg/mL) do extrato metanólico bruto das folhas de *V. palmarum* contra dermatófitos.

Espécie	CIM-EF	CFM-EF
<i>T. mentagrophytes</i>	250 ± 0	500 ± 0
<i>T. rubrum</i>	388,89 ± 127,29	388,89 ± 127,29
<i>M. gypseum</i>	444,44 ± 96,23	444,44 ± 96,23

CIM-EF, concentração inibitória mínima do extrato da folha; CFM-EF, concentração fungicida mínima do extrato da folha.

**Tabela 7:** Concentração inibitória mínima (µg/mL) e concentração fungicida mínima (µg/mL) do extrato metanólico bruto do caule de *V. palmarum* contra dermatófitos.

Espécie	CIM-EC	CFM-EC
<i>T. mentagrophytes</i>	36,46 ± 0	388,89 ± 104,86
<i>T. rubrum</i>	187,5 ± 72,17	187,5 ± 72,17
<i>M. gypseum</i>	319,44 ± 168,39	319,44 ± 168,39

CIM-EC, concentração inibitória mínima do extrato do caule; CFM-EC, concentração fungicida mínima do extrato do caule.

**Tabela 8:** Concentração inibitória mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) e concentração fungicida mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) do itraconazol contra dermatófitos.

Espécie	CIM-I	CFM-I
<i>T. mentagrophytes</i>	$6,87 \pm 0$	$244,44 \pm 26,46$
<i>T. rubrum</i>	$55 \pm 0$	$129,86 \pm 52,92$
<i>M. gypseum</i>	$137,5 \pm 0$	$213,89 \pm 190,82$

CIM-I, concentração inibitória mínima do itraconazol; CFM-I, concentração fungicida mínima do itraconazol.

#### 1.4 DISCUSSÃO

De acordo com os resultados obtidos, o EMB das folhas de *V. palmarum* possui teor de fenólicos e de flavonoides mais elevado o ( $50,87 \text{ mg EAG/g}$  e  $31,15 \text{ mg EQ/g}$ , respectivamente), em relação a outras espécies da família Orchidaceae, como *Phalaenopsis* sp., por exemplo (MINH et al., 2016). Porém, a maioria das pesquisas realizadas até então foi feita com o extrato etanólico das folhas dessas espécies. De fato, a escolha do solvente é extremamente importante para a extração eficiente de determinados componentes de uma mistura, e a afinidade dos compostos em estudo com o solvente empregado varia de uma espécie para outra (SASIDHARAN et al., 2011).

Há, ainda, outro ponto a ser destacado no que concerne à determinação do teor de fenóis totais em extratos vegetais: o método comumente utilizado. Sabe-se que o reagente de Folin-Ciocalteu possui algumas limitações – ele não detecta apenas compostos fenólicos, mas também outras substâncias, tais como açúcares, clorofila, gorduras e terpenos – o que faz dele um método não específico (ANGELO; JORGE, 2007). Assim sendo, pode-se inferir que o conteúdo de fenóis em algumas espécies é superestimado. De qualquer maneira, resultados positivos para fenólicos e flavonoides representam o potencial farmacológico da espécie estudada, visto que esses compostos atuam de diversas maneiras, inclusive como antioxidantes e antimicrobianos (TAPAS; SAKARKAR; KAKDE, 2008). Esta informação, por sua vez, corrobora com os resultados dos testes de atividade antioxidante pelo sequestro do radical livre DPPH e pelo sequestro do radical livre ABTS, os quais mostram que ambos os EMBs das folhas e do caule de *V. palmarum* apresentaram atividade antioxidante, sendo a  $CE_{50}$  do EMB bruto do caule ( $0,69 \text{ mg/mL}$ ) maior que a  $CE_{50}$  do EMB das folhas ( $0,67 \text{ mg/mL}$ ), para o DPPH, e o contrário para o ABTS ( $5,96 \text{ mg/mL}$  para o EMB das folhas e  $4,53 \text{ mg/mL}$  para o EMB do caule). Porém, no teste de sequestro do DPPH esses valores não diferem significativamente entre os extratos.

Quando comparados aos resultados obtidos por Nguyen et al. (2018) com os extratos metanólicos de espécies do gênero *Phalaenopsis*, a atividade antioxidante de *V. palmarum* é mais elevada, visto que a CE<sub>50</sub> dos extratos de *Phalaenopsis* (8,01 mg/mL) é muito maior que a dos extratos de *V. palmarum*. Porém, comparados aos padrões ácido ascórbico e trolox, ambos os extratos tiveram baixa atividade antioxidante.

Vale ressaltar que a quantidade de fenólicos num vegetal depende de vários fatores, e a ontogenia (período do desenvolvimento vegetal) é um deles. Um estudo realizado com *V. planifolia* revelou que as folhas jovens desta espécie expressam maior quantidade de fenóis do que folhas mais velhas (PALAMA et al., 2010).

Em se tratando da atividade antimicrobiana dos extratos analisados, não há estudos sobre a atividade antifúngica de *V. palmarum*. A espécie de *Vanilla* mais estudada, até o momento, é *V. planifolia*, a qual teve a sua atividade antimicrobiana analisada, num estudo preliminar, mas não contra dermatófitos. Contra *Aspergillus niger*, o extrato metanólico das folhas de *V. planifolia* foi eficaz numa concentração mínima de 50 mg, em teste de difusão em disco (JAMAL UDDIN et al., 2015). Extratos etanólicos de outras espécies da família Orchidaceae, tais como *Luisia zeylanica*, *Pholidota pallidae* *Dendrobium nutantiflorum*, inibiram o crescimento micelial do fungo filamentoso *Fusarium oxysporum*, o que justifica a importância de se estudar os efeitos antifúngicos de espécies de Orchidaceae contra fungos filamentosos, inclusive dermatófitos (SHWETA et al., 2015).

Neste trabalho, o extrato metanólico do caule mostrou-se mais eficaz contra os dermatófitos testados que o extrato metanólico das folhas, em ambos os testes antimicrobianos realizados, sendo que a porcentagem de inibição do crescimento micelial de cada fungo decresce conforme a concentração de extrato no meio diminui, revelando assim uma relação dose dependente entre os resultados. *T. mentagrophytes* foi o dermatófito mais resistente à ação dos extratos, de acordo com os resultados do teste de inibição do crescimento micelial. No teste da CIM, no entanto, ele se mostrou o mais susceptível de todos aos extratos e ao itraconazol, apresentando a CIM mais baixa (250 µg/mL para o extrato das folhas, 36,46 µg/mL para o extrato do caule e 0,98 µg/mL para o itraconazol). O itraconazol desempenhou efeito fungistático diante de todos os dermatófitos. Os extratos das folhas e do caule foram fungistáticos para *T. mentagrophytes* e fungicidas para *T. rubrum* e *M. gypseum*.

Diante da atividade antifúngica dos extratos testados, pode-se considerar *V. palmarum* uma fonte de princípios ativos para a produção de antifúngicos derivados de produtos naturais. Na literatura, há vários registros de resistência à terapia antifúngica convencional. Essa resistência está relacionada à semelhança de processos moleculares existente entre as

células humanas e as células fúngicas, de maneira que a toxicidade do antifúngico sintético pode atingir também as células do hospedeiro (ARIF et al., 2009). Por isso, a busca por novas substâncias eficazes, porém menos agressivas aos usuários, tem se tornado cada vez maior, e os produtos naturais são constantemente avaliados nesse sentido (HEMALATHA et al., 2013). Assim, a presença de compostos fenólicos nos extratos de *V. palmarum* contribui com as informações anteriores, visto que diversas pesquisas apontam para o potencial desses compostos como antimicrobianos.

Contudo, a ação antifúngica de um extrato pode variar devido a uma série de fatores – a quantidade e os tipos de fenólicos em sua composição, o solvente utilizado para extração desses compostos e os métodos empregados para a avaliação de sua atividade antifúngica são alguns deles (TEODORO et al., 2015; COS et al., 2006). Assim sendo, outras análises devem ser realizadas, inclusive com as substâncias isoladas a partir dos extratos contra os dermatófitos. A toxicidade desses extratos também deve ser avaliada.

## REFERÊNCIAS

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.

ARIF, T. et al. Natural products – antifungal agents derived from plants. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 7, p. 621-638, jul., 2009.

BASTOS, C. A. **A família Orchidaceae no município de Morro do Chapéu, Bahia, Brasil.** 2009. 120f. Dissertação (Mestrado em Ciências – Botânica). Universidade Estadual de Feira de Santana – Feira de Santana.

BOUCHARA, J. P.; MIGNON, B.; CHATUVERDI, V. Dermatophytes and dermatophytoses: a thematic overview of state of the art, and the directions for future research and developments. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1-2, p. 1-4, 2017.

CORTEZ, A. C. et al. Frequency and etiology of dermatophytosis in children age 12 and under in the state of Amazonas. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 29, n. 4, p. 223-226, 2012.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro “proof-of-concept”. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

DELMONDES, P. H. et al. Substâncias antioxidantes presentes nos vegetais. **Revista Eletrônica Interdisciplinar Univar**, Barra do Garças, v. 1 n. 9, p. 1-5, 2013.

EDGINGTON, L.V.; KHEW, K.L.; BARRON, G.L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v.61, n.1, p. 42-44, jan., 1971.

ELMEGEED, A. S. M. A. et al. Dermatophytes and other associated fungi in patients attending to some hospitals in Egypt. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 46, n. 3, p. 799-805, 2015.

EMBRAPA. **Comunicado Técnico 128.** Fortaleza: EMBRAPA, 2007.

HAYETTE, M.; SACHELI, R. Dermatophytosis, trends in epidemiology and diagnostic approach. **Current Fungal Infection Report**, v. 9, n. 3, p. 164-179, 2015.

HEMALATHA, M. et al. A review on antimicrobial efficacy of some traditional medicinal plants in Tamilnadu. **Journal of Acute Disease**, p. 99-105, 2013.

HOSSEINZADEH, S. et al. The application of medicinal plants in traditional and modern medicine: a review of *Thymus vulgaris*. **International Journal of Clinical Medicine**, v. 6, p. 635-642, 2015.

JAMAL UDDIN, A. F. M. et al. Antibacterial and antifungal activities of *Vanilla planifolia* grown in Sher-e-Bangla Agricultural University. **Bangladesh Research Publications Journal**, v. 11, n. 1, p. 34-39, mar.-apr., 2015.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 3, p. 217-233, 2011.

