



SIMONY CARVALHO MENDONÇA

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTES, ANTI-*Candida*
E INIBITÓRIAS DA LIPOXIGENASE E ALFA-
AMILASE DE ESPÉCIES MEDICINAIS DO
GÊNERO *Plectranthus***

LAVRAS – MG

2016

SIMONY CARVALHO MENDONÇA

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTES, ANTI-*Candida* E INIBITÓRIAS DA
LIPOXIGENASE E ALFA-AMILASE DE ESPÉCIES MEDICINAIS DO
GÊNERO *Plectranthus***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Plantas Medicinais Aromáticas e
Condimentares, para a obtenção do
título de Mestre.

Orientadora
Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci

Coorientador
PhD. José Eduardo Brasil P. Pinto

**LAVRAS – MG
2016**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Mendonça, Simony Carvalho.

Atividades antioxidantes, anti-*Candida* e inibitorias da lipoxigenase e alfa-amilase de espécies medicinais do gênero *Plectranthus* / Simony Carvalho Mendonça. – Lavras : UFLA, 2016.

122 p. : il.

Dissertação (mestrado acadêmico)–Universidade Federal de Lavras, 2016.

Orientador(a): Suzan Kelly Vilela Bertolucci.

Bibliografia.

1. boldo. 2. compostos fenólicos. 3. espécies reativas de oxigênio. 4. carvacrol. 5. óleo essencial. I. Universidade Federal de Lavras. II. Título.

SIMONY CARVALHO MENDONÇA

**ATIVIDADES ANTIOXIDANTES, ANTI-*Candida* E INIBITÓRIAS DA
LIPOXIGENASE E ALFA-AMILASE DE ESPÉCIES MEDICINAIS DO
GÊNERO *Plectranthus***

Dissertação apresentada à
Universidade Federal de Lavras,
como parte das exigências do
Programa de Pós-Graduação em
Plantas Medicinais Aromáticas e
Condimentares, para a obtenção do
título de Mestre.

APROVADA em 07 de abril de 2016.

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci UFLA

Dra. Luciane Vilela Resende UFLA

Dra. Nelma de Mello Silva Oliveira UNIFENAS

Dra. Suzan Kelly Vilela Bertolucci
Orientadora

PhD. José Eduardo Brasil P. Pinto
Coorientador

**LAVRAS – MG
2016**

À minha família.

*Vocês são a base de tudo que eu sou e
de tudo que eu me tornei.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado o dom do estudo e do aprendizado.

Aos meus pais por nunca medirem esforços para que eu alcançasse os meus objetivos, por estarem sempre ao meu lado apoiando as minhas escolhas e por todo tempo e amor dedicados à mim.

Ao meu marido pelo companheirismo, por acreditar e apostar em mim, por dedicar o seu tempo ao meu tempo sem nunca me cobrar nada em troca.

À minha irmã, meu cunhado e sobrinhos por me proporcionarem momentos de alegria e distração, pelo carinho e pela amizade.

Aos amigos que estão sempre por perto e às amigas Krisnanda, Carlinha e Livia por me ajudarem a vencer mais essa etapa. Obrigada por toda cumplicidade e apoio, vocês foram essenciais para que eu chegasse até aqui.

À professora e orientadora Suzan que tanto confiou e apostou em mim. Foi mais que uma mestra, foi uma amiga. Você sempre fará parte da minha trajetória pois foi você quem me abriu as portas desse caminho.

Ao professor José Eduardo pelos incentivos, conselhos e exemplo de profissionalismo.

À Anette, Luizinho, Dico e Paulo por estarem sempre dispostos a nos ajudar.

Aos amigos do Núcleo de Estudos em Plantas Medicinais, NEMAC.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Departamento de Agricultura (DAG), pela oportunidade concedida para a realização do mestrado.

À Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) pela concessão da bolsa de estudos.

RESUMO GERAL

No primeiro artigo, objetivou-se quantificar os compostos fenólicos totais e avaliar o potencial antioxidante e inibitório da alfa-amilase de três espécies medicinais do gênero *Plectranthus* (*Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus ornatus* e *Plectranthus barbatus*). Utilizou-se folhas frescas das três espécies como material vegetal. Os extratos aquosos foram preparados sob-refluxo durante 60 minutos e por infusão na concentração de 5%. Os extratos hidroalcoólicos foram preparados por turboextração com etanol 70% por 3 ciclos de 10 minutos, em banho de gelo, com intervalo de 1 minuto entre eles, também na concentração de 5%. As quantificações de fenólicos totais, flavonoides e dihidroflavonoides e as avaliações das atividades antioxidante e inibitória da alfa-amilase foram realizadas por métodos espectrofotométricos usuais. As atividades antioxidantes foram avaliadas por meio dos métodos de capacidade antioxidante total (CAT) pela redução do molibdato de amônio, poder quelante, poder redutor, inibição da peroxidação lipídica e atividade de eliminação de radicais livres (ABTS e DPPH). Observou-se que dentre as espécies estudadas o extrato obtido por refluxo e turboextração de *P. barbatus* apresentaram maiores teores de constituintes fenólicos, atividade antioxidante e inibição da alfa-amilase. No segundo artigo objetivou-se determinar a composição química e as atividades antioxidantes, anti-*Candida* e inibitórias das enzimas lipoxigenase e alfa-amilase do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus*. Para essas avaliações foram utilizadas plantas cultivadas em canteiro e em casa de vegetação e coletadas de manhã e de tarde. O óleo essencial foi obtido por hidrodestilação, utilizando um aparelho tipo Clevenger modificado, e o seu teor, expresso em massa seca das folhas, variou entre 0,047 e 0,100%. Nas análises cromatográficas dezesseis compostos foram identificados, sendo o carvacrol o componente majoritário representando de 68 a 75% da composição química total desse óleo. A capacidade atioxidante total (CAT) e de eliminação de radicais livres (DPPH e ABTS) do óleo essencial mostrou resultados significativos frente aos controles positivos empregados. A atividade inibitória das enzimas lipoxigenase e alfa-amilase não foi significativa. No entanto, o óleo de *P. amboinicus* evidenciou potencial atividade anti-*Candida in vitro*.

Palavras-chave: Boldo. Compostos fenólicos. Espécies reativas de oxigênio. Óleo essencial. Carvacrol.

GENERAL ABSTRACT

In the first article aimed to quantify the total phenolic compounds and evaluate the antioxidant and inhibitory potential of alpha-amylase of three medicinal species *Plectranthus genus* (*Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus ornatus* and *Plectranthus barbatus*). Fresh leaves were used from three species as plant material. The aqueous extracts were prepared for refluxing during 60 minutes and infusion at a concentration of 5%. The hydroalcoholic extracts were prepared by turboextraction with ethanol 70% using 3 cycles of 10 minutes in an ice bath with 1-minute interval between them, also at a concentration of 5%. Quantification of total phenolics, and flavonoids dihydroflavonoides and evaluating the inhibitory activity of alpha-amylase was performed by spectrophotometry. The antioxidant activity was evaluated by the total antioxidant capacity methods (TAC) for the reduction of ammonium molybdate, chelating power, reducing power, inhibition of lipid peroxidation and scavenging activity of free radicals (ABTS and DPPH). It was observed that among the studied species the extract obtained by refluxing and turboextraction for *P. barbatus* showed high levels of phenolic components, antioxidant activity and inhibition of alpha-amylase. In the second article aimed to determine the chemical composition and antioxidant activities, anti-*Candida* and inhibitory of the lipoxygenase and alpha-amylase enzymes of the essential oil of *P. amboinicus*. For these evaluations, were tested plants grown on plat and in the greenhouse and collected in the morning and afternoon. The essential oil was obtained by hydrodistillation using a Clevenger type apparatus modified, and its percentage yield relative to dry weight of the plant ranged between 0.047 and 0.100%. Chromatographic analysis led to the identification of sixteen compounds carvacrol being the major component representing 68-75%. The total antioxidant capacity (TAC) and elimination of free radicals (DPPH and ABTS) essential oil showed significant results compared to the positive controls employed. The inhibitory activity of lipoxygenase and alpha-amylase enzymes was not significant. However, the *P. amboinicus*'s oil showed potential anti-*Candida* activity in vitro.

Keywords: Bilberry. Phenolic compounds. Oxygen reactive species. Essential oil. Carvacrol.

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1	Aspecto geral da espécie <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour) Spreng..	19
Figura 2	Aspecto geral da espécie <i>Plectranthus ornatus</i> Codd.	20
Figura 3	Aspecto geral da espécie <i>Plectranthus barbatus</i> Andr.	22
Figura 4	Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	23
Figura 5	Núcleo fundamental dos flavonóides.....	24
Figura 6	Subclasses de flavonóides, suas características químicas, nome de flavonóides e exemplos da estrutura bases.....	25
Figura 7	Biossíntese dos terpenóides.....	27
Figura 8	Estrutura química do Timol e do Carvacrol.....	28
Figura 9	Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários nas plantas.....	29
Figura 10	Estruturas químicas do (a) BHA e (b) BHT.....	31
Figura 11	Atuação cooperativa dos sistemas antioxidantes presente nas células.....	33
Figura 12	a) Cascata do ácido araquidônico e b) Estrutura química e conversão do ácido araquidônico em leucotrienos.5-HPETE = ácido 5 hidroperoroieicosatetraenóico.....	39
Figura 13	Componentes da estrutura do amido a) estrutura química da amilose e b) amilopectina.....	41

SEGUNDA PARTE - ARTIGOS

ARTIGO 1

- Figura 1 Percentage yield of extracts of the *Plectranthus* species (PA:*Plectranthus amboinicus*, PO: *Plectranthus ornatus*, PB: *Plectranthus barbatus*)..... 69
- Figura 2 Reducing power of different extracts from (a) *P. amboinicus* (b) *P.ornatus* e (c) *P. barbatus* using different extraction methods..... 76

ARTIGO 2

- Figura 1 Teor dos óleos de *P. amboinicus* (CCM: Cultivo em Canteiro coleta de manhã; CCT: Cultivo em Canteiro coleta de tarde; CVM: Casa de Vegetação, coleta de manhã; CVT: Casa de Vegetação, coleta de tarde)..... 99
- Figura 2 Estrutura química do Timol e do Carvacrol..... 102
- Figura 3 Correlação entre a atividade antioxidante e a atividade inibitória da lipoxigenase. (a, b, c). a) Capacidade antioxidante total (CAT), expresso em miligrama equivalente em ácido ascórbico por g de material vegetal (mg EAA/g). b) Eliminação de radicais livres DPPH expressos em IC₅₀ (mg/mL). c) Eliminação de radicais ABTS, expressos em IC₅₀ (mg/mL)..... 106
- Figura 4 Correlação entre a atividade antioxidante e a atividade inibitória da lipoxigenase. (a, b, c). a) Capacidade antioxidante total (CAT), expresso em miligrama equivalente em ácido ascórbico por g de material vegetal (mg EAA/g). b) Eliminação de radicais livres DPPH expressos em IC₅₀ (mg/mL). c) Eliminação de radicais ABTS, expressos em IC₅₀ (mg/mL)..... 111

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS

ARTIGO 1

Tabela 1: Levels of phenolic constituents of different extracts of <i>P. amboinicus</i> (PA), <i>P. ornatus</i> (PO) and <i>P. barbatus</i>	70
Tabela 2: Antioxidant activities of different extracts of <i>Plectranthus amboinicus</i> (PA), <i>P. ornatus</i> (PO) and <i>P. barbatus</i> (PB).....	72
Tabela 3: Estimates of the Pearson correlation coefficients between the quantified compounds and total antioxidant capacity(TAC), scavenging activity of DPPH and ABTS radicals and chelating power.	74
Tabela 4: Chelating and inhibition of lipid peroxidation of different extracts of <i>P. amboinicus</i> (PA), <i>P. ornatus</i> (PO) and <i>P. barbatus</i> (P.B).....	75

ARTIGO 2

Tabela 1: Composição química do óleo essencial de <i>P. amboinicus</i>	101
Tabela 2: Atividades antioxidantes dos óleos de <i>P. amboinicus</i>	103
Tabela 3: Estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson entre o poder inibitório da lipoxigenase e a capacidade antioxidante total (CAT) e atividade de eliminação de radicais DPPH e ABTS.....	106
Tabela 4: Atividade inibitória da lipoxigenase e alfa-amilase dos óleos de <i>P. amboinicus</i>	109
Tabela 5: Estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson entre o poder inibitório da lipoxigenase e a capacidade antioxidante total (CAT) e atividade de eliminação de radicais DPPH e ABTS.....	112
Tabela 6: Atividade antifúngica do óleo essencial de <i>P. amboinicus</i>	113

SUMÁRIO

PRIMEIRA PARTE

1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	16
2.1	Gênero <i>Plectranthus</i>	16
2.1.1	<i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour) Spreng.....	18
2.1.2	<i>Plectranthus ornatus</i> Codd.....	20
2.1.3	<i>Plectranthus barbatus</i> Andr.....	21
2.2	Metabolismo secundário.....	22
2.2.1	Compostos fenólicos.....	24
2.2.2	Óleos essenciais.....	26
2.2.3	Fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários	28
2.3	Atividade antioxidante.....	30
2.4	Atividade anti- <i>Candida</i>	34
2.5	Atividade inibitória enzimática.....	36
2.5.1	Lipoxigenase.....	37
2.5.2	Alfa-amilase.....	40
	REFERÊNCIAS.....	43
	SEGUNDA PARTE – ARTIGOS.....	56
	ARTIGO 1: Antioxidant potential and alpha-amylase inhibition of three medicinal species of the <i>Plectranthus</i> genus.....	56
1	INTRODUCTION.....	59
2	MATERIALS AND METHODS.....	61
2.1	Chemicals and equipments.....	61
2.2	Plant material.....	62
2.3	Moisture content determination.....	62
2.4	Extraction preparation.....	62
2.5	Determination of total phenolics.....	63
2.6	Quantification of flavonoids (flavones and total flavonoids).....	63
2.7	Quantification of total dihydroflavonoids.....	64
2.8	Total antioxidant capacity (TAC).....	64
2.9	Free radical scavenging activity (DPPH).....	65
2.10	Radical scavenging activity (ABTS).....	65
2.11	Determination of metal chelating ability.....	66
2.12	Determination of reducing power.....	66

2.13	Inhibition of lipid peroxidation.....	67
2.14	Test of inhibition of the alpha-amylase.....	67
2.15	Statistical analysis.....	68
3	RESULTS AND DISCUSSION.....	68
3.1	Moisture content, extraction yield, and quantification of phenolic of the species.....	68
3.2	Total antioxidant capacity test (TAC), ABTS and DPPH.....	71
3.3	Chelating ability, liposomes and reducing power of the species.....	74
3.4	Inhibition of alpha-amylase.....	77
4	CONCLUSION.....	77
	REFERENCES.....	79
	ARTIGO 2: Composição química do óleo essencial de <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour) Spreng e seu potencial antioxidante, anti-<i>Candida</i> e inibitórios da lipoxigenase e alfa-amilase.....	83
1	INTRODUÇÃO.....	86
2	MATERIAL E MÉTODOS.....	89
2.1	Obtenção do material vegetal.....	89
2.2	Determinação da umidade.....	90
2.3	Extração.....	90
2.4	Análise química do óleo essencial.....	91
2.5	Reagentes.....	92
2.6	Testes antioxidantes.....	92
2.6.1	Capacidade antioxidante total (CAT).....	92
2.6.2	Atividade de eliminação de radicais livres (DPPH).....	93
2.6.3	Determinação da atividade de eliminação de radicais livres (ABTS).....	93
2.6.4	Determinação do poder quelante.....	94
2.7	Testes enzimáticos.....	95
2.7.1	Teste de inibição da alfa-amilase.....	95
2.7.2	Teste de inibição da 5-lipoxigenase.....	95
2.8	Teste da capacidade antifúngica.....	96
2.9	Análise Estatística.....	97
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	98
3.1	Umidade e rendimento extrativo dos óleos.....	98
3.2	Composição química do óleo essencial de <i>P. amboinicus</i>.....	100

3.3	Atividades antioxidantes.....	102
3.3.1	Determinação do poder quelante.....	107
3.4	Inibição da alfa-amilase e lipoxigenase.....	108
3.5	Análise antifúngica.....	112
4	CONCLUSÃO.....	115
	ANEXO A.....	116
	REFERÊNCIAS.....	117

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

O emprego e uso constante de plantas medicinais com a finalidade de cura ou alívio de sintomas e doenças é uma prática tão antiga quanto a humanidade (SALES, 2012). Atualmente o estudo das plantas medicinais e seus constituintes químicos chama a atenção de equipes multidisciplinares, sendo estudada por químicos, farmacêuticos, biólogos, agrônomos entre outros.

Outra importante abordagem se refere as doenças infecciosas, que são causadas por microrganismos patogênicos, tais como bactérias, vírus, fungos ou parasitas e podem ser disseminadas direta ou indiretamente de uma pessoa a outra (WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO, 2008). Nos últimos anos, tem sido cada vez maior a preocupação com o tratamento dessas doenças uma vez que bactérias e outros organismos como vírus, fungos e parasitas têm grande capacidade de desenvolver resistência a medicamentos antimicrobianos, bem como o uso indiscriminado tem levado a uma resistência aos já existentes (PIMENTA, 2008). E os produtos de origem natural têm se mostrado bastante promissores nesse sentido sendo às vezes mais eficazes, menos tóxicos e com menos efeitos indesejáveis que os medicamentos sintéticos existentes hoje no mercado.

A crescente preocupação com a dieta e a ingestão de produtos alimentícios sem aditivos sintéticos torna necessária a busca por antioxidantes naturais para minimizar a oxidação lipídica, principalmente em produtos cárneos. Os condimentos da família Lamiaceae têm sido extensivamente estudados devido ao caráter antioxidante de seus compostos fenólicos. (MARIUTTI; BRAGAGNOLO, 2007).

Os antioxidantes são capazes de interceptar os radicais livres gerados pelo metabolismo celular ou por fontes exógenas evitando a formação de lesões e perda da integridade celular (ROCHA et al., 2007). Essa interceptação dos radicais livres é importante para os processos do metabolismo e torna interessante o estudo dos antioxidantes naturais, como os encontrados em plantas do gênero *Plectranthus*.

Dentre as plantas de importância medicinal a família Lamiaceae tem sido reconhecida pela existência de inúmeras espécies utilizadas como aromáticas e medicinais (ABDEL-MOGIB et al., 2002; LORENZI; MATOS, 2008). Considerado um dos maiores gêneros da família Lamiaceae, o *Plectranthus* é composto por espécies utilizadas na medicina popular pelas suas propriedades antidiarréicas, analgésicas, estimulantes da digestão entre outras (BANDEIRA et al., 2011; PASSARINHO-SOARES et al., 2006). As potencialidades terapêuticas dessas espécies (BANDEIRA et al., 2011; RICE et al., 2011), demonstram a necessidade de estudos da atividade biológica das mesmas.

Diante do exposto o presente trabalho teve dois objetivos. No primeiro objetivou-se quantificar os teores de constituintes fenólicos, comparar o potencial antioxidante e a capacidade de inibição da alfa-amilase *in vitro*, de extratos aquosos e hidroalcoólicos des três espécies do gênero *Plectranthus* (*P. amboinicus*, *P. barbatus* e *P. ornatus*). No segundo objetivou-se elucidar os componentes químicos e avaliar o potencial antioxidante, antifúngico e inibitórios da lipoxigenase e alfa-amilase do óleo essencial de *P. amboinicus*, cultivado em campo e em cultivo protegido e coletado de manhã e de tarde.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Gênero *Plectranthus*

A família Lamiaceae contém vários gêneros, tais como sálvia (*Salvia*), manjerição (*Ocimum*) e hortelã (*Mentha*), com uma rica diversidade de usos. O *Plectranthus* é outro gênero importante dessa família, e compreende cerca de 300 espécies de ervas e arbustos nativos de regiões tropicais (DELLAR et al., 1996; LUKHOBA et al., 2006). É considerado um dos maiores gêneros dessa família e tem ocorrência, principalmente, em quatro continentes: África, América, Oceania e Ásia (ALBUQUERQUE, 2000; BANDEIRA et al., 2011; PASSARINHO-SOARES et al., 2006).

O gênero *Plectranthus*, entre os gêneros pertencentes à família Lamiaceae, é considerado um dos mais ricos em óleos essenciais, tendo como principais constituintes os mono e sesquiterpenos, além também da vasta composição química apresentada por seus extratos de diversas polaridades (ABDEL-MOGIB et al., 2002).

No entanto, na literatura há divergências quanto a composição química dos óleos essenciais das espécies de *Plectranthus*. De acordo com Rodrigues et al. (2013), carvacrol e p -cimeno foram os constituintes majoritários presentes no óleo essencial de *P. amboinicus*, com teores de 67,9% e 10,3% respectivamente, e eugenol em *P. ornatus* e *P. barbatus* com teores de 22,9% e 25,1% respectivamente. Outros constituintes químicos, além do eugenol, que também estão presentes em *P. ornatus*, conforme Albuquerque et al. (2006), são timol (14,1%), β -cariofileno (9,6%) e carvacrol (7,5%) de acordo com Barbosa et al. (2011) e Bocardi (2008), em *P. barbatus*, o componente químico principal do óleo essencial é o α -valenceno (23%), seguido do β -cariofileno (21%) e para *P. amboinicus* o β -cariofileno (25,5%). Diferenças na composição química de óleos

essenciais são comumente relatadas na literatura, sendo que fatores técnicos de manejo agrícola, condições ambientais e genéticos concorrem pelas causas desse fenômeno (GOBBO NETO; LOPES, 2010). Por isso, faz-se necessário relacionar esses fatores com estudos de atividade biológica, visando apontar possíveis variações químicas nas atividades biológicas e selecionar àqueles mais promissores.

Dentre os diversos componentes químicos dos óleos essenciais, o timol e o carvacrol se destacam devido suas pronunciadas atividades antimicrobiana (ALMEIDA, 2015). Estes monoterpenos fenólicos são os constituintes principais dos óleos essenciais de várias plantas aromáticas, tais como *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae), *Origanium compactum* (Labiatae), *Acalypha phleoides* (Euphorbiaceae) e *Lippia sidoides* (Verbenaceae) (PEIXOTO-NEVES et al., 2010). Em especial o carvacrol, diversos autores determinaram, por meio de estudos *in vitro*, suas atividades germicida, antisséptica e antifúngica (MATOS, 2000; OLIVEIRA et al., 2006, 2007). A ocorrência de cariofileno, componente também do óleo essencial, pode estar relacionada ao uso tradicional destas espécies vegetais contra as dores estomacais (BOCARDI, 2008).

Espécies de *Plectranthus* apresentam grande capacidade biossintética para a produção de diversas classes químicas do metabolismo celular secundário, principalmente diterpenóides e triterpenóides, algumas delas com atividades biológicas determinadas (GASPAR et al., 2006).

Nas folhas de *P. barbatus* o diterpenóide, Plectrinona A, foi isolado a partir da fração orgânica do extrato aquoso (5% p/v) particionado com água e acetato de etila (SCHULTZ et al., 2007). O extrato aquoso de *P. barbatus* teve a presença de ácido rosmarínico e derivados flavonoídicos. O ácido rosmarínico é um constituinte comum na família Lamiaceae, sendo o principal composto encontrado em extratos aquosos das espécies de *Plectranthus*, anteriormente

citadas e responsável pela atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase (ABDELI-MOGIB et al., 2002).

Estudos fitoquímicos realizados por Zelnik et al. (1977) isolaram três diterpenos: a barbatusina a 3 β -hidróxi-3-deoxibarbatusina (teor de 0,014%) e a ciclobutatusina (teor de 0,008%) a partir de extratos acetônicos de folhas secas de *P. barbatus*. Bhat et al. (1977) isolaram, das raízes de *P. barbatus*, cinco diterpenos do tipo labdano. Lindner et al. (1978) elucidaram a estrutura química e determinaram a atividade cardioativa e de diminuição da pressão sanguínea do forskolin, isolado anteriormente por Bhat et al. (1977) a partir do extrato metanólico das raízes de *P. barbatus*. Posteriormente, foi proposto por Dubey et al. (1981), que o forskolin seria um diastereoisômero do coleonol.

Dentre os usos de espécies de *Plectranthus* o mais citado é para fins medicinais, o que representa mais de 85% de todos usos. As espécies são utilizadas para o tratamento de perturbações digestivas, afecções cutâneas, infecções respiratórias, infecções gerais e febre, infecções do trato geniturinário, dor e condições músculo-esqueléticas, problemas circulatórios e perturbações do sistema nervoso (ALBUQUERQUE, 2000; LUKHOBBA et al., 2006; GASPAR et al., 2006).

2.1.1 *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng

Plectranthus amboinicus (Lour) Spreng (Figura 1) é uma planta nativa da Ásia Oriental, encontrada em toda América tropical (CHIU et al., 2012). É uma erva herbácea aromática, perene, ereta, semicarnosa, de 40 cm a 1m de altura. No Nordeste brasileiro não chega a produzir flores, essas só aparecem quando a planta é cultivada em climas amenos. As flores são azuladas ou róseas e dispostas em cachos terminais. Possui um óleo essencial responsável por variadas e importantes propriedades medicinais, dentre elas antibacteriana (AGUIAR et al.,

2014), modulador da atividade antibacteriana (AGUIAR et al., 2015), antiinflamatória (CHEN et al., 2014; UMA et al., 2011), bio-herbicida (PINHEIRO et al., 2015) entre outras. É conhecida popularmente como malvarisco, malvariço, hortelã grosso, hortelã grande, hortelã graúda, hortelã gorda e malva.



