



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA**

**Laboratório de Produtos Naturais e Espectroscopia**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**ESTUDO QUÍMICO, ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL E  
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E  
ANTIBACTERIANA DO Marmelhinho [*Cordia sessilis*  
(Vell.) Kuntze (Rubiaceae)].**

**BRUNNO BORGES CANELHAS**

**UBERLÂNDIA – MG**

**JULHO DE 2012**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO QUÍMICA**

**Laboratório de Produtos Naturais e Espectroscopia**

**ESTUDO QUÍMICO, ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL E  
AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E  
ANTIBACTERIANA DO Marmelhinho [*Cordia sessilis*  
(Vell.) Kuntze (Rubiaceae)].**

**BRUNNO BORGES CANELHAS**

**Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-graduação em  
Química da Universidade Federal  
de Uberlândia, como requisito  
parcial para obtenção do título de  
Mestre em Química.**

**Orientador: Prof. Dr. Francisco J. T. de Aquino**

**Co-Orientador: Prof. Dr. Alberto de Oliveira**

**UBERLÂNDIA – MG**

**JULHO DE 2012**



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia  
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 146/COPGQ.

DATA: 06/07/2012

DISCENTE: Brunno Borges Canelhas

MATRÍCULA: 11012QMI001

TÍTULO DO TRABALHO: Estudo químico, análise do óleo essencial, atividades antioxidante e antibacteriana da espécie *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze, (Marmelinho).

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Química dos Produtos Naturais

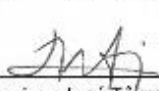
PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Estudo químico, análise do óleo essencial, atividade antioxidante e antibacteriana da espécie *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze, (Marmelinho).

Às treze horas e trinta minutos do dia seis de julho do ano dois mil e doze, no Auditório B do Bloco 50, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Antônio Eduardo Miller Crotti, da Universidade de Franca, Welington de Oliveira Cruz, do Instituto de Química da UFU e Francisco José Tôrres de Aquino, professor orientador e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa apresentou o candidato e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 01/2010/COPGQ. Em seguida, o presidente da mesa concedeu a palavra ao candidato para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o apresentador. A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e A provou o candidato. Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será ESTUDO QUÍMICO, ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL E AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIBACTERIANA DO MARMELINHO (CORDIA SESSILIS (VELL.) KUNTZE (RUBIACEAE))

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 17 horas e 00 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

  
Prof. Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti –  
UNIFRAN

  
Prof. Dr. Welington de Oliveira Cruz – IQUFU

  
Orientador: Prof. Dr. Francisco José Tôrres de Aquino – IQUFU

Dedico este trabalho ao autor e consumidor de minha fé, JESUS CRISTO, o filho de DEUS. Que padeceu na cruz levando consigo todos os meus pecados, mas ressuscitou ao terceiro dia para que eu tivesse vida e vida em abundância. "Nada pode me separar do amor de DEUS"

## AGRADECIMENTOS

- Primeiramente a DEUS, pela força, paz, saúde e certeza de que sempre esteve, e sempre estará comigo em todos os momentos da minha vida.
- A minha amada namorada (futura esposa) Carol. Simplesmente TE AMO. Obrigado por todo amor, carinho, compreensão, companheirismo e paciência. Muito obrigado.
- Aos meus pais, Carlos e Maria das Graças, muito obrigado pelo imenso amor, pela gigantesca paciência e por todas as orações. Sem vocês nada seria possível.
- A minha irmã Roberta, pelo constante apoio e incentivo.
- A minha família que sempre esteve ao meu lado em todos os momentos. Em especial a minha querida avó Maria. Desculpe pela ausência. A senhora é o alicerce de nossa família. Muito obrigado pelo apoio do meu sogro, minha sogra, meus cunhados, minhas tias, tios, primos, primas, sempre com muita paciência, apoio e amor. Obrigado pelas orações. Agradeço a DEUS pela vida de todos.
- Ao prof. Dr. Francisco J. T. de Aquino, meu orientador. A sua grandeza de professor e pesquisador me incentivou a melhorar cada vez mais. Muito obrigado por todos os conselhos e dicas. Agradeço muito por ser seu orientado e saiba que você muito contribuiu e contribui para minha formação profissional e humana. Desculpe por qualquer inconveniente que possa ter passado por mim. Obrigado pela oportunidade concedida de fazer parte do seu grupo e pela confiança depositada em meu trabalho.
- A prof. Dr. Alberto de Oliveira, meu co-orientador, tenho somente a lhe agradecer pelas sugestões, ensinamentos e amizade.
- Aos professores Dr. Sergio A. L. de Moraes, prof. Dr. Evandro A. do Nascimento e prof. Dr. Roberto Chang, por suas contribuições para o desenvolvimento desse trabalho.
- Ao laboratório de pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca – LaPeMa, pelas análises de atividade antimicrobiana que foram realizadas com a autorização e supervisão do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.
- Um agradecimento especial ao amigo, ou melhor, ao irmão Luisinho. Nada seria possível sem a sua ajuda e participação de você. Serei eternamente grato a você por essa conquista. Agradeço a DEUS por sua vida e peço que DEUS lhes dê tudo que almeja em seu coração, pois você merece muito. MUITO OBRIGADO.

- Gostaria muito de agradecer ao meu amigo-irmão Deusmaque, que em todos os momentos esteve ao meu lado, incentivando, ajudando e aconselhando. Muito obrigado por tudo. Sem a sua colaboração esse momento nunca teria chegado.
- Aos meus amigos de laboratório, amigos que agradeço a DEUS por estarem ao meu lado: Carla, Mário, Edmilson, Cassiana, Gabriela e Raquel.
- Aos alunos de iniciação científica: Laís, Trícia, Ítalo e Fernanda. Muito obrigado por tudo. Essa vitória é nossa.
- À Mayta Peixoto, secretária do Programa de Pós-Graduação em Química, sempre disponível a me auxiliar.
- Aos amigos da Uniube, em especial, ao Sebastião, Alexandre, Chadu, Wílson, Otaviano, Tony, pelo apoio, sugestões, incentivo, companheirismo e amizade.
- Aos meus grandes amigos, em especial, Samuel, Harley, Marcelo, Ivair, Carlos Alberto, André, Wesley, Marinho. Vocês fazem parte dessa vitória.
- Aos membros da banca pelo aceite na participação e pelas valiosas contribuições no aprimoramento desse trabalho.
- A todos vocês e a tantos outros que de alguma forma participaram da realização deste trabalho, o meu muitíssimo obrigado e que DEUS abençoe ricamente a todos!

“Não to mandei eu? Esforça-te e tem bom ânimo; não pases, nem te espantes, porque o SENHOR, teu DEUS, é contigo, por onde quer que andares.”

JOSUÉ 1:9

BÍBLIA SAGRADA

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE FIGURAS.....</b>	<b>ii</b>
<b>LISTA DE TABELAS.....</b>	<b>iv</b>
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....</b>	<b>vi</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>vii</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>ix</b>
<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
1.1 O CERRADO BRASILEIRO.....	1
1.2 A ESPÉCIE <i>Cordia sessilis</i> (Vell) Kuntze.....	1
1.3 PLANTAS MEDICINAIS E SEUS USOS.....	3
1.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA.....	6
1.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS DO CERRADO.....	8
1.6 MICRO-ORGANISMOS BUCAIS.....	10
1.7 EXTRATOS E ÓLEOS DE PLANTAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A MICRO-ORGANISMOS BUCAIS.....	13
<b>2 JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>18</b>
<b>3 OBJETIVOS.....</b>	<b>19</b>
3.1 OBJETIVOS GERAIS.....	19
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	19
<b>4 METODOLOGIA.....</b>	<b>20</b>
4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES.....	21
4.2 COLETA E PRERARO DO MATERIAL VEGETAL.....	23
4.3 ANÁLISES QUÍMICAS.....	23
4.3.1 Obtenção dos extratos brutos etanólicos por maceração das folhas, cascas e madeira de <i>Cordia sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	24
4.3.2 Obtenção dos extratos por partição líquido-líquido das folhas e cascas de <i>Cordia sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	24
4.3.3 Determinação do teor de umidade.....	25
4.3.4 Determinação dos constituintes químicos macromoleculares da casca e madeira de <i>Cordia sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	25
4.3.4.1 Determinação do teor de Cinzas (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 1985).....	25
4.3.4.2 Preparação da madeira e cascas livre de extrativos.....	25



4.3.4.3 Tratamento Alcalino para Extração dos Ácidos Fenólicos da madeira e Cascas.....	26
4.3.4.4 Determinação da Lignina insolúvel (Lignina de Klason).....	26
4.3.4.5 Determinação da Lignina solúvel.....	27
4.3.4.6 Determinação da Holocelulose.....	28
4.3.5 Extração de óleo essencial por hidrodestilação.....	28
4.3.5.1 Separação e identificação dos compostos voláteis por cromatografia gasosa acoplada ao espectro de massas (CG-EM).....	30
4.3.6 Identificação qualitativa dos metabólitos secundários presentes no extrato etanólico das folhas, cascas e madeira de <i>C. Sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	30
4.3.6.1 Reagentes e soluções específicas.....	30
4.3.6.2 Ensaios de identificação.....	31
4.3.6.2.1 Teste para Fenóis e Taninos.....	31
4.3.6.2.2 Teste para Antocianinas, Antocianidinas, Flavonóides, Chalconas e Auronas.....	32
4.3.6.2.3 Teste para Esteroides e Triterpénoides.....	32
4.3.6.2.4 Teste para Saponinas.....	33
4.3.6.2.5 Teste de confirmação para Saponinas.....	33
4.3.7 Avaliação da atividade antioxidante.....	33
4.3.7.1 Determinação de Fenóis totais.....	33
4.3.7.2 Determinação de Taninos condensados (Proantocianidinas).....	34
4.3.7.3 Análise quantitativa da atividade antioxidante (Método DPPH).....	34
4.3.7.3.1 Construção da curva de calibração do DPPH.....	35
4.3.7.3.2 Leitura das medidas de absorvância nas amostras.....	35
4.3.8 Atividade Antibacteriana.....	36
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>37</b>
5.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE.....	37
5.2 DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS MACROMOLECULARES DA CASCA E MADEIRA DE <i>C. Sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	38
5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES VOLÁTEIS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS POR CG-EM.....	39
5.4 IDENTIFICAÇÃO QUALITATIVA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS,	

CASCAS E MADEIRA DA <i>Cordia sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	48
5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	50
5.5.1 Preparação dos extratos em etanol e partição líquido-líquido.....	50
5.5.2 Determinação do teor de fenóis totais (FT).....	51
5.5.3 Determinação de proantocianidinas.....	53
5.5.4 Atividade antioxidante e cálculo do CE <sub>50</sub> .....	55
5.5.4.1 Atividade antioxidante para o extrato etanólico bruto e partição das folhas de <i>Cordia sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	57
5.5.4.2 Extrato etanólico bruto e partições das cascas de <i>C. sessilis</i> (Vell.) Kuntze.	60
5.5.4.3 Extrato etanólico bruto da madeira de <i>Cordia sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	62
5.6 ATIVIDADE ANTIBACTERIANA.....	65
<b>6 CONCLUSÕES.....</b>	<b>71</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>73</b>
<b>APÊNDICE A.....</b>	<b>84</b>
METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE	
ANTIBACTERIANA.....	84

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Imagem da <i>Cordia sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	2
Figura 2: Imagem do fruto verde da <i>Cordia sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	2
Figura 3: Aspectos morfológicos do fruto maduro de <i>C. sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	3
Figura 4: Estrutura química das antocianinas.....	7
Figura 5: Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.....	8
Figura 6: Estruturas químicas do Timol (a), do Carvacrol (b), da Carvona (c) e do Mentol (d).....	9
Figura 7: Estrutura química da (-) Cubebina (a) e (-)-hinoquinina (b).....	16
Figura 8: Estrutura química do BHT.....	17
Figura 9: Fluxograma para a análise química de madeiras, cascas e folhas utilizada neste trabalho.....	20
Figura 10: Fluxograma para identificação dos componentes voláteis do óleo essencial das folhas de <i>Cordia sessilis</i> (Vell.) Kuntze utilizado neste trabalho.....	21
Figura 11: Imagem da montagem de aparelho Extrator Soxhlet utilizado neste estudo para extração contínua.....	26
Figura 12: Imagem da montagem do aparelho de Cleavenger modificado utilizado nesse estudo.....	29
Figura 13: Cromatograma de CG-EM do óleo essencial das folhas de <i>C. sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	40
Figura 14: Estruturas químicas do Linalol (a), $\alpha$ -Terpineol (b), do Fitol (c), do (E)-Geraniol (d), do Ácido n-Hexadecanóico (e) e do Ácido Linolênico (f).....	43
Figura 15: Cromatogramas de CG-EM do óleo essencial das cascas de <i>C. sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	44
Figura 16: Estrutura química do Ácido Octadeca-9,12-dienóico.....	46
Figura 17: Cromatograma de CG-EM do óleo essencial da madeira de <i>C. Sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	46
Figura 18: Estruturas químicas do n-Nonadecanol (a) e do <i>trans</i> -Cariofileno (b)....	48
Figura 19: Reação típica do ácido gálico com o íon molibdênio presente no	

reagente de Folin.....	51
Figura 20: Curva de calibração para determinação espectrofotométrica de fenóis totais (Método Folin-Ciocalteu).....	52
Figura 21: Reação da vanilina com o anel A da proantocianidina.....	54
Figura 22: Curva de calibração para determinação espectrofotométrica de proantocianidinas (Método da Vanilina).....	54
Figura 23: Estrutura química do radical livre DPPH <sup>•</sup> .....	56
Figura 24: Reação típica do radical livre DPPH <sup>•</sup> com os compostos fenólicos.....	56
Figura 25: Curva de calibração para determinação espectrofotométrica da atividade antioxidante (Método DPPH <sup>•</sup> ).....	57
Figura 26: Gráfico típico do consumo de DPPH <sup>•</sup> em função das diferentes concentrações do extrato das folhas de <i>C. sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	58
Figura 27: Gráfico do comportamento cinético da atividade antioxidante do extrato bruto (a) e partições (b-e) das folhas de <i>C. sessilis</i> (Vell.) Kuntze em diferentes concentrações.....	59
Figura 28: Gráfico típico do consumo de DPPH <sup>•</sup> em função das diferentes concentrações do extrato etanólico bruto das cascas de <i>C. sessilis</i> (Vell.) Kuntze...	61
Figura 29: Gráfico do comportamento cinético da atividade antioxidante do extrato bruto (a) e partições (b-c) das cascas de <i>C. sessilis</i> (Vell.) Kuntze em diferentes concentrações.....	61
Figura 30: Curva de calibração para determinação espectrofotométrica da atividade antioxidante do extrato etanólico da madeira (Método DPPH <sup>•</sup> ).....	62
Figura 31: Gráfico do consumo de DPPH <sup>•</sup> em função das diferentes concentrações do extrato etanólico bruto da madeira de <i>C. sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	63
Figura 32: Gráfico da atividade antioxidante em função do tempo do extrato etanólico bruto da madeira de <i>C. sessilis</i> (Vell.) Kuntze em diferentes concentrações.....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Padrões de mudança de cor para os testes qualitativos (MATOS, 1997).....	32
Tabela 2: Rendimentos dos extratos etanólicos estudados.....	37
Tabela 3: Rendimento das extrações da madeira e casca.....	37
Tabela 4: Rendimento (%) das extrações da casca e madeira.....	38
Tabela 5: Constituintes químicos macromoleculares (%) da casca e da madeira da <i>Cordia sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	39
Tabela 6: Rendimentos dos óleos essenciais de <i>C. Sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	40
Tabela 7: Principais constituintes voláteis identificados no óleo das folhas da <i>Cordia sessilis</i> (Vell.) Kuntze por CG-EM.....	41
Tabela 8: Principais constituintes voláteis identificados no óleo das cascas da <i>Cordia sessilis</i> (Vell.) Kuntze por CG-EM.....	44
Tabela 9: Principais constituintes voláteis identificados no óleo da madeira da <i>Cordia sessilis</i> (Vell.) Kuntze por CG-EM.....	46
Tabela 10: Identificação qualitativa dos metabólitos secundários do extrato etanólico da folha, casca e madeira da <i>C. sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	49
Tabela 11: Teor de fenóis totais para o extrato das folhas e cascas de <i>C. sessilis</i> (Vell.) Kuntze em comparação com resultados para outras plantas do cerrado.....	52
Tabela 12: Teor de proantocianidinas para os extratos etanólicos das folhas e cascas de <i>C. sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	55
Tabela 13: Valores de CE <sub>50</sub> para extrato etanólico e partições para extrato bruto e partições das folhas de <i>C. sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	60
Tabela 14: Valores de CE <sub>50</sub> para extrato etanólico bruto (a) e partições (b-c) das cascas de <i>C. sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	62
Tabela 15: Resultados das análises realizadas para o extrato etanólico bruto da madeira de <i>C. sessilis</i> (Vell.) Kuntze.....	64
Tabela 16: Valores de CE <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> ) para extrato etanólico bruto e partições da <i>Cordia sessilis</i> (Vell.)Kuntze e comparação com <i>K. coreaceae</i> outro vegetal do Cerrado já estudado.....	64
Tabela 17: Resultados das concentrações inibitórias mínimas para as partições das folhas de <i>C. sessilis</i> (Vell.) Kuntze frente às bactérias aeróbias.....	65

Tabela 18: Resultados das concentrações inibitórias mínimas para os extratos das cascas de <i>C. sessilis</i> (Vell.) Kuntze frente às bactérias aeróbias.....	66
Tabela 19: Resultados das concentrações inibitórias mínimas para os extratos das folhas de <i>C. sessilis</i> (Vell.) Kuntze frente às bactérias anaeróbias.....	67
Tabela 20: Resultados das concentrações inibitórias mínimas para os extratos das cascas de <i>C. sessilis</i> (Vell.) Kuntze frente às bactérias anaeróbias.....	68
Tabela 21: Valores comparativos de CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de extratos de folhas e cascas da <i>Cordia sessilis</i> (Vell.) Kuntze e de outro vegetal de estudo do grupo de pesquisa frente ao microrganismo aeróbio <i>Streptococcus mitis</i> .....	68
Tabela 22: Valores comparativos de CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de folhas e cascas da <i>Cordia sessilis</i> (Vell.) Kuntze e de outros vegetais de estudo do grupo de pesquisa frente ao microrganismo aeróbio <i>Streptococcus mutans</i> .....	69
Tabela 23: Valores comparativos de CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de folhas e cascas da <i>Cordia sessilis</i> (Vell.) Kuntze e de outros vegetais de estudo do grupo de pesquisa frente ao microrganismo aeróbio <i>Streptococcus sanguinis</i> .....	69

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

**ANVISA** – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

**ATCC** – (do inglês) “*American Type Culture Collection*”

**CE<sub>50</sub>** – Concentração efetiva média, concentração de amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais DPPH<sup>•</sup>

**BHT** - Butil-hidroxi-tolueno

**CG/EM** – Cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas

**CIM** – Concentração inibitória mínima

**CLSI** – (do inglês) “*Clinical and Laboratory Standards Institute*”

**DMSO** – Dimetilsulfóxido

**DPPH<sup>•</sup>** – Radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

**EAG** – Equivalentes de ácido gálico

**ECAT** – Equivalentes de catequina

**ed** - Edição

**GTFs** – Glicosiltransferases

**IgA** – Imunoglobulina A

**IgG** – Imunoglobulina G

**INMETRO** – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental

**MA** – Extrato metanol-água

**MIC** – Microdiluição em caldo

**OMS** – Organização Mundial de Saúde

**Part.** - Partição

**PEC** – Polissacarídeos extracelulares

**TSB** – Caldo triptona soja

**v v<sup>-1</sup>** – Relação volume / volume

**° C** – Graus Celsius

**λ** - comprimento de onda

## RESUMO

Neste trabalho foi realizada a análise química, a identificação dos componentes voláteis, a determinação da atividade antioxidante e da atividade antibacteriana da madeira, cascas e folhas de *Cordia sessilis* (Vell) Kuntze, mais conhecida como Marmelinho. Este estudo justifica-se pois à análise química da espécie *Cordia sessilis* (Vell) Kuntze não havia sido estudada até este momento. Extratos etanólicos de folhas, cascas e madeira foram preparados e submetidos a análise química, buscando identificar, quantificar e, conseqüentemente, determinar a aplicabilidade do vegetal em uso medicinal. As porcentagens obtidas para os constituintes macromoleculares da casca e madeira estão dentro da faixa de aceitação para as árvores folhosas. O teor de lignina de Klason encontrado foi de 28,55 % e 24,00 %, de holocelulose foi de 20,0 % e 72,0 % para cascas e madeira, respectivamente. Este trabalho apresenta a primeira identificação por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) do óleo essencial das folhas, cascas e madeira. Foram identificados 31 componentes para as folhas, na sua maioria ácidos orgânicos, totalizando 46 % do óleo, destacando-se o Ácido *n*-Hexadecanóico (24,73 %) e o Ácido Linolênico (6,91 %). O Linalol,  $\alpha$ -Terpineol, (*E*)-Geraniol e Fitol foram os únicos monoterpenos e diterpenos oxigenados encontrados respectivamente, representando 5,84 % do total do óleo. Ainda destacam-se os alcoóis de cadeia curta (como o Ciclohex-4-en-1-ol, o Hex-3-en-1-ol, Hex-2-en-1-ol, 1-Hex-1-anol), totalizando 23 % do total do óleo; e os aldeídos (como o (*E*)-2-Hex-2-enal (5,31 %)), totalizando 12 % do total do óleo. Para as cascas temos identificados 18 componentes, na sua maioria ácidos graxos de cadeia longa, totalizando 88,4 % do óleo, destacando-se o Ácido Hexadecanóico (40,11 %) e o Ácido Octadecadienóico (33,2 %). Na madeira foram identificados 18 componentes, temos outra vez a predominância de ácidos graxos de cadeia longa, destacando-se o Ácido Hexadecanóico (32,23 %) e o Ácido *n*-Nonadecanóico (18,53 %), sendo que desta vez foi encontrado o sesquiterpeno *trans*-Cariofileno (0,72 %). Pela análise do teor de fenóis totais através do método Folin-Ciocalteu encontramos  $42,12 \pm 0,93$  mg g<sup>-1</sup> de amostra para as folhas e  $35,23 \pm 0,46$  mg g<sup>-1</sup> de amostra para as cascas. O teor de proantocianidinas encontrado pelo método da Vanilina foi de  $133,6 \pm 0,021$  mg de ECAT g<sup>-1</sup> de amostra para as folhas e de  $111,1 \pm 0,023$  mg de ECAT g<sup>-1</sup> de amostra para as cascas. Na determinação da atividade antioxidante os valores do CE<sub>50</sub> encontrados



para as folhas foram  $38,94 \pm 2,59 \mu\text{g mL}^{-1}$  para o extrato etanólico bruto,  $79,67 \pm 4,19 \mu\text{g mL}^{-1}$  para a partição cicloexano,  $38,165 \pm 5,92 \mu\text{g mL}^{-1}$  para a partição diclorometano,  $17,97 \pm 2,72 \mu\text{g mL}^{-1}$  para a partição acetato de etila, e  $15,79 \pm 1,017 \mu\text{g mL}^{-1}$  para a partição metanol. Já para as cascas os valores encontrados de  $\text{CE}_{50}$  são de  $39,73 \pm 5,01 \mu\text{g mL}^{-1}$  para extrato etanólico bruto,  $415,55 \pm 0,83 \mu\text{g mL}^{-1}$  para a partição cicloexano e  $33,24 \pm 0,75 \mu\text{g mL}^{-1}$  para a partição diclorometano. O extratos das folhas e cascas bem como suas partições apresentaram atividade antibacteriana frente a micro-organismos aeróbios e anaeróbios, com destaque para as partições em cicloexano e diclorometano das folhas que apresentaram valores de concentrações inibitórias mínimas (CIM) de  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  para micro-organismos anaeróbios. A partição cicloexano das cascas com CIM de  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$  e as demais partições das folhas tiveram concentrações inibitórias mínimas variando de 200 a  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$  para micro-organismos aeróbios, e valores entre 100 a  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$  para micro-organismos anaeróbios. As partições das cascas variaram de 25 a  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$  para os aeróbios e para os anaeróbios os valores encontrados são maiores que  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Comparado com outros estudos de plantas do cerrado os valores de CIM para os extratos e partições das folhas são considerados bastante relevantes para a continuidade da busca de outras caracterizações.

**Palavras-chave:** *Cordia sessilis* (Vell) Kuntze; análise química, óleo essencial; Atividade antioxidante; Atividade antibacteriana.

## ABSTRACT

In this work was carried out chemical analysis, identification of volatile components, the determination of antioxidant activity and antibacterial activity of wood, bark and leaves of *Cordia sessilis* (Vell) Kuntze, known as marmelinho. This study is justified because the analysis of chemical species *Cordia sessilis* (Vell) Kuntze had not been studied so far. Ethanol extracts of leaves, bark and wood were prepared and subjected to chemical analysis, seeking to identify, quantify and therefore determine the applicability of vegetable medicinal use. The percentages obtained for the macromolecular constituents of the bark and wood are within the acceptable range for hardwood trees. The content of Klason lignin was found to be 28.55 % and 24.00 % holocellulose content was 20.0 % and 72.0 % for the shell and timber, respectively. This work presents the first identification by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) of essential oil from leaves, bark and wood. 31 were identified components for the sheets, in most organic acids, totaling 46 % of oil, especially the n-hexadecanoic acid (24.73 %) and linolenic acid (6.91 %). Linalool,  $\alpha$ -Terpineol, (E)-Geraniol and Phytol were only found oxygenated monoterpenes and diterpenes respectively, corresponding to 5.84 % of total oil. Even if include short chain alcohols (such as cyclohex-4-en-1-ol, hex-3-en-1-ol, Hex-2-en-1-ol, 1-hex-1-anol ), totaling 23 % of oil, and aldehydes (such as (E)-2-hex-2-enal (5.31 %)), totaling 12 % of total oil. To the shells 18 have identified components, the majority of long chain fatty acids, total 88.4% of oil, especially the hexadecanoic acid (40.11 %) and octadecadienoic acid (33.2 %). In the wood was identified 18 components, we have again the predominance of long chain fatty acids, especially hexadecanoic Acid (32.23 %) and n-nonadecanoic acid (18.53 %), and this time was found sesquiterpene trans-Caryophyllene (0.72 %). For analysis of total phenols by Folin-Ciocalteu found  $42.12 \pm 0.93 \text{ mg g}^{-1}$  sample to the leaves and  $35.23 \pm 0.46 \text{ mg g}^{-1}$  sample to the shells. The content of proanthocyanidins found by the method of Vanillin was  $133.6 \pm 0.021 \text{ mg ECAT g}^{-1}$  sample to the sheets and  $111.1 \pm 0.023 \text{ mg ECAT g}^{-1}$  sample for the peel. In determining the antioxidant activity of  $EC_{50}$  values found for the leaves were  $38.94 \pm 2.59 \text{ mg mL}^{-1}$  for the crude ethanolic extract,  $79.67 \pm 4.19 \text{ mg mL}^{-1}$  for cyclohexane partition,  $38.165 \pm 5, 92 \text{ mg mL}^{-1}$  for the partition dichloromethane,  $17.97 \pm 2.72 \text{ mg mL}^{-1}$  to the partition

ethyl acetate, and  $15.79 \pm 1.017 \text{ mg mL}^{-1}$  for the partition methanol. As for the shells found  $EC_{50}$  values are  $39.73 \pm 5.01 \text{ mg mL}^{-1}$  for crude ethanol extract,  $415.55 \pm 0.83 \text{ mg mL}^{-1}$  for the partition cyclohexane and  $33.24 \pm 0.75 \text{ g mL}^{-1}$  for the partition dichloromethane. The extracts from the leaves and barks and its partitions showed antibacterial activity against the micro-aerobic and anaerobic organisms, especially the partitions in cyclohexane and dichloromethane leaf with values of minimum inhibitory concentrations (MIC) of  $50 \text{ mg mL}^{-1}$  for anaerobic micro-organisms. The partition of cyclohexane shells with MIC of  $25 \text{ mg mL}^{-1}$  and the other partitions of the leaves had minimum inhibitory concentrations ranging from 200 to  $400 \text{ mg mL}^{-1}$  for aerobic micro-organisms, and values between 100-400  $\text{mg mL}^{-1}$  for micro anaerobic organisms. The partitions shells ranged from 25-400  $\text{mg mL}^{-1}$  for the aerobic and anaerobic for the values are higher than  $400 \text{ mg mL}^{-1}$ . Compared with other studies of cerrado plants MIC values for the extracts and partitions of the leaves are considered very relevant to the continuing search for other characterizations.