LAKSHMIPATHY, D. T.; KANNABIRAN, K. Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment. **Natural Science**, v. 2, n. 7, p. 726-731, 2010.

LANA, D. F. D. et al. Dermatofitoses: agentes etiológicos, formas clínicas, terapêutica e novas perspectivas de tratamento. **Clinical and Biomedical Research**, Porto Alegre, v. 36, n. 4, p. 230-241, 2016.

MIHN, T. N. et al. Phenolic compounds and antioxidant activity of *Phalaenopsis* orchid hybrids. **Antioxidants**, v. 5, n. 3, 2016.

NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos**; Norma Aprovada. Documento M38-A. Pensilvânia: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002.

NGUYEN, H. C. et al. Antioxidant activities of the methanol extracts of various parts of *Phalaenopsis* orchids with white, yellow, and purple flowers. **Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca**, v. 46, n. 2, 2018.

OLIVEIRA, A. C. D. et al. Vegetals as natural sources of antioxidants. **Quimica Nova**, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

PALAMA, T. L. et al. Biological variation of *Vanilla planifolia* leaf metabolome. **Phytochemistry**, v. 71, n. 5-6, p. 567-573, 2010.

PERES, M. T. L. P. et al. Estudos químicos e biológicos de *Microgramma vacciniifolia* (Langsd. & Fisch.). **Quimica Nova**, v. 32, n. 4, 2009.

PIRES C. A. et al. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 259-264, 2014.

SASIDHARAN, S. et al. Extraction, isolation and characterization of bioactive compounds from plants' extracts. **African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicine**, v. 8, n. 1, p. 1-10, 2011.

SILVA, N. C. C.; FERNANDES JÚNIOR, A. Biological properties of medicinal plants: a review of their antimicrobial activity. **The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 3, p. 402-413, 2010.

SHWETA, S. D. et al. Antifungal efficacy of some epiphytic orchids of Karnataka, India. **Scholars Journal of Agriculture and Veterinary Sciences**, v. 2, n. 3B, p. 266-269, 2015.

SOUSA, C. M. M. et al. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

TAPAS, A. R.; SAKARKAR, D. M.; KAKDE, R. B. Flavonoids as nutraceuticals: a review. **Tropical Journal of Pharmaceutical Research**, v. 7, n. 3, p. 1089-1099, 2008.

TEODORO, G. R. et al. Potential use of phenolic acids as anti-*Candida* agents: a review. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, dec., 2015.

VIZZOTTO, M.; PEREIRA, M. C. Amora-preta (*Rubus* sp.): otimização do processo de extração para determinação de compostos fenólicos antioxidantes. **Revista Brasileira Fruticultura**, Jaboticabal, v. 33, n. 4, 2011.

WOISKY, R. G. **Métodos de controle químico de amostras de própolis**. 1996. 81 f. Dissertação (Mestrado em Fármaco e Medicamentos) – Universidade de São Paulo, São Paulo.

## **CAPÍTULO 2**

### **ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE *Lippia alba* RICO EM CARVONA FRENTE A DERMATÓFITOS**

## 2.1 INTRODUÇÃO

Os dermatófitos são um grupo de fungos que invadem tecidos queratinizados (pele, cabelo e unha), onde, pela ação de enzimas queratinolíticas, transformam a queratina em substrato para o seu crescimento. Esses fungos são classificados em três gêneros: *Trichophyton*, *Microsporum* e *Epidermophyton*. Seu habitat natural é o solo, mas eles são capazes de infectar animais e humanos, provocando as dermatofitoses conhecidas como “tinha” (LAKSHMIPATHY; KANNABIRAN, 2010).

No Brasil, a prevalência das dermatofitoses varia entre 18 e 23%, com os dermatófitos *Trichophyton rubrum* e *T. mentagrophytes* sendo os mais incidentes nas regiões Sul e Sudeste do país (CORTEZ et al., 2012; PERES et al., 2010). Porém, elas têm ocorrência mundial, sendo mais frequentes em regiões de clima tropical e subtropical. Atualmente, o tratamento dessas micoses é feito de acordo com a gravidade da infecção e com o patógeno envolvido (PIRES et al., 2014). Frequentemente, a profilaxia oral é combinada com a aplicação tópica de antifúngicos, principalmente quando as lesões são generalizadas, recorrentes, crônicas ou persistentes perante o tratamento tópico. No entanto, além dos efeitos adversos (distúrbios gastrointestinais, hepatotoxicidade e leucopenia), há relatos de resistência microbiana aos antifúngicos comumente utilizados, especialmente os azóis (itraconazol e fluconazol, por exemplo), bem como de limitações nesses medicamentos devido às similaridades entre as células eucarióticas humanas e as células fúngicas (GUPTA; COOPER, 2008; LANA et al., 2016). Por isso, a busca por novas alternativas de tratamento é constante, e o estudo de princípios ativos obtidos de fontes naturais é muito importante nesse sentido (BOUCHARA, MIGNO, CHATUVERDI, 2017).

Os óleos essenciais (OEs) produzidos por plantas medicinais são misturas voláteis ricas numa variedade de substâncias que lhes conferem propriedades organolépticas únicas (sabor e fragrância) interessantes para as indústrias de cosméticos e de alimentos (DEGENHARDT; KÖLLNER; GERSHEZON, 2009). Compostos principalmente por mono e sesquiterpenos, eles são usados na medicina tradicional para fins terapêuticos, e muitos já tiveram sua atividade antimicrobiana comprovada por testes *in vitro* (BAKKALI et al., 2008; ALI et al., 2015; SWAMY; AKHTAR; SINNIAH, 2016).

Dentre as espécies produtoras de OEs estão as da família Verbenaceae que, com 34 gêneros, possui diversos relatos de ação antimicrobiana (ZAMORA; TORRES; NUNES, 2018; PINTO et al, 2013). *Lippia* é um dos gêneros de destaque, abrangendo mais de 200

espécies com ampla distribuição na África, América Central e do Sul (FRANÇA; ATKINS, 2009), das quais 83 estão localizadas no Brasil, sendo 59 endêmicas (Lippia, 2018).

*Lippia alba* é um arbusto aromático com ampla distribuição nos países da América Central e do Sul, com ocorrência também na Índia e Austrália. É uma das espécies de *Lippia* mais utilizadas na medicina tradicional, com relatos para o tratamento de distúrbios gastrointestinais, tosse, resfriado, dores e problemas de pele, entre outros (HENNEBELLE et al., 2008; PINTO et al., 2013). Em relação à atividade biológica, é também uma das espécies mais estudadas, em especial a ação antimicrobiana de seu óleo essencial frente a bactérias como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella choleraesuis* e fungos, entre os quais os dermatófitos. (MACHADO; PEREIRA; BATISTA, 2014; MESA-ARANGO, 2009; HENNEBELLE et al., 2008). A atividade frente a *Trichophyton rubrum*, *Epidermophyton floccosum* e *Microsporum gypseum* do óleo essencial rico em linalol, bem como seu possível mecanismo de ação, foi previamente descrita (COSTA et al, 2013).

Entretanto, devido a sua ampla distribuição geográfica e variabilidade genética, o óleo essencial de *L. alba* apresenta uma larga variação em sua composição química, dando origem a diferentes quimiotipos, classificados conforme seus componentes majoritários. Sete quimiotipos já foram descritos: quimiotipo I (cital e/ou linalol e/ou E-cariofileno), II (tagetona), III (limoneno e carvona ou dihidrocarvona, piperitona, piperitenona), IV (mirceno), V ( $\gamma$ -terpineno), VI (cânfora/1,8 cineol) e VII (estragol), que podem apresentar distintas ações biológicas (HENNEBELLE et al., 2008; HENNEBELLE et al., 2006).

Considerando esta diversidade química, o objetivo deste trabalho foi analisar a atividade frente a dermatófitos do óleo essencial do quimiotipo rico em carvona da espécie *L. alba*.

## 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.2.1 Coleta do material vegetal

A coleta do material vegetal foi realizada no mês de fevereiro, no ano de 2018, no banco de germoplasma do Horto Florestal da Universidade Estadual de Feira de Santana, no período da manhã. O material fértil foi herborizado e depositado, em forma de exsicata, no

Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Estadual de Feira de Santana (HUEFS), com o número de depósito 240989. As folhas do material coletado foram separadas e submetidas à secagem em temperatura ambiente.

### **2.2.2 Extração do óleo essencial**

Para a extração dos óleos essenciais, as folhas secas (1,6 kg) foram separadas em porções de aproximadamente 200 g, sendo trituradas em liquidificador com o auxílio de água destilada. Em seguida, o material triturado foi submetido a uma hidrodestilação em aparelho de Clevenger para extração do óleo essencial. O óleo obtido foi coletado, seco com sulfato de sódio anidro e armazenado a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  até a realização das análises. O teor de óleo extraído foi calculado em mL de óleo por 100 g de folhas secas.

### **2.2.3 Análise da composição química**

A análise da composição química dos óleos essenciais foi realizada por cromatografia em fase gasosa, empregando-se cromatógrafo a gás com detector de ionização em chama (CG/DIC) para a quantificação e cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG/EM) para identificação dos constituintes. Para a análise foi injetado  $1\text{ }\mu\text{L}$  de uma solução do óleo essencial em acetato de etila, a  $25\text{ mg/mL}$ , com razão de split de 1:100.

Na análise por CG/DIC foi utilizado um Cromatógrafo Shimadzu® CG-2010 com coluna capilar DB-5 (30 m x 0,5 mm, com espessura do filme de  $0,25\text{ }\mu\text{m}$ ), temperatura do injetor de  $220\text{ }^{\circ}\text{C}$  e do detector de  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ , hélio como gás de arraste ( $1\text{ mL/min}$ ), com programa de temperatura do forno de  $60\text{ }^{\circ}\text{C}$  a  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$  ( $3\text{ }^{\circ}\text{C/min}$ ),  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$  (20 min). As análises por CG/EM foram realizadas em Cromatógrafo Shimadzu® CG-2010 acoplado a Espectrômetro de Massas CG/MS-QP 2010 Shimadzu®, coluna capilar DB-5ms (30 m x 0,25 mm, com espessura de filme  $0,25\text{ }\mu\text{m}$ ), temperatura do injetor  $220\text{ }^{\circ}\text{C}$ , gás de arraste hélio ( $1\text{ mL/min}$ ), temperatura da interface de  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ , temperatura da fonte de ionização de  $240\text{ }^{\circ}\text{C}$ , energia de ionização  $70\text{ eV}$ , corrente de ionização:  $0,7\text{ kV}$  e programa de temperatura do forno similar a supracitada.

