

Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Farmácia  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**ÓLEOS VOLÁTEIS DE ESPÉCIES DE *OCOTEA* NATIVAS DO RIO GRANDE DO  
SUL: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-  
INFLAMATÓRIA E ANTIFÚNGICA**

Dissertação de Mestrado

MICHELE ANDRÉIA RAMBO

Porto Alegre, 2014



Universidade Federal do Rio Grande do Sul  
Faculdade de Farmácia  
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas

**ÓLEOS VOLÁTEIS DE ESPÉCIES DE *OCOTEA* NATIVAS DO RIO GRANDE DO  
SUL: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-  
INFLAMATÓRIA E ANTIFÚNGICA**

Dissertação apresentada por **Michele  
Andréia Rambo** para obtenção do GRAU DE  
MESTRE em Ciências Farmacêuticas

Orientador: Miriam Anders Apel

Porto Alegre, 2014

Dissertação apresentada no Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, em nível de Mestrado acadêmico da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e aprovada em 31 de Março de 2014, pela banca Examinadora constituída por:

Prof. Dr. Gilsane Lino Von Poser

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Rubem Mario Figueiró Vargas

Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS)

Dr. Grazielle Pereira Ramos Pedrazza

Universidade Federal do Rio Grande do sul

#### CIP - Catalogação na Publicação

Rambo, Michele Andréia

ÓLEOS VOLÁTEIS DE ESPÉCIES DE OCOTEA NATIVAS DO RIO GRANDE DO SUL: COMPOSIÇÃO QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTI-INFLAMATÓRIA E ANTIFÚNGICA / Michele Andréia Rambo. -- 2014.

122 f.

Orientadora: Miriam Anders Apel.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, BR-RS, 2014.

1. Ocotea . 2. Óleo volátil. 3. Atividade anti-inflamatória. 4. Atividade antioxidante. 5. Atividade antifúngica. I. Anders Apel, Miriam, orient. II. Título.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Farmacognosia e no Laboratório de Micologia Aplicada do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Campus da Saúde, Porto Alegre.

Agradecemos ao CNPq pelo suporte financeiro e pela bolsa recebida durante o desenvolvimento deste trabalho.



Dedico este trabalho aos meus pais,  
Pelo exemplo, amor, amizade e apoio incondicional  
Eu amo vocês



## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por me capacitar, dar força, sabedoria, superação, coragem e ainda ser meu refúgio nos momentos difíceis.

Aos meus pais, Irineu e Dulce, pelo amor, carinho, amizade, compreensão, paciência, educação e suporte financeiro. Eu amo muito vocês e tenho muito orgulho de ser sua filha!

Ao meu irmão Douglas e minha cunhada Renata, que me incentivaram a entrar nesse caminho acadêmico e pela paciência quando passei por momentos difíceis.

Ao meu namorado, Bruno, pela amizade, amor, compreensão, paciência, carinho, dedicação, cumplicidade e por me incentivar todos os dias a não desistir dos meus objetivos e sonhos.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup> Miriam Anders Apel, pela sua disposição, apoio, amizade, ensinamentos e paciência demonstrados durante sua orientação. Além de seus ensinamentos, por não medir esforços para me ajudar durante toda a pesquisa e ainda por acreditar que eu era capaz.

Ao Dr. Alexandre M. Fuentefria, pela disposição, pelo apoio, pelos seus ensinamentos e por estar sempre à disposição partilhando seus conhecimentos.

Ao botânico, Sérgio Bordignon, pelo seu trabalho na identificação e coleta das plantas, sem seu trabalho, nada teria sido possível.

As minhas amigas, Christina, Fernanda, Kássia, Krissie e Rejane, obrigada pela amizade, carinho, paciência, risadas, festas, parceria, choro... Vocês são muito especiais e sempre estiveram comigo nos momentos bons e ruins em que passei. Levo todas em meu coração.

As queridas, Michele Milk, Aline Foza e Andrieli, muito obrigada pela ajuda, amizade, paciência, carinho. Vocês são anjos que Deus colocou em meu caminho quando eu precisei. Muito obrigada por tudo!

As minhas amigas Luana e Marcell, muito obrigada pela amizade, risadas, carinho, companheirismo e por fazer meus dias na UFRGS mais alegres e divertidos na companhia de vocês. Com vocês não tem tempo e nem dia ruim.

Aos meus amigos do Laboratório da Farmacognosia, Juliana, Roger e Luciana, pela amizade e ajuda nos momentos difíceis.

As Controlets do meu coração, Luana, Luiza, Bruna, Marina, Sara e Letícia, obrigada pela amizade, carinho, compreensão e por estarem comigo nos momentos difíceis, me dando incentivo, apoio, para ser forte e continuar meu caminho.

As micogirls, Daiane, Gabriella e Vanessa, pela paciência nos ensinamentos, amizade, carinho, risadas no laboratório.

Aos professores da Uri-Campus Santo Ângelo, por terem sido fundamentais na minha construção acadêmica e pelos seus ensinamentos.

A Ivane, por sempre estar disposta a ajudar o próximo com um sorriso lindo no rosto.

Aos professores da Pós-Graduação da UFRGS, pelos novos aprendizados no decorrer desta nova etapa de minha vida.

Ao CNPq pela bolsa concedida na realização deste trabalho.

Muito Obrigada a Todos

“O caminho pode ser longo e difícil, mas eu vou conseguir chegar onde eu quero,  
pois a minha vontade é maior”

Autor Desconhecido



## SUMÁRIO

<b>RESUMO.....</b>	<b>xvii</b>
<b>ABSTRAT.....</b>	<b>xix</b>
<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>xxi</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>xxiii</b>
<b>LISTA DE ESQUEMA.....</b>	<b>xxv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....</b>	<b>xxvii</b>
<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>27</b>
<b>1. OBJETIVO.....</b>	<b>31</b>
<b>1.1 Objetivo Geral.....</b>	<b>33</b>
<b>1.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>33</b>
<b>2. REVISÃO DA LITERATURA.....</b>	<b>35</b>
<b>2.1 Óleos voláteis.....</b>	<b>37</b>
2.1.1 Terpenóides.....	39
2.1.2 Monoterpenos.....	42
2.1.3 Sesquiterpenos.....	44
<b>2.2 Considerações sobre a família Lauraceae.....</b>	<b>47</b>
<b>2.3 Considerações sobre o gênero Ocotea .....</b>	<b>49</b>
<b>2.4 Revisão química e biológica.....</b>	<b>51</b>
<b>2.5 Atividade antifúngica.....</b>	<b>55</b>
2.5.1 Dermatófitos.....	58
2.5.2 Candida spp.....	59
2.5.2.1 Candida parapsilosis.....	60
<b>2.6 Atividade anti-inflamatória.....</b>	<b>63</b>
<b>2.7 Atividade antioxidante.....</b>	<b>64</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>65</b>

<b>3.1 Material vegetal.....</b>	<b>69</b>
<b>3.2 Obtenção do óleo volátil.....</b>	<b>69</b>
<b>3.3 Análise química do óleo volátil.....</b>	<b>69</b>
3.3.1 Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas.....	69
3.3.2 Identificação dos componentes.....	69
<b>3.4 Atividade antifúngica.....</b>	<b>70</b>
3.4.1 Preparo da amostra.....	71
3.4.2 Preparo do inóculo fúngico para os testes de susceptibilidade .....	71
3.4.3 Avaliação da atividade antifúngica dos óleos voláteis pelo método de microdiluição em placa.....	71
3.4.4 Material utilizado.....	71
<b>3.5 Atividade anti-inflamatória.....</b>	<b>72</b>
<b>3.6 Atividade antioxidante.....</b>	<b>73</b>
<b>3.7 Procedimentos para tratamento dos resíduos.....</b>	<b>73</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>75</b>
<b>4.1 Análise química dos óleos voláteis.....</b>	<b>77</b>
4.1.1 <i>Ocotea acutifolia</i> (Nees) Mez.....	77
4.1.2 <i>Ocotea indecora</i> (Schott) Meisn. ex Mez.....	79
4.1.3 <i>Ocotea puberula</i> (Rich.) Nees.....	84
4.1.4 <i>Ocotea silvestris</i> Vattimo-Gil.....	88
4.2 Atividade Antifúngica.....	90
<b>4.3 Atividade Anti-inflamatória.....</b>	<b>93</b>
<b>4.4 Atividade Antioxidante.....</b>	<b>94</b>
<b>DISCUSSÃO GERAL.....</b>	<b>95</b>
<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>101</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>103</b>

## RESUMO

O gênero *Ocotea* Aubl. (Lauraceae), amplamente distribuído no estado do Rio Grande do Sul, foi investigado visando a análise química dos óleos voláteis e a avaliação *in vitro* das atividades anti-inflamatória, antioxidante e antifúngica dos óleos obtidos. Foram coletadas quatro espécies de *Ocotea* (*O. acutifolia*, *O. indecora*, *O. puberula* e *O. silvestris*) em diversas localidades do Rio Grande do Sul. A composição química foi determinada por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas, onde os óleos apresentaram predominância de sesquiterpenos. Não foi observada a presença de monoterpenos nas espécies estudadas, exceto para uma das coletas realizadas para *O. indecora*, cujo óleo apresentou 16% de monoterpenos hidrocarbonetos, representados em especial por beta-pineno. Para uma das espécies, *O. acutifolia*, foi observada a predominância de um diterpeno no óleo. A atividade anti-inflamatória foi realizada pelo método da câmara de Boyden, sendo que nenhum óleo analisado apresentou atividade. Na avaliação da atividade antioxidante, esta foi determinada pela reação com 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) por espectrofotometria. Apenas o óleo de *O. silvestris* foi testado, e o resultado foi negativo para essa atividade. A avaliação da atividade antifúngica foi realizada através da concentração inibitória mínima e os óleos voláteis testados apresentaram uma inibição no crescimento da cepa de *Candida parapsilosis* numa concentração de 500 µg/mL.

Palavras-chave: *Ocotea*, óleo volátil, Lauraceae, atividade anti-inflamatória, atividade antioxidante e atividade antifúngica.



## ABSTRACT

### VOLATILE OILS OF *OCOTEA* NATIVE SPECIES OF RIO GRANDE DO SUL: CHEMICAL COMPOSITION AND ANTIOXIDANT, ANTI-INFLAMMATORY AND ANTIFUNGAL ACTIVITIES

The genus *Ocotea* Aubl. (Lauraceae), widely distributed in the state of Rio Grande do Sul, was investigated aiming to chemical analysis of volatile oils and in vitro evaluation of anti-inflammatory, antioxidant and antifungal activities of the obtained oils. Four species of *Ocotea* (*O. acutifolia*, *O. indecora*, *O. puberula* and *O. silvestris*) were collected from different localities of Rio Grande do Sul. The chemical compositions was determined by gas chromatography coupled to mass spectrometry, where the oils showed a predominance of sesquiterpenes. *O. indecora*, except for, it was observed the absence of monoterpenes in the studied species. In this species, the oil presents 16% hydrocarbon monoterpenes represented in particular beta-pinene. For one species, *O. acutifolia*, the predominance of a diterpene in the oil was observed. The anti-inflammatory activity was evaluated by the Boyden Chamber method, and this activity was observed for the tested oils. In the evaluation of antioxidant activity, this was determined by reaction with 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) by spectrophotometry method. In this test only the oil, *O. silvestris* was tested and the result was negative for this activity. The evaluation of antifungal activity was performed by minimum inhibitory concentration and volatile oils tested showed an inhibition in the growth of *Candida parapsilosis* strain at a concentration of 500 µg/mL.

Keywords: *Ocotea*, volatile oils, Lauraceae, anti-inflammatory activity, antioxidant activity and antifungal activity.



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Unidade básica de formação de terpenos.....	39
<b>Figura 2.</b> Biossíntese dos monoterpenos.....	42
<b>Figura 3.</b> Biossíntese dos sesquiterpenos.....	44
<b>Figura 4.</b> Quimiosistemática da Família Lauraceae.....	47
<b>Figura 5.</b> Processo de formação de espécies reativas de oxigênio.....	65
<b>Figura 6.</b> Cromatograma das folhas de <i>Ocotea acutifolia</i> (Nees) Mez.....	79
<b>Figura 7.</b> Componentes majoritários do óleo volátil de <i>Ocotea acutifolia</i> .....	79
<b>Figura 8.</b> Cromatograma das folhas de <i>Ocotea indecora</i> (SA).....	83
<b>Figura 9.</b> Cromatograma das folhas de <i>Ocotea indecora</i> (SV).....	83
<b>Figura 10.</b> Componentes majoritários de <i>Ocotea indecora</i> (SA).....	83
<b>Figura 11.</b> Componentes majoritários de <i>Ocotea indecora</i> (SV) .....	84
<b>Figura 12.</b> Cromatograma das folhas de <i>Ocotea puberula</i> (coleta 1).....	87
<b>Figura 13.</b> Cromatograma das folhas de <i>Ocotea puberula</i> (coleta 2).....	87
<b>Figura 14.</b> Estrutura química de <i>Ocotea puberula</i> (coleta 1).....	87
<b>Figura 15.</b> Estrutura química de <i>O. puberula</i> (coleta 2).....	88
<b>Figura 16.</b> Cromatograma das folhas de <i>Ocotea silvestris</i> (coleta 1).....	89
<b>Figura 17.</b> Cromatograma das folhas de <i>Ocotea silvestris</i> (coleta 2).....	90
<b>Figura 18.</b> Fluxograma de trabalho realizado para a atividade antifúngica.....	91
<b>Figura 19.</b> Porcentagem de terpenoides encontrados nas espécies de <i>Ocotea</i> .....	98



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Dados de coleta e rendimento dos óleos voláteis obtidos a partir das espécies coletadas.....	77
<b>Tabela 2.</b> Composição química do óleo volátil das folhas de <i>Ocotea acutifolia</i> (Nees) Mez coletadas em Caçapava do Sul.....	78
<b>Tabela 3.</b> Composição química do óleo volátil das folhas de <i>Ocotea indecora</i> coletadas em Santo Antônio da Patrulha.....	82
<b>Tabela 4.</b> Composição química do óleo volátil de diferentes coletas de <i>Ocotea puberula</i> .....	86
<b>Tabela 5.</b> Identificação e comparação química de espécies de <i>Ocotea silvestris</i> .....	89
<b>Tabela 6.</b> Screening contra fungos filamentosos e leveduriformes de diferentes espécies de <i>Ocotea</i> .....	92



## LISTA DE ESQUEMAS

<b>Esquema 1.</b> Processo de formação de terpenos derivados de DMAPP E IPP pela via do ácido mevalônico.....	40
<b>Esquema 2.</b> Vias de formação do isopreno.....	41
<b>Esquema 3.</b> Estruturas dos núcleos monoterpênicos.....	43
<b>Esquema 4.</b> Ciclização do pirofosfato de farnesila por terpeno ciclases.....	45
<b>Esquema 5.</b> Estruturas formadas pela enzima $\delta$ -selineno sintase.....	46



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CG/MS	Cromatografia à gás acoplada à espectrometria de massas
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	Clinical Laboratory Standart Institute
DAMPP	Difosfato de dimetilalila
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazila
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GPP	Pirofosfato de geranila
IPP	Difosfato de Isopentanila
LPS	Lipopolissacarídeo de <i>Escherichia coli</i>
UV	Ultravioleta







As plantas são fontes naturais ricas em compostos capazes de exercer as mais diversas ações farmacológicas. Essa característica, aliada à sua grande diversidade química, faz dos produtos de origem vegetal excelente matéria-prima para a síntese de novos fármacos, sendo que variações morfológicas podem ocorrer dentro da mesma espécie em função da sua adaptação a locais e climas diferentes. O conhecimento da composição química pode, ainda, auxiliar na sua classificação botânica. Entre os produtos do metabolismo secundário vegetal mais promissores de mais fácil acesso para a pesquisa de compostos ativos, encontram-se os óleos voláteis ou essenciais, que têm sido considerados o maior grupo de produtos naturais e fonte potencial de substâncias biologicamente ativas (DEMYTTENAERE e KIMPE, 2001; BELTRAME et al., 2010; FREIRE et al., 2011).

Os óleos voláteis se caracterizam pela sua alta volatilidade e odor. Essas substâncias têm sido empregadas em grande escala nas indústrias farmacêuticas, principalmente na sua utilização em cosméticos, perfumaria e ainda em condimentos, devido as suas propriedades biológicas, tais como, atividades anti-inflamatória, antioxidante e antifúngica (KAMATOU et al., 2007; KOSE et al., 2010; SANTURIO et al., 2011; ANDRADE et al., 2012).

O aumento de resistência aos antifúngicos tem levado ao desenvolvimento de inúmeras pesquisas em busca de alternativas de tratamento e profilaxia, como a investigação de atividade farmacológica em substâncias isoladas de plantas (BAJPAI et al., 2009). Entre essas substâncias encontram-se os terpenoides, compostos presentes nos óleos voláteis, originados do metabolismo secundário dos vegetais, e caracterizados como estruturas complexas, que demonstram importantes atividades biológicas, entre elas, antibacteriana e antifúngica, tornando-se possíveis alternativas de tratamento dessas infecções (KAMATOU et al., 2007; LOPES-LUTZ et al., 2008; SINGH et al., 2008; BAJPAI et al., 2009; AHMADI et al., 2010; KÖSE et al., 2010).

As dermatomicoses são infecções fúngicas comuns entre as infecções humanas e em animais, causadas por fungos dermatófitos dos gêneros *Epidermophyton*, *Microsporum* e o *Trichophyton*. Estes fungos infectam a pele, as unhas e o couro cabeludo. Por outro lado, algumas micoses superficiais podem estar associadas à presença de leveduras, dentre elas, o gênero *Candida*, sendo que estas podem ser

encontrada em pequena quantidade na pele sadia, mas pode rapidamente colonizar a pele danificada (DA SILVA, 2005).

A diversidade de plantas medicinais, algumas caracterizadas pela presença de substâncias com atividade antifúngica, contribui para estudos que objetivam demonstrar a ação e eficácia de alguns compostos, os quais poderão ser empregados na terapia antifúngica (DA SILVA, 2005).

O uso indiscriminado de antimicrobianos vem trazendo um aumento crescente no número de cepas resistentes ao tratamento convencional, principalmente em pacientes imunocomprometidos que fazem uso de antifúngicos azóis na profilaxia de infecções micóticas (McCARRON et al., 2004; PANÁCEK et al., 2009).

Em associação à atividade antimicrobiana, muitos dos óleos voláteis apresentam propriedades anti-inflamatórias e antioxidantes. Um composto com essas propriedades auxilia de forma significativa na cicatrização da lesão, já que infecções concomitantemente desencadeiam um processo inflamatório (WU e TEIK, 2007; OLIVEIRA et al., 2011). A ação anti-inflamatória associada à ação antifúngica em um único composto tem a vantagem de limitar sintomas, como prurido, ardor e eritema, enquanto que o efeito antioxidante elimina os radicais livres responsáveis pelo dano tecidual durante o processo inflamatório (TEPE et al., 2007; HAVLICKOVA e FRIEDRICH, 2008; MASTELIC et al., 2008; JIA et al., 2010).

O gênero *Ocotea* Aubl. (Lauraceae), de ocorrência natural no estado do Rio Grande do Sul, é quimicamente caracterizado pela presença de óleos voláteis e atividades como antioxidante, anti-inflamatória, antimicrobiana, analgésica dentre outras, têm sido reportadas para espécies deste gênero. Dessa forma, os objetivos da presente proposta são a análise dos óleos voláteis em espécies de *Ocotea* de ocorrência no Rio Grande do Sul, para as quais não há nenhum relato químico ou farmacológico, e a avaliação *in vitro* da atividade antifúngica, anti-inflamatória e antioxidante dos óleos obtidos.





## 1.1 Objetivo Geral

Tendo em vista a importância dos óleos voláteis, o presente trabalho visou à análise da composição química do óleo volátil do gênero de *Ocotea* Aubl. (Lauraceae) nativas do Rio Grande do Sul e a investigação de suas atividades biológicas.

## 1.2 Objetivos específicos

- Análise da composição química de óleos voláteis extraídos de folhas de plantas do gênero *Ocotea* coletadas no Rio Grande do Sul:
  - Obtenção do óleo volátil por hidrodestilação utilizando aparelho tipo Clevenger;
  - Caracterização química dos óleos voláteis obtidos por cromatografia à gás acoplada a espectrômetro de massas;
- Avaliação da atividade antifúngica contra fungos filamentosos e leveduriformes de interesse clínico.
- Avaliação da ação anti-inflamatória *in vitro* dos óleos voláteis obtidos pelo método da câmara de Boyden.
- Avaliação da atividade antioxidante dos óleos voláteis utilizando o ensaio colorimétrico com DPPH (1,1-difenil-2-picrilidrazila).







## 2.1 Óleos voláteis

As plantas são fontes naturais, ricas em compostos capazes de exercer as mais diversas ações farmacológicas. Essa característica, aliada à sua grande diversidade química, faz dos produtos de origem vegetal excelente matéria-prima para a síntese de novos fármacos. Entre os produtos do metabolismo vegetal mais promissores e de mais fácil acesso para a pesquisa de compostos ativos, encontram-se os óleos voláteis ou essenciais, que nos últimos anos têm sido considerados fonte potencial de substâncias biologicamente ativas. Conforme definição da ANVISA (BRASIL, 1999), “óleos essenciais são produtos voláteis de origem vegetal obtidos por processo físico e que podem se apresentar isoladamente ou misturados entre si, retificados, desterpenados ou concentrados”. Podem ser encontrados em todas as estruturas vegetais, sendo obtidos por diferentes processos, dependendo da localização no vegetal, da quantidade e das características requeridas para o produto final. As técnicas mais usuais para sua obtenção são: prensagem ou expressão, extração com solventes orgânicos ou gorduras, com fluido supercrítico, destilação por arraste de vapor ou, ainda, por *headspace*. (BELTRAME et al., 2010; FREIRE et al., 2011).

São misturas complexas de substâncias voláteis, lipofílicas, geralmente líquidas e odoríferas, não possuem na sua constituição ésteres glicerílicos dos ácidos graxos, não deixam manchas gordurosas e não são saponificados com álcalis. Podem ser chamadas de óleos etéreos ou essências ou ainda óleos essenciais. Estas nomenclaturas provêm de suas características físico-químicas e designam produtos odorantes não formados anteriormente na planta. Sua principal característica é a volatilidade, diferenciando-se assim dos óleos voláteis fixos (SANTURIO et al., 2007; BELTRAME et al., 2010).

Os óleos essenciais derivados de plantas que são utilizados como condimentos, apresentam complexas misturas de substâncias naturais, que são utilizadas para acentuar o paladar ou o aroma de alguns alimentos. Estes ocupam um papel importante nas indústrias de insumos farmacêuticos, agroalimentícias, perfumaria e cosméticos, não somente pela possibilidade de obtenção de compostos aromáticos, mas também para a obtenção de compostos com propriedades

terapêuticas, proteção contra os processos de oxidação ou ainda deterioração por microrganismos (SANTURIO et al., 2011; ANDRADE et al., 2012).

Os óleos voláteis não apresentam distribuição muito ampla no reino vegetal, sendo encontrados em aproximadamente 50 famílias. Dentre elas, Lamiaceae (*Mentha ssp.*), Myrtaceae (*Psidium ssp.*), Poaceae (*Cymbopogon ssp.*), Lauraceae (*Ocotea ssp.*), Rosaceae (*Rosa ssp.*) e Asteraceae (*Matricaria ssp.*, *Calendula ssp.*) são bastante conhecidas por suas propriedades aromáticas relacionadas a eles.

A composição química de óleos voláteis pode variar amplamente, desde hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas, até compostos com nitrogênio e enxofre. Toda essa diversidade funcional, no entanto, pode ser agrupada em duas séries principais: a série aromática e a série terpênic (BELL e CHARLWOOD, 1980).

Na série aromática são classificados os derivados do fenilpropano (C<sub>6</sub>-C<sub>3</sub>), oriundos do metabolismo do ácido chiquímico. Esses compostos são formados por reações de transaminação enzimática da fenilalanina e da tirosina que originam os ácidos cinâmico e *p*-cumárico, respectivamente. Os derivados mais comuns em óleos voláteis são as cumarinas e alguns aldeídos aromáticos (GEISSMAN e CROUT, 1969; GUIGNARD et al., 1985). Na série terpênic, quantitativamente mais numerosa e qualitativamente mais variada encontram-se os monoterpenos, compostos cujo esqueleto é formado por 10 átomos de carbono e os sesquiterpenos, com 15 átomos, arranjados em estruturas acíclicas, monocíclicas, bicíclicas e tricíclicas (CROTEAU, 1987; CANE, 1990).

Muitas atividades farmacológicas são atribuídas aos óleos voláteis, mas devido à complexidade de sua composição química é difícil relacionar as atividades a um único componente. Ênfase tem sido dada às propriedades: antimicrobiana, antiviral, anestésica, analgésica, anti-inflamatória, anticolinesterásica, antioxidante, anticancerígena, anti-helmíntica, antiparasitária e antimalárica, além de sua ação sobre o sistema nervoso central. Geralmente, a ação atribuída a um composto isolado pode não ser exata, devido a interações que podem ocorrer entre os componentes do óleo (TEPE et al., 2005).