**Keywords:** *Cordia sessilis* (Vell) Kuntze, chemical analysis, essential oil; antioxidant activity, antibacterial activity.

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 O CERRADO BRASILEIRO

O cerrado brasileiro é reconhecido como a savana mais rica em biodiversidade do mundo, contando com a presença de vários ecossistemas. Nele encontramos uma riquíssima flora com mais de 10.000 espécies. (O cerrado brasileiro, 2010, [www.portalbrasil.net/cerrado](http://www.portalbrasil.net/cerrado)).

A vegetação característica do cerrado é composta por árvores de médio porte com troncos e galhos retorcidos, cascas espessas, folhas coriáceas e raízes profundas. O cerrado manteve-se praticamente inalterado até a década de 50. A partir da década de 70 e 80, devido ao deslocamento agrícola, o cerrado teve sua área bastante modificada, restando uma pequena área original. Estima-se que atualmente existam aproximadamente 51,5 % de áreas nativas remanescentes do Cerrado e sua perda, principalmente pelo desmatamento para a agropecuária, continua acelerada (MEWS et. al., 2011).

## 1.2 A ESPÉCIE *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze, (Marmelinho)

No cerrado brasileiro encontramos a *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze, que é uma planta rubiácea de copa baixa (Figura 1), que em muitas vezes adquire aspecto arbustivo presente no cerrado típico. O cerrado típico é um subtipo de cerrado, no sentido restrito, e apresenta vegetação, predominantemente arbóreo-arbustiva, com cobertura arbórea de 20 a 50 % e altura entre 3 e 6 m (RIBEIRO e WALTER, 2008).



**Figura 1:** *Cordiera sessilis* (Vell.) Kuntze em seu habitat natural.

**Fonte:** Arquivo do autor.

A descrição morfológica de seus frutos e sementes já se encontram na literatura (MATHEUS, BACELAR e OLIVEIRA, 2008). Seu fruto verde possui até 3,5 cm de diâmetro e globoso (Figura 2), negro quando maduro (Figura 3), carnosos, indeiscentes, com polpa castanha adocicada.



**Figura 2.** Imagem do fruto verde da *Cordiera sessilis* (Vell.).

**Fonte:** Arquivo do autor.

A espécie possui frutos bacóides e com muitas sementes. Os seus frutos são comestíveis e também muito procurados pelos pássaros. É uma das rubiáceas brasileiras mais saborosas, pois seus frutos lembram o gosto adocicado de batata-doce.



**Figura 3:** Aspectos morfológicos do fruto maduro de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze.

Legenda: epi = epicarpo; mês = mesocarpo; sem = semente.

**Fonte:** MATHEUS, BACELAR e OLIVEIRA, 2008.

### 1.3 PLANTAS MEDICINAIS E SEUS USOS

São consideradas plantas medicinais todas as plantas que possuem substâncias que podem ser usadas na terapêutica, ou ainda que possam ser utilizadas como precursoras de síntese pela indústria químico-farmacêutica (CONFERÊNCIA SOBRE CUIDADOS PRIMÁRIOS DA SAÚDE, 1979).

Os estudos de Almeida (1993) mencionam que o início da história da fitoterapia, provavelmente, começou com Mitridates, rei de Ponto, na Anatólia (sudoeste da Ásia que corresponde, hoje, à Turquia) no Século II a.C. Ele foi o primeiro farmacologista experimental da história da humanidade. Os chineses foram precursores no estudo e utilização de plantas medicinais há mais de 5000 anos, sendo utilizadas cerca de 11.000 plantas como medicamento atualmente na China. Acredita-se que o primeiro livro a descrever o uso de plantas medicinais é de 2700 a.C. seja de origem chinesa com a obra intitulada de Pen Ts'ao (A Grande Fitoterapia), escrito pelo Imperador Sheng-Nung. Entretanto, o primeiro tratado médico aceito e respeitado pela comunidade científica, que inclui o uso de plantas, foi o papiro decifrado em 1873, pelo egiptólogo alemão Georg Ebers. Este achado, datado de aproximadamente 1500 anos antes da era Cristã, e em exibição no Museu de Leipzig, tem como frase introdutória “Aqui começa o livro relativo à preparação dos remédios para todas as partes do corpo humano” (ALMEIDA, E. R, 2003).

O profundo conhecimento do acervo químico da natureza pelos povos primitivos e pelos indígenas pode ser considerado fator fundamental para o descobrimento de

substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo. A convivência e o aprendizado com os mais diferentes grupos étnicos contribuem para o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais (VIEGAS, BOLZANI, e BARREIRO, 2006). Cerca de 70% da população mundial utiliza plantas ou extratos de plantas como medicamentos e mais de 120 medicamentos utilizados são derivados de plantas medicinais (LORENZI, 1998). A informação popular sobre o uso das plantas se constitui em um importante critério de seleção de material para estudo químico, visando à sua aplicação medicinal. Remédios, repelentes de insetos, venenos para peixes usados na pesca, podem fornecer pistas para o estudo químico de produtos naturais, ao lado de plantas conhecidas como tóxicas para o homem e animais.

Lamentavelmente, esse tipo de informação tende a desaparecer, pois os costumes do meio rural em contacto com os meios de comunicação em massa, substituem progressivamente os velhos hábitos, além de proporcionar a perda de vários destes conhecimentos pelo desaparecimento de florestas e de povos indígenas, detentores do conhecimento destas plantas medicinais. Assim, o estudo de plantas medicinais também colabora com o meio ambiente no sentido preservacionista.

Ainda, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as práticas da medicina tradicional expandiram-se mundialmente no decorrer da última década do século XX, ganhando popularidade. Devido a isso, desde 1978 a OMS tem estimulado o desenvolvimento de políticas públicas, a fim de inserir os medicamentos fitoterápicos no sistema oficial de saúde dos cento e noventa e um Estados-membro. A inclusão do Brasil na discussão dessa política sobre fitoterápicos deve-se ao fato de o país possuir não só a maior diversidade genética do mundo, abrigando cerca de 60 mil espécies catalogadas, como também pela ampla tradição no uso de plantas medicinais. Estima-se que 4 mil espécies vegetais sejam utilizadas, estando intrínseca ao conhecimento popular dos brasileiros (RODRIGUES et al., 2006). MORGAN (1994) afirma que toda planta que contém um ou mais princípios ativos em sua composição e que são úteis à saúde dos seres humanos são consideradas plantas medicinais.

A diversidade dos constituintes químicos das plantas, a ocorrência de pequenas quantidades de compostos de interesse, concomitantemente com grandes quantidades de constituintes já conhecidos e muito comuns, ao lado de vários outros fatores interferentes, dificulta o trabalho de isolamento e purificação dos princípios ativos desejados. Esses fatos tornam praticamente impossíveis o estabelecimento da composição química completa de uma planta. Essas dificuldades podem ser

minimizadas, quando se definem objetivos específicos para o estudo químico das plantas e se aplicam técnicas de prospecção preliminares adequadas aos objetivos escolhidos.

Muitas vezes se busca o isolamento e a caracterização de compostos de interesse acadêmico, por exemplo, compostos inéditos na literatura especializada, ou intermediários de processos de biossíntese de importância quimiotaxonômica. Outras vezes, tenta-se encontrar e isolar substâncias de interesse econômico, principalmente novos agentes medicamentosos, ou novas fontes de compostos raros já utilizados como precursores de síntese destas substâncias.

Trabalhos que relatam o uso de várias plantas medicinais do Cerrado pelas populações locais são encontrados na literatura (GUARIM-NETO, 2006; MORAIS, 2003; VIEIRA; MARTINS, 2000; RODRIGUES; CARVALHO (c), 2001).

O estudo da relação entre os seres humanos com o ambiente, ou seja, com recursos de flora e fauna é denominado como etnobiologia. Dentro dessa ressaltamos a etnobotânica que relaciona estudos e interpretações dos conhecimentos do uso tradicional de elementos da flora (GUARIM-NETO, 2006). Percebemos com base nesses estudos que as comunidades utilizam os vegetais de forma consciente, percebendo que sua preservação e utilização são de fundamental importância medicinal e alimentar. Os vegetais podem ainda fornecer madeira utilizada para fabricar currais, palanques, ferramentas e compensados e ainda terem aplicações medicinais atuando como expectorantes, emolientes de secreções e contra afecções bronco-pulmonares (MORAIS, 2005).

O levantamento realizado junto às comunidades rurais do sul de Minas Gerais apresentou as espécies mais utilizadas na medicina popular. Entre essas encontramos: *Baccharis trimera* (carqueja), *Bidens pilosa* (picão), *Brosimum gaudichaudii* (mamacadela), *Caryocar brasiliense* (pequi), *Heteropteris anceps* (guiné-do-campo), *Lychnophora pinaster* (arnica), *Mikania smilacina* (guaco), *Strychnos brasiliensis* (quina-cruzeiro), *Strychnos pseudo-quina* (quina-mineira), *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) e *Vernonia polyanthes* (assapeixe) entre outras. As principais aplicações medicinais usadas nessas comunidades são: afecções nos rins, reumatismo, dores estomacais, hemorroidas, diarreias, cólicas menstruais, vermes, diabetes entre outras aplicações medicamentosas (RODRIGUES; CARVALHO (d), 2001). Tais fatos demonstram a importância do estudo dos produtos naturais, mais especificamente os



vegetais tidos como plantas medicinais, pois muitos desses usos atribuídos aos vegetais ainda não estão devidamente estabelecidos cientificamente.

#### 1.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS E ATIVIDADE BIOLÓGICA

Os metabólitos primários são geralmente macromoléculas, como por exemplo: proteínas, ácidos nucleicos e lipídeos. São de ocorrência geral com função importante para manutenção da vida. Os metabólitos primários estão presentes em cada célula vegetal que é capaz de divisão, enquanto que os metabólitos secundários estão presentes acidentalmente e não são essenciais para a vida da planta (KOSSEL, 1891).

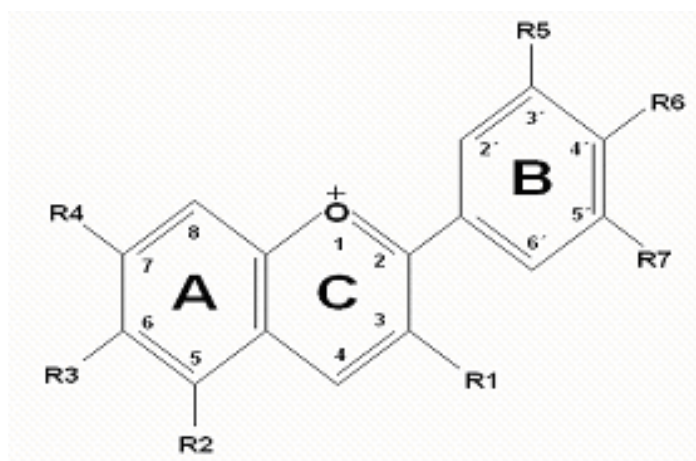
Os metabólitos secundários estão presentes em todos os vegetais superiores e devido a vários fatores, como alterações climáticas, condições do solo (pH, nutrientes, disponibilidade de água, etc.), presença ou ausência de predadores naturais entre outros fatores, possuem enorme quantidade de estruturas, funções e aplicabilidades variadas. Essa diversidade de estruturas pode ser associada ao processo evolutivo, onde os vegetais se diversificaram em ambientes variados, coexistindo em locais repletos de bactérias, vírus, fungos, insetos e animais (DIXON, 2001; FIRN e JONES, 2003).

Os metabólitos em um determinado vegetal apresentam variações em suas quantidades também. Os metabólitos podem estar presentes em um estado ativo ou como uma “pró-droga” ou “pró-fármaco” que é ativada por algum processo enzimático (WINK, 2003). Portanto, fármacos derivados de produtos naturais são comprovadamente importantes fontes para a produção de fármacos, cosméticos e agroquímicos. Os vegetais do cerrado possuem diversos metabólitos secundários de origem fenólica, denominados de polifenóis. Vários estudos realizados com compostos fenólicos, especialmente os flavonoides demonstram sua atividade antioxidante (capacidade de captar radicais livres). Os flavonoides nos vegetais possuem função protetora e estão estrategicamente localizados nas folhas, cascas e sementes. Os compostos fenólicos encontram-se ligados aos fenômenos biológicos, botânicos, genéticos e taxonômicos (EVARISTO, 2001).

As proantocianidinas são biflavonóides ativos encontrados em diversas plantas. As proantocianidinas são consideradas antioxidantes 20 vezes mais potentes que a vitamina C e 50 vezes mais que a vitamina E (NATUROPATIA, 2006). As antocianinas são metabólitos secundários pertencentes à classe dos flavonoides (WALTON et al.,

2006). São encontrados em abundância nos vegetais e responsáveis pelas colorações azuis, violeta e vermelho das flores e frutos e sua principal aplicação industrial é como corante natural (MARKAKIS, 1982; WROLSTAD, 2000; MALACRIDA; MOTA, 2005). A principal aplicação biológica das antocianinas é seu potencial antioxidante (SUN et al., 2002; MEYERS et al., 2003), porém algumas outras funções são também atribuídas a elas, como proteção à ação de luz, mecanismos de defesa e funções biológicas. As cores vivas e intensas que são produzidas por elas, possuem papel importante em mecanismos reprodutores, tais como polinização e dispersão de sementes. A atividade antioxidante das antocianinas é explicada por sua estrutura química que é formada por três anéis, que possuem ligações duplas conjugadas e também hidroxilas distribuídas ao longo da estrutura que permitem o sequestro de radicais livres, que estão relacionados a danos celulares e doenças degenerativas (KONG et al., 2003; SILVA et. al, 2007).

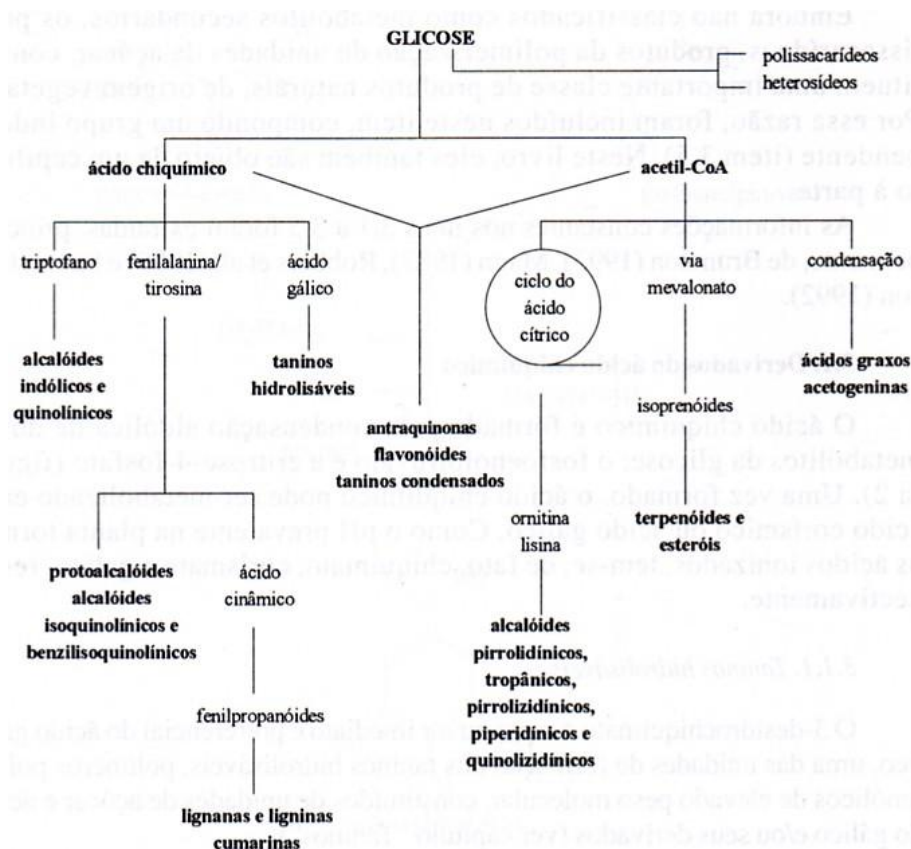
A Figura 4 apresenta a estrutura química das antocianinas.



**Figura 4:** Estrutura química das antocianinas.

**Fonte:** LÓPEZ, JIMÉNEZ e VARGAS, 2000.

A Figura 5 mostra o esquema do ciclo biossintético dos metabólitos secundários presentes nos vegetais.



**Figura 5:** Ciclo biossintético dos metabólitos secundários.

**Fonte:** Adaptado de SANTOS, 2004.

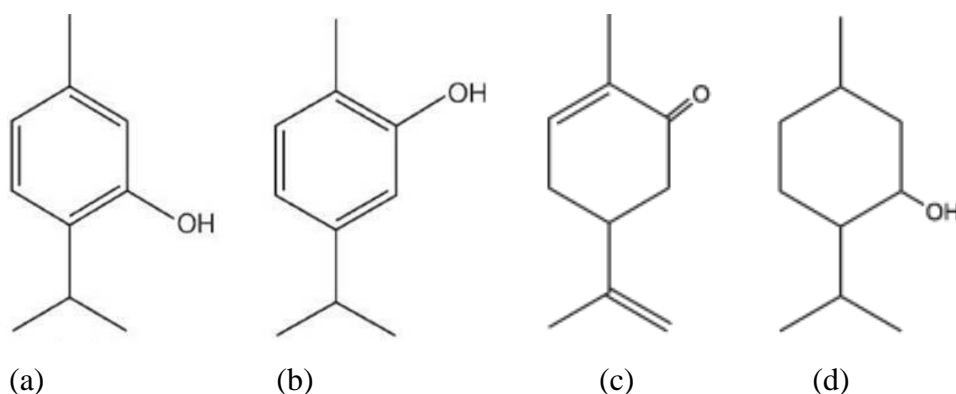
## 1.5 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DE PLANTAS DO CERRADO

A utilização de plantas medicinais para tratamento e cura de diversas doenças é uma das formas mais antigas de práticas medicinais da humanidade. Planta com propriedades terapêuticas tem grande importância na medicina mundial (MINJA, 1994; BEZERRA et al, 2006; LEITÃO et al, 2006; REBELO et al, 2012).

Muitas plantas do cerrado são usadas pela população local como medicamentos naturais para tratar varias doenças tropicais, incluindo esquistossomose, malária, leishmaniose, infecções fungicas e bacterianas, entre outras (ALVES, 2000). Em contrapartida, devido ao desconhecimento do vegetal, possíveis efeitos tóxicos são desconhecidos, bem como sua devida aplicação farmacológica. Desta forma, muitas vezes as plantas medicinais são usadas de modo incorreto, não produzindo o efeito esperado.

As propriedades antimicrobianas de extratos produzidos de vegetais como consequência do metabolismo secundário, também são conhecidos há séculos. Entretanto, alguns desses extratos só foram comprovados em estudos científicos posteriores (JANSEN, 1987).

A atividade antimicrobiana tem sido atribuída a pequenas estruturas de terpenóides e compostos fenólicos presentes nos vegetais. Como exemplo dessas estruturas podemos citar o timol, a carvona, o carvacrol, o mentol entre outros (DIDRY, 1993; CONNER, 1993; SMID, 1996). A Figura 6 apresenta as estruturas químicas dessas substâncias.



**Figura 6:** Estruturas químicas do Timol (a), do Carvacrol (b), da Carvona (c) e do Mentol (d).

O possível mecanismo de ação desses compostos ainda não está devidamente esclarecido, mas parece estar associado ao alto caráter lipofílico, havendo acúmulo de gordura nas membranas e perda de energia pelas células (CONNER, 1993). Outros grupos de substâncias com propriedades antimicrobianas incluem: alcaloides (FESSENDEN, 1982); lectinas e polipeptídios (TERRAS *et al.* 1993; ZHANG e LEWIS, 1997) e substâncias fenólicas e polifenóis, que são: fenóis simples, ácidos fenólicos, quinonas (STERN *et al.*, 1996), flavonas, flavonóis e flavonóides (FESSENDEN, 1982), tanino (SCALBERT, 1991) e cumarinas (O'KENNEDY e THORNES, 1997).

Os compostos isolados das plantas medicinais apresentam estruturas químicas diferentes dos antibióticos derivados de micro-organismos. As substâncias retiradas desses vegetais podem atuar como reguladores do metabolismo intermediário, ativando ou bloqueando processos enzimáticos, alterando diretamente uma reação enzimática em

nível nuclear ou ribossomal, ou ainda modificando as estruturas das membranas (SINGH e SHUKLA, 1984).

No início do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos. O grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos proporciona a produção de novos fármacos sintéticos para as mais variadas ações farmacológicas, porém 25 % dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas. Os vegetais estão envolvidos no desenvolvimento de 44 % de todos os novos fármacos. Em algumas áreas, como aquelas que envolvem doenças como o câncer e doenças infecciosas, em torno de 60 % dos fármacos são de origem natural (NEWMAN, 2003).

Outro grande fator de interesse científico a ser considerado para os produtos naturais é a sua utilização como protótipo ou modelo para medicamentos sintéticos com atividades fisiológicas parecidas com os compostos originais (MONTANARI, 2001).

O interesse em plantas com propriedades antimicrobianas tem reaparecido devido aos vários problemas associados ao uso intermitente de antibióticos, principalmente àqueles relacionados à resistência de algumas linhagens de micro-organismos contra vários medicamentos (SOUZA et. al., 2002; KOKOSKA et. al., 2002). Dessa forma, agentes antimicrobianos, oriundos de plantas, podem levar ao desenvolvimento de novos fármacos clinicamente importantes (BORRIS, 1996). Inúmeras substâncias naturais, principalmente obtidas de vegetais, têm sido testadas com o objetivo de se avaliar a atividade antimicrobiana sobre os micro-organismos do biofilme da placa dentária, constituindo assim um vasto campo de pesquisas (LIMA, 1994).

## 1.6 MICRO-ORGANISMOS BUCAIS

Para se fixarem na boca, os micro-organismos devem primeiro aderir à superfície dos dentes ou da mucosa. A aderência é essencial para reter o fluxo salivar e é mediada por adesinas na superfície das bactérias e por receptores da superfície oral. As adesinas microbianas consistem de polissacarídeos, glicosiltransferases e lectinas,

que são adesinas protéicas que têm afinidade específica por carboidratos. Estas adesinas são encontradas nos componentes da parede celular das bactérias ou associadas com estruturas celulares, tais como fímbrias ou fibrilas. Os receptores podem ser componentes salivares (mucinas, glicoproteínas, amilase, lisozimas, IgA, IgG, proteínas e estaterinas) ou componentes bacterianos (glicosiltransferase e glicanos), que estão ligados nas superfícies orais (GIBBONS, 1998; SCANNAPIECO, 1994; RUDNEY, 1995). A interação hidrofóbica é outra via utilizada pelos micro-organismos quando, as adesinas bacterianas e os receptores teciduais são hidrofóbicos (apolares). Em presença de água não se solubilizam promovendo adsorção na superfície dos dentes (WILSON, 2002).

Além das vias lectinas e hidrofóbicas, são conhecidas outros recursos de aderência direta ao esmalte dental e à glicoproteína salivar que se deposita sobre ele:

- Interação eletrostática via  $\text{Ca}^{+2}$ : utilizada por *S. mutans*
- Interação via IgA salivar: *S. sanguinis*
- Interação com glicosiltransferase e glicanos: *S. mutans* e *S. sobrinus*.
- Interação com proteínas salivares acídicas ricas em prolina: *Streptococcus gordonii*, *A. naeslundii*, *Fusobacterium nucleatum*.
- Interação com estaterina (fosfoproteína salivar): *A. naeslundii*, *F. nucleatum*.
- Interação com amilase salivar: *S. gordonii*.
- Interação com fragmentos de células bacterianas depositadas sobre a película adquirida: *S. sanguinis*, *S. oralis* e *S. gordonii*.
- Interação com outros receptores: *S. sanguinis*, *S. oralis*, *S. mitis*, *S. gordonii*, *F. nucleatum*, *Capnocytophaga ochraeae* (DE LORENZO, 2004).

Geralmente as bactérias bucais possuem mais de um tipo de adesina na superfície das células e podem participar de múltiplas interações, facilitando a ligação com moléculas da película adquirida e também com receptores de outras bactérias (MARSH, 2004). Bactérias colonizam as superfícies do hospedeiro aderindo a outras bactérias (coagregação) (KOLENBRANDER, 1993). A coagregação pode ser importante no desenvolvimento da placa dental porque permite a colonização de bactérias que não tem habilidade de aderir diretamente a película adquirida (NYVAD, 1993). As relações intermicrobianas positivas (sinergismo) e negativas (antagonismo)

(DE LORENZO, 2004) ajudam a manter o equilíbrio da microbiota bucal (THEILADE, 1998).

A coagregação é um exemplo de comensalismo e sinergismo que ocorre entre as espécies microbianas (OCHIAI, 1993). Um exemplo de interação positiva ocorre quando, bactérias anaeróbias facultativas utilizam oxigênio, reduzindo sua concentração, permitindo a colonização de bactérias anaeróbias estritas (THEILADE, 1998).

A dieta promove um aumento na proporção de micro-organismos que apresentam vantagens microbiológicas na presença da sacarose no meio bucal, como por exemplo, os *S. mutans*. Estes, são acidogênicos e acidúricos, sintetizam polissacarídeos extracelulares (PEC) a partir da sacarose. Além deste fato, sintetizam glicanos através das enzimas glicosiltransferases (GTFs). Algumas glicosiltransferases sintetizam moléculas de glicose formando os glicanos solúveis e insolúveis. Os glicanos, principalmente os insolúveis em água, permanecem mais tempo na placa e favorecem a aderência e acúmulo de *Streptococcus* cariogênicos sobre a superfície do esmalte dental (HAMADA, 1980).

Mecanismos de competição e antagonismo entre as bactérias bucais residentes podem ajudar o equilíbrio ecológico prevenindo um crescimento exagerado de algumas espécies bacterianas (THEILADE, 1998). *S. mitis* e *S. sanguinis* produzem peróxido de hidrogênio que pode ajudar na prevenção de bactérias periodontopatogênicas. O peróxido de hidrogênio inativa *A. actinomycetemcomitans*, um patógeno muito agressivo para o periodonto adulto, e principalmente de jovens (WILLCOX, 1988). O acúmulo de *Streptococcus* na superfície dental é considerado um dos fatores críticos no desenvolvimento do biofilme cariogênico, devido à produção de ácidos que proporcionam a queda do pH do biofilme dental, aumentando a possibilidade de desmineralização dos tecidos dentais. A produção de ácido lático pelo *S. mutans* e *Lactobacillus* gera um abaixamento do pH e inibe o crescimento de *S. sanguinis* e *S. oralis*, bem como bactérias Gram-negativas (LOESCHE, 1986).

Um elevado grau de especificidade na interação adesinas-receptores explica por que diferentes espécies bacterianas têm afinidade por diferentes estruturas da boca (AAS, 2005). Análises de amostras de salivas mostraram que nas primeiras seis horas após a limpeza dos dentes, os níveis de *S. mitis* e *S. oralis* são baixos na saliva, mas foram presentes em altos níveis no biofilme dental. Em contra partida outras bactérias

como: *A. naeslundii*, *F. nucleatum* foram encontrados em níveis elevados na saliva e quase ausentes no biofilme dental (LI, 2004).

Microrganismos bucais, além de serem considerados fatores de risco de doenças bucais como a cárie e periodontites, podem atingir a corrente sanguínea desencadeando outras doenças no organismo humano como: endocardites, abscessos cerebrais, infecções de garganta, infecções nos sistemas respiratório e gastrointestinal e bacteremias. Procedimentos clínicos (extrações dentais, tratamentos endodônticos, cirurgias periodontais), infecções bucais e saúde bucal precária são alguns dos principais fatores que promovem a introdução de microrganismos na corrente sanguínea. A endocardite infecciosa é a doença cardíaca mais comum causada por bactérias da cavidade bucal. *S. sanguinis* e *S. mutans* são as bactérias mais particularmente relacionadas com esta patologia (GENDRON e LI, 2000). Já o *S. salivarius* produz glicanos, e é a espécie predominante nas superfícies das mucosas, no qual é encontrado mais comumente no dorso da língua. *S. mitis* implanta-se tanto na mucosa como no dente (AAS, 2005).