A identificação dos constituintes foi realizada por espectrometria de massas e por meio do tempo de retenção corrigido de cada pico (índice arimético - IA), utilizando-se uma

solução de n-alcenos (C8 a C24) como padrão. O IA foi calculado conforme fórmula descrita por Adams (2007):  $IA = 100 N + 100 \cdot [(t'R(A) - R(N)) / (t'R(N+1) - t'R(N))]$ , onde, N = Número de átomos de carbono do padrão do alceno  $t'R(A)$  = tempo de retenção do pico calculado,  $t'R(N)$  = tempo de retenção do alceno correspondente ao pico calculado e  $t'R(N + 1)$  = tempo de retenção do alceno que elui posteriormente ao pico calculado.

Cada pico do cromatograma (Apêndice A) foi identificado pelo seu espectro de massas, por comparação com a biblioteca do equipamento (Nist 21 e Nist 72) e fontes da literatura (ADAMS, 2007; JOULAIN; KONIG, 1998). A quantificação do percentual relativo foi obtida com base nas áreas dos picos cromatográficos correspondentes calculados pelo método da normalização.

## 2.2.4 Testes antimicrobianos

### 2.2.4.1 Microrganismos

As espécies de dermatófitos testadas (*Trichophyton mentagrophytes*, *Trichophyton rubrum* e *Microsporum gypseum*) foram isoladas de material clínico e identificadas como agentes de micoses cutâneas (pele, pelos e unhas). Todos os dermatófitos citados foram cedidos pela Coleção de Culturas URM do Departamento de Micologia do Centro de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco, na qual as linhagens estão registradas com os códigos 6272, 4727 e 6199, respectivamente. Os dermatófitos foram preservados em meio batata-dextrose-ágar (BDA).

### 2.2.4.2 Teste de inibição do crescimento micelial

O teste de inibição do crescimento micelial foi realizado segundo Edington, Khew e Barron (1971), com algumas modificações. As emulsões do óleo essencial foram preparadas em Tween a 5%. Após terem sido esterilizadas por meio de filtração em membrana de nylon de 0,22  $\mu$ m, 1 mL das emulsão foram dispensadas em 99 mL de meio de cultura BDA e vertido em placas de Petri, nas concentrações de 930, 465, 260 e 130  $\mu$ g/mL. As placas contendo o meio de cultura permaneceram expostas à luz ultravioleta por duas horas, até a

solidificação. Passado esse tempo, foi inoculado, no centro de cada placa, um disco micelial de 6 mm de diâmetro.

Depois de inoculados, os dermatófitos foram incubados em estufa à 28°C, por 48 horas, e o crescimento das colônias foi monitorado diariamente pela medida de seu diâmetro (em duas direções) até o sétimo dia pós inoculação. O experimento foi acompanhado pelos controles negativos (meio de cultura sem óleo) e os controles positivos (meio de cultura com itraconazol).

No sétimo dia, foi calculada a média dos diâmetros das colônias de cada dermatófito e os resultados foram empregados na fórmula de Edington, para o cálculo da porcentagem de inibição do crescimento micelial:  $I = (MC_n - MT) \times 100 / MC_n$ , em que I é a porcentagem de inibição,  $MC_n$  é a média dos diâmetros dos controles negativos e MT é a média dos diâmetros do tratamento em análise. Para cada tratamento, foram feitas cinco repetições.

Para comparação entre as médias de cada tratamento, foi realizada a análise de variância pelo teste de Tukey, que foi conduzido utilizando-se programa de análises estatísticas Sisvar.

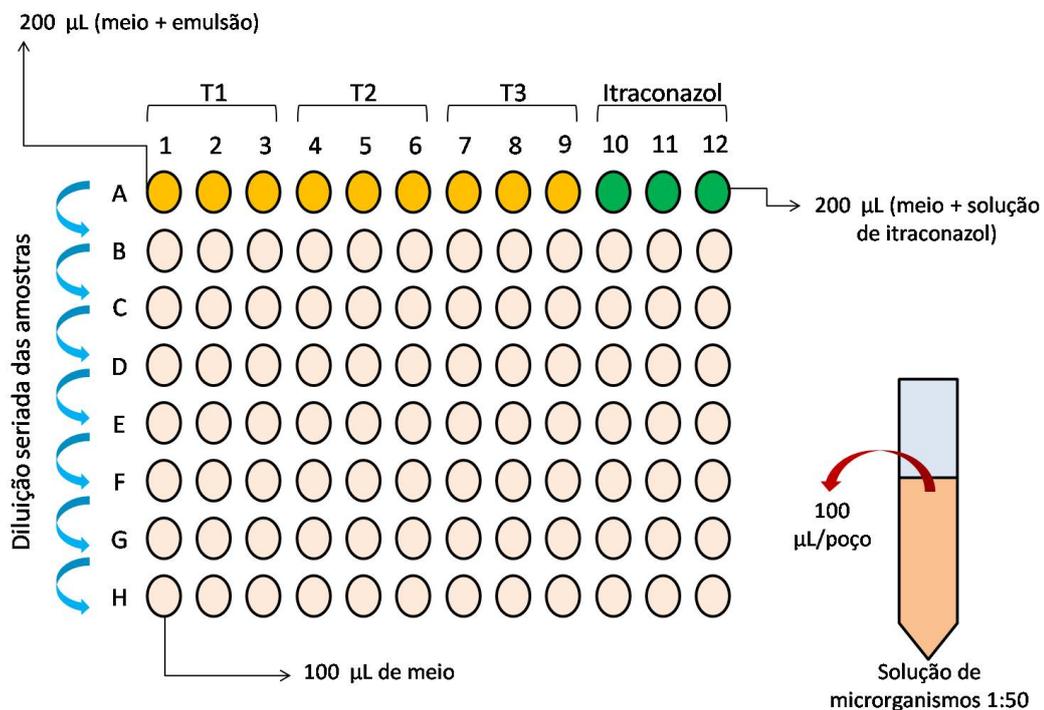
#### 2.2.4.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Fungicida Mínima (CFM)

Foi utilizado o ensaio de susceptibilidade por microdiluição em caldo, recomendado pelo NCCLS (2002), para a determinação da CIM do OE de *L. alba*. Os testes foram realizados em caldo Sabouraud-dextrose (SD). Para cada dermatófito, foram confeccionadas três emulsões do óleo essencial em Tween 80 a 5%, na concentração de 9,3 mg/mL. Essas emulsões foram esterilizadas por meio de filtração através de membrana de nylon (0,22 µm).

Para a preparação do inóculo, as amostras fúngicas foram cultivadas em placas de petri contendo BDA e incubadas a 35°C por sete dias. Passado este tempo, as colônias fúngicas foram raspadas com o auxílio de canudo estéril e o raspado foi transferido para tubo estéril contendo 5 mL de solução salina a 0,85%. Depois de agitá-la em vortex, deixou-se a mistura de esporangiosporos e fragmentos de hifas em repouso por 20 minutos e, em seguida, transferiu-se o sobrenadante para tubos para colorímetro estéreis. A suspensão foi ajustada para uma absorvância entre 0,09 e 0,17, na leitura em colorímetro. Um volume de 1 mL dessa suspensão foi diluído em 49 mL de meio caldo Sabouraud-dextrose (SD), de modo a obter uma concentração final entre  $0,4 \times 10^4$  a  $5 \times 10^4$  UFC/mL, numa suspensão 1:50 de micro-

organismo. Essa concentração foi conferida por meio da semeadura de 10  $\mu\text{L}$  do inóculo preparado em meio BDA e contagem do número de colônias.

Nas microplacas de 96 poços, 100  $\mu\text{L}$  de caldo SD foram colocados em cada poço. Em seguida, as emulsões estéreis foram testadas em triplicata, de maneira que 300  $\mu\text{L}$  de cada emulsão fossem distribuídos nos primeiros poços (100  $\mu\text{L}$  em cada). A partir dos primeiros poços foram feitas diluições seriadas para os poços seguintes. Por fim, cada poço recebeu 100  $\mu\text{L}$  de suspensão de microrganismo (Figura 13, p. 69). A concentração de OE nos primeiros poços foi de cerca de 2 400  $\mu\text{g}/\text{mL}$ .



**Figura 13:** Procedimentos para o teste da concentração inibitória mínima do óleo essencial de *L. alba*, em que a letra “T” representa a triplicata.

**Fonte:** A autora.

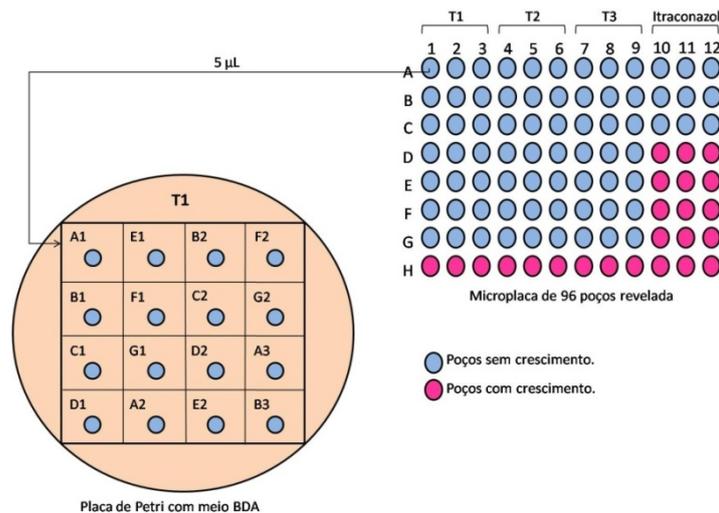
Itraconazol em *pellet*, preparado numa solução com 400  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO) e 600  $\mu\text{L}$  de água destilada autoclavada, foi utilizado como controle positivo, na concentração inicial (primeiro poço) de 550  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Foram realizados também controles de viabilidade dos microrganismos testados e do meio de cultura. Também foi testada a CIM da solução de Tween 80 a 5%, para eliminar a possibilidade de interferência do Tween nos resultados. A esterilidade das emulsões e do caldo SD utilizados foi verificada através da inoculação de todos eles em microplaca. A pesagem do itraconazol em *pellet* foi realizada mediante a multiplicação da concentração inicial desejada pelo fator de correção 4,55, cálculo

necessário para se obter o valor real de princípio ativo presente na forma farmacêutica em que este se encontra.