A maior parte dos trabalhos foi realizada com os óleos sem fracionamento e, em alguns casos sem a identificação dos componentes químicos. Em outros, a ação foi atribuída a algum dos componentes do óleo, com base em estudos realizados com substâncias isoladas. Entretanto, substâncias presentes em menor quantidade podem contribuir, pelo menos em parte, para a ação, possivelmente pela ocorrência de sinergismo entre os compostos do óleo.

### 2.1.1 Terpenoides

Os terpenoides constituem uma classe de produtos naturais com uma grande diversidade estrutural, e até o momento, observa-se o maior número de substâncias descritas. Estes são biossinteticamente originados da condensação enzimática de unidades isoprênicas (5 átomos de carbono), mostrados na Figura 1, que podem ser unidas por ligações cauda-cabeça ou ainda cabeça-cauda, sendo que esta última é a forma preferencial destas ligações, possibilitando a formação de diversos grupos de terpenos, tais como: hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), sesterpenos (C25), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40). Os precursores dos terpenos são identificados como ésteres difosfatos denominados pirofosfato de dimetilalila (DMAPP) e pirofosfato de isopentilalila (IPP) mostrados no Esquema 1.

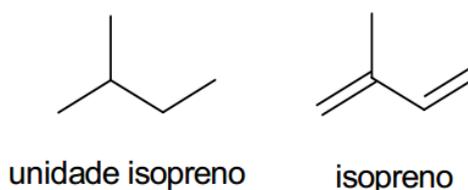
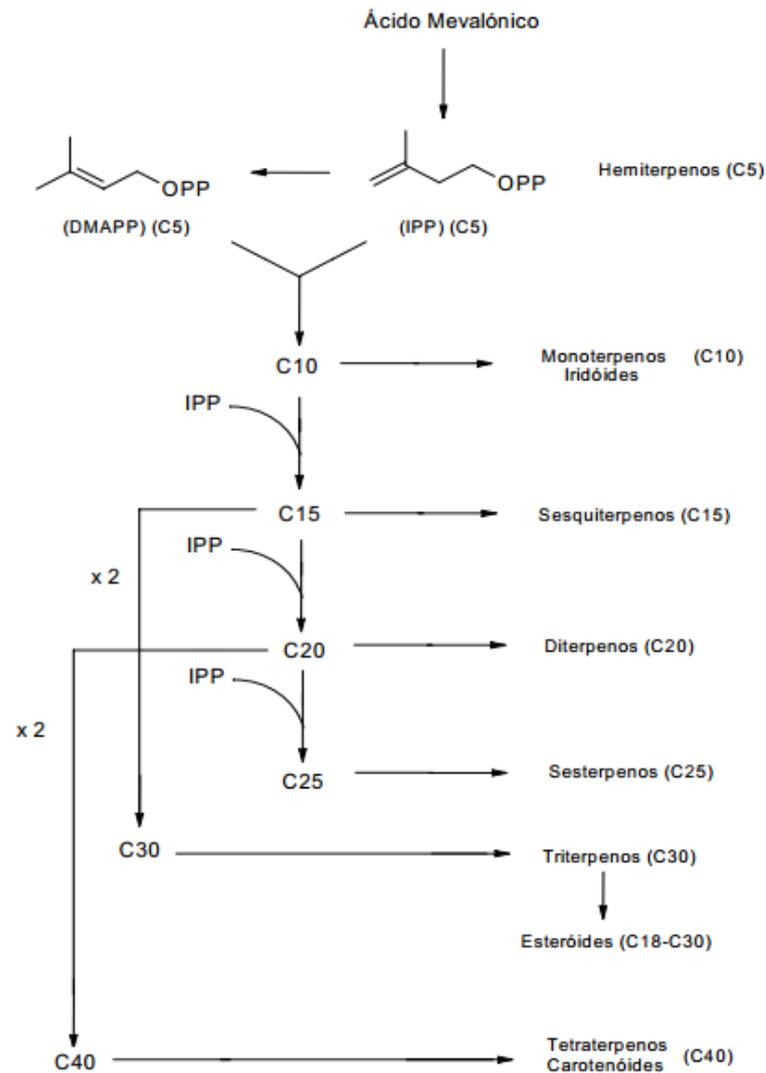


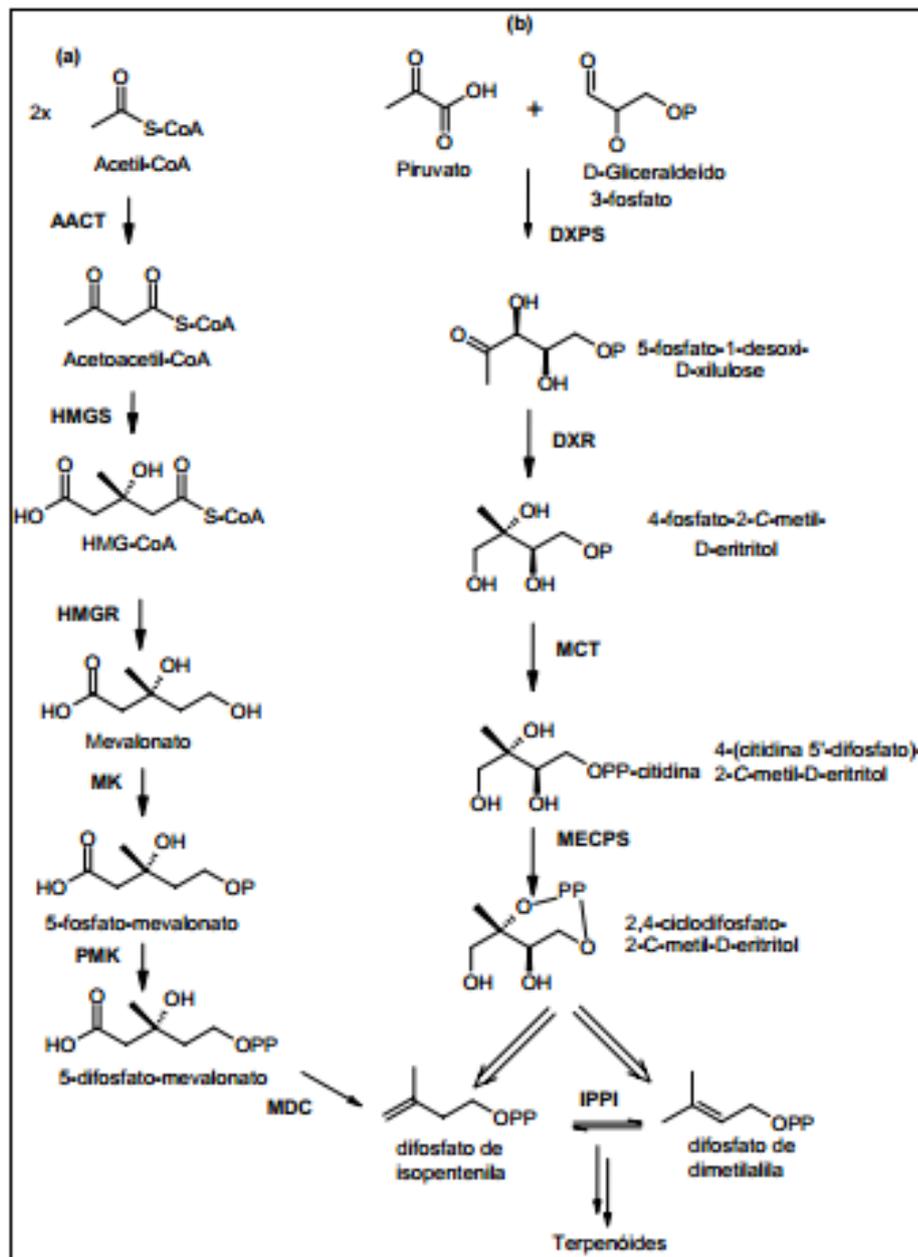
Figura 1. Unidade básica de formação de terpenos (PETERSEN, 2006).

Esses compostos podem servir para diferentes funções, dentre elas estão: compostos de defesa (monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos), transporte de elétrons, regulação subcelular, componentes de membranas, fotoproteção, hormônios, resistência ao estresse oxidativo e termotolerância. A termotolerância dos monoterpenos acredita-se que seja à sua capacidade de captar radicais derivados do oxigênio oriundo do processo fotossintético (BRUNETON, 2001; PEÑUELAS e LLUSIÁ, 2002; PEÑUELAS e MUNNÉ-BOSCH, 2005).



Esquema 1. Processo de formação de terpenos derivados de DMAPP E IPP pela via do ácido mevalônico (DEWICK, 1997).

Existem duas principais vias principais para a formação do isopreno: a via do mevalonato e a via da desoxixilulose-5-fosfato. A bioquímica dessas unidades isoprênicas, com formação de IPP, são derivadas da rota metabólica principal denominada via do ácido mevalônico, que se inicia com a acetilcoenzima-A (acetil-CoA) e procede através do ácido mevalônico como intermediário. Sendo que em algas, bactérias e plantas superiores ocorre também por outras vias (McCASKILL e CROTEAU, 1997; LICHTENTHALER et al., 1997; SCHWENDER et al., 1997; DEWICK, 1999; DUBEY et al., 2003) (Esquema 2).



Esquema 2. Vias de formação do isopreno: via do mevalonato (a) e 1-desoxixilulose-5-fosfato (b) para biossíntese de IPP/DMPP. AACT: Acetil-CoA:acetil-CoA C-acetiltransferase; CMK: 4-(citidina-5'-difosfo)-2-C-metileritritol quinase; DXPS: 1-desoxixilulose-5-fosfato sintase; DXR: 1-desoxixilulose-5-fosfato redutiisomerase; HMGR: 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA redutase; HMGS: 3-hidróxi-3-metilglutaril-CoA sintase; IPPI: pirofosfato de isopentenila isomerase; MCT: 2-C-metileritritol-4-fosfato citidiltransferase; MDC: mevalonato-5-fosfato descarboxilase; MECPS: 2-C-metileritritol-2,4-ciclodifosfato sintase; MK: mevalonato quinase; PMK: fosomevalonato quinase (adaptado de MAHMOUND e CROTEAU, 2002).

### 2.1.2 Monoterpenos

Os monoterpenoides são os compostos mais voláteis presentes nas plantas, devido ao seu baixo peso molecular. Estes compostos, muitas vezes, não estão presentes em grandes quantidades em algumas espécies vegetais. Além disso, de acordo com sua rota biossintética (Figura 2) podem ser transformados em sesquiterpenoides.

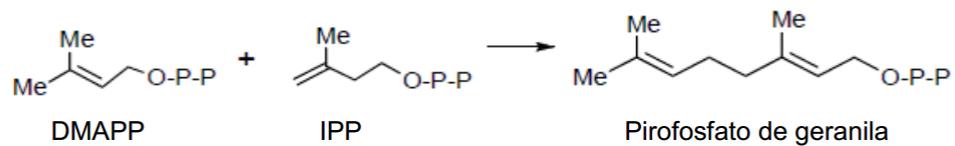
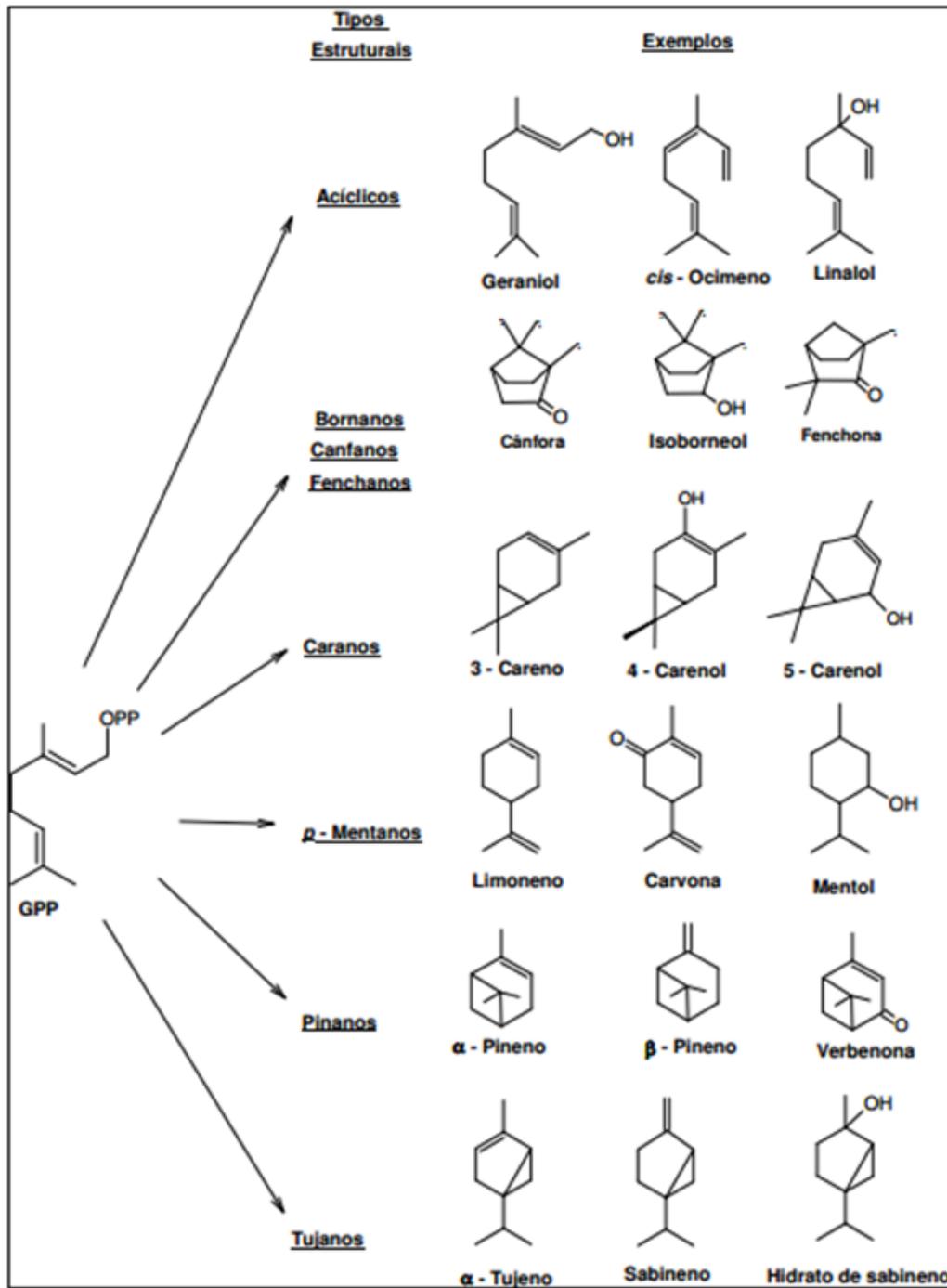


Figura 2. Biossíntese dos monoterpenos (PINTO, 2012).

Estes compostos podem ser isolados através de destilação ou extração. O primeiro monoterpenoide a ser isolado foi a “turpentina” (C<sub>10</sub>H<sub>16</sub>) na década de 1850 na Alemanha. Atualmente são conhecidos mais de 1.000 monoterpenoides naturais e alguns têm sido empregados nas indústrias de perfumes e fragrâncias, produção de especiarias, culinária, indústria de alimentos e condimentos (OLIVEIRA et al., 2003).

Os monoterpenos podem ser divididos em três sub-grupos: acíclicos, monocíclicos e bicíclicos e ainda em cada sub-grupo há outras classificações: hidrocarbonetos insaturados, álcoois, aldeídos ou cetonas, lactonas e tropolonas e alguns desses sub-grupos estão mostrados no Esquema 3 (VUNDA, 2011).

Ocorrem em pêlos glandulares, células parenquimáticas diferenciadas e em canais oleíferos. Eles podem estar estocados em flores (laranjeira), folhas (capim-limão), nas cascas dos caules (canela, madeira, sândalo ou no pau-rosa) e em frutos como na erva-doce (PERES, 2004).



Esquema 3. Algumas estruturas representativas dos principais núcleos monoterpênicos: GPP, pirofosfato de geranila (adaptado de MAHMOUD e CROTEAU, 2002).

### 2.1.3 Sesquiterpenos

Os sesquiterpenos formam um grande grupo de produtos naturais, que podem ser encontrados em plantas, microrganismos e em alguns organismos marinhos. Nas plantas, estes constituintes possuem uma função ecológica muito importante, agindo na interação com insetos e micróbios. Além disso, são componentes de muitos óleos essenciais, os quais são largamente utilizados na indústria como flavorizantes e aromatizantes (PROSSER et al., 2002).

Atualmente, mais de 300 esqueletos sesquiterpênicos distintos foram identificados e seus derivados oxidados ou modificados já foram isolados a partir de plantas, fungos ou ainda bactérias (PROSSER et al., 2002; FELICETTI e CANE, 2004).

A formação dos sesquiterpenos ocorre pela adição de uma terceira unidade de IPP ao GPP, via fenil transferase, formando a unidade fundamental sesquiterpênica, o pirofosfato de farnesila (FPP), conforme a Figura 3, o qual pode levar à formação dos sesquiterpenos lineares e cíclicos, conforme o Esquema 4. Nessas substâncias, a adição de números de carbonos leva ao número de isômeros envolvendo o carbocátion e a diversidade estrutural das ciclizações tornam-se significativas, conforme o Esquema 5.

Os sesquiterpenos são da mesma natureza dos compostos precedentes, podendo ser divididos em: acíclicos, monocíclicos ou bicíclico ou ainda lactonas sesquiterpênicas.

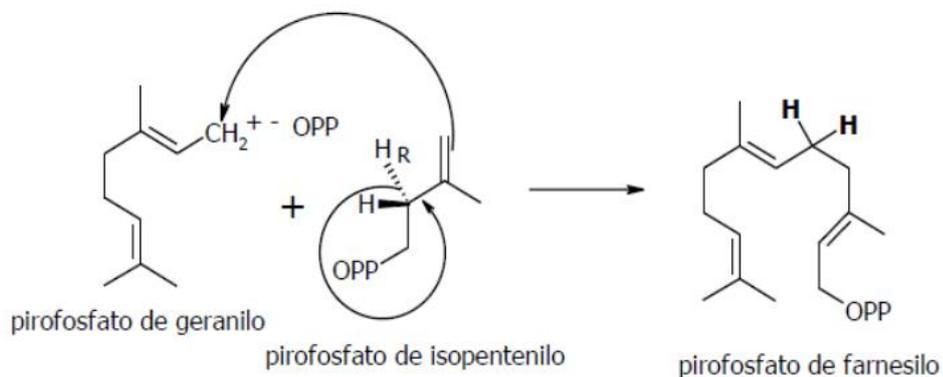
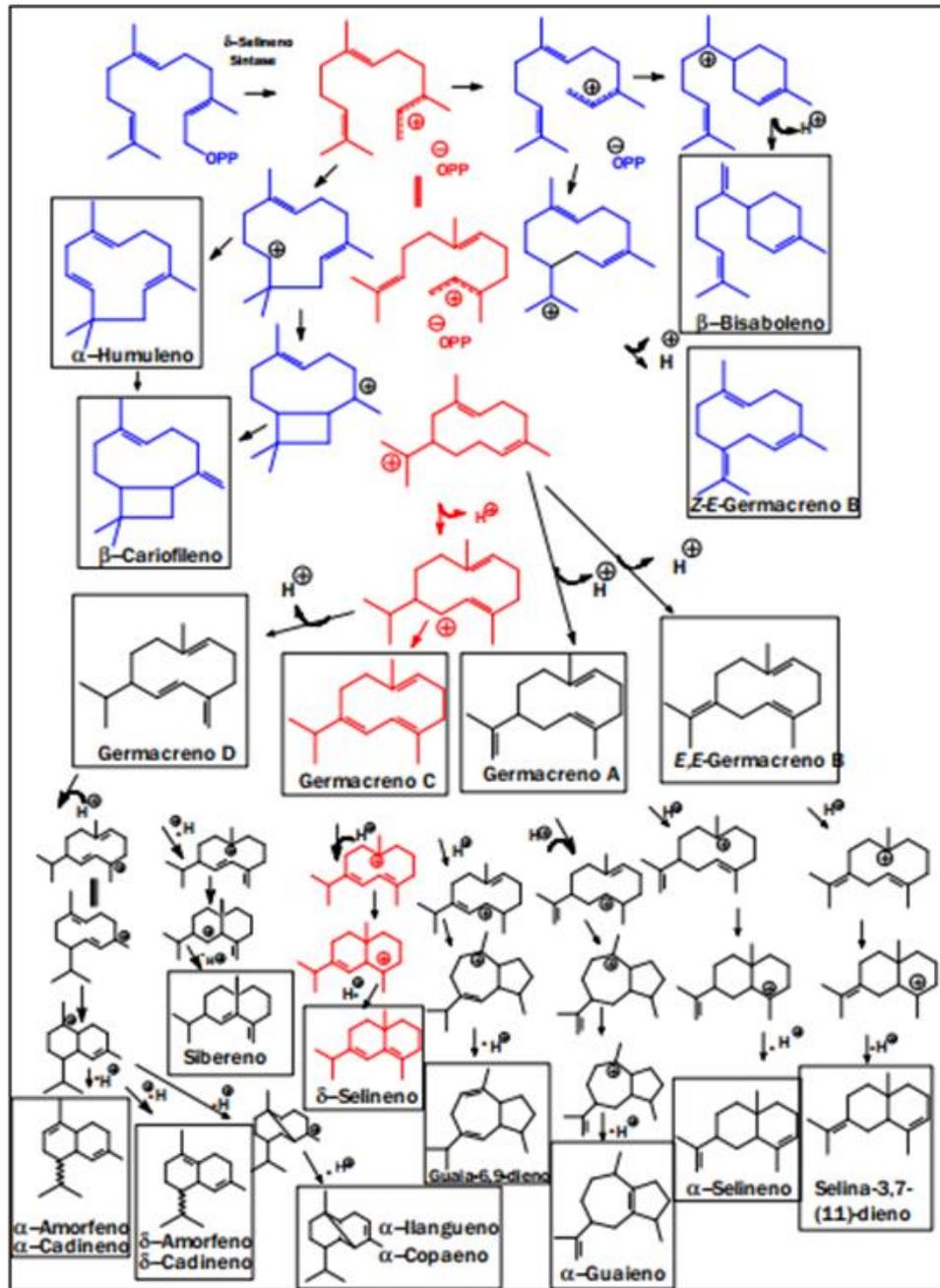
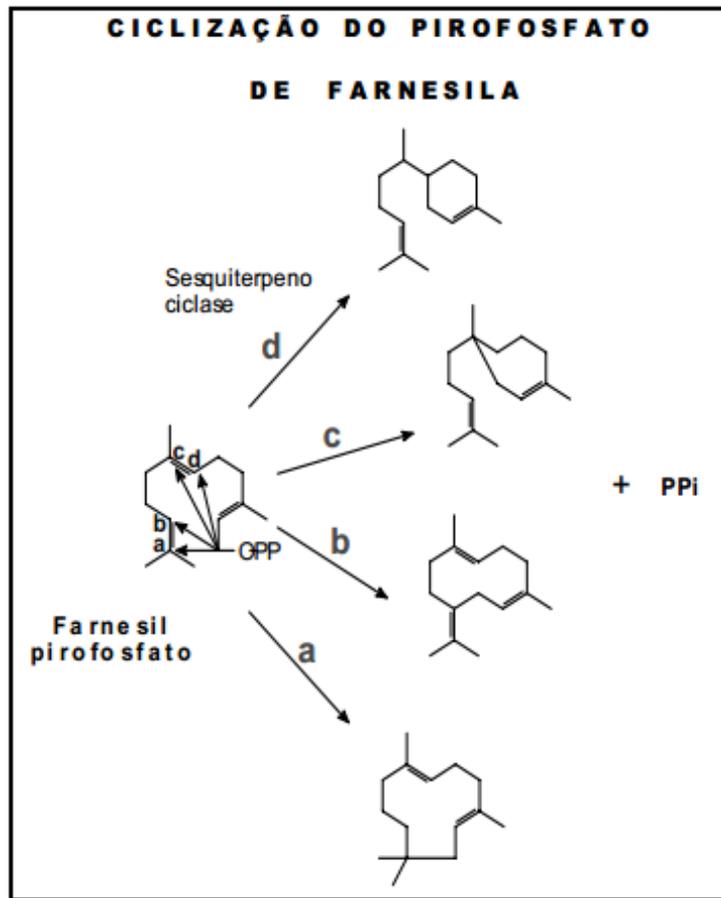


Figura 3. Biossíntese dos sesquiterpenos (PINTO, 2012).



Esquema 4. Estruturas formadas pela ação da enzima  $\delta$ -selineno sintase, isolada de *Abies grandis* (douglas ex D. Don) Lindl. (Pinaceae) sobre o farnesilpirofosfato (FPP): OPP: pirofosfato (STEELE, 1998).



Esquema 5. Ciclização do pirofosfato de farnesila por terpeno ciclastes origina diversos núcleos sesquiterpênicos: PPI: pirofosfato; a- grupo humulano (anel de 11 membros); b- grupo germacrano (anel de 10 membros); c- grupo caroteno (anel de 7 membros); d- grupo bisabolano (anel de 6 membros) (CHAPPELL, 1995).