Figura 1 Aspecto geral da espécie *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng

P. amboinicus possui atividade antiinflamatória, utilizada principalmente para doenças de pele (queimaduras, picadas de insetos e alergias de pele), também é muito utilizada como digestiva, para doenças respiratórias e como antitumoral, existem ainda pequenos relatos de atividade hipoglicêmica (KUO; CHIEN, 2012). Em outros estudos o extrato etanólico (90% v/v) das folhas secas de *P. amboinicus* mostrou possuir efeitos antioxidantes e nefroprotetor (nefrotoxicidade induzida por acetaminofeno e diuréticos fortes em ratos) (PALANI et al., 2010). Nos estudos de Palani et al. (2010) o extrato aumentou as respostas antioxidantes do organismo de ratos com nefrotoxicidade induzida, tal como avaliado por testes bioquímicos e através de análises histopatológicas.

P. amboinicus também mostrou a capacidade de tratar a artrite induzida em ratos (CHANG et al., 2010).

2.1.2 *Plectranthus ornatus* Codd.

Plectranthus ornatus Codd. (Figura 2) é uma planta da família Lamiaceae, considerada originária do leste da África, da Etiópia à Tanzânia, mas que encontra-se semi-naturalizada em outras regiões, onde é cultivada como planta ornamental, sendo também de uso medicinal. No Brasil, a planta é conhecida pelas designações comuns de boldo rasteiro, boldo miúdo, boldinho e boldo chinês (SANTOS et al., 2014). Trata-se de uma erva perene, herbácea e aromática com 30 a 40cm de altura, de folhas suculentas com flores em espigas nos tons malva ou azul purpúrea (CODD, 1985). Na medicina popular é indicada para males do fígado e problemas digestivos (ALBUQUERQUE, 2000).



Figura 2 Aspecto geral da espécie *Plectranthus ornatus* Codd

P. ornatus é comumente utilizado para distúrbios estomacais e problemas de fígado. Apresenta atividades antiinflamatórias, diuréticas, antipirética e

analgésica (OLIVEIRA et al., 2005). O seu óleo essencial, contendo *trans*- β -cariofileno (9,6%), eugenol (38,0%) e timol (14,1%) como constituintes majoritários, demonstrou elevada atividade antioxidante medida pelo teste de eliminação de radicais DPPH, atribuída aos altos teores de eugenol e timol (ALBUQUERQUE et al., 2006).

2.1.3 *Plectranthus barbatus* Andr.

Plectranthus barbatus Andr. (Figura 3), conhecida popularmente como falso boldo, boldo nacional, boldo do Brasil, malva santa, sete-dores, provavelmente originário da África, é amplamente cultivado em todo o Brasil e utilizado como planta medicinal, com propriedades analgésica e antidiarréica (KAPEWANGOLO et al., 2013). Trata-se de um arbusto aromático perene, de ramos eretos e sub-lenhosos, que atinge de 1,0 a 1,5m de altura. As folhas são ovalado-oblongas, pilosas e grossas com bordos denteados. As flores de coloração azulada crescem em racemos (espigas) que surgem na estação chuvosa (ALBUQUERQUE, 2000).

Nas folhas de *P. barbatus* o diterpenóide (Plectrinona A) foi identificado como o composto responsável pela atividade antiúlcera deste chá (SCHULTZ et al., 2007). Os diterpenos encontrados em *P. barbatus* estão relacionados com as propriedades cardioativa e hipotensiva desta planta (BHAT et al., 1977). A espécie *P. barbatus* pode ser usada ainda como tônico, digestivo, hipossecrator gástrico, para afecções do fígado e ressaca alcoólica (MARTINS et al., 2000). Possui também atividades analgésicas, antiinflamatórias, coleréticas, colagogas, antifúngica, anti-séptica e, de acordo com Bhakuni et al. (1970), apresenta também função antiviral, antitumoral, antibacteriana, ação antioxidante e ainda hipoglicêmica (TAMARISIO et al., 1998).



Figura 3 Aspecto geral da espécie *Plectranthus barbatus* Andr

2.2 Metabolismo secundário

Desde os tempos antigos as plantas já são utilizadas pelas sociedades com propósitos terapêuticos. Tal fato levou a um estudo mais aprofundado das espécies vegetais gerando um maior conhecimento etnobotânico e farmacológico acumulado ao longo de gerações. Esses estudos serviram de base para o desenvolvimento de fármacos de grande importância, tais como: digoxina, quinina, morfina, hiosciamina, ácido salicílico e artemisina. Neste contexto, os metabólitos secundários vegetais apresentam um grande valor do ponto de vista social e econômico (SOARES, 2013).

Os princípios ativos que são encontrados nos vegetais são, em sua maioria, provenientes do metabolismo secundário cuja função principal é a proteção do organismo vegetal em consequência da interação da planta com o ambiente que a envolve (MAIA, 2008). Os metabólitos secundários, oriundos do metabolismo secundário, são os grandes responsáveis pelos efeitos medicinais ou tóxicos apresentados pelas plantas, representando uma defesa química contra

insetos e microrganismos (MAZID; KHAN; MOHAMMAD, 2011; VERPOORTE; MEMELINK, 2002).

A origem de todos os metabólitos secundários pode ser resumida a partir do metabolismo da glicose, por meio de dois intermediários principais, o ácido chiquímico e o acetato (Figura 4). Alguns metabólitos derivam não apenas de um desses intermediários, mas são resultantes da combinação destas vias, como é o caso dos flavonóides (SIMÕES et al., 2007).

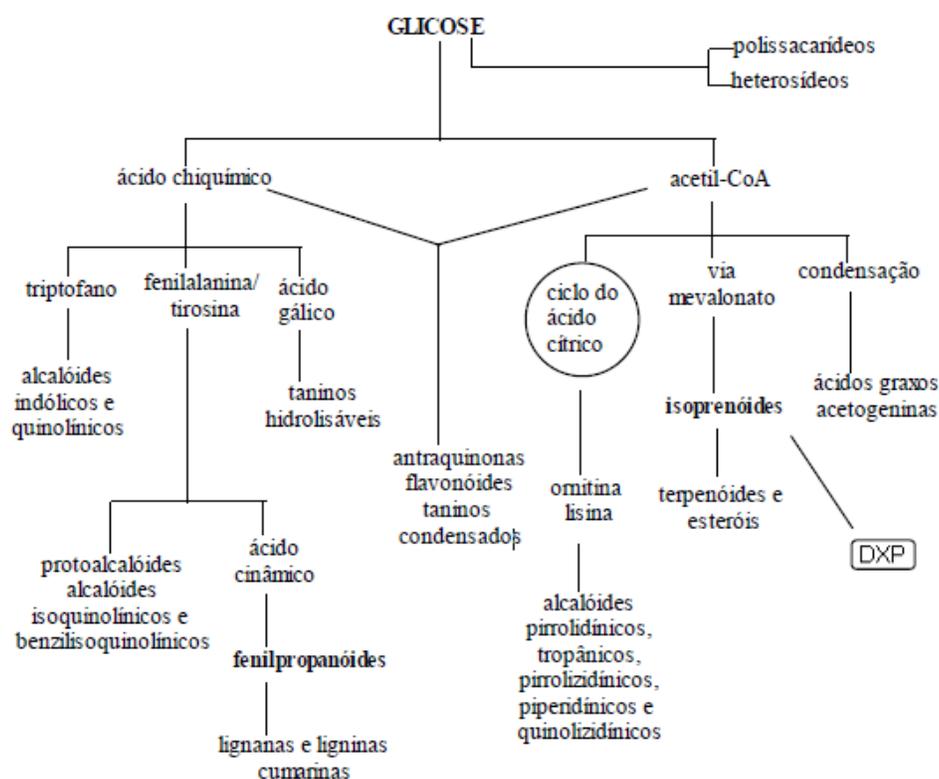


Figura 4 Ciclo biossintético dos metabólitos secundários

Fonte: Adaptado de Simões et al., 2007

2.2.1 Compostos fenólicos

Entre todos os metabólitos secundários sintetizados pelas plantas, os compostos fenólicos são os mais difundidos no reino vegetal. Eles são caracterizados por ter pelo menos um anel aromático com um ou mais grupamento hidroxila. São biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e são frequentemente conjugados com açúcares, outros fenólicos e poliamidas (TORRAS-CLAVERIA et al., 2012).

Os flavonóides são compostos fenólicos conhecidos por exibir propriedades antiviral, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória e analgésica (CLAVIN et al., 2007; IBRAHIM et al., 2012; PELZER et al., 1998). Esse grupo compreende compostos polifenólicos de baixo peso molecular contendo 15 átomos de carbono em seu núcleo fundamental (SIMÕES et al., 2007). Nos compostos tricíclicos, as unidades são chamadas núcleos A, B e C (Figura 5).

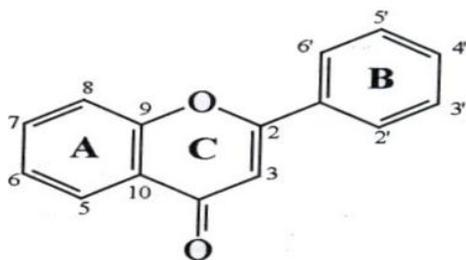


Figura 5 Núcleo fundamental dos flavonóides

Fonte: Simões et al., 2007

Esses compostos podem ocorrer na sua forma livre, quando são chamados de agliconas, ligados a açúcares, chamados de glicosídeos ou heterosídeos e também podem ocorrer como derivados metilados (NIJVELDT et

al., 2001). São sintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e do acetato e por isso são ditos de origem mista (SIMÕES et al., 2007).

Os flavonóides são classificados de acordo com a variação do núcleo fundamental mostrado na Figura 6. Dentre elas estão: flavonóis, flavonas, flavanonas, catequinas, antocianidinas, isoflavonas, dihidroflavonóis e chalconas. Os grupos principais de flavonóides estão listados na Figura 6, em conjunto com os membros mais conhecidos de cada grupo.

Classes de flavonóides	Anel C insaturado	Grupo funcional no anel C	Exemplos de flavonóides	Estrutura química
Flavanas/Flavanóis ou catequinas	Nenhum	3-hidroxi 3-O-galato	Catequina Epicatequina Luteoforol Procianidina Theaflavina	
Flavanonas	Nenhum	4-oxo	Hesperidina Naringenina	
Flavonas	2-3 ligação dupla	4-oxo	Apigenina Luteolina Diosmetina Tangeretina Nobiletina	
Isoflavonas	2-3 ligação dupla	4-oxo	Daidzeína Genisteína	
Flavonóis	1-2, 3-4 ligação dupla	3-hidroxi 4-oxo	Isoamnetina Caemferol Quercetol Quercetina Rutina Mircetina	
Antocianidinas	2-3 ligação dupla	3-hidroxi	Cianidina Delinidina Peonidina	

Figura 6 Subclasses de flavonoides, suas características químicas, nome de flavonóides e exemplos da estrutura base

Fonte: Silva, 2012

Esses compostos são distribuídos largamente nas folhas, sementes, raízes e flores das plantas. Mais de 10.000 estruturas de flavonoides já foram descobertas (AGATI et al., 2012). Nas plantas, os flavonóides têm a função principal de atrair polinizadores e absorver a radiação UV prejudicial que pode induzir dano celular (TAKAHASHI; OHNISHI, 2004).

Nos seres humanos, os flavonóides têm sido descritos por exercer efeitos benéficos em diversas doenças incluindo câncer, desordens neurodegenerativas e doenças cardiovasculares (BEHLING et al., 2004). Muitas dessas ações biológicas têm sido atribuídas às suas propriedades antioxidantes, através da capacidade de redução, doação de hidrogênio e influência no estado redox intracelular. Essa atividade parece estar diretamente relacionada com o número de grupamento hidroxila no núcleo B (HUSAIN et al., 1987; WILLIAMS et al., 2004).

2.2.2 Óleos essenciais

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos lipofílicos, de baixo peso molecular, geralmente odoríficos, e são constituídos por diferentes compostos, como hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, entre outros, os quais são responsáveis por suas propriedades físico-químicas e biológicas (SIMÕES et al., 2007).

Para a International Organization for Standardization (ISO), óleos essenciais são compostos que podem ser obtidos através dos processos de hidrodestilação ou destilação por arraste a vapor d'água, bem como os produtos obtidos por expressão dos pericarpos de frutos cítricos.

A constituição química dos óleos essenciais é muito variada podendo ser formada de derivados de terpenóides ou de fenilpropanóides. Os terpenóides constituem a maior classe encontrada em produtos naturais de plantas, sendo

classificados pelo número de carbonos. Conforme Figura 7 são sintetizados a partir da unidade isoprênica (2-metil-1,3-butadieno) que se origina do ácido mevalônico (rota que acontece no citosol) ou do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXPS) (rota que acontece nos cloroplastos) (DEWIK, 2002).

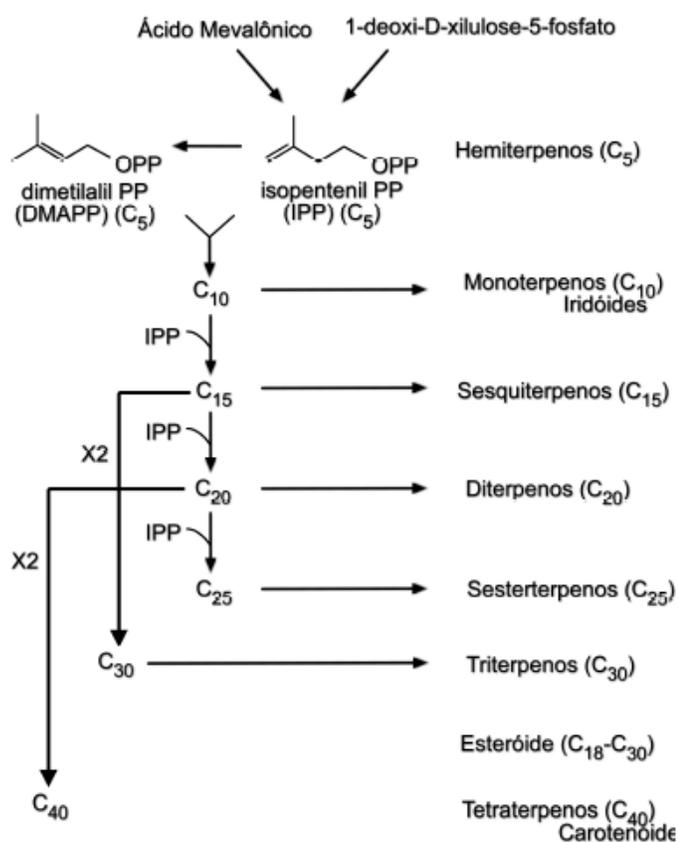


Figura 7 Biossíntese dos terpenóides

Fonte: Dewik, 2002

Nos óleos essenciais os compostos terpênicos mais encontrados são os monoterpenos (C₁₀) e sesquiterpenos (C₁₅), que cada vez são mais estudados

devido às diversas propriedades biológicas apresentadas por estes compostos (DUBEY et al., 2003).

Dentre os milhares de compostos que podem estar presentes na composição dos óleos essenciais, o timol e o carvacrol (Figura 8) se destacam devido suas pronunciadas atividades antimicrobiana (ALMEIDA, 2015). Estes monoterpenos aromáticos são os constituintes principais dos óleos essenciais de várias plantas aromáticas, tais como *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae), *Origanum compactum* (Labiatae), *Acalypha phleoides* (Euphorbiaceae) e *Lippia sidoides* (Verbenaceae) (PEIXOTO-NEVES et al., 2010).

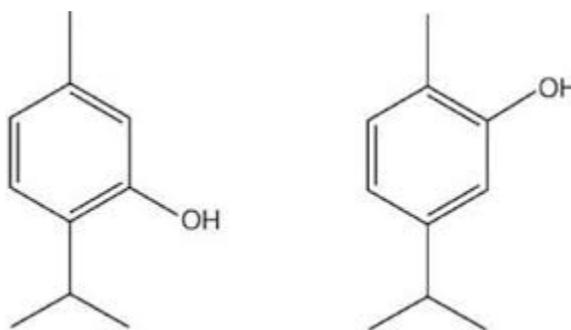


Figura 8 Estrutura química do Timol e do Carvacrol

2.2.3 Fatores que influenciam a produção de metabólitos secundários

De acordo com Gobbo Neto e Lopes (2010) dentre os fatores que podem coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos secundários os principais são: sazonalidade, ritmo circadiano e desenvolvimento, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrientes, poluição atmosférica, altitude, indução por estímulos mecânicos ou ataque de patógenos (Figura 9).

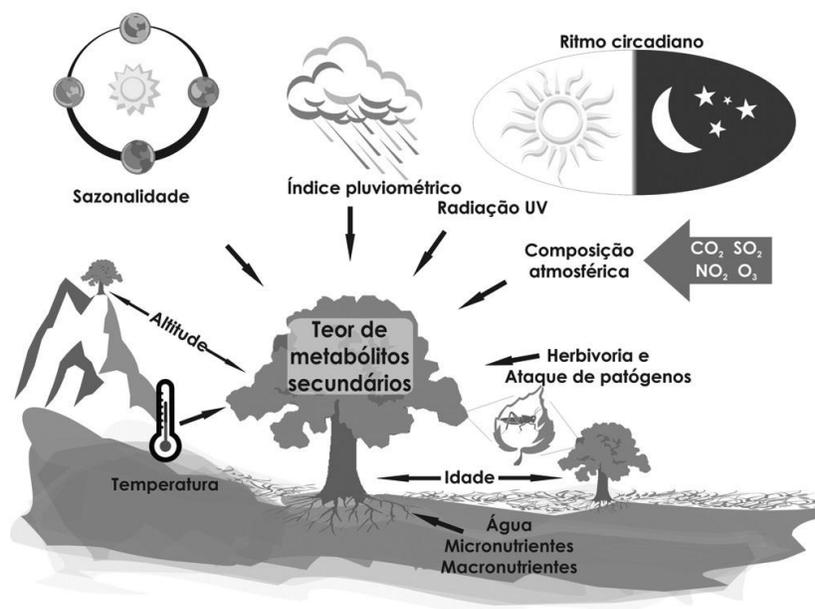


Figura 9 Principais fatores que podem influenciar o acúmulo de metabólitos secundários nas plantas

Fonte: Gobbo Neto e Lopes, 2010

Variações temporais e espaciais no conteúdo total de metabólitos secundários em plantas ocorrem em diferentes níveis e, apesar da existência de um controle genético, a expressão pode sofrer modificações resultantes da interação de processos bioquímicos, fisiológicos, ecológicos e evolutivos (HARTMANN, 1996; LINDROTH et al., 1987). Como já dito anteriormente de fato, os metabólitos secundários representam uma conexão entre as plantas e o ambiente circundante e depende, além dos fatores genéticos, também dos fisiológicos e ambientais (FREITAS et al., 2004).

Os estudos têm mostrado que não há constância de concentrações de metabólitos secundários nas espécies vegetais, pelo contrário, dependendo de onde e como os cultivos são realizados, a quantidade dessas substâncias em uma mesma planta pode variar e um mesmo fator pode interferir positivamente ou

negativamente na produção de uma determinada substância em espécies de plantas diferentes (GOBBO NETO; LOPES, 2010).

Dessa forma, considerando que a quantidade dos constituintes presentes nas plantas varia consideravelmente em função de fatores externos como os já citados, faz-se necessário um estudo destas características objetivando a qualidade da matéria-prima vegetal de forma a garantir a qualidade e eficácia do produto final (CARNEIRO et al., 2010).

2.3 Atividade antioxidante

Antioxidantes são substâncias que retardam ou previnem o início ou a propagação da cadeia de reações de oxidação transformando-se em radicais não reativos (na maioria das vezes estabilizados por ressonância) e prevenindo danos severos ao organismo (ROCHA et al., 2007).

Compostos químicos que possuem atividade antioxidante geralmente são aromáticos e contêm pelo menos uma hidroxila podendo ser sintéticos como o butil hidroxianisol (BHA) e o butil hidroxitolueno (BHT) (Figura 10), largamente utilizados pela indústria de alimentos ou naturais, denominados substâncias bioativas. Os naturais incluem os organosulfurados, os fenólicos (tocoferóis, flavonóides e ácidos fenólicos), os terpenos, carotenóides e o ácido ascórbico que fazem parte da constituição de diversos vegetais (MELO; GUERRA, 2002; VELIOGLU, 1998).

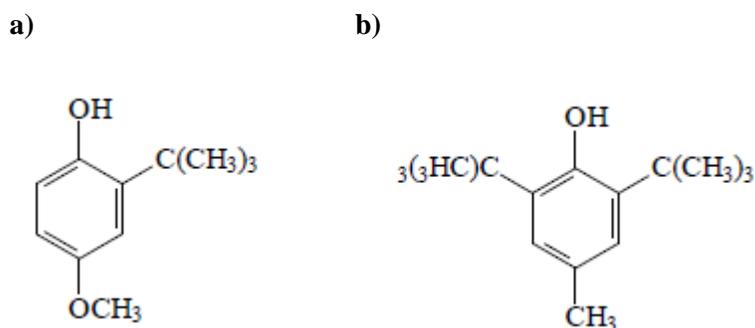


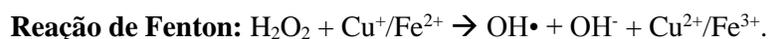
Figura 10 Estruturas químicas do (a) BHA e (b) BHT

Fonte: Miranda, 2010

Comoceptor final de elétrons da cadeia respiratória, o O_2 tem uma função muito importante para os organismos aeróbicos, participando na obtenção de energia na forma de ATP e de várias reações metabólicas, como a biossíntese de prostaglandinas e esteróides e na oxidação de muitas substâncias aromáticas, entre outras (FLESCHEIN et al., 2000). Cerca de 95 a 98% do oxigênio consumido durante a respiração celular é para a produção de energia, o restante (2 a 5% do oxigênio metabolizado), produz ERO's (Espécies Reativas de Oxigênio) (SOARES, 2013). Os radicais livres e outros derivados ativos do oxigênio são inevitavelmente co-produzidos nessas reações biológicas e exercem papel fisiológico importante, mas também estão envolvidos em vários processos deletérios ao organismo humano como o câncer, a aterosclerose, o *Diabetes mellitus*, a artrite reumatóide, a distrofia muscular, a catarata, as desordens neurológicas e o processo de envelhecimento (NORDBERG; ARNÉR, 2001).

ERO's como ânion superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical hidroxil (OH^{\bullet}) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são produzidas como subproduto do metabolismo celular e são geradas constantemente no corpo humano atuando como moduladores de processos biológicos internos, incluindo a sinalização da transdução, transcrição ou morte programada (CUI et al., 2004).

Dentre as ERO's o radical $\text{OH}\cdot$ é o mais reativo e nocivo, sendo considerado o radical capaz de causar mais danos aos sistemas biológicos do que qualquer outra ERO (SOARES, 2013). Ele é formado pelo H_2O_2 numa reação conhecida como Reação de Fenton que é catalisada por íons metálicos (Fe^{2+} e Cu^+) conforme representado a seguir:



O organismo não dispõe de um sistema enzimático de defesa contra o radical hidroxil, dessa forma a defesa que a célula encontrou foi não deixar que o mesmo seja formado, controlando a homeostase metálica (SOARES, 2013). Os íons metálicos ou têm seu transporte regulado, ou são mantidos em sua valência mais alta ou estão em alguma forma complexados a enzimas e proteínas onde são armazenados e/ou fazem parte funcional das mesmas (FRIDOVICH, 1998; HALLIWELL, 1991; HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

As células possuem muitas maneiras de controlar a produção de ERO's, através de antioxidantes enzimáticos (superóxido dismutase - SOD, catalase - CAT e glutathione peroxidase, e não-enzimáticos (ácido ascórbico - vitamina C, α -tocoferol - vitamina E e glutathione). O balanço entre a produção e a degradação de ERO's mantém a homeostase celular (COVARRUBIAS et al., 2008).

Os sistemas antioxidantes atuam em conjunto (Figura 11). A ausência de um deles acarreta um desequilíbrio celular, podendo levar ao aumento da sensibilidade a agentes oxidantes intra ou extracelular (DRÖGE, 2002).

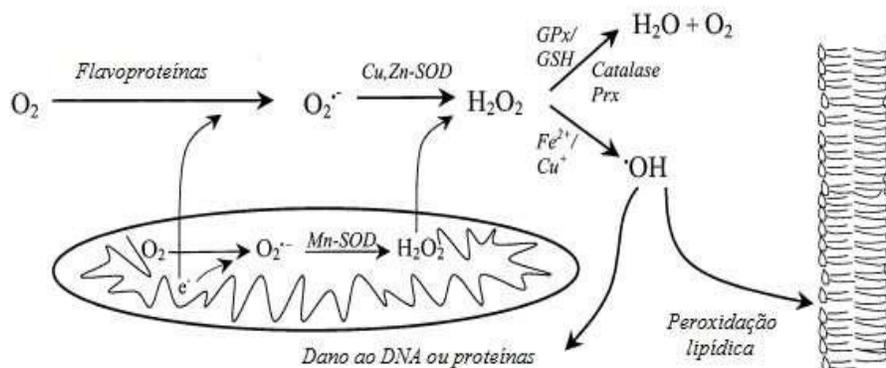


Figura 11 Atuação cooperativa dos sistemas antioxidantes presente nas células
 Fonte: Adaptado de Nordberg e Árner, 2001

Muitas evidências bioquímicas, biológicas e clínicas sugerem o envolvimento do estresse oxidativo induzido por radicais livres na patogênese de várias doenças e no envelhecimento acelerado (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007).

