

A close-up photograph of a female scientist wearing safety goggles and a white lab coat. She is holding a clear petri dish filled with a dense mass of green and white sprouts, likely alfalfa or mung bean sprouts. The background is blurred, showing a laboratory setting.

**Raissa Rachel Salustriano da Silva-Matos  
Vanessa Reis Cardoso  
Kleber Veras Cordeiro  
(Organizadores)**

# **Produção e Controle de Produtos Naturais 2**

**Atena**  
Editora  
Ano 2020



**Raissa Rachel Salustriano da Silva-Matos  
Vanessa Reis Cardoso  
Kleber Veras Cordeiro  
(Organizadores)**

# **Produção e Controle de Produtos Naturais 2**

**Atena**  
Editora  
Ano 2020

2020 by Atena Editora

Copyright © Atena Editora

Copyright do Texto © 2020 Os autores

Copyright da Edição © 2020 Atena Editora

**Editora Chefe:** Profª Drª Antonella Carvalho de Oliveira

**Diagramação:** Lorena Prestes

**Edição de Arte:** Lorena Prestes

**Revisão:** Os Autores



Todo o conteúdo deste livro está licenciado sob uma Licença de Atribuição *Creative Commons*. Atribuição 4.0 Internacional (CC BY 4.0).

O conteúdo dos artigos e seus dados em sua forma, correção e confiabilidade são de responsabilidade exclusiva dos autores. Permitido o download da obra e o compartilhamento desde que sejam atribuídos créditos aos autores, mas sem a possibilidade de alterá-la de nenhuma forma ou utilizá-la para fins comerciais.

### **Conselho Editorial**

#### **Ciências Humanas e Sociais Aplicadas**

Profª Drª Adriana Demite Stephani – Universidade Federal do Tocantins  
Prof. Dr. Álvaro Augusto de Borba Barreto – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Alexandre Jose Schumacher – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso  
Profª Drª Angeli Rose do Nascimento – Universidade Federal do Estado do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Antonio Carlos Frasson – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Antonio Gasparetto Júnior – Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais  
Prof. Dr. Antonio Isidro-Filho – Universidade de Brasília  
Prof. Dr. Carlos Antonio de Souza Moraes – Universidade Federal Fluminense  
Prof. Dr. Constantino Ribeiro de Oliveira Junior – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Cristina Gaio – Universidade de Lisboa  
Profª Drª Denise Rocha – Universidade Federal do Ceará  
Prof. Dr. Deyvison de Lima Oliveira – Universidade Federal de Rondônia  
Prof. Dr. Edvaldo Antunes de Farias – Universidade Estácio de Sá  
Prof. Dr. Eloi Martins Senhora – Universidade Federal de Roraima  
Prof. Dr. Fabiano Tadeu Grazioli – Universidade Regional Integrada do Alto Uruguai e das Missões  
Prof. Dr. Gilmei Fleck – Universidade Estadual do Oeste do Paraná  
Profª Drª Ivone Goulart Lopes – Istituto Internazionale delle Figlie de Maria Ausiliatrice  
Prof. Dr. Julio Candido de Meirelles Junior – Universidade Federal Fluminense  
Profª Drª Keyla Christina Almeida Portela – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia de Mato Grosso  
Profª Drª Lina Maria Gonçalves – Universidade Federal do Tocantins  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Pereira da Silva – Universidade Federal do Maranhão  
Profª Drª Miranilde Oliveira Neves – Instituto de Educação, Ciência e Tecnologia do Pará  
Profª Drª Paola Andressa Scortegagna – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Rita de Cássia da Silva Oliveira – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Sandra Regina Gardacho Pietrobon – Universidade Estadual do Centro-Oeste  
Profª Drª Sheila Marta Carregosa Rocha – Universidade do Estado da Bahia  
Prof. Dr. Rui Maia Diamantino – Universidade Salvador  
Prof. Dr. Urandi João Rodrigues Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. William Cleber Domingues Silva – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Willian Douglas Guilherme – Universidade Federal do Tocantins

#### **Ciências Agrárias e Multidisciplinar**

Prof. Dr. Alexandre Igor Azevedo Pereira – Instituto Federal Goiano  
Prof. Dr. Antonio Pasqualetto – Pontifícia Universidade Católica de Goiás  
Profª Drª Daiane Garabeli Trojan – Universidade Norte do Paraná

Profª Drª Diocléa Almeida Seabra Silva – Universidade Federal Rural da Amazônia  
Prof. Dr. Écio Souza Diniz – Universidade Federal de Viçosa  
Prof. Dr. Fábio Steiner – Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul  
Prof. Dr. Fágner Cavalcante Patrocínio dos Santos – Universidade Federal do Ceará  
Profª Drª Girlene Santos de Souza – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Júlio César Ribeiro – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Profª Drª Lina Raquel Santos Araújo – Universidade Estadual do Ceará  
Prof. Dr. Pedro Manuel Villa – Universidade Federal de Viçosa  
Profª Drª Raissa Rachel Salustriano da Silva Matos – Universidade Federal do Maranhão  
Prof. Dr. Ronilson Freitas de Souza – Universidade do Estado do Pará  
Profª Drª Talita de Santos Matos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Prof. Dr. Tiago da Silva Teófilo – Universidade Federal Rural do Semi-Árido  
Prof. Dr. Valdemar Antonio Paffaro Junior – Universidade Federal de Alfenas

### **Ciências Biológicas e da Saúde**

Prof. Dr. André Ribeiro da Silva – Universidade de Brasília  
Profª Drª Anelise Levay Murari – Universidade Federal de Pelotas  
Prof. Dr. Benedito Rodrigues da Silva Neto – Universidade Federal de Goiás  
Prof. Dr. Edson da Silva – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
Profª Drª Eleuza Rodrigues Machado – Faculdade Anhanguera de Brasília  
Profª Drª Elane Schwinden Prudêncio – Universidade Federal de Santa Catarina  
Prof. Dr. Ferlando Lima Santos – Universidade Federal do Recôncavo da Bahia  
Prof. Dr. Fernando José Guedes da Silva Júnior – Universidade Federal do Piauí  
Profª Drª Gabriela Vieira do Amaral – Universidade de Vassouras  
Prof. Dr. Gianfábio Pimentel Franco – Universidade Federal de Santa Maria  
Profª Drª Iara Lúcia Tescarollo – Universidade São Francisco  
Prof. Dr. Igor Luiz Vieira de Lima Santos – Universidade Federal de Campina Grande  
Prof. Dr. José Max Barbosa de Oliveira Junior – Universidade Federal do Oeste do Pará  
Profª Drª Magnólia de Araújo Campos – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Mylena Andréa Oliveira Torres – Universidade Ceuma  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federaci do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Paulo Inada – Universidade Estadual de Maringá  
Profª Drª Renata Mendes de Freitas – Universidade Federal de Juiz de Fora  
Profª Drª Vanessa Lima Gonçalves – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
Profª Drª Vanessa Bordin Viera – Universidade Federal de Campina Grande

### **Ciências Exatas e da Terra e Engenharias**

Prof. Dr. Adélio Alcino Sampaio Castro Machado – Universidade do Porto  
Prof. Dr. Alexandre Leite dos Santos Silva – Universidade Federal do Piauí  
Prof. Dr. Carlos Eduardo Sanches de Andrade – Universidade Federal de Goiás  
Profª Drª Carmen Lúcia Voigt – Universidade Norte do Paraná  
Prof. Dr. Eloi Rufato Junior – Universidade Tecnológica Federal do Paraná  
Prof. Dr. Fabrício Menezes Ramos – Instituto Federal do Pará  
Prof. Dr. Juliano Carlo Rufino de Freitas – Universidade Federal de Campina Grande  
Profª Drª Luciana do Nascimento Mendes – Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Marcelo Marques – Universidade Estadual de Maringá  
Profª Drª Neiva Maria de Almeida – Universidade Federal da Paraíba  
Profª Drª Natiéli Piovesan – Instituto Federal do Rio Grande do Norte  
Prof. Dr. Takeshy Tachizawa – Faculdade de Campo Limpo Paulista

### **Conselho Técnico Científico**

Prof. Me. Abrãao Carvalho Nogueira – Universidade Federal do Espírito Santo  
Prof. Me. Adalberto Zorzo – Centro Estadual de Educação Tecnológica Paula Souza  
Prof. Dr. Adaylson Wagner Sousa de Vasconcelos – Ordem dos Advogados do Brasil/Seccional Paraíba  
Prof. Me. André Flávio Gonçalves Silva – Universidade Federal do Maranhão



Profª Drª Andreza Lopes – Instituto de Pesquisa e Desenvolvimento Acadêmico  
 Profª Drª Andrezza Miguel da Silva – Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia  
 Prof. Dr. Antonio Hot Pereira de Faria – Polícia Militar de Minas Gerais  
 Profª Ma. Bianca Camargo Martins – UniCesumar  
 Profª Ma. Carolina Shimomura Nanya – Universidade Federal de São Carlos  
 Prof. Me. Carlos Antônio dos Santos – Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
 Prof. Ma. Cláudia de Araújo Marques – Faculdade de Música do Espírito Santo  
 Prof. Me. Daniel da Silva Miranda – Universidade Federal do Pará  
 Profª Ma. Dayane de Melo Barros – Universidade Federal de Pernambuco  
 Prof. Me. Douglas Santos Mezacas -Universidade Estadual de Goiás  
 Prof. Dr. Edwaldo Costa – Marinha do Brasil  
 Prof. Me. Eliel Constantino da Silva – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita  
 Profª Ma. Fabiana Coelho Couto Rocha Corrêa – Centro Universitário Estácio Juiz de Fora  
 Prof. Me. Felipe da Costa Negrão – Universidade Federal do Amazonas  
 Profª Drª Germana Ponce de Leon Ramírez – Centro Universitário Adventista de São Paulo  
 Prof. Me. Gevair Campos – Instituto Mineiro de Agropecuária  
 Prof. Me. Guilherme Renato Gomes – Universidade Norte do Paraná  
 Profª Ma. Jaqueline Oliveira Rezende – Universidade Federal de Uberlândia  
 Prof. Me. Javier Antonio Albornoz – University of Miami and Miami Dade College  
 Profª Ma. Jéssica Verger Nardeli – Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho  
 Prof. Me. José Luiz Leonardo de Araujo Pimenta – Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria Uruguay  
 Prof. Me. José Messias Ribeiro Júnior – Instituto Federal de Educação Tecnológica de Pernambuco  
 Profª Ma. Juliana Thaisa Rodrigues Pacheco – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
 Prof. Me. Leonardo Tullio – Universidade Estadual de Ponta Grossa  
 Profª Ma. Lilian Coelho de Freitas – Instituto Federal do Pará  
 Profª Ma. Liliani Aparecida Sereno Fontes de Medeiros – Consórcio CEDERJ  
 Profª Drª Lívia do Carmo Silva – Universidade Federal de Goiás  
 Prof. Me. Luis Henrique Almeida Castro – Universidade Federal da Grande Dourados  
 Prof. Dr. Luan Vinicius Bernardelli – Universidade Estadual de Maringá  
 Profª Ma. Marileila Marques Toledo – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri  
 Prof. Me. Rafael Henrique Silva – Hospital Universitário da Universidade Federal da Grande Dourados  
 Profª Ma. Renata Luciane Posaque Young Blood – UniSecal  
 Profª Ma. Solange Aparecida de Souza Monteiro – Instituto Federal de São Paulo  
 Prof. Me. Tallys Newton Fernandes de Matos – Faculdade Regional Jaguaribana  
 Prof. Dr. Welleson Feitosa Gazel – Universidade Paulista

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
(eDOC BRASIL, Belo Horizonte/MG)**

P964 Produção e controle de produtos naturais 2 [recurso eletrônico] / Organizadores Raissa Rachel Salustriano da Silva-Matos, Vanessa Reis Cardoso, Kleber Veras Cordeiro. – Ponta Grossa, PR: Atena, 2020.

Formato: PDF  
 Requisitos de sistema: Adobe Acrobat Reader  
 Modo de acesso: World Wide Web  
 Inclui bibliografia  
 ISBN 978-65-5706-000-1  
 DOI 10.22533/at.ed.001200904

1. Biodiversidade. 2. Plantas – Cultivo e manejo. I. Silva-Matos, Raissa Rachel Salustriano da. II. Cardoso, Vanessa Reis. III. Cordeiro, Kleber Veras

CDD 577.27

**Elaborado por Maurício Amormino Júnior – CRB6/2422**

Atena Editora  
Ponta Grossa – Paraná - Brasil

## APRESENTAÇÃO

A utilização de plantas como medicamento provavelmente é tão antiga quanto o surgimento do homem, pois sempre existiu uma grande preocupação com as doenças durante toda a história da humanidade. No Brasil, a cultura indígena, possui uma sabedoria tradicional, passada de geração a geração acerca das propriedades dessas plantas. Apesar de muitas plantas serem úteis para a medicina, existem algumas tóxicas ou venenosas, sendo necessário conhecer as características de cada uma. Se fazendo importante os estudos científicos, tendo em vista a grande diversidade de flora do Brasil.

O leitor irá encontrar nesta obra estudos que abordam diversas propriedades das plantas medicinais, como sua ação antioxidante, antimicrobiana, analgésica e ainda a utilização dos óleos essenciais como conservantes de alimentos. Também sua utilização na defesa contra raios UV, utilizando compostos químicos naturais de plantas.

O e-book “Produção e Controle de Produtos Naturais 2”, possui 9 artigos científicos, e ressalta a importância de dar seguimento ao conhecimento acerca das pesquisas da flora brasileira, que contribuem para o crescimento e o desenvolvimento da pesquisa, preservação da utilização das plantas, levando o leitor a uma reflexão. Desejamos uma ótima leitura!

Raissa Rachel Salustriano da Silva-Matos  
Vanessa Reis Cardoso  
Kleber Veras Cordeiro

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>1</b>
AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE COPAÍBA ( <i>Copaifera langsdorffii</i> Desf.) FRENTE AO AGENTE DA MASTITE BOVINA: <i>Staphylococcus aureus</i>	
Liandra Maria Abaker Bertipaglia	
Bruno Benhocci Santana	
Gabriel Maurício Peruca de Melo	
Käthery Brennecke	
Cátia Rezende	
Dora Inês Kozusny-Andreani	
Wanderley José de Melo	
<b>DOI 10.22533/at.ed.0012009041</b>	
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>13</b>
ANÁLISE DA AÇÃO FOTOPROTETORA DOS FLAVONOIDES	
Ana Graziela Soares Rêgo Lobão	
Mayara Ladeira Coêlho	
Lara Eunice Cândido Soares	
<b>DOI 10.22533/at.ed.0012009042</b>	
<b>CAPÍTULO 3</b> .....	<b>26</b>
AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE COPAÍBA, BURITIE TUCUMÃ PARA CONTROLAR <i>Staphylococcus aureus</i>	
Liandra Maria Abaker Bertipaglia	
Aline Alves Rezende	
Gabriel Maurício Peruca de Melo	
Wanderley José de Melo	
<b>DOI 10.22533/at.ed.0012009043</b>	
<b>CAPÍTULO 4</b> .....	<b>39</b>
CARACTERIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO ADEQUADA DE PRODUTOS FITOTERÁPICOS: UMA REVISÃO DE LITERATURA	
Dayane de Melo Barros	
Marcela de Albuquerque Melo	
Tamiris Alves Rocha	
Sandrelli Meridiana de Fátima Ramos dos Santos Medeiros	
Gerliny Bezerra de Oliveira	
Marllyn Marques da Silva	
José Hélio Luna da Silva	
Andreza Roberta de França Leite	
Silvio Assis de Oliveira Ferreira	
Jaciane Maria Soares dos Santos	
Iago Dillion Lima Cavalcanti	
Maurilia Palmeira da Costa	
José Cleberson Santos Soares	
Daniel Charles dos Santos Macêdo	
Maurianny Palmeira da Costa	
Marcelino Alberto Diniz	
Danielle Feijó de Moura	
<b>DOI 10.22533/at.ed.0012009044</b>	

<b>CAPÍTULO 5 .....</b>	<b>47</b>
QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIÚLCERA E ANTIMICROBIANA: <i>Machaerium eriocarpum</i> BENTH	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Miriam Sannomiya</li> <li>João Victor Joaquim Ruy</li> <li>Luciana Sayuri Tahira</li> <li>Charlyana Carvalho Bento</li> <li>Marcelo Marucci Pereira Tangerina</li> <li>Ângela Lúcia Bagnatori Sartori</li> <li>Taís Maria Bauab</li> <li>Clélia Akiko Hiruma-Lima</li> <li>Wagner Vilegas</li> </ul>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.0012009045</b>	
<b>CAPÍTULO 6 .....</b>	<b>58</b>
EFFECT OF FROZEN STORAGE ON THE COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS FROM ARAÇÁ, MAROLO AND MIXED PULPS	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Ruver Rodrigues Feitosa Ramalho</li> <li>Clarissa Damiani</li> <li>Suzana da Costa Santos</li> <li>Pedro Henrique Ferri</li> </ul>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.0012009046</b>	
<b>CAPÍTULO 7 .....</b>	<b>72</b>
ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DO EXTRATO AQUOSO <i>HIBISCUS SABDARIFFA</i> (MALVACEAE)	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Davi Vicente dos Santos (autor)</li> <li>Marcia Maria Dourado Maranhão</li> <li>Naomi Kato Simas</li> <li>Taiane Borges Machado Silva</li> <li>Gláucio Diré Feliciano</li> <li>Alaíde de Sá Barreto</li> </ul>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.0012009047</b>	
<b>CAPÍTULO 8 .....</b>	<b>84</b>
ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA MISTURA DE $\alpha$ - E $\beta$ -AMIRINAS: BIOMARCADORES PARA A PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO DE FOLHAS DE <i>CHROMOLAENA ODORATA</i>	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Temistocles Barroso de Oliveira</li> <li>Lucas Gomes Bezerra</li> <li>Simone Sacramento Valverde</li> </ul>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.0012009048</b>	
<b>CAPÍTULO 9 .....</b>	<b>93</b>
ÓLEO ESSENCIAL DE COPAÍBA ( <i>COPAIFERA LANGSDORFFII</i> DESF.) NO TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA	
<ul style="list-style-type: none"> <li>Liandra Maria Abaker Bertipaglia</li> <li>Josiane Clarindo de Freitas</li> <li>Gabriel Maurício Peruca de Melo</li> <li>Vando Edesio Soares</li> <li>Wanderley José de Melo</li> </ul>	
<b>DOI 10.22533/at.ed.0012009049</b>	



**SOBRE OS ORGANIZADORES..... 111**

**ÍNDICE REMISSIVO ..... 112**

## AÇÃO ANTIMICROBIANA DO ÓLEO DE COPAÍBA (*Copaifera langsdorffii* Desf.) FRENTE AO AGENTE DA MASTITE BOVINA: *Staphylococcus aureus*

Data de aceite: 26/03/2020

Data de submissão: 01/03/2020

### **Liandra Maria Abaker Bertipaglia**

(Universidade Brasil, UB, Descalvado-SP) <http://lattes.cnpq.br/6395901509400650>)

### **Bruno Benhocci Santana**

(Universidade Brasil, UB, Descalvado-SP, Centro Universitário de Votuporanga, UNIFEV, Votuporanga -SP) <http://lattes.cnpq.br/0996528680870181>

### **Gabriel Maurício Peruca de Melo**

(Universidade Brasil, UB, Descalvado-SP) <http://lattes.cnpq.br/7523098767637138>

### **Käthery Brennecke**

(Universidade Brasil, UB, Descalvado-SP) <http://lattes.cnpq.br/5772754247707035>

### **Cátia Rezende**

(Centro Universitário de Votuporanga, UNIFEV, Votuporanga-SP) <http://lattes.cnpq.br/7250268568766512>

### **Dora Inês Kozusny-Andreani**

(Universidade Brasil, UB, Descalvado-SP) <http://lattes.cnpq.br/1260217332585007>

### **Wanderley José de Melo**

(Universidade Estadual Paulista, FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP e Universidade Brasil, UB, Descalvado-SP). Pesquisador Sênior CNPq, <http://lattes.cnpq.br/9360208572775742>

como forma de terapia alternativa aos medicamentos sintéticos é cada vez mais estudada e difundida em vários sistemas produtivos. Na pecuária leiteira, o uso indiscriminado de antibacterianos no tratamento de enfermidades, principalmente da mastite, tem levado ao aumento da resistência de muitos microrganismos patogênicos aos principais fármacos disponíveis no mercado. Somando-se a este fato, o incumprimento do período de carência destes fármacos tem promovido o aumento de resíduo destes no leite produzido e disponibilizado ao consumidor, o que configura problema de saúde pública. Diante disso, objetivou-se, no presente trabalho, avaliar a ação antimicrobiana do óleo de copaíba sobre *Staphylococcus aureus*, isolado do leite de vacas positivas para a presença do microrganismo alvo. A hipótese da pesquisa é que, diluído ou na máxima concentração, o óleo de copaíba pode ser capaz de inibir o desenvolvimento do agente causador da mastite. A atividade antibacteriana foi determinada pelo teste de disco-difusão, utilizando-se o óleo de copaíba nas concentrações de 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39% e 0,19%. Verificou-se que o óleo de copaíba apresentou atividade antimicrobiana nas concentrações de 100% a 3,12%, sendo que o aumento da concentração de óleo provocou um aumento no halo de inibição. Conclui-se que o poder de

**RESUMO:** A utilização de plantas medicinais

inibição de desenvolvimento bacteriano do óleo de copaíba sobre o *Staphylococcus aureus*, causador da mastite subclínica em vacas leiteiras, existe e é dependente da diluição.

**PALAVRAS-CHAVE:** fitoterápico, leite, disco-difusão, óleo medicinal, terapia alternativa.

### *COPAIBA OIL (Copaifera langsdorffii DESF.) ANTIMICROBIAL ACTION AGAINST BOVINE MASTITIS AGENT: Staphylococcus aureus*

**ABSTRACT:** The use of medicinal plants is increasingly studied as a form of alternative therapy to synthetic drugs. In dairy cattle, today, the indiscriminate use of antibacterial in treatment, mainly mastitis is a reality. In addition, was observed residue of these drugs on milk that was available for human consumption, which constitutes a public health problem. The objective of this work was to evaluate the minimum inhibitory concentration of copaiba oil on *Staphylococcus aureus* isolated from the milk of dairy cows positive for these microorganism. The hypothesis was, diluted or at maximum concentration, copaiba oil may be able to inhibit the development of the agent causing mastitis. The antibacterial activity was determined by disk diffusion test, using copaiba oil at concentrations of 100%, 50%, 25%, 12.5%, 6.25%, 3.12%, 1.56%, 0.78%, 0.39% and 0.19%. It was found that the copaiba oil showed antimicrobial activity at concentrations ranging 100% to 3.12%, and the increase in oil concentration increasing the inhibition halo. Conclude that the power bacterial inhibition of copaiba oil on *Staphylococcus aureus*, which causes subclinical mastitis in dairy cows, exists and is dependent on the dilution.

**KEYWORDS:** alternative therapy, disk diffusion test, medicinal oil, milk, phytotherapeutic.

## 1 | INTRODUÇÃO

Atualmente, aproximadamente 820 milhões de toneladas de leite são produzidas por ano no mundo. No Brasil, entre 2005 e 2016, houve crescimento de 138% nas vendas de leite UHT e 509% de queijos (EMBRAPA, 2019)

A mastite bovina é a inflamação sob os tecidos devido ao dano fisiológico, à irritação química ou à infecção, considerada prevalente e onerosa à indústria leiteira. A patologia pode ser classificada em clínica e subclínica, com presença de sintomas inflamatórios e ausência dos mesmos, respectivamente. O *Staphylococcus aureus* é considerado, mundialmente, como o principal agente etiológico da mastite infecciosa e pode expressar genes de resistência antimicrobiana dificultando o controle da mesma; contribuindo na diminuição da produção de leite, na alteração da composição e na baixa qualidade (FONSECA e SANTOS, 2000; ZECCONI e HAHN, 2000; GOMES e HENRIQUES, 2015; LANGE et al., 2017; BIANCHI et al., 2019; CRUZADO-BRAVO et al., 2019; PUMIPUNTU, 2019; ASHRAF E IMRAN, 2020; MONISTERO et al., 2020).

Além do impacto econômico à pecuária leiteira, a presença da mastite bovina infecciosa coloca em risco à população consumidora de leite e derivados lácteos contaminados com patógenos humanos. No Brasil, são comuns casos de doenças veiculadas ao leite contaminado, sendo de importância à Saúde Pública.(LANGONI 2013, CALEFFE e LANGONI, 2015, BAGGIO e MONTANHINI, 2017). Para Jamas et al. (2018), a qualidade do leite é amplamente estudada e caracteriza-se por ser multifatorial, com a dependência de fatores intrínsecos e extrínsecos ao animal.

Na alopatia, antimicrobianos são as principais substâncias empregadas para tratar a mastite e, associado ao fato do uso indiscriminado, a resistência dos microrganismos é crescente. Portanto, o emprego isolado ou associado de plantas medicinais no tratamento de doenças pode ser estratégico e, também, para melhorar os resultados clínicos na prática (BEZERRA et al., 2009; DANTAS et al, 2010; GOMES e HENRIQUES, 2015).

Cada vez mais as plantas medicinais têm se destacado no tratamento da saúde, especialmente, para as populações mais carentes e seus rebanhos. O uso de determinadas espécies vegetais com propriedades antimicrobianas tem crescido, principalmente, devido aos grandes problemas associados aos antibióticos, como as reações de hipersensibilidade e a resistência microbiana. Assim, a utilização das plantas medicinais, é cada vez mais estudada como forma de terapia alternativa aos medicamentos sintéticos(LIMA, 2001; HÄNSEL et al., 2002; HEYMAN et al., 2009). Diversos estudos com plantas medicinais demonstraram atividades antimicrobianas contra *Staphylococcus aureus* (CUTRO et al., 2019; OKWU et al.; 2019; SALEHA et al., 2019; MANILAL et al., 2020).

Estudos farmacológicos utilizando o óleo de copaíba mostram que o seu uso vem demonstrando grande atividade anti-inflamatória, cicatrizante, antitumoral e bactericida (MACIEL et al., 2002). A atividade antimicrobiana do óleo de copaíba, na forma de oleorresina e essencial foram verificadas sobre 55 microrganismos isolados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite subclínica. Observou-se que a oleorresina apresentou boa atividade antimicrobiana em amostras com *Staphylococcus coagulase positivo*, *Staphylococcus coagulase negativo*, *Streptococcus* do grupo C, F, G e *Corynebacterium* spp. Os autores concluíram que frente às bactérias isoladas, a oleorresina apresentou melhor atividade antimicrobiana do que o óleo essencial de *Copaifera* spp. (SOARES et al., 2003). Sendo assim pode-se ressaltar o potencial que o óleo de copaíba apresenta em atividades antimicrobianas significativas para homens e animais (PACKER e LUZ, 2017).

Neste contexto, o trabalho objetivou determinar o efeito da concentração do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) na inibição do desenvolvimento do *Staphylococcus aureus*, importante agente causador da mastite subclínica em bovinos leiteiros em âmbito nacional.



## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Utilizaram-se 50 vacas leiteiras lactantes, para a detecção da mastite subclínica e coleta de amostras de leite, para o isolamento do *Staphylococcus aureus*. Na coleta das amostras do leite, os tetos foram higienizados através de imersão em solução antisséptica de álcool iodado (5%), decorridos 30 segundos, o excesso de antisséptico foi removido com álcool 70% e seco com papel toalha. Após a higienização seguiu-se o teste da caneca telada e o California Mastitis Test (CMT) (SCHALM e NOORLANDER, 1957) para a detecção da mastite. Dentre as 50 vacas, 10 foram consideradas casos positivos para mastite subclínica e utilizadas na amostragem.

Coletaram-se 10 mL de leite dos tetos positivos ao CMT, em frascos estéreis de 25 mL, abertos apenas no momento da coleta e fechados em seguida. As amostras foram levadas sob refrigeração em caixa isotérmica ao laboratório para realização dos testes microbiológicos.

Na análise de identificação e caracterização do *Staphylococcus*, 25mL da amostra foram homogeneizados em 225 mL de solução salina peptonada 0,1% (diluição 1/10). A partir desta diluição inicial, foram preparadas mais duas diluições decimais ( $10^{-2}$  e  $10^{-3}$ ), utilizando-se o mesmo diluente.

Na identificação do *Staphylococcus* foi utilizada a metodologia descrita por Lancette e Bennett (2001), onde placas de Petri contendo ágar Baird-Parker (BP) suplementado com telurito de potássio e solução de gema de ovo receberam as amostras adequadamente homogeneizadas e diluídas. A partir de cada diluição, um volume de 0,1mL foi colocado sobre o ágar e espalhada com auxílio de uma alça de Drigalski. Em seguida, as placas foram incubadas a 35°C por 24 horas. Após a incubação, foi realizada a contagem das colônias características, que apresentaram cor negra e halo. Destas, até três colônias foram repassadas para tubos com caldo BHI e incubadas por 24 horas a 35°C para continuação dos testes bioquímicos e confirmação da espécie *Staphylococcus aureus* (catalase, coagulase, DNase, manitol e coloração de Gram).

Após análise macroscópica foi realizada a bacterioscopia utilizando a coloração de Gram para confirmar as características morfotintoriais e se em caso de suspeita de *Staphylococcus aureus*, a identificação ocorreu por provas bioquímicas (Figura 1).

Com uma alça bacteriológica foram coletadas as colônias suspeitas para *Staphylococcus* ssp e dispersadas em uma lâmina de vidro, colocou-se sobre o esfregaço uma gota de peróxido de hidrogênio a 3% onde se observou a formação de bolhas (Teste da catalase), confirmando a positividade para *Staphylococcus* sp.(ANVISA, 2004).

Após o teste da catalase em lâminas, foram feitas provas da coagulase em tubos. Depositou-se 0,1 mL de caldo BHI, onde havia amostras de colônias suspeitas para *Staphylococcus* em um tubo de ensaio contendo 0,5 mL de plasma humano e incubou-

se por 12 horas a 35°C em banho-maria. Após análise, observou-se formação de coágulo, sendo um indicativo para positividade do *Staphylococcus aureus* (ANVISA, 2008).

O teste de DNase foi usado para detectar a degradação do ácido desoxirribonucleico (DNA), contido no meio de cultura, isto ocorre apenas por bactérias que possuem uma enzima extracelular, a desoxirribonuclease, responsável por esta reação. Ao meio DNase foi adicionado azul de ortotoluidina na concentração de 0,1%; inoculou-se amostras de caldo BHI contendo colônias suspeitas de *Staphylococcus* e incubou-se as placas a 35°C por 24 horas. Após a incubação observou-se a formação de um halo transparente, identificando a presença de *Staphylococcus aureus* (BAIRD-PARKER, 1962).

A confirmação do agente causador isolado foi realizada pelo teste de crescimento em ágar sal manitol, visto que o *Staphylococcus aureus* tem a capacidade de fermentar o MSA (Teste do crescimento em ágar sal manitol) em meio contendo 7,5% de cloreto de sódio, produzindo assim colônias grandes e rodeadas de uma zona amarela. Estafilococos patogênicos, como *S. aureus*, crescem bem em ambiente rico em sal, virando o MSA para o amarelo mediante liberação de ácido (BAIRD-PARKER, 1962). Após a incubação por 24 horas a 35°C, observou-se a positividade para bactéria do gênero *Staphylococcus aureus*. (Figura 2).

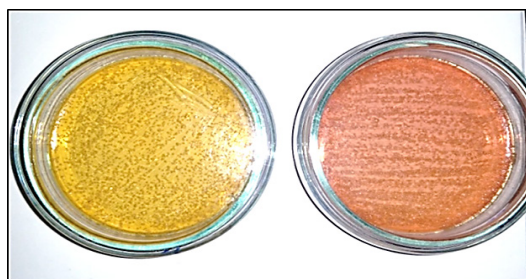


Figura 2: A formação de halo amarelo ao redor das colônias indica presença do *S. aureus*, devido à capacidade de fermentar o manitol contendo 7,5% de cloreto de sódio.

Fonte: Santana (2019)

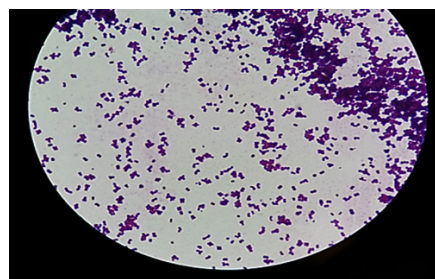


Figura 1: Resultado do teste de coloração de Gram (coloração roxa/azulada), com a presença de colônias de bactérias Gram positivas dispostos em grupos em forma de “cachos de uvas”, visto ao microscópio (100x).

Fonte: Santana (2019)

Após análise de todas as provas bioquímicas e confirmação do agente causador da mastite bovina (colônia positiva para *Staphylococcus aureus*), procedeu-se o teste de Disco-difusão para análise do potencial antimicrobiano do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.).

Dada a confirmação microbiológica para bactérias *Staphylococcus aureus*, retiradas das amostras de leite, utilizou-se a cepa da bactéria em questão e aplicou-se a técnica de disco-difusão em ágar Mueller-Hinton (OSTROSKY et al., 2008) para avaliar a atividade antimicrobiana do óleo extraído da copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.).

O teste disco-difusão foi realizado em Agar Mueller-Hinton, com alíquotas de 10 $\mu$ L do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) puro e de suas diluições consecutivas (1+1) utilizando como diluente dimetilsulfóxido (DMSO), obtendo as concentrações de 100%, 50%, 25%, 12,5%, 6,25%, 3,12%, 1,56%, 0,78%, 0,39% e 0,19% do óleo (volume/volume). O preparo dos discos de papel absorvente seguiu a técnica descrita pela Farmacopeia Brasileira (1988), na qual utilizou-se discos de papeis secos e estéreis, medindo 11mm de diâmetro.

As diferentes concentrações preparadas com óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) foram impregnadas nos disco por saturação em ágar Mueller-Hinton (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1988) fundido com a cepa de *Staphylococcus aureus*. Os discos foram colocados nas placas, manualmente com o auxílio de pinças estéreis e incubadas à 35°C por 24 horas. Para cada diluição foram utilizadas 10 placas e em cada placa dois discos saturados totalizando 20 leituras de halo para cada diluição. Como controle positivo utilizou-se o antibiótico cloranfenicol (CLO), 10 $\mu$ g/disco. Após o tempo de incubação os diâmetros dos halos foram medidos com um paquímetro, sendo considerados suscetíveis, os halos com diâmetro igual ou acima de 10 mm.

Os dados foram analisados em um delineamento inteiramente casualizado composto por 8 tratamentos (7 concentrações de óleo de copaíba e um tratamento controle com cloranfenicol) os tratamentos 0,78%, 0,39% e 0,19% foram suprimidos da análise estatística por não promoverem a formação de halo, ou seja, não apresentaram atividade inibitória no crescimento do *Staphylococcus aureus*. Os dados foram analisados inicialmente com relação à distribuição normal dos erros, sendo os dados outlier retirados e à homogeneidade de variâncias. Como as variâncias foram heterogêneas os dados foram transformados em  $\sqrt{X}$ , procedendo-se à análise de variância (ANOVA) e a comparação de médias entre os tratamentos comparadas pelo teste de Tukey, com  $p < 0,05$ .

Como houve efeito de tratamento, os resultados obtidos foram submetidos à análise de regressão linear entre diâmetro do halo e a concentração de óleo de copaíba sendo as concentrações de 0,78%, 0,39% e 0,19%, do óleo de copaíba excluídas do modelo.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A aplicação do óleo de copaíba nos discos promoveu inibição do crescimento microbiano, uma vez que foi verificada diferença significativa ( $P < 0,05$ ) entre as médias dos diâmetros dos halos observados para bactéria avaliada (Tabela 1). De acordo com os resultados, quanto maior a concentração do óleo aplicado, maior foi o halo de inibição obtido, com diferença significativa entre eles. Deve ser ressaltado que nas diluições de 0,78%, 0,39% e 0,19% do óleo não houve inibição do crescimento bacteriano (sem formação aparente do halo).

O cloranfenicol, utilizado como controle positivo no teste de disco-difusão é um

antibiótico da classe dos anfenicóis, com propriedade bacteriostática, interfere na síntese proteica bacteriana e apresentou maior halo de inibição do crescimento do *S. aureus*, comparado às demais concentrações avaliadas ( $P < 0,05$ ).

Tratamentos	Diâmetro do halo de inibição (mm) e desvio padrão
Cloranfenicol *	25,99 ( $\pm 0,0243$ ) A
100%	14,55 ( $\pm 0,0114$ ) B
50%	12,32 ( $\pm 0,0117$ ) C
25%	10,36 ( $\pm 0,0150$ ) D
12,5%	9,21 ( $\pm 0,0095$ ) E
6,25%	8,71 ( $\pm 0,0105$ ) F
3,12%	7,01 ( $\pm 0,0111$ ) G
1,56%	6,06 ( $\pm 0,0445$ ) H

Tabela 1: Atividade antimicrobiana pelo método de difusão de placas do óleo de copaíba sobre o *Staphylococcus aureus* em função das concentrações avaliadas.

Médias seguidas pela mesma letra na coluna diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p < 0,05$ )

\*10 ug/disco (antimicrobiano sintético, controle positivo)

Considerando-se a classificação da ação de extratos e o conseqüente tamanho dos halos, proposta por Alves et al., (2000), considera-se como inativo aquele que produz um halo menor que 9 mm; 9 a 12 mm indicam extratos ativos, e aqueles halos de 13 a 18 mm, ou maiores, correspondem a extratos muito ativos. Desta forma o óleo de copaíba pode ser considerado muito ativo frente à inibição do crescimento microbiano na sua forma pura ou 100%.

Resultado de atividade antimicrobiana semelhante a este estudo foi demonstrado, sendo que à concentração de 25% do óleo de copaíba em dimetilsulfoxido (DMSO) foi observado halo com inibição de crescimento bacteriano em meio de cultura Mueller-Hinton em teste de difusão em discos, com média de 10mm para o mesmo patógeno (MENDONÇA e ONOFRE, 2009). De acordo com os autores, foi possível verificar que o halo de inibição foi de 13mm com o uso do óleo puro (100%), diminuindo para 11, 10, 9, 7 e 7mm, nas concentrações de 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,12%, respectivamente.

Foram observados resultados negativos quando o óleo de copaíba foi pesquisado quanto a sua ação antimicrobiana frente aos microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. No estudo, utilizaram metodologia diferente a utilizada neste trabalho, em ágar com orifício e observaram o crescimento dos microrganismos avaliados (PACKER e LUZ, 2007).

Em outro trabalho de pesquisa, foi demonstrado que o oleorresina obtido de *Copaifera langsdorffii* apresenta atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas (GILBERT et al., 2002).

De acordo com estudos antimicrobianos in vitro que utilizaram o óleo de copaíba



no combate as bactérias (MASSON et al., 2013), mostraram atividades antimicrobianas com o óleo de copaíba sobre os microrganismos orais *S. mutans*, *S. salivarius*, *S. pyogenese*, *E. faecalis*. Os halos de inibição foram maiores que os obtidos com o controle positivo a clorexidina, confirmando a ação inibitória microbiana.

Segundo autores (ARFA et al., 2006; BURT, 2004; ULTEE et al., 2002; XU et al., 2008) a atividade antimicrobiana pode ser devido ao efeito do óleo sobre a membrana citoplasmática, especialmente, às proteínas da membrana; alteração no transporte ativo em nível de membrana, interrompendo a força motriz de prótons e do fluxo de elétrons, e, também, pela coagulação dos conteúdos celulares. Pesquisa sobre a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba brasileiro obtido de diferentes espécies do gênero *Copaifera* (*Copaifera martii*, *Copaifera officinalis* e *Copaifera reticulata*) identificou, sob a análise de microscopia eletrônica, que o microrganismo *S. Aureus* tratado com o óleo de copaíba apresentou danos e rompimento da membrana da célula, resultando em alterações morfológicas, liberação de componentes citoplasmáticos e redução no volume celular (SANTOS et al., 2008).

A atividade antimicrobiana do óleo de copaíba de acordo com Leandro et al. (2012) não pode ser atribuída a um único componente, pois as características farmacológicas podem ser atribuídas aos diferentes compostos, que de forma sinérgica atuam na atividade antimicrobiana. O  $\beta$ -cariofileno, que é um dos principais constituintes bioativos encontrados no óleo-resina de copaíba é um sesquiterpeno cuja composição perfaz 99,47% dos componentes do óleo e apresenta propriedades medicinais (anti-inflamatórias e antifúngicas) (GALÚCIO et al., 2016).

No presente estudo foi possível observar, também, pela análise de regressão com modelo quadrático, relação entre os níveis crescentes do óleo de Copaíba e o tamanho do halo representativo da inibição do crescimento do *Staphylococcus aureus* ( $Y = 6,777 + 0,1618x - 0,000849x^2$ ), cujo modelo explica 95,37%. Neste caso, quanto maior a concentração do óleo aplicado, maior foi o halo de inibição formado para a inibição do crescimento, até atingir o ponto de inflexão, que foi para 100% do óleo para *S. aureus*. Portanto, é possível estimar a concentração mais eficiente contra a bactéria avaliada (Figura 3).

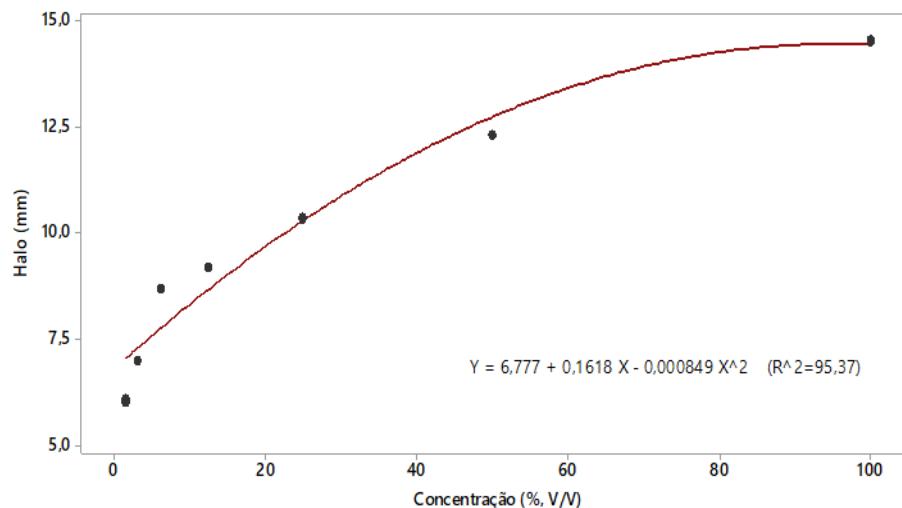


Figura 3: Halos de inibição antimicrobiana (mm) em função das diluições do óleo de copaíba.

De acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, existe a possibilidade de tratamento de infecções subclínicas por *S. aureus* com o óleo de Copaíba e esta deve ser avaliada, inclusive *in vivo*, como uma alternativa aos antibióticos para o tratamento da mastite, garantindo assim, que não ocorram complicações infecciosas em virtude do crescimento ou proliferação microbiana, e o agravamento do quadro da doença, gerando a diminuição na produção leiteira dos animais.

#### 4 | CONCLUSÕES

Verificou-se que o óleo de Copaíba apresenta efeito inibidor de crescimento quando testado *in vitro*, frente ao *Staphylococcus aureus*. Constata-se, através desse estudo, a correlação na diminuição do halo de inibição antimicrobiano com o aumento da diluição do extrato, necessitando de ensaios biológicos *in vivo* para que no futuro possa ser uma alternativa terapêutica no controle de mastite bovina.

#### REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Detecção e Identificação de Bactérias de Importância Médica**. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod\\_5\\_2004.pdf](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/microbiologia/mod_5_2004.pdf). Acessado em: 22 abr. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Serviços de saúde**. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede\\_rm/cursos/boas\\_praticas/modulo4/id\\_sta2.htm](http://www.anvisa.gov.br/servicosaude/controle/rede_rm/cursos/boas_praticas/modulo4/id_sta2.htm). Acessado em: 22 abr. 2018.

ALVES, T.M.A. et al. Biological screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.95, n.3, p. 367-73, 2000.

ARFA, A.B.; COMBES, S.; PREZIOSI-BELLOY, L. GONTARD, N.; CHALIER, P. Antimicrobial activity of carvacrol related to its chemical structure. **Letters in Applied Microbiology**, v.43, n.2, p.149-154, 2006.

ASHRAF, A.; IMRAN, M. Causes, types, etiological agents, prevalence, diagnosis, treatment,

prevention, effects on human health and future aspects of bovine mastitis. **Animal Health Research Reviews**, p.1–14, 2020.

BAGGIO, A.P.; MONTANHINI, M.T.M. Qualidade de leite cru produzido na região do Norte Pioneiro do Paraná. **Revista brasileira de higiene e sanidade animal**, v.11, n.2, p. 184 –189, 2017.

BAIRD-PARKER, A.C. Animal proved diagnostic and selective medium for isolating coagulase-positive staphylococci. **Journal of Applied Microbiology**, v.25, p.12-19, 1962.

BEZERRA, D.A.C.; PEREIRA, A.V.; LÔBOKMS.et al. Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n.4, p. 814-817, 2009.

BIANCHI, R.M.; SCHWETZ, C.I.; CECCO, B.S.; PANZIERA, W.; DE LORENZO, C.; HECK L.C.; et al. Pathological and microbiological characterization of mastitis in dairy cows. **Tropical Animal Health and Production**. 2019. <https://doi.org/10.1007/s11250-019-01907-0>

BURT, S. Essential oils: their antimicrobial properties and potential applications in foods – a review. **International Journal of Food Microbiology**, v.94, n.3, p. 223-253, 2004.

CALLEFE, J.L.R.; LANGONI, H. Qualidade do leite: uma meta a ser atingida. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.2, n.22, p.151-161, 2015.

CRUZADO-BRAVO, M.L.M.; SILVA, N.C.C.; RODRIGUES, M.X.; SILVA, G.O.; PORTO, E.; STURION G.L. Phenotypic and genotypic characterization of *Staphylococcus* spp. isolated from mastitis milk and cheese processing: Study of adherence and biofilm formation. **Food Research International**, v.122, p.450-460, 2019.

CUTRO, A.C.; CASTELLI, M.V.; LOPEZ, S.N.; ROSALES, M.A.; HOLLMAN, A.; RODRIGUEZ, S.A. Chemical composition of *Schinus areira* essential oil and antimicrobial action against *Staphylococcus aureus*. **Natural Product Research**, p.1-6, 2019.

DANTAS, S.A.F; SENA, L.V.T.; MELO, D.J.A. et al. Avaliação de plantas medicinais no combate a mastite bovina. **Holos**, v.4, p. 96-101, 2010.

EMBRAPA. Anuário do leite 2019. [www.embrapa.br](http://www.embrapa.br). acessado em 22/02/2020.  
FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4ed. São Paulo: Atheneu, 1988.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M,V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. 1ª ed. São Paulo: Lemos, 2000. 314p.

GALÚCIO, A.C.S.; BENITES, A.C.I; RODRIGUES, R.A.F.; MACIEL, A.M.R.W. Recuperação de sesquiterpenos do óleo-resina de copaíba a partir da destilação molecular. **Química Nova**, v. 39, n.7, p.795-800, 2016.

GILBERT, B.; ALVES, L.; FERREIRA, J.L. A base científica da fitoterapia. **Certification and Accreditation (C.&A.)**, v.25, p.129-135, 2002.

GOMES, F.; HENRIQUES, M. Control of Bovine Mastitis: Old and Recente Therapeutic Approaches. **Curr Microbiol**. 2015.

HÄNSEL, R.; TYLER, V.E.; SCHULZ, V. **Fitoterapia racional: um guia de fitoterapia para as ciências da saúde**. Barueri, SP: Manole, 2002. 386 p.

HEYMAN, H.M.; HUSSEN, A.A.; MEYER, J.J.M.; LALL N. Antibacterial activity of south African medicinal plants methicillin resistant *Staphylococcus aureus*. **Pharmaceutical Biology**, v.47, n.1,

p.67-71, 2009.

JAMAS, L.T.; SALINA, A.; ROSSI, R.; MENOZZI, B. D.; LANGONI, H. Parâmetros de qualidade do leite bovino em propriedades de agricultura familiar. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.38, n.4, p.573-578, 2018.

JOHN, G.; HOLT, PETER H.; SNEATH, NOEL R. KRIEG, **Bergey's manual of determinative bacteriology**. 9 ed. Baltimore: Williams & Wilkins, 1994. 787 p.

LANCETTE, G.A.; BENNETT, R.W. **Staphylococcus aureus and Staphylococcal Enterotoxins**. In: Downes F. P; Ito, K. (Eds). Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods. Washington: Apha, 2001. p. 387-403.

LANGE, M.J.; ZAMBOM, M.A.; POZZA, M.S.S. Tipologia de manejo de ordenha: análise de fatores de risco para a mastite subclínica. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.37, n.11, p.1205-1212, 2017.

LANGONI, H. Qualidade do leite: utopia sem um programa sério de monitoramento da ocorrência de mastite bovina. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.33, n.5, p.620-626, 2013.

LEANDRO, L.M.; VARGAS, F.S.; BARBOSA, P.C.S.; NEVES, J.K.O.; SILVA, J.Á., VEIGA JUNIOR, V.F. Chemistry and biological activities of Terpenoids from Copaiba (*Copaifera* spp.) **Oleorensis. Molecules**, v.17, p.3866-3889, 2012.

LIMA, E.O. **Plantas e suas propriedades antimicrobianas: uma breve análise histórica**. In: Yues, R.; Calixto, J.B. (Ed.). Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna. Chapecó: Argos, 2001. p. 481-501.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIOR, V.F. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MANILAL, A.; KUZHUNELLIL, R.S.; SHEWANGIZAW, M.; AKLILU, A.; SEID, M.; MERDIKIOS B.; et al. In vitro antibacterial activity of medicinal plants against biofilm-forming methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*: efficacy of *Moringa stenopetala* and *Rosmarinus officinalis* extracts. **Heliyon**, v.6, e03303, 2020.

MASSON, D.S.; SALVADOR, S.L.; POLIZELLO, A.C.M. et al. Antimicrobial activity of copaiba (*Copaifera langsdorffii*) oleoresin on bacteria of clinical significance in cutaneous wounds. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.15, n.4, p.664-669, 2013.

MENDONÇA, D.E.; ONOFRE, S.B. Atividade antimicrobiana do oleoresina produzido pela copaíba – *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p.577-581, 2009.

MONISTERO, V.; BARBERIO, A.; BISCARINI, F.; CREMONESI, P.; CASTIGLIONI, B.; GRABER, H.E.; et al. Different distribution of antimicrobial resistance genes and virulence profiles of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical mastitis in six countries. **Journal of Dairy Science**, vol. 103, n.4, 2020.

OKWU, M.U.; OLLEY, M.; AKPOKA, A.O.; IZEBUWA, O.E. Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and anti-MRSA activities of extracts of some medicinal plants: A brief review. **AIMS Microbiology**, v.5, 2, p.117–137, 2019.

OSTROSKY, E.A.; MIZUMOTO, M.K.; LIMA, M.E.L. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CMI) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.2, p.301-307, 2008.

PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem natural. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.102-107, 2007.

- PUMIPUNTU, N. *Staphylococcus argenteus*: An emerging subclinical bovine mastitis pathogen in Thailand. **Veterinary World**, v.12(12), p. 1940-1944, 2019.
- SALEHA, A.; NETZEL, M.E.; TINGGI, U.; OSBORNE, S.A.; FLETCHER, M.T.; SULTANBAWA, Y. Antioxidant Rich Extracts of *Terminalia ferdinandiana* Inhibit the Growth of Foodborne Bacteria. **Foods**, v.8, p.281, 2019.
- SANTANA, B.B. Ação antimicrobiana do óleo de copaíba (*Copaifera langsdorffii* Desf.) frente ao agente da mastite: *Staphylococcus aureus*. 2019. 43 p. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Ambientais). Universidade Brasil, Fernandópolis, SP. 2019.
- SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. Antimicrobial activity of brazilian copaíba oils obtained from diferente species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p.277-281, 2008.
- SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.130, 199-204, 1957.
- SOARES, J.G.; VAREÃO, M.J.C.; WOLTER FILHO, W.; MOURÃO, A.P.; CRAVEIRO, A.A.R.; ALENCAR, J.C. Estudo químico de óleos essenciais, oleaginosas e láticas da Amazônia I. Composição e oxidação do óleo de uma espécie de *Copaifera*. **Acta Amazonica**, v.9, p.65-59, 2003.
- ULTEE, A.; BENNIK, M.H.J.; MOEZELA, A.R.R. The phenolic hydroxyl group of carvacrol essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v.68, n.4, p. 1561–1568, 2002.
- XU, J.; ZHOU, F.; JI, B.P.; PEI, R.S.; XU, N. The antibacterial mechanism of carvacrol and thymol against *Escherichia coli*. **Letters in Applied Microbiology**, v.47, n.3, p.174-179, 2008.
- ZECCONI, A.; HAHN, G. *Staphylococcus aureus* in raw milk and human health risk. **Bulletin of the International Dairy Federation**, v.345, p.15-18, 2000.



## ANÁLISE DA AÇÃO FOTOPROTETORA DOS FLAVONOIDES

Data de aceite: 26/03/2020

Data da submissão: 31/12/2019

### Ana Graziela Soares Rêgo Lobão

Faculdade Facid Wyden

Teresina-PI

<http://lattes.cnpq.br/3951581360468335>

### Mayara Ladeira Coêlho

Faculdade Facid Wyden

Teresina-PI

<http://lattes.cnpq.br/5634589156742478>

### Lara Eunice Cândido Soares

Faculdade Facid Wyden

Teresina-PI

<http://lattes.cnpq.br/9428677786710895>

**RESUMO:** O artigo teve como objetivo realizar uma prospecção científica e tecnológica sobre a ação fotoprotetora dos flavonoides, e mapear tecnologias envolvendo o uso dos flavonoides como fator de fotoproteção. Foi realizado um levantamento científico nas bases de dados *PubMed* e *Scielo* e tecnológico na base de dados tecnológicas do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI), usando os termos indexadores “flavonoids” e “photoprotection” em inglês e português respectivamente. Os resultados mostram que existe interesse científico no composto químico secundário de

plantas, flavonoides, porém, foi constatado um número reduzido de patentes. Diante disto, é válido destacar que os achados estimulam o meio acadêmico e as indústrias a realizarem mais pesquisas inovadoras referentes às ações fotoprotetivas de compostos químicos secundários de plantas como estratégias de defesa contra os raios UV e no sentido de promover o desenvolvimento de novos produtos e processos com potencial mercadológico.

**PALAVRAS-CHAVE:** flavonoides, fotoproteção, radiação ultravioleta.

### ANALYSIS OF PHOTOPROTETIC ACTION OF FLAVONOIDS

**ABSTRACT:** The article aimed to conduct a scientific and technological research on the photoprotective action of flavonoids, and to map technologies related to the use of flavonoids as a photoprotection factor. A scientific survey was conducted in the *PubMed* and *Scielo* databases and the technology database of the National Institute of Industrial Property (INPI), using the index terms “flavonoids” and “photoprotection” in English and Portuguese respectively. The results show that there is scientific interest in the secondary chemical compound of flavonoids, however, a small number of patents were found. Given this, it is highlighted what is found in the stimuli or the academic environment and how to

conduct more innovative research related to photoprotective actions of secondary plant chemicals such as UV defense strategies and meaningful promotion or development of new products. and processes with market potential.

**KEYWORDS:** flavonoids, photoprotection, ultra violet reaction.

## 1 | INTRODUÇÃO

A radiação ultravioleta (UV) induz danos no DNA, estresse oxidativo e processos inflamatórios na epiderme humana, resultando em inflamação, fotoenvelhecimento e fotocarcinogênese. Ao atingir a pele desprotegida, com ação cumulativa a radiação UV provoca um processo complexo associado a reações químicas e morfológicas. Pode ocorrer formação de espécies reativas de oxigênio (ROS), alterações histoquímicas de diferentes gravidades, espessamento da camada espinhosa e retificação da junção dermoepidérmica. Diversas moléculas na pele podem absorver a radiação UV e sofrer alterações químicas devido a essa absorção. O DNA é uma das principais moléculas que absorve a radiação UV e, portanto, pode sofrer mutações que posteriormente podem resultar em transformações malignas da célula. A radiação UV pode ativar componentes do sistema imune cutâneo, gerando resposta inflamatória por distintos mecanismos, tais como: ativação direta de queratinócitos e outras células que liberam mediadores inflamatórios e redistribuição e liberação de auto antígenos sequestrados de células danificadas pela radiação UV. Embora muitos fatores genéticos e ambientais contribuam para o desenvolvimento de várias doenças de pele, o fator mais importante é a exposição crônica da pele à radiação UV. O espectro solar UV pode ser dividido em três segmentos baseados nos comprimentos de onda da radiação: onda curta (UVC; 200–290 nm), onda média (UVB; 290–320 nm) e onda longa (UVA; 320–400 nm). Cada espectro tem um limite característico de eficiência na penetração das camadas epidérmica e dérmica da pele humana.<sup>11, 15</sup>

A utilização de protetores solares é a principal abordagem cosmética contra os efeitos nocivos da radiação UV. Estudos diversos evidenciam que o uso adequado e regular de fotoprotetores reduz o número de casos de queratose actínica, carcinoma de células escamosas e atenua o desenvolvimento de novos nevos em crianças. Adicionalmente, o uso regular de fotoprotetores evita o envelhecimento precoce da pele. A proteção adequada da pele é essencial para combater os efeitos prejudiciais da radiação UV.<sup>2, 6</sup>

Atualmente tem surgido um interesse considerável no uso de plantas para proteção da pele humana contra danos induzidos por UV, uma vez que a classe de compostos químicos, flavonoides e outros compostos fenólicos têm sido considerados como uma importante classe protetora contra danos induzidos por UV e uma das tendências atuais em cosmetologia é o desenvolvimento de produtos com o maior grau possível de ingredientes naturais.<sup>6, 19</sup>

Dentre as classes de substâncias produzidas pelas plantas que possuem grande potencial aplicável ao setor industrial, destacam-se os flavonoides. O termo flavonoide compreende um grupo importante de metabólitos secundários estruturalmente diversos que vem sendo objeto de considerável interesse científico devido à sua ampla ocorrência e importância terapêutica. Os flavonoides são compostos de natureza fenólica e podem ser encontrados em espécies vegetais, principalmente em plantas vasculares. A pesquisa de flavonoides vem sendo estimulada pela diversidade estrutural que esse grupo de compostos possui que, por sua vez, proporciona um amplo espectro de atividades biológicas. Vários estudos correlacionam o teor de flavonoides com a atividade antioxidante, antimicrobiana e fotoprotetora de plantas. Além disso, também são atribuídas aos flavonoides a atividade anti-inflamatória, anti-ulcerogênica e anti-hipertensiva de diversas espécies vegetais. Atualmente, os flavonoides são frequentemente usados em cosméticos, principalmente para ações antioxidantes e calmantes.<sup>8, 10</sup>

Nesse contexto o objetivo do trabalho foi realizar uma prospecção científica e tecnológica sobre a ação fotoprotetora dos flavonoides, e mapear tecnologias nacionais envolvendo o uso dos flavonoides como fator de fotoproteção.

## 2 | MÉTODO

Primeiramente foi realizado um levantamento científico nas bases de dados Medical Literature and Retrieval System onLine (*MEDLINE/PubMed*®) e Scientific Eletronic Library Online (*SCIELO*). Foram utilizados os termos indexadores na língua inglesa “flavonoids” e “photoprotection” sendo incluídos todos os artigos originais, publicados nos últimos 10 anos, disponíveis online nas bases de dados, nos idiomas português e inglês e direcionados a seres humanos. E como critério de exclusão artigos que não responderam ao objetivo principal da pesquisa, por meio da leitura de título e resumo e artigos duplicados. Após a seleção dos artigos todos foram lidos na íntegra.

Na pesquisa tecnológica foi realizada busca na base de dados tecnológicas do Instituto Nacional de Propriedade Industrial (INPI). Os termos indexadores foram utilizados em português, sendo o INPI uma base de dados nacional, “flavonoides” e “fotoproteção” e foram utilizados os mesmos critérios de inclusão e exclusão da base de dados científica.

## 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

A Prospecção científica e a tecnológica constituem ferramentas rotineiras básicas para a fundamentação nos processos de tomada de decisão e formação de estratégias em diferentes níveis de conhecimento. Tem como propósito delinear possíveis e desejáveis ações que contribuirão de forma positiva na construção de pesquisas futuras. Além disto, são facilitadoras da propriedade intelectual, visando

melhorar a gestão da inovação ao aumentar o senso crítico e ampliar a visão dos desenvolvimentos tecnológicos.<sup>13, 18</sup>

Mediante a pesquisa dos termos indexadores nas bases de dados científicas *PubMed* e *Scielo* os artigos selecionados foram analisados na íntegra. Sendo encontrado um total de 16 artigos no *PubMed* e selecionados 12 e no *Scielo* um total de 4 artigos e selecionados os 4 para o presente estudo (Tabela 1).

ANO	AUTOR	TÍTULO DO ARTIGO
2018	MILANI L.P.G., et al	Extract from byproduct <i>Psidium guajava</i> standardized in ellagic acid: additivation of the <i>in vitro</i> photoprotective efficacy of a cosmetic formulation.
2018	KOSTYUK et al	Natural Substances for Prevention of Skin Photoaging: Screening Systems in the Development of Sunscreen and Rejuvenation Cosmetics.
2016	GRETHER-BECK S., MARINI A., JAENICKE T., KRUTMANN J.	French Maritime Pine Bark Extract (Pycnogenol®) Effects on Human Skin: Clinical and Molecular Evidence.
2015	COSTA S.C.C., et al	<i>In vitro</i> photoprotective effects of <i>Marcetia taxifolia</i> ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations
2015	ORLANDA J.F.F., et al	Phytochemical analysis and photoprotective activity of the ethanolic extract of <i>Euphorbia tirucalli</i> Linneau (Euphorbiaceae).
2015	DEUSCHLE V.C.K.N., et al	Phytochemical evaluation and <i>in vitro</i> antioxidant and photo-protective capacity of <i>Calendula officinalis</i> L. leaves
2015	BAZYLKO A, BORZYM J., PARZONKO A	Determination of <i>in vitro</i> antioxidant and UV-protecting activity of aqueous and ethanolic extracts from <i>Galinsoga parviflora</i> and <i>Galinsoga quadriradiata</i> herb.
2014	SABCHEZ A.	Protective effects of citrus and rosemary extracts on UV-induced damage in skin cell model and human volunteers.
2013	WOFLE U.	The photoprotective and antioxidative properties of luteolin are synergistically augmented by tocopherol and ubiquinone.
2013	SHIN S.W.	Antagonist effects of veratric acid against UVB-induced cell damages.
2012	HUNSDÖRFER C., STAHL W., MÜLLER T.J., DE SPIRT S.	UVA photoprotective properties of an artificial carotenylflavonoid hybrid molecule.
2011	WU et al	Chrysin protects epidermal keratinocytes from UVA- and UVB-induced damage.
2011	HEINRICH et al	Green tea polyphenols provide photoprotection, increase microcirculation, and modulate skin properties of women.
2010	KATIYAR S.K.	Green tea prevents non-melanoma skin cancer by enhancing DNA repair.
2009	NICHOLS J.A., KATIYAR S.K.	Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms.
2009	WILLIAMS S., TAMBURIC S., LALLY C.	Eating chocolate can significantly protect the skin from UV light.

Verificou-se que a atividade farmacológica dos flavonoides é relatada na literatura científica há certo período, porém, ainda são poucos os estudos que falam sobre a aplicação deste composto em formulações fotoprotetoras tópicas. Em sua maioria as publicações descrevem sobre o uso dos flavonoides em formulações fotoprotetoras via oral. Os estudos concordam que os flavonoides não apresentam atividade citotóxica e nem efeitos fototóxicos, além de demonstra grande potencial como inibidor de ROS, sendo essa à atividade biológica mais estuda em relação aos flavonoides.

Teoricamente, os metabólitos secundários das plantas podem modificar a interação pele - UV em vários pontos cruciais: (1) pela absorção de UVA + UVB; (2) por inibição de reações de radicais livres induzidas por UV em células da pele e matriz extracelular (efeitos de eliminação e quebra de cadeia antioxidante direta); (3) pela proteção de antioxidantes lipídicos da superfície da pele, como alfa-tocoferol, coenzima Q10 e esqualeno (ação antioxidante de resgate); (4) por indução de sistemas antioxidantes endógenos em queratinócitos e fibroblastos (efeitos antioxidantes indiretos); (5) pela atenuação das respostas inflamatórias nas células imunes cutâneas (queratinócitos / leucócitos / células dendríticas); (6) pela modulação de respostas excessivas ao estresse metabólicas e proliferativas induzidas por UV (efeitos anti-estresse) e (7) pela atenuação da supressão imune relacionada a UV (imunomodulação). Propriedades protetoras de metabólitos de plantas secundárias contra a luz solar de ampla faixa espectral de irradiação UV a luz visível e infravermelha são muito semelhantes para células vegetais e de mamíferos. Essa possibilidade de defesa universal é fornecida por uma estrutura química peculiar (cromóforos) que permite absorver a energia da luz solar e dissipá-la na forma de energia de luz térmica ou fluorescente / fosforescente (propriedades do filtro solar) ou convertê-la em energia para reações químicas (fotossensibilização).<sup>12</sup>

Em um estudo realizado por KOSTYUK em 2018 foi proposto um painel dos métodos *in vitro* para pré-seleção de substâncias fotoprotetoras naturais com alta fotoestabilidade e baixa fototoxicidade, capazes de absorver uma irradiação de banda larga UVA + UVB (filtro solar físico), reduzindo a superprodução relacionada à UV de radicais livres e perda de antioxidantes endógenos (proteção química) e atenuação da citotoxicidade induzida por UV e respostas imunes e metabólicas (proteção biológica) em queratinócitos epidérmicos humanos primários e culturas de queratinócitos humanos. Nesse estudo foi possível identificar várias substâncias fotoestáveis e não fototóxicas, principalmente fenilpropanóides glicosilados e flavonoides, com proteção física, química e biológica efetiva da banda larga UVA + UVB.

Na evolução temporal foi possível observar que nos últimos 10 anos houve um número reduzido de publicações científicas relacionadas ao uso dos flavonoides



e seu possível fator de fotoproteção, porém encontramos um aumento do número de publicações relacionadas às demais atividades biológicas dos flavonoides, principalmente a sua atividade antioxidante, uma atividade biológica, que é determinada pela sua estrutura química. Os flavonoides representam um grupo heterogêneo de plantas estruturalmente baseadas em uma espinha dorsal de flavonas (2-fenil1,4-benzopirona). Eles carregam pelo menos um substituinte fenólico; no entanto, o número e a posição de hidroxila ou grupos metoxi aumentam a variedade química do grupo. Flavonoides são catadores efetivos de ROS, mas a sua contribuição para a defesa antioxidante *in vivo* é um questão de debate. A atividade de eliminação de ROS *in vitro* está relacionada para o número e posição dos grupos hidroxil.<sup>9</sup>

Na utilização dos flavonoides por via oral encontramos estudos que demonstram que uma ingestão regular de compostos contendo flavonoides, apresenta grande potencial fotoprotetor. CASANOVA (2017) realizou um estudo onde foi realizada uma combinação de extratos de alecrim e bioflavonoides cítricos para inibir os efeitos nocivos da radiação UV em queratinócitos da linhagem HaCaT humanos e em voluntários humanos por ingestão oral. Foi realizada uma combinação específica de extrato de alecrim, enriquecido em polifenóis e diterpenos, e um extrato de bioflavonoide cítrico, contendo flavonoides, e utilizado para inibir os efeitos nocivos do UVB nos queratinócitos humanos. A capacidade desta combinação para diminuir a morte celular mediada por UVB, à formação de ROS e o dano ao DNA em queratinócitos humanos e a genotoxicidade induzida por raios-X em linfócitos humanos, foi avaliada. A sobrevivência de células HaCaT após a radiação UVB foi maior nos tratamentos usando a combinação de extratos do que naqueles realizados com extratos individuais, indicando potenciais efeitos sinérgicos. A combinação de extratos também diminuiu as ROS intracelulares induzidas por UVB e preveniu o dano ao DNA em células HaCaT e diminuiu as aberrações cromossômicas em linfócitos humanos irradiados com radiação X. O consumo oral diário de 250 mg da combinação por voluntários humanos revelou um aumento significativo da dose mínima de eritema após oito semanas (34%,  $p < 0,05$ ). Uma proteção mais forte foi obtida após 12 semanas (56%,  $p < 0,01$ ). A combinação de flavonoides cítricos e polifenóis de alecrim e diterpenos foi considerada como um ingrediente para a fotoproteção oral. Em princípio a fotoproteção oral é aceita, embora a cinética de tempo para se obter uma fotoproteção é mensurável, bem como a magnitude da fotoproteção que pode ser alcançada e diferir significativamente daqueles obtidos após a aplicação tópica de um protetor solar regular, uma vez que requer até 3 meses de ingestão oral e os níveis de fator de proteção solar resultantes são moderados, embora significativos.<sup>7, 17</sup>

Outro estudo, realizado por BAZYLKO (2015) foi utilizado *Galinsoga parviflora* e *Galinsoga quadriradiata* que são espécies de ervas da família *Asteraceae*, e é uma das famílias com maior número de espécies entre as Angiospermas. A composição química, atividade e uso de ambas as espécies tendem a ser semelhante e são ricas em flavonoides na sua composição química. Os extratos de espécies de *Galinsoga* são

aplicados topicamente na pele, para tratar doenças dermatológicas, como eczemas, líquenes e feridas cicatrizantes e também para tratar picadas de cobra. Oralmente eles são administrados para tratar gripes e resfriados comuns. Antioxidantes de origem natural, e compostos polifenólicos derivados de plantas, são relatados entre os fatores que protege a pele dos efeitos nocivos da radiação solar. A atividade antioxidante desses extratos foi avaliada examinando a capacidade de eliminação de radicais gerados em sistemas livres de células. Também foi investigado o efeito na geração de ROS por fibroblastos da pele humana após exposição à radiação UV. Além disso, também foi testado o potencial de citotoxicidade dos extratos e seu efeito protetor contra os danos causados pela radiação UV. No estudo, foram realizados testes que mostraram que não houve diferenças significativas na potência entre as duas espécies de *Galinsoga*. Pelo contrário, houve diferenças substanciais na atividade entre os extratos aquosos e etanólico. O extrato etanólico da erva têm atividade citotóxica e, em concentrações: variando de 12,5 a 50  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ , apresentam efeito intensificador na geração de ROS por fibroblastos após irradiação com UVB, apesar de seus efeitos serem semelhantes aos extratos aquosos após irradiação UVA. Enquanto os extratos aquosos do erva de *Galinsoga* exibiu atividade protetora nos fibroblastos. Os extratos impediram a diminuição da atividade proliferativa e o aumento da apoptose causada pela radiação UVA e UVB, e mostrou a capacidade de inibir a geração de ROS, em um maneira dependente da concentração. Na conclusão, a solução aquosa de extratos das duas espécies testadas foi eficaz como fotoprotetores.

A crisina (5,7-di-hidroxi-flavona) é um flavonoide natural que ocorre em várias plantas e alimentos, como própolis e mel, supostamente se opõe à inflamação e à carcinogênese, mas tem sido raramente aplicada no cuidado da pele. Em um estudo realizado por WU (2011) ele teve como objetivo explorar os papéis da crisina na proteção contra danos induzidos por UV em queratinócitos da linhagem HaCaT. Os resultados mostraram que a crisina pode atenuar a apoptose, a produção ROS e a expressão da ciclooxygenase 2 (COX-2) induzida por UVB e UVA. Estudos em animais revelaram que a aplicação tópica de crisina demonstrou absorção percutânea eficiente e sem irritação da pele.

Uma tendência mundial no desenvolvimento de produtos cosméticos, especialmente no mercado de fotoproteção, é o uso de ingredientes naturais incorporados em formulações inovadoras e eficientes, comprometidas com o meio ambiente. Essa tendência é reforçada pela aceitação da população e também pelos meios de comunicação admitindo que a matéria-prima proveniente de recursos naturais seja mais segura e ecologicamente aceitável do que os componentes de origem sintética, uma vez que são menos agressivos ao meio ambiente. Os flavonoides são uma classe de metabólitos que atende a esses requisitos e a demanda por extratos ativos ricos em flavonoides tornou-se um componente importante para a descoberta de novas moléculas ativas para a fotoproteção humana. Isso se deve à sua semelhança estrutural com os filtros químicos, o que a torna suscetível à absorção de radiação na

região ultravioleta. Extratos vegetais ricos em flavonoides são capazes de absorver a luz ultravioleta, geralmente dois picos máximos de absorção ultravioleta nas regiões UVB e UVA, o que resulta na possibilidade de uso desses extratos no desenvolvimento de formulações de filtros solares. Assim, uma vez comprovada a capacidade de absorver a radiação solar e sua atividade antioxidante, esses novos ingredientes podem fornecer uma fotoproteção mais ampla do que os filtros UV sintéticos, devido à sua capacidade de eliminar os radicais livres gerados na pele após a exposição solar.

5, 14

Posteriormente foi realizada busca com base nos pedidos de patentes depositados no banco de dados do Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil (INPI). A pesquisa foi realizada com os termos em português sendo o INPI uma base de dados nacionais. Utilizando os dois termos “flavonoides” e “fotoproteção” juntos, não foi gerada nenhuma patente, desta forma foi realizada a pesquisa de patentes utilizando os indexadores separados.

Primeiramente, foi avaliado o número de pedidos de patentes depositados, sendo encontrados 30 patentes usando o termo indexador “flavonoides” e selecionadas 11 patentes e usando o termo indexador “fotoproteção” foram encontradas 20 patentes e selecionadas 9 patentes, de acordo com os critérios de inclusão e exclusão descritos anteriormente (Tabela 2).

INDEXADORES	BASE DE DADOS TECNOLÓGICOS	PATENTES ENCONTRADAS	PATENTES SELECIONADAS
“Flavonoides” “Fotoproteção”	INPI	0	0
“Flavonoides”	INPI	30	11
“Fotoproteção”	INPI	20	9

Tabela 2: Número de patentes depositadas na base de dados tecnológicos INPI.

Fonte: Autoria própria (2019).

Dentro das patentes selecionadas usando o indexador “flavonoide” (tabela 3) foi encontrado tecnologias que fazem uso dos flavonoides em diversas áreas como; avaliação de atividade antimural, métodos de diagnósticos para aumentar a eficácia de tratamentos quimioterapêuticos, no tratamento de lesões por isquemia e reperfusão, no tratamento de doenças causadas por apoptose celular e/ou necrose celular, no tratamento de artrite reumatóide e osteoartrite, em composições adjuvantes capazes de modular a resposta imune em um indivíduo, incluindo aprimorar ou suprimir a resposta imune e para aumentar a biodisponibilidade de outros compostos químicos. Observou-se a utilização de sinergias entre duas ou mais plantas como também o uso de flavonoides sintéticos.

ANO DO DEPOSITO DE PATENTE	TITULO	IPC
2017	PROCESSO PARA OBTENÇÃO DE FLAVONOÍDES DE SOLANUM PALUDOSUM COM ATIVIDADES NA ENZIMA TOPOISOMERASE II-ALFA HUMANO E EM GLIOBLASTOMA HUMANO (ANTITUMORAL).	A61K 36/81
2016	UTILIZAÇÃO DE FLAVONOÍDES E/OU XANTONÓIDES DO CAPIM DOURADO (SYBGONANTHUS NITENS) PARA SISTEMAS DE DIAGNÓSTICOS.	G01N 33/52
2015	COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO MELATONINA E FLAVONOÍDES PARA USO NO TRATAMENTO DE TUMORES RESISTENTES À QUIMIOTERAPIA.	A61K 45/06
2014	CÁPSULA, METODO DE PREPARAÇÃO DE UMA CÁPSULA CONTENDO FLAVONOÍDES TOTAIS DE DESMODIUM STYRACIFOLIUM, E USO DA CÁPSULA.	A61K 36/48
2013	NOVOS COMPOSTOS FLAVONOÍDES E SUAS RESPECTIVAS UTILIZAÇÕES.	C07H 15/26
2012	COMPOSIÇÃO FARMACÉUTICA CONTENDO UMA FRAÇÃO RICA EM FLAVONOÍDES DE FOLHAS DE ECHINODORUS GRANDIFLORUS E USO NO TRATAMENTO DE ARTRITE.	A61K 36/884
2012	COMPOSIÇÕES FARMACÉUTICAS COMPREENDENDO UMA COMBINAÇÃO DE VEÍCULOS, VITAMINAS, TANINOS E FLAVONOÍDES DE SELEÇÃO COMO IMUNOMODULADORES ESPECÍFICOS DE ANTÍGENO.	A61K 39/395
2010	COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO FLAVONOÍDES, SEU MÉTODO DE PREPARAÇÃO, ADESIVO PARA APLICAÇÃO DE FLAVONOÍDE, MÉTODOS DE PRODUÇÃO DE FLAVONOÍDE HIDRATADO, MÉTODOS DE PREPARAÇÃO DE FORMULAÇÃO TÓPICA, E USO DE FLAVONOÍDE.	A61K 9/70
2010	USO DE FLAVONOÍDES PARA AUMENTAR A BIODISPONIBILIDADE DE HESPERETINA.	A61K 31/352
2009	PROCESSO PARA EXTRAIR EXTRATOS CÍTRICOS RICOS EM FLAVONOÍDES.	A61K 36/752
2009	COMPOSIÇÕES COMPREENDENDO EXTRATOS CONTENDO FLAVONOÍDE DE PLANTAS DO GÊNERO FLAVONOÍDES DE CITRUS E/OU DE CITRUS ISOLADOS E AGENTES ATIVOS DE SUPERFÍCIE CATIONÍCOS ESPECÍFICOS, E REFERIDA COMPOSIÇÃO PARA USO COMO UM AGENTE PARA TRATAR INFECÇÕES COM PIOLHO.	A01N 33/12

Tabela 3: Patentes selecionadas no banco de dados tecnológicos INPI, utilizando o indexador “flavonoides”.

Fonte: Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil - INPI (2019).

Em um estudo realizado por ORLANDA (2015) no desafio de descobrir novos fármacos a partir de plantas, teve como objetivo realizar uma triagem fitoquímica e avaliar a atividade fotoprotetora *in vitro* do extrato bruto etanólico de *Euphorbia tirucalli* Linneau. A atividade sequestradora de radicais livres para o *Euphorbia tirucalli* Linneau pode ser explicada pela presença de compostos fenólicos ( $96,18 \pm 1,33$  mg EqAG/g) e de flavonoides ( $63,57 \pm 2,74$  mg EqC/g), um valor considerado alto quando comparado com outras espécies botânicas descritas na literatura. Na avaliação do fator de proteção solar pode-se observar que todas as concentrações testadas apresentaram potencial de fotoproteção da radiação UV. Na concentração de  $0,1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  do extrato apresentou fator de proteção solar (FPS) de 19,84 levando em conta o FPS determinado pela RDC 30, de 01 de junho de 2012, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2012), todas as concentrações do extrato etanólico testadas ( $0,01$  a  $0,1 \mu\text{g}.\text{mL}^{-1}$  p\w) poderiam ser utilizadas como protetores solares, pois

o fator mínimo de proteção segundo essa resolução, é de FPS 06.

Em outro estudo de investigação da atividade fotoprotetora foi utilizado o extrato etanólico da *Marcetia taxifolia* em uma formulação de filtro solar, onde o extrato apresentou boa atividade antioxidante e fotoprotetora frente à radiação UVB e UVA. Esses efeitos podem ser atribuídos aos derivados de flavonoides presentes na planta, incluindo a quercetina. Os protetores solares foram desenvolvidos e o FPS foi avaliado. As formulações contendo extrato etanólico de *M. taxifolia* apresentaram valores de FPS próximo a um filtro químico freqüentemente utilizado na indústria farmacêutica, a benzofenona-3. A *M. taxifolia* tem grande potencial para uso como princípio ativo em protetores solares.<sup>5</sup>

Mesmo com uma quantidade considerável de estudos científicos que comprovam a eficácia dos flavonoides como potencial agente de fotoproteção e inibidor ROS, a busca utilizando o indexador “flavonoides” não gerou nenhuma patente sobre a sua utilização como fator fotoprotetivo. Este resultado expõe uma deficiência de atividades de inovação e a utilização da propriedade intelectual. Com esse resultado fica evidente que apesar do Brasil ser possuidor de uma biodiversidade reconhecida internacionalmente, com diversas moléculas identificadas em espécies vegetais, incluindo os flavonoides, esse conhecimento não está sendo usado de forma adequada, no sentido de promover o desenvolvimento de novos produtos e processos com potencial mercadológico.

Na distribuição de patentes por ano de depósito, utilizando o termo indexador “flavonoides” observou-se que os anos com maior número de depósitos de patente, foram 2009, 2010 e 2012. Tendo um declínio no registro de patentes nos anos decorrentes.

Utilizando o indexador “fotoproteção” à quantidade de depósitos de patentes encontradas foram 20, dessas 9 se enquadravam nos critérios de inclusão e exclusão e somente 2 se utilizam de tecnologias em formulações tópicas com ação fotoprotetora (Tabela 4).



ANO DO DEPOSITO DE PATENTE	TÍTULO	IPC
2017	PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DE VEÍCULOS LIPÍDICOS, VEÍCULOS LIPÍDICOS NANOESTRUTURADOS, COMPOSIÇÕES COSMECÊUTICA E COSMÉTICA, COMPOSIÇÃO DE CUIDADOS COM OS CABELOS, MÉTODOS PARA PROTEGER O CABELO E PARA PROPORCIONAR FOTOPROTEÇÃO E USO DE UMA COMPOSIÇÃO.	A61K 8/37
2015	FORMULAÇÕES DE USO TÓPICO PARA FOTOPROTEÇÃO CONTENDO PASSIFLORA CINCINNATA.	A61K 8/9789
2014	COMPOSIÇÃO DE FOTOPROTEÇÃO PARA CUIDADOS PESSOAIS, MÉTODO DE AUMENTAR A PROTEÇÃO E MÉTODO PARA DIMINUIR A PRODUÇÃO DE SEBO NA PELE.	A61K 8/44
2012	COMPOSIÇÃO FOTOPROTETORA, USO DE BAICALINA, AGENTE MULTICONSTITUINTE PARA A FOTOPROTEÇÃO DE MATÉRIAS QUERATÍNICAS HUMANAS, USOS DE UMA COMPOSIÇÃO E USOS DE UM AGENTE MULTICONSTITUINTE.	A61K 8/49
2012	COMPOSIÇÃO COSMÉTICA DE FOTOPROTEÇÃO A UV.	A61Q 17/04
2011	COMPOSIÇÃO FOTOESTÁVEL DE FILTROS SOLARES, USO DE UMA COMPOSIÇÃO E MÉTODO DE FOTOPROTEÇÃO DE SUBSTRATOS QUERATINOSOS HUMANOS.	A61K 8/35
2010	POLÍMERO DE FOTOPROTEÇÃO PROGRESSIVA DE ORGANOSILÍCIO, USO E PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DO MESMO, COSMÉTICO OU COMPOSIÇÃO DERMATOLÓGICA, MONÔMERO E PROCESSO PARA A PREPARAÇÃO DO MESMO.	A61K 8/89
2009	KIT, PROCESSO E COMPOSIÇÃO COSMÉTICA DE FOTOPROTEÇÃO DE MATERIAIS QUERATÍNICOS CONTRA UMA RADIAÇÃO UV, E, FILME DE FOTOPROTEÇÃO.	A61K 8/49
2009	AGENTE PARA FOTOPROTEÇÃO CUTÂNEA CONTRA RAIOS UVA/UVB.	A61K 8/97

Tabela 4: Patentes selecionadas no banco de dados tecnológicos INPI, utilizando o indexador fotoproteção.

Fonte: Instituto Nacional de Propriedade Industrial do Brasil - INPI (2019).

Na evolução anual utilizando o indexador “fotoproteção”, o maior número de produções tecnológicas foi observado nos anos de 2009 e 2012. Apresentando declínio nos demais anos.

Do ponto de vista científico, o composto químico flavonoide apresenta um bom número de publicações que mostram um leque de atividades terapêuticas relevantes. Porém, observou-se que até o presente momento houve um número reduzido de depósitos de patentes relacionado ao tema de estudo.

#### 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Essa prospecção permitiu analisar publicações em bases científicas e tecnológicas. Os resultados mostram que existe interesse científico nos flavonoides, porém, foi constatado um número reduzido de patentes na base dados tecnológico nacional. Diante disto, é válido destacar que os achados estimulam o meio

acadêmico e as indústrias a realizarem mais pesquisas inovadoras referentes à ação fotoprotetora de compostos químicos naturais de plantas que produzam metabólitos secundários como estratégias de defesa contra os raios UV. Esses metabólitos fornecem fotoproteção através de seus efeitos de triagem UV e por inibir as espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzido sob influência UV. Essas propriedades dos metabólitos secundários das plantas estão sendo cada vez mais reconhecidos. De acordo com exposto fica evidente a importância da linha de pesquisa, preconizada nas necessidades decorrentes de novos fotoprotetores orgânicos ideais e, sobretudo tornar esses produtos acessíveis à população.

## REFERÊNCIAS

ANVISA, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Regulamento Técnico Mercosul sobre Protetores Solares em Cosméticos – RDC 30 de 1º de Junho de 2012.

BALOGH, T. S. et al. **Ultraviolet radiation protection: current available resources in photoprotection**. Anais Brasileiros de Dermatologia. v. 86, n. 4, p. 732 - 42, 2011.

BAZYLKO, A.; BORZYM, J.; PARZONKO, A. **Determination of in vitro antioxidant and UV-protecting activity of aqueous and ethanolic extracts from Galinsoga parviflora and Galinsoga quadriradiata herb**. Jornal de fotoquímica e fotobiologia B: Biologia. v. 149, p. 189 - 195, 2015.

CASANOVA, L. M.; COSTA, S. S. **Interações Sinérgicas em Produtos Naturais: Potencial Terapêutico e Desafios**. Revista Virtual Química. v. 9, n. 2, p. 575 – 595, 2017.

COSTA, Sônia C. C. et al. **In vitro photoprotective effects of Marcetia taxifolia ethanolic extract and its potential for sunscreen formulations**. Rev. bras. farmacogn., Curitiba, v. 25, n. 4, p. 413-418, 2015.