## 2.2 Considerações Botânicas sobre a família Lauraceae

A família Lauraceae Juss. pertence à ordem Laurales, uma das famílias mais primitivas das angiospermas. Esta forma junto com Canellales, Piperales e Magnoliales um clado que é suportado entre as Angiospermas basais (APG II, 2003). O provável relacionamento entre as espécies está ilustrado na Figura 4. Esta família é conhecida por produzir uma diversidade de alcaloides, neolignanas e terpenoides (GOTTLIEB, 1972; MILLER e TUCK, 2013; FUNASAKI 2006).

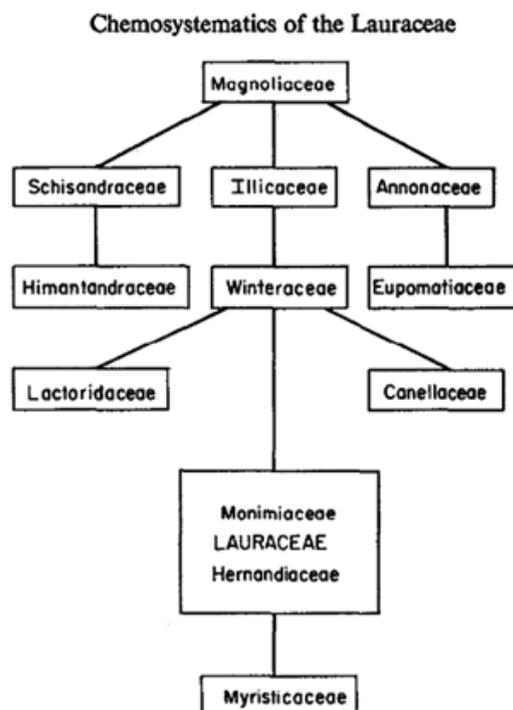


Figura 4. Possíveis relações entre algumas famílias Magnoliales (GOTTLIEB, 1972).

Compreende cerca de 52 gêneros e aproximadamente 2500-3000 espécies e um registro fóssil, principalmente encontradas em Regiões Tropical e Sub-Tropical, mas também sendo bem representadas na América, Ásia, Austrália, Madagascar e raras na África. Na Austrália está representada por 129 espécies em sete gêneros. Na região Himalaia 15 espécies foram relatadas e as folhas e cascas dessas espécies são utilizadas como ingredientes de especiarias e aromatizantes, e a mistura com outros ingredientes são utilizadas como tônicos (VAN DER WERFF e RITCHER, 1996; LIN et al., 2007; JOSHI et al., 2010; BANNISTER et al., 2012; MILLER, e TUCK, 2013).

Estudos revelam que algumas espécies desta família apresentam atividades como antioxidante, antibacteriana, citotóxica, fungicida e atividade inibitória da cruzaina (JOSHI et al., 2010).

Apresenta uma grande família de árvores geralmente verdes, folhas picantes e arbustos (VAN DER WERFF e RITCHER, 1996). A população tem usado essa família devido a sua madeira, frutos comestíveis, gordura da semente, drogas, especiarias e ainda óleos essenciais, principalmente usados na fabricação de perfume (GOTTLIEB, 1972; OH et al., 2012).

### 2.3 Considerações Botânicas sobre o gênero *Ocotea*

O gênero *Ocotea* foi descrito por AUBLET (1775) tendo como espécie-tipo *Ocotea guianensis* Aubl. O gênero *Ocotea* Aubl. é o maior gênero Neotropical desta família, compreendendo, aproximadamente, 300-350 espécies na região Neotropical, mais cerca de 50-60 espécies na África e Madagascar. É altamente incidente na Mata Atlântica do Brasil, onde 20 - 30% das espécies de *Ocotea* ocorrem. Estima-se que no Brasil ocorra aproximadamente entre 120 a 160 espécies (ROHWER, 1986; BAITELLO, 2001; BAITELLO e MARCOVINO 2003; ASSIS et al., 2005, QUINET, 2005).

A organização desse gênero começou a ser melhor compreendida a partir do estudo de MEZ (1889) que traz 199 espécies de *Ocotea* distribuídas em quatro subgêneros, *Hemiocotea*, *Dendrodaphne*, *Mesphilodaphne* e *Oreodaphne*.

ROHWER (1986) reconheceu 205 espécies e as reuniu em dois subgêneros, *Dendrodaphne* e *Ocotea*, organizando-as em grupos informais. ASSIS (2009) utilizou uma análise combinada de dados morfológicos e moleculares, dividindo o complexo *Ocotea* em oito clados, realizando também a revisão do grupo *Ocotea indecora* (Schott ex Spreng.) Mez.

Estudos filogenéticos têm relacionado *Ocotea* com os gêneros mais representativos do Novo Mundo. CHANDERBALI e colaboradores (2001) configuraram um clado mais derivado dentro da família com um grupo *Persea*, *Laureae*, *Cinnamomum* asiático e um complexo *Ocotea*, este especialmente diverso nas terras baixas da América do Sul.

Este gênero caracteriza-se por apresentar flores monóclinas ou díclinas, com 6 tépalas, flores estaminadas, com androceu com 9 estames férteis, anteras quadrilocelares, locelos dispostos em pares superpostos; estames das séries I e II com 3 estames cada, anteras introrsas. Estames da série III com 3 estames, par de glândulas na base dos filetes, anteras extrorsas e na série IV ausente ou quando presente com 3 estaminódios, em geral reduzidos, filiformes, ou raramente estaminódios bem desenvolvidos, cordados ou sagitados; pistilóide presente ou ausente. Flores pistiladas com estaminódios reduzidos, de morfologia semelhante aos estames das flores estaminadas. Fruto bacáceo, sobre ou parcialmente

envolvido pela cúpula, em geral com margem simples e tépalas decíduas (QUINET, 2010).

A identificação entre espécies do gênero *Ocotea* e *Cinnamomum* nem sempre são tão claras, pois algumas espécies apresentam características intermediárias entre os dois gêneros, mas as espécies do gênero *Ocotea* podem ser distinguidas por estames com quatro sacos polínicos dispostos em dois pares, um sobre o outro, juntamente com funcionalidades adicionais, tais como flores geralmente com falta de papilas, apresentam tépalas livres, e podem ser unissexuais ou bissexuais (VAN DER WERFF, 1991 e 2002; QUINET, 2010).

A importância econômica desse gênero diz respeito aos representantes fornecedores de madeira de excelente qualidade, que podem ser também utilizados na culinária, medicina popular, fabricação de papel, indústrias química e farmacêutica (KLEIN et al., 1979; INOUE et al., 1984; MARQUES, 2001).

No Paraná, inúmeras espécies foram exploradas predatoriamente para uso da madeira, das quais apenas cinco são recomendadas para planos de manejo (INOUE et al., 1984). A pressão sobre as florestas nativas levou *Ocotea catharinensis*, *Ocotea odorifera* (Vell.) Rohwer e *Ocotea porosa* (Nees) Barroso a serem incluídas na Lista Oficial de Espécies da Flora Brasileira Ameaçadas de Extinção (MELLO FILHO et al., 1992; BRASIL, 2008).

## 2.4 Revisão química e biológica do gênero *Ocotea*

Plantas pertencentes ao gênero *Ocotea* são conhecidas popularmente como canelas e são de grande importância econômica, com relatos da utilização dos seus óleos voláteis como matéria-prima na indústria de cosméticos, além de alguns apresentarem atividades antimicrobiana, antifúngica, antioxidante e anti-inflamatória. Estudos fitoquímicos envolvendo espécies deste gênero têm revelado a presença de neolignanas, lignanas, tetrahidrofuranos, alcaloides aporfínicos, alcaloides benzilisoquinolinos, fenilpropanoides, flavonoides e sesquiterpenos, além de uma variedade de terpenos presentes em seus óleos essenciais (ROHWER, 1986; ROHWER, 1993; VAN DER WERFF, 2002; MADRIÑÁN, 2004; TAKAKU, et al., 2007; PABON e CUCA, 2010).

*Ocotea corymbosa*, coletada na região do cerrado de São Paulo, foi submetida à investigação fitoquímica, flavonoides, ácidos fenólicos, um sesquiterpeno, *rel*-(1R,4S)-7-hidroxicalameneno, e lignanas foram caracterizados (BATISTA et al., 2010). De *O. macrophylla*, coletada na Colômbia, foram isolados alcaloides aporfínicos (PABON e CUCA, 2010; BARRERA, e SUAREZ, 2009), e outras dez espécies de *Ocotea* provenientes da Costa Rica tiveram seus óleos voláteis caracterizados pela predominância de alfa-pineno, beta-pineno, beta-cariofileno e germacreno-D (TAKAKU et al., 2007).

A análise da composição química do óleo volátil de *Ocotea puberula*, coletada no Paraná, levou a identificação de três monoterpenos e dez sesquiterpenos, sendo beta-cariofileno e biciclogermacreno os compostos majoritários (DE ARAÚJO et al., 2001).

*Ocotea pulchella*, coletada em Torres, foi submetida à investigação química de derivados semi-sintéticos, três novos alcaloides e furanoeudesmano (BOTEGA et al., 1993). De *Ocotea porosa*, foram identificados um sesquiterpeno e um flavonoide pelo método de RMN de hidrogênio. Na literatura há relatos de neolignanas presentes no caule desta planta (DAVID et al., 1994).

De *Ocotea duckei* foi obtido o óleo essencial caracterizado por altos teores de beta-cariofileno nas folhas, beta-eudesmol nas cascas do caule, limoneno nos frutos e elemol nas raízes. Estes óleos foram ensaiados para atividade cardiovascular em

ratos normotensos, não anestesiados, e o óleo essencial das diferentes partes desta espécie induziu significativa hipotensão seguido de bradicardia (BARBOSA-FILHO et al., 2008). *Ocotea bofo*, proveniente do Equador, teve seu óleo volátil caracterizado e testado para as atividades antimicrobiana e antioxidante apresentando resultados promissores (GUERRINI et al., 2006).

Estudos biológicos foram conduzidos a fim de verificar atividade anti-inflamatória do óleo volátil de *Ocotea quixos*, coletada no Equador, e de seus componentes majoritários, os fenilpropanoides trans-cinamaldeído e metil-cinamato, em ensaios tanto *in vitro* como *in vivo*. Os resultados demonstraram que o óleo e apenas trans-cinamaldeído foram capazes de inibir a liberação de óxido nítrico induzido por LPS de macrófagos J774 em concentrações não tóxicas, além de inibir a liberação de COX<sub>2</sub> induzida por LPS e aumentar a produção de AMPc induzido por forskolina. Quando testados no ensaio de edema de pata de rato induzido pela carragenina, ambos apresentaram também efeito anti-inflamatório sem causar dano à mucosa gástrica (BALLABENI et al., 2010). Em um trabalho anterior, a atividade antitrombótica foi investigada em camundongos, através de tratamento subagudo com o óleo essencial desta mesma espécie e o resultado positivo foi relacionado à sua capacidade de inibir a agregação plaquetária, retraindo o coágulo formado e pela vasoconstrição (BALLABENI et al., 2007). Além destes trabalhos, esta espécie também foi investigada para as atividades antioxidante *in vitro* e antimicrobianas (BRUNI et al., 2004).

ZANIN e colaboradores (2011) descrevem a ocorrência e quantidade de alcaloides aporfínicos em mudas de germinação de *Ocotea puberula* com 12 meses de idade e em folhas de plantas adultas. Nas folhas das mudas mostrou-se um perfil de alcaloides semelhante a folhas da planta adulta. No entanto, as folhas das mudas apresentaram maiores teores de alcaloides boldina, dicentrina, leucoxina e isodomeesticina quando comparado ao adulto.

FARAGO e colaboradores (2005) coletaram *Ocotea puberula* no Paraná e nessa amostra foram isolados quatro alcaloides aporfínicos, a ocoteína, a deidroocoteína, a dideidroocoteína e a talicminina e ainda neste estudo analisaram a morfoanatomia foliar dessa planta.

A partir das folhas de *Ocotea elegans*, coletada em São Paulo, foram isolados um sesquiterpeno aromático (*rel*-(1*R*, 4*S*)-7-hydroxycalamenene) e um flavonoide derivado da quercetina e de *Ocotea corymbosa* foram isolados flavonoides também, derivados da quercetina como a aglicona diidroquercetina e um éster do ácido 4-OE-cafeoilquínico (BATISTA et al., 2010).

De *Ocotea cymbarum*, proveniente do estado do Pará, foi isolada a neolignana burchelina que apresentou importante ação contra o agente etiológico da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi* (CABRAL et al., 2010). De *O. foetens*, coletada em Portugal, foi realizado teste para atividade antioxidante utilizando extrato hidroalcoólico e o resultado positivo foi relacionado à presença de flavonoides (TAVARES et al., 2010).

*Ocotea gomeziie* e *Ocotea morae*, coletadas na Costa Rica, tiveram a identificação dos seus componentes presentes nos seus óleos essenciais. Os óleos de *O. gomeziie* foram constituídos principalmente por sesquiterpenoides como alfa-cadineno, 1,10-di-epi-cubenol, alfa-muroleno, epi-alfa cadinol dentre outros, enquanto os de *O. morae* apresentaram monoterpenos (beta-pineno, mirceno dentre outros) e sesquiterpenoides como germacreno D, bicilogermacreno dentre outros (CHAVERRI et al., 2011).

COUTINHO e colaboradores (2006) coletaram em Paraíba *Ocotea duckei* e realizaram um estudo, morfoanatômico e químico, das folhas dessa espécie. Essa amostra é rica em alcaloides, lignanas e óleos essenciais. Um dos constituintes mais importantes é iangambina, uma lignana furo-furânica, que têm demonstrado várias atividades farmacológicas como: antagonista do receptor do fator de agregação plaquetária (PAF), efeito protetor contra colapso cardiovascular e choque anafilático, antialérgica, analgésica, anticonvulsivante e depressora do sistema nervoso central.

CANSIAN e colaboradores (2010) estudaram a avaliação do potencial antioxidante de extratos aquosos, hidroalcoólicos e óleo essencial de *Ocotea odorifera*, bem como a atividade antimicrobiana desse óleo essencial. Observaram que o extrato hidroalcoólico apresentou atividade antioxidante duas vezes superior ao extrato aquoso e mais de 200 vezes superior ao óleo essencial. A análise

antimicrobiana mostrou que o óleo essencial possui um amplo espectro de ação, inibindo todas as bactérias avaliadas nesse estudo.

Os óleos essenciais das folhas de *Ocotea nigrescens* Vicentini e *Ocotea splendens* (Meisn.) Baill coletadas em Manaus, foram analisados quimicamente e avaliados para a agregação plaquetária. Beta-cariofileno foi a substância com o maior percentual para as duas espécies (37,9% e 51,0%, respectivamente). Os óleos essenciais de ambas as espécies mostrou um baixo fator anti-agregante, 10,8% para *O. nigrescens* e 11,74% para *O. splendens*, quando comparado com o padrão positivo ácido acetilsalicílico que inibe fortemente a agregação plaquetária (100%) (YAMAGUCHI et al., 2013).

Algumas espécies de *Ocotea* apresentam diferentes aplicações, como por exemplo, *O. quixos* é usada como desinfetante, anti-diarreico e anestésico local, *O. lancifolia* é usada como antiparasitária e *O. caparrapi* é usada no tratamento contra picada de insetos, picada de cobra, bronquite e ainda tumores cancerosos (PABON e CUCA, 2010).

Dentre as atividades farmacológicas já encontradas em algumas espécies de *Ocotea*, destacam-se como antibacteriana (SOUZA et al., 2004), antifúngica (SOUZA et al., 2004), anti-inflamatória (ZSCHOCKE, et al., 2000a,b), antialérgica (SERRA et al., 1997), depressora do SNC (MORAIS et al., 1998), relaxante muscular (RIBEIRO et al., 2003), hipotensora (DIAS et al., 2004), e antagonista do PAF (FARIA-NETO et al., 1995a,b), entre outras.

## 2.5 Atividade antifúngica

A resistência aos antimicrobianos é a baixa susceptibilidade do micro-organismo ao agente antimicrobiano, pelo teste de sensibilidade *in vitro*, no qual a concentração inibitória mínima do fármaco supera o limite do ponto de corte definido para este microrganismo. Essa resistência pode ser de duas maneiras, a resistência primária, que é conhecida por estar presente em um organismo sem prévia exposição ao fármaco e a resistência secundária ou adquirida que se desenvolve em resposta a exposição a estes fármacos e normalmente é dependente de uma alteração na expressão de genes (ESPINEL-INGROFF, 2008; KANAFANI e PERFECT, 2008; PFALLER, 2012; TOBUDIC et al., 2012).

A resistência clínica é definida como uma persistência da infecção, mesmo após a administração de um agente antifúngico, que demonstre nos teste de susceptibilidade *in vitro* uma concentração inibitória mínima baixa contra o patógeno causador da doença (TOBUDIC et al., 2012).

De maneira geral, o controle das infecções fúngicas depende inicialmente da resposta imune do hospedeiro. A doença se instala quando ocorre uma falha nas defesas ou o patógeno se evade das respostas, o que leva à necessidade de se utilizarem drogas fungistáticas ou fungicidas que atuem o mais especificamente possível contra o agente agressor, de modo a evitar danos ao hospedeiro (PERES et al., 2010). Devido a isto, a resistência dos azólicos é uma das questões que desperta o interesse de estudos na atualidade.

Em 1856, o termo micose foi empregado pela primeira vez por Rudolf Virchow para designar infecções produzidas por microfungos parasitas. As micoses causadas por fungos queratinofílicos são denominados dermatofitoses e são classificadas como micoses superficiais, sendo causadas por fungos dos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* e *Epidermophyton* (ZAMPRONHA et al., 2005).

Uma dermatomicose é uma infecção fúngica do pêlo, unha ou pele causada por um não-dermatófito (*Aspergillus* sp., *Penicillium* sp., *Curvularia* sp., *Candida* sp., *Rhizopus* sp.), ou seja, os fungos que não são classificados nos gêneros *Microsporum*, *Trichophyton* ou *Epidermophyton*. Apesar de raramente apresentarem

risco de vida para os pacientes, podem acarretar efeitos debilitantes, afetando a sua qualidade de vida (ROTTA et al., 2012).

Os antifúngicos podem ser classificados em 4 classes principais. O grupo dos azólicos, que constituem o maior grupo de antifúngicos (interferem na síntese do ergosterol), grupo dos poliênicos (que atuam na membrana plasmática), as pirimidinas (que promovem a inibição da síntese de ácidos nucleicos) e o grupo das equinocandinas (que atuam inibindo a síntese de glucana da parede celular de diversos fungos patogênicos) (LACAZ et al., 2002; WHITE et al., 2005; CUENCA-ESTRELLA, 2010; SIDRIM e ROCHA, 2010).

O mecanismo de ação primário dos derivados azólicos envolve a inibição da biossíntese do ergosterol, que é o produto final da via metabólica de esteróis fúngicos. Isso ocorre por meio da inibição seletiva da enzima 14  $\alpha$ -demetilase, dependente do citocromo P-450, que participa da sequência de eventos envolvidos na conversão de lanosterol a ergosterol, resultando no acúmulo de uma série de precursores metilados (incluindo o lanosterol) e concomitante diminuição ou mesmo ausência do produto final da via biossintética. Em seguida, a substituição do ergosterol pelos precursores metilados determinará a formação de membranas plasmáticas defeituosas e com permeabilidade alterada (KOKJOHN et al., 2003; MARTINDALE, 2005). Os azóis causam menos reações adversas que a anfotericina B, mas são menos potentes que a mesma. Podem ter ação fungistática ou fungicida. O uso excessivo dos azóis levou ao aparecimento de resistência em espécies suscetíveis. Além disso, os azóis ainda apresentam a desvantagem da resistência cruzada (BERGOLD e GEORGIADIS, 2004).

A anfotericina B faz parte do grupo dos polienos. Tem como mecanismo de ação a sua ligação aos esteróis da membrana, principalmente o ergosterol. Essa ligação resulta na formação de inúmeros poros na membrana que alteram a sua permeabilidade, levando à perda de sódio, potássio e outros componentes citoplasmáticos, o que causaria a morte fúngica. Assim a anfotericina é considerada um fármaco fungicida (GABLER et al., 2008).

A nistatina é um antifúngico poliênico, obtido a partir do *Streptomyces noursei*. O mecanismo de ação da nistatina se dá através de ligação aos esteroides (ergosterol) existentes na membrana celular dos fungos susceptíveis, com resultante

alteração na permeabilidade da membrana celular e consequente extravasamento do conteúdo citoplasmático. A nistatina não apresenta atividade contra bactérias, protozoários ou vírus. Tem ação fungistática e fungicida *in vitro* contra uma grande variedade de leveduras e fungos filamentosos, incluindo *C. albicans*, *C. parapsilosis*, *C. tropicalis*, *C. guilliermondi*, *C. pseudotropicalis*, *C. krusei*, *Torulopsis glabrata*, *Tricophyton rubrum*, *T. mentagrophytes*. (BRASIL, 2012).

Flucitosina, um análogo da pirimidina citosina, interfere com a síntese de RNA e portanto com a síntese proteica. Todos os fungos sensíveis são capazes de desaminar a flucitosina em 5-fluoruracila, um potente antimetabólito e como resultado final, a síntese de ácido desoxirribonucléico (ADN) dos mesmos fica prejudicada. Embora as células dos mamíferos não convertam a flucitosina em fluoruracila, o que é crucial para ação seletiva do composto, alguns microrganismos da flora intestinal o fazem, causando certa toxicidade aos humanos. A flucitosina tem espectro de ação restrito (tem atividade clinicamente útil somente contra *Cryptococcus neoformans*, *Candida spp.* e os agentes da cromomicose) e a resistência medicamentosa que surge durante a terapia é causa importante de fracasso terapêutico (BERGOLD e GEORGIADIS, 2004).

As equinocandinas são inibidores não competitivos da enzima  $\beta$ -1,3-glicano sintase, que catalisa a polimerização da glicose-uridina-difosfato (UDP-glicose) em  $\beta$ -1,3-glicano. Quando a síntese deste polímero é inibida, ocorre o extravasamento de componentes da célula, como resposta à alta pressão osmótica exercida sobre a membrana enfraquecida (KURTZ e DOUGLAS, 1997). Existem duas formas da subunidade catalítica da enzima, uma é ativa quando o fungo está na fase vegetativa (FKS1) e a outra é ativa quando o fungo se encontra na fase reprodutiva (FKS2). As candinas têm ação sobre as duas formas da enzima (KURTZ e DOUGLAS, 1997; GEORGOPAPADAKOU, 2002; BERGOLD e GEORGIADIS, 2004). Entre as equinocandinas, a anidulafungina foi a primeira molécula isolada com posterior descobrimento da caspofungina e micafungina; entretanto, somente em 2001 a caspofungina foi liberada para uso em humanos, seguido da micafungina em 2005 e finalmente anidulafungina em 2006 (CORTÉZ e RUSSI, 2011).

### 2.5.1 Dermatófitos

Dermatofitoses são processos infecciosos causados por um grupo de fungos capazes de invadir e infectar tecidos queratinizados como pêlo, pele e unhas, tanto em humanos quanto em animais. Comuns em países em desenvolvimento, em geral, essas infecções são superficiais, mas podem afetar as mucosas. A denominação dessas patologias é definida conforme a região anatômica afetada, como *tinea barbae*, afetando a barba e o bigode e *tinea capitis*, infectando o couro cabeludo (BALAKUMAR et al., 2011; DIEGO, 2011).

Os dermatófitos, fungos causadores desta patologia, classificam-se em três gêneros: *Epidermophyton*, *Microsporum* e *Trichophyton*, de acordo com a formação e morfologia de seus conídios (estruturas de reprodução assexuada). Além disso, as espécies de dermatófitos são divididas em zoofílicas, geofílicas e antropofílicas, dependendo de seu habitat primário (animais, solo ou humanos, respectivamente). As espécies zoofílicas são responsáveis por cerca de 30% das dermatofitoses humanas e geralmente provocam uma inflamação aguda, enquanto que as espécies antropofílicas representam cerca de 70% das infecções nesses hospedeiros, causando uma infecção crônica e de progressão lenta, sugerindo que o fungo tenha se adaptado ao hospedeiro humano. Até o momento, cerca de 30 espécies de dermatófitos já foram identificadas dentre os patógenos humanos. Em relação ao gênero *Epidermophyton*, a espécie *E. floccosum* é a única patogênica ao homem, enquanto que o gênero *Microsporum* apresenta cerca de 20 espécies, sendo que dez deles são patógenos humanos. *Trichophyton* é considerado o gênero mais frequente, implicando quadros de infecção humana, onde as espécies *T. rubrum* e *T. mentagrophytes* complex são comumente responsáveis por grande parte dos casos de tinea (PERES et al., 2010; DIEGO, 2011).

A transmissão das dermatofitoses ou *tineas* ocorre pelo contato direto com animais e humanos infectados, ou indireto por fômites contaminados, e as formas clínicas variam de acordo com o agente etiológico (espécie) e o sítio anatômico acometido. Os sintomas podem ser brandos ou severos dependendo do estado imunológico do hospedeiro, e geralmente não ocorre invasão de tecidos subcutâneos ou órgãos internos. As lesões características nas infecções de pele são circulares, eritematosas e pruriginosas, sendo consequentes da ação direta do fungo

ou de reações de hipersensibilidade ao microrganismo e/ou a seus produtos metabólicos. Nas infecções de unha (onicomicoses) pode ocorrer descolamento das bordas, espessamento, aparecimento de manchas brancas e até distrofia total das unhas (PERES et al., 2010).