## 1.7 EXTRATOS E ÓLEOS DE PLANTAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA FRENTE A MICRO-ORGANISMOS BUCAIS

A procura por novos compostos naturais com atividade antibacteriana bucal e com menores efeitos adversos, quando comparados aos produtos industrializados, seria muito importante para obtenção de um meio efetivo de controle da formação de um biofilme patogênico (MARSH, 1994).

Várias plantas e compostos isolados são relatados com potencial atividade contra microrganismos bucais (LANG E BUCHBAUER, 2012). Este trabalho traz uma revisão sobre extratos e óleos essenciais com atividade antimicrobiana e antifúngica.

Extratos brutos da Amoreira (*Maclura tictoria* L.) evidenciaram atividade antimicrobiana frente a microrganismos da cavidade bucal, quando avaliados pelo método da microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os microrganismos indicadores utilizados foram *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis*. A concentração inibitória mínima (CIM) para os extratos variou entre 250 e 400 µg mL<sup>-1</sup> (MORAIS, 2012).



A atividade antimicrobiana do extrato de arnica e da própolis foi avaliada *in vitro* (KOO, 2000). Determinou-se a atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar pela mensuração do halo de inibição de crescimento bacteriano. Dentre os microrganismos testados, citam-se: *Cândida albicans*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *Streptococcus cricetus*, *A. naeslundii*, *Actinomyces viscosus*, *P. gingivalis*, *Porphyromonas endodontalis* e *Prevotella denticola*. O extrato de arnica não demonstrou atividade antimicrobiana. O extrato da própolis inibiu significativamente todos os microrganismos testados.

O xantorrizol (1,3,5,10-bisabolatetraen-3-ol), isolado de extratos metanólicos de raízes da *Curcuma xanthorrhiza* (Zingiberaceae), exibiu potente atividade antibacteriana, determinada pela concentração inibitória mínima contra espécies de *Streptococcus* causadores da cárie dental, e também demonstrou potencial antimicrobiano contra *A. viscosus* e *P. gingivalis*, os quais são responsáveis por periodontites (HWANG, 2000).

Extratos da *própolis* mostraram atividade antimicrobiana contra vários microrganismos bucais, sendo esta, determinada pelo método de difusão em ágar e pelo método da microdiluição (DUARTE, 2003).

Ensaio de extratos de *Mikania laevigatae* e *Mikania glomerata* mostraram significativa atividade antimicrobiana frente a *S. mutans* pelo método da microdiluição. Extrato etanólico de *M. laevigatae* frente a várias linhagens de *S. mutans*, apresentaram valores de concentração inibitória mínima (CIM) que variaram entre 25 e superiores a 800 µg mL<sup>-1</sup>. Os extratos hexânicos de *M. laevigatae* apresentaram valores de CIM mais significativos com relação aos mesmos microrganismos variando entre 12,5 e 100 µg mL<sup>-1</sup> (YATSUDA, 2004).

Extratos aquosos da planta *Psidium cattleianum* (Myrtaceae) apresentaram atividade antimicrobiana contra *S. mutans* e *F. nucleatum*, avaliada por método de difusão em ágar com disco de papel (KHALIL, 2005). Extratos de *Arctium lappa* (nome popular: bardana), apresentaram ação antimicrobiana sobre a espécie *C. albicans*, através de avaliação macroscópica e microscópica com a coloração de Gram (PERIN, 2001).

Outro estudo realizado buscou verificar a ação antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da casca da romã (*Punica granatum Linn.*) frente à *Streptococcus mitis*, *S. mutans* e *S. sanguinis*. Utilizou-se o método de difusão em Agar. Todas as linhagens

bacterianas mostraram-se sensíveis ao extrato de *Punica granatum linn* indicando a eficácia desse extrato sobre os microrganismos formadores de placa (PEREIRA, 2001).

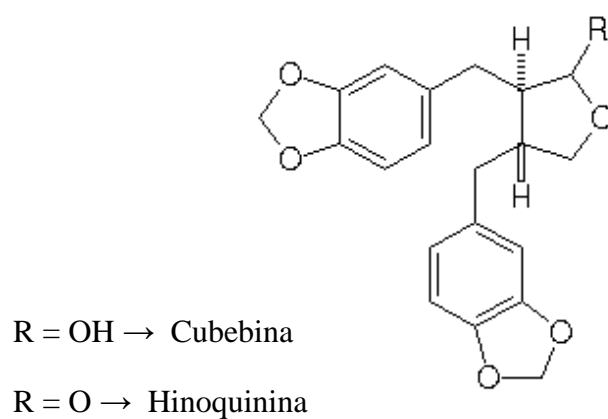
Cita-se outro estudo concluído com extrato da fração hexânica dos frutos de *Piper marginatum* frente às espécies de *S. aureus* e *C. albicans*. Para a realização dos ensaios, utilizou-se a avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de difusão em ágar. Os resultados obtidos identificaram resultados positivos frente às linhagens de *S. aureus*, porém não apresentaram atividade antifúngica frente às linhagens de *C. albicans* (BISPO JÚNIOR, 2004).

O extrato bruto e as frações da casca de *Pithecolobium avaremotemo* (barbatimão) foram submetidas às avaliações de suas atividades antimicrobianas contra as espécies do gênero *Cândida*: *C. albicans*, *Cândida tropicalis*, *Cândida guilliermondi* e *Cândida krusei*. Avaliou-se a eficiência antimicrobiana frente às leveduras pelo método da difusão em Agar. As soluções dos extratos testados na concentração de 100 mg mL<sup>-1</sup>, segundo os autores, obtiveram resultados que confirmaram a atividade antimicrobiana direcionada a fungos de interesse clínico das frações com propriedades químicas semelhantes aos taninos (ARAÚJO, 2004).

A atividade antimicrobiana de nove extratos de três espécies de *Miconia* (*M. albicans*, *M. rubiginosa* e *M. stenostachya*) foi avaliada. A atividade antimicrobiana foi avaliada frente a 11 microrganismos, sendo quatro Gram-positivos (*S. aureus*, *Staphylococcus saprophyticus*, *E. faecalis* e *Streptococcus agalactiae*) e seis Gram-negativos (*Proteus mirabilis*, *Escherichia coli*, *Shigella flexneri*, *Klesbsela pneumoniae*, *Salmonella sp.*, *P. aeruginosa*) e *C. albicans*. Os extratos das três espécies de *Miconia* apresentaram atividade na concentração de 300 mg mL<sup>-1</sup>. Para análise da atividade antimicrobiana utilizou-se o método da difusão em ágar. Os resultados mostraram que *M. stenostachya* apresentou atividade antimicrobiana somente contra *C. albicans*, enquanto que *M. albicans*, *M. rubiginosa* apresentam atividade sobre *S. aureus*, *S. saprophyticus*, *S. agalactiae*, *S. flexneri*, *Klesbsela pneumoniae* e *C. albicans* (CELOTTO, 2003).

Avaliou-se a atividade antimicrobiana do extrato hexânico bruto de *Zanthoxylum naranjillo* e do extrato etanólico bruto de *Piper cubeba*, bem como da substância isolada (-)-cubebina e de alguns de seus derivados frente a microrganismos da cavidade bucal, utilizando o método da microdiluição para a determinação da concentração inibitória mínima e método de difusão em ágar. Os extratos brutos de *P. cubeba* e de *Z. naranjillo* apresentaram atividade antimicrobiana frente a *S. mutans* e *C. albicans* tanto

pelo método de difusão em ágar como pelo método de microdiluição. Os extratos brutos de *P. cubeba* e *Z. naranjillo*, apresentaram atividade semelhante frente a *S. mutans* e *C. albicans* quando avaliados pelo método de difusão em ágar. A substância pura (-)-cubebina e seu derivado obtido por oxidação (-)-hinoquinina, após serem submetidos aos ensaios de microdiluição e método de difusão em ágar, apresentaram atividade antimicrobiana frente a *S. mutans* e *C. albicans*, somente pelo método da microdiluição. As substâncias puras (-)-cubebina e (-)-hinoquinina (Figura 7) apresentaram atividade antimicrobiana frente a todos os microrganismos testados, com CIM variando de 70  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (COIMBRA, 2005). A Figura 7 apresenta as estruturas químicas da (-)-Cubebina e (-)-Hinoquinina.



**Figura 7:** Estrutura química da (-)-Cubebina e (-)-Hinoquinina.

Á avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de bakuchiol contra microrganismos bucais, mostrou que o bakuchiol, substância isolada das sementes de *Psoralea corylifolia*, árvore nativa da China, teve efeito bactericida contra todas as bactérias testadas. As bactérias utilizadas foram *S. sobrinus*, *S. sanguinis*, *S. salivarius*, *S. mutans*, *E. faecalis*, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. viscosus* e *P. gingivalis*. Os valores de CIM variaram entre 1 a 4  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (KATSURA, 2001).

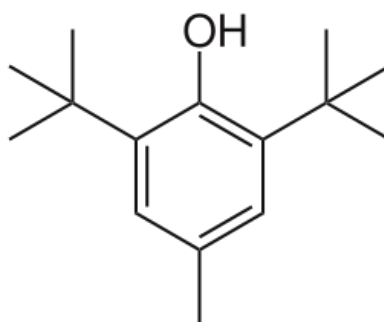
Compostos isolados das raízes de *Mussaenda macrophylla* apresentaram atividade antimicrobiana quando avaliados pelo método da microdiluição frente a *P. gingivalis* (bactéria periodontopatogênica) (KIM, 1999).

A partir das raízes de *Hydrastis canadensis* L. isolou-se dois novos flavonóides, que posteriormente foram submetidos a ensaios de microdiluição para determinação da CIM frente aos microrganismos *S. mutans* e *F. nucleatum*. Os compostos apresentaram

atividade antimicrobiana e os valores de CIM estiveram entre 250  $\mu\text{g mL}^{-1}$  até concentrações superiores a 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (HWANG, 2003).

Metabólitos secundários como os terpenos foram testados frente a microrganismos e suas concentrações inibitórias mínimas (CIM) determinadas para se estabelecer a relação de suas estruturas com a atividade antimicrobiana. Cerca de 60 terpenos foram testados contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli*, *staphylococcus aureus* e *Cândida albicans*. Os terpenos oxigenados apresentaram padrões de atividade contra os quatro microrganismos testados. Parâmetros de ligação de hidrogênio foram identificados como fator associado à ação antimicrobiana (GRIFFIN, 1999).

Óleos essenciais de *Cananga odorata*, *Boswellia thurifera*, *Cymbopogon citratus*, *Marjorana hortensis*, *Ocimum basilicum*, *Rosmarinus officinalis*, *Cinnamomum zeylanicum* foram testados frente a 25 gêneros diferentes de bactérias e uma espécie de fungo. Os óleos essenciais exibiram resultados inibitórios consideráveis contra todos os microrganismos utilizados nesses ensaios. Suas atividades antioxidantes foram analisadas também, encontrando resultados semelhantes ao Butil-hidroxi-tolueno (BHT), apresentado na Figura 8, que é um antioxidante de grau alimentício muito usado industrialmente (BARATTA, 1998).



**Figura 8:** Estrutura química do BHT.

## 2 JUSTIFICATIVA

Somente cerca de 10 % das espécies vegetais tem sido sistematicamente estudadas em termos de compostos bioativos, das mais de 1.110 espécies estudadas por suas propriedades medicinais, e dentre as mais de 365.000 espécies já conhecidas (RODRIGUES E CARVALHO, 2008, GARCIA, 1995;). Estes dados revelam a grande importância do conhecimento cada vez crescente sobre plantas com potencial medicinal nos biomas nacionais.

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa de Produtos Naturais do Instituto de Química da UFU tem estudado vegetais do cerrado e tem interesse em estudar a espécie vegetal *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze, típica do cerrado. Ela apresenta grande interesse econômico para produção de madeira que é empregada para lenha e carvão. Com a expansão agrícola dos cerrados, a espécie vem sendo vítima de uma exploração predatória tomando-se extinta em muitas regiões. Entretanto não se encontra na literatura relatos sobre a sua utilização como planta com propriedades medicinais, e que seja usada pelas populações locais. Desta forma este trabalho buscou conhecer suas propriedades antioxidantes e antimicrobianas.

Neste trabalho foi realizada a análise química, a determinação da atividade antioxidante e a determinação da atividade antimicrobiana da madeira, cascas e folhas da espécie *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze. Este trabalho apresenta a primeira identificação dos componentes voláteis presentes no óleo essencial de suas folhas, cascas e madeira.

Não foram encontrados trabalhos relacionados com a atividade antimicrobiana frente a microrganismos bucais de óleos e extratos das cascas, madeira e folhas da planta *Cordia sessilis* (Vell) Kuntze.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

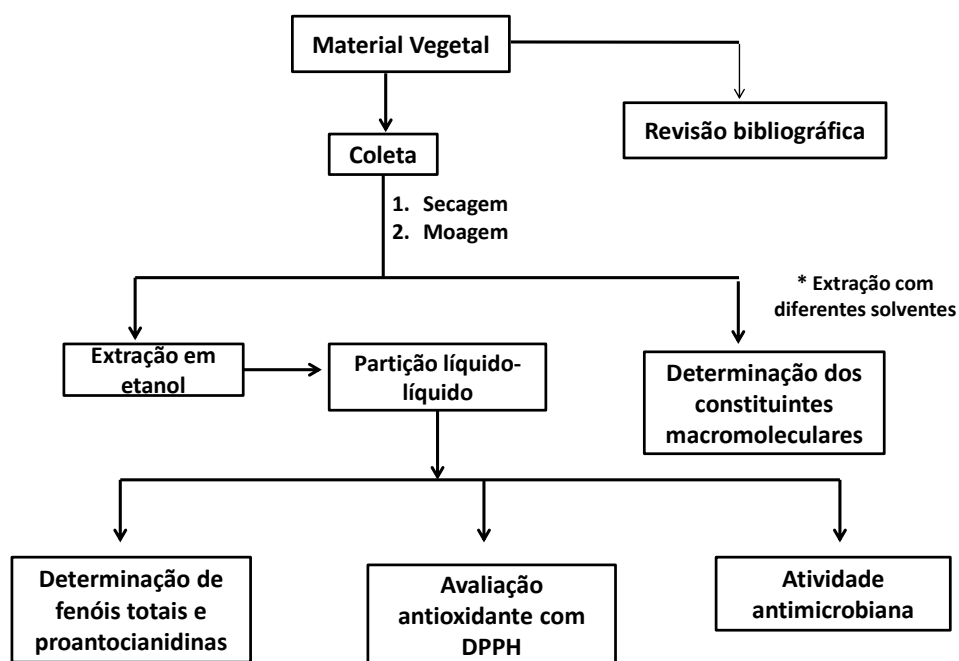
Este trabalho teve como objetivo geral realizar o estudo químico e biológico da *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze uma vez que as informações desse vegetal na literatura são incipientes, não constando ainda trabalhos que discutam seus componentes e nem suas possíveis aplicações medicinais.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção de extratos brutos da madeira, cascas e folhas da espécie arbustiva *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze.
- Quantificação dos constituintes macromoleculares da madeira e cascas.
- Caracterização dos constituintes voláteis das folhas, cascas e madeira da espécie *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM).
- Quantificação do teor de polifenóis e proantocianidinas presentes nos extratos de folhas e cascas pelo método do Folin Ciocalteau e Vanilina sulfúrica.
- Avaliação da atividade antioxidante utilizando o método de sequestro do radical livre DPPH dos extratos brutos e frações da madeira, cascas e folhas da espécie *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze.
- Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos e partições das cascas e folhas frente a microrganismos aeróbios e anaeróbios bucais, utilizando o método da microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

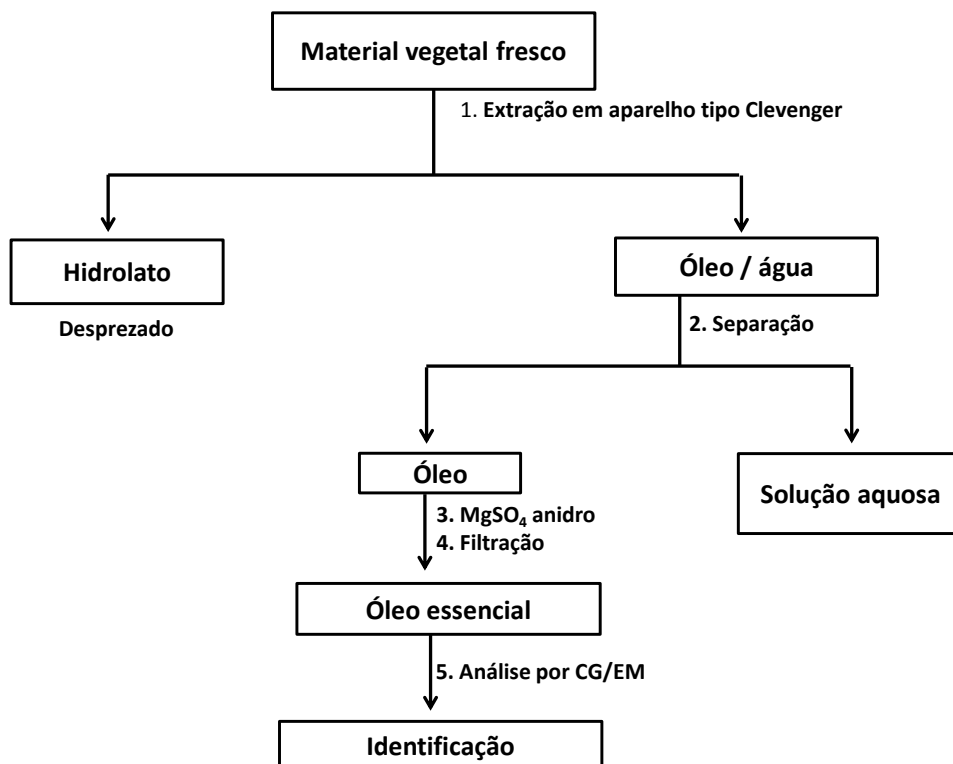
## 4 METODOLOGIA

Os procedimentos experimentais para a metodologia utilizada encontram-se resumidos no fluxograma da Figura 9 (análise química e biológica).



**Figura 9:** Fluxograma para a análise química de madeiras, cascas e folhas utilizada neste trabalho.

As análises dos componentes voláteis encontram-se resumidas no fluxograma da Figura 10.



**Figura 10:** Fluxograma para identificação dos componentes voláteis do óleo essencial das folhas de *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze utilizado neste trabalho.

#### 4.1 REAGENTES E SOLUÇÕES

Os solventes utilizados foram de grau analítico, adquiridos da Vetec Química Fina LTDA. Os padrões de catequina e ácido gálico foram adquiridos da Sigma – Aldrich.

- **Solução de carbonato de sódio 7,5 %:** Dissolveu-se 18,75 g de carbonato de sódio em água destilada em um béquer. Transferiu-se para um balão volumétrico de 250,0 mL e completou-se o volume com água.
- **Solução de catequina 50,0 µg mL<sup>-1</sup>:** Pesou-se 0,0125 g de catequina, a massa foi transferida para um balão de 250,0 mL. O balão foi completado com água destilada. A partir dessa solução foram feitas diluições para as concentrações de 40, 30, 20, 10 e 1 µg mL<sup>-1</sup>.



- **Solução de ácido gálico 50,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$** : Pesou-se 0,0125 g ácido gálico, a massa foi transferida para um balão de 250,0 mL. O balão foi completado com água destilada. A partir dessa solução foram feitas diluições para as concentrações de 40,0; 30,0; 20,0; 10,0 e 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .
- **Solução do reativo de Folin-Ciocalteu 10 %**: Adicionou-se em um balão volumétrico de 50,0 mL, 5,0 mL do reativo de Folin (VETEC) e completou-se o balão com água destilada.
- **Solução de DPPH 40  $\mu\text{g mL}^{-1}$** : Pesou-se 0,004 g de DPPH<sup>·</sup>, a massa foi transferida para um balão de 100,0 mL. Completou-se o balão com metanol.
- **Solução de ácido sulfúrico 72 %**: Utilizou-se um balão volumétrico de 50,0 mL, com 36,0 mL do ácido e 14,0 mL de água.
- **Solução de vanilina 0,01 g  $\text{mL}^{-1}$ , em ácido sulfúrico 70 % (v v<sup>-1</sup>)**: A solução de ácido sulfúrico foi preparada, em um balão volumétrico de 50,0 mL, com 35,0 mL do ácido e 15,0 mL de água. Pesam-se 0,5 g de vanilina, que foi colocada em um balão volumétrico de 50,0 mL. Completou-se o balão com a solução de ácido sulfúrico 70 %.
- **Preparação da solução de ácido sulfúrico 70 % (v v<sup>-1</sup>)**: Em uma proveta de 100,0 mL mediu-se 70,0 mL de ácido sulfúrico (PA) e 30,0 mL de água destilada.
- **Solução de acetato de sódio 20 %**: Dissolveram-se 20,0 g de acetato de sódio em água destilada em um béquer. Transferiu-se para um balão volumétrico de 100,0 mL e completou-se o volume com água destilada.
- **Solução de clorito de sódio 40 %**: Dissolveram-se 40,0 g de clorito de sódio em água destilada em um béquer. Transferiu-se para um balão volumétrico de 100,0 mL e completou-se o volume com água destilada.
- **Solução de hidróxido de potássio 5 %**: Dissolveram-se cerca de 5,0 g de hidróxido de potássio em água destilada em um béquer. Transferiu-se para um balão volumétrico de 100,0 mL e completou-se o volume com água destilada.

## **4.2 COLETA E PRERARO DO MATERIAL VEGETAL**

O material foi coletado em outubro de 2010 na Reserva Ecológica do Panga (REP), localizada a 30 km do centro da cidade, dentro dos limites do município de Uberlândia-MG e às margens da estrada de Campo Florido, pertencente à Universidade Federal de Uberlândia - UFU. A REP compreende 409,5 ha, e está posicionada geograficamente entre as coordenadas 19° 09'20"-19° 11'10" de latitude sul e 48°23'20"-48°24'35" de longitude oeste, com altimetria variando entre 740 e 830m.

Em seguida, sua exsicata foi preparada, identificada pelo professor Glein Monteiro de Araújo (Instituto de Biologia – UFU), e depositada no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia (HUFU) com o número 25486.

## **4.3 ANÁLISES QUÍMICAS**

O material (folhas, cascas e madeira) foi seco à temperatura ambiente antes que fosse realizada as análises químicas. As cascas e madeira secas foram separadamente moídas em moinho de bolas e todas as análises foram realizadas em triplicata e os resultados correspondem a média  $\pm$  o desvio padrão.

As folhas secas foram moídas em moinho de facas e todas as análises foram realizadas em triplicata. Os resultados correspondem à média  $\pm$  o desvio padrão.

As amostras moídas foram peneiradas e as frações que ficarem entre as peneiras de 40 e 60 meshes foram armazenadas em recipiente de polietileno e acondicionadas em freezer até o momento das análises.

Os ensaios químicos foram realizados no Laboratório de Química dos Produtos Naturais da Universidade Federal de Uberlândia – UFU.

#### **4.3.1 Obtenção dos extratos brutos etanólicos por maceração das folhas, cascas e madeira de *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze.**

Os extratos de folhas, cascas e madeira foram preparados por maceração com etanol à temperatura ambiente, por quatro vezes consecutivas. Cada extração teve a duração de quatro dias. Em seguida foram calculados os rendimentos. O rendimento foi obtido dividindo a massa do extrato obtido pela massa do vegetal utilizado e multiplicando o valor final por 100, para que possamos apresentar o resultado em percentual (%). Com os extratos etanólicos das folhas, cascas e madeira obtidas foram determinados o teor de fenóis totais e de proantocianidinas, e a avaliação da atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH. Com os extratos das folhas e cascas foi determinada atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição em caldo.

#### **4.3.2 Obtenção dos extratos por partição líquido-líquido das folhas e cascas de *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze.**

Uma amostra do extrato etanólico bruto das folhas e uma amostra do extrato etanólico bruto da casca foram ressuspensas em 200,0 mL de solução metanol água<sup>-1</sup> (9:1). Em funil de decantação foi realizada a partição líquido-líquido com a seguinte sequência de solventes para o extrato das folhas: cicloexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, e para o extrato das cascas: cicloexano e diclorometano. Utilizou-se um total de 600,0 mL de cada um dos solventes (3 x 200,0 mL). As soluções de cicloexano, diclorometano, acetato de etila e metanol com os respectivos extrativos, tiveram seus solventes evaporados a pressão reduzida com temperatura do banho em torno de 40 °C. Os quatro extratos brutos das folhas foram avaliados quanto às suas potencialidades antimicrobianas pelo método da microdiluição em caldo (utilizando a Concentração inibitória mínima) frente a microrganismos da cavidade bucal, e seus efeitos antioxidantes pelo método de sequestro do radical livre DPPH. Para as cascas foram encontrados dois extratos brutos (cicloexano e diclorometano), pois com a adição do diclorometano não houve nova separação de fases no funil, impossibilitando a formação de uma nova partição.

#### **4.3.3 Determinação do teor de umidade**

Para a determinação da umidade das amostras secas utilizou-se uma balança de luz infravermelha (marca Kett, modelo FD-600). As amostras (1,0 g) foram deixadas a temperatura de 105 °C por quinze minutos até teor de umidade constante. A umidade das folhas, cascas e madeira deve ser conhecida a fim de que a água existente não seja quantificada como produto em algumas análises executadas. A massa utilizada faz referencia à massa seca, subtraindo-se a porcentagem de água e tomando-se uma massa maior para compensar a umidade.

#### **4.3.4 Determinação dos constituintes químicos macromoleculares da casca e madeira de *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze.**

##### **4.3.4.1 Determinação do teor de Cinzas (INSTITUTO ADOLF LUTZ, 1985)**

Para a determinação de cinzas, 2,0 g de cascas e madeira foram transferidas para cadinhos de porcelana previamente calcinados, esfriados e pesados. Após a distribuição uniforme das amostras nos cadinhos, as mesmas foram incineradas na temperatura de aproximadamente 600 °C por 6 h. Após esta etapa são calculadas as porcentagens de cinzas em relação ao pó que foi submetido ao processo de secagem.

##### **4.3.4.2 Preparação da madeira e cascas livre de extrativos**

Uma amostra de 50,0 g do pó das cascas e da madeira, separadamente, de *Cordia sessilis* (Vell.), foram colocadas em um cartucho de papel filtro e adaptado ao extrator Soxhlet (Figura 13). Realizaram-se quatro extrações com os solventes: cicloexano, cicloexano: etanol (2:1 v v<sup>-1</sup>), clorofórmio e água sucessivamente no aparelho Soxhlet. Todas as extrações foram feitas por um período de 20 h. Em seguida, o material vegetal livre de extrativos é retirado do aparelho Soxhlet deixado em dessecador até a evaporação completa do solvente. Essa amostra foi utilizada na

determinação de lignina solúvel, insolúvel e a holocelulose.



**Figura 11:** Imagem da montagem de aparelho Extrator Soxhlet utilizado neste estudo para extração contínua.

**Fonte:** Arquivo do autor.

#### **4.3.4.3 Tratamento Alcalino para Extração dos Ácidos Fenólicos da madeira e cascas**

Uma amostra de 2,0 g da madeira ou cascas, separadamente, livre de extrativos, foi tratada por uma hora a 90 °C com 200,0 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 1 % ( $\text{m v}^{-1}$ ). O resíduo foi filtrado e lavado sucessivamente com 100,0 mL de água a 80 °C, 50,0 mL de ácido acético 10 % ( $\text{m v}^{-1}$ ) e novamente com 200,0 mL a 80 °C, seco a  $105 \pm 3$  °C e pesado.

#### **4.3.4.4 Determinação da Lignina insolúvel (Lignina de Klason)**

Para a determinação da lignina de Klason, lignina solúvel e holocelulose em cascas e madeira são necessárias à realização de um pré-tratamento das amostras em meio básico para solubilização de substâncias que também são insolúveis em ácidos

minerais e seriam contabilizados no rendimento final.

