

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ  
DIRETORIA DE GRADUAÇÃO E EDUCAÇÃO PROFISSIONAL  
COORDENAÇÃO DO CURSO DE TECNOLOGIA EM PROCESSOS QUÍMICOS

JÉSSICA MARIANE SCHONS

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE  
ORQUÍDEAS**

TOLEDO  
2021

JÉSSICA MARIANE SCHONS

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE  
ORQUÍDEAS**

Projeto de Trabalho de Conclusão de Curso apresentado a Coordenação do Curso Superior de Tecnologia em Processos Químicos (COPEQ) da Universidade Tecnológica Federal do Paraná – UTFPR, câmpus Toledo, como requisito parcial para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Orientador (a): Dr. Solange Maria Cottica  
Coorientador (a): Tatiana Shioji Tiunan

TOLEDO  
2021

JÉSSICA MARIANE SCHONS

**DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE  
ORQUÍDEAS**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do curso de Tecnologia em Processos Químicos da UTFPR, câmpus Toledo, como parte das exigências para obtenção do título de Tecnólogo em Processos Químicos.

Aprovado em 05, de maio de 2021.

Banca examinadora

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Solange Maria Cottica  
UTFPR, câmpus Toledo  
Orientadora

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Tatiana Shioji Tiunan  
UTFPR, câmpus Toledo  
Coorientadora

---

Prof Dr Clayton Antunes Martin  
UTFPR, câmpus Toledo  
Avaliador

---

Dr<sup>a</sup> Ortência Leocádia González da Silva Nunes  
PPGQB-UTFPR, câmpus Toledo  
Avaliador

OBS: A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Curso de Tecnologia em Processos Químicos.

## **Agradecimentos**

**O desenvolvimento deste trabalho de conclusão de curso se deu devido a ajuda de diversas pessoas, dentre elas agradeço:**

**A Deus pela minha vida, saúde e bençãos derramadas sobre mim, me ajudando a ultrapassar todos obstáculos encontrados perante o curso.**

**Aos meus pais, Adriane J. J. Schons e Mario Schons, e irmãos Joyce Schons e Jeferson Schons, que sempre me apoiaram e me deram forças para continuar nos momentos mais difíceis, não me deixando desistir dos meus sonhos, compreendendo minha ausência para realização deste trabalho.**

**Ao meu noivo, Matheus Henrique da Silva, por todo apoio, carinho, atenção, incentivo, paciência e conforto nesse momento difícil.**

**A minha orientadora Solange Maria Cottica e coorientadora Tatiana Shioji Tiunan, pelo apoio, ensinamentos, correções e ajuda prestada durante este trabalho.**

**Aos técnicos do laboratório pela atenção e ajuda prestada e ao laboratório Multiusuário do Câmpus Toledo da Universidade Tecnológica Federal do Paraná pelas análises realizadas.**

**Ao recurso financeiro ofertado pela Universidade Tecnológica Federal do Paraná.**

**Aos orquidários Ana Maria e Santa Anastacia, pela atenção, disponibilização de espaço para coletas e ajuda.**

**Aos meus amigos e colegas pela compreensão e apoio.**

**Meu muito obrigada!**

## Resumo

O maior grupo de flores é considerado a família *Orchidaceae*, que se desenvolve principalmente em regiões tropicais. Embora poucos, existem estudos que comprovam suas atividades antioxidantes, sendo moléculas capazes de retardar ou evitar a oxidação, atuando em alimentos ou sistemas biológicos. O objetivo deste trabalho foi determinar a atividade antioxidante e antimicrobiana em orquídeas. A atividade antioxidante foi determinada por DPPH, FRAP, ABTS, compostos fenólicos e flavonoides. A atividade antimicrobiana foi determinada pelo método do teste de difusão em disco e concentração mínima inibitória. Por meio deste trabalho, concluiu-se que há atividade antioxidante e atividade antimicrobiana para as orquídeas estudadas.

Palavras-chave: DPPH. FRAP. ABTS. Fenólicos totais. Atividades biológicas.

## **Abstract**

The largest group of flowers is considered the *Orchidaceae* family, which grows mainly in tropical regions. Although few, there are studies that prove its antioxidant activities, being molecules capable of delaying or preventing oxidation, acting on food or biological systems. The objective of this work was to determine the antioxidant and antimicrobial activity in orchids. The antioxidant activity was determined by DPPH, FRAP, ABTS, phenolic compounds and flavonoids. The antimicrobial activity was determined by the disc diffusion test method and minimum inhibitory concentration. Through this work, it was concluded that there is antioxidant and antimicrobial activity for the studied orchids.

Keywords: DPPH. FRAP. ABTS. Total phenolics. Biological activities.

## Lista de ilustrações

Figura 1. Estrutura da flor da orquídea.....	16
Figura 2. Localização da antera e polínea. ....	16
Figura 3. <i>Dendrobium Nobile</i> . ....	17
Figura 4. <i>Cattleya</i> . ....	17
Figura 5. <i>Vanilla planifolia</i> . ....	17
Figura 6. <i>Cyrtopodium cardiochilum</i> . ....	17
Figura 7. <i>Gastrodia cunninghamii</i> . ....	17
Figura 8. <i>Cymbidium tracyanum</i> . ....	18
Figura 9. Estrutura fenólica de antioxidantes sintéticos. ....	20
Figura 10. Seiva exposta nos botões da orquídea. ....	23
Figura 11. <i>Dendrobium Nobile</i> recém coletada. ....	23
Figura 12. <i>Dendrobium Nobile</i> embalada a vácuo. ....	23
Figura 13. Processo de extração. ....	24
Figura 14. Filtração. ....	24
Figura 15. Processo de rotaevaporação. ....	24
Figura 16. Extrato <i>Dendrobium Nobile</i> . ....	25
Figura 17. Cromatograma dos padrões utilizados na análise por CLAE.....	35
Figura 18. Cromatograma da amostra 3 (2,5 mg mL <sup>-1</sup> ).....	35
Figura 19. Cromatograma da amostra 1 (2,5 mg mL <sup>-1</sup> ).....	36
Figura 20. Cromatograma da amostra 2 (2,5 mg mL <sup>-1</sup> ).....	36
Figura 21. Cromatograma da amostra 1 (25,0 mg mL <sup>-1</sup> ).....	36
Figura 22. Cromatograma da amostra 2 (25,0 mg mL <sup>-1</sup> ).....	36
Figura 23. Resultados da CIM, sendo (A) referente a amostra 1; (B) referente a amostra 2; e (C) referente a amostra 3.....	36
Figura 24. Resultados dos halos referentes a bactéria <i>Salmonella</i> .....	37
Figura 25. Resultados dos halos referentes a bactéria <i>S. aureus</i> .....	37
Figura 26. Resultados dos halos referentes a bactéria <i>E.coli</i> .....	38

## **Lista de tabelas**

Tabela 1. Preparo das amostras para análises de flavonoides, fenólicos e DPPH.....	25
Tabela 2. Preparo das amostras para análises de FRAP e ABTS.....	26
Tabela 3. Rendimentos obtidos no processo de extração referentes a amostra 1 e 2.....	32
Tabela 4. Média das massas e resultados obtidos no processo de determinação do teor de umidade referentes a amostra 1 e 2.....	32
Tabela 5. Médias das análises de antioxidantes obtidas por grama de extrato para as amostras 1 e 2, enquanto para a amostra 3 por grama de amostra, seguidas do desvio padrão.....	33

## SUMÁRIO

<b>1.</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	12
2.1.	OBJETIVO GERAL .....	12
2.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICO .....	12
<b>3.</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	13
<b>4.</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	14
4.1.	PLANTAS MEDICINAIS .....	14
4.2.	ORQUÍDEAS .....	15
4.3.	RADICAIS LIVRES E O ESTRESSE OXIDATIVO .....	18
4.3.1.	<i>CLASSES DE ANTIOXIDANTE</i> .....	19
4.3.1.1.	Antioxidantes sintéticos .....	20
4.3.1.2.	Antioxidantes naturais .....	20
<b>5.</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	22
5.1.	MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS .....	22
5.2.	AMOSTRAGEM E EXTRAÇÃO .....	22
5.3.	METODOLOGIAS.....	26
5.3.1.	<i>DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE</i> .....	26
5.3.2.	<i>ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH</i> .....	26
5.3.3.	<i>ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP</i> .....	27
5.3.4.	<i>ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS</i> .....	27
5.3.5.	<i>COMPOSTOS FENÓLICOS</i> .....	28
5.3.6.	<i>FLAVONOIDES</i> .....	28
5.3.7.	<i>AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS POR CLAE</i> .....	29
5.3.8.	<i>TESTE DE DISCO – DIFUSÃO</i> .....	29
5.3.9.	<i>DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA</i> .....	31
5.3.10.	<i>ANÁLISE ESTATÍSTICA</i> .....	31
<b>6.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	33
6.1.	ANÁLISES DE ANTIOXIDANTES .....	33
6.2.	ANÁLISES ANTIMICROBIANAS .....	37
<b>7.</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	40
	REFERÊNCIAS.....	40

## 1. INTRODUÇÃO

O maior grupo de plantas com flores do mundo é a Família *Orchidaceae*, composta por uma variação de 700 gêneros e 25.000 espécies. Desenvolve-se principalmente em regiões tropicais, contendo grande diversidade em forma, tamanho e cor de suas flores, sendo principalmente cultivada de forma ornamental (LORENZI; SOUZA, 2001).

Apesar de rústicas e de fácil cultivo, exige-se conhecimentos específicos e exclusivos, sendo imprescindível o uso de substratos, que servirão como suporte ao sistema radicular da planta (ASSIS et al, 2010). Atualmente as orquídeas são cultivadas em todos os continentes destacando-se, no continente Americano e no Brasil, os seguintes gêneros: *Cattleya*; *Oncidium*; *Epidendrum*; *Dendrobium nobile* (FIGUEIREDO; KOLB, 2013).

Embora haja pouco estudo sobre as orquídeas, existem estudos que confirmam sua função antioxidante, fazendo com que esta deixe de ser apenas uma planta ornamental (SCHUSTER et al, 2017). Estes autores, apontam que algumas doenças já foram tratadas por meio destas orquídeas, sendo: câncer, tuberculose, cólera, eczema, asma, etc.

Ademais, há interesse em se encontrar fontes naturais de antioxidantes desde os anos 80, tanto para uso alimentício, quanto para uso medicinal, isso devido ao grande potencial cancerígeno dos antioxidantes sintéticos, dentre outros malefícios à saúde humana (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Entre outros benefícios encontram-se propriedades diuréticas, relaxantes, antirreumáticas, anti-inflamatórias, anticarcinogênicas, antimicrobianas, antivirais, hipoglicemiantes, anticonvulsivantes e neuroprotetoras (SILVA; BOLDRINI; KUSTER, 2013).

Os antioxidantes são responsáveis por retardar a oxidação de moléculas, podendo absorver e neutralizar radicais livres, quelando o oxigênio ou decompondo peróxidos (OLIVEIRA et al, 2009). Segundo Oliveira et al, (2009) nenhum antioxidante contém todas as características de um antioxidante ideal, sendo estas: ser um composto biológico naturalmente presente em tecidos animais; ser ativo na proteção de moléculas de proteínas e lipídios; ter boa biodisponibilidade, após administração oral e parenteral; ter meia-vida longa; ser ativo no espaço intra e extracelular e ser capaz de cruzar a membrana celular intacto.

Encontram-se estudos sobre os antioxidantes envolvendo folhas e flores de orquídeas, porém este estudo foi baseado, além das flores, também na seiva destas, localizada nas flores, sendo formada nas raízes de plantas e conseqüentemente distribuída para todos os tecidos da planta. A maior parte dos trabalhos feitos com orquídeas para uso medicinal, são das espécies

asiáticas e europeias, sendo poucas as pesquisas das orquídeas brasileiras (SILVA; BOLDRINI; KUSTER, 2013).

Diante do exposto, há um imenso campo para o estudo de orquídeas brasileiras. Dessa forma, no presente trabalho foi feita a determinação das atividades antioxidantes da seiva de flores de orquídeas que se assemelha a *Cattleya*, não sendo possível ser feita a identificação botânica até então, e de extratos etanólicos de flores de orquídea *Dendrobium Nobile Lindl*, a partir dos métodos DPPH; FRAP; e ABTS, e além disso, de sua atividade antimicrobiana.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Determinar atividade antioxidante e antimicrobiana de seiva de uma orquídea *Cattleya sp.* e extratos de orquídeas feitos a partir da *Dendrobium Nobile Lindl.*

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICO

Determinar atividade antioxidante a partir dos métodos: DPPH, FRAP e ABTS;

Determinar o teor de compostos fenólicos totais e flavonoides;

Determinar atividade antimicrobiana das orquídeas;

Comparar as atividades das variedades estudadas.