As infecções causadas por dermatófitos são de difícil manejo. Cura espontânea é muito improvável, exigindo, portanto, tratamento na maioria dos casos. A terapia além de ser complexa, alto custo, longa e frequentemente apresenta recorrência. Além desses fatores, o aumento da resistência pelos patógenos e o crescente número de pacientes imunocomprometidos, caracterizados com alto risco, constitui este tipo de infecção fúngica como um problema mundial. Dessa maneira, esforços científicos têm sido realizados com a finalidade de desenvolver tratamentos que possam ser empregados como alternativa à terapia convencional, com grande interesse na investigação da ação antifúngica de diferentes extratos vegetais e óleos voláteis (PINTO et al., 2006; BAJPAI et al., 2009; BALAKUMAR et al., 2011; DIEGO, 2011; JAMALIAN et al., 2012).

#### 2.5.2 *Candida* spp.

As principais espécies de *Candida* relacionadas a infecções clínicas são: *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. guilliermondii*, *C. krusei*, *C. lusitaniae*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*. Há relatos que há casos de doenças superficiais e invasivas relacionadas a espécies emergentes de *Candida*, como por exemplo, *C. dubliensis*, *C. kefyr*, *C. famata*, *C. rugosa*, *C. utilis* entre outras (FRIDKIN e JARVIS, 1996; SLAVIN, 2002; COLOMBO e GUIMARÃES, 2003; EGGIMANN et al., 2003; PASQUALOTTO, 2004).

*Candida albicans* pode ser encontrada no trato gastrointestinal, cutâneo e genital e esta espécie é a mais frequente nos processos de infecção fúngica. *Candida glabrata* é uma levedura que surge como um importante patógeno hospitalar, constituindo-se na segunda ou terceira espécie mais comum na maioria das séries de candidemia relatada na Europa e nos Estados Unidos. *Candida parapsilosis*, desde os anos 80, é um importante patógeno hospitalar de fungemias. Sua ocorrência é ainda maior em crianças e recém-nascidos. Isolados clínicos são sensíveis aos triazólicos e a anfotericina B. *Candida krusei* é uma espécie que vem aumentando sua incidência nos últimos anos, acometendo principalmente pacientes imunocomprometidos. Pacientes portadores de HIV estão sujeitos às infecções

oportunistas, dentre elas a criptococose, que é causada pelo fungo *Cryptococcus neoformans*, esse microrganismo é cosmopolita e pode ser encontrado associado às fezes de aves (BATISTA, 2011).

As três espécies consideradas não-*albicans* mais prevalentes são *C. glabrata*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis*, sendo que *C. glabrata* é a segunda espécie mais prevalente em candidemia (PASQUALOTTO, 2004).

As espécies de *Candida spp.* crescem em presença de oxigênio (aerobiose), suportam pH entre 2,5 e 7,5 e temperatura de 20 °C a 38 °C. Estas espécies fazem parte da microbiota da pele, das mucosas e ainda do trato gastrointestinal, sendo que *Candida albicans* é a mais frequente em humanos. Suas colônias crescem em meio Sabouraud e ágar sangue e apresentam textura cremosa, membranosa e úmida, não formando hifas aéreas (LACAZ et al., 2002; EGGIMANN et al., 2003; SIDRIM e ROCHA, 2004; PASQUALOTTO, 2004).

#### 2.5.2.1 *Candida parapsilosis*

*Candida parapsilosis* é uma levedura saprofítica encontrada na pele ao invés de superfícies das mucosas. Esta espécie emerge como um importante patógeno nosocomial (comensal, quando em indivíduo sadio) associada a cateteres, com manifestações clínicas que incluem fungemias, endocardites, endoftalmites, artrites e peritonites, e estas infecções usualmente ocorrem em associação a procedimentos invasivos ou dispositivos protéticos. *C. parapsilosis* é a mais frequente em infecções na corrente sanguínea, sobretudo em neonatos, pacientes transplantados, associadas a cateteres, pacientes que recebem nutrição parenteral e prévia terapia antifúngica. Essas características podem ser um importante fator de risco para infecções em pacientes com câncer que usam dispositivos de acesso (ASBECK et al., 2008; BARBEDO e SGARBI, 2010; OLIVEIRA et al., 2010; PAUGAM et al., 2011; CORTI et al., 2013).

*Candida parapsilosis* é a segunda espécie mais isolada em amostras de candidemia em muitas regiões do mundo, a primeira sendo encontrada é a *C. albicans*. No entanto, tornou-se o principal agente em algumas instituições localizadas na Ásia, Europa e no Sul da América. Esta espécie de candidas que apresenta o maior aumento em três espécies que estão agrupadas em *Candida*

*parapsilosis*, dentre elas estão: *C. parapsilosis sensu stricto*, *C. orthopsilosis*, e *C. metapsilosis*, com base em diversos critérios, incluindo análise de DNA, eletroforese de isoenzimas, eletroforese de cariótipos, morfotipos, sequências de DNA mitocondrial, habilidade de produção de biofilmes, dentre outras. *C. metapsilosis* é raramente isolada de material clínico e possivelmente tem origem a partir de um ambiente de não-mamíferos, sendo a menos virulenta entre as três (GÁCSEER et al., 2007; BARBEDO e SGARBI, 2010; VAZ et al., 2011; ROMEO et al., 2012; SINGARAVELU et al., 2014).

Há relatos na literatura que essa espécie apresenta uma certa adesão e habilidade em formar biofilmes, principalmente pela produção de iodo extra-celular em superfícies abióticas. Essa formação de biofilme de fungos em cateteres e próteses contribui para o desenvolvimento de infecções nosocomiais (OLIVEIRA et al., 2010; SARDI et al., 2014).

Este patógeno é relativamente sensível para a maioria dos agentes antifúngicos sistêmicos incluindo cetoconazol, itraconazol, fluconazol e anfotericina B, flucitosina e equinocandinas. A caspofungina (CAS), micafungina e anidulafungina apresentam atividade potente contra *Candida spp.* tanto *in vivo* e *in vitro* (KRCMERY e BARNES, 2002; ASBECK et al., 2008).

SZABÓ e colaboradores (2009), avaliaram *in vitro* a eficácia de cinco antifúngicos (anfotericina B, fluconazol, voriconazol, posaconazol, e 5-fluorocitosina) contra seis *Candida parapsilosis*, três *Candida orthopsilosis*, e quatro *Candida metapsilosis* utilizando a metodologia de tempo de morte, sendo que observaram nas primeiras 24 horas em concentrações de 1 a 4µg/mL de anfotericina B foram mortas um isolado de seis de *C. parapsilosis*, um isolado de três *C. orthopsilosis*, e três isolados de quatro *C. metapsilosis*. Os antifúngicos voriconazol e fluconazol são menos ativos *in vitro* contra *C. parapsilosis*. O antifúngico 5-fluorocitosina provou ser fungistático contra as três espécies.

Avaliações das concentrações inibitórias mínimas do antifúngico caspofungina frente à infecção de cepas de *C. parapsilosis* foram testadas por SALAS e colaboradores (2013), sendo que esta apresentou uma alta concentração inibitória mínima frente a equinocandinas quando comparado a outras espécies de *Candida*.

Dessa maneira, essa classe farmacêutica, provavelmente, pode ser uma boa escolha para essas infecções.

Uma investigação molecular de *C. parapsilosis* em unidades de terapia intensiva para neonatos foi estudada por RUIZ e colaboradores (2013). Estes encontraram 11 casos de fungemia causadas por esse microrganismo e a confirmação desses casos foi através da técnica de microssatélite. Os autores relatam que há outros estudos mostrando que esta técnica é eficiente na comprovação de *C. parapsilosis* nas infecções em pacientes que estão nas unidades de terapia intensiva.

LATTIF e colaboradores (2010) avaliaram a capacidade de isolados clínicos de *C. parapsilosis*, *C. orthopsilosis*, e *C. metapsilosis* de formar biofilmes em discos de elastômero de silicone, sendo que esta capacidade foi determinada utilizando a atividade metabólica e ensaios de peso seco. Os ensaios revelaram que a atividade metabólica de *C. metapsilosis* foi significativamente maior do que isolados de *C. parapsilosis* e *C. orthopsilosis*. Em contraste, não houve diferença estatisticamente significativa na biomassa do biofilme formado por essas espécies.

Estudos de BONASSOLI et al., 2005, relatam a alta frequência de *C. parapsilosis* em mãos de pessoas saudáveis. Das pessoas analisadas 59,3% carregavam leveduras em suas mãos, sendo que em 51 % foi encontrada *C. parapsilosis*.

## 2.6 Atividade anti-inflamatória

A inflamação é uma resposta de defesa que ocorre após o dano celular causado por microrganismos, agentes químicos (substâncias cáusticas, toxinas), físicos (trauma, radiação, queimaduras), necrose tecidual e reações imunológicas (LIMA et al., 2007). É uma tentativa de proteção do organismo para remover os estímulos nocivos e para iniciar o processo de cura. Esta pode acometer milhares de pessoas no mundo (KUMAWAT et al., 2012).

A resposta inflamatória inclui a participação de diferentes tipos celulares, como por exemplo, neutrófilos, macrófagos, mastócitos, linfócitos, plaquetas, células dendríticas, células endoteliais e fibroblastos (LIMA et al., 2007). Compreende dois mecanismos de defesa: uma resposta inespecífica (resposta inata), responsável pelas características da região inflamada (vermelhidão, edema, calor, dor e perda de função) e uma resposta imunológica, na qual há produção de anticorpos específicos contra um determinado agente agressor (COUTINHO et al., 2009; ROMANI, 2011). Alguns mediadores do processo inflamatório podem ser: metabólitos do ácido araquidônico, reação específica, óxido nítrico (NO) e ainda citocinas. Atualmente, os principais agentes anti-inflamatórios são representados pelos glicocorticóides e pelos anti-inflamatórios não esteroidais (AINEs).

A descoberta de novos fármacos a partir de plantas conduziu ao isolamento de muitas substâncias que ainda hoje são utilizadas clinicamente ou então servem como protótipos para a síntese de novos fármacos. Estes estudos têm investigado a capacidade de inibição da migração leucocitária como mecanismo relacionado a propriedades anti-inflamatórias do composto (MONKS et al., 2002; SOUZA et al., 2003; ANDRADE et al., 2011; SUYENAGA et al., 2011; BARROS et al., 2013).

Outra técnica usual para sua avaliação é o edema de pata de rato induzido pelos agentes inflamatórios dextrina e carragenina (DI ROSA et al., 1971; SANTOS e RAO, 2000).

## 2.7 Atividade antioxidante

Muitas plantas contêm antioxidantes naturais que agem em resposta metabólica à produção endógena de radicais livres e outras espécies oxidantes. A oxidação é um processo biológico para produção de energia, intrínseco e controlado por vários mecanismos celulares. Estas respostas são devidas ao estresse ou são promovidas por toxinas produzidas por fungos ou bactérias patogênicas. Recentemente, o interesse tem aumentado na ocorrência de antioxidantes naturais que podem ser utilizados para proteger o ser humano dos danos causados pelo estresse oxidativo (TEPE et al., 2007; HOSSAIN e SHAH, 2011; ZENG et al., 2011).

Antioxidantes são substâncias com ação enzimática ou não, capazes de prevenir os efeitos deletérios da oxidação pela inibição da lipoperoxidação, sequestro de radicais livres e/ou quelação de íons metálicos. No primeiro grupo estão os compostos capazes de bloquear a iniciação da oxidação, ou seja, as enzimas que removem as espécies reativas ao oxigênio. No segundo grupo estão as moléculas que interagem com as espécies radicalares e são consumidas durante a reação (antioxidantes naturais, como os compostos fenólicos (MOREIRA e MANCINI FILHO, 2003). Existindo ainda os compostos naturais com ação hormética, que em pequenas doses ativam o sistema enzimático antioxidante (UMEMURA et al., 2008).

As espécies reativas de oxigênio (EROs) são encontradas em todos os sistemas biológicos e geradas naturalmente nos organismos pelo processo metabólico natural. Em condições fisiológicas do metabolismo celular aeróbio, o oxigênio sofre redução tetravalente, com aceitação de quatro elétrons, resultando na formação de água, conforme a Figura 5. Durante esse processo, são formados intermediários reativos, sob a forma de radical superóxido, radical hidroperoxila, radical hidroxila e peróxido de hidrogênio. Além da geração normal de radicais livres, situações não-fisiológicas podem também levar à formação de EROs (BARBOSA, 2008).

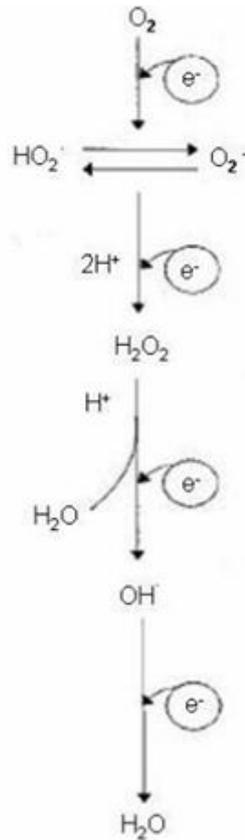


Figura 5. Redução tetraivalente do oxigênio molecular ( $\text{O}_2$ ) na mitocôndria até a formação de  $\text{H}_2\text{O}$ . Várias espécies reativas são formadas no processo (fonte: modificado de FERREIRA e MATSUBARA, 1997).

É comum considerar que EROs são geradas em situações de estresse oxidativo e participam do dano celular conduzindo a vários processos inflamatórios. Diversos estudos têm demonstrado que EROS estão altamente relacionados com o processo inflamatório via ativação da membrana da fosfolipase  $\text{A}_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) a qual catalisa a biotransformação do ácido araquidônico (AAs) a prostaglandinas e tromboxanos pelas COX. EROS são diretamente produzidos pela COX no local da inflamação e amplificam a fase aguda da resposta inflamatória. Com isso, agentes antioxidantes e sequestradores de radicais livres podem atenuar o processo inflamatório mediado pela COX pela anulação dos efeitos das EROS (MCINTYRE et al., 1999; SCOUT et al., 1999).

Alguns produtos naturais dotados de ação antioxidante e anti-inflamatória são os óleos essenciais. Vários estudos demonstraram o potencial antioxidante dos óleos, principalmente em espécies vegetais utilizadas como condimentos. Alguns

exemplos são os óleos de orégano (*Origanum vulgare* L.), timo (*Thymus* L.), menta (*Mentha* L.), alecrim (*Rosmarinus officinalis* L.), anis (*Pimpinella anisum* L.), funcho (*Foeniculum vulgare* Mill.) e coriandro (*Coriandrum sativum* L.), enquanto que os fenilpropanoides, como o carvacrol e o eugenol e hidrocarbonetos monocíclicos também apresentam atividade antioxidante para os óleos voláteis. Estudos mostraram que os monoterpenos, como o timol e  $\gamma$ -terpineno apresentam atividade, podendo atuar na inibição da peroxidação lipídica (BASMACIOGLU et al., 2004; BOTSOGLOU et al., 2004; TEPE et al., 2007; MASTELIC et al., 2008; VIUDA-MARTOS et al., 2011).

RUBERTO e BARATTA (2000) avaliaram a atividade de diversos componentes isolados de óleos voláteis. Nesse trabalho, foi evidenciado o efeito antioxidante de monoterpenos (terpinoleno,  $\alpha$ -terpineno,  $\gamma$ -terpineno e sabineno). Em particular, a atividade do  $\alpha$ -terpineno e do  $\gamma$ -terpineno foi comparável à do  $\alpha$ -tocoferol, utilizado como controle positivo nos ensaios, e de compostos fenólicos, classe química com reconhecida ação antioxidante. Atividade antioxidante pronunciada foi também observada para óleo volátil de *Eupatorium laevigatum* Lam. e a ação foi relacionada, pelo menos em parte, à presença do composto majoritário levigatina, um sesquiterpeno furânico, cujo efeito foi semelhante ao encontrado para o óleo (SOUZA, 2007).

Uma grande variedade de testes *in vitro* é utilizada para a determinação desta atividade em extratos vegetais. No caso de óleos essenciais, os testes mais adequados são DPPH, PCL e  $\beta$ -caroteno, pois permitem a avaliação das etapas primária e secundária da oxidação em sistemas lipossolúveis (MANTLE et al., 1998; SACCHETTI et al., 2005) e o uso de testes combinados torna-se necessário quando o objetivo é determinar o mecanismo da ação antioxidante (DORMAN et al., 2000).





### 3.1 Material vegetal

Foram coletadas as partes aéreas de espécies do gênero *Ocotea* nativas do Rio Grande do Sul. Um exemplar de cada planta foi identificado pelo Prof. Dr. Sérgio Augusto de Loreto Bordignon, botânico, e depositado no Herbário da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (ICN).

### 3.2 Obtenção do óleo volátil

O óleo volátil foi obtido a partir das folhas frescas, reduzidas com auxílio de um moinho de facas e submetidas à hidrodestilação em aparelho tipo-Clevenger (Farmacopéia Brasileira, 2010), durante 4 horas. A quantificação foi realizada pela leitura do volume de óleo coletado. Os óleos obtidos foram armazenados sob refrigeração 4-5 °C até a análise dos seus constituintes.

### 3.3 Análise química do óleo volátil

Os óleos voláteis obtidos a partir da hidrodestilação foram diluídos a 2% em éter etílico ou acetona (V/V) (Tédia) para a análise cromatográfica.

A identificação química desses óleos extraídos foi realizada em cromatógrafo à gás acoplado detector de massas (CG/MS).

#### 3.3.1 Cromatografia Gasosa-Espectrometria de Massas

As amostras foram analisadas por CG-EM em um aparelho Shimadzu QP5000 com quadrupolo cilíndrico, equipado com coluna capilar de sílica fundida DB-5 (30 m, 0,25 mm de diâmetro interno e filme de 0,25 µm de espessura), operando com energia de ionização de 70 eV. A temperatura do injetor e detector foi de 220 °C e 250 °C, respectivamente, e a programação de temperatura da coluna foi de 60 a 300 °C a 3 °C/min, com hélio como gás carreador a 80 kPa e fluxo de 1 mL/min.

#### 3.3.2 Identificação dos componentes

Os componentes químicos presentes nos óleos extraídos foram identificados por comparação de seu índice de retenção (Índice de retenção relativo) e o espectro de massas foi comparado com dados na literatura (ADAMS, 2009), bem como a espectroteca de aquisição (NIST 12 e NIST 62 – National Institute of Standards and

Technology, Kyoto, Japão) e para o cálculo do Índice de retenção relativo (I) foi utilizada a seguinte equação:

$$I = 100z + \frac{100 (tr_x - tr_z)}{(tr_{z+1} - tr_z)}$$

Onde: z = número de carbonos do alcano com menor peso molecular;

tr<sub>x</sub> = tempo de retenção do composto x, sendo tr<sub>x</sub> intermediário entre tr<sub>z</sub> e tr<sub>(z+1)</sub>;

tr<sub>z</sub> = tempo de retenção do alcano com “n” carbonos;

tr<sub>(z+1)</sub> = tempos de retenção do alcano com “n+1”;

Quantidades relativas de cada composto foram calculados a partir das áreas dos picos do CG.

### 3.4 Atividade antifúngica

As amostras foram submetidas ao teste de susceptibilidade ao flucoconazol, os antifúngicos mais prevalentes responsáveis pelas micoses cutâneas e mucocutâneas no homem.

Foram selecionadas as espécies de fungos filamentosos *Microsporum canis* 38, *Microsporum gypseum* 01, *Trichophyton mentagrophytes* 32 e *Trichophyton rubrum* 51 e espécies de leveduras *Candida albicans* 15, *Candida glabrata* 09, *Candida krusei* 03, *Candida parapsilosis* 52, *Candida tropicalis* 750 e *Cryptococcus neoformans* 16.

Para a obtenção de células viáveis para os testes, os isolados leveduriformes foram crescidos em Ágar Sabouraud contendo cloranfenicol 0,04% por 48 h a 32 °C. Nos isolados filamentosos, por sua vez, alterou-se apenas o período de incubação no ágar, que foi 7 dias a 30 °C.

#### 3.4.1 Preparo da amostra

As amostras foram pesadas em balança de precisão Mettler Toledo, modelo AB 204. Estas foram dissolvidas em Tween 2% e água estéril, tendo ao final uma concentração de 500 µg/mL.

#### 3.4.2 Preparo do inóculo fúngico para os testes de susceptibilidade

Tomou-se como referencial, o método de microdiluição, segundo as recomendações do Clinical Laboratory Standart Institute (CLSI, 2008 e 2012). Foram seguidos os protocolos de preparação do inóculo fúngico de acordo com os documentos M27-S4 e M38-A2, respectivamente para fungos leveduriformes e filamentosos.

As leituras dos inóculos foram realizadas em espectrofotômetro Femto, modelo 600 Plus e a homogeneização dessas amostras no meio foi através de vórtex IKA, modelo Lab Dancer.

#### 3.4.3 Avaliação da atividade antifúngica dos óleos voláteis pelo método de microdiluição em placa.

O teste de susceptibilidade aos óleos voláteis foi testado de acordo com as recomendações dos documentos aprovados pelo Clinical and Laboratory Standart Institute (CLSI, 2008), e os resultados expressos em concentração inibitória mínima (CIM).

Os ensaios foram desenvolvidos em quadriplicata, sendo realizado, portanto, quatro experimentos para cada cepa estudada. As microplacas foram incubadas a 35 °C durante 2 dias para leveduras e 7 dias a 35 °C para fungos filamentosos em estufa DeLeo e a leitura para determinação da CIM do óleo essencial foi realizada pelo método visual, comparando com os controles do teste, sendo um controle positivo do meio (RPMI 1640) e o outro o controle do diluente da amostra (Tween 2%).

#### 3.4.4 Material utilizado

Todos os materiais utilizados nesse trabalho foram autoclavados em autoclave vertical Phoenix, modelo AV 50.

### 3.5 Atividade anti-inflamatória

A atividade quimiotáxica *in vitro* foi empregada através da técnica de BOYDEN (1962) descrita por SUEYNAGA e colaboradores (2011).

Para a obtenção da suspensão dos neutrófilos, foi injetado um volume de 20 mL de uma solução de glicogênio a 1% na cavidade peritoneal de um rato Wistar macho, adulto, pesando cerca de 180 g, procedente do Biotério Central da UFRGS.

Após um período de 4 horas, a coleta das células foi realizada. Para esta coleta, o rato foi sacrificado por exposição ao éter etílico, a seguir, foi injetado na cavidade peritoneal, 60 mL de solução de Hanks.

Após, a cavidade peritoneal foi aberta e o líquido contendo as células foi retirado, lavando-se duas vezes esta cavidade com 10 mL de solução de Hanks cada, promovendo assim a lise das hemácias por meio de um choque hipotônico. Essas soluções foram centrifugadas a 3000 rpm durante 10 minutos. O sedimento obtido foi ressuspenso com solução de Hanks. A quantidade de células que foi adicionada ao compartimento superior da câmara de quimiotaxia foi de  $1,5 \times 10^6$  células/mL, contadas em câmara de Neubauer.

Como fator quimiotáxico foi utilizado lipopolissacarídeo de *Escherichia coli* (LPS), em uma concentração de 65 µg/mL, ativado em banho-maria a 37 °C por 30 minutos. As amostras foram igualmente dissolvidas em plasma, ativadas em banho-maria a 37 °C por 30 minutos e diluídas em solução de Hanks. O plasma foi diluído em uma solução de Hanks na concentração de 20%.

A atividade migratória dos leucócitos foi determinada em câmaras cilíndricas, construídas em acrílico transparente, consistindo de dois compartimentos (0,5 mL de capacidade cada): o compartimento inferior preenchido com uma solução contendo o fator quimiotáxico, e o compartimento superior com a suspensão de neutrófilos, separados por um filtro de nitrato de celulose com 13 mm de diâmetro e poros de 8 µm de diâmetro. As câmaras foram cobertas com gaze umedecida e envolta um saco plástico, sendo em seguida, incubadas na estufa, a 37 °C durante 1 hora. Imediatamente após esse período, os filtros foram removidos, fixados, corados, diafanizados *overnight* e montados entre lâmina e lamínula.

A leitura desses filtros foi realizada sob microscopia óptica, de campo claro conforme descrito por ZIGMOUND e HIRSCH (1973), utilizando-se ampliação de 40 vezes. Com o foco no plano superior do filtro, a observação microscópica será até que apenas duas células estejam visíveis. A distância que é medida em micrômetros, entre o plano superior do filtro e dessas duas células em foco, permitirá avaliar a capacidade migratória dos neutrófilos dos animais, esse resultado foi comparado estatisticamente com o controle positivo. A leitura foi realizada em cinco campos de cada filtro, totalizando 10 leituras por amostra, uma vez que cada amostra foi testada em duplicata. Os resultados foram expressos como média $\pm$ erro padrão da média (epm) e analisados estatisticamente pelo teste “t” de Student.

A carcaça do rato utilizado neste estudo foi envolta em sacos plásticos de cor branca, armazenadas em freezer (-20 °C) até o recolhimento desta carcaça sadia pela Empresa Aborgama do Brasil.