DEUSCHLE, V. C. K. N. et al. **Phytochemical evaluation and in vitro antioxidant and photoprotective capacity of Calendula officinalis L. leaves**. Rev. bras. plantas med., v. 17, n. 4, p. 693-701, 2015.

GRETHER-BECK, S.; MARINI, A.; JAENICKE, T.; KRUTMANN, J. **French Maritime Pine Bark Extract (Pycnogenol®) Effects on Human Skin: Clinical and Molecular Evidence**. Skin Pharmacol Physiol. v. 29, p. 13-17, 2016.

HEINRICH, U. et al. **Green Tea Polyphenols Provide Photoprotection, Increase Microcirculation, and Modulate Skin Properties of Women**. The Journal of Nutrition. v. 141, n. 6, p. 1202 – 1208, 2011.

HUNSDÖRFER, C.; STAHL, W.; MÜLLER, T. J. J.; SPIRT, S. **UVA Photoprotective Properties of an Artificial Carotenylflavonoid Hybrid Molecule**. Chemical Research in Toxicology. V. 25, n. 8, p. 1692 – 1698, 2012.

JUNIOR, R. G. O. et al. **Use of flavonoids in pharmaceutical industry sector: a technological forecasting study**. Revista GEINTEC. v. 4, n. 2, p. 859-866, 2014.

KATIYAR, S. K. **Green tea prevents non-melanoma skin cancer by enhancing DNA repair**. Arch Biochem Biophys. v. 508, n. 2, p. 152–158, 2011.

KOSTYUK, V. et al. **Natural Substances for Prevention of Skin Photoaging: Screening Systems in the Development of Sunscreen and Rejuvenation Cosmetics.** *Rejuvenation Research.* v. 21, n. 2, p. 91 – 101, 2018.

MACHADO, K. C.; MACHADO, K. C.; GOMES JÚNIOR, A. L.; DE FREITAS, R. M. **Aplicação farmacêutica de inibidores de proteases: uma prospecção tecnológica.** *Revista Geintec.* v. 4, n. 2, p. 780 – 787, 2014.

MILANI, Livia P. G. et al. **Extract from byproduct Psidium guajava standardized in ellagic acid: additivation of the in vitro photoprotective efficacy of a cosmetic formulation.** *Rev. bras. farmacogn.* v. 28, n. 6, p. 692-696, 2018.

NICHOLS, J. A.; KATIYAR, S. K. **Skin photoprotection by natural polyphenols: anti-inflammatory, antioxidant and DNA repair mechanisms.** *Archives of dermatological research.* v. 302, n. 2, p. 71–83, 2010.

ORLANDA, J. F. F.; VALE, V. V. **Análise fitoquímica e atividade fotoprotetora de extrato etanólico de Euphorbia tirucalli Linneau (Euphorbiaceae).** *Rev. bras. plantas med.* v. 17, n. 4, p. 730-736, 2015.

PÉREZ-SÁNCHEZ, A. **Protective effects of citrus and rosemary extracts on UV-induced damage in skin cell model and human volunteers.** *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* v. 136, p. 12-18, 2014.

SERAFINI, M. R.; ANTUNES, A.; ARAUJO, D. S. **Prospecção tecnológica: Morinda citrifolia e indústria farmacêutica.** *Revista Geintec.* v. 1, n. 1, p. 22–31, 2011.

SHIN, S.W. et al. **Antagonist Effects of Veratric Acid against UVB - Induced Cell Damages.** *Molecules.* v. 18, n. 5, p. 5405 – 5419, 2013.

WU N. L. et al. **Chrysin protects epidermal keratinocytes from UVA- and UVB-induced damage.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry.* v. 59, n. 15, p. 8391–8400, 2011.

## AVALIAÇÃO *IN VITRO* DE ÓLEOS ESSENCIAIS DE COPAÍBA, BURITI E TUCUMÃ PARA CONTROLAR *Staphylococcus aureus*

Data de aceite: 26/03/2020  
Data de submissão: 01/03/2020

### **Liandra Maria Abaker Bertipaglia**

(Universidade Brasil, UB, Descalvado-SP) <http://lattes.cnpq.br/6395901509400650>

### **Aline Alves Rezende**

(Universidade Brasil, UB, Descalvado-SP) <http://lattes.cnpq.br/8349315786342216>

### **Gabriel Maurício Peruca de Melo**

(Universidade Brasil, UB, Descalvado-SP) <http://lattes.cnpq.br/7523098767637138>

### **Wanderley José de Melo**

(Universidade Estadual Paulista, FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP e Universidade Brasil, UB, Descalvado-SP). Pesquisador Sênior CNPq. <http://lattes.cnpq.br/9360208572775742>

**RESUMO:** Plantas medicinais estão sendo cada vez mais estudadas para o tratamento de doenças a fim de minimizar os efeitos negativos causados pelo uso indiscriminado de antimicrobianos. As propriedades biológicas dos óleos essenciais têm sido amplamente exploradas em busca de alternativas contra microrganismos patogênicos. O presente capítulo tem o objetivo trazer informações acerca da ação antimicrobiana *in vitro* dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii*, *Mauritia flexuosa* e *Astrocaryum vulgare*, sobre cepa bacteriana

*Staphylococcus aureus*. Foram realizados estudos comparativos com o antimicrobiano Amoxicilina (30 µg) como controle positivo e com água, controle negativo. A atividade microbiana foi determinada pelo teste de sensibilidade antimicrobiana e pela concentração inibitória mínima (CIM), determinada pela atividade antimicrobiana com base no diâmetro dos halos de inibição. Para o teste de sensibilidade antimicrobiana foi utilizada a técnica de difusão em ágar Mueller Hinton. A concentração avaliada e suas diluições seriadas não promoveram inibição do crescimento microbiano. No teste de sensibilidade antimicrobiana, *S. aureus* foi sensível ao antibiótico Amoxicilina, porém com nenhum dos óleos testados obteve-se resultado satisfatório nas concentrações avaliadas. Conclui-se que óleos essenciais de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e buriti (*Mauritia flexuosa*) e Tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), na maneira como foram preparados, não apresentam capacidade para controlar o crescimento *in vitro* de *Staphylococcus aureus*.

**PALAVRAS-CHAVE:** antibiograma, atividade antimicrobiana, concentração inibitória mínima, plantas medicinais da Amazônia, cerrado.

*IN VITRO* EVALUATION OF COPAÍBA, BURITI AND TUCUMÃ ESSENTIAL OILS FOR

**ABSTRACT:** Medicinal plants are being increasingly studied for the treatment of diseases in order to: minimize the negative effects caused by the indiscriminate use of antimicrobials. The biological properties of essential oils have been widely explored in searching for alternatives against pathogenic microorganisms. This chapter aims to provide information about the antimicrobial action in vitro of the essential oils of *Copaifera langsdorffii*, *Mauritia flexuosa* and *Astrocaryum vulgare*, on the bacterial strain *Staphylococcus aureus*. Comparative studies were performed with antimicrobial-Amoxicillin (30-ug) as a positive control and with water as a negative control. The microbial activity was determined by the antimicrobial sensitivity test and the minimum inhibitory concentration (MIC), determined by the antimicrobial activity based on the diameter of the inhibition halos. In the antimicrobial sensitivity test, the Mueller Hinton agar diffusion technique was used. The concentration evaluated and its dilutions serial did not promote microbial growth inhibition. In the antimicrobial sensitivity test, *S. aureus* was sensitive to the antibiotic Amoxiline. However, with none of the oils tested, a satisfactory result was obtained at the concentrations evaluated. We concluded that the essential oils of copaiba (*Copaifera langsdorffii*), buriti- (*Mauritia flexuosa*) and tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), in the way they were prepared, were not able to control the in vitro growth of in *Staphylococcus aureus*.

**KEYWORDS:** antibiogram, antimicrobial activity, Amazonian medicinal plants, cerrado, minimum inhibitory concentration

### 1 | INTRODUÇÃO

Nas últimas décadas, o uso dos fitofármacos tem assumido importante papel como terapia alternativa aos fármacos sintéticos, embora estudos conduzidos ou em andamento sejam ainda insuficientes na avaliação da efetividade do tratamento.

A aplicação de plantas no tratamento e cura de doenças é utilizado desde civilizações antigas. Apesar de nem sempre terem seus componentes químicos conhecidos, as observações populares divulgam seus benefícios terapêuticos, relatados frente aos efeitos medicinais produzidos (MACIEL et al., 2002).

Mais recentemente, nos Estados Unidos, a *Food and Drug Administration* (FDA) tem se preocupado em verificar a segurança e eficácia dos agentes dos óleos essenciais devido às crescentes comercializações e práticas de autocuidado pelos americanos, em uma ampla variedade de doenças (MANION e WIDDER, 2017). Segundo os autores, o número de artigos relevantes indexados, usando a terminologia “assuntos médicos e óleo essencial”, dobrou desde 2004 em função da crescente popularidade dos óleos e também dos acessos pelos profissionais da saúde pela necessidade de estarem preparados para discernir a qualidade de um óleo, a segurança da administração e a validade do seu uso.



O Instituto Atlântico de Aromaterapia ([www.atlanticinstitute.com](http://www.atlanticinstitute.com)) compilou uma lista de relatos de casos relacionados ao uso e segurança de óleos. Embora a evidência, caso a caso, não seja geralmente confiável, reflete experiência e pode ajudar a orientar uma investigação (MANION e WIDDER, 2017).

Os óleos essenciais são oriundos do metabolismo secundário das plantas. A sua composição química é complexa, destacando-se a presença de terpenos e fenilpropanoides, elementos voláteis presentes em muitos órgãos vegetais e estão relacionados às funções de sobrevivência das plantas (SIANI, et al., 2000). Os compostos voláteis sintetizados e emitidos pelas plantas têm como finalidade defender ou atrair os polinizadores. Para isso, os óleos essenciais podem ser considerados fontes potenciais de substâncias biologicamente ativas, principalmente contra microrganismos, como bactérias, fungos filamentosos e leveduras (KELSEY et al., 1984).

Diferentes compostos químicos podem fazer parte da composição dos óleos essenciais, chegando a ser cerca de 20 a 60 componentes em variadas concentrações. Denominam-se compostos majoritários aqueles presentes em 20 a 70% da composição (BAKKALI et al., 2008). No óleo-resina da *Copaifera* spp. os terpenoides (principalmente os sesquiterpenos (~93,36%) são os compostos majoritários (BATISTA et al., 2016). Os grupamentos álcoois, fenóis, ésteres, ácidos, aldeídos e terpenos podem explicar a ação bacteriostática e/ou bactericida do óleo de copaíba (WERNER, 2002).

A atividade antimicrobiana e a composição estão diretamente ligadas às: propriedades geneticamente determinadas, idade da planta, disponibilidade hídrica, temperatura do ambiente, sazonalidade, local onde a planta se desenvolveu, altitude, nutrientes disponíveis no solo e radiação UV (GOBBO-NETO e LOPES, 2007). Geralmente, os componentes isolados são quantificados em termos da porcentagem relativa presente no óleo usando métodos analíticos como a cromatografia gasosa-espectrometria de massa (GC-MS), cromatografia gasosa, cromatografia líquida de alta eficiência com detecção ultravioleta, e cromatografia líquida - espectrometria de massa em tandem (KUMMAR et al., 2012).

### **Copaíba (*Copaifera langsdorffii*)**

A *Copaifera langsdorffii*, popularmente conhecida como Copaíba, pertence ao gênero *Copaifera* e à subfamília Caesalpinoideae, Esse gênero apresenta 16 espécies presentes no Brasil, apresentando quatro espécies na região Norte, onde o óleo é amplamente comercializado e utilizado na medicina popular (DEUS et al., 2009).

Oliveira (2019) descreveu as características do metaboloma (composição geral de todos os metabólitos que constituem a amostra biológica) das principais espécies do gênero *Copaifera* (*C. langsdorffii* Desf., *C. multijuga* Hayne, *C. trapezifolia* Hayne, *C. lucens* Dwyer e *C. venezuelana* Harms & Pittier). Detectou 47 metabólitos, entre diversas classes metabólicas, como derivados de ácido benzoico e ácido cinâmico, ácidos graxos, ácidos diterpenos, flavonoides agliconas, flavonoides glicosilados, um

glicosídeo fenólico, ácidos galoilquínicos e taninos condensados. Em função da análise de componentes principais (PCA), foi observada forte distinção no perfil metabólico das folhas (ácidos galoilquímicos di- e trissubstituídos e flavonoides glicosilados (derivados de quercetina e canferol) e cascas (taninos condensados derivados de catequina).

Furtado et al., (2018) avaliaram os óleo-resinas e extratos polares das folhas de cinco espécies (*Copaifera duckei* Dwyer, *C. multijuga* Hayne, *C. paupera* Dwyer, *C. pubiflora* Benth, *C. reticulata* Ducke e *C. trapezifolia*) e observaram ausência do efeito citotóxico em testes e genotóxico (testes *in vitro* e *in vivo*). Nos extratos, os pesquisadores detectaram 16 ácidos galoilquínicos e os flavonoides quercetin-3-O-ramnosídeo e canferol-3-O-ramnosídeo.

O estudo realizado por Mendonça e Onofre (2009) ressaltou o efeito antimicrobiano do óleo-resina de Copaíba, com Concentração Inibitória Mínima (CIM90) de 0,164 mg/mL e Concentração Bactericida Mínima de CBM90 de 1,31 mg/mL. O mesmo foi capaz de inibir o crescimento de bactérias Gram positivas e Gram negativas como *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*.

### **Buriti (*Mauritia flexuosa*)**

O Buriti é uma palmeira nativa do Brasil, cujo gênero *Mauritia* apresenta 34 espécies. As espécies *Mauritia flexuosa* e *Mauritia vinífera* são as mais citadas no bioma da Amazônia e Cerrado brasileiro. O óleo extraído da polpa dos frutos de Buriti causa interesse devido à sua composição química, rica em carotenoides, ácidos graxos e tocoferol, podendo ser utilizado na indústria terapêutica e cosmética. Segundo Nobre et al. (2018), o constituinte majoritário do óleo de buriti é o ácido oleico (72,14%). Para Silva et al. (2009), o óleo de buriti é uma fonte valiosa de ácidos graxos monoinsaturados e vitaminas A e E, sendo os ácidos oleico (74,06%), palmítico (16,78%) e linoleico (4,94%) os ácidos graxos mais abundantes.

De acordo com Bezerra et al. (2009), a composição química do óleo essencial da casca de *Mauritia flexuosa* vem sendo muito estudada, colocando a espécie em destaque a partir de avanços no conhecimento químico-farmacológico. Observou-se uma abundância de taninos e flavonoides em seu extrato, que são os possíveis responsáveis pela atividade antimicrobiana apresentada pela planta.

Estudos mostram resultados positivos quanto ao poder antimicrobiano do óleo de buriti. Pereira et al., (2018) observaram Concentração Inibitória Mínima (CIM)  $\geq 1024 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$  para todas as cepas bacterianas padrão e multirresistentes, além do efeito sinérgico do óleo no *Staphylococcus aureus* SA-10, com redução da CIM de gentamicina e amicacina em 40,00% e 60,55%, respectivamente. Segundo os pesquisadores, os resultados obtidos indicam que o óleo de *M. flexuosa* é uma fonte valiosa de ácido oleico e modulador da atividade de aminoglicosídeos. Os aminoglicosídeos são antibióticos com um mecanismo de ação baseado na síntese de proteínas. Por ligação no ribossomo procariótico 30S, impedem a tradução adequada do mRNA.

### ***Tucumã (Astrocaryum vulgare)***

Tucumã é uma palmeira de grande porte, com um único tronco, que pode atingir altura de aproximadamente 20 m (LORENZI et al., 1996). Pertence à família Areaceae. Produz um fruto típico na região Amazônica, com formato elipsóide e coloração alaranjada, rico em compostos bioativos e cuja composição química pode ser caracterizada por carotenoides ( $125,7 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ), fitoesterol ( $152,6 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) e tocoferol ( $6,8 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ).

O óleo de tucumã é usado principalmente como anti-inflamatório e antioxidante (BONY et al., 2012). Estudos de Baltissera et al. (2017) em camundongos diabéticos induzidos por aloxana demonstraram que o tratamento com óleo de tucumã causa efeito hipoglicêmico, melhorando os níveis de insulina e o status antioxidante/oxidante, além de apresentar efeito protetor contra os danos no pâncreas, induzidos pelo estresse oxidativo. Cabral et al. (2019) demonstraram que, além de reduzir os processos oxidativos, os compostos bioativos do óleo do tucumã podem inibir as células de proliferação e induzir parada do ciclo celular e apoptose. Inibe o progresso do ciclo celular através das fases G0/G1.

### ***Staphylococcus aureus***

O gênero *Staphylococcus* apresenta-se subdividido em 40 espécies, sendo *S. aureus* considerada a mais importante em função da sua maior patogenicidade (VON EIFF et al., 2001; CASSETARI et al., 2005).

*S. aureus* é relatado como o patógeno mais frequentemente isolado em casos de mastite subclínica. Seu tratamento torna-se difícil devido à elevada resistência aos antibióticos, e isso vem acarretando grande perda econômica na produção do leite (FAGUNDES e OLIVEIRA, 2004; FERREIRA, et al., 2006).

A mastite é um processo infeccioso, onde o *S. aureus* se aloja principalmente nos quartos mamários, na pele do úbere e nos tetos. Tais infecções causam grande preocupação, tornando-se até um problema de saúde pública devido à produção de toxinas, uma vez que a contaminação por enterotoxinas termoestáveis pode ser encontrada mesmo em leite pasteurizado. A presença das toxinas causa distúrbios como o desencadeamento de alergias em indivíduos propensos, efeitos tóxicos e carcinogênicos, acarretados por alterações no equilíbrio da microbiota intestinal e também pela seleção de bactérias resistentes no trato digestivo dos consumidores (FONTANA et al., 2010; LANGONI et al., 2011).

Segundo Zafalon et al. (2007), programas de controle de mastites por meio da antibioticoterapia realizados durante a lactação tem como finalidade a diminuição da duração das infecções intramamárias, que podem ser viáveis economicamente, uma vez que a qualidade do leite é um componente significativo.

Neste contexto, o objetivo da pesquisa apresentada neste capítulo foi estudar a potencialidade dos óleos essenciais de *Copaifera langsdorffii*, *Mauritia flexuosa* e

*Astrocaryum vulgare* no controle de crescimento do *Staphylococcus aureus*. De maneira específica, objetivou-se: aplicar o teste antimicrobiano pela metodologia da difusão em placas e determinar a CIM (concentração inibitória mínima) dos óleos essenciais frente ao *Staphylococcus aureus*.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Os óleos essenciais utilizados foram adquiridos em farmácias de manipulação e suas especificações foram apresentadas pelo fornecedor Quadro 1. Os óleos essenciais foram manipulados a partir de uma solução composta de uma parte de óleo essencial e uma parte de éter etílico. Outros diluentes como: álcool etílico e clorofórmio foram testados, porém não se obteve uma solução homogênea. Desta solução (óleo essencial e éter etílico) foram elaboradas soluções seriadas 1:2; 1:4; 1:8, 1:16 e 1:32.

Copaíba ( <i>Copaifera langsdorffii</i> )	Óleo 100% puro. Seiva processada por filtração.
Buriti ( <i>Mauritia flexuosa</i> )	Óleo 100% puro. Extraído mediante prensagem a frio da polpa do fruto e posterior filtração.
Tucumã ( <i>Astrocaryum vulgare</i> )	Óleo 100% puro. Extraído mediante prensagem a frio da polpa do fruto e posterior filtração.

Quadro 1: Especificações do fornecedor dos óleos essenciais de Copaíba, Tucumã e Buriti usados na pesquisa.

### ***Microrganismo utilizado***

Utilizou-se, neste estudo, linhagem bacteriana padronizada de *Staphylococcus aureus* (linhagem CCCD S003 CEFAR Diagnóstica – Brasil), que foi submetida aos testes de resistência e sensibilidade ao antimicrobiano de uso comum (Amoxicilina 30 µg) e às soluções antimicrobianas dos óleos vegetais.

A cepa mantida congelada a -18 °C em caldo *Brain-Heart-Infusion* (BHI) com Glicerol. A recuperação das cepas foi realizada em Agar Nutriente com incubação por 24 horas a 37 °C. Após este período, foram transferidas duas alçadas da cultura em BHA (BHI + ágar) para solução salina estéril (NaCl 0,85 %) até turvação compatível com o grau 0,5 da escala de Mac Farland. Em seguida, com auxílio de *swab* estéril, as culturas foram inoculadas de forma homogênea em placas Ágar Muller-Hilton (MH).

### ***Teste de sensibilidade antimicrobiana (antibiograma)***

O teste comparativo com o antibiótico para avaliar a sensibilidade antimicrobiana *in vitro* dos isolados foi realizado mediante a técnica de difusão em ágar Mueller-Hinton segundo Quinn et al. (1994) de acordo com protocolo proposto pelo NCCLS (2000).

Para tanto, o ágar foi preparado de acordo com as indicações do fabricante, ajustando-se o pH (7,2 – 7,4). Em cada placa de 150 mm e foram distribuídos 50-60 mL do meio de incubação, para que este apresentasse espessura homogênea de 3-4 mm.

O método da difusão em disco de papel foi realizado após a ativação do *S. aureus*. Posteriormente, o microrganismo foi semeado em placas com ágar Mueller-Hinton com auxílio de um *swab* estéril. A inoculação foi feita em forma de estrias na superfície do ágar em três direções, girando a placa em ângulo de 60° após cada estria.

A seguir, sobre a superfície semeada, foram colocados, com o auxílio de uma pinça estéril, os discos de papel filtro estéreis (previamente cortados no diâmetro padrão de 6 mm e esterilizados em estufa a 180 °C por 2 horas), impregnados com os óleos (ficaram no dessecador por 24 horas após serem embebecidos com os óleos). As placas foram incubadas a 36 °C por 48 horas.

Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos pela média aritmética do diâmetro dos halos de inibição formado ao redor dos discos nas 3 repetições, em mm, usando um paquímetro, que foi encostado na parte de trás da placa de Petri invertida.

### ***Teste da concentração inibitória mínima (CIM)***

A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada pela atividade antimicrobiana com base no diâmetro dos halos de inibição, sendo este superior a 11 mm. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 37 °C por um período de 24 horas (QUINN et al., 1994). A CIM foi considerada a menor concentração do extrato que inibiu completamente o crescimento bacteriano, ou seja, presença do halo de inibição.

A determinação da CIM foi feita pelo método da diluição seriada, utilizando discos de papel dos óleos essenciais em ágar Mueller-Hinton. Os óleos foram diluídos em éter etílico na proporção de 1:1; 1:2; 1:4; 1:8, 1:16 e 1:32 para a determinação da atividade antimicrobiana das plantas testadas (óleos). Para o controle negativo, foi água destilada. Como controle positivo, foi utilizado o disco com o antimicrobiano Amoxicilina (AMC) (30 µg).

A suspensão-inóculo foi preparada em solução salina (NaCl na concentração de 0,85%), a partir de culturas de 18-20 horas em ágar sangue e a turbidez da suspensão padronizada com o tubo 0,5 da escala de MacFarland. As placas foram inoculadas com alças descartáveis, calibradas para 1 µL, dentro de 30 minutos de preparo do inóculo. A sensibilidade da amostra ao crescimento microbiano foi considerada para medidas superiores a 11 mm do diâmetro de halo formado (QUINN et al., 1994).

### ***Análise dos dados***

Para a CMI, a análise foi do tipo descritiva, com os seguintes parâmetros: resistente, intermediário, sensível e não avaliado. Os diâmetros dos halos de inibição de crescimento foram registrados e interpretados de acordo com os padrões estabelecidos pelo NCCLS (2000).



### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para comparar o potencial antimicrobiano entre os óleos essenciais de copaíba (*Copaifera langsdorffii*), buriti (*Mauritia flexuosa*) e tucumã (*Astrocaryum vulgare*), foram avaliados os efeitos inibitórios destes frente à cultura de *S. aureus* e, para tanto, os halos de inibição bacteriana foram medidos. Na Tabela 1, pode ser observado o resultado do teste de sensibilidade do *S. aureus* ao antimicrobiano Amoxicilina (AMC) 30 µg e à água (Figura 1). Nota-se que a cepa avaliada apresentou comportamento sensível ao antimicrobiano AMC, segundo NCCLS (2000).

Antibiótico (µg)	Halo (mm)	Perfil
Amoxicilina (30)	16,5	S
Água	0	R

S – Sensível, R - Resistente

Tabela 1: Teste de sensibilidade do *S. aureus* ao antibiótico de uso comum na terapia humana e veterinária, segundo NCCLS (2000), como resultado do diâmetro do halo formado e medido em milímetros (mm).



Figura 1: Antibiógramas com Amoxicilina (30 µg), controle positivo, e com água, controle negativo. Fonte: Rezende (2017)

Langoni et al. (2000) observaram que, quando realizado o tratamento intramamário de casos de mastites bovinas com a amoxicilina (62,5 mg), houve índice de cura de 71,4% para mastite subclínica e 66,7% para mastite clínica em função da presença da *Staphylococcus aureus*. Freitas et al., (2005) relataram que os estafilococos mostram elevada resistência a AMC, sendo que observaram frequências de sensibilidade para amoxicilina de 25% e para penicilina, de 20%.

Na avaliação da concentração inibitória mínima (CIM), o óleo de copaíba apresentou halo de inibição inferior aos 11 mm (Figura 2A), associado ao comportamento de sensibilidade segundo NCCLS (2000). Nas diluições 1:1, 1:2 e 1:4, o óleo de copaíba apresentou halo de inibição de 8,0; 9,0 e 9,0 mm, respectivamente. Nas diluições 1:8, 1:16 e 1:32, o halo formado foi diminuindo até zero na maior diluição, podendo-se inferir que os resultados demonstram maior potencial de inibição (Tabela 2).

Óleos Essenciais	Diluições					
	1:1	1:2	1:4	1:8	1:16	1:32
<b>Copaíba</b>	8,0	9,0	9,0	4,0	2,0	0,0
<b>Buriti</b>	5,0	3,0	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Tucumã</b>	*	*	*	*	*	*

\* dados não avaliados

Tabela 2: Avaliação da concentração inibitória mínima (CIM) dos tratamentos avaliados pela média aritmética do diâmetro do halo, expresso em milímetro (mm).

Quanto aos resultados para o óleo essencial de tucumã, estes não puderam ser obtidos pela dificuldade da sua manipulação. O referido óleo, que é muito espesso e dificilmente diluído, não pôde ser embebido nos discos de difusão para a análise.

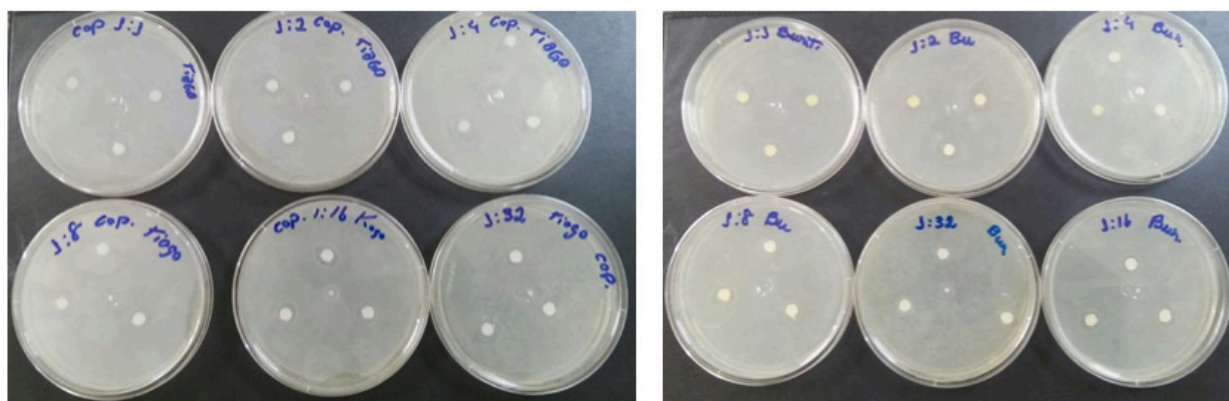


Figura 2: Concentração inibitória mínima (CIM) do óleo de copaíba, em A, e do óleo de buriti, em B, avaliado pelo halo de crescimento da cultura do *Staphylococcus aureus*.

Fonte: Rezende (2017)

Dentre as pesquisas voltadas ao controle do crescimento do *S. aureus*, um dos principais agentes da mastite bovina, com o óleo de copaíba, pode-se citar o estudo realizado por PIERI et al, (2009), que avaliaram o efeito antimicrobiano de óleo de duas espécies copaíba (*Copaifera langsdorffii* e a *Copaifera officinalis*), medindo os halos de inibição do crescimento da cultura. Os autores constataram resultados satisfatórios, ou seja, os óleos de ambas as espécies tiveram ação antibacteriana sobre os *S. aureus*.

Quanto ao óleo essencial do buriti, observaram-se halos de inibição do crescimento da cultura de *S. aureus* com 5 e 3 mm nas diluições 1:1 e 1:3, respectivamente, ambos inferiores a 11 mm, considerado como sensível ao crescimento microbiano (NCCLS, 2000), ou seja, a cultura foi resistente ao efeito antimicrobiano do óleo de buriti (Figura 2B). Contrário aos resultados obtidos no presente estudo, Batista et al., (2012) verificaram eficiência do óleo essencial de buriti em reduzir a contagem de *Staphylococcus aureus* em ensaio de atividade antimicrobiana *in vitro*.

Silveira et al., (2005) avaliaram partições de frutos de buriti, em hexano e em

acetato de etila do mesocarpo/endocarpo. Observaram que foram altamente inibitórias para *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, mas não foram capazes de inibir significativamente a cepa de *E. coli*. O extrato etanólico bruto do epicarpo/mesocarpo de *M. vinifera* inibiu significativamente apenas as cepas Gram negativas o que, segundo os autores, pode ser devido, principalmente, aos constituintes da partição em acetato de etila do epicarpo/mesocarpo. As partições lipofílicas do epicarpo/mesocarpo e do mesocarpo/endocarpo de *M. vinifera* foram as mais inibitórias para a cepa de *S. aureus* e são explicadas pelos ácidos graxos presentes, principalmente nos extratos lipofílicos, que podem ser os responsáveis pela atividade antimicrobiana encontrada nessa planta. Esses dados sugerem que os métodos de extração e os diferentes componentes da árvore têm efeitos antimicrobianos diferentes.

Marangon et al., (2016) avaliaram a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de Copaíba e de Buriti. Observaram que o óleo de copaíba mostrou atividade contra *Staphylococcus aureus* com uma CIM de  $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$  e comportamento bacteriostático. O óleo de buriti, por sua vez, não apresentou atividade até  $4000 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

## 4 | CONCLUSÕES

Os óleos essenciais de copaíba (*Copaifera langsdorffii*) e buriti (*Mauritia flexuosa*) não apresentam potencialidade para controlar o crescimento do *Staphylococcus aureus* nas condições do presente estudo.

O óleo de tucumã, da maneira como foi preparado, não tende aos requisitos da técnica de disco-difusão.

## REFERENCIAS

BALDISSERA, M.D.; SOUZA, C.F.; GRANDO, T.H. et al. Antihyperglycemic, antioxidant activities of tucumã oil (*Astrocaryum vulgare*) in alloxan-induced diabetic mice, and identification of fatty acid profile by gas chromatograph: New natural source to treat hyperglycemia. **Chemico-Biological Interactions**, v. 270, p.51-58, 2017.

BAKKALI, F. et al. Biological effects of essential oils: a review. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 446-475, 2008.

BATISTA, A. G.; FERRARI, A. S. F.; CUNHA, D. C. C.; SILVA, J. K. S.; CAZARINA, C. B. B.; CORREA, L. C.; PRADO, M. A.; CARVALHO-SILVA, L. B.; ESTEVES, E.A.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. Polyphenols, antioxidants, and antimutagenic effects of *Copaifera langsdorffii* fruit. **Food Chemistry**, v.197, p. 1153-1159, 2016.

BATISTA, J. S.; OLINDA, R. G.; MEDEIROS, V. B.; RODRIGUES C. M. F. R.; OLIVEIRA, A. F.; PAIVA, E. S.; FREITAS, C. I. A.; MEDEIROS, A. C.; Atividade antibacteriana e cicatrizante do óleo de buriti *Mauritia flexuosa* L. **Ciência Rural**, v.42, n.1, p.136-141, 2012

BEZERRA, D. A. C.; PEREIRA, A.V.; LÔBO, K.M.S.; RODRIGUES, O.G.; ATHAYDE, A.C.R.; MOTA, R.A.; MEDEIROS, E.S.; RODRIGUES, S.C. Atividade biológica da jurema-preta (*Mimosa tenuiflora* (Wild) Poir.) sobre *Staphylococcus aureus* isolado de casos de mastite bovina. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 4, p. 814-817, 2009.

BONY, E.; BOUDARD, F.; BRAT, P.; DUSSOSSOY, E.; PORTET, K.; POUCHERET, P.; GIAIMIS, J.; MICHEL, A.; Awara (*Astrocaryum vulgare* M.) pulp oil: chemical characterization, and anti-inflammatory properties in a mice model of endotoxic shock and a rat model of pulmonary inflammation, **Fitoterapia**, v.83, p. 33-43, 2012.

CABRAL, F.L.; BERNARDES, V.M.; PASSOS, D.F.; DE OLIVEIRA, J.S.; DOLESKI, P.H.; SILVEIRA, K.L.; HOVART, M.C.; BREMM, JOÁ.M.; BARBISAN, F.; AZZOLIN, V.F.; TEIXEIRA, C.F.; ANDRADE, C.M.; CRUZ, I.B.M.; RIBEIRO, E.E.; LEAL, D.B.R. *Astrocaryum aculeatum* fruit improves inflammation and redox balance in phytohemagglutinin-stimulated macrophages, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 247, n.30, 112274, 2019.

CASSETARI, V. C.; STRABELLI, T.; MEDEIROS, E. A. S. Staphylococcus aureus bacteremia: what is the impact of oxacillin resistance on mortality? **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, v. 9, n. 1, p. 70-76, 2005.

DEUS, R. J. A.; CARVALHO, A.S.C.; BANNA, D.A.D.S.; ARRUDA, M.S.P.; ALVES, C.N.; SANTOS, A.S.; Efeito fungitóxico in vitro do óleo resina e do óleo essencial de copaíba (*Copaifera multijuga* Hayne). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.3, p.347-353, 2009.

FAGUNDES, H.; OLIVEIRA, C. A. F.; Infecções intramamárias causadas por *Staphylococcus aureus* e suas implicações em paúde pública. **Ciência Rural**, v.34, n.4, p.1315-1320, 2004.

FERREIRA, L. M. et al. Variabilidades fenotípica e genotípica de estirpes de *Staphylococcus aureus* isoladas em Casos de mastite subclínica bovina. **Ciência Rural**, v.36, n.4, p. 1.228-1.234, 2006.

FONTANA, V. L. D. S.; GIANNINI, M. J. S. M.; LEITE, C. Q. F.; MIRANDA, E. T.; ALMEIDA, A. M. F.; FONTANA, C. A. P.; SOUZA, C. M.; STELLA, A. E. Etiologia da mastite bovina subclínica, sensibilidade dos agentes às drogas antimicrobianas e detecção do gene da Beta-lactamase em *Staphylococcus aureus*. **Veterinária e Zootecnia**, v. 7, n. 4, p. 552-559, 2010.

FREITAS, M. F. L.; PINHEIRO JÚNIOR, J. W.; STAMFORD, T. L. M.; RABELO, A. S. S.; SILVA, D. R.; SILVEIRA FILHO, V. M.; SANTOS, F. G. B.; SENA, M. J.; MOTA, R. A.; Perfil de sensibilidade antimicrobiana in vitro de *Staphylococcus coagulase* positivos isolados de leite de vacas com mastite no agreste do estado de Pernambuco. **Arquivos do Instituto Biológico**, v.72, n.2, p.171-177, 2005.

FURTADO, R. A.; OLIVEIRA, P. F.; SENEDESE, J. M.; OZELIN, S. D.; SOUZA, L. D.R.; LEANDRO, L. F.; OLIVEIRA, W. L.; SILVA, J. M.; OLIVEIRA, L. C.; ROGEZ, H.; AMBRÓSIO, S. R.; VENEZIANI, C. S.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Assessment of toxicogenetic activity of oleoresins and leaves extracts of six *Copaifera* species for prediction of potential human risks, **Journal of Ethnopharmacology**, v. 221, p. 119-125, 2018.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabolitos secundários. **Química Nova**, v.30, p. 374-81, 2007.

KELSEY, R. G.; REYNOLDS, G.W.; RODRIGUEZ, E. The chemistry of biologically active constituents secreted and stored in plant glandular trichomes. In: RODRIGUEZ, E.; HEALEY, P.L.; METHA, I. (Eds.). **Biology and chemistry of plant trichomes**. New York: Plenum, p.187-241, 1984.

KUMAR, S.; VASUDEVA, N.; SHARMA, S.; GC-MS analysis and screening of antidiabetic, antioxidant and hypolipidemic potential of *Cinnamomum tamala* oil in streptozotocin induced diabetes mellitus in rats. **Cardiovascular Diabetology**, v. 11, n.95, 2012.

LANGONI, H.; PENACHIO, D. S.; CITADELLA, J.C.C.; LAURINO F.; MARTINS, P. Y. F.; LUCHEIS, S. B.; MENOZZI, B. D.; SILVA A. V. Aspectos microbiológicos e de qualidade do leite bovino. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v.31, n.12, p.1059-1065, 2011.

LANGONI, H.; ARAÚJO, W. N. DE, SILVA A.V. DA, SOUZA, L.C. de Tratamento da mastite bovina com amoxicilina e enrofloxacin bem como com a sua associação. **Arquivos do Instituto Biológico**,

v.67, n.2, p.177-180, 2000.

LORENZI, H.; SOUZA, A.M.; MEDEIRAS-COSTA, J.T.; CERQUEIRA, L.S.C.; VON BEHR, N., 1996. **Palmeiras no Brasil: Exóticas e Nativas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa. 432p.

MACIEL M. A. M.; PINTO A. C.; VEIGA JR V. F.; GRYNBERG N. F.; ECHEVARRIA A. Medicinal plants: The need for multidisciplinary scientific studies. **Química Nova**, v.25, p. 429 – 438, 2002.

MANION, C. R.; WIDDER, R. M. Essentials of essential oils. **American Journal of Health-System Pharmacy**, v. 74, n. 9, p.153–162, 2017.

MARANGON, C. A.; LEITE, P. M. F.; RODRIGUES, M. A. V.; MARTINS, V. C. A.; PLEPIS, A. M. G.; NITSCHKE, M. Influência dos óleos de copaíba e buriti em emulsões de quitosana/gelatina sobre *Staphylococcus aureus*. In: Anais. Foz do Iguaçu, 2016.

MENDONÇA D. E.; ONOFRE S. B.; Atividade antimicrobiana do óleo-resina produzido pela copaiba – *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, n. 2B, p.577-581, 2009.

**NCCLS. Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically**. Approved standard, 5th ed. NCCLS document M7-A5. 2000.

NOBRE, C. B.; SOUSA, E. O.; SILVA, J. M. F. DE L.; COUTINHO, H. D. M.; COSTA, J. G. M.; Chemical composition and antibacterial activity of fixed oils of *Mauritia flexuosa* and *Orbignya speciosa* associated with aminoglycosides. **European Journal of Integrative Medicine**, v. 23, p. 84-89, 2018.

OLIVEIRA, D. S. Estudo metabolômico do gênero *Copaifera* – FABACEAE. 2019. 131 f. **Dissertação** (Mestrado em Química de produtos naturais). Universidade Federal do Amazonas, Manaus, 2019.

PEREIRA Y.F.; COSTA M.S.; TINTINO S.R.; ROCHA J.E.; RODRIGUES F.F.G.; FEITOSA M.K.S.B.; DE MENEZES I.R.A.; COUTINHO H.D.M.; DA COSTA J.G.M.; DE SOUSA E.O. Modulation of the antibiotic activity by the *Mauritia flexuosa* (Buriti) fixed oil against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) and other multidrug-resistant (MDR) bacterial strains. **Pathogens**, v. 7, n.4, 2018.

PIERI, F. A.; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M.A.S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.11, n.4, p.465-472, 2009.

QUINN, P. J.; MARKEY, B. K.; CARTER, M. E.; DONNELLY, W. J.; LEONARD, F. C. **Microbiologia veterinária e doenças infecciosas**. Ed. Artmed, 1994.

SIANI, A. C. et al. Óleos essenciais: potencial antiinflamatório. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v.16, p.38-43, 2000.

SILVA, S. M.; SAMPAIO, K. A.; TAHAM, T.; ROCCO, S. A.; CERIANI, R.; MEIRELLES, A. J. A. Characterization of oil extracted from buriti fruit (*Mauritia flexuosa*) grown in the Brazilian amazon region. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v.86, n.1, p.611-616, 2009.

SILVEIRA, C.S.; PESSANHA, C.M.; LOURENÇO, M.C.S.; NEVES JUNIOR, I.; MENEZES, F.S.; KAPLAN, M.A.C. Atividade antimicrobiana dos frutos de *Syagrus oleracea* e *Mauritia vinífera*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 2, p. 143-148, 2005.

VON EIFF, C.; BECKER, K.; MACHKA, K.; STAMMER, H.; PETERS, G. Nasal carriage as a source of *Staphylococcus aureus* bacteremia. **The New England Journal of Medicine**, v. 344, n.1, p. 11-6, 2001.



WERNER, M. **Les Huiles Essentielles**, 2.ed. Paris: Editions Vigot, 2002.

ZAFALON L.F.; NADER FILHO A.; OLIVEIRA J.V.; RESENDE F.D. Mastite subclínica causada por *Staphylococcus aureus*: custo-benefício da antibioticoterapia de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.59, n.3, p.577-585, 2007.

## CARACTERIZAÇÃO E UTILIZAÇÃO ADEQUADA DE PRODUTOS FITOTERÁPICOS: UMA REVISÃO DE LITERATURA

Data de aceite: 26/03/2020

### **Dayane de Melo Barros**

Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente  
– Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, CAV/UFPE- Pernambuco

### **Marcela de Albuquerque Melo**

Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente  
– Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, CAV/UFPE- Pernambuco

### **Tamiris Alves Rocha**

Doutora em Ciências Biológicas – Universidade Federal de Pernambuco, UFPE – Pernambuco

### **Sandrelli Meridiana de Fátima Ramos dos Santos Medeiros**

Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente  
– Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, CAV/UFPE- Pernambuco

### **Gerliny Bezerra de Oliveira**

Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente  
– Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, CAV/UFPE - Pernambuco

### **Marllyn Marques da Silva**

Mestre em Saúde Humana e Meio Ambiente  
– Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, CAV/UFPE- Pernambuco

### **José Hélio Luna da Silva**

Bacharel em Nutrição – Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, CAV/UFPE- Pernambuco

### **Andreza Roberta de França Leite**

Bacharel em Nutrição – Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, CAV/UFPE- Pernambuco

### **Silvio Assis de Oliveira Ferreira**

Mestre em Bioquímica e Fisiologia– Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

### **Jaciane Maria Soares dos Santos**

Bacharel em Nutrição – Centro Acadêmico de Vitória, Universidade Federal de Pernambuco, CAV/UFPE – Pernambuco

### **Iago Dillion Lima Cavalcanti**

Bacharel em Farmácia - Associação Caruaruense de Ensino Superior, ASCES - Pernambuco

### **Maurilia Palmeira da Costa**

Doutora em Bioquímica e Fisiologia– Universidade Federal de Pernambuco – Pernambuco

### **José Cleberson Santos Soares**

Bacharel em Farmácia - Centro Universitário Maurício de Nassau, UNINASSAU - Pernambuco.

