



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA
NuPPeN- Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ATIVIDADE BIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS
PRESENTES NAS FOLHAS E CASCAS DE *Cordiera sessilis* (Vell.) Kuntze**

ALANNA EVELLIN ALVES FERREIRA

**UBERLÂNDIA – MG
2018**

ALANNA EVELLIN ALVES FERREIRA

**ATIVIDADE BIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS
PRESENTES NAS FOLHAS E CASCAS DE *Cordiera sessilis* (Vell.) Kuntze**

Dissertação apresentada ao programa de Pós-Graduação em Química, da Universidade Federal de Uberlândia, como exigência parcial para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de concentração: Química de Produtos Naturais

Orientador: Prof. Dr. Francisco José Torres de Aquino

Co-orientador: Prof. Dr. Alberto de Oliveira

**Uberlândia – MG
2018**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

F383a Ferreira, Alanna Evellin Alves, 1994-
2018 Atividade biológica e caracterização de compostos presentes nas
folhas e cascas de *Cordiera sessilis* (Vell.) Kuntze / Alanna Evellin Alves
Ferreira. - 2018.
117 f. : il.

Orientador: Francisco José Torres de Aquino.
Coorientador: Alberto de Oliveira.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Química.
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.1133>
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. Plantas medicinais - Cerrado - Teses. I. Aquino, Francisco José Torres de. II. Oliveira, Alberto de. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

CDU: 54

Maria Salete de Freitas Pinheiro – CRB6/1262



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 270/PPQUI.

DATA: 30/01/2018

DISCENTE: Alanna Evelin Alves Ferreira

MATRÍCULA: 11522QMI001

TÍTULO DO TRABALHO: Prospeção fitoquímica, ensaios biológicos e espectrofotométricos de plantas do cerrado.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Química de Produtos Naturais

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Estudo fitoquímico e atividade biológica de extratos e partições de folhas e cascas da espécie *Cordiera sessilis* (Vell.) Kuntze (Marmelinho)

As quatorze horas do dia trinta de janeiro do ano dois mil e dezoito, no(a) Auditório Prof. Dr. Manuel Gonzalo Hernández-Terrones, piso superior do Bloco 51 no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelo Profº Dra. Richele Priscila Severino, Universidade Federal de Goiás, Profº Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa, Universidade Federal de Uberlândia e Prof. Dr. Francisco José Tôrres de Aquino, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas no Regulamento do Programa PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(a) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolveu-se dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e Aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será ATIVIDADE BIOLÓGICA E CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS PRÉSENTES NAS FOLHAS E CASCAS DE *Cordiera sessilis* (Vell.) KUNTZE.

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 12 horas e 15 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Profª Dra. Richele Priscila Severino

Profª Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa

Prof. Dr. Francisco José Tôrres de Aquino

Agradecimentos

Ao meu orientador Prof. Dr. Francisco José Torres de Aquino e ao co-orientador Prof. Dr. Alberto de Oliveira, pela paciência e dedicação empregadas na construção deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Ivan Schiavini da Silva, da Universidade Federal de Uberlândia, pela identificação botânica da espécie.

Ao Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, da Universidade de Franca, pela realização dos testes antibacterianos e antifúngicos.

Ao Ms. Allisson Benatti Justino, doutorando em Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, pela realização dos testes antienzimáticos e de capacidade de sequestro do radical peroxil.

Ao Ms. Mario Martins, doutorando em Química da Universidade Federal de Uberlândia, pela realização dos ensaios cromatográficos e espectrométricos.

Aos membros do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais (NuPPeN), principalmente aos colegas de laboratório, que contribuíram para a realização deste trabalho.

A todos que colaboraram para a construção desta dissertação.

Ao Instituto Federal Goiano pela liberação e incentivo.

RESUMO

Cordiera sessilis, popularmente conhecida como “marmelinho do cerrado” é uma espécie nativa do Cerrado. De acordo com o conhecimento popular, suas folhas são usadas em forma de emplastos ou banhos a fim de tratar afecções na pele. As folhas e cascas de *C. sessilis* foram selecionadas neste trabalho para estudo químico e biológico. Foram obtidos extratos etanólicos das cascas e folhas, posteriormente foi realizada partição líquido-líquido com a sequência de solventes: hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol. O extrato etanólico, frações e resíduo hidrometanólico foram submetidos aos testes de atividade antibacteriana, antifúngica, inibição enzimática e capacidade de sequestro do radical peroxil. A fração em hexano das cascas apresentou promissora atividade antibacteriana frente à aeróbia bucal *Streptococcus mitis* (CIM 200 µg mL⁻¹) e foi selecionada para fracionamento em coluna, a partir dessa fração foi possível identificar, por meio de CG-EM e RMN, a presença dos seguintes compostos: campesterol (**2**), estigmasterol (**3**), sitosterol (**4**), ácido palmítico (**1**), ácido esteárico (**6**), ácido beênico (**7**), ácido lignocérico (**8**), 14-metil pentadecanoato de metila (**5**), palmitato de etila (**9**) e linoleato de etila (**10**). A fração em acetato de etila das cascas apresentou promissora atividade antibacteriana frente à anaeróbia bucal *Fusobacterium nucleatum* (CIM 200 µg mL⁻¹), antifúngica frente às leveduras *Candida albicans* (CIM 93,75 µg mL⁻¹) e *Candida tropicalis* (CIM 93,75 µg mL⁻¹), excelentes resultados na capacidade de sequestro do radical peroxil ($2415,5 \pm 157,8 \mu\text{mol Trolox eq g}^{-1}$) e de inibição da enzima lipase (98,4 ± 2,1%), desse modo foi selecionada para fracionamento e identificação de compostos. A fração em acetato de etila das cascas de *C. sessilis* mostrou a presença dos seguintes compostos, por meio de CLAE-EM/EM: ácido geniposídico (**11**), ácido coumaroilquínico (**12**), metil éster do ácido cafeoilquínico (**13**), lioniresinol glicopiranosídeo (**14**) e ácido dicafeoilquínico (**15**).

Palavras-chave: *Cordiera sessilis*, cascas, folhas, atividade biológica.

ABSTRACT

Cordiera sessilis, popularly known as "marmelinho do cerrado" is a species native to the Cerrado. According to popular knowledge, its leaves are used in the form of plasters or baths in order to treat conditions on the skin. The leaves and barks of *C. sessilis* were selected in this work for chemical and biological studies. Ethanolic extracts were obtained from the barks and leaves, after which a liquid partition was performed with the solvent sequence: hexane, dichloromethane, ethyl acetate and *n*-butanol. The ethanolic extract, fractions and hydrometanic residue were submitted to the tests of antibacterial and antifungal activities, enzymatic inhibition and peroxy radical sequestration capacity. The hexane fraction of the barks showed promising antibacterial activity against the oral aerobic *Streptococcus mitis* (MIC 200 µg mL⁻¹) and was selected for column fractionation. From this fraction it was possible to identify, with GC-MS and NMR, presence of the following compounds: campesterol (**2**), stigmasterol (**3**), sitosterol (**4**), palmitic acid (**1**), stearic acid (**6**), behenic acid (**7**), lignoceric acid (**8**), methyl 14-methyl pentadecanoate (**5**), ethyl palmitate (**9**) and ethyl linoleate (**10**). The ethyl acetate fraction of the barks showed promising antibacterial activity against oral anaerobic *Fusobacterium nucleatum* (MIC 200 µg mL⁻¹), antifungal against yeasts *Candida albicans* (MIC 93,75 µg mL⁻¹) and *Candida tropicalis* (MIC 93,75 µg mL⁻¹), excellent peroxy radical sequestration capacity (2415,5 ± 157,8 µmol Trolox eq g⁻¹) and inhibition of lipase enzyme (98,4 ± 2,1%), so was selected for fractionation and identification of compounds. The ethyl acetate fraction of the *C. sessilis* barks showed the presence of the following compounds, with HPLC-MS/MS: geniposidic acid (**11**), coumariloylquinic acid (**12**), caffeoarylquinic acid methyl ester (**13**), lyoniresinol glycopiranoside (**14**) and dicaffeoylquinic acid (**15**).

Key-words: *Cordiera sessilis*, bark, leaves, biological activity

Lista de Figuras

FIGURA 1 - Espécie <i>Cordiera sessilis</i>	9
FIGURA 2 - Lignanas enantioméricas identificadas no extrato das cascas de <i>C. sessilis</i>	10
FIGURA 3 - Substâncias identificadas no extrato das cascas de <i>C. sessilis</i>	11
FIGURA 4 - Compostos identificados no extrato das folhas de <i>C. sessilis</i>	12
FIGURA 5 - Esquema simplificado de biossíntese de esteroides e terpenos.....	13
FIGURA 6 - Esquema simplificado de biossíntese de flavonoides.	15
FIGURA 7 - Esquema simplificado de biossíntese das lignanas.	16
FIGURA 8 - Fluxograma do procedimento para obtenção dos extratos e frações.....	19
FIGURA 9 - Fluxograma dos testes químicos e biológicos das amostras de cascas e folhas.	20
FIGURA 10 - Fluxograma do fracionamento em coluna (CH1) da fração em hexano das cascas.....	29
FIGURA 11 - Fluxograma do refracionamento em coluna (CH2) da subfração 13H1.	30
FIGURA 12 - Fluxograma do fracionamento em coluna (CA1) da fração em acetato de etila das cascas.....	32
Figura 13 - Fluxograma geral do procedimento experimental.	34
FIGURA 14 - Cromatograma de CG-EM da subfração 14H1	57
FIGURA 15 - Espectros de massas dos compostos obtidos na subfração 14H1.....	58
FIGURA 16 - Propostas de fragmentação para os esteroides da subfração 14H1.....	59
FIGURA 17 - Compostos identificados na subfração 14H1.....	60
FIGURA 18 - Espectro de RMN ¹ H da subfração 14H1.....	62
FIGURA 19 - Cromatograma de CG-EM da subfração 18H1.....	64
FIGURA 20 - Espectros de massas dos ácidos esteárico (6), beênico (7) e lignocélico (8).	65
FIGURA 21 - Espectro de massas do éster 14-metil pentadecanoato de metila (5).	66
FIGURA 22 - Cromatograma de CG-EM da subfração 8H2.....	67
FIGURA 23 - Espectros de massas dos ésteres palmitato de etila (9) e linoleato de etila (10).	68
FIGURA 24 - Esquema de obtenção dos compostos da fração em hexano das cascas de <i>C. sessilis</i>	69
FIGURA 25 - Cromatograma de CLAE-EM/EM da subfração 6A1.....	71
FIGURA 26 - Espectro de massas EM/EM do ácido geniposídico (11).	73

FIGURA 27 - Espectro EM/EM do ácido coumaroilquínico (12).	74
FIGURA 28 - Espectro de massas EM/EM do éster metílico do ácido cafeoilquínico (13)	75
FIGURA 29 - Espectro de massas EM/EM do lioniresinol glucopiranosídeo (14).	76
FIGURA 30 – Cromatograma de CLAE-EM/EM da subfração 12A1.	77
FIGURA 31 - Espectro de massas EM/EM do ácido dicafeoilquínico (15).	78
FIGURA 32 - Esquema de obtenção dos compostos bioativos da fração em hexano das cascas de <i>C. sessilis</i>	79

Lista de Tabelas

TABELA 1 - Solventes usados como fase móvel na coluna CH1.	28
TABELA 2 - Solventes usados como fase móvel na coluna CH2.	30
TABELA 3 - Solventes usados como fase móvel na coluna CA1.	31
TABELA 4 - Atividade antibacteriana (aeróbias) das amostras de cascas e folhas.....	35
TABELA 5 - Comparação entre resultados obtidos no trabalho atual e em Canelhas (2012) para as amostras de cascas e folhas de <i>C. sessilis</i> frente a bactérias aeróbias....	37
TABELA 6 - Atividade antibacteriana (anaeróbias) das amostras de cascas e folhas ..	39
TABELA 7 - Comparação entre resultados obtidos no trabalho atual e em Canelhas (2012) para as amostras de cascas e folhas de <i>C. sessilis</i> frente a bactérias anaeróbias.	40
TABELA 8 - Atividade antifúngica das amostras de cascas e folhas de <i>C. sessilis</i>	42
TABELA 9 - Capacidade de sequestro do radical peroxil para as amostras de cascas e folhas de <i>C. sessilis</i>	44
TABELA 10 - Inibição das amostras de cascas e folhas sobre α -amilase.....	47
TABELA 11 - Inibição das amostras de cascas e folhas sobre α -glicosidase.....	48
TABELA 12 - Inibição das amostras de cascas e folhas sobre lipase.....	50
TABELA 13 - Teor de fenóis totais das amostras de cascas e folhas.	54
TABELA 14 - Tempos de retenção dos principais picos da subfração 14H1.....	57
TABELA 15 - Dados de RMN ^{13}C dos esteroides campesterol (2), estigmasterol (3) e sitosterol (4) encontrados na subfração 14H1.	60
TABELA 16 - Tempos de retenção dos principais picos da subfração 18H1.....	64
TABELA 17 - Tempos de retenção dos principais picos da subfração 8H2.....	67
TABELA 18 - Tempos de retenção dos principais picos da subfração 6A1.....	71

Lista de abreviaturas e siglas

- AAPH - 2,2'-azobis (2-amidinopropano) diidrocloreto
Abs - absorbância
a.C. - antes de Cristo
A.f - fração em acetato de etila das folhas
amost. - amostra
ASC - área sobre a curva
CCD - cromatografia em camada delgada
CE - concentração efetiva
CG-EM - Cromatógrafo Gasoso acoplado ao Espectrômetro de Massas
CIM - concentração inibitória mínima
CLAE-EM/EM - Cromatógrafo Líquido de Alta Eficiência acoplado ao Espectrômetro de Massas
CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute* (inglês)
cm - centímetro
cont. - controle
Dicloro. - fração em diclorometano
DMAPP - difosfato de dimetilalila
DMSO - dimetilsulfóxido
EAG - miligramma de equivalente de ácido gálico
EDTA - *ethylenediamine tetraacetic acid* (inglês)
EGTA - *ethylene glycol-bis(β-aminoethyl ether)-N,N,N',N'-tetraacetic acid* (inglês)
Ext. Et.- extrato etanólico
f-AG - fração enriquecida de α-glicosidase
f-As - fração de saliva enriquecida de α-amilase
GAL-G2-α-CNP – α-(2-cloro-4-nitrofenil)-β-1,4-galactopiranosilmaltosídeo
GO - Goiás
ha - hectare
IPP - difosfato de isopentila
LAMIQ - Laboratório de Multusuários do Instituto de Química
LaPeMa - Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada
MES - ácido 2-(N-morfolino)-etanossulfônico
MetOH - fração em metanol

M.f - fração em metanol das folhas
mg - miligrama
MG - Minas Gerais
MHz - mega *hertz*
Mm - milímetros
MOPS – 3-*N*-morfolinopropanossulfônico
nm - nanômetros
NP/PEG - difenilboriloxietilamina/polietilenoglicol
NuPPeN - Núcleo de Pesquisa em Produtos Naturais
ORAC - *Oxygen Radical Absorbance Capacity* (inglês)
p.f. - ponto de fusão
pH - potencial hidrogênionico
PL - lipase pancreática suína
p-NPG - 4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo
p-NPP - palmitato de *p*-nitrofenil
RMN - Ressonância Magnética Nuclear
S.I. - sem inibição
SP - São Paulo
T.A. - temperatura ambiente
TSB - triptona de soja
UFU - Universidade Federal de Uberlândia
UNIFRAN - Universidade de Franca
UV - ultravioleta
Vis - visível
Vf - volume final
Vs - volume da solução
 Δ Abs - variação da absorbância

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 Potencialidades do Cerrado no fornecimento de plantas medicinais.....	3
1.1.1 <i>Características do Cerrado</i>	3
1.1.2 <i>Plantas medicinais do Cerrado</i>	4
1.2 A espécie <i>Cordiera sessilis</i> (Vell.) Kuntze	8
1.2.1 <i>Revisão do estudo químico e biológico de C. sessilis.....</i>	10
1.2.2 <i>Metabólitos secundários presentes na espécie Cordiera sessilis</i>	12
2 JUSTIFICATIVA	16
3 OBJETIVOS	16
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	17
4.1 Equipamentos e reagentes	17
4.1.1 Equipamentos	17
4.1.2 Reagentes.....	18
4.2 Coleta e identificação	18
4.3 Preparo das amostras	18
4.4 Obtenção dos extratos.....	18
4.5 Partição líquido-líquido	19
4.6 Atividade antibacteriana	20
4.7 Atividade antifúngica	21
4.8 Capacidade de sequestro do radical peroxil	22
4.9 Inibição enzimática.....	23
4.9.1 <i>Inibição da α-amilase</i>	23
4.9.2 <i>Inibição da α-glicosidase</i>	24
4.9.3 <i>Inibição da lipase</i>	25
4.10 Prospecção fitoquímica.....	26
4.11 Teor de fenóis totais	27
4.12 Fracionamento da fração em hexano das cascas	27

<i>4.12.1 Fracionamento em coluna da fração em hexano das cascas (Coluna CH1)</i>	28
<i>4.12.2 Refracionamento em coluna da fração em hexano das cascas (Coluna CH2)</i>	29
4.13 Fracionamento da fração em acetato de etila das cascas	31
<i>4.13.1 Fracionamento em coluna da fração em acetato de etila das cascas (Coluna CAI)</i>	31
4.14 Ensaios espectroscópicos e espectrométricos.....	33
<i>4.14.1 Análise em CG-EM</i>	33
<i>4.14.2 Análise em CLAE-EM/EM</i>	33
<i>4.14.3 Análise de RMN de 1H e de ^{13}C</i>	33
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES	35
5.1 Atividade antibacteriana	35
<i>5.1.1 Atividade antibacteriana aeróbica</i>	35
<i>5.1.2 Atividade antibacteriana anaeróbica</i>	38
5.2 Atividade antifúngica	42
5.3 Capacidade de sequestro do radical peroxil	43
5.4 Inibição enzimática.....	46
<i>5.4.1 Inibição da α-amilase</i>	<i>46</i>
<i>5.4.2 Inibição da α-glicosidase</i>	<i>48</i>
<i>5.4.3 Inibição da lipase</i>	<i>49</i>
5.5 Prospecção fitoquímica	51
5.6 Determinação do teor de fenóis totais	53
5.7 Fracionamento da fração em hexano das cascas e identificação de compostos ...	55
<i>5.7.1 Fracionamento em coluna da fração em hexano das cascas (Coluna CH1)</i>	55
<i>5.7.2 Subfração 14H1</i>	56
<i>5.7.3 Subfração 18H1</i>	<i>63</i>

<i>5.7.4 Refracionamento em coluna da fração em hexano das cascas (Coluna CH2)</i>	66
<i>5.7.5 Subfração 8H2</i>	66
5.8 Fracionamento da fração em acetato de etila das cascas e identificação de compostos	69
<i>5.8.1 Fracionamento em coluna da fração em acetato de etila das cascas (Coluna CA1)</i>	69
<i>5.8.2 Subfração 6A1</i>	70
<i>5.8.3 Subfração 12A1</i>	77
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS	79
REFERÊNCIAS	81
APÊNDICE	95

1 INTRODUÇÃO

As plantas medicinais são usadas desde o primórdio da humanidade na cura, prevenção e tratamento de doenças. Desde 500 a.C. textos chineses já relatavam nomes, doses e indicações de plantas para tratamento de enfermidades. Há 3000 a.C. o imperador chinês Shen Nung classificou mais de 300 ervas medicinais sob inspiração do Deus da Criação. Atualmente os chineses ainda dispõem do conhecimento milenar das propriedades das plantas medicinais para tratar diversas doenças (HELPAND; COWEN, 1990).

O interesse pelas propriedades farmacológicas das plantas medicinais tem crescido no Brasil, devido ao progressivo interesse na exploração da biodiversidade e no desenvolvimento sustentável (SOUZA; MENDONÇA; SILVA, 2013).

No mercado de Ver-o-peso, em Belém-PA, por exemplo, são comercializadas mais de 1200 plantas medicinais e ainda existem cerca de 240 espécies sendo cultivadas em quintais residenciais deste mesmo estado. A enorme biodiversidade da flora nacional garante a fonte medicinal natural utilizada pela população brasileira, que assegura a validade das informações terapêuticas, cuja transmissão ultrapassa séculos, desde a época em que apenas os índios ocupavam o território do Brasil (MACIEL *et al.*, 2002).