### **3.6 Atividade antioxidante**

A atividade antioxidante de cada óleo foi avaliada por espectrofotômetro Agilent, modelo 8453, utilizando como reagente o DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazila). As amostras foram testadas em diversas concentrações, utilizando metanol como branco. A mistura foi incubada a temperatura ambiente por 30 min. A absorbância foi medida a 515 nm. As concentrações testadas foram 10, 50, 100 e 150  $\mu\text{g/mL}$ .

### **3.7 Procedimentos para tratamento dos resíduos**

Durante este trabalho tentou-se diminuir, na medida do possível, a geração de resíduos. Os resíduos produzidos durante os experimentos foram segregados de acordo com suas características, conforme normas preconizadas pela COSAT (Comissão de Segurança do Trabalho da Faculdade de Farmácia da UFRGS).



#### **4. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

---



Foram coletadas quatro espécies de *Ocotea* de ocorrência no Estado do Rio Grande do Sul, nas cidades de Nova Petrópolis (29°22'33"S; 51°06'43"W), Caçapava do Sul (30°30'44"S; 53°29'29"W) e Santo Antônio da Patrulha (29°49'03"S; 50°31'11"W). Os dados de coleta da cada espécie estão apresentados na Tabela 1, bem como o rendimento de cada óleo obtido por hidrodestilação a partir das folhas frescas dessas espécies. Neste estudo foram realizadas duas coletas para *O. indecora*, *O. puberula* e *O. silvestris* e somente uma para *O. acutifolia*.

Tabela 1: Dados de coleta e rendimento dos óleos voláteis obtidos a partir das espécies coletadas.

Espécie	Data das coletas	Local	ICN	Rendimento (%)
<i>O. acutifolia</i>	11/09/2012	Caçapava do Sul	176762	0,2
<i>O. indecora</i>	18/07/2013	Santo Antônio da Patrulha	192541	0,3
<i>O. indecora</i>	18/07/2013	Santo Antônio da Patrulha	192541	0,2
<i>O. puberula</i>	03/07/2012 e	Nova Petrópolis	176761	0,2
<i>O. puberula</i>	08/04/2013	Nova Petrópolis	176761	0,2
<i>O. silvestris</i>	03/07/2012 e	Nova Petrópolis	176763	0,2
<i>O. silvestris</i>	08/04/2013	Nova Petrópolis	176763	0,2

#### 4.1 Análise química dos óleos voláteis

Os óleos voláteis obtidos a partir da hidrodestilação foram diluídos a 2% em éter etílico ou acetona (V/V) (Tédia) para a análise de seus constituintes em cromatógrafo à gás acoplado a detector de massas (CG-EM). Para facilitar a discussão dos resultados, as espécies foram separadas e seus resultados serão apresentados em ordem alfabética por espécie.

##### 4.1.1 *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez

A coleta de *O. acutifolia* foi realizada na cidade de Caçapava do Sul localizada na região da campanha do estado do Rio Grande do Sul. O rendimento obtido foi de 0,2% (V/V), apresentando coloração alaranjada e consistência viscosa.

Para esta, foram identificados um total de sete componentes no óleo de suas folhas, representando cerca de 98% do conteúdo total do óleo. O óleo das folhas foi caracterizado pela predominância de um diterpeno tetracíclico insaturado, o filocladeno (67,9%), seguido pelo sesquiterpeno bicíclico beta-selineno (18,0%),

formado a partir da rota biossintética do germacrano (Tabela 2). Neste óleo não foi verificada a presença de monoterpenos. O cromatograma obtido por CG-EM a estrutura química dos componentes majoritários dessa amostra encontram-se nas Figuras 6 e 7, respectivamente.

SILVA e colaboradores (2013) coletaram *O. acutifolia* em São Francisco de Assis, Rio Grande do Sul, e identificaram um total de 24 componentes no óleo volátil das folhas, sendo caracterizado pela predominância de sesquiterpenos oxigenados, como o óxido de cariofileno (56,9%), epóxido de calareno (11,7%) e gama-elemeno (8,2%). Neste mesmo estudo, foi identificada, ainda, a presença de monoterpenos, como alfa-tujeno, alfa-pineno, limoneno, linalol, dentre outros.

Pela primeira vez é relatada a presença de filocladeno para espécies do gênero *Ocotea*. Este composto já foi identificado anteriormente em populações da espécie *Cryptomeria japonica* D. Don (Cupressaceae) coletadas em Portugal (MOITEIRO et al., 2013) e em folhas, galhos e raízes de *Eryngium aquifolium* Cav. (Apiaceae) coletados na Espanha (PALÁ-PAÚL et al., 2010).

Tabela 2. Composição química do óleo volátil das folhas de *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez coletadas em Caçapava do Sul.

IR	Composto	%
1467	<i>Cis</i> - $\beta$ -guaieno	0,4
1470	$\beta$ -selineno	18,0
1480	$\alpha$ -selineno	3,2
1568	Óxido de cariofileno	3,0
1638	$\alpha$ -eudesmol	2,3
1659	$\alpha$ -muurolol	4,0
2019	Filocladeno	67,7
	Total	100,0
	Monoterpenos	0
	Sesquiterpenos hidrocarbonados	21,6
	Sesquiterpenos oxigenados	10,7
	Diterpenos	67,7

IR: Índice de retenção em coluna DB5.

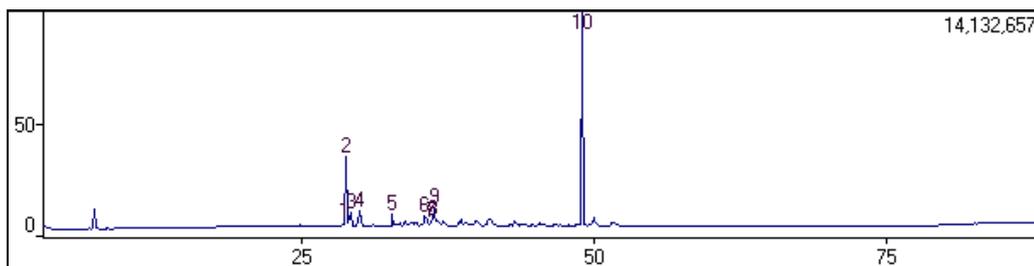


Figura 6. Cromatograma obtido por CG-EM do óleo volátil das folhas de *Ocotea acutifolia* (Nees) Mez.

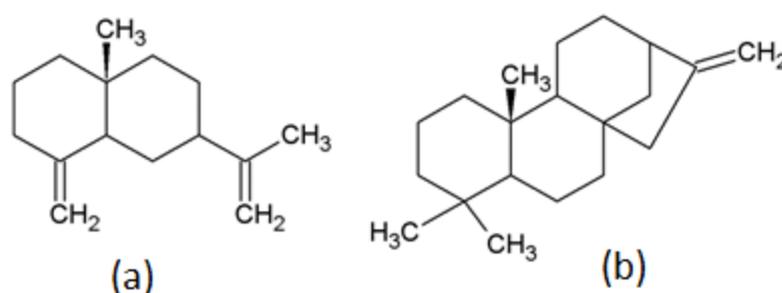


Figura 7. Componentes majoritários do óleo volátil de *Ocotea acutifolia*. Beta-selineno (a) e filocladeno (b).

#### 4.1.2 *Ocotea indecora* (Schott) Meisn. ex Mez

A coleta de *Ocotea indecora* foi realizada na cidade de Santo Antônio da Patrulha. Para esta espécie foram realizadas duas coletas no mesmo local, em indivíduos diferentes, um deles localizado sob a sombra (SA) de árvores de maior porte e o outro estando sob a incidência direta dos raios solares (SV). O rendimento de óleo obtido a partir das folhas foi de 0,3% e 0,2% para SA e SV, respectivamente. O óleo obtido para as duas amostras apresentou aspecto límpido e coloração amarela clara.

Foram identificados 24 componentes considerando o óleo das duas coletas, representando 100% e 95,3% do conteúdo para SA e SV, respectivamente (Tabela 3). Para ambas as coletas foram identificados sesquiterpenos hidrocarbonetos como componentes majoritários. Para a SA, germacreno D (10,5%), biciclogermacreno (40,7%) e tau-cadinol (10,2%) foram os componentes majoritários e para a SV guaiol (30,2%), beta-eudesmol (12,7%) e alfa-eudesmol (27,6%) foram os principais

compostos. O cromatograma dessas duas análises e a estrutura química dos componentes majoritários encontram-se nas Figuras 8, 9, 10 e 11, respectivamente. É interessante observar que o óleo SV apresentou maior teor de compostos oxigenados em relação ao óleo SA, sugerindo que a luminosidade pode influenciar diretamente na qualidade do óleo. Os sesquiterpenos germacreno D e biciclogermacreno, presentes em SA, podem sofrer rearranjos e oxidações diversas, enzimáticas ou não, originando diferentes sesquiterpenoides com esqueleto cadinano, guaiano ou eudesmano, podendo ser ocasionado pela elevação da temperatura (BÜLOW e KONIG, 2000). Cabe ressaltar que as plantas coletadas foram armazenadas em freezer até o momento da extração e os óleos obtidos também foram armazenadas a baixas temperaturas até o momento da análise química.

Outra diferença entre as duas coletas foi a presença de monoterpenos na coleta realizada na sombra (SA), sendo estes derivados do pirofosfato de geranila, precursor inicial dos monoterpenos, que após algumas reações de ciclização dá origem a compostos do tipo estrutural pinanos (alfa-pineno, beta-pineno), *p*-mentanos (limoneno) e acíclicos como mirceno (POULOSE e CROTEAU, 1978). A amostra SV não apresentou esta classe de compostos.

É conhecido que a variabilidade química, tanto quantitativa quanto qualitativa, pode ocorrer por vários motivos. Considerando os estádios fenológicos da espécie vegetal, ocorrem alterações bioquímicas e fisiológicas capazes de modificar a produção de substâncias biologicamente ativas, influenciando diretamente no teor e na qualidade dos óleos voláteis. Por essa razão, os óleos não são constantes em termos quali e quantitativos, sendo diretamente influenciados por fatores ambientais como solo, luminosidade, temperatura, radiação, déficit hídrico, local e horário de coleta. Assim, diferentes combinações de solo (teor de acidez ou alcalinidade), clima, relevo, umidade, temperatura e insolação podem ocasionar variabilidade nas características química e física dos óleos. Assim, plantas que foram coletadas em locais com diferente intensidade de luz, calor e temperatura podem ter um desenvolvimento diferenciado, sendo, em geral, menor para aquelas sob maior incidência de frio, por exemplo.

Em estudo analisando a composição química do óleo volátil de *Dalbergia rutescens* (Vell.) Britton (Fabaceae) e a influência das condições ambientais na espécie, foi observado que o rendimento do óleo volátil foi fortemente influenciado pelas condições ambientais, apresentando um comportamento diretamente proporcional à temperatura e nebulosidade e inversamente proporcional à precipitação. Em relação à influência das condições ambientais sobre a composição química, foi verificado que linalol,  $\alpha$ -ionona e  $\beta$ -ionona, compostos que caracterizaram o óleo na primavera, sofreram influência diretamente proporcional da temperatura e da insolação. Foi observado, ainda, que as estações do outono e inverno foram caracterizadas pela ocorrência de  $\beta$ -damascenona e geranil-acetona compostos que, a princípio, não apresentaram relação com as condições ambientais (MENDES et al., 2012).

Além dos fatores abióticos, como solo, temperatura e luminosidade, fatores genéticos também podem apresentar grande influência sobre o teor e a composição química dos óleos voláteis, podendo estes caracterizar diferentes genótipos conforme sua constituição. A determinação da extensão da influência das condições edafoclimáticas e dos fatores genéticos sobre os óleos pode ser determinada pelo sistema de cultivo com condições controladas.

Tabela 3. Composição química do óleo volátil das folhas de *Ocotea indecora* coletadas em Santo Antônio da Patrulha.

IR	Composto	Coleta SA 18/07/2013	Coleta SV 18/07/2013
926	$\alpha$ -pineno	4,2	
968	$\beta$ -pineno	9,0	
985	Mirceno	0,7	
1021	Limoneno	2,3	
1395	$\alpha$ -copaeno	3,2	
1378	$\beta$ -elemeno	1,3	
1402	$\beta$ -cariofileno	1,8	3,0
1436	$\beta$ -humuleno	0,9	
1465	Germacreno D	10,5	1,7
1483	Biciclogermacreno	40,7	3,1
1488	Germacreno A	0,8	
1506	$\delta$ -cadineno	3,3	2,2
1539	Germacreno B	1,1	
1564	Espatulenol	4,6	2,0
1567	Óxido de cariofileno	Traços	4,4
1570	Globulol	2,5	1,9
1577	<i>Epi</i> -globulol	0,6	
1588	Guaiol		30,2
1615	1- <i>epi</i> -cubenol		1,5
1625	<i>Iso</i> -espatulenol	1,6	
1629	<i>tau</i> -cadinol		4,9
1639	$\beta$ -eudesmol		12,7
1642	$\alpha$ -cadinol	10,2	
1647	$\alpha$ -eudesmol		27,6
Total		100,0	95,2
Monoterpenos hidrocarbonados		16,1	0
Sesquiterpenos hidrocarbonados		64,3	9,9
Sesquiterpenos oxigenado		19,6	85,3

IR: Índice de retenção em coluna DB5; SA: coleta realizada na sombra; SV: coleta realizada no sol.

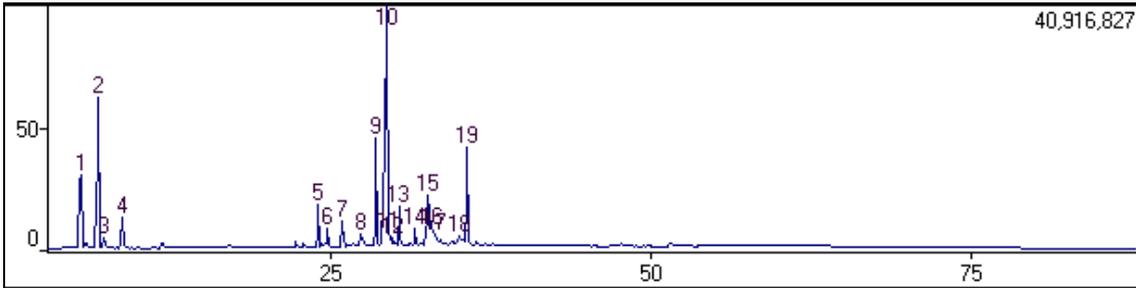


Figura 8. Cromatograma obtido por CG-EM do óleo volátil das folhas de *Ocotea indecora*, coletadas em indivíduo localizado na sombra (SA).

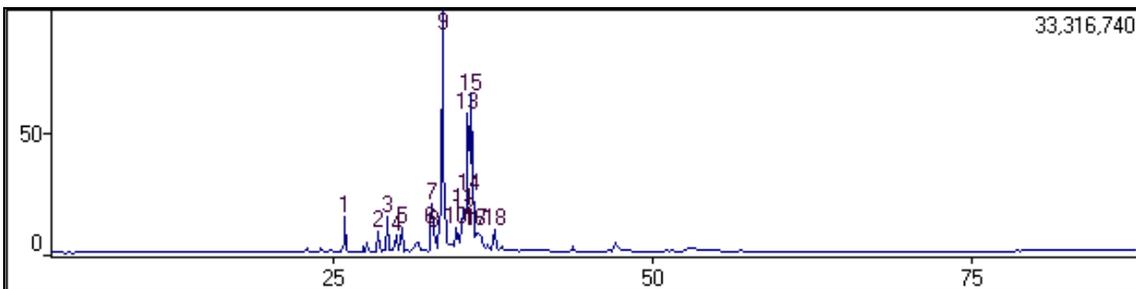


Figura 9. Cromatograma obtido por CG-EM do óleo volátil das folhas de *Ocotea indecora*, coletadas em indivíduo com incidência direta de luz solar (SV).

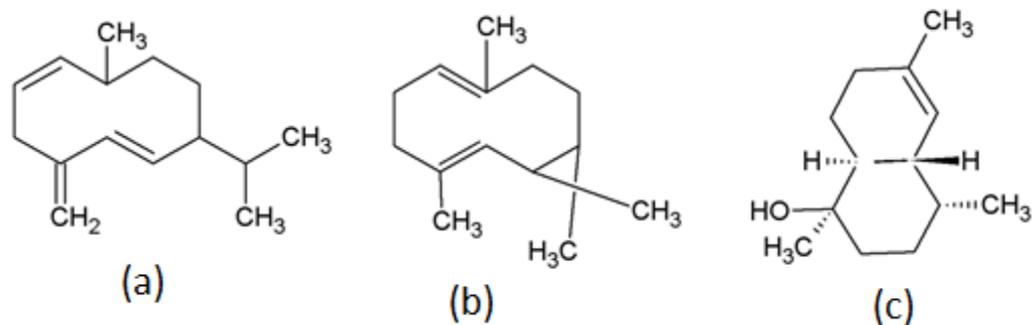


Figura 10. Componentes majoritários do óleo volátil de *Ocotea indecora* (SA), germacreno D (a), bicylogermacreno (b) e *tau*-cadinol (c).

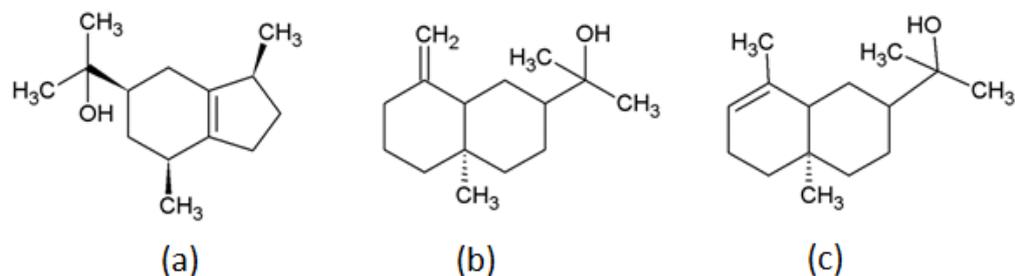


Figura 11. Componentes majoritários do óleo volátil de *Ocotea indecora* (SV) guaiol (a), beta-eudesmol (b) e alfa-eudesmol (c).

#### 4.1.3 *Ocotea puberula* (Rich.) Nees

A coleta de *Ocotea puberula* foi realizada na cidade de Nova Petrópolis. Foram coletadas amostras de dois indivíduos próximos, sob a incidência direta dos raios solares. O rendimento de óleo a partir das folhas foi de 0,2% para ambas as coletas. A coloração deste óleo foi amarelo e límpido para as duas amostras.

Foram identificados 18 componentes no total das folhas das duas coletas, correspondendo a aproximadamente 94% do conteúdo de óleo para cada amostra. Para ambas as coletas, sesquiterpenos hidrocarbonetos foram os componentes majoritários (Tabela 4). Para a coleta 1, beta-cariofileno (25,2%) foi o principal constituinte do óleo, seguido pelos sesquiterpenos oxigenados *E*-nerolidol (13,1%) e espatulenol (11,8%) e na coleta 2 foram identificados também os sesquiterpenos hidrocarbonetos aromadendreno (11,5%) e beta-acoradieno (12,5%), seguido pelo sesquiterpeno oxigenado globulol (22,6%). Apesar da grande diferença quantitativa, há uma certa proximidade química, pois os principais sesquiterpenos oxigenados identificados na coleta 2 podem ser originados pela oxidação dos sesquiterpenos hidrocarbonetos predominantes na coleta 1. O cromatograma dessas duas análises encontram-se nas Figuras 12 e 13 e a estrutura química dos componentes majoritários encontram-se nas Figuras 14 e 15. Nas duas coletas não foi identificada a presença de monoterpenos para essa espécie.

No estudo de DE ARAÚJO e colaboradores (2001), foram identificados no óleo das folhas de *Ocotea puberula* três monoterpenos e dez sesquiterpenos, sendo beta-cariofileno e biciclogermacreno os compostos majoritários em seu estudo.

RAGGI (2008) verificou a composição química das folhas de três indivíduos, sendo que apresentaram como composto majoritário o hidrocarboneto sesquiterpênico beta-cariofileno (25,25%), além de beta-elemeno, biciclogermacreno, alfa-copaeno e alfa-humuleno. Este estudo corrobora com os resultados obtidos por DE ARAÚJO e colaboradores (2001) e com parte dos resultados encontrados neste trabalho.

Tabela 4. Composição química do óleo volátil de diferentes coletas de *Ocotea puberula*.

IR	Composto	Coleta 1 03/07/2012	Coleta 2 08/04/2013
1365	$\alpha$ -copaeno	1,1	
1394	Isocariofileno	9,5	0,3
1406	$\beta$ -cariofileno	25,2	7,4
1425	Aromadendreno	0,7	11,5
1440	$\alpha$ -humuleno	2,7	Traços
1447	<i>Allo</i> -aromadendreno	0,8	Traços
1461	$\alpha$ -acoradieno	1,4	3,7
1463	$\beta$ -acoradieno	5,4	12,5
1467	Germacreno D	0,8	
1481	Biciclogermacreno	1,0	6,0
1509	$\delta$ -cadineno	0,5	1,9
1554	<i>E</i> -nerolidol	13,0	6,0
1566	Espatuleno	11,8	6,3
1570	Óxido de cariofileno	7,9	
1573	Globulol	6,6	22,6
1581	<i>Epi</i> -globulol	4,8	4,4
1584	Ni		1,2
1591	Ni	4,6	1,8
1645	$\alpha$ -muuro	1,4	
1815	Ni		3,2
1817	Ni		0,4
1826	ni*		10,7
2099	Nonadecanal	0,4	
	Total	94,8	93,3
	Sesquiterpenos hidrocarbonetos	62,0	49,2
	Sesquiterpenos oxigenados	32,4	33,4
	Compostos alifáticos	0,4	0

IR: Índice de retenção em coluna DB5. ni: não identificado; ni\*: M/Z(Rel Int): 41(100), 55(28), 69(33), 91(32), 105(41), 119(19), 131(26), 145(32), 159(42), 173(9), 187(8), 202(41), 220(3)

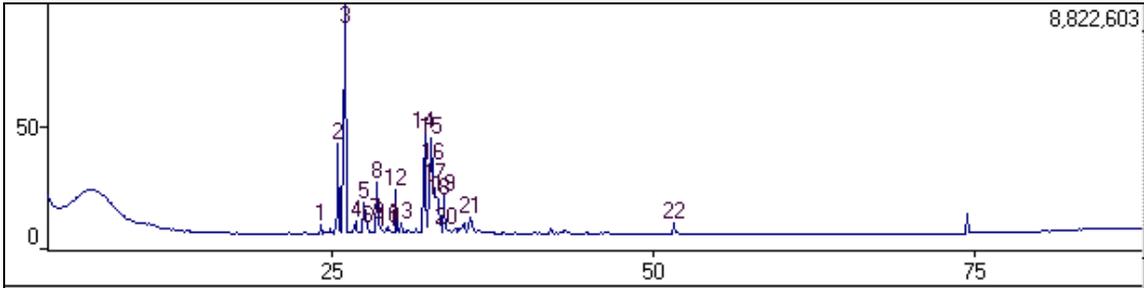


Figura 12. Cromatograma da identificação dos componentes voláteis das folhas de *Ocotea puberula* (coleta 1).

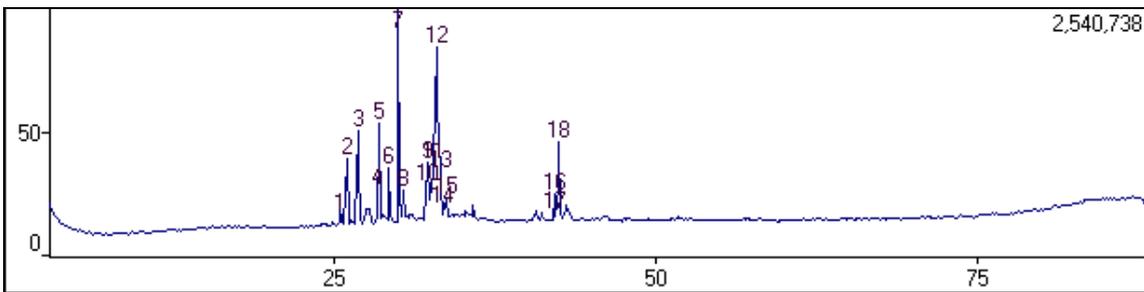


Figura 13. Cromatograma da identificação dos componentes voláteis das folhas de *Ocotea puberula* (coleta 2).

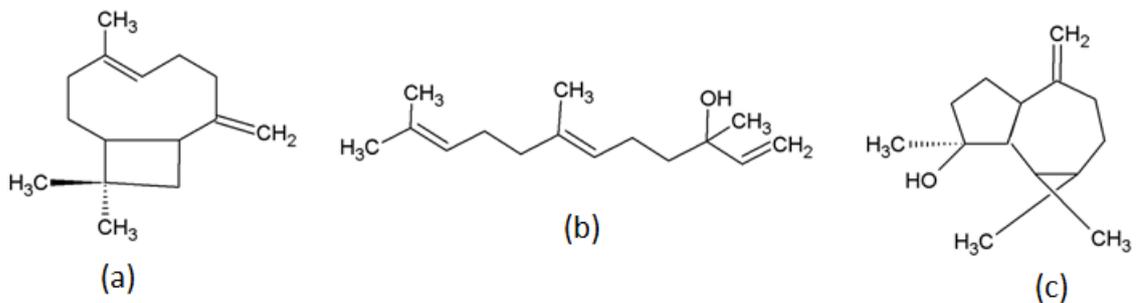


Figura 14. Estrutura química dos componentes majoritários do óleo volátil de *Ocotea puberula* (coleta 1): beta-cariofileno (a), *E*-nerolidol (b) e espatulenol (c).