### **Daniel Charles dos Santos Macêdo**

Bacharel em Farmácia – Universidade Federal de Pernambuco, UFPE – Pernambuco

### **Maurianny Palmeira da Costa**

Especialista em Residência Multiprofissional em Saúde Coletiva– Escola de Governo em Saúde Pública de Pernambuco, ESPPE – Pernambuco

### **Marcelino Alberto Diniz**

Bacharel em Farmácia – Universidade Federal de Pernambuco, UFPE – Pernambuco

**RESUMO:** A utilização de plantas medicinais com propriedades curativas tem sido realizada ao longo da história caracterizando-se como parte da cultura de vários povos no tratamento e cura de doenças. Ao longo dos anos e com o desenvolvimento da tecnologia e indústrias farmacêuticas, as plantas medicinais foram industrializadas a fim de se obter um medicamento e o fitoterápico é o produto resultante desse processo. Diante dessa perspectiva, o objetivo do estudo foi identificar evidências disponíveis na literatura sobre a caracterização e utilização adequada de produtos fitoterápicos. Para tanto, realizou-se uma revisão narrativa mediante busca em bancos de dados eletrônicos bem como livros e legislações sobre a caracterização e utilização adequada de produtos fitoterápicos. As bases de dados consultadas foram: *Scielo*, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e Revistas Eletrônicas de Saúde, com dimensão temporal entre 1996 e 2019. Como critérios de inclusão utilizaram-se artigos científicos completos, dissertações, livros e manuais do Ministério da Saúde em português e inglês intrínsecos ao tema. Verificou-se que a caracterização e utilização de produtos fitoterápicos é uma abordagem de significativa importância, uma vez que, o uso incorreto destes medicamentos pode causar efeitos indesejáveis à saúde humana.

**PALAVRAS-CHAVE:** Fitoterápico. Plantas medicinais. Revisão narrativa. Saúde humana.

**ABSTRACT:** The use of medicinal plants with healing properties has been carried out throughout history, being characterized as part of the culture of several peoples in the treatment and cure of diseases. Over the years and with the development of technology and pharmaceutical industries, medicinal plants have been industrialized in order to obtain a medicine and herbal medicine is the product resulting from this process. Given this perspective, the objective of the study was to identify evidence available in the literature on the characterization and proper use of herbal products. For this, a narrative review was carried out by searching electronic databases as well as books and legislation on the characterization and proper use of herbal products. The databases consulted were: *Scielo*, Virtual Health Library (VHL) and Electronic Health Journals, with a temporal dimension between 1996 and 2019. As inclusion criteria, full scientific articles, dissertations, books and manuals from the Ministry of Health in Portuguese and English intrinsic to the theme were used. It was found that the characterization and use of herbal products is an approach of significant importance, since the incorrect use of these drugs can cause undesirable effects on human health.

**KEYWORDS:** Herbal medicine. Medicinal plants. Narrative review. Human health.

## INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são consideradas elementos que compõem parte da biodiversidade e são amplamente utilizadas desde os primórdios da civilização por vários povos e de diferentes formas (FIRMO et al., 2011). Ao longo do tempo os atributos curativos dos vegetais foram sendo cada vez mais identificados e usados, de modo que, os conhecimentos das técnicas utilizadas e o emprego são transmitidos de geração para geração, proporcionando um saber cultural e valioso (DUTRA, 2009).

No decorrer dos anos e com o desenvolvimento da tecnologia e indústrias farmacêuticas, as plantas medicinais foram industrializadas a fim de se obter um medicamento para o tratamento e/ou cura de enfermidades e o fitoterápico é o produto gerado desse processo. Basicamente, medicamento fitoterápico é aquele obtido empregando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais. Devido aos avanços científicos, a classe desse medicamento encontra-se em um crescimento progressivo no mercado, pois, tem sido comprovada a eficácia das plantas medicinais, através de estudos químicos e farmacológicos (BRASIL, 2004; GIRALDI; HANAZAKI, 2010).

Estima-se que no Brasil aproximadamente 82% da população utiliza produtos a base de plantas medicinais nos cuidados à saúde, evidenciando sua relevância a nível econômico e social, seja por meio de conhecimento empírico, na medicina popular ou conhecimento científico, nos sistemas oficiais de saúde (RODRIGUES; SIMONI, 2010).

Contudo, apesar de ser fabricado de maneira natural, apresentar preços mais acessíveis, ser considerado eficaz e seguro faz-se necessário elucidar que a utilização de fitoterápicos pode desencadear reações adversas intrínsecas ou extrínsecas. As intrínsecas estão associadas à própria composição química do medicamento, que pode causar toxicidade, interação com outros fármacos e reação idiossincrática. Enquanto que, as extrínsecas estão relacionadas a falhas na produção, que podem acontecer por identificação incorreta da planta, provocando erro de medicação e contaminação por praguicidas (SILVA et al., 2006; ZAMBOM, 2018).

A utilização de produtos fitoterápicos requer cuidados semelhantes aos medicamentos sintéticos, para isso, o indivíduo deve obter informações de profissionais da saúde aptos, os quais devem informar sobre as reações adversas garantindo a segurança e eficácia do produto na terapêutica. Desse modo, o objetivo do estudo foi identificar evidências disponíveis na literatura sobre a caracterização e utilização adequada de produtos fitoterápicos.

## METODOLOGIA

O estudo baseia-se em uma revisão narrativa realizada mediante busca em bancos de dados eletrônicos, livros e manuais do Ministério da Saúde sobre a caracterização e utilização adequada de produtos fitoterápicos. As bases de dados

consultadas foram: *Scielo*, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS) e Revistas Eletrônicas de Saúde, com dimensão temporal entre 1996 e 2019. Na estratégia de busca, foram utilizados os descritores: biossegurança, plantas medicinais, fitoterápicos e promoção da saúde. Como critérios de inclusão utilizaram-se artigos científicos completos, dissertações, livros e manuais do Ministério da Saúde em português e inglês intrínsecos ao tema. Foram excluídas as publicações científicas que não estavam de acordo com a abordagem proposta.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

A utilização da fitoterapia na terapêutica humana é considerada um dos processos terapêuticos mais antigos da humanidade, apresentando origem tanto do conhecimento empírico como científico. A palavra fitoterapia origina-se dos termos *Phyton*, que significa “vegetal” e *Therapeia*, que significa “terapia” originando o termo “terapia utilizando plantas”. A fitoterapia é altamente expandida no mundo todo como um método natural preventivo, conservador, regenerador e curativo. O reconhecimento de seu valor como recurso clínico, farmacêutico e econômico levou muitos países a aplica-la como política pública de saúde (ALVES; SILVA, 2002; BARRETO, 2011; GRIBNER; RATTMANN; GOMES, 2019).

No Brasil, produto fitoterápico é definido através da RDC nº 14/2010 como, medicamento obtido utilizando-se exclusivamente matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são comprovadas através de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecnocientíficas ou evidências clínicas. Caracteriza-se pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso (segurança), bem como pela reprodutibilidade e manutenção de sua qualidade. Vale destacar que, não são incluídos no medicamento fitoterápico substâncias ativas isoladas, de qualquer origem, tampouco as associações destas com extratos vegetais (BRASIL, 2010).

No período contemporâneo, o interesse pela fitoterapia aumentou de forma relevante entre usuários, pesquisadores e serviços de saúde. O crescimento da demanda por fitoterápicos pode estar relacionado a uma alternativa mais saudável e menos prejudicial de tratamento e também a uma insatisfação das pessoas associada à falta de acesso aos medicamentos sintéticos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006; ROSA, CÂMARA; BÉRIA, 2011).

Levando em consideração a qualidade e inocuidade de produtos vegetais, o principal órgão responsável pela regulamentação de plantas medicinais e seus derivados no Brasil é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), vinculada ao Ministério da Saúde, que tem como função proteger e promover a saúde da população garantindo a segurança sanitária de produtos e serviços além de colaborar com a construção de seu acesso (BRASIL, 1999). Uma das atividades realizadas pela ANVISA para garantir a segurança da saúde das pessoas é o registro de medicamentos, etapa em que esses produtos são avaliados quanto a sua segurança, eficácia e



qualidade antes de serem comercializados. Em 2008, através de um levantamento da ANVISA, foi verificado um total de 512 medicamentos fitoterápicos registrados, sendo 80 fitoterápicos associados e 432 simples, quer dizer, obtidos de derivados de apenas uma espécie vegetal. As principais formas farmacêuticas cadastradas (Figura 1) foram às cápsulas, seguidas de comprimidos, demonstrando desse modo, o predomínio das formas farmacêuticas sólidas no registro de fitoterápicos (CARVALHO et al., 2008).

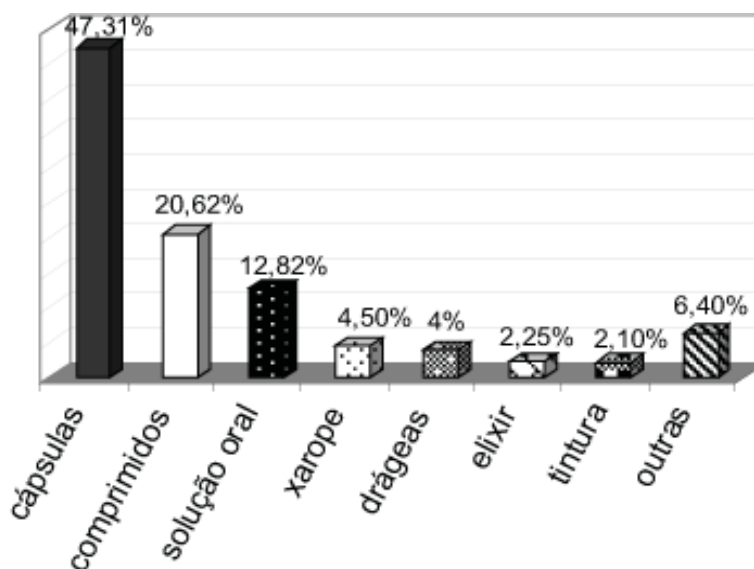


Figura 1: Formas farmacêuticas de medicamentos fitoterápicos registrados pela ANVISA

Fonte: Carvalho et al. (2008).

Embora a ANVISA seja responsável pela regulamentação de plantas medicinais e seus derivados, estudos sugerem que algumas vezes, os produtos fitoterápicos apresentam processos de avaliação de segurança e eficácia menos rigorosos e questionáveis, quando comparados com medicamentos comerciais. Acredita-se que se um medicamento à base de planta vem sendo utilizado a um longo período de tempo e não há registros de toxicidade, eles são considerados como seguros, quando usados adequadamente, em doses terapêuticas comuns (MOREIRA et al., 2014).

Contudo, a ausência de um registro de toxicidade de um determinado fitoterápico não é determinante para considerá-lo ausente de efeitos adversos. O tipo de toxicidade e os sinais clínicos podem contribuir para evidenciar os efeitos que o fitoterápico pode causar, quer dizer, se houver sintomas agudos e efeitos tóxicos (distúrbios gastrointestinais e efeitos dermatológicos) a curto prazo possivelmente estas reações estão associadas ao uso do fitoterápico porém, efeitos adversos a longo prazo tais como câncer, danos hepáticos, renais e disfunções reprodutivas, são mais difíceis de identificar, desse modo, dificilmente estão associadas ao uso popular de um medicamento fitoterápico (MOREIRA et al., 2014).

Os fitoterápicos possuem um papel importante no processo terapêutico, no entanto, a indicação desses produtos na medicina humana apresenta-se como uma alternativa a fim de aumentar as opções terapêuticas oferecidas pelos profissionais de saúde e

não como um substitutivo de medicamentos sintéticos registrados e distribuídos com eficácia assegurada, para as mesmas recomendações terapêuticas e ocasionalmente com indicações complementares as existentes, levando em consideração os preceitos éticos que regem o emprego de xenobióticos nos seres humanos (BRASIL, 1996).

Tendo em vista a riqueza da flora brasileira deveria existir um maior número de informações científicas que viabilizassem uma maior produção de medicamentos fitoterápicos, entretanto, implicações socioculturais e econômicas, ausência de estudos organizados e integrados e a pequena disponibilidade de dados científicos não possibilitaram ainda, a mudança desses recursos ao conceito atualizado de fitoterápico (RATES, 2001).

De acordo com Rates (2001) e Mekuria et al. (2017) são considerados como os principais problemas na utilização e implementação da fitoterapia no Brasil:

- Prescrição e dispensação desprovida de regulamentação: os fitoterápicos são produtos de venda livre e várias vezes, bonificados;
- A maior parte das plantas nativas ainda não analisada quanto a sua eficácia e segurança;
- A publicidade de que o natural não é prejudicial, excluindo a viabilidade de efeitos tóxicos ou reações adversas;
- Os cursos de graduação em medicina não apresentam em seus currículos, disciplinas específicas para a utilização desses recursos;
- O número reduzido de pesquisas farmacocinéticas que viabilizem a definição de posologias adequadas e o desenvolvimento de formas farmacêuticas modernas;
- A prevalência do uso de literatura promocional como meio de informação profissional, o que gera em uma baixa qualidade de informação oferecida ao usuário;
- A maioria das plantas com eficácia comprovada é exótica e/ou importada e até para estas, existem poucos achados científicos acerca de interações: fitoterápico x fitoterápico e fitoterápico x medicamento sintético;
- A produção regulamentada, porém com regulamentação não verdadeiramente implementada;
- A aceitação cultural e a ligação com crenças religiosas, independentes da comprovação da eficácia, com aumento considerável da utilização e comercialização de produtos inertes ou tóxicos;
- Falta de credibilidade quanto à eficácia dos medicamentos fitoterápicos na terapêutica e possíveis efeitos adversos.

Vale ressaltar, que é muito importante que os profissionais de saúde cada vez mais busquem orientar o usuário quanto ao uso de fitoterápicos da forma mais adequada possível, para isso faz-se necessário uma abordagem apropriada, para

que se possa entender suas reais necessidades e alternativas a serem oferecidas e de forma conjunta pode ser decidido a melhor conduta a ser realizada. É preciso ser proposto um ambiente, no qual o usuário se sinta a vontade e com confiança tanto para fornecer quanto para receber informações, fazendo com que o mesmo não sinta receio de ser “desaprovado” por estar se automedicando ou optando pelo uso de plantas medicinais para seu tratamento. É importante que o profissional de saúde haja de forma natural e agradável para realizar o aconselhamento correto ao paciente (BLENKINSOPP; PAXTON, 1998; RATES, 2001).

Além disso, Zheng et al. (2019) evidenciaram que há uma necessidade de haver esforços colaborativos entre os profissionais de saúde, autoridades governamentais, consumidores e institutos de pesquisa, de forma especializada e contínua, focando na segurança e eficácia dos produtos fitoterápicos, destacando a comunicação e colaboração interprofissional, o que resultará na transmissão de informações coerentes acerca da utilização de produtos a base de plantas.

## CONCLUSÕES

A caracterização e utilização de produtos fitoterápicos é uma abordagem de considerável relevância, posto que, o uso inadequado destes medicamentos pode ocasionar efeitos indesejáveis à saúde do consumidor. Para isso, é importante que as autoridades governamentais, profissionais de saúde e comunidade científica busquem informar a população em geral acerca dos potenciais riscos do uso indiscriminado de fitoterápicos, buscando assim, a promoção da saúde, o que viabiliza o uso adequado e seguro desses produtos.

## REFERÊNCIAS

ALVES, D. L.; SILVA, C. R. **Fitohormônios: abordagem natural da terapia hormonal**. São Paulo: Editora Atheneu, 105p., 2002.

BARRETO, B B. **Fitoterapia na Atenção Primária à Saúde: a visão dos profissionais envolvidos**. 2011, 93p. Dissertação (Mestrado em Saúde Coletiva) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, 2011.

BLENKINSOPP, A.; PAXTON, P. **Symptoms in the Pharmacy: A Guide to the Management of Common illness**. 3.ed. Oxford: Blackwell Science, 1998.

BRASIL. Ministério da Saúde. Conselho Nacional de Saúde. **Resolução n. 196/96**. Diário Oficial da União, v.201, seção I, p. 21082-21085, 1996.

BRASIL. **RDC n. 48 de 16 de março de 2004**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. ANVISA, 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução da Diretoria Colegiada da ANVISA. **RDC nº14 de 31/03/2010**. Registro de Medicamentos Fitoterápicos. ANVISA, 2010.

**CARVALHO, A.C.B. et al. Situação do registro de medicamentos fitoterápicos no Brasil. Revista Brasileira de Farmacognosia, v.18, n.2, p.314-319, 2008.**

DUTRA, M.G. **Plantas Medicinais, Fitoterápicos e Saúde Pública: um diagnóstico situacional em Anápolis, Goiás.** 112f. Dissertação (Mestrado – Área de Concentração em Sociedade, tecnologia e meio ambiente) - Centro universitário de Anápolis, UniEVANGÉLICA, Anápolis, 2009.

FIRMO, W.C. A. et al. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de pesquisa, v.18, p. 90-95, 2011.**

GIRALDI, M.; HANAZAKI, N. Uso e conhecimento tradicional de plantas medicinais no Sertão do Ribeirão, Florianópolis, SC, Brasil. **Acta Botânica Brasilica, v. 24, n. 2, p. 395-406, abril/junho 2010.**

GRIBNER, C; RATTMANN, Y. D.; GOMES, E. C. Fitoterápicos na Atenção Básica à saúde: uma experiência na região Sul do BRASIL. **Visão Acadêmica, v. 20, n. 2, p.4-16, 2019.**

MEKURIA, A.B. et al. Prevalence and associated factors of herbal medicine use among pregnant women on antenatal care follow-up at University of Gondar referral and teaching hospital, Ethiopia: a cross-sectional study. **BMC Complementary and Alternative Medicine, v.17, n.86, p.1-7.**

MOREIRA, D.L. et al. Traditional use and safety of herbal medicines. **Brazilian Journal of Pharmacognosy, v.24, p.248-257, 2014.**

RATES, S. M. K. Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia, v. 11, n. 2, p. 57-69, 2001.**

RODRIGUES, A. G.; DE SIMONI, C. Plantas medicinais no contexto de políticas públicas. **Informe Agropecuário, v. 31, n. 255, p. 7-12, 2010.**

ROSA, C.; CÂMARA, S.G.; BÉRIA, J.U. Representações e intenção de uso da fitoterapia na atenção básica à saúde. **Ciência & Saúde Coletiva, v.16, n.1, p.311-318, 2011.**

SILVA, M.I.G. et al. Utilização de fitoterápicos nas unidades básicas de atenção à saúde da família no município de Maracanaú (CE). **Revista Brasileira de Farmacognosia, v.16, n.1, p.455-62, 2006.**

TUROLLA, M.S.R.; NASCIMENTO, E.S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, v.42, n.2, 2006.**

ZAMBON, C. P. et al. O uso de medicamentos fitoterápicos no processo de emagrecimento em acadêmicos do curso de Farmácia da Faculdade de Educação E Meio Ambiente-FAEMA. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente, v. 9, p. 500-506, 2018.**

ZHENG, T. et al. Helthcare provider's role regarding the safe and appropriate use of herbal products by breastfeeding mothers: A systematic literature review. **Complementary Therapies in Clinical Practice, v.35, p. 131-147, 2019.**

## QUÍMICA E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTI-INFLAMATÓRIA, ANTIÚLCERA E ANTIMICROBIANA: *Machaerium eriocarpum* BENTH.

Data de aceite: 26/03/2020  
Data de submissão: 08/01/2020

### **Miriam Sannomiya**

Universidade de São Paulo, Escola de Artes,  
Ciências e Humanidades, São Paulo- SP, [https://  
orcid.org/0000-0003-3306-9170](https://orcid.org/0000-0003-3306-9170)

### **João Victor Joaquim Ruy**

Universidade de São Paulo, Escola de Artes,  
Ciências e Humanidades, São Paulo-SP, [http://  
lattes.cnpq.br/7252229223109127](http://lattes.cnpq.br/7252229223109127)

### **Luciana Sayuri Tahira**

Universidade de São Paulo, Escola de Artes,  
Ciências e Humanidades, São Paulo- SP, [http://  
lattes.cnpq.br/3560806165556042](http://lattes.cnpq.br/3560806165556042)

### **Charlyana Carvalho Bento**

Universidade de São Paulo, Escola de Artes,  
Ciências e Humanidades, São Paulo- SP, [http://  
lattes.cnpq.br/3921637401370002](http://lattes.cnpq.br/3921637401370002)

### **Marcelo Marucci Pereira Tangerina**

Universidade de São Paulo, Instituto de Biologia,  
Departamento de Botânica, São Paulo-SP, [http://  
lattes.cnpq.br/1958613439965014](http://lattes.cnpq.br/1958613439965014)

### **Ângela Lúcia Bagnatori Sartori**

Universidade Federal do Mato Grosso do  
Sul, Instituto de Biociência, Departamento de  
Botânica, Campo Grande-MS, [http://lattes.cnpq.  
br/8767219552990019](http://lattes.cnpq.br/8767219552990019)

### **Taís Maria Bauab**

Universidade Estadual Paulista, Faculdade  
de Ciências Farmacêuticas, Departamento de

Ciências Biológicas, Araraquara-SP, [http://lattes.  
cnpq.br/4910754838277580](http://lattes.cnpq.br/4910754838277580)

### **Clélia Akiko Hiruma-Lima**

Universidade Estadual Paulista, Instituto  
de Biociências, Departamento de  
Fisiologia, Botucatu-SP, [http://lattes.cnpq.  
br/3814504901386844](http://lattes.cnpq.br/3814504901386844)

### **Wagner Vilegas**

Universidade Estadual Paulista, Campus  
litoral, São Vicente-SP, [http://lattes.cnpq.  
br/7927877224326837](http://lattes.cnpq.br/7927877224326837)

**RESUMO:** *Machaerium eriocarpum* Beth. (Fabaceae) é popularmente reconhecida como “Angiquinho” e “Espinheira-Santa”. Sua ocorrência no Brasil se restringe às vegetações do Cerrado, Pantanal e Chaco. Esta espécie é empregada como planta medicinal no tratamento de úlceras e inflamações. Neste trabalho foi realizado o estudo químico e bem como biológico do extrato hidroetanólico das folhas de *M. eriocarpum*. As análises dos dados obtidos de espectrometria de massas (FIA-ESI-MS) do extrato permitiram identificar a presença de isovitexina, apigenina 4'-metóxi-8-C-β-D- glicopiranosídeo, apigenina 6-C-glicosil-7-O-β-D-glicopiranosídeo, 4' -metóxi-5,7,3',5' - tetrahidróxi-6-glicosil-flavona e ácido quínico. O extrato hidroetanólico apresentou efeito anti-inflamatório na dose de 125 mg/Kg. O extrato



hidroetanólico mostrou inativo no ensaio antiúlcera através do modelo de etanol absoluto nas doses de 125 e 250 mg/Kg. A avaliação da atividade antimicrobiana da isovitexina e da apigenina padrão frente a *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Samonella* sp e *Escherichia coli*. Indicou que a isovitexina é mais ativa que a apigenina frente a *H. pylori* e *C. albicans*.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Machaerium*, jacarandá, flavonas C-glicosiladas, atividade anti-inflamatória, atividade antimicrobiana

#### CHEMISTRY AND ANTI-INFLAMMATORY, ANTIULCER AND ANTIMICROBIAL ACTIVITIES EVALUATION: *Machaerium eriocarpum* BENTH.

**ABSTRACT:** *Machaerium eriocarpum* Benth. (Fabaceae) is popularly recognized as “Angiquinho” and “Espinheira-Santa”, occurring in Brazil only in Cerrado, Pantanal and Chaco vegetations. This species is used as medicinal plant on ulcer and inflammation treatments. In this work both the chemical and biological studies of hydroethanolic extract of *M. eriocarpum* leaves was performed. Mass spectrometry data acquired by FIA-ESI-MS analysis allowed the identification of isovitexin, apigenin-4'-methoxy-8-C- $\beta$ -D-glucopyranoside, apigenin-6-C-glucosyl-7-O- $\beta$ -D-glucopyranoside, 4'-methoxy-5,7,3',5'-tetrahydroxy-6-glucosyl-flavone and quinic acid. The hydroethanolic extract showed anti-inflammatory effect at 125 mg/kg did not show antiulcer activity using the absolute ethanol- induce model at concentrations of 125 e 250 mg/kg.. Antimicrobial activity evaluation of isovitexin and apigenin standard against *Helicobacter pylori*, *Candida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Samonella* sp and *Escherichia coli* indicated that isovitexin is more active than apigenin against *H. pylori* and *C. albicans*.

**KEYWORDS:** *Machaerium*, jacarandá, C-glycosylated flavones, anti-inflammatory activity, antimicrobial activity

## INTRODUÇÃO

*Machaerium* Persoon é um gênero neotropical com cerca de 130 espécies. É um dos maiores gêneros arbóreos tropicais da subfamília Papilionoideae. Compreende espécies de plantas de hábito arbóreo e arbustivo-escandente (POLIDO & SARTORI, 2011). Algumas destas têm uma importância econômica por fornecer madeira-de-lei conhecida como “jacarandá”. Espécies que dispõem o caule lenhoso e rígido são empregadas em marcenarias, enquanto as de lenho menos rígido e leve são utilizadas na fabricação de rolhas, afiadores de navalha e também em pequenas peças artesanais (BASTOS, 1987).

Algumas espécies são de uso etnofarmacológico, dentre elas *Machaerium eriocarpum* Benth., cujas entrecascas são utilizadas popularmente no tratamento de inflamações (POTT & POTT, 2004). É comumente conhecida como “Espinheira” e “Jacarandá”. Possui sinonímia com as seguintes espécies *Machaerium martii* Tul. e *M.*

*spinosum* Micheli (FILARDI, 2015).

Espécies pertencentes a este gênero produzem principalmente flavonóides (SEO et al., 2001; DONELLY, 1982; IMAMURA et al., 1982; KUROSAWA et al., 1978; OLLIS et al., 1978; OLIVEIRA et al., 1968; OLLIS et al., 1968; BENTO et al., 2018; RIBEIRO et al., 2016). Até o dado momento somente três espécies deste gênero tiveram seus estudos com base em extratos de alta polaridade envolvendo seus materiais vegetais. O extrato etanólico das raízes de *M. aristulatum* e bem como suas isoflavonas apresentaram atividade anti-giardial (EL SOHLY et al., 1999). A partir do extrato alcóolico das raízes e galhos de *M. floribundum* foi isolada uma procianidina com ação antibacteriana frente à *Pseudomonas maltophilia* (WAAGE et al., 1984). De acordo com RIBEIRO e colaboradores (2016) o extrato hidroetanólico das folhas de *M. hirtum* apresentaram seis C-flavonas glicosiladas sendo quatro delas derivadas da apigenina e duas da luteolina. O estudo químico do extrato hidroetanólico das folhas de *M. eriocarpum* resultaram no isolamento de isovitexina, apigenina 4'-metóxi-8-C-β-D-glicopiranosídeo, 4'-metóxi-5,7,3',5'-tetrahidroxi-6-glicosil-flavona e apigenina-6-C-glicosil-7-O-β-D-glicopiranosídeo, bem como na atividade alelopática da isovitexina e deste extrato frente a sementes de sorgo (BENTO et al., 2018). Como FIA-ESI-IT-MS trata-se de uma técnica extremamente versátil por ser direta e rápida na identificação de constituintes em extratos vegetais, o intuito deste trabalho foi obter uma análise qualitativa do extrato hidroetanólico das folhas de *M. eriocarpum* e avaliar seu potencial anti-inflamatório, antiulcerogênico e antimicrobiano.

## PARTE EXPERIMENTAL

O material vegetal de *Machaerium eriocarpum* Benth. Foi coletado em Savana estépica arborizada ou Chaco arborizado no município de Porto Murtinho-MS, pela botânica Ângela Lucia Bagnatori Sartori da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul. A exsiccata encontra-se depositada no Herbário CGMS (CGMS 411323).

O material foi seco em estufa a 40 °C e moídos em moinho de facas com um tamanho médio de partícula de 1 a 3 mm.

As folhas de *M. eriocarpum* foram submetidas à percolação simples pelo método de extração exaustivo segundo PRISMA, (1995). O processo teve início com o intumescimento prévio de aproximadamente 700 g do pó com 4 L de etanol 70% (V/V). Em seguida, o percolador foi empacotado com a mistura (pó + EtOH 70%) de forma mais homogênea possível, respeitando a proporção 4:1 (cada 4 referente ao percolador 1 do pó da espécie) em relação ao tamanho do percolador. A vazão do percolador foi ajustada para aproximadamente 30 gotas/min.

Após a extração, o solvente foi rota-evaporado sob pressão reduzida em temperatura de 42 °C e armazenado em frasco âmbar vedado. Após esse processo foi determinado o rendimento do extrato das folhas (15,1%).

Os espectros de massas foram realizados em espectrômetro de massas LCQ FLEET (ESI-IT-MS<sup>n</sup>, Thermo Scientific®), equipado com dispositivo de inserção direta da amostra via análise por injeção em fluxo contínuo (FIA).

As matrizes estudadas foram analisadas no modo de ionização por *electrospray* (ESI) e as fragmentações em múltiplos estágios (MS<sup>n</sup>) realizadas em uma interface do tipo *ion-trap* (IT). O modo negativo foi escolhido para a geração e análise dos espectros de massas em primeira-ordem (MS), bem como para os demais experimentos em múltiplos estágios, sob as seguintes condições: voltagem do capilar -4 V, voltagem do spray -5 kV, temperatura do capilar 280 °C, gás de arraste (N<sub>2</sub>) fluxo 60 (unidades arbitrárias). A faixa de aquisição foi *m/z* 50-2000, com dois ou mais eventos de varredura realizados simultaneamente no espectrômetro de massas LCQ.

O primeiro evento foi uma varredura completa (*full-scan*) do espectro de massas para adquirir os dados dos íons na faixa *m/z* estabelecida. Os demais eventos foram experimentos MS<sup>n</sup> realizados a partir dos dados da primeira varredura para íons precursores pré-selecionados com energia de colisão entre 25 e 30% da energia total do instrumento.

O software *Xcalibur* (Thermo Scientific®) foi utilizado durante a aquisição e processamento dos dados espectrométricos.

### *Ensaio biológicos*

*Edema de Orelha Induzido por Ácido Araquidônico (AA)* (YOUNG *et al.*, 1984 com modificações).

Para avaliar a participação do AA na ação anti-inflamatória do extrato hidroetanólico das folhas de *M. eriocarpum*, foi utilizado o modelo experimental de indução de edema com o uso tópico do AA. Para indução desse edema de orelha, 20 µL de AA diluído em acetona na concentração de 2 mg/20 µL, foram aplicados topicamente na orelha direita dos camundongos machos (10 µL na face anterior da orelha, 10 µL na face posterior). A orelha esquerda foi utilizada como controle. Os animais (n=8-10), submetidos ao jejum por 2 horas, foram tratados 2 horas antes da indução do edema com dexametasona (5 mg/kg, i.p) e uma hora antes da indução do edema tratados oralmente com veículo (salina) ou extrato hidroalcoólico das folhas de *M. eriocarpum* (125 e 250 mg/kg). Após uma hora da indução do edema, os animais foram mortos e foi retirada uma secção circular (7 mm de diâmetro) de suas orelhas esquerda e direita com o auxílio de um puncher (perfurador). Logo em seguida as orelhas foram pesadas e o edema foi expresso pela diferença de massa (mg) entre a orelha direita e a orelha esquerda.

### *Indução de úlcera gástrica por etanol absoluto*

Baseado no modelo descrito por ROBERT *et al.*, (1979) com modificações, ratos machos *Wistar* foram divididos aleatoriamente em grupos e pesados para seus respectivos tratamentos (salina 0,9 %, carbenoxolona (100 mg/kg) e droga-teste (curva dose-resposta). Cada tratamento foi administrado por via oral em dose volume de 10 mL/kg. Decorridos 60 minutos, 1 mL do agente lesivo (etanol P.A.) foi aplicado em todos os animais. Transcorridas uma hora deste tratamento, todos os animais foram mortos e os estômagos analisados para a obtenção da área das lesões gástricas utilizando-se o programa AvSoft BioView.

#### *Avaliação da atividade antimicrobiana*

Foram utilizadas cepas padrões de *Helicobacter pylori* ATCC 43504, *Salmonella* sp ATCC 19196, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923, *Escherichia coli* ATCC 25922 e *Candida albicans* ATCC 10231.

#### *Determinação da Concentração Inibitória Mínima - CIM*

A CIM foi determinada pela técnica de diluição em microplacas (96 orifícios) de acordo com a metodologia descrita na norma M7-A6 do *Manual Clinical and Laboratory Standards Institute* (2006a) para as bactérias aeróbicas (*E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* sp) e adaptado para as fastidiosas (*H. pylori*) seguindo suplemento M100-S16 do CLSI (2006b) com modificações (SPÓSITO *et. al.*, 2019). Para a *Candida albicans* foi utilizada a metodologia descrita na norma M27-A3 do CLSI (2008).

Os orifícios das microplacas foram preenchidos com 100 µL de caldo Muller-Hinton nos testes com as bactérias e RPMI-1640 para a levedura. Os extratos vegetais foram diluídos (1000 a 7,8 µL) e acrescentados aos orifícios das microplacas. Adicionalmente foram colocados 20 µL das suspensões dos microrganismos diluídos adequadamente  $1,0 \times 10^8$  UFC/mL de bactérias e  $5 \times 10^6$  UFC/mL de leveduras. Como controle positivos foram utilizados a anfotericina B (32 µg/mL), fluconazol (256 µg/mL), amoxicilina (100 µg/mL) e ampicilina (50 µg/mL). Os testes foram realizados em triplicata.

As microplacas foram incubadas em estufa a 37°C por 24 horas para *E. coli*, *S. aureus* e *Salmonella* sp; 48 horas para *C. albicans* e 72 horas sob condição de microaerofilia para *H. pylori*.

A leitura dos testes foi realizada utilizando resazurina a 100 µg/mL nos testes com bactérias e 2,3,5-trifeniltetrazólio (TTC) a 2% com levedura.

## **RESULTADOS E DISCUSSÃO**

A fim de se ter um panorama geral da composição química do extrato foi realizada a análise por ESI-MS. Foram realizados experimentos MS<sup>n</sup> dos picos majoritários a fim de obter dados adicionais que permitissem obter mais informações sobre as estruturas

das substâncias.

Os picos apresentados pelo espectro de massas foram comparados com substâncias já isoladas e identificadas anteriormente. Através da fragmentação nos experimentos de MS<sup>2</sup> para os compostos 1-5 foram observados fragmentos característicos referentes à quebra interna da unidade de açúcar, com perdas de 120 Da e 90 Da a partir do íon molecular, indicando hexoses C-glicosiladas (CUYCKENS & CLAEYS, 2004).

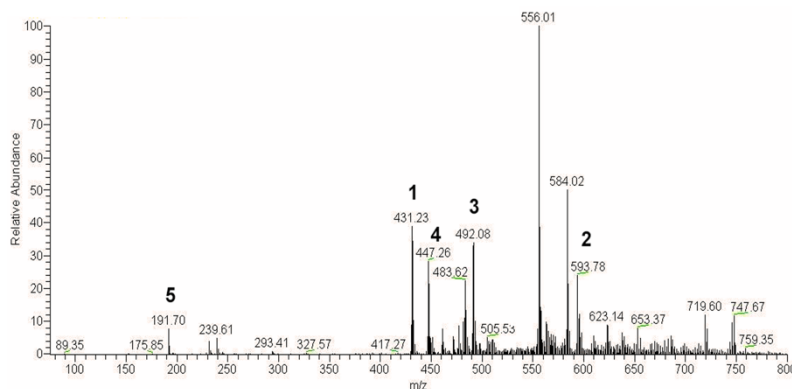


Figura 1: Espectro de massas em *full-scan* do extrato bruto hidroalcoólico de folhas de *M. eriocarpum* (FIA – ESI – IT, modo negativo)

A confirmação de que o pico 1 (Figura 1) corresponde à apigenina-6-C-β-D-glucopiranosídeo, se dá através dos fragmentos de  $m/z$  431 Da [M-90-H] e  $m/z$  311 Da [M-120-H], os quais indicam a presença de uma hexose C-glicosilada ligada à aglicona. Hexoses C-glicosiladas sofrem perdas de 134 Da, 120 Da e 90 Da, devido às quebras internas do açúcar devido à ligação C-C do açúcar com a aglicona ser forte (CUYCKENS & CLAEYS, 2004).

De modo análogo ocorreu a confirmação do apigenin 6-C-glucosyl-7-O-β-D-glucopyranoside, 2. O fragmento de  $m/z$  593 refere-se ao íon pseudo-molecular. E A fragmentação do íon precursor de  $m/z$  593, fornece o íon produto de  $m/z$  311 Da [M-162-120-H], permitindo inferir que a mesma se trata de um derivado de apigenina contendo uma O-hexose e uma C-hexose.

O pico 3 de  $m/z$  492 juntamente com os fragmentos de  $m/z$  401 e 371 referem-se às perdas de 90 e 120 unidades, as quais denotam a presença de outro derivado de tricina contendo uma C-hexose, 4'-metóxi-5,7,3',5' - tetrahidróxi-6-glicosil-flavona, 3.

A presença de outra apigenina pode ser evidenciada através do íon pseudomolecular de  $m/z$  447, juntamente com os fragmentos de  $m/z$  357 e 327, os quais indicam a presença de uma C-hexose ligada a este derivado, apigenina-4'-metóxi-8-C-glicosídeo, 4.

No espectro em *full-scan* do extrato de *M. eriocarpum* (Figura 1), observa-se o fragmento de  $m/z$  191. Como a presença de ácidos fenólicos é muito comum em extratos polares de plantas, realizou-se a injeção do padrão de ácido quínico 4



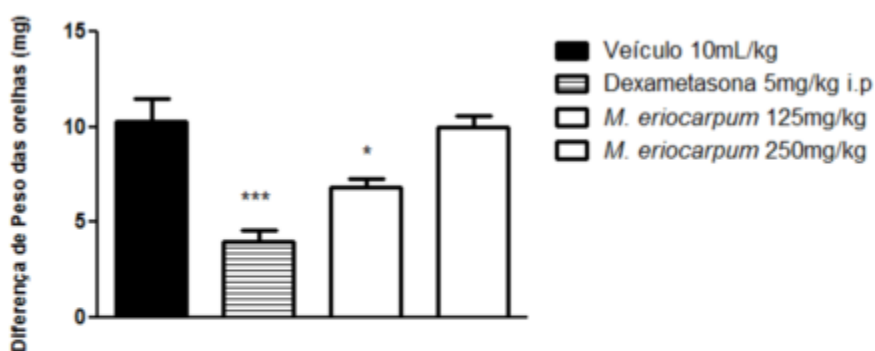
(Aldrich). A comparação do padrão de fragmentação do ácido quínico e do espectro de segunda ordem do íon precursor de  $m/z$  191 sugere-se que estes se referem ao mesmo composto. A fragmentação  $MS^2$  forneceu os íons produtos de  $m/z$  85, 93, 111, 127, 173.

Constituinte	$m/z$ [M-H] <sup>-</sup>	Fragmentação $MS^n$
1	431	323; 313; 179; 161
2	593	473; 431; 341; 311
3	491	473; 401; 371
4	447	429; 357; 327
5	191	173; 127; 111; 93; 85

Tabela 1: Substâncias propostas através da análise do espectro de massas em *full-scan* do extrato bruto hidroalcoólico de folhas de *M. eriocarpum*

Foi utilizado o modelo experimental inflamatório de edema de orelha induzido por ácido araquidônico para avaliar o efeito da *M. eriocarpum*. Trata-se de um modelo é estratégico e interessante, pois é mais específico e avalia a cascata inflamatória gerada pela ação das enzimas cicloxigenase e lipoxigenase sobre o ácido araquidônico produzindo prostaglandinas, prostaciclina e leucotrienos, importantes eicosanóides envolvidos na inflamação e dor inflamatória.

No modelo do edema de orelha induzido pela aplicação tópica de ácido araquidônico, os animais foram tratados com o extrato de *M. eriocarpum* nas doses 125 e 250 mg/kg. Os resultados mostram um bom efeito anti-inflamatório na dose de 125 mg/kg v.o. (Figura 2). Porém não foi observado sob a dose de 250 mg/kg.



Avaliação do efeito anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico de *M. eriocarpum* (125, 250 mg/kg v.o) no modelo de edema de orelha induzido pelo ácido araquidônico. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M (n=8-10) e a significância estatística foi determinada por ANOVA seguida de teste de Dunnet; \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.001$ . Porcentagem corresponde à redução da média da diferença de peso (mg) das orelhas em relação ao grupo controle (veículo).

Figura 2: Avaliação do efeito anti-inflamatório do extrato hidroalcoólico das folhas de *M. eriocarpum* a partir da diferença de peso (mg) das orelhas em relação ao grupo controle

### Ensaio de anti-úlceras

O extrato etanólico 70% das folhas de *M. eriocarpum* foram submetidas ao ensaio de anti-úlceras através do modelo induzido por etanol absoluto nas concentrações de 125, 250 e 500 mg/kg (Figura 3). Utilizou-se como controle negativo, solução salina e positivo o fármaco carbenoxolona (100 mg/kg).

### Modelo de úlcera gástrica induzida por etanol absoluto (Robert et al., 1979 com modificações)

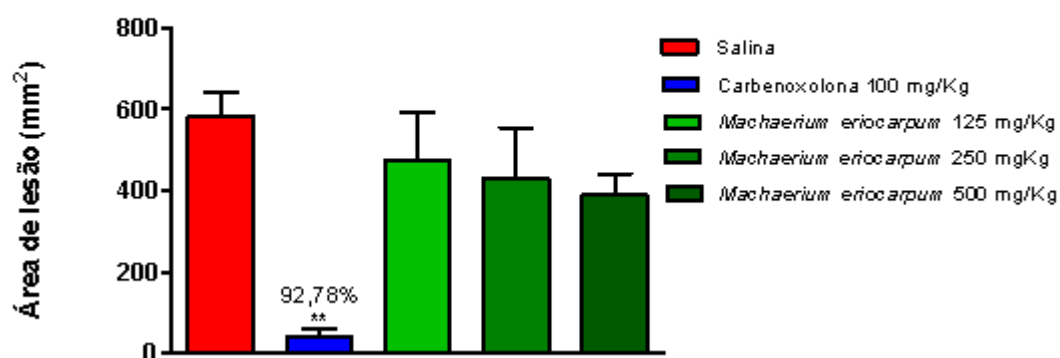


Figura 3: Os números em porcentagem indicam a proteção em relação ao grupo veículo.

Os resultados estão expressos na forma de média  $\pm$  erro padrão da média. ANOVA com teste a posteriori de Dunnet com  $**p < 0,01$ .

De acordo com os dados ilustrados acima (Figura 3) o extrato de *M. eriocarpum* avaliado não apresenta atividade antiulcerogênica no modelo de úlcera induzida por etanol em nenhuma das doses testadas.

#### Ensaio antimicrobiano

Como no extrato hidroetanólico das folhas foram identificados derivados da apigenina, e a isovitexina havia sido isolada previamente deste extrato por Bento e colaboradores (2018), os ensaios antimicrobianos envolveram a avaliação do potencial da isovitexina e da apigenina frente a *H. pylori*, *Salmonella sp*, *S. aureus*, *E. coli* e *C. albicans* (Tabela 2).