### 3. JUSTIFICATIVA

Atualmente saúde e beleza são temas bastantes abordados e várias doenças podem ser causadas devido às espécies reativas de oxigênio, ocasionando danos à célula humana. Cada vez mais se tem interesse em novas fontes naturais de antioxidantes para suprir as necessidades humanas (HUANG, et al., 2005).

As orquídeas são plantas da família *Orchidaceae*, sendo a maior família da classe angiosperma, contendo uma grande variedade de formas, tamanhos e cores. Além dessa variedade de gêneros e espécies ser complexa, é uma flor facilmente identificada devido sua folhagem e beleza (LORENZI; SOUZA, 2001).

Os antioxidantes inibem a oxidação de algumas moléculas, neutralizando os radicais livres. Essa inibição consequentemente reduz o envelhecimento, além de ser usada em fármacos, cosméticos e alimentos. Segundo Silva (2013) os extratos de orquídeas possuem efeitos antioxidantes, no entanto, o efeito antioxidante na seiva destas orquídeas ainda não foi estudado.

Neste trabalho, foi feita a determinação da atividade antioxidante e antimicrobiana da seiva e extrato de orquídeas, para que, possam, futuramente, ser utilizadas em termos de saúde, estética ou alimentação.

## 4. REVISÃO DE LITERATURA

Desde a antiguidade, utilizam-se plantas como fonte de medicamentos para tratamentos de doenças e feridas. Dados apontam que 80 % da população depende de plantas medicinais em casos primários em relação à saúde (ROSA et al., 2011).

Nos últimos anos, tem sido grande o aumento de casos de câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune, entre outros, associados aos radicais livres e outros oxidantes (ATOUI et al., 2005).

O Brasil tem buscado aprovações da Política Nacional de Práticas Interativas e Complementares (PNPIC), que incluem em suas diretrizes a promoção do uso de plantas medicinais e fitoterápicos no Sistema Único de Saúde (BRASILEIRO, 2008). Assim, é fundamental estudar cada espécie para direcionar estratégias para o uso medicinal.

### 4.1. PLANTAS MEDICINAIS

Segundo Almeida (2011), plantas são usadas com histórico medicinal antes mesmo do surgimento da escrita, para o tratamento de diversas enfermidades. A pesquisa etnofarmacológica foi reconhecida como um dos melhores caminhos para se descobrir novas drogas, reduzindo custo e tempo (ALMEIDA, 2011).

A etnofarmacologia surgiu em 1967, nos Estados Unidos e é definida como a exploração científica interdisciplinar dos agentes biologicamente ativos, tradicionalmente empregados ou observados pelo homem (BRUHN; HOLMSTEDT, 1981 apud ALMEIDA, 2011<sup>1</sup>).

De acordo com a RDC nº 26, publicada em 13 de maio de 2014 da ANVISA, define categorias de medicamentos fitoterápicos e produtos tradicionais, bem como:

II - Chá medicinal: droga vegetal com fins medicinais a ser preparada por meio de infusão, decocção ou maceração em água pelo consumidor;

V - Derivado vegetal: produto da extração da planta medicinal fresca ou da droga vegetal, que contenha as substâncias responsáveis pela ação terapêutica, podendo ocorrer na forma de extrato, óleo fixo e volátil, cera, exsudato e outros;

VIII - Droga vegetal: planta medicinal, ou suas partes, que contenham as substâncias responsáveis pela ação terapêutica, após processos de coleta/colheita, estabilização, quando aplicável, e secagem, podendo estar na forma íntegra, rasurada, triturada ou pulverizada;

---

<sup>1</sup> BRUHN, J. G.; HOLMSTEDT, B. **Ethnopharmacology: objectives, principles and perspectives**. In: BEALE, J. L.; REINHARD, E. (Ed). *Natural products as medicinal agents*. Stuttgart: Hippokrates, 1981. p.405-430.

XXIII - Planta medicinal: espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos. (ANVISA, 2014).

Segundo Almeida (2011), é considerado um medicamento todos os fármacos direcionados para modificar ou explorar sistemas fisiológicos ou estados patológicos, assim beneficiando o paciente, com objetivo profilático, curativo, paliativo. É então, considerado remédio todos os meios físicos, químicos ou psicológicos, através dos quais se procura o restabelecimento da saúde.

Orquídeas vêm sendo usadas como plantas medicinais, sendo muitas as espécies que sintetizam compostos de grande importância fitoterápica, usados principalmente na Índia e na China. Além disso, as plantas podem ser usadas na estética, desde que possuam propriedades antioxidantes. Porém, são poucos os estudos em relação aos princípios ativos (CARRERA et al., 2014). Diante disso, instiga-se o interesse em novos conhecimentos a respeito.

#### 4.2. ORQUÍDEAS

Foi durante o período cretáceo, 145 milhões a 66 milhões de anos, que se originou a família *Orchidaceae*, na Malásia (GARAY, 1972 apud SOARES, 2012<sup>2</sup>). As orquídeas têm sua presença marcante devido às suas formas, cores, hábitos de crescimento e beleza. São apreciadas não só pelo aspecto ornamental, mas também pela sua importância medicinal (STANCATO; BEMELMANS; VEGRO, 2001).

A família *Orchidaceae* divide-se em 88 subtribos, com mais de 600 gêneros e mais de 20.000 espécies. No Brasil existem em torno de 2500 a 3500 espécies, subdivididas em 200 gêneros (LORENZETI; SOUZA, 2001). Ademais, sua flor é composta por três sépalas e três pétalas, na qual uma é denominada labelo, como demonstrado na Figura 1, com a função de atrair polinizadores (SILVA, 2003).

Segundo Vanique; Coelho (1996) apud Silva (2003) a peça denominada coluna é o local onde os órgãos sexuais se encontram fundidos, a antera se localiza no pico da coluna e nela encontram-se os grãos de pólen agrupados na polínea (Figura 2). Sua superfície viscosa possui um disco denominado de estigma, localizado abaixo da antera na qual é utilizada como depósito das políneas (VANIQUE; COELHO, 1996 apud SILVA, 2003<sup>3</sup>).

<sup>2</sup> GARAY, L. (1972). **On the origin of the orchidaceae, ii.** *Journal of the Arnold Arboretum*, 53(2), 202-215.

<sup>3</sup> VANIQUE, M. M.; COELHO, S. J.; (1996) **Cultivo de orquídeas.** Lavras, MG: UFLA. Boletim Técnico. Série Extensão; Ano 5, n. 12.

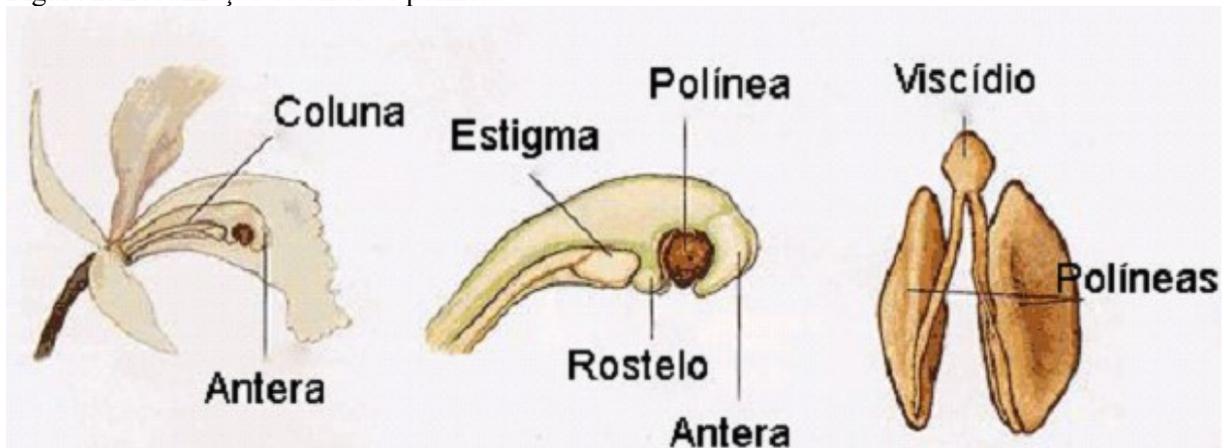
A grande variedade de orquídeas se deu pela sua adaptação a diferentes ambientes e polinizadores distintos. Além disso, em suas partes vegetativas encontram-se diversidades que facilitam a obtenção de recursos como água, luz e nutrientes (MATTIUZ, C.; RODRIGUES; MATTIUZ, B., 2006).

Figura 1. Estrutura da flor de orquídea.



Fonte: Orquidário UEL (1997).

Figura 2. Localização da antera e polínea.



Fonte: Orquidário UEL (1997).

Na literatura há estudos relacionando as orquídeas às plantas medicinais, devido à capacidade antioxidante em seus extratos foliculares, entre outros. Porém, não há estudos sobre a seiva da flor de orquídea (CARRERA, et al., 2014).

A espécie *Dendrobium nobile* (Figura 3) é a mais cultivada da família *Orchidaceae*, assim como seus híbridos. É originária da China e Himalaia, cresce em diferentes habitats e tem importante valor florístico. Além disso, há relatos de que essas orquídeas possuem propriedades farmacológicas, sendo elas antioxidantes, vasodilatadoras e anticancerígenas (LIN et al., 2003).

A *Cattleya* (Figura 4) é considerada uma das orquídeas mais importantes devido a seu valor ornamental e sua diversidade, muito usada em cruzamentos, para se obter híbridos interespecíficos (PEDRO DE MORAES, 2000 apud SAONCELLA, 2012<sup>4</sup>).

Figura 3. *Dendrobium nobile*



Fonte: autoria própria.

Figura 4. *Cattleya sp*



Fonte: autoria própria.

A orquídea *Vanilla planifolia* (Figura 5) é uma orquídea muito usada em alimentos, bebidas e cosméticos. É mais conhecida por baunilha, e contém ação antimicrobiana (PETERSON et al., 2004). Já o extrato de *Cyrtopodium cardiochilum* (Figura 6) tem grande importância em tratamentos de tuberculose, devido suas propriedades imunológicas (BARRETO; PARENTE, 2006). Além destas, os rizomas da orquídea *Gastrodia Cunninghamii* (Figura 7) são apreciados na culinária (MAHENDRAN; BAI, 2008).

Figura 5.

*Vanilla planifolia*



Fonte: OrtoBotanico (2008).

Figura 6.

*Cyrtopodium cardiochilum*



Autor: Narcisa Orquideas (2012).

Figura 7.

*Gastrodia Cunninghamii*



Autor: Rebecca Bowater (2009).

De um modo geral, as orquídeas exalam odor, e os osmóforos são considerados os responsáveis pela liberação dos compostos voláteis, que podem atrair polinizadores. Segundo

<sup>4</sup> PEDROSO-DE-MORAES, C. (2000). **Cultivo de Orquídeas**. Pró-Reitoria de Comunidade e Extensão do Centro Universitário Hermínio Ometto, Uniararas, São Paulo. 130 p

Cardoso (2011) esses odores são produzidos por óleos voláteis e compostos fenólicos de baixo peso molecular.

Outras características são a presença de amido no botão floral e após um tempo, a presença de gotículas de óleo nos protoplastos de células epidérmicas das pétalas. Em relação aos dados microquímicos, vale lembrar que por conta de não haver muita clorofila nos tecidos florais, é comum reservas de óleo (VOGUEL, 1983 apud SILVA, 1990<sup>5</sup>).

Stpiczynska (1993), identificou osmóforos na base das pétalas e margem do labelo de *Cymbidium tracyanum* (Figura 8), com produção de odor. Segundo Williams; Whitten (1983) apud Silva (1990)<sup>6</sup>, em relação aos voláteis florais são encontrados hidrocarbonetos, benzenoides, éteres, ésteres, aldeídos, cetonas, terpenoides, aminados e várias outras substâncias metabólicas.

Figura 8. *Cymbidium tracyanum*.



Fonte: José Santos (2017).

Raskin et al., (1990) apud Silva (1990)<sup>7</sup> por meio dos osmóforos, quantificaram teores de ácido salicílico em estruturas das espécies *Araceae* e *Cycadaceae*. No entanto, essa ocorrência não foi estudada em *Orchidaceae*. O fato de o ácido salicílico exercer atividade antioxidante, como um composto fenólico, desperta interesse em novas pesquisas.