Uma condição de estresse oxidativo ocorre quando a célula acumula um excesso de ERO's que podem danificar as células através da oxidação de lipídios, proteínas e DNA (COVARRUBIAS et al., 2008). Por esta razão, mais atenção tem se dado aos antioxidantes naturais que podem servir como medicina preventiva para proteger o organismo humano contra os radicais livres e retardar o progresso de muitas doenças crônicas (KRISHNAIAH et al., 2011).

As plantas possuem larga variedade de moléculas captadoras de radicais livres como flavonóides, antocianinas, carotenóides e vitaminas (CHOI et al., 2002).

Entre todos os metabólitos secundários sintetizados pelas plantas, os compostos fenólicos são os mais difundidos no reino vegetal. Eles são caracterizados por ter pelo menos um anel aromático com um ou mais grupamento hidroxila. São biossintetizados a partir da via dos fenilpropanóides e

são frequentemente conjugados com açúcares, outros fenólicos e poliamidas (TORRAS-CLAVERIA et al., 2012). Esses compostos possuem uma variedade de funções biológicas como antiviral, antimicrobiana, antioxidante, anti-inflamatória, analgésica entre outras (CLAVIN et al., 2007; IBRAHIM et al., 2012; PELZER et al., 1998).

2.4 Atividade anti-*Candida*

As leveduras do gênero *Candida* são as principais identificadas em laboratórios de análises clínicas, principalmente de pacientes hospitalizados (PEDROSO et al., 2014). Espécies de *Candida* são também relatadas como as leveduras mais frequentemente envolvidas em infecções micóticas (WILHELMUS, 2005). A infecção por dermatófitos afeta aproximadamente 40% da população mundial e representa 30% de todas as infecções micóticas cutâneas, sendo as mais comuns as que afetam a pele e as mucosas (ARAÚJO et al., 2003).

A candidíase é a mais comum infecção micótica sendo *Candida albicans* seu mais importante agente causador, embora *Candida guilliermondii*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida stellatoidea* e *Candida tropicalis* também tenham sido relatadas como agentes etiológicos possíveis (DUARTE et al., 2005; LIMA et al., 2006; SCHWARTZ, 2004). Infecções da corrente sanguínea por *Candida* spp. apresentam mortalidade elevada e são responsáveis pelo aumento dos custos hospitalares (ALFONSO et al., 2010).

O problema da resistência dos micro-organismos patogênicos frente aos produtos sintéticos existentes hoje no mercado gera grande preocupação para os cientistas (BAUTISTA-BAÑOS et al., 2003). A resistência aos antifúngicos, clínica ou *in vitro*, pode ocorrer quando células de fungos suscetíveis passam a ser resistentes devido ao contato prévio com as drogas ou é inerente ao próprio

microrganismo (MORSCHHÄUSER, 2002). Em decorrência disso, surge cada vez mais a necessidade de avaliação da sensibilidade destes agentes a outros antifúngicos como os de origem natural (PEDROSO et al., 2014).

Nesse contexto os óleos essenciais têm-se destacado dentre os agentes terapêuticos provenientes das plantas com uso medicinal popular e científico (COSTA et al., 2008).

Diversos estudos tem demonstrado a atividade anti-*Candida* dos óleos essenciais. Como mostrado por Abrantes et al. (2013) os óleos essenciais de *Citrus limonum*, *Cinnamomum zeylanicum*, *Eucalyptus globulus*, *Eugenia coryophyllata*, *Mentha arvensis*, *Mentha piperita*, *Mentha spicata*, *Origanum vulgare*, *Pimpinella anisum* apresentaram forte atividade anti-*Candida* com média de halos de inibição entre 18 a 49 mm de diâmetro. Nesse estudo foram testadas várias leveduras *Candidas* não *albicans*. De acordo com Almeida et al. (2011) os óleos essenciais de diversas espécies vegetais (*Ocimum basilicum*, *Cymbopogon martinii*, *Cyperus articulatus*, *Thymus vulgaris* e *Cinnamomum cassia*), apresentaram alta atividade frente a cepas de *C. albicans*. O valores dos halos de inibição dos óleos essenciais variaram entre 27 e 30mm enquanto o miconazol (controle positivo empregado) variou entre 8 e 10mm.

Além disso, alguns óleos já se mostraram efetivos em “reverter” a resistência causada por alguns antifúngicos utilizados clinicamente como é o caso do óleo essencial de *P. amboinicus*. De acordo com Oliveira et al. (2007) o óleo essencial de *P. amboinicus* mostrou destacável interferência sobre a atividade antifúngica de itraconazol, sendo observado um efeito sinérgico sobre *C. albicans*, *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. stellatoidea*. Ademais, o óleo essencial interferiu na atividade antifúngica de cetoconazol sobre *C. albicans*, *C. guilliermondii* e *C. stellatoidea* causando efeito sinérgico. Estes dados mostram que o uso combinado de plantas medicinais e/ou seus produtos derivados com

drogas industrializadas, particularmente, antimicrobianos, podem interferir sobre os efeitos terapêuticos esperados.

Os antifúngicos podem ser agrupados em três classes baseados no seu ponto de ação: inibidores da síntese do ergosterol (o principal esterol de fungos); polienos, que interagem fisicoquimicamente com os esteróis de membrana e inibidores da síntese de proteína (ARTHINGTON-SKAGGS et al., 2002). Em relação ao seu mecanismo de ação antifúngico os óleos essenciais são relatados por serem inibidores da síntese de ergosterol (BARBOSA, 2010).

2.5 Atividade inibitória enzimática

As pesquisas envolvendo mecanismos de inibição enzimática de um determinado processo metabólico por substâncias naturais têm apresentado considerável atenção. Muitas dessas pesquisas tem apontado para o fato de que essas substâncias possuem uma ação, muitas vezes, mais seletiva e com menos efeitos indesejáveis do que os medicamentos sintéticos utilizados para a mesma finalidade (SALES, 2012).

Zangara et al. (2003) identificaram que a huperzina A, extraída da espécie *Huperzia serrata*, apresentou atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase superior a fármacos usados para o tratamento do mal de Alzheimer. Os óleos essenciais de plantas como *Eucalyptus globulus*, *Cupressus sempervirens* e *Thymus vulgaris* também apresentaram elevada atividade inibitória da enzima acetilcolinesterase conforme estudos de Aazza et al. (2011).

Substâncias isoladas das espécies *Atractylodis rhizoma* e *Artocarpus heterophyllus*, plantas de origem asiática, mostraram capacidade inibitória da enzima tirosinase, contriubuindo para efeitos de clareamento da pele (ARUNG et al., 2006; CHANG et al., 2007). Além disso o extrato aquoso da espécie

Artocarpus heterophyllus apresentou atividade inibitória da enzima alfa-amilase, *in vitro* (KATOWAROO et al., 2006).

De acordo com Miguel et al. (2014) extratos obtidos a partir das espécies *Ammi visnaga*, *Viscum album* e *Berberis vulgaris* apresentaram atividade inibitória da enzima lipoxigenase mostrando-se eficientes frente a processos inflamatórios e antioxidantes.

Para contribuir com o desenvolvimento da aplicação de inibidores enzimáticos no tratamento de doenças, torna-se importante o estudo de substâncias de origem natural que sejam ativas contra algumas dessas enzimas.

2.5.1 Lipoxigenase

O ácido araquidônico (AA) é um ácido graxo poliinsaturado liberado a partir dos fosfolídeos das membranas celulares através da ação da enzima fosfolipase A2 em resposta a estímulos mecânicos, químicos ou físicos e também por mediadores químicos (SILVA, 2012). Os metabólitos do ácido araquidônico, denominados eicosanóides, são sintetizados por duas vias enzimáticas:

- a via das enzimas lipoxigenases (LOX), que resulta na formação de leucotrienos e lipoxinas (FALEIRO, 2014),
- a via das enzimas cicloxigenases (COX), que leva à formação de prostaglandinas (PGs) e tromboxanos (TXA) (prostanoides) (FALEIRO, 2014).

As lipoxigenases (LOXs) são enzimas que catalisam a adição de oxigênio molecular ao ácido araquidônico levando a formação de hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados (5-HPETE - ácido 5-hidroperoxieicosatetraenóico) (Figura 12), que atuam como intermediários de rotas metabólicas (AXELROD et al., 1981; MACK; PETERMAN; SIEDOW, 1987). Em animais e, de forma similar nos vegetais, a rota das LOXs e

ciclooxigenases, onde o hidroperóxido ou endoperóxido formados por essas enzimas são transformados em leucotrienos, prostaglandinas, prostaciclina e tromboxanos, depende da natureza do estímulo celular (BARROS et al., 2008). Esses metabólitos demonstram uma poderosa atividade reguladora de processos inflamatórios em mamíferos (SAMUELSSON et al., 1987; SCHEWE; RAPOPORT; KUHN, 1986)

Devido à produção desses hidroperóxidos de ácidos graxos poliinsaturados (5-HPETE) (Figura 12), compostos que são capazes de inibir a enzima podem ser considerados como antioxidantes (MIGUEL et al., 2014). Ao mesmo tempo, esses produtos são convertidos em outros que desempenham um papel fundamental em processos inflamatórios, como os leucotrienos (Figura 2). Portanto, compostos que são capazes de inibir esta enzima, também possuem propriedades antiinflamatórias (STEINHILBER, 1999) uma vez que a peroxidação lipídica está intimamente relacionada com processos inflamatórios (SILVA et al., 2002).

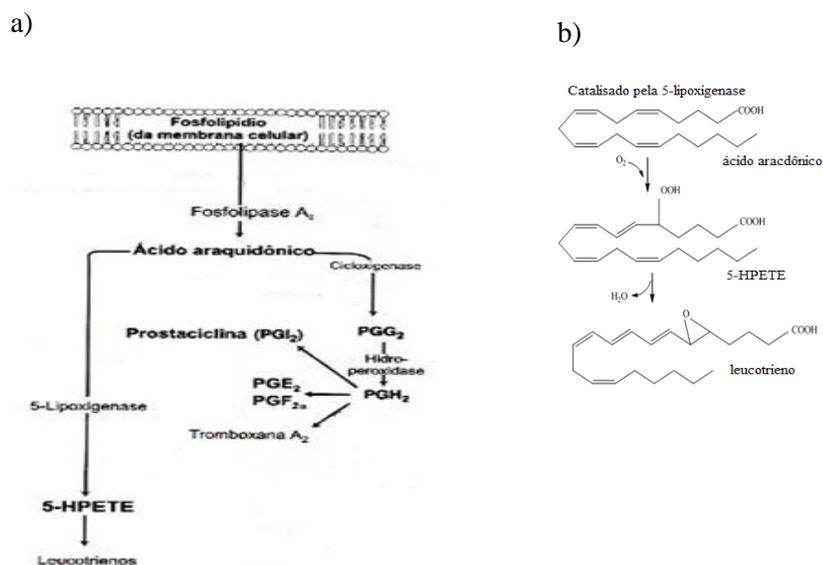


Figura 12 a) Cascata do ácido araquidônico e b) Estrutura química e conversão do ácido araquidônico em leucotrienos. 5-HPETE = ácido 5-hidroperoroieicosatetraenóico

Fonte: Mycek, Harvey e Champe (1998)

Os produtos da ação das enzimas COX e 5-LOX sobre o ácido araquidônico, são portanto as prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, também denominados eicosanóides. Tais compostos são agentes homeostáticos, envolvidos na manutenção da integridade dos sistemas inflamatório, cardiovascular e renal (SILVA et al., 2002). Dessa forma um desequilíbrio na homeostase de leucotrienos pode resultar em respostas inflamatórias com distúrbios respiratórios (asma e rinite alérgica), artrite e desordens inflamatórias no intestino.

Flavonóides e compostos fenólicos têm sido estudados por atuarem nessa via interferindo no metabolismo final do ácido araquidônico (HARBORNE et al., 2000). A propriedade apresentada pelos flavonóides em inibir tanto a via

da ciclooxigenase quanto da 5-lipoxigenase pode, portanto, contribuir para as propriedades antiinflamatórias dessa classe de metabólitos secundários (SILVA et al., 2002).

Estudo realizado por Faleiro (2014) demonstrou experimentalmente a atividade antiinflamatória de extratos hidroalcoólicos de espécies do gênero *Adama* por inibição concomitante da COX e da 5-LOX. A revelação da composição química por UHPLC-UV-MS (Ultra High Performance Liquid Chromatography acoplada a detector no ultravioleta e espectrometria de massas) mostrou a presença de flavonóides e ácidos clorogênicos o qual foram atribuídas essa atividade.

A necessidade de estudos nessa área torna-se de grande importância uma vez que medicamentos sintéticos que inibam somente a COX levam a um deslocamento da via do ácido araquidônico para a produção de leucotrienos e vice versa, aumentando os efeitos indesejáveis desses medicamentos (FALEIRO, 2014). Dessa forma a descoberta de espécies vegetais que sejam capazes de inibir as duas enzimas ao mesmo tempo tornam essas pesquisas de grande valia para o mercado farmacêutico atual.

2.5.2 Alfa-amilase

Investigações do potencial antidiabético de extratos vegetais são de suma importância como uma busca alternativa de novos fármacos, uma vez que os fármacos hipoglicemiantes disponíveis no mercado e a insulina apresentam efeitos colaterais que limitam seu uso (ALI; HOUGHTON; SOUMYANATH, 2006).

O amido constitui uma fonte de energia essencial para muitos seres vivos, incluindo o homem, além de ser uma substância de reserva para a maioria das plantas superiores (VIELLE; ZEIKUS, 2001). Trata-se de um polissacarídeo

composto inteiramente por unidades de D-glicose, que é considerado o principal carboidrato sintetizado pelas plantas e de grande importância na dieta humana (VILLALBA, 2012). Em sua constituição, contém dois tipos de polímeros da glicose (Figura 13), a amilose (que consiste de cadeias longas, não ramificadas de unidades de D-glicose unidas por ligações tipo $\alpha 1 \rightarrow 4$) e a amilopectina (que consiste de cadeias longas, altamente ramificadas de unidades de D-glicose unidas por ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ e as ramificações unidas por ligações tipo $\alpha 1 \rightarrow 6$) (NELSON; COX, 2002).

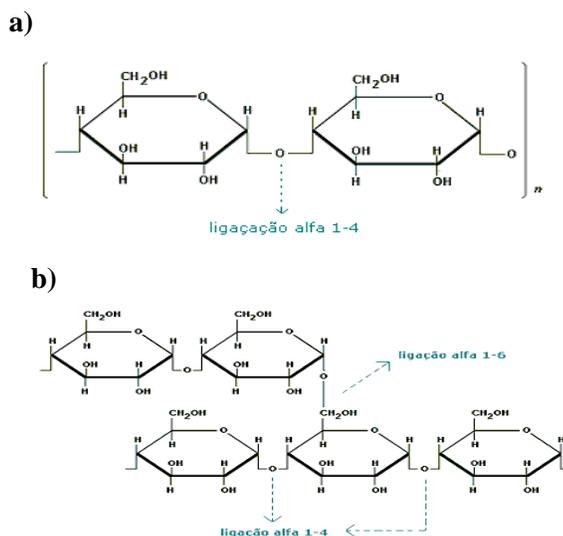


Figura 13 Componentes da estrutura do amido: a) estrutura química da amilose e b) amilopectina

Fonte: Villalba, 2012

As amilases são enzimas que catalisam a quebra das ligações $\alpha 1 \rightarrow 4$ glicosídicas produzindo mono ou oligossacarídeos e por isso são consideradas enzimas importantes em processos biológicos e patológicos (RIBEIRO; SERAVALLI, 2004). São produzidas por animais, vegetais e microrganismos.

O Diabetes é uma desordem do metabolismo de carboidratos que resulta em um aumento anormal de glicose no sangue (NELSON; COX, 2002). Os inibidores da alfa-amilase possuem essa aplicação terapêutica por retardarem a digestão e absorção geral de amido, aumentando a tolerância à glicose em pacientes diabéticos (LAYER et al., 1986; PAYAN, 2004).

Dietas suplementadas com inibidores de alfa-amilase, tem sido adotadas de forma crescente ultimamente (PEREIRA et al., 2010). O uso destes inibidores é feito com o objetivo de redução da hiperglicemia pós-prandial no controle da obesidade e do *Diabetes mellitus* tipo 2 (não insulino-dependente). Esta inibição leva a saciedade, tolerância aos carboidratos, perda de peso e prolonga o esvaziamento gástrico, além de serem ferramentas utilizadas para a descoberta de novos nutracêuticos e fitofármacos (UDANI et al., 2009).

A faseolamina é um potente inibidor da alfa-amilase purificado a partir do feijão branco, *Phaseolus vulgaris* (VILLALBA, 2012). Essa substância só inibe a alfa-amilase de animais não inibindo de plantas, bactérias e fungos e por isso é muito utilizada como controle positivo em testes biológicos de inibição dessa enzima (MARSHALL; LAUDA, 1975).

Além da faseolamina já se tem estudos de alguns inibidores da alfa-amilase purificados e caracterizados como os encontrados em sementes de trigo (*Triticum aestivum*) (FRANCO et al., 2000), no arroz (*Oryza sativa*) (LIN, 2006) e na cevada (*Hordeum vulgare*) (KADZIOLA, 1994).

Dessa forma estudos nessa área têm sido feitos em busca de inibidores de alfa-amilase que sejam clinicamente efetivos (LOIZZO et al., 2007).

REFERÊNCIAS

- AAZZA, S. et al. Antioxidant and antiacetylcholinesterase activities of some commercial essential oils and their major compounds. **Molecules**, Basel, v. 16, p. 7672-7690, Sept. 2011.
- ABDEL-MOGIB, M. et al Chemistry of the Genus *Plectranthus*. **Molecules**, Basel, v. 7, p. 271-301, 2002.
- ABRANTES, M. R. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre leveduras *Candida* não *albicans*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 94, n. 3, p. 227-233, 2013.
- AGATI, G. et al. Flavonoids as antioxidants in plants: Location and functional significance. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 196, p. 67-76, 2012.
- AGUIAR, J. J. S. et al. Antibacterial and modifying-antibiotic activities of the essential oils of *Ocimum gratissimum* L. and *Plectranthus amboinicus* L. **European Journal of Integrative Medicine**, Amsterdam, v. 7, p. 151–156, 2015.
- AGUIAR, J. J. S. et al. Avaliação da atividade antibacteriana do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* Lamiaceae. e seu potencial modulatório sobre aminoglicosídeos. **Revista Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia**, Rio de Janeiro, v. 2, p. 1-5, jun. 2014. Especial.
- ALBUQUERQUE, R. L. **Contribuição ao estudo químico de plantas medicinais do Brasil: *Plectranthus barbatus* Andr. e *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng.** 2000. 166 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2000.
- ALBUQUERQUE, R. L. et al. Chemical composition and antioxidant activity of *Plectranthus grandis* and *P. ornatus* essential oils from north-eastern Brazil, **Flavour and Fragrance Journal**, Malden, v. 22, p. 24-26, Sept. 2006.
- ALFONSO, C. et al. Identificación presuntiva de *Candida* spp. y de otras levaduras de importancia clínica: utilidad de Brilliance Candida Agar. **Revista Iberoamericana de Micología**, Barcelona, v. 27, n. 2, p. 90–93, 2010.

ALI, H.; HOUGHTON, P. J.; SOUMYANATH, A. Alpha-amylase inhibitory activity of some Malaysian plants used to treat diabetes; with particular reference to *Phyllanthus amarus*. **Journal Ethnopharmacology**, Oxford, v. 107, p. 449-455, 2006.

ALMEIDA, L. F. D. et al. Screening da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre *Candida Albicans*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, São Caetano do Sul, v. 14, n. 4, p. 51-56, 2011.

ALMEIDA, R. R. **Mecanismos de ação dos monoterpenos aromáticos: timol e carvacrol**. 2015. 22 p. Monografia (Bacharel em Química) – Universidade Federal de São João Del Rei, São João Del Rei, 2015.

ARAÚJO, A. J. G. et al. Ocorrência de onicomicose em pacientes atendidos em consultórios dermatológicos da cidade do Rio de Janeiro, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, p. 299-308, maio/jun. 2003.

ARTHINGTON-SKAGGS, B. A. et al. Comparison of visual and spectrophotometric Methods of Broth Microdilution MIC end point determination and evaluation of a sterol quantitation method for in vitro susceptibility testing of fluconazole and itraconazole against trailing and nontrailing candida isolates. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Washington, v. 46, p. 2477-2481, 2002.

ARUNG, E. T. et al. Inhibitory effect of artocarpone from *Artocarpus heterophyllus* on melanin biosynthesis. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 29, n. 9, p. 1966-1969, 2006.

AXELROD, V. et al. Lipoxigenase from soybeans. **Methods in Enzymology**, New York, v. 71, p. 441- 451, 1981.

BANDEIRA, J. M. et al. Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 157-164, 2011.

BARBOSA, F. F. et al. Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 157-164, 2011.

BARBOSA, L. N. **Propriedade Antimicrobiana de óleos essenciais de plantas condimentares com potencial de uso como conservante em carne e hambúrguer bovino e testes de aceitação.** 2010. 107 p. Dissertação (Mestrado em Biologia de Parasitas e Microrganismos) - Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

BARROS, J. G. A. et al. Efeito do inibidor de protease Kunitz sobre níveis de lipoxigenases em sementes de soja. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 32, n. 4, p. 1126-1132, 2008.

BAUTISTA-BAÑOS, S. et al. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. **Crop Protection**, Guildford, v. 22, p. 1087-1092, 2003.

BEHLING, E. B. et al. Flavonoid quercetin: general aspects and biological actions. **Alimentos e Nutrição**, Marília, v. 15, p. 285-292, 2004.

BHAKUNI, D. S. et al. Dhar screening of Indian plants for biological activity: part III. **Indian Journal of Experimental Biology**, New Delhi, v. 9, p. 91-102, 1970.

BHAT, S. V. et al. Structures and stereochemistry of new labdane diterpenoids from *Coleus forskohlii* Briq. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 19, p. 1669-1672, 1977.

BOCARDI, J. M. B. **Etnofarmacologia das plantas medicinais de céu azul e composição química do óleo essencial de *Plectranthus neochilus* Schltr.** 2008. 101 p. Dissertação (Mestrado em Química Aplicada) - Universidade Estadual de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2008.

CARNEIRO, F. B. et al. Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, p. 600-606, Ago./Set. 2010.

CHANG, H. Y. et al. Inhibition of Melanogenesis by Selina-4(14), 7(11)-dien-8-one Isolated from *Atractylodis rhizoma* Alba. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, Tokyo, v. 30, n. 4, p. 228-31, 2007.

CHANG, J. M. et al. Potential use of *Plectranthus amboinicus* in the treatment of rheumatoid arthritis, **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 7, n. 1, p. 115–120, 2010.

CHEN, Y. S. et al. Chemical constituents of *Plectranthus amboinicus* and the synthetic analogs possessing anti-inflammatory activity. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 22, p. 1766–1772, 2014.

CHIU, Y. J. et al. Analgesic and antiinflammatory activities of the aqueous extract from *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. Both in vitro and in vivo. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Taiwan, v. 1, p. 1-11, July 2012.

CHOI, C. W. et al. Antioxidant activity and free radical scavenging capacity between Korean medicinal plants and flavonoids by assay-guided comparison. **Plant Science**, Limerick, v. 163, p. 1161-1168, 2002.

CLAVIN, M. et al. Antiinflammatory activity of flavonoids from *Eupatorium arnottianum*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 112, p. 585-589, 2007.

CODD, L. E. Lamiaceae. In: LEISTNER, O. A. (Ed.). **Flora of southern Africa**. Pretoria: Botanical Research Institute, 1985. v. 28, p. 137–172.

COSTA, M. A. C. et al. Variação estacional do óleo essencial em arnica (*Lychnofora ericoides* Mart.). **Revista de Biologia Neotropical**, Goiânia, v. 5, n. 1, p. 53-65, 2008.

COVARRUBIAS, L. et al. Function of reactive oxygen species during animal development: Passive or active? **Developmental Biology**, San Diego, v. 320, p. 1-11, 2008.

CUI, K. et al. Role of oxidative stress in neurodegeneration: recent developments in assay methods for oxidative stress and nutraceutical antioxidants. **Progress in Neuro-Psychopharmacology & Biological Psychiatry**, Oxford, v. 28, p. 771-799, 2004.

DELLAR, J. E. et al. Antimicrobial abietane diterpenoids from *Plectranthus elegans*. **Phytochemistry**, New York, v. 41, n. 3, p. 735–738, 1996.

DEWIK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2nd ed. Hoboken: J. Wiley & Sons, 2002. 507 p.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, Bethesda, v. 82, p. 47-95, 2002.

DUARTE, M. C. T. et al. Anti-*Candida* activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 97, p. 305-311, 2005.