Microrganismo \ Amostra	<i>Helicobacter pylori</i>	<i>Salmonella sp</i>	<i>Staphylococcus aureus</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Candida albicans</i>
apigenina	250	>1000	500	1000	1000
isovitexina	62,5	>1000	500	1000	250

Tabela 2: Valores da Concentração Inibitória Mínima ( $\mu\text{g/mL}$ ) da isovitexina isolada do extrato hidroetanólico das folhas de *M. eriocarpum*.

Os resultados ilustrados nesta Tabela 2 demonstram a maior atividade antimicrobiana da isovitexina em relação à apigenina frente à *Helicobacter pylori* e uma boa atividade desta mesma flavona frente à *Candida albicans*. Estes dados mostram que a presença da C-glicose na posição 6 do esqueleto flavonoídico favorece a atividade antimicrobiana frente a estes dois microrganismos.

## CONCLUSÕES

O estudo químico do extrato por FIA-ESI-MS permitiu identificar cinco compostos, sendo eles isovitexina, apigenina 4'-metóxi-8-C- $\beta$ -D- glicopiranosídeo, apigenina 6-C-glicosil-7-O- $\beta$ -D-glicopiranosídeo, 4' -metóxi-5,7,3',5' - tetrahidróxi-6-glicosil-flavona e ácido quínico.

Os resultados obtidos indicam que o extrato hidroalcoólico de *M. eriocarpum* apresenta o efeito anti-inflamatório na dose de 125 mg/kg. Os resultados mostraram que no modelo de úlcera induzida por etanol não apresentou atividade em nenhuma das doses testadas (125 e 250 mg/kg).

O ensaio da atividade antimicrobiana com uma das C-flavonas isoladas do extrato de *M. eriocarpum* e a apigenina frente a diferentes microrganismos mostrou uma efetiva atividade antimicrobiana da isovitexina em relação à apigenina frente à *Helicobacter pylori* e frente à *Candida albicans*. Estes resultados sugerem a presença da C-glicose na posição 6 do esqueleto flavonoídico favorece a atividade antimicrobiana frente a estes dois microrganismos. Estes dados sugerem que a possível ação anti-inflamatória do extrato esteja relacionado com a ação antimicrobiana frente à *H. pylori* das flavonas ali presentes.

## AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem ao suporte financeiro concedido pela FAPESP (Nº 2009/16147-5) e a bolsa de estudo para Charlyana Carvalho Bento (Fapesp Nº 2011/09568-4).

## REFERÊNCIAS

BASTOS, M. N. C. **Contribuição ao estudo sistemático de algumas espécies do gênero *Machaerium Persoon* (Leguminosae-Papilionoideae) ocorrentes na Amazônia**

**Brasileira.** Boletim do Museu Paraense Emílio Goeldi. Série Botânica, Belém, v. 3, p. 183-278, 1987.

BENTO, C.C. et al. **Chemical constituents and allelopathic activity of *Machaerium eriocarpum* Benth.**, Natural Product Research, 2018. DOI: 10.1080/14786419.2018.1508136

CLSI, Clinical and Laboratory tandars Institute. **Methodos for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards.** Manual clinical and laboratory standards intitute - 6 ed. Document M7-A6 performance standards for antimicrobial susceptibility testing. Pennsylvania, 2006a.

CLSI, Clinical and Laboratory tandars Institute. **Methodos for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically; approved standards.** Manual clinical and laboratory standards intitute - 6 ed. Performance standards for antmicrobial susceptibility testing. Sixteenth informal supplement M100-S16 (tab 2J). Pennsylvania, 2006b.

CLSI, Clinical and Laboratory tandars Institute. **Reference methods for broth dilution antifungal susceptibility test for yeasts; approved standards.** Manual clinical and laboratory standards intitute, CLSI document M27-A3, Pennsylvania, 2008.

CUYCKENS, F.; CLAEYS, M. **Mass spectrometry in the structural analysis of flavonoids.** Journal of Mass Spectrometry. 39, 1-15. 2004.

DONELLY, D. M. **Studies in Organic Chemistry (Amsterdam)**, Dublin: University College Dublin. Volume Date 1981, 11 (Flavonoids Bioflavonoids), p. 263-78, 1982.

EL SOHLY, H. N.; JOSHI, A. S.; NIMROD, A. C. **Antigiardial isoflavones from *Machaerium aristulatum*.** Planta Medica 65: 490, 1999.

FILARDI, F.L.R. 2015 ***Machaerium in*** Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB29766>>. Acesso em: 07/01/2020.

IMAMURA, H. et al. **A benzoquinone and two isoflavans from the heartwood of *Machaerium sp.* (Leguminosae).** *Mokuzai Gakkaishi* 28:174-178, 1982.

KUROSAWA, K. *et al.* **Isoflavonoid constituents of *Dalbergia* and *Machaerium* species.** Part 3. Vestitol and vesticarpan, isoflavonoids from *Machaerium vestitum*. *Phytochemistry* 17: 1413-15, 1978.

OLIVEIRA, A. B.; GOTTLIEB, O. R.; OLLIS, W. D. **Chemistry of Brazilian Leguminosae. XVII.** Constituents of *Machaerium villosum*. 2. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 40:147-50, 1968.

OLLIS, W. D. et al. **Neoflavanoids from *Machaerium kuhlmannii* and *Machaerium nictitans* and the recognition of a new neoflavanoid type, the neoflavenes.** *Chemical Communications.* 22: 1392-1393, 1968.

OLLIS, W. D. et al. **Neoflavanoid group of natural products. Part 5. Petrostyrene, a cinnamylphenol from *Machaerium acutifolium*.** *Phytochemistry* 17: 1379-1381, 1978.

POLIDO, C. D. A., SARTORI, A. L. B. **O gênero *Machaerium* (Leguminosae-Papilionoideae - Dalbergieae) no Pantanal Brasileiro.** *Rodriguesia.* 62 (1):107–122, 2011.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal.** Brasília Embrapa, p. 175-176, 2004.

PRISTA, L.N. **Tecnologia farmacêutica.** VI e II, 5º ed. Fundação Calouste Gulbenkian, 1995.

RIBEIRO, D.L. et al. **Chemical and biological characterisation of *Machaerium hirtum* (Vell.) Stellfeld: absence of cytotoxicity and mutagenicity and possible chemopreventive potential.** *Mutagenesis*, 31: 147-60, 2016.

ROBERT, A. et al. **Cytoprotection by prostaglandins in rats. Prevention of gastric necrosis produced by alcohol, HCL, NaOH. Hypertonic NaCl and thermal injury.** *Gastroenterology*, 77: 433 - 443, 1979.

SEO, E. K. et al. **Macharistol, a new cytotoxic cinnamylphenol from the stems of *Machaerium aristulatum*.** *Journal of Natural Products*, 64: 1483 -1485, 2001.

SPÓSITO, L. et al. ***In vitro* and *in vivo* anti-*Helicobacter pylori* activity of *Casearia silvestris* leaf derivatives.** *Journal of Ethnopharmacology*, 233: 1-5, 2019.

WAAGE, S. K.; HEDIN, P. A.; GRIMLEY, E. **A biologically-active procyanidin from *Machaerium floribundum*.** *Phytochemistry*, 23: 2785 - 2787, 1984.

YOUNG, J. M. et al. **The mouse ear inflammatory response to topical arachidonic acid.** *Journal of Investigative Dermatology*, 82: 367 - 371, 1984.



## EFFECT OF FROZEN STORAGE ON THE COMPOSITION OF ESSENTIAL OILS FROM ARAÇÁ, MAROLO AND MIXED PULPS

Data de aceite: 26/03/2020

Data de submissão: 12/02/2020

### **Ruver Rodrigues Feitosa Ramalho**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Química

Goiânia – Goiás

[http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/  
visualizacv.do?id=K4487399Z3](http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4487399Z3)

### **Clarissa Damiani**

Universidade Federal de Goiás, Escola de  
Agronomia

Goiânia – Goiás

[http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/  
visualizacv.do?id=K4771335D2](http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4771335D2)

### **Suzana da Costa Santos**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Química

Goiânia – Goiás

[http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/  
visualizacv.do?id=K4793945U9](http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4793945U9)

### **Pedro Henrique Ferri**

Universidade Federal de Goiás, Instituto de  
Química

Goiânia – Goiás

[http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/  
visualizacv.do?id=K4785526A5](http://buscatextual.cnpq.br/buscatextual/visualizacv.do?id=K4785526A5)

### EFEITO DO ARMAZENAMENTO CONGELADO NA COMPOSIÇÃO DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE POLPAS DE ARAÇÁ, MAROLO E MISTA

**RESUMO:** Frutos exóticos do Cerrado brasileiro como araçá (*Psidium guineense*) e marolo (*Annona crassiflora*) são comercializados em feiras regionais como polpas cujo consumo está aumentando continuamente devido à preferência do consumidor por hábitos alimentares saudáveis. Neste trabalho, os óleos essenciais (OEs) de polpas de araçá, marolo e mista (1:1) foram investigados visando avaliar se o armazenamento congelado por 12 meses preserva a qualidade geral das polpas frescas. Os OEs foram obtidos por hidrodestilação e analisados por CG-DIC e CG-EM. Os hidrocarbonetos sesquiterpênicos constituíram os principais constituintes do araçá, enquanto ésteres foram majoritários no marolo. A polpa mista preservou os voláteis das polpas originais, com uma leve tendência aos voláteis do marolo. Alguns poucos constituintes minoritários só ocorrem nessa polpa. A análise por redundância (RDA) resultou em 89,2% de variância explicada. A RDA1 separou as polpas do araçá (terpenos) daquelas do marolo (ésteres), enquanto a RDA2 estabeleceu os

constituintes minoritários associados com a polpa mista. A curva de resposta principal (PRC) mostrou que a variabilidade nos OEs foi causada majoritariamente pela origem da polpa (87,8%) com pouca influência do tempo de armazenamento (2,3%). Assim, as polpas congeladas armazenadas por 12 meses se assemelharam a polpas frescas, com pequenas alterações em alguns constituintes e retiveram os constituintes voláteis semelhantes aos frutos frescos.

**PALAVRAS-CHAVE:** Frutos exóticos, frutos processados, variabilidade química, voláteis.

**ABSTRACT:** Brazilian Cerrado exotic fruits such as araçá (*Psidium guineense*) and marolo (*Annona crassiflora*) are sold at regional fairs as pulps, whose consumption is on the rise due to consumer preference for healthy eating habits. In this study, essential oils (EOs) from araçá, marolo and mixed (1:1) pulps were examined to assess whether a 12-month frozen storage preserves the overall quality of fresh pulps. EOs were obtained by hydrodistillation and analyzed by GC-FID and GC-MS. Sesquiterpene hydrocarbons were the main constituents in araçá, whereas esters were the main constituents in marolo. Volatiles from original pulps were preserved in the mixed pulp, with a closer association with marolo. Few minor constituents are found only in this pulp. Redundancy analysis (RDA) resulted in 89.2% of explained variance. RDA1 separated araçá pulp (terpenes) from those of marolo (esters), while RDA2 established minor chemical constituents associated with the mixed pulp. Principal response curves (PRC) showed that chemovariation in EOs was mainly caused by pulp origin (87.8%), with storage time playing a minor role (2.3%). Pulps that were stored frozen for 12 months resembled fresh pulps, with small changes in some constituents, and retained volatiles, similarly to fresh fruit.

**KEYWORDS:** Exotic fruits, processed fruit, chemical variability, volatiles.

## 1 | INTRODUCTION

The Brazilian Cerrado has a rich biodiversity and is home to species whose fruits have a high nutritional value. Currently more than 58 species of native fruits are found in the region, which ensures food diversification and enrichment for the local population (AQUINO & OLIVEIRA, 2006). However, most fruits are highly perishable, with seasonal and extractive production (FINCO et al., 2012). As an alternative to increase shelf life, artisanal fruit processing seeks to prevent postharvest loss and offers a differentiated product for consumption. Among the native fruits viewed as commercially exploitable are araçá (*Psidium guineense* Sw.) and marolo (*Annona crassiflora* Mart.), particularly due to their pleasant sensory characteristics and nutritional and functional potential. Moreover, they are well received by consumers both in natura and in the processed form of pulps, jams, ice creams and juices (ARRUDA & PASTORE, 2019; FRANZON et al., 2009).

A product's shelf life is determined by how long it remains in good sensory and microbiological conditions for consumption, without compromising taste and health. These conditions depend on physical, chemical and microbiological transformations during technological processing and storage (SILVA & ABUD, 2017). Essential oils (EOs), generally safe (ECFR, 2019) and widely known for their antimicrobial activity (TONGNUANCHAN & BENJAKUL, 2014), are alternatives to synthetic preservatives in increasing shelf life. In this scenario, processed frozen pulps acquire special importance, since they maintain sensory appeals such as exotic aroma and flavor, combined with the microbiological control promoted by EOs. In fact, frozen pulp storage is one way of preserving fruit freshness with maximum food safety and a substantial increase in shelf life (SILVA & ABUD, 2017), although these qualities are affected during storage.

Previous studies have shown that *P. guineense* pulp extracts have antibacterial activity (ANESINI & PEREZ, 1993; GONZÁLEZ et al., 2005) and terpenes or esters as major volatiles (PERALTA-BOHÓRQUEZO et al., 2010). EOs from marolo have mainly terpenes (SIRENA et al., 2014). In turn, fresh pulp show changes in terpene and ester compositions, with only esters at the end of fruit ripening (SILVA et al., 2013), whereas lyophilized pulp provides esters and alcohols as its main constituents (BEZERRA et al., 2018). Some studies have indicated that pulp extracts have antioxidant, antimicrobial, molluscicide and anti-Alzheimer activity (ARRUDA & PASTORE, 2019).

To our knowledge, the effects of frozen storage on the volatile profile of these pulps have so far not been described. Therefore, this study aims to assess whether the frozen storage of araçá, marolo and mixed (1:1) pulps could be a suitable means of preserving the overall quality of fresh fruits, with emphasis on the variability of EOs analyzed over a one-year period.

## 2 | MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Fruit Collection, Pulp Preparation and Frozen Storage

Ripe fruits of araçá and marolo were respectively collected in March 2007 in Ingaí and Contagem, both cities in Minas Gerais state, Brazil. Fruits were selected, prewashed, sanitized in sodium hypochlorite solution (100 mg/L, 20 min) and pulped using stainless steel spoons. Fresh pulp was packed in low density polyethylene bags (100 g/package) using a manual dispenser and immediately sealed after air expulsion. Sealed bags were frozen and stored in a freezer (-18°C) for 12 months.

### 2.2 Extraction and Analysis of Essential Oils (EOs)

Pulps in frozen storage for 0, 2, 4, 6, 8 and 12 months were thawed at room temperature and EOs were extracted by hydrodistillation in a Clevenger apparatus (2 h), dried with anhydrous Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> and kept in a freezer (-18°C). EOs were analyzed by

gas chromatography-mass spectrometry (GC/MS) on a QP5050A (Shimadzu) using a DB5 capillary column (30 m x 0.25 mm x 0.25  $\mu$ m); flow rate of 1.0 ml/min (He) and heating at a programmed temperature (60-246°C at 3°C/min); sample injection of 0.4  $\mu$ l (20% hexane) and split ratio of 1:50. Ionization energy was 70 eV; mass range was 40-400 Da at 1.0 scan/s. Injector and interface temperatures were 220°C and 240°C, respectively. A Varian CP3900 with a flame ionization detector (GC/FID) was used for compositional analysis. Chromatographic conditions were the same as those of GC/MS. The carrier gas was N<sub>2</sub> and relative percentages were determined from peak areas without use of correction factors. Identification of oil constituents was performed by comparing mass spectra with those of NIST (1988) and ADAMS (2018) libraries, as well as by comparing mass spectra and retention indices (ADAMS, 2017). Arithmetic retention indices (DOOL & KRATZ, 1963) were calculated by co-injection with a linear hydrocarbon (C<sub>8</sub>-C<sub>32</sub>) mixture.

### 2.3 Statistical Analysis

Average multiple comparisons were established by analysis of variance (ANOVA), with pulp and storage time as factors using SAS (SAS Institute Inc., version 6.0, 1996). Normality and homoscedasticity were checked with Shapiro-Wilk and Hartley tests, respectively, followed by a Tukey *post hoc* test. *P*-values < 0.05 were considered significant. For multivariate analysis, oil constituents were organized in a response matrix, with samples in rows and chemical percentages as variables in columns. An explanatory matrix contained the same samples in rows and two categorical variables, representing pulp origin and storage time in columns. Redundancy analysis (RDA) was performed with the interaction between pulp origin and storage time as explanatory variables. Monte Carlo permutation tests (999 permutations) were used to assess the significance of canonical axes. Principal response curve (PRC) was applied to investigate the effects in EOs and their changes over time (VAN DEN BRINK & TER BRAAK, 1999). In PRC, sampling months were used as covariables and interaction time and treatment (pulp) were used as explanatory variables. Monte Carlo permutation tests (999 permutations) were performed on the entire time sequence to compare treatments (araçá and marolo pulps) and a control (mixed pulp). To verify whether treatment outcome at a given storage period varied significantly, treatment effects at each time period were also assessed via permutation (499 permutations). Variables with weights ranging from -0.5 to +0.5 suggest random fluctuations and are not shown. Prior to multivariate analysis, the response matrix was log(x+1)-transformed, centralized and analyzed in R (R Foundation for Statistical Computing, version 3.4.4, 2018).

## 3 | RESULTS AND DISCUSSION

Forty compounds were identified in EOs, accounting for 69%-100% of volatile constituents in pulp samples (Table 1).

Oil constituent (RI <sup>b</sup> )	Pulp	Frozen storage time / months							Mean
		0	2	4	6	8	10	12	
a-Pinene <sup>c</sup>	Mixed	12.2 <sup>Aab</sup>	2.4 <sup>Ab</sup>	4.5 <sup>Aab</sup>	3.3 <sup>Aab</sup>	16.1 <sup>Aa</sup>	7.5 <sup>Aab</sup>	5.3 <sup>Aa</sup>	
(935)	Araçá	4.8 <sup>Aa</sup>	4.6 <sup>Aa</sup>	5.9 <sup>Aa</sup>	8.2 <sup>Aa</sup>	3.3 <sup>Ba</sup>	5.4 <sup>Aa</sup>	14.6 <sup>Aa</sup>	
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
b-Pinene <sup>c</sup>	Mixed	3.3	0.6	0.8	0.8	3.0	1.4	1.2	1.6 <sup>B</sup>
(978)	Araçá	1.0	0.9	2.2	1.6	1.8	1.5	3.8	1.8 <sup>A</sup>
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
	Mean	2.2 <sup>bc</sup>	0.7 <sup>c</sup>	1.5 <sup>abc</sup>	1.2 <sup>abc</sup>	2.4 <sup>a</sup>	1.4 <sup>abc</sup>	2.5 <sup>ab</sup>	
Ethyl hexanoate <sup>d</sup>	Mixed	8.6 <sup>Aa</sup>	5.4 <sup>Aa</sup>	5.2 <sup>Ba</sup>	13.4 <sup>Aa</sup>	18.1 <sup>Aa</sup>	7.9 <sup>Aa</sup>	5.5 <sup>Ba</sup>	
(997)	Araçá	-	-	-	-	-	-	-	
	Marolo	9.5 <sup>Ab</sup>	12.6 <sup>Ab</sup>	35.9 <sup>Aa</sup>	21.8 <sup>Ab</sup>	8.1 <sup>Ab</sup>	11.8 <sup>Ab</sup>	20.4 <sup>Ab</sup>	
Limonene	Mixed	-	-	-	-	-	-	-	
(1030)	Araçá	-	-	0.9 <sup>a</sup>	0.6 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>	0.9 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
Methyl octanoate <sup>d</sup>	Mixed	6.6	6.6	5.3	7.6	9.8	8.7	7.2	7.4 <sup>B</sup>
(1123)	Araçá	-	-	-	-	-	-	-	
	Marolo	11.5	10.3	19.8	15.2	16.8	17.1	18.2	15.6 <sup>A</sup>
	Mean	9.1 <sup>a</sup>	8.5 <sup>a</sup>	12.6 <sup>a</sup>	11.4 <sup>a</sup>	13.3 <sup>a</sup>	12.9 <sup>a</sup>	12.7 <sup>a</sup>	
a-Terpineol <sup>c</sup>	Mixed	-	-	-	-	-	-	-	
(1191)	Araçá	0.7 <sup>a</sup>	0.9 <sup>a</sup>	0.8 <sup>a</sup>	0.7 <sup>a</sup>	1.7 <sup>a</sup>	0.5 <sup>a</sup>	1.0 <sup>a</sup>	
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
Ethyl octanoate <sup>c</sup>	Mixed	18.1	22.4	19.2	20.9	19.8	23.4	22.8	20.9 <sup>B</sup>
(1197)	Araçá	-	-	-	-	-	-	-	
	Marolo	43.7	37.3	22.3	44.2	48.9	47.6	48.7	41.8 <sup>A</sup>
	Mean	30.9 <sup>a</sup>	29.9 <sup>a</sup>	20.7 <sup>a</sup>	32.5 <sup>a</sup>	34.4 <sup>a</sup>	35.5 <sup>a</sup>	35.8 <sup>a</sup>	
Methyl decanoate <sup>c</sup>	Mixed	0.3 <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	0.2 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup>	0.4 <sup>a</sup>	
(1326)	Araçá	-	-	-	-	-	-	-	
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
a-Copaene	Mixed	1.1	1.2	1.0	1.6	0.7	1.2	1.2	1.1 <sup>B</sup>
(1378)	Araçá	2.9	2.7	2.8	2.9	2.9	2.9	2.5	2.8 <sup>A</sup>
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
	Mean	2.0 <sup>a</sup>	2.0 <sup>a</sup>	1.9 <sup>a</sup>	2.2 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	
Ethyl decanoate <sup>d</sup>	Mixed	1.4	1.8	1.8	1.1	0.9	1.8	1.9	1.5 <sup>B</sup>
(1395)	Araçá	-	-	-	-	-	-	-	
	Marolo	5.5	4.9	2.5	2.5	3.6	4.8	3.6	3.9 <sup>A</sup>



	Mean	3.5 <sup>a</sup>	3.4 <sup>a</sup>	2.2 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	2.3 <sup>a</sup>	3.3 <sup>a</sup>	2.7 <sup>a</sup>	
(E)-Caryophyllene	Mixed	8.8	10.6	10.4	9.2	6.3	9.9	10.4	9.4 <sup>B</sup>
(1420)	Araçá	22.1	23.3	22.1	20.8	20.7	21.5	19.4	21.4 <sup>A</sup>
	Marolo	3.4	2.6	0.7	1.9	t	t	0.1	1.2 <sup>C</sup>
	Mean	11.4 <sup>ab</sup>	12.2 <sup>a</sup>	11.1 <sup>ab</sup>	10.7 <sup>ab</sup>	9.0 <sup>b</sup>	10.5 <sup>ab</sup>	10.0 <sup>ab</sup>	
b-Gurjunene	Mixed	0.3 <sup>a</sup>	-	-	0.1 <sup>a</sup>	-	0.3 <sup>a</sup>	-	
(1434)	Araçá	-	-	0.3 <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup>	0.7 <sup>a</sup>	0.6 <sup>a</sup>	-	
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
	Mean								
Aromadendrene	Mixed	1.2	1.4	1.2	0.9	0.7	1.4	1.3	1.2 <sup>B</sup>
(1443)	Araçá	3.2	2.9	3.1	2.7	3.6	3.6	2.9	3.1 <sup>A</sup>
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
	Mean	2.2 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	2.2 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	2.2 <sup>a</sup>	2.5 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	
a-Humulene <sup>d</sup>	Mixed	1.8	1.9	0.9	1.4	1.1	1.3	1.5	1.4 <sup>B</sup>
(1457)	Araçá	3.6	3.7	3.3	2.9	3.2	3.3	2.9	3.3 <sup>A</sup>
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
	Mean	2.7 <sup>a</sup>	2.8 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	2.2 <sup>a</sup>	2.3 <sup>a</sup>	2.2 <sup>a</sup>	
3-Hexenyl heptanoate <sup>e</sup>	Mixed	1.7	2.9	3.2	2.0	0.4	2.2	1.9	2.1 <sup>B</sup>
(1462)	Araçá	-	-	-	-	-	-	-	
	Marolo	11.0	11.5	3.2	3.0	4.5	6.2	3.1	6.1 <sup>A</sup>
	Mean	6.3 <sup>a</sup>	7.2 <sup>a</sup>	3.2 <sup>a</sup>	2.5 <sup>a</sup>	2.5 <sup>a</sup>	4.2 <sup>a</sup>	2.5 <sup>a</sup>	
9- <i>epi</i> -(E)-Caryophyllene	Mixed	0.3 <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup>	-	-	-	0.2 <sup>a</sup>	0.4 <sup>a</sup>	
(1465)	Araçá	-	-	-	-	-	-	-	
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
b-Selinene <sup>c</sup>	Mixed	4.7	6.1	6.6	4.7	3.3	5.7	6.1	5.3 <sup>B</sup>
(1493)	Araçá	13.2	12.7	13.0	11.7	12.3	12.5	11.1	12.4 <sup>A</sup>
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
	Mean	9.0 <sup>a</sup>	9.4 <sup>a</sup>	9.8 <sup>a</sup>	8.2 <sup>a</sup>	7.8 <sup>a</sup>	9.1 <sup>a</sup>	8.6 <sup>a</sup>	
a-Selinene <sup>c</sup>	Mixed	5.5	6.9	7.9	6.3	3.7	6.7	6.8	6.2 <sup>B</sup>
(1503)	Araçá	12.8	12.0	12.3	12.8	12.3	13.7	10.1	12.3 <sup>A</sup>
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
	Mean	9.1 <sup>a</sup>	9.4 <sup>a</sup>	10.1 <sup>a</sup>	9.5 <sup>a</sup>	8.0 <sup>a</sup>	10.2 <sup>a</sup>	8.4 <sup>a</sup>	
b-Bisabolene <sup>d</sup>	Mixed	0.8	1.0	1.4	1.8	0.3	0.9	1.0	1.0 <sup>B</sup>
(1507)	Araçá	2.1	1.7	1.8	1.7	2.2	1.9	1.7	1.9 <sup>A</sup>
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
	Mean	1.5 <sup>a</sup>	1.4 <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>	1.7 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>	1.4 <sup>a</sup>	1.4 <sup>a</sup>	
g-Cadinene	Mixed	-	-	-	-	-	-	-	
(1514)	Araçá	-	-	-	-	-	-	-	

	Marolo	3.4 <sup>a</sup>	2.6 <sup>ab</sup>	1.3 <sup>c</sup>	-	-	-	-	
b-Curcumene <sup>d</sup> (1516)	Mixed	0.5	0.6	0.6	2.0	0.2	0.6	0.6	0.7 <sup>B</sup>
	Araçá	0.8	0.9	1.1	1.3	1.8	1.3	1.0	1.2 <sup>A</sup>
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
	Mean	0.6 <sup>a</sup>	0.8 <sup>a</sup>	0.9 <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>	1.0 <sup>a</sup>	1.0 <sup>a</sup>	0.8 <sup>a</sup>	
d-Cadinene <sup>c</sup> (1524)	Mixed	0.8	1.2	2.3	0.5	0.3	0.6	0.6	1.0 <sup>B</sup>
	Araçá	2.6	2.5	1.8	2.7	1.9	1.9	1.5	2.1 <sup>A</sup>
	Marolo	1.0	0.9	0.4	t	t	t	t	0.3 <sup>C</sup>
	Mean	1.5 <sup>a</sup>	1.5 <sup>a</sup>	1.5 <sup>a</sup>	1.1 <sup>a</sup>	0.7 <sup>a</sup>	0.9 <sup>a</sup>	0.8 <sup>a</sup>	
Zonarene <sup>c</sup> (1528)	Mixed	2.0	2.8	3.5	2.8	1.3	2.2	2.8	2.5 <sup>B</sup>
	Araçá	5.7	5.7	5.3	3.5	6.7	5.7	4.6	5.3 <sup>A</sup>
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
	Mean	3.8 <sup>a</sup>	4.2 <sup>a</sup>	4.4 <sup>a</sup>	3.1 <sup>a</sup>	4.0 <sup>a</sup>	3.9 <sup>a</sup>	3.7 <sup>a</sup>	
(E)-g-Bisabolene (1537)	Mixed	0.7	0.8	0.6	0.5	0.2	0.8	0.7	0.6 <sup>B</sup>
	Araçá	1.1	1.6	1.8	1.4	1.9	1.7	1.4	1.6 <sup>A</sup>
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
	Mean	0.9 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>	1.0 <sup>a</sup>	1.1 <sup>a</sup>	1.3 <sup>a</sup>	1.1 <sup>a</sup>	
a-Cadinene (1540)	Mixed	1.0	0.9	0.8	0.5	0.3	1.1	0.9	0.8 <sup>B</sup>
	Araçá	2.2	1.6	2.3	1.9	2.4	2.8	1.8	2.1 <sup>A</sup>
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
	Mean	1.6 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>	1.4 <sup>a</sup>	1.9 <sup>a</sup>	1.3 <sup>a</sup>	
Selina-3,7(11)-diene (1547)	Mixed	0.8	1.1	1.1	0.7	0.4	1.0	1.1	0.9 <sup>B</sup>
	Araçá	2.6	2.3	2.5	2.1	2.4	2.5	2.1	2.4 <sup>A</sup>
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
	Mean	1.7 <sup>a</sup>	1.7 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	1.4 <sup>a</sup>	1.4 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>	
Germacrene B <sup>c</sup> (1559)	Mixed	0.4 <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup>	1.7 <sup>a</sup>	t	0.3 <sup>a</sup>	0.4 <sup>a</sup>	
	Araçá	-	-	-	2.4	-	0.3	-	
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
	Mean								
(E)-Nerolidol (1566)	Mixed	1.0 <sup>B</sup>	1.5 <sup>A</sup>	1.5 <sup>A</sup>	0.6 <sup>B</sup>	0.4 <sup>B</sup>	1.2 <sup>B</sup>	1.6 <sup>A</sup>	1.1 <sup>B</sup>
	Araçá	2.0 <sup>Aa</sup>	2.0 <sup>Aa</sup>	2.0 <sup>Aa</sup>	1.9 <sup>Aa</sup>	1.9 <sup>Aa</sup>	2.0 <sup>Aa</sup>	1.7 <sup>Aa</sup>	1.9 <sup>A</sup>

	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	-
	Mean	1.5 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	1.8 <sup>a</sup>	1.3 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>	1.7 <sup>a</sup>	
Caryophyllene oxide (1583)	Mixed	-	-	-	-	-	-	-	
	Araçá	-	0.4 <sup>a</sup>	-	0.3 <sup>a</sup>	-	-	-	
	Marolo	1.3 <sup>a</sup>	0.5 <sup>a</sup>	0.4 <sup>a</sup>	1.1 <sup>a</sup>	-	-	-	
	Mean								
Globulol <sup>d</sup> (1587)	Mixed	1.2	1.1	1.7	1.3	0.2	1.4	1.4	1.2 <sup>A</sup>
	Araçá	2.1	2.4	1.1	1.3	0.5	1.5	0.7	1.4 <sup>A</sup>
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
	Mean	1.7 <sup>ab</sup>	1.8 <sup>a</sup>	1.4 <sup>ab</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	0.3 <sup>b</sup>	1.5 <sup>ab</sup>	1.1 <sup>ab</sup>	
Ethyl dodecanoate <sup>c</sup> (1594)	Mixed	0.5	0.4	2.6	t	t	0.3	0.4	0.6 <sup>A</sup>
	Araçá	0.9	0.5	0.2	0.2	0.4	0.9	0.6	0.5 <sup>A</sup>
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
	Mean	0.7 <sup>a</sup>	0.4 <sup>a</sup>	1.4 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	0.2 <sup>a</sup>	0.6 <sup>a</sup>	0.5 <sup>a</sup>	
Humulene epoxide II (1609)	Mixed	-	-	-	-	-	-	-	
	Araçá	-	-	-	-	-	-	-	
	Marolo	0.8 <sup>a</sup>	-	-	-	0.1 <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup>	0.2 <sup>a</sup>	
1- <i>epi</i> -Cubenol <sup>c</sup> (1630)	Mixed	0.5 <sup>a</sup>	0.9 <sup>a</sup>	0.6 <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>	0.2 <sup>a</sup>	0.5 <sup>a</sup>	0.7 <sup>a</sup>	
	Araçá	-	-	-	-	-	-	-	
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
<i>allo</i> -Aromadendrene (1642)	Mixed	0.2 <sup>ab</sup>	1.0 <sup>a</sup>	0.8 <sup>a</sup>	0.4 <sup>ab</sup>	0.1 <sup>b</sup>	0.3 <sup>ab</sup>	0.8 <sup>a</sup>	
	Araçá	-	-	-	-	-	-	-	
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
<i>epi</i> - $\alpha$ -Muurolol <sup>c</sup> (1645)	Mixed	0.3 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>	0.8 <sup>a</sup>	0.2 <sup>a</sup>	0.6 <sup>a</sup>	t	0.7 <sup>a</sup>	
	Araçá	-	-	-	-	-	-	-	
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
$\alpha$ -Muurolol <sup>c</sup> (1650)	Mixed	0.5 <sup>abc</sup>	1.2 <sup>ab</sup>	1.5 <sup>a</sup>	0.2 <sup>c</sup>	0.1 <sup>c</sup>	0.4 <sup>bc</sup>	1.4 <sup>a</sup>	
	Araçá	-	-	-	-	-	-	-	
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
Selin-11-en-4a-ol (1660)	Mixed	2.7	5.0	4.5	2.5	1.2	2.7	3.8	3.2 <sup>B</sup>
	Araçá	6.0	6.3	6.0	5.7	5.3	5.1	4.8	5.6 <sup>A</sup>
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	

	Mean	4.3 <sup>ab</sup>	5.7 <sup>a</sup>	5.2 <sup>a</sup>	4.1 <sup>ab</sup>	3.2 <sup>b</sup>	3.9 <sup>ab</sup>	4.3 <sup>ab</sup>	
<i>epi</i> -b-Bisabolol (1673)	Mixed	1.3	2.0	1.9	0.9	0.5	1.4	1.8	1.4 <sup>B</sup>
	Araçá	2.7	2.9	3.0	2.3	2.9	2.7	2.3	2.7 <sup>A</sup>
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
	Mean	2.0 <sup>a</sup>	2.5 <sup>a</sup>	2.4 <sup>a</sup>	1.6 <sup>a</sup>	1.7 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	2.1 <sup>a</sup>	
Eudesm-7(11)-en-4-ol (1701)	Mixed	0.4	0.6	0.4	1.1	t	0.2	0.5	0.4 <sup>A</sup>
	Araçá	0.3	0.3	0.3	1.2	0.3	t	t	0.4 <sup>A</sup>
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
	Mean	0.4 <sup>a</sup>	0.5 <sup>a</sup>	0.3 <sup>a</sup>	1.2 <sup>a</sup>	0.2 <sup>a</sup>	0.1 <sup>a</sup>	0.2 <sup>a</sup>	
(2Z,6E)-Farnesol (1725)	Mixed	0.8	1.3	0.7	0.5	0.3	0.9	1.4	0.8 <sup>B</sup>
	Araçá	1.6	1.9	1.9	1.0	1.9	1.9	1.5	1.7 <sup>A</sup>
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
	Mean	1.2 <sup>ab</sup>	1.6 <sup>a</sup>	1.3 <sup>ab</sup>	0.7 <sup>b</sup>	1.2 <sup>ab</sup>	1.4 <sup>ab</sup>	1.4 <sup>ab</sup>	
Monoterpene hydrocarbons <sup>c</sup>	Mixture	15.5	3	5.2	4.1	19.1	8.9	6.5	8.9 <sup>A</sup>
	Araçá	5.8	5.5	9.0	10.4	6.4	7.7	20.2	9.3 <sup>A</sup>
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
	Mean	10.7 <sup>ab</sup>	4.2 <sup>b</sup>	7.1 <sup>ab</sup>	7.3 <sup>ab</sup>	12.7 <sup>a</sup>	8.3 <sup>ab</sup>	13.3 <sup>a</sup>	
Oxygenated monoterpenes <sup>c</sup>	Mixture	-	-	-	-	-	-	-	
	Araçá	0.7 <sup>a</sup>	0.9 <sup>a</sup>	0.8 <sup>a</sup>	0.7 <sup>a</sup>	1.7 <sup>a</sup>	0.5 <sup>a</sup>	1.0 <sup>a</sup>	
	Marolo	-	-	-	-	-	-	-	
Sesquiterpene hydrocarbons <sup>c</sup>	Mixture	30.6	37.8	39.5	34.8	18.8	34.5	36.7	33.2 <sup>B</sup>
	Araçá	74.8	73.5	73.6	71.0	74.9	76.1	63.0	72.4 <sup>A</sup>
	Marolo	7.8	6.1	2.4	1.9	t	t	0.1	2.6 <sup>C</sup>
	Mean	37.7 <sup>a</sup>	39.2 <sup>a</sup>	38.5 <sup>a</sup>	35.9 <sup>a</sup>	31.2 <sup>a</sup>	36.9 <sup>a</sup>	33.2 <sup>a</sup>	
Oxygenated sesquiterpenes <sup>c</sup>	Mixture	8.5	15.0	13.6	8.8	3.3	8.8	13.2	10.2 <sup>B</sup>
	Araçá	15.0	15.9	14.1	13.6	12.7	13.2	11.0	13.7 <sup>A</sup>
	Marolo	2.1	0.5	0.4	1.1	0.1	0.3	0.2	0.7 <sup>C</sup>
	Mean	8.5 <sup>ab</sup>	10.5 <sup>a</sup>	9.4 <sup>ab</sup>	7.9 <sup>ab</sup>	5.4 <sup>b</sup>	7.4 <sup>ab</sup>	8.1 <sup>ab</sup>	
Esters <sup>d</sup>	Mixed	37.1	39.7	37.2	45.1	49.1	44.7	40.1	41.5 <sup>B</sup>
	Araçá	0.9	0.5	0.2	0.2	0.4	0.9	0.6	0.5 <sup>C</sup>
	Marolo	81.2	76.8	83.7	86.6	82.0	87.5	93.9	84.5 <sup>A</sup>
	Mean	39.7 <sup>a</sup>	39.0 <sup>a</sup>	40.4 <sup>a</sup>	44.0 <sup>a</sup>	43.8 <sup>a</sup>	44.4 <sup>a</sup>	44.9 <sup>a</sup>	

Table 1: Average content<sup>a</sup> of EO constituents from araçá, marolo and mixed (1:1) pulps over frozen storage time.

<sup>a</sup>Percentage on original values; <sup>b</sup>Retention index; <sup>c</sup>rank, <sup>d</sup>arcsine and <sup>e</sup>log-transformed in ANOVA.

Averages with the same small letters in rows and same capital letters in columns did not share significant differences at 5% based on Tukey test; t = trace (< 0.1%).

Pulps' EOs showed a predominance of esters (0-96.2%, mean of 42.3%) and sesquiterpene hydrocarbons (0-79.4%, 36.1%), particularly in marolo (84.5%) and araçá (72.4%), respectively. ANOVA indicated interaction between the two factors only for  $\alpha$ -pinene and methyl hexanoate, with the highest contents at around six months of storage for mixed (16.1%) and marolo (35.9%) pulps, respectively. For other volatiles, terpenes and esters had significantly higher percentages in araçá and marolo, respectively, without any influence of storage time. In turn,  $\beta$ -pinene and total monoterpene hydrocarbons had a significant increase from the eighth month of storage onwards. In contrast, (*E*)-caryophyllene, selin-11-en-4a-ol and total oxygenated sesquiterpenes showed reduction at the same period, with both variations occurring regardless of pulp origin. Despite being a minor component,  $\alpha$ -terpineol occurred only in araçá, which suggests an enzymatic degradation in the mixed pulp. Constituents with low contents such as  $\alpha$ -muurolol, 1-*epi*-cubenol, *epi*- $\alpha$ -cubenol, *allo*-aromadendrene and methyl decanoate only occurred in the mixed pulp, with most of them not influenced by storage time.

Terpenes (60.8%, 82 compounds) and esters (69.5%, 58 compounds) have been identified as the main components in the *P. guineense* pulp via solvent extraction-distillation (SED) and solid phase microextraction (SPME), respectively (PERALTA-BOHÓRQUEZO et al., 2010). (*E*)-Caryophyllene (8.6%) and selin-11-en-4a-ol (5.9%) were predominant in SDE, and ethyl butyrate (7.4%) and ethyl hexanoate (2.5%) in SPME. Marolo has previously shown mainly oxygenated sesquiterpenes (SIRENA et al., 2014). However, in this study, ripe fruit pulp extracted by SPME showed only esters, mainly methyl and ethyl derivatives of hexanoate, octanoate and decanoate (SILVA et al., 2013). Terpenes were also identified, but only in the stages prior to full fruit ripening. Alcohols and esters, such as 2,3-butanediol (32.8%), ethyl hexanoate (21.2%), acetic acid (7.9%), ethyl octanoate (6.8%), 1,2-propanediol (5.4%) and methyl octanoate (4.7%), also predominated in the lyophilized pulp (BEZERRA et al., 2018). Variations in volatiles can be attributed to different extraction techniques (TONGNUANCHAN & BENJAKUL, 2014), as in the results described above. Postharvest process and storage conditions also affect volatile composition (DAMIANI et al., 2009; SHASHIREKHA et al., 2008). Volatiles may also be released from glycosidically linked non-volatile precursors by enzymatic or acid hydrolysis (HERRMANN, 2010), which may account for minor constituents observed only in the mixed pulp.

RDA indicated that correlations between EOs and the two factors were higher in the first two canonical axes (0.994 and 0.972), with 89.2% of the variation being explained by pulp origin and storage time interactions (Figure 1).



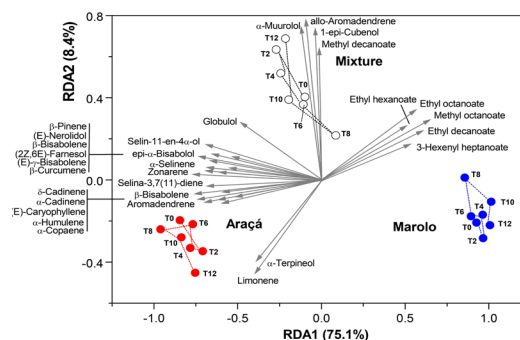


Figure 1: RDA diagram of araçá, marolo and mixed pulps according to EO variation along frozen storage (T0-T12). Fitted oil constituents (> 50%) are represented by long arrows.

RDA1 contributed with 75.1% ( $F$ -Fisher = 20.3;  $P < 0.001$ ) of total explained variation and showed a clear separation between marolo – mainly characterized by higher ester contents (hexanoate, octanoate and decanoate of ethyl or methyl) – from araçá pulps, mainly characterized by higher terpene contents. RDA2 explained 8.4% of total variation ( $F = 3.9$ ;  $P < 0.001$ ) and distinguished mixed pulp samples mainly by higher contents of methyl decanoate,  $\alpha$ -muurolol, *allo*-aromadendrene and 1-*epi*-cubenol, as well as by lower levels in monoterpenes such as limonene and  $\alpha$ -terpineol. Thus, RDA1 described the variation of major constituents in araçá (terpenes) and marolo (esters) pulps, whereas RDA2 was associated with minor constituents, particularly in the mixed pulp. The RDA diagram suggests a small influence of storage time, with sample distribution predominantly influenced by pulp origin, a result already indicated by ANOVA. In RDA, however, the contribution of minor constituents for mixed pulp separation is clearly established. Since the projection of temporal effects is often not linear in factorial planes, principal response curves (PRC) were applied to assess metabolite differences and their changes over time (Figure 2).