Aproximadamente 80% da população dos países em desenvolvimento são dependentes dos recursos da medicina popular. A prescrição depende, na maioria das vezes, dos efeitos terapêuticos, uma vez que nem sempre os constituintes químicos são conhecidos. O tratamento baseado em plantas medicinais é denominado fitoterapia (SOUZA; MENDONÇA; SILVA, 2013). De acordo com Firmo *et al.* (2011) 25% das prescrições médicas apresentam formulações baseadas em substâncias derivadas de plantas ou análogos sintéticos derivados de vegetais.

É estimado que 8% do faturamento da indústria farmacêutica originam-se de medicamentos derivados de produtos naturais. Por isso, é fundamental o conhecimento das propriedades farmacológicas dos vegetais e dos constituintes químicos responsáveis pela atividade biológica, chamados de princípios ativos. Esse estudo é importante também para evitar prejuízos aos usuários da fitoterapia, além de compreender as potencialidades terapêuticas da flora brasileira em meio a sua vasta biodiversidade, promovendo a utilização de recursos de maneira racional e científica (BRAGA; CASTILHO, 2012).

Os princípios ativos são derivados do metabolismo secundário dos vegetais. As moléculas e substâncias essenciais para o desenvolvimento da planta como carboidratos

e proteínas são responsáveis por funções básicas nas células vegetais e são conhecidas como metabólitos primários (BRAZ FILHO, 2010).

Como as plantas não apresentam sistema imunológico semelhante aos animais, para adaptarem-se, defenderem-se e evoluírem, desenvolvem uma resistência química complexa, biossintetizada através do metabolismo secundário. Essas substâncias atuam em alvos específicos das moléculas de seus predadores e podem também alcançar alvos terapêuticos de doenças humanas. Enquanto os medicamentos apresentam, em sua maioria, um único princípio ativo, os extratos vegetais são constituídos por multicomponentes que atuam em alvos farmacológicos diferentes. Tal eficácia tem garantido a utilidade da fitoterapia para cura de enfermidades há muito tempo (FERREIRA; PINTO, 2010).

A concentração ou ausência de metabólitos secundários na planta depende de fatores externos. Condições climáticas, época de coleta, período de desenvolvimento da espécie, índice de pluviosidade, radiação ultravioleta, nutrientes, altitude, poluição atmosférica, indução de estímulos mecânicos e ataques de patógenos podem influenciar na quantidade de metabólitos secundários produzidos pela planta ou até colaborar para a ausência de determinadas substâncias na composição da espécie. Tais fatores podem atuar em conjunto ou isoladamente para reduzir ou eliminar metabólitos nas plantas e, consequentemente, a atividade biológica do fitoterápico (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

O conhecimento popular sobre as propriedades de determinada planta é transmitido através da tradição oral, o que pode limitar as informações sobre os efeitos maléficos e benéficos do fitoterápico (FIRMO *et al.*, 2011). Essa relação entre as pessoas, plantas e sabedoria que os povos de determinada etnia detêm é notável para a seleção da espécie vegetal em estudo (ALBUQUERQUE; HANAZAKI, 2006). Um exemplo está na utilidade de *Cordiera sessilis*, conhecida também pelos nomes populares de “marmelada do campo” e “marmelinho do cerrado”, em que as folhas e ramos desta Rubiaceae são usadas para tratar afecções na pele (SOUZA; MENDONÇA; SILVA, 2013).

1.1 Potencialidades do Cerrado no fornecimento de plantas medicinais

1.1.1 Características do Cerrado

O Cerrado é um ecossistema brasileiro que ocupa aproximadamente 24% do território do país (BRAGA; CASTILHO, 2012). Nesse ecossistema, as chuvas ocorrem, geralmente, entre outubro e março e a temperatura média anual está entre 22 °C a 23 °C, por conta de sua posição geográfica possui radiação solar intensa, principalmente no mês de outubro (COUTINHO, 2002).

O relevo é caracterizado por intensos planaltos acima do nível do mar. Os solos são profundos, porosos e permeáveis, originados por deposição de sedimentos desde o período Terciário. Possui altos níveis de Al³⁺ responsáveis por tornar os solos aluminotóxicos, com pH entre 4 e 5 e impróprios para a agricultura. Assim há a necessidade de correção do pH e adubaçāo do solo, transformando a região dos estados de Goiás, Minas Gerais e Mato Grosso como as principais produtoras de soja do país (COUTINHO, 2002).

A vegetação do Cerrado não é única no ecossistema inteiro, apresenta-se como um mosaico, manifestando-se como campo sujo, cerradão, campo cerrado, cerrado *sensu stricto* ou campo limpo. De modo geral, possui dois estratos vegetais: lenhoso, constituído de árvores e arbustos, e herbáceo, formado por ervas e arbustos (COUTINHO, 2002).

O campo sujo é uma forma de cerrado em que predomina o estrato lenhoso, enquanto no campo limpo prevalece o herbáceo. Nas formas cerradão, campo cerrado e cerrado *sensu stricto* há um estrato intermediário, apresentando-se em vegetação herbácea e arbórea. Além disso, o fogo exerce um fator de múltiplos e diversificados efeitos ecológicos, uma excelente ferramenta para manejo das áreas do Cerrado, no sentido de conservação do ecossistema (COUTINHO, 2002).

O Cerrado conta com a disponibilidade de água subterrânea do Aquífero Guarani que alimenta nascentes de rios os quais compõem as bacias do Tocantins, São Francisco e Rio da Prata (RIBEIRO, 2009).

A variedade da fauna e flora permite a presença de povos desfrutando da biodiversidade do Cerrado há mais de 10 mil anos. O uso das plantas medicinais e fitoterápicos derivados do Cerrado é baseado no conhecimento tradicional, transmitido de geração em geração, e depende da identificação da espécie e da forma de manipulação baseada no conhecimento dos curandeiros e raizeiros (RIBEIRO, 2009).

A biodiversidade das espécies encontradas no Cerrado é responsável pela produção de uma variedade de compostos com potencial bioativo. As mais de 6 mil espécies de árvores existentes nesse ecossistema garantem uma diversidade taxonômica que provoca uma maior diferença química entre as plantas (OLIVEIRA, 2009).

1.1.2 Plantas medicinais do Cerrado

Desde os primórdios da humanidade há a relação planta-homem, a partir desse contato são desenvolvidas concepções sobre as plantas e suas utilidades. Essa relação é definida como etnobotânica e os conhecimentos obtidos a partir dela são, por muitas vezes, característicos de uma cultura ou comunidade (OLIVEIRA *et al.*, 2009a). Os conhecimentos etnobotânicos favorecem a escolha de uma espécie para ser estudada química e biologicamente, pois viabiliza com maior probabilidade a descoberta de substâncias bioativas (MACIEL *et al.*, 2002).

Uma pesquisa popular realizada com raizeiros e curandeiros do Alto e Médio Jequitinhonha e Norte de Minas Gerais demonstrou que cerca de 29,0% desses detentores de sabedoria popular utilizam as raízes dos vegetais para preparo dos medicamentos naturais. Enquanto aproximadamente 27,6% usam as folhas e 17,5% utilizam partes do caule (DIAS; LAUREANO, 2009).

O barbatimão (*Stryphnodendron barbatiman*) é uma das principais plantas usadas pelos curandeiros e raizeiros mineiros. Essa planta apresenta efeito cicatrizante, é usada no tratamento da gastrite e úlcera, coceira e corrimento vaginal (DIAS; LAUREANO, 2009). Estudos químicos revelam que as folhas dessa espécie possuem taninos, flavonoides (SANTOS *et al.*, 2002), saponinas e cumarinas (OLIVEIRA; FIGUEIREDO, 2007), enquanto as cascas apresentam flavonoides, derivados fenólicos e saponinas (MACEDO *et al.*, 2007).

Também são usadas pelos curandeiros e raizeiros mineiros a pacari (*Lafoensia pacari*) e o rufão (*Peritassa campestris*). As folhas e entrecascas da pacari em infusão são recomendadas para o tratamento da gastrite e úlcera e em banhos ou pomadas para curar feridas na pele, pois apresenta ação cicatrizante (DIAS; LAUREANO, 2009).

Pesquisas comprovaram que as bactérias multirresistentes *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, principais causadoras de infecção hospitalar, possuem sensibilidade ao extrato hidrometanólico das folhas de *Lafoensia pacari* (PORFÍRIO *et al.*, 2009). Essa parte da planta detém metabólitos das classes dos fenóis, taninos

hidrolisáveis, flavonoides, triterpenos, alcaloides, saponinas, flavonas, esteroides e terpenoides (FIRMO *et al.*, 2014). As cascas de *L. pacari* apresentam atividade antifúngica (SILVA JUNIOR *et al.*, 2010), efeito analgésico, anti-edematoso, anti-inflamatório, antipirético (ROGÉRIO *et al.*, 2006) e propriedades anti-depressivas comprovadas em camundongos (GALDINO *et al.*, 2009).

Na medicina popular mineira, das raízes alaranjadas do rufão (*Peritassa campestris*) é obtido um óleo usado em massagens para cólicas intestinais e reumatismo. Esse óleo também é consumido em infusões ou café quente como expectorante. As raízes são usadas em infusões e “garrafadas” para tratar anemia, impotência sexual e inflamações no estômago e intestino (DIAS; LAUREANO, 2009). As raízes de *P. campestris* possuem uma grande variedade de alcaloides (LIÃO *et al.*, 2001) e triterpenos (LIÃO *et al.*, 2014).

Os curandeiros e raizeiros goianos do Vale do Rio Vermelho, em Goiás, recomendam as espécies algodãozinho-do-campo e pé-de-perdiz para diversos tratamentos. Dos rizomas do algodãozinho-do-campo (*Cochlospermum regium*) é obtido um polvilho usado para tratar inflamações no útero e ovário, menstruação desregulada, doenças sexualmente transmissíveis, reumatismo, gastrite e úlcera. A “garrafada” feita dos rizomas é indicada para purificar o sangue, sanar coceiras, manchas na pela e mioma uterino. As folhas e flores do algodãozinho são recomendadas para inchaço nas pernas e dores de ouvido, respectivamente (DIAS; LAUREANO, 2009).

Pesquisas sugerem baixa toxicidade do extrato hidroetanólico dos rizomas de *Cochlospermum regium* em ratos (TOLEDO *et al.*, 2000) e considerável toxicidade do extrato aquoso dos rizomas em células ovarianas sadias de hamster (CESCHINI; CAMPOS, 2006). Os rizomas também possuem atividade antimicrobiana frente aos microorganismos *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, além de apresentar derivados fenólicos e triacilbenzenos (SOLON, 2009).

Do pé-de-perdiz (*Croton antisyphiliticus*) os curandeiros e raizeiros goianos usam a raiz como anti-inflamatório, depurativo do sangue, no tratamento de infecções, principalmente no útero, ovário e próstata, reumatismo, sífilis, também é indicada para limpar o útero após o parto, regular a menstruação e estimular a gravidez (DIAS; LAUREANO, 2009). Pereira *et al.* (2012) realizaram estudo com as raízes de *C. antisyphiliticus*, as quais apresentam atividade antimicrobiana frente à *S. aureus* e foram encontrados diterpenos com potencial citotóxico (FERNANDES *et al.*, 2013). As partes

aéreas da planta apresentaram atividade anti-inflamatória e flavonoides em sua composição (REIS *et al.*, 2014).

Na região do Bico do Papagaio e Norte do Tocantins, os curandeiros e raizeiros que ocupam essa localidade recomendam o uso de batata-de-purga (*Operculina macrocarpa*) e do ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*) para diversas enfermidades.

Segundo a sabedoria popular, os rizomas da batata-de-purga são usados em “garrafadas” ou pó com ação laxante, depurativo do sangue e tratamento da má digestão. Transformados em pó e em seguida em pílulas, os rizomas são indicados no combate a vermes, anemia, gripe, inflamações, alergia e doenças de pele, deles também é possível obter uma resina para tratar vermes, gripe e bronquite asmática. A infusão das sementes de batata-de-purga é recomendada para sanar a conjuntivite, dor na uretra e cólica menstrual (DIAS; LAUREANO, 2009).

Os rizomas de *Operculina macrocarpa* têm comprovado efeito laxante (MICHELIN; SALGADO, 2004) e anti-plaquetário, além de apresentarem a existência de polifenóis (PIERDONÁ *et al.*, 2014). O extrato hidroetanólico, a infusão e resina obtidos dos rizomas possuem atividade antioxidante e presença de ácidos fenólicos. Entretanto, a infusão e extrato demonstram efeitos hepatotóxicos (MICHELIN, 2008).

Os curandeiros e raizeiros tocantinenses preparam diversos produtos a partir da entrecasca do ipê-roxo (*Handroanthus impetiginosus*) como “garrafadas”, tinturas e infusões que são usados no tratamento de inflamações, infecções no sistema urinário, problemas de pele, doenças do coração, derrame, pressão alta, prisão de ventre e doenças sexualmente transmissíveis. A pomada obtida da casca do ipê-roxo é empregada como cicatrizante de ferimentos, na cura de coceiras e manchas na pele (DIAS; LAUREANO, 2009).

Pesquisas comprovam que a casca da espécie *H. impetiginosus* é rica em quinonas (WAGNER *et al.*, 1989), iridoides e fenil-propanoides glicosilados, além disso, apresenta ação adstringente, anti-inflamatória e antioxidante e favorece a reparação residual de lesões cutâneas (COELHO, 2015). O cerne de *H. impetiginosus* revela a presença de antraquinonas e naftoquinonas (STEINERT *et al.*, 1996).

O uso de plantas medicinais do Cerrado também está presente nas tradições do sul do Maranhão. Entre as principais plantas recomendadas pelos curandeiros e raizeiros maranhenses, estão o buriti (*Mauritia flexuosa*) e o velame (*Croton campestris*).

A partir do fruto do buriti obtém-se um azeite que apresenta ação cicatrizante, anti-inflamatória, é recomendado para evitar sangramento na gengiva e no tratamento de

queimaduras e doenças na pele, inclusive em animais. Esse azeite também é usado como protetor solar, hidratante, repelente e para tratar picadas de cobra. As raízes são usadas em forma de infusão, recomendada para má circulação e doenças cardíacas. A seiva obtida do talo verde é indicada para micose e o carvão, resultantes da queima dos frutos, é recomendado para gastrite e ressaca (DIAS; LAUREANO, 2009).

A investigação químico-biológica sobre o óleo do fruto do buriti (*Mauritia flexuosa*) demonstra que o produto é rico em β-caroteno, vitaminas (FRANÇA *et al.*, 1999), principalmente A e E (SILVA *et al.*, 2009), carotenoides, tocoferóis e ácidos graxos (ALBUQUERQUE *et al.*, 2005), com propriedades que previnem e tratam a xeroftalmia (SANTOS, 2005). Nas folhas é possível encontrar flavonoides (OLIVEIRA *et al.*, 2003) e compostos fenólicos que apresentam ação antioxidante e também estão presentes nos frutos e tronco da espécie. Além dessas propriedades, as folhas também apresentam atividade antimicrobiana frente à *Pseudomonas aureus* (KOOLEN *et al.*, 2013).

Do velame (*Croton campestris*) utiliza-se a raiz, que em forma de infusão é usada para tratar derrame, reumatismo, dor nas juntas, hemorroidas, prisão de ventre e no combate aos vermes. A “garrafada” obtida da raiz é indicada no tratamento e prevenção da epilepsia, febre e gripe. O xarope da raiz é usado para curar a gripe, pneumonia, falta de ar e tosse (DIAS; LAUREANO, 2009).

A casca de *Croton campestris* possui diterpenoides e apresenta ação moluscicida frente à *Bulinus truncatus* (EL BABILI *et al.*, 2006). As folhas da espécie possuem taninos, flavonas, flavonóis, auronas, flavonóis, catequinas, flavononas, alcaloides e terpenos (MATIAS *et al.*, 2010), apresentam efeitos anti-ulcerogênicos (JUNIOR *et al.*, 2013), atividade antibacteriana frente à *Escherichia coli* e *S. aureus* (MATIAS *et al.*, 2011). O óleo essencial das folhas contém sesquiterpenos e ação antimicrobiana frente à *E. coli* (ALMEIDA *et al.*, 2013), *S. aureus*, *Enterrococcus hirae* e *Candida albicans* (EL BABILI *et al.*, 2009).

O uso das plantas medicinais é, em muitos casos, a alternativa mais viável para tratamento de várias enfermidades que acometem determinada população, além de representar o valor cultural de uma região e seu povo. Entretanto, são baixos os valores econômicos obtidos a partir da exploração da biodiversidade do Cerrado na perspectiva do uso de plantas medicinais (RODRIGUES; BARBOSA, 2012).

Uma estimativa realizada por Rodrigues e Barbosa (2012) indica que o valor econômico atribuído a cada hectare de Cerrado explorado para o fornecimento de plantas

medicinais, sob as condições econômicas atuais, é de R\$ 0,001 ao ano, enquanto a pastagem e a lavoura geram um rendimento por hectare de R\$ 221,90 ao ano e R\$ 326,90 ao ano, respectivamente. Esse mesmo estudo revela uma projeção futura (em situação de otimismo financeiro e aumento da probabilidade de encontrar um novo medicamento derivado de plantas de 10%, considerando que atualmente é apenas 0,001%) em que a indústria farmacêutica alcançaria metade do faturamento atual das indústrias norte-americanas de fitoterápicos, que é de U\$ 6,3 bilhões/ha/ano.

Nesse sentido, o incentivo à pesquisa de produtos naturais e as melhorias nas condições econômicas e de exploração do Cerrado podem contribuir para preservação da biodiversidade desse ecossistema, a fim de garantir a matéria-prima dos medicamentos e o uso sustentável da biodiversidade (RODRIGUES; BARBOSA, 2012).

O clima e localização apropriados ao desenvolvimento da agricultura e pecuária na região do Cerrado têm colaborado para expansão dessa atividade em contrapartida à exploração da biodiversidade do ecossistema. O Cerrado tem perdido espaço para o desenvolvimento de culturas de produção de alimentos e dessa forma, sua flora e fauna perdem o ambiente nativo, prejudicando o acesso da população aos recursos naturais dessa região. Menos de 1% do potencial medicinal do Cerrado foi quimicamente estudado e há a possibilidade de que menos de 5% das espécies sejam adicionadas ao conhecimento disponível antes que sejam extintas (VIEIRA; MARTINS, 2000).

1.2 A espécie *Cordiera sessilis* (Vell.) Kuntze

A espécie *Cordiera sessilis*, conhecida pelos nomes populares “marmelinho do cerrado” ou “marmelada do campo” é uma planta que pertence ao gênero *Cordiera*, à tribo Gardenieae, à sub-família Ixoroideae da família Rubiaceae e é sinonímia de *Alibertia sessilis* (PERSSON, 2000).

A planta apresenta aspecto arbustivo e é característica do cerrado *sensu stricto*. A espécie possui pequenas flores brancas. O fruto é preto quando maduro, entre novembro e fevereiro, indeiscente, possui pequenas e muitas sementes, seu gosto adocicado remete levemente à batata-doce e serve de alimento para pássaros (MATSUOKA, 2008).

A madeira da planta é muito utilizada como lenha e carvão, suas folhas são consumidas por bovinos e, junto com os ramos é feita uma compressa pastosa ou banho para tratar afecções da pele, de acordo com a sabedoria popular (SILVA *et al.*, 2013). A

Figura 1 apresenta fotos de *C. sessilis* em seu habitat natural, das flores, galhos e frutos verdes da espécie.

FIGURA 1 - Espécie *Cordiera sessilis*.



Fonte: A autora.

1.2.1 Revisão do estudo químico e biológico de *C. sessilis*

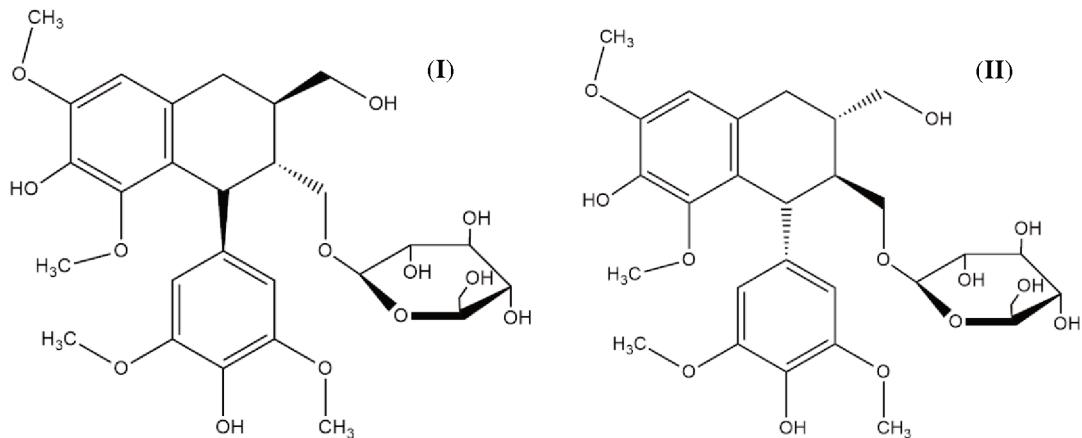
Estudos químicos e biológicos têm sido relatados referentes à espécie *C. sessilis*. De acordo com o estudo realizado por Canelhas (2012), o extrato etanólico das folhas e da madeira da espécie apresentaram metabólitos secundários como fenóis, flavonas, flavonóis, xantonas, esteroides e saponinas. Enquanto o extrato etanólico das cascas revela a presença de fenóis, flavonas, flavonóis, xantonas e saponinas.