A lignina de Klason é determinada de acordo com o método descrito por Browning, 1967. Uma amostra de 1,0 g da amostra livre de extrativos e pré-tratada (40/60 meshes), foi colocada em um béquer e adicionou-se 15,0 mL de uma solução de ácido sulfúrico 72 %, de forma lenta, e sob agitação constante. A mistura foi deixada em repouso por duas horas à temperatura ambiente, agitando a cada 10 min. Em seguida, foram adicionados 560,0 mL de água destilada. Deixou-se a solução em banho aquecido por quatro horas, com periódica agitação e adição de água para manter o volume constante. Depois disso, a solução foi resfriada, filtrada e o resíduo lavado com água destilada até pH neutro. O resíduo foi seco em estufa a 105 °C, até massa constante. Determinou-se a quantidade de lignina insolúvel pela diferença entre a massa pré-tratada e a massa do resíduo obtido.

#### **4.3.4.5 Determinação da Lignina solúvel**

A determinação da lignina solúvel foi calculada de acordo com o procedimento descrito por GOLDSCHIMID (1971 apud MORAIS, 2005).

O filtrado da solução anterior foi colocado em balão volumétrico de 1,0 L e completado com água destilada até ajustar o menisco. A partir dessa solução, retirou-se 10,0 mL e acrescentou-se mais 5,0 mL de água destilada, formando assim uma segunda solução. A partir dessa nova solução é possível determinar quantitativamente a lignina solúvel por espectroscopia no ultravioleta (UV), a partir da análise das bandas de absorção nas regiões de 215 e 280 nm do espectro. É feito um branco realizando o mesmo procedimento para determinação de lignina insolúvel, entretanto, sem a presença de cascas livres de extrativos.

A concentração de lignina solúvel é calculada segundo a Equação 1:

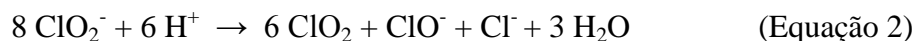
$$C_{L.S.} = \frac{4,53A_{215} - A_{280}}{300} \quad (\text{Equação 1})$$

Em que:  $C_{L.S.}$  = concentração em g L<sup>-1</sup> de lignina na amostra;  $A_{215}$  = absorvância da solução a 215 nm menos a absorvância do branco a 215 nm;  $A_{280}$  = absorvância da solução a 280 nm menos a absorvância do branco a 280 nm;

#### 4.3.4.6 Determinação da Holocelulose

O teor de holocelulose é determinado pelo método descrito por Browning, 1967. Inicialmente realiza-se o pré-tratamento da amostra livre de extrativos com solução de hidróxido de sódio 1 % (m v<sup>-1</sup>) como descrito anteriormente. Em seguida, em um erlenmeyer de 1000,0 mL são adicionados 5,0 g de amostra livre de extrativos e pré-tratada (40/60 meshes). Foram adicionados 110,0 mL de água destilada; 3,0 mL de ácido acético glacial; 22,0 mL de solução de acetato de sódio a 20 % (m v<sup>-1</sup>) e 9,0 mL de clorito de sódio a 40 % (m v<sup>-1</sup>), respectivamente. A mistura foi homogeneizada com agitação, tampada com um erlenmeyer de 100,00 mL invertido para evitar a saída prematura de gases e colocada em banho aquecido a 75 °C por 60 min, sob agitação frequente. A adição dos reagentes foi repetida por mais três vezes a cada intervalo de 60 min, até que se observou a holocelulose com coloração branca. Em seguida, a solução foi filtrada a vácuo. O filtrado é lavado com cerca de 1000,0 mL de água destilada, duas porções pequenas de acetona (cerca de 10,0 mL cada porção) e aspirado até a holocelulose ficar relativamente seca. O produto é seco em estufa a 70 °C.

A metodologia utilizada na deslignificação baseia-se na reação da lignina com ClO<sub>2</sub> e ClO<sup>-</sup>, que são subprodutos obtidos na reação de oxirredução do ClO<sub>2</sub><sup>-</sup> (Equação 2) em meio ácido (REYES et. al., 1998).



#### 4.3.5 Extração de óleo essencial por hidrodestilação

Para a extração do óleo essencial foi utilizado o aparelho de Clevenger modificado, apresentado na Figura 12.



**Figura 12:** Imagem da montagem do aparelho de Cleavenger modificado utilizado nesse estudo.

**Fonte:** Arquivo do autor.

Foram coletadas 100,0 g de amostra fresca (madeira, cascas e folhas) pelo período da manhã, picadas e colocadas em um balão de 1,0 L com 500,0 mL de água. Após o tempo de 5 h do material vegetal em ebulição, o óleo que foi arrastado pela água, foi recolhido em um funil de separação, com a adição prévia no aparelho Clevenger de 10,0 mL de diclorometano, por três vezes. É este o solvente que separa o óleo essencial da água. O óleo dissolvido no diclorometano foi transferido para um béquer e, neste béquer, foi adicionado sulfato de sódio anidro para retirar a água que eventualmente, passou do funil de separação. Depois filtrou-se, e o filtrado, foi deixado em sistema aberto em temperatura ambiente até a evaporação completa do solvente. Em seguida, o óleo extraído foi estocado em frascos de 10,0 mL, tampado e armazenado em freezer a -10,0 °C até sua utilização (MORAIS et. al., 2009). O rendimento dessas extrações foi determinado dividindo a massa obtida de óleo pela massa de vegetal utilizada, multiplicando-se o resultado por 100 para apresenta-lo em percentual (%).

Os óleos foram submetidos ao teste de atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição em caldo e seus constituintes separados e identificados por cromatografia a gás acoplada a espectrometria de massas.



#### **4.3.5.1 Separação e identificação dos compostos voláteis por cromatografia gasosa acoplada ao espectrometria de massas (CG-EM)**

A separação e identificação dos constituintes voláteis foram feitas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas num aparelho da Shimadzu, modelo GC17A/QP5000. O programa de temperatura é de 40 °C (5 min.); 40-60 °C (4 °C min<sup>-1</sup>); 60-250 °C (8 °C min<sup>-1</sup>); injetor no modo split (1/20) a 250 °C; hélio a fluxo constante de 1,2 mL min<sup>-1</sup> e coluna DB1. O detector de massas opera com energia de impacto de 70 eV e são captados os fragmentos de 40 a 650 u; temperatura da interface de 280 °C; temperatura do quadrupolo de 150 °C ; temperatura da fonte de íons de 230 °C e 1 µL de amostra, dissolvido em diclorometano, foi injetado.

A identificação dos compostos foi feita por meio das bibliotecas de espectros de massas da Wiley (140, 229 e 275) e por índices de Kovat. Para obtenção dos Índices de Kovats, uma mistura de padrões de alcanos (C9-C20) foi preparada, usando-se hexano como solvente.

#### **4.3.6 Identificação qualitativa dos metabólitos secundários presentes no extrato etanólico das folhas, cascas e madeira de *C. Sessilis* (Vell.) Kuntze.**

Para todos os extratos de folhas, cascas e madeira fresca foram realizadas a prospecção fitoquímica seguindo a metodologia descrita por MATOS, (1997) e adaptações de COSTA, (2000).

Os testes foram realizados utilizando-se 12,0 mg de extrato etanol água<sup>-1</sup> (8:2) (v v<sup>-1</sup>) dissolvidos em 12,0 mL de etanol e colocados em tubos de ensaio numerados de 1 a 4; para comparação foi realizado um teste em branco usando apenas água e o cloreto férrico.

##### **4.3.6.1 Reagentes e soluções específicas**

- **Reagente de Liebermann-Burchard:** Misturou-se 10,0 mL de ácido anidrido acético e duas gotas de ácido sulfúrico concentrado.

- **Reagente de Salkowski:** Ácido sulfúrico concentrado.
- **Solução de cloreto de ferro III 1 mol L<sup>-1</sup>:** Dissolveu-se 14,997 g de FeCl<sub>3</sub>.6H<sub>2</sub>O em 50 mL de água destilada contendo 2 mL de ácido clorídrico (HCl) 3 mol L<sup>-1</sup> e completou-se o volume para 100,0 mL com etanol em um balão volumétrico.
- **Solução de ácido clorídrico 3 mol L<sup>-1</sup>:** Adicionou-se 9,26 mL de HCl concentrado em água suficiente para 100,0 mL de solução, em balão volumétrico.

#### 4.3.6.2 Ensaio de identificação

Extratos etanólicos das partes aéreas frescas foram submetidos a testes para verificação de fenóis e taninos (reação com cloreto férrico), antocianinas, antocianidinas e flavonóides (teste de variação de pH, com hidróxido de sódio e ácido sulfúrico), esteroides e triterpenóides (teste de Liberman-Buchard), chalconas e auroras, e saponinas (teste de espuma e teste de precipitação). Os resultados foram interpretados de acordo com critérios qualitativos e semi-quantitativos mediante reações coradas, formação de espuma, e/ou de precipitado (MATOS, 1997; COSTA 2000).

##### 4.3.6.2.1 Teste para Fenóis e Taninos

No tubo de ensaio número 1 foram adicionadas três gotas de solução alcoólica de FeCl<sub>3</sub> 1,0 mol L<sup>-1</sup>. Agitou-se bem e observou-se que a solução ficou com uma coloração verde e não houve formação de precipitado. O resultado foi comparado com um teste em branco, usando água e FeCl<sub>3</sub>. A coloração variando entre azul e vermelho é indicativo de fenóis.

A formação de precipitado azul escuro indica presença de taninos pirogálicos (taninos hidrolisáveis) e de cor verde à presença de taninos flobatênicos (taninos condensados ou catequéticos).

#### 4.3.6.2.2 Teste para Antocianinas, Antocianidinas, Flavonóides, Chalconas e Auronas

Tomaram-se os tubos numerados de 2 a 4. O tubo de número 2 foi acidulado com HCl 3,0 mol L<sup>-1</sup> e os tubos 3 e 4 foram alcalinizados respectivamente a pH 8,5 e 11,0 com NaOH 1 mol L<sup>-1</sup>. A observação de mudança de coloração da solução e a interpretação dos dados seguiram a Tabela 1 abaixo (ROCHA et. al., 2011).

**Tabela 1:** Padrões de mudança de cor para os testes de antocianinas, antocianidinas e flavonas, flavonóides chalconas, e auronas (MATOS, 1997).

CLASSE	COR		
	Ácido (pH = 3) (tubo 2)	Alcalino (pH = 8,5) (tubo 3)	Alcalino (pH = 11) (tubo 4)
Antocianinas e antocianidinas	Vermelha	Lilás	Azul-purpura
Flavonas, flavonóis	-----	-----	Amarela
Chalconas e auronas	Vermelha	-----	Vermelho púrpuro
Flavonóis	-----	-----	Vermelho-Laranja

#### 4.3.6.2.3 Teste para Esteroides e Triterpénoides

Adicionou-se 10,0 mL de solução etanólica dos extratos em béqueres e deixou-se secar em banho-maria. Extraíu-se o resíduo seco de cada béquer três vezes com porções de 1,0-2,0 mL de clorofórmio (CHCl<sub>3</sub>). Separaram-se e colocaram-se algumas gotas de CHCl<sub>3</sub>. Filtrou-se a solução clorofórmica em um pequeno funil fechado com uma bolinha de algodão, coberta com miligramas de Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro para um tubo de ensaio seco.

Adicionou-se 1,0 mL de anidrido acético e agitou-se suavemente e observou-se o rápido desenvolvimento de cores. A coloração azul seguida de verde permanente é um indicativo da presença de esteroides livres. Coloração parda até vermelha indica triterpenóides pentacíclicos livres.

#### **4.3.6.2.4 Teste para Saponinas**

Tomaram-se os resíduos insolúveis em clorofórmio, separados no teste anterior, solubilizou-se em água destilada e filtrou-se a solução para um tubo de ensaio. Agitou-se fortemente o tubo com a solução, por 2 a 3 min e observou-se a formação de espuma. Uma espuma persistente e abundante indica a presença de saponinas.

#### **4.3.6.2.5 Teste de confirmação para Saponinas**

Ao conteúdo do teste anterior foram adicionados 2,0 mL de ácido clorídrico concentrado que posteriormente foi deixado em banho-maria 55 °C por uma hora. Após esfriar, o conteúdo foi neutralizado e agitado novamente. A presença de precipitado e a não formação de espuma confirma a presença de saponinas.

#### **4.3.7 Avaliação da atividade antioxidante**

##### **4.3.7.1 Determinação de Fenóis totais**

Uma alíquota dos extratos etanólicos contendo 12,5 mg de amostra foi dissolvida em metanol, transferindo quantitativamente para um balão volumétrico de 50,0 mL e o volume final completado com metanol. Desta solução retirou-se uma alíquota de 0,5 mL que foi transferida para um tubo de ensaio. Adicionou-se 2,5 mL de uma solução do reativo de Folin-Ciocalteu 10 % e 2,0 mL de uma solução de carbonato de sódio a 7,5 % recém-preparadas. Esta mistura foi mantida em um banho de água a uma temperatura de 50 °C por 5 min. Esfriou-se a amostra e fez a medida de sua absorvância a 760 nm. Preparou-se uma curva de calibração para ácido gálico em diversas concentrações na faixa de 10,0; 20,0; 30,0; 40,0; 50,0; 60,0; 70,0 e 80,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Tanto as amostras como os padrões passaram pelo mesmo tratamento. A leitura foi feita descontando-se o valor do branco. O teor de fenóis totais é determinado por interpolação da absorvância das

amostras contra uma curva de calibração construída com padrões de ácido gálico e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por g de extrato.

#### **4.3.7.2 Determinação de Taninos condensados (Proantocianidinas)**

Uma alíquota dos extratos etanólicos contendo 12,5 mg de amostra foi dissolvida em metanol, transferindo quantitativamente para um balão volumétrico de 50 mL e o volume final completado com metanol. Desta solução retirou-se uma alíquota de 2,0 mL e transferiu-se para um tubo de ensaio. Neste tubo adicionou-se 3,0 mL de uma solução recém-preparada de vanilina em ácido sulfúrico 70 % (v v<sup>-1</sup>) na concentração de aproximadamente 5,0 mg L<sup>-1</sup>. A mistura é mantida em um banho de água a uma temperatura de 50 °C por 15 min.

A amostra foi esfriada e a absorvância medida a 500 nm utilizando-se cubetas de vidro, tendo como branco o metanol e todos os reagentes, menos o extrato. O teor de taninos condensados foi determinado por interpolação da absorvância das amostras contra uma curva padrão, construída com padrões de catequina. A curva padrão é construída nas mesmas condições da reação com amostra onde a amostra foi substituída pela catequina. Os resultados são expressos como mg de EC (equivalentes de catequina) por grama de extrato.

#### **4.3.7.3 Análise quantitativa da atividade antioxidante (Método DPPH)**

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante foi feita seguindo a metodologia descrita na literatura, monitorando-se o consumo do radical livre DPPH<sup>•</sup> (radical 1,1-difenil-2-picrilidrazila,) pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorvância de soluções de diferentes concentrações. Estas medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda de 517 nm, tendo como controle positivo o ácido gálico.

#### 4.3.7.3.1 Construção da curva de calibração do DPPH

Primeiramente, serão preparados 50,0 mL de solução estoque de DPPH em metanol na concentração de  $40,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , mantendo-se sob-refrigeração e protegida da luz. Foram feitas diluições de 50,0; 45,0; 40,0; 35,0; 30,0; 25,0; 20,0; 15,0; 10,0; 5,0 e  $1,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorvância a 517 nm de todas as soluções ( $1,0$  a  $40,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), medidas em cubetas de vidro com caminho óptico de 1 cm e tendo como “branco” o metanol.

As medidas de absorvância foram efetuadas em triplicata e em intervalos de 1 min entre cada leitura. Para preparo das soluções aquosas, foi utilizada água ultra purificada em sistema Millipore Milli-Q com resistividade  $\geq 18 \text{ M}\Omega \text{ cm}$ .

#### 4.3.7.3.2 Leitura das medidas de absorvância nas amostras

Soluções dos extratos etanólicos e dos controles positivos em metanol foram diluídos nas concentrações de 250,0; 200,0; 150,0; 100,0; 50,0 e  $25,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . As medidas das absorvâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra ou do controle positivo e 2,7 mL da solução estoque de DPPH na concentração de  $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) foram feitas a 517 nm, no 1º, 5º e 10º min até completar 1 hora. A mistura de metanol (2,7 mL) foi utilizada como branco.

A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorvância no tempo de 30 min para cada concentração testada, foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes (% DPPH<sub>REM</sub>), conforme a Equação 3:

$$\% \text{ DPPH}_{\text{REM}} = [\text{DPPH}]_{T=t} / [\text{DPPH}]_{T=0} \times 100 \quad (\text{Equação 3})$$

Onde  $[\text{DPPH}]_{T=t}$  corresponde à concentração de DPPH no meio, após a reação com o extrato e  $[\text{DPPH}]_{T=0}$  é a concentração inicial de DPPH, ou seja,  $40 \text{ mg mL}^{-1}$  ( $100 \mu\text{mol mL}^{-1}$ ). A concentração eficiente, ou a quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50 % (CE<sub>50</sub>), será determinada usando o programa Microcal Origin 7.5, a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando-se na abscissa as concentrações da amostra ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) ou do

controle positivo e na ordenada, a porcentagem de DPPH remanescentes (% DPPH<sub>REM</sub>). Esse método para a determinação do CE<sub>50</sub> utilizando o recurso computacional já está devidamente estabelecido e conferido pelo laboratório de produtos naturais e espectroscopia, sendo utilizando pelo grupo de pesquisa em todas as suas análises (MORAIS (d) et al., 2003).

Os valores de absorvância em todas as concentrações testadas, no tempo de 30 min, foram também convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA), determinada pela Equação 4:

$$\% AA = \{[Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100\} / Abs_{controle} \quad (\text{Equação 4})$$

Onde: Abs<sub>controle</sub> é a absorvância inicial da solução metanólica de DPPH e Abs<sub>amostra</sub> é a absorvância da mistura reacional (DPPH + amostra).

#### **4.3.8 Atividade Antimicrobiana**

As análises de atividade antimicrobiana foram feitas no laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada – LAPEMA – da Universidade de Franca – UNIFRAN. A metodologia utilizada para a avaliação dos extratos brutos e partições foi a microdiluição em caldo para a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM's) frente a microrganismos, e que se encontra no Anexo 1.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os rendimentos obtidos na extração por maceração dos materiais vegetais constam na Tabela 2 e todos os materiais vegetais resultaram em uma boa quantidade de material vegetal que viabilizou a realização dos experimentos.

**Tabela 2:** Rendimentos dos extratos etanólicos estudados.

<b>Material vegetal</b>	<b>Rendimento (%)<sup>*</sup></b>
<b>Folha</b>	<b>36,61 %</b>
<b>Casca</b>	<b>22,72 %</b>
<b>Madeira</b>	<b>12,42 %</b>

<sup>\*</sup> **Rendimento (%) = (massa de extrato/massa de material vegetal) x 100**

### 5.1 DETERMINAÇÃO DO TEOR DE UMIDADE

A umidade das folhas, cascas e madeira deve ser conhecida a fim de que a água existente não seja quantificada como produto em algumas análises executadas. A massa utilizada faz referencia à massa seca, subtraindo-se a porcentagem de água e tomando-se uma massa maior para compensar a umidade. O teor de umidade encontrado no vegetal seco encontra-se na Tabela 3.

**Tabela 3:** Determinação do teor de umidade do vegetal seco (%).

<b>Material vegetal</b>	<b>Umidade (%)<sup>*</sup></b>
<b>Folha</b>	<b>8,8 % ± 0,5</b>
<b>Casca</b>	<b>8,0 % ± 0,5</b>
<b>Madeira</b>	<b>9,0 % ± 0,5</b>

Os valores encontrados são considerados relativamente altos para um vegetal seco (próximo de 10 %), pois se trata de um vegetal característico do cerrado, que possui mecanismos para evitar a perda de água. Suas folhas coriáceas são caracterizadas



pela presença de uma cutícula que envolve a epiderme da folha diminuindo a perda de água por transpiração.

## 5.2 DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS MACROMOLECULARES DA CASCA E MADEIRA DE *C. Sessilis* (Vell.) Kuntze

Em uma outra amostra foi realizada a análise dos compostos macromoleculares da casca e madeira (lignina e holocelulose). Para essa análise é necessário remover os extrativos a fim de evitar que produtos de condensação com a lignina sejam formados (KLOCK *et al.*, 2005). Os rendimentos obtidos na extração por maceração dos materiais vegetais constam na Tabela 2 e todos os materiais vegetais resultaram em quantidades apreciáveis de material vegetal que viabilizaram a realização dos experimentos.

Os rendimentos das extrações da casca e madeira encontram-se na Tabela 4.

**Tabela 4:** Rendimento (%) das extrações da casca e madeira.

Solvente	Rendimento das extrações (%)	
	Casca	Madeira
Cicloexano	0,09	0,41
Cicloexano: etanol (2:1)	49,10	0,64
Clorofórmio	0,18	0,61
Água	2,07	2,95
<b>Total de extrativos</b>	<b>51,44 %</b>	<b>4,61 %</b>

Os valores dos constituintes químicos macromoleculares de cascas e madeira da *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze encontram-se na Tabela 5. Dos solventes utilizados na extração, a mistura de cicloexano: etanol (2:1) foi a mais eficiente para a casca e a água para madeira, representando 49,1 % e 2,95 %, respectivamente, do total da extração. Pode-se inferir que a maioria dos extrativos presentes na casca é pouco polar, e na madeira sejam mais polares porque a mistura cicloexano: etanol (2:1) foi o sistema com

maior porcentagem de extração e os extrativos constituintes das cascas sejam apolares, porque o cicloexano foi o solvente com maior porcentagem na remoção dos compostos orgânicos.

**Tabela 5:** Constituintes químicos macromoleculares (%) da casca e da madeira da *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze

CONSTITUINTES	CASCA*	MADEIRA
Extrativos	51,44 ± 3,35	4,61 ± 1,40
Lignina de Klason	28,5 ± 1,10	24,0 ± 1,20
Lignina solúvel em ácido	-	0,5 ± 0,01
Holocelulose	20,0 ± 1,80	72,0 ± 2,10
Cinzas	1,3 ± 0,50	0,8 ± 0,04
<b>Total</b>	<b>101,24 ± 6,75</b>	<b>101,91 ± 4,75</b>

\* o hífen indica que na determinação o valor não foi significativo.

Comparando esses resultados com os encontrados para *Kielmeyera coriácea* (MARTINS, 2012) a casca de *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze apresenta mais extrativos e lignina de Klason nas cascas e menos holocelulose. A madeira apresentou teores estatisticamente iguais (72 %) de holocelulose quando comparado com os estudos de *Kielmeyera coriácea*.

Como esperado, a casca possui mais extrativos do que a madeira, e esta mais holocelulose do que a casca. As porcentagens totais dos constituintes químicos da casca e madeira não foram iguais a 100 %. Porém, esse resultado é esperado, devido à deficiência do método analítico. De acordo com Browning (1967), a falha no somatório total dos constituintes pode ser atribuída a alguns fatores como: sobreposição na análise, presença de impurezas e interferências de outros componentes. É comum a porcentagem total variar de 95 a 102 %. Entretanto os valores encontrados acima de 102 % são aceitáveis devido aos problemas que acontecem durante análise química.

### 5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES VOLÁTEIS PRESENTES NO ÓLEO ESSENCIAL DAS FOLHAS, CASCAS E MADEIRA POR CG-EM.

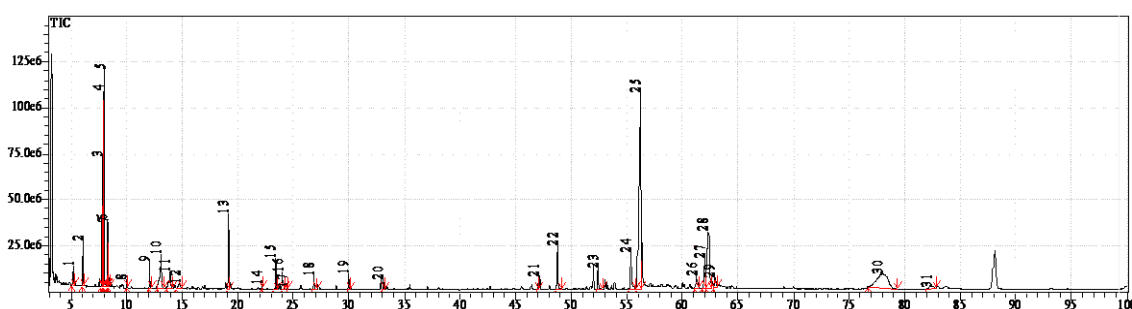
Ainda não foram relatados estudos referentes à análise do óleo essencial das partes aéreas de *C. Sessilis* (Vell.) Kuntze do Cerrado Mineiro. A Tabela 6 mostra os rendimentos (%) obtidos do óleo essencial de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze em base seca.

**Tabela 6:** Rendimentos dos óleos essenciais de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze.

Amostra	Rendimento (%)
Folha	$0,70 \pm 0,02$
Casca	$0,50 \pm 0,05$
Madeira	$0,30 \pm 0,04$
<b>Total</b>	$1,50 \pm 0,11$

O maior rendimento do óleo foi encontrado para as folhas. Esses resultados das folhas estão próximos dos teores de óleos essenciais encontrados para as folhas de *C. pubescens*, onde foram encontrados valores de  $0,64 \pm 0,06$  e  $0,15 \pm 0,01$  para o caule (ROCHA , 2011), bem como para as folhas de *Kielmeyera coriácea* (MARTINS, 2012), onde foi encontrado o valor de  $0,7 \pm 0,1$ .

A Figura 13 mostra o cromatograma de CG-EM do óleo essencial das folhas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze, onde foram identificados 31 compostos representativos para a sua análise em triplicata.



**Figura 13:** Cromatograma de CG-EM do óleo essencial das folhas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze.

A Tabela 7 mostra os 31 compostos identificados por CG-EM óleo essencial das folhas da *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze.

**Tabela 7:** Principais constituintes voláteis identificados no óleo das folhas da *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze por CG-EM.