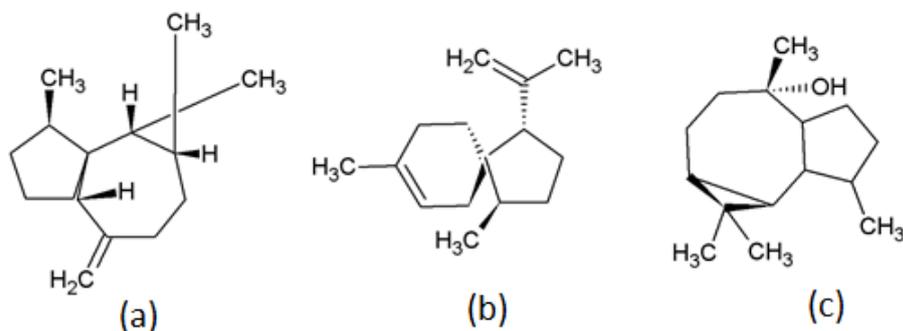


Figura 15. Estrutura química dos componentes majoritários do óleo volátil de *O. puberula* (coleta 2): aromadendreno (a), beta-acoradieno (b) e globulol (c).

#### 4.1.4 *Ocotea silvestris* Vattimo-Gil

A coleta de *Ocotea silvestris* foi realizada na cidade de Nova Petrópolis. Foram coletadas folhas de dois indivíduos próximos, e ambos sob a incidência direta dos raios solares. O rendimento das folhas foi de 0,2% para ambas as coletas. A coloração deste óleo foi amarelo claro e límpido para as duas coletas.

Foram identificados dez componentes, totalizando 90% e 100% dos conteúdos total dos óleos, respectivamente. Para esta espécie os constituintes químicos dos óleos obtidos foi praticamente a mesma. Para ambas as coletas o óleo foi caracterizado por sesquiterpenos hidrocarbonados, que apresentaram quase que a totalidade da percentagem, sendo germacreno D (54,1% e 73,3%, respectivamente para coleta 1 e 2) e biciclogermacreno (29,8% e 26,7%, respectivamente para coleta 1 e 2), os principais componentes do óleo volátil (Tabela 5). O cromatograma dessas duas análises encontra-se nas Figuras 16 e 17. Não foi observada a presença de monoterpenos para as duas coletas de *O. silvestris*.

Tabela 5. Identificação e comparação química de espécies de *Ocotea silvestris*.

IK	Composto	Coleta 1 03/07/2012	Coleta 2 08/04/2013
1383	$\beta$ -elemeno	0,3	
1407	$\beta$ -cariofileno	1,9	
1466	$\gamma$ -muuroleno	0,6	
1467	Germacreno D	54,1	73,3
1484	Biciclogermacreno	29,8	26,7
1488	$\alpha$ -muuroleno	0,3	
1511	$\delta$ -cadineno	2,3	
1568	Espatuleno	1,1	
1575	Globulol	1,3	
1649	$\alpha$ -muurolol	0,2	
Total		91,9	100,0
Sesquiterpenos hidrocarbonetos		89,3	
Sesquiterpenos oxigenados		2,6	

IR: Índice de retenção em coluna DB5.

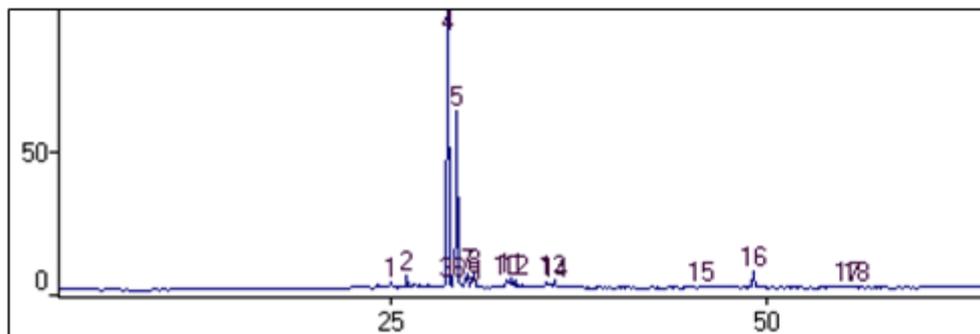


Figura 16. Cromatograma obtido por CG-EM do óleo volátil das folhas de *Ocotea silvestris* (coleta 1).

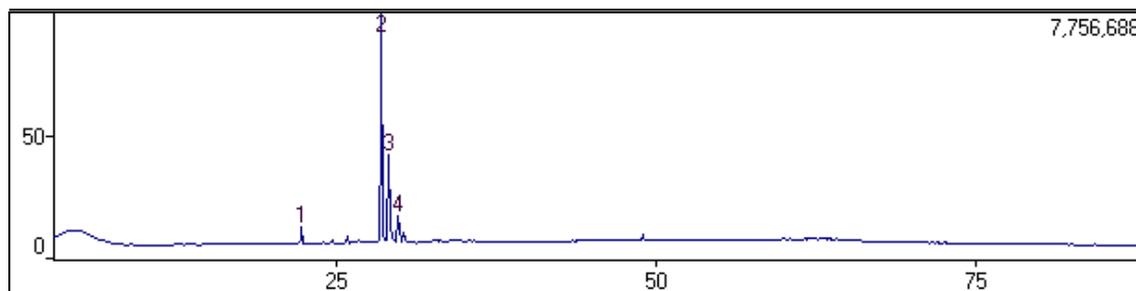


Figura 17. Cromatograma obtido por CG-EM do óleo volátil das folhas de *Ocotea silvestris* (coleta 2).

## 4.2 Atividade Antifúngica

O ensaio para avaliação de atividade antifúngica foi realizado pelo método de microdiluição em caldo, de acordo com os protocolos padronizados pelo CLSI M27-S4 e M38-A2 para fungos leveduriformes e fungos filamentosos respectivamente. Todos os ensaios foram realizados em quadruplicata. Para este ensaio foram testadas as seguintes amostras de óleos voláteis de *Ocotea*: *O. acutifolia*, *O. indecora* SA e SV, *O. puberula* coleta 2 e *O. silvestris* coleta 1.

As amostras utilizadas nesse estudo foram testadas frente a 4 cepas de fungos filamentosos, dentre as quais *Microsporum canis* 38, *Microsporum gypseum* 01, *Trichophyton mentagrophytes* 32 e *Trichophyton rubrum* 51. Para todas as amostras não foi observada inibição do crescimento das cepas na concentração de 500 µg/mL.

Para fungos leveduriformes, todas as amostras foram testadas frente a 6 cepas, sendo elas *Candida albicans* 15, *Candida glabrata* 09, *Candida krusei* 03, *Candida parapsilosis* 52, *Candida tropicalis* 750 e *Cryptococcus neoformans* 16. Todas as amostras apresentaram alguma inibição no crescimento frente à cepa de *Candida parapsilosis* 52. Nas demais cepas não houve inibição no crescimento na concentração de 500 µg/mL.

Considerando os resultados obtidos com a cepa de *Candida parapsilosis* 52, as amostras foram testadas numa concentração de 500 µg/mL utilizando cinco cepas diferentes deste fungo. Os ensaios foram comparados com os controles positivos do teste, sendo um o diluente utilizado nas amostras (tween 20 a 2%) e o outro o meio RPMI 1640 com o inóculo. Nesses dois controles positivos sempre foi

observado o crescimento do microrganismo. Como referência do controle negativo, foi utilizado apenas o meio RPMI 1640 na placa de 96 poços. Nesse poço em nenhum momento foi observado crescimento microbiológico e caso houvesse o crescimento de microrganismos o experimento seria rejeitado por apresentar contaminação no meio. A leitura dos resultados foi realizada pelo método visual.

Os resultados do *screening* frente a fungos filamentosos e leveduriformes encontram-se na Tabela 6. Na Figura 18 é apresentado um fluxograma da atividade antifúngica.

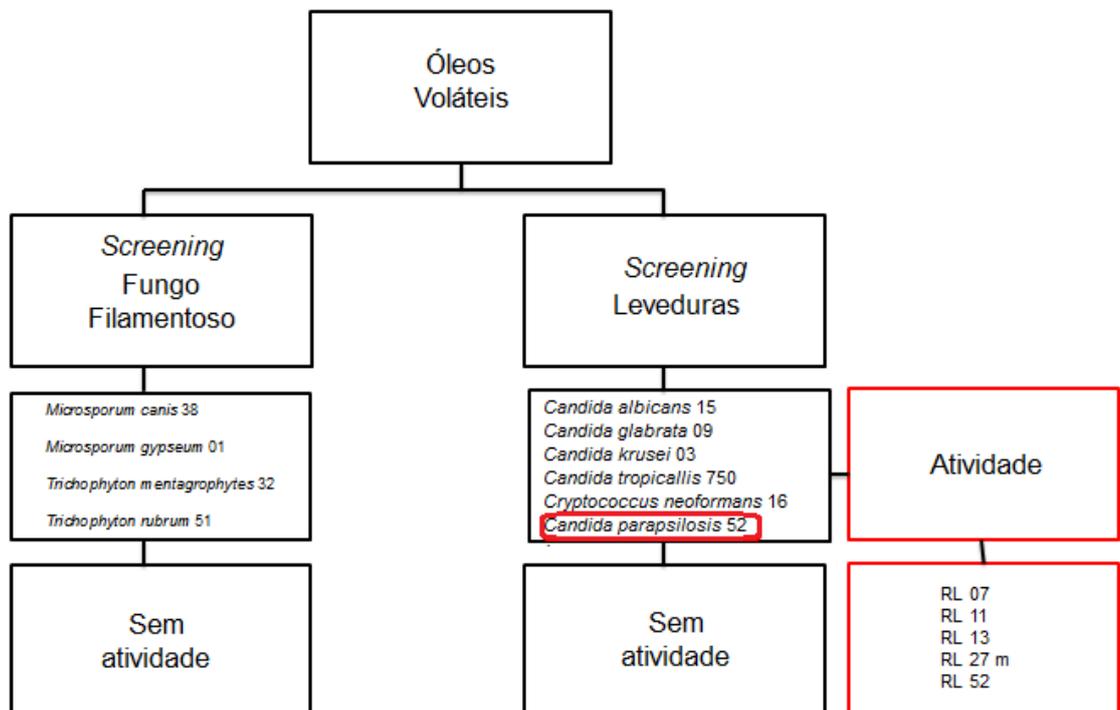


Figura 18. Fluxograma de trabalho realizado para a atividade antifúngica.

Tabela 6. *Screening* contra fungos patogênicos filamentosos e leveduriformes do óleo volátil de diferentes espécies de *Ocotea* comparando com os controles do ensaio.

	O. <i>Acutifolia</i>	O. <i>indecora</i> SA	O. <i>indecora</i> SV	<i>O. puberula</i> coleta 2	O. <i>silvestris</i> coleta 1	Controle Diluyente	C +	C -
<i>M canis</i> 38	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>M. gypseum</i> 01	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>T. mentagrophytes</i> 32	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>T. rubrum</i> 51	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>C. albicans</i> 15	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>C. glabrata</i> 09	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>C. krusei</i> 03	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>C. parapsilosis</i> 52	-	-	-	-	-	+	+	-
<i>C. tropicalis</i> 750	+	+	+	+	+	+	+	-
<i>Cryptococcus</i> <i>neoformans</i> 16	+	+	+	+	+	+	+	-

+: houve crescimento; -: sem crescimento; C+: controle positivo; C-: controle negativo; SA: coleta realizada na sombra; SV: coleta realizada no sol

Após os resultados do *screening* frente às cepas de fungos filamentosos e leveduriformes, a cepa leveduriforme de *Candida parapsilosis* 52 por apresentar uma inibição frente aos óleos testados foi separada para realizar o ensaio da concentração inibitória mínima (CIM). Como as cepas de fungos filamentosos não inibiram o crescimento, estas não foram testadas.

Para o ensaio da concentração inibitória mínima (CIM) utilizando o método de microdiluição em caldo, conforme preconizado pelo CLSI, foram utilizadas cinco cepas diferentes de *Candida parapsilosis* (RL 07, RL 11, RL 13, RL 27 m e RL 52) para a sua comparação frente a inibição, sendo que todas as cepas foram resistentes. No entanto, todos os óleos voláteis testados apresentaram uma concentração inibitória mínima na concentração de 500 µg/mL.

DA SILVA (2010) avaliou a atividade antifúngica de extratos de *Ocotea acutifolia*, rico em alcaloides, apresentando potencial efeito fungitóxico. A concentração inibitória mínima do extrato alcaloidico contra as cepas de *Candida glabrata*, *Candida tropicalis* e *Cryptococcus neoformans* foi de 7,8 µg/mL. Para o extrato etanólico das folhas e cascas do caule, os melhores resultados foram frente a *C. neoformans* (62,5 µg/mL) e para *C. tropicalis* (15, 6 µg/mL), respectivamente.

RAGGI (2008), avaliou a atividade antifúngica por bioautografia em placa de sílica gel, do óleo volátil de *Ocotea puberula*, observando-se fraca atividade frente aos dois fungos testados, *Cladosporium cladosporioides* e *C. sphaerospermum*. Este autor também avaliou essa atividade frente às cepas de *Aspergillus niger* e *Candida albicans*, com diferentes coletas no ano (3 indivíduos) de *O. puberula*, mas os resultados mostram que não houve variação de atividade entre os indivíduos e entre as estações do ano frente ao fungo *A. niger*. A média da porcentagem de inibição foi de 67%.

A atividade antibacteriana dos óleos voláteis de folhas de *O. puberula* também foi testada por RAGGI (2008) para três bactérias, dentre eles, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Escherichia coli* e os resultados mostram que há diferenças entre os indivíduos, o que sugere o autor, que seja provavelmente em função das variações quantitativas na composição. Com relação à bactéria *S. aureus*, o óleo volátil das folhas do indivíduo 2, coletadas no início de outono, foi o mais ativo com 94,4% de inibição e o menos ativo foi o referente à coleta de início da primavera do indivíduo 1. Os óleos voláteis das coletas do meio de verão e início de outono tiveram, em média, 70% de inibição frente à bactéria *P. aeruginosa*.

### 4.3 Atividade Anti-inflamatória

Durante um processo inflamatório, ocorrem alterações hemodinâmicas e na permeabilidade dos vasos sanguíneos e ainda na agregação de células inflamatórias. Esse acúmulo de células provém da migração leucocitária direcionada ao foco do processo inflamatório, chamado de quimiotaxia (MONKS et al., 2002). Os leucócitos, nesse experimento, são neutrófilos polimorfonucleares especializados na defesa do organismo contra vírus, bactérias, fungos ou ainda outros patógenos, e estes são rapidamente ativados após a exposição, migrando da corrente sanguínea ao foco da lesão (ZEN et al., 2006). Dessa maneira, os óleos voláteis de espécies de *Ocotea* foram submetidos ao ensaio anti-quimiotático, a fim de avaliar a sua capacidade de inibição da migração leucocitária.

A atividade anti-quimiotática *in vitro* foi realizada seguindo a técnica de BOYDEN (1962) descrita por SUEYNAGA e colaboradores (2011). Dessa maneira, as amostras dos óleos voláteis foram testadas nas concentrações de 0,3125 a 5 µg/mL. Nenhuma

das amostras analisadas apresentou atividade quimiotóxica nas concentrações testadas quando comparadas ao controle do teste que foi indometacina.

Há relatos na literatura que plantas pertencentes ao gênero *Ocotea* apresentam atividade anti-inflamatória. No entanto, há poucos estudos com essa atividade correlacionada do a esse gênero e os testes mais utilizados encontrados são através da indução do processo inflamatório pelo ensaio com carragenina. Não há relatos do ensaio anti-quimiotáxico para espécies de *Ocotea*.

#### **4.4 Atividade Antioxidante**

Espécies reativas de oxigênio, como íon superóxido ( $O_2^-$ ), peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) e íon hidroxila ( $OH\cdot$ ) são altamente reativas e podem gerar processos patológicos quando sua produção está em desequilíbrio com o sistema antioxidante do organismo. A formação desses radicais está diretamente envolvida em processos tanto inflamatórios quanto infecciosos e a atividade antioxidante pode ocorrer por diversos mecanismos (SINGH et al., 2009; JIA et al., 2010). Devido a isso, o óleo volátil de *O. silvestris* foi submetido ao ensaio de avaliação da capacidade antioxidante pelo método DPPH.

Neste ensaio, quando a substância é antioxidante, atua basicamente doando um átomo de hidrogênio formando um radical mais estável (MIGUEL, 2010). Dessa maneira, a capacidade de redução da formação de radicais é determinada pela diminuição da absorção induzida pelo antioxidante.

Sendo assim, a atividade sequestradora de radicais livres foi determinada, nas concentrações de 10, 50, 100 e 150  $\mu\text{g/mL}$ . Entretanto, nenhuma amostra apresentou efeito antioxidante por esse método nas concentrações testadas, comparando com o controle do teste (ácido ascórbico).





Foram coletadas e analisadas quatro espécies de *Ocotea* de ocorrência no Rio Grande do Sul. Os óleos voláteis obtidos dessas espécies não variaram em seu rendimento, mas, por outro lado, houve variação, tanto quali quanto quantitativa na sua composição química entre as espécies.

Os óleos voláteis são, tradicionalmente, classificados em duas séries: terpênica e fenilpropanoide. A série terpênica, por sua vez, é composta por monoterpenos e sesquiterpenos. O óleo obtido de *Ocotea acutifolia* representa uma exceção dentre as amostras analisadas, apresentando o filocladeno, um diterpeno, como principal constituinte do óleo. É a primeira vez que é observada a ocorrência deste diterpeno na família Lauraceae.

Com relação à classe de terpenos encontrada, a maioria das amostras foi caracterizada pela presença de sesquiterpenos (Figura 19). Não foi observada a presença de monoterpenos nas espécies estudadas, exceto para uma das coletas realizadas para *O. indecora*, cujo óleo apresentou 16% de monoterpenos hidrocarbonetos, representados em especial por alfa- e beta-pineno. Este fato pode estar relacionado ao fato de esta ser a única coleta realizada em um indivíduo localizado a sombra de outras árvores de maior porte. Suas folhas, nestas condições, apresentavam-se em maior tamanho e mais escuras quando comparado à coleta feita em indivíduo recebendo incidência direta da luz solar. É sabido que o ambiente onde o vegetal se desenvolve pode influenciar na quantidade de óleo, bem como na composição química deste. A temperatura, a umidade, o regime de chuvas, a exposição ao sol, entre outros fatores como o solo, que fornece os nutrientes para a planta, exercem influência direta sobre a produção de óleo voláteis, ainda mais se o óleo estiver estocado em estruturas histológicas localizadas na superfície da folha. Assim, este fato pode explicar, pelo menos em parte, a ausência de monoterpenos nas demais espécies, pois todas estavam sob a incidência direta da luz solar.

Dentre os sesquiterpenos, a maioria das amostras é formada pelos sesquiterpenos cíclicos. Em apenas uma amostra foi observada quantidade expressiva do sesquiterpeno acíclico *E*-nerolidol (13% - *O. puberula*). Dentro do grupo dos sesquiterpenos cíclicos, diferentes tipos de esqueletos ocorrem simultaneamente nas espécies analisadas. De forma geral é observada a predominância de compostos provenientes da rota biossintética dos germacranos.

Dentre os compostos que predominam neste grupo estão o biciclogermacreno, espatulenol, aromadendreno e globulol.

O grupo cariofilano foi predominante em uma das coletas de *O. puberula*, representado pelo beta-cariofileno. A rota dos cadinanos está presente em quase todas as amostras, principalmente nas coletas de *Ocotea silvestris*, sendo representado pelo germacreno D.

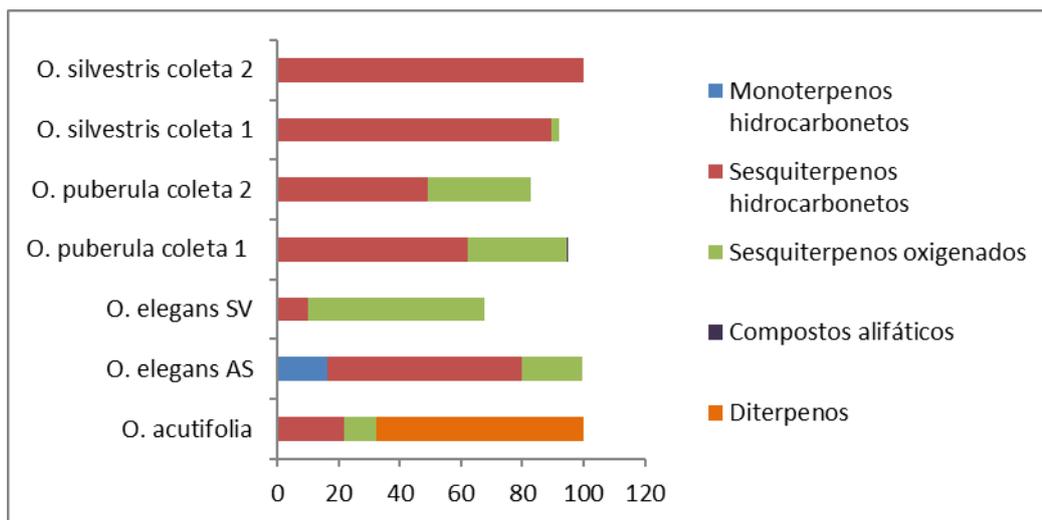


Figura 19. Porcentagem de terpenoides encontrados nas espécies de *Ocotea*.

Outros estudos realizados com espécies de *Ocotea* apontaram para a presença tanto de monoterpenos quanto de sesquiterpenos. O óleo de *O. morae* foi analisado e os monoterpenos beta-pineno e mirceno, bem como os sesquiterpenos germacreno D e biciclogermacreno, foram caracterizados como principais componentes do óleo. Este resultado corrobora com os resultados encontrados, demonstrando que estes compostos são comuns a espécies do gênero *Ocotea*, apresentando semelhança com o óleo de *O. indecora* (CHAVERRI et al., 2011).

Nos estudos de TAKAKU e colaboradores (2007), estes fizeram a identificação química de dez espécies de *Ocotea*. Nenhuma espécie citada encontra-se nesse estudo, mas os autores observaram em *O. holdridgeana* a presença de alfa-pineno (29,9%), germacreno-D (19,9%) e beta-pineno (9,1%). Para *O. meiziana* foram identificados alfa-pineno (30,2%), beta-cariofileno (24,8%), beta-pineno (16,5%) e germacreno D (16,5%). O óleo de *O. tonduzii* apresentou alfa-

pineno (4,2%) e beta-pineno (25,0%) como componentes majoritários, demonstrando que monoterpenos podem estar presentes em grandes quantidades.

Os óleos voláteis das folhas de *Ocotea nigrescens* e *Ocotea splendens* coletados em Manaus, Brasil, foram analisados e beta-cariofileno foi a substância com o maior percentual em ambas as espécies (37,9% e 51,0%, respectivamente). Outros componentes detectados foram alfa-pineno (6,7%), beta-pineno (6,9%), linalol (5,5%) e alfa-copaeno (6,2%), em *O. nigrescens* e óxido de cariofileno (9,9%), linalol isovalerato (5,7%), alfa-humuleno (6,2%) e alfa-guaieno (4,5%) em *O. splendens* (YAMAGUCHI et al., 2013).

Segundo o estudo de BATISTA e colaboradores (2010), foi isolado um sesquiterpeno aromático (*rel*-(1*R*, 4*S*)-7-hydroxycalamenene) de *Ocotea indecora* coletada em São Paulo. Este composto não foi identificado nas duas coletas realizadas em Santo Antônio da Patrulha, e a presença de terpenos aromáticos é pouco frequente nas espécies deste gênero.

No ensaio para atividade anti-inflamatória *in vitro* os óleos de todas as espécies foram ensaiados nas concentrações de 0,3125 a 5 µg/mL. Entretanto, nenhuma das amostras apresentou atividade. Para a ação antioxidante frente ao DDPH, apenas foi possível testar o óleo volátil de *O. silvestris*, pois somente esta dispunha de quantidade suficiente de óleo. Assim, esta espécie foi testada nas concentrados de 10, 50, 100 e 150 µg/mL, mas não foi observado resultado positivo para esta ação.

Na atividade antifúngica, os óleos testados apresentaram um resultado seletivo para *Candida parapsilosis*. Assim, procedeu-se à determinação da concentração inibitória mínima, sendo observada uma inibição de aproximadamente 80% do crescimento do fungo na concentração de 500 µg/mL. Esta concentração é a preconizada para amostras de origem natural. Entretanto, segundo os resultados obtidos, tal concentração não representa um valor promissor, pois é a concentração limite utilizada no ensaio. Como foi observada uma certa inibição, seria interessante aprofundar os estudos no sentido de verificar possível sinergismo com antifúngicos.

Os óleos voláteis são uma mistura complexa de compostos e sabe-se que muitas vezes as atividades biológicas podem estar associadas ou não a compostos isolados. Para reverter resultados nas atividades biológicas de um composto em uma mistura, utilizam-se agentes químicos, que são farmacologicamente inativos, mas que podem alterar a função da barreira da pele de maneira reversível e segura.