O extrato etanólico e frações das folhas de *C. sessilis* apresentaram alta capacidade de sequestro do radical livre DPPH[·] e atividade promissora na inibição do crescimento de microorganismos do gênero *Streptococcus* spp e *Porphyromonas gingivalis*. As frações e extrato das cascas também exibiram resultados promissores frente às bactérias *S. mitis* e *S. sanguinis* (CANELHAS, 2012).

De acordo com Aquino *et al.* (2013), o óleo essencial das folhas apresenta uma grande quantidade de ácidos graxos (46,0%), álcoois de cadeia curta (22,4%), aldeídos (12,4%) e terpenos (6,0%). O óleo essencial das cascas compõe-se majoritariamente de ácidos graxos (88,4%) e o óleo da madeira é composto por ácidos graxos (29,0%), álcoois de cadeia longa (18,5%), fenóis (5,2%) e o sesquiterpeno *trans*-cariofileno (0,7%).

As cascas de *C. sessilis* também foram estudadas por Silva *et al.* (2006) e foram encontradas duas lignanas glicosiladas enantioméricas descritas pela primeira vez no gênero Rubiaceae: o (+)-lioniresinol 3 α -O- β -glicopiranosídeo (**I**) e o (-)-lioniresinol 3 α -O- β -glicopiranosídeo (**II**) (Figura 2).

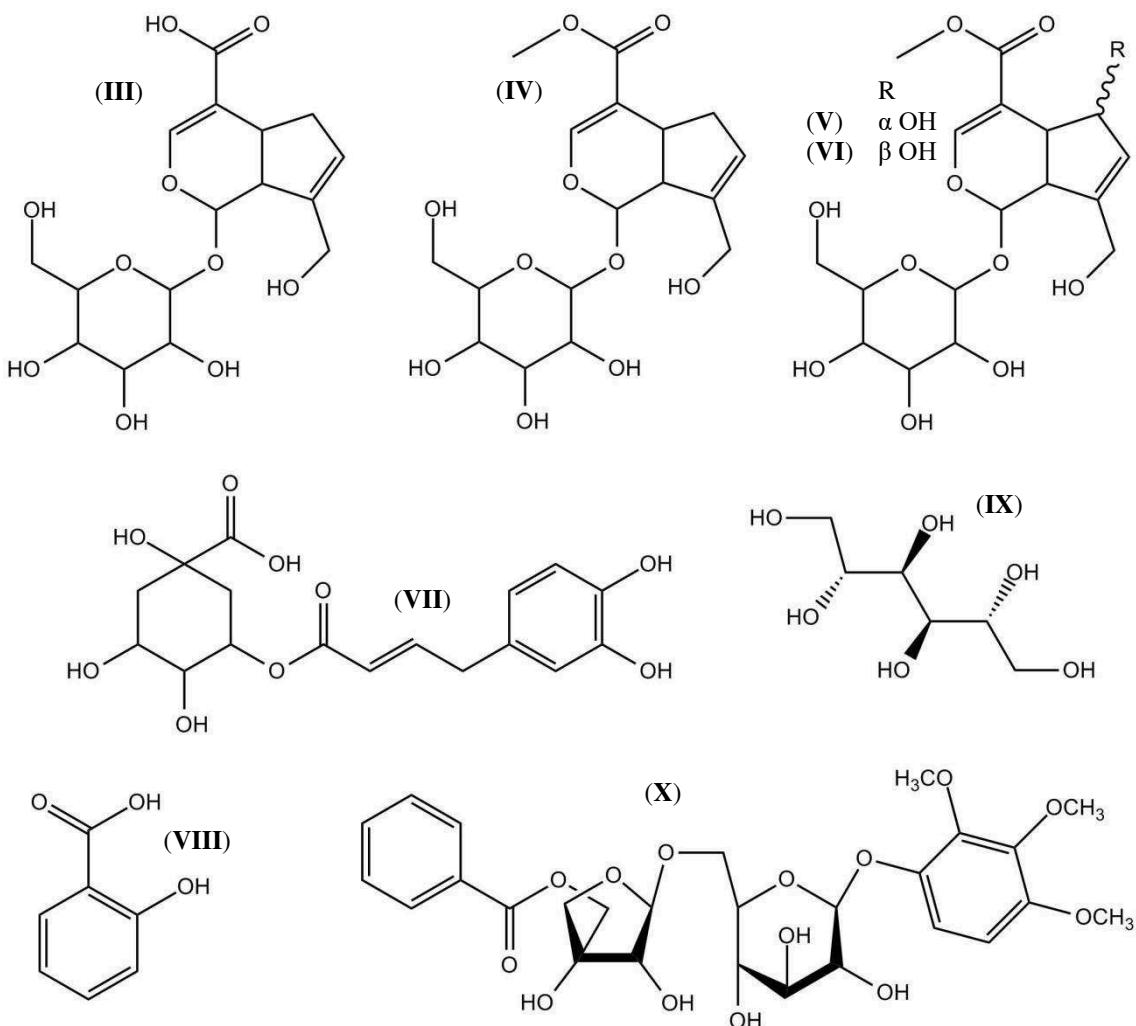
FIGURA 2 - Lignanas enantioméricas identificadas no extrato das cascas de *C. sessilis*.



Fonte: SILVA et al., 2006.

Em 2007a, Silva *et al.* identificaram nas cascas de *C. sessilis* os seguintes compostos: ácido geniposídico (**III**), geniposídeo (**IV**), 6 α -hidroxigeniposídeo (**V**), 6 β -hidroxigeniposídeo (**VI**), ácido clorogênico (**VII**), ácido salicílico (**VIII**), D-manitol (**IX**) e o derivado fenólico glicosilado; 3,4,5-trimetoxifenil-1-*O*- β -D-(5-*O*-siringoil)-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)- β -D-glicopiranosídeo (**X**) (Figura 3, p. 11). Todos os compostos foram submetidos ao teste do potencial antifúngico por bioautografia direta e o derivado fenólico glicosilado (**X**) demonstrou atividade moderada (CIM 100 μ g mL $^{-1}$) frente aos microorganismos *Cladosporium cladosporioides* e *Cladosporium sphaerospermum*.

FIGURA 3 - Substâncias identificadas no extrato das cascas de *C. sessilis*.

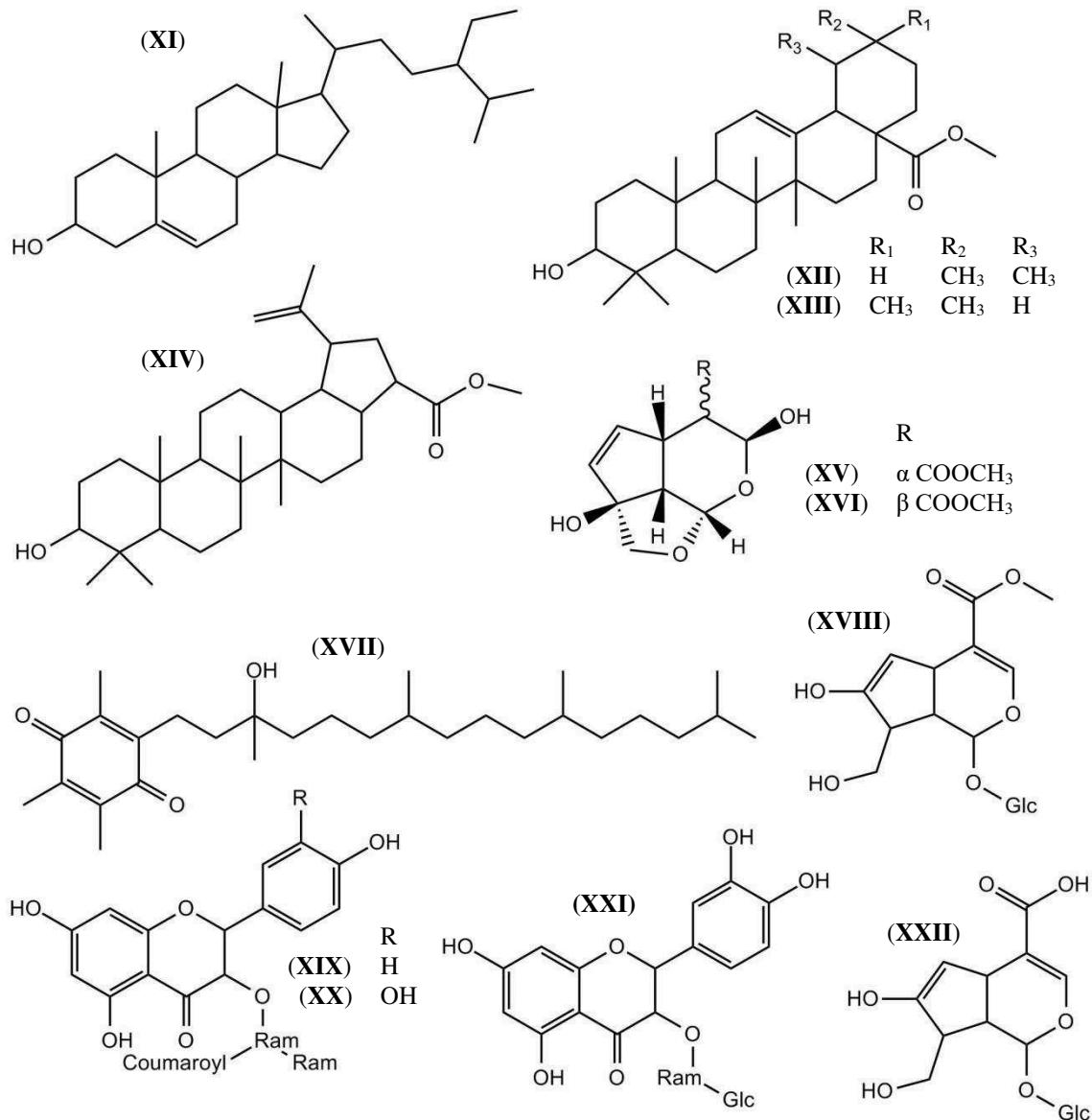


Fonte: Silva *et al.*, 2007a.

Anteriormente, Bolzani *et al.* (1997) realizaram estudo com as folhas da espécie *C. sessilis*. A planta foi quimicamente investigada e demonstrou a presença dos compostos: sitosterol (**XI**), ésteres metílicos do ácido ursólico (**XII**), oleanólico (**XIII**) e

epi-betulínico (**XIV**), tocoferolquinona (**XVII**), α e β gardiol (**XV** e **XVI**, respectivamente), iridóide gardenosídeo (**XVIII**), éster metílico do ácido deacetilasperulosídico (**XXII**), quercentin-3-*O*-rutinosídeo (**XXI**), quercentin-3-*O*- β -D-(2"-*O*-*trans*-p-coumaroyl)-rutinosídeo (**XX**) e kaempferol-3-*O*- β -D-(2"-*O*-*trans*-p-coumaroyl)-rutinosídeo (**XIX**) (Figura 4).

FIGURA 4 - Compostos identificados no extrato das folhas de *C. sessilis*.



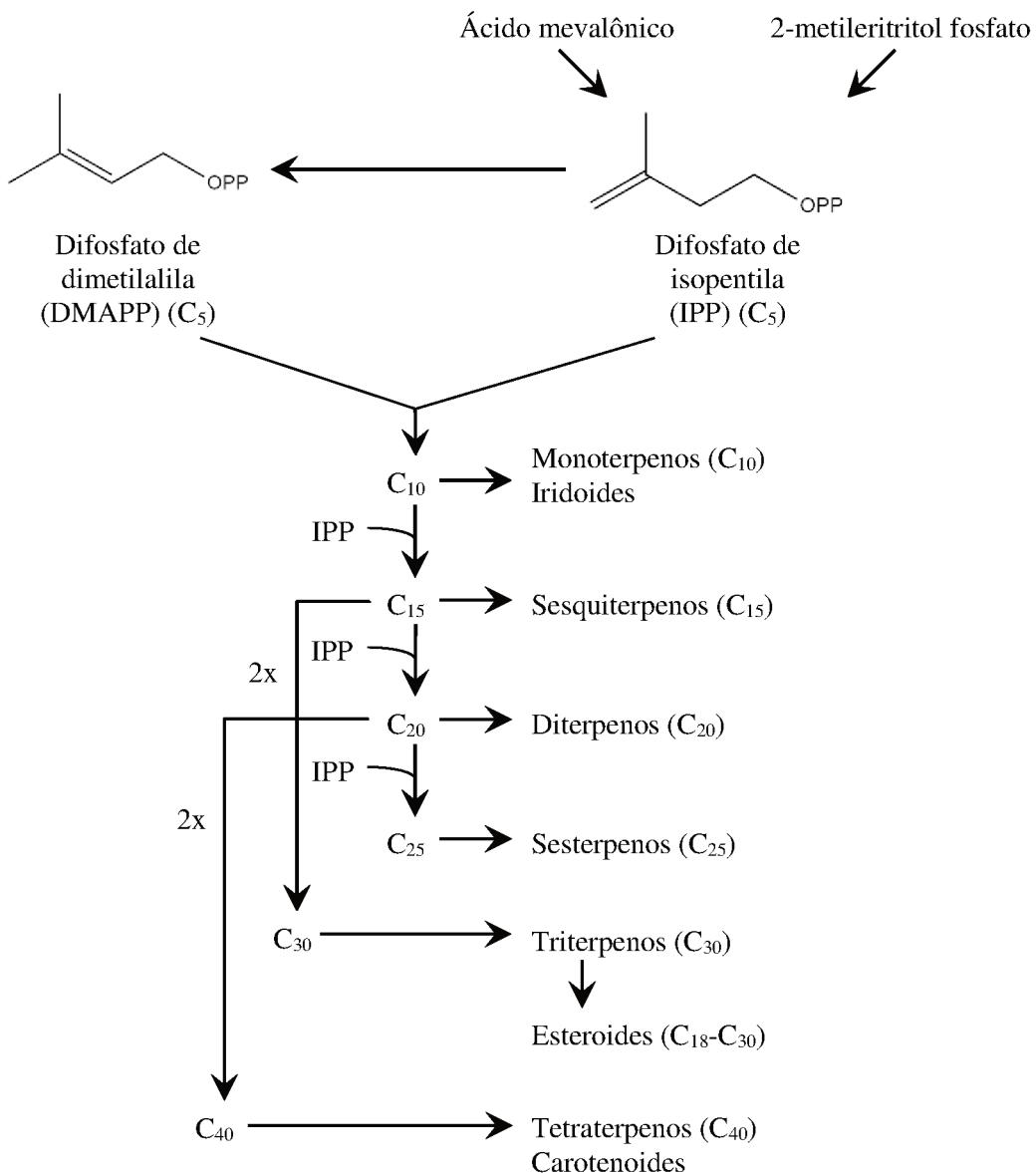
Fonte: BOLZANI et al., 1997.

1.2.2 Metabólitos secundários presentes na espécie *Cordiera sessilis*

Os triterpenos e esteroides identificados nas folhas da espécie *C. sessilis* (substâncias **XI**, **XII**, **XIII** e **XIV**) são biossintetizados a partir da ligação cabeça-cauda

de seis unidades de isopreno (2-metil-butadieno), fornecendo uma ampla variedade de substâncias por conta da diversidade de esqueleto e funcionalização (DEWICK, 2009) (Figura 5).

FIGURA 5 - Esquema simplificado de biossíntese de esteroides e terpenos.



Fonte: Dewick (2009).

Entre os 100 tipos de esqueletos disponíveis, a maioria dos triterpenos é formada por tetra ou pentaciclos (DOMINGO *et al.*, 2009) e fornecem cerca de 40 000 estruturas diferentes (ROBERTS, 2007). É a maior classe de produtos naturais, possuindo diversos papéis no organismo vegetal como defesa contra predadores, patógenos e concorrentes, além de envolverem-se em relações de mutualismo entre as plantas e seus companheiros

(GERSHENZON; DUDAREVA, 2007). Apresentam ampla atividade biológica, dentre elas; antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante (VECHIA *et al.*, 2009), leishmanicida (DELGADO-MENDEZ *et al.*, 2008) e cardioprotetora (SUDHALAR *et al.*, 2007).

O esqueleto iridano, encontrado nos iridóides, presentes nas folhas e cascas de *C. sessilis* (substâncias **III**, **IV**, **V**, **VI**, **XV**, **XVI**, **XVIII** e **XXII**) é originado a partir de um monoterpeno, formado por duas unidades de isoporenos. O esqueleto contém um anel ciclopentano fundido com um heterociclo de oxigênio comportando seis membros e possui grupos funcionais que garantem a variabilidade de estruturas dessa classe. Geralmente, os iridoides são encontrados em sua forma glicosilada (DEWICK, 2009).

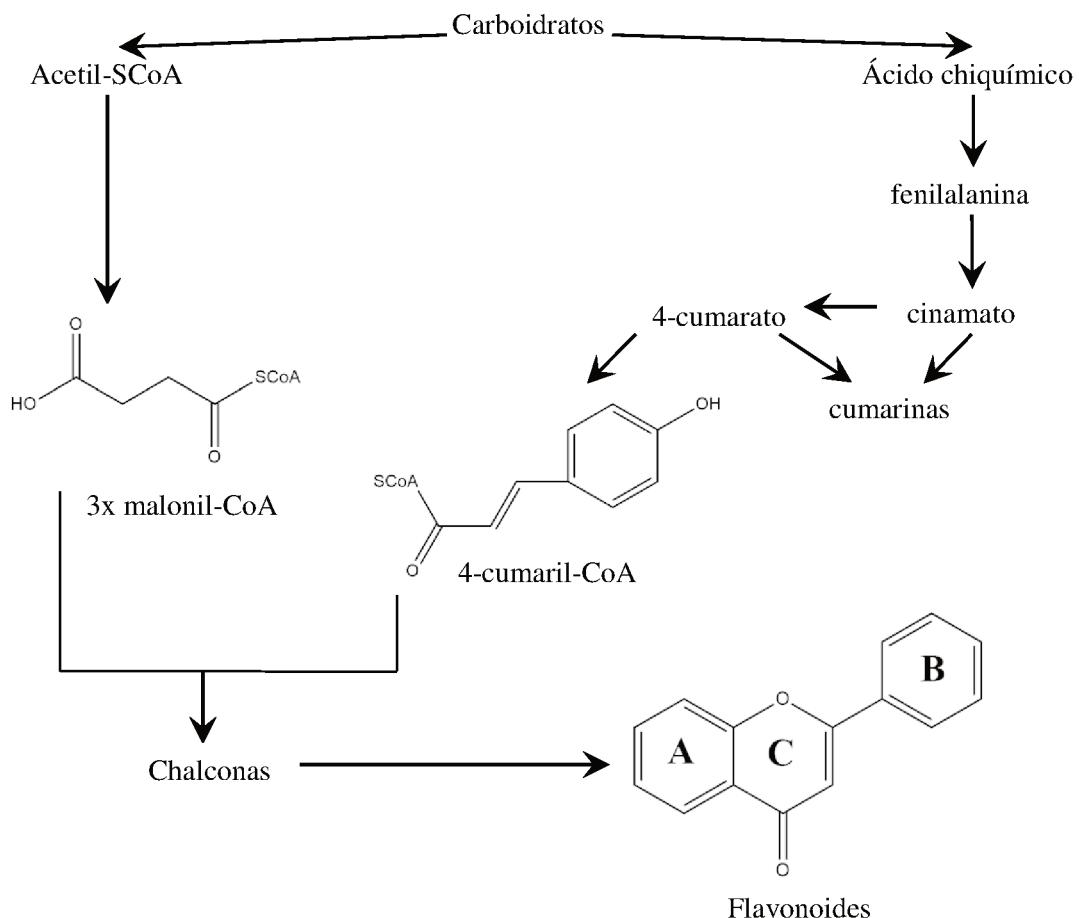
Nas plantas, os iridoides desempenham função protetora frente aos predadores, sendo amargos e tóxicos para os herbívoros (HEGNAUER; KOOIMAN, 1978). Estudos comprovam atividade antitumoral, antimicrobiana (ISHIGURO *et al.*, 1988), anti-inflamatória (RÉCIO *et al.*, 1994) e anti-viral (BERMEJO *et al.*, 2002) desses compostos.