As placas foram incubadas a 35°C durante 72 horas. Passado esse período, para análise qualitativa do crescimento microbiano nos poços de ensaio, foram adicionados 50 µL do revelador resazurina em cada poço, na concentração final de 0,005 mg/poço. A CIM foi definida como a menor concentração, nas triplicatas, em que não se observou crescimento microbiano. A CIM final foi obtida pelo cálculo da média aritmética e desvio padrão de todas as triplicatas.

Para confirmar a atividade fungicida, foi determinada a concentração fungicida mínima (CFM) da solução de OE testada, e também do itraconazol, para cada poço do teste de CIM que não apresentou crescimento microbiano. Para isso, placas de Petri contendo meio de cultura BDA foram divididas em pequenos quadrados identificados com a letra e o número correspondente ao poço do qual foi realizada a semeadura. Um volume de 5 µL do conteúdo de cada poço foi semeado dentro dos limites do respectivo quadrado (Figura 14, p. 70). As placas foram incubadas nas mesmas condições usadas no teste da CIM. A CFM foi definida como a menor concentração sem crescimento microbiano, calculada pela média aritmética e desvio padrão de todas as triplicatas.

Todas as medidas foram feitas em quadruplicata e com três experimentos independentes.



**Figura 14:** Procedimentos para o teste da concentração fungicida mínima.

**Fonte:** A autora.

## 2.3 RESULTADOS

### 2.3.1 Composição química do óleo essencial

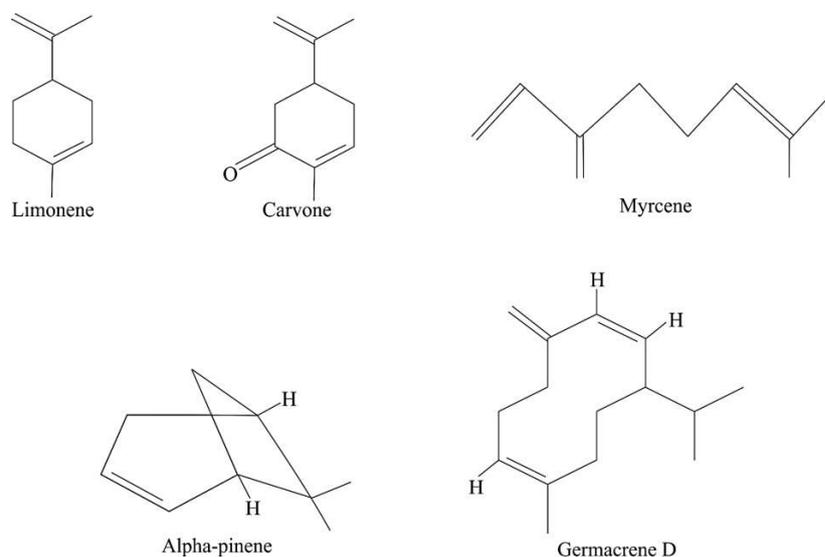
O óleo essencial foi obtido com um teor de  $1,96 \pm 0,15\%$  (V/m). Pela análise química (Tabela 9, p. 71) foi possível identificar 34 compostos químicos, correspondendo a 98,32% do óleo essencial, dos quais 58,82% pertencem à classe dos monoterpenos e 41,18% são sesquiterpenos. A carvona foi o composto majoritário (48,17%), seguida pelo limoneno (14,6%), germacreno-D (12,09%),  $\beta$ -mirceno (7,1%) e  $\alpha$ -pineno (3,68%) (Figura 15, p. 72). Exceto o germacreno-D (sesquiterpeno), todos os compostos majoritários detectados são monoterpenos.

**Tabela 9:** Composição química do óleo essencial de *Lippia alba*.

Composto	IA <sub>lit</sub>	IA <sub>calc</sub>	Média $\pm$ DP (%)
$\alpha$ -tujeno	924	928	$0,14 \pm 0,01$
$\alpha$ -pineno	932	938	$3,68 \pm 0,12$
Canfeno	946	957	T
Sabineno	969	978	$0,12 \pm 0,01$
$\beta$ -pineno	974	981	$0,33 \pm 0,02$
$\beta$ -mirceno	988	991	$7,1 \pm 0,41$
d-3-careno	1008	1013	$0,17 \pm 0$
Limoneno	1024	1036	$14,6 \pm 0,35$
<i>E</i> - $\beta$ -ocimeno	1044	1049	$0,47 \pm 0,02$
Linalol	1095	1106	$0,77 \pm 0,03$
<i>cis</i> -verbenol	1137	1154	$0,20 \pm 0$
<i>trans</i> -verbenol	1140	1158	$1,31 \pm 0,01$
Mirtenol	1194	1209	$0,35 \pm 0,02$
Mirtenal	1195	1212	$1,53 \pm 0,07$
<i>trans</i> -carveol	1215	1233	$0,17 \pm 0,05$
Carvona	1239	1263	$48,17 \pm 1,15$
Piperitona	1249	1272	$0,72 \pm 0,02$
<i>trans</i> -mirtanol	1258	1281	$0,36 \pm 0,03$
Acetato de mirtenila	1334	1324	$0,22 \pm 0,01$
Piperitenona	1340	1359	$0,86 \pm 0,13$
Eugenol	1356	1368	$0,14 \pm 0,05$
$\alpha$ -copaeno	1374	1385	$0,14 \pm 0,01$
$\beta$ -bourboneno	1387	1394	$0,80 \pm 0,09$
$\beta$ -cubebeno+ $\beta$ -elemeno	1387/1389	1397	$0,67 \pm 0,13$
<i>E</i> -cariofileno	1417	1432	$0,24 \pm 0,02$
$\beta$ -copaeno	1430	1442	$0,22 \pm 0,03$
$\beta$ -gurjuneno+( <i>Z</i> )- $\beta$ -farneseno	1431/1440	1458	$0,24 \pm 0,01$
<i>allo</i> -aromadendreno	1458	1474	$0,38 \pm 0,05$
Germacreno D	1484	1495	$12,09 \pm 1,90$
Biciclogermacreno+ $\alpha$ -muuroleno	1500	1510	$0,65 \pm 0,09$
$\delta$ -cadineno	1522	1531	$0,57 \pm 0,09$
( <i>E</i> )-nerolidol	1561	1569	$0,75 \pm 0,1$
Espatuleno	1577	1597	$0,12 \pm 0$

$\alpha$ -cadinol	1652	1678	$0,12 \pm 0$
<b>Total de compostos identificados</b>	<b>98,32</b>		

IA<sub>lit</sub>, índice aritmético da literatura; IA<sub>calc</sub>, índice aritmético calculado; DP, desvio padrão



**Figura 15:** Compostos majoritários do óleo essencial de *L. alba*, quimiotipo III.  
**Fonte:** A autora.

### 2.3.2 Testes antimicrobianos

No teste de inibição do crescimento micelial (Tabela 10, p. 73), todos os dermatófitos apresentaram uma diminuição considerável em seu crescimento, perante todas as concentrações de OE testadas (Apêndice B). É importante destacar que a solução de Tween a 5% foi também avaliada e não inibiu o crescimento microbiano. *T. rubrum* foi o fungo mais sensível, sendo inibido em 61,97% pela menor concentração de óleo (130  $\mu\text{g/mL}$ ), não havendo diferença significativa entre as concentrações de 465  $\mu\text{g/mL}$  e 260  $\mu\text{g/mL}$  de OE, e entre essas concentrações e o itraconazol. Há uma relação dose dependente em todos os resultados, pois a inibição microbiana pelo OE decresce conforme a concentração diminui, sendo que a maior concentração utilizada nos testes (930  $\mu\text{g/mL}$ ) inibiu o crescimento dos dermatófitos em 100%.

**Tabela 10:** Inibição do crescimento micelial de dermatófitos perante diferentes concentrações de óleo essencial de *L. alba* rico em carvona ( $p < 0,05$ ).

Dermatófito	Inibição do crescimento micelial (%)				
	930 µg/mL	465 µg/mL	260 µg/mL	130 µg/mL	Itraconazol 32 µg/mL
<i>T. mentagrophytes</i>	100a	79,49b	63,37c	40,80d	71,81e
<i>T. rubrum</i>	100a	77,99b	74,96b	61,97c	71,94b
<i>M. gypseum</i>	100a	60,54b	52,09c	37,54d	24,86e

Nas linhas, médias seguidas pela mesma letra não possuem diferença significativa segundo o Teste de Tukey a 5% de probabilidade.

Os resultados para o teste da CIM e da CFM estão descritos na Tabela 11 (p. 73), na qual é possível observar que o dermatófito mais resistente à ação do OE estudado e do itraconazol é *M. gypseum*, o qual exige uma CIM maior de ambos (72 µg/mL e 137,5 µg/mL, respectivamente), em relação aos outros dermatófitos testados. Os dados de CFM do OE de *L. alba* indicam que, para todas essas cepas de dermatófitos, ele possui efeito fungistático, assim como o itraconazol, já que os valores de CFM foram mais altos que de CIM.

**Tabela 11:** Concentração inibitória mínima (µg/mL) e concentração fungicida mínima (µg/mL) do óleo essencial de *Lippia albae* do itraconazol frente a dermatófitos (média e desvio padrão).

Espécie	CIM-LA	CFM-LA	CIM-I	CFM-I
<i>T. mentagrophytes</i>	36 ± 0	240 ± 48	6,87 ± 0	244,44 ± 26,46
<i>T. rubrum</i>	36 ± 0	116 ± 48	55 ± 0	129,87 ± 52,92
<i>M. gypseum</i>	72 ± 0	256 ± 99	137,5 ± 0	213,89 ± 190,82

CIM-LA, concentração inibitória mínima de *L. alba*; CFM-LA, concentração fungicida mínima de *L. alba*; CIM-I, concentração inibitória mínima de itraconazol; CFM-I, concentração fungicida mínima de itraconazol.

## 2.4 DISCUSSÃO

A composição química dos OEs de uma mesma espécie pode variar devido à influência de fatores intrínsecos às plantas que os produzem, tais como o seu estágio de crescimento e a sua saúde, bem como devido a fatores externos (clima, meio ambiente, composição e características do solo, entre outros), interferindo assim na atividade biológica deste material (FIGUEIREDO et al., 2008; SCHIMIDT, 2010; TELES et al., 2012).