PICO (N.)/COMPOSTO	MM	IKc	Área do pico (%TIC)
1- Pent-2-en-1-ol	86,0	749	0,75
2- Hexanal	100,0	800	2,00
3- (E)-Hex-2-enal	98,0	854	7,06
4- Hex-4-en-1-ol	100,0	8114	9,43
5- Hex-3-en-1-ol	100,0	815	5,08
6- Hex-2-en-1-ol	100,0	821	2,53
7- Hexan-1-ol	102,0	822	2,03
8- Hexa-2,4-dienal	96,0	863	0,27
9- (Z)-Hept-2-enal	112,0	911	1,08
10- Octenóis	-	935	3,37
11- Ácido Hex-3-enóico	114,0	953	1,90
12- Ácido Hex-2-enóico	114,0	975	0,75
13- Linalol	154,0	1077	3,46
14- (E)-2-Nonenal	140,0	1148	0,14
15- 3-Hexenil éster	170,0	1177	1,43
16- $\alpha$ -Terpineol	154,0	1192	0,91
17- Decanal	156,0	1201	0,09
18- (E)-Geraniol	154,0	1258	0,76
19- 4-Vinilguaicol + (E,E)-2,4-decadienal	-	1331	0,92
20- Hexanoato de (Z)-Hex-3-enila	172,0	1398	0,68
21- Hexadecanal	240,0	1733	0,63
22- Ácido Mirístico	228,0	1773	3,06

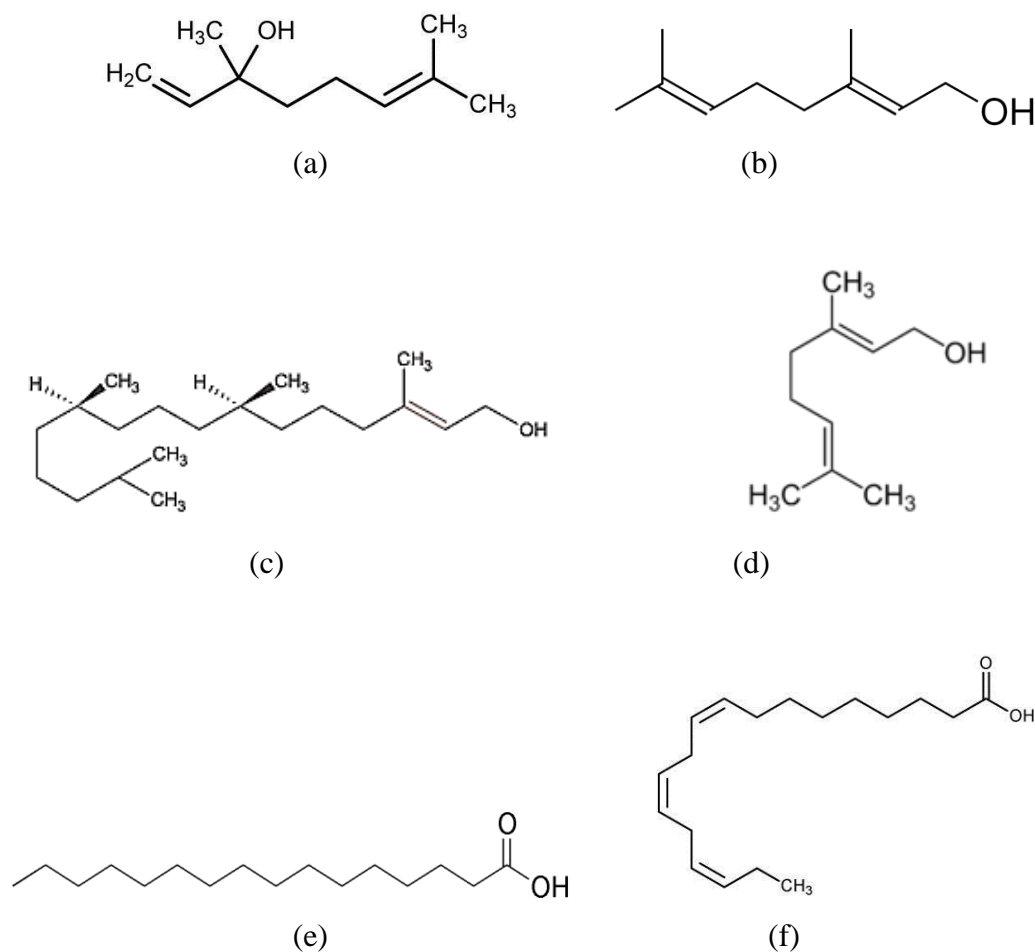
23- Ácido Pentadecanóico	242,0	1859	1,40
24- Ácido 9-Hexadecanóico	254,0	1928	3,23
25- Ácido n-Hexadecanóico	256,0	1942	24,73
26- Fitol	296,0	2068	0,83
27- Ácido Linoleico	280,0	2085	2,93
28- Ácido Linolênico	278,0	2093	6,91
29- Ácido Estearico	284,0	2106	1,08
30- Alcano de cadeia longa	-	2461	9,90
31- Alceno de cadeia longa	-	2565	0,66
<b>Total do óleo (%)</b>			<b>100,0</b>
<b>Rendimento do óleo (%) (m.m<sup>-1</sup>), base seca</b>			<b>0,7 ± 0,1</b>

IKc = índice de Kovats calculado

A composição do óleo essencial presente nas amostras das folhas de *C. Sessilis* (Vell.) Kuntze apresentou muito poucos compostos, diferenciando-se enormemente em quantidade daqueles encontrados para óleos de folhas de outras plantas do cerrado estudadas no nosso grupo de pesquisa, como exemplos a *Campomanesia Pubescens* O. Berg (gabirola peluda), (ROCHA, 2011) e a *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc (pau santo) (MARTINS, 2012).

O Linalol (3,46 %), o  $\alpha$ -Terpineol (0,91 %) e o diterpeno Fitol (0,83 %), e o (*E*)-Geraniol (0,76 %) foram os únicos terpenos (monoterpenos oxigenados) encontrados, representando cerca de 6,0 % do total do óleo. O Linalol apresenta atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina (MRSA, sigla em inglês; difusão em disco) e contra *S. enteritidis* (MIC 20.0-80.0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (ROLLER et. al., 2009). O geraniol apresenta-se como alternativa para controle de larvas (larvicida) de *Aedes aegypti* (SIMAS et. al, 2003). O  $\alpha$ -Terpineol teve ação anticonvulsivante, aumentando o tempo de latência para convulsões (de SOUSA, 2007). Segundo Sivropoulou (SIVROPOULOU et. al, 1996), óleos essenciais compostos de Carvacrol, Timol e Terpineol exibiram elevados níveis de atividade antimicrobiana contra estirpes de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas. O Fitol presente no óleo essencial das folhas apresenta efeito anti-inflamatório e antinociceptivo (LEITE, 2010).

A Figura 14 apresenta as estruturas do Linalol, do  $\alpha$ -Terpineol, do Fitol, do (*E*)-Geraniol, do Ácido n-Hexadecanóico e do Ácido Linolênico.



**Figura 14:** Estruturas químicas do Linalol (a),  $\alpha$ -Terpineol (b), do Fitol (c), do (*E*)-Geraniol (d), do Ácido n-Hexadecanóico (e) e do Ácido Linolênico (f).

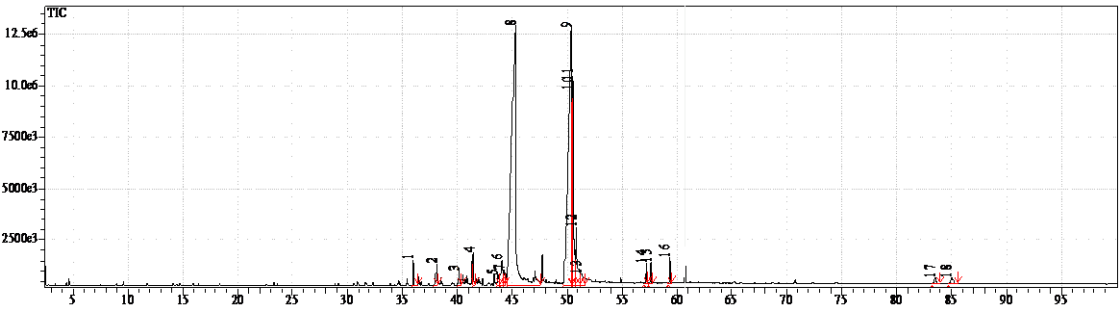
Entretanto, os componentes principais do óleo essencial das folhas de *C. Sessilis* (Vell.) Kuntze foram ácidos orgânicos de cadeia longa (como o Ácido n-Hexadecanóico (24,73 %) e o Ácido Linolênico (6,91 %)). O total destes ácidos orgânicos representa 46,0 % do total do óleo. O ácido n-Hexadecanóico está presente no híbrido citrumelo Swingle (16,0 %), utilizado como porta-enxerto para mudas cítricas. Este ácido apresentou atividade antimicrobiana contra patógenos humanos como *B. subtilis* e *E. coli* (MIC 10 mg mL<sup>-1</sup>) (PAVITHRA et. al. 2009). O ácido n-Hexadecanóico também está presente em várias formulações cosméticas como cremes e emulsões, principalmente em cremes de barbear, servindo como diluente de outras substâncias,

fato esse que o leva a ser encontrado como contaminantes em vários rios que circundam cidades metropolitanas (VIOLA, 2008).

Ainda destacam-se os alcoóis de cadeia curta (como o Cicloex-4-en-1-ol, o Hex-3-en-1-ol, Hex-2-en-1-ol, Hexan-1-ol, e Octenóis), representando 22,4% do total do óleo, e os aldeídos, representando 12,4 % do total do óleo.

Não foram observadas as presenças de germacreno D, de *trans*-Cariofileno, de Bicyclogermacreno, de Epatulenol e de Viridiflorol, que são sesquiterpenos com atividades biológicas comprovadas (FERNANDES, 2007; MONTANARI et al., 2011; LANG, 2012) e comumente encontrados em outros óleos essenciais de plantas do cerrado.

A Figura 15 apresenta o cromatograma de CG-EM do óleo essencial das cascas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze, onde são indicados apenas 18 compostos representativos para a sua análise em triplicata.



**Figura 15:** Cromatogramas de CG-EM do óleo essencial das cascas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze.

A Tabela 8 apresenta os 18 compostos identificados por CG-EM óleo essencial das cascas da *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze.

**Tabela 8:** Principais constituintes voláteis identificados no óleo das cascas da *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze por CG-EM.

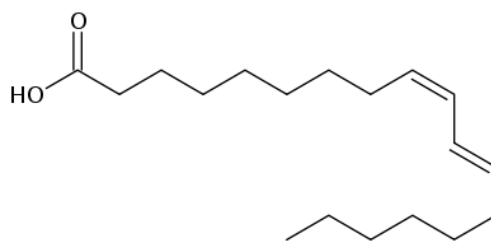
PICO (N.)/COMPOSTO	MM	IKc	Área do pico (%TIC)
1- Tetradecanal	212,0	1473	0,56
2- Ácido Tetradecanoico	228,0	1520	0,81

3- Ácido Eicosanóico	242,0	1571	0,59
4- Ácido Pentadecanóico	242,0	1602	1,03
5- Octadeca-9,12-dien-1-ol	280,0	1655	0,57
6- Ácido Octadec-9-enóico	282,0	1662	1,87
7- Ácido Hexadec-9-enóico	254,0	1667	0,67
8- n-Ácido Hexadecanóico	256,0	1690	40,11
9- Ácido Octadeca-9,12-dienóico	280,0	1810	33,20
10- Octadec-9-en-1-ol	282,0	1812	4,58
11- Ácido Octadeca-9,12,15-trienóico	278,0	1814	8,00
12- Ácido Octadecanóico	284,0	1822	3,40
13- Ácido Ciclopropaneoctanóico	334,0	1830	1,40
14- Fenol	302,0	1971	0,63
15- NI (78%)	302,0	1977	0,71
16- NI (84%)	302,0	2018	0,76
17- NI (55%)	391,0	2582	0,53
18- NI (55%)	420,0	2618	0,58
<b>Total do óleo (%)</b>			<b>100,0</b>
<b>Rendimento do óleo (%)(m.m<sup>-1</sup>), base seca</b>			<b>0,5 ± 0,05</b>

IKc = índice de Kovats calculado

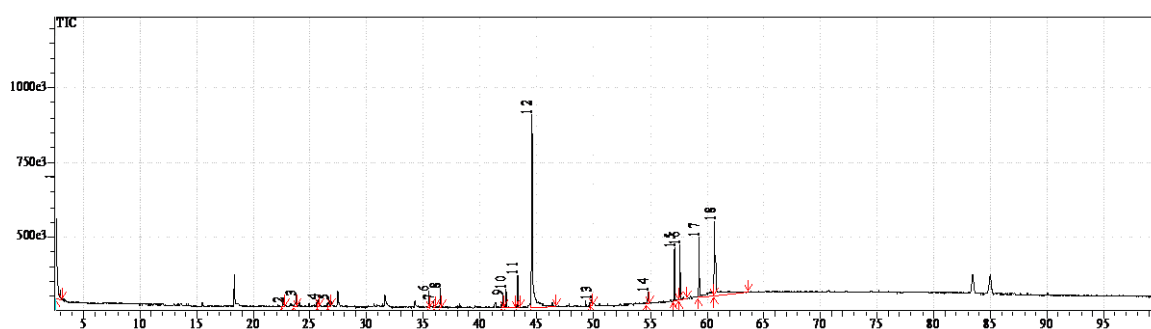
Observa-se aqui também a predominância absoluta de ácidos graxos de cadeia longa, representando 88,4 % do óleo. Os principais ácidos carboxílicos são o Ácido Hexadecanóico (40,11 %) e o Ácido Octadecadienóico 33,2 %). Mais uma vez não foram identificados sesquiterpenos na sua composição. A Figura 16 apresenta a estrutura química do Ácido Octadecadienóico.





**Figura 16:** Estrutura química do Ácido Octadeca-9,12-dienóico.

A Figura 17 apresenta o cromatograma de CG-EM do óleo essencial da madeira de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze, onde são indicados apenas 18 compostos representativos para a sua análise em triplicata.



**Figura 17:** Cromatogramas de CG-EM (a) de CG-DIC (b) do óleo essencial da madeira de *C. Sessilis* (Vell.) Kuntze.

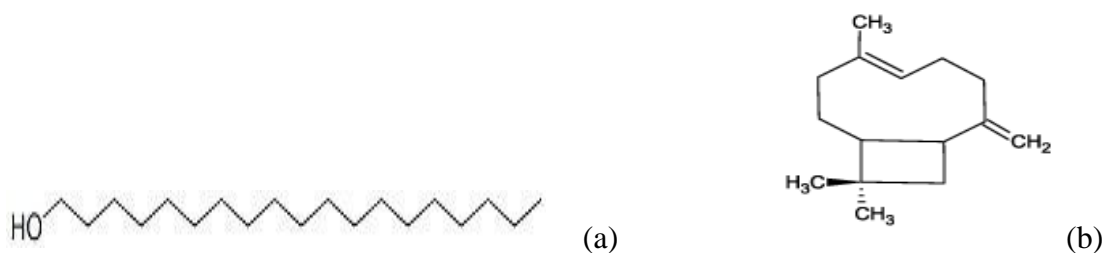
A Tabela 9 apresenta os 18 compostos identificados por CG-EM óleo essencial das cascas da *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze.

**Tabela 9:** Principais constituintes voláteis identificados no óleo da madeira da *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze por CG-EM.

PICO (N.)/COMPOSTO	MM	IKc	Área do pico (%TIC)
1- n-Nonadecanol	184,0	688	18,53
2- <i>trans</i> -Cariofileno	204,0	1160	0,72
3- NI (93%)	204,0	1183	1,35
4- 1-Cloro Tetradecano	232,0	1231	0,82
5- Cicloheptano	204,0	1252	1,03

6- Ácido Oxálico	241,0	1437	1,59
7- Tetradecanal	212,0	1472	0,83
8- Azuleno	198,0	1483	1,96
9- NI (75 %)	156,0	1612	1,32
10- NI (78 %)	262,0	1619	2,12
11- NI (79 %)	241,0	1643	3,16
12- Ácido <i>n</i> -Hexadecanóico	256,0	1675	32,23
13- Ácido Octadec-9-enóico	282,0	1798	0,81
14- Ácido Cicloexanacético	319,0	1916	1,28
15- Fenol	302,0	1970	5,17
16- NI (75 %)	302,0	1978	5,54
17- NI (86 %)	302,0	2018	7,98
18- NI (75 %)	304,0	2053	13,56
<b>Total do óleo (%)</b>			<b>100,0</b>
<b>Rendimento do óleo (%)(m.m<sup>-1</sup>), base seca</b>			<b>0,3 ± 0,04</b>
<b>IKc = índice de Kovats calculado</b>			

Também aqui ocorre a predominância de ácidos graxos de cadeia longa, representando 29,% do óleo. O principal ácido carboxílico é o Ácido Hexadecanóico (32,23 %). Ainda destacam-se o *n*-Nonadecanol (18,53 %) e o fenol (5,17%). Desta vez foi identificado o sesquiterpeno *trans*-Cariofileno (0,72 %) na sua composição. Segundo informações contidas na literatura, o *trans*-Cariofileno é utilizado para dar aroma aos cosméticos e sabonetes (GUENTHER, 1972; WINDHOLZ, 1976), além de estar relacionado a ações biológicas como atividade antioxidante, antibacteriana e antifúngica (MEVY et al., 2007). A Figura 18 apresenta as estruturas químicas do *n*-Nonadecanol (a) e do *trans*-Cariofileno (b).



**Figura 18:** Estruturas químicas do n-Nonadecanol (a) e do *trans*-Cariofileno (b).

De forma geral, pode-se afirmar que os óleos essenciais das diferentes partes da *C. Sessilis* (Vell.) Kuntze apresentam grande quantidade ácidos carboxílicos e algum potencial para a sua utilização na farmacopeia nacional.

#### 5.4 IDENTIFICAÇÃO QUALITATIVA DOS METABÓLITOS SECUNDÁRIOS PRESENTES NO EXTRATO ETANÓLICO DAS FOLHAS, CASCAS E MADEIRA DA *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze.

Os ensaios qualitativos secundários para o extrato etanólico das folhas de *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze mostraram a presença de fenóis, flavonas, flavonoides, e saponinas, e a ausência de taninos e triterpenóides. Para o extrato etanólico das cascas de *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze mostraram a presença de fenóis, flavonas, flavonoides, xantonas e saponinas, e a ausência de taninos, de esteroides e de triterpenóides. O extrato etanólico da madeira de *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze mostraram a presença de fenóis, flavonas, flavonoides, xantonas, esteroides e saponinas, e a ausência de taninos e de triterpenóides. Os resultados para os ensaios qualitativos dos extratos das folhas, cascas e madeira são apresentados na tabela 10.

**Tabela 10:** Identificação qualitativa dos metabólitos secundários do extrato etanólico da folha, casca e madeira da *C. sessilis* (Vell.) Kuntze.

Classes de compostos	Resultado Folha	Resultado Casca	Resultado Madeira	Testes
Fenóis	++	++	++	Solução Alcoólica de cloreto férrico
Taninos	-	-	-	Solução Alcoólica de cloreto férrico
Flavonas, Flavonóis e Xantonas	+	++	+	Shinoda
Esteroides	+++	-	+++	Liebermann- Burchard
Triterpenóides	-	-	-	Liebermann- Burchard
Saponinas	+++	++	+++	Espuma
Confirmatório para Saponinas	++	+	++	Precipitado

(-) Não há extrativo; (+) Baixa concentração; (++) Média concentração; (+++) Alta concentração.

Os metabólitos secundários possuem várias funções no desenvolvimento e na defesa para crescimento dos vegetais, como por exemplo, defendendo o vegetal contra herbívoros e ainda tendo função atrativa de agentes polinizadores e ação alelopática (HARBONE, 1997 e 1991).

Nas folhas, cascas e madeiras de *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze foram encontrados derivados fenólicos que apresentam propriedades antioxidantes, bactericida e cicatrizante em feridas cutâneas, o que confere um valor etnofarmacológico ao gênero (MATSUMOTO, 2010). Os flavonoides que possuem 15 átomos de carbono na cadeia carbônica principal constituem uma classe importante de polifenóis apresentam atividades variadas como antimicrobiana, antiviral, antitumoral, antioxidante, entre outras.

A alelopatia, que é a liberação de substâncias que causam efeitos benéficos ou maléficos sobre outros vegetais (RODRIGUES, 1992), está dentre as atividades biológicas dos taninos (RAWAT *et al.* 1998) e dos terpenóides (HAIG, 2008). Os taninos são substâncias fenólicas que formam complexos insolúveis com alcaloides,

gelatinas e outras proteínas. São responsáveis pelo sabor adstringente de frutos. Os flavonoides também podem ter ação alopática (ZUANAZZI e MONTANHA 1999).

Os triterpenos (30 átomos de carbono) originam-se da ciclização do esqualeno. Os esteroides (27 átomos de carbono) podem ser metabólitos dos triterpenos. As saponinas que apresentam em sua estrutura uma parte com características lipofílica e outra com características hidrofílicas que determinam suas propriedades detergentes e emulsificantes.

Em cascas do caule e folhas de plantas medicinais do cerrado como na *Myracrodruon urundeuva* Allem. (Anacardiaceae) e na *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan (Mimosaceae) também foram registradas a presença de taninos e derivados fenólicos (MONTEIRO et. al. , 2005).

Serão necessários estudos posteriores para realizar o fracionamento dos extratos brutos das folhas, cascas e madeiras a fim de identificar os princípios ativos, para buscar sintetizá-los ou potencializar sua ação, além de realizar o ensaio biológico com substâncias purificadas.

## **5.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE**

### **5.5.1 Preparação dos extratos em etanol e partição líquido-líquido**

Amostras da folha (350,0 g), da casca (500,0 g), e da madeira (200,0 g) seca e moída foram submetidas à extração com etanol em Soxhlet. Após filtração e evaporação do solvente, sob pressão reduzida em evaporador rotativo, foram obtidas 128,2 g, 113,6 g e 24,84 g de extrato bruto para a folha, casca e madeira, respectivamente.

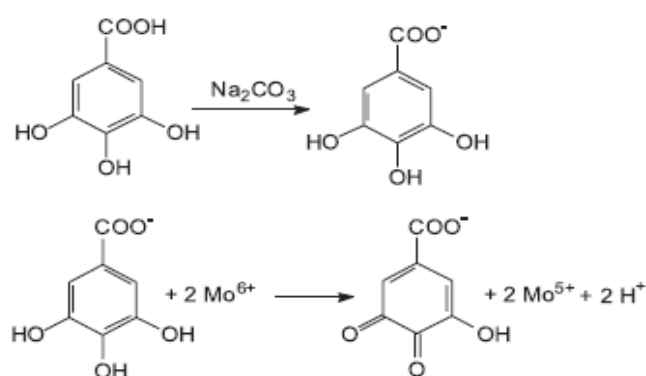
Para as partições das folhas encontramos valores de 4,83 g, 8,35 g, 1,45g e 1,89 g para os solventes cicloexano, diclorometano, acetato de etila e metanol, respectivamente. Para as partições das cascas foram encontrados os valores de 2,21 g e 4,78 g para os solventes cicloexano e diclorometano, respectivamente.

A partição líquido-líquido do extrato etanólico da madeira não foi realizada porque a massa obtida foi muito baixa, além do fato da madeira ser constituída principalmente dos componentes macromoleculares lignina e holocelulose (Tabelas 4 e 5). Este fato também foi determinante para não realizar os estudos de

atividade antioxidante e antimicrobiana destas partes da *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze para as partições líquido-líquido.

### 5.5.2 Determinação do teor de fenóis totais (FT)

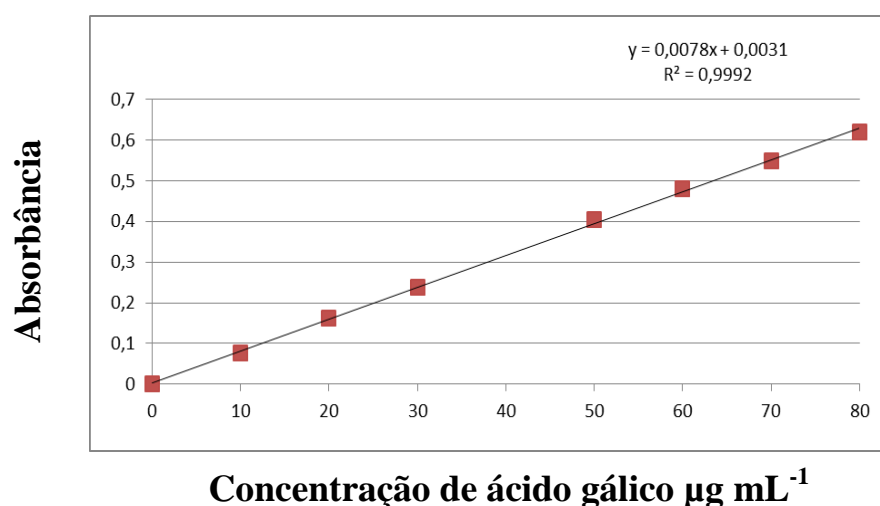
A metodologia utilizada baseia-se no uso do reagente Folin-Ciocalteu, constituído por uma mistura dos ácidos fosfomolibídico ( $\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$ ) e fosfotungístico ( $\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$ ), resultando numa solução de cor amarela. Em meio básico, ocorre a desprotonação dos compostos fenólicos, gerando ânions fenolatos. Em seguida, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion gerado e o reagente de Folin, no qual o molibdênio sofre redução, ocasionando a mudança de cor do meio reacional de amarela para azul e o composto fenólico é oxidado, como pode ser observado na Figura 19 (OLIVEIRA et. al., 2009).



**Figura 19:** Reação típica do ácido gálico com o íon molibdênio presente no reagente de Folin.

**Fonte:** OLIVEIRA (2009).

A curva de calibração para a quantificação de compostos fenólicos totais com ácido gálico equivalente foi construída mediante leituras espectrofotométricas em comprimento de onda de 760 nm de absorvância de solução padrão de ácido gálico em concentrações de 10,0 a 80,0  $\text{mg mL}^{-1}$  (Figura 20).



**Figura 20:** Curva de calibração para determinação espectrofotométrica de fenóis totais (Método Folin-Ciocalteu).

Os teores de fenóis totais, expressos em miligrama equivalente de ácido gálico por grama de amostra são mostrados na Tabela 11, em comparação com resultados para outras plantas do cerrado. Como se trata de um vegetal com poucas informações na literatura, todos os resultados são significativos.

**Tabela 11:** Teor de fenóis totais para o extrato das folhas e cascas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze em comparação com resultados para outras plantas do cerrado.

ANÁLISE	EXTRATO ETANÓLICO	
	FOLHAS	CASCAS
	35,23 ± 0,46	42,12 ± 0,93
Fenóis Totais (mg de EAG /g de amostra)	309,37 ± 3,95*	346,45 ± 1,87*
	115,0 ± 1,8**	114,0 ± 1,3**

\*Valores encontrados por MARTINS (2012) para *K. Coreaceae* (Clusiaceae).

\*\*Valores encontrados por ROCHA (2011) para *Campomanesia P. O. Berg* (Mirtácea).

O extrato etanólico da casca apresentou a maior quantidade de fenóis totais do que o das folhas. Em comparação com outros resultados para plantas do cerrado estudadas por nosso grupo, estes valores são bem inferiores aos encontrados pelo grupo

de pesquisa. ROCHA (2011) observou que para *Campomanesia Pubescens* O. Berg (gabioba peluda), que foram de 115,0 e 114,0 mg de EAG g<sup>-1</sup> (para folha e casca, respectivamente) e os valores encontrados por MARTINS (2012) para *Kielmeyera coreaceae* Mart. & Zucc, que foram de 309,0 e 346,0 mg de EAG g<sup>-1</sup> (para folha e casca, respectivamente). Esse método para a determinação do teor de fenóis totais utilizando o recurso computacional já está devidamente estabelecido e conferido pelo laboratório de produtos naturais e espectroscopia, sendo utilizando pelo grupo de pesquisa em todas as suas análises (MORAIS, 2003).

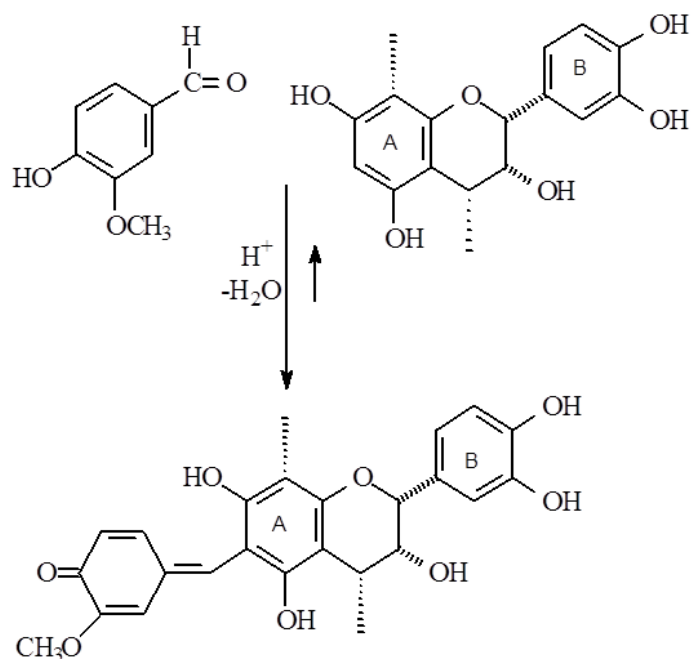
Para outras espécies também do cerrado, outros autores encontraram valores diferentes. MAGINA e colaboradores (2010) encontraram para a *Eugênia umbelliflora* (pitanga) valores de 128,0 e 105,8 mg de EAG g<sup>-1</sup> para folha e casca, respectivamente. COUTINHO e colaboradores (2008) encontraram para as folhas da *Campomanesia adamantium* (gabioba lisa) valor de 7,2 mg de EAG g<sup>-1</sup>, valor bem abaixo do observado neste trabalho.

### 5.5.3. Determinação de proantocianidinas

Os taninos condensados ou proantocianidinas são amplamente encontrados no reino vegetal. Apresentam unidades flavânicas com variações nas posições de suas ligações e na estereoquímica.

Para o método vanilina utilizado neste estudo, a quantificação envolve uma reação do grupo aldeído da vanilina com um anel metassubstituído dos flavonoides, formando complexos coloridos que absorvem em 500 nm (Figura 21).