#### 4.3. RADICAIS LIVRES E O ESTRESSE OXIDATIVO

Nas últimas décadas, tem-se estudado bastante o papel dos radicais livres no organismo dos seres humanos, que durante sua atividade metabólica é produzido, reagindo diretamente

<sup>5</sup> VOGUEL, S. (1983). **Ecophysiology of zoophilic pollination**. In: LANGE, O. L.; NOBEL, P. S.; OSMOND, C. B.; e ZIEGLER, H. (ed). Springer Verlag. p. 559-624.

<sup>6</sup> WILLIAMS, N. H.; WHITTEN, W. M. (1983) **Orchid floral fragrances and advances in the last sesquidecade**. Biol. Bull., 164: 355-395.

<sup>7</sup> RASKIN, I.; SKUBATZ, H.; TANG, W.; MEEUSE, B. J. D. (1990) **Salicylic acid level in thermogenic and non-thermogenic plants**. Ann. Bot., 66: 369-373.

com o DNA, RNA, proteínas e outras substâncias oxidáveis, responsáveis pelo envelhecimento e doenças, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune, entre outras (SOUSA et al., 2007). Assim sendo, tem-se por base que os radicais livres e outros oxidantes são causadores de várias doenças. Além disso, em excesso podem gerar estresse oxidativo, definido como circunstâncias nas quais os radicais livres causam danos teciduais. (SOUSA et al., 2007).

Segundo Barbosa et al., (2010), o estresse oxidativo ocorre por conta do excesso de produção de radicais livres, sendo além da capacidade protetora das defesas antioxidantes. Os radicais livres são átomos ativos, compostos por um número ímpar de elétrons na sua órbita externa. Enquanto o ânion superóxido contem oxigênio, conhecido por espécies reativas de oxigênio, incluindo 19 superóxidos, radical hidroxila e derivados que não contem elétrons ímpares. No entanto, os radicais tornam-se moléculas altamente instáveis, devido os elétrons ímpares, prejudicando as células, proteínas e DNA (BARBOSA et al., 2010).

Há grande interesse em estudar e avaliar a atividade antioxidante, por conta de alguns benefícios já comprovados, bem como sua capacidade de proteger o organismo de radicais livres, prevenindo ou adiando várias doenças crônicas e neurodegenerativas (KARADAG; OZCELIK; SANER, 2009).

No sistema celular a auto-oxidação dos ácidos graxos insaturados localizado na membrana celular, é apontada como o processo oxidativo que ocorre mais frequentemente no organismo humano (SOUSA et al., 2007). Com base na necessidade de encontrar uma forma de controlar essa auto-oxidação no organismo dos seres humanos, foi constatado que os vegetais possuem benefícios à saúde, por conta das substâncias biologicamente ativas com efeitos desejáveis, impulsionando estudos sobre propriedades antioxidantes em plantas (CHIPAULT et al., 1952 apud MELO, 2006<sup>8</sup>).

#### 4.3.1. CLASSES DE ANTIOXIDANTE

De acordo com Bianchi et al., (1990), antioxidantes são substâncias que, em baixa concentração, retardam ou inibem o aparecimento de alterações oxidativas de maneira eficaz.

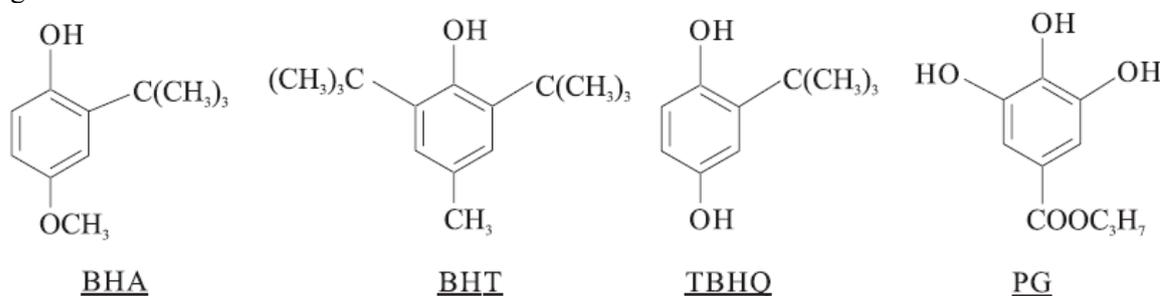
---

<sup>8</sup> CHIPAULT, J. R.; MIZUN, G. K.; HAWKINS, J. M.; LUNDBERG, W. O. **The antioxidant properties of natural spices.** *Food Res.*, v. 17, p. 46-55, 1952.

#### 4.3.1.1. Antioxidantes sintéticos

Segundo Ramalho et al., (2006) a CIS (cisteína), MBS (metabissulfito de sódio), BHA (buthylated hydroxyanisole, BHT (butylated hydroxytoluene), PG (propil galato) e TBHQ (terc butyl hydroquinone), são os antioxidantes mais utilizados na indústria farmacêutica e de alimentos, na qual tais estruturas permitem a doação de um próton a um radical livre, interrompendo o mecanismo de oxidação por radicais livres, transformando os derivados fenólicos em radicais livres. A Figura 9 representa a estrutura fenólica do BHA, BHT, PG e TBHQ.

Figura 9. Estrutura fenólica de antioxidantes sintéticos.



Fonte: SALVADOR, A. A. (2014).

O BHA é um antioxidante mais efetivo em gorduras animais, tendo sua eficiência limitada em óleos insaturados de vegetais ou sementes. Além disso não é muito estável diante de temperaturas altas, porém bem efetivo no controle de oxidação de ácidos graxos de cadeia curta. Enquanto o BHA age como sequestrante de radicais peróxidos, o BHT age como regenerador de radicais BHA (RAMALHO et al., 2006).

#### 4.3.1.2. Antioxidantes naturais

Os antioxidantes naturais mais utilizados podem ser citados como alecrim e sálvia. Sendo os tocoferóis os mais aplicados para inibição da oxidação dos óleos e gorduras, prevenindo a oxidação dos ácidos graxos insaturados (RAFECAS et al.,1998).

Diante da escolha por antioxidantes, é interessante levar em consideração fatores que incluem a legislação sobre seu uso, custo e a preferência do consumidor, que se dá por antioxidantes naturais (RAFECAS et al.,1998).

Os tocoferóis estão em todos óleos vegetais, na qual a atividade antioxidante ocorre principalmente devido à capacidade de doar hidrogênios à radicais livres. Enquanto os ácidos fenólicos são caracterizados por um anel benzênico, um grupamento carboxílico e grupamentos de hidroxila, que tornam propriedades antioxidantes (RAMALHO et al., 2006).

Segundo Ramalho et al., (2006), os antioxidantes fenólicos funcionam como sequestradores de radicais, formando produtos intermediários relativamente estáveis. Muitos estudos vêm sendo realizados para substituição dos antioxidantes sintéticos.

Os compostos fenólicos, divididos em flavonoides e não flavonoides, são considerados os antioxidantes mais ativos nos vegetais, sendo multifuncionais como antioxidantes, atuando de várias maneiras. Este compõe a classe de fitoquímicos alimentares, na qual sua formula contém ao menos um anel aromático ligado a uma ou mais hidroxilas (SOARES, 2002).

Assim, nota-se a importância de produtos vindo da natureza, bem como o uso de antioxidantes de orquídeas, usados em tratamentos medicinais e estéticos (CARRERA et al., 2014).

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1. MATERIAIS, REAGENTES E EQUIPAMENTOS

Os reagentes utilizados durante a execução deste trabalho foram: etanol, metanol, água destilada, DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila), ácido gálico, quercetina, ácido clorídrico, cloreto férrico, sulfato ferroso, solução tampão acetato de sódio, 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina, carbonato de sódio, reagente Folin-Ciocalteu, cloreto de alumínio, ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzoatiazolina-6-sulfônico), persulfato de potássio, ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-carboxílico, ágar Mueller-Hinton, caldo Mueller-Hinton, solução salina, dimetilsulfóxido (DMSO), corante cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio (CTT).

Os equipamentos utilizados durante a execução deste trabalho, seguidos de sua marca e modelo, respectivamente, foram: balança analítica (SHIMADZU, ATY224), agitador magnético (EVEN, XMTD-204), estufa (SOLAB, SL. 102/125), sistema de filtração à vácuo, evaporador rotativo (SOLAB, SL. 126), cromatógrafo líquido de alta eficiência (THERMO FISHER, ULTIMATE 3000 LC SYSTEM), espectrofotômetro (PG INSTRUMENTS LIMITED, T80+), centrífuga (PARSEC, CT-0603).

Enquanto os materiais utilizados para as análises foram: papel filtro; ponteiras, espátulas, tubos falcons, placas de Petri, tubos vazios, eppendorfs e caneta.

### 5.2. AMOSTRAGEM E EXTRAÇÃO

As amostras foram coletadas em orquidários da região de Toledo e Marechal Cândido Rondon. Da variedade de orquídea *Cattleya sp.* foram retiradas apenas as gotas da seiva exposta na flor, como visto na Figura 10 circulado em vermelho. A coleta foi feita no período de novembro/2019 a dezembro/2019. A seiva foi coletada com o auxílio de uma espátula e transferida para eppendorfs, armazenados ao abrigo da luz e sob atmosfera de nitrogênio no congelador até o momento da análise.

Figura 10. Seiva exposta nos botões da orquídea.



Fonte: autoria própria.

Outras amostras da flor da variedade *Dendrobium nobile lindl*, UNOP10378, foram coletadas no distrito de Dez de Maio, município de Toledo e no interior de Margarida, município de Marechal Candido Rondon. A coleta foi feita no período de agosto/2019 a setembro/2019. As amostras foram lavadas com água destilada, embaladas a vácuo e congeladas, como mostram as Figuras 11 e 12.

Figura 11. *Dendrobium nobile* recém coletada.



Fonte: autoria própria.

Figura 12. *Dendrobium nobile* embalada a vácuo.



Fonte: autoria própria.

A obtenção do extrato das flores foi feita por agitação magnética, como apresenta a figura 13. A partir de 50 g de flores trituradas com 500 mL de etanol em um processador, foi feita a extração sob agitação magnética por 2 horas ao abrigo da luz

Figura 13. Processo de extração



Fonte: autoria própria.

Na sequência, o extrato foi filtrado em filtro de papel, com auxílio de bomba e o solvente foi eliminado com um evaporador rotativo à temperatura de 37 °C, como mostram as figuras 14 e 15.

Figura 14. Filtração.



Fonte: autoria própria.

Figura 15. Processo de rotaevaporação.



Fonte: autoria própria.

Em seguida, a amostra foi transferida para um tubo falcon, ao abrigo da luz, como mostra a figura 16.

Figura 16. Extrato *Dendrobium nobile*.



Fonte: autoria própria.

Foi utilizado gás nitrogênio para remover o restante do solvente que ainda poderia estar presente. A amostra foi armazenada em congelador até o momento das análises.

As amostras receberam as codificações: orquídea *Dendrobium nobile* de Dez de Maio – TD (AMOSTRA 1); orquídea *Dendrobium nobile* de Margarida – MCR (AMOSTRA 2); seiva de orquídea *Cattleya sp.* (AMOSTRA 3).

Após a extração, as amostras utilizadas nas análises de flavonoides, fenólicos e DPPH foram preparadas a partir de metanol, conforme a Tabela 1.

Tabela 1. Preparo das amostras para análises de flavonoides, fenólicos e DPPH.

<b>Amostra</b>	<b>Peso da amostra (mg)</b>	<b>Volume metanol (mL)</b>	<b>Concentração (mg mL<sup>-1</sup>)</b>
<b>1</b>	25,20	10,00	2,52
<b>2</b>	25,10	10,00	2,51
<b>3</b>	25,30	10,00	2,53

As amostras para as análises de FRAP e ABTS foram preparadas conforme a tabela 2. Para a análise de FRAP, a concentração da amostra 2 foi de 1,25 mg mL<sup>-1</sup>.

Tabela 2. Preparo das amostras para as análises de FRAP e ABTS.

<b>Amostra</b>	<b>Peso da amostra (mg)</b>	<b>Volume etanol (mL)</b>	<b>Concentração (mg mL<sup>-1</sup>)</b>
<b>1</b>	250,1	100,00	2,501
<b>2</b>	250,0	100,00 / 200,00	2,500 / 1,250
<b>3</b>	250,0	50,00	5,000

### 5.3. METODOLOGIAS

#### 5.3.1. DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE

A determinação do teor de umidade das amostras 1 e 2 foi feita a partir de aproximadamente 3,000 g da amostra, em triplicata. Cadinhos de massa conhecida foram levados à estufa por 2 horas a 105 °C e resfriados por 1 hora. As amostras em foram levadas em triplicata, à estufa a 105 °C por 18 horas. (ZENEBO; PASCUET; TIGLEA; 2008).