De acordo com os resultados obtidos pela análise química, o OE de *L. alba* deste estudo enquadra-se, segundo os critérios de Hennebelle et al. (2008), no quimiotipo III, o qual é caracterizado pela grande quantidade de carvona e limoneno. Muitos pesquisadores relatam o potencial farmacológico desses dois monoterpenos – ambos podem atuar como antimicrobianos, antioxidantes e imunomoduladores (OUMZIL et al., 2002; YU; YAN; SUN, 2017; RAPHAEL; KUTTAN, 2003), sugerindo assim que a atividade antidermatofítica observada pode ser atribuído a essas substâncias.

O monoterpeno oxigenado carvona pode ser encontrado em OEs de diversas espécies vegetais, tais como *Mentha spicata* L. e *Mentha viridis* L. (CARVALHO; FONSECA, 2006). Uma série de OEs ricos em carvona foi testada para diferentes tipos de atividade biológica, comprovando, assim, que esse monoterpeno tem potencial farmacológico para combater fungos e bactérias patogênicos, como *Candida sp.* e *Listeria monocytogenes*, por exemplo, e para prevenir contra o câncer (MCGEADY; WANSLEY; LOGAN, 2002; ZHENG; KENNEY; LAM, 1992; MORO et al., 2017). Além disso, Aggarwal et al. (2002) detectaram a atividade antidermatofítica dos OEs de *M. spicata* e *Anethum sowa* ricos em carvona e limoneno contra *T. rubrum* e *M. gypseum*. Outro ponto que merece destaque em se tratando da carvona é a sua baixa citotoxicidade, que a faz adequada para ser empregada como um complemento aos protocolos clínicos utilizados na terapia antifúngica (BONI et al., 2016).

O limoneno, por sua vez, é um monoterpeno de baixa toxicidade muito utilizado como aromatizante e flavorizante, sendo considerado seguro pela Food and Drug Administration (FLAMM; LEHMAN-MCKEEMAN, 1991). Além de ser amplamente utilizado nas indústrias de cosméticos e de alimentos, o limoneno pode ser aplicado clinicamente, pois diversos estudos comprovam o seu potencial terapêutico e preventivo contra determinadas doenças – ele tem provado ser um quimiopreventivo contra vários tipos de câncer (SUN, 2007). Quanto a sua atividade antimicrobiana, o número de pesquisas que atestam essa atividade é extenso e OEs que apresentam o limoneno como composto majoritário mostraram-se excelentes antimicrobianos frente a fungos e bactérias patogênicos (JAVED et al., 2013). Num estudo *in vitro* realizado com limoneno comercial, foi detectado que esse composto possui ação inibitória com efeito fungicida contra *T. rubrum* (CHE; KIM; LEE, 2009).

No tocante ao  $\beta$ -mirceno, ele é outro monoterpeno considerado seguro pela Food and Drug Administration, com baixa toxicidade oral e dérmica, sendo frequentemente empregado como aromatizante e flavorizante em indústrias de cosméticos e de alimentos (BEHR; JOHNEN, 2009). Ele pode ser encontrado em OEs de muitas plantas, apresentando-se como um dos compostos majoritários de vários deles (BONAMIN et al., 2014). Entretanto, uma pesquisa feita com mirceno extraído de fontes naturais revelou que ele não desempenha atividade antibacteriana contra as espécies *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus* (GALLUCCI et al., 2009). Essa informação traz à tona a necessidade de se investigar mais a propriedade antimicrobiana dessa substância isolada perante outros microrganismos patogênicos, inclusive dermatófitos.

Em se tratando do  $\alpha$ -pineno, o composto majoritário encontrado em menor quantidade na amostra, sabe-se que, nas plantas, ele apresenta propriedades fungicidas (SILVA et al., 2012).

O germacreno-D é o único sesquiterpeno que se apresenta como um componente majoritário do quimiotipo analisado. Ele é um dos cinco isômeros do germacreno e pode ser encontrado em OEs de espécies de outros gêneros da família Verbenaceae (ZAMORA; TORRES; NUÑES, 2018). Montanari et al. (2011) analisaram várias espécies dessa família, inclusive algumas do gênero *Lippia*, todas coletadas no Brasil e ricas em germacreno-D, e detectaram a atividade antibacteriana de seus OEs contra *S. aureus*, *E. colie* *Bacillus cereus*. Houicher, Hechachna e Özogul (2016), por sua vez, confirmaram a atividade antifúngica do OE de *Artemisia campestris*, rico deste mesmo composto, contra diferentes espécies de fungos filamentosos patogênicos, tais como *Aspergillus niger* e *Fusarium graminearum*, deixando clara a importância de se testar os OEs em que o germacreno-D é majoritário contra dermatófitos, que também são fungos filamentosos, e de se verificar o potencial dessa substância.

O potencial antimicrobiano dos OEs pode ser associado aos compostos majoritários, contudo, é possível que os componentes presentes em menor quantidade no óleo contribuam para a sua ação antimicrobiana por meio de algum sinergismo com os componentes predominantes (AFOLAYAN; ASHAFANA, 2009). De acordo com os resultados dos testes antimicrobianos realizados neste trabalho, o quimiotipo carvona de *L. alba* possui atividade antidermatofítica fungistática contra todos os dermatófitos testados, com uma CIM de 72  $\mu\text{g/mL}$  frente a *M. gypseum* e 36  $\mu\text{g/mL}$  para *T. mentagrophytes* e *T. rubrum*. Outro quimiotipo desta espécie, rico em linalol, inibiu o crescimento de *T. rubrum* e *M. gypseum* com valores de CIM de 39  $\mu\text{g/mL}$  e 312  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente (COSTA, et al, 2013), com eficiência inferior ao aqui observado. O OE *L. gracilis* (MELO et al., 2013) também inibiu isolado de *T. rubrum*, mas com valores de CIM de 46,87 e 93,75  $\mu\text{g/mL}$ . Entretanto, variações de cepas e de metodologia dificultam uma comparação direta entre estes trabalhos. É importante também salientar o fato de que os resultados dos testes antimicrobianos podem ser influenciados pelos métodos usados, visto que eles não possuem a mesma sensibilidade ou não se baseiam nos mesmos princípios (COS et al., 2006).

Em relação à utilidade dos OEs no tratamento contra dermatofitoses, a característica lipofílica dos componentes desses óleos pode facilitar a sua distribuição pelo estrato córneo da pele, de maneira que a sua aplicação tópica pode, a depender da gravidade da infecção, ser

suficiente (ARA et al., 2011), mas ensaios posteriores para determinação do mecanismo de ação e toxicidade devem ser conduzidos.

## REFERÊNCIAS

- ALI, B. et al. Essential oils used in aromatherapy: a systemic review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 5, n. 8, p. 601-611, 2015.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4.ed. Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007. 804 p.
- AFOLAYAN, A. J.; ASHAF, A. O. T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Chrysocoma ciliata* L. leaves. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 3, n. 5, p. 390-394, 2009.
- AGGARWAL, K. K. et al. Antimicrobial activity profiles of the two enantiomers of limonene and carvone isolated from the oils of *Mentha spicata* and *Anethum sowa*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 17, p. 59-63, 2002.
- ARA, G. et al. In-vitro antibacterial activity of essential oils extracted from locally available medicinal plants. **Journal of the Chemical Society of Pakistan**, v. 33, 2, p. 205-208, 2011.
- BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils – a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BEHR, A.; JOHNEN, L. Myrcene as a natural base chemical in sustainable chemistry: a critical review. **ChemSusChem**, v. 2, 1072-1095, 2009.
- BONAMIN, F. et al. The effect of a minor constituent of essential oil from *Citrus aurantium*: the role of  $\beta$ -myrcene in preventing peptic ulcer disease. **Chemico-Biological Interactions**, v. 212, p. 11-19, 2014.
- BONI, G. C. et al. Antifungal and cytotoxic activity of purified biocomponents as carvone, menthone, menthofuran and pulegone from *Mentha* spp. **African Journal of Plant Science**, v. 10, v. 10, p. 203-210, oct., 2016.
- BOUCHARA, J. P.; MIGNON, B.; CHATUVERDI, V. Dermatophytes and dermatophytoses: a thematic overview of state of the art, and the directions for future research and developments. **Mycopathologia**, v. 182, n. 1-2, p. 1-4, 2017.
- CARVALHO, C. C. R.; FONSECA, M. R. Carvone: why and how should one bother to produce this terpene. **Food Chemistry**, v. 95, n. 3, p. 413-422, 2006.

CHE, H. Y.; KIM, H.; LEE, M. H. *In vitro* antifungal activity of limonene against *Trichophyton rubrum*. **Mycobiology**, v. 37, n. 3, p. 243-246, 2009.

CORTEZ, A. C. et al. Frequency and etiology of dermatophytosis in children age 12 and under in the state of Amazonas. **Revista Iberoamericana de Micologia**, v. 29, n. 4, p. 223-226, 2012.

COS, P. et al. Anti-infective potential of natural products: how to develop a stronger in vitro "proof-of-concept". **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

COSTA, D. C. M. et al. Inhibitory effect of linalool-rich essential oil from *Lippia alba* on the peptidase and keratinase activities of dermatophytes. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, p. 1-6, 2013.

DEGENHARDT, J.; KÖLLNER, T. G.; GERSHEZON, J. Monoterpene and sesquiterpene synthases and the origin of terpene skeletal diversity in plants. **Phytochemistry**, v. 70, n. 15-16, p. 1621-1637, oct.-nov., 2009.

EDGINGTON, L. V.; KHEW, K. L.; BARRON, G. L. Fungitoxic spectrum of benzimidazole compounds. **Phytopathology**, Saint Paul, v. 61, n. 1, p. 42-44, 1971.

FIGUEIREDO, A. C. et al. Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 23, n. 4, p. 213-226, 2008.

FLAMM, W. G.; LEHMAN-MCKEEMAN, L. D. The human relevance of the renal tumor-inducing potential of d-limonene in male rats: implications for risk assessment. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 3, n. 1, p. 70-86, 1991.

FRANÇA, F.; ATKINS, S. Neotropical Verbenaceae. In: MILLIKEN, W.; KLITGÅRD, B.; BARACAT, A. **Neotropikey**: interactive key and information resources for flowering plants of the neotropics. Londres: Kew Gardens, 2009. Disponível em: <<http://www.kew.org/science/tropamerica/neotropikey/families/Verbenaceae.htm>>. Acesso em: 13 jun. 2018.