Os terpenos são um dos grupos químicos mais estudados, apresentando capacidade na promoção da permeação, apresentando uma baixa toxicidade sistêmica e menor irritação na pele. Esses compostos podem ser combinados com propilenoglicol, proporcionando um aumento significativo na permeação transdérmica de fármacos hidrofílicos como a hidrocortisona e a cafeína. O mecanismo de ação desses compostos é através da modificação da solubilidade da camada córnea, o que permite aumentar a partilha entre a pele e o fármaco, assim como, o aumento da difusão dos fármacos através da pele (YUNES e CECHINEL FILHO, 2012; VIEIRA, 2013).

Esses compostos menores tendem a ser mais ativos e apresentam uma maior capacidade de absorção cutânea. Os terpenos apolares, como o d-limoneno, proporcionam uma maior penetração para os compostos lipofílicos enquanto que os compostos polares, como o 1,8-cineol, manifestam uma melhor penetração para os compostos hidrofílicos. Esses compostos provocam a ruptura da bicamada lipídica do estrato córneo, enquanto que o composto nerolidol reforça as camadas duplas dessa mesma barreira. Outro composto estudado foi o mentol, atuando na permeação cutânea por meio de um mecanismo duplo, ou seja, inicialmente leva à formação de uma mistura eutética com o composto permeante, aumentando desta forma a sua solubilidade, seguida da alteração da propriedade barreira do estrato córneo. O mentol distribui-se preferencialmente nos espaços intercelulares do estrato córneo, causando uma alteração reversível das camadas lipídicas, promovendo a permeação dos fármacos (VIEIRA, 2013; RAFEIRO, 2013).

**CONCLUSÕES**

---

---



- Todas as espécies coletadas apresentaram conteúdo de óleo volátil, com teores variando de 0,2 a 0,3%.
- Nos óleos analisados foi observada a predominância de sesquiterpenos, sendo os principais compostos caracterizados, beta-cariofileno, germacreno D, biciclogermacreno, E-nerolidol e guaiol.
- Apenas para uma espécie, *O. indecora*, foi observada ocorrência de monoterpenos, em especial beta-pineno.
- *Ocotea acutifolia* foi a única espécie que apresentou como principal componente do óleo volátil um diterpeno, filocladeno, sendo este de ocorrência inédita neste gênero.
- No *screening* frente a fungos filamentosos, nenhuma das amostras ensaiadas apresentou atividade.
- No *screening* contra fungos leveduriformes, todas as amostras testadas apresentaram uma inibição para a cepa de *Candida parapsilosis* 52.
- A concentração inibitória mínima foi avaliada para cinco cepas de *Candida parapsilosis*, sendo que a CIM foi estabelecida na concentração de 500 µg/mL.
- Nenhuma das amostras analisadas apresentou atividade anti-inflamatória nas concentrações de 0,3125 a 5 µg/mL.
- Apenas a espécie *Ocotea silvestris* foi testada para a atividade antioxidante, porém não demonstrou ação.
- O presente trabalho contribuiu para ampliar o conhecimento da composição química dos óleos voláteis de espécies de *Ocotea* presentes no Rio Grande do Sul.







ADAMS, R. P. **Identification of essential oils by ion trap mass spectrometry.**

New York: Academic Press, 2009.

AHMADI, F.; SADEGUI, S.; MODARRESI, M.; ABIRI, MIKAELI, A. Chemical composition, in vitro antimicrobial, antifungal and antioxidant activities of the essential oil and methanolic extract of *Hymenocrater longiflorus* of Iran. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 5, p. 1137-1144, 2010.

ANDRADE, J. M. M.; ABOY, A. L.; APEL, M. A.; RASEIRA, M. C. B.; PEREIRA, J. F. M.; HENRIQUES, A. T. Phenolic composition in different genotypes of Guabiju fruits (*Myrcianthes pungens*) and their potential as antioxidant and antichemotactic agents. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 8, p. 1181-1187, 2011.

ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C. T.; MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, 2012.

APG II - ANGIOSPERM PHYLOGENY GROUP. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, London, v. 141, p. 399–436, 2003.

ASBECK, E. V.; CLEMONS, K. V.; MARTINEZ, M.; TONG, A. J.; STEVENS, D. A. Significant differences in drug susceptibility among species in the *Candida parapsilosis* group. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 62, p. 106–109, 2008.

ASSIS, L. C. S. **Sistemática e filosofia: filogenia do complexo *Ocotea* e revisão do grupo *Ocotea indecora* (Lauraceae).** Tese de Doutorado, Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2009.

ASSIS, L. C. S.; FORZZA, R. C.; VAN DER WERFF, H. A família *Lauraceae* na Reserva Biológica da Represa do Gramma, Descoberto, Minas Gerais, Brasil. **Boletim de Botânica da Universidade de São Paulo**, v. 23, n. 1, p. 113-139, 2005.

AUBLET, J. B. C. F. **Histoire des plantes de la Guiane Française.** v. 2, p. 781, 1775.

BAITELLO, J. B. Novas espécies de *Lauraceae* para a flora brasileira. **Acta Botanica Brasileira**, v. 15, n. 3, p. 445-450, 2001.

BAITELLO, J. B.; MARCOVINO, J. R.; WANDERLEY, M. G. L.; SHEPHERD, G. J.; GIULIETTI, A. M.; MEHEM, T. S. *Lauraceae: Ocotea* Aubl. In **Flora fanerogâmica do Estado de São Paulo**, v. 3, p. 179-208, 2003.

BAJPAI, V. K.; AL-REZA, S. M.; CHOI, U. K.; LEE, J. H.; KANG, S. C. Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, n. 8, p. 1876-1883, 2009.

BALAKUMAR, S.; RAJAN, S.; THIRUNALASUNDARI, T.; JEEVA, S. Antifungal activity of *Aegle marmelos* (L.) Correa (Rutaceae) leaf extract on dermatophytes. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 4, p. 309-312, 2011.

BALLABENI, V.; TOGNOLINI, M.; BERTONI, S.; BRUNI, R.; GUERRINI, A.; RUEDA, G. M.; BAROCELLI, E. Antiplatelet and antithrombotic activities of essential oil from wild *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) calices from Amazonian Ecuador. **Pharmacological Research**, v. 55, n. 1, p. 23–30, 2007.

BALLABENI, V.; TOGNOLINI, M.; GIORGIO, C.; BERTONI, S.; BRUNI, R.; BAROCELLI, E. *Ocotea quixos* Lam. Essential oil: *In vitro* and *in vivo* investigation on its anti-inflammatory properties. **Fitoterapia**, v. 81, n. 4, p. 289-295, 2010.

BANNISTER, J. M.; CONRAN, J. G.; LEE, D. E. Lauraceae from rainforest surrounding an early Miocene maar lake, Otago, southern New Zealand. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 178, p. 13–34, 2012.

BANNISTER, J. M.; CONRAN, J. G.; LEE, D. E.; Lauraceae from rainforest surrounding an early Miocene maar lake, Otago, southern New Zealand. **Review of Palaeobotany and Palynology**, v. 178, p. 13–34, 2012.

BARBEDO, L. S.; SGARBI, D. B. G. Candidiasis. **Jornal Brasileiro de Doenças Sexualmente Transmissíveis**, v. 22, n. 1, p. 22-38, 2010.

BARBOSA, D. B. **Avaliação das atividades antimicrobiana, antioxidante e análise preliminar da mutagenicidade do extrato aquoso das folhas de *Anacardium humile* St. Hill. (Anacardiaceae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia-MG, 2008.

BARBOSA-FILHO, J. M.; CUNHA, R. M.; DIAS, C. S.; ATHAYDE-FILHO, P. F.; SILVA, M. S.; CUNHA, E. V. L.; MACHADO, M. I. L.; CRAVEIRO, A. A.; MEDEIROS, I. A. GC-MS Analysis and cardiovascular activity of the essential oil of *Ocotea duckei*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 1, p. 37-41, 2008.

BARRERA, E. D. C.; SUAREZ, L. E. C. Aporphine alkaloids from leaves of *Ocotea macrophylla* (Kunth) (Lauraceae) from Colombia. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 37, n. 4, p. 522–524, 2009.

BARROS, F. M. C.; PIPPI, B.; DRESCH, R. R.; DAUBER, B.; LUCIANO, S. C.; APEL, M. A.; FUENTEFRIA, A. M.; VON POSER, G. L. Antifungal and antichemostatic activities and quantification of phenolic compounds in lipophilic extracts of *Hypericum* spp. native to South Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 294-299, 2013.

BASMACIOGLU, H.; TOKUSOGLU, O.; ERGUL, M. The effect of oregano and rosemary essential oils or alpha-tocopheryl acetate on performance and lipid oxidation of meat enriched with n-3 PUFA's in broilers. **South African Journal of Animal Science**, v. 34, n. 3, p. 197-210, 2004.

BATISTA, A. L. **Avaliação da atividade antimicrobiana e antiradicalar dos extratos e substâncias dos frutos de *Buchenavia tomentosa* –Eichler (Combretaceae) e *Ouratea spectabilis* Aubl. (Ochnaceae)**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2011.

BATISTA, A. N. L.; JUNIOR, J. M. B.; LÓPEZ, S. N.; FURLAN, M.; CAVALHEIRO, A. J.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; NUNOMURA, S. M.; YOSHIDA, M. Aromatic

compounds from three Brazilian Lauraceae species. **Química Nova**, v. 33, n. 2, p. 321-323, 2010.

BELL, E. A.; CHARLWOOD, B. V. Encyclopedia of Plant Physiology. **Secondary Plant Products**. New York: Springer-Verlag, v. 8, n. 1, p. 79, 1980.

BELTRAME, J. M.; LOBO, V. DS.; DOTTO, F.; MARQUES, K. B.; ANGNES, R. A. Estudo de obtenção de óleos essenciais de fatores em sua composição. **Anais do II ENDICT– Encontro de Divulgação Científica e Tecnológica**, p. 2176-3046, 2010.

BERGOLD, A. M.; GEORGIADIS, S. Novidades em fármacos antifúngicos: uma revisão. **Visão Acadêmica**, v. 5, n. 2, p. 159 -172, 2004.

BONASSOLI, L. A.; BERTOLI, M.; SVIDZINSKI, T. I. E. High frequency of *Candida parapsilosis* on the hands of healthy hosts. **Journal of Hospital Infection**, v. 59, p. 159–162, 2005.

BOTEGA, C.; PAGLIOSA, F. M.; BOLZANI, V. D. S.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Benzylisoquinoline alkaloids and eudesmane Sesquiterpenes from *Ocotea pulchella*. **Phytochemistry**, v. 32, n. 5, p. 1331-1333, 1993.

BOTSOGLOU, N. A.; CHRISTAKI, E.; FLOROU-PANERI, P.; GIANNENAS, I.; PAPAGEORGIOU, G.; SPAIS, A. B. The effect of a mixture of herbal essential oils or alpha-tocopheryl acetate on performance parameters and oxidation of body lipids in broilers. **South African Journal of Animal Science**, v. 34, n. 3, p. 56-61, 2004.

BOYDEN, S. The chemotactic effect of mixtures of antibody and antigen on polymorphonuclear leukocytes. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 115, n. 3, p. 453-466, 1962.

BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n. 104 de 26 de abril de 1999. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, 1999.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em [http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM\[25472-1-0\].PDF](http://www4.anvisa.gov.br/base/visadoc/BM/BM[25472-1-0].PDF). Acesso em: 14 de outubro de 2013, 2012.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. Instrução Normativa n. 6, de 23 de setembro de 2008. **Reconhece as espécies da flora brasileira ameaçadas de extinção**, 2008.

BRUNETON, J. **Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas Medicinalés**, 2. ed. Zaragoza: Acribia, 2001.

BRUNI, R.; MEDICI, A.; ANDREOTTI, E.; FANTIN, C.; MUZZOLIB, M.; DEHESA, M.; ROMAGNOLI, C.; SACCHETTI, G. Chemical composition and biological activities of *Ishpingo* essential oil, a traditional Ecuadorian spice from *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. (Lauraceae) flower calices. **Food Chemistry**, v. 85, n. 3, p. 415–421, 2004.

BULOW, N.; KONIG, W. A. The role of germacrene D as a precursor in sesquiterpene biosynthesis: investigations of acid catalyzed, photochemically and thermally induced rearrangements. **Phytochemistry**, v. 55, p. 141-168, 2000.

CABRAL, M. M. O.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAIA, G. L. A.; CHAVES, M. C. O.; BRAGA, M. V.; DE SOUZA, W.; SOARES, R. O. A. Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 124, n. 3, p. 319-324, 2010.

CANE, D. E. Enzymatic formation of sesquiterpenes. **Chemical Reviews**, v. 90, n. 7, p. 1089-1103, 1990.

CANSIAN, R. L.; MOSSI, A. J.; PAROUL, N.; TONIAZZO, G.; ZBORALSKI, F.; PRICHOA, F. C.; KUBIAK, G. B.; LERIN, L. A. Antioxidant and antimicrobial activity of *Cinnamom sassafras* extracts (*Ocotea odorifera* (Vell.) Rowher). **Perspectiva**, v. 34, n. 127, p. 123-133, 2010.

CHANDERBALI, A. S.; VAN DER WERFF, H.; RENNER, S. S. Phylogeny and historical biogeography of *Lauraceae*: evidence from the chloroplast and nuclear genomes. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 88, n. 1, p. 104-134, 2001.

CHAPPELL, J. Biochemistry and molecular biology of isoprenoid biosynthesis in plants. **Annual Review of Plant Physiology**, v. 46, p. 521-547, 1995.

CHAVERRI, C.; DIAZ, C.; CICCIO, J. F. Chemical Analysis of Essential Oils from *Ocotea gomezii* W.C. Burger and *Ocotea morae* Gómez-Laur. (Lauraceae) Collected at "Reserva Biológica Alberto M. Brenes" in Costa Rica and their Cytotoxic Activity on Tumor Cell Lines. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 22, n. 4, p. 741-745, 2011.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of filamentous fungi: Approved Standard. CLSI Document M38-A2. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2008.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE (CLSI). Reference Method for Broth Dilution Antifungal Susceptibility Testing of Yeasts; Approved Standard. CLSI Document M27-S4. Clinical Laboratory Standards Institute, Wayne, PA, USA, 2012.

COLOMBO, A. L.; GUIMARÃES, T. Epidemiology of hematogenous infections due to *Candida spp.* **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n. 5, p. 599-607, 2003.

CORTÉS, J. A.; RUSSI, J. A. R. Equinocandinas. **Revista chilena de infectología**, v. 28, p. 529-536, 2011.

CORTI, M.; SOLARI, R.; DE CAROLIS, L.; CANGELOSI, D.; ARECHAVALA, A.; NEGRONI, R. *Candida parapsilosis* meningitis in a patient with AIDS. Report of a case and review of the literature. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 30, n. 2, p. 122-124, 2013.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

CROTEAU, R. Biosynthesis and catabolism of monoterpenoids. **Chemical Reviews**, v. 87, n. 5, p. 929–954, 1987.

CUENTRA-ESTRELLA, M. Antifúngicos en el tratamiento de las infecciones sistémicas: importância del mecanismo de acción, espectro de actividad y resistências. **Revista Española de Quimioterapia**, v. 23, n. 4, p. 169-176, 2010.

DA SILVA, A. F. G. **Estudo químico e avaliação de atividades citotóxica, genotóxica e antifúngica de *Ocotea acutifolia* (NEES) MEZ. (Lauraceae)**. Tese de Doutorado, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, 2010.

DA SILVA, C. D. B. **Novas formas farmacêuticas contendo óleo volátil de *Cymbopogon citratus*: Estudos de formulação, estabilidade e atividade biológica**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2005.

DAVID, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Phenylpropanoid-catechins from bark of *Ocotea porosa*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 2, p. 545-546, 1994.

DE ARAÚJO, A. J.; LORDELLO, A. L. L.; MAIA, B. H. L. N. S. Análise comparativa dos óleos essenciais de folhas e galhos de *Ocotea puberula* (Lauraceae). **Revista Visão Acadêmica**, v. 2, n. 2, p. 81-84, 2001.

DEMYTTENAERE, J. C. R.; KIMPE, N. Biotransformation of terpenes by fungi. Study of the pathways involved. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 11, n. 4-6, p. 265-270, 2001.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A biosynthetic approach**. England: John Wiley e Sons, 3. ed. 1997.

DEWICK, P. M. The biosynthesis of C<sub>5</sub>-C<sub>25</sub> terpenoid compounds. **Natural Product Reports**, v. 16, n. 1, p. 97-130, 1999.

DI ROSA, M.; GIROUD, J. P.; WILLOUGHBY, D. A. Studies of the mediators of the acute inflammatory response induced in rats in different sites by carrageenan and turpentine. **Journal of Pathology**, v. 104, n.1, p. 15-29, 1971.

DIAS, K.L.; SILVA, C.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, R.N.; AZEVEDO, N. C. D. M. Cardiovascular effects induced by reticuline in normotensive rats. **Planta Medica**, v. 70, n. 4, p. 328-333, 2004.

DIEGO, A. M. Aspectos clínicos, diagnosticos y terapéuticos de las dermatofitosis. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, v. 29, s. 3, p. 33-39, 2011.

DORMAN, H. J. D.; FIGUEIREDO, A. C.; BARROSO, J. G.; DEANS, S. G. In vitro evaluation of antioxidant activity of essential oils and their components. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 15, n. 1, p. 12-16, 2000.

DUBEY, S. V.; BHALLA, R.; LUTHRA, R. Na overview of the non-mevalonate pathway for terpenoid biosynthesis in plants. **Journal of Biosciences**, v. 28, n. 5, p. 637-646, 2003.

EGGIMANN, P.; GARBINO, J.; PITTET, D. Epidemiology of *Candida* species infections in critically ill non-immunosuppressed patients. **Lancet Infect Dis**, v. 3, n. 11, p. 685-702, 2003.

ESPINEL-INGROFF, A. Mechanisms of resistance to antifungal agents: yeasts and filamentous fungi. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 25, n. 2, p. 101-106, 2008.

FARAGO, P. V.; BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R.; NAKASHIMA, T. Análise morfoanatômica de folhas de *Ocotea puberula* (Rich.) Nees, Lauraceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, n. 3, p. 250-255, 2005.

FARIA-NETO, H.C.; ARAUJO, C. V.; MOREIRA, S.; BOZZA, P.T.; THOMAS, G.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CORDEIRO, R. S.; TIBIRICA, E.V. A new naturally occurring platelet activating factor receptor antagonist: in vivo pharmacological studies. **Planta Medica**, v. 61, n. 2, p. 106-112, 1995 (b).

FARIA-NETO, H.C.; TIBIRICA, E.V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; THOMAS, G. A new naturally occurring platelet activating factor receptor antagonist: binding and in vitro studies. **Planta Medica**, v. 61, n. 2, p. 101-105, 1995 (a).

FARMACOPÉIA BRASILEIRA, 5 ed.; v..I; **Agência Nacional de Vigilância Santária**; Brasília; 2010

FELICETTI, B.; CANE, D. E. Aristolochene Synthase. Mechanistic analysis of active site residues by site-directed mutagenesis. **Journal of the American Chemical Society**, v. 126, n. 23, p. 7212-7221, 2004.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FREIRE, J. M.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; ANDRADE, M. A. Essential oil of *Origanum majorana* L., *Illicium verum* Hook. f. and *Cinnamomum zeylanicum* Blume: chemical and antimicrobial characterization. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 13, n. 2, p. 209-214, 2011.

FRIDKIN, S. K.; JARVIS, W. R. Epidemiology of nosocomial fungal infections. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 9, n. 4, p. 499-511, 1996.

GABLER, I. G. E.; BARBOSA, A. C.; VELELA, R. R.; LYON, S.; ROSA, C. A. Incidence and anatomic localization of oral Candidiasis in patients with aids hospitalized in a public hospital in Belo Horizonte, MG, Brazil. **Journal of Applied Oral Science**, v. 16, n. 4, p. 247-250, 2008.

GÁCSEK, A.; SCHAFER, W.; NOSANCHUK, J. S.; SALOMON, S.; D. NOSANCHUK, J. D. Virulence of *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* in reconstituted human tissue models. **Fungal Genetics and Biology**, v. 44, p. 1336-1341, 2007.

GEISSMAN, T. A. Y.; CROUT, D. H. G. **Organic chemistry of secondary plant metabolism**. Freeman Cooper, San Francisco, 1969.

GEORGOPAPADAKOU, N. H. - Infectious disease 2001: drug resistance, new drugs. **Drug Resist Updat**. n. 5, p. 181-191, 2002.

GOTTLIEB, O. R. Chemosystematics of the Lauraceae. **Phytochemistry**, v. 11, n. 5, p. 1537-1570, 1972.

GUERRINI, A.; SACCHETTI, G.; MUZZOLI, M.; RUEDA, G. M.; MEDICI, A.; BESCO, E.; BRUNI, R. Composition of the volatile fraction of *Ocotea bofo* Kunth (Lauraceae) calyces by GC-MS and NMR fingerprinting and its antimicrobial and antioxidant activity. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 20, p. 7778-7788, 2006.

GUIGNARD, J.L.; COSSON, L.; HENRY, M. **Abrégé de phytochimie**. Masson, Paris, 1985.

HAVLICKOVA, B.; FRIEDRICH, M. The advantages of topical combination therapy in the treatment of inflammatory dermatomycoses. **Mycoses**, v. 51, n. 4, p. 16-26, 2008.

HOSSAIN, M. A.; SHAH, M. D. A study on the total phenols content and antioxidant activity of essential oil and different solvent extracts of endemic plant *Merremia borneensis*. **Arabian Journal of Chemistry**, 2011.

INOUE, M. T.; RODERJAN, C. V.; KUNIYOSHI, Y. S. **Projeto Madeira do Paraná**. Curitiba: Fundação de Pesquisas Florestais, 1984.

JAMALIAN, A.; SHAMS-GHAHFAROKHI, M.; JAIMAND, K.; PASHOOTAN, N.; AMANI, A.; RAZZAGHI-ABYANEH, M. Chemical composition and antifungal activity of *Matricaria recutita* flower essential oil against medically important dermatophytes and soil-borne pathogens. **Journal de Mycologie Médicale**, v. 22, p. 308-315, 2012.

JIA, H. L.; JI, Q. L.; XING, S. L.; ZHANG, P. H.; ZHU, G. L.; WANG, X. H. Chemical composition and antioxidant, antimicrobial activities of the essential oils of *Thymus marschallianus* Will. and *Thymus proximus* Serg. **Food Engineering and Physical Properties**, v. 75, n. 1, p. 59-65, 2010.

JOSHI, S. C.; VERMA, A. R. ; MATHELA, C. S. Antioxidant and antibacterial activities of the leaf essential oils of *Himalayan* Lauraceae species. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 1, p. 37-40, 2010.

KAMATOU, G. P. P.; VILJOEN, A. M.; FIGUEIREDO, A. C.; TILNEY, P. M.; VAN ZYL, R. L.; BARROSO, J. G.; PEDRO, L. G.; VAN VUUREN, S. F. Trichomes, essential oil composition and biological activities of *Salvia albicaulis* Benth. and *S. dolomitica* Codd, two species from the Cape region of South Africa. **South African Journal of Botany**, v. 72, n. 1, p. 102-108, 2007.

KANAFANI, Z.A. & PERFECT, J.R. Antimicrobial resistance: resistance to antifungal agents: mechanisms and clinical impact. **Clinical Infectious Diseases**, v. 46, n. 1, p. 120-8, 2008.

KLEIN, R. M.; REIS, A.; REITZ, R. **Madeiras do Brasil**. Florianópolis: Lunardelli, 1979.

KOKJONH, K.; BRADLEY, M.; GRIFFITHA, B.; GHANNOUM, M. Evaluation of *in vitro* activity of ciclopirox olamina, butenafine HCL and econazole against

dermatophytes and bacteria. **International Journal of Dermatology**, v. 42, p. 11-17, 2003.

KOSE, E. O.; DENIZ, I. G.; SARIKURKÇÜ, C.; AKTAS, Ö.; YAVUZ, M. Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of the essential oils of *Sideritis erythrantha* Boiss. and Heldr. (var. *erythrantha* and var. *cedretorum* P.H. Davis) endemic in Turkey. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 10, p. 2960-2965, 2010.

KRCMERY, V.; BARNES, A. J. Non-albicans *Candida spp.* causing fungaemia: pathogenicity and antifungal resistance. **Journal of Hospital Infection**, v. 50, p. 243-260, 2002.

KUMAWAT, R.; SHARMA, S.; VASUDEVA, N.; KUMAR, S. In vivo anti-inflammatory potential of various extracts of *Sida tiagii* Bhandari. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p. 947-952, 2012.

KURTZ, M. B.; DOUGLAS, C. M. Lipopeptide inhibitors of fungal glucan synthase. **Journal of Medical and Veterinary Mycology**, n. 35, p. 79-86. 1997.

LACAZ, C. S.; PORTO, E.; MARTINS, J. E. C.; HEINZ-VACCARI, E. M.; MELO, N. T. **Tratado de Micologia Médica**. 9ª ed. São Paulo: Sarvier, p. 1104, 2002.