DUBEY, M. P. et al. Pharmacological studies on coleonol, a hypotensive diterpene from *Coleus forskohlii*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 3, p. 1-13, 1981.

DUBEY, V. S. et al. An overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Journal of Biosciences**, Bangalore, v. 28, p. 637-646, 2003.

FALEIRO, D. P. V. **Perfil metabólico, desreplicação de extratos de *Aldama la Lhave* (Asteraceae) e inibição das enzimas cicloxigenase e lipoxigenase**. 2014. 56 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

FLESchIN, S. et al. Free radicals mediated protein oxidation in biochemistry. **Romanian Biotechnological Letters**, Bucharest, v. 5, p. 479-495, 2000.

FRANCO, O. L. et al. Activity of wheat alpha-amylase inhibitors towards bruchid alpha-amylases and structural explanation of observed specificities. **European Journal Biochemistry**, Berlin, v. 267, p. 2166-2173, 2000.

FREITAS, M. S. et al. Produção e qualidade de óleos essenciais de *Mentha arvensis* em resposta à inoculação de fungos micorrízicos arbusculares. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 39, p. 887-894, 2004.

FRIDOVICH, I. Oxygen toxicity: a radical explanation. **The Journal of Experimental Biology**, Cambridge, v. 201, p. 1203-1209, 1998.

GASPAR, M. et al. Abietanes from *Plectranthus grandidentatus* and *P. hereroensis* against methicillin- and vancomycin-resistant bacteria. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 13, n. 4, p. 267-271, 2006.

GOBBO NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, out. 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Reactive species can be poisonous. In: _____. **Free radicals in biology and medicine**. 4th ed. New York: Oxford University, 2007. p. 440-487.

HALLIWELL, B. Reactive oxygen species in living systems: source, biochemistry, and role in human disease. **American Journal of Medicine**, New York, v. 91, p. 4-22, 1991.

HARBORNE, J. B. et al. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**, New York, v. 55, p. 481-504, 2000.

HARTMANN, T. Global harmonization of herbal health claims. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, Amsterdam, v. 80, p. 177-179, 1996.

HUSAIN, S. R. et al. Hydroxyl radical scavenging activity of flavonoids. **Phytochemistry**, New York, v. 26, p. 2489-2491, 1987.

IBRAHIM, B. et al. Antiinflammatory, analgesic and antioxidant activities of *Cyathula prostrata* (Linn.) Blume (Amaranthaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 141, p. 282-289, 2012.

KADZIOLA, A. et al. Crystal and molecular structure of barley α -amylase. **Journal of Molecular Biology**, London, v. 239, n. 1, p. 104-21, 1994.

KAPEWANGOLO, P. et al. Inhibition of HIV-1enzymes, antioxidant and anti-inflammatory activities of *Plectranthus barbatus*. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 149, p. 184-190, 2013.

KATOWAROO, M. I. et al. Screening of traditional antidiabetic medicinal plants of Mauritius for possible alpha-amylase inhibitory effects in vitro. **Phytotherapy Research**, London, v. 20, n. 3, p. 228-231, 2006.

KRISHNAIAH, D. et al. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 89, p. 217-233, 2011.

KUO, Y. S.; CHIEN, H. F. Research article *Plectranthus amboinicus* and *Centella asiatica* Cream for the treatment of diabetic foot ulcers. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Taiwan, v. 1, p. 1-9, 2012.

- LAYER, P. et al. Effect of a purified amylase inhibitor on carbohydrate tolerance in normal subjects and patients with diabetes mellitus. **Mayo Clinic Proceedings, Rochester**, v. 61, p. 447, 1986.
- LIMA, I. O. et al. Atividade antifúngica de óleos essenciais sobre espécies de *Candida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, p. 197-201, 2006.
- LINDNER, E. et al. Positive Inotropic and blood pressure lowering activity of a diterpene derivative: isolated from *Coleus forskohlii*: forskolin. **Arzneimittel-Forschung**, Stuttgart, v. 28, p. 284-89, 1978.
- LINDROTH, R. L., et al. Tropical plants. **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 15, p. 681-682, 1987.
- LIN, Y. H. Purification, crystallization and preliminary X-ray crystallographic analysis of rice bifunctional alpha-amylase/subtilisin inhibitor from *Oryza sativa*. **Acta Crystallographica Section F: Structural Biology and Crystallization Communications**, Chester, v. 62, n. 8, p. 743-5, 2006.
- LOIZZO, M. R. et al. Composition and α -amylase inhibitory effect of essential oils from *Cedrus libani*. **Fitoterapia**, Milano, v. 78, p. 323-326, 2007.
- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. 2. ed. Nova Odessa: Plantarum, 2008. 544 p.
- LUKHOB, C. W. et al. *Plectranthus*: a review of ethnobotanical uses. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 103, p. 1-24, 2006.
- MACK, A. J.; PETERMAN, T. K.; SIEDOW, J. N. Lipoxygenase isozymes in higher plants: biochemical properties and physiological role. **Current Topics in Biological and Medical Research**, Bethesda, v. 13, p. 127-154, 1987.
- MAIA, C. N. **Análise fitoquímica e atividade antibacteriana "in vitro" de extrato de plantas do Cerrado**. 2008. 90 p. Dissertação (Mestrado em Ciências biológicas) - Universidade Estadual de Montes Claros, Montes Claros, 2008.
- MARIUTTI, L. R. B.; BRAGAGNOLO, N. Revisão: antioxidantes naturais da família Lamiaceae - aplicação em produtos alimentícios. **Brazilian journal of food technology**, Campinas, v. 10, n. 2, p. 96-103, 2007.

MARSHALL, J. J.; LAUDA, C. M. Purification and properties of phaseolamin, an inhibitor of α amylase, from the kidney bean, *Phaseolus vulgaris*. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 250, p. 8030-8037, 1975.

MARTINS, E. R. et al. **Plantas medicinais**. Viçosa, MG: UFV, 2000. 220 p.

MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais**: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil. 2. ed. Fortaleza: UFC, 2000.

MAZID, M.; KHAN, T. A.; MOHAMMAD, F. Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. **Biology and Medicine**, Portland, v. 3, p. 232-249, 2011.

MELO, E. A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 36, n. 1, p. 1-11, jan./jun. 2002.

MIGUEL, M. et al. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-acetylcholinesterase activities of eleven extracts of moroccan plants. **Fresenius Environmental Bulletin**, Washington, v. 6, n. 24, p. 1-14, Feb. 2014.

MIRANDA, C. A. S. F. **Atividade antioxidante de óleos essenciais de folhas de diversas plantas**. 2010. 151 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica e Agrobioquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

MORSCHHÄUSER, J. The genetic basis of fluconazole resistance development in *Candida albicans*. **Biochemical and Biophysical Acta**, Oxford, v. 1587, p. 240-48, 2002.

MYCEK, M. J.; HARVEY, R. A.; CHAMPE, P. C. **Farmacologia ilustrada**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1998. 478 p.

NELSON, D. L.; COZ, M. **Lehninger**: princípios de bioquímica. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2002.

NIJVELDT, R. J. et al. Flavonóides: uma revisão de prováveis mecanismos de ação e aplicações potenciais. **American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 74, p. 418-425, 2001.

NORDBERG, J.; ARNÉR, E. S. J. Reactive oxygen species, antioxidants, and mammalian thioredoxin system. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 31, p. 1287-1312, 2001.

OLIVEIRA, P. M. et al. Diterpenoids from the Aerial Parts of *Plectranthus ornatus*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 68, p. 588-591, 2005.

OLIVEIRA, R. A. G. et al. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, p. 77-82, 2006.

OLIVEIRA, R. A. G. et al. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-*Candida* activity of some clinically used antifungals. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 186-190, Apr./June 2007.

PALANI, S. et al. Evaluation of nephroprotective, diuretic, and antioxidant activities of *Plectranthus amboinicus* on acetaminophen-induced nephrotoxic rats. **Toxicology Mechanisms and Methods**, Philadelphia, v. 20, n. 4, p. 213–221, 2010.

PASSARINHO-SOARES, H. et al. Authentication of medicinal plant botanical identity by amplified fragmented length polymorphism dominant DNA marker: inferences from the *Plectranthus* genus. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 72, p. 929-931, 2006.

PAYAN, F. Structural basis for the inhibition of mammalian and insect α -amylases by plant protein inhibitors. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1696, p. 171-180, 2004.

PEDROSO, R. S. et al. Sensibilidade de isolados de *Candida* spa a antifúngicos por disco-difusão em ágar e microdiluição em caldo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 304-311, jan./fev. 2014.

PEIXOTO-NEVES, D. et al. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundamental Clinical Pharmacology**, Paris, v. 24, p. 341-350, 2010.

PELZER, L. E. et al. Acute and chronic antiinflammatory effects of plants flavonoids. **II Farmaco**, Pavia, v. 53, p. 421-424, 1998.

PEREIRA, L. L. S. Precipitação do inibidor de α -amilase de feijão branco: avaliação dos métodos. **Alimentos e Nutrição**, Marília, v. 21, n. 1, p. 15-20, jan./mar. 2010.

PIMENTA, D. O. M. M. **Avaliação *in vitro* da atividade antifúngica e antibacteriana de extratos de *Pothomorphe umbellata* e *Struthantus* sp e análise da expressão protéica**. 2008. 87 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia de Plantas Medicinais e Microrganismos) – Universidade de Ribeirão Preto, Ribeirão Preto, 2008.

PINHEIRO, F. P. et al. Phytotoxicity and cytotoxicity of essential oil from leaves of *Plectranthus amboinicus*, carvacrol, and thymol in plant bioassays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 63, p. 8981–8990, 2015.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. **Química de alimentos**. São Paulo: E. Blücler, 2004. 184 p.

RICE, L. J. et al. *Plectranthus*: a plant for the future? **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 77, p. 947–959, 2011.

ROCHA, F. D. et al. Produtos naturais de algas marinhas e seu potencial antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, n. 4, p. 631-639, out./ dez. 2007.

RODRIGUES, F. F. G. et al. Study of the Interference between *Plectranthus* Species Essential Oils from Brazil and Aminoglycosides. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Taiwan, v. 1, p. 1-7, 2013.

SALES, P. M. **Estudo biomonitorado do epicarpo do fruto de *Pouteria torta* (Mart.) Raldk por ensaio de atividade de inibição da alfa-amilase**. 2012. 165 p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2012.

SAMUELSSON, B. et al. Leucotrienes and lipoxins: structures, biosynthesis, and biological effects. **Science**, London, v. 237, p. 1171-1176, 1987.

SANTOS, L. et al. Determinação da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da planta *Plectranthus ornatus* codd (Boldo chinês). **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 12, p. 119-129, 2014.

SCHEWE, T.; RAPOPORT, S. M.; KUHN, H. Enzymology and physiology of reticulocyte lipoxygenase: comparison with others lipoxygenases. *Advances Enzymology Related Areas. Molecular Biology*, New York, v. 58, p. 191- 272, 1986.

SCHULTZ, C. et al. Inhibition of gastric H⁺, K⁺-ATPase by pectrinone A, a diterpenoid isolated from *Plectranthus barbatus* Andrews. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 111, p. 1-7, 2007.

SCHWARTZ, R. et al. Superficial fungal infections. **Lancet**, London, v. 364, p. 1173-1182, 2004.

SILVA, C. S. E. **Plantas utilizadas como chás com propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes**. 2012. 43 p. Monografia (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Lusófona de Humanidades e Tecnologias, Lisboa, 2012.

SILVA, R. R. et al. Efeito de flavonoids no metabolismo do ácido araquidônico. **Medicina**, Ribeirão Preto, v. 35, p. 127-133, abr./jun. 2002.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre: UFRGS, 2007. 1104 p.

SOARES, J. J. **Avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* de extratos preparados a partir das folhas de *Syzygium cumini* (L.) Skeels**. 2013. 81 p. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) - Universidade Federal do Pampa, Uruguaiana, 2013.

STEINHILBER, D. 5-Lipoxygenase: a target for anti-inflammatory drugs revisited. **Current Medicinal Chemistry**, Scriphol, v. 6, p. 71-85, 1999.

TAKAHASHI, A.; OHNISHI, T. The significance of the study about the biological effects of solar ultraviolet radiation using the exposed facility on the internal space station. **Biological Sciences in Space**, Sagamihara, v. 18, p. 255-260, 2004.

TAMARISIO, V. et al. *In vitro* antioxidant activity of *Coleus barbatus* (Andr.) Benth (false boldo) and *Peumus boldo*(Molina) (Boldo do Chile): a comparative study. **Revista de Farmácia e Bioquímica da Universidade de São Paulo**, São Paulo, v. 34, p. 15-7, 1998.

TORRAS-CLAVERIA, L. et al. Analysis of phenolic compounds by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry in senescent and water-stressed tobacco. **Plant Science**, Limerick, v. 182, p. 71-78, 2012.

UDANI, J. K. et al. Lowering the glycemic index of white bread using a white bean extract. **Nutrition Journal**, London, v. 8, n. 52, p. 1-5, 2009.

UMA, M. et al. Determination of bioactive components of *Plectranthus amboinicus* Lour by GC-MS analysis. **Science Journal**, New York, v. 4, n. 8, p. 66-69, 2011.

VELIOGLU, Y. S. Antioxidant activity and total phenolic in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 46, p. 4113-4117, 1998.

VERPOORTE, R.; MEMELINK, J. Engineering secondary metabolite production in plants. **Current Opinion in Biotechnology**, London, v. 13, p. 181-187, 2002

VIEILLE, C.; ZEIKUS, G. J. Hyperthermophilic enzymes: Sources, uses and molecular mechanisms for thermostability. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 65, p. 1-43, 2001.

VILLALBA, C. M. A. **Estudos estruturais de proteínas: inibidor de alfa-amilase de *Secale cereale*, GTPase YchF e enolase de *Trypanosoma cruzi***. 2012. 121 p. Dissertação (Mestrado em Química aplicada) – Universidade Federal de Ponta Grossa, Ponta Grossa, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health topics: **Infectious diseases**. 2008. Disponível em: <http://www.who.int/topics/infectious_diseases/en/>. Acesso em: 19 mar. 2016.

WILHELMUS, K. R. Climatology of dematiaceous fungal keratitis. **American Journal of Ophthalmology**, New York, v. 140, p. 156-1157, 2005.

WILLIAMS, R. J. et al. Flavonoids: antioxidant or signalling molecules? **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 36, p. 838-849, 2004.

ZANGARA, A. The psychopharmacology of huperzine A: an alkaloid with cognitive enhancing and neuroprotective properties of interest in the treatment of Alzheimer's disease. **Pharmacology, Biochemistry and Behavior**, Phoenix, v. 75, p. 675-86, 2003.

ZELNIK, R. et al. Barbatusin and cyclobutatusin, two novel diterpenoids from *Coleus barbatus* Benth. **Tetrahedron Letters**, Oxford, v. 33, p. 1457-1467, 1977.

SEGUNDA PARTE – ARTIGOS**ARTIGO 1**

**ANTIOXIDANT POTENTIAL AND ALPHA-AMYLASE
INHIBITION OF THREE MEDICINAL SPECIES OF THE
Plectranthus GENUS**

Submetido para a revista Food Chemistry em 06/04/2016:

Simony Carvalho Mendonça^a, Smail Aazza^b, Krisnanda Kelly C. de Souza^a, Diogo Mendes da Silva^a, José Eduardo Brasil P. Pinto^a, Suzan Kelly V. Bertolucci^{a*1}

^a Federal University of Lavras (UFLA), Department of Agriculture, Mailbox: 3037, 37.200-000, Lavras - MG, Brazil.

^b University of Algarve, IBB- Center for Plant Biotechnology, Faculty of Science and Technology, Gambelas fields, 8005-139 Faro - Portugal.

* Corresponding author at: Federal University of Lavras (UFLA), Department of Agriculture, Mailbox: 3037, 37.200-000, Lavras - MG, Brazil. Tel.: +55 35 38291330; fax: +55 35 38291301. *E-mail address*: suzan@dag.ufla.br (Suzan Kelly V. Bertolucci).

RESUMO

O gênero *Plectranthus*, pertencente a família Lamiaceae, tem sido muito investigado quanto as suas propriedades terapêuticas e nutraceuticas. Foram avaliados o potencial antioxidante e a inibição de alfa-amilase das espécies *Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus ornatus* e *Plectranthus barbatus*. Os extratos foram preparados por infusão, refluxo e turboextração utilizando as folhas das três espécies. Os resultados mostraram que os extratos obtidos por refluxo e turboextração de *P. barbatus* se destacou no teor de constituintes fenólicos e atividade antioxidante. Dentre os métodos de eliminação de radicais livres estudados, o DPPH e ABTS foram os que tiveram resultados mais expressivos para as três espécies e houve ainda correlação positiva entre os constituintes fenólicos e a atividade antioxidante. Não foi observada nenhuma atividade de inibição de alfa-amilase pelos extratos analisados.

Palavras-chave: Atividade antioxidante. Alfa-amilase. *Plectranthus amboinicus*. *Plectranthus ornatus*. *Plectranthus barbatus*.

ABSTRACT

The *Plectranthus* genus belongs to the family Lamiaceae, which has been widely investigated for its therapeutic and nutraceutical properties. We evaluated the antioxidant potential and the inhibition of alpha-amylase of the species *Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus ornatus* and *Plectranthus barbatus*. The extracts were prepared for infusion, refluxing, and turbo extraction using leaves of the three species. The results showed that the extracts obtained by refluxing and turbo extraction of *P. barbatus* stood out in the content of phenolic constituents and antioxidant activity. The methods of scavenging free radicals (DPPH and ABTS) were those that had best significant results for the three species and there was a positive correlation between phenolic constituents and antioxidant activity too. There was no activity of inhibition by alpha-amylase on the extracts analyzed.

Keywords: antioxidant activity; alpha-amylase; *Plectranthus amboinicus*, *Plectranthus ornatus*, *Plectranthus barbatus*.

1. INTRODUCTION

It is known that the development of civilization was followed by the history of the medicinal and aromatic plants, as well as condiments. Compounds derived from natural products were the basis for the development of many drugs currently available in the market (Miguel, Bouchmaaa, Aazza, Gaamoussi & Lyoussi, 2014). Among these substances, the condiments of the family Lamiaceae have been widely studied due the antioxidant activity of its phenolic compounds (Mariutti & Bragagnolo, 2007).

Recently, there was an increased concern regarding the synthetic antioxidants because of their possible toxicity against the animal DNA. This fact explains the interest in the study of plant extracts as a source of natural antioxidants with the advantage of being cheaper and effective (Ozyurt, Demirata & Apak, 2007). Antioxidants are substances that retard or prevent the onset or spread of chain oxidation reactions. They may act by various mechanisms, such as elimination of free radicals, chelation of transition metals such as iron, inhibiting lipid peroxidation, as reducing agents, and as activators of enzymatic systems of antioxidant protection, such superoxide dismutase and glutathione peroxidase (Muraina, Suleiman & Eloff, 2009). Thus, the natural antioxidants protect the biological systems against free radicals and retard the progress of several chronic diseases (Krishnaiah, Sarbatly & Nithyanandam 2011).

The alpha-amylase enzyme has been studied by its action on carbohydrate metabolism and it is responsible for the breakdown of oligosaccharides to monosaccharides, which are further absorbed by the body. Changes in carbohydrate metabolism may be associated with some diseases such as type 2 diabetes mellitus and obesity. Nowadays, these diseases represent a problem of individual and population health due to its overall increase and

implications (Rengasamy, Aderogba, Amoo, Stirk & Staden, 2013). Therefore, the alpha-amylase enzyme inhibitors constitute one of the therapeutic options to control these diseases.

The *Plectranthus* genus has been widely investigated. This genus belongs to the family Lamiaceae and involves about 300 species naturally occurring in Africa, Asia and Australia (Rice, Brits, Potgieter & Van Staden, 2011). These species have biosynthetic capacity to produce a variety of secondary metabolites (Albuquerque, Silva, Machado, Matos, Morais & Neto, 2006), which makes the *Plectranthus* an important genus for the research and development of new drugs (Rice et al. 2011). Although belonging to the same genus, the species *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng, *Plectranthus barbatus* Andr., and *Plectranthus ornatus* Codd., exhibit different chemical and pharmacological properties (Albuquerque et al. 2006).

P. amboinicus is an East Asian native plant most commonly found throughout tropical America (Chang, Cheng, Hung, Chung & Wu, 2007). It is popularly called as malvarisco, malvariço, thick mint, great mint or mallow. *P. barbatus*, popularly known as false boldo, national boldo, Brazilian boldo or holy mallow; it is probably originated in Africa and it is widely cultivated and used in Brazil as a medicinal plant due its analgesic and anti-dyspeptic properties (Chang et al. 2007). *P. ornatus* is a native plant from East Africa, but semi-naturalized in other regions. In Brazil it is known by the common names of boldo rasteiro, boldo miúdo, boldinho or chinese boldo (Ascensão, Mota & Castro, 1999).

Most studies evaluated the specie *P. barbatus* because of the pharmacological importance of the diterpenes present in its leaves (Albuquerque et al. 2006). Comparatively few studies exist on the other two species of the genus evaluated in this study. Therefore, the our goal was evaluate the aqueous and hydroalcoholic extracts of these three species of the genus *Plectranthus* (*P.*

amboinicus, *P. barbatus* and *P. ornatus*) by the quantification of its phenolic constituents level, comparison of the antioxidant potential, and its ability to inhibit alpha-amylase *in vitro*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1. Chemicals and equipments

All chemicals were of analytical grade. Folin-Ciocalteu solution; sodium carbonate (Na_2CO_3); aluminum chloride (AlCl_3); gallic acid; thiobarbituric acid (TBA); 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH); 2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) (ABTS); potassium ferricyanide [$\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$]; deoxyribose; 2,4-dinitrophenol (DNP); potassium hydroxide (KOH); trichloroacetic acid (TCA); ferrozine [3-(2-pyridyl)-5,5-bis(4-phenyl sulfonic acid)-1,2,4-triazine]; ethylene diamine tetra acetic acid (EDTA), potassium persulfate ($\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$); iron(II) chloride tetrahydrate ($\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$); iron II sulphate heptahydrate ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), Spain); hydrogen peroxide (H_2O_2); sodium dodecyl sulfate (SDS);

Alpha-amylase; L (+) - ascorbic acid 99,7-100,5% purity; naringenin purity $\geq 95\%$; gallic acid anhydrous purity $\geq 98\%$ and quercetin purity $\geq 95\%$ were obtained from Sigma. Phaseolamin, powdered drug containing 1.15% phaseolamin obtained from Gemini.

Microplate reader TECAN Infinity® M200 PRO using the *software* I-control® version 3.37.; Moisture analyzer balance OHAUS model MB45. Extractor Turratec model MA 102.

2.2. Plant material

Fresh leaves of three species of the genus *Plectranthus* were used (*P. amboinicus*, *P. barbatus* and *P. ornatus*). The species were grown in the garden of medicinal plants of the Federal University of Lavras - UFLA (21°14'07 "S, 44 ° 58'22" O; 879 m asl). They were fertilized with cattle manure in 3.0 kg.m² dose and periodically irrigated four times a week. The leaves were collected in March 2015. A sample of each plant material was identified and incorporated into the PAMG herbarium collection of the Agricultural Research Company of Minas Gerais (EPAMIG), receiving the deposit numbers PAMG 57803 (PB), PAMG 57804 (PA) e PAMG 57805 (PO).

2.3. Moisture content determination

The moisture content of the fresh leaves of the three species was determined by infrared radiation, using a MB45 Ohaus® balance, drying set to 105 ° C for 5 minutes. The results were expressed in percentage moisture loss in mass through the mean of three determinations using 3 g of leaves each determination ± standard deviation.

2.4. Extraction preparation

The extracts (5% w/v) were prepared by refluxing, infusion, and turbo extraction from fresh leaves of all species. Water was the solvent for the extracts obtained by refluxing and infusion, while 70% ethanol solution was utilized for the turbo extraction. For the preparation of the extracts by refluxing, the plant material (leaves) was individually distilled for 30 minutes to boil in a closed system to reduce possible losses by evaporation. The infusions were prepared by

pouring distilled water at 80°C over the plant material (3 to 5 mm). The infusion remained under static maceration for 10 min in a capped container. For the turbo extraction, each species was extracted by 3 cycles of 10 minutes in an ice bath with an interval of 1 minute between them. After the extractive procedures, the aqueous and hydroalcoholic extracts were filtered, and kept in a freezer at -20°C until analysis. The extractives yields were calculated by rotoevaporation with 25 mL of each extract to dryness.

2.5. Determination of total phenolics

The quantification of the phenolic compounds was determined by the Slinkard & Singleton (1977) method. 50 µL of the extracts were mixed with 100 µL of Folin-Ciocalteu reagent (10% w/v) and 125 µL Na₂CO₃ solution (7% w/v). The absorbance was measured at 760 nm after an incubation period of 2 hours at room temperature. The concentration of the calibration curve ($y = 4,7449x + 0.1612$, $R^2 = 0.9969$) ranged from 1.27 to 0.0099 mg/mL in an ethanol solution of gallic acid. The total phenolic content of the extracts were expressed in milligram of gallic acid equivalents per gram of fresh leaf (mg GAE/g).