#### 5.3.2. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO DPPH

Uma forma de obtenção dos resultados, é a partir da curva de calibração empregando o padrão Trolox. Uma solução de concentração 2000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foi preparada em balão volumétrico de 25,0 mL, dissolvendo-se 12,5 mg desse padrão em metanol, completando-se o volume. A partir da diluição da solução Trolox de 2000  $\mu\text{mol L}^{-1}$  foram preparadas as concentrações: 0, 100, 500, 1000, 1500  $\mu\text{mol L}^{-1}$  (BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSET, 1997, apud BOROSKI, et al., 2015).

A solução de DPPH foi preparada dissolvendo-se 3,7 mg de DPPH em metanol, em um balão de 100,0 mL ao abrigo da luz. Transferiu-se uma alíquota de 50  $\mu\text{L}$  de cada solução Trolox em triplicata, para tubos falcons e acrescentaram-se 3 mL da solução de DPPH. Fez-se a homogeneização e após 30 minutos a leitura da absorbância, em 517nm contra o branco. Seguiu-se o mesmo procedimento para as amostras e branco. Feito isso, obteve-se os resultados em  $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  extrato. (BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSET, 1997, apud BOROSKI, et al., 2015).

### 5.3.3. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO FRAP

Para a determinação da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP), preparou-se a solução do complexo  $[\text{Fe}^{3+}(\text{TPTZ})_2]\text{Cl}_3$ . Preparou-se a solução de acetato de sódio  $300 \text{ mmol L}^{-1}$  com 3,10 g de  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  e 16 mL de  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , dissolvido em 1 litro de água destilada. Calibrou-se o pHmetro ficando em 92 % de confiabilidade e aferiu-se o pH para 3,5. Na sequência preparou-se 50 mL da solução TPTZ a  $10 \text{ mmol L}^{-1}$ , no qual transferiu-se 0,16 g de TPTZ dissolvido em 1 mL de  $\text{HCl}$  ( $1,0 \text{ mol L}^{-1}$ ) para um balão de 50 mL e completou-se o volume com água destilada. Em sequência preparou-se a amostra de  $\text{FeCl}_3$  a  $20 \text{ mmol L}^{-1}$ , no qual utilizou-se 0,16 g de  $\text{FeCl}_3$  dissolvidos em 50 mL de água destilada. Para a curva utilizou-se o padrão Trolox a  $2000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ , diluído em concentrações de 50, 100, 250, 500,  $1000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Esse teste foi realizado sob proteção da luz em triplicata, no qual o reagente FRAP é mantido a temperatura de  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Primeiramente adicionou-se 3,0 mL do reagente FRAP para a cubeta para que fosse feito a leitura a 593 nm, sendo este o branco. Em seguida, ao abrigo da luz transferiu-se uma alíquota de  $100 \text{ } \mu\text{L}$  da amostra para tubos de ensaio e acrescentou-se  $300 \text{ } \mu\text{L}$  de água destilada, misturado com 3 mL do reagente FRAP, manteve-se em banho-maria a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$  e homogeneizou-se em centrífuga por 5 minutos a 3000 rpm. Realizou-se a leitura (593 nm) com 40 minutos de repouso em banho maria a  $37 \text{ }^\circ\text{C}$ , feito isso obteve-se os resultados em  $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  extrato. (BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSET, 1997, apud BOROSKI, et al., 2015).

### 5.3.4. ATIVIDADE ANTIOXIDANTE PELO MÉTODO ABTS

Para o preparo do reagente ABTS utilizou-se 30,0 mg de ABTS para 7,8 mL de persulfato de potássio a  $2,45 \text{ mmol L}^{-1}$ , para formação de uma concentração final de  $7,0 \text{ mmol L}^{-1}$ . Feito o reagente ABTS, o mesmo ficou em repouso por 16 horas à temperatura ambiente. O preparo da solução de persulfato de potássio foi feito a partir de 6,6 mg de persulfato de potássio dissolvidos para 10 mL de água destilada, perfazendo uma solução final de  $2,45 \text{ mmol L}^{-1}$ . A solução de tampão fosfato de sódio foi preparada a partir de 64,0 mg de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e 278,7 mg de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , transferiu-se para balão de 500 mL e completou-se o volume com água destilada, ajustou-se o pH para 7,4. O padrão Trolox foi utilizado para curva de calibração sendo utilizado 31,25 mg para 50 mL de tampão fosfato de sódio  $5 \text{ mmol L}^{-1}$ , pH 7,4. Feita a solução de Trolox a  $2500 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$  fez-se as diluições para 0, 250, 500, 1000, 1500 e  $2000 \text{ } \mu\text{mol L}^{-1}$ .

Preparadas todas soluções, fez-se uma leitura para branco da solução de ABTS diluído em tampão fosfato de forma a obter uma absorbância de  $0,700 \pm 0,02$  a 734 nm.

Em seguida, foi preparada a curva de calibração. Transferiu-se uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  de cada solução Trolox (0, 250, 500, 1000, 1500 e 2000  $\mu\text{mol L}^{-1}$ ), em triplicata, para as cubetas e acrescentou-se 2,0 mL da solução de ABTS. Fez-se a homogeneização da mistura, e seguidos 6 minutos em banho a 37 °C, foi feita a leitura da absorbância em 734 nm.

Para a análise dos extratos das amostras, transferiu-se uma alíquota de 20  $\mu\text{L}$  de cada diluição do extrato para tubos falcons em triplicata e com proteção da luz. Foram adicionados 2,0 mL do cátion radicalar, homogeneizou-se a mistura e após 6 minutos em banho maria de 37 °C, faz-se a leitura da absorbância em 734 nm, e obteve-se os resultados em  $\mu\text{mol ET g}^{-1}$  extrato. (RE, et al., 1999).

### 5.3.5. *COMPOSTOS FENÓLICOS*

Segundo Oliveira et al., (2009, apud BOROSKI, et al., 2015), prepara-se a solução padrão de ácido gálico ao abrigo da luz sendo utilizado 0,0101 g para 50 mL de água destilada. Esse padrão é diluído em concentrações de 25, 50, 100, 150 e 200  $\text{mg L}^{-1}$ . Preparou-se a solução de carbonato de sódio utilizando 8,75 g do sal em 25 mL de água destilada, sob agitação até a formação de um corpo de fundo, sendo utilizado apenas o sobrenadante para as análises. O reagente de Folin-Ciocalteu é preparado ao abrigo da luz numa concentração de 1:1 com água destilada.

Para determinação de compostos fenólicos, adicionou-se 250  $\mu\text{L}$  do reagente de Folin-Ciocalteu, 500  $\mu\text{L}$  da solução saturada de carbonato de sódio e 4,0 mL de água destilada, a 250  $\mu\text{L}$  da amostra. Agitou-se e manteve-se em temperatura ambiente sob proteção da luz por 25 minutos, em seguida centrifugou-se por 10 minutos a 3000 rpm. Preparou-se o branco a partir de 250  $\mu\text{L}$  de metanol no lugar da amostra e prosseguir com as mesmas condições como descrito para a amostra. Determina-se a absorção máxima em 725 nm em espectrofotômetro UV-Vis e obtém-se os resultados em mg de equivalente ácido gálico por grama de extrato. (OLIVEIRA, et al., 2009 apud BOROSKI, et al., 2015).

### 5.3.6. *FLAVONOIDES*

Para a curva de calibração utilizou-se o padrão de quercetina, sendo preparado ao abrigo da luz. Utilizou-se 20,1 mg de quercetina, que foram transferidas para um balão de 10 mL, completado com metanol. Preparou-se também a solução de cloreto de alumínio 5 %, utilizando

2,49 g do sal, transferiu-se para um balão 50 mL e completou-se com metanol, este foi deixado sob agitação magnética e utilizou-se apenas o sobrenadante para prosseguir às análises. (OLIVEIRA, et al., 2009 apud BOROSKI, et al., 2015).

Prosseguiu-se a análise de determinação de flavonoides, no qual adicionou-se 250 µL da solução de cloreto de alumínio 5 % e 4,25 mL de metanol a 500 µL da solução de extrato da amostra teste. Colocou-se sob agitação e manteve-se em temperatura ambiente por 30 minutos. Preparou-se um branco nas mesmas condições descritas para a amostra, com metanol. Em seguida determinou-se a absorção máxima em 425 nm em espectrofotômetro UV-Vis e obteve-se os resultados em mg equivalente quercetina por grama de extrato. (CHANG, et al., 2002 apud BOROSKI, et al., 2015).

### 5.3.7. AVALIAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS POR CLAE

A determinação foi feita utilizando um sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) acoplado com detector UV/Vis. As condições cromatográficas utilizadas foram: coluna de fase reversa C18 (250 x 4,6 mm) com tamanho de partícula de 5 µm; temperatura do forno 40 °C; comprimento de onda de detecção 280 nm; fluxo de 1,0 mL min<sup>-1</sup>; volume de injeção 20 µL; fase móvel: água ultra pura acidificada com ácido acético 0,5% (pH 3,03): metanol acidificada com ácido acético 0,5% (pH 3,52), com eluição por gradiente. A composição inicial foi H<sub>2</sub>O:metanol (85:15), com aumento de metanol até 30 minutos (40:60), essa proporção foi aumentada até 35 minutos (5:95), mantendo essa proporção até 40 minutos.

Os padrões de ácido gálico; catequina; ácido cafeico; ácido *p*-cumárico; ácido ferúlico; propil galato; quercetina; ácido *trans*-cinâmico; kaempferol; kaempferide foram injetados e, em sequência, as amostras 1, 2 e 3 em concentração de 2,5 mg mL<sup>-1</sup>. Como não se obteve bons resultados, preparou-se as amostras 1 e 2 em concentração de 25 mg mL<sup>-1</sup>, que foram injetadas na sequência.

Após as análises cromatográficas, comparou-se os tempos de retenção das amostras aos padrões.

### 5.3.8. TESTE DE DISCO – DIFUSÃO

Para o teste de disco-difusão preparou-se 400 mL de ágar Mueller-Hinton, sendo utilizado 15,23 g de ágar para 400 mL de água destilada. Preparou-se também o caldo Mueller-Hinton utilizando 4,2 g para 200 mL de água destilada, após solubilização transferiu-se 2 mL para 10 tubos de ensaio, o restante foi deixado em erlenmeyer para uso posterior. A solução salina foi preparada a partir de 1,7 g de NaCl para 200 mL de água destilada. Feito a

solubilização, transferiu-se 2 mL para tubos de ensaio. Após os preparos de meios, estes foram encaminhados para a autoclave, acompanhado de ponteiras, placas, tubos vazios, eppendorfs e canaleta, a 121 °C.

Após a autoclavagem os materiais foram resfriados e o ágar vertido nas placas já estéreis, enquanto os meios deixados em estufa a 35 °C por 24 horas para garantir a esterilidade, feito isso dá-se continuidade nas análises. Estes meios são utilizados também para a determinação de concentração mínima inibitória.

Após materiais esterilizados preparou-se as amostras, utilizando-se 25,1 mg para a amostra 1; 25,0 mg para a amostra 2; e 25,0 mg para a amostra 3. Na sequência adicionou-se 100,4 µL de DMSO e 903,6 µL de caldo Mueller-Hinton para a amostra 1; 100 µL de DMSO e 900 µL de caldo Mueller-Hinton para a amostra 2; e 100 µL de DMSO e 900 µL de caldo Mueller-Hinton para a amostra 3.

Em uma placa de ágar Mueller-Hinton, fez-se a repicagem das bactérias que serão utilizadas nas análises, sendo estas *S.aureus*; *E.coli*; e *Salmonella*, no qual estriou-se cada bactéria em uma placa separada e identificada, deixando-as em incubação a 35 °C por 24 horas. Feito isso, faz-se a raspagem das bactérias, transferindo-as para um eppendorf identificado para cada bactéria, contendo caldo Mueller-Hinton com 10 % de glicerol. Essas repicagens são congeladas e utilizadas para a análise de disco-difusão e concentração mínima inibitória.

O preparo das bactérias para utilização desta análise é feito a partir de 10 µL da repicagem de cada bactéria, transferidas de formas distintas para um tubo contendo 2 mL de caldo Mueller-Hinton sendo feita a incubação a 35 °C por 24 horas. Havendo o crescimento das bactérias transferiu-se para a solução salina a quantidade necessária para turvação do meio ser padronizada à escala de 0,5 MacFarland.

Em seguida é feita a identificação das placas e a aplicação da amostra nos discos, sendo assim introduziu-se o swab estéril dentro do tubo de cepa padronizada, comprimindo-o contra a parede do tubo para a remoção do excesso de líquido. A inoculação é feita em forma de estrias na superfície do ágar em três direções, girando a placa em ângulo de 60° após cada estria. Na sequência é feito o preparo dos discos com as amostras acima, no qual aplicou-se 10 µL das amostras em discos separados e então é feita a aplicação na placa, com pinça estéril para evitar contaminação, após certificação de que o excesso de umidade tenha sido absorvido. (SEJAS et al., 2003).