Os flavonoides, metabólitos secundários encontrados nas folhas de *C. sessilis* (substâncias **XIX**, **XX** e **XXI**), são grupos polifenólicos que apresentam sua estrutura basicamente composta por dois anéis aromáticos. Já foram identificadas mais de 8000 substâncias pertencentes a esse grupo. Tal variedade surge devido à ampla variação de combinações de grupos metila e hidroxila como substituintes na estrutura química básica da cadeia (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

Os flavonoides heterosídeos, obtidos a partir de ligações entre os flavonoides e grupos glicosídicos, garantem características importantes às plantas como copigmentação em flores e proteção contra raios ultra-violeta nas folhas (ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTTO, 2017). Os flavonoides possuem múltiplos efeitos biológicos, sendo eles atividade antioxidante (HARAGUCHI *et al.*, 1998), anti-inflamatória (SERAFINI; PELUZO; RAGUZZINI, 2010) e antitumoral (SRINIVAS, 2015). Essa classe de compostos também é responsável por inibir a destruição do colágeno (DI CARLO *et al.*, 1999) e agregação plaquetária. É possível observar que a ingestão de flavonoides está associada à longevidade e à redução na incidência de doenças cardiovasculares (KUMAR; PANDEY, 2013).

A Figura 6 (p. 15) apresenta um esquema simplificado de biossíntese de flavonoides.

FIGURA 6 - Esquema simplificado de biossíntese de flavonoides.

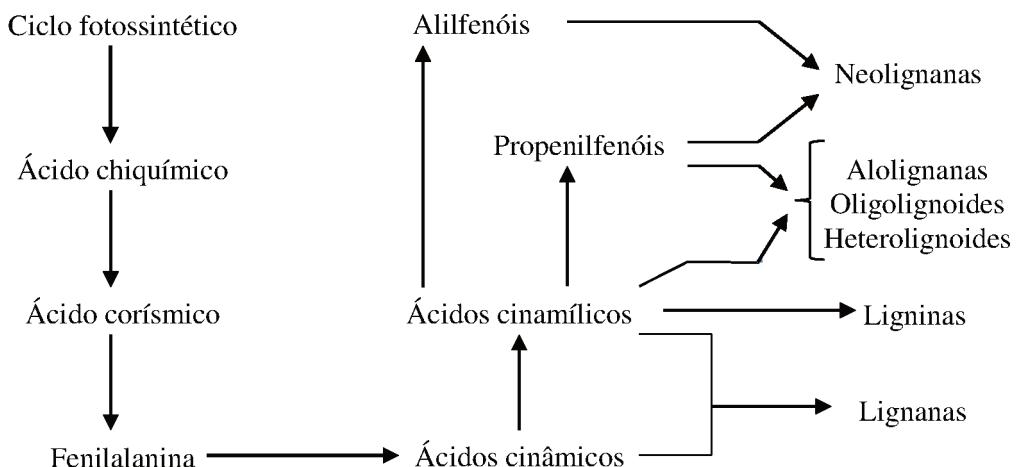


Fonte: Zuanazzi; Montanha; Zucolotto (2017).

As lignanas, exibidas nas cascas da espécie (substâncias I e II), são dímeros formados a partir do acoplamento de álcoois cinamílicos e ácidos cinâmicos. As lignanas depositam-se nas paredes celular dos vegetais, sendo responsável pela rigidez que essas células apresentam (BARBOSA-FILHO, 2017). Os lignoides, grande grupo ao qual pertencem as lignanas, desempenham função importante na adaptação ecológica das espécies e estão envolvidos em interações das plantas com fungos, insetos e outros vegetais (GOTLIEB, 1982). As lignanas apresentam atividade anticâncer (IONKOVA, 2011), anti-inflamatória, antimicrobiana, antioxidante e imunossupressora (SALEEM *et al.*, 2005).

A Figura 7 (p. 16) ilustra um esquema simplificado de biossíntese das lignanas.

FIGURA 7 - Esquema simplificado de biossíntese das lignanas.



Fonte: Barbosa Filho (2017).

A variedade de metabólitos secundários identificada nas folhas e cascas de *C. sessilis* e a atividade antifúngica associada a esses metabólitos, bem como a ação antibacteriana e antioxidante dos extratos e frações das cascas e folhas desse vegetal, demonstram o potencial farmacológico que a espécie possui.

2 JUSTIFICATIVA

Canelhas (2012) realizou estudo fitoquímico e biológico dos extratos das folhas e cascas da espécie *C. sessilis*, além da análise do óleo essencial das cascas, folhas e madeira. Foram obtidos resultados promissores para os testes antioxidant e antibacteriano. Entretanto, os componentes químicos das frações de cascas e folhas não foram identificados, assim como não foram realizados testes para verificação da atividade antifúngica e inibição enzimática dessas frações.

Nesse contexto, este trabalho realizou estudos adicionais de atividades biológicas (inibição enzimática e antimicrobiana), bem como a identificação estrutural de substâncias bioativas presentes nas folhas e cascas da espécie.

3 OBJETIVOS

Identificar os constituintes químicos presentes nos extratos, frações e resíduo obtidos da partição líquido-líquido das cascas e folhas de *C. sessilis*, assim como avaliar o potencial de inibição enzimática, atividades antimicrobiana e antifúngica e a capacidade

de sequestro do radical peroxil dos extratos, frações e resíduos obtidos das cascas e folhas da espécie.

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

A análise química das amostras e sua preparação foram realizadas no Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais (NuPPeN) da Universidade Federal de Uberlândia-MG (UFU). A experimentação envolvida para verificação da atividade antimicrobiana foi realizada no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMa) da Universidade de Franca-SP (UNIFRAN). Os testes para verificação da inibição enzimática e avaliação da capacidade de sequestro do radical peroxil foram realizados no Laboratório de Genética e Bioquímica da UFU.

4.1 Equipamentos e reagentes

4.1.1 Equipamentos

- Balança analítica Shimadzu, modelo AUW220D;
- Balança de luz infravermelha, marca Kett, modelo FD-600;
- Multiprocessador;
- Evaporador rotatório sob pressão reduzida IKr, modelo RV10;
- Banho de aquecimento Fisaton, modelo 550;
- Aparelho liofilizador Terroni, modelo LZ 3000;
- Placas cromatográficas de sílica-gel 60 com indicador de fluorescência UV₂₅₄ (0,2 mm, Macherey-Nagel);
- Chapa de aquecimento Fisatom, modelo 550;
- Sílica-gel 40-63 µm, diâmetro de poro 60 Å, Sigma-Aldrich;
- RMN Bruker modelo Ascend TM (9,2 Tesla) frequência 400 MHz para H¹ e 100 MHz para C¹³;
- CG-EM, marca Shimadzu, modelo GC2010/QP5010;
- CLAE-EM/EM, marca Agilent, modelo Infinity 1260B;
- Espectrofotômetro Genesys 10S UV-Vis;

4.1.2 Reagentes

- NP-40, Sigma-Aldrich;
- PEG, Sigma Aldrich;
- Cloreto de alumínio, Vetec Química;
- Vanilina, Vetec Química;
- Fase estacionária C₁₈, Sorbent Technologies;
- Fase estacionária sílica gel, 40-63 µm, Sigma-Aldrich;
- Folin-Ciocalteu, Cromoline;
- Ácido gálico, Sigma-Aldrich;
- CDCl₃ (D-99,8%, Cambridge Isotope Laboratories).

4.2 Coleta e identificação

Aproximadamente 1 kg de folhas e cascas externas da planta foi coletado na Fazenda Contendas, zona rural do município de Morrinhos, em Goiás (Latitude: 17°42'00.9"S; Longitude: 49°21'48.6"W), em 18 de Outubro de 2015. A exsicata utilizada para identificação botânica da espécie foi depositada no Herbário Uberlandense sob o código HUFU 74562. A espécie foi gentilmente identificada pelo professor Dr. Ivan Schiavini da Silva, da Universidade Federal de Uberlândia, em 19 de Outubro de 2015.

4.3 Preparo das amostras

As folhas e cascas foram secas separadamente em temperatura ambiente. A umidade do material foi medida utilizando balança de luz infravermelha. Após secagem, as amostras foram picadas e moídas em multiprocessador e o resultante da moagem foi armazenado em recipiente de vidro para extração em etanol.

4.4 Obtenção dos extratos

A extração por maceração em temperatura ambiente foi realizada com o material resultante da moagem das cascas e folhas. O pó foi dividido em três porções e armazenado em recipientes de vidro, em seguida o material coberto com etanol e deixado em repouso durante 5 semanas à temperatura ambiente. A cada semana, retirava-se o solvente por

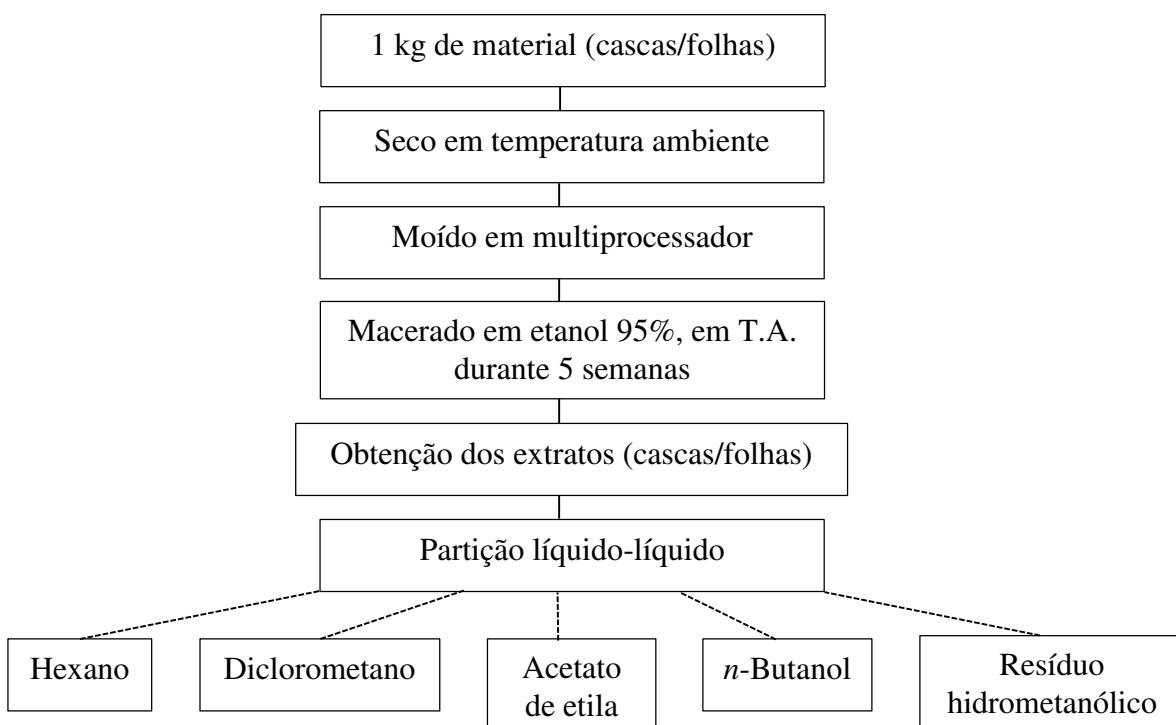
meio de filtração e submetia o filtrado à evaporação rotativa a 40°C. O produto seco obtido foi armazenado em freezer a -18,0 ± 5 °C, em seguida liofilizado.

4.5 Partição líquido-líquido

Cerca de 30,0 gramas do extrato etanólico das cascas e 30,2 gramas do extrato etanólico das folhas foram submetidos, separadamente, à partição líquido-líquido (Figura 8). A massa do extrato foi ressolvabilizada em 200 mL de metanol/água (9:1), em seguida essa suspensão foi disposta em funil de separação e submetida à adição dos solventes por ordem crescente de polaridade: hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol. Foram realizadas 5 adições de 200 mL para cada solvente.

Após decantação, a fase orgânica foi recolhida e submetida à evaporação rotativa sob pressão controlada, na temperatura de 40 °C, obtendo-se as frações referentes a cada solvente. Ao final das adições foi obtido o resíduo hidrometanólico, o qual teve solvente retirado por evaporação rotativa. As frações e resíduo resultantes da partição foram armazenados no freezer (-18°C ± 5 °C) e depois liofilizados. A Figura 8 apresenta o esquema de obtenção das frações a partir da partição líquido-líquido.

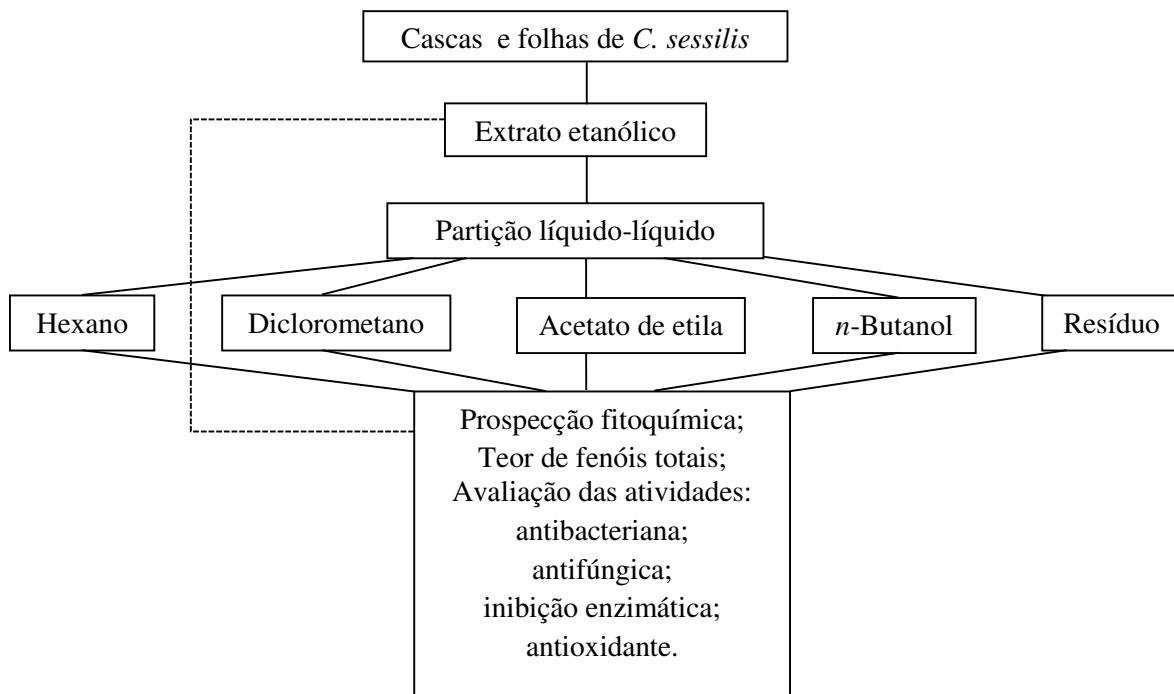
FIGURA 8 - Fluxograma do procedimento para obtenção dos extratos e frações.



Fonte: A autora.

As frações obtidas da partição líquido-líquido, bem como o resíduo hidrometanólico e o extrato etanólico de cascas e folhas foram submetidos aos testes biológicos e de prospecção fitoquímica (Figura 9).

FIGURA 9 - Fluxograma dos testes químicos e biológicos das amostras de cascas e folhas.



Fonte: A autora.

4.6 Atividade antibacteriana

A avaliação da atividade antibacteriana foi feita mediante regulamento da *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012a; 2012b) pelo método de Microdiluição em Caldo (CARVALHO *et al.*, 2011; PETROLINI *et al.*, 2013), realizada no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA) da Universidade de Franca – SP. Foram utilizadas as cepas aeróbias *Streptococcus mutans*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus sanguinis* e *Aggregatibacter actinomycetemcomitans* e as anaeróbias *Porphyromonas gingivalis*, *Fusobacterium nucleatum* e *Actinomyces naeslundii*.

Triptona de soja (TSB) foi usado como meio de cultura para as bactérias aeróbias e para as anaeróbias utilizou-se caldo *Schaedler* suplementado com hemina ($5 \mu\text{g mL}^{-1}$) e menadione ($10 \mu\text{g mL}^{-1}$). O teste foi realizado em microplaca contendo 96 poços, onde foram adicionados em cada orifício o inóculo, o caldo e a amostra (extrato, frações e resíduo de cascas e folhas), resultando em um volume final de $100 \mu\text{L}$ para bactérias

aeróbias e 200 µL para anaeróbias. O inóculo foi preparado e padronizado de acordo com a escala McFarland e o volume adicionado em cada poço para as bactérias aeróbias foi 20 µL e para anaeróbias 40 µL.

Para o teste com bactérias aeróbias, as microplacas foram seladas com parafilme e incubadas em microaerofilia pelo sistema chama/vela, na temperatura de 37 °C, durante 24 h. Após o período de incubação foram adicionados em cada poço 30 µL de indicador resazurina (0,01% em água).

As bactérias anaeróbias foram incubadas por 72 h em câmara de anaerobiose (5-10% H₂, 10% CO₂, 80-85% N₂), na temperatura de 36 °C, e também foi usada resazurina como indicador após a incubação. A coloração azul após adição de resazurina indica ausência de crescimento bacteriano e a coloração vermelha determina presença de crescimento bacteriano.

As concentrações das amostras testadas para bactérias aeróbias e anaeróbias foram de 400 µg mL⁻¹ a 0,195 µg mL⁻¹. Clorexidina foi utilizada como controle positivo para bactérias aeróbias, as concentrações testadas deste controle foram 5,9000 µg mL⁻¹ a 0,0115 µg mL⁻¹ e para os microorganismos anaeróbios foi usado Metronidazol como controle positivo, com concentrações testadas entre 5,9000 µg mL⁻¹ e 0,0115 µg mL⁻¹. Como controle negativo foi usado DMSO (concentração 4% v/v).

O resultado do teste é expresso em Concentração Inibitória Mínima (CIM), usando a unidade µg mL⁻¹ e indicando a concentração mínima capaz de inibir o crescimento das bactérias testadas.

4.7 Atividade antifúngica

A avaliação da atividade antifúngica foi realizada mediante regulamento CLSI 2008, no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA) da Universidade de Franca – SP, pelo método de microdiluição em caldo segundo metodologia descrita por Goughenour; Balada-Llasat; Rappleye (2015) e Cunha *et al.* (2017). Foram utilizados os microorganismos *Candida albicans*, *Candida tropicalis* e *Candida glabrata*.

Para o teste antifúngico, as amostras foram dissolvidas em DMSO na concentração de 192000 µg mL⁻¹ (solução estoque), foram realizadas diluições da solução estoque de cada amostra (extrato, fração e resíduo de cascas e folhas) em meio de cultura RPMI 1640, tamponado a pH 7,2, com 0,165 mol L⁻¹ do ácido 3-N-

morfolinopropanossulfônico (MOPS) a $12000 \mu\text{g mL}^{-1}$. O incóculo foi preparado de acordo com a escala McFarland e obteve-se o valor de $6,0 \cdot 10^6 \text{ UFC mL}^{-1}$, posteriormente, foram realizadas diluições em caldo RPMI até que o inóculo atingisse $1,2 \cdot 10^3 \text{ UFCmL}^{-1}$.

O teste foi realizado em placas de microdiluição com 96 poços, nos quais foram feitas diluições seriadas com as concentrações variando entre $3000,00 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $1,46 \mu\text{g mL}^{-1}$. O meio de cultura usado no teste foi o caldo RPMI tamponado com MOPS (pH 7,2). Volume de $100 \mu\text{L}$ da suspensão do inóculo foram colocados em cada poço e o volume final de cada orifício foi de $200 \mu\text{L}$. Anfotericina B foi usada como controle positivo e as concentrações testadas variaram entre $16,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $0,1 \mu\text{g mL}^{-1}$, para controle negativo foi usado DMSO e as concentrações testadas estavam entre 10% a 1% (v/v). O resultado foi obtido em Concentração Inibitória Mínima (CIM) usando a unidade $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.8 Capacidade de sequestro do radical peroxil

O extrato etanólico, as frações e resíduo hidrometanólico das cascas e folhas foram submetidos à avaliação da capacidade de sequestro do radical peroxil pelo método ORAC (do inglês *Oxygen Radical Absorbance Capacity*) segundo a metodologia descrita por PRIOR *et al.* (2003). As análises foram realizadas no Instituto de Genética e Bioquímica da UFU.