2.6. Quantification of flavonoids (flavones and total flavonoids)

The quantification of flavonoids was determined by the method of Ahn et al. (2007). 100 µL of the extracts were mixed with 100 µL of AlCl₃ solution (10% w/v). The absorbance was measured at 420 nm after an incubation period of 40 minutes at room temperature. The concentration of the calibration curve ($y = 7,0356x + 0.0695$, $R^2 = 0.9998$) ranged from 1.71 to 0.013 mg/mL in an

ethanol solution containing quercetin. The flavonoid content of extract was expressed in milligram of quercetin equivalents per g of fresh leaf (QE mg/g).

2.7. Quantification of total dihydroflavonoids

Quantification of total dihydroflavonoids was determined by the method of Popova, Bankova and Butovska (2004). 200 μ L of the extracts were mixed with 400 μ L of a methanol solution of DNP (1% w/v) and heated at 50°C for 50 minutes. After cooling to room temperature, it was added 1.4 mL of KOH (10% v/v) in methanol to the reaction solution (sample + DNP). Then, 100 μ L of the reagent solution (sample+DNP+KOH) was diluted in 900 μ L of methanol and centrifuged at 3,000 rpm for 10 minutes. A volume of 250 μ L of each sample was transferred to the wells of the microplate. The absorbance was measured at 486 nm. The calibration curve ($y = 0,1795x + 0.1254$, $R^2 = 0.9941$) comprised concentration range from 2.0 to 0.015 mg/mL in a methanolic solution of naringenin. The dihydroflavonoides levels in the extracts were expressed in milligram of naringenin equivalents per g of fresh leaf (NE mg/g).

2.8. Total antioxidant capacity (TAC)

The total antioxidant capacity (TAC) was measured based on the method of reduction of ammonium molybdate described by Prieto, Pineda & Aguilar (1999). 200 μ L of the extracts were mixed with 1500 μ L of the reagent solution (0.6 M sulfuric acid, 28 mM sodium phosphate monobasic, 4 mM ammonium molybdate). After 90 minutes incubation at 95°C, the samples were cooled to room temperature and the absorbance measured at 695 nm. The aqueous calibration curve of ascorbic acid comprised the range of 0.65 to 0,010 mg/mL. The straight-line equation ($y = 3,4675x + 0.1722$, $R^2 = 0.9951$), where y is the

absorbance and X is the concentration, was used to determine the activity. Results were expressed in milligram of ascorbic acid equivalent per g of fresh leaf (AAE mg/g).

2.9. Free radical scavenging activity (DPPH)

The scavenging activity of DPPH (1,1-diphenyl-1,2-picrylhydrazyl) was determined by the method proposed by Brand-Williams, Cuvelier & Berset (1995). It was added 250 uL of an ethanolic solution of DPPH in 50 uL of the sample. The mixture was incubated for 60 minutes in the dark at room temperature. After this time, the absorbance was measured at 517 nm. BHT was used as positive control and the activity of capturing free radicals by DPPH was expressed by percentage of inhibition, calculated using the formula: (%) = $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100$, where A0 is the negative control absorbance, and A1 is the absorbance of the samples. Free radical scavenging activity was expressed as IC₅₀.

2.10. Radical scavenging activity (ABTS)

ABTS radical cation decolorization assay was carried out using the method described by Re, Pellegrini, Proteggente, Pannala, Yang & Rice-Evans (1999), and Ling et al. (2009), with minor modifications. Briefly, the ABTS radical was generated by reacting an aqueous solution of K₂S₂O₈ (2,45 mM) in the dark for 16h, followed by setting the absorbance at 734 nm for 0.7 at room temperature. 30 uL samples of the extracts were added to 270 uL ABTS and the absorbance was read at 734 nm after 6 minutes. BHT was used as positive control and the percentage removal of ABTS was calculated from the formula

described above: (%) = $(A_0 - A_1) / A_0 * 100$. Free radical scavenging activity was expressed as IC_{50} .

2.11. Determination of metal chelating ability

The chelating activity of Fe^{2+} ions was performed according to Miguel (2010). In aliquots of 100 μ L of sample, it was added 30 μ L of $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (2 mM). After incubation for 10 minutes, it was added 40 μ L of 5 mM ferrozine [3-(2-pyridyl) -5,5-bis (4-phenyl sulfonic acid) -1,2,4-triazine]. The absorbance of the solutions was measured at 562 nm. The percentage inhibition of the formation of ferrozine- Fe^{2+} complex was determined using the formula: (%) = $(A_0 - A_1) / A_0 * 100$, previously described. Results were expressed as IC_{50} and EDTA was used as positive control.

2.12. Determination of reducing power

The method described by Oyaizu (1986) was utilized to determine the reducing power of the extracts of the leaves of all species. In ependorfs, a volume of 25 μ L of the extracts was mixed with 100 mL of sodium phosphate buffer (pH 6,6) and 100 mL of a 1% potassium ferricyanide aqueous solution ($K_3Fe(CN)_6$), and incubated in a water bath at 50°C for 20 minutes. Then, 100 μ L of a 10% trichloroacetic acid (TCA) aqueous solution was added to the mixture, along with 300 μ L of distilled water, and 60 μ L of 0.1% ferric chloride aqueous solution. 250 μ L were transferred into the microplate and the intensity of the blue-green color was measured at 700 nm. Ascorbic acid was used as positive control. The IC_{50} (mg/mL) represents the concentration at which the absorbance of the extract was 0.5 for reducing power. It was calculated from the graph absorbance at 700 nm against the concentration of the extract.

2.13. Inhibition of lipid peroxidation

Inhibition of lipid peroxidation (LP) was measured according to the method described by Aazza, Lyoussi, Megías, Giraldo, Vioque & Miguel (2014). Liposomes were obtained from 0.5g of soy lecetina in 100 mL of chloroform until complete dryness by evaporation. Then, it was resuspended in 100 mL 0.01M PBS buffer pH 7.0 and kept at 4°C until assay. For testing, 400 uL of the liposome suspension together with 500 uL of the sample, 100 uL of PBS buffer, 100 µL 0.08% ferric chloride and 50 uL of 0.018% ascorbic acid were incubated at 37°C for 1 hour. After this period, it was added 1 mL of TCA and 1.5mL of TBA dissolved in a 0.8M solution of SDS to 1.1% and the mixture was incubated at 95°C for 15 minutes. Then, after cooled, 300 uL were transferred to a microplate and read at 532 nm. BHT was used as a positive control and the percentage of inhibition was calculated by the equation previously described: (%) = $(A_0 - A_1) / A_0 \times 100$. Inhibition of the activity of LP was expressed as IC₅₀.

2.14. Test of inhibition of the alpha-amylase

The inhibition assay of α -amylase was performed according to Xiao, Storms & Tsang (2006) based on the starch-iodine test. In 50 uL of sample, it was added 50 uL of 0.01% enzyme aqueous solution, and 50 uL of a sodium phosphate buffer pH 6.9. After waiting 10 minutes, it was added 50 uL of a 0.2% starch aqueous solution. Then, after another 20 minutes, it was added 20 uL of 0.1M HCl solution and 100 mL of an aqueous of iodine. The iodine solution was made by adding 5 mM I₂ and 10 mM KI in 100 ml water. Measurements were carried out at 620 nm. The phaseolamine was used as positive control and the inhibition percentage of the enzyme was calculated by

the equation previously described: $(\%) = (A_0 - A_1) / A_0 \times 100$. Inhibition activity was expressed as IC_{50} .

2.15. Statistical analysis

The experimental design was randomized according to a 3x3 factorial scheme, with three species and three extraction methods. All assays were performed in triplicate and statistical analysis of data utilized the Sisvar software version 5.3 (Ferreira, 2010). The average between the treatments were subjected to analysis of variance by F test, and compared by Tukey test with 5% probability.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1. Moisture content, extraction yield, and quantification of phenolic of the species

The moisture percentage of the fresh leaves of *P. amboinicus*, *P. ornatus* e *P. barbatus* were 43.09 ± 2.90 ; 53.31 ± 2.28 and 57.96 ± 1.54 , respectively. In this order, the increasing humidity values of the three species may have influenced the extractive yield and the levels of phenolic compounds obtained by turbo extraction because we observed the same behavior for these variables (Fig. 1 and Table 1).

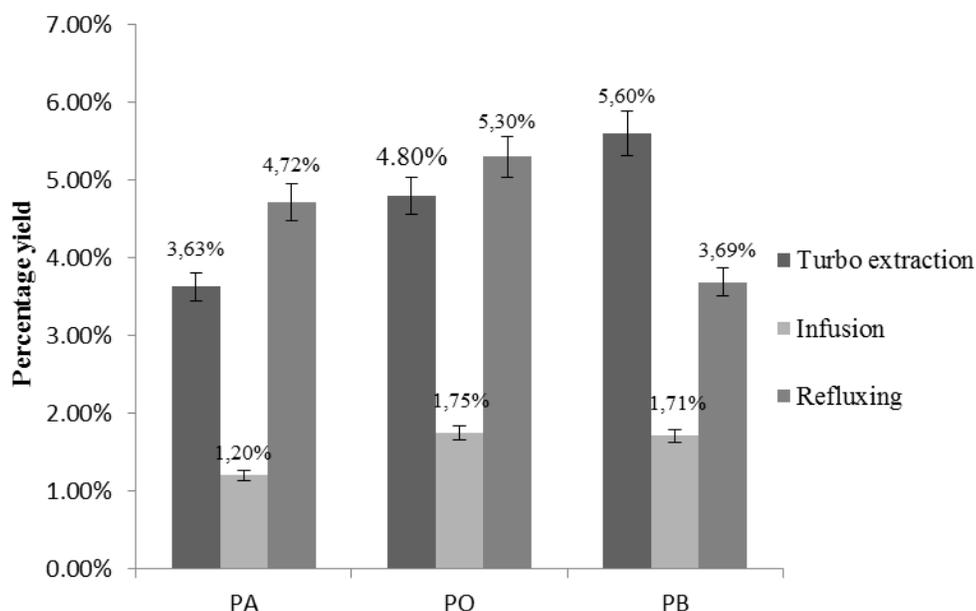


Figure 1 Percentage yield of extracts of the *Plectranthus* species (PA: *Plectranthus amboinicus*, PO: *Plectranthus ornatus*, PB: *Plectranthus barbatus*)

The extractive yields of the three species were dependent on the plant and the extraction method. For the three *Plectranthus* species infusion proved to be the least effective method of extraction of phenolic compounds. For *P. amboinicus* and *P. ornatus*, the highest extractive yields and total phenolic content were observed in the extraction under reflux, followed by turbo extraction and infusion (Figure 1 and Table 1). The best method for *P. barbatus* species was turbo extraction followed by decoction and infusion. Falé et al. (2009) evaluated the extractive yields of decoctions and infusions of five species of *Plectranthus*, and noted variations between species and the method of extraction. The results of Falé et al. (2009) for *P. barbatus* corroborate the results of this study, in which the contact of the plant material with a high temperature for a certain time is an important parameter for achieving greater

extractive yields in this species. The turbo extracts of *P. barbatus* also had the highest levels of phenolic compounds including phenols, flavonoids and total dihydroflavonoids (Table 1). As Oh, Heonjoo, Ah Reum, Sung-Jin & Jaejoon (2013) pointed out, in general, the ethanol extracts contain more phenolic compounds than the aqueous extract. Ethanol and methanol are cited as the best extractors for phenolic compounds in comparison to less polar solvents and water.

Table 1 Levels of phenolic constituents of different extracts of *P. amboinicus* (PA), *P. ornatus* (PO) and *P. barbatus*.

Plant species	Total phenolics (mg GAE/g)		
	Refluxing	Infusion	Turbo extraction
PA	9,31±0,01 bA	1,46±0,01 bC	7,56±0,00 cB
PO	9,20±0,02 bA	1,57±0,03 bC	8,23±0,01 Bb
PB	10,80±0,01 aB	3,37±0,02 aC	11,67±0,01Aa
Flavonoids (mg QE/g)			
PA	0,60±0,01 cB	0,08±0,01 cC	0,89±0,02 Ca
PO	0,90±0,02 bB	1,57±0,03 bC	8,23±0,01 Bb
PB	2,35±0,01 aB	0,32±0,01 aC	2,50±0,01 Aa
Dihydroflavonoids (mg NE/g)			
PA	3,20±0,02 bA	1,06±0,02 aC	3,02±0,01 Cb
PO	2,69±0,00 cB	1,10±0,01 aC	6,61±0,02 bA
PB	3,58±0,02 aB	0,84±0,01 bC	7,82±0,03 aA

Means followed by the same upper case letter in the line and the same lower case letter in the column do not differ significantly for the same phenolic compound class, according to Tukey's test ($p < 0.05$). **Total phenolics:** expressed in mg of gallic acid equivalents/g of fresh leaf (mg GAE / g). **Flavonoids:** expressed in mg of quercetin equivalents/g of fresh leaf (QE mg/g). **Dihydroflavonoids:** expressed in mg of naringenin equivalents/g of fresh leaf (EN mg / g). The data represent the mean \pm standard deviation ($n = 3$).

The three species of *Plectranthus* had higher levels of dihydroflavonoids than flavonoids. The highest flavonoid contents of all species were obtained with turbo extraction. The dihydroflavonoid content varied between species and extractive methods. *P. amboinicus* showed higher dihydroflavonoid content under reflux, whereas *P. ornatus* and *P. barbatus* obtained better results with turbo extraction. No study on optimizing the extraction method of phenolic compounds for the species *Plectranthus* was found in the literature for comparative purposes.

3.2. Total antioxidant capacity test (TAC), ABTS and DPPH

The aqueous extracts obtained by refluxing of *P. amboinicus* and *P. ornatus*, and the hydroalcoholic extract of *P. barbatus* showed the highest antioxidant activity in these tests (Table 2).

Table 2 Antioxidant activities of different extracts of *Plectranthus amboinicus* (PA), *P. ornatus* (PO) and *P. barbatus* (PB)

Plant species	TAC (mg AAE /g)		
	Refluxing	Infusion	Turbo extraction
PA	1,51±0,02 cA	0,19±0,01 aC	1,16±0,01 cB
PO	2,11±0,00 bA	0,03±0,01 bC	1,50±0,01 bB
PB	2,70±0,00 aB	0,21±0,02 aC	2,96±0,01 aA
DPPH (IC ₅₀ =mg/mL)			
PA	0,51±0,00 bA	4,47±0,01 bC	0,75±0,00 cB
PO	0,50±0,00 bA	4,69±0,01 cC	0,67±0,01 bB
PB	0,28±0,00 aB	2,07±0,00 aC	0,12±0,01 aA
ABTS (IC ₅₀ =mg/mL)			
PA	0,75±0,00 aA	4,50±0,01 cC	0,98±0,01 bB
PO	0,72±0,02 cA	1,96±0,00 aC	0,97±0,00 bB
PB	0,45±0,01 bA	3,74±0,02bB	0,33±0,01 aA

Means followed by the same upper case letter in line and the same lower case letter in the column do not differ significantly in each antioxidant test, according to Tukey's test ($p < 0.05$). **TAC**: total antioxidant capacity in mg of ascorbic acid equivalents/g of fresh leaf (AAE mg/g); **DPPH**: capture of free radicals DPPH; **ABTS**: capture of free radicals ABTS; **BHT**: IC₅₀ = 0.18 ± 0.01 mg/ml. The data represent mean ± standard deviation (n=3).

P. barbatus extract obtained by turbo extraction showed the highest antioxidant potential. TAC was about 50% higher than *P. ornatus* by turbo extraction and, in absolute terms, about 9% higher than the reflux *P. barbatus*. Comparing the turbo extracts of *P. barbatus* and *P. ornatus*, the first was about 5.6 and 3.0 times more active in the capture of free radicals DPPH and ABTS, respectively. The antioxidant activity of the extracts, with regard to their ability to scavenge free radicals DPPH was high and similar to BHT (IC₅₀ = 0.18 ± 0.01 mg/ml) used as a standard; the turbo extracts of *P. barbatus* was higher than this standard. Falé et al. (2009) demonstrated that decoctions of *P. barbatus* also exhibited high antioxidant activity in the DPPH test (IC₅₀ = 45.8 ± 0.51 dry

extract ug/ml). In this same study, the authors also report that the species of the same genus, *P. ecklonii*, *P. fruticosus* and *P. lanuginosus* showed comparable antioxidant activity to *P. barbatus* measured by DPPH method. In the three species, there was a positive correlation between the content of phenolic constituents and antioxidant activity (Table 3). For the CAT test, it was observed that the Pearson correlation coefficient was positive, indicating a positive correlation. Concerning the DPPH test, ABTS and chelating power, they were negative for the same coefficient, however it concluded that the correlation is positive, since the results are expressed in IC₅₀, and the lower this value the greater will be the antioxidant power of the plant. Therefore, it concluded that there was a positive correlation between total phenolic content, flavonoid and dihydroflavonoid with antioxidant activity measured by CAT tests, DPPH, ABTS and chelating power. Several authors have also attributed the increased antioxidant activity of the natural products to the presence of high levels of phenolics (Sousa et al, 2007; Aazza, Lyoussi, Antunes & Miguel 2013; Freitas, Azevedo, Souza, Rocha & Santos, 2014; Miguel et al. 2014; Amarante, Dias, Santos, Neves, Batista & Lins, 2015).

Phytochemical screening studies of extracts of the species *Plectranthus* have shown the presence of different constituents as flavonoids, acids and esters phenolics, phenylpropanoid, and diterpenes, which may contribute for the antioxidant activity (Oliveira et al. 2005;. Falé et al. 2009). Among the phenolic constituents rosmarinic acid, an ester of caffeic acid, and 3,4-dihydroxyphenyl lactic, was one of the main constituents found in aqueous extracts of species of *P. barbatus* containing a IC₅₀ = 0.44 mg/mL according to the DPPH test (Falé et al. 2009). Comparatively, the extracts obtained by refluxing had IC₅₀ of 0.51 mg/mL, 0.50 mg/mL and 0.28 mg/mL for *P. amboinicus*, *P. ornatus*, and *P. barbatus*, respectively. Besides these, other components of non-phenolic nature,

such diterpenes might also explain in part the antioxidant activity of *Plectranthus* spp. (Kabouche, Kabouche, Ozturk, Holak & Topcu, 2007).

Table 3 Estimates of the Pearson correlation coefficients between the quantified compounds and total antioxidant capacity (TAC), scavenging activity of DPPH and ABTS radicals and chelating power

Compounds	TAC (mg AAE/g)	DPPH (IC ₅₀ =mg/mL)	ABTS (IC ₅₀ =mg/mL)	Chelating power (IC ₅₀ =mg/mL)
Total phenolics	0,958	- 0,942	- 0,871	- 0,976
Flavonoids	0,888	- 0,720	- 0,704	- 0,773
Dihydroflavonoids	0,754	- 0,667	- 0,672	- 0,771

More or less 0.6 indicates a strong correlation

3.3. Chelating ability, liposomes and reducing power of the species

The mean values obtained in the assay of the chelating power and liposomes of the extracts of *P. amboinicus*, *P. ornatus*, and *P. barbatus* are shown in Table 4 and Figure 2 demonstrates the reducing power compared to the standard ascorbic acid.

Table 4 Chelating and inhibition of lipid peroxidation of different extracts of *P. amboinicus* (PA), *P. ornatus* (PO) and *P. barbatus* (P.B)

Plant species	CHELATING (IC ₅₀ =mg/mL)		
	Refluxing	Infusion	Turbo extraction
PA	5,19±0,01 bA	15,78±0,02 bC	8,56±0,02 bB
PO	3,81±0,02 aA	15,61±0,02 bC	5,18±0,01 aB
PB	5,08±0,02 bB	14,16±0,03 aC	3,04±0,01 aA
LIPOSSOMES (IC ₅₀ = mg/mL)			
PA	Nd	Nd	3,48±0,02 a
PO	Nd	Nd	3,04±0,01 b
PB	4,36±0,03 A	Nd	1,89±0,02 cB

Means followed by the same upper case letter in line and the same lower case letter in the column do not differ significantly according to Tukey's test ($p < 0.05$). EDTA IC₅₀ = 0.04 ± 0.01 mg/ml, BHT IC₅₀ = 0.18 ± 0.01 mg mL. ND: not determined.

Only the turbo extracts of the three *Plectranthus* species and reflux of *P. barbatus* showed inhibition of lipid peroxidation at 50% concentration and, therefore, the calculation of IC₅₀ was possible (Table 4). The results of the other extracts were expressed as percent inhibition of lipid peroxidation, which had a range of inhibition of 18.92% to 30.33%. The results showed that the hydroalcoholic extracts presented more inhibitory activity of the lipid peroxidation.

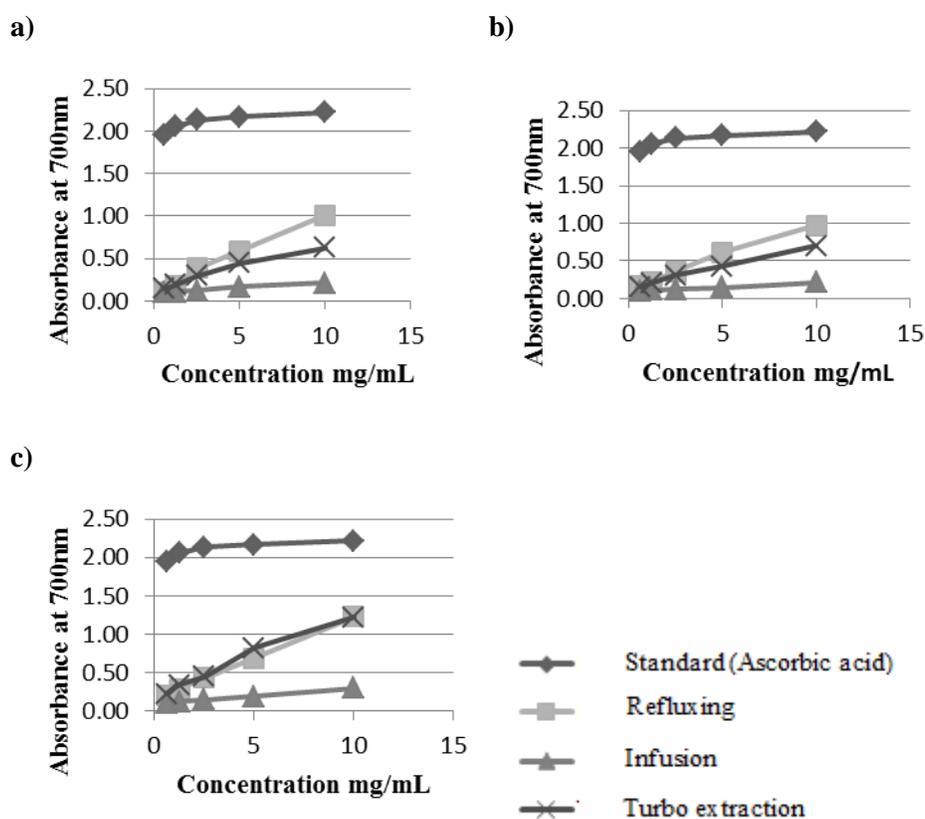


Figure 2 Reducing power of different extracts from (a) *P. amboinicus*, (b) *P. ornatus* and (c) *P. barbatus* using different extraction methods

The chelating and reducing power presented better results in the extracts obtained by refluxing for *P. amboinicus* and *P. ornatus*, and turbo extraction for *P. barbatus*. The chelating power of turbo extracts of *P. barbatus* is comparable to the power of Fe^{+2} ion chelation of reflux of *P. ornatus*. For *P. barbatus* the reducing power of turbo extracts and reflux presented similar results. Compared to the positive controls, the extracts had little chelation capacity and low

reducing power and inhibition of lipid peroxidation. This shows that perhaps the antioxidant capacity of the studied species is more related to the elimination of free radicals than by chelation and reduction of the metal ions, or inhibition of lipid peroxidation; however, it has also been observed a positive correlation with the phenolic constituent contents and chelating power (Table 3).

3.4. Inhibition of alpha-amylase

The phaseolamin was utilized as a standard for inhibiting the alpha-amylase enzyme and the IC_{50} was calculated in the amount of 0.0067 ± 0.00 mg/mL. It was not observed a 50% inhibition of enzyme activity for the concentrations studied. The extracts showed between 11.37% and 45.67% inhibition of alpha-amylase, the maximum percentage was observed in the turboextracts of *P. barbatus*. Given this results, it was observed that different extracts of *P. amboinicus*, *P. ornatus* and *P. barbatus* do not possess hypoglycemic activity by inhibiting the enzyme alpha-amylase. However, we cannot conclude that the three species of *Plectranthus* do not have hypoglycemic activity, since other mechanisms of action for this activity have not been tested. In the literature, no reference was found to inhibit the activity of alpha-amylase of the extracts of these species.

4. Conclusion

It is concluded that among the species studied, the extract obtained by refluxing and turbo extraction of *P. barbatus* stood out in the content of phenolic constituents, antioxidant activity and inhibition of alpha-amylase. Antioxidants tests that assess the capacity of elimination of free radicals obtained better results than others did. This demonstrates that the species act as antioxidants,

possibly by this mechanism, and not by inhibiting of lipid peroxidation or reducing and chelating ions.

The three species of *Plectranthus* showed no inhibition of the enzyme alpha-amylase activity. However, this result is not conclusive because other mechanisms that assess the hypoglycemic activity should be performed.

Acknowledgments

The authors are grateful to Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for the financial support to the project, study scholarships and productivity scholarships.