Pressionou-se suavemente todos os discos para o contato total com a superfície do ágar em distâncias de 30 mm entre um disco e outro e de 15 mm da margem da placa foram mantidas, impedindo a superposição dos halos de inibição, sendo feito um controle com antibióticos em

cada placa, no qual utilizou-se a ampicilina para *Salmonella* e *E.coli*; e cefotaxima para *S. aureus* (SEJAS et al., 2003).

Incubou-se por 24 horas, e após retirada, foram feitas as leituras com auxílio de régua, utilizando fonte de luz refletida para iluminar a placa invertida sobre um fundo preto e opaco. (SEJAS et al., 2003).

### 5.3.9. DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

Após a esterilização dos materiais, as amostras foram preparadas em eppendorf, sendo utilizado 10,0 mg para a amostra 1; 10,3 mg para a amostra 2; e 20,0 mg para a amostra 3. Na sequência adicionou-se 100 µL de DMSO e 900 µL de caldo Mueller-Hinton para a amostra 1; 103 µL de DMSO e 927 µL de caldo Mueller-Hinton para a amostra 2; e 100 µL de DMSO e 900 µL de caldo Mueller-Hinton para a amostra 3.

O preparo das bactérias para utilização desta análise é feito a partir de 10 µL da repicagem de cada bactéria, transferidas de formas distintas para um tubo contendo 2 mL de caldo Mueller-Hinton sendo feita a incubação a 35 °C por 24 horas. Havendo o crescimento das bactérias transferiu-se para a solução salina a quantidade necessária para turvação do meio ser padronizada à escala de 0,5 MacFarland, a partir dessa padronização, transferiu-se 50 µL para um eppendorf, adicionando-se 950 µL de caldo Mueller-Hinton.

O procedimento é feito a partir do preparo de microplacas com 96 poços, na qual adicionou-se 100 µL de caldo Mueller-Hinton em todos poços, na sequência adiciona-se na linha A 100 µL do extrato, como preparado acima, para que sejam feitas várias diluições. Fez-se diluições seriadas até a linha G, desprezando no final 100 µL, sendo os poços da linha H considerados o controle. Na sequência adicionaram-se 10 µL da suspensão de bactérias que foram padronizadas em todos os poços, feito isso, faz-se a incubação overnight, a 35 °C.

Após o tempo previsto de incubação, examinam-se os resultados e faz-se a determinação da concentração inibitória mínima, sendo detectada a olho nu, podendo ser utilizado aparelhos de leitura óptica (BAUER et al., 1966 apud ALVES et al., 2008).

Após a análise, aplicou-se 5 µL do corante CTT (cloreto de 2,3,5-trifeniltetrazólio) e incubou-se novamente por 3 horas, a 35 °C.

### 5.3.10. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram avaliados pelo teste Tukey e por análise de variância (ANOVA) com nível de 5 % de significância para as análises de FRAP, DPPH e ABTS, e pelo

teste t de Student para as análises de compostos fenólicos totais e flavonoides, utilizando-se do programa Statistica versão 10.

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1. ANÁLISES DE ANTIOXIDANTES

A Tabela 3 apresenta os dados de rendimento na extração das amostras 1 e 2, referentes a *Dendrobium Nobile*, que foram calculados considerando a massa inicial de cada amostra e a massa de extrato obtida após secagem.

Tabela 3. Rendimentos obtidos no processo de extração referentes as amostras 1 e 2.

Amostra	Massa inicial (g)	Massa final (g)	Rendimento (%)
1	49,081	3,477	7,08
2	50,320	3,918	7,79

Cruz (2010) obteve um rendimento de 3,6 % em um extrato de etanol de orquídea *Dendrobium Nobile* pelo caule, enquanto em um processo de extração com etanol e carvão ativado, obteve-se um rendimento de 1 %. Portanto, as amostras 1 e 2 tiveram um bom rendimento de extração pela flor.

A umidade para as amostras 1 e 2 foi calculada a partir da massa final e inicial, e os resultados constam na tabela 4.

Tabela 4. Média das massas e resultados obtidos no processo de determinação do teor de umidade referentes a amostra 1 e 2.

Determinação de umidade	Amostras	
	1	2
Massa média inicial (g) $\pm$ desvio padrão	3,26 $\pm$ 0,10	3,05 $\pm$ 0,12
Massa média final (g) $\pm$ desvio padrão	0,25 $\pm$ 0,01	0,23 $\pm$ 0,02
Umidade (%)	92,32	92,35

A partir dos resultados, nota-se que o teor de umidade das amostras 1 e 2 são próximas, 92,32 % e 92,35 %, respectivamente. Dessa forma, os rendimentos das extrações em base seca correspondem a 92,19 % e 101,83 % para as amostras 1 e 2, respectivamente.

A partir das análises de antioxidantes realizadas, obteve-se os resultados por meio da equação da reta, gerada pela curva de calibração e absorbâncias, no qual se obtém a concentração em equivalente do padrão L<sup>-1</sup>. A partir desse resultado foi feito o cálculo da concentração por grama de extrato, os quais estão apresentados na tabela 5.

Tabela 5. Médias das análises de antioxidantes obtidas por grama de extrato, para as amostras 1 e 2, enquanto para a amostra 3, por grama de amostra, seguidas do desvio padrão.

Análises de antioxidantes	Amostras		
	1	2	3
<b>DPPH**</b> ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ extrato)	307,19 $\pm$ 3,33 <sup>b</sup>	384,11 $\pm$ 4,27 <sup>c</sup>	29,29 $\pm$ 2,01 <sup>a</sup>
<b>FRAP**</b> ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ extrato)	392,20 $\pm$ 12,09 <sup>b</sup>	448,71 $\pm$ 4,70 <sup>c</sup>	12,70 $\pm$ 1,34 <sup>a</sup>
<b>ABTS**</b> ( $\mu\text{mol ET g}^{-1}$ extrato)	714,45 $\pm$ 7,57 <sup>a</sup>	706,07 $\pm$ 18,58 <sup>a</sup>	97,03 $\pm$ 1,53 <sup>b</sup>
<b>Compostos fenólicos***</b> (mg EAG g <sup>-1</sup> extrato)	35,75 $\pm$ 1,08 <sup>a</sup>	50,42 $\pm$ 2,55 <sup>b</sup>	ND*
<b>Flavonoides***</b> (mg EQ g <sup>-1</sup> extrato)	22,93 $\pm$ 0,92 <sup>a</sup>	29,02 $\pm$ 0,68 <sup>b</sup>	ND*

\* ND = Não detectado. \*\*Médias  $\pm$  desvio padrão seguidas de letras sobrescritas diferentes em uma mesma linha diferem significativamente entre si pelo teste de Tukey ( $P > 0,05$ ) ou \*\*\*pelo teste t de Student. Análises realizadas em triplicata.

O DPPH é uma técnica que envolve a captura do radical livre estável, 2,2-difenil-1-picril-hidrazila. O método é bastante utilizado para determinação de atividade antioxidante. A partir da equação da reta obtida ( $y = -0,0003x + 0,9328$ ) e  $R^2 = 0,999$ , obteve-se os resultados expressos na Tabela 5. A amostra 1 inibiu em 307,19  $\mu\text{mol}$  de equivalente Trolox o radical DPPH por grama de extrato, enquanto que para a amostra 2, são 384,11  $\mu\text{mol}$  de equivalente Trolox por grama de extrato, e para a amostra 3 são 29,29  $\mu\text{mol}$  de equivalente Trolox por grama de amostra, com diferença significativa entre elas ( $P < 0,05$ ). Segundo Singh, et al. (2015) em um extrato de metanol de *Dendrobium denudans* a atividade do radical DPPH foi encontrada e expressa em IC50 sendo de  $153,509 \pm 3,476 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

O método FRAP (Ferric Reducing Antioxidant Power) utiliza o complexo férrico de 2,4,6-tripiridil-1,3,5-triazina, para medição de antioxidantes sendo reduzido a  $[\text{Fe}^{2+}(\text{TPTZ})_2]^{2+}$  apresentando coloração roxa. Por meio da curva de calibração com o padrão Trolox foi obtida a equação da reta ( $y = 0,0009x + 0,0762$ ) e em um  $R^2 = 0,9976$ . A partir disso, obtiveram-se os resultados expressos na Tabela 5. Uma absorbância alta significa uma elevada capacidade redutora do complexo ferroso. Assim, observa-se uma capacidade considerável de poder de redução para a amostra 1 que contém 392,20  $\mu\text{mol}$  de equivalente Trolox por grama de extrato, para a amostra 2 tem-se 448,71  $\mu\text{mol}$  de equivalente Trolox por grama de extrato, e para a amostra 3 apresentou um valor inferior, sendo 12,70  $\mu\text{mol}$  de equivalente Trolox por grama de amostra, com diferença significativa entre elas ( $P < 0,05$ ). Singh, et al., 2015 apresentou resultados para o extrato de metanol de *Dendrobium denudans* correspondendo ao valor IC50 de  $10,052 \pm 2,365 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

O método ABTS apresenta vantagem em relação aos demais pela possibilidade de utilização em amostras hidrossolúveis e lipossolúveis, além de compostos puros e extratos vegetais, baseado na captura ou estabilidade do cátion ABTS, provocando decréscimo na absorvância, lida em diferentes tempos. Os resultados foram calculados a partir da equação da reta ( $y = 0,0002x + 0,6407$ ) e  $R^2 = 0,9989$ , expressos na Tabela 5, e indicam uma captura do cátion ABTS sem diferença significativa ( $P > 0,05$ ) para a amostra 1 e 2, respectivamente, de 714,45 e 706,07  $\mu\text{mol}$  de equivalente Trolox por grama de extrato, enquanto a amostra 3 apresenta 97,03  $\mu\text{mol}$  de equivalente Trolox por gramas de amostra. Luo, et al., (2009) em uma caracterização de polissacarídeos solúveis em água, dos caules de *Dendrobium denneanum* revelou que mesmo em concentração de 2  $\mu\text{g mL}^{-1}$  seu poder de eliminação contra o radical ABTS é insuficiente, resultando em apenas 25,56 % de inibição.

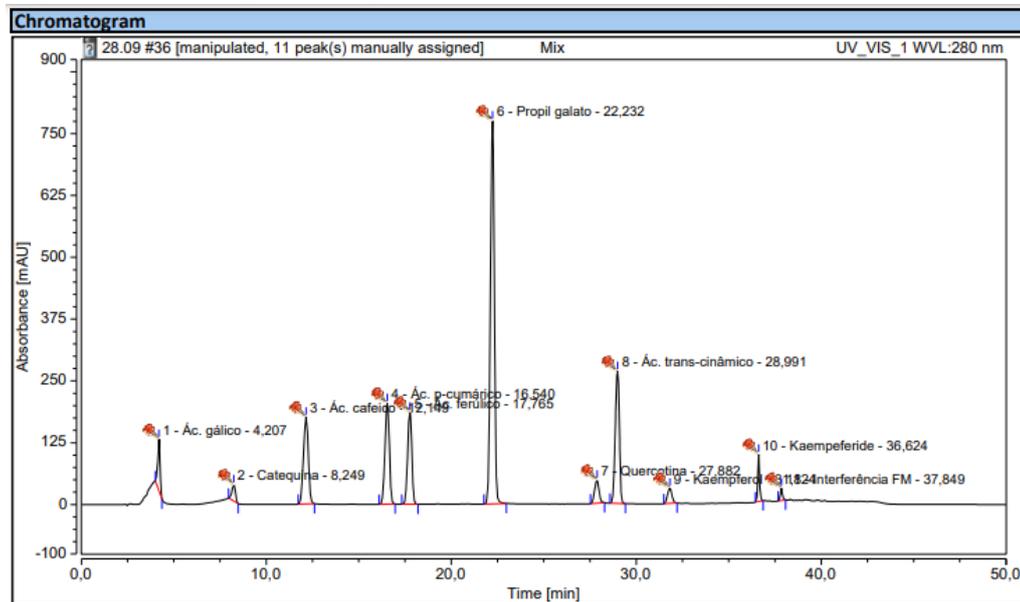
O método de determinação de compostos fenólicos por Folin-Ciocalteu se baseia na reação de oxirredução de compostos fenólicos em meio alcalino com sais de tungstato de sódio e molibdato de sódio. A partir de uma curva padrão de ácido gálico foi possível quantificar a concentração de compostos fenólicos presentes nas amostras. Como visto na Tabela 5, obteve-se a partir da equação da reta ( $y = 0,0047x + 0,0799$ ) e  $R^2 = 0,9955$ , um teor de compostos fenólicos de 35,75 mg do equivalente ácido gálico por grama de extrato para a amostra 1, e 50,42 mg EAG  $\text{g}^{-1}$  para a amostra 2, respectivamente, com diferença significativa entre elas ( $P < 0,05$ ). A amostra 3 não apresentou quantidades detectáveis de compostos fenólicos. Singh, et al., (2015) apresentou resultados de  $129,02 \pm 0,87$  mg EAG  $\text{g}^{-1}$  de compostos fenólicos em um extrato de caules de orquídea *Dendrobium denudans*, em metanol.