GALLUCCI, M. A. et al. Antimicrobial combined action of terpenes against the food-borne microorganisms *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* and *Bacillus cereus*. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 24, p. 348-354, 2009.

GUPTA, A. K.; COOPER, E. A. Update in antifungal therapy of dermatophytosis. **Mycopathologia**, v. 166, n. 5-6, p. 353-367, 2008.

HENNEBELLE, T. et al. Ethnopharmacology of *Lippia alba*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 116, p. 211-222, 2008.

HENNEBELLE, T. et al. The essential oil of *Lippia alba*: analysis of samples from French overseas departments and review of previous works. **Chemistry and Biodiversity**, v.3, n.10, p.1116–1125, 2006.

HOUICHER, A.; HECHACHNA, H.; ÖZOGUL, F. *In vitro* determination of the antifungal activity of *Artemisia campestris* essential oil from algeria. **International Journal of Food Properties**, v. 19, p. 1749-1756, 2016.

JAVED, S. et al. Chemical constituents, antimicrobial and antioxidant activity of essential oil of *Citrus limetta* var. Mitha (sweet lime) peel in Pakistan. **African Journal of Microbiology Research**, v. 7, n. 4, p. 3071-3077, 2013.

JOULAIN, D.; KÖNIG, W. A. **The atlas of spectral data of sesquiterpene hydrocarbons**. Hamburg: E. B. Verlag, 1998. 658 p.

LAKSHMIPATHY, D. T.; KANNABIRAN, K. Review on dermatomycosis: pathogenesis and treatment. **Natural Science**, v. 2, n. 7, p. 726-731, 2010.

LANA, D. F. D. et al. Dermatofitoses: agentes etiológicos, formas clínicas, terapêutica e novas perspectivas de tratamento. **Clinical and Biomedical Research**, Porto Alegre, v. 36, n. 4, p. 230-241, 2016.

*Lippia*. In: **Flora do Brasil 2020 em construção**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB15170>>. Acesso em: 13 Jun. 2018

MACHADO, T. F.; PEREIRA, R. C. A.; BATISTA, V. C. V. Seasonal variability of the antimicrobial activity of the essential oil of *Lippia alba*. **Revista Ciência Agronômica**, Fortaleza, v. 45, n. 3, p. 515-519, sept., 2014.

MCGEADY, D. L.; WANSLEY, D. L.; LOGAN, D. A. Carvone and perillaldehyde interfere with the serum-induced formation of filamentous structures in *Candida albicans* at substantially lower concentrations than those causing significant inhibition of growth. **Journal of Natural Products**, v. 65, n. 7, p. 953-955, 2002.

MELO, J. O. et al. Antidermatophytic and antileishmanial activities of essential oils from *Lippia gracilis* Schauer genotypes. **Acta Tropica**, v. 128, p. 110-115, 2013.

MESA-ARANGO, A. C. et al. Citral and carvone chemotypes from the essential oils of Colombian *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown: composition, cytotoxicity and antifungal activity. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 6, 2009.

MONTANARI, R. M. et al. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from Verbenaceae species: alternative sources of (e)-caryophyllene and germacrene-D. **Quimica Nova**, v. 24, n. 9, p. 1550-1555, 2011.

MORO, I. J. et al. Evaluation of antimicrobial, cytotoxic and chemopreventive activities of carvone and its derivatives. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 53, n. 4, 2017.

NCCLS. **Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica de Fungos Filamentosos**; Norma Aprovada. Documento M38-A. Pensilvânia: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2002.

OUMZIL, H. et al. Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. **Phytotherapy Research**, v. 16, p. 727-731, 2002.

PERES, N. T. A. et al. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, 657-667, 2010.

PINTO, C. P. et al. Antimicrobial activity of *Lippia* species from the brazilian semiarid region traditionally used as antiseptic and anti-infective agents. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, Artical ID614501, 2013, 5 p.

PIRES C. A. et al. Clinical, epidemiological, and therapeutic profile of dermatophytosis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 89, n. 2, p. 259-264, 2014.

RAPHAEL, T. J.; KUTTAN, G. Immunomodulatory activity of naturally occurring monoterpenes carvone, limonene and perillic acid. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 25, p. 285-294, 2003.

SCHMIDT, E. Production of essential oils. In: BAS, ER K. H.; BUCHBAUER, G. **Handbook of essential oils**. Science, technology, and applications. Boca Raton: CRC Press, 2010.

SILVA, A. C. R. da et al. Biological activities of  $\alpha$ -pinene and  $\beta$ -pinene enantiomers. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6.305-6.316, 2012.

SUN, JIDONG. D-limonene: safety and clinical applications. **Alternative Medicine Review**, v. 12, n. 3, 2007.

SWAMY, M. K.; AKHTAR, M. S.; SINNIAH, U. R. Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2016.

TELES, S. et al. Geographical origin and and drying methodology may affect the essential oil of *Lippia alba*(Mill) N.E. Brown. **Industrial Crops and Products**, v. 37, p. 247-252, 2012.

YU, L.; YAN, J.; SUN, Z. D-limonene exhibits anti-inflammatory and antioxidant properties in an ulcerative colitis rat model via regulation of iNOS, COX-2, PGE2 and ERK signaling pathways. **Molecular Medicine Reports**, v. 15, n. 4, p. 2.339-2.346, 2017.

ZAMORA, C. M. P.; TORRES, C. A.; NUÑES, M. B. Antimicrobial activity and chemical composition of essential oils from Verbenaceae species growing in South America. **Molecules**, v. 23, n. 544, 2018.

ZHENG, G. Q.; KENNEY, P. M.; LAM, L. K. T. Anethofuran, carvone, and limonene - potential cancer chemopreventive agents from dill weed oil and caraway oil. **Planta Medica**, v. 58, n. 4, p. 338-341, 1992.

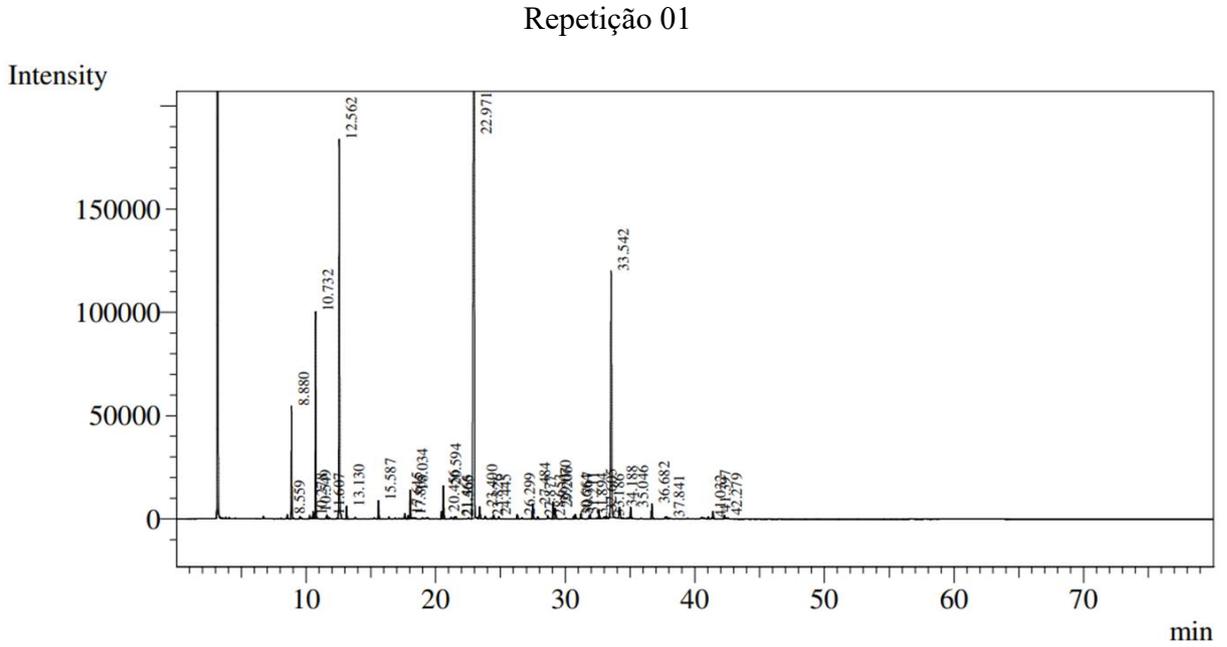
## CONCLUSÃO GERAL

A presença de fenólicos e flavonóides nos extratos de *V. palmarum* sugere o seu potencial farmacológico, visto que esses metabólitos atuam como antimicrobianos e antioxidantes.

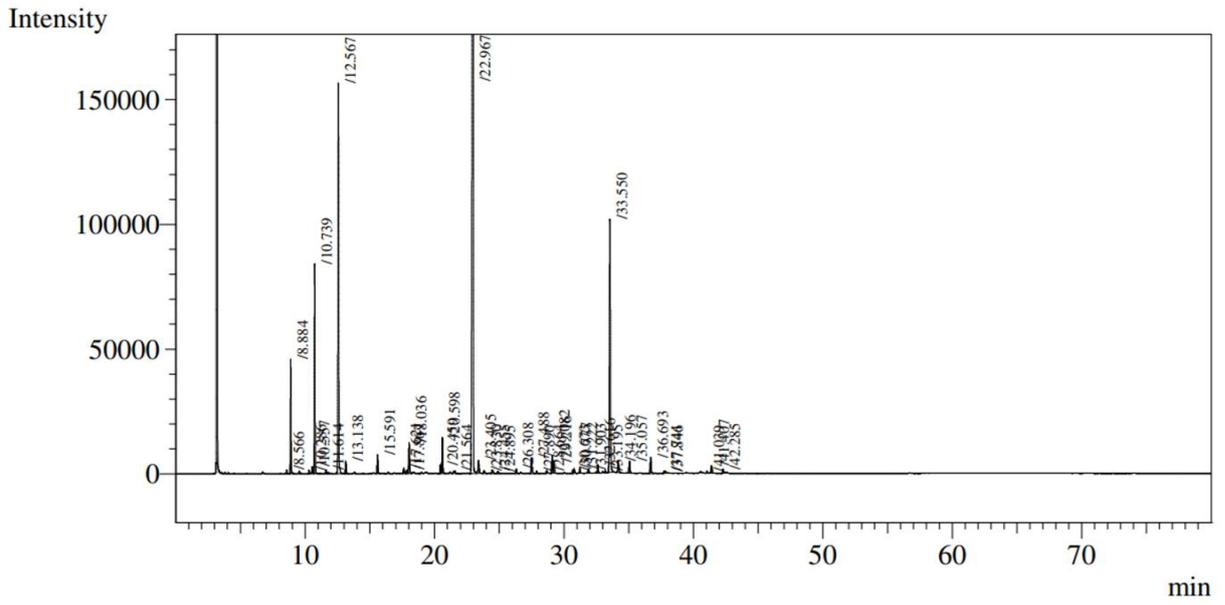
Tanto os extratos metanólicos brutos de *V. palmarum* quanto óleo essencial de *L. alba* desempenharam atividade antidermatofítica contra as três espécies de dermatófitos testadas.