REFERENCES

- Aazza, S., Lyoussi, B., Antunes, D., & Miguel, M. G. (2013). Physicochemical Characterization and Antioxidant Activity of Commercial Portuguese Honeys. *Journal of Food Science*, 78, 1159-1165.
- Aazza, S., Lyoussi, B., Megías, C., Giraldo, I. C., Vioque, J., Figueiredo, A. C. & Miguel, M. G. (2014). Anti-oxidant, anti-inflammatory and anti-proliferative activities of Moroccan commercial essential oils. *Natural Product Communications*, 9, 587-594.
- Ahn, M. R., Kumazawa, S., Usui, Y., Nakamura, J., Matsuka, M., Zhu, F., Nakayama, T. (2007). Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of China. *Food Chemistry*, 101, 1383-1392.
- Albuquerque, R. L., Silva, M.G.V., Machado, M. I. L, Matos, F. G. A., Morais, S. M., & Neto, J. S. (2006). Chemical composition and antioxidant activity of *Plectranthus grandis* and *P. ornatus* essential oils from north-eastern Brazil. *Flavour and Fragrance Journal*, 22, 24-26.
- Amarante, C. B., Dias, A. C. A. A., Santos, A. C. F., Neves, P. A. P. F. G., Batista R. J. R., & Lins, A. L. F. A. (2015). Flavonoides em *Montrichardia linifera* (arruda) Schott (Araceae): Doseamento e localização *in situ*. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 96, 1055-1069.
- Ascensão, L., Mota, L., & Castro, M. M. (1999). Glandular Trichomes on the Leaves and Flowers of *Plectranthus ornatus*: Morphology, Distribution and Histochemistry. *Annals of Botany*, 84, 437-447.
- Brand-Williamns, W., Cuvelier, M. E. & Berset, C. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science Technology*, 28, 25-30.

- Chang, J.M., Cheng, C.M., Hung, L.M., Chung, Y. S. & Wu, R.Y. (2007). Potential Use of *Plectranthus amboinicus* in the treatment of rheumatoid arthritis. *eCAM*, 7, 115-120.
- Falé, P. L., Borges, C., Madeira P. J. M., Ascensão, L., Araújo, M. E. M., Florêncio, M. H. & Serralheiro, M. L. M. (2009). Rosmarinic acid, scutellarein 40-methyl ether 7-O-glucuronide and (16S)-coleon E are the main compounds responsible for the antiacetylcholinesterase and antioxidant activity in herbal tea of *Plectranthus barbatus* (“falso boldo”). *Food Chemistry*, 114, 798–805.
- Ferreira, D. F. (2010). **SISVAR**: sistema de análise de variância: versão 5.3. Lavras: Editora da UFLA.
- Freitas, R. C., Azevedo, R. R. S., Souza, L. I. O., Rocha, T. J. M. & Santos, A. F. (2014). Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante das espécies *Plectranthus amboinicus* (Lour.) e *Mentha x villosa* (Huds.). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada*, 35, 113-118.
- Kabouche, A., Kabouche, Z., Ozturk, M., Kolak, U. & Topcu, G. (2007). Antioxidant abietane diterpenoids from *Salvia barrelieri*. *Food Chemistry*, 102, 1281-1287.
- Krishnaiah, D., Sarbatly, R. & Nithyanandam, R. (2011). A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. *Food and Bioprocess Processing*, 89, 217-233.
- Mariutti, L. R. B. & Bragagnolo, N. (2007). Review: Natural Antioxidants from the Lamiaceae Family. Application in Food Products. *Brazilian Journal of Food Technology*, 10, 96-103.
- Miguel, M. (2010). Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. *Molecules*, 15, 9252-9287.

- Miguel, M., Bouchmaaa, N., Aazza, S., Gaamoussi, F. & Lyoussi, B. (2014). Antioxidant, anti-inflammatory and anti-acetylcholinesterase activities of eleven extracts of moroccan plants. *Fresenius Environmental Bulletin*, 6, 1-14.
- Muraina, I. A., Suleiman, M. M. & Eloff, J. N. (2009). Can MTT be used to quantify the antioxidant activity of plant extracts? *Phytomedicine*, 16, 665–668.
- Oh, J., Heonjoo, J., Ah Reum, C., Sung-Jin, K. & Jaejoon, H. (2013). Antioxidant and antimicrobial activities of various leafy herbal teas. *Food Control*, 31, 263-620.
- Oliveira, P. M., Ferreira, A. A., Silveira, D., Alves, R. B., Rodrigues, G. V., Emerenciano, V. P. & Raslan, D. S. (2005). Diterpenoids from the aerial parts of *Plectranthus ornatus*. *Journal of Natural Products*, 68, 588-591.
- Oyaizu, M. (1986). Studies on product of browning reaction prepared from glucose amine. *Japanese Journal of Nutrition*, 44, 307-315.
- Ozyurt, D., Demirata, B. & Apak, R. (2007). Determination of total antioxidant capacity by a new spectrophotometric method based on Ce(IV) reducing capacity measurement. *Talanta*, 71, 1155–1165.
- Popova, M.; Bankova, V.; Butovska, D. (2004). Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. *Phytochemistry Analysis*, 15, 235-240.
- Prieto, P., Pineda, M. & Aguilar, M. (1999). Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analysis Biochemistry*, 269, 337-341.

- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M. & Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology & Medicine*, 26, 1231-1237.
- Rengasamy, K. R. R., Aderogba, M. A., Amoo, S. O., Stirk, W. A. & Staden, J. V. (2013). Potential antiradical and alpha-glucosidase inhibitors from *Ecklonia maxima* (Osbeck) Papenfuss. *Food Chemistry*, 141, 1412-1415.
- Rice, L. J., Brits, G.J., Potgieter, C.J. & Van Staden, J. (2011). *Plectranthus*: A plant for the future? *South African Journal of Botany*, 77, 947-959.
- Slinkard, K. & Singleton, V. (1977). Total phenol analysis: automation and comparison with manual methods. *American Journal of Enology and Viticulture*, 28, 49-55.
- Sousa, C.M.M., Silva, H.R., Vieira, G. M., Ayres, M. C. C., Costa, C. L. S., Araújo, D. S., Cavalcante, L. C. C., Barros, E. D. S., Araújo, P. B. M., Brandão, M. S. & Chaves, M. H. (2007). Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants. *Química Nova*, 30, 351-355.
- Xiao, Z., Storms, R., & Tsang, A. (2006). A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. *Analytical Biochemistry*, 351, 146-148.

ARTIGO 2

**COMPOSIÇÃO QUÍMICA DO ÓLEO ESSENCIAL DE
Plectranthus amboinicus (Lour) Spreng E SEU POTENCIAL
ANTIOXIDANTE, ANTI-*Candida* E INIBITÓRIOS DA
LIPOXIGENASE E ALFA-AMILASE**

Simony Carvalho Mendonça¹
Smail Aazza²
Nelma de Mello Silva Oliveira³
Mariana de Souza Ribeiro¹
José Eduardo Brasil Pereira Pinto¹
Suzan Kelly Vilela Bertolucci¹

**Artigo formatado de acordo com a NBR 6023 (ABNT, 2002),
conforme orientação do Manual de Normalização da UFLA**

1 Universidade Federal de Lavras (UFLA), Departamento de Agricultura, Caixa Postal 3037, 37.200-000, Lavras – MG, Brasil

2 Universidade do Algarve, IBB-Centro de Biotecnologia Vegetal, Faculdade de Ciências e Tecnologia, Edif. 8, Campos de Gambelas, 8005-139 Faro – Portugal

3 Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Laboratório de Biologia e Fisiologia de Microrganismo, Caixa Postal 23, 37.130-000, Alfenas – MG, Brasil

RESUMO

Objetivou-se determinar os potenciais antioxidante, anti-*Candida* e inibitórios das enzimas lipoxigenase e alfa-amilase do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus*. Folhas frescas de *P. amboinicus* oriundas de cultivo protegido e em campo e coletadas de manhã e de tarde, foram submetidas a hidrodestilação em aparelho de Clevenger modificado para extração de óleos essenciais. O teor dos óleos essenciais, em peso seco, variou de 0,047 a 0,103%. As análises cromatográficas levaram à identificação de dezesseis constituintes químicos, sendo o carvacrol o componente majoritário correspondendo a 68 a 75% da composição química total. A capacidade antioxidante total (CAT) e de eliminação de radicais livres (DPPH e ABTS) do óleo essencial mostrou resultados significativos frente aos controles positivos. As atividades inibitórias das enzimas lipoxigenase e alfa-amilase não foram significativas. O óleo de *P. amboinicus* apresentou diferentes sensibilidades frente a onze cepas de *Candida* avaliadas, sendo a levedura *C. albicans* (ATCC 900028) a que apresentou maior diâmetro de halo de inibição ($42 \pm 0,000$ cm). O óleo essencial de *P. amboinicus* possui atividades antioxidantes e anti-*Candida* proeminentes, mas não é efetivo nas inibições enzimáticas da lipoxigenase e alfa-amilase.

Palavras-chave: Atividade antioxidante. Alfa-amilase. Lipoxigenase. Atividade anti-*candida*. *Plectranthus amboinicus*.

ABSTRACT

This study aimed to determine the potential antioxidant, anti-*Candida* and the inhibitory lipoxygenase enzymes and alpha-amylase of the essential oil of *Plectranthus amboinicus*. Fresh leaves of *P. amboinicus* coming from greenhouse and field and collected in the morning and afternoon, were subjected to hydrodistillation in Clevenger apparatus modified for the extraction of essential oils. The content of essential oils, in dry weight ranged from 0.047 to 0.103%. Chromatographic analysis led to the identification of sixteen chemical constituents, being the major component carvacrol corresponding to 68 to 75% of total chemical composition. The Total Antioxidant Capacity (TAC) and elimination of free radicals (DPPH and ABTS) essential oil showed significant results compared to the positive controls. The inhibitory activities of the lipoxygenase enzymes and alpha-amylase were not significant. The *P. amboinicus* oil showed different sensitivities to eleven front *Candida* strains evaluated, and the *C. albicans* yeast (ATCC 900028) presented the highest inhibition zone diameter (42 ± 0.000 cm). The essential oil of *P. amboinicus* has antioxidant activity and anti-*Candida* prominent, but is not effective in enzyme inhibition of lipoxygenase and alpha-amylase

Keywords: Antioxidant activity. Alpha-amylase. Lipoxygenase. Anti-candida activity. *Plectranthus amboinicus*.

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais, no Brasil, foi introduzido e disseminado pela cultura indígena, pelos colonizadores europeus e ainda pelos africanos, um pouco mais tarde (BRASIL, 2006; FREIRE, 2004). Com a evolução dessa prática ao longo dos anos, a terapêutica usando plantas medicinais assumiu importante papel no meio científico levando à pesquisa das espécies vegetais com potencial medicinal como fundamento para explicar as suas indicações populares (FREIRE, 2004). A busca por substâncias naturais com capacidade antioxidante, antiinflamatória, hipoglicemiante, antifúngica entre outras, motivam os estudos de atividades biológicas dessas substâncias.

O gênero *Plectranthus* é considerado um dos mais ricos em óleos essenciais dentro da família Lamiaceae, compreendendo muitas espécies com propriedades terapêuticas (BANDEIRA et al., 2011). A espécie *Plectranthusamboinicus* (Lour) Spreng é uma planta perene, aromática e de folhas suculentas, seu comprimento varia de 40 cm a 1 m e é atualmente encontrada em toda a América tropical (CASTILLO; GONZÁLES, 1999). Na forma de chá suas folhas têm utilização etnomedicinais no tratamento de constipação, cefaléia, tosse, rouquidão, febre, doenças digestivas e micose superficial (LORENZI; MATOS, 2002; MORAIS et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2007; SELLAR, 2002; TORRES et al., 2005).

A natureza aromática da espécie é atribuída à produção de óleo essencial (ALASBAHI; MELZIG, 2010) que apresenta propriedades antifúngicas, antiviral, antibacteriana, nematicida, larvicida e repelente de mosquitos (DOMIJAN et al., 2005; DORNER; COLE, 2002; KRITZINGER et al., 2002; PANDEY et al., 2000; PATTNAIK et al., 1996; SCHUHMACHER et al., 2003). A vasta capacidade farmacológica destes compostos aromáticos os torna

fontes importantes para a busca e o desenvolvimento de novas drogas (RICE et al., 2011).

A descoberta de substâncias capazes de inibir enzimas chave de um determinado processo metabólico, como a acetilcolinesterase, lipoxigenase, alfa-glicosidase e alfa-amilase, têm motivado os estudos pela busca por novos inibidores enzimáticos, os quais podem ser utilizados terapêuticamente (SALES, 2012).

As lipoxigenases são enzimas que catalisam a adição de oxigênio molecular aos ácidos graxos polinsaturados contendo o sistema *cis, cis* - 1,4 - pentadieno, levando a formação de hidroperóxidos de ácidos graxos insaturados (AXELROD et al., 1981; MACK et al., 1987). Devido à produção desses peróxidos, compostos que são capazes de inibir essa enzima podem ser considerados como antioxidantes (MIGUEL et al., 2014). Ao mesmo tempo, esses produtos são convertidos em outros que desempenham um papel fundamental em processos inflamatórios, como os leucotrienos. Portanto, compostos que são capazes de inibir esta enzima, também possuem propriedades antiinflamatórias (STEINHILBER, 1999).

Outra enzima bastante estudada nesse contexto é a alfa amilase. Essa enzima é responsável pela hidrólise de carboidratos no trato digestivo levando a absorção de glicose. Constitui, portanto, um alvo importante para o controle de doenças como o *diabetes mellitus* tipo 2 e a hiperglicemia (SALES et al., 2012).

Leveduras do gênero *Candida* são habitantes comuns da pele e membranas mucosas da traqueia e dos tratos gastrointestinal e geniturinário. Os pacientes em unidades de tratamento intensivo (UTI), com disfunções imunológicas, transplantados de medula óssea e de doenças subjacentes são considerados de alto risco à candidíase (FOSTEL; LARTEY, 2000).

Dentre as centenas de espécies descritas, leveduras do gênero *Candida* são os maiores agentes de infecção hospitalar e representam um desafio para a

sobrevida de pacientes com doenças graves e àqueles em período pós-operatório (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA, 2004). Em decorrência disso, tem surgido cada vez mais a necessidade de estudo de novos compostos antifúngicos mais potentes e que causem menos efeitos colaterais (PEDROSO et al., 2014).

Por conseguinte, a forma de cultivo e o tempo de colheita podem promover variações significativas nos teores dos óleos essenciais, o que pode levar a variações em suas atividades biológicas. Como um exemplo, o óleo essencial de *Cymbopogon citratus* em cultivo solteiro e consorciado com *Achillea millefolium* apresentou atividade moderada frente à *Candida albicans* e *C. tropicalis*, obtidas de material clínico humano (0,63-1,25 mg/mL). Para as bactérias avaliadas, o óleo essencial de *C. citratus* em canteiro único apresentou alta atividade frente ao *Staphylococcus aureus* ATCC-6538 (0,08mg/mL) e foi inativo para as demais bactérias (*Echerichia coli* ATVV-8739 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC-9027) (SANTOS et al., 2009).

Objetivou-se avaliar o potencial antioxidante, anti-*Candida* e inibitórios da lipoxigenase e alfa-amilase do óleo essencial das folhas de *P. amboinicus* sob diferentes formas de cultivo e horários de colheita.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Obtenção do material vegetal

O experimento foi instalado e conduzido em casa de vegetação (cultivo protegido) e em canteiros (cultivo em campo) do Horto Medicinal do Departamento de Agricultura (DAG) da Universidade Federal de Lavras (UFLA), Lavras – MG, em março de 2015. A UFLA está situada nas coordenadas geográficas 21° 14' S e 45° 00 W, a 918 m de altitude. Segundo a classificação de Sá Júnior et al. (2012), o clima regional predominante, de acordo com metodologia proposta por Köppen, é do tipo Cwa, com as características; úmido com inverno seco e verão quente.

A casa de vegetação, onde foi realizado o cultivo protegido, foi construída com ferro e possuía cobertura transparente que permitia a passagem da luz solar para crescimento e desenvolvimento das plantas.

As mudas foram obtidas por meio de microestacas de ponteira, com aproximadamente 5 cm, retiradas de plantas matrizes do Horto Medicinal da UFLA. Estas foram cultivadas em bandejas com substrato comercial Hortplant® por 30 dias em cultivo protegido, com irrigação constante. Após o enraizamento foram transplantadas para vasos com capacidade de 5 L, contendo 4kg da mistura solo e esterco bovino na proporção 3:1. O solo utilizado foi coletado na camada de 0-20cm de profundidade, de um Latossolo Vermelho-Amarelo distrófico (SANTOS et al., 2006), em Lavras, MG. Para favorecimento do crescimento das mudas, após 90 dias do transplante, passou-se a aplicar suplementação com meio MS (MURASHIGE; SKOOG, 1962) de 15 em 15 dias durante 45 dias.

As plantas cultivadas em campo, no canteiro de dimensões de 6 x 1,20m, foram previamente adubados com esterco bovino na dose de 3,0 kg.m² e

irrigados periodicamente 4 vezes por semana. O solo do canteiro foi o mesmo utilizado no cultivo em vasos. Folhas do cultivo protegido e em campo foram colhidas no período de 05/03/2015 a 17/03/2015 às 9:00 e às 13:00 ao completarem 240 dias de idade.

O material vegetal foi herborizado e incorporado ao acervo do Herbário PAMG da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), sob registro PAMG 57803 (ANEXO A).

2.2 Determinação da umidade

O teor de umidade das folhas frescas de *P. amboinicus*, do canteiro e da casa de vegetação, foi determinado por radiação no infravermelho, utilizando uma balança MB45 Ohaus®, com secagem programada para 105°C por 5 minutos. Os resultados foram expressos em perda percentual de umidade em massa através da média de três determinações, utilizando 3g das folhas em cada determinação \pm o desvio padrão.

2.3 Extração

Para extração do óleo essencial, empregou-se 200g de folhas frescas de *P. amboinicus* que foram hidrodestiladas com um litro de água, em aparelho de Clevenger modificado, por 120 minutos. Os óleos foram separados por decantação, particionados com diclorometano, armazenados em frascos âmbar com capacidade de 2mL e mantidos sob refrigeração (4°C), até as análises químicas. O teor do óleo essencial foi determinado e expresso em g.100g⁻¹ de matéria seca das folhas.

2.4 Análise química do óleo essencial

As análises quantitativas do óleo foram realizadas por cromatografia em fase gasosa acoplado a um detector de ionização em chama de hidrogênio (CG-DIC) em um sistema Agilent® 7890A equipado com coluna capilar de sílica fundida HP-5 (30 m de comprimento × 0,25 mm de diâmetro interno × 0,25 µm de espessura do filme) (Califórnia, EUA). Utilizou-se hélio como gás de arraste com fluxo de 1,0 mL/min; as temperaturas do injetor e do detector foram mantidas em 240 °C. A temperatura inicial do forno foi de 50 °C com uma rampa de temperatura de 3° C/min até 180 °C, seguido por outra rampa de 10 °C/min até 280 °C, mantendo uma isoterma de 1 min. O óleo foi diluído em acetato de etila (1%, v/v) e injetado automaticamente no cromatógrafo empregando volume de injeção de 1,0 µL, no modo *split* a uma razão de injeção de 50:1. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados expressos pela média da porcentagem de área normalizada relativa dos picos cromatográficos ± o desvio padrão.

As análises qualitativas foram realizadas em Cromatógrafo Agilent® 7890A acoplado a um detector seletivo de massas Agilent® MSD 5975C (Agilent Technologies, Califórnia, EUA), operado por ionização de impacto eletrônico a 70 eV, em modo varredura, a uma velocidade de 1,0 scan/s, com intervalo de aquisição de massas de 40-400 m/z. As condições operacionais foram as mesmas empregadas nas análises por CG-DIC.

Os constituintes químicos foram identificados por comparação dos seus índices de retenção relativos à co-injeção de uma solução padrão de *n*-alcanos (C8-C20, Sigma-Aldrich®, St. Louis, USA) e por comparação dos espectros de massas do banco de dados da biblioteca NIST/EPA/NHI (NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY - NIST, 2008) e de literatura (ADAMS, 2007). Os índices de retenção foram calculados usando-se a

equação de Van den Dool e Kratz (1963) e para as atribuições foram consultados índices de retenção citados em literatura (ADAMS, 2007).

2.5 Reagentes

Ácido sulfúrico 0,6M, fosfato de sódio monobásico 28 mM, molibdato de amônio e 2,2-difenyl-1-picrilhidrazil (DPPH) foram adquiridos da Sigma-Aldrich®, Alemanha. Ferrozina e $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ foram adquiridos da Acrosorganics®, EUA.

Alfa-amilase (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha), Faseolamina, droga pulverizada contendo 1,15% de faseolamina (Gemini).

2.6 Testes antioxidantes

As leituras de absorção molecular no ultravioleta foram mensuradas em leitora de microplacas TECAN Infinity® M200 PRO operado pelo *software* I-control® versão 3.37.

2.6.1 Capacidade antioxidante total (CAT)

A capacidade antioxidante total (CAT) foi mensurada baseada no método de redução do complexo fosfomolibdênio descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999). Um volume de 25 μL dos óleos - na diluição 1/100 - foram misturados com 1000 μL da solução reagente (ácido sulfúrico 0,6M, fosfato de sódio monobásico 28mM, molibdato de amônio 4mM). Após 90 minutos de incubação a 95°C, as amostras foram resfriadas até temperatura ambiente e suas absorbâncias mensuradas a 695 nm. A curva de calibração de solução aquosa de ácido ascórbico, compreendeu a faixa de 0,19 a 2,2mg/mL. A equação da reta (y

= $0,2219 x + 0,1417$, $R^2 = 0,9992$), em que y é a absorbância e x é a concentração, foi empregada para determinação da atividade. Os resultados foram expressos em mg equivalentes em ácido ascórbico por g de folha fresca (mg EAA/g).

2.6.2 Atividade de eliminação de radicais livres (DPPH)

A atividade sequestrante de radicais DPPH (1,1-diphenil-1,2-picrilhidrazil) foi determinada pelo método proposto por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Em 25 μ L dos óleos essenciais - nas diluições de 1/50 a 1/1600 - foi adicionado 275 μ L de solução etanólica de DPPH. A mistura, já acondicionada em microplaca, foi incubada por 60 minutos ao abrigo da luz e a temperatura ambiente. Após esse período a absorbância foi mensurada a 517 nm. A diminuição na absorbância indica atividade sequestrante de radicais livres. Os testes foram realizados em triplicata. O BHT foi usado como padrão (controle positivo), e o controle negativo continha o solvente da amostra no lugar da mesma. A atividade da captura de radicais livres por DPPH foi expressa pela porcentagem de inibição (50%), calculada pela fórmula: $(\%) = (A_0 - A_1) / A_0 * 100$, em que A_0 é a absorbância do controle negativo e A_1 a absorbância das amostras. A atividade de eliminação de radicais livres foi expressa como IC_{50} , correspondendo à concentração de extrato capaz de inibir 50% dos radicais DPPH.

2.6.3 Determinação da atividade de eliminação de radicais livres (ABTS)

O ensaio de descoloração catiônica do radical ABTS foi realizado utilizando o método descrito por Ling et al. (2009) e Re et al. (1999), com pequenas modificações. Sucintamente, o radical ABTS foi gerado por reação de

uma solução aquosa com $K_2S_2O_8$ (2,45mM) no escuro durante 16h, seguido de ajuste de absorbância a 734 nm para 0,7 a temperatura ambiente. Baixa absorbância da mistura da reação indica atividades mais elevadas. Amostras de 25 μ L dos óleos - nas diluições 1/50 a 1/1600 - foram adicionados a 275 μ L de ABTS e a absorbância foi lida a 734 nm, após 6 minutos. O BHT foi usado como padrão (controle positivo) e o controle negativo continha o solvente da amostra no lugar da amostra. A percentagem de eliminação do radical ABTS foi calculada a partir da fórmula: $(\%) = (A0 - A1) / A0 * 100$, em que A0 é a absorbância do controle negativo e A1 a absorbância das amostras. A atividade de eliminação de radicais livres foi expressa como IC₅₀, correspondendo à concentração de extrato capaz de inibir 50% dos radicais ABTS.

2.6.4 Determinação do poder quelante

A atividade quelante de íons Fe^{2+} foi realizada de acordo com a metodologia de Miguel et al. (2010). Em alíquotas de 25 μ L das amostras - nas diluições de 1/1, 1/10 e 1/50 - foi adicionado 30 μ L de $FeCl_2 \cdot 4H_2O$ (2mM). Após incubação por 10 minutos acrescentou-se 40 μ L de ferrozina 5mM [3-(2-piridil)-5,5-bis-(4-ácido fenil sulfônico)-1,2,4-triazina]. A absorbância das soluções foi mensurada a 562nm. A porcentagem de inibição da formação do complexo ferrozina- Fe^{2+} foi determinada usando a fórmula: $(\%) = (A0 - A1) / A0 * 100$, em que A0 é a absorbância do complexo ferrozina- Fe^{2+} (controle negativo sem a amostra) e A1 a absorbância das amostras analisadas. Os resultados foram expressos como IC₅₀, correspondendo à concentração eficaz para a quelação de 50% de íons Fe^{2+} . O EDTA foi utilizado como padrão (controle positivo).