Os flavonoides são relacionados a várias atividades biológicas, e sua determinação é feita pela capacidade destes em quelar íons metálicos, especialmente o  $\text{Al}^{3+}$ . O padrão para obtenção da curva de calibração mais utilizado para essa análise é a quercetina. A partir da curva obteve-se a seguinte equação da reta ( $y = 0,0054x - 0,0216$ ) e  $R^2 = 0,9989$ , utilizados para o cálculo dos resultados. Observa-se na Tabela 5 que o teor de flavonoides para as amostras 1 e 2 foi de 22,93 e 29,02 mg do equivalente quercetina por grama de extrato, respectivamente, com diferença significativa entre elas ( $P < 0,05$ ). A amostra 3 não apresentou quantidades detectáveis de flavonoides. Singh, et al., (2015) apresentou também resultados de flavonoides em um extrato metanólico feito com a orquídea *Dendrobium denudans*, no qual encontrou  $108,33 \pm 1,16$  mg EQ por grama de extrato. A partir dos resultados de Singh, et al., (2015) nota-se que os caules da *Dendrobium Nobile Lindl* possuem compostos fenólicos e flavonoides.

Para as análises dos compostos bioativos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foram utilizados os padrões de ácido gálico, catequina, ácido cafeico, ácido *p*-

cumárico, ácido ferúlico, propil galato, quercetina, ácido *trans*-cinâmico, kaempferol e kaempferida (Figura 17).

Figura 17. Cromatograma dos padrões utilizados na análise por CLAE.



Singh, et al., (2015) identificou em suas amostras a rutina, ou vitamina P. No entanto, como visto na Figura 17, esse padrão não foi avaliado para comparativo de cromatogramas. Ademais, todas as amostras apresentaram os mesmos picos, sendo as amostras testadas em concentração de  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$  como demonstram as Figuras 18, 19 e 20 e em concentração de  $25 \text{ mg mL}^{-1}$  como demonstram as Figuras 21 e 22, não sendo identificados os antioxidantes dos padrões testados.

Figura 18. Cromatograma da amostra 3 ( $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ).

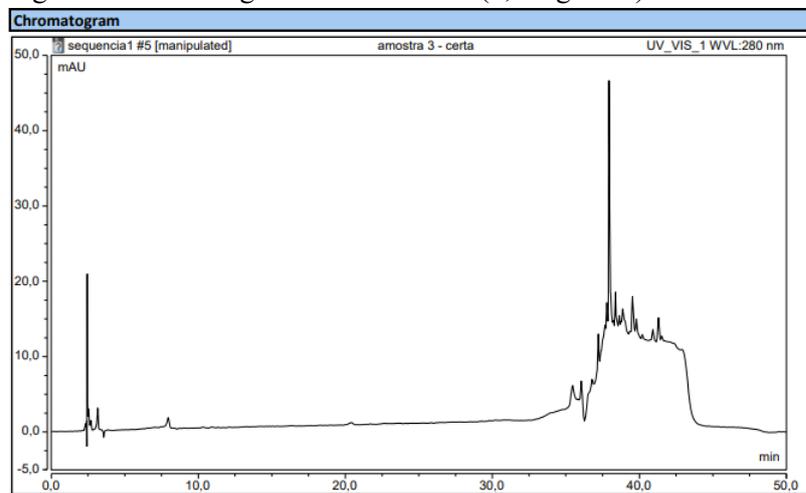


Figura 19. Cromatograma da amostra 1 (2,5 mg mL<sup>-1</sup>).

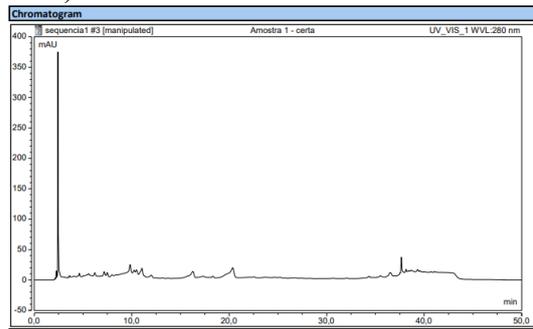


Figura 20. Cromatograma da amostra 2 (2,5 mg mL<sup>-1</sup>).

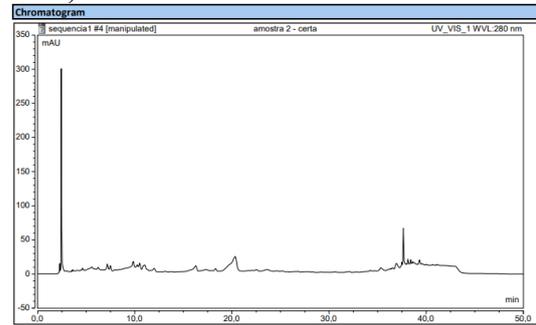


Figura 21. Cromatograma da amostra 1 (25,0 mg mL<sup>-1</sup>).

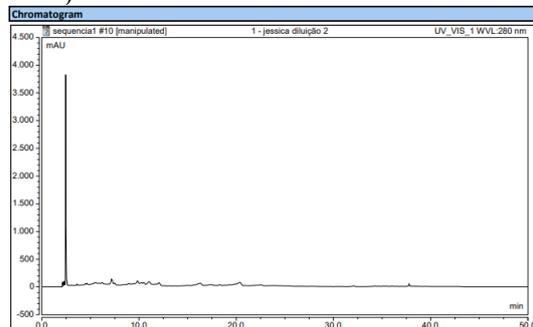
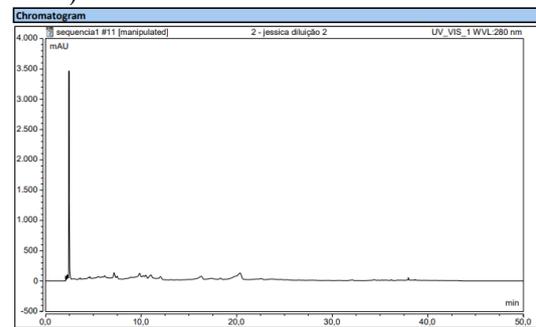


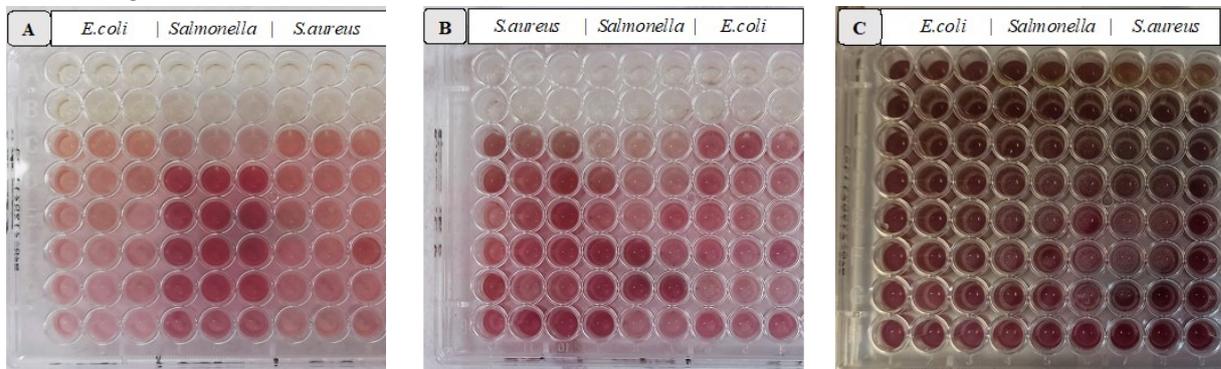
Figura 22. Cromatograma da amostra 2 (25,0 mg mL<sup>-1</sup>).



## 6.2. ANÁLISES ANTIMICROBIANAS

Para o método de CIM, foram feitos testes com *E.coli*; *Salmonella*; *S.aureus*, em triplicata. O teste é uma ótima ferramenta para analisar a susceptibilidade das amostras. A seguir na Figura 23, tem-se os resultados para as amostras 1, 2 e 3, respectivamente.

Figura 23. Resultados da CIM, sendo (A) referente a amostra 1; (B) referente a amostra 2; e (C) referente a amostra 3.



Fonte: autoria própria

Para as amostras 1 e 2, observa-se que houve inibição na primeira e segunda linha. As amostras foram utilizadas em concentração de 10,0 mg mL<sup>-1</sup>. Como foram feitas diluições seriadas, a primeira linha contém uma concentração de 5,0 mg mL<sup>-1</sup>, enquanto a segunda linha

contém uma concentração de  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ . Significando que a concentração mínima inibitória para as amostras 1 e 2 é de  $2,5 \text{ mg mL}^{-1}$ .

Já a amostra 3 foi utilizada em concentração de  $20 \text{ mg mL}^{-1}$  e observa-se a partir da Figura 25 - (C) que não se obteve nenhuma inibição em relação às bactérias utilizadas.

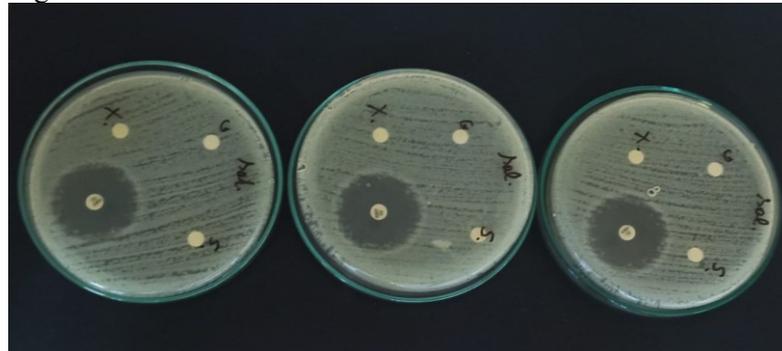
Segundo Bertolino (2015), a partir de um extrato feito da *Dendrobium sp.* pelo método Soxhlet em etanol após terem sido secadas, apresentaram 20 % de inibição. A *E. coli* foi a cepa mais resistente (CIM =  $50 \text{ mg mL}^{-1}$ ), enquanto a *C. albicans* e *P. aeruginosa* apresentaram (CIM =  $25 \text{ mg mL}^{-1}$ ), *S. aureus* (CIM =  $12,5 \text{ mg mL}^{-1}$ ), *C. dubliniensis* (CIM =  $3,1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e *C. krusei* (CIM =  $1,9 \text{ mg mL}^{-1}$ ). A ação microbicida só não ocorreu na espécie *E. faecalis*.

Houve melhor atividade antimicrobiana na orquídea *Dendrobium Nobile Lindl*, não sendo caracterizada a orquídea avaliada por Bertolino (2015). Sugere-se para a amostra 3, que não obteve inibição, testes em maiores concentrações para um comparativo.

O teste de disco difusão em ágar, consiste na formação de um halo de inibição dos microrganismos em relação a concentração da substância aplicada, no qual é feito um controle positivo, para que seja feita a comparação com as amostras.

Nas figuras 24, 25 e 26, constam os resultados para as amostras 1, 2 e 3, que estão identificadas como X, S e G, respectivamente.

Figura 24. Resultados dos halos referentes a bactéria *Salmonella*.



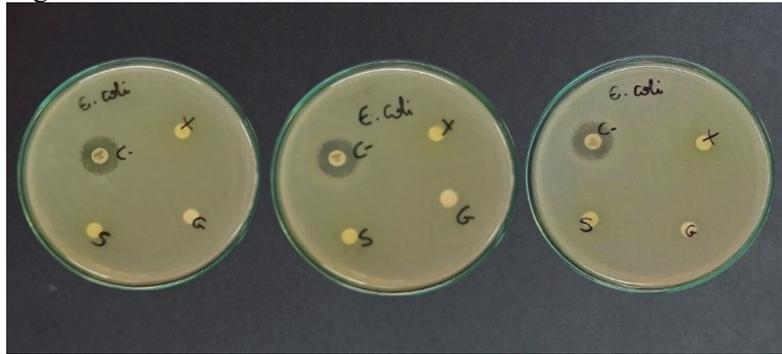
Fonte: autoria própria

Figura 25. Resultados dos halos referentes a bactéria *S. aureus*.