Dos resultados apresentados frente aos dermatófitos testados neste trabalho, o OE de *L. alba* quimiotipo III representa uma alternativa promissora para o tratamento de dermatofitoses, principalmente pelo fato de seus componentes majoritários (carvona e limoneno) já terem sido testados em modelos animais, nos quais, em sua maioria, não foram detectadas reações adversas ou mutações, o que indicaa segurança desses compostos para o uso em humanos.

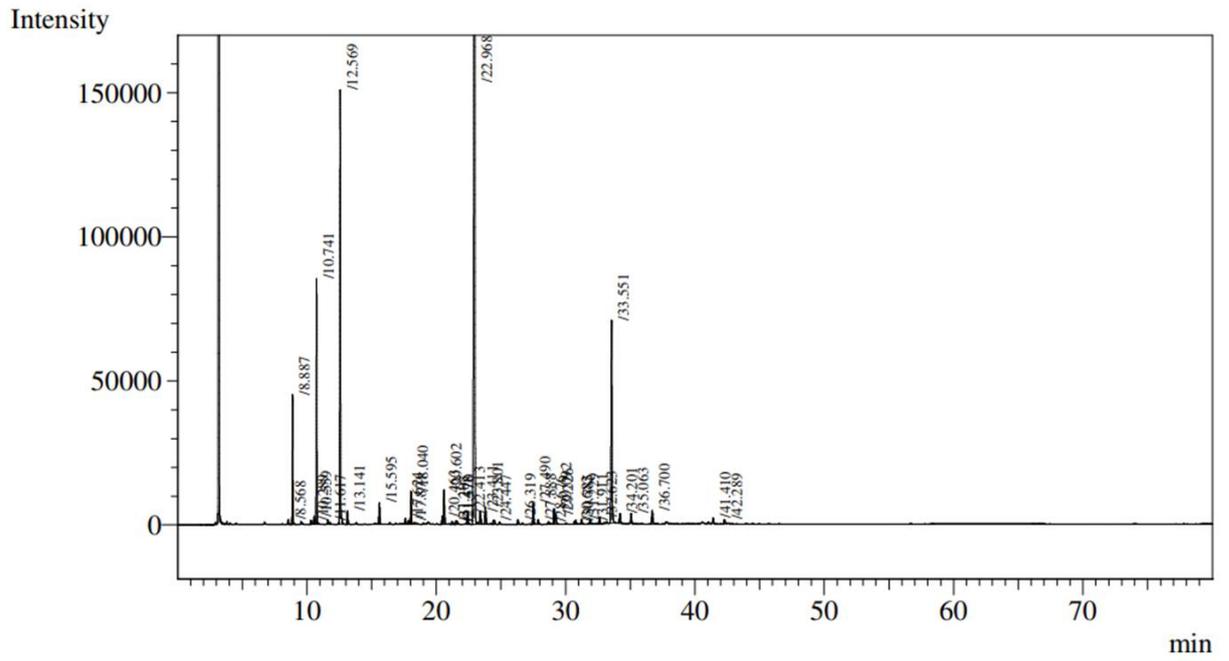
Estudos futuros de determinação do mecanismo de ação do óleo essencial, de toxicidade e ensaios em modelos animais devem ser conduzidos.

APÊNDICE A – Perfil cromatográfico do óleo essencial de *L. alba* obtido por CG/DIC

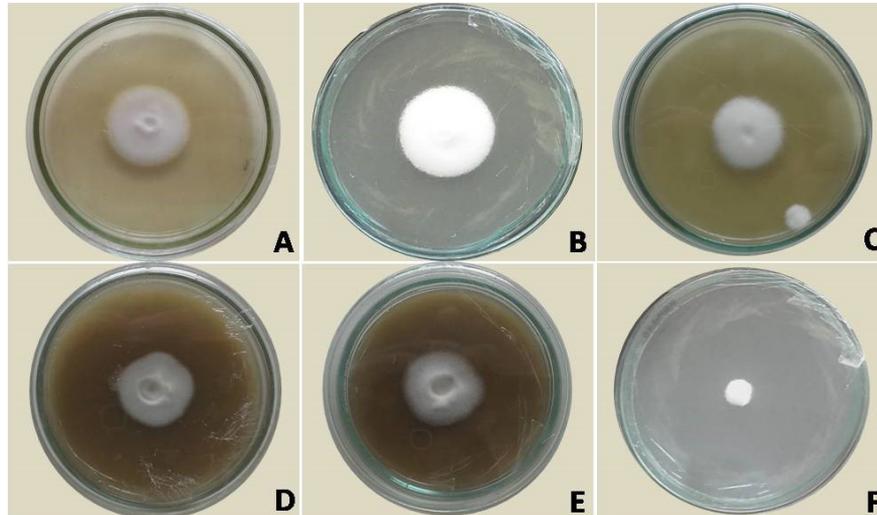
## Repetição 02



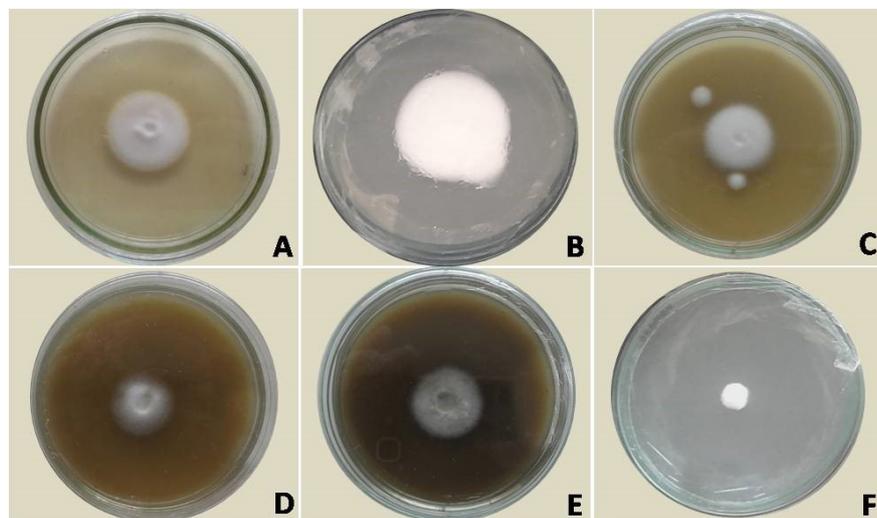
## Repetição 03



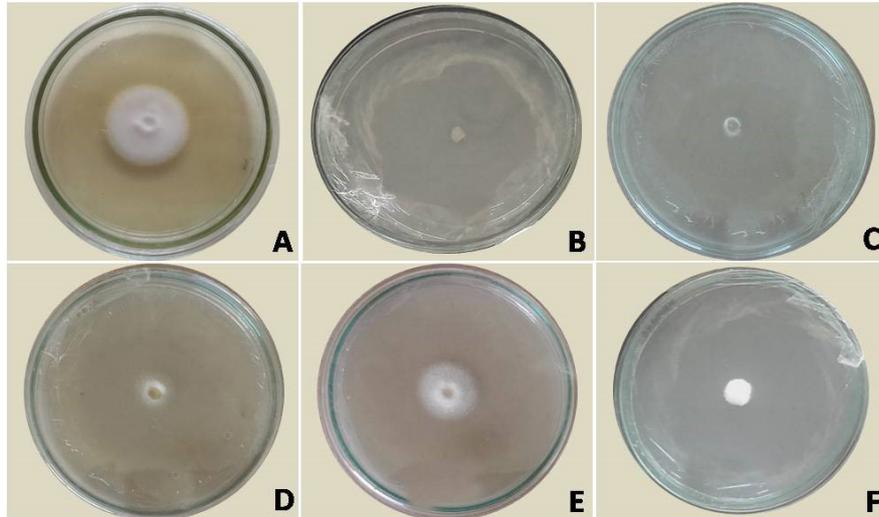
**APÊNDICE B** – Inibição do crescimento micelial dos dermatófitos perante os extratos de *V. palmarum* e o óleo essencial de *L. alba*, em diferentes concentrações



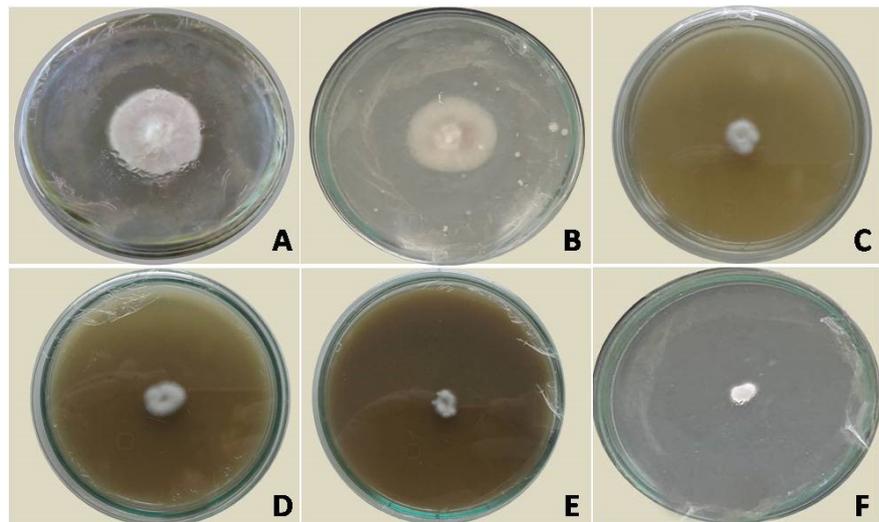
Inibição do crescimento micelial de *T. mentagrophytes* pelo extrato metanólico bruto dos caules de *V. palmarum* em diferentes concentrações. A: controle negativo; B: 1 mg/mL; C: 2 mg/mL; D: 4 mg/mL; E: 8 mg/mL; F: itraconazol.