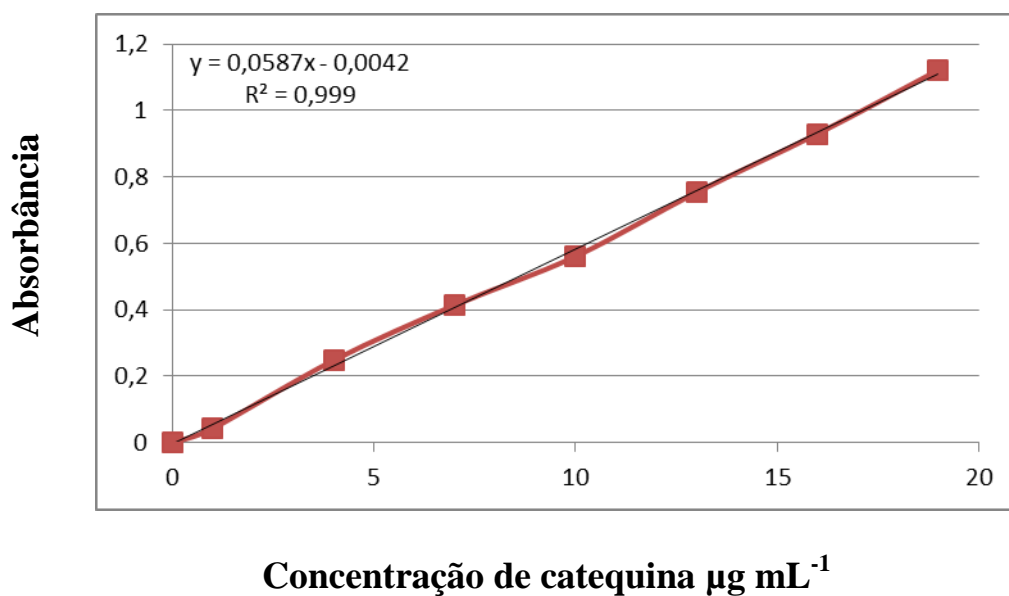




**Figura 21:** Reação da vanilina com o anel A da proantocianidina.

**Fonte:** SCHOFIELD (2001).

A partir de soluções com concentrações conhecidas de catequina, traçou-se uma curva analítica de calibração em função das concentrações das soluções de catequina e das medidas de absorvância.



**Figura 22:** Curva de calibração para determinação espectrofotométrica de proantocianidinas (Método da Vanilina).

A partir dos valores de absorvância medidos das amostras em 500 nm, e empregando-se a equação da reta obtida pela curva de calibração da catequina, os teores de proantocianidinas (taninos condensados) foram obtidos e são mostrados na Tabela 12 em comparação com resultados para outras plantas do cerrado.

**Tabela 12:** Teor de proantocianidinas para os extratos etanólicos das folhas e cascas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze.

ANALISE	EXTRATO ETANÓLICO	
	FOLHAS	CASCAS
	133,6 ± 0,021	111,1 ± 0,023
Proantocianidinas (mg de ECAT/g de amostra)	109,0 ± 1 <sup>*</sup>	328,0 ± 1 <sup>*</sup>
	17,3 ± 0,5 <sup>**</sup>	7,6 ± 0,3 <sup>**</sup>

<sup>\*</sup>Valores encontrados por MARTINS (2012) para *K. Coreaceae* (Clusiaceae).

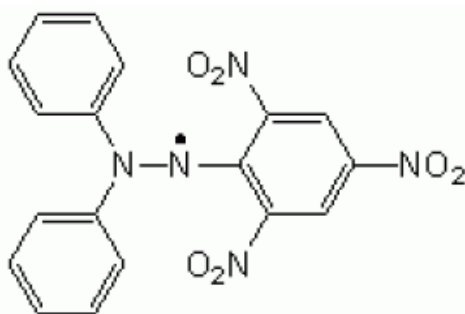
<sup>\*\*</sup>Valores encontrados por ROCHA (2011) para *Campomanesia P. O. Berg* (Mirtácea).

O extrato etanólico da folha apresentou maior quantidade deste polifenol. Estes resultados são bem superiores aos encontrados por ROCHA (2011), e BRUM e CARDOSO (1999) para *Campomanesia pubescens O. Berg* do cerrado. As proantocianidinas possuem função de defesa à exposição térmica e mecânica das plantas, bem como proteção contra animais herbívoros (possuem sabor adstringente). A maior concentração de proantocianidinas nas folhas explica este fato. Entretanto, MARTINS (2012) encontrou valor de proantocianidinas cerca de três vezes maior na casca de *Kielmeyera coreaceae* Mart. & Zucc (Tabela 12).

#### 5.5.4 Atividade antioxidante e cálculo do CE<sub>50</sub>

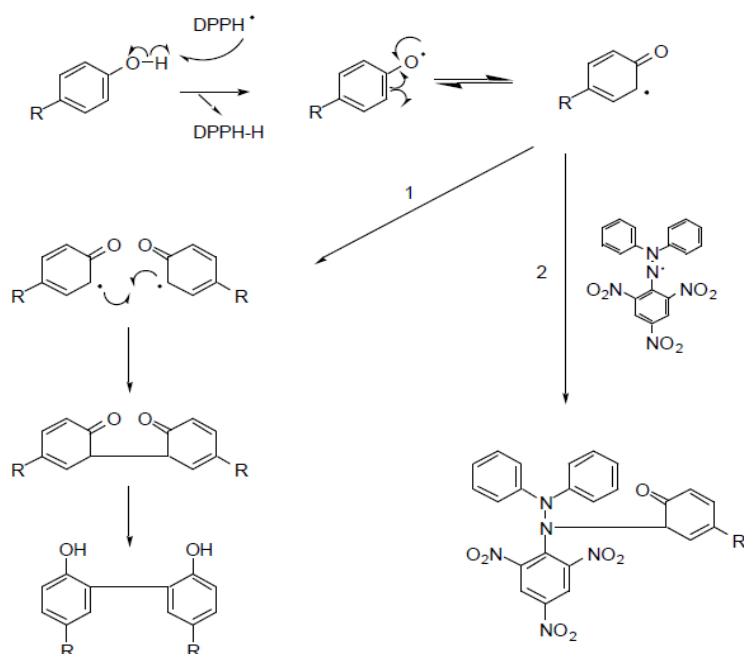
Para determinar a atividade antioxidante de uma amostra, um dos métodos que podem ser utilizados é através da quantificação da ação sequestrante do radical livre DPPH<sup>·</sup>. A metodologia para verificar a capacidade antioxidante baseia-se em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH<sup>·</sup>), que possui

coloração violeta, e absorve em 517 nm. A Figura 23 apresenta a estrutura do radical livre DPPH<sup>•</sup>.



**Figura 23:** Estrutura química do radical livre DPPH<sup>•</sup>.

Numa reação típica, o radical DPPH<sup>•</sup> é reduzido e forma-se a 2,2-difenilpicrilidrazina (DPPH-H) por meio da ação do antioxidante (A—H), originando uma solução de coloração amarela. Através do decréscimo da absorvância, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante, ou seja, a quantidade do radical DPPH<sup>•</sup> que é consumido pelo antioxidante ou a porcentagem do radical livre DPPH que permanece no meio reacional (BRAND-WILLIAMS et. al., 1995; OLIVEIRA et al., 2009). A Figura 24 apresenta a reação radicalar típica do radical livre DPPH<sup>•</sup> com os compostos fenólicos.

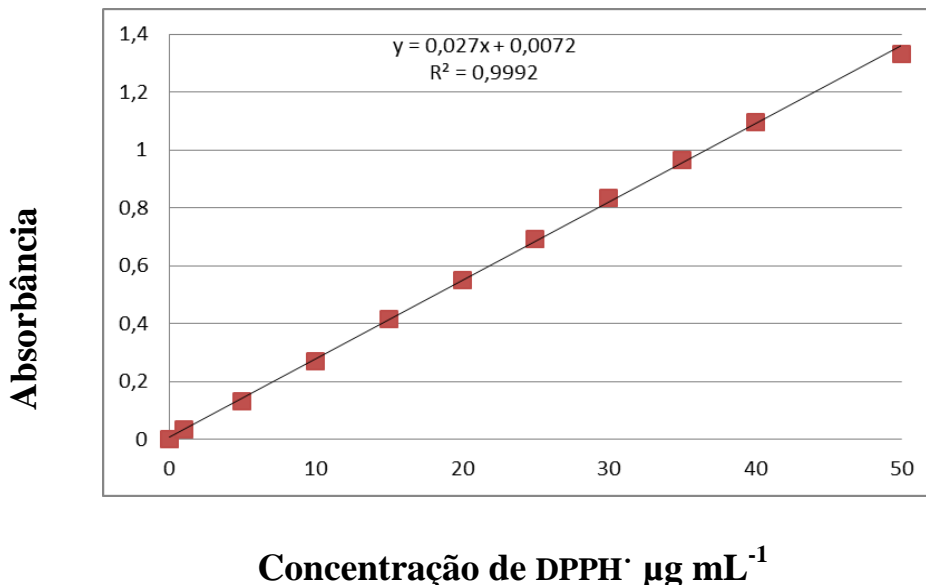


**Figura 24:** Reação típica do radical livre DPPH<sup>•</sup> com os compostos fenólicos.

**Fonte:** BRAND-WILLIAMS (1995)

Os compostos com ação antioxidante possuem a capacidade de reagir com os radicais livres e transformá-los em espécies estáveis não reativas.

A partir da medida das absorvâncias de soluções com concentrações conhecidas do radical livre DPPH<sup>·</sup> foi construída a curva analítica de calibração que é apresentada na figura 25.

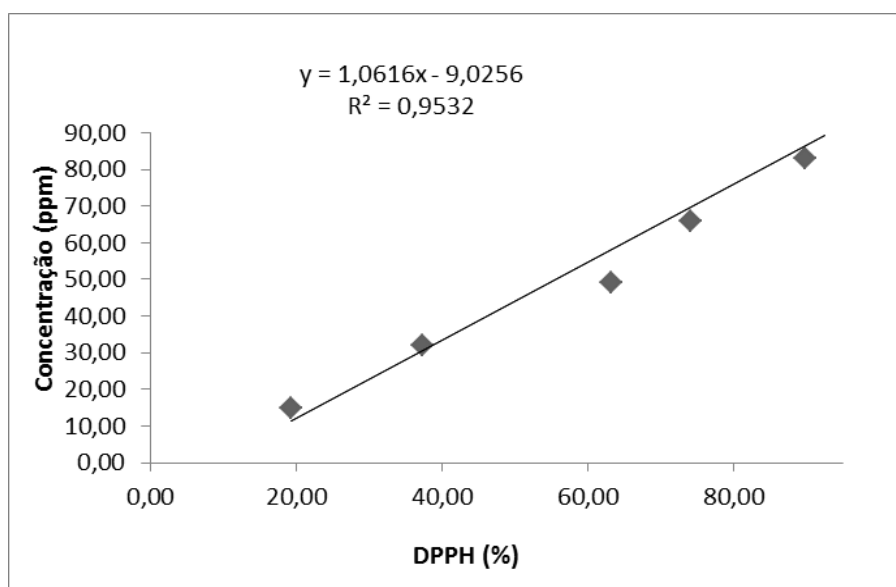


**Figura 25:** Curva de calibração para determinação espectrofotométrica da atividade antioxidante (Método DPPH<sup>·</sup>).

Para a determinação da atividade antioxidante e para o cálculo do CE<sub>50</sub> do extrato bruto e das partições de folhas e cascas foram realizadas análises em triplicatas.

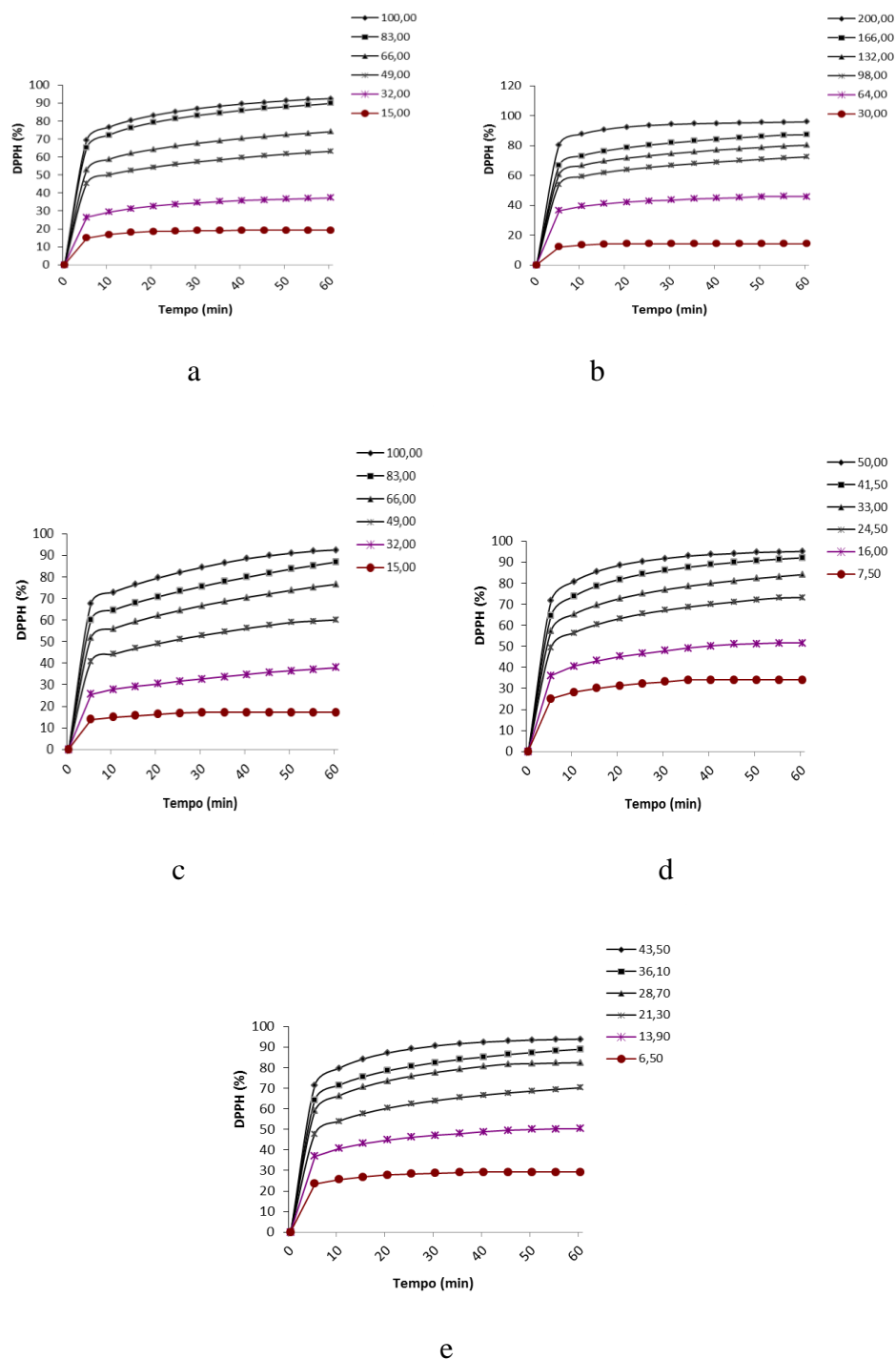
#### **5.5.4.1 Atividade antioxidante para o extrato etanólico bruto e partição das folhas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze.**

Primeiramente, para as folhas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze foi determinada a atividade do extrato etanólico bruto e de suas partições em função do consumo DPPH<sup>·</sup> para várias concentrações (µg mL<sup>-1</sup>).



**Figura 26:** Gráfico típico do consumo de DPPH em função das diferentes concentrações do extrato das folhas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze.

Os gráficos obtidos para a cinética da atividade antioxidante das amostras de folhas (extrato bruto e partições) nas seis concentrações estudadas (em ppm) estão apresentadas nas Figura 27.



**Figura 27:** Gráfico do comportamento cinético da atividade antioxidante do extrato bruto (a) e partições (b-e) das folhas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze em diferentes concentrações.

Pode-se verificar que para os extratos etanólicos, as maiores porcentagens de sequestro do radical DPPH· ocorreram nas partições acetato de etila e metanol. Esse fato se deve em função do aumento de polaridade do solvente utilizado para realizar a partição.

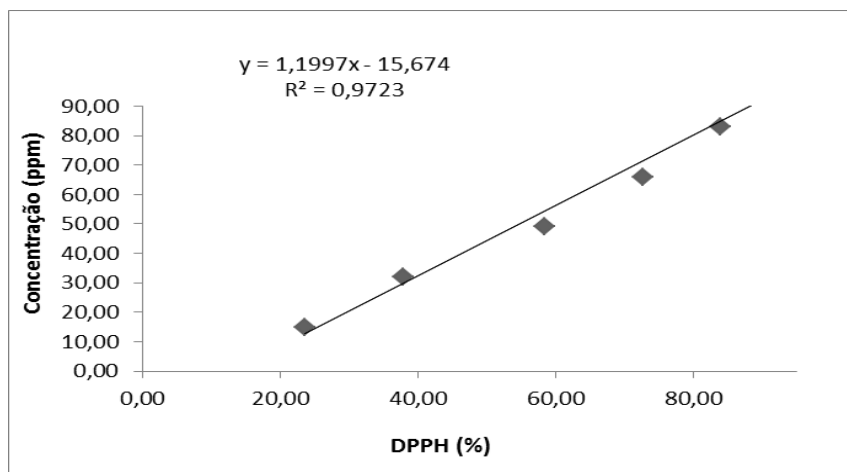
**Tabela 13:** Valores de  $CE_{50}$  para extrato etanólico e partições para extrato bruto e partições das folhas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze.

AMOSTRA	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$CE_{50}$ (mg extrato /mg de DPPH)
EXTRATO BRUTO	$38,94 \pm 2,59$	$2,38 \pm 0,0643$
Partição cicloexano	$79,67 \pm 4,19$	$4,96 \pm 0,11$
Partição diclorometano	$38,165 \pm 5,92$	$2,35 \pm 0,43$
Partição acetato de etila	$17,972 \pm 2,72$	$1,0 \pm 0,199$
Partição metanol	$15,79 \pm 1,017$	$0,94 \pm 0,075$

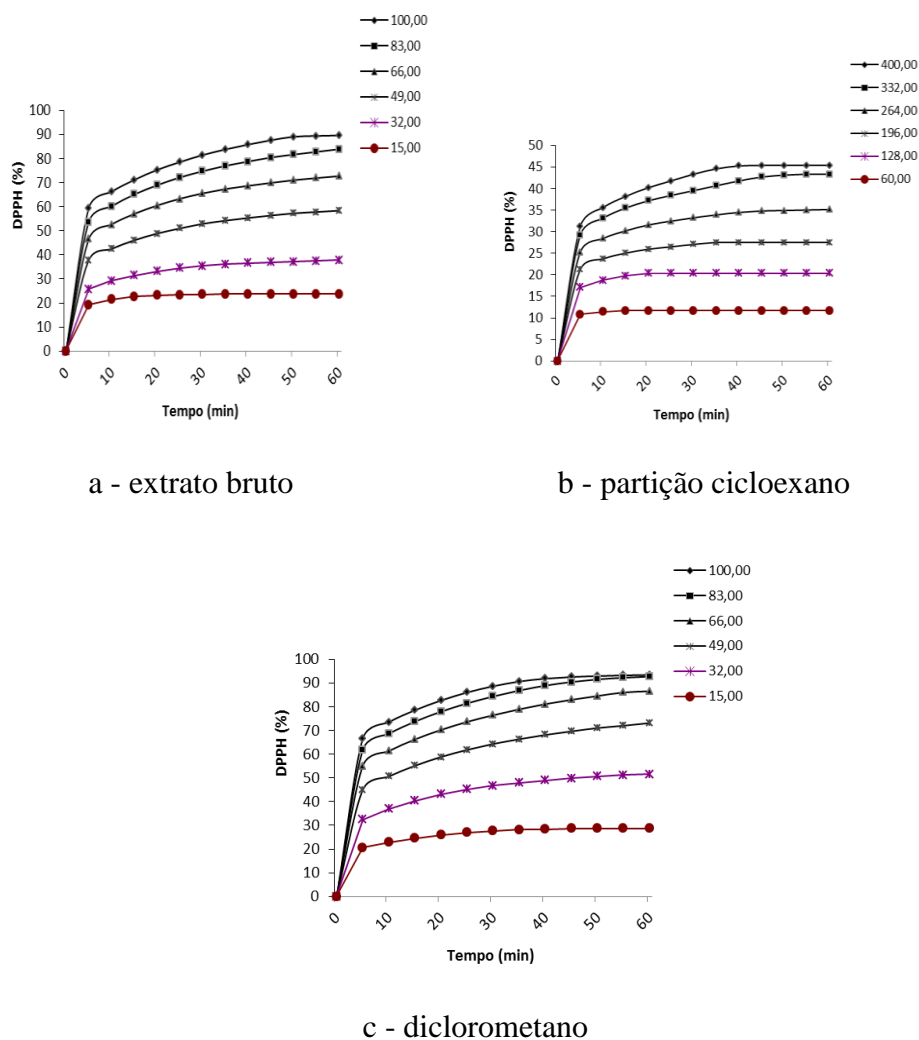
A Tabela 13 apresenta os valores de  $CE_{50}$  para o extrato etanólico bruto e partições das folhas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze. De acordo com o apresentado podemos notar que os melhores valores são encontrados para as partições acetato de etila e metanol ( $17,972 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $15,79 \mu\text{g mL}^{-1}$  respectivamente). O valor de  $CE_{50}$  representa a concentração de amostra necessária para sequestrar 50 % do radical livre DPPH. Valores de  $CE_{50}$  menores que  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$  são considerados muito ativos, de  $50 - 100 \mu\text{g mL}^{-1}$  são moderadamente ativos, de  $100 - 200$  são pouco ativos. Já valores acima de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  são considerados resultados inativos (REYNERTSON et al., 2005). De acordo com a Tabela 13 apenas a partição cicloexano é considerada moderadamente ativa ( $79,67 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), enquanto todas as demais amostras são consideradas muito ativas.

#### 5.5.4.2 Extrato etanólico bruto e partições das cascas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze

Em seguida foi determinada a atividade do extrato etanólico bruto das cascas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze em função do consumo DPPH para várias concentrações do extrato bruto.



**Figura 28:** Gráfico típico do consumo de DPPH em função das diferentes concentrações do extrato etanólico bruto das cascas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze.



**Figura 29:** Gráfico do comportamento cinético da atividade antioxidante do extrato bruto (a) e partições (b-c) das cascas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze em diferentes concentrações.



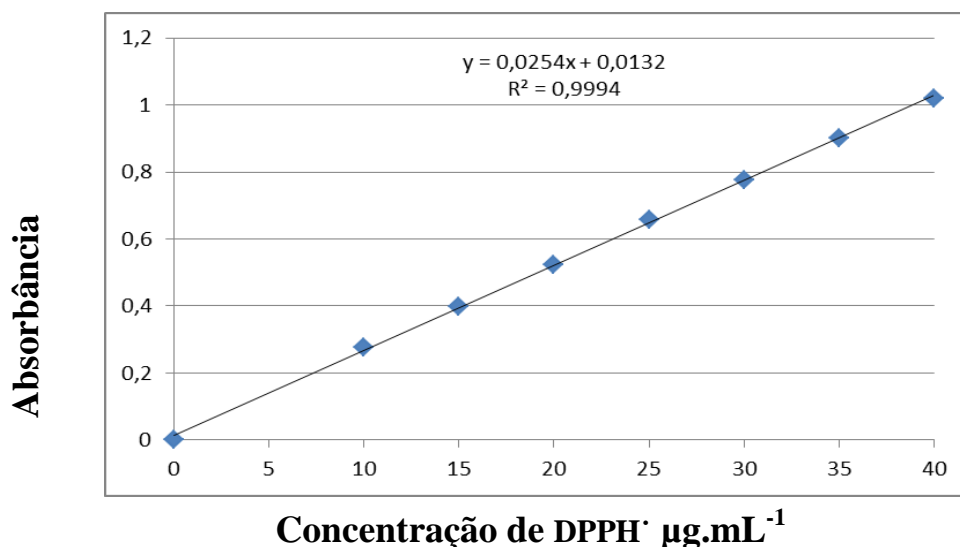
**Tabela 14:** Valores de  $CE_{50}$  para extrato etanólico bruto (a) e partições (b-c) das cascas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze.

AMOSTRA	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	$CE_{50}$ (mg extrato /mg de DPPH)
Extrato bruto	$39,73 \pm 5,01$	$2,27 \pm 0,4$
Partição cicloexano	$415,55 \pm 0,83$	$25,38 \pm 1,46$
Partição diclorometano	$33,24 \pm 0,75$	$1,68 \pm 0,10$

O resultado de  $CE_{50}$  é relevante, embora não esteja próximo do valor de  $CE_{50}$  para o padrão BHT ( $7,26 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Houve correlação positiva na concentração do extrato e consumo do radical DPPH $\cdot$ . Segundo REYNERTSON (2005), o extrato bruto e a partição em diclorometano são muito ativas (menores que  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) enquanto a partição em cicloexano é considerada inativa.

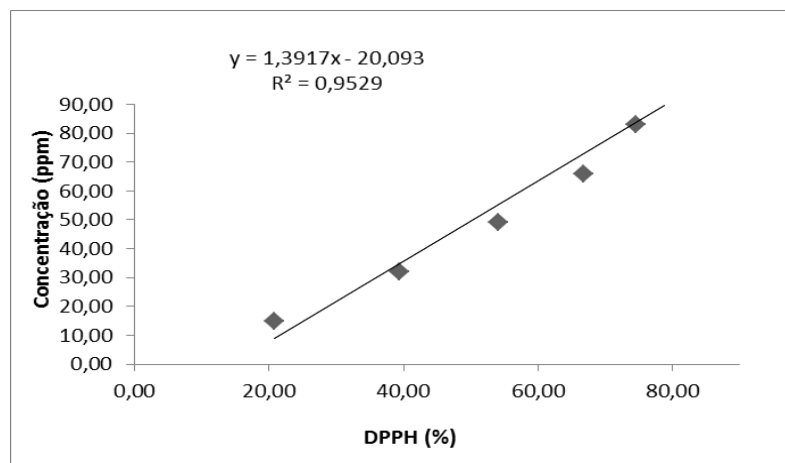
#### 5.5.4.3 Extrato etanólico bruto da madeira de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze

Para a determinação da atividade antioxidante da madeira de *C. Sessilis* (Vell.) Kuntze, foi necessário à elucidação e uma nova curva analítica do DPPH $\cdot$ , pois o extrato que foi utilizado acabou. A nova curva analítica do radical DPPH $\cdot$  está apresentada abaixo.

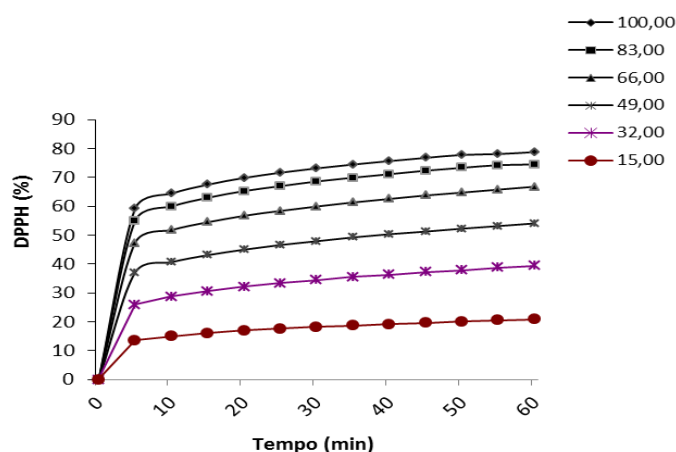


**Figura 30:** Curva de calibração para determinação espectrofotométrica da atividade antioxidante do extrato etanólico da madeira (Método DPPH).

Primeiramente foi determinada a atividade do extrato etanólico bruto da madeira de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze em função do consumo DPPH<sup>•</sup> para várias concentrações do extrato.



**Figura 31:** Gráfico do consumo de DPPH<sup>•</sup> em função das diferentes concentrações do extrato etanólico bruto da madeira de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze.



**Figura 32:** Gráfico da atividade antioxidante em função do tempo do extrato etanólico bruto da madeira de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze em diferentes concentrações.