Fonte: autoria própria.

Figura 26. Resultados dos halos referentes a bactéria *E.coli*.



Fonte: autoria própria.

Como visto nas figuras acima, as amostras não demonstraram inibição para a *Salmonella*, *S. aureus* e *E.coli*, enquanto o controle positivo feito com a ampicilina resultou em halos de 29 mm para as triplicatas em *Salmonella*; e para *E.coli* a ampicilina inibiu em 16 mm. Para a bactéria *S.aureus* testou-se o antibiótico cefotaxima, que resultou em halos de 28 mm.

Pela determinação da CIM e por terem sido utilizadas as mesmas bactérias, as amostras resultariam em certa inibição no teste de disco-difusão, isto pode não ter ocorrido devido à quantidade aplicada nos discos ter sido insuficiente.

## 7. CONCLUSÃO

Existem estudos que comprovam as atividades antioxidantes e antimicrobianas em orquídeas, porém não a respeito da seiva da flor de orquídea. Pelos resultados obtidos, observou-se que há atividade antioxidante na seiva pelos métodos FRAP, ABTS e DPPH, embora em comparação aos extratos preparados pela flor da orquídea *Dendrobium nobile*, sua atividade antioxidante demonstrou-se mais baixa.

Para as análises de compostos fenólicos totais e flavonoides a seiva (amostra 3) não apresentou atividade, enquanto que as amostras 1 e 2 apresentaram tanto teor de compostos fenólicos como flavonoides.

Para a análise de ABTS a amostra 1 e 2 não apresentaram diferença significativa entre elas, enquanto que, para as análises de FRAP, DPPH, fenólicos e flavonoides, notou-se que a amostra 2 apresentou os maiores valores. Essa variação nos resultados pode ocorrer devido a fatores que influenciam no local coletado, como temperatura, iluminação, nutrição da planta, dentre outros, inclusive para a amostra 3, por estar mais exposta, pode ter oxidado no meio ambiente.

Em relação às análises de disco-difusão não se observou nenhum resultado significativo para as amostras analisadas, podendo ser resultado de baixa concentração no disco. No entanto, para as análises de CIM as amostras 1 e 2 inibiram em até 2,5 mg mL<sup>-1</sup>.

Embora pela análise por CLAE não tenham sido identificados os antioxidantes padrões testados, conclui-se que há atividade antioxidante para todas as amostras de orquídeas, enquanto fenólicos totais e flavonoides apenas nas amostras 1 e 2, assim como, há atividade antimicrobiana para *Salmonella*, *E.coli* e *S.aureus* para as amostras 1 e 2.

Os resultados sugerem a continuação da pesquisa por meio de outras análises, outras formas de extração, ou até outros gêneros e espécies de orquídeas, para possíveis usos destes antioxidantes em formulações estéticas e alimentares, sendo que se obteve bons resultados. Assim é possível a reduzir o uso de antioxidantes sintéticos, utilizando-se cada vez mais antioxidantes naturais.

## REFERÊNCIAS

- ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. (2008). **Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade anti-bacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras.** *Química nova*, v. 31, n. 5, p. 1224-1229. Disponível em: <[http://quimicanova.s bq.org.br/imagebank/pdf/Vol31No5\\_1224\\_51-NT07004.pdf](http://quimicanova.s bq.org.br/imagebank/pdf/Vol31No5_1224_51-NT07004.pdf)>. Acesso em: 12 JUNHO 2019.
- ALMEIDA, M.Z.; (2011). **Plantas medicinais.** *Edufba*. Disponível em: <<http://books.scielo.org/id/xf7vy/pdf/almeida-9788523212162.pdf>>. Acesso em: 05 maio 2019.
- ANDREWS, J. M. (2001). **Determination of minimum inhibitory concentrations.** *Journal of antimicrobial Chemotherapy*, 48(suppl\_1), 5-16. Acesso em: 05 maio 2019.
- BRASIL, R. R. (2014). **26 - Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos.** ANVISA. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil. Brasília, DF.* Disponível em: <[http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0026\\_13\\_05\\_2014.pdf/d6e5b9d7-dc13-46ce-bfaa-6af74e8a2703](http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/rdc0026_13_05_2014.pdf/d6e5b9d7-dc13-46ce-bfaa-6af74e8a2703)> Acesso em 12 maio 2021.
- ASSIS, A. M.; UNEMOTO, L. K.; DE FARIA, R. T.; DESTRO, D.; TAKAHASHI, L. S. A.; ROBERTO, S. R.; TOMBOLATO, A. F. C. (2011). **Adaptação de cultivares de antúrio como flor de corte em área subtropical.** *Pesquisa Agropecuária Brasileira*, 46(2), 161-166. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-204X2011000200007](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-204X2011000200007)>. Acesso em: 02 maio 2019.
- ÁVILA-DÍAZ, I.; OYAMA, K.; GÓMEZ-ALONSO, C.; & SALGADO-GARCIGLIA, R. (2009). **In vitro propagation of the endangered orchid *Laelia speciosa*.** *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 99(3), 335-343. Disponível em: <[http://images3.wikia.nocookie.net/\\_cb20100215065348/orchids/en/images/b/bf/In\\_vitro\\_propagation\\_of\\_the\\_endangered\\_orchid\\_Laelia\\_speciosa.pdf](http://images3.wikia.nocookie.net/_cb20100215065348/orchids/en/images/b/bf/In_vitro_propagation_of_the_endangered_orchid_Laelia_speciosa.pdf)>. Acesso em: 25 abr. 2019.
- ATOUI, A. K.; MANSOURI, A.; BOSKOU, G.; KEFALAS, P. (2005) **Tea and herbal infusions: Their antioxidant activity and phenolic profile.** *Food Chem.*, v.89,p. 27-36.
- BARBOSA, K. B. F.; COSTA, N. M. B.; ALFENAS, R. D. C. G.; DE PAULA, S. O.; MINIM, V. P. R.; BRESSAN, J. (2010). **Estresse oxidativo: conceito, implicações e fatores modulatórios.** *Revista de nutrição*, 23(4), 629-643. Disponível em: <[https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1415-52732010000400013](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1415-52732010000400013)> Acesso em: 21 abril 2019
- BARRETO, D.W.; PARENTE, J.P.; (2006). **Chemical properties and biological activity of a polysaccharide from *Cyrtopodium cardiochilum*.** *Carbohydrate Polymers, Barking*, 64 (2):287–291. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/221949022\\_Chemical\\_properties\\_and\\_biological\\_activity\\_of\\_a\\_polysaccharide\\_from\\_Cyrtopodium\\_cardiochilum](https://www.researchgate.net/publication/221949022_Chemical_properties_and_biological_activity_of_a_polysaccharide_from_Cyrtopodium_cardiochilum)>. Acesso em: 23 mar. 2019.

BERG, M.V.D.; (1998). **Toxic equivalency factors (TEFs) for PCBs, PCDDs, PCDFs for humans and wildlife.** *Environ Health Perspect.* 106(12), 775-792. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1533232/>>. Acesso em: 01 jun. 2019.

BERTOLINO, B. F. C.; (2015) **Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *dendrobium sp.* e *cymbidium sp.*** Disponível em: <<https://docplayer.com.br/69591371-Avaliacao-da-atividade-antimicrobiana-dos-extratos-de-dendrobium-sp-e-cymbidium-sp.html>> Acesso em: 22 abr. 2021

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. (1990) **Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta.** *Rev Nutr*, v. 12, n. 2, p. 123-30.

BRASILEIRO, B. G., PIZZIOLO, V. R., MATOS, D. S., GERMANO, A. M., & JAMAL, C. M. (2008). **Plantas medicinais utilizadas pela população atendida no " Programa de Saúde da Família", Governador Valadares, MG, Brasil.** *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 44(4), 629-636.

BOROSKI, M.; VISENTAINER, J. V.; COTTICA, S. M.; MORAIS, D. R. (2015). **ANTIOXIDANTES, Princípios e Métodos Analíticos.** Curitiba: ed. Annrís, 2015. Acesso em: 21 abr. 2019.

BOTTERWECK, A. A. M.; VERHAGEN, H.; GOLDBOEHM, R. A.; KLEINJANS, J.; (2000) **Ingestão de hidroxianisol butilado e hidroxitolueno butilado e risco de câncer de estômago: resultados de análises no Estudo de Coorte da Holanda.** *Food Chem. Toxicol.* pg 599-605. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0278691500000429>> Acesso em 21 abr. 2019

CARDOSO, P.R.; (2011). **Estruturas secretoras em plantas.** *Programa de Pós Graduação em Biodiversidade Vegetal e Meio Ambiente, São Paulo.* Disponível em: <[http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Estruturas\\_Secretoras\\_Poliana\\_Ramos\\_Cardoso.pdf](http://www.biodiversidade.pgibt.ibot.sp.gov.br/Web/pdf/Estruturas_Secretoras_Poliana_Ramos_Cardoso.pdf)>. Acesso em: 08 maio 2019.

CARRERA, G. C.; BENEDITO, E. F.; SOUZA-LEAL, T.; PEDROSO-DE-MORAES, C.; GASPI, F. O. G. (2014) **Testes fitoquímicos em extratos foliares de *Oeceoclades maculata* Lindl. (Orchidaceae).** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v. 16, n. 4, p. 938-944.

CELESTINO, M.T. (2011). **Estudo do uso racional de antioxidantes em formulações de sólidos orais.** *Rio de Janeiro. 108 p* (Doctoral dissertation, Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro). Disponível em: <<http://objdig.ufrj.br/59/teses/792017.pdf>>. Acesso em: 28 abr. 2019.

CARRERA, G.C.; (2014). **Phytochemical tests in *Oeceoclades maculata* Lindl. (Orchidaceae) leaf extracts.** *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 16(4), 938-944. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1516-05722014000400020](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-05722014000400020)>. Acesso em: 21 abr. 2019.

CRUZ, L. A. (2010) **Análise do potencial da orquídea dendrobium nobile para o uso cosmético.** Disponível em: <<https://pantheon.ufrj.br/bitstream/11422/12604/1/LACruz.pdf>> Acesso em: 20 abr. 2021.

DEGÁSPARI, C. H.; WASZCZYNSKYJ, N. (2004) **Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos.** *Visão acadêmica*, v. 5, n. 1.

FIGUEIREDO, L. D.; KOLB, R. M. (2013). **Novo substrato para o cultivo de orquídeas: estudo do seu potencial de uso em plantas de Laelia pulcherrima.** *Revista Brasileira de Biociências*, 11(4).

HUANG, D.; OU, B.; & PRIORI, RL (2005). **A química por trás dos ensaios de capacidade antioxidante.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 (6).

KARADAG, A.; OZCELIK, B.; SANER, S. (2009) **Review of Methods to Determine Antioxidant Capacities.** *Food Analytical Methods*, v. 2, n. 1, p. 41-60. ISSN 1936-9751.

Disponível em:

<[https://www.academia.edu/16084445/Review\\_of\\_Methods\\_to\\_Determine\\_Antioxidant\\_Capacities](https://www.academia.edu/16084445/Review_of_Methods_to_Determine_Antioxidant_Capacities)> Acesso em 13 abr. 2019.

KUSKOSKI, E.M.; (2005). **Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante en pulpa de frutos.** *Food Ciência and Technology*, 25 (4): 726-732. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612005000400016](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612005000400016)>. Acesso em: 21 abr. 2019.

LIMA, A. (2008). **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no Pequi.** (*Caryocar brasiliense, Camb.*). Disponível em: <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/9/9131/tde-30042008-090010/pt-br.php>>. Acesso em: 21 abr. 2019.

LIN, P. (2003) **Advances in studies on pharmacology of plants from Dendrobium Sw.** *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, v.34, p.19-22.

LIZ, R.D. (2013). **Elucidação da morfo-histodiferenciação do desenvolvimento de protocormos e estruturas semelhantes a protocormos (esps) de espécies de cattleya lindl. Micropropagadas.** Disponível em:

<<https://repositorio.ufsc.br/bitstream/handle/123456789/107524/318764.pdf?sequence=1&isAllowed=y>>. Acesso em: 20 abr. 2019.

LOPES, M.A.; NOGUEIRA, I. S.; OBICI, S.; ALBIERO, A. L. M. (2015). **Estudo das plantas medicinais, utilizadas pelos pacientes atendidos no programa “Estratégia saúde da família” em Maringá/PR/Brasil.** *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 17(4), 702-706. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v17n4s1/1516-0572-rbpm-17-4-s1-0702.pdf>>. Acesso em: 22 abr. 2019.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. (2001). **Plantas ornamentais no Brasil: arbustivas, herbáceas e trepadeiras.** [S.1]. 3. ed. Nova Odessa: Plantarum.