As amostras foram dissolvidas em DMSO, atingindo a concentração de $20 \mu\text{g mL}^{-1}$, de onde foram retirados $25 \mu\text{L}$ aos quais foram misturados $150 \mu\text{L}$ de fluoresceína dissolvida em tampão fosfato a 75 mmol L^{-1} , em pH 7,4 (o poder antioxidante da amostra, ao longo do tempo, é indicado através da fluorescência dessa substância) e deixado em repouso durante 15 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados $30 \mu\text{L}$ da solução de 2,2'-azobis (2-amidinopropano) dihidrocloreto (AAPH) dissolvido em fosfato na concentração de 75 mmol L^{-1} , em pH 7,4. A reação é iniciada pela decomposição térmica do AAPH que gera o radical peroxil, a análise avalia o potencial antioxidante da amostra a partir da inibição da oxidação induzida pelo radical peroxil.

A intensidade da fluorescência é medida no espectrofluorímetro a cada 1 minuto e 30 segundos num intervalo de 90 minutos. O branco é determinado substituindo a amostra por tampão fosfato e para controle positivo foi usado o ácido ascórbico.

A capacidade de sequestro do radical peroxil é determinada por meio de uma curva analítica construída com concentrações conhecidas do ácido 6-hidroxi-2,5,7,8-

tetrametilcromano-2-carboxílico (Trolox) (125,00; 62,50; 31,25; 15,62 e 7,81 μM). A medida da perda de fluorescência da fluoresceína é feita a partir do cálculo da área sob a curva de concentrações conhecidas de Trolox. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados são expressos em μmol equivalente de Trolox por grama de amostra.

4.9 Inibição enzimática

4.9.1 Inibição da α -amilase

Os ensaios de avaliação da inibição da α -amilase foi realizada no Laboratório de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia. Foi utilizado o método GALG2CNP modificado para verificar a capacidade do extrato, frações e resíduo em inibir a atividade da enzima α -amilase (SANTOS *et al.*, 2012; GOUVEIA *et al.*, 2014).

Para o teste foi usado o substrato α -(2-cloro-4-nitrofenil)- β -1,4-galactopiranosilmaltosídeo (GAL-G2- α -CNP) e uma fração de saliva enriquecida de α -amilase (f-AS), a qual foi obtida a partir da coleta de saliva humana armazenada a -20 °C por 48h (Comitê de Ética N° 407.597). Posteriormente, a saliva foi descongelada e centrifugada a 12000 xg durante 10 minutos, na temperatura de 20 °C, o sobrenadante obtido foi submetido ao fracionamento em coluna Q-Sepharose usando como fase móvel; 50 mmol L⁻¹ de Tris-HCl, 10 mmol L⁻¹ de EDTA e 10 mmol L⁻¹ de EGTA. O volume de exclusão da coluna foi dialisado em tampão de bicarbonato de amônio 50 mmol L⁻¹ (pH 7,0), liofilizado e solubilizado em 50 mmol L⁻¹ de tampão ácido 2-(N-morfolino)-etanossulfônico (MES), contendo 5 mmol L⁻¹ de cloreto de cálcio, 140 mmol L⁻¹ de tiocianato de potássio e 300 mmol L⁻¹ de cloreto de sódio (pH 6,0).

Extratos, frações e resíduo de cascas e folhas foram dissolvidas em DMSO na concentração de 1 mg mL⁻¹ e incubadas com f-AS na proporção 1:10, no período de 30 minutos e temperatura de 37 °C. Em seguida, houve adição de 320 μL do substrato (GAL-G2- α -CNP) na concentração de 12 mmol L⁻¹, a fim de iniciar a reação. Os valores de absorbância foram medidos a 405 nm, durante 3 minutos, com intervalo de 1 minuto e na temperatura de 37 °C. O controle foi realizado substituindo a amostra pelo tampão MES e a acarbose foi utilizada como controle positivo, ambos na concentração de 1 mg mL⁻¹.

Os ensaios foram realizados em triplicata e o resultado é apresentado em porcentagem de inibição da α -amilase, calculado por meio da Equação 3 (p. 24). As

Equações 1 e 2 determinam, respectivamente, a atividade da enzima em U mL⁻¹ e em % e foram usadas no cálculo da inibição.

$$\text{Atividade da } \alpha\text{-amilase } \left(\frac{U}{mL}\right) = \frac{\left[\frac{(\Delta Abs)}{min} \cdot Vf \cdot Fd\right]}{\varepsilon \cdot Vs \cdot I} \quad \text{Equação 1}$$

$$\text{Atividade da } \alpha\text{-amilase (\%)} = \frac{(A \text{ amostra})}{(A \text{ controle})} \cdot 100 \quad \text{Equação 2}$$

$$\text{Inibição da } \alpha\text{-amilase (\%)} = 100 - (\% \text{ atividade da } \alpha\text{-amilase}) \quad \text{Equação 3}$$

Onde: $\Delta Abs/min = [(Abs_3 - Abs_1)/2]$ corresponde à diferença de absorbância por minuto (Abs = absorbância; 1 e 3 = minutos); Vf é o volume total da reação (328 µL); Vs trata-se do volume das amostras mais α -amilase, 8 µL; Fd é o fator de diluição da saliva (50); ξ refere-se ao coeficiente de absorvidade do 2-cloro-*p*-nitrofenol; I significa o comprimento do percurso da luz (0,97); *A controle* é a atividade da α -amilase e *A amostra* é a atividade da α -amilase na presença das amostras.

4.9.2 Inibição da α -glicosidase

O teste para avaliação da inibição da α -glicosidase foi realizado no Laboratório de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, de acordo com a metodologia descrita por Shan *et al.* (2016) e Toma *et al.* (2014). O extrato, frações e resíduos das cascas e folhas foram testados neste ensaio.

Para verificação da capacidade de inibir a atividade da enzima α -glicosidase foi utilizado o substrato 4-nitrofenil- α -D-glicopiranosídeo (*p*-NPG) e uma fração enriquecida da enzima α -glicosidase (f-AG). Foram usados 200 mg de pó de intestino de rato, para preparo da f-AG. A massa foi solubilizada em 3 mL de solução aquosa de cloreto de sódio (0,9% m/v). A solução homogeneizada foi centrifugada a 12000 xg durante 30 minutos e o sobrenadante (f-AG) foi usado no ensaio.

As amostras de extrato, frações e resíduos das cascas e folhas foram solubilizadas em DMSO na concentração de 1 mg mL⁻¹ e incubadas com a f-AG e 1,5 mmol L⁻¹ de glutationa reduzida (diluída em tampão fosfato a 50 mmol L⁻¹, pH 6,8) durante 20 minutos, na temperatura de 37°C. A reação teve início com a adição do substrato *p*-NPG (4 mmol L⁻¹, em tampão fosfato de sódio a 50 mmol L⁻¹, pH 6,8). Os valores de

absorbância foram medidos a 405 nm, a cada 5 minutos, no período de 30 minutos, na temperatura de 37 °C. Para o controle negativo, a amostra foi substituída por tampão fosfato e para controle positivo, foi utilizada a acarbose, ambos na concentração de 1 mg mL⁻¹. Os testes foram feitos em triplicata e o resultado é dado em porcentagem de inibição da α-glicosidase, calculado por meio da Equação 4.

$$\text{Inibição da } \alpha - \text{glicosidase (\%)} = \left[\frac{(\text{ASC cont.} - \text{ASC amost.})}{\text{ASC cont.}} \right] \cdot 100 \quad \text{Equação 4}$$

Onde: *ASC cont.* é a área sob a curva na ausência da amostra e *ASC amost.* é a área sob a curva na presença da amostra.

4.9.3 Inibição da lipase

A análise de inibição da atividade da lipase foi realizada no Laboratório de Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia, utilizando a metodologia descrita por Gupta *et al.* (2002). Foram testados os extratos, frações e resíduos das cascas e folhas da espécie.

Para o teste foi utilizado como substrato o palmitato de *p*-nitrofenil (*p*-NPP) e lipase pancreática suína (PL) (tipo II, Sigma). As amostras foram previamente dissolvidas em DMSO até atingirem a concentração de 2 mg mL⁻¹ e em seguida, incubadas durante 20 minutos, na temperatura de 37 °C, com uma concentração de PL 10g L⁻¹ (diluída em 0,05 mol L⁻¹ de Tris-HCl, pH 8,0, contendo 0,010 mol L⁻¹ de CaCl₂ e 0,025 mol L⁻¹ de NaCl).

A reação teve início com a adição de 0,008 mol L⁻¹ *p*-NPP (diluído em 0,5% Triton X-100). Os valores de absorbância foram medidos em 410 nm, durante 30 minutos e na temperatura de 37 °C. Para controle positivo foi utilizado Orlistat e como controle negativo foi empregado DMSO, ambos na concentração de 2 mg mL⁻¹. Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados são demonstrados em percentagem de inibição de lipase, calculada de acordo com a Equação 5.

$$\text{Inibição da lipase (\%)} = \left[\frac{(\text{ASC controle} - \text{ASC amostra})}{\text{ASC controle}} \right] \cdot 100 \quad \text{Equação 5}$$

Onde: $ASC_{controle}$ é a área sob a curva na ausência da amostra e $ASC_{amostra}$ é a área sob a curva na presença da amostra.

4.10 Prospecção fitoquímica

Os extratos, frações e resíduos das cascas e folhas foram analisados quanto à presença das classes de metabólitos secundários, por meio da prospecção fitoquímica por cromatografia em camada delgada de acordo com a metodologia proposta por Wagner e Bladt (2001). Foram utilizadas placas cromatográficas de sílica-gel e dois tipos de fase móvel: uma com características mais polares contendo acetato de etila/ácido fórmico/ácido acético/água (10:1,1:1,1:2,6) e outra com características menos polares contendo clorofórmio/metanol/hidróxido de amônio (9:1:0,25).

Foram usadas placas cromatográficas com 3,5 cm de largura e 5,0 cm de comprimento, a aplicação das amostras foi feita dissolvendo-as em metanol e com o auxílio de um capilar.

Após eluição e evaporação do solvente, foi adicionado o revelador químico e a placa foi submetida à chapa de aquecimento a 100 °C, sem seguida, foi observada em câmara de fluorescência e a olho nu. A presença de determinadas classes de metabólitos secundários é indicada pelo aparecimento de cor (resultado da reação química entre os metabólitos e os reveladores) (REGINATTO, 2017).

Foram usados reveladores químicos comuns, conforme Quadro 1. A preparação desses reveladores foi realizada segundo Wagner e Bladt (2001) e a análise dos compostos foi realizada a quente, a olho nu e em câmara de luz UV nos comprimentos de onda 254 - 365 nm.

QUADRO 1 - Principais reveladores químicos usados na detecção de classes de metabólitos secundários.

Reveladores químicos	Classes de metabólitos secundários detectados
Dragendorff	Alcaloides e compostos nitrogenados
Vanilina	Terpenoides e fenil-propanoides, esteroides e saponinas
Liebermann-Burchard	Esteroides, triterpenos e saponinas
Cloreto de alumínio	Flavonoides e compostos fenólicos
Anisaldeído	Esteroides, saponinas e compostos fenólicos
NP/PEG	Compostos fenólicos e flavonóides

Fonte: Wagner e Bladt (2001).

4.11 Teor de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais das amostras de cascas e folhas foi realizada segundo Morais *et al.* (2008).

Amostras do extrato etanólico, frações em hexano, diclorometano, *n*-butanol e resíduo hidrometanólico das cascas foram dissolvidas em metanol na concentração 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a fração em acetato de etila das cascas foi dissolvida em metanol na concentração 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Alíquotas de 0,5 mL de cada solução foram dispostas em tubos de ensaios, em seguida houve a adição dos reagentes: 2,5 mL de solução aquosa de Folin-Ciocalteu 10% e 2,0 mL de solução aquosa de carbonato de sódio 7,5%. Os tubos contendo as misturas foram mantidos em banho a 50 °C durante 5 minutos.

Após esse período, a absorbância da mistura foi medida em um espectrofotômetro no comprimento de onda 760 nm. Foi realizada a medida do branco substituindo o volume de amostra no tubo por metanol. O teste foi realizado em triplicata e o resultado é expresso em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de amostra. O resultado é calculado por meio da equação da reta obtida pela curva de calibração de soluções-padrão de ácido gálico (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$).

As amostras de folhas também foram submetidas ao teste de determinação do teor de fenóis totais. Foram preparadas soluções metanólicas do extrato etanólico, fração em hexano, diclorometano, *n*-butanol e resíduo hidrometanólico das folhas na concentração 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, a fração em acetato de etila das folhas foi dissolvida em metanol na concentração 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As soluções das folhas seguiram o mesmo procedimento das amostras de cascas.

4.12 Fracionamento da fração em hexano das cascas

A fração em hexano das cascas de *C. sessilis* foi selecionada para fracionamento bioguiado porque apresentou resultados promissores na inibição do crescimento bacteriano.

4.12.1 Fracionamento em coluna da fração em hexano das cascas (Coluna CH1)

Aproximadamente 400 mg da fração em hexano foram submetidos à separação por coluna cromatográfica. A sílica gel foi usada como fase estacionária e hexano com adições crescentes de clorofórmio e metanol foram usados como fase móvel (Tabela 1).

TABELA 1 - Solventes usados como fase móvel na coluna CH1.

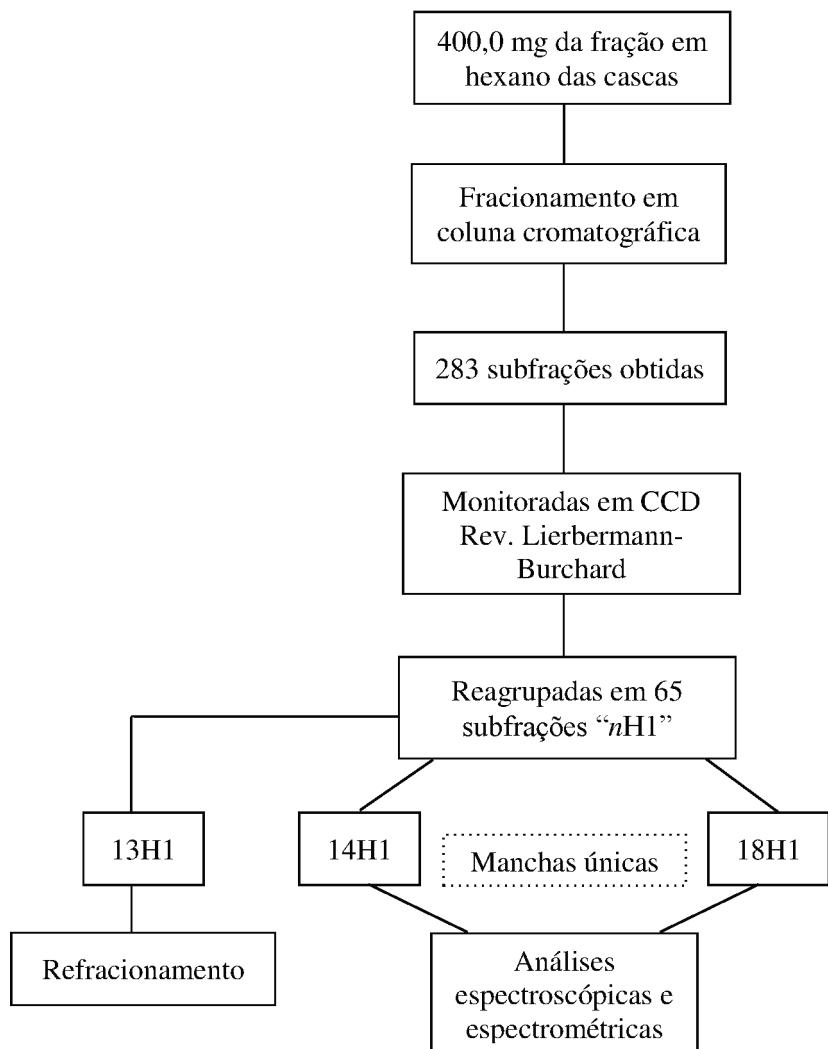
Adição (%)	Volume (mL)	Adição (%)	Volume (mL)
Hexano (100)	140	Clorofórmio/Metanol (95:5)	300
Clorofórmio/Hexano (50:50)	190	Clorofórmio/Metanol (94:6)	120
Clorofórmio/Hexano (60:40)	200	Clorofórmio/Metanol (93:7)	120
Clorofórmio/Hexano (70:30)	120	Clorofórmio/Metanol (92:8)	240
Clorofórmio/Hexano (80:20)	360	Clorofórmio/Metanol (90:10)	120
Clorofórmio/Hexano (90:10)	360	Clorofórmio/Metanol (80:20)	60
Clorofórmio (100)	80	Clorofórmio/Metanol (70:30)	60
Clorofórmio/Metanol (99:1)	120	Clorofórmio/Metanol (60:40)	60
Clorofórmio/Metanol (98:2)	180	Clorofórmio/Metanol (50:50)	60
Clorofórmio/Metanol (97:3)	180	Metanol (100)	120

Fonte: A autora

Foram obtidas 283 subfrações cujo monitoramento foi realizado por Cromatografia em Camada Delgada (CCD) com placa cromatográfica em sílica gel e eluente: clorofórmio/metanol/hidróxido de amônio (9:1:0,25). O revelador Liebermann-Burchard foi usado para detectar a presença de triterpenos, esteroides e saponinas, uma vez que essas classes de compostos foram observadas com mais intensidade no teste de prospecção fitoquímica da fração em hexano. Aquelas subfrações que apresentavam fator de retenção semelhante foram reagrupadas, originando 65 subfrações denominadas frações “nH1”.

As subfrações 14H1 e 18H1 apresentavam manchas únicas na placa cromatográfica e foram selecionadas para serem submetidas a ensaios espectrométricos (CG-EM) e espectroscópicos (RMN ^1H e ^{13}C). A Figura 10 (p. 29) apresenta o fluxograma da separação cromatográfica da fração em hexano por meio da coluna CH1.

FIGURA 10 - Fluxograma do fracionamento em coluna (CH1) da fração em hexano das cascas.



Fonte: A autora.

4.12.2 Refracionamento em coluna da fração em hexano das cascas (Coluna CH2)

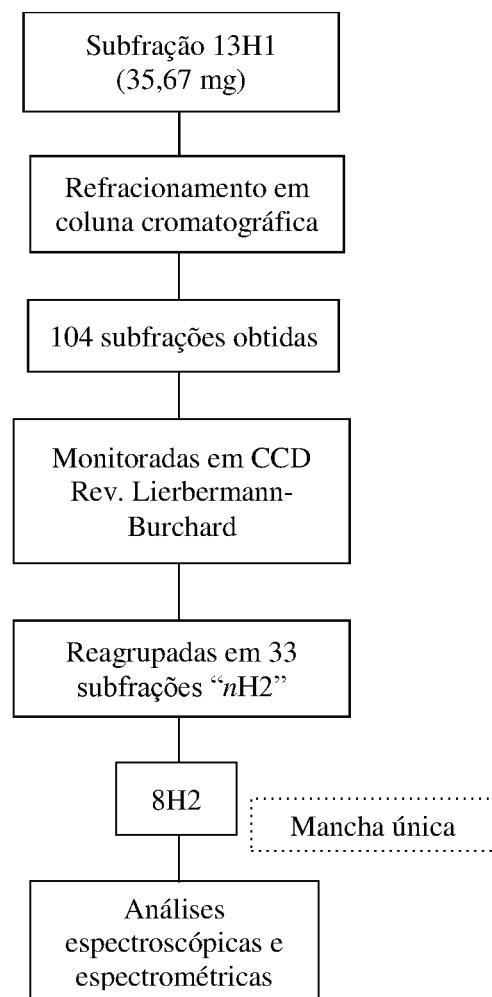
A subfração 13H1 (35,67 mg) obtida da coluna CH1 (sólido branco, três manchas na placa cromatográfica) foi submetida ao refracionamento por cromatografia em coluna, usando sílica-gel como fase estacionária e diclorometano com adições crescentes de metanol como fase móvel (Tabela 2, p. 30). A Figura 11 (p. 30) revela o esquema de obtenção de subfrações a partir da coluna CH2.

TABELA 2 - Solventes usados como fase móvel na coluna CH2.