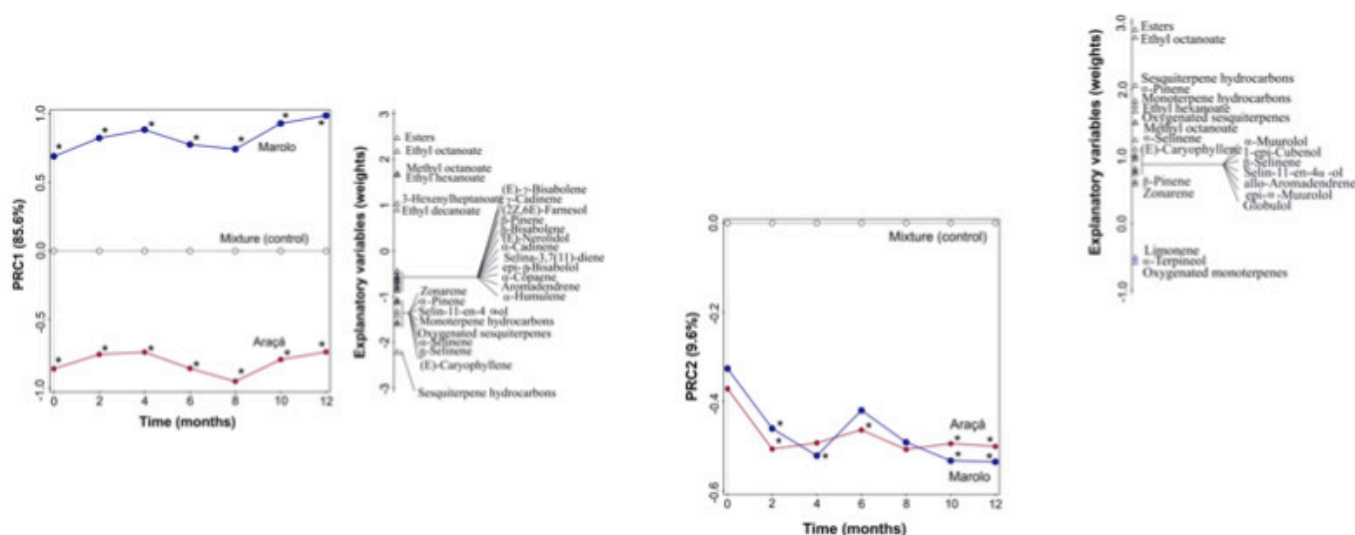


Figure 2. First and second principal response curves (PRC) diagram indicating variations in EO contents according to fruit pulps along frozen storage time.

PRCs showed that the treatment (pulp) x time interaction accounted for 89.9% in EO variation, with 87.8% being attributable to pulp effect, of which 95.2% ( $P = 0.02$ ) were represented by the first two diagrams (PRC1: 85.6%,  $F = 140$ ; PRC2: 9.6%,  $F = 25.1\%$ ). Storage time contributed with 2.3% of the variance. In PRC1, the most important variables for distinguishing between marolo and araçá (treatments) and mixed pulp (control) were esters, with high levels in marolo, and mainly sesquiterpene hydrocarbons in araçá ( $P < 0.02$ ). In PRC2, limonene,  $\alpha$ -terpineol and oxygenated monoterpenes were the main variables for treatment distinctions, with higher levels in marolo and araçá ( $P < 0.03$ ), particularly in the last quarter of storage time. Volatile dynamics during pulp storage, with small changes in minor constituents, was similar to that of Cerrado fruits like pequi, custard and red mombin (DAMIANI et al., 2009; SHASHIREKHA et al., 2008; TODISCO et al., 2014), but differed from mangaba, which showed higher compositional changes (GONÇALVES et al., 2018).

#### 4 | CONCLUSIONS

Forty volatiles were identified in the EOs of araçá, marolo and mixed pulps. Esters were identified mainly in marolo, whereas terpenes were the major component in araçá. In the mixed pulp, EOs were slightly more related to marolo, with some minor constituents being identified only in this mixture. Volatile changes were mainly associated with pulp origin, while storage contributed very little to chemovariations. Pulps in frozen storage for 12 months resembled fresh pulps, with minor changes in some constituents, and retained volatiles similarly to fresh fruits. These findings endorse artisanal fruit processing and frozen pulp storage to preserve fruits' native aroma and flavor.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The authors wish to thank the Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) for its financial support (# 401188-2016-7).

## REFERENCES

ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**, 4.1<sup>th</sup> ed. Allured Corp.: Carol Stream, 2017.

ADAMS, R. P. **Essential oil GCMS database**. FarHawk: New York, 2018.

ANESINI, C.; PEREZ, C. Screening of plants used in Argentine folk for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 39, n. 2, p. 119-128, 1993.

ARRUDA, H. S.; PASTORE, G. M. Araticum (*Annona crassiflora* Mart.) as a source of nutrients and bioactive compounds for food and non-food purposes: a comprehensive review. **Food Research International**, v. 123, p. 450-480, 2019.

AQUINO, F. G.; OLIVEIRA, M. C. **Reserva legal no Bioma Cerrado: usos e preservação**. Embrapa Cerrados: Planaltina, 2006.

BEZERRA, T. S. et al. Induction of crystallization influences the retention of volatile compounds in freeze-dried marolo pulp. **Drying Technology**, v. 36, n. 10, p. 1250-1262, 2018.

DAMIANI, C. et al., Volatile compounds profile of fresh-cut peki fruit stored under different temperatures. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 2, p. 435-439, 2009.

DOOL, H. V. D.; KRATZ, P. D. Generalization of the retention index system including linear temperature programmed gas-liquid partition chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 11, n. 2, p. 463-471, 1963.

ELETRONIC CODE OF FEDERAL REGULATIONS. **Food and Drugs. Part 182: Substance generally recognized as safe**. Silver Spring: FDA, 2019.

FINCO, F. D. B. A. et al. Physicochemical characteristics and antioxidant activity of three native fruits from Brazilian Savannah (Cerrado). **Alimentos e Nutrição**, v. 23, n. 2, p. 179-185, 2012.

FRANZON, R. C. et al. **Araçás do gênero *Psidium*: principais espécies, ocorrência, descrição e usos**. Embrapa Cerrados: Planaltina, 2009.

GONÇALVES, G. A. S. et al. The effect of pasteurization, freezing and prolonged storage on volatile compounds of mangaba pulp. **Journal of Food and Nutrition Research**, v. 6, n. 9, p. 561-569, 2018.

GONZÁLEZ, A. M. N. et al., Estudio fitoquímico y actividad antibacterial de *Psidium guineense* Sw. (choba) frente a *Streptococcus mutans*, agente causal de caries dentales. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 10, n. 3-4, p. 2-6, 2005.

HERRMANN, A. **The chemistry and biology of volatiles**. John Wiley & Sons: Sussex, 2010.

PERALTA-BOHÓRQUEZO, A. F. et al. Analysis of volatile compounds of sour guava (*Psidium guineense* Swartz) fruit. **Journal of Essential Oil Research**, v. 22, n. 6, p. 493-498, 2010.

SHASHIREKHA, M. N. et al. Influence of processing conditions on flavour compounds of custard apple (*Annona squamosa* L.). **LWT- Food Science and Technology**, v. 41, n. 2, p. 236-243, 2008.

SILVA, C. E. F; ABUD, A. K. S. Tropical fruit pulps: processing, product standardization and main control parameters for quality assurance. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 60, p. e160209, 2017.

SILVA, E. P. et al. Characterization and development of marolo (*Annona crassiflora* Mart.). **Food Science and Technology**, v. 33, p. 666-675, 2013.

SIRENA, J. T. et al. Chemical composition of the essential oil from *Annona crassiflora*. **Chemistry of Natural Compounds**, v. 50, n. 3, p. 543-544, 2014.

TODISCO, K. M. et al. The use of headspace solid-phase microextraction (HS-SPME) to assess the quality and stability of fruit products: an example using red mombin pulp (*Spondias purpurea* L.). **Molecules**, v. 19, p. 16851-16860, 2014.

TONGNUANCHAN P.; BENJAKUL, S. Essential oils: extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 7, p. R1231-R1249, 2014.

VAN DEN BRINK, P. J.; TER BRAAK, C. J. F. Principal response curves: analysis of time-dependent multivariate responses of biological community to stress. **Environmental Toxicology and Chemistry**, v. 18, p. 138-148, 1999.

## ESTUDO QUÍMICO E BIOLÓGICO DO EXTRATO AQUOSO *HIBISCUS SABDARIFFA* (MALVACEAE)

Data de aceite: 26/03/2020  
Data de submissão: 08/01/2020

### **Davi Vicente dos Santos (autor)**

Universidade federal do Rio de Janeiro  
Fundão - Rio de Janeiro  
<http://lattes.cnpq.br/4850826170166040>

### **Marcia Maria Dourado Maranhão**

Centro Universitário Estadual da Zona Oeste  
Campo Grande – Rio de Janeiro  
<http://lattes.cnpq.br/7037740958582472>

### **Naomi Kato Simas**

Universidade Federal do Rio de Janeiro  
Fundão – Rio de Janeiro  
<http://lattes.cnpq.br/7460060045516567>

### **Taiane Borges Machado Silva**

Centro Universitário Estadual da Zona Oeste  
Campo Grande – Rio de Janeiro  
<http://lattes.cnpq.br/9482174552139891>

### **Gláucio Diré Feliciano**

Centro Universitário Estadual da Zona Oeste  
Campo Grande – Rio de Janeiro  
<http://lattes.cnpq.br/7179565411550967>

### **Alaíde de Sá Barreto**

Centro Universitário Estadual da Zona Oeste  
Campo Grande – Rio de Janeiro  
<http://lattes.cnpq.br/4788272992943811>

conhecido como hibisco, vinagreira ou quiaboda-guiné é uma planta que tem ganho um grande interesse nas pesquisas da área acadêmica. Muito provavelmente devido a sua propriedade antioxidante. O perfil fitoquímico preliminar do extrato aquoso dos cálices de *Hibiscus sabdariffa* apresentou flavonoides, antocianinas, cumarinas e saponinas. O potencial antioxidante foi de 324,95 mM Trolox/g medido por ABTS. A dose letal (DL<sub>50</sub>) do extrato foi superior a 1000 ppm, se mostrando segura. O extrato apresentou ação antimicrobiana na dose de 24µL e sinergismo quando associado a discos de cloranfenicol em cepas de *Escherichia Coli* selvagem (AB 1157).

**PALAVRAS-CHAVE:** *Hibiscus sabdariffa*, fitoquímica, antioxidante, microbiologia.

### CHEMICAL AND BIOLOGICAL STUDY OF WATER EXTRACT *HIBISCUS SABDARIFFA* (MALVACEAE)

**ABSTRACT:** *Hibiscus sabdariffa*, popularly known as hibiscus, vinegar or guinea okra, is a plant that has gained a great deal of interest in academic research. Most likely due to its antioxidant property. The preliminary phytochemical profile of the aqueous extract of the chalice of *Hibiscus sabdariffa* presented flavonoids, anthocyanins, coumarins and

**RESUMO:** O *Hibiscus sabdariffa*, popularmente

saponins. The antioxidant potential was 324.95 mM Trolox / g as measured by ABTS. The lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of the extract was higher than 1000 ppm and was shown to be safe. The extract showed 24 µL antimicrobial action and synergism when associated with chloramphenicol disks in strains of wild *Escherichia coli* (AB 1157).

**KEYWORDS:** *Hibiscus sabdariffa*, phytochemical, antioxidant, microbiology.

## INTRODUÇÃO

Desde os tempos antigos, o ser humano tem procurado na natureza, componentes que possam ajudar no tratamento ou na cura das doenças. No início, o homem observando os animais, percebeu que estes comiam certas plantas quando estavam sentindo alguma dor ou mal-estar, isto ocorria de forma instintiva. É importante salientar que na época ainda não havia muita compreensão sobre doenças (SALEM, 2014). Além disso, não se sabia quais plantas poderiam ou deveriam ser usadas. Tudo se baseava em experiências empíricas. Posteriormente, informações científicas auxiliaram na elucidação sobre o caráter benéfico e maléfico dos produtos oriundos das plantas no combate das doenças (SILVA *et al*, 2018).

A descoberta dos componentes presentes em plantas medicinais bem como seus mecanismos de ação biológica, vem sendo um dos maiores desafios para a química, bioquímica e a farmacologia (HAMIDI, 2014). Contudo, apesar do aumento de estudos nesta área, o que se observa é que apenas cerca de 20 % das espécies vegetais existentes foram estudadas quanto ao seu potencial medicinal) Entre as propriedades farmacológicas estudadas em produtos naturais estão à ação antioxidante e antimicrobiana. A avaliação desta atividade tem sido uma questão importante considerando sua importância sobre a saúde humana, uma vez que os agentes antioxidantes naturais apresentam baixo risco à saúde, quando comparados aos sintéticos que apresentam efeito tóxico (LEITE *et al*, 2013).

A espécie *Hibiscus sabdariffa* (hibisco) tem se mostrado de grande interesse acadêmico e comercial devido ao seu poder antioxidante. É considerado um alimento funcional nos países da África e Ásia. Na Índia e no México as infusões preparadas com o cálice do mesmo são tradicionalmente usadas pela sua atividade diurética, antiolesterolêmica, febrífuga, anti-hipertensiva e aumento do peristaltismo intestinal (DA-COSTA-ROCHA *et al.*, 2014; PEREIRA, 2012).

Embora se tenham vários estudos relatando o uso do *Hibiscus sabdariffa*, ainda não foram descritos na literatura ou bem relatados sua ação antioxidante; ação bactericida em culturas na presença e na ausência de agentes redutores e outros antimicrobianos; determinação dos compostos fenólicos majoritários, bem como, bioensaios de toxicidade sobre *Artemia salina* Leach.



## METODOLOGIA

O estudo foi conduzido no Laboratório de Análises Químicas e Biológicas (LAQB) da Universidade Estadual da Zona Oeste (UEZO) em Campo Grande/ RJ. As flores de Hibisco (*Hibiscus sabdariffa*) foram doadas pela empresa Interflora, sendo colhidas e desidratadas no Egito.

## EXTRATO AQUOSO

Inicialmente foram separados parte do cálice de hibisco (30,0 g) em BALANÇA semi analítica (classe II Bel Mark 2500). Em seguida, o cálice de hibisco (30,0 g) foi triturado, a seco, em um liquidificador (10 min). O extrato aquoso do cálice de hibisco foi obtido por infusão em um becker com 500 mL de água destilada quente (70 °C). Após 30 minutos, o extrato aquoso; foi filtrado e guardado em potes de vidro com tampa de rosca envelopados em papel alumínio (ALMEIDA, 2018). O extrato foi congelado (24 horas) e em seguida foi liofilizado (Liofilizador, LIOTOP 220) a uma temperatura de -80°C até massa constante

## AVALIAÇÃO FITOQUÍMICA PRELIMINAR

Realizado usando metodologia descrita por Trease e Evans (1984), no qual liofilizado é submetido a reagentes para detecção de possíveis metabólitos secundários presentes no extrato, indicados pela presença ou ausência de reação característica.

## DETERMINAÇÃO DA DOSE LETAL (DL<sub>50</sub>)

O ensaio de toxicidade dos extratos adaptado do método descrito por Meyer e colaboradores (1982) utilizando o microcrustáceo *Artemia salina*. Meyers e colaboradores identificaram a correlação da toxidez e a dose letal, DL<sub>50</sub>, apresentando pelo extrato de plantas em modelo de *Artemia salina*. Desde então é considerado que valores acima de 1000 ppm são considerados não tóxicos e valores inferiores são considerados potencialmente tóxicos (abaixo de 999 ppm) ou tóxicos (abaixo de 100 ppm). Dez microcrustáceos de *A. salina* foram transferidos para 12 tubos contendo solução água do mar (pH= 8-9) e concentrações diferente de extrato aquoso. O conjunto foi incubado sob luz artificial durante 24 horas. Os grupos (triplicata) foram montados da seguinte maneira:

- Grupo 1: Grupo controle preparado contendo apenas os metanúplios e água artificial do mar.
- Grupo 2: extrato de hibisco diluído a 10 ppm (parte por milhão) e volume final de 10 mL foi completado com água artificial do mar,
- Grupo 3: extrato 100 ppm e volume final de 10 mL foi completado com água artificial do mar,

- Grupo 4: extrato 1000 ppm e volume final de 10 mL foi completado com água artificial do mar,

Após 24 horas foi realizada a contagem do número de metanúplios vivos e mortos para determinação da DL<sub>50</sub>. O resultado foi interpretado em valores de DL<sub>50</sub> com a porcentagem, indivíduo e concentração do composto testado. Para isso, utilizou-se o método SPEARMAN KARBBER como análise para obtenção das DL (concentração letal média) e respectivos intervalos de confiança  $p < 0,5$ .

## DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS

O método de redução do radical ABTS foi realizado conforme metodologia descrita por RE e colaboradores (1999). O método de redução do radical ABTS é um dos métodos mais utilizados para medir a atividade antioxidante através da captura do radical 2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS). Com essa metodologia, pode-se medir a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica (KUSKOSKI *et al.*, 2005). A absorvância foi medida utilizando um espectrofotômetro IL-592 KASUAKI, no tempo de 7 minutos após a adição da amostra. O resultado foi expresso em TEAC (atividade antioxidante equivalente a trolox [6-hydroxy- 2,5,7,8-tetramethylchromo-2-carboxylic acid]). A curva padrão foi construída com 0,0101g de trolox e vitamina E diluída em 0,02L de água deionizada nas concentrações de 20.18  $\mu\text{M}$ ; 40.35  $\mu\text{M}$ ; 80.71  $\mu\text{M}$ ; 403.53  $\mu\text{M}$  e 807.06  $\mu\text{M}$ . O extrato aquoso liofilizado de Hibiscus foi homogeneizado em água destilada, agitado por 30 minutos em um vortex a 3300 RPM durante 6 minutos e adicionado de 250  $\mu\text{L}$  de ABTS em ambiente escuro e repouso por mais 6 minutos. A absorvância foi lida em 734 nm. Todas as análises foram realizadas em triplicata e o resultado expresso em média  $\pm$  desvio padrão.

Após o preparo do radical, foi preparada uma solução de persulfato potássico (Sigma Aldrich, USA) e 10 mL de persulfato misturados, homogeneizados e mantidos num frasco âmbar pelo mínimo de 16 h protegido da luz (KUSKOSKI *et al.*, 2005).

Para o ensaio da amostra, foi pipetada uma alíquota de 200  $\mu\text{L}$  do radical formado e diluído em 10 mL de etanol 96° P.A. Medidas de absorvância em cubetas de 10 mm a 734 nm foram realizadas para certificação da densidade óptica em torno de  $0,700 \pm 0,02$  e a curva padrão foi preparada com 0,0101g do análogo hidrossolúvel da vitamina E, Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromo-2-ácido carboxílico; Sigma Aldrich, USA), dissolvido em 0,02L água deionizada (2018 mM= 0,002 mol/ L), nas concentrações de 20,18 mM; 40,35 mM; 80,71 mM; 403,53 mM e 807,06 mM. Utilizou-se as concentrações de Trolox para construir uma curva de calibração.

O extrato aquoso de hibisco foi homogeneizado em água deionizada, agitados por 30 minutos em agitador para tubo tipo vortex 3300 rotações por minuto (rpm), com 250  $\mu\text{L}$  de solução ABTS<sup>+</sup> durante 6 minutos no escuro a 600 rpm. Em seguida, foi realizada a leitura da absorvância a 734 nm.

Diferenças entre as médias no nível de 5% ( $P < 0,05$ ) foram consideradas

significantes. Admitiram-se resultados com coeficiente de variação (CV) abaixo de 10%.

## TESTE DE SENSIBILIDADE PERANTE ANTIMICOBRIANOS E AGENTES REDUTORES (DISCO-DIFUSÃO)

A atividade antimicrobiana foi verificada *in vitro* pelo método de disco-difusão em disco de papel, também conhecido por Teste de Sensibilidade (HEATLEY, 1944) a Antimicrobianos (TSA). O princípio da técnica consiste no preparo e inoculação de uma suspensão de bactérias de cultivo recente na superfície de uma placa de Agar Mueller Hinton. Após a semeadura do inócuo bacteriano, dispersamos os discos de papel-filtro impregnados com os antimicrobianos e agentes redutores em concentrações pré-estabelecidas, incubando-os em estufa por 24h, onde analisamos o padrão de crescimento ou inibição ao redor de cada disco (BALOURI *et al*, 2016).

O experimento foi conduzido, utilizando-se as cepas de *Escherichia coli* AB1157, colônias provenientes de cultivo bacteriano recente de 18 às 24h, isoladas a partir de meios de cultura não seletivos, suspensas em ambiente estéril em 5mL de solução salina (Solução fisiológica estéril de NaCl 0,9%) até a obtenção de uma turvação compatível comparada com um tubo aferido na escala 0,5 de Mac Farland ( $1 \times 10^6$  UFC/mL).

Utilizou-se no plaqueamento, placas de petri de 150 mm, contendo 50 mL de meio ágar onde foram preparadas 15 placas, separadas em 4 grupos de 5 discos e um grupo de 3 discos, todos em triplicata, perfazendo um total de 23 discos. (PEIXOTO *et al.*, 2014).

Ao término desta etapa as placas foram armazenadas em estufa bacteriológica (Solab, SL-101) por 24h a 35°C. Na leitura dos resultados foi utilizada uma régua para medição de halos em antibiograma da marca Laborclin. O protocolo do procedimento acima foi adotado para a cepa AB1157.

Os resultados obtidos foram analisados e as médias aritméticas foram comparadas no intuito de avaliar a proporcionalidade entre volume, tratamentos dos compostos associados ao extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* e o desvio padrão do diâmetro do halo de inibição.

## RESULTADOS E DISCUSSÃO

Este trabalho teve por intuito avaliar as ações do *Hibiscus sabdariffa* (Hibisco) através da análise do extrato aquoso, por se assemelhar muito mais ao uso cotidiano da população e viabilizando sua utilização.

## TESTES FITOQUÍMICOS PRELIMINARES

O extrato aquoso das folha de *Hibiscus sabdariffa* foram submetidos a uma série de reações químicas, no intuito de caracterizar a presença de terpenóides, esteróides

(positivo, se mudança de cor para o verde), flavonóides ( surgimento de cor vermelha para flavonóides), taninos (positivo se mudança de coloração para azul ou preto-esverdeado) , cumarinas (positivo se mudança do meio para amarelo) , saponinas (positivo se apresentar espuma) e glicosídeos (positivo se houver aparecimento da cor verde azulada) , segundo metodologia descrita por Trease & Evans (1984). Em via de regra, a tabela 1, confirma certos pressupostos e características exaltadas ao *Hibiscus sabdarifa*, devido a presença de flavonóides que estão interligados a ação antioxidante, anti-inflamatória e antitumoral (MACHADO, 2008), das cumarinas que podem apresentar atividade anticancerígenas, antimicrobiana e moluscicida (GASPAROTTO *et al*, 2005) e as saponinas com vários estudos demonstrando sua atividade larvicida, inclusive sob larvas do *Aedes aegypti* – causador da dengue (GARCEZ, 2013).

Constituinte	Resultado
<b>Flavonoides</b>	<b>Positivo</b>
<b>Esteroides</b>	Negativo
<b>Taninos</b>	Negativo
<b>Cumarinas</b>	<b>Positivo</b>
<b>Saponinas</b>	<b>Positivo</b>
<b>Glicosídeos</b>	Negativo
<b>Terpenoides</b>	Negativo

Tabela 1 -Resultado dos testes fitoquímicos

## ENSAIO DE TOXICIDADE

Atualmente, o teste de letalidade utilizando-se *Artemia salina* é usado para identificar o efeito citotóxico de compostos químicos ou fitoquímicos. Este consiste em um teste preliminar na triagem de extratos aquosos ou metanólicos, toxinas, pesticidas e outros (SARAH, 2017). Verificou-se que o extrato aquoso de *Hibiscus sabdarifa* não apresentou toxicidade frente a *Artemia salina*, uma vez que a concentração de 1000 ppm não conseguiu matar 50% dos indivíduos. Segundo Meyer (1982), são consideradas tóxicas substâncias que apresentam valores de DL<sub>50</sub> abaixo de 1000 ppm. O motivo que corrobora a observação da baixa toxicidade do Hibisco sobre A.

*salina* é o fato do cálice da planta ser comumente utilizada na alimentação tradicional de vários povos (ADESOKAN, 2013).

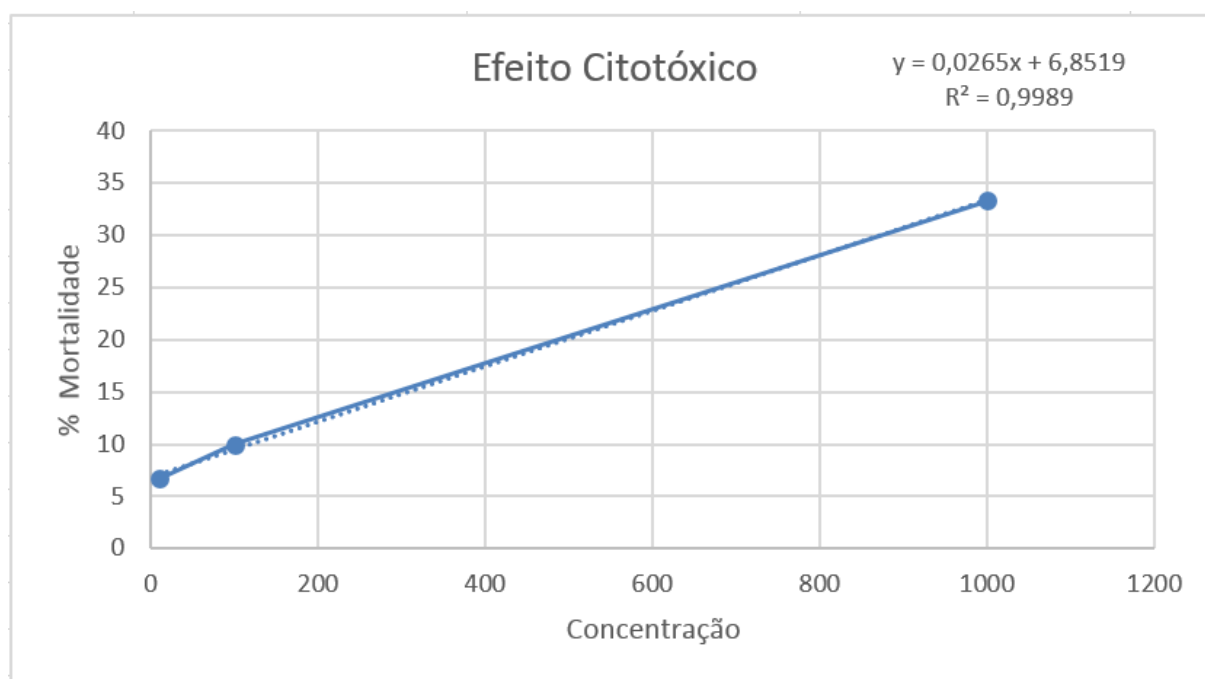


Figura 1- Curva DL<sub>50</sub> para o extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa*

Dados: porcentagem de náuplios de *Artemia salina* mortos em relação ao aumento de concentração do extrato aquoso evidenciados pela linha azul no gráfico (concentrações 10, 100 e 1000 mg/mL). A DL50 é observada é superior a 1000 ppm PROBIT.

## ENSAIO COM REDUÇÃO DO RADICAL ABTS EM TEAC

Uma das estratégias para se avaliar o potencial antioxidante do cálice de Hibisco foi utilizar o método ABTS<sup>+</sup>. Este método tem por finalidade avaliar a captura de radicais livres. A vantagem do ABTS em vista de outros testes que existem para identificar a atividade antioxidante consiste na sua simplicidade, que pode entrar na rotina de qualquer laboratório bem como de inibir processos oxidativos orgânicos vistos em plantas. De acordo com BORGES (2011) os efeitos defensivos de antioxidantes naturais em frutas e vegetais estão relacionados a três grandes grupos: ácido ascórbico e fenólicos como antioxidantes hidrofílicos e carotenóides como antioxidantes lipofílicos. O valor TEAC caracteriza a capacidade da amostra testada em reagir com o radical ABTS<sup>+</sup>.

O valor encontrado foi de 324,95 mM Trolox/g, que se faz justificado por ser um resultado bem similar ao encontrado por SAYARGO-AYERDI (2007). Este potencial pode ser considerado baixo devido ao modo como foi obtido. Ramos (2011) realizou uma análise antioxidante no extrato aquoso e no extrato etanólico do *Hibiscus sabdariffa*. Ele verificou que o extrato etanólico apresentou 263% de atividade antioxidante. Tal

fator pode ser explicado devido ao poder extrator do solvente etanólico ter possibilitado a extração de uma maior quantidade de compostos bioativos. Além disso, a literatura cita que os valores da atividade antioxidante em extratos de *H. sabdariffa* variam de acordo com a origem geográfica da planta (ZHEN et al., 2016), processos de adubação (RAMOS et al., 2011) e métodos de extração (MACIEL et al., 2018). Logo, não podemos descartar a ação destes fatores abióticos na composição do extrato. Em contrapartida o resultado se mostra bem positivo quando comparado a outras espécies da família Malvaceae com extração aquosa. Segundo os achados de OLIVEIRA (2012), ao pesquisar o potencial antioxidante da *Sidastrum micranthum*, *Wissadula periplocifolia*, e *Sida rhombifolia* apresentando TEAC 35.503 mM Trolox/g, 83.15 mM Trolox/g, 67.67 mM Trolox/g, respectivamente.

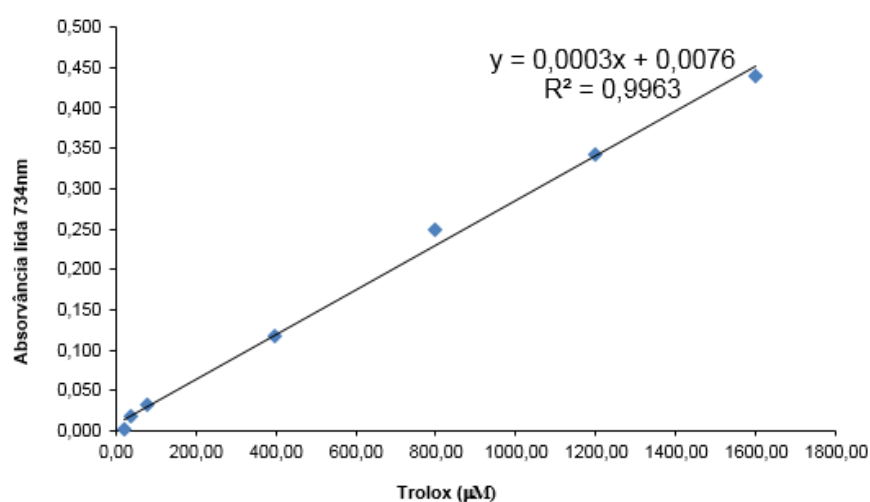


Figura 2- Curva analítica do trolox para determinar a atividade antioxidante pelo método ABTS.

## TESTE DE SENSIBILIDADE PERANTE ANTIMICROBIANOS

Muitos extratos de plantas medicinais possuem expressivas propriedades antimicrobianas, no entanto, a maioria delas permanece inexplorada. Neste estudo, foi observado, a partir das análises dos resultados obtidos que as amostras de um extrato aquoso do cálice de *Hibiscus sabdariffa* exercem efeito citotóxico dependente de concentração sobre as cepas bacterianas de *Escherichia coli* AB 1157, uma vez que foi observado halo de inibição a partir da concentração de 24 µL. Resultado em conformidade e até com maior halo que os encontrado por ALMEIDA (2018) que fez o mesmo teste porém utilizando a cepa BW 9091, knockout para o gene xthA, responsável pelo sistema de reparo provindo de danos oxidativos no DNA bacteriano, mais precisamente, em fase exponencial de crescimento.



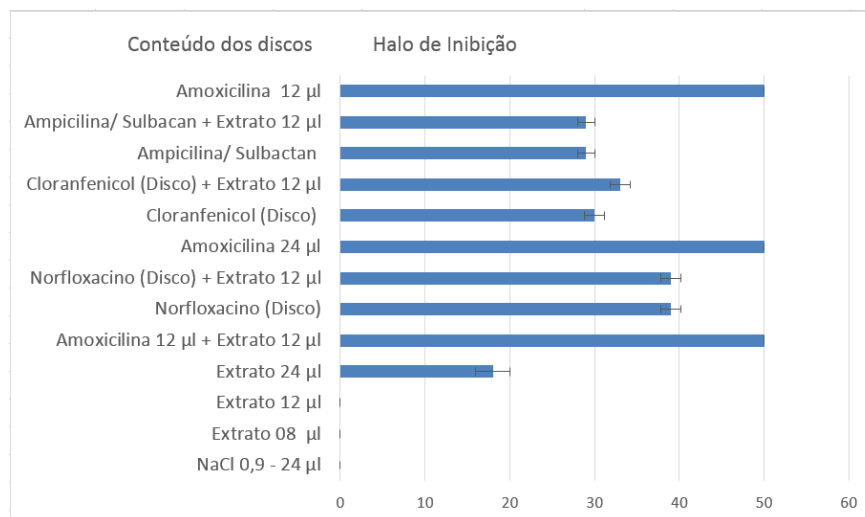


Figura 3- Correlação dos diversos tratamentos\* utilizando diferentes volumes, associados ou não ao extrato aquoso de *Hibiscus sabdariffa* e os halos de inibição de crescimento bacteriano para a cepa *E. coli* AB AB1157.

\*Dados constantes no eixo das abscissas: 24 µL de Cloreto de Sódio (NaCl 0,9% P/V); 8 µL de Extrato Aquoso; 12 µL de Extrato Aquoso; 24 µL de Extrato Aquoso; 12 µL de Amoxicilina (50 mg / mL); 12 µL de Amoxicilina + 12 µL de Extrato Aquoso; Disco de Norfloxacino + 12 µL de extrato; 24 µL de Amoxicilina; Disco de Cloranfenicol (30 µg/mL); Disco de Cloranfenicol + 12 µL de Extrato Aquoso; Disco de Ampicilina associada a Sulbactan (20 µg/mL); Disco de Ampicilina associada a Sulbactan + 12 µL de Extrato Aquoso. No eixo das ordenadas encontramos os valores dos halos de inibição em milímetros.

O extrato de *Hibiscus sabdariffa* se mostrou brandamente eficaz quando associado a antibióticos inibidores da síntese de proteínas, tal qual o cloranfenicol, um agente bacteriostático de amplo espectro, potente inibidor da síntese proteica bacteriana.

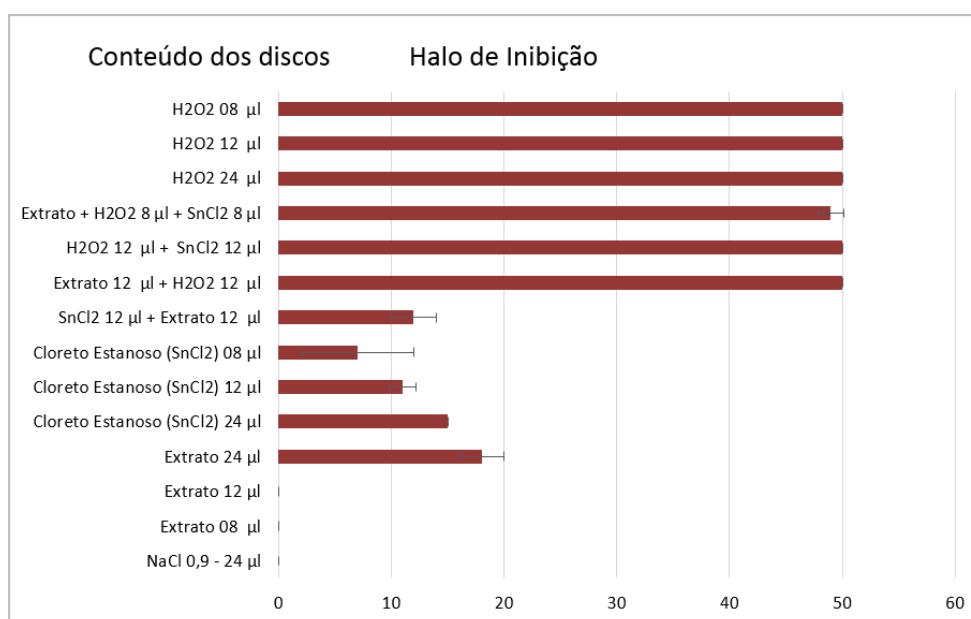


Figura 4 - Correlação dos diversos tratamentos\* utilizando diferentes volumes, associados ou não ao extrato aquoso *in natura* de *Hibiscus sabdariffa* e os halos de inibição de crescimento bacteriano para cepa AB 1157

\*Dados constantes no eixo das abscissas: 24 µL de Cloreto de Sódio (NaCl 0,9% P/V); 8

12 µL de Extrato Aquoso; 12 µL de Extrato Aquoso; 24 µL de Extrato Aquoso; 24 µL de Cloreto Estanoso (SnCl<sub>2</sub>) a 5 mg / mL; 12 µL de Cloreto Estanoso; 8 µL de Cloreto Estanoso; 12 µL de Cloreto Estanoso + 12 µL do Extrato Aquoso; 12 µL de Extrato Aquoso + 12 µL de Peróxido de Hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3% V/V); 12 µL de Peróxido de Hidrogênio + 12 µL de Cloreto Estanoso; 8 µL de Extrato Aquoso + 8 µL de Cloreto Estanoso + 8 µL de Peróxido de Hidrogênio; 24 µL de Peróxido de Hidrogênio; 12 µL de Peróxido de Hidrogênio; 8 µL de Peróxido de Hidrogênio. No eixo das ordenadas encontramos os valores dos halos de inibição em milímetros.

Avaliando o potencial citotóxico e genotóxico do extrato, foi usado como controles positivos o SnCl<sub>2</sub> (cloreto estanoso), um sal de estanho que é um agente redutor capaz de se ligar ao DNA e produzir espécies reativas de oxigênio conforme reação de Fenton e o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (peróxido de hidrogênio), substância quando isolada é inócua, mas capaz de formar radical OH• com metais de transição e frequentemente gera mutação no DNA, pois pode se difundir facilmente através das membranas celulares como a membrana do núcleo (BARREIROS et al., 2006).

Não foi possível a quantificação dos resultados dos testes de extrato associados aos agentes redutores cloreto estanoso e peróxido de hidrogênio pois ambos mesmo isolados atingiram a concentração inibitória máxima, passando dos 50 mm de halo, sendo impossível uma comparação exata. Se faz necessário novos testes com concentrações diminutas.

## CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos pode-se concluir a presença dos metabólitos secundários flavonoides, saponinas e cumarinas. O potencial antioxidante foi de 324,95 mM Trolox/g medido por ABTS.

A dose letal (DL<sub>50</sub>) do extrato foi superior a 1000 ppm, se mostrando segura.

O extrato apresentou ação antimicrobiana na dose de 24µL e sinergismo quando associado a discos de cloranfenicol em cepas de *Escherichia Coli* selvagem (AB 1157) e atividade sinérgica com antibióticos inibidores da síntese de proteínas (Cloranfenicol) e em associação com Cloreto Estanoso (SnCl<sub>2</sub>), sendo necessário novos testes para a identificação da ação conjunta com amoxicilina e peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) já que ambas apresentam um halo extenso, maior que 50 milímetros.

## REFERÊNCIAS

ADESOKAN, I. A. Abiola, O. P., Adigun, M. O., & Anifowose, O. A. **Analysis of quality attributes of *Hibiscus sabdariffa* (zobo) drinks blended with aqueous extract of ginger and garlic.** African Journal of Food Science, v. 7, n. 7, p. 174-177, 2013.

ALMEIDA, P. S. ; NASCIMENTO, C.C.H.C. ; Nascimento, S. F. ; Gomes M. Luisa ; Vasconcelos, S.D. D. de ; Azevedo, L.A.C. ; STEPHENS, P. R. S. ; Diré, G. F. ; Barreto, A. S. **Evaluation of the antioxidant, antimicrobial, cytotoxic and genotoxic activities of the aqueous extract of chalice of *Hibiscus sabdariffa* linn.** European journal of biomedical and pharmaceutical sciences, v. 5, p. 31-44, 2018.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, Jorge M.; DAVID, Juceni P. **Estresse oxidativo: relação entre**

- geração de espécies reativas e defesa do organismo.** Química nova, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.
- BOLOURI M, Mohammad R; VILCINSKAS, Andreas; RAHNAMAEIAN, M. **Cooperative interaction of antimicrobial peptides with the interrelated immune pathways in plants.** Molecular plant pathology, v. 17, n. 3, p. 464-471, 2016.
- BORGES, L. L. **Uma abordagem sobre métodos analíticos para determinação da atividade antioxidante em produtos naturais.** Enciclopédia Biosfera, v. 7, n. 12, p. 1-20, 2011.
- DA-COSTA-ROCHA, Inês, I, Bonnländer, B., Sievers, H., Pischel, I., & Heinrich, M I. **Hibiscus sabdariffa L.—A phytochemical and pharmacological review.** Food chemistry, v. 165, p. 424-443, 2014.
- EVANS, William Charles. **Trease and evans' pharmacognosy E-book.** Elsevier Health Sciences, 1984.
- GARCEZ, W. S. **Substâncias de origem vegetal com atividade larvídica contra Aedes aegypti.** Revista Virtual de Química, v. 5, n. 3, p. 363-393, 2013.
- HAMIDI, M.; JOVANOVA, Blagica; PANOVSKA, T. **Toxicological evaluation of the plant products using Brine Shrimp (Artemia salina L.) model.** Macedonian Pharm Bull, v. 60, n. 1, p. 9-18, 2014.
- KUSKOSKI, E. M; Asuero, A. G., Troncoso, A. M., Mancini-Filho, J., & Fett, R. **Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos.** Food Science and Technology, v. 25, n. 4, p. 726-732, 2005.
- LEITE, NADGHIA F. SOBRAL-SOUZA, C. E., ALBUQUERQUE, R. S., BRITO, D. I., LAVOR, A. K., ALENCAR, L. B. CUNHA, F. A. **Actividad antiparasitaria in vitro citotóxica de cariofileno y eugenol contra Trypanosoma cruzi y Leishmania brasiliensis.** Revista Cubana de Plantas Medicinales, v. 18, n. 4, p. 522-528, 2013.
- MACHADO, H., NAGEM, T. J., PETERS, V. M., FONSECA, C. S., & OLIVEIRA, T. T. D. (2008). **Flavonóides e seu potencial terapêutico.** Boletim do Centro de Biologia da Reprodução, Juiz de Fora, v. 27, n. 1/2, p. 33-39, 2008.
- MACIEL, L. G.; DO CARMO, M. A. V.; AZEVEDO, L.; DAGUER, H.; MOLOGNONI, L.; DE ALMEIDA, M. M.; GRANATO, D.; ROSSO, N. D. **Hibiscus sabdariffa anthocyanins rich extract: chemical stability, in vitro antioxidant and antiproliferative activities.** Food and Chemical Toxicology, v. 113, p. 187–197, 2018.
- MEYER, B. N. **Brine shrimp: a convenient general assay for active plant constituents PI.** Med, v. 45, p. 31-34, 1982.
- OLIVEIRA, A. M. F., SOUSA PINHEIRO, L., SOUTO PEREIRA, C. K., NEVES MATIAS, W., ALBUQUERQUE GOMES, R., SOUZA CHAVES, O. **Total phenolic content and antioxidant activity of some Malvaceae family species.** Antioxidants, v. 1, n. 1, p. 33-43, 2012.
- PEIXOTO, L. O; Azevedo, C. V., Almeida, S. M. A., Freitas, B. S., Melo, M. V. C., & Silva, I. N. G. **Avaliação Microbiológica e Parasitológica de alfaces minimamente processados, comercializados em supermercados da cidade de Fortaleza.** Ceará. Nutrivisa, v. 1, n. 1, p. 27-31, 2014.
- PEREIRA, R. J., DAS GRAÇAS C, M. **Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes.** Journal of Biotechnology and Biodiversity, v. 3, n. 4, 2012.
- RAMOS, D. D.; VIEIRA, M. C. FORMAGIO, A. S. N.; CARDOSO, C. A. L.; RAMOS, D. D.; CARNEVALI, T. O. **Atividade antioxidante de Hibiscus sabdariffa L. em função do espaçamento**

**entre plantas e da adubação orgânica.** *Ciência Rural*, v. 41, n. 8, p. 1331–1336, 2011.

SALEM, M. Z.; OLIVARES-PÉREZ, J.; SALEM, A. Z. M. **Studies on biological activities and phytochemicals composition of Hibiscus species-A review.** *Life Science Journal*, v. 11, n. 5, p. 1-8, 2014.