LUO, A.X.; HE, X.J.; ZHOU, S.D.; FAN, Y.J.; HE, T.; CHUN, Z. (2009). **In vitro antioxidant activities of a water-soluble polysaccharide derived from Dendrobium**

**nobile Lindl. extracts.** *International Journal of Biological Macromolecules*, volume 45, Issue 4, p. 359-363. Acesso em: 22 abr. 2021.

MAHENDRAN, G.; BAI, V.N.; (2008). **Mass propagation of *Satyrium Nepalense* D.Don.- A medicinal orchid via seed culture.** *Scientia Horticulturae*, 119(2), 203-207. Disponível em: <<https://kundoc.com/pdf-mass-propagation-of-satyrium-nepalense-ddona-medicinal-orchid-via-seed-culture-.html>>. Acesso em: 23 abr. 2019.

MATTIUZ C.F.M.; RODRIGUES T.J.D.; MATTIUZ B. (2006). **Aspectos fisiológicos de orquídeas cortadas.** *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental*. 12:21-30.

MELO, E.A. (2006). **Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas.** *Food Science and Technology*, 26(3), 639-644. Disponível em: <<https://www.redalyc.org/html/3959/395940079024/>>. Acesso em: 21 abr. 2019.

NASCIMENTO, J.C. LAGE, L. F. O.; CAMARGOS, C. R. D.; AMARAL, J. C.; COSTA, L. M.; SOUSA, A. N.; OLIVEIRA, F. Q. (2011). **Antioxidant determination activity by DPPH method and assay for total flavonoids in leaves extracts of *Bauhinia variegata* L.** *Rev. Bras. Farm*, 92, 327-332. Disponível em: <<http://www.rbfarma.org.br/files/rbf-2011-92-4-14-327-332.pdf>>. Acesso em: 26 abr. 2019.

NOGUEIRA, R.E. (2004). **Fungos micorrízicos associados a orquídeas em campos rupestres na região do Quadrilátero Ferrífero, MG, Brasil.** *Acta Botanica Brasílica*, 19(3), 417-424. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/0D/abb/v19n3/27355.pdf>>. Acesso em: 19 abr. 2019.

OLIVEIRA, A. C.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F. **Fontes vegetais naturais de antioxidantes.** *Química nova*, São Paulo, v.32, n. 3, p.689-702, 2009.

OLIVEIRA, G.L.S. (2015). **Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH: estudo de revisão.** *Rev. bras. plantas med*, 36-44. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbpm/v17n1/1983-084X-rbpm-17-01-00036.pdf>>. Acesso em: 10 abr. 2019.

ORQUIDÁRIO, Orquidário Uel. (1997). **Estrutura da flor de orquídea.** Disponível em: <<http://www.orquidariouel.com.br/2017/02/estrutura-da-flor-de-orquidea.html>>. Acesso em: 19 maio 2019.

PACIFICO, S.; D'ABROSCA, B.; GOLINO, A.; (2007). **Antioxidant evaluation of polyhydroxylated nerolidols from redroot pigweed (*Amaranthus retroflexus*) leaves.** *LWT-Food Science and Technology*, 41(9), 1665-1671. Disponível em: <[https://www.academia.edu/13513206/Antioxidant\\_evaluation\\_of\\_polyhydroxylated\\_nerolidols\\_from\\_redroot\\_pigweed\\_Amaranthus\\_retroflexus\\_leaves](https://www.academia.edu/13513206/Antioxidant_evaluation_of_polyhydroxylated_nerolidols_from_redroot_pigweed_Amaranthus_retroflexus_leaves)>. Acesso em: 28 abr. 2019.

PEREIRA, O.L.; (2005). **Indução in vitro da germinação de sementes de *Oncidium flexuosum* (orchidaceae) por fungos micorrízicos rizoctonióides.** *Revista Brasileira de Ciência do Solo*, 29(2), 199-206. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcs/v29n2/24156.pdf>>. Acesso em: 01 jun. 2019.

PETERSON, R.L.; HUGUES, B.M.; LEWIS, H.M.; (2004). **Mycorrhizas: Anatomy and Cell Biology**. *NRC Research Press*. Disponível em: <<https://www.emphhttps://issuu.com/anac.ponticelli/docs/99848561-mycorrhizasorioidasorquideas.com.br/laelia->>. Acesso em: 05 jun. 2019.

RAFECAS, M.; GUARDIOLA, F.; ILLERA, M.; CODONY, R.; BOATELLA, J. (1998). **Liquid Chromatographic determination of phenolic antioxidants in bakery products**. *Journal of Chromatography. A*, v.822, p. 305 – 309. Acesso em: 03 jun 2019.

RAMALHO, A. C.; JORGE, N.; (2006) **Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos**. *Química Nova*, 755-760. Disponível em: <[https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422006000400023](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422006000400023)> Acesso em: 18 abr. 21.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A. YANG, M.; EVANS, C. R.; (1999). **Antioxidant activities applying and improved ABTS radical cation decolorization assay**. *Free Radical Biology and Medicine*, 26 (9-10) 1231-1237.

ROCHEL, T.C. (2015). **Determinação e avaliação da atividade antioxidante em polpas de frutas de açaí, acerola e cupuaçu**. *Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Tecnológica Federal do Paraná*. Disponível em: <[http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/5314/1/LD\\_COALM\\_2015\\_2\\_05.pdf](http://repositorio.roca.utfpr.edu.br/jspui/bitstream/1/5314/1/LD_COALM_2015_2_05.pdf)>. Acesso em: 21 abr. 2019.

ROSA, C. DA; CÂMARA, S. G.; BÉRIA, J. U. (2011). **Representações e intenção de uso da Fitoterapia na atenção básica à saúde**. *Ciência & Saúde Coletiva*, v. 16, n. 1, p. 311-318. Disponível em: <[https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1413-81232011000100033](https://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1413-81232011000100033)> Acesso em 02 jun. 2019.

ROSA, Y.B.C.J.; RAMOS, F. Z.; SOUZA, R. G. (2014). **Influência da luminosidade no crescimento e floração de Dendrobium nobile Lindl**. *Revista Brasileira de Horticultura Ornamental 20(1)*. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/275336850\\_Influencia\\_da\\_luminosidade\\_no\\_crescimento\\_e\\_floracao\\_de\\_Dendrobium\\_nobile\\_Lindl](https://www.researchgate.net/publication/275336850_Influencia_da_luminosidade_no_crescimento_e_floracao_de_Dendrobium_nobile_Lindl)>. Acesso em: 04 jun. 2019.

RUFINO, M.S.M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. D. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. (2006). **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pelo Método de Redução do Ferro (FRAP)**. *Embrapa Agroindústria Tropical-Comunicado Técnico (INFOTECA-E)*. Disponível em: <[http://www.cnpat.embrapa.br/cd/jss/acervo/Ct\\_125.pdf](http://www.cnpat.embrapa.br/cd/jss/acervo/Ct_125.pdf)>. Acesso em: 23 mar. 2019.

SALVADOR, A. A. (2014) **Atividade antioxidante e perfil de ácidos graxos de extratos da torta de noz pecã (carya illinoensis) obtidos por extração supercrítica**. Disponível em: <[https://www.researchgate.net/publication/319990317\\_Atividade\\_antioxidante\\_e\\_perfil\\_de\\_acidos\\_graxos\\_de\\_extratos\\_da\\_torta\\_de\\_noz\\_pecã\\_Carya\\_illinoensis\\_obtidos\\_por\\_extração\\_supercritica/link/59c54d32458515548f28c22a/download](https://www.researchgate.net/publication/319990317_Atividade_antioxidante_e_perfil_de_acidos_graxos_de_extratos_da_torta_de_noz_pecã_Carya_illinoensis_obtidos_por_extração_supercritica/link/59c54d32458515548f28c22a/download)> Acesso em: 20 abril 2019

- SCHUSTER, R.; ZEINDL, L.; HOLZER, W.; KHUMPIRAPANG, N.; et al., (2017). **Eulophia macrobulbon—an orchid with significant anti-inflammatory and antioxidant effect and anticancerogenic potential exerted by its root extract.** *Phytomedicine*, 24, 157-165.
- SENEVIRATHNE, M.; KIM, S. H.; SIRIWARDHANA, N.; HA, J. H.; LEE, K. W.; JEON, Y. J. (2006). **Antioxidant potential of ecklonia cavaon reactive oxygen species scavenging, metal chelating, reducing power and lipid peroxidation inhibition.** *Food science and technology international*, 12(1), 27-38.
- SEJAS, L. M.; SILBERT, S.; REIS, A. O.; & SADER, H. S. (2003). **Avaliação da qualidade dos discos com antimicrobianos para testes de disco-difusão disponíveis comercialmente no Brasil.** *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*, 39(1), 27-35.
- SILVA, A. G.; BOLDRINI, R. F.; KUSTER, R. M. (2013). **Os sumarés cicatrizantes da medicina tradicional brasileira, ou, as surpresas químicas ativas do desconhecido gênero *Cyrtopodium* (Orchidaceae).** *Natureza on line*, 11, 152-154.
- SILVA, E.F. (2003). **Multiplicação e crescimento in vitro de orquídea *Brassocattleya pastoral* x *Laeliocattleya amber glow*.** *Tese de Doutorado. Tese de Mestrado, Universidade Federal de Lavras, Lavras.* Disponível em: <[http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/4220/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O\\_Multiplicaca%C3%A7%C3%A3o%20e%20crescimento%20in%20vitro%20de%20orqu%C3%ADdea%20Brassocattleya%20Pastoral%20x%20Laeliocattleya%20Amber%20Glow.pdf](http://repositorio.ufla.br/jspui/bitstream/1/4220/1/DISSERTA%C3%87%C3%83O_Multiplicaca%C3%A7%C3%A3o%20e%20crescimento%20in%20vitro%20de%20orqu%C3%ADdea%20Brassocattleya%20Pastoral%20x%20Laeliocattleya%20Amber%20Glow.pdf)>. Acesso em: 20 abr. 2019.
- SILVA, M.L.C.; COSTA, R.S.; SANTANA, A.S. (2010). **Phenolic compounds, carotenoids and antioxidant activity in plant products.** *Semina: Ciências Agrárias*, 31(3), 669-682. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semagrarias/article/viewFile/6510/5926>>. Acesso em: 13 maio 2019.
- SILVA, A. G. (1990). **Osmóforos: retrospectiva dos últimos 20 anos de pesquisa.** *Rodriguésia*, v. 42, n. 68-70, p. 7-20.
- SINGH, C. B.; DEVI, M. C.; THOKCHOM, D. S.; SENGUPTA, M.; SINGH, A. K.; **Phytochemical screening, estimation of total phenols, total flavonoids and determination of antioxidant activity in the methanol extract of *Dendrobium denudans*.** *D. Don stems. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 4(4):06-11, 2015. Acesso em: 21 abr. 2021.
- SOARES, J. S., ROSA, Y. B. C. J., SUZUKI, R. M., SCALON, S. P. Q., & ROSA JUNIOR, E. J. (2012). **Germinação assimbiótica e desenvolvimento de *Dendrobium nobile* Lindl. sob efeito de reguladores vegetais no tratamento pré-germinativo.** *Revista Brasileira de Plantas Medicinai*s, 14(4), 617-623.
- SOARES, S. E. (2002). **Ácidos fenólicos como antioxidantes Phenolic acids as antioxidants.** *Revista de Nutrição*, 15(1), 71-81. Disponível em: <[https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-52732002000100008&script=sci\\_arttext&tlng=pt](https://www.scielo.br/scielo.php?pid=S1415-52732002000100008&script=sci_arttext&tlng=pt)> Acesso em: 02 jun. 2019

SOUSA, C.M.M.; (2007). **Total phenolics and antioxidant activity of five medicinal plants.** *Quimica Nova*, 30(2), 351-355. Disponível em: <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422007000200021](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000200021)>. Acesso em: 20 abr. 2019.

STANCATO, G.C.; BEMELMANS, P.F.; VEGRO, C.L.R.; (2001). **Produção de mudas de orquídeas a partir de sementes in vitro e sua viabilidade econômica: estudo de caso.** *Ornamental Horticulture*, 7(1). Disponível em: <<https://ornamentalthorticulture.emnuvens.com.br/rbho/article/download/74/17>>. Acesso em: 19 abr. 2019.

STPICZYNSKA, M. (1993) **Anatomy and ultrastructure of osmophores of Cymbidium tracyanum Rolfe (Orchidaceae).** *Acta Soc. Bot. Polomiae*, 62: 5-9.

ZENEON, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P. (2008). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos.** Instituto Adolfo Lutz – São Paulo, 1º Ed. Digital.