Adição (%)	Volume (mL)
Diclorometano (100)	300
Diclorometano/Metanol (97:3)	90
Diclorometano/Metanol (96:4)	30
Diclorometano/Metanol (95:5)	30
Diclorometano/Metanol (94:6)	30
Diclorometano/Metanol (93:7)	60
Diclorometano/Metanol (92:8)	60
Diclorometano/Metanol (91:9)	60
Diclorometano/Metanol (90:10)	60
Diclorometano/Metanol (80:20)	60
Metanol (100)	60

Fonte: A autora.

FIGURA 11 - Fluxograma do refracionamento em coluna (CH2) da subfração 13H1.



Fonte: A autora.

Desse fracionamento foram obtidas 104 subfrações, as quais foram monitoradas via CCD usando Liebermann-Burchard como revelador químico. Aquelas placas que apresentavam manchas com mesmo fator de retenção foram reunidas fornecendo 33 subfrações que foram denominadas subfrações “nH2”.

A subfração 8H2 apresentava uma única mancha na placa cromatográfica e foi selecionada para ser submetida às análises espectrométricas (CG-EM) e espectroscópicas (RMN ^1H e ^{13}C).

4.13 Fracionamento da fração em acetato de etila das cascas

A fração em acetato de etila apresentou resultados satisfatórios para os testes de inibição enzimática, atividade antimicrobiana e capacidade de sequestro do radical peroxil, sendo selecionada para o fracionamento em coluna.

4.13.1 Fracionamento em coluna da fração em acetato de etila das cascas (Coluna CA1)

Cerca de 2,0 g da fração em acetato de etila foram submetidos ao fracionamento em coluna, usando C18 como fase estacionária e água com adições crescentes de metanol como fase móvel (Tabela 3).

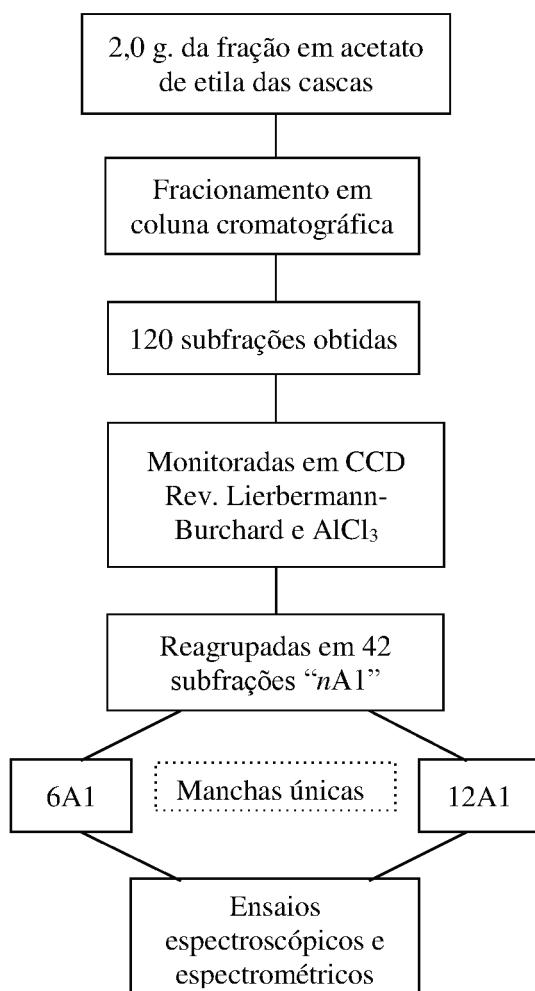
TABELA 3 - Solventes usados como fase móvel na coluna CA1.

Adição (%)	Volume (mL)
Água/Metanol (95:5)	70
Água/Metanol (90:10)	40
Água/Metanol (80:20)	40
Água/Metanol (70:30)	40
Água/Metanol (60:40)	200
Água/Metanol (50:50)	240
Água/Metanol (40:60)	160
Água/Metanol (30:70)	80
Água/Metanol (20:80)	160
Água/Metanol (10:90)	160
Metanol (100)	200

Fonte: A autora.

Foram obtidas 120 subfrações que foram monitoradas com os reveladores Liebermann-Burchard e cloreto de alumínio. As subfrações que apresentavam mesmo fator de retenção foram reagrupadas, dando origem a 42 subfrações denominadas “nA1”, novamente foi realizado monitoramento via CCD das subfrações reunidas. As subfrações 6A1 e 12A1, que apresentavam manchas únicas nas placas cromatográficas durante o monitoramento em CCD, foram submetidas à análise espectrométrica em CLAE-EM/EM e espectroscópica em RMN (^1H e ^{13}C) (Figura 12).

FIGURA 12 - Fluxograma do fracionamento em coluna (CA1) da fração em acetato de etila das cascas.



Fonte: A autora.

4.14 Ensaios espectroscópicos e spectrométricos

4.14.1 Análise em CG-EM

As subfrações 14H1, 18H1 (Coluna CH1) e 8H2 (Coluna CH2) foram dissolvidas em diclorometano, apresentando as respectivas concentrações 1,4; 0,5 e 2,4 mg mL⁻¹. De cada solução foram resgatados 1 µL, o qual foi utilizado para injeção no CG-EM. As análises foram realizadas em equipamento CG-EM equipado com coluna capilar OV-5 Serial 121345, d.i. 0,25 mm THICKNESS: 0,25 um, 30 m. Foi usado gás hélio como carreador a fluxo constante de 1,2 mL min⁻¹, temperatura do injetor 280 °C (modo *Split* 1:20), temperatura inicial em 100 °C crescente a cada minuto em 13 °C até 280 °C, mantendo-se nessa temperatura por 25 minutos. O tempo total da análise foi de 41 minutos. Os cromatogramas e espectros obtidos de cada subfração foram analisados.

A análise dos espectros de massas foi realizada por comparação com as bibliotecas NIST, SHIMADZU, WILLEY disponíveis no equipamento.

4.14.2 Análise em CLAE-EM/EM

As subfrações 6A1 e 12A1 (Coluna CA1) foram dissolvidas em metanol nas concentrações 1,7 e 1,8 mg mL⁻¹, respectivamente. As análises foram realizadas em um aparelho CLAE (Cromatografia Líquida de Alta Eficiência) da marca Agilent, modelo Infinity 1260, acoplado a um espectrômetro de massas de alta resolução (QTOF), da marca Agilent, modelo 6520 B, com fonte de ionização por *electrospray*. Os parâmetros cromatográficos foram: coluna Agilent modelo Zorbax, 2,1 mm de diâmetro interno, 5 cm de comprimento, partículas de 1,8 µm, fase móvel: água acidificada com ácido fórmico (0,1%, v v⁻¹) (A) e metanol (B), com o seguinte sistema gradiente de solventes: 2% de B (0 min), 98% de B (0-15 min); 100% de B (15-17 min); 2% B (17-18 min) e 2% B (18-22 min). Os parâmetros de ionização foram: pressão do nebulizador de 58 psi, gás seccante a 8 L min⁻¹, uma temperatura de 220 °C, e energia no capilar de 4,5 KVa.

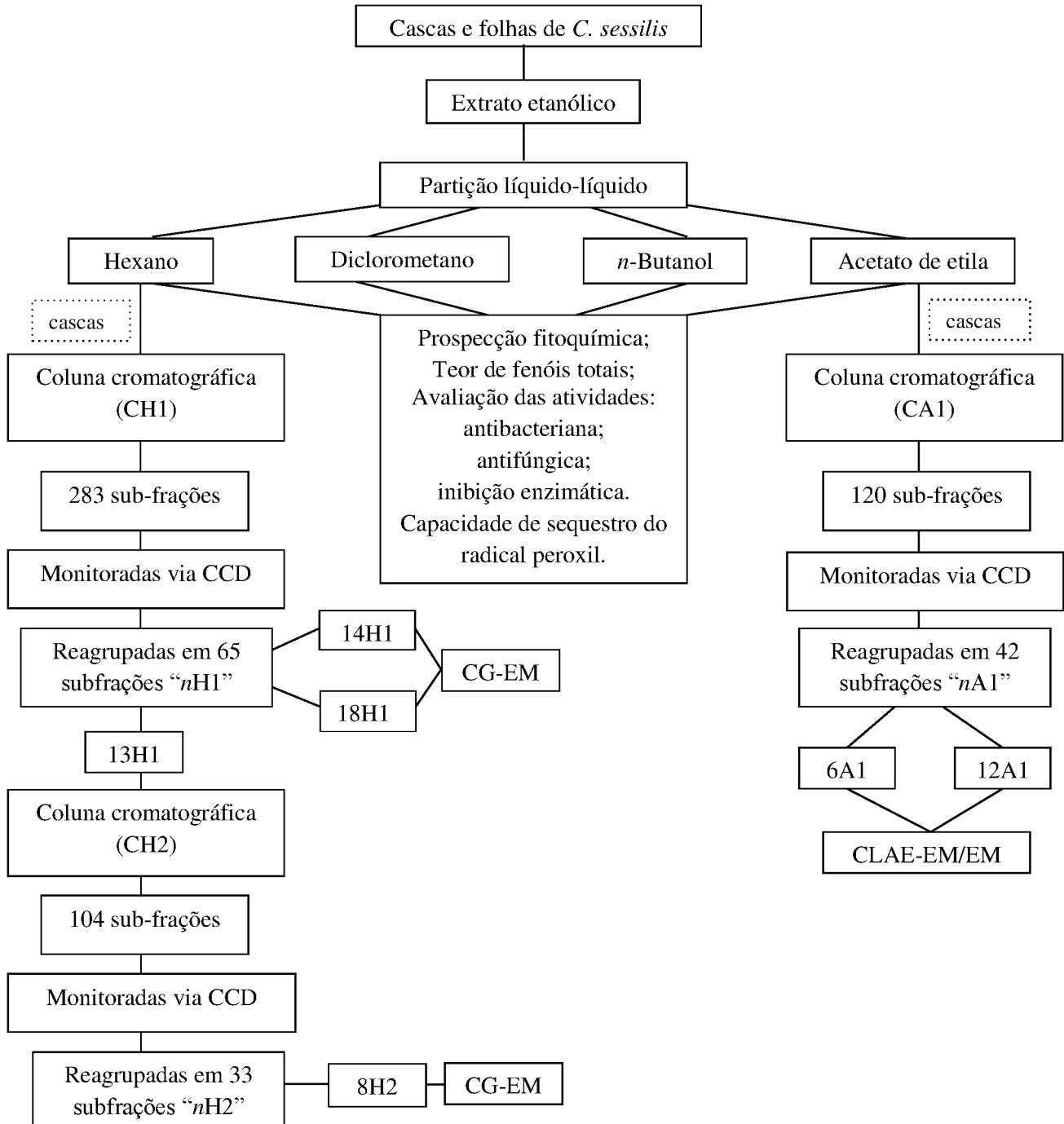
4.14.3 Análise de RMN de ¹H e de ¹³C

As subfrações obtidas da coluna CH1 (14H1 e 18H1), CH2 (8H2) e CA1 (6A1 e 12A1) foram submetidas à análise de Ressonância Magnética Nuclear. As amostras foram dissolvidas em clorofórmio deuterado CDCl₃ (D-99,8%). Os ensaios foram realizados no

Laboratório de Multiusuários do Instituto de Química da UFU (LAMIQ). A temperatura dos ensaios foi 30 °C e foi utilizado TMS ($\delta_{TMS} = 0,00$) como padrão interno ou sinal residual do solvente (clorofórmio-*d* δ_H 7,26 ppm e δ_C 77,0 ppm).

A Figura 13 apresenta o fluxograma geral do procedimento experimental adotado para obtenção das compostos identificados nas cascas de *C. sessilis*.

Figura 13 - Fluxograma geral do procedimento experimental.



Fonte: A autora.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Atividade antibacteriana

Segundo Rios e Récio (2005), valores de CIM abaixo de 100 µg mL⁻¹ são considerados promissores, enquanto CIM inferiores a 10 µg mL⁻¹ são excelentes. Para Holetz *et al.* (2002), valores de CIM entre 500 µg mL⁻¹ e 100 µg mL⁻¹ expressam uma atividade moderada, entre 1000 µg mL⁻¹ e 500 µg mL⁻¹ é considerada fraca e acima de 1000 µg mL⁻¹ é inativa.

5.1.1 Atividade antibacteriana aeróbia

Os resultados de CIM (µg mL⁻¹) referentes às amostras cascas e folhas de *C. sessilis* frente às bactérias aeróbias são demonstrados na Tabela 4.

TABELA 4 – Atividade antibacteriana (aeróbias) das amostras de cascas e folhas.

Amostras	CIM (µg mL ⁻¹)			
	Bactérias aeróbias			
	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456	<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	<i>Aggregatibacter actinomycetemcomitans</i> ATCC 43717
C Ext. Et.	400	400	200	400
A Hexano	>400	200	400	>400
S Dicloro.	>400	>400	200	>400
C AcOEt	>400	>400	>400	>400
A Butanol	>400	200	100	>400
S Resíduo	>400	>400	>400	>400
F Ext. Et.	>400	>400	>400	>400
O Hexano	>400	>400	>400	>400
L Dicloro.	>400	>400	>400	>400
H AcOEt	>400	>400	>400	>400
A Butanol	>400	>400	>400	>400
S Resíduo	>400	>400	>400	>400
Clorexidina*	0,922	1,844	1,844	0,922

Nota: *Clorexidina é o controle positivo.

O extrato etanólico das cascas de *C. sessilis* exibiu atividade moderada frente a todas as bactérias aeróbias testadas, apresentando valores de CIM 400 µg mL⁻¹ sobre os microorganismos *S. mutans*, *S. mitis* e *A. actinomycetemcomitans* e 200 µg mL⁻¹ sobre o microorganismo *S. sanguinis*. Esses resultados podem estar associados à ação conjunta dos metabólitos secundários encontrados no extrato das cascas que inibem o crescimento bacteriano.

A fração em hexano das cascas apresentou atividade moderada frente às aeróbias *S. mitis* e *S. sanguinis*, demonstrando um valor de CIM 200 µg mL⁻¹ e 400 µg mL⁻¹, respectivamente. A fração em diclorometano das cascas foi moderadamente ativa frente à bactéria *S. sanguinis*, apresentando um valor de CIM 200 µg mL⁻¹. Enquanto a fração em *n*-butanol das cascas revelou-se moderamente ativa frente às aeróbias *S. mitis* e *A. actinomycetemcomitans*, apresentando o CIM 200 µg mL⁻¹ e 400 µg mL⁻¹, respectivamente. Essa fração também demonstrou atividade promissora frente à cepa *S. sanguinis*, apresentando um valor de CIM de 100 µg mL⁻¹. Contudo, a fração em acetato de etila e o resíduo hidrometanólico apresentaram valores de CIM superiores a 400 µg mL⁻¹, indicando que essas amostras apresentam fraca atividade ou são inativas frente às bactérias aeróbias testadas.

As amostras de folhas, com exceção da fração em diclorometano, demonstraram pouca atividade ou inatividade frente aos microorganismos testados, pois os valores de CIM foram superiores a 400 µg mL⁻¹. A fração em diclorometano das folhas (CIM 400 µg mL⁻¹) demonstrou atividade moderada na inibição do crescimento de bactérias *S. sanguinis*.

Os microorganismos aeróbios testados são responsáveis por diversas doenças bucais, entre elas a gengivite, desenvolvimento da placa dentária bacteriana, cárie, periodontite, alterações de restaurações dentárias e estão relacionadas à endocardite, causada por bactérias que penetram na corrente sanguínea após trauma (ETO; RASLAN; CORTELLI, 2003; YAMAGUCHI *et al.*, 2006).

Canelhas (2012), em estudo da mesma espécie, submeteu as amostras de cascas e folhas de *C. sessilis* à avaliação da atividade antimicrobiana pelo método de Microdiluição em Caldo. Foram utilizadas as cepas aeróbias *S. mutans* (ATCC 25175), *S. mitis* (ATCC 49456) e *S. sanguinis* (ATCC 10556) e as amostras testadas foram as frações em cicloexano e diclorometano das cascas e cicloexano, diclorometano, acetato de etila e metanol das folhas. Os resultados obtidos por Canelhas (2012) estão expostos na Tabela 5 (p. 37).

TABELA 5 - Comparação entre resultados obtidos no trabalho atual e em Canelhas (2012) para as amostras de cascas e folhas de *C. sessilis* frente a bactérias aeróbias.

Amostras	CASCAS			FOLHAS		
	Bactérias			Bactérias		
	<i>S. mutans</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. sanguinis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. mitis</i>	<i>S. sanguinis</i>
Ext. Et.	400	400	200	Ext. Et.	>400	>400
Hexano	>400	200	>400	Hexano	>400	>400
Dicloro	>400	>400	200	Dicloro	>400	>400
AcOEt	>400	>400	>400	AcOEt	>400	>400
Butanol	>400	200	100	Butanol	>400	>400
Resíduo	>400	>400	>400	Resíduo	>400	>400
Cicloexano*	>400	25	400	Cicloexano*	>400	400
				Dicloro*	200	200
Dicloro*	>400	400	200	AcOEt*	200	200
				MetOH*	>400	>400

Nota: O asterisco (*) apresenta os dados obtidos por Canelhas (2012).

Fonte: A autora; Canelhas (2012).

As amostras de cascas de *C. sessilis* do atual trabalho e na pesquisa realizada por Canelhas (2012) apresentaram valores de CIM superiores à $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ frente à cepa *S. mutans*, com exceção do extrato etanólico do presente trabalho que revelou uma atividade moderada frente a essa aeróbia (CIM $400 \mu\text{g mL}^{-1}$). O microorganismo aeróbio não é suscetível à ação dos metabólitos presentes nas amostras de cascas de *C. sessilis*.

Amostras de cascas do atual trabalho (extrato etanólico, frações em hexano e *n*-butanol) apresentaram atividade moderada sobre a bactéria *S. sanguinis*, assim como amostras de cascas testadas no trabalho de Canelhas (2012) (frações em cicloexano e diclorometano). Esses resultados demonstram que a bactéria *S. sanguinis* é suscetível às amostras de cascas de *C. sessilis*, as quais inibiram moderadamente o crescimento do microorganismo.

A fração em cicloexano das cascas do trabalho de Canelhas (2012) apresentou um resultado promissor frente ao microorganismo *S. sanguinis* (CIM $25 \mu\text{g mL}^{-1}$), enquanto a fração em diclorometano demonstrou um resultado moderado (CIM $400 \mu\text{g mL}^{-1}$). O extrato etanólico e as frações em hexano e *n*-butanol do presente trabalho revelaram atividade moderada frente à mesma bactéria (CIM $400 \mu\text{g mL}^{-1}$, $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente).

Não foi possível verificar a recorrência dos resultados de folhas demonstrados por Canelhas (2012) no atual trabalho. No estudo de Canelhas (2012), as frações em diclorometano e acetato de etila das folhas de *C. sessilis* exibiram CIM de 200 µg mL⁻¹ frente à *S. mutans* e *S. mitis*, demonstrando uma atividade moderada sobre o crescimento dessas aeróbias. Enquanto no atual trabalho, todas as frações de folhas testadas apresentaram CIM superior a 400 µg mL⁻¹ sobre as mesmas bactérias.

As divergências exibidas pela comparação entre os resultados demonstrados no presente trabalho e naquele desenvolvido por Canelhas (2012) podem estar associadas às condições ambientais das espécies de *C. sessilis*. A espécie estudada neste trabalho foi coletada em uma Reserva Legal da Fazenda Contendas, no município de Morrinhos - GO, em Outubro de 2015 (período de seca), a espécie do estudo de Canelhas (2012) foi coletada na Reserva Ecológica do Panga, em Uberlândia - MG, em Outubro de 2010.

Segundo Gobbo-Neto e Lopes (2007), a idade e desenvolvimento da planta, bem como a localização da espécie influenciam na produção de metabólitos secundários. Os locais onde as espécies foram coletadas podem apresentar diferenças na altitude, temperatura, incidência da radiação ultravioleta, nutrientes presentes no solo, poluição atmosférica e índice de pluviosidade, dessa forma alterando a quantidade e variedade de metabólitos secundários e consequentemente a atividade biológica que a espécie apresenta.

5.1.2 Atividade antibacteriana anaeróbia

Os resultados da atividade antibacteriana anaeróbia das amostras de cascas e folhas de *C. sessilis* são fornecidos em CIM, na unidade µg mL⁻¹ e estão expostos na Tabela 6 (p. 39).

TABELA 6 - Atividade antibacteriana (anaeróbias) das amostras de cascas e folhas.