LATTIF, A. A.; MUKHERJEE, P. K.; CHANDRA, J.; SWINDELL, K.; LOCKHART, S. R.; DIEKEMA, D. J.; PFALLER, M. A.; GHANNOUM, M. A. Characterization of biofilms formed by *Candida parapsilosis*, *C. metapsilosis*, and *C. orthopsilosis*. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 265–270, 2010.

LICHTENTHALER, H. K.; SCHWENDER, J.; DISCH, A.; ROHMER, M. Biosynthesis of isoprenoids in higher plant chloroplasts proceeds via a mevalonate independent pathway. **FEBS Letters**, v. 400, n. 3, p. 271-274, 1997.

LIMA, R. R.; COSTA, A. M. R.; DE SOUZA, R. D.; GOMES-LEAL, W. Inflamação em Doenças Neurodegenerativas. **Revista Paraense de Medicina**, v. 21, n. 2, p. 29-33, 2007.

LIN, C. T.; CHEN, C. J.; LIN, T. Y.; TUNG, J. C.; WANG, S. Y. Anti-inflammation activity of fruit essential oils from *Cinnamomum insularimontae* Hayata. **Bioresource Technology**, v. 99, p. 8783-8787, 2008.

LOPES-LUTZ, D.; ALVIANO, O. S.; ALVIANO, C. S.; KOLODZIEJCZYK, D. P. Screening of chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Artemisia* essential oils. **Phytochemistry**, v. 69, n. 8, p. 1732-1738, 2008.

MADRIÑÁN, S.; SMITH, N.; MORI, S. A.; STEVENSON, D. W.; HEALD, S. V. **Lauraceae**. In: **Flowering plants of the Neotropics**. Princeton University Press, Princeton, p. 204-206, 2004.

MAHMOUND, S. S.; CROTEAU, R. B. Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. **Trens Plant Sciences**, n. 7, p. 366-373, 2002.

MANTLE, D.; ANDERTON, J. G.; FALKOUS, G.; BARNES, M.; JONES, P.; PERRY, E. K. Comparison of methods for determination of total antioxidant status: application

to analysis of medicinal plant essential oils. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B**, v. 121, n. 4, p. 385-391, 1998.

MARQUES, C. A. Importância econômica da família Lauraceae Lindl. **Revista Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 195-206, 2001.

MARTINDALE. **The complete drug reference**. 34. ed. London: The Royal Pharmaceutical Society of Great Britain, p. 398-9, 2005.

MASTELIC, J.; JERKOVIC, J.; BLAZEVIC, I.; BLAZI, M. P.; BOROVIĆ, S.; BACE, I. I.; SMRECKI, V.; ZARKOVIC, N.; KOSTIC, K. B.; TOPIC, D. V.; MÜLLER, N. Comparative study on the antioxidant and biological activities of carvacrol, thymol and eugenol derivatives. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, n. 11, p. 3989-3996, 2008.

McCARRON, P. A.; DONNELLY, R. F.; CANNING, P. E.; McGOVERN, J. G.; JONES, D. S. Anti-adherent and antifungal activities of surfactant-coated poly (ethylcyanoacrylate) nanoparticles. **Biomaterials**, v. 25, n. 12, p. 2399-2407, 2004.

McCASKILL, D.; CROTEAU, R. **Prospects for the bioengineering of terpenoid biosynthesis**. In: **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, Springer, v. 55, p. 107-145, 1997.

MCINTYRE, M.; BOHR, D. F.; DOMINICZAK, A. F. Endothelial function in hypertension the role of superoxide anion. **Hypertension**, v. 34, n. 1, p. 539-545, 1999.

MELLO FILHO, L. E. DE; SOMMER, G. V.; PEIXOTO, A. L. **Centuria Plantarum Brasiliensium Exstintionis Minitata**. Sociedade Botânica do Brasil/IBAMA, p. 167, 1992.

MENDES, C. E.; CASARIN, F.; OHLAND, A. L.; FLACH, A.; COSTA, L. A. M. A.; DENARDIN, R. B. N.; MOURA, N. F. Efeitos das condições ambientais sobre o teor e variabilidade dos óleos voláteis de *Dalbergia frutescens* (Vell.) Britton (Fabaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1787-1793, 2012.

MEZ, C. **Lauraceae Americanae**. Jahrbuch Königlichen botanischen Gartens Berlin, v. 5, p. 1-556, 1889.

MIGUEL, M. G. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, v. 15, p. 9252-9287, 2010.

MILLER, R.E.; TUCK, K. L. Reports on the distribution of aromatic cyanogenic glycosides in Australian tropical rainforest tree species of the Lauraceae and Sapindaceae, **Phytochemistry** v. 92, n. 1, p. 46-52, 2013.

MOITEIRO, C.; ESTEVES, T.; RAMALHO, L.; ROJAS, R.; ALVAREZ, S.; ZACCHINO, S.; BRAGANÇA, H. Essential oil characterization of two azorean *Cryptomeria japonica* populations and their biological evaluations. **Natural Products Communication**, v. 8, n. 12, p. 1785-1790, 2013.

MONKS, N. R.; LERNER, C.; HENRIQUES, A. M.; FARIAS, F. M.; SCHAPOVAL, E. E. S.; SUYENAGA, E. S.; DA ROCHA, A. B.; SCHWARTSMANN, G.; MOTHES, B. Anticancer, antichemotactic and antimicrobial activities of marine sponges collected

off the coast of Santa Catarina, southern Brazil. **Journal of Experimental Marine Biology and Ecology**, v. 281, n. 1-2, p. 1-12, 2002.

MORAIS, L. C. S. L.; BARBOSA-FILHO, J. M.; ALMEIDA, R. N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 62, n. 1, p. 57-61, 1998.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI FILHO, J. Efeito dos compostos fenólicos de especiarias sobre lípideos polinsaturados. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 39, p. 130-133, 2003.

OH, J.; BOWLING, J. J.; CARROLL, J. F.; DEMIRCI, B.; BASER, K. H. C.; LEININGER, T. D.; HAMANN, M. T. Natural product studies of U.S. endangered plants: Volatile components of *Lindera melissifolia* (Lauraceae) repel mosquitoes and ticks. **Phytochemistry**, v. 80, p. 28–36, 2012.

OLIVEIRA, M. T.; SPECIAN, A. F. L.; ANDRADE, C. G. T. J.; FRANÇA, E. J. G.; MAIA, L. F.; FURLANETO, M. C. Interaction of *Candida parapsilosis* isolates with human hair and nail surfaces revealed by scanning electron microscopy analysis. **Micron**, v. 41, p. 604–608, 2010.

OLIVEIRA, P. C.; PAULA, C. A.; REZENDE, S. A.; CAMPOS, F. T.; GUIMARÃES, D. A. S. Anti-inflammatory activity of *Lychnophora passerina*, Asteraceae (Brazilian "Arnica"). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 135, n. 2, p. 393-398, 2011.

OLIVEIRA, R. B.; GODOY, S. A. P.; COSTA, F. B. **Plantas tóxicas: conhecimento e prevenção de acidentes**. Ribeirão Preto – SP: Editora Holos, p. 64, 2003.

PABON, L. C.; CUCA, L. E. Aporphine alkaloids from *Ocotea macrophylla* (Lauraceae). **Quimica Nova**, v. 33, n. 4, p. 875-879, 2010.

PALÁ-PAÚL, J.; USANO-ALEMANY, J.; BROPHY, J. J.; PÉREZ-ALONSO, M. J.; SORIA, A. C. Essential oil composition of the different parts of *Eryngium aquifolium* from Spain. **Natural Products Communication**, v. 5, n. 5, p. 817-821, 2010.

PANÁČEK, A.; KOLÁR, M.; VECEROVÁ, R.; PRUCEK, R.; SOUKUPOVÁ, J.; KRYSTOF, V.; HAMAL, P.; ZBORIL, R.; KUÍTEK, L. Antifungal activity of silver nanoparticles against *Candida* spp. **Biomaterials**, v. 30, n. 31, p. 6333-6340, 2009.

PASQUALOTTO, A. C. **Epidemiologia das infecções por *Candida* spp. Na corrente sanguínea: coorte retrospectiva em hospital terciário brasileiro**. Tese de Doutorado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2004.

PAUGAM, A.; BAIXENCH, M. T.; TAIEB, F.; CHAMPAGNAC, C.; CAMET, J. D. Emergence of *Candida parapsilosis* candidemia at Cochin hospital. Characterization of isolates and search for risk factors. **Pathologie Biologie**, v. 59, p. 44–47, 2011.

PEÑUELAS, J.; LLUSIÁ, J. Linking photorespiration, monoterpenes and thermotolerance in *Quercus*. **New Phytologist**, v. 155, n. 2, p. 227, 2002.

PEÑUELAS, J.; MUNNÉ-BOSCH, S. Isoprenoids: na evolutionary pool for photoprotection. **Trend plant Sciences**, v. 10, n. 4, p. 166-169, 2005.

PERES, L. E. P. **Metabolismo Secundário**. Piracicaba – São Paulo: Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz. ESALQ/USP, p. 1-10, 2004.

PERES, N. T. D. A.; MARANHÃO, F. C. A.; ROSSI, A.; MARTINEZ-ROSSI, N. M. Dermatofitos: interação patógeno-hospedeiro e resistência a antifúngicos. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, n. 5, p. 657-667, 2010.

PETERSEN, R. Z. **Biotransformação de terpenóides por culturas de células vegetais e fungos filamentosos**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2006.

PFALLER, M.A. Antifungal drug resistance: mechanisms, epidemiology, and consequences for treatment. **American Journal of Medicine**, v. 125, n. 1, p. S3-13, 2012.

PINTO, E.; PINA-VAZ, C.; SALGUEIRO, L.; GONÇALVES, M. J.; COSTA-DE-OLIVEIRA, S.; CAVALEIRO, C.; PALMEIRA, A.; RODRIGUES, R.; MARTINEZ-DE-OLIVEIRA, J. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. **Journal of Medicinal Microbiology**, v. 55, p. 1367-1373, 2006.

PINTO, P. S. **Terpenóides em espécies do gênero *Salvia* (Lamiaceae)**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.

POULOSE, A. J.; CROTEAU, R.  $\gamma$ -terpinene to *p*-cymene and thymol in *Thymus vulgaris* L. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 187, n. 2, p. 307-314, 1978.

PROSSER, I.; PHILLIPS, A. L.; GITTINGS, S.; LEWIS, M. J.; HOOPER, A. M.; PICKETT, J. A.; BEALE, M. H. (+) (10R) Germacrene A synthase from goldenrod, *Solidago canadensis*; cDNA isolation, bacterial expression and functional analysis. **Phytochemistry**, v. 60, n. 7, p. 691-702, 2002.

QUINET, A. Nova espécie e novo nome em *Ocotea* Aubl. (Lauraceae) para o Brasil. **Acta Botanica Brasileira**, v. 24, n. 1, p. 225-228, 2010.

QUINET, A. Sinopse taxonômica da família Lauraceae no estado do Rio de Janeiro. **Acta Botanica Brasileira**, v. 19, n. 3, p. 563-572, 2005.

RAFEIRO, D. F. B. **Novas estratégias de promoção da permeação transdérmica**. Dissertação de Mestrado, Universidade Lusófona, Lisboa, 2013.

RAGGI, L. **Estudo da composição química e das atividades biológicas de óleos voláteis de espécies de Lauraceae, em diferentes épocas do ano**. Dissertação de Mestrado, Instituto de Botânica da Secretaria do Meio Ambiente, São Paulo, 2008.

RIBEIRO, R. A.; CARMO, L. G.; VLADIMOROVA, I.; JURKIEWICZ, N. H.; JURKIEWICZ, A. Nantenine blocks muscle contraction and Ca<sup>2+</sup> transient induced by noradrenaline and K<sup>+</sup> in rat vas deferens. **The European Journal of Pharmacology**, v. 470, n. 1-2, p. 37-43, 2003.

ROHWER, J. G. **Lauraceae: In the families and genera of vascular plants**. Springer-Verlag, v. 2, p. 336- 391, 1993.

ROHWER, J. G. Prodrômus einer monographie der gattung *Ocotea* Aubl. (Lauraceae), sensu lato. **Mitteilungen aus dem Institut für Allgemeine Botanik Hamburg**, v. 20, n. 1, p. 1278, 1986.

ROMANI, L. Immunity to fungal infections. **Nature Reviews**, v. 11, p. 275-288, 2011.

ROMEO, O.; DELFINO, D.; COSTANZO, B.; CASCIO, A.; CRISEO, G. Molecular characterization of Italian *Candida parapsilosis* isolates reveals the cryptic presence of the newly described species *Candida orthopsilosis* in blood cultures from newborns. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 72, p. 234–238, 2012.

ROTTA, I.; FLEITHOTUKI, M.; SANCHES, A. C. C.; , CORRER, C. J. Eficácia de antifúngicos tópicos em diferentes dermatomicoses: uma revisão sistemática com metanálise. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 58, n. 3, p. 308-318, 2012.

RUBERTO, G.; BARATTA, M. T. Antioxidant activity of selected essential oil components in two lipid model systems. **Food Chemistry**, v. 69, n. 2, p. 167-174, 2000.

RUIZ, L. D.; MONTELLIB, A. C.; SUGIZAKI, M. D. F.; DA SILVA, E. G. A.; DE BATISTA, G. C. M.; MOREIRA, D.; PAULA, C. R. Outbreak of fungemia caused by *Candida parapsilosis* in a neonatal intensive care unit: Molecular investigation through microsatellite analysis. **Revista Iberoamericanade Micología**, v. 30, n. 2, p. 112–115, 2013.

SACCHETTI, G.; MAIETTI, S.; MUZZOLI, M.; SCAGLIANTI, M.; MANFREDINI, S.; RADICE, M.; BRUNI, R. Comparative evaluation of 11 essential oils of different origin as functional antioxidants, antiradicals and antimicrobials in foods. **Food Chemistry**, v. 91, p. 621–632, 2005.

SALAS, V.; PASTOR, F. J.; CAPILLA, J.; SUTTON, D. A.; MAYAYO, E.; FOTHERGILL, A. W.; RINALDI, M. G.; GUARRO, J. Evaluation of the correlation of Caspofungin MICs and treatment outcome in murine infections by wild type strains of *Candida parapsilosis*. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 77, p. 41–45, 2013.

SANTOS, F. A.; RAO, V. S. Antiinflammatory and antinociceptive effects of 1,8-cineole a terpenoid oxide present in many plant essential oil. **Phytoterapy Research**, v. 14, n. 4, p. 240-244, 2000.

SANTURIO, D. F. **Atividade antimicrobiana de óleos essenciais de condimentos sobre *Escherichia coli* isoladas de suínos, aves e bovinos**. Dissertação de Mestrado; Universidade Federal de Santa Maria, 2011.

SANTURIO, J. M.; SANTURIO, D. F.; POZZATTI, P.; MORAES, C.; FRANCHIN, P. R.; ALVES, S. H. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de orégano, tomilho e canela frente a sorovares de *Salmonella enterica* de origem avícola. **Ciência Rural**, v. 37, n. 3, p. 803-808, 2007.

SARDI, J. D. C. O.; PITANGUI, N. D. S.; ARELLANES, G. R.; TAYLOR, M. L.; ALMEIDA, A. M. F.; GIANNINI, M. J. S. M. Highlights in pathogenic fungal biofilms. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, p. 22–29, 2014.

SCHWENDER, J.; ZEIDLER, J.; GROENER, R.; MULLER, C.; BRAUN, M.S.; LICHTENTHALER, F. W.; LICHTENTHALER, H. K. Incorporation of 1-deoxy-D-xylulose into isoprene and phytol by higher plants and algae. **FEBS Letters**, v. 414, n. 1, p. 129-134, 1997.

SCOUT, K. F.; BRYANT, K. J.; BIDGOOD, M. J. Functional coupling and differential regulation of the phospholipase A2-cyclooxygenase pathways in inflammation. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 66, n. 4, p. 535-541, 1999.

SERRA, M. F.; DIAZ, B. L.; BARRETO, E. O.; PEREIRA, A. P. B.; LIMA, M.C. R.; BARBOSA-FILHO, J. M.; CORDEIRO, R. S. B.; MARTINS, M. A.; SILVA, P. M. R. Anti-allergic properties of natural PAF antagonist yangambin. **Planta Medica**, v. 63, p. 207-212, 1997.

SIDRIM, J. C. S.; ROCHA, M. F. G. **Micologia Médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

SIDRIM, J. J. C.; ROCHA, M. F. G. **Micologia médica à luz de autores contemporâneos**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 388, 2010.

SILVA, L. D. L.; DA SILVA, D. T.; GARLET, Q. L.; CUNHA, M. A.; MALLMANN, C. A.; BALDISSEROTTO, B.; LONGHI, S. J.; PEREIRA, A. M. S.; HEINZMANN, B. M. Anesthetic activity of Brazilian native plants in silver catfish (*Rhamdia quelen*). **Neotropical Ichthyology**, v. 11, n. 2, p. 443-451, 2013.

SINGARAVELU, K.; GÁCSEB, A.; NOSANCHUK, J. D. Genetic determinants of virulence –*Candida parapsilosis*. **Revista Iberoamericana de Micología**, v. 31, n. 1, p. 16–21, 2014.

SINGH, G.; KAPOOR, I. P. S.; SINGH, P.; HELUANI, C. S.; LAMPASONA, M. P.; CATALAN, C. A. N. Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 10, p. 3295-3302, 2008.

SINGH, H. P.; MITTAL, S.; KAUR, S.; BATISH, D. R.; KOHLI, R. K. Chemical composition and antioxidant activity of essential oil from residues of *Artemisia scoparia*. **Food Chemistry**, v. 114, p. 642-645, 2009.

SLAVIN, M. A. The epidemiology of candidaemia and mould infections in Australia. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 49, n. 1, p. 3-6, 2002.

SOUZA, G. C.; HAAS, A. P. S.; VON POSER, G. L.; SCHAPOVAL, E. E. S.; ELISABETSKY, E. Ethnopharmacological studies of antimicrobial remedies in the south of Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 90, n. 1, p. 135-143, 2004.

SOUZA, M. M.; CRUZ, A. B.; SCHUHMACHER, M. R.; KREUGER, M. R. O.; FREITAS, R. A.; CRUZ, R. C. B. **Métodos de avaliação de atividade biológica de produtos naturais e sintéticos**. In: Bresolin, T. M. B.; Cechinel Filho, V. Ciências químico-Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos. Itajai: UNIVALI, 2003.

SOUZA, T. J. T. **Determinação da composição química e avaliação preliminar das atividades antioxidante e anticolinesterásica dos óleos voláteis de espécies de *Eupatorium* L. (Asteraceae).** Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

STEELE, C. L.; CROCK, J.; BOHLMANN, J.; CROTEAU, R. Sesquiterpene synthases from Grand Fir (*Abies grandis*). Comparison of constitute and wound-induced activities, and cDNA isolation, characterization, and bacterial expression of  $\delta$ -selinene synthase and gamma-humulene synthase. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 4, p. 2089, 1998.

SUYENAGA, E. S.; KONRATH, E. L.; DRESCH, R. R.; APEL, M. A.; ZUANAZZI, J. A.; CHAVES, C. G.; HENRIQUES, A. T. Appraisal of the antichemotactic activity of flavonoids on polymorphonuclear neutrophils. **Planta Medica**, v. 77, n. 7, p. 698-704, 2011.

SZABÓ, Z.; SZILÁGYI, J.; TAVANTI, A.; KARDOS, G.; ROZGONYI, F.; BAYEGAN, S.; MAJOROS, L. In vitro efficacy of 5 antifungal agents against *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, and *Candida metapsilosis* as determined by time–kill methodology. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 64, p. 283–288, 2009.

TAKAKU, S.; HABER, W.A.; SETZER, W. N. Leaf essential oil composition of 10 species of *Ocotea* (Lauraceae) from Monteverde, Costa Rica. **Biochemical Systematics and Ecology**, v. 35, n. 8, p. 525-532, 2007.

TAVARES, L.; CARRILHO, D.; TYAGI, M.; BARATA, D.; SERRA, A. T.; DUARTE, C. M. M.; DUARTE, R. O.; FELICIANO, R. P.; BRONZE, M. R.; CHICAU, P.; ESPÍRITO-SANTO, M. D.; FERREIRA, R. B.; DOS SANTOS, C. N. Antioxidant Capacity of Macaronesian Traditional Medicinal Plants. **Molecules**, v. 15, n. 4, p. 2576-2592, 2010.

TEPE B., SOKMEN M., SOKMEN A., DAFERERA D., POLISSIOU M. Antimicrobial and antioxidative activity of the essential oil and various extracts of *Cyclotrichium organifolium* (Labill.) Manden. & Scheng. **Journal of Food Engineering**, v. 69, n. 3, p. 335-342, 2005.

TEPE, B.; TEPE, A. S.; DAFERERA, D.; POLISSIOU, M.; SOKMEN, A. Chemical composition and antioxidant activity of the essential oil of *Clinopodium vulgare* L. **Food Chemistry**, v. 103, p. 766-770, 2007.

TOBUDIC, S., KRATZER, C. & PRESTERL, E. Azole-resistant *Candida* spp. emerging pathogens?, **Mycoses**, v. 55, p. 24-32, 2012.

UMEMURA, K.; ITOH, T.; HAMADA, N.; FUJITA, Y.; AKAO, Y.; NOZAWA, Y.; MATSUURA, N.; IINUMA, M.; ITO, M. Preconditioning by sesquiterpene lactone enhances H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Nrf2/ARE activation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 368, n. 4, p. 948-954, 2008.

VAN DER WERFF, H. A key to the genera of Lauraceae in the New World. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 78, n. 2, p. 377-387, 1991.

- VAN DER WERFF, H. A synopsis of *Ocotea* (Lauraceae) in Central America and southern Mexico. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 89, n. 3 p. 429-451, 2002.
- VAN DER WERFF, H.; RITCHER, H. G. Toward and improved classification of Lauraceae. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 83, n.3, p. 409-418, 1996.
- VAZ, C.; SAMPAIO, P.; CLEMONS, K. V.; HUANG, Y-C.; STEVENS, D. A.; Célia PAIS, C. Microsatellite multilocus genotyping clarifies the relationship of *Candida parapsilosis* strains involved in a neonatal intensive care unit outbreak. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 71, p. 159–162, 2011.
- VIUDA-MARTOS, M.; MOHAMADY, M. A.; FERNÁNDEZ-LÓPEZ, J.; ELRAZIK, K. A. A.; OMER, E. A.; PÉREZ-ALVAREZ, J. A.; SENDRA, E. In vitro antioxidante and antibacterial activities of Essential oils obtained from *Egyptina* aromatic plants. **Food Control**, p. 1-8, 2011.
- VUNDA, S. L. L. **Estudo químico e biológico de espécies de Croton (Euphorbiaceae) nativas do Rio Grande do Sul**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2011.
- WHITE, P. L.; ARCHER, A. E.; BARNES, R. A. Comparison of non-culture-based methods for detection of systemic fungal infections, with an emphasis on invasive *Candida* infections. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 5, p. 2181-2187, 2005.
- WU, S. J.; TEIK, L. Tetrandrine inhibits proinflammatory cytokines, iNOS and COX-2 expression in human monocytic cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, n. 1, p. 59-62, 2007.
- YAMAGUCHI, K. K. D.; ALCANTARA, J. M.; LIMA, E. S.; DA VEIGA, V. F. Chemical Composition and Platelet Aggregation Activity of Essential Oils of Two Species of the Genus *Ocotea* (Lauraceae). **Journal of Essential oil Bearing plants**, v. 16, n. 4, p. 518-523, 2013.
- ZAMPRONHA, V. C. D. C.; OLIVEIRA, I. P. D.; MONTEIRO, M. S. R.; SOUZA, H. D.; SANTOS, K. J. G. D. ARAÚJO, A. A. D. Isolamento e identificação de dermatófitos de animais presentes no campus ii da universidade católica de goiás. **Revista Eletrônica Faculdade Montes Belos**, v.1, n.1, p. 22-36, 2005.
- ZANIN, S. M. W.; MIGUEL, O. G.; MONTRUCCHIO, D. P.; COSTA, C. K.; LAGOS, J. B. Mudanças de *Ocotea puberula* (Lauraceae): identificação e monitoramento de alcaloides aporfínicos. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 743-747, 2011.
- ZEN, K.; REAVES, T. A.; SOTO, I.; LIU, Y. Response to genistein: Assaying the activation status and chemotaxis efficacy of isolated neutrophils. **Journal of Immunological Methods**, v. 309, p. 86-98, 2006.
- ZENG, W.; ZHU, R.; JIA, L.; GAO, H.; ZHENG, Y.; SUN, Q.; Chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of essential oil from *Gnaphalium affine*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, p. 1322-1328, 2011.

ZIGMOND, S. H.; HIRSCH, J. G. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 137, n. 2, p. 387-410, 1973.

ZSCHOCKE, S.; DREWES, S.E.; PAULUS, K.; BAUER, R.; VAN STANDEN, J. Analytical and pharmacological investigation of *Ocotea bullata* (black stinkwood) bark and leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 71, n. 1-2, p. 219-230, 2000 (a).

ZSCHOCKE, S.; VAN STANDEN, J.; PAULUS, K.; BAUER, R.; HORN, M. M.; MUNRO, N. J.; DREWES, S. Stereostructure and anti-inflammatory activity of three diastereomers of ocobullenone from *Ocotea*. **Phytochemistry**, v. 54, n. 6, p. 591-595, 2000 (b).