SÁYAGO-AYERDI, S G. Arranz, S., Serrano, J., & Goñi, I.. **Dietary fiber content and associated antioxidant compounds in roselle flower (*Hibiscus sabdariffa* L.) beverage.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n. 19, p. 7886-7890, 2007.

SILVA E. J., NASCIMENTO C. C. H. C., NASCIMENTO S. F., VASCONCELOS, S. D. D. De, NOGUEIRA R. I., Stephens P. R. S., BARRETO A. S. and DIRÉ G. F. **study of the biological effects of aqueous extracts of schinus terebinthifolius raddi, on the survival fraction of mutant and wild strains of escherichia coli.** *Merit Research Journals* v 6 p 89, 2018.

ZHEN, J.; VILLANO, T. S.; GUO, Y.; QI, Y.; CHIN, K.; PAN, M.; HO, C.; SIMON, J. E.; WU, Q. **Phytochemistry, antioxidant capacity, total phenolic content and anti-inflammatory activity of *Hibiscus sabdariffa* leaves.** *Food Chemistry*, v. 190, p. 673–680, 2016.

## ISOLAMENTO E IDENTIFICAÇÃO DA MISTURA DE $\alpha$ - E $\beta$ -AMIRINAS: BIOMARCADORES PARA A PADRONIZAÇÃO DO EXTRATO DE FOLHAS DE *CHROMOLAENA ODORATA*

Data de aceite: 26/03/2020

Data de submissão: 13/01/2020

### Temistocles Barroso de Oliveira

Fiocruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos -  
Farmanguinhos  
Rio de Janeiro – RJ  
<http://lattes.cnpq.br/7708814317410094>

### Lucas Gomes Bezerra

Fiocruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos -  
Farmanguinhos  
Rio de Janeiro – RJ  
<http://lattes.cnpq.br/7192000695736634>

### Simone Sacramento Valverde

Fiocruz, Instituto de Tecnologia em Fármacos -  
Farmanguinhos  
Rio de Janeiro – RJ  
<http://lattes.cnpq.br/4557544100221923>

**RESUMO:** A mistura dos triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina (ABA) é obtida de diversas espécies vegetais e suas atividades estão amplamente descritas na literatura científica como anti-inflamatória, analgésica, sedativa, ansiolítica, hepatoprotetora, antidepressiva, entre outras. Em *Chromolaena odorata* (CO) essa mistura foi isolada e determinada através de CLC, CG-EM, CCD e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , visando sua definição como biomarcadores dos extratos

de folhas de CO para sua padronização e posterior desenvolvimento de formulação farmacêutica para o tratamento de dor e distúrbios inflamatórios. Esses resultados permitiram relacionar o uso tradicional desta espécie como antibacteriana, antiespasmódica, antitripanossoma, antifúngica, anti-hipertensiva, anti-inflamatória, diurética, adstringente, antiprotozoária e como agente hepatotrópico com as atividades biológicas descritas na literatura científica para esta planta. Conhecida popularmente como “arnica do mato”, CO é nativa das Américas Central e do Sul e distribuída em áreas tropicais e subtropicais do mundo, bem como em todo território brasileiro. A mistura binária de ABA foi obtida a partir da extração por maceração dinâmica de folhas de CO com metanol, detectada em CCD, seguida de CG-EM das frações que a continham. Após este, foi realizada CCDP para sua purificação e CCD em 2D para verificar sua pureza e teve, após seu isolamento em CCDP sua identidade confirmada através de RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  além de comparação com padrão analítico.

**PALAVRAS-CHAVE:**  $\alpha$ - e  $\beta$ -amirinas, biomarcadores, padronização de extratos, *Chromolaena odorata*

ISOLATION AND IDENTIFICATION OF A

### BIOMARKERS TO THE STANDARDIZATION OF CHROMOLAENA ODORATA LEAVES EXTRACT

**ABSTRACT:** The mixture of triterpenes  $\alpha$  and  $\beta$ -amirin (ABA) is obtained from several plant species and their activities are widely described in the scientific literature as an anti-inflammatory, analgesic, sedative, anxiolytic, hepatoprotective, antidepressant, among others. In *Chromolaena odorata* (CO) this mixture was isolated and determined by CLC, CG-MS, CCD, and  $^1\text{H}$ , and  $^{13}\text{C}$  NMR, aiming at its definition as biomarkers of CO leaf extracts for its standardization and further development of a pharmaceutical formulation for treatment of pain and inflammatory disorders. These results allowed us to relate the traditional use of this species as antibacterial, antispasmodic, antitrypanosomal, antifungal, antihypertensive, anti-inflammatory, diuretic, astringent, antiprotozoal and as hepatotropic agent with the biological activities described in the scientific literature for this plant. Popularly known as “arnica do mato”, CO is native to Central and South America and distributed in tropical and subtropical areas of the world, as well as throughout Brazil. The binary ABA mixture was obtained by dynamic maceration of CO sheets with methanol, detected in CCD, followed by CG-MS of the fractions containing it. After this, CCDP was performed for its purification and 2D CCD to verify its purity and had, after its isolation in CCDP, its identity confirmed by  $^1\text{H}$  and  $^{13}\text{C}$  NMR and compared with analytical standard.

**KEYWORDS:**  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrins, biomakers, extract standardization, *Chromolaena odorata*

## 1 | INTRODUÇÃO

Os triterpenos pentacíclicos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina (ABA) são do tipo ursano e oleanano, respectivamente, e amplamente encontrados em plantas medicinais, especialmente em óleo resinas de plantas da família Burseraceae (Fig.: 1). Essas substâncias apresentam descrição na literatura científica com importantes atividades biológicas como antimicrobiana, antifúngica, anti-inflamatória, anti-úlceras, antipruriginosa, antinociceptiva, hepatoprotetora, ansiolítica e antidepressiva (Vásquez et al., 2019; Melo, 2009; Aragão, 2008; Oliveira, 2005; Oliveira et al., 2004 a e b; Otuki et al., 2005b e Medeiros et al., 2007). Os mecanismos responsáveis pelas atividades relatadas como a supressão da expressão da COX-2, de citocinas, ação antiagregação plaquetária e antilipoxigenase e bloqueio da ativação de NF $\kappa$ B (Aragão et al., 2004 e 2006; Vitor et al., 2009).



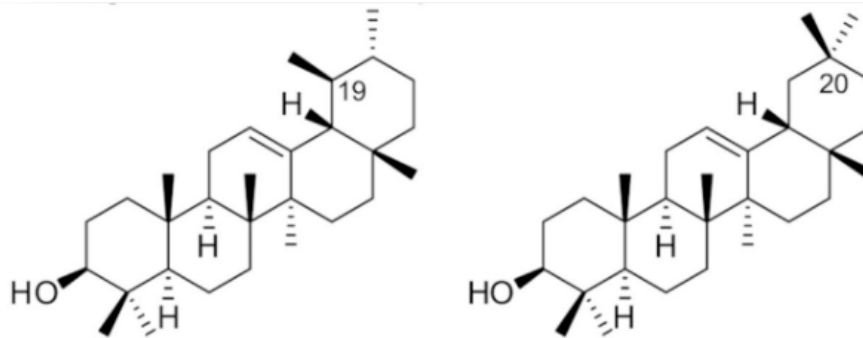


Fig.: 1 -  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina

*Chromolaena odorata* (L.) King & Robinson (*Eupatorium odoratum* L.) (Fig.: 2) mais conhecida como arnica também possui como nomes populares arnica do mato, mato amargo, eupatorium, Erva daninha de São, erva do diabo, erva francesa, hagonoy, co hoy, sendo conhecida na Indonésia como ki rinyuh e si koko (Vaisakh e Pandey, 2012; Prawiradiputra & Rinyuh, 2007). CO apresenta uma distribuição mundial que ocorre da América do Norte à América do Sul, existem poucas destas espécies na Europa, Ásia e África tropical, estendendo seu território até países asiáticos como Indonésia, Índia, China, Bangladesh, Tailândia e outros.



Fig.: 2 - *Chromolaena odorata*

No Brasil, esta planta é uma espécie nativa e ocorre em todo o território brasileiro com seus domínios fitogeográficos: Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa, Pantanal. Diferentes espécies de plantas medicinais brasileiras são popularmente chamadas por “arnica”, sendo seu principal uso para tratar feridas, edema, e outras doenças inflamatórias (Man, 2010; Oliveira, 2012; Akah, 1990; Wagner, H. & Bladt, S., 1996. Carvalho, et al., 2012)

Suas ações analgésicas, anti-inflamatórias e cicatrizantes, coincidem com ações apresentadas pela mistura de ABA (Uritu, et al., 2018; Vázquez, et al., 2019; Jäger, S. et al., 2009) Considerada ainda como uma espécie daninha, invasora e alelopática, por causar prejuízo em plantações, na produção agrícola, em ecossistemas naturais, especialmente para os pequenos produtores rurais de plantas produtoras de óleo, como palmeiras, coco, de borracha e de cítricos, uma vez que suprime a vegetação

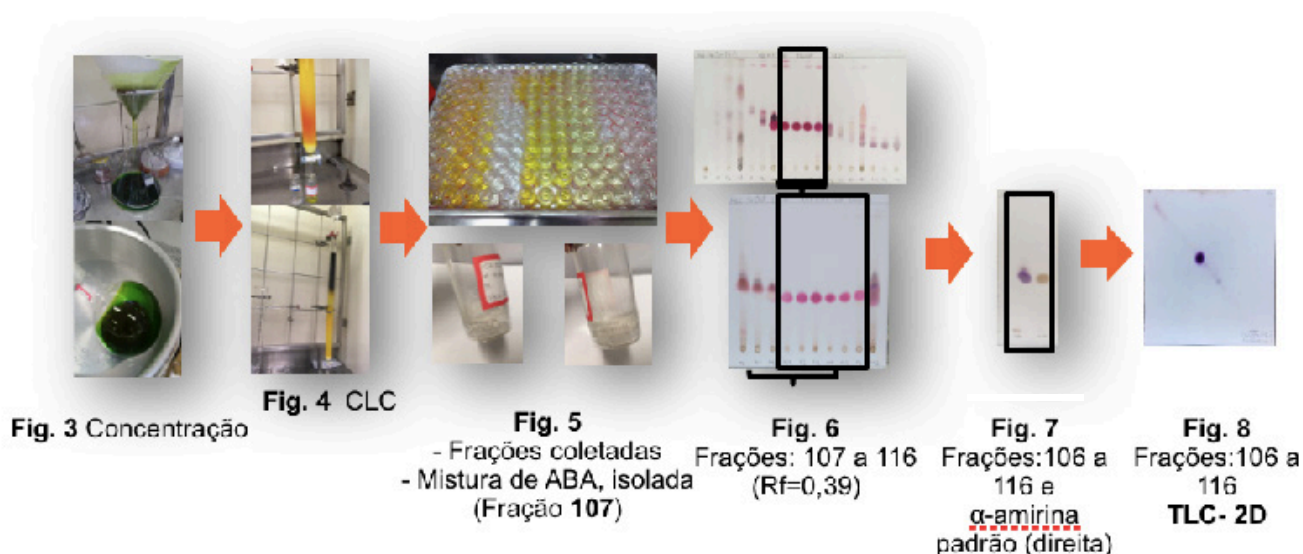
vizinha (Bamba et al, 1993; Irobi, 1992).

## 2 | MATERIAIS E MÉTODOS

Folhas de *Chromolaena odorata* (CO) coletadas no Fórum Itaboraí (FIT-Fiocruz-Petrópolis) (22°51'57.134"S; 43°18'86.719"W) foram submetidas à identificação, com exsicata depositada no Jardim Botânico do RJ, mondadas, secas em estufa à temperatura de 40°C e pulverizadas em moinho de facas.

121g do material foi submetido à extração com 1,8L de metanol por maceração dinâmica em “shaker” durante 6h. O filtrado foi concentrado sob pressão reduzida em evaporador rotatório, produzindo 12,45g de extrato (~10,3% de rendimento) (Fig. 3).

O extrato bruto metanólico de folhas (COF) obtido foi submetido às cromatografias: líquida de alta eficiência (CLAE) utilizando-se duas metodologias: (Valverde et al., 2009; Dias et al., 2011) ; líquida em coluna (CLC) (Fig.: 4), utilizando solventes em gradiente de polaridade crescente do hexano ao metanol e as frações recolhidas, em volume de ~20mL, cada (Fig.: 5), analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD), reveladas fisicamente sob lâmpada de UV e quimicamente com solução de anisaldeído sulfúrico (Wagner & Blatt, 1996) e reunidas por semelhança cromatográfica (Fig. 6 a 8). Em seguida, essas frações também foram submetidas à CG-EM (Fig.: 9) nas condições: 60°C (10 min) a 120°C e taxa de aquecimento de 6°C/min, 120-290°C (15°C/min); 290°C (17 min); gás carreador, He, fluxo 1mL/min; Injeção da amostra: 1mg diluída em hexano; técnica de injeção *splitless*; 70eV, no modo de ionização eletrônica (EI); temperatura da fonte 200°C; *scan* mass *m/z* 40-650 e temperatura de interface, 300°C (Veiga Jr. et al., 1997).



Para o isolamento da mistura isomérica de ABA, as frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada do tipo preparativa (CCDP) e, em seguida, visando a confirmação da sua pureza, submetida à CCD em duas dimensões (CCD 2D), e à

RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , bem como às técnicas DEPT 135°, HSQC e HMBC.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

Sob reação química com solução de anisaldeído sulfúrico, a  $\alpha$ -amirina revela coloração amarela, enquanto a  $\beta$ -amirina, apresenta coloração violeta. Assim, quando a mistura de ABA foi revelada, inicialmente observou-se uma coloração amarela e, logo em seguida, a coloração violeta que a sobrepôs, indicando-nos a presença de ambas as amirinas, alfa e beta (Fig.: 6 e7). A fração 107 (reunião entre 106 e 116) apresentou-se na forma de cristais aciculares difusos, com faixa de fusão entre  $149,6^\circ$  a  $191,7^\circ\text{C}$ , compatível com a mistura observada em CG-EM de seis substâncias, o que confirmou não apenas a presença das duas amirinas (55,92%), bem como de mais 4 substâncias: Taraxasterol (34,07%), espatulenol (0,25%) e 2 não identificadas (5,36 e 27,51%) (Fig. 9 e Tabela 1).

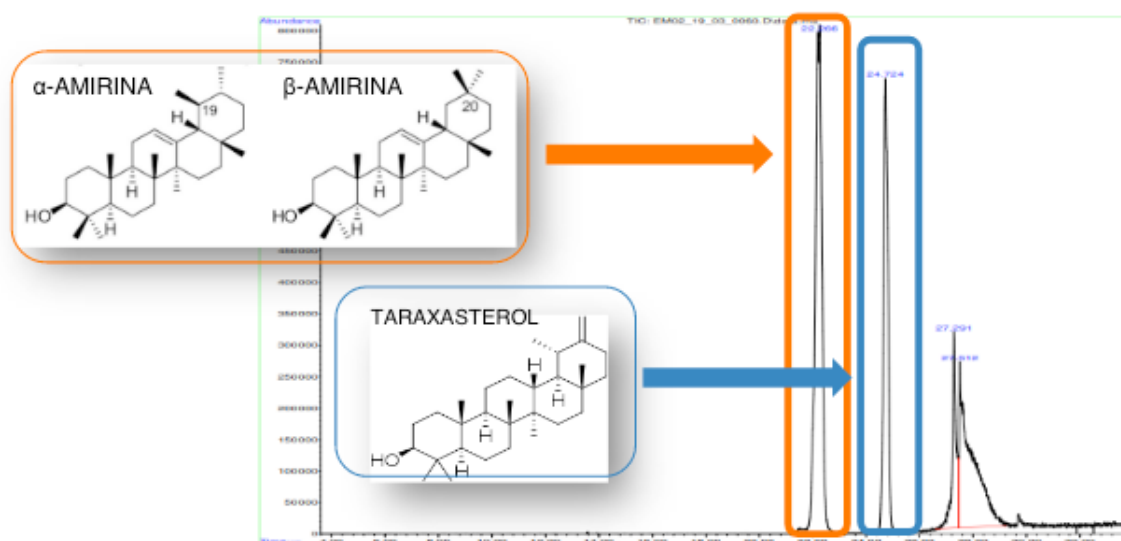


Fig. 9 -TIC da Fração 107 de COF

<b>13,57</b>	<b>0,25</b>	<b>espatulenol</b>
<b>22,26</b>	<b>55,92</b>	<b><math>\alpha</math> e <math>\beta</math>-amirinas</b>
<b>24,72</b>	<b>34,07</b>	<b>Taraxasterol</b>
<b>27,29</b>	<b>5,36</b>	<b>NI</b>
<b>27,51</b>	<b>27,51</b>	<b>NI</b>

Tabela 1 – Substâncias identificadas por CG-EM na Fração reunida (106-116)

As frações 106 a 116 que apresentaram a mistura binária ABA, confirmada inicialmente através de CCD, utilizando-se como padrão comercial, a  $\alpha$ -amirina (Fig.: 7), foram reunidas, seguida de isolamento por CCDP e da confirmação do seu isolamento por CCD em duas dimensões (CCD 2D) (Fig. 8), e RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , dos carbonos olefínicos e carbinólico de ABA (Fig.: 10 e Tabela 2).

<b>C (Nº)</b>	<b>RMN <math>^1\text{H}</math> (1)</b>	<b>RMN <math>^{13}\text{C}</math> (1)</b>	<b>RMN <math>^1\text{H}</math></b>	<b>RMN <math>^{13}\text{C}</math></b>
	500MHz; $\text{CDCl}_3$	500MHz; $\text{CDCl}_3$	400MHz; $\text{CDCl}_3$	400MHz; $\text{CDCl}_3$
C3 - carbinólico	3,16 / 3,15	79,6 / 79,3	3,18 / 3,22	78,68 / 78,70
C12 - olefínico	5,06 / 5,12	124,4 / 121,7	5,12 / 5,17	124,43 / 121,73
C13 - olefínico	-	139,5 / 145,2	-	139,6 / 145,3

Tabela 2 – Dados de RMN dos carbonos olefínicos e carbinólico de ABA

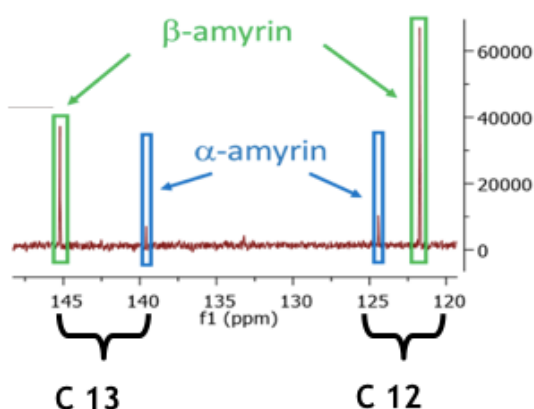


Fig. 10 - RMN  $^{13}\text{C}$  dos carbonos olefínicos e carbinólico da mistura de ABA

## 4 | CONCLUSÕES

A presença de ABA permitiu sua indicação como biomarcador dos extratos alcoólicos de CO, além de justificar a utilização popular de COF, uma vez que as ações anti-inflamatória, antioxidante e antinociceptiva, tanto na dor de origem neurogênica quanto na dor de origem inflamatória descritas para os triterpenoides  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina, confirmados nas frações reunidas 106 a 116, corroboram com o uso popular dessa espécie em contusões e processos inflamatórios como sucedânea à espécie *Arnica montana*.

A análise através da RMN  $^{13}\text{C}$  mostra-se eficaz, inequívoca e reproduzível para a caracterização, identificação e proporção dos triterpenos  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina (ABA) (1:2), ainda que em mistura binária, contribuindo especialmente quando a metodologia em CLAE não for adequada aos extratos em estudo.

Este é o primeiro relato da presença e isolamento da mistura de  $\alpha$  e  $\beta$ -amirina (ABA) em *Chromolaena odorata* obtida com alto grau de pureza, caracterizada e identificada através de CG-EM e RMN $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ .

Agradecimentos: Ao Programa INOVA Fiocruz pelo apoio, fomento e bolsa concedida, ao CNPq, à Farmanguinhos e à Fiocruz.

## REFERÊNCIAS

Akah, P.A. **Mechanism of Hemostatic Activity of *Eupatorium odoratum***. Int. J. Crude Drug Res., 28, 233-235. 1990

Aragão, G.F. **Atividade anti-inflamatória, anti-agregante plaquetária e efeitos centrais de alfa e beta amirina isolada de *Protium heptaphyllum* (Aubl) March**. Mestrado, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, CE, Brasil (2004)

Bamba, D., Bessiere, J.M., Marion, C., Pelissier, Y., Fourate, I. **Essential Oil of *Eupatorium odoratum***. Planta Medica, 59, 184-185. 1993

Carvalho, T.S.; Oliveira, T.B.; Souza, S.P.; Valverde, S.S. **Chemistry of *Eupatorium odoratum* (Asteraceae)**, a Brazilian Arnica. Oral Presentation. III Simpósio Internacional de Plantas Medicinais e Nutracêuticos (3ISMNP). Aracaju. SE, Brasil. 2012

Dias, M.O., Hamerski, L., Pinto, A.C. **Separação Semipreparativa de  $\alpha$  e  $\beta$ -Amirina por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência**. Quím. Nova, 34(4), 704-706. 2011

Irobi, O.N. **Activities of *Chromolaena odorata* (Compositae) leaf extract against *Pseudomonas aeruginosa* and *Streptococcus faecalis***. J. Ethnopharmacol., 37, 81-83. 1992

Jäger, S., Holger, T., Kopp, T., Laszczyk, M.N., Scheffler, A. Gustav, C. **Pentacyclic Triterpene Distribution in Various Plants – Rich Sources for a New Group of Multi-Potent Plant Extracts**. Molecules. 14, 2016-2031; doi:10.3390/molecules14062016. 2009

Man, N.B.C. **Phytochemical Analysis of the Leaves of *Chromolaena odorata* (Asteraceae)** Bachelor of Science (Hons.) Chemistry Faculty of Applied Sciences University Teknologi Mara. 2010.

Melo, C.M. Neves, K.M.M.B., Morais, T.C., Rao, V.S., Santos, F.A., Brito, G.A.B.  **$\alpha$ ,  $\beta$ -amyrin,**

**a natural triterpenoid ameliorates L-arginine-induced acute pancreatitis in rats.** World J Gastroenterol. 14; 16(34): 4272–4280. doi: 10.3748/wjg.v16.i34.4272. 2010

Oliveira, F.A., Chaves, M.H., Almeida, F.R., Lima, R.C., Jr, Silva, R.M., Maia, J.L. **Protective effect of alpha- and beta-amyrin, a triterpene mixture from *Protium heptaphyllum* (Aubl.) March. trunk wood resin, against acetaminophen-induced liver injury in mice.** J Ethnopharmacol 98: 103–108. 2005

Oliveira, F.A., Lima-Junior, R.C., Cordeiro, W.M., Vieira-Junior, G.M., Chaves, M.H., Almeida, F.R. **Pentacyclic triterpenoids, alpha,beta-amyrins, suppress the scratching behavior in a mouse model of pruritus.** Pharmacol Biochem Behav 78: 719–725. 2004a

Oliveira, F.A., Vieira-Junior, G.M., Chaves, M.H., Almeida, F.R., Santos, K.A., Martins, F.S. **Gastroprotective effect of the mixture of alpha- and beta-amyrin from *Protium heptaphyllum*: role of capsaicin-sensitive primary afferent neurons.** Planta Med 70: 780– 782. 2004b

Otuki, M.F., Ferreira, J., Lima, F.V., Meyre-Silva, C., Malheiros, A., Muller, L.A. **Antinociceptive properties of mixture of alphaamyrin and beta-amyrin triterpenes: evidence for participation of protein kinase C and protein kinase A pathways.** J Pharmacol Exp Ther 313: 310–318. 2005a.

Otuki, M.F., Vieira-Lima, F., Malheiros, A., Yunes, R.A., Calixto, J.B. **Topical antiinflammatory effects of the ether extract from *Protium kleinii* and alpha-amyrin pentacyclic triterpene.** Eur J Pharmacol., v. 507(1-3), 253-259. 2005b

Prawiradiputra, B.R. & Rinyuh, Ki. ***Chromolaena odorata* (L) R M King dan H Robinson: Gulma padang rumput yang merugikan Wartazoa.** 17 (1). 2007

Uritu, C.M. Mihai, C.T., Stanciu, G-D., Alexa-Stratulat, T., Luca, A., Leon-Constantin, M.M., Stefanescu, R., Bild, V., Melnic, S., Tamba, B. **Medicinal Plants of the Family Lamiaceae in Pain Therapy: A Review.** Pain Res Manag.: 7801543. doi: 10.1155/2018/7801543. 2018

Vaisakh, M. N. & Pandey, A. **Pharmacognostic study of leaves of *Chromolaena odorata*.** UNM International Journal of Pharmaceutical Research and Development (IJPRD). 2012

Vázquez, L.H.; Palazon, J., Navarro-Ocaña, A. **The Pentacyclic Triterpenes,  $\alpha$ - and  $\beta$ -amyrins: A Review of Sources and Biological Activities.** Disponível em: www.intechopen.com. Acesso em: set, 2019

Veiga Jr, V.F., Patitucci, M.L., Pinto, A.C. **Controle de Autenticidade de Óleos de Copaíba Comerciais por Cromatografia Gasosa de Alta Resolução.** Quím. Nova, 20(6), 612-615. 1997.

Vitor, C.E., Figueiredo, C.P., Hara, D.B., Bento, A.F., Mazzuco, T.L., Calixto, J.B. **Therapeutic action and underlying mechanisms of a combination of two pentacyclic triterpenes,  $\alpha$  and  $\beta$ -amyrin, in a mouse model of colitis.** British Journal of Pharmacology. 157, 1034–1044. 2009

Wagner, H.; Bladt, S. **Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas.** 2<sup>a</sup> ed., München: Germany. 1996





## ÓLEO ESSENCIAL DE COPAÍBA (*Copaifera langsdorffii* DESF.) NO TRATAMENTO DE MASTITE BOVINA

Data de aceite: 26/03/2020  
Data de submissão: 01/03/2020

### **Liandra Maria Abaker Bertipaglia**

(Universidade Brasil, UB, Descalvado-SP) <http://lattes.cnpq.br/6395901509400650>

### **Josiane Clarindo de Freitas**

(Faculdades Integradas Aparício Carvalho, FIMCA, Vilhena-RO e Universidade Brasil, UB, Descalvado-SP) <http://lattes.cnpq.br/5381354593551898>

### **Gabriel Maurício Peruca de Melo**

(Universidade Brasil, UB, Descalvado-SP) <http://lattes.cnpq.br/7523098767637138>

### **Vando Edesio Soares**

(Universidade Brasil, UB, Descalvado-SP) <http://lattes.cnpq.br/7962561205493122>

### **Wanderley José de Melo**

(Universidade Estadual Paulista, FCAV/UNESP, Jaboticabal-SP e Universidade Brasil, UB, Descalvado-SP). Pesquisador Sênior CNPq. <http://lattes.cnpq.br/9360208572775742>

**RESUMO:** O uso de óleos essenciais com propriedades antimicrobianas tem despertado interesse no setor industrial, tão como, nos sistemas agropecuários orgânicos. Atualmente, observa-se maior aceitação do consumidor pelos produtos de sistemas orgânicos, em virtude da menor utilização de substâncias sintéticas o que reduz a possibilidade de contaminação

alimentar. Neste sentido, o presente capítulo busca contribuir com informações e produtos que possam ser incorporadas nos sistemas de produção de leite, no tratamento da mastite. Com o objetivo de avaliar o efeito do óleo de copaíba, no tratamento da mastite subclínica bovina e na alteração na composição química do leite, foi avaliada a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba em pasta formulada pela empresa NewAgri® (convênio Universidade Brasil/Empresa) para aplicação intramamária (20% de óleo de copaíba), comparada ao tratamento com o antibiótico sintético gentamicina (250 mg). Foram utilizadas vacas mestiças (Holandês x Zebu), múltiparas e em lactação. Foi realizado o teste Califórnia Mastite Teste para detecção da mastite subclínica com o objetivo de escolha dos animais que participariam do teste. A avaliação experimental se deu um dia antes do tratamento dos animais, nos três dias de tratamento e, quatro dias após a aplicação intramamária. Amostras de leite foram colhidas para análise química e microbiológica. Não houve alteração significativa na composição química do leite dos animais nos tratamentos avaliados. Detectou-se presença de microrganismos relacionados à mastite subclínica (famílias Micrococcaceae, Enterobacteriaceae e Pseudomonadaceae) antes, durante e após os tratamentos, no entanto, pela frequência dos isolados pode-se concluir que o óleo de copaíba na concentração

de 20%, apresenta-se viável para o tratamento alternativo de mastite subclínica bovina, na presença de bactérias específicas (*E.coli*, *Proteus* sp. e *Pseudomonas* sp.), quatro dias após o tratamento.

**PALAVRAS-CHAVE:** composição do leite, contagem de bactéria total, óleo medicinal, terapia alternativa, gentamicina

## COPAIBA ESSENTIAL OIL (*Copaifera langsdorffii* DESF.) ON BOVINE MASTITIS TREATMENT

**ABSTRACT:** The application of essential oils with antimicrobial property has aroused interest in the industrial sector, as well as in organic agricultural systems. Currently, there is greater consumer acceptance for products from organic systems, due to the lower use of synthetic substances, which reduces the possibility of food contamination. This sense, this chapter seeks to contribute information that can be incorporated into milk production systems in the treatment of mastitis. In order to evaluate the effect of copaiba oil on the treatment of bovine subclinical mastitis and on the change in the chemical composition of milk, we evaluated the antimicrobial activity of copaiba oil in paste for intramammary application (20% copaiba oil), formulated by NewAgri® company (Brazil University/ Company agreement), and compared to treatment with the synthetic antibiotic gentamicin (250 mg). Crossbred (Holstein x Zebu), multiparous and lactating cows were used. The California Mastitis Test was performed to detect subclinical mastitis in order to choose the animals that would participate in the test. The experimental evaluation occurred in one day before treatment, in the three days of treatment and, in four days after intramammary treatment. There was no significant change in the milk chemical composition in animals under treatment. The presence of microorganisms related to subclinical mastitis (Micrococcaceae, Enterobacteriaceae and Pseudomonadaceae families) was detected before, during and after treatments, however, due to the frequency of the isolates, it can be concluded that copaiba oil at a concentration of 20% is viable for the alternative treatment of bovine subclinical mastitis, in the presence of specific bacteria (*E.coli*, *Proteus* sp. and *Pseudomonas* sp.), four days after treatment.

**KEYWORDS:** alternative therapy, medicinal oil, gentamicina, milk composition, total bacteria count

## 1 | INTRODUÇÃO

Os tratamentos usuais contra os agentes infecciosos causadores da mastite, especialmente contra as bactérias, são baseados na infusão intramamária de antimicrobianos, no entanto, nem sempre são efetivos além de estarem associados com a resistência bacteriana e à presença de resíduos desse medicamento no leite. Para Tozzetti et al. (2008), o método mais utilizado nos tratamentos das mastites é

o convencional, com a utilização de anti-inflamatórios e antimicrobianos, que são excretados no leite, sendo assim necessário obedecer ao período de carência e desprezar o leite do animal em tratamento, o que representa prejuízos ao produtor de leite, além de gerar uma preocupação para a indústria laticinista e para a saúde pública.

Diante deste cenário, o uso de produtos naturais baseados em óleos essenciais e ou extrato de plantas configura-se como uma importante alternativa para o controle de enfermidades nos animais de produção.

Óleos essenciais são produtos aromáticos de metabolismo secundário de plantas, normalmente produzidos por células secretoras ou grupos de células, sendo encontrados em diversas partes do vegetal, como folhas, caules, cascas ou frutos, e frequentemente apresentam composição diferente (CONNER, 1993).

Para Wanzala et al., (2005), é crescente a utilização desses produtos naturais na produção animal, uma vez que é de baixo risco. Com isso, vem ganhando importância dentro dos sistemas de produção, com o intuito de substituir o uso de antibióticos e outros químico-convencionais que além do alto custo, causam danos tanto ao ambiente, quanto à saúde pública.

As plantas medicinais vêm contribuindo fortemente no desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas por meio de seus metabólitos secundários. Estes atuam de forma direta ou indireta no organismo, inibindo ou ativando importantes alvos moleculares e celulares (CALIXTO, 2005).

A utilização da fitoterapia sugere que os medicamentos naturais apresentam uma relação risco-benefício favorável. Entretanto, esses métodos podem ser considerados como um potencial e atraente recurso terapêutico. Persiste a necessidade de avaliar os reais benefícios e os possíveis riscos apresentados através da realização de ensaios clínicos conduzidos em conformidade com os princípios da ciência clínica atualmente praticada (BRASIL, 2008).

Fitoterapia, segundo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2010) é a utilização de vegetais em preparações farmacêuticas, como extratos, pomadas, tinturas e cápsulas, empregados no tratamento de doenças, manutenção e recuperação da saúde. Medicamentos fitoterápicos são aqueles obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, cuja eficácia e segurança são validadas por meio de levantamentos etnofarmacológicos, de utilização, documentações tecno-científicas ou evidências clínicas. Os medicamentos fitoterápicos são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, assim como pela reprodutibilidade e constância de sua qualidade.

As pesquisas com plantas medicinais envolvem investigações da medicina tradicional e popular (etnofarmacológico); isolamento, purificação e caracterização de princípios ativos (química orgânica, fitoquímica); investigações farmacológicas de extratos vegetais e constituintes químicos isolados (farmacologia); transformações químicas de princípios ativos (química orgânica sintética); estudo da relação estrutura/

atividade e dos mecanismos de ação dos princípios ativos (química medicinal e farmacológica) e finalmente a operação de formulações para a produção de fitoterápicos. A integração destas áreas na pesquisa de plantas medicinais conduz a um caminho promissor e eficaz para descoberta de novos medicamentos (MACIEL et al., 2002).

Neste contexto a copaíba da qual extrai-se o óleo resina para a obtenção do óleo essencial vem se destacando por contribuir com a medicina popular e outras terapias. A copaíba é uma árvore de grande porte, da família Leguminosae, subfamília Cesalpinoídea (CASCON, 2004; BRITO et al. 2005; VEIGA JUNIOR et al. 2005; OLIVEIRA et al. 2006; PIERI et al. 2009) que pode chegar até aos 40 metros de altura. Popularmente conhecida como copaibeiras ou pau-d'óleo, as espécies de copaíba são largamente distribuídas nas regiões amazônicas e centro-oeste do Brasil, sendo o óleo de copaíba extraído de várias espécies de *Copaifera* (Leguminosae-Caesalpinoideae).

No território brasileiro ocorrem mais de vinte espécies e entre as mais abundantes destacam-se *C. officinalis* L., *C. guianensis* Desf., *C. reticulata* Ducke, *C. multijuga* Hayne, *C. confertiflora* Bth, *C. langsdorffii* Desf., *C. coriacea* Mart., *C. cearensis* Huber exDucke (CASCON e GILBERT, 2000; VEIGA JÚNIOR e PINTO, 2002).

Além da espécie de copaíba, as características do local de crescimento das árvores também afetam a coloração e composição química do óleo-resina. Entre as características físico-químicas, a baixa viscosidade e acidez do óleo-resina de copaíba são importantes para o processamento farmacêutico, pois o mesmo, nas condições citadas, age como antimicrobiano (VEIGA JUNIOR e PINTO, 2002; PLOWDEN, 2003; CASCON, 2004).

Em um estudo realizado por Veiga Junior e Pinto (2002) com óleo de *Copaifera multijuga*, foram observadas variações na composição de óleos coletados de uma mesma árvore, em períodos diversos do ano (verão-inverno). Além desse caráter, Costa et al., (2018) observaram que a partir das análises cromatográficas, constatou-se que os óleos de copaíba mostraram uma diferença na composição química e isso pode estar relacionado a uma possível adulteração nos óleos vendidos nas feiras livres e nas farmácias.

O óleo de copaíba possui substâncias dos grupos dos sesquiterpenos, diterpenos e terpenoides (MACIEL et al. 2002; VEIGA JUNIOR e PINTO, 2002; ARAÚJO JÚNIOR et al. 2005; OLIVEIRA et al. 2006; RAMOS, 2006; TOGASHI et al. 2008), que podem variar na concentração.

Os terpenóides podem atravessar a membrana, inchando a célula bacteriana, interferindo nos gradientes de pH. Danos causados à membrana da célula bacteriana, bem como prejuízos causados à proliferação celular de *S. aureus* por terpenóides de óleos essenciais foram descritos por Togashi et al. (2008).

Estudo realizado por Brandão (2009) a partir do extrato bruto da casca da raiz (EBCR) da copaíba, baseado nos testes de triagem fitoquímica, foi positivo para fenóis; taninos; flavonoides; antraquinonas; triterpenoides; saponinas; alcaloides.

Bloise (2003) observaram que o óleo de copaíba possui  $\beta$ -cariophileno, princípio

ativo que possui ação germicida, sendo assim deve provocar resultado positivo, havendo produção de halo de inibição de crescimento bacteriano.

Nos últimos anos, pesquisadores têm relatado a sensibilidade das bactérias Gram-positivas aos fitoterápicos. O óleo de copaíba tem muitas substâncias diferentes que poderiam atuar em alvos celulares diferentes, atuando sinergicamente em várias estruturas e mecanismos da célula bacteriana, resultando em uma forma de impedir ou dificultar o surgimento de bactérias resistentes (PACHECO et al. 2006; PACKER e LUZ, 2007; SANTOS et al. 2008; MENDONÇA e ONOFRE, 2009; PIERI et al. 2009).

De maneira geral, o efeito antimicrobiano do óleo de copaíba é atribuído à sua interação com componentes estruturais da célula bacteriana (BELLETTI et al. 2004), como a camada fosfolipídica da membrana celular, aumentando a permeabilidade e ligando-se a constituintes de vital importância para a bactéria (SINGH et al. 2002).

Segundo Braga e Silva (2007), são vários os estudos relacionados ao uso da copaíba (*Copaifera* spp) no tratamento de enfermidades, pois ela apresenta características terapêuticas anti-inflamatória, cicatrizante e ação antimicrobiana contra agentes como *Staphylococcus aureus*, dentre outros.

Dentre as pesquisas voltadas ao tratamento fitoterápico com o óleo de copaíba contra a mastite bovina pode-se citar: Soares et al., (2003), avaliaram a atividade antimicrobiana do óleo de copaíba, na forma de óleo-resina e essencial foram verificadas sobre 55 microrganismos isolados de amostras de leite de vacas diagnosticadas com mastite subclínica. Observou-se que a óleo-resina apresentou boa atividade antimicrobiana em amostras com *Staphylococcus* coagulase positivo, *Staphylococcus* coagulase negativo, *Streptococcus* do grupo C, F, G e *Corynebacterium* spp. Os autores concluíram que frente às bactérias isoladas, a óleo-resina apresentou melhor atividade antimicrobiana do que o óleo essencial de *Copaifera* spp. Braga e Silva (2007), avaliaram o efeito antimicrobiano do extrato da folha da copaíba (*Copaifera langsdorffii*) sobre as bactérias *S. aureus*, sendo neste experimento, realizadas as avaliações de três concentrações do extrato em 0,2; 0,1; 0,05 g/ml pelo método de difusão em disco.

Neste contexto, o objetivo com a pesquisa apresentada neste estudo foi avaliar o uso *in vitro* de pasta de aplicação intramamária em emulsão oleosa elaborada a base de óleo de copaíba, no tratamento alternativo da mastite subclínica e, compará-la ao antimicrobiano sintético.

## 2 | MATERIAL E MÉTODOS

Foram selecionadas 10 vacas da raça mestiças (Holandês x Zebu), multíparas, com peso vivo médio de 500 kg, em terço médio de lactação, com média de produção diária de 10 litros de leite. A seleção dos animais ocorreu em função da detecção positiva de mastite pelo teste de CMT (SCHALM e NOORLANDER, 1957), em um ou mais quartos mamários do úbere.



O delineamento experimental foi inteiramente casualizado, com dois tratamentos que compreenderam da aplicação de pasta intramamária com óleo de copaíba na concentração de 20% (seringas de 10 gramas) e, da aplicação de pomada intramamária com antimicrobiano gentamicina, 250 mg, avaliadas ao longo do tempo (antes do tratamento, durante os 3 dias de tratamento e 4 dias subsequentes ao tratamento). Cada tratamento foi composto por cinco animais. O tratamento foi administrado uma vez ao dia em cada teto positivo ao CMT, após o *pós-dipping* da ordenha, durante três dias.

A pasta em suspensão oleosa com o óleo de copaíba, para a aplicação intramamária, foi formulada e embalada na empresa NewAgri®, convênio Universidade Brasil/empresa. O tratamento com o antimicrobiano (Gentatec® Mastite 250 mg em suspensão oleosa à base de gentamicina, especialmente formulada para aplicação intramamária) foi adquirido pronto para o uso, em loja especializada de insumos para a produção animal.

Na coleta das amostras do leite, os tetos foram higienizados através de imersão em solução antisséptica de álcool iodado (5%), decorridos 30 segundos o excesso de antisséptico foi removido com álcool 70% e seco com papel toalha. Após a higienização seguiu-se o teste da caneca telada e o California Mastitis Test (CMT).

Foram coletados 10 mL de leite em frascos estéreis de 25 mL, abertos apenas no momento da amostragem e fechados em seguida. As amostras foram transportadas refrigeradas até o laboratório para realização dos testes microbiológicos, sendo o isolamento e identificação bacteriana, de acordo com BRITO et al. (1999). As contagens bacterianas totais (CBT, expressadas em UFC/mL) foram obtidas por meio da análise em equipamento automatizado, que adota o princípio de citometria de fluxo.