Amostras	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
	Bactérias anaeróbias				
	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	<i>Actinomyces naeslundii</i> ATCC 19039	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	<i>Bacteroides thetaiotaomicron</i> ATCC 29741
C Ext. Et.	400	400	400	-	-
A Hexano	>400	400	400	-	-
S Dicloro.	400	>400	200	-	-
C AcOEt	400	200	>400	-	-
A Butanol	400	200	400	-	-
S Resíduo	>400	>400	>400	-	-
F Ext. Et.	>400	>400	>400	-	-
O Hexano	>400	>400	>400	-	-
L Dicloro.	>400	>400	>400	-	-
H AcOEt	>400	>400	>400	-	-
A Butanol	>400	>400	>400	-	-
S Resíduo	>400	>400	>400	-	-
Metronidazol*	-	-	-	0,737	1,475

Nota: Metronidazol* é o controle positivo; o hífen (-) indica que não foi testado.

Fonte: A autora.

O extrato etanólico das cascas apresentou atividade moderada frente a todas as anaeróbias testadas *P. gingivalis*, *F. nucleatum* e *A. naeslundii*, revelando um CIM de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para as três bactérias. A fração em hexano das cascas foi moderadamente ativa na inibição do crescimento das cepas *F. nucleatum* e *A. naeslundii*, exibindo um valor de CIM de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para ambas. A fração em diclorometano das cascas revelou atividade moderada frente às anaeróbias *P. gingivalis* e *A. naeslundii*, apresentando valores de CIM de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

A fração em acetato de etila das cascas foi moderadamente ativa sobre as bactérias *P. gingivalis* e *F. nucleatum*, uma vez que apresentou CIM de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. A fração em *n*-butanol das cascas mostrou-se moderadamente ativa em inibir o crescimento das anaeróbias testadas, apresentando valores de CIM 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente às bactérias *P. gingivalis* e *A. naeslundii* e CIM 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ frente à *F. nucleatum*. Contudo, o resíduo hidrometanólico das cascas demonstrou-se fracamente ativo ou

inativo sobre as anaeróbias testadas, pois apresentou valores de CIM acima de 400 µg mL⁻¹.

As amostras de folhas de *C. sessilis* apresentaram valores de CIM superiores a 400 µg mL⁻¹, revelando fraca atividade ou inatividade referente à inibição do crescimento das bactérias anaeróbias testadas. As amostras cascas de *C. sessilis* demonstraram-se mais ativas na inibição do crescimento de bactérias aeróbias e anaeróbias bucais do que as amostras de folhas.

Os microorganismos anaeróbios utilizados no teste são responsáveis pelo desenvolvimento do biofilme dental, periodontite e apendicite aguda (CASTELLARIN *et al.*, 2011; DIEGE *et al.*, 2009; HOLT *et al.*, 1999).

Canelhas (2012) realizou avaliação da atividade antimicrobiana das amostras de cascas e folhas de *C. sessilis* sobre as bactérias *P. gingivalis* (ATCC 33277) e *A. naeslundii* (ATCC19039). A Tabela 7 apresenta os resultados obtidos por Canelhas (2012) em comparação com os resultados do presente trabalho.

TABELA 7 - Comparação entre resultados obtidos no trabalho atual e em Canelhas (2012) para as amostras de cascas e folhas de *C. sessilis* frente a bactérias anaeróbias.

Amostras	CASCAS		FOLHAS	
	Bactérias		Bactérias	
	<i>P. gingivalis</i>	<i>A. naeslundii</i>	<i>P. gingivalis</i>	<i>A. naeslundii</i>
Ext. Et.	400	400	>400	>400
Hexano	>400	400	>400	>400
Dicloro.	400	200	>400	>400
AcOEt	400	>400	>400	>400
Butanol	400	400	>400	>400
Resíduo	>400	>400	>400	>400
Cicloexano*	>400	>400	Ciclohexano*	50
			Dicloro*	50
Dicloro*	>400	>400	AcOEt*	400
			MetOH*	>400

Nota: O asterisco (*) apresenta os dados obtidos por Canelhas (2012).

Fonte: A autora; Canelhas (2012).

No presente trabalho, o extrato etanólico e as frações em diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol das cascas apresentaram CIM de 400 µg mL⁻¹, revelando uma

atividade moderada frente à anaeróbia *P. gingivalis*. No estudo de Canelhas (2012), as frações em cicloexano e diclorometano apresentaram valores de CIM superiores à 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, demonstrando uma atividade fraca ou inativa das amostras de cascas sobre o crescimento dessa bactéria.

O extrato etanólico e as frações em hexano e *n*-butanol das cascas do atual trabalho exibiram atividade moderada na inibição do crescimento de *A. naeslundii*, com um valor de CIM 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todavia, no estudo realizado por Canelhas (2012), as frações em cicloexano e diclorometano das cascas revelaram um valor de CIM superior à 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ demonstrando que essas frações de *C. sessilis* possuem fraca atividade ou são inativas na inibição do crescimento da anaeróbia testada.

Foi verificada a recorrência nos resultados exibidos neste trabalho e no estudo de Canelhas (2012) referentes à inibição do crescimento de *A. naeslundii*. As amostras de folhas deste trabalho e do estudo de Canelhas (2012) apresentaram CIM superior a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, revelando uma fraca atividade ou inatividade das amostras de folhas frente à *A. naeslundii*.

As frações em acetato de etila e metanol das folhas, no trabalho de Canelhas (2012), demonstraram atividade moderada frente à anaeróbia *P. gingivalis* (CIM 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e CIM 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente) e as frações em cicloexano e diclorometano das cascas apresentam CIM 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$, revelando atividade promissora dessas frações sobre a anaeróbia testada. Entretanto, as amostras de folhas do atual estudo demonstraram CIM superior à 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, indicando uma fraca atividade ou inatividade do extrato e frações na inibição do crescimento de *P. gingivalis*.

As divergências dos resultados biológicos obtidos para a mesma espécie vegetal (*Cordiera sessilis*) e mesmos microorganismos testados podem estar associadas ao local de desenvolvimento e coleta da espécie vegetal, bem como a idade que a planta apresentava quando foi submetida ao estudo.

Ainda assim, neste trabalho é possível verificar que as amostras de cascas de *C. sessilis* são moderadamente ativas na inibição do crescimento de bactérias aeróbias e anaeróbias bucais e as amostras de folhas mostraram-se fracamente ativas ou inativas na inibição do crescimento das mesmas bactérias.

5.2 Atividade antifúngica

A atividade antifúngica da espécie *C. sessilis* foi analisada com leveduras do gênero *Candida* spp. O resultado da Concentração Inibitória Mínima é expresso em $\mu\text{g mL}^{-1}$, está exposto na Tabela 8 para amostras de cascas e folhas, os valores são ponderados de acordo com Rios e Récio (2005) e Holetz *et al.* (2002).

TABELA 8 - Atividade antifúngica das amostras de cascas e folhas de *C. sessilis*.

Amostras	CIM ($\mu\text{g mL}^{-1}$)				
	Bactérias aeróbias				
	<i>Candida albicans</i> ATCC 28366	<i>Candida tropicalis</i> ATCC 13803	<i>Candida glabrata</i> ATCC 15126	<i>Candida krusei</i> ATCC 6358	<i>Candida parapsilosis</i> ATCC 22019
C Ext. Et.	46,87	1500	3000	-	-
A Hexano	3000	3000	3000	-	-
S Dicloro.	375	>3000	3000	-	-
C AcOEt	93,75	93,75	750	-	-
A Butanol	93,75	93,75	750	-	-
S Resíduo	187,50	187,50	375	-	-
F Ext. Et.	187,50	>3000	>3000	-	-
O Hexano	3000	3000	3000	-	-
L Dicloro.	3000	>3000	3000	-	-
H AcOEt	46,87	187,50	>3000	-	-
A Butanol	93,75	1500	750	-	-
S Resíduo	46,87	1500	>3000	-	-
Anfotericina*	-	-	-	1,0	0,5

Nota: *Anfotericina é o controle positivo e o hífen (-) indica que não foi testado.

Fonte: A autora.

Os extratos etanólicos das cascas e das folhas apresentaram atividades promissoras frente ao fungo *C. albicans*, apresentando um CIM de 46,87 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e indicando o resultado mais eficiente desse teste. O conjunto de metabólitos secundários que o extrato etanólico exibe colaborou para a ocorrência da atividade promissora na inibição do crescimento do fungo *C. albicans*, ocorrendo um sinergismo que proporcionou o melhor resultado entre as amostras de cascas testadas.

As frações com características mais polares, acetato de etila e *n*-butanol das cascas, demonstraram valores de CIM 93,75 µg mL⁻¹, para ambas, indicando atividade promissora frente aos fungos *C. albicans* e *C. tropicalis*.

O resíduo hidrometanólico das cascas expressou valores de CIM 187,5 µg mL⁻¹ frente aos microorganismos *C. albicans* e *C. tropicalis* e um valor de CIM 375 µg mL⁻¹ frente à *C. glabrata*, esses resultados revelam que o resíduo hidrometanólico foi moderadamente ativo na inibição do crescimento dos fungos testados.

Os fungos utilizados nesse teste são responsáveis pela candidíase, patologia que acomete pele, cavidade oral, esôfago, trato gastrointestinal, órgãos sexuais e sistema vascular dos seres humanos (CALDERONI; FONZI, 2001).

As frações com características mais polares das folhas apresentaram melhores resultados frente aos fungos analisados. A fração em acetato de etila demonstrou atividade promissora frente à levedura *C. albicans* (CIM 46,87 µg mL⁻¹) e atividade moderada frente à *C. tropicalis* (CIM 187,50 µg mL⁻¹). A fração em *n*-butanol das folhas exibiu CIM 93,75 µg mL⁻¹, apresentando atividade moderada sobre o microorganismo *C. albicans*, embora tenha se revelado inativa sobre *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

O resíduo hidrometanólico das folhas exibiu CIM 46,87 µg mL⁻¹, demonstrando atividade promissora frente à levedura *C. albicans*, entretanto revelou-se inativo frente aos microorganismos *C. tropicalis* e *C. glabrata*.

O extrato etanólico, bem como as frações com características mais polares (acetato de etila, *n*-butanol e resíduo hidrometanólico) das cascas e folhas de *C. sessilis* expressaram resultados favoráveis à inibição do crescimento de leveduras do gênero *Candida* spp, indicando o potencial da espécie frente aos fungos causadores da candidíase.

5.3 Capacidade de sequestro do radical peroxil

O método utilizado no teste é chamado ORAC (*Oxygen Radical Absorbance Capacity*) e apresenta vantagens sobre outros métodos, uma vez que a medida da inibição da oxidação é realizada a partir da intensidade da fluorescência, impedindo que a coloração da amostra interfira na medida e, consequentemente, no resultado. Outra vantagem apresentada pelo método ORAC, comparada aos demais, é a utilização do radical peroxil ou hidroxil como pró-oxidantes fisiológicos, conferindo ao teste um significado biológico maior (LIMA, 2008a).

No teste que analisa a capacidade de sequestro do radical peroxil, esta espécie radicalar é formada a partir da reação do AAPH com o oxigênio da atmosfera. O radical peroxil reage com a fluoresceína (indicador fluorescente) fornecendo um produto não fluorescente. As substâncias com propriedades antioxidantes presentes na amostra, evitam a ação antioxidante do radical peroxil sobre a fluoresceína, fornecendo átomos de hidrogênio à espécie radicalar. Sendo assim, a intensidade da fluorescência torna-se proporcional ao potencial antioxidante que amostra apresenta (ALVES *et al.*, 2010).

Os resultados da capacidade de sequestro do radical peroxil são fornecidos em μmol equivalente de Trolox por grama de amostra, isto é, a quantidade de Trolox (antioxidante sintético) em micromols que possui a mesma atividade antioxidante que um grama da amostra testada.

A atividade antioxidante satisfatória é avaliada a partir de comparação do valor exibido pelas amostras testadas com o controle positivo ácido ascórbico ($2194 \pm 321,5 \mu\text{mol Trolox eq g}^{-1}$). Nesse sentido, quanto maior a quantidade de matéria de Trolox equivalente a 1 grama de amostra testada, maior será a capacidade de sequestro do radical peroxil associada a ela e o potencial antioxidante que a amostra apresenta.

A Tabela 9 apresenta os resultados obtidos na avaliação da capacidade de sequestro do radical peroxil para as amostras de cascas e folhas de *C. sessilis*.

TABELA 9 - Capacidade de sequestro do radical peroxil para as amostras de cascas e folhas de *C. sessilis*.

CASCAS		FOLHAS	
Amostras	$\mu\text{mol Trolox eq. g}^{-1}$	Amostras	$\mu\text{mol Trolox eq. g}^{-1}$
Ext. Et.	$880,6 \pm 26,6$	Ext. Et.	$1119,4 \pm 300,2$
Hexano	$167,8 \pm 52,1$	Hexano	$932,1 \pm 131,7$
Dicloro.	$1511,3 \pm 119,7$	Dicloro.	$265,4 \pm 109,6$
AcOEt	$2415,5 \pm 157,8$	AcOEt	$2319,8 \pm 80,2$
Butanol	$606,5 \pm 157,8$	Butanol	$2051,6 \pm 20,0$
Resíduo	$719,5 \pm 146,4$	Resíduo	$809,1 \pm 110,3$
Ác. ascórbico*	$2194 \pm 321,5$	Ác. ascórbico*	$2194 \pm 321,5$

Nota: *O controle positivo é o ácido ascórbico.

Fonte: A autora.

As frações em diclorometano e acetato de etila das cascas de *C. sessilis* exibiram resultados satisfatórios na inibição da oxidação causada pelo radical peroxil ($1511,3 \pm 119,7$ e $2415,5 \pm 157,8 \mu\text{mol Trolox eq g}^{-1}$, respectivamente). O extrato etanólico e as frações em acetato de etila e *n*-butanol das folhas também demonstraram valores satisfatórios na inibição da oxidação ($1119,4 \pm 300,2$; $2319,8 \pm 80,2$ e $2051,6 \pm 20,0 \mu\text{mol Trolox eq g}^{-1}$, respectivamente).

A fração em acetato de etila das cascas e folhas apresentou valor tão eficiente quanto o controle positivo utilizado no teste, revelando o potencial antioxidante das substâncias presentes na fração. Esse eminente resultado pode estar associado à presença de compostos fenólicos e flavonoides na fração em acetato de etila, uma vez que essas classes de metabólitos apresentam acentuada atividade antioxidante (ZUANAZZI; MONTANHA; ZUCOLOTTO, 2017).

Os resultados exibidos para o extrato etanólico das cascas e folhas de *C. sessilis* ($880,6 \pm 26,6$ e $1119,4 \pm 300,2 \mu\text{mol Trolox eq g}^{-1}$, respectivamente) são melhores do que aqueles demonstrados pela espécie da mesma família *Nauclea latifolia* (Rubiaceae). O extrato aquoso das folhas de *N. latifolia* apresentou um valor de $196,55 \pm 0,073 \mu\text{mol Trolox eq g}^{-1}$ e o extrato aquoso dos frutos demonstrou um valor de $55,88 \pm 0,073 \mu\text{mol Trolox eq g}^{-1}$, resultados inferiores àqueles encontrados para *C. sessilis* (AYELESO; OGUNTIBEJU; BROOK, 2014).

Estudo realizado com plantas brasileiras por Silva *et al.* (2007b) demonstrou que extratos hidrometanólicos das cascas de *Cedrela odorata* (Meliaceae) e *Dalbergia subcymosa* (Fabaceae) foram avaliados quanto à capacidade de sequestro do radical peroxil e expressaram valores $1038,1 \pm 189,6$ e $1396,8 \pm 36,8 \mu\text{mol Trolox eq g}^{-1}$, respectivamente. Esses valores são inferiores àquele demonstrado pela fração em acetato de etila das cascas de *C. sessilis* ($2415,5 \pm 157,8 \mu\text{mol Trolox eq g}^{-1}$), revelando que essa fração apresenta significativa capacidade em inibir a ação oxidante do radical peroxil.

O extrato hidrometanólico das folhas de *Byrsonima crassifolia* (Malpighiaceae) apresentou resultado $778,8 \pm 54,4 \mu\text{mol Trolox eq g}^{-1}$, de acordo com Silva *et al.* (2007b). O extrato etanólico das folhas de *C. sessilis* e as frações em acetato de etila e *n*-butanol ($1119,4 \pm 300,2$; $2319,8 \pm 80,2$ e $2051,6 \pm 20,0 \mu\text{mol Trolox eq g}^{-1}$, respectivamente) expressaram valores superiores ao extrato hidrometanólico das folhas de *B. crassifolia*.

Dessa forma, é possível verificar que as amostras de cascas e folhas de *C. sessilis*, principalmente aquelas mais polares e os extratos etanólicos, apresentam excelente

capacidade em inibir a ação oxidativa causada pelo radical peroxil, revelando o potencial antioxidante das cascas e folhas dessa espécie.

5.4 Inibição enzimática

Atualmente, o Diabetes Mellitus é considerado uma epidemia mundial e está associado ao desenvolvimento de várias doenças por conta de suas complicações, como insuficiência renal, amputação de membros inferiores, cegueira e doença cardiovascular. O diabetes é caracterizado pelo aumento anormal de glicose no sangue (Ministério da Saúde, 2006).

A fonte de glicose na corrente sanguínea depende da ação das enzimas α -amilase e α -glicosidase que realizam hidrólise dos carboidratos. Inibir a atividade dessas enzimas a partir da redução na ingestão de carboidratos é a principal estratégia para o tratamento do diabetes (SU; LAI; NG, 2013).

A acarbose é uma droga capaz de inibir a ação dessas enzimas e é usada no tratamento do diabetes, entretanto, seu uso apresenta efeitos colaterais, como a eliminação de gordura nas fezes. Sendo assim, as fontes vegetais podem apresentar uma alternativa no tratamento da doença, uma vez que são ricas em inibidores de α -amilase e α -glicosidase (FIGUEIREDO-GONZALES *et al.*, 2016). Nesse sentido, realizou-se o teste a fim de verificar a ação inibitória das amostras de cascas e folhas de *C. sessilis* sobre ação das enzimas α -amilase e α -glicosidase.

5.4.1 Inibição da α -amilase

Os resultados do teste para verificar a ação inibitória das amostras de cascas e folhas de *C. sessilis* sobre a enzima α -amilase são expressos em porcentagem de inibição enzimática (%). A concentração das amostras testadas e do controle positivo utilizado no teste foi 1 mg mL^{-1} . Os resultados obtidos para as amostras de cascas e folhas estão expostos na Tabela 10 (p. 47).

TABELA 10 - Inibição das amostras de cascas e folhas sobre α -amilase.

CASCAS		FOLHAS	
Amostras	Inibição (%)	Amostras	Inibição (%)
Ext. Et.	21,6 ± 3,0	Ext. Et.	2,7 ± 2,5
Hexano	16,5 ± 1,6	Hexano	27,5 ± 3,7
Dicloro.	13,1 ± 7,3	Dicloro.	24,2 ± 4,5
AcOEt	37,1 ± 4,8	AcOEt	32,5 ± 5,3
Butanol	15,0 ± 4,8	Butanol	28,1 ± 8,0
Resíduo	25,9 ± 5,8	Resíduo	29,0 ± 3,8
Acarbose*	98,8 ± 0,1	Acarbose*	98,8 ± 0,1

Nota: *Acarbose é o controle positivo.

Fonte: A autora.

Os maiores valores de porcentagem de inibição enzimática indicam melhor atividade da amostra em coibir a ação da α -amilase. Logo, as frações em acetato de etila das cascas (37,1 ± 4,8%) e das folhas (32,5 ± 5,3) demonstraram o melhor resultado se comparadas às demais amostras testadas, embora a percentagem de inibição seja muito inferior aquela demonstrada pelo controle positivo Acarbose (98,8 ± 0,1%). Os compostos fenólicos possuem ação inibitória sobre as enzimas α -amilase e α -glicosidase (RIOS *et al.*, 2015).

O extrato etanólico das folhas da espécie *Genipa americana* (Rubiaceae) (0,29 ± 0,049%) apresentou valor percentual de inibição da enzima α -amilase inferior àquele encontrado para o extrato etanólico de cascas (21,6 ± 3,0%) e folhas (2,7 ± 2,5%) de *C. sessilis* (SOUZA, 2011). O extrato em hexano das folhas de espécies nativas do Cerrado *Morus nigra* (Moraceae) e *Pouteria torta* (Sapotaceae) (22,41 ± 0,005% e 9,95 ± 0,009%, respectivamente) demonstraram resultados inferiores àqueles exibidos pela fração em hexano das amostras de cascas (16,5 ± 1,6%) e folhas (27,5 ± 3,7%) de *C. sessilis* (SOUZA, 2011).