2.7 Testes enzimáticos

2.7.1 Teste de inibição da alfa-amilase

O ensaio de inibição da α -amilase foi realizado de acordo com Xiao et al. (2006) com base no teste de amido-iodo. Em 50 μ L das amostras (nas diluições 1/10, 1/50, 1/100 e 1/200) foram adicionados 50 μ L de solução aquosa da enzima a 0,01% e 100 μ L de tampão fosfato de sódio pH 6,9. Após repouso de 10 minutos foram adicionados 200 μ L da solução aquosa de amido a 0,2%. Após mais 20 minutos foram adicionados 40 μ L de solução de HCL 0,1M e 200 μ L de solução aquosa de iodina. A solução de iodina foi feita adicionando 5 mM de I₂ e 10 mM de KI em qsp 100 mL de água. A leitura foi então realizada em 620 nm. A reação de controle representando 100% da atividade da enzima não continha qualquer quantidade dos extratos. A faseolamina foi usada como controle positivo (padrão). A cor azul-escuro é indicativa da presença de amido; a cor amarela indica a ausência de amido, enquanto uma cor acastanhada indica amido parcialmente degradado na mistura da reação. Como a reação foi mínima aumentou-se a quantidade da amostra gradativamente até 500 μ L, aumentando-se também, proporcionalmente, as quantidades dos reagentes. A porcentagem de inibição da enzima foi calculada pela equação: (%) = (A0 - A1) / A0 * 100 em que A0 é a absorbância do controle negativo e A1 a absorbância das amostras. A atividade de inibição foi expressa como IC₅₀.

2.7.2 Teste de inibição da 5-lipoxigenase

O ensaio da 5-lipoxigenase foi realizado segundo o procedimento descrito por Boulanouar et al. (2013). A conversão de ácido linoleico em ácido 13-hidroperoxi-linoleico foi seguida espectrofotometricamente pelo

aparecimento de um dieno conjugado a 234 nm. A reação se iniciou pela adição de 15 ul de solução de lipoxigenase (0,054 g em 1 ml de tampão de borato 0,005%, Tween a 0,1 M, pH 9) a 930 uL de tampão borato, 5 ul das amostras e 50 ul de ácido linoleico (0,001 M).

A porcentagem de inibição da enzima foi calculada pela equação: (%) = $(A0 - A1) / A0 * 100$ em que A0 é a absorbância do controle negativo e A1 a absorbância das amostras. A atividade de inibição foi expressa como IC₅₀. O ácido nordihidroguaiaretico (NDGA) foi utilizado como controle positivo.

2.8 Teste da capacidade antifúngica

Para as análises antifúngicas foi feito um mix com os óleos coletados das plantas cultivadas em canteiro e em casa de vegetação de manhã e de tarde, devido ao baixo rendimento do óleo essencial de *P. amboinicus*. Portanto o resultado apresentado será de apenas um óleo correspondente ao mix dos quatro obtidos. Para isso 100µL de cada óleo foi colocado em um único frasco âmbar com capacidade de 5mL e mantido sob refrigeração (4°C) até o momento da análise.

A determinação da sensibilidade aos óleos foi feita pela técnica de disco-difusão em ágar conforme descrito no documento M44-A2 do *Clinical and Laboratory Standards Institute* – CLSI (2009) no laboratório de Farmacogenética e Biologia Molecular da Universidade José do Rosário Vellano/UNIFENAS.

Foram analisadas as espécies *Candida rugosa* (IZ-12), *Candida kruseii* (ATCC 6258), *Candida tropicalis* (CBS 94), *Candida dubliniensis* (CBS7987), *Candida albicans* (ATCC 90028), *Candida utilis* (CBS 5609), *Candida kruseii* (CBS 572), *Candida lusitanea* (IZ-06), *Candida gablata* (IZ-07), *Candida gablata* (ATCC 5207), *Candida albicans* (CBS 562).

As espécies de *Candida* utilizadas neste estudo são cepas de referência e selecionadas segundos os critérios de qualidade da CLSI (2009) e que foram cedidas dos Laboratórios de Farmacogenética e Biologia Molecular da Universidade José do Rosário Vellano/UNIFENAS e do Laboratório de Microbiologia e Imunologia da Universidade de Odontologia de Piracicaba/UNICAMP.

A suspensão de leveduras foi preparada em solução salina fisiológica (NaCl 0,85%) com turbidez equivalente ao tubo 0,5 da escala de McFarland (10^6 células/mL), e espalhada com *swab* esterilizado na superfície do agar Müeller-Hinton (suplementado com 2% de glicose e 0,5 µg/ml de azul de metileno). Os discos contendo 5 uL dos óleos foram aplicados na superfície do ágar e incubado a 35°C. Após 18 a 24 h, o halo de inibição do crescimento foi medido. Os testes foram realizados em triplicata.

2.9 Análise Estatística

O delineamento experimental utilizado foi inteiramente casualizado, em um arranjo fatorial 2 x 2, sendo dois tipos de cultivo (canteiro e casa de vegetação) e dois horários de coleta (manhã - 9:00hrs e tarde - 13:00hrs), com quatro repetições.

Todos os ensaios foram realizados em triplicata e para as análises estatísticas dos dados, utilizou-se o programa Sisvar, versão 5.3 (FERREIRA, 2010). As médias entre os tratamentos foram submetidas à análise de variância, pelo teste F, e comparadas pelo teste de Tukey, a 5% de probabilidade. Para as análises de correlação foi aplicado o coeficiente de correlação de Pearson, também chamado de "coeficiente de correlação", para medir o grau da correlação e a direção dessa correlação - se positiva ou negativa - entre duas variáveis analisadas.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Umidade e rendimento extrativo dos óleos

Os percentuais de umidade das folhas frescas de *P. amboinicus*, cultivadas em canteiro e em casa de vegetação, foram de $43,09 \pm 2,90$ e $45,91 \pm 2,45$, respectivamente.

A hidrodestilação das folhas frescas forneceu óleos essenciais de cor amarelada, com um forte odor característico e com teores extrativos que variaram de 0,047 a 0,050% em cultivo protegido e de 0,100 a 0,103% no cultivo em campo (Figura 1), Resultados similares foram observados por Bandeira et al. (2011) que encontraram teores abaixo de 0,09% para o óleo essencial extraído das folhas frescas de *P. amboinicus* com percentuais de umidade de 87% a 93%. No entanto, Vera et al. (1993) observaram teores de 0,7% de óleo essencial extraído por hidrodestilação das folhas e caules de plantas de *P. amboinicus* cultivadas na França.

Pôde-se observar que os óleos coletados das plantas cultivadas em campo apresentaram teores cerca de 50% a mais que os teores das plantas em cultivo protegido, independente do horário de colheita.

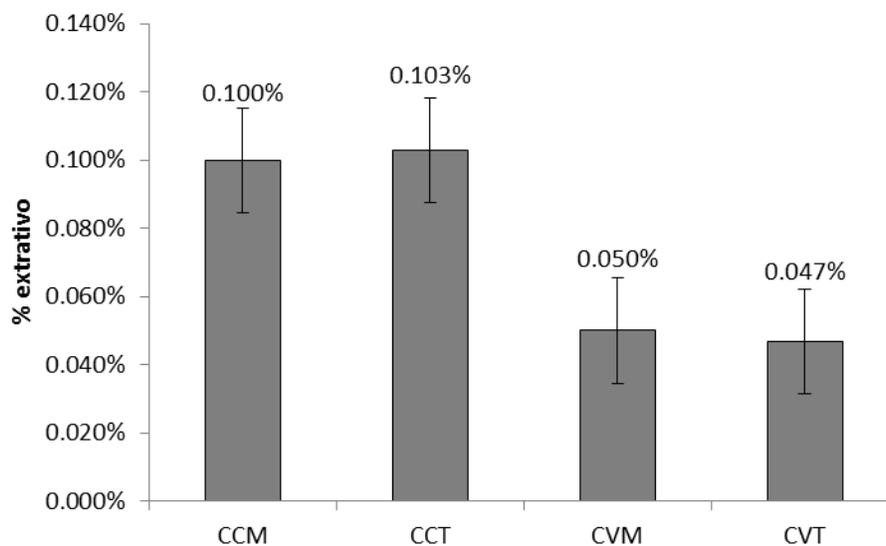


Figura 1 Teor dos óleos essenciais de *P. amboinicus* (CCM: Cultivo em Canteiro coleta de manhã; CCT: Cultivo em Canteiro coleta de tarde; CVM: Casa de Vegetação, coleta de manhã; CVT: Casa de Vegetação, coleta de tarde)

Resultado semelhante foi relatado por Carneiro et al. (2010), em que os melhores rendimentos do óleo essencial de *P. amboinicus* foram obtidos quando a planta havia sido cultivada em canteiros expostos ao sol e com irrigação alternada em relação ao cultivo em sombra com irrigação diária (casa de vegetação), corroborando os nossos resultados. Esse trabalho também demonstrou que o melhor horário para coleta das folhas para extração do óleo essencial de *P. amboinicus* foi na parte da manhã, entre 7 e 9 horas. No presente estudo não foram observadas diferenças em relação ao horário de coleta.

O horário de coleta é um fator que altera a produção de óleos essenciais e é variável entre as espécies. Cita-se o exemplo, observado para o óleo essencial de alfavaca (*Ocimum gratissimum*), em que houve uma variação de

mais de 80% na concentração de eugenol quando coletado de manhã em relação ao período da tarde, atingindo um máximo em torno do meio-dia (SILVA et al., 1999). O mesmo acontece com os níveis de conina em *Conium maculatum* que são maiores quando as coletas são efetuadas pela manhã que no entardecer (FAIRBAIRN; SUWAL, 1961). Já o conteúdo total de taxanos em *Taxus media* mostrou-se menor pela manhã, aumentando durante o dia e atingindo um máximo no final da noite (ELSOHLY et al., 1997).

3.2 Composição química do óleo essencial de *P. amboinicus*

As análises químicas por CG/EM do óleo essencial de *P. amboinicus* permitiu identificar 16 componentes químicos entre monoterpenos e sesquiterpenos (Tabela 1). Dos dezesseis constituintes químicos identificados nos óleos do presente estudo, oito também já foram relatados na literatura (SENTHILKUMAR; VENKATESALU, 2010), sendo eles β -mirceno, α -terpineno, *o*-cimeno, γ -terpineol, timol, carvacrol, α -humuleno e óxido de cariofileno.

Os monoterpenos oxigenados compreenderam a classe majoritária, a qual foi representada pelo monoterpeno fenólico carvacrol que apresentou teores de 68,92 a 72,01%, no cultivo em campo, e de 74,42 a 75,21%, em cultivo protegido, em relação a composição química total. Por outro lado, Vera et al. (1993) observaram que o óleo essencial das folhas e caules de *P. amboinicus* cultivados na França foi constituído principalmente por monoterpenos hidrocarbonetos (53%), sendo representados majoritariamente por Δ -3-careno (16,3%) e γ -terpineno (11,9%). Esses mesmo autores também identificaram o carvacrol, mas esse correspondeu a apenas 13,4% nesse óleo essencial.

Tabela 1 Composição química do óleo essencial de *P. amboinicus*

Constituintes	IR ^a	Área % ± DP				
		CPM	CPT	CCM	CCT	Mix
α -Pineno	932	0,05±0,00	0,08±0,00	nd	nd	0,05±0,00
Sabineno	969	0,56±0,00	0,27±0,00	0,22±0,00	0,32±0,00	0,52±0,00
β -Pineno	978	0,59±0,01	0,34±0,00	0,84±0,00	0,65±0,01	0,76±0,00
β -Mirceno	991	0,13±0,00	0,28±0,00	0,23±0,00	0,33±0,00	0,20±0,00
α -Terpineno	1015	0,31±0,01	0,51±0,00	0,39±0,00	0,47±0,00	0,45±0,01
<i>o</i> -Cimeno	1022	2,30±0,07	4,35±0,05	4,84±0,03	6,26±0,03	5,30±0,02
1,8-Cineol	1026	nd	0,15±0,00	0,12±0,00	0,16±0,00	0,14±0,00
γ -Terpineno	1057	4,25±0,08	5,13±0,02	4,77±0,06	5,50±0,04	4,36±0,04
4-Terpineol	1174	1,32±0,01	1,31±0,02	1,24±0,00	1,18±0,00	1,12±0,01
Timol	1287	nd	0,13±0,00	0,16±0,00	0,15±0,00	0,17±0,01
Carvacrol	1306	75,21±0,11	74,42±1,38	72,01±0,02	68,92±0,09	71,04±1,54
β -Cariofileno	1415	7,70±0,04	6,68±0,12	6,81±0,02	7,18±0,04	7,53±0,05
α -Bergamoteno	1434	3,84±0,03	3,49±0,06	3,17±0,01	3,65±0,01	3,41±0,03
α -Humuleno	1449	2,04±0,01	1,81±0,03	1,86±0,00	1,91±0,01	1,89±0,00
Espatuleno	1577	0,75±0,01	0,90±0,01	1,76±0,01	1,83±0,01	1,72±0,02
Óxido de Cariofileno	1603	nd	0,15±0,00	0,27±0,00	0,27±0,00	0,34±0,00
Monoterpenos hidrocarbonetos		8,19	10,95	11,29	13,52	11,65
Monoterpenos oxigenados		1,32	1,46	1,37	1,34	1,26
Sesquiterpenos hidrocarbonetos		13,57	11,39	11,83	12,73	12,82
Sesquiterpenos oxigenados		0,75	1,04	2,03	2,10	2,06
Compostos fenólicos		75,21	74,55	72,17	69,07	71,21
TOTAL (%)		99,04	99,39	98,69	98,77	98,99

^aÍndice de retenção relativo a série n-alcenos (C₈-C₂₀) em coluna HP-5MS na ordem de eluição. nd = não detectado; DP: desvio padrão ($n=3$).; CPM: Cultivo protegido coleta de Manhã; CPT: Cultivo protegido coleta de Tarde; CCM: Cultivo em Campo Coleta de Manhã; CCT: Cultivo em Campo Coleta de Tarde; Mix: Mistura dos 4 óleos anteriores.

Com exceção do *o*-cimeno (2,30% a 6,26%), não houve variações químicas quantitativas expressivas dos constituintes químicos dos óleos essenciais oriundos das plantas sob cultivo protegido ou em campo ou colhidos pela manhã e tarde. Diferenças qualitativas foram observadas nos óleos das plantas cultivadas em campo coletados de manhã e de tarde, nos quais não foi detectada a presença de α -pineno, assim como nos óleos das plantas sob cultivo

protegido coletadas pela manhã que não apresentaram os constituintes 1,8-cineol e timol.

Os teores de carvacrol no óleo essencial de *P. amboinicus* foram maiores nas plantas submetidas a cultivo protegido, correspondendo a 74,42% e 75,21%, em relação a 68,92% a 72,01% nas plantas em canteiros. O carvacrol juntamente com o timol (Figura 2), são os principais monoterpênicos aromáticos constituintes de vários óleos essenciais extraídos de plantas aromáticas tais como *Thymus vulgaris* L. (Lamiaceae), *Origanium compactum* (Labiatae), *Acalypha phleoides* (Euphorbiaceae) e *Lippia sidoides* (Verbenaceae) (PEIXOTO-NEVES et al., 2010). São amplamente estudados devido a variedade de ações biológicas atribuídas a eles tais como, anti-inflamatória, antioxidante, antibacteriana, antifúngica, anticarcinogênica e ainda por possuírem alguma solubilidade em água e baixa toxicidade, sendo características extremamente favoráveis a um princípio ativo (ALMEIDA, 2015).

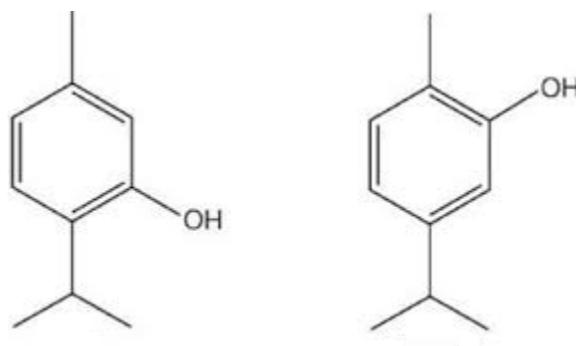


Figura 2 Estrutura química do Timol e do Carvacrol

3.3 Atividades antioxidantes

Existem numerosos métodos para a avaliação da capacidade antioxidante, *in vitro*, que podem ser classificados em dois tipos: ensaios baseados na transferência de átomos de hidrogênio (TAH) e ensaios baseados na

transferência de elétrons (TE). Portanto mais do que um tipo de avaliação da capacidade antioxidante tem de ser realizada para levar em conta os diferentes modos de ação dos antioxidantes (DUDONNE et al., 2009).

Pode-se observar que os melhores resultados dos ensaios antioxidantes foram obtidos dos óleos essenciais oriundos das plantas sob cultivo protegido e colhidas pela manhã (Tabela 2).

Tabela 2 Atividades antioxidantes dos óleos de *P. amboinicus*

Horários de coleta	CAT (mg EAA /g)	
	Canteiro	Casa de Vegetação
Manhã	1591,7±0,02 aB	1904,8±0,00 aA
Tarde	1548,6±0,01 bB	1568,1±0,02 bA
DPPH (IC₅₀=mg/mL)		
Manhã	0,41±0,01 aB	0,36±0,02 aA
Tarde	0,51±0,02 bB	0,47±0,02 bA
ABTS (IC₅₀=mg/mL)		
Manhã	0,067±0,00 aB	0,058±0,00 aA
Tarde	0,078±0,00 bA	0,077±0,00 bA

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente em cada ensaio antioxidante segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). **CAT**: Capacidade Antioxidante Total em mg equivalentes de ácido ascórbico/g de folha fresca (mg EAA/g); **DPPH**: Captura de radicais livres de DPPH; **ABTS**: Captura de radicais livres de ABTS; BHT: IC₅₀ = 0,18±0,01mg/mL. Os dados representam a média ± desvio padrão ($n=3$).

Em relação à atividade antioxidante total (CAT) observa-se que o óleo de *P. amboinicus*, independente da forma de cultivo, apresentou uma potente atividade antioxidante. A solução inicial apresentou coloração amarela tornando-se verde à medida que o complexo fosfato de molibdênio se reduziu (Molibdênio VI para Molibdênio V) com a ação dos antioxidantes presentes no óleo. Segundo Amorati et al. (2013), óleos essenciais são misturas de diferentes tipos de

antioxidantes ou compostos terpenoides oxidáveis que desempenham um papel importante na eficácia da ação antioxidante. A maior atividade antioxidante medida por esse método pode ser explicada devido aos altos teores de Carvacrol presente no óleo essencial. Esta afirmação é evidenciada pela correlação positiva observada entre a CAT e o teor desse composto (Figura 3a e Tabela 3).

A atividade antioxidante dos óleos, no que diz respeito a sua capacidade de eliminar os radicais livres DPPH e ABTS foi expressiva e consideravelmente maior que o controle positivo no teste de ABTS (BHT, $IC_{50} = 0,18 \pm 0,01$ mg/mL). O óleo essencial extraído de plantas sob cultivo protegido e coletadas pela manhã apresentou capacidade antioxidante cerca de 3 vezes superior ao controle positivo empregado para o teste de ABTS. O potencial antioxidante do óleo de *P. amboinicus* por captura de radicais DPPH não foi tão evidente quanto àquele observado nos ensaios de captura de ABTS. Para esses ensaios, os óleos de *P. amboinicus* apresentaram valores médios de cerca de 61% menor que o controle positivo. Rodrigues et al. (2013) também obtiveram resultados similares quando avaliaram a capacidade de captura dos radicais DPPH do óleo de *P. amboinicus* encontrando resultados similares de IC_{50} ($0,589 \pm 0,007$ mg/mL) ao presente estudo.

Conforme Ozgen et al. (2006), os radicais ABTS e DPPH utilizam o mesmo mecanismo de transferência eletrônica, revelando o poder redutor dos componentes que constituem os óleos. No entanto, apesar de apresentarem o mesmo mecanismo de transferência de elétron, os compostos fenólicos podem ter diferentes cinéticas de oxidação conforme o ensaio utilizado e, conseqüentemente, eficiência distinta na capacidade de captura de radicais livres, explicando as diferenças observadas nos ensaios de captura de radicais DPPH e ABTS para os óleos de *P. amboinicus*.

Outro ponto importante a se considerar, é que diversos autores têm demonstrado correlações significativas entre propriedades antioxidantes e conteúdo de compostos fenólicos. Dudonne et al. (2009) obtiveram resultados de correlação positiva entre os ensaios de captura de radicais DPPH e ABTS e o conteúdo de fenóis totais de extratos de trinta espécies diferentes de plantas medicinais. Lordêllo (2015) demonstrou que os extratos hidroalcoólicos das folhas de três espécies de *Mentha* apresentam maiores quantidades de compostos fenólicos e maiores atividades antioxidantes, observando uma correlação significativa entre esses dados. Da mesma forma os resultados obtidos por Miguel et al. (2014), ao avaliarem extratos de sete espécies medicinais marroquinas, mostraram forte correlação entre a capacidade de eliminação de radicais DPPH e os teores de fenóis totais.

Posto isso, as atividades antioxidantes demonstradas pelos óleos essenciais de *P. amboinicus* poderiam estar relacionadas ao elevado teor de carvacrol (68,92% a 75,21%) presente nesses óleos. Análises de correlação de Pearson confirmaram essa hipótese (Figura 3 e Tabela 3). Correlação positiva foi observada entre o teor de carvacrol e a capacidade antioxidante total expressa em mg equivalentes em ácido ascórbico por g de folha fresca (mg EAA/g) (Figura 3a e Tabela 3). Correlações negativas entre IC_{50} e teor de carvacrol (Figuras 3b e 3c; Tabela 3), demonstraram a importância deste constituinte químico na atividade antioxidante do óleo essencial de *P. amboinicus* mensurada por meio dos ensaios de captura de radicais livres DPPH e ABTS.

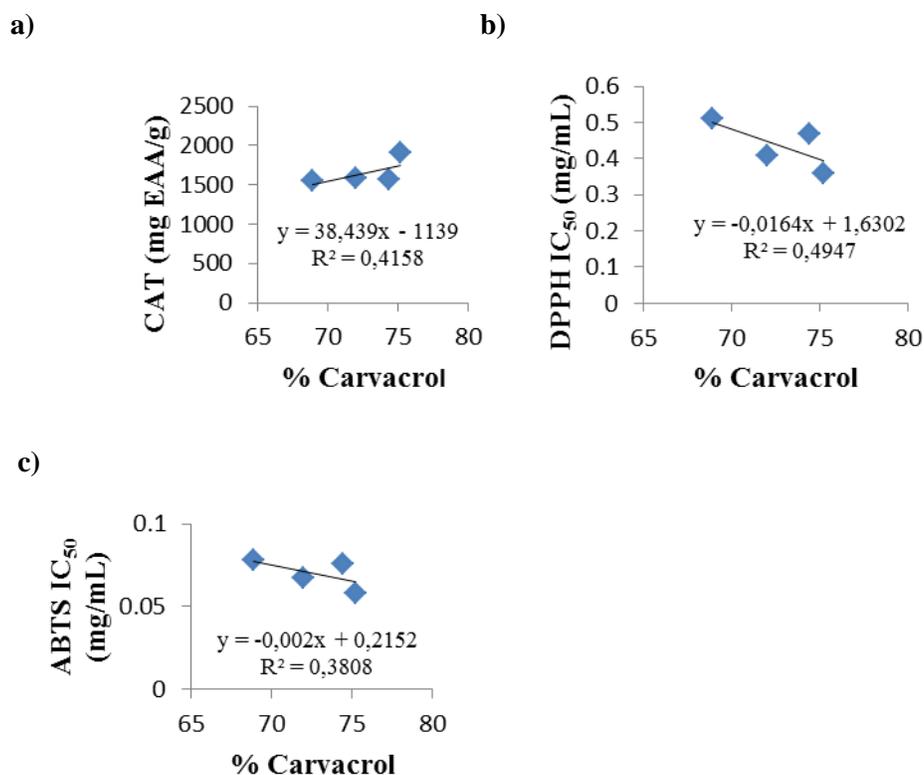


Figura 3 Correlação entre a atividade antioxidante e a porcentagem de carvacrol. (a, b, c). a) Capacidade antioxidante total (CAT), expresso em miligrama equivalente em ácido ascórbico por g de material vegetal (mg EAA/g). b) Eliminação de radicais livres DPPH expressos em IC_{50} (mg/mL). c) Eliminação de radicais ABTS, expressos em IC_{50} (mg/mL)

Tabela 3 Estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson entre teor de Carvacrol e a capacidade antioxidante total (CAT) e atividade de eliminação de radicais DPPH e ABTS

Composto	CAT (mg EAA /g)	DPPH (IC_{50} =mg/mL)	ABTS (IC_{50} =mg/mL)
% Carvacrol	0,645	-0,703	-0,617

0,6 positivo ou negativo indica uma forte correlação

Em *L. origanoides*, Teixeira (2013) também atribuiu ao carvacrol (39,80%) as melhores atividades antioxidantes no ensaio de DPPH. Avaliações da capacidade antioxidante realizados por Aazza et al. (2011) com diferentes óleos essenciais de plantas aromáticas (*Citrus aurantium*, *Cupressus sempervirens*, *Eucalyptus globulus*, *Foeniculum vulgare*, *Thymus vulgaris* e *Citrus limon*), demonstraram que o óleo essencial de *T. vulgaris*, rico em timol (12%) e carvacrol (16%), apresentou melhores resultados nos ensaios antioxidantes avaliados. O teor de carvacrol no óleo de *T. vulgaris* foi cerca de 4,6 vezes menor que no óleo de *P. amboinicus*, podendo-se deduzir uma provável atividade dose-dependente, já que o óleo de *P. amboinicus* apresentou uma atividade 10 vezes superior.