O valor de  $CE_{50}$  foi de  $37,1 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O resultado de  $CE_{50}$  é relevante, pois é considerado muito ativo (menores que  $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), mesmo estando longe do padrão BHT ( $7,26 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

**Tabela 15:** Resultados das análises realizadas para o extrato etanólico bruto da madeira de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze.

ANALISES	EXTRATO ETANÓLICO	BHT
CE <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )	37,1 ± 2,20	7,26 ± 0,34
CE <sub>50</sub> (mg extrato /mg de DPPH)	2,03 ± 0,46	0,36 ± 0,028

Comparando-se os resultados obtidos com a *Cordia sessilis* e dados da literatura (Tabela 16) verifica-se que o valor de CE<sub>50</sub> são maiores ou menores do que algumas outras plantas do cerrado.

**Tabela 16:** Valores de CE<sub>50</sub> (µg mL<sup>-1</sup>) para extrato etanólico bruto e partições da *Cordia sessilis* (Vell.)Kuntze e comparação com *K. coreaceae* outro vegetal do Cerrado já estudado.

CE <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> ) / extrato bruto *		
Amostra	<i>Cordia sessilis</i>	<i>K. coreaceae</i> MARTINS (2012)
Folhas	38,94 ± 2,59	10,6 ± 0,7
Cascas	39,73 ± 5,01	5,9 ± 0,1
Madeira	37,1 ± 2,20	25,5 ± 3,9
CE <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> ) / cicloexano		
Folhas	79,67 ± 4,19	132,72 ± 1,60
Cascas	415,55 ± 0,83	16,04 ± 1,68
CE <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> ) / diclorometano		
Folhas	38,165 ± 5,92	12,72 ± 0,59
Cascas	33,24 ± 0,75	6, 63 ± 0,88
CE <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> ) / acetato		
Folhas	17,972 ± 2,72	-
CE <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> ) / metanol		
Folhas	15,79 ± 1,017	-
Cascas	-	4,33 ± 0,29

\* o hífen indica que na determinação o valor não foi encontrado.

## 5.6. Atividade antibacteriana

Os ensaios para avaliação da atividade antibacteriana foram realizados no laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada – LAPEMA – da Universidade de Franca – UNIFRAN com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins. A metodologia utilizada para a avaliação dos extratos brutos e partições foi a microdiluição em caldo para a determinação das concentrações inibitórias mínimas. Os resultados são apresentados nas Tabelas 17, 18, 19 e 20.

A avaliação da atividade antibacteriana através da CIM mostrou que os extratos e partições de diferentes partes aéreas de *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze possuem diferentes níveis de atividade contra cada estirpe bacteriana estudada. Quanto menor o valor de CIM, mais promissora é a atividade antibacteriana das amostras. Resultados de CIM menores de 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  são considerados promissores (RIOS et al., 2007).

**Tabela 17:** Resultados das concentrações inibitórias mínimas para as partições das folhas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze frente às bactérias aeróbias.

AMOSTRA	AERÓBIAS (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			
	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
	<i>sanguinis</i>	<i>faecalis</i>	<i>mitis</i>	<i>mutans</i>
	ATCC 10556	ATCC 4082	ATCC 49456	ATCC 25175
Part. cicloexano	> 400	> 400	400	> 400
Part. diclorometano	> 400	> 400	200	200
Part. acetato	400	> 400	200	200
Part. metanol	> 400	> 400	> 400	> 400
<b>CLORIDRATO DE CLOREXIDINA *</b>	<b>3,688</b>	<b>7,375</b>	<b>3,688</b>	<b>1,844</b>

\* CONTROLE

Houve atividade de todas as partições frente a todos os microrganismos aeróbios bucais estudados. Os valores de CIM estiveram entre 200 e 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os resultados demonstram que as partições das folhas não inibiram o crescimento das bactérias em concentrações menores que 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Diversos autores têm relatado um papel importante dos fitofármacos como alternativa no tratamento odontológico, diante das

propriedades antimicrobianas relatadas frente a afecções bucais, principalmente do biofilme dental. AKPATA e AKINRIMISI (1977) afirmam que extratos aquosos de plantas inibem o crescimento de *Streptococcus mutans*, um dos principais responsáveis pela formação da cárie.

Algumas plantas têm sido pesquisadas com o intuito de combater as infecções que acometem a cavidade bucal, principalmente as originadas pela presença do biofilme bacteriano. Ensaio *in vivo* utilizando a camomila (*Matricaria recutita* L.) como dentifrício demonstram uma redução na gengivite em 97 % dos casos relatados (RYSKY, 1991). Estudos recentes mostraram a potencialidade da *Punica granatum* na inibição do crescimento bacteriano das linhagens *Streptococcus mitis*, *S. mutans*, *S. sanguis*, *S. sobrinus*, sugerindo o emprego do extrato de romã, como meio alternativo, ao controle desses microrganismos na formação do biofilme (PEREIRA ET AL., 2006).

Apesar do valor encontrado ( $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) estar acima do desejado ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) podemos afirmar que o extrato etanólico das folhas (partição em diclorometano e acetato de etila) possui atividade promissora como alternativa odontológica no combate antibacteriano para evitar e combater a cárie. Estudos posteriores ainda devem ser realizados a fim de determinar sua citotoxicidade.

Houve atividade de todos os extratos e partições frente a todos os microrganismos anaeróbios bucais estudados. Os valores de CIM estiveram entre 50 e  $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Os resultados demonstram que as partições das folhas não inibiram o crescimento das bactérias em concentrações menores que  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

**Tabela 18:** Resultados das concentrações inibitórias mínimas para os extratos das cascas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze frente às bactérias aeróbias.

AMOSTRAS	AERÓBIAS (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			
	<i>Streptococcus</i>	<i>Enterococcus</i>	<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus</i>
	<i>sanguinis</i>	<i>faecalis</i>	<i>mitis</i>	<i>mutans</i>
	ATCC 10556	ATCC 4082	ATCC 49456	ATCC 25175
Part. cicloexano	400	> 400	25	> 400
Part. diclorometano	200	> 400	400	> 400
CLORIDRATO DE CLOREXIDINA *	1,844	7,375	3,688	3,688

As concentrações dos extratos testados para as cascas foram de 0,98  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e os do controle foram 0,115  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 59,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As amostras mais ativas frente às bactérias aeróbias foram a partição em cicloexano (CIM de 25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e em diclorometano com valores de CIM de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Nessas duas amostras os resultados de CIM foram bastante significativos e promissores, por se tratar de um extrato vegetal. Na literatura foram encontrados alguns valores inferiores, porém com o uso de óleos essenciais como apresenta CANSIAN (2010).

**Tabela 19:** Resultados das concentrações inibitórias mínimas para os extratos das folhas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze frente às bactérias anaeróbias.

AMOSTRAS	ANAERÓBIAS (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			
	<i>Actinomices</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Porphyromonas</i>
	<i>naeslundii</i>	<i>nigrescens</i>	<i>fragilis</i>	<i>gingivalis</i>
	ATCC 19039	ATCC 33563	ATCC 25285	ATCC 49417
Part. cicloexano	> 400	> 400	> 400	50
Part. diclorometano	> 400	> 400	> 400	50
Part. acetato	> 400	> 400	> 400	400
Part. metanol	> 400	> 400	> 400	100
<b>CLORIDRATO DE CLOREXIDINA *</b>	<b>3,688</b>	<b>7,375</b>	<b>3,688</b>	<b>1,844</b>

\* CONTROLE

As concentrações dos extratos testados para as folhas foram de 0,98  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , e os do controle foram 0,115  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 59,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As amostras mais ativas frente às bactérias anaeróbias foram a partição em cicloexano e em diclorometano com valores de CIM de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A partição em metanol também apresentou bom resultado de CIM (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Nessas duas amostras os resultados de CIM foram bastante significativos e promissores.

A *Porphyromonas gingivalis* é um agente patogênico periodontal, fato esse que pode levar a inúmeras doenças periodontais, como por exemplo, a periodontite, que é uma infecção persistente bacteriana. Com os valores encontrados, os extratos das folhas de *Cordia sessilis* (Vell.) se apresentam como promissoras fontes de fitofármacos para tratamento de infecções por *P. gingivalis*.

Esse micro-organismo tem sido associado também à artrite reumatoide. É causa comum de infecção em humanos, e está em uma lista curta de patógenos que estão causando grande resistência a antibióticos. Este fato demonstra a importância desses resultados, pois se podem utilizar, futuramente, esses extratos na produção de novos medicamentos. Estudos posteriores ainda devem ser realizados a fim de determinar sua citotoxicidade.

**Tabela 20:** Resultados das concentrações inibitórias mínimas para os extratos das cascas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze frente às bactérias anaeróbias.

AMOSTRAS	ANAERÓBIAS (CIM, $\mu\text{g mL}^{-1}$ )			
	<i>Actinomyces</i>	<i>Prevotella</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Porphyromonas</i>
	<i>naeslundii</i>	<i>nigrescens</i>	<i>fragilis</i>	<i>gingivalis</i>
	ATCC 19039	ATCC 33563	ATCC 25285	ATCC 49417
Part. cicloexano	> 400	> 400	> 400	> 400
Part. diclorometano	> 400	> 400	> 400	> 400
<b>CLORIDRATO DE CLOREXIDINA *</b>	<b>1,844</b>	<b>7,375</b>	<b>3,688</b>	<b>1,844</b>

\* CONTROLE

As concentrações dos extratos testados para as cascas foram de 0,195  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e os do controle foram 0,115  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 59,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Os resultados encontrados não são bons, pois todas as amostras apresentaram CIM bem superior ao desejado. As Tabelas 21-23 apresentam a comparação de CIM para extratos de folhas e cascas da *C. Sessilis* com a *K. coreaceae* estudada recentemente (MARTINS, 2012).

**Tabela 21:** Valores comparativos de CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de extratos de folhas e cascas da *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze e de outro vegetal de estudo do grupo de pesquisa frente ao microrganismo aeróbio *Streptococcus mitis*.

CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	<i>Cordia sessilis</i>	<i>Kielmeyera coreaceae</i>
<b>FOLHAS</b>	200 - 400	200 - 400
<b>CASCAS</b>	25 - 400	3,12 - 400

De acordo com os resultados apresentados na Tabela 21, podemos perceber que o extrato das cascas de *Kielmeyera coreaceae* apresentou melhor resultado que os do extrato das folhas frente ao *Streptococcus mitis*. As cascas tiveram resultados bem promissores, pois valores de CIM (concentração inibitória mínima) menores que 100 µg mL<sup>-1</sup> são excelentes. Esses resultados são de extrema importância para a população uma vez que o consumo de medicamentos fitoterápicos vem crescendo de forma acelerada, pois se trata de terapias mais econômicas e/ou naturais que aqueles normalmente oferecidos pela indústria farmacêutica, principalmente no Brasil que responde a 25 % da flora mundial (CASTILHO, 2007).

O resultado apresentado na Tabela 22 demonstra que os extratos de *K. coreaceae* são muito mais eficientes que os apresentados nos extratos de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze, podendo ser utilizada na primeira escolha no combate ao microrganismo *Streptococcus mutans*, uma vez que os valores de CIM são mais de 60 vezes menores.

**Tabela 22:** Valores comparativos de CIM (µg mL<sup>-1</sup>) de folhas e cascas da *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze e de outros vegetais de estudo do grupo de pesquisa frente ao microrganismo aeróbio *Streptococcus mutans*.

CIM (µg mL <sup>-1</sup> )	<i>Cordia sessilis</i>	<i>Kielmeyera coreaceae</i>
<b>FOLHAS</b>	200 - 400	> 400
<b>CASCAS</b>	> 400	6,25 - 400

Os resultados apresentados na Tabela 23 mostram que os extratos de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze mais uma vez não foram muito eficientes frente ao microrganismo *Streptococcus mutans*, dado que os valores de CIM são bem maiores que o desejado (100 µg mL<sup>-1</sup>).

**Tabela 23:** Valores comparativos de CIM (µg mL<sup>-1</sup>) de folhas e cascas da *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze e de outros vegetais de estudo do grupo de pesquisa frente ao microrganismo aeróbio *Streptococcus sanguinis*.

CIM (µg mL <sup>-1</sup> )	<i>Cordia sessilis</i>	<i>Kielmeyera coreaceae</i>
<b>FOLHAS</b>	> 400	200 - 400
<b>CASCAS</b>	200 - 400	6,25 - 400



Pelo exposto, temos que os extratos de folhas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze apresentaram atividade antimicrobiana frente a microrganismos aeróbios e anaeróbios. As concentrações inibitórias mínimas (CIM's) do extrato etanólico das folhas estiverem entre 200 e 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , para as bactérias aeróbias, e entre 50 e 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para as bactérias anaeróbias. As partições diclorometano e acetato apresentaram os melhores valores de CIM para os micro-organismos aeróbios *Streptococcus mitis* e *Streptococcus mutans* (200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , cada), e os mesmos valores de CIM para os demais micro-organismos aeróbios testados. As partições cicloexano e diclorometano apresentaram os melhores valores de CIM para os microrganismos anaeróbios bucais *Porphyromonas gingivalis* (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), seguida da partição metanol (100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para os mesmos microrganismos anaeróbios. Todas as demais partições estudadas apresentaram CIM elevada (igual ou maior que 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) frente aos microrganismos aeróbios e anaeróbios testados. Segundo ALIGIANIS et. al (2001), materiais vegetais com CIM até 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$  são considerados de forte inibição. Assim, e de forma geral, estes resultados mostram uma atividade antimicrobiana forte dos extratos etanólicos das folhas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze frente aos microrganismos aeróbios e anaeróbios estudados, e excelentes para o *Porphyromonas gingivalis*.

## 6 CONCLUSÕES

A análise e a quantificação dos constituintes químicos das partes aéreas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze, bem como a atividade antioxidante de seus extratos, apresentaram resultados que confirmam o uso potencial desta planta pelas populações do cerrado. Como esperado, a casca possui mais extrativos do que a madeira, e esta mais holocelulose do que a casca. Os diferentes solventes utilizados permitem inferir que a maioria dos extrativos presentes na casca é pouco polar, e os presentes na madeira são apolares.

A composição do óleo essencial presente nas amostras das folhas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze apresentou muito pouco terpenos, diferenciando-se enormemente daqueles encontrados para óleos de folhas de outras plantas do cerrado. O Linalol,  $\alpha$ -Terpineol, Fitol, (*E*)-Geraniol foram os únicos monoterpenos oxigenados, representando 5,84 % do total do óleo. Os componentes principais foram os ácidos orgânicos (como o Ácido n-Hexadecanóico (24,73 %) e o Ácido Linolênico (6,91 %)). O total de ácidos orgânicos representa cerca de 46,0 % do total do óleo. Ainda destacam-se os alcoóis de cadeia curta, totalizando 23,0 % do óleo); e os aldeídos, totalizando 12,0 %. Para as cascas, na sua maioria encontramos ácidos graxos de cadeia longa, totalizando 88,4 % do óleo, destacando-se o Ácido Hexadecanóico (40,11 %) e o Ácido Octadecadienóico (33,2 %). Na madeira, temos outra vez a predominância de ácidos graxos de cadeia longa, destacando-se o Ácido Hexadecanóico (32,23 %) e o *n*-Nonadecanol (18,53 %), sendo que desta vez foi encontrado o sesquiterpeno *trans*-Cariofileno (0,72 %).

Os resultados dos ensaios qualitativos secundários para os extratos etanólico das folhas, cascas e madeiras de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze não apresentaram uniformidade da presença das diversas classes estudadas.

Todos os resultados para fenóis totais e proantocianidinas são significativos. Houve correlação positiva entre os teores de fenóis totais e de proantocianidinas com as atividades antioxidantes dos extratos e partições estudadas. As partições em acetato de etila e metanólica dos extratos das folhas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze apresentaram as melhores e mais fortes atividades antioxidantes. As partições cicloexano desta planta apresentaram as menores atividades antioxidantes.

Os extratos de folhas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze apresentaram atividade antimicrobiana frente a microrganismos aeróbios e anaeróbios. As partições cicloexano

e diclorometano apresentaram os melhores valores de CIM para os microrganismos anaeróbios bucais *Porphyromonas gingivalis* ( $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), seguida da partição metanol ( $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) para os mesmos microrganismos anaeróbios. De forma geral, a atividade antimicrobiana dos extratos etanólicos das folhas de *C. sessilis* (Vell.) Kuntze foi efetiva, frente aos microrganismos aeróbios e anaeróbios estudados, e bastante expressivos para o *Porphyromonas gingivalis*.

Como se trata de um vegetal com poucas informações na literatura, todos os resultados são significativos.

## REFERÊNCIAS

- AAS, J.A.; PASTER, J.B.; STOKES, N.L.; OLSEN, I.; DEWHIRST, E.F. **Defining the normal bacterial flora of the oral cavity**. Journal of Clinical Microbiology. v. 43, n.11, p. 5721-5732, 2005.
- AKPATA, E.S.; AKINRIMISI, E.O. **Antibacterial activity of extracts from some Africans chewing sticks**. Oral Surg 717-722, 1997.
- ALIGIANIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU,S.; CHINOU, J.B.; **Composition and antimicrobial activity of the essential oil of two Origanum species**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 49, 4168-4170, 2001.
- ALMEIDA, E. R. **As plantas medicinais brasileiras**. São Paulo: Hemus, p. 339, 1993.
- ALVES T.M.A.; SILVA A.F.; BRANDÃO M.; GRANDI T.S.M.; SMÂNIA E.F.A.; SMÂNIA J.R.A.; ZANI C.L.; **Biological screening of Brazilian medicinal plants**. Mem Inst Oswaldo Cruz ; 95:367-73, 2000.
- ARAÚJO, C.W.G.; ARAÚJO, A.M.; VASCONCELOS, A.M.A.; SILVA, I.C.B.; VIANA, M.M.; ALMEIDA, M.C.S.; FREIRE, S.A.F.; PIRES, L.L.S ZENALDO, P. Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2003. Disponível em: [http://www.propep.ufal.br/Eventos/IJornadaCientificaFarmacia/Resumo\\_02.htm](http://www.propep.ufal.br/Eventos/IJornadaCientificaFarmacia/Resumo_02.htm). Acesso em: 14 Fev. 2012
- BARATTA, M.T.; DORMAN, H.J.D; DEANS, S.G.; FIGUEIREDO, A.C.; BARROSO, J.G.; RUBERTO, G. **Propriedades antimicrobiana e antioxidante de alguns óleos essenciais comerciais**. Flavour and Fragrance Journal. v. 13, p. 235-244, Julho/Agosto, 1998.
- BEZERRA J.L.; COSTA G.C.; LOPES T.C.; CARVALHO I.C.D.S.; PATRÍCIO F.J.; SOUSA S.M.; AMARAL F.M.M.; REBELO J.M.M.; GUERRA R.N.M.; RIBEIRO M.N.S.; NASCIMENTO F.R.F.; **Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais**. Revista Brasileira de Farmacognosia. 16(Supl.): 631-637, 2006.
- BISPO JÚNIOR, W.; PIRES, L.S.S.; ARAÚJO, C.W.G de; SANTOS, B.V.O.; PORFÍRIO, Z. Universidade Federal de Alagoas, Alagoas, 2003. Disponível em: [http://www.propep.ufal.br/Eventos/IJornadaCientificaFarmácia/Resumo\\_02.htm](http://www.propep.ufal.br/Eventos/IJornadaCientificaFarmácia/Resumo_02.htm). Acesso em: 14 Fev., 2012.
- BORRIS, R.P. **Natural products research: perspectives from a major pharmaceutical company**. Journal of Ethnopharmacology. 82, 51, 2002.
- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. **Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity**. Lebensmittel-Wissenschaft Technologie, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.
- BROWNING, B. L. **Methods of Wood Chemistry**. New York : Interscience,v.2. 1967.

CANSIAN, R.L. et al. **Atividade antimicrobiana e antioxidante do óleo essencial de ho-sho (*Cinnamomum camphora* Ness e Eberm Var. *Linaloolifera fujita*)**. Ciências e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v.30, p. 378-384 384, abr.-jun. 2010.

CASTILHO, A.R.; MURATA, R.M.; PARDI, V. **Produtos Naturais em Odontologia**. Revista Saúde, Universidade Guarulhos. v. 1, n. 1, 2007.

CELOTTO, A.C.; NAZARIO, D.Z.; SPESSOTO, M.A.; MARTINS, C.H.G.; CUNHA, W.R. **Evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of crude extracts of three Miconia species**. Brazilian Journal of Microbiology. v. 34, n. 4, p. 339, 2003.

CLSI- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacterial that grow aerobically, approved standard – M7-A7, 7<sup>a</sup> ed, v. 26, 2006.**

CLSI- CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, approved standard – M11-A7, 7<sup>a</sup> ed, v. 27, 2007.**

COIMBRA, H.S. **Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos de *Zanthoxylum naranjillo* (Rutácea), *Piper cubeba* (Piperácea), (-)-Cubebina e alguns de seus derivados**. Dissertação (Mestrado em ciências). Universidade de Franca, 2005.

CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE CUIDADOS PRIMÁRIOS DE SAÚDE. Resolução Alma-Ata, set. de 1978. **Cuidados primários de saúde**, Relatório, Alma-Ata, OMS, p. 64. 1979.

CONNER D.E. **Naturally occurring compounds**. In: Antimicrobials and Foods, Davidson P.M., Branem A. L. Eds., Dekker: New York, p. 441-468. 1993.

COSTA, A.F. **Farmacognosia Experimental**. vol III. 3<sup>a</sup> Edição. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, p. 993, 2000.

COUTINHO, I.D. **Estudo químico e atividades biológicas de *Campomanesia adamantium* (Cambes.) O. Berg (Myrtaceae)**. Dissertação de Mestrado, Programa de Pós-graduação em Química, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande, p. 159, 2008.

CUNHA, A. P. **Plantas e produtos vegetais em fitoterapia**. Lisboa: Fundação Calote Gulbenkiam, p.702, 2003.

DE LORENZO, J.L. **Microbiologia para o estudante de odontologia**. São Paulo: Atheneu, 2004.

De SOUSA, D.P; De ALMEIDA, R.N. **Evolution of the Anticonvulsant Activity of  $\alpha$ -Terpineol**. Pharmaceutical Biology, v.45, n.1, p. 69-70, 2007.

DIDRY N., DUBREUIL L., PINKAS M. **Activé antibactérienne du thymol, du carvacrol et de l'aldéhyde cinnamique seuls ou associés (Antibacterial activity of**

**thymol, carvacrol and cinnamaldehyde singly or in combinations**), Pharmazie, v. 48, p. 301-304, 1993.

DIXON, R. A. **Natural products and plant disease resistance**. Nature. v. 411, p. 843-847, 2001.

DUARTE, S.; KOO, H.; BOWEN, W.H.; HAYACIBARA, M.F.; CURY, J.A.; IKEGAKI, M.; ROSALEN, P.L. **Effect of a Novel Type os Propolis and Its Chemical Fraction on Glucosyltransferases and on Growth and Adherence of *mutans Streptococci***. Biological and Pharmaceutical Bulletin. v. 26, n. 4, p. 527-531, 2003.

EVARISTO, I. M.; LEITAO, M. C. **Identificação e quantificação por DAD-HPLC, da fração fenólica contida em folhas de *Quercus suber* L. Silva Lusitana**, v. 9, n. 2, p. 135-141, 2001.

FERNANDES, E. S., PASSOS, G. F., MEDEIROS, R., CUNHA, F. M., FERREIRA, J., CAMPOS, M. M., PIANOWSKI, L. F., CALIXTO, J. B. **Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea***. European Journal Pharmacology. v.569, p. 228–236. 2007.

FESSENDEN, R.J. **Organic chemistry**. Boston: Willard Grant Pres, 1982.

FIRN, R. D., JONES, C. G. **Natural products – A simple model to explain chemical diversity**. Natural Product Reports. v. 20, p. 382-391, 2003.

GARCIAL, E.S. **“Biodiversidade, biotecnologia, e saúde”**. Cadernos de Saúde Pública. Rio de Janeiro, v. 11, n. 3, 1995.

GENDRON, R.; GRENIER, D.; MAHEU-ROBERT, L.F. **The oral cavity as a reservoir of bacterial pathogens for focal infections**. Microbes and Infection. v. 2, p. 897-906, 2000.

GIBBONS, R.J.; HAY, D.I.; CISAR, J.O.; CLARK,, W.B. **Adsorbed salivary prolinerich protein 1 and statherin: receptors for type 1 fimbriae of *Actinomyces viscosus* T14V-J1 on apatitic surfaces**. Infection and immunity. v. 56, p. 2990-2993, 1998.

GRIFFIN, S.G.; GRANT WYLLIE, S.; MARKHAM, J.L.; LEACH, D.N. **O papel da estrutura e as propriedades moleculares de terpenóides na determinação da sua atividade antimicrobiana**. Flavour and Fragrance Journal, v. 14, p. 322-332, Setembro/Outubro, 1999.

GUARIM NETO, G.; **O saber tradicional pantaneiro: as plantas medicinais e a educação ambiental**. Revista eletrônica do Mestrado em educação ambiental, UFRG, v. 17, 2006.

GUENTHER, E. **The Essential Oils**, Publishing Company Hutington, New York, v.1, n.6, 1972.

HAIG, T. Allelochemicals in plants. In: Zeng, R.S.; Mallik A.U. & Luo A.M (eds). **Allelopathy in Sustainable Agriculture and Forestry**. London, Springer. p. 63-104, 2008.

HAMADA, S.; SLADE, H.D. **Biology, immunology and cariogenicity of *Streptococcus mutans***. Microbiology Reviews. v. 44, p. 331-384, 1980.

HARBORNE, J.B. **Plant secondary metabolism**. In: CRAWLEY, M.J. (Ed.). **Plant Ecology**. 2<sup>a</sup> ed. Blackwell Science, p. 132-155. 1997.

HARVEY, A. **Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products**. Drug Discovery. v. 5, p. 294-300, 2001.

HELFAND W.H.; COWEN D.L. **Pharmacy – an illustrated history**, Harry N. Abrams, New York. 1990.

HWANG, B.Y.; ROBERTS, S.K.; CHADWICK, L.R.; WU, C.D.; KINGHORN, A.D. **Antimicrobial constituents from goldenseal (the rhizomes of *Hydrastis canadensis*) against oral pathogens**. Planta Médica. v. 69, p. 623-627, 2003.

HWANG, J.K.; SHIM, J.S.; PYUN, Y.R. **Antibacterial activity of xanthorrhizol from *Curcuma xanthorrhiza* against oral pathogens**. Fitoterapia. v. 71, n. 3, p. 312-323, Jun, 2000.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas Analíticas: métodos químicos e físicos para análise de alimentos**. 3<sup>a</sup> ed., São Paulo, v. 1, 1985.

JANSEN, A.M., SCHEFFER, J.J.C., BAERHEIM, S. A. **Antimicrobial activity of essential oils from Greek *Sideritis* species**, Pharmazie, v. 45, p. 70, 1987.

KATSURA, H.; TSUKIYAMA, R.I.; SUSUKI, A.; KOBAYASHI, M. ***In vitro* antimicrobial activities of bakuchiol against oral microorganisms**. Antimicrobial Agents and Chemotherapy. v. 45, n. 11, p. 3009-3013, 2001.

KHALIL, A.; SOUZA, E.S.; KHALIL, O.A.K.; LANDUCCI, L.F.; GAETTI-JARDIM JÚNIOR, E. **Biological activity of traditionally prepared herbal infusions on oral microbiota strains**. Brazilian Journal Pharmaceutical Sciences. v. 41, supl.1, p. 347, Sep, 2005.

KIM, N.C.; DESJARDINS, A.E.; WU, C.D.; KINGHORN, A.D. **Activity of triterpenoid glycosides from the root of *Mussaenda macrophylla* against two oral pathogens**. Journal Natural Products. v. 62, p. 1379-1384, 1999.

KLOCK, U., MUÑIZ, G. I. B., HERNANDEZ, J. A., ANDRADE A. S. **Química da madeira**. 3<sup>a</sup> ed. Revista Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005.

KOKOSKA, L.; POLESNY, Z.; RADA, V.; NEPOVIN, A.; VANEK, T.; **Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity**. Journal of Ethnopharmacology. v. 82, 51, 2002.

KOLENBRANDER, P.E. **Coaggregation of human oral bacteria: potential role in the accretion of dental plaque.** Journal Applied Bacteriology. v. 74, p. 79-86, 1993.