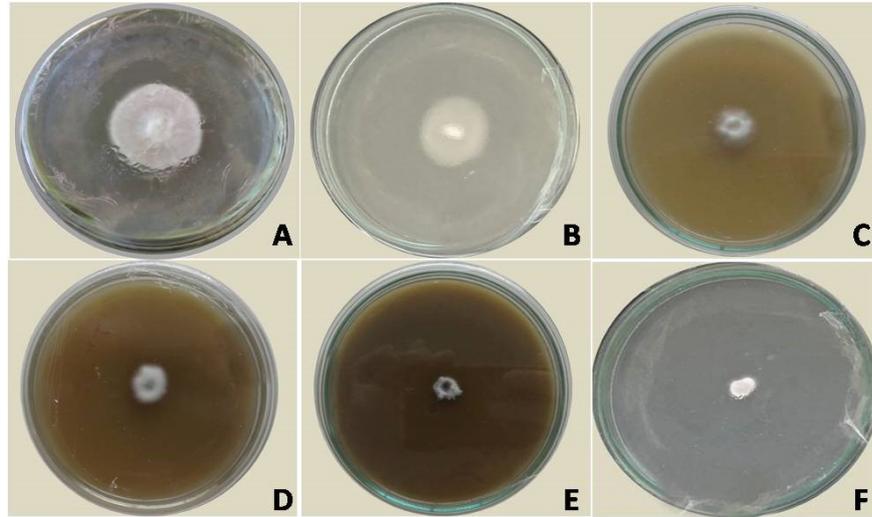
Inibição do crescimento micelial de *T. mentagrophytes* pelo extrato metanólico bruto das folhas de *V. palmarum* em diferentes concentrações. A: controle negativo; B: 1 mg/mL; C: 2 mg/mL; D: 4 mg/mL; E: 8 mg/mL; F: itraconazol.



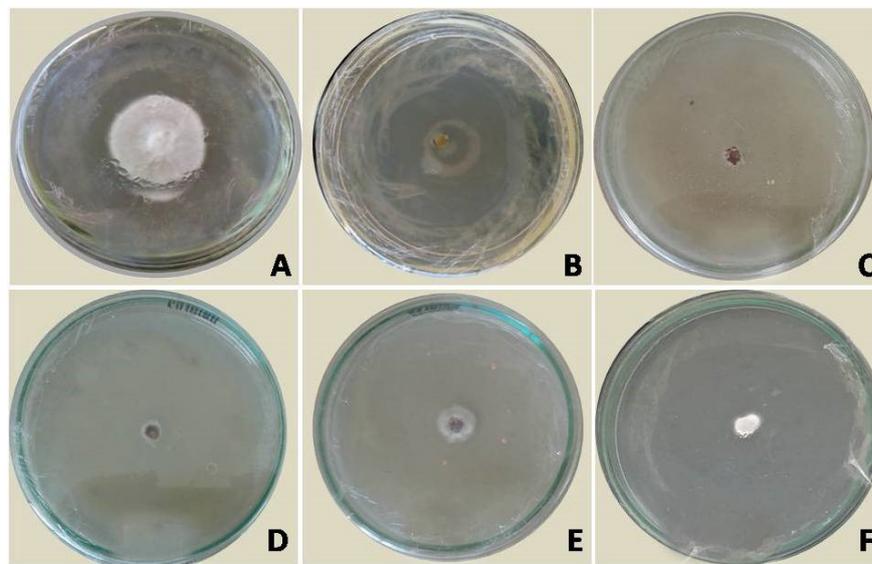
Inibição do crescimento micelial de *M. gypseum* pelo óleo essencial de *L. alba* em diferentes concentrações. A: controle negativo; B: 930 µg/mL; C: 465 µg/mL; D: 260 µg/mL; E: 130 µg/mL; F: itraconazol.



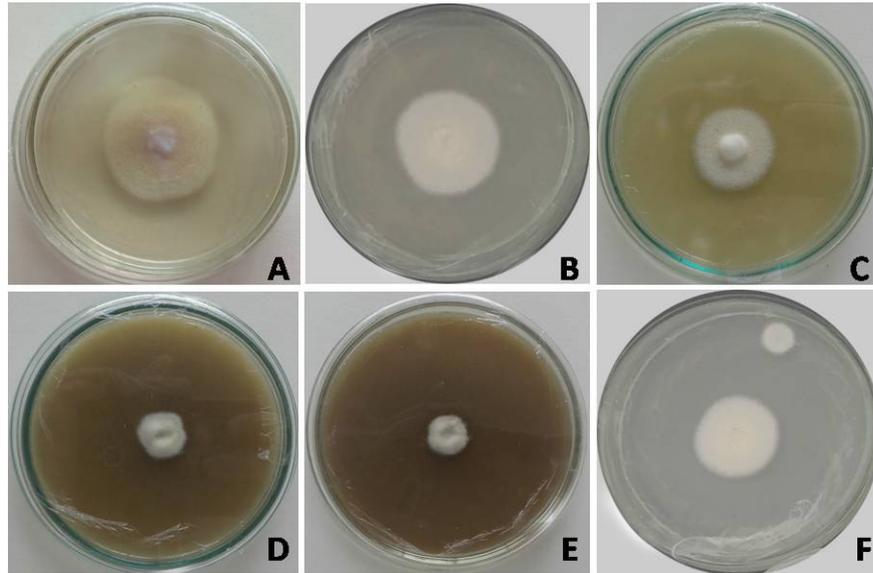
Inibição do crescimento micelial de *T. rubrum* pelo extrato metanólico bruto dos caules de *V. palmarum* em diferentes concentrações. A: controle negativo; B: 1 mg/mL; C: 2 mg/mL; D: 4 mg/mL; E: 8 mg/mL; F: itraconazol.



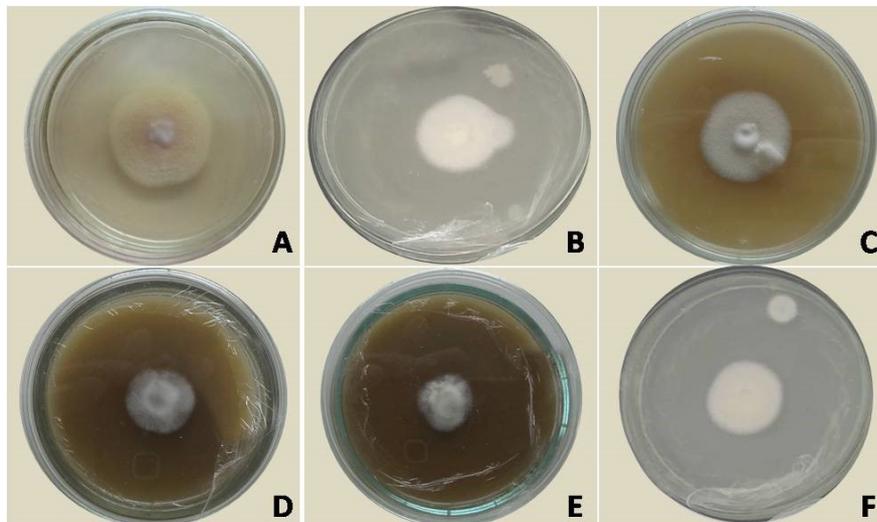
Inibição do crescimento micelial de *T. rubrum* pelo extrato metanólico bruto das folhas de *V. palmarum* em diferentes concentrações. A: controle negativo; B: 1 mg/mL; C: 2 mg/mL; C: 4 mg/mL; E: 8 mg/mL; F: itraconazol.



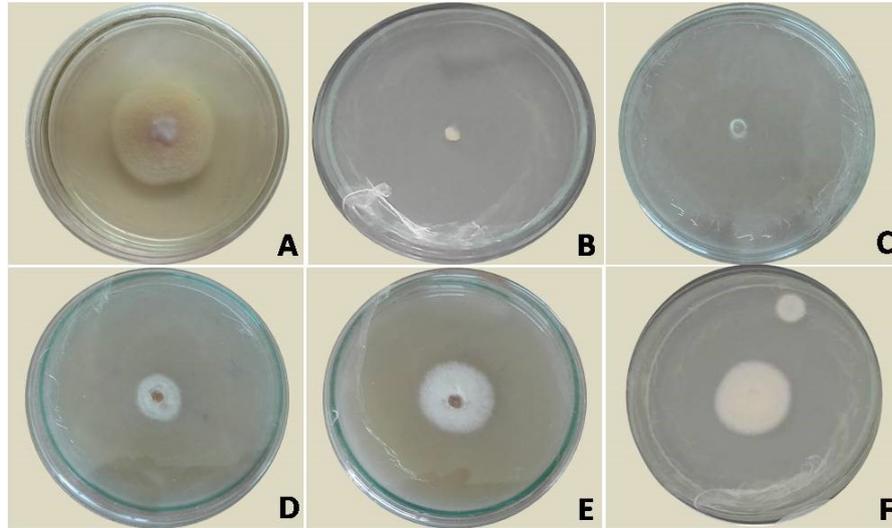
Inibição do crescimento micelial de *T. rubrum* pelo óleo essencial de *L. alba* em diferentes concentrações. A: controle negativo; B: 930  $\mu\text{g/mL}$ ; C: 465  $\mu\text{g/mL}$ ; C: 260  $\mu\text{g/mL}$ ; E: 130  $\mu\text{g/mL}$ ; F: itraconazol.



Inibição do crescimento micelial de *M. gypseum* pelo extrato metanólico bruto dos caules de *V. palmarum* em diferentes concentrações. A: controle negativo; B: 1 mg/mL; C: 2 mg/mL; D: 4 mg/mL; E: 8 mg/mL; F: itraconazol.



Inibição do crescimento micelial de *M. gypseum* pelo extrato metanólico bruto das folhas de *V. palmarum* em diferentes concentrações. A: controle negativo; B: 1 mg/mL; C: 2 mg/mL; D: 4 mg/mL; E: 8 mg/mL; F: itraconazol.



Inibição do crescimento micelial de *M. gypseum* pelo óleo essencial de *L. alba* em diferentes concentrações. A: controle negativo; B: 930  $\mu\text{g/mL}$ ; C: 465  $\mu\text{g/mL}$ ; C: 260  $\mu\text{g/mL}$ ; E: 130  $\mu\text{g/mL}$ ; F: itraconazol.