Da mesma forma amostras de óleo essencial de folhas de tomilho coletadas na França e tomilho comercial rico em timol, foram avaliados em relação às suas atividades antioxidantes por Chizzola et al. (2008). Os autores relataram que óleos essenciais com grandes quantidades de timol e/ou carvacrol mostraram altas atividades antioxidantes, corroborando também, com os dados encontrados neste trabalho.

3.3.1 Determinação do poder quelante

Dentre as diferentes diluições 1/10, 1/50, 1/100 e 1/400 avaliadas, pôde-se observar a olho nú que não houve reação uma vez que a coloração obtida para as amostras foram idênticas à do controle negativo. Esse fato, evidenciou que o óleo não possui atividade antioxidante baseada no teste do poder quelante. Dessa forma, como não foi observado atividade quelante na concentração de 50%, não foi possível o cálculo da IC₅₀. Os resultados foram expressos em porcentagem de quelação, os quais tiveram uma faixa de atividade entre 13,74% a 15,28%. Os resultados numéricos corroboraram à análise visual, confirmando que o óleo

essencial de *P. amboinicus* não possui atividade antioxidante baseada no poder quelante.

Conforme observado por Boulanouar et al. (2013) alguns dos óleos essenciais analisados por eles também não apresentaram atividade antioxidante baseada neste teste.

3.4 Inibição da alfa-amilase e lipoxigenase

As enzimas tiveram comportamentos diferenciados conforme mostrado na Tabela 4. No que se refere a inibição da α -amilase, não houve diferenças estatísticas entre os óleos coletados pela manhã em ambas formas de cultivo. No entanto, entre o óleo essencial extraído das plantas cultivadas em campo e em cultivo protegido, o do cultivo protegido demonstrou maior atividade para essa enzima, sendo o óleo coletado pela manhã com atividade superior em relação àquele das coletas realizadas no período da tarde.

Em relação à inibição da lipoxigenase, ambos os óleos do cultivo protegido tiveram, melhores atividades que os do campo e, similarmente, ao observado para a outra enzima, o óleo essencial da coleta realizada durante a manhã apresentou maior poder inibitório.

Tabela 4 Atividade inibitória da lipoxigenase e alfa-amilase dos óleos de *P. amboinicus*

Horários de coleta	Alfa-amilase (IC ₅₀ =mg/mL)	
	Canteiro	Casa de Vegetação
Manhã	0,65±0,01 aA	0,63±0,00 aA
Tarde	0,69±0,03 aA	0,66±0,01 bB
Horários de coleta	Lipoxigenase (IC ₅₀ =mg/mL)	
	Canteiro	Casa de Vegetação
Manhã	1,55±0,02 aB	1,50±0,04 aA
Tarde	1,58±0,01 bB	1,56±0,02 bA

Médias seguidas de mesma letra maiúscula na linha e de mesma letra minúscula na coluna não diferem significativamente em cada ensaio antioxidante segundo teste de Tukey ($p < 0,05$). **Alfa-amilase:** inibição da enzima alfa-amilase; Faseolamina: IC₅₀ = 0,0067±0,00 mg/mL **Lipoxigenase:** inibição da enzima lipoxigenase; NDGA: IC₅₀ = 0,020±0,03mg/mL. Os dados representam a média ± desvio padrão ($n=3$).

Em relação a atividade inibitória da enzima alfa-amilase comparada a faseolamina, os óleos essenciais das folhas de *P. amboinicus* não apresentaram atividade significativa, sendo cerca de 100 vezes menos potentes que o controle positivo. Não foram encontrados dados na literatura para comparação.

Em relação a atividade inibitória da enzima lipoxigenase comparada ao padrão NDGA, os óleos da espécie estudada também não apresentam atividade inibitória significativa, sendo cerca de 80 vezes menor que o controle positivo. Também não foi encontrada referências sobre a inibição da lipoxigenase para o óleo de *P. amboinicus*.

As lipoxigenases são enzimas que catalisam a adição de oxigênio molecular aos ácidos graxos polinsaturados contendo o sistema *cis,cis*-1,4 - pentadieno (AXELROD et al., 1981; MACK et al., 1987). Devido à produção desses peróxidos, compostos que são capazes de inibir essa enzima também podem ser considerados como antioxidantes (MIGUEL et al., 2014). Sendo assim, embora a atividade da lipoxigenase comparada ao padrão não tenha sido significativa para indicar um potencial efeito antiinflamatório e antioxidante

desse óleo, percebe-se claramente a correlação da atividade inibitória da lipoxigenase com as atividades antioxidantes. As análises de correlação de Pearson demonstraram correlação significativa entre os ensaios antioxidantes (CAT, DPPH e ABTS) e a atividade inibitória da enzima lipoxigenase (Figura 4 e Tabela 5). Na Figura 4a observa-se correlação negativa entre os ensaios de CAT, expresso em mg EAA/g, e de inibição da lipoxigenase, expresso em IC_{50} , o que indica relação da lipoxigenase com a atividade antioxidante. Em contrapartida, correlações positivas entre as IC_{50} do ensaio da lipoxigenase e das IC_{50} dos ensaios de DPPH e ABTS (Figuras 4b e 4c; Tabela 3), também demonstraram a participação da lipoxigenase em atividades antioxidantes.

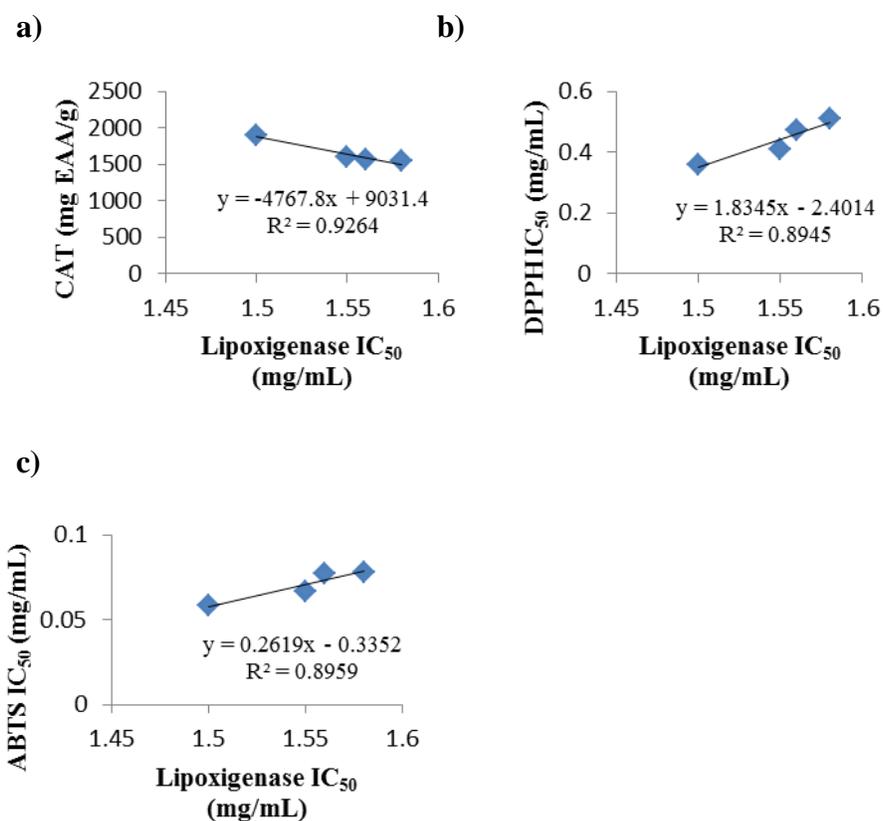


Figura 4 Correlação entre a atividade antioxidante e a atividade inibitória da lipoxigenase. (a, b, c). a) Capacidade antioxidante total (CAT), expresso em miligrama equivalente em ácido ascórbico por g de material vegetal (mg EAA/g). b) Eliminação de radicais livres DPPH expressos em IC₅₀ (mg/mL). c) Eliminação de radicais ABTS, expressos em IC₅₀ (mg/mL)

Tabela 5 Estimativas dos coeficientes de correlação de Pearson entre o poder inibitório da lipoxigenase e a capacidade antioxidante total (CAT) e atividade de eliminação de radicais DPPH e ABTS

Atividade	CAT (mg EAA /g)	DPPH (IC ₅₀ =mg/mL)	ABTS (IC ₅₀ =mg/mL)
Inibição da lipoxigenase	-0,962	0,946	0,947

0,6 para positivo ou negativo indica uma forte correlação

3.5 Análise antifúngica

Como mostrado na Tabela 1 a análise química do óleo essencial correspondente ao mix dos quatro óleos essenciais obtidos, demonstra a presença dos constituintes químicos dos quatro óleos, sendo o monoterpene aromático, carvacrol, o constituinte majoritário (71,04%).

O óleo essencial de *P. amboinicus* apresentou potencial anti-*Candida*, demonstrado pela sensibilidade das leveduras em discos impregnados com 5 µL de óleo essencial de *P. amboinicus* (Tabela 6). O volume usado (5µL) demonstra uma efetividade nas propriedades antifúngicas. Dentre as espécies de *Candida* analisadas, *C. albicans* (ATCC 90028) foi a que apresentou maior sensibilidade a esse óleo

Tabela 6 Atividade antifúngica do óleo essencial de *P.amboinicus*

Organismos	Diâmetro do halo (mm)
<i>C. rugosa</i> IZ-12	32±0,00
<i>C. kruseii</i> ATCC 6258	28±0,00
<i>C. topicalis</i> CBS 94	31±0,00
<i>C. dubliniensis</i> CBS 7987	40±0,00
<i>C. albicans</i> ATCC 90028	42±0,00
<i>C. utilis</i> CBS 5609	38±0,00
<i>C. kruseii</i> CBS 572	38±0,00
<i>C.lusitanea</i> IZ-06	36±0,00
<i>C.gablata</i> IZ-07	37±0,00
<i>C.gablata</i> ATCC 5207	38±0,00
<i>C. albicans</i> CBS 562	35±0,00

Os dados representam a média ± desvio padrão ($n=3$).

Nos estudos de Almeida et al. (2011) foram testados óleos essenciais de diversas espécies vegetais, entre elas *Ocimum basilicum* (manjeriço), *Cymbopogon martinii* (palmarosa), *Cyperus articulatus* (piprioca), *Thymus vulgaris* (tomilho) e *Cinnamomum cassia* (canela da china), frente a cepas de *C. albicans*. A atividade anti-*Candida* também foi avaliada pela medição dos valores dos halos de inibição e o método utilizado também foi o de disco-difusão em ágar. Os volumes de óleo utilizado foi de 20µL (4 vezes maior ao volume usado neste trabalho) e os valores dos halos de inibição dos óleos essenciais variaram entre 27 e 30mm enquanto o miconazol (controle positivo empregado) variou entre 8 e 10mm. Em nosso experimento, para *C. albicans*, o valor do halo de inibição variou entre 35 a 42mm usando somente 5µL do óleo essencial de *P. amboinicus* demonstrando seu o alto potencial anti-*Candida albicans*.

Compostos fenólicos como o carvacrol e o timol comprovadamente possuem elevada atividade frente a espécies de fungos. Nos estudos de Akgul e Kivanc (1988) foi observado que o óleo de *Origanum vulgare* (orégano) apresentou elevada atividade antifúngica e antibacteriana atribuídas à presença de carvacrol, constituinte majoritário do óleo analisado. Também nos estudos de Sridhar et al. (2003) a atividade antifúngica do óleo essencial de Ajowan (*Trachyspermum ammi*), frente ao fungo *Colletotrichum lindemuthianum*, foi bastante pronunciada. Nesse óleo o timol foi o principal constituinte. Misturas de carvacrol e timol também mostraram exercer inibição antifúngica total como mostrado para o óleo de orégano, sinalizando que os componentes fenólicos foram os responsáveis pela atividade antifúngica (LAMBERT et al., 2001; MURTHY et al., 2009). Estes estudos indicam claramente que a elevada atividade antifúngica do óleo de *P. amboinicus* pode estar relacionada a presença do carvacrol como principal constituinte do óleo essencial (Tabela 1).

A atividade antifúngica dos óleos essenciais em geral, segundo Silva et al. (2003), está relacionada com sua propriedade hidrofóbica. Dessa forma, quando o óleo entra em contato com fungo, há interação com os lipídeos da parede, membrana celular e da mitocôndria levando a uma alteração da sua permeabilidade e causando distúrbios estruturais. Essas alterações podem promover a exposição do conteúdo celular, inclusive a exposição do núcleo da célula, levando a morte celular.

4 CONCLUSÃO

O óleo essencial de *P. amboinicus* possui atividades antioxidante e antifúngica, *in vitro*, frente a linhagens de *Candida*. O carvacrol, principal constituinte do óleo essencial, evidencia ter grande responsabilidade por essas atividades.

As atividades inibitórias das enzimas lipoxigenase e alfa-amilase não foram significativas se comparadas ao controle positivo empregado.

AGRADECIMENTOS

A Rede Mineira de Ensaio Toxicológicos e Farmacológicos de Produtos Terapêuticos – RMTOXIFAR pelo apoio a pesquisa da parte microbiológica.

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo suporte financeiro ao projeto e concessão de bolsas de estudo e produtividade.

ANEXO A



EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA DE MINAS GERAIS

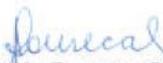


Avenida José Cândido da Silveira, 1647, Bairro União - Belo Horizonte - Minas Gerais - Brasil
 CEP 31.170-495 - Fone: 31 3489-5069 - Fax: 31 34895064
 E-mail: herbario@epamig.br ou andreiasilva@epamig.br

DECLARAÇÃO

Declaro que Simony Carvalho Mendonça, estudante do curso de Mestrado em Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, da Universidade Federal de Lavras (UFLA) depositou no Herbário PAMG, da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG), vouchers (exemplares-testemunho) das espécies listadas abaixo.

Nome Científico	Família	Registro
<i>Mikania laevigata</i> Sch.Bip. ex Baker	Asteraceae	PAMG 57818 (2 duplicatas)
<i>Plectranthusamboinicus</i> (Lour.) Spreng.	Lamiaceae	PAMG 57804 (2 duplicatas)
<i>Plectranthus barbatus</i> Andr.	Lamiaceae	PAMG 57803 (3 duplicatas)
<i>Plectranthus ornatus</i> Codd.	Lamiaceae	PAMG 57805


 Andréia Fonseca-Silva

957.639.106-72

Pesquisadora da EPAMIG, Curadora do Herbário PAMG

Herbário PAMG - Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (EPAMIG)
 Instituição Fiel Depositária, conforme Deliberação Nº 45, de 18 de Dezembro de 2003

REFERÊNCIAS

AAZZA, S. et al. Antioxidant and Antiacetylcholinesterase Activities of Some Commercial Essential Oils and Their Major Compounds. **Molecules**, Basel, v. 16, p. 7672-7690, Sept. 2011.

ADAMS, R. P. **Identification of essencial oils componentes by gas chromatography/mass spectroscopy**. 4th ed. Carol Stream: Allured, 2007. 804 p.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Deteção e Identificação dos fungos de importância médica**. Brasília, 2004. (Modulo VII).

AKGUL, A.; KIVANC, M. Inhibitory effects of selected Turkish spices and oregano components on some food borne fungi. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 6, n. 3, p. 263-268, 1988.

ALASBAHI, R. H.; MELZIG, M. F. *Plectranthus barbatus*: A Review of Phytochemistry, Ethnobotanical Uses and Pharmacology – Part 1. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 76, n. 7, p. 653-661, 2010.

ALMEIDA, L. F. D et al. *Screening* da atividade antifúngica de óleos essenciais sobre *Candida Albicans*. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, João Pessoa, v. 14, n. 4, p. 51-56, 2011.

ALMEIDA, R. R. **Mecanismos de ação dos monoterpenos aromáticos: timol e carvacrol**. 2015. 22 p. Monografia (Bacharel em Química) – Universidade Federal de São João Del Rei, São João Del Rei, 2015.

AMORATI, R. et al. Antioxidant activity of essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 61, n. 46, p. 10835-10847, Nov. 2013.

AXELROD, V. et al. Lipoxigenase from soybeans. **Methods in Enzymology**, New York, v. 71, p. 441- 451, 1981.

BANDEIRA, J. M.; et al. Composição do óleo essencial de quatro espécies do gênero *Plectranthus*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 13, n. 2, p. 157-164, 2011.

BOULANOUAR, B. et al. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. **Industrial Crops and Products**, Berlin, v. 46, p. 85-96, 2013.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**. Brasília, 2006. p. 60.

CARNEIRO, F. B. et al. Variação da quantidade de β -cariofileno em óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng., Lamiaceae, sob diferentes condições de cultivo. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, p. 600-606, ago./set. 2010.

CASTILLO, R. A. M.; GONZÁLEZ, V. P. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, La Habana, v. 33, p. 23-32, 1999.

CHIZZOLA, R. et al. Antioxidative properties of *Thymus vulgaris* leaves: comparison of different extracts and essential oil chemotypes. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 56, n. 16, p. 6897-6904, Aug. 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Method for antifungal disk diffusion susceptibility testing of yeasts; approved guideline**. 2nd ed. Wayne: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2009. (Document M44-A2).

DOMIJAN, A. M. et al. Seed-borne fungi and ochratoxin A contamination of dry beans (*Phaseolus vulgaris* L.) in the Republic of Croatia. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 43, p. 427-432, 2005.

DORNER, J. W.; COLE, R. J. Effect of application of nontoxigenic strains of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus* on subsequent aflatoxin contamination of peanuts in storage. **Journal of Stored Products Research**, Oxford, v. 38, n. 4, p. 329–339, 2002.

- DUDONNE, S. et al. Comparative study of antioxidant properties and total phenolic content of 30 plant extracts of industrial interest using DPPH, ABTS, FRAP, SOD, and ORAC assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 57, p. 1768-1774, 2009.
- ELSOHLY, H. N. et al. The medicinal plants in our time. **Phytochemistry**, New York, v. 8, p. 124-127, 1997.
- FAIRBAIRN, J. W.; SUWAL, P. N. Bioactive natural products. **Phytochemistry**, New York, v. 1, p. 38-41, 1961.
- FERREIRA, D. F. **SISVAR**: sistema de análise de variância: versão 5.3. Lavras: UFLA, 2010.
- FOSTEL, J. M.; LARTEY, P. A. Emerging novel antifungal agents. **Drug Discovery Today**, Oxford, v. 5, p. 25-32, 2000.
- FREIRE, M. F. I. Plantas medicinais: a importância do saber cultivar. **Revista Científica Eletrônica de Agronomia**, Garça, v. 3, n. 5, p. 1-9, 2004.
- KRITZINGER, Q. et al. Effect of essential plant oils on storage fungi, germination and emergence of cowpea seeds. **Seed Science and Technology**, Zürich, v. 30, n. 3, p. 609-619, 2002.
- LAMBERT, R. J. W. et al. A study of the minimum inhibitory concentration and mode of action of oregano essential oil, thymol and carvacrol. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 91, p. 453-462, 2001.
- LING, L. T. et al. Standardised *Mangifera indica* extract is an ideal antioxidant. **Food Chemistry**, London, v. 113, n. 4, p. 1154-1159, Apr. 2009.
- LORDÊLLO, D. M. S. **Disponibilidade hídrica no crescimento, acúmulo e composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* L. e estudo comparativo de atividades antioxidantes em espécies de mentas**. 2015. 98 p. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2015.
- MACK, A. J. et al. Lipxygenase isozymes in higher plants: biochemical properties and physiological role. **Current Topics in Biological and Medical Research**, Bethesda, v. 13, p. 127-154, 1987.

MIGUEL, M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, Basel, v. 15, n. 12, p. 9252-9287, Dec. 2010.

MIGUEL, M. et al. Antioxidant, anti-inflammatory and anti-acetylcholinesterase activities of eleven extracts of morrocan plants. **Fresenius Environmental Bulletin**, Washington, v. 6, n. 24, p. 1-14, Feb. 2014.

MORAIS, S. M. et al. Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, p. 169-177, 2005.

MURASHIGE, T.; SKOOG, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. **Physiologia Plantarum**, Sweden, v. 15, n. 3, p. 473-497, July 1962.

MURTHY, P. S. et al. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. **Food Chemistry**, London, v. 114, p. 1014-1018, 2009.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARDS AND TECHNOLOGY. **PC version 2.0 of the NIST/EPA/NIH Mass Spectral Library**. Gaithersburg, 2008.

OLIVEIRA R. A. G. et al. Interference of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on the anti-*Candida* activity of some clinically used antifungals. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, São Paulo, v. 17, n. 2, p. 186-190, Apr./June 2007.

OZGEN, U. et al. Antioxidant properties of some medicinal Lamiaceae (Labiatae) species. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 44, n. 2, p. 107-112, Oct. 2006.

PANDEY, R. et al. Essential oils as potent sources of nematicidal compounds. **Journal of Phytopathology**, Saint Paul, v. 148, n. 7, p. 501-502, 2000.

PATTNAIK, S. et al. Antibacterial and antifungal activity of ten essential oils in vitro, **Microbios**, San Francisco, v. 86, n. 1, p. 237-246, 1996.

PEDROSO, R. S. et al. Sensibilidade de isolados de *Candida* spa a antifúngicos por disco-difusão em ágar e microdiluição em caldo. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 1, p. 304-311, jan./fev. 2014.

PEIXOTO-NEVES, D. et al. Vasorelaxant effects of the monoterpenic phenol isomers, carvacrol and thymol, on rat isolated aorta. **Fundamental Clinical Pharmacology**, Paris, v. 24, p. 341-350, 2010.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analysis Biochemistry**, Oxford, v. 269, n. 2, p. 337-341, June 1999.

RE, R. et al. Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 26, n. 10, p. 1231-1237, May 1999.

RICE, L. J. et al. *Plectranthus*: a plant for the future? **South African Journal of Botany**, Pretoria, v. 77, p. 947-959, 2011.

RODRIGUES, F. F. G. et al. Study of the Interference between *Plectranthus* Species Essential Oils from Brazil and Aminoglycosides. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, Taiwan, v. 1, p. 1-7, 2013.

SÁ JÚNIOR, A. et al. Application of the Koppen classification for climatic zoning in the state of Minas Gerais, Brazil. **Theoretical and Applied Climatology**, Wien, v. 108, p. 1-7, 2012.

SALES, P. M. **Estudo biomonitorado do epicarpo do fruto de *Pouteria torta* (Mart.) Ralck por ensaio de atividade de inibição da alfa-amilase**. 2012. 165 p. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Brasília, Brasília, 2012.

SANTOS, A. Determinação do rendimento e atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf em função de sazonalidade e consorciamento. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 19, n. 2A, p. 436-441, abr./jun. 2009.

SANTOS, H. G. et al. (Ed.). **Sistema brasileiro de classificação de solos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Embrapa Solos, 2006. 306 p.

SCHUHMACHER, A. et al. Virucidal effect of peppermint oil on the enveloped viruses herpes simplex virus type 1 and type 2 *in vitro*. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 10, n. 6-7, p. 504-510, 2003.

SELLAR, W. **Óleos que curam: o poder da aromaterapia**. Rio de Janeiro: Nova Era, 2002. 230 p.

SENTHILKUMAR, A.; VENKATESALU, V. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oil of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against *Anopheles stephensi*: a malarial vector mosquito. **Parasitology Research**, Berlin, v. 107, p. 1275-1278, 2010.

SILVA, M. G. V. et al. Chemical variation during daytime of constituents of the essential oil of *Ocimum gratissimum* leaves. **Fitoterapia**, Milano, v. 70, p. 32-34, 1999.

SILVA, S. R. S. et al. Análise de constituintes químicos e da atividade antimicrobiana do óleo essencial de *Melaleuca alternifolia* Cheel. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 6, p. 63-70, 2003.

SRIDHAR, S. R. et al. Antifungal activity of some essential oils. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, p. 7596-7599, 2003.

STEINHILBER, D. 5-Lipoxygenase: a target for anti-inflammatory drugs revisited. **Current Medicinal Chemistry**, Scriphol, v. 6, p. 71-85, 1999.

TEIXEIRA, M. L. **Óleos essenciais de *Lippia origanoides* L. e *Mentha spicata* L.: Composição química, potencialidades biológicas e caracterização das estruturas secretoras**. 2013. 127 p. Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

TÔRRES, A. R. et al. Estudo sobre o uso de plantas medicinais em crianças hospitalizadas da cidade de João Pessoa: riscos e benefícios. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, p. 373-380, 2005.

VERA, R. et al. Chemical composition of the essential oil and aqueous extract of *Plectranthus amboinicus*. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 59, p. 182-183, 1993.

XIAO, Z. et al. A quantitative starch-iodine method for measuring alpha-amylase and glucoamylase activities. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 351, n. 1 p. 146-148, 2006.