No isolamento das bactérias, as amostras foram incubadas por 8 horas e em seguida repicadas nos seguintes meios: Agar BHI, Agar MacConkey e Agar Manitol Vermelho de Fenol. Em seguida, as colônias foram observadas quanto a sua forma, cor, bordas, dentre outras características fenotípicas. Após a diferenciação inicial das colônias, estas foram submetidas às provas de identificação preliminar: Coloração de Gram, para observação das características morfológicas e tintoriais; teste de hidrólise ao KOH a 3%, para confirmação do Gram; e prova da catalase. Toda a etapa de identificação foi realizada de acordo com o gênero isolado, utilizando-se provas bioquímicas específicas como recomendado por (KONEMAN. et al. 2008).

Nas análises da composição química do leite (sólidos totais, sólidos totais desengordurados, gordura, proteína, lactose, densidade, pH, condutividade e ponto de congelamento), após a ordenha total da glândula mamária, foram reservados 50 mL do leite, armazenados em tubo tipo Falcon. As análises químicas nas amostras de leite foram realizadas utilizando-se aparelho de infravermelho próximo (Ultrasonic Milk Analyzer, marca Master Classic), empresa NewAgri®.

Os dados da composição química foram analisados usando o procedimento PROC GLM do SAS (2006) e a análise de variância realizada considerando os

efeitos de tratamento e período e suas interações. Os dados foram avaliados como medidas repetidas no tempo (um dia antes do tratamento, nos três dias de aplicação do tratamento e, quatro dias após o tratamento). Foram submetidos à prerrogativa dos testes de normalidade, homogeneidade de variâncias e análise de resíduo. Os dados foram comparados pelo teste t ao nível de 95% de confiança.

Os dados referentes aos parâmetros microbiológicos foram submetidos aos testes Exato de Fisher e Qui-quadrado. A contagem bacteriana total ( $\times 10^3$  UFC/mL) foi transformada em logaritmo na base 10. Aos dados de CMT, empregou-se a técnica de estatística descritiva por meio da distribuição das frequências absolutas para quartos mamários referentes.

### 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO

O teste (California Mastitis Test – CMT) aplicado na verificação da presença de mastite nos quartos mamários foi baseado no resultado padrão, conforme apresentado na Figura 1.



Figura 1: Em A, escore negativo (CMT-) e em B, escore positivo (CMT+) para presença ou não de mastite subclínica ao teste de CMT dos quartos mamários (PE posterior esquerdo; PD posterior direito; AE anterior esquerdo; AD anterior direito)) dos animais experimentais submetidos aos tratamentos com óleo de copaíba e antimicrobiano gentamicina.

No primeiro, segundo ou terceiro dia do tratamento, não foi observada diferença significativa nas alterações das frequências positivas ou negativas referente ao teste do CMT nos quartos mamários dos animais experimentais dos dois tratamentos, ou no total geral dos mesmos (Tabela 1).

Período	Tratamento	CMT	Posterior Esquerdo	Posterior Direito	Anterior Esquerdo	Anterior Direito	Total	
Antes do tratamento	Copaíba	-	4	5	3	3	15	A*
		+	1	0	2	2	5	
	Gentamicina	-	5	4	2	4	15	A*
		+	0	1	3	1	5	
Dia 1 do tratamento	Copaíba	-	4	5	4	3	16	A*
		+	1	0	1	2	4	
	Gentamicina	-	5	5	2	5	17	A*
		+	0	0	3	0	3	
Dia 2 do tratamento	Copaíba	-	5	5	3	3	16	A*
		+	0	0	2	2	4	
	Gentamicina	-	5	5	2	4	16	A*
		+	0	0	3	1	4	
Dia 3 do tratamento	Copaíba	-	4	5	4	3	16	A*
		+	1	0	1	2	4	
	Gentamicina	-	5	4	2	5	16	A*
		+	0	1	3	0	4	

\*: Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, dentro de Período e Total, não diferem entre si pelo teste Exato de Fisher ( $p \geq 0,05$ )

Tabela 1: Frequências de ocorrência do escore positivo (+) ou negativo (-) para mastite subclínica ao teste de CMT, nos quartos mamários (PE posterior esquerdo; PD posterior direito; AE anterior esquerdo; AD anterior direito) dos animais experimentais, antes e durante o tratamento com óleo de copaíba e antimicrobiano gentamicina.\*: Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, dentro de Período e Total, não diferem entre si pelo teste Exato de Fisher ( $p \geq 0,05$ )

No primeiro dia após o período de tratamento foi observada diferença significativa da frequência do teste de CMT (Tabela 2). O quarto mamário anterior do lado esquerdo (AE) dos animais tratados com óleo de copaíba, apresentou 100% dos testes com resultado negativo, diferindo significativamente dos animais que foram tratados com gentamicina, com 20% dos testes positivos. No total, não houve diferença entre os tratamentos na frequência dos resultados positivos ou negativos do CMT.

No segundo dia após o tratamento, observou-se o mesmo comportamento do primeiro dia, na frequência do CMT no quarto mamário anterior esquerdo (AE), para os dois tratamentos avaliados. No entanto, no total geral das frequências do CMT, no tratamento com óleo de copaíba foi observado 100% de testes negativos para mastite subclínica e, para o tratamento com gentamicina, apenas 75% (Tabela 2).

No terceiro dia após o tratamento, observou-se o mesmo comportamento ocorrido no segundo dia após o tratamento, ou seja, a frequência do CMT com resultado positivo

(100%) para o tratamento com óleo de copaíba e 75% com gentamicina. No total geral não houve diferença entre os tratamentos para a frequência dos resultados positivos ou negativos do CMT. No quarto dia após o tratamento, no total geral, não houve diferença significativa nas alterações das frequências dos casos positivos e negativos do teste de CMT, nos dois tratamentos avaliados (Tabela 2).

Nos animais tratados com óleo de copaíba, observou-se que dos 160 quartos mamários submetidos ao teste do CMT apenas 20 foram positivos para mastite, dos quais cinco estavam positivos antes do início do tratamento, oito ocorreram durante o período de tratamento e sete foram após o término do tratamento. Por outro lado, no grupo dos animais tratados com gentamicina, em relação aos 160 testes de CMT realizados, 30 foram positivos para mastite subclínica dos quais 5 já estavam antes do início do tratamento com o medicamento convencional, 7 ocorreram durante o tratamento e 18 foram após o término do tratamento (Figura 2).

Período após tratamento	Tratamento	CMT	Posterior Esquerdo	Posterior Direito	Anterior Esquerdo	Anterior Direito	Total
Dia 1 após	Copaíba	-	5	5	5	4	19
		+	0	0	0	1	1
	Gentamicina	-	5	4	2	4	15
		+	0	1	3	1	5
Dia 2 após	Copaíba	-	5	5	5	5	20
		+	0	0	0	0	0
	Gentamicina	-	5	4	2	4	15
		+	0	1	3	1	5
Dia 3 após	Copaíba	-	5	5	5	4	19
		+	0	0	0	1	1
	Gentamicina	-	5	5	2	5	17
		+	0	0	3	0	3
Dia 4 após	Copaíba	-	5	5	5	4	19
		+	0	0	0	1	1
	Gentamicina	-	5	5	4	5	19
		+	0	0	1	0	1

\*: Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, dentro de Período e Total, não diferem entre si pelo teste Exato de Fisher ( $p \geq 0,05$ )

Tabela 2: Frequências de ocorrência do escore positivo (+) ou negativo (-) para mastite subclínica ao teste de CMT, nos quartos mamários (PE posterior esquerdo; PD posterior direito; AE anterior esquerdo; AD anterior direito) dos animais experimentais submetidos ao tratamento com óleo de copaíba e ao tratamento com o antimicrobiano gentamicina, dias após o tratamento.

Na avaliação da frequência total dos quartos mamários, o tratamento óleo de

copaíba apresentou 14,28% de CMT positivo para a mastite subclínica e, o tratamento gentamicina, 23,07%. Diante destes resultados, é possível constatar que houve redução numérica da mastite subclínica na ordem de 6,25% no grupo submetido ao tratamento com o óleo de copaíba em relação ao tratamento com gentamicina (Figura 2).

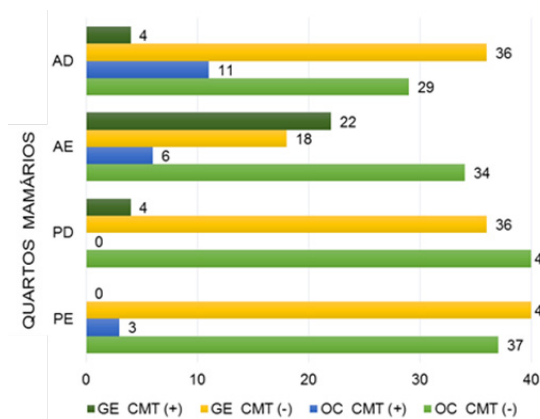


Figura 2: Frequências totais de ocorrência do escore positivo (CMT+) ou negativo (CMT-) para mastite subclínica ao teste de CMT (total geral e total individual dos quartos mamários (PE posterior esquerdo; PD posterior direito; AE anterior esquerdo; AD anterior direito)).

De uma forma geral, verificou-se que os microrganismos mais frequentes, identificados a partir das amostras coletadas, pertenciam à família *Micrococcaceae*, sendo mais frequentes as do grupo dos *Staphylococcus*; à família *Enterobacteriaceae*, sendo observada a *Enterobacter* sp, *E. coli* e *Proteus* sp; à família *Pseudomonadaceae*, a bactéria *Pseudomonas* sp (Tabela 3). Assim como em trabalhos realizados por Reis. et al (2003) e Martins. et al (2010), identificaram nos exames microbiológicos, o isolamento dos seguintes microrganismos *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus coagulase-negativa*, *Bacillus* ssp, *Corynebacterium bovis*, *E. coli*, *Streptococcus úberes* e *Pseudomonas*.

Verificou-se que, no grupo tratado com óleo de copaíba, no período anterior ao tratamento houve crescimento dos seguintes microrganismos *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp, *Enterobacter* e *Pseudomonas* sp, confirmando-se a mastite subclínica, visto que estas bactérias são as principais causadoras desta enfermidade, como descrito por Fonseca et al (2000), Beloti et al (1997) e Mendonça et al (1999).

Durante o período da utilização do óleo de copaíba no tratamento da mastite subclínica, pode-se verificar que, no 2º dia de tratamento, dos 50 isolamentos realizados houve crescimento em 5, com prevalência do *Staphylococcus* sp, *Enterobacter*, *Corynebacterium* sp e *Proteus* sp. Já no 3º e último dia da utilização do óleo de copaíba, pode-se observar que dos 50 isolamentos ocorreu crescimento em 5 onde a prevalência foi de *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp, *Corynebacterium* sp, *Proteus* sp e *Pseudomonas* sp (Tabela 3).

No grupo dos animais tratados com antimicrobiano gentamicina, antes de iniciar o

tratamento da mastite subclínica com a gentamicina foi possível observar presença de *Staphylococcus* sp, *Streptococcus* sp e *Corynebacterium* sp, confirmando-se a mastite subclínica neste grupo. Durante o período de tratamento com a gentamicina observou-se que no 2º dia de tratamento ocorreu crescimento em 5 dos 50 isolamentos onde os microrganismos presentes foram, *Staphylococcus* sp, *Enterobacter* sp e *Escherichia coli*, já no 3º e último dia de tratamento dos 50 isolamentos houve crescimento em apenas 2, com a prevalência de *Enterobacter* sp e *Staphylococcus* sp (Tabela 3).

Diante do descrito, de acordo com a Tabela 3, no total da frequência dos microrganismos isolados, não houve diferença significativa entre os tratamentos avaliados, nos períodos antes do tratamento e, primeiro, segundo e terceiro dia de tratamento.

Períodos	Tratamentos	Crescimento	Crescimento										Total	
			<i>Staphylococcus</i> sp	<i>Streptococcus</i> sp	<i>Enterobacter</i> sp	<i>Escherichia coli</i>	<i>Corynebacterium</i> sp	<i>Proteus</i> sp	<i>Citrobacter</i>	<i>Klebsiella</i> sp	<i>Pseudomonas</i> sp	<i>Bacillus</i> sp		
Antes do tratamento	Copaíba	-	2	3	4	5	5	5	5	5	4	5	43	A**
	Gentamicina	+	3	2	1	0	0	0	0	0	1	0	7	
Dia 1 do tratamento	Copaíba	-	3	5	4	5	4	4	5	5	5	5	45	A**
	Gentamicina	+	2	0	1	0	1	1	0	0	0	0	5	
Dia 2 do tratamento	Copaíba	-	4	4	5	5	4	4	5	5	4	5	45	A*
	Gentamicina	+	1	1	0	0	1	1	0	0	1	0	5	
Dia 3 do tratamento	Copaíba	-	4	5	5	5	5	5	5	5	4	5	48	A*
	Gentamicina	+	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	2	
Dia 3 do tratamento	Copaíba	-	5	5	5	4	5	5	5	5	5	5	49	A*
	Gentamicina	+	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	1	

\*: Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, dentro de Data e Total, não diferem entre si pelo teste Exato de Fisher ( $p \geq 0,05$ )

\*\* : Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, dentro de Data e Total, não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ( $p \geq 0,05$ )

Tabela 3: Comparações não paramétricas das frequências de microrganismos isolados em amostras de leite dos animais experimentais submetidos ao tratamento com óleo de copaíba e ao tratamento com o antimicrobiano gentamicina, antes do tratamento e, nos três dias de tratamentos experimentais.

Nos quatro dias após o final do tratamento, no total das frequências observadas dos isolamentos, pode-se observar que não houve diferença significativa entre os dois tratamentos (Tabela 4).

Quanto à prevalência das bactérias isoladas nas amostras após o tratamento, tanto com o óleo de copaíba como com a gentamicina, indica insensibilidade ao efeito bactericida dos tratamentos (Tabela 4). Por outro lado, Rodrigues et al (2013), observaram, ao testar 122 isolamentos de *Staphylococcus* sp, sensibilidade à ação



bactericida do óleo de copaíba.

Período	Tratamentos	Crescimento	<i>Staphylococcus sp</i>	<i>Streptococcus sp</i>	<i>Enterobacter sp</i>	<i>Escherichia coli</i>	<i>Corynebacterium sp</i>	<i>Proteus sp</i>	<i>Citrobacter</i>	<i>Klebsiella sp</i>	<i>Pseudomonas sp</i>	<i>Bacillus sp</i>	Total	
Dia 1 após o tratamento	Copaíba	-	5	5	5	5	5	4	4	3	3	4	43	A**
		+	0	0	0	0	0	1	1	2	2	1	7	
Dia 1 após o tratamento	Gentami-cina	-	4	4	3	5	5	5	5	4	5	4	44	A**
		+	1	1	2	0	0	0	0	1	0	1	6	
Dia 2 após o tratamento	Copaíba	-	5	5	4	4	4	4	4	3	5	5	43	A*
		+	0	0	1	1	1	1	1	2	0	0	7	
Dia 2 após o tratamento	Gentami-cina	-	5	5	4	3	5	5	5	5	5	5	47	A*
		+	0	0	1	2	0	0	0	0	0	0	3	
Dia 3 após o tratamento	Copaíba	-	4	4	5	5	5	4	5	5	4	5	46	A*
		+	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	4	
Dia 3 após o tratamento	Gentami-cina	-	4	5	4	3	5	5	5	5	5	5	46	A*
		+	1	0	1	2	0	0	0	0	0	0	4	
Dia 4 após o tratamento	Copaíba	-	5	4	4	5	4	4	5	5	4	5	45	A*
		+	0	1	1	0	1	1	0	0	1	0	5	
Dia 4 após o tratamento	Gentami-cina	-	3	4	3	4	5	5	5	5	5	5	44	A*
		+	2	1	2	1	0	0	0	0	0	0	6	

\*: Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, dentro de período e total, não diferem entre si pelo teste Exato de Fisher ( $p \geq 0,05$ )

\*\* : Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, dentro de período e total, não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ( $p \geq 0,05$ )

Tabela 4: Comparações não paramétricas das frequências de microrganismos isolados em amostras de leite, nos quatro dias após os tratamentos com óleo essencial de copaíba e com o antimicrobiano gentamicina.

Com relação a gentamicina, no presente trabalho, foi baixa a sensibilidade do *Staphylococcus* frente ao antimicrobiano, sendo os resultados diferentes aos encontrados por Fontana et al. (2010), que mostraram maior eficiência da gentamicina sobre esta bactéria.

No total geral do período após o tratamento experimental, não houve diferença significativa da frequência dos isolamentos entre os dois tratamentos (Tabela 5). Em particular, no caso do isolado de *E.coli*, houve diferenças significativas entre os tratamentos, sendo que o tratamento com óleo de copaíba apresentou 97,5% de isolados negativos, e, no tratamento com gentamicina, 82,5%. Para *Proteus sp.*, no tratamento com óleo de copaíba houve 85% de casos negativos e, 100% de ausência de crescimento no tratamento com gentamicina. Para *Pseudomonas sp.*, 92% de ausência de crescimento no tratamento com óleo de copaíba e 100% de ausência nos tratados com gentamicina (Figura 3).

Tratamentos	Crescimento	Staphylococcus sp	Streptococcus sp	Enterobacter sp	Escherichia coli	Corynebacterium sp	Proteus sp	Citrobacter	Klebsiella sp	Pseudomonas sp	Bacillus. sp	Total
Copaíba	-	32	35	36	39	36	34	38	36	33	39	358
	+	8	5	4	1	4	6	2	4	7	1	42
Gentamicina	-	33	35	31	33	39	40	40	39	40	39	369
	+	7	5	9	7	1	0	0	1	0	1	31

\*: Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste Exato de Fisher ( $p \geq 0,05$ )

\*\* : Valores seguidos pela mesma letra, na coluna, não diferem entre si pelo teste de Qui-quadrado ( $p \geq 0,05$ )

Tabela 5: Comparações não paramétricas das frequências totais de microrganismos isolados em amostras de leite dos animais experimentais submetidos ao tratamento com óleo essencial de copaíba e ao tratamento com o antimicrobiano gentamicina.

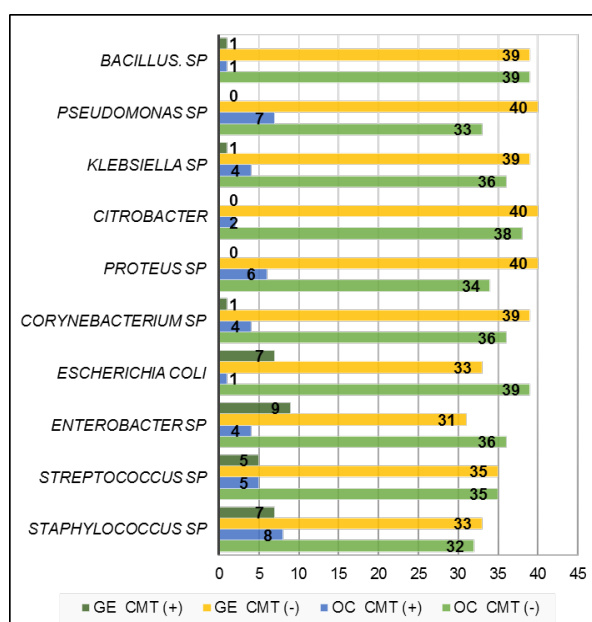


Figura 3: Frequências totais de microrganismos isolados em amostras de leite dos animais experimentais com crescimento positivo (CMT+) e negativo (CMT-), submetidos aos tratamentos com óleo de copaíba e ao tratamento com o antimicrobiano gentamicina.

Foi possível observar neste trabalho que o óleo de copaíba teve ação inibitória sobre *E.coli* e *Pseudomonas* sp, assim como em trabalhos realizados por Mendonça e Onofre (2009), onde os mesmos avaliaram o efeito inibitório do óleo de copaíba e observaram que estas bactérias apresentaram sensibilidade ao óleo de copaíba.

Na composição do leite, não houve alteração significativa nos parâmetros sólidos não gordurosos e sólidos totais (Tabela 6), proteína (Tabela 7) em função dos tratamentos avaliados com óleo de copaíba e gentamicina e os dias de avaliação.

O parâmetro lactose apresentou, no último dia de avaliação, teor 29,4% superior no grupo dos animais tratados com óleo de copaíba, em relação ao grupo tratado com gentamicina ( $P < 0,05$ ). Em relação ao parâmetro gordura no leite, no primeiro período, ou seja, antes da aplicação dos tratamentos, o grupo óleo de copaíba apresentou teor

maior em relação ao grupo gentamicina ( $P < 0,05$ ) (Tabela 7).

Observou-se a influência do período de avaliação nos parâmetros lactose, apenas no grupo óleo de copaíba, sendo que houve diferença significativa entre o período 8, com maior teor (4,52%) e os períodos 2, 3 e 5, com os menores teores (2,99, 2,90 e 3,01) e, os demais períodos semelhantes entre si e, ao 2, 3, 5 e 8.

Parâmetro	Período*	Tratamento/Médias e desvios padrões <sup>1</sup>		Análise de Variância	
		Oleo de copaíba	Gentamicina	Valor de F <sup>2</sup>	prob. < F <sup>3</sup>
Sólidos não gordurosos	1	1,97 ± 0,40	2,74 ± 1,52	2,35	0,1302
	2	2,84 ± 1,42	2,93 ± 0,87	0,03	0,8622
	3	2,20 ± 1,03	2,20 ± 0,69	0,00	0,9969
	4	2,84 ± 0,58	1,93 ± 0,73	2,01	0,1610
	5	1,97 ± 0,31	2,42 ± 0,76	0,82	0,3677
	6	2,58 ± 0,35	1,91 ± 0,34	1,75	0,1905
	7	2,05 ± 0,75	2,08 ± 0,43	0,00	0,9969
	8	2,04 ± 0,37	2,08 ± 0,86	0,00	0,9654
Valor de F <sup>4</sup>		0,95	1,14		
prob. < F <sup>3</sup>		0,4744	0,3484		
Sólidos totais	1	4,30 ± 0,32	4,66 ± 0,20	2,81	0,0987
	2	4,04 ± 0,71	4,21 ± 0,09	0,66	0,4183
	3	3,91 ± 0,49	4,03 ± 0,30	0,31	0,5805
	4	4,20 ± 0,37	4,30 ± 0,19	0,20	0,6583
	5	4,07 ± 0,32	4,21 ± 0,14	0,44	0,5074
	6	4,49 ± 0,33	4,30 ± 0,21	0,77	0,3824
	7	4,24 ± 0,44	4,41 ± 0,15	0,63	0,4289
	8	4,22 ± 0,41	4,31 ± 0,25	0,17	0,6784
Valor de F <sup>4</sup>		1,36	1,40		
prob. < F <sup>3</sup>		0,2364	0,2225		

1: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste t ( $p \geq 0,05$ ).

2: Valor de F para o desdobramento de Grupos dentro de Período.

3: Probabilidade de Significância para o valor de F.

4: Valor de F para o desdobramento de Dias dentro de Grupo.

\*Períodos: 1=antes do tratamento; 2-4= dias consecutivos de tratamento (total de três dias); 5-8 = dias consecutivos pós-tratamento (total de quatro dias).

Tabela 6: Resultados das comparações das médias dos parâmetros sólidos não gordurosos e sólidos totais das amostras de leite colhidas nos quartos mamários dos animais experimentais submetidos ao tratamento com óleo essencial de copaíba e ao tratamento com o antimicrobiano gentamicina, em diferentes períodos.

Também, no parâmetro gordura, apenas no tratamento com gentamicina, houve a influência do período de coleta, sendo o primeiro dia, o maior valor e diferente dos demais ( $P < 0,05$ ) (Tabela 7).

Período*	Tratamento/Médias e desvios padrões <sup>1</sup>				Análise de Variância	
	Óleo essencial de copaíba		Gentamicina		Valor de F <sup>2</sup>	prob. < F <sup>3</sup>
Proteína	1	28,36 ± 1,97	30,23 ± 0,75		2,11	0,1511
	2	25,81 ± 3,76	26,84 ± 0,93		0,64	0,4264
	3	25,49 ± 2,56	26,26 ± 2,03		0,36	0,5499
	4	27,12 ± 2,09	28,41 ± 1,66		1,00	0,3219
	5	26,76 ± 1,88	27,38 ± 0,63		0,24	0,6276
	6	29,22 ± 2,07	28,46 ± 1,22		0,35	0,5561
	7	27,89 ± 2,67	29,11 ± 1,11		0,89	0,3488
	8	27,79 ± 2,62	28,38 ± 1,84		0,22	0,6441
Valor de F <sup>4</sup>	1,94		0,08			
prob. < F <sup>3</sup>	1,9600		0,0746			
Lactose	1	3,18 ± 0,23 Aab	3,46 ± 0,16 Aa		0,30	0,5850
	2	2,99 ± 0,52 Ab	3,12 ± 0,07 Aa		0,07	0,7938
	3	2,90 ± 0,36 Ab	2,98 ± 0,22 Aa		0,03	0,8678
	4	3,11 ± 0,27 Aab	3,18 ± 0,14 Aa		0,02	0,8897
	5	3,01 ± 0,23 Ab	3,12 ± 0,10 Aa		0,05	0,8275
	6	3,33 ± 0,24 Aab	3,18 ± 0,15 Aa		0,08	0,7785
	7	3,14 ± 0,33 Aab	3,26 ± 0,11 Aa		0,06	0,8029
	8	4,52 ± 3,03 Aa	3,19 ± 0,19 Ba		7,04	0,0100
Valor de F <sup>4</sup>	2,16		0,15			
prob. < F <sup>3</sup>	0,0496		0,9937			
Gordura	1	4,90 ± 0,12 Ba	5,42 ± 1,07 Aa		8,49	0,0049
	2	4,88 ± 0,15 Aa	4,86 ± 0,07 Ab		0,02	0,9026
	3	4,81 ± 0,09 Aa	4,77 ± 0,05 Ab		0,05	0,8240
	4	4,83 ± 0,09 Aa	4,78 ± 0,06 Ab		0,07	0,7896
	5	4,86 ± 0,09 Aa	4,82 ± 0,03 Ab		0,04	0,8414
	6	4,88 ± 0,12 Aa	4,85 ± 0,08 Ab		0,03	0,8675
	7	4,90 ± 0,12 Aa	4,85 ± 0,08 Ab		0,08	0,7811
	8	4,88 ± 0,15 Aa	4,89 ± 0,10 Ab		0,00	0,9911
Valor de F <sup>4</sup>	0,07		2,77			
prob. < F <sup>3</sup>	0,9995		0,0139			

1: Valores seguidos pela mesma letra, maiúscula na linha e minúscula na coluna, não diferem entre si pelo teste t (p≥0,05).

2: Valor de F para o desdobramento de Grupos dentro de Período.

3: Probabilidade de Significância para o valor de F.

4: Valor de F para o desdobramento de Dias dentro de Grupo.

\*Períodos: 1=antes do tratamento; 2-4= dias consecutivos de tratamento (três); 5-8 = dias consecutivos pós-tratamento (quatro).

Tabela 7: Resultados das comparações das médias da composição em proteína, gordura e lactose das amostras de leite colhidas nos quartos mamários dos animais experimentais submetidos ao tratamento com óleo essencial de copaíba e ao tratamento com o antimicrobiano gentamicina, em diferentes períodos.

## 4 | CONCLUSÕES

Conclui-se que o uso do óleo de copaíba no tratamento de mastite subclínica não causa alterações significativas na composição química do leite. Nas condições do experimento pode-se concluir que o tratamento com óleo de copaíba (apresenta-se viável para o tratamento alternativo de mastite subclínica bovina, na presença de bactérias específicas.

## REFERENCIAS

ANVISA. Agência Nacional Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 14, de 31 de março de 2010. **Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos.** Brasília. ANVISA: 2010.

ARAÚJO JÚNIOR, F.A.; BRAZ, M.N.; ROCHA NETO, G. Efeito do óleo de copaíba nas aminotransferases de ratos submetidos à isquemia e reperfusão hepática com e sem pré-condicionamento isquêmico. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v.20, n.1, p.93-9, 2005.

BELLETTI, N.; NDAGIJIMANA, M.; SISTO, C.; GUERZONI, M.E.; LANCIOTTI, R.; GARDINI F. Evaluation of the antimicrobial activity of citrus essences on *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.52, n.23, p.6932-6938, 2004.

BELOTI, V.; MULLER, E. E.; FREITAS, J.C.; METIFOGO, E. Estudo da mastite subclínica em rebanhos leiteiros no norte do Paraná. **Semina: Ciências Agrárias**, 1997. v. 18, n. 1, p. 45-53.

BLOISE, M.I. Óleos vegetais e especialidades da floresta Amazônica. **Cosmetics & Toiletries**, v.15, p. 46-49, p.2003.

BRAGA, M. D; SILVA C. C. M. Atividade antimicrobiana do extrato aquoso de *Copaifera langsdorffii* Desf. Sobre *Staphylococcus aureus*. **Unimontes Científica**, v.9, n.1, p.91-97, 2007.

BRANDÃO, M.G.L. **Plantas medicinais e fitoterápicos.** Universidade Federal de Minas Gerais. 2009. Disponível em <http://www.ceplamt.org.br/wp-content/uploads/2014/02/Plantas-Medicinais-e-Fitoterpicos2009.pdf>. (Acessado 20 de Fevereiro 2014).

BRASIL. Ministério da Saúde. **Instruções operacionais:** informações necessárias para a condução de ensaios clínicos com fitoterápicos. Ministério da Saúde, Organização Mundial da Saúde. Brasília: Ministério da Saúde; 2008

BRITO, M. A. V. P. **Conceitos básicos da qualidade.** In: BRITO, J. R. F.; DIAS, J. C. Sanidade do gado leiteiro. Coronel Pacheco: Embrapa-CNPGL/ São Paulo: Tortuga, 1995. p. 55-62.

BRITO, M. A. V. P.; BRITO, J. R. F. **O efeito da mastite no leite.** Embrapa-CNPGL, 1998. Disponível em: <<http://www.mastite.com.br/artigo04.htm>>. (Acessado 18 Abril 2015).

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

CASCON, V. Copaíba - *Copaifera* spp. In: CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, 2004. 480p.

CASCON, V.; GILBERT, B. Characterization of the chemical composition of oleoresins of *Copaifera guianensis* Desf., *Copaifera duckei* Dwyer and *Copaifera multijuga* Hayne. **Phytochemistry**, v.55, p. 773-778, 2000.

CONNER, D.E. **Naturally occurring compounds**. In: DAVIDSON P.; BRANEN A.L. Antimicrobials in foods. New York: Marcel Dekker, Inc. 1993. p.441-68.

COSTA, D. R. M.; SILVA, S. Y. S.; SILVA, S. C.; OLIVEIRA, J.M. D.; VIEIRA, I. V.; NERES, M. E.S. **Avaliação da composição química do óleo de Copaíba (*Copaifera* sp.) comercializado no município de Marabá-Pará por GC-MS**. Capítulo 4. In: Produção e controle de produtos naturais. Org. PIOVESAN, N.; VIERA, V. B. Ponta Grossa (PR): Atena Editora, 2018.

FONSECA, L.F.L.; SANTOS, M.V. **Qualidade do leite e controle da mastite**. 1ª ed. São Paulo: Lemos, 2000. 314p.

FONTANA V.L.D.S.; GIANNINI M.J.S.M.; LEITE C.Q.F.; MIRANDA E.T.; ALMEIDA A.M.F.; FONTANA C.A.P.; SOUZA C.M.; STELLA A.E. Etiology of bovine subclinical mastitis, susceptibility of the agents to antimicrobial drugs and detection of the gene  $\beta$ -Lactamasis in *Staphylococcus aureus*. **Journal of Veterinary Medicine and Animal Science**, v.17, n.4, p. 552-559, 2010.

KONEMAN, E. W.; ALLEN, S. D.; JANDA, W. M. **Diagnóstico Microbiológico**. 6 ed. Rio de Janeiro: MEDSI, 2008.

MACIEL, M.A.M.; PINTO, A.C.; VEIGA JUNIOR, V.F. Plantas medicinais: A necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v.25, n.3, p.429-438, 2002.

MARTINS, R. P.; SILVA, J. A. G.; NAKAZATO, L.; DUTRA, V.; ALMEIDA, E. S. Filho. Prevalência e etiologia infecciosa da mastite bovina microrregião de Cuiabá MT. **Ciências Animal Brasileira**, v.11, n.1, p.181-187, 2010.

MENDONÇA, C. L.; FIORAVANT, M. C. S.; SILVA, J. A. B. A.; SOUZA, M. I.; EURIDES, D.; LANGONI, H. Etiologia da mastite bovina: revisão. **Veterinária Notícia**, v. 5, n. 1, p. 107-118, 1999.

MENDONÇA, D.E.; ONOFRE, S.B. Atividade antimicrobiana do oleoresina produzido pela copaíba – *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p.577-581, 2009.

MENDONÇA, D.E.; ONOFRE, S.B. Atividade antimicrobiana do oleoresina produzido pela copaíba – *Copaifera multijuga* Hayne (Leguminosae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.19, p.577-581, 2009.

OLIVEIRA, E.C.P. LAMEIRA, O.A.; ZOGHBI, M.G.B. Identificação da época de coleta do óleo-resina de copaíba (*Copaifera* spp.) no município de Moju-PA. **Revista Brasileira de Plantas medicinais**, v.8, n.3, p.14-23, 2006.

PACHECO, T.A.R.C.; BARATA, L.E.S; DUARTE, M.C.T. Antimicrobial activity of copaíba (*Copaifera* spp) balsams. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.8, p.123-4, 2006.

PACKER, J.F.; LUZ, M.M.S. Método para avaliação e pesquisa da atividade antimicrobiana de produtos de origem animal. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, p.102-107, 2007.



- PIERI, F.A.; MUSSI, M.C.; MOREIRA, M.A.S. Óleo de copaíba (*Copaifera* sp.): histórico, extração, aplicações industriais e propriedades medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, vol.11, n.4, pp. 465-472, 2009.
- PLOWDEN, C. Production ecology of copaíba (*Copaifera* spp) Oleoresin in the Eastern brazilian Amazon. **Economic Botany**, v. 57, n. 4, p. 491-501, 2003.
- RAMOS, M.F.S. Desenvolvimento de microcápsulas contendo a fração volátil de copaíba por *spray-drying*: estudo de estabilidade e avaliação farmacológica. 2006. 132p. **Tese** (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.
- REIS, S.R.; SILVA, N.; BRESCIA, M.V. Antibioticoterapia para controle da mastite subclínica de vacas em lactação. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v.55, p.651-658, 2003.
- RODRIGUES, F. G.; KOZERSKI, D. N.; GAZIM, Z. C.; GONÇALVES, D. D.; MARTINS, L. A. Atividade bactericida da *Copaifera* sp frente a *Staphylococcus* spp isolados de mastite bovina. **Enciclopédia Biosfera, Centro Científico Conhecer**, v. 9, n. 17, p. 293, 2013.
- SANTOS, A.O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; VEIGA JUNIOR, V.F.; PINTO, A.C.; NAKAMURA, C.V. Antimicrobial activity of brazilian copaíba oils obtained from diferente species of the *Copaifera* genus. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p.277-281, 2008.
- SCHALM, O.W.; NOORLANDER, D.D. Experiments and observations leading to development of the California Mastitis Test. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, v.130, 199-204, 1957.
- SINGH, N.; SINGH, R.K.; BHUNIA, A.K. Efficacy of chlorine dioxide, ozone and thyme essential oil or a sequential washing in killing *E. coli* O157:H7 on lettuce and baby carrots. **Lebensm.-Wissensch. Technology**, v.35, p.720-729, 2002.
- SOARES, J.G.; VAREÃO, M.J.C.; WOLTER FILHO, W.; MOURÃO, A.P.; CRAVEIRO, A.A.R.; ALENCAR, J.C. Estudo químico de óleos essenciais, oleaginosas e láticas da Amazônia I. Composição e oxidação do óleo de uma espécie de *Copaifera*. **Acta Amazônica**, v.9, p.65-59, 2003.
- TOGASHI, N.; INOUE, Y.; HAMASHIMA, H.; TAKANO, A. Effects of two terpene alcohols on the antibacterial activity and the mode of action of farnesol against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v.13, p.3069-3076, 2008.
- TOZZETTI, D.S.; BATAIER, M.B.N.; ALEMIDA, L.R. Prevenção, controle e tratamento das mastites bovinas: revisão de literatura. **Revista Científica Eletrônica de Medicina Veterinária**, v.6, n.10, p.1-7, 2008.
- VEIGA JUNIOR, V.F.; VALDIR F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M.A.M. Plantas medicinais: cura segura? **Química nova**, v.28, n.3, p.519-28, 2005.
- VEIGA, V. F. J; PINTO, A. C. O gênero *Copaifera* L. **Química Nova**, v. 25. n. 2, p. pp.273-286, 2002.
- WANZALA, W.; ZESSIN, K.H.; KYULE, N.M.; BAUMANN, M.P.O; MATHIAS, E.; HASSANALI A. Ethnoveterinary medicine: a critical review of its evolution, perception, understanding and the way forward. **Livestock Research Rural Development**, v.17, p.1-29, 2005.

## SOBRE OS ORGANIZADORES

**Raissa Rachel Salustriano da Silva-Matos:** Graduada em Ciências Biológicas pela Universidade de Pernambuco – UPE (2009), Mestre em Agronomia – Solos e Nutrição de Plantas pela Universidade Federal do Piauí – UFPI (2012), com bolsa do CNPq. Doutora em Agronomia pela Universidade Federal da Paraíba -UFP (2016), com bolsa da CAPES. Atualmente é professora adjunta do curso de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais (CCAA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Tem experiência na área de Agronomia, com ênfase em Fitotecnia, fisiologia das plantas cultivadas, propagação vegetal, manejo de culturas, nutrição mineral de plantas, adubação, atuando principalmente com fruticultura e floricultura. E-mail para contato: raissasalustriano@yahoo.com.br; raissa.matos@ufma.br; Lattes: <http://lattes.cnpq.br/0720581765268326>.

**Vanessa Reis Cardoso:** Graduada em Agronomia pela Universidade Federal do Maranhão - UFMA (2019). Tem experiência na área de Agronomia, com ênfase em fitotecnia, fisiologia das plantas cultivadas, propagação vegetal, manejo de culturas, adubação, atuando principalmente com fruticultura e floricultura. E-mail para contato: [vanessarcards@gmail.com](mailto:vanessarcards@gmail.com); Lattes: <http://lattes.cnpq.br/8199995262480877>

**Kleber Veras Cordeiro:** Aluno de Agronomia do Centro de Ciências Agrárias e Ambientais (CCAA) da Universidade Federal do Maranhão (UFMA). Foi bolsista do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica (PIBIC) em 2016-2017 pelo projeto de pesquisa “Formação de mudas de maracujazeiro amarelo em substratos regional a base de caule decomposto de babaçu (*Attalea speciosa* Mart.)” com bolsa da FAPEMA e bolsista do PIBIC em 2017-2018 pelo projeto de pesquisa “Substratos alternativos para produção de mudas de mamoeiro em chapadinha” com bolsa pela FAPEMA. Atualmente é bolsista pelo Programa Foco Acadêmico do eixo ensino (2019-2020), pelo projeto de monitoria da disciplina de “Floricultura, jardinocultura e paisagismo e estudo de plantas ornamentais”. Integrante do Grupo de Pesquisa em Fruticultura no Maranhão (FRUTIMA). Tem experiência na área de produção vegetal com ênfase na propagação vegetativa e agroecologia. E-mail para contato: [kvcordeiro@hotmail.com](mailto:kvcordeiro@hotmail.com); Lattes: <http://lattes.cnpq.br/7585883012639032>

## ÍNDICE REMISSIVO

### A

Ação antimicrobiana 1, 7, 12, 26, 55, 72, 81, 97

Ação fotoprotetora 6, 13, 15, 22, 24

Antibiograma 26, 31, 76

Anti-inflamatória 7, 3, 15, 47, 48, 50, 55, 77, 84, 85, 90, 97

Antimicrobiana 5, 7, 1, 2, 3, 5, 7, 8, 9, 11, 12, 15, 26, 28, 29, 31, 32, 34, 35, 36, 37, 47, 48, 51, 55, 72, 73, 76, 77, 81, 85, 93, 97, 108, 109, 110

Antioxidante 5, 15, 17, 18, 19, 20, 22, 30, 72, 73, 75, 77, 78, 79, 81, 82, 90

Antiúlcera 7, 47, 48

Araçá 58, 59, 60, 61, 62, 65, 66, 67, 68, 69

Atividade anti-inflamatória 3, 15, 48, 90

Atividade antimicrobiana 1, 3, 5, 7, 8, 11, 26, 28, 29, 32, 34, 35, 37, 48, 51, 55, 76, 93, 97, 110, 108, 109

### B

Biomarcadores 84

Buriti 26, 27, 29, 33, 34, 35, 37

### C

Cerrado 26, 27, 29, 47, 48, 58, 59, 69, 70, 86

Chromolaena odorata 84, 85, 86, 87, 90, 91

Composição do leite 94, 105

Concentração inibitória mínima 26, 29, 31, 32, 33, 34, 51, 55

Contagem de bactéria total 94

Copaíba 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 26, 28, 29, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 91, 93, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 108, 109, 110

Copaifera langsdorffii 6, 7, 1, 2, 3, 5, 6, 7, 11, 12, 26, 27, 28, 30, 31, 33, 34, 35, 93, 94, 97

### D

Disco-difusão 1, 2, 5, 6, 35, 76

Disco-difusão 5

Disco-Difusão 76

### E

Estudo químico 12, 47, 49, 55, 110

Extrato aquoso 72, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 108

### F

Fitoquímica 2, 21, 25, 40, 41, 43, 44, 72, 74, 95, 96, 97

Fitoterápico 40

Flavonoides 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 28, 29, 72, 81, 96

Fotoproteção 13, 15, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24

Frutos exóticos 58, 59

## G

Gentamicina 29, 93, 94, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 108

## H

Hibiscus sabdariffa 72, 73, 74, 76, 78, 79, 80, 81, 82, 83

## I

In vitro 7, 9, 11, 17, 18, 21, 24, 25, 26, 27, 29, 31, 34, 57, 36, 76, 82, 97

## J

Jacarandá 48

## L

Leite 1, 2, 3, 4, 5, 6, 10, 11, 30, 36, 39, 93, 94, 95, 97, 98, 103, 104, 105, 106, 108, 109

## M

Machaerium eriocarpum 7, 47, 48, 49, 56

Malvaceae 79, 82

marolo 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71

Mastite bovina 2, 3, 5, 9, 10, 11, 34, 35, 36, 97, 109, 110

Microbiologia 9, 72, 37

Mista 58, 59

## O

Óleo de copaíba 1, 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 28, 33, 34, 35, 37, 93, 96, 97, 98, 99, 100, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 108, 110

Óleo medicinal 2, 94

Óleos essenciais 5, 12, 26, 27, 28, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 58, 93, 95, 96, 110

## P

Padronização de extratos 84

Plantas medicinais 11, 26, 36, 40, 46, 108, 109, 110

Produtos fitoterápicos 40, 41, 43, 45

## R

Radiação ultravioleta 13, 14

Revisão narrativa 40, 41

Revisão narrativa 40

## S

Saúde humana 39, 40, 73

Staphylococcus aureus 6, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 26, 27, 29, 30, 31, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 48, 51, 97, 108, 109, 110

## T

Terapia alternativa 1, 2, 3, 27, 94

Tucumã 26, 27, 30, 31, 33, 34, 35

## V

Variabilidade química 59

Voláteis 28, 58, 59

 **Atena**  
Editora  
**2 0 2 0**