KONG, J.M. et al. **Analysis and biological activities of anthocyanins.** Phytochemistry, v. 64, n. 5, p. 923-933, 2003.

KOO, H.; GOMES, B.P.F.A.; ROSALEN, P.L.; AMBROSANO, G.M.B.M.; PARK, Y.K.; CURY, J.A. **In vitro antimicrobial activity of própolis and *Arnica Montana* against oral pathogens.** Archives of Oral Biology. v. 45, p. 141-148, 2000.

KOSSEL, A. **On the chemical composition of the cell.** Archives of Physiology. p. 181-186, 1891.

LANG G, BUCHBAUER G **A review on recent research results (2008-2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review.** Flavour and Fragrance Journal v. 27, p. 13-39, 2012.

LEITÃO, S.G.; CASTRO O.; FONSECA, E.M.; JULIÃO, L.S.; TAVARES, E.S.; LEO, R.R.T.; VIEIRA, R.C.; OLIVEIRA, D.R.; LEITÃO, G.G.; MARTINOV; SULSEN, V.; BARBOSA, Y.A.G.; PINHEIRO, D.P.G.; SILVA, P.E.A.; TEIXEIRA, D.F.; LOURENÇO, M.C.S.; **Screening of Central and South American plant extracts for antimycobacterial activity by the Alamar Blue test.** Revista Brasileira de Farmacognosia, v.16, p. 6-11, 2006.

LI, J.; HELMERHORST, E.J.; LEONE, C.W.; TROXLER, R.F.; YASKELL, T.; HAFFAJEE, A.D.; SOCRANSKY, S.S.; OPPENHEIM, F.G. **Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm.** Journal of Applied Microbiology. v. 97, n.6, p. 1311, Dec, 2004.

LI, X.; KOLLTVEIT, K.M.; TRONSTAD, L.; OLSEN, I. **Systemic diseases caused by oral infection.** Clinical Microbiology Reviews, v. 13, n.4, p. 547-558, Oct, 2000.

LIMA, K. C. 1994. In: Pereira, J.V.; Silva, S.C.; Filho, S.C.; Higino, J.S. **Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da *Punica granatum* sobre microrganismos formadores da placa bacteriana.** Revista Periodontia, v.12, n.4, p. 57-64, out, 2001.

LOESCHE, W.J.; **Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay.** Microbiology Reviews. v. 50, p. 353-380, 1986.

LÓPEZ O.P.; JIMÉNEZ A.R.; VARGAS F.D. et al. **Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains – characteristics, biosynthesis, processing, and stability.** Critical Reviews Food Science Nutrition, v.40, n.3, p.173-289, 2000.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas.** 2ª ed.; Editora Plantarum; São Paulo, Brasil, p. 384, 1998.

MAGINA, M.A., GILIOLI, A., MORESCO, H.H., COLA, G., PIZZOLATTI, M.G., BRIGHENTE, I.M.C. **Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (*Myrtaceae*).** Latin American Journal of Pharmacy, v. 29, n. 3, p. 376-382, 2010.



MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. da. **Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva**. Ciência Tecnologia Alimentos, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.

MARKAKIS, P. **Anthocyanins as Food Colors**. New York: Academic Press, 1982.

MARSH, P.D. **Microbial ecology of dental plaque and its significance in health and disease**. Advances in Dental Research. v. 8, p. 263-271, 1994.

MARSH, P.D. **Dental plaque as a microbial biofilm**. Caries Research. v. 38, p. 204-211, 2004.

MARTINS, C. M. **Estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc (PAU-SANTO) do Cerrado, 2012, 100 p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade de Federal de Uberlândia.**

MATHEUS, M.T.; BACELAR, M.; OLIVEIRA, S.A.S.; **Descrição morfológica de frutos e sementes de marmelhinho-do-campo – *Alibertia sessilis* SCHUM. – (RUBIACEAE)**. Revista Caatinga, n. 3, p. 60-61. 2008.

MATOS, F.J. de A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza, EUFC, 1997.

MATSUMOTO, R. S., RIBEIRO, J. P. N., TAKAO, L. K., SALGUEIRO, M. I. **Potencial alelopático do extrato foliar de *Annona glabra* L. (Annonaceae)**. Acta Botanica Brasilica, v. 24, n. 3, p. 631-635, 2010.

MEYERS, K. J.; WATKINS, C. B.; PRITTS, M. P.; LIU, R. H. **Antioxidant and antiproliferative activities of strawberries**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 51, n. 23, p. 6887-6892, 2003.

MEWS, H. A.; MARIMON, B. S.; MARACAHIPES, L.; FRANCAZAK, D. D.; MARIMON-JUNIOR, B. H. **“Dynamics of the woody community of a typical cerrado in Northeastern Mato Grosso, Brazil”**, Biota Neotropica, v. 11, nº1, p. 73-82, 2011.

MEVY, J.P.; BESSIERE, J.M.; DHERBOMEZ, M.; MILLOGO, J. VIANO, J. **Chemical composition and some biological activities of the volatile oils of a chemotype of *Lippia chevalieri* Moldenke**. Food Chemistry, v. 101 p. 682–685, 2007.

MINJA M.M.; **Medicinal plants used in promotion of animal health in Tanzania**. Rev Sci Tech. v. 13, p. 905-925, 1994.

MONTANARI, C. A.; BOLZANI, V. S. **Planejamento racional de fármacos baseados em produtos naturais**. Química Nova v. 24, n.1, p. 105-111, 2001.

MONTANARI, R.M., BARBOSA, L.C.A., DEMMUNER, A.J., SILVA, C.J. **Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Verbenaceae* species:**

**alternative sources of E-caryophyllene and germacrene-D.** Química Nova. v. 34, n. 9, p.1550-1555, 2011.

MONTEIRO, J.M.; NETO, E.M.F.L.; AMORIM, E.L.C.; STRATTMANN, R.R.; ARAÚJO, E.L. & ALBUQUERQUE, U.P. **Teor de taninos em três espécies medicinais arbóreas simpátricas da caatinga.** Revista Árvore v. 9, p. 999-1005, 2005.

MORAIS SAL, LAMOUNIER KC, CUNHA LCS, AQUINO FJT, CHANG R, NASCIMENTO EA, SOUZA MGM, MARTINS CHG, CUNHA WR **Chemical analysis and study of phenolics, antioxidant activity and antibacterial effect of the wood and bark of *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud.** Evidence-based complementary and alternative medicine. p. 1-7, 2012.

MORAIS, S.A.L.; AQUINO, F.J.T.; NASCIMENTO, E.A.; NASCIMENTO, P.M.; CHANG, R. **Compostos bioativos e atividade antioxidante do café conilon submetido à diferentes graus de torra.** Química Nova, v. 32, n. 2, 327-331. 2009.

MORAIS, S. A. L., NASCIMENTNO, E. A., MELO, D.C. **Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I–Estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis.** Revista Árvore, Viçosa-MG, v. 29, n. 3, p. 461-470, 2005.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; OLIVEIRA, G. S. **Análise química da madeira do cedro.** In: CONGRESSO BRASILEIRO DE QUÍMICA, 43, Ouro Preto. Anais. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Química, p. 542, 2003.

MORGAN, R. **Enciclopédia das ervas e plantas medicinais.** São Paulo: Hemus, p. 555, 1994.

NATUROPATIA. **As Proantocianidinas - Efeitos Fitofisiológicos.** Disponível em: < <http://naturopatiaonline.blogspot.com/2006/11/as-proantocianidinas-efeitos.html> >. Acesso em: 07 fev.2012.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SNADER, K. M. **Natural products as sources of new drugs over the period.** Journal of Natural Products. v. 66, n.7, p. 1022-1037, Jul, 2003.

NYVAD, B. **Microbial colonization of human tooth surfaces.** Acta Pathol. Microbiology Immunology. Scand. v. 101, p. 7-45, 1993.

OCHIAI, K.T.; KURITA-OCHIAI, Y.; KAMINO, T. **Effect of co-aggregation on the pathogenicity of oral bacteria.** Journal Medical Microbiology. v. 39, p. 183-190, 1993.

O'KENNEDY, R.; THORNES, R.D. **Coumarins: biology, applications and mode of action.** New York: John Willey, 1997.

OLIVEIRA, A. C., VALENTIM, I. B., GOULART, M. O. F., SILVA, C. A., BECHARA, E. J. H., TREVISAN, M. T. S. **Fontes vegetais naturais de antioxidantes.** Química Nova, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, A.L.S, FIGUEIREDO, A.D.L. **Prospecção Fitoquímica das Folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae)**, Revista Brasileira de Biociência, v. 5, p. 384-386, 2007.

PAVITRA, P.S.; SREEVIDYA, N.; VERMA, R.S. **Antibacterial activity and chemical composition of essential oil of *Pamburus missionis***. Journal Ethnopharmacol. v.124, n. 1, p. 151-153, 2009.

PEREIRA, J.V.; SILVA, S.C.; FILHO, L.C.; HIGINO, J.S. **Atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da *Punica granatum* sobre microrganismos formadores da placa bacteriana**. Revista Periodontia, v. 12, n. 4, p. 57-64, 2001.

PERIN, F.M. **Avaliação *in vitro* do efeito bactericida promovido por diferentes métodos de desinfecção do canal radicular**. 2001. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto – Universidade de Ribeirão Preto.

PESSOA, M.C.R., ZAPPI, D. ***Cordia* in Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB020721>. Acesso em Janeiro de 2012.

RAWAT, M.S.M.; PANT, G.; PRASAD, D.; JOSHI, R.K., PANDE, C.B. **Plant growth inhibitors (Proanthocyanidins) from *Prunus armeniaca***. Biochemical Systematic and Ecology, v. 26, p. 13-23, 1998.

REBELO, R. A. et al., **Composição química e avaliação da atividade antimicrobiana do óleo essencial das folhas de *Piper malacophyllum* (C. PRESL.) C. DC**. Química Nova, v. 35, n. 3, 477-481, 2012.

REYES, J., ZAMORA, P. P., DURÁN, N. **Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulases. Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos**. Química Nova, São Paulo, v. 21 n. 2, p. 140-143, 1998.

REYNERTSON, K. A., BASILE, M. J., KENNELLY, E.J. **Antioxidant potential of seven *Myrtaceous* fruits**. Ethnobotany Research & Applications. v. 3 p. 25-36, 2005.

RIBEIRO, J.F.; WALTER, B.M.T. **As principais fitofisionomias do Bioma Cerrado. In Cerrado: ecologia e flora** (S.M. Sano, S.P. Almeida & J.F. Ribeiro, eds.). Embrapa Cerrados, Planaltina. p.151-212, 2008.

ROCHA, E.O.; MORAIS, S. A. L.; CHANG, R.; NASCIMETO, E. A.; CUNHA, L.C.S. ; AQUINO, F.J.T. de ; SOUZA, M.G.M. ; CUNHA, W.R. ; MARTINS, C.H.G. **Essential oil composition and atioxidant and antimicrobial properties of *Campomanesia pubescens* O. Berg. native of Brazilian Cerrado**. Acta Farmacêutica Bonaerense, v. 30, p. 1843-1848, 2011.

ROCHA, M.L. **Estudo experimental dos efeitos da laserterapia de baixa intensidade e da imobilização na resposta inflamatória aguda**. 2006. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) – Universidade de Franca.

ROCHA, T.J.M.; SANTOS, K.C.B.S.S.; FILHO, B.P.N.; NOÉ, B.D.R.; NASCIMENTO, H.F.N.; SANTOS, A.F. **Atividade antioxidante dos extratos de *Anacardium occidentale* & *glycyrrhiza glabra* pela captura do radical livre DPPH.** Revista de Biologia e Farmácia, v. 6, n. 2, 2011.

RODRIGUES, A. G.; SANTOS, M. G.; AMARAL, A. C. F. **Políticas públicas em plantas medicinais e fitoterápicos.** In: A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos; Ministério da Saúde, Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica, Brasília: Ministério da Saúde, p.148, 2006.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. **Florística de plantas medicinais nativas de remanescente de floresta estacional semidecidual na região do Alto Rio Grande.** Cerne, Lavras, v. 14, n. 2, p. 93-112, 2008.

RODRIGUES, V.E.G.; CARVALHO, D.A. **Plantas medicinais no domínio dos Cerrados.** Lavras: UFLA, 2001.

RODRIGUES,V.E.G; CARVALHO, D.A. **Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do alto rio grande –Minas Gerais.** Ciência e Agrotecnologia, Lavras, v.25, n.1, p.102-123, jan./fev., 2001

ROLLER, S.; ERNEST, N.; BUCKLE, J. **The antimicrobial activity of high-necrodane and other lavender oils on methicillin-sensitive and -resistant *Staphylococcus aureus* (MSSA and MRSA).** Journal of Alternative Complementary Medicine, v. 15, n 3, p. 275-279, 2009.

RUDNEY, J.D.; Z, J.I.; LARSON, C.J.; LILJEMARK, W.F.; HICKEY, K.L. **Saliva protein binding to layers of oral streptococci *in vitro* and *in vivo*.** Journal Dental Reserarch. v. 74, p. 1280-1288, 1995.

RYSECKY, S. **The effects of officinal herbs on inflammation of gingival margin: a clinical trial with a newly formulated toothpaste.** Journal of Clinical Dentistry, v.2, p. 19-21, 1991.

SANTOS, R.I. **Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários.** In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. Farmacognosia da planta ao medicamento, 5º ed., Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul. 1102p, 2004.

SCALBERT, A. **Antimicrobial properties of tannins.** Phytochemistry, v. 30, p. 3875-3883, 1991.

SCANNAPIECO,F.A. **Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology.** Critical Reviews in Oral Biology and Medicine, v. 5, p. 203-248, 1994.

SILVA, D. D. **Quantificação do linalol no óleo essencial da *Aniba duckei* Korstermans utilizando uma nova coluna capilar POLYH4-MD em Cromatografia Gasosa.** Química Nova, v. 26, n. 4, p. 461-465, 2003.

- SILVA, F. L. et al. **Anthocyanins pigments in strawberry**. LWT, v. 40, n. 2, p. 374-382, 2007.
- SIMAS, N. K. et al. **Produtos naturais para o controle da transmissão da dengue – atividade larvicida de *myroxylon balsamum* (óleo vermelho) e de terpenóides e fenilpropanóides**. Química Nova, v. 27, n. 1, p. 46-49, 2004.
- SMID E.J., KOEKEN J.P.G., GORRIS L.G.M. **Fungicidal and fungistatic action of the secondary plant metabolites cinnamaldehyde and carvone**. In: Modern Fungicides and Antimicrobial Compounds, Lyr H., Russell P.E., Sisler H.D. Eds. Intercept: Andover, U.K., p. 173-180, 1996.
- SINGH, K.V.; SHUKLA, N.P. **Activity on multiple resistant bacteria of garlic (*Allium sativum*) extract**. Fitoterapia, v. 55, p. 313-315, 1984.
- SIVROPOULOU, A. et al. **Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Origanum* Essential Oils**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 44, n. 5, p. 1202–1205, 1996.
- SOUZA, L.K.H.; OLIVEIRA, C.M.A.; FERRI, P.H.; OLIVEIRA JÚNIOR, J.G.; MIRANDA, A.T.B.; LIÃO, L.M.; SILVA, M.R.R. **Antifungal properties of Brazilian cerrado plants**. Brazilian Journal of Microbiology. v. 33, p. 247, 2002.
- STERN, J.L.; HAGERMAN, A.E.; STEINBERG, P.D.; MASON, P.K. **Phlorotannin-protein interactions**. Journal of Chemical Ecology, v. 22, p. 1887-1899, 1996.
- SUN, J. et al. **Antioxidant and antiproliferative activities of common fruits**. Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 50, n. 25, p. 7449-7454, 2002.
- TERRAS, F.R.G.; SCHOOFS, H.M.E.; THEVISSSEN, H.M.E.; BROEKAERT, W.F. **Synergistic enhancement of the antifungal activity of wheat and barley thionins by radish and oilseed rape 2S albumins and by barley trypsin inhibitors**. Plant Physiology, v. 103, p. 1311-1319, 1993.
- THEILADE, E. 1990 apud MARCOTE, H.; LAVOIE, M.C. **Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A**. Microbiology and Molecular Biology Reviews. v. 62, p. 71-109, March, 1998.
- VIEIRA, R. F.; MARTINS, M. V. M. **Recursos genéticos de plantas medicinais do cerrado: uma compilação de dados**. Revista Brasileira de Plantas Medicinais, v. 3, n.1, p. 13-36, 2000.
- VIEGAS, J. R. C.; BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. **Os produtos naturais e a química medicinal moderna**. Química Nova, v. 29, p. 326-337, 2006.
- VIOLA, Z. G. G. **Avaliação da qualidade das águas da bacia do rio doce/MG: caracterização da matéria orgânica e seus impactos ambientais**. 2008. Tese (Doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais.

- WALTON, M. C. et al. **Anthocyanins absorption and antioxidant status in pigs.** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 54, n. 20, p. 7940-7946, 2006.
- WILLCOX, M.D.; DRUCKER, D.B. **Partial characterization of the inhibitory substances produced by *Streptococcus oralis* and related species.** Microbios. v. 55, p. 135-145, 1988.
- WILSON, M.; MCNAB, R.; HENDERSON, B. **Bacterial disease mechanisms. An introduction to cellular microbiology.** 1ed. Cambrige: Cambrige University Press, 2002.
- WINDHOLZ, M. **The Merk Index.** 9ª ed. New Jersey, 1976.
- WINK, M. **Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective.** Phytochemistry, v. 64, p. 3-19, 2003.
- WROLSTAD, R. E. Anthocyanins. In: FRANCIS, F. J.; LAURO, G. J. (Ed.). **Natural Food Colorants.** New York: Marcel Dekker Inc., p. 237-252. 2000.
- YATSUDA, R. **Efeito antimicrobiano *in vitro* da *Mikania laevigata* e da *Mikania glomerata* sobre estreptococcus do grupo mutans.** 2004. p. 55. Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual de Campinas.
- ZHANG, Y.; LEWIS, K. **Fabatins: new antimicrobial plant peptides.** FEMS Microbiological Letters, v. 149, p. 59-64, 1997.
- ZUANAZZI, J.A.S.; MONTANHA, J.A. **Flavonoides.** Pp.577-614. In:Simoes, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; DE MELLO, J.C.P.;MENTZ, L.A. & PETROVICK P.R. (Ed.). Farmacognosia: da planta ao medicamento. Porto Alegre, Ed. da UFRGS, 1999.

## APÊNDICE A – METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA (CLSI, 2007)

### 1 MICRORGANISMOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS

Para a determinação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos e das partições foram utilizadas as seguintes cepas padrão, provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC): *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Actinomyces naeslundii*, (ATCC 19039) (Tabela 1).

**Tabela 1:** Microrganismos, procedência, morfotipos e meios de culturas utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana.

Microrganismo/Cepas Padrão ATCC	Morfotipo	Meio de cultura do inóculo	Meio de cultura do teste
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	Coco Gram positivo	TSB Ágar	TSB
<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456	Coco Gram positivo	TSB Ágar	TSB
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Coco Gram positivo	TSB Ágar	TSB
<i>Actinomyces naeslundii</i> ATCC 19039	Bacilo Gram positivo	Schaedler Ágar	Schaedler

TSB: Triptona de soja

### 2 MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

Os meios de cultura utilizados para a determinação da atividade antimicrobiana pelo método de microdiluição em caldo (MIC), para determinação da concentração inibitória mínima (CIM), foram: Caldo Schaedler e Ágar Schaedler suplementado para bactérias anaeróbias e caldo triptona de soja (TSB) e Ágar sangue para bactérias aeróbias, descritos abaixo.

O termo “suplementado”, encontrado no decorrer do texto, deve ser considerado como a adição de 1,0 mL de solução de Hemina a uma concentração de 5,0 mg mL<sup>-1</sup> e

1,0 mL de menadione a uma concentração de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$  para cada 1,0 L de meio de cultura.

### **Caldo Schaedler (BD<sup>®</sup>)**

Composição:

Digestão Pancreática de Caseína .....	8,2 g
Digestão Peptídica de Tecido Animal .....	2,5 g
Digestão Papaínica de farelo de soja .....	1,0 g
Dextrose .....	5,8 g
Extrato de Levedura .....	5,0 g
Cloreto de Sódio .....	1,7 g
Fosfato dipotássio .....	0,8 g
Hemina .....	0,01 g
L-Cistina .....	0,4 g
TRIS (hidroximetil) aminometano .....	3,0 g

Preparação: Dissolveu-se aproximadamente 28,4 g desta composição em 1,0 L de água destilada, a qual foi homogeneizada e autoclavada por 15 min a  $121 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ . Após autoclavagem a solução foi suplementada.

### **Caldo triptona de soja TSB (DB<sup>®</sup>)**

Composição:

Peptona de Caseína.....	17,0 g
Peptona de soja.....	3,0 g
Glicose.....	2,5 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Hidrogenofosfato dipotássico.....	2,5 g

Preparação: Dissolveram-se 30,0 g desta composição em 1,0 L de água destilada, a qual foi homogeneizada e autoclavada por 20 min a  $121 \pm 1 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .



### **Base para ágar sangue (BD<sup>®</sup>)**

Composição:

Infusão de músculo cardíaco .....	2,0 g
Digestão pancreática de caseína .....	13,0 g
Extrato de levedura .....	5,0 g
Cloreto de sódio.....	5,0 g
Agar .....	15,0 g

Preparação: Dissolveu-se 40,0 g desta composição em 1,0 L de água destilada. A solução resultante foi aquecida e homogeneizada até a dissolução do pó e autoclavada por 15 min, a 121°C. Após autoclavagem, a base foi resfriada de 45 a 50 °C e adicionada uma solução de 5 % de sangue desfibrinado de carneiro. 25,0 mL dessa mistura foram colocados em placas de Petri.

### **Ágar Schaedler (DB<sup>®</sup>)**

Composição:

Digestão pancreática de caseína.....	8,2 g
Digestão peptídica de tecido animal.....	2,5 g
Digestão papaínica de farelo de soja.....	1,0 g
Dextrose.....	5,8 g
Extrato de levedura.....	5,0 g
Cloreto de sódio.....	1,7 g
Fosfato dipotássio.....	0,8 g
Hemina.....	0,4 g
L-Cytina.....	0,4 g
TRIS (hidroximetil) aminometano.....	3,0 g
Ágar.....	13,0 g

Preparação: Dissolveu-se aproximadamente 41,9 g desta composição em 1,0 L de água destilada. A solução resultante foi aquecida e homogeneizada até a completa dissolução

do pó e autoclavada por 15 min a 121 °C. Logo em seguida, a solução foi suplementada com 1,0 mL de solução de Hemina ( $5,0 \text{ mg mL}^{-1}$ ), 1,0 mL de solução de menadione ( $1 \text{ mg mL}^{-1}$ ) e com solução 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Em seguida, foram distribuídos 30,0 mL da solução resultante em placas de Petri.

### **Solução de Hemina**

Dissolveu-se 0,5 g de Hemina em 10,0 mL de solução NaOH a 1,0 N e adicionou-se 90,0 mL de água destilada esterilizada. Após obter a solução na concentração final de  $5 \text{ mg mL}^{-1}$ , esta foi filtrada em membrana filtrante de  $0,22 \mu\text{m}$  de porosidade para um tubo esterilizado.

### **Solução Menadione**

Dissolveu-se em frasco esterilizado 0,1 g de menadione em 100,0 mL de etanol absoluto, obtendo-se uma solução na concentração de  $1,0 \text{ mg mL}^{-1}$ .

## **3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA**

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos e das partições foi determinada pelo método da microdiluição em caldo (MIC) através da concentração inibitória mínima (CIM).

## **4 PREPARO DAS AMOSTRAS DOS EXTRATOS PARA O MÉTODO DE MICRODILUIÇÃO**

Para a realização da técnica de microdiluição em microplaca, todas as amostras selecionadas foram inicialmente preparadas com concentrações de  $8000 \mu\text{g mL}^{-1}$  (solução de partida). Para se obter esta concentração, dissolveram-se 2,0 mg de cada

amostra em 250  $\mu\text{L}$  de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida preparam-se as seguintes soluções:

1-Solução mãe para o teste de microdiluição em caldo para aeróbios:

Retirou-se 125  $\mu\text{L}$  da solução de partida, colocou-se em um frasco de 10,0 mL e acrescentou-se 1875  $\mu\text{L}$  de caldo TSB, obtendo-se uma nova solução de concentração 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

2-Solução mãe para o teste de microdiluição em caldo para anaeróbios:

Retirou-se 162,5  $\mu\text{L}$  da solução de partida e acrescentou-se 2437,5  $\mu\text{L}$  de caldo Schaedler suplementado, obtendo-se uma nova solução de concentração 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

## **5 PREPARO DO INÓCULO**

Com o auxílio de uma alça de platina esterilizada, foram transferidas culturas de 24 horas dos microrganismos indicadores, crescidos no meio Ágar triptona de soja adicionado com solução 0,5 % de sangue de carneiro, para tubos contendo caldo triptona soja para os microrganismos aeróbios; o mesmo procedimento foi utilizado para preparação das bactérias anaeróbias com crescimento de 72 horas em ágar Schaedler. Padronizou-se o inóculo fazendo a comparação deste com o tubo 0,5 ( $1,5 \times 10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$ ) para bactérias na escala Mc Farland. Esta preparação do inóculo foi realizada para todas as bactérias.

## **6 PREPARAÇÃO DA DROGA PADRÃO**

A droga padrão utilizada para validação da técnica foi o dicloridrato de clorexidina. Primeiro pesou-se 1 mg da droga e diluiu-se em 10,0 mL de água destilada esterilizada, tendo uma concentração final de 0,1  $\text{mg mL}^{-1}$ . Em seguida, transferiu-se 1 mL dessa primeira diluição para um tubo contendo 4,0 mL de caldo Schaedler suplementado; essa última diluição de concentração de 0,02  $\text{mg mL}^{-1}$  é a solução estoque para realização da técnica. Levou-se em consideração a potência de 100 % da droga.

## 7 CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS

Para a determinação de atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição, utilizou-se como controle positivo, frente aos microrganismos indicadores e dicloridrato de clorexidina. Para o método de CIM, as concentrações de dicloridrato de clorexidina variam de 0,0115  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 5,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Ainda realizaram-se para o método de microdiluição em caldo os seguintes controles: esterilidade dos caldos TSB e Schaedler; controle da cultura (inoculo); esterilidade da clorexidina, esterilidade dos extratos e partições e controle do DMSO.

## 8 MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A determinação de concentração inibitória mínima das soluções dos extratos e das partições foi realizada segundo o método de microdiluição em caldo segundo os padrões CLSI para os microrganismos aeróbios (CLSI, 2006) e o CLSI para os microrganismos anaeróbios (CLSI, 2007).

Realizou-se todo procedimento em capela de fluxo laminar, com os cuidados necessários; as vidrarias, ponteiras e os meios de cultura foram esterilizados. Foram utilizadas microplacas estéreis com 96 orifícios. Cada orifício recebeu inóculo, caldo triptona soja ou caldo Schaedler e amostra das soluções preparadas. O volume final em cada orifício foi de 100,0  $\mu\text{L}$  para os microrganismos aeróbios e 200,0  $\mu\text{L}$  para os anaeróbios.

Avaliaram-se as amostras das soluções nas seguintes concentrações: 400 a 3,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Determinou-se, então, a concentração mínima de cada amostra capaz de inibir o crescimento dos microrganismos indicadores.

As microplacas foram seladas com parafilme e incubadas a 37 °C por 24 horas. As placas que continham *S. mutans*, *S. sanguinis* e *S. mitis* foram incubadas em microaerofilia pelo sistema de chama/vela. Após o período de incubação, foram adicionados em cada orifício 30,0  $\mu\text{L}$  de resazurina (Sigma) preparada em solução aquosa (0,01 %) para bactérias.

Este sistema revelador permite a observação imediata da atividade antimicrobiana da amostra testada, sendo que a cor azul representa ausência de

crescimento bacteriano e a cor vermelha, a presença de crescimento bacteriano. Os microrganismos anaeróbicos são incubados por 48 a 72 horas em câmara de anaerobiose, a 36 °C. Em seguida, utiliza-se o mesmo revelador (resazurina) para a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) frente aos microrganismos anaeróbios.

Para todas as bactérias testadas foi realizado o controle do solvente (DMSO) nas concentrações de 5 a 1 %. Todos os extratos e as partições foram avaliados frente aos microrganismos indicadores em triplicata.