Entretanto, as amostras de *C. sessilis* não revelaram promissores resultados, como os que foram exibidos pela espécie *Eugenia dysenterica* (98,95 ± 0,008%) (SOUZA, 2011). Os resultados obtidos para as amostras de cascas e folhas *C. sessilis* revelam a insuficiência da espécie em coibir a ação da enzima α -amilase.

5.4.2 Inibição da α -glicosidase

Os resultados da análise de inibição da enzima α -glicosidase são expressos em porcentagem de inibição (%). A concentração das amostras de cascas, folhas e do controle positivo utilizado no teste foi 1 mg mL⁻¹.

A Tabela 11 apresenta os resultados obtidos para as amostras de cascas e folhas de *C. sessilis* no teste que verifica a percentagem de inibição da enzima glicosídica α -glicosidase.

TABELA 11 - Inibição das amostras de cascas e folhas sobre α -glicosidase.

CASCAS		FOLHAS	
Amostras	Inibição (%)	Amostras	Inibição (%)
Ext. Et.	S.I.	Ext. Et.	32,1 ± 1,1
Hexano	1,6 ± 0,1	Hexano	S.I.
Dicloro.	S.I.	Dicloro.	10,0 ± 3,0
AcOEt	7,0 ± 4,2	AcOEt	37,5 ± 1,1
Butanol	9,0 ± 1,4	Butanol	51,6 ± 2,3
Resíduo	S.I.	Resíduo	33,3 ± 7,0
Acarbose*	74,4 ± 0,7	Acarbose*	74,4 ± 0,7

Nota: *Acarbose é o controle positivo e S.I. indica que não houve inibição.

Fonte: A autora.

Pelos resultados obtidos, verifica-se que as amostras de cascas não apresentaram resultados satisfatórios para inibição da enzima α -glicosidase. Uma vez que, os valores encontrados são inferiores à 10% para as frações em hexano, acetato de etila e *n*-butanol (1,6 ± 0,1%, 7,0 ± 4,2% e 9,0 ± 1,4%, respectivamente). A fração em diclorometano, resíduo hidrometanólico e extrato etanólico não apresentaram inibição sobre a enzima α -glicosidase.

As folhas de *C. sessilis* apresentaram resultados de inibição de α -glicosidase inferiores ao controle positivo Acarbose (74,4 ± 0,7%), medicamento atualmente utilizado para inibir a ação das hidrolases glicosídicas. A fração em *n*-butanol das folhas apresentou o maior resultado obtido entre as amostras de cascas e folhas testadas (51,6 ± 2,3%).

O extrato etanólico das cascas de *Allamanda blanchetti* (Apocynaceae), espécie nativa do Cerrado, demonstrou percentual de inibição da α -glicosidase 33,57 ± 0,065%,

valor superior aquele apresentado pelo extrato etanólico das cascas de *C. sessilis* (S.I.). Já o extrato etanólico das folhas de *A. blanchetti* demonstrou percentagem de inibição $18,11 \pm 0,051\%$ inferior ao encontrado para extrato etanólico das folhas de *C. sessilis* ($32,1 \pm 1,1$) (SOUZA, 2011).

As frações mais ativas das folhas de *C. sessilis* (fração em acetato de etila e *n*-butanol; $37,5 \pm 1,1$ e $51,6 \pm 2,3\%$, respectivamente) revelaram um potencial de inibição entre menor do que aquele apresentado pela Acarbose. Além disso, as amostras de folhas mostraram-se mais ativas na inibição de α -glicosidase, se comparadas às cascas, enquanto no teste sobre inibição da α -amilase, as cascas se sobressaíram às folhas.

As enzimas α -amilase e α -glicosidase atuam juntas na absorção de carboidratos, realizando a hidrólise dessas moléculas. Dessa forma, um inibidor eficaz deve ser capaz de impedir a atividade de ambas enzimas. Neste trabalho, é possível verificar que as amostras cascas e folhas de *C. sessilis* foram pouco eficientes na inibição da enzima α -amilase e as folhas demonstraram melhor resultado na inibição da enzima α -glicosidase. Todavia, as amostras não demonstraram resultados eficazes, que se aproximam daquele exibido pelo controle, demonstrando que as cascas e folhas de *C. sessilis* não representam uma eficaz alternativa no tratamento do diabetes.

5.4.3 Inibição da lipase

De acordo com a Pesquisa de Orçamentos Familiares (POF), realizada pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística em 2008-2009, 14,8% dos brasileiros adultos são obesos, o que afeta 12,5% dos homens e 16,9% das mulheres do país (BRASIL, 2010). O diabetes, a hipertensão arterial, as doenças cardiovasculares e a apneia do sono são distúrbios que estão associadas ao desenvolvimento da obesidade (FARIA *et al.*, 2010).

Os medicamentos mais utilizados para perda de peso são o Subtramine e Orlistat que geram, em média, uma perda de peso de 3 a 5 kg, após um ano de tratamento (COUTINHO, 2009). Nesse sentido, surge a procura por medicamentos naturais que contribuam para a redução de peso e melhora na qualidade de vida (SHARMA; SHARMA; SEO, 2005).

A perda de peso está relacionada à redução do aproveitamento calórico. Dessa forma, as enzimas lipases envolvidas no metabolismo dos lipídios tornam-se os alvos dos inibidores. Durante a ingestão de lipídios o processo de digestão inicia-se na boca, quando

a lipase lingual emulsifica pequena quantidade de triacilgliceróis (constituintes dos lipídios). No estômago, a lipase gástrica dispersa os lipídios em partículas menores e no intestino delgado, pela ação das enzimas pancreáticas (dentre elas a lipase pancreática) e sais biliares, os lipídios são hidrolisados e absorvidos pelas células da mucosa intestinal (SILVA *et al.*, 2002).

A lipase pancreática é hidrossolúvel e depende da proteína colipase para degradar os lipídios, dessa maneira, adquire caráter anfipático, usando sua extremidade apolar para interagir com lipídios e polar para ligar-se à água, causando a quebra do lipídio (SILVA *et al.*, 2002). A lipase pancreática hidrolisa entre 50% a 70% dos lipídios ingeridos na dieta. Portanto, os inibidores da lipase pancreática impedem a ação da enzima de metabolizar os lipídios e esses são eliminados do organismo sem serem absorvidos (SOUZA, 2009).

Os resultados da avaliação da inibição da enzima lipase são expressos em porcentagem de inibição (%). As amostras de cascas, folhas e o controle positivo utilizado no teste foram testados na concentração de 2 mg mL⁻¹. A Tabela 12 apresenta as porcentagens de inibição para as amostras de cascas e folhas de *C. sessilis*.

TABELA 12 - Inibição das amostras de cascas e folhas sobre lipase.

CASCAS		FOLHAS	
Amostras	Inibição (%)	Amostras	Inibição (%)
Ext. Et.	36,5 ± 8,5	Ext. Et.	S.I.
Hexano	51,5 ± 17,1	Hexano	25,7 ± 6,4
Dicloro.	71,2 ± 10,7	Dicloro.	S.I.
AcOEt	98,4 ± 2,1	AcOEt	71,2 ± 2,1
Butanol	42,4 ± 17,1	Butanol	28,7 ± 2,1
Resíduo	13,6 ± 2,1	Resíduo	2,5 ± 0,7
Orlistat*	94,5 ± 2,1	Orlistat*	94,5 ± 2,1

Nota: *Orlistat é o controle positivo e S.I. indica que não houve inibição.

Fonte: A autora.

A fração em diclorometano das cascas de *C. sessilis* (71,2 ± 10,7%) apresentou resultado promissor em inibir a ação da enzima lipase. A fração em acetato de etila das cascas (98,4 ± 2,1%) demonstrou resultado tão eficiente quanto o controle positivo

utilizado no teste (Orlistat $94,5 \pm 8,3\%$), sendo a fração mais ativa entre todas as testadas e indicando o potencial que essa fração demonstra em inibir a ação da enzima lipase.

Souza (2009) realizou estudo a fim de avaliar a capacidade das cascas de *Malus communis* (Rosaceae) em inibir a ação da enzima lipase. Foi verificado que o extrato metanólico das cascas da espécie demonstrou um percentual de inibição de $24,1 \pm 0,08\%$, inferior ao encontrado para as amostras de cascas de *C. sessilis* (com exceção do resíduo hidrometanólico $13,6 \pm 2,1\%$).

O extrato etanólico e a fração em diclorometano das folhas não apresentaram capacidade de inibição da enzima lipase. Contudo, a fração em acetato de etila das folhas ($71,2 \pm 2,1\%$) revelou promissor resultado, demonstrando ser a fração mais ativa das folhas de *C. sessilis* na inibição dessa enzima.

Em 2009, Souza realizou teste a fim de avaliar o potencial de inibição lipática de algumas plantas brasileiras. O extrato metanólico das folhas de *Coffea arabica* (Rubiaceae) demonstrou percentual de inibição equivalente a $53,2 \pm 0,2\%$, valor inferior aquele demonstrado pela fração em acetato de etila das folhas de *C. sessilis* ($71,2 \pm 2,1\%$).

As frações em acetato de etila das cascas e folhas e a fração em diclorometano das cascas de *C. sessilis* ($98,4 \pm 2,1\%$, $71,2 \pm 2,1\%$ e $71,2 \pm 10,7\%$, respectivamente) apresentaram-se ativas na inibição da enzima lipase, responsável pela absorção de lipídios no organismo. Dessa forma, esses resultados demonstram que a espécie *C. sessilis*, em especial as cascas do vegetal, são significativamente ativas em inibir a ação da enzima lipase.

5.5 Prospecção fitoquímica

A prospecção fitoquímica foi realizada por meio da cromatografia em camada delgada, utilizando os reveladores mais comuns. Nas placas cromatográficas foi verificada a presença e intensidade de manchas, as quais indicavam a existência de classes de metabólitos secundários que reagiam com o revelador químico utilizado.

O Quadro 2 (p. 52) mostra a intensidade da coloração que foi observada nas manchas das placas cromatográficas durante a prospecção fitoquímica das cascas de *C. sessilis*.

QUADRO 2 - Prospecção fitoquímica das amostras de cascas.

Revelador	Amostra						
	Ext.	Et.	Hexano	Dicloro.	AcOEt	Butanol	Resíduo
Dragendorff (Alcalóides/compostos nitrogenados)	-	-	-	-	-	-	-
Vanilina (Terpenóides/fenil-propanoides)	-	-	-	-	-	-	-
Liebermann-Burchard (Esteroides/triterpenos/saponinas)	++	++	++	+	+	+	+
Cloreto de alumínio (Flavonoides)	+	++	++	++	++	++	++
Anisaldeído (Esteroides/saponinas/fenólicos)	-	++	++	-	-	++	
NP/PEG (Compostos fenólicos/flavonoides)	++	++	++	++	++	++	++

Nota: Os sinais representam a intensidade da coloração das manchas: (-) ausente, (+) pouco nítida e (++) nítida.

Fonte: A autora.

As placas borrifadas com o revelador Dragendorff não apresentaram nenhuma coloração característica da ocorrência de alcaloides ou outros compostos nitrogenados.

No entanto, houve aparecimento de manchas nítidas nas placas após aplicação dos reveladores Liebermann-Burchard, cloreto de alumínio, anisaldeído e NP/PEG, sugerindo a presença das seguintes classes de metabólitos secundários: triterpenos, esteroides, saponinas, flavonoides e compostos fenólicos nas cascas de *C. sessilis*. Em especial, nas frações em hexano, diclorometano e no resíduo hidrometanólico, que apresentaram manchas com coloração mais intensa.

O Quadro 3 (p. 53) apresenta o resultado da prospecção fitoquímica das folhas de *C. sessilis*. Os sistemas de eluição foram os mesmos das cascas, assim como os tratamentos para revelação.

QUADRO 3 - Prospecção fitoquímica das amostras de folhas.

Revelador	Amostra						
	Ext.	Et.	Hexano	Dicloro.	AcOEt	Butanol	Resíduo
Dragendorff (Alcalóides/compostos nitrogenados)	-	-	-	-	-	-	-
Vanilina (Terpenóides/fenil-propanoides)	+	+	++	+	+	+	+
Liebermann-Burchard (Esteroides/triterpenos/saponinas)	++	++	++	++	++	++	-
Cloreto de alumínio (Flavonoides)	++	+	++	-	++	++	
Anisaldeído (Esteroides/saponinas/fenólicos)	++	++	++	+	+	+	+
NP/PEG (Compostos fenólicos/flavonoides)	+	++	++	+	+	+	+

Nota: Os sinais representam a intensidade da coloração das manchas (-) ausente; (+) pouco nítida e (++) nítida.

Fonte: A autora.

Observa-se novamente, a ausência de manchas nas placas reveladas com Dragendorff, sugerindo a ausência de alcaloides e compostos nitrogenados nas folhas da espécie. Entretanto, é possível verificar, a partir das manchas nítidas e/ou pouco nítidas e pela ação dos demais reveladores, a presença de determinadas classes de metabólitos secundários como terpenoides, fenil-propanoides, esteroides, triterpenos, saponinas, flavonoides e compostos fenólicos.

O teste de prospecção fitoquímica indicou a presença das várias classes de metabólitos secundários presentes nas cascas e folhas de *C. sessilis*.

5.6 Determinação do teor de fenóis totais

O reagente de Folin-Ciocalteu, utilizado no teste de determinação do teor de fenóis totais, é composto por uma mistura dos ácidos fosfomolibdico $H_3P(Mo_3O_{10})_4$ e fosfotunguístico $H_3P(W_3O_{10})_4$ e possui coloração amarela. No teste, em meio básico, os compostos fenólicos presentes na amostra são desprotonados fornecendo ânions fenolatos. Esses ânions reagem com o reagente de Folin-Ciocalteu reduzindo o molibdênio e ocasionando a mudança de cor de amarela para azul (OLIVEIRA *et al.*, 2009b).

A absorbância do meio reacional é medida em um espectrofotômetro em 760 nm. O valor que indica o teor de fenóis presentes na amostra é determinado por meio da

equação da reta fornecida por soluções-padrão de ácido gálico (Apêndice – Figura VIII). O resultado é expresso em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de amostra.

A Tabela 13 (p. 54) apresenta os resultados, em mg de equivalente de ácido gálico por grama de amostra (mg de EAG g^{-1}), da determinação de fenóis totais para as amostras de cascas e folhas de *C. sessilis*.

TABELA 13 - Teor de fenóis totais das amostras de cascas e folhas.

CASCAS		FOLHAS	
Amostras	Fenóis totais (mg de EAG g ⁻¹)	Amostras	Fenóis totais (mg de EAG g ⁻¹)
Ext. Et.	$25,0 \pm 2,5$	Ext. Et.	$24,3 \pm 3,3$
Hexano	$2,4 \pm 1,3$	Hexano	$6,4 \pm 1,4$
Dicloro.	$36,9 \pm 3,4$	Dicloro.	$29,4 \pm 0,5$
AcOEt	$76,1 \pm 6,0$	AcOEt	$92,4 \pm 3,1$
Butanol	$37,5 \pm 4,1$	Butanol	$34,0 \pm 1,9$
Resíduo	$44,8 \pm 4,7$	Resíduo	$11,6 \pm 3,4$

Fonte: A autora.

O resultado mais significativo do teste de determinação dos fenóis totais das amostras de cascas é da fração em acetato de etila ($76,1 \pm 6,0$ mg de EAG g⁻¹), embora as amostras de cascas de *C. sessilis* tenham apresentado baixo teor de fenóis totais se comparadas às espécies da mesma família (Rubiaceae) *Psychotria fractistipula* e *Guettarda graziela*. O extrato etanólico e a fração em acetato de etila das cascas de *P. fractistipula* exibiram teor de fenóis totais $503,9 \pm 0,01$ e $783,7 \pm 0,04$ mg de EAG por grama de amostra, respectivamente, valores muito superiores aqueles exibidos pelas amostras de cascas de *C. sessilis*. A fração hidrometanólica do caule de *G. graziela* demonstrou teor de fenóis totais $347,75 \pm 0,02$ mg de EAG por grama de amostra, superando os resultados exibidos pelas amostras de cascas (LIMA, 2008b; OLIVEIRA, 2015).

A fração em acetato de etila das folhas se sobressaiu às demais amostras, apresentando o teor de fenóis totais de 92,4 mg de EAG g⁻¹. Ainda assim, os resultados expressos por essa fração são inferiores aos demonstrados pelas espécies da mesma família (Rubiaceae) *Guettarda graziela*, *Psychotria fractistipula* e *Spermacoce latifolia*. As frações em acetato de etila das folhas de *G. graziela* e *P. fractistipula* exibiram teor

de fenóis totais $298,03 \pm 0,02$ e $679,39 \pm 0,07$ mg de EAG por grama de amostra, respectivamente, demonstrados valores muito superiores a fração em acetato de etila das folhas de *C. sessilis*. O extrato metanólico de partes aéreas da espécie *S. latifolia* apresentou teor de fenóis totais $482,7 \pm 1,8$ mg de EAG por grama de amostra, exibindo um resultado que se sobressai às amostras de folhas testadas (LIMA, 2008b; OLIVEIRA, 2015; COSMOSKI *et al.*, 2015).

As amostras de cascas e folhas de *C. sessilis* não exibiram alto teor de fenóis totais se comparados a algumas espécies da mesma família (*G. grazielae*, *P. fractistipula* e *S. latifolia*). Entretanto, os valores apresentados indicam que as frações em acetato de etila das cascas e folhas ($76,1 \pm 6,0$ e $92,4 \pm 3,1$ mg de EAG g⁻¹, respectivamente) exibem maior quantidade de compostos fenólicos do que as demais amostras testadas e demonstram valores superiores aos das espécies *Genipa americana* e *Bathysa australis*, da família Rubiaceae. Os extratos etanólicos dos frutos de *G. americana* e das folhas de *B. australis* apresentaram teor de fenóis totais $11,78 \pm 0,06$ e $40,792$ mg de EAG por grama de amostra, respectivamente, exibindo valores inferiores àqueles demonstrados pelas frações em acetato de etila das cascas e folhas de *C. sessilis* (BARBOSA, 2008; SOUZA *et al.*, 2013).

5.7 Fracionamento da fração em hexano das cascas e identificação de compostos

As cascas de *C. sessilis* apresentaram resultados satisfatórios na avaliação da atividade antibacteriana, antifúngica, capacidade de sequestro do radical peroxil e de inibição da enzima lipase, sobressaindo-se aos resultados encontrados para as folhas.

A fração em hexano das cascas exibiu resultados promissores frente às bactérias aeróbias e anaeróbias *S. mitis* (CIM $200 \mu\text{g mL}^{-1}$), *S. sanguinis* (CIM $400 \mu\text{g mL}^{-1}$), *F. nucleatum* (CIM $400 \mu\text{g mL}^{-1}$) e *A. naeslundii* (CIM $400 \mu\text{g mL}^{-1}$). Sendo assim, essa fração foi selecionada para fracionamento por cromatografia em coluna.

5.7.1 Fracionamento em coluna da fração em hexano das cascas (Coluna CH1)

A partir da coluna CH1 foram obtidas 283 subfrações que foram monitoradas por CCD e reagrupadas em 65 subfrações denominadas subfrações “nH1”, as quais foram novamente monitoradas. As subfrações 14H1 e 18H1 apresentavam manchas únicas nas placas cromatográficas, reveladas com Liebermann-Burchard, e por isso foram selecionadas para serem submetidas à análise em CG-EM. A análise dos espectros de

massas de CG-EM foi realizada por comparação com as bibliotecas NIST, SHIMATSU, WILLEY disponíveis no equipamento.

5.7.2 Subfração 14H1

O cromatograma de íons totais da subfração 14H1 (8,91 mg) (Figura 14, p. 57) demonstra a presença de 6 picos mais intensos nos tempos de retenção apresentados na Tabela 14 (p. 57).

A identificação dos compostos presentes na subfração 14H1 foi realizada por meio da comparação de dados espectroscópicos e espectrométricos com aqueles presentes na literatura. Foram identificados três esteroides: campesterol C₂₈H₄₈O (**2**), estigmasterol C₂₉H₄₈O (**3**) e sitosterol C₂₉H₅₀O (**4**) e o ácido palmítico C₁₆H₃₂O₂ (**1**). Esses esteroides, bem como o ácido palmítico são comumente encontrados em vegetais e apresentam reconhecida atividade biológica (DEWICK, 2009).

FIGURA 14 - Cromatograma de CG-EM da subfração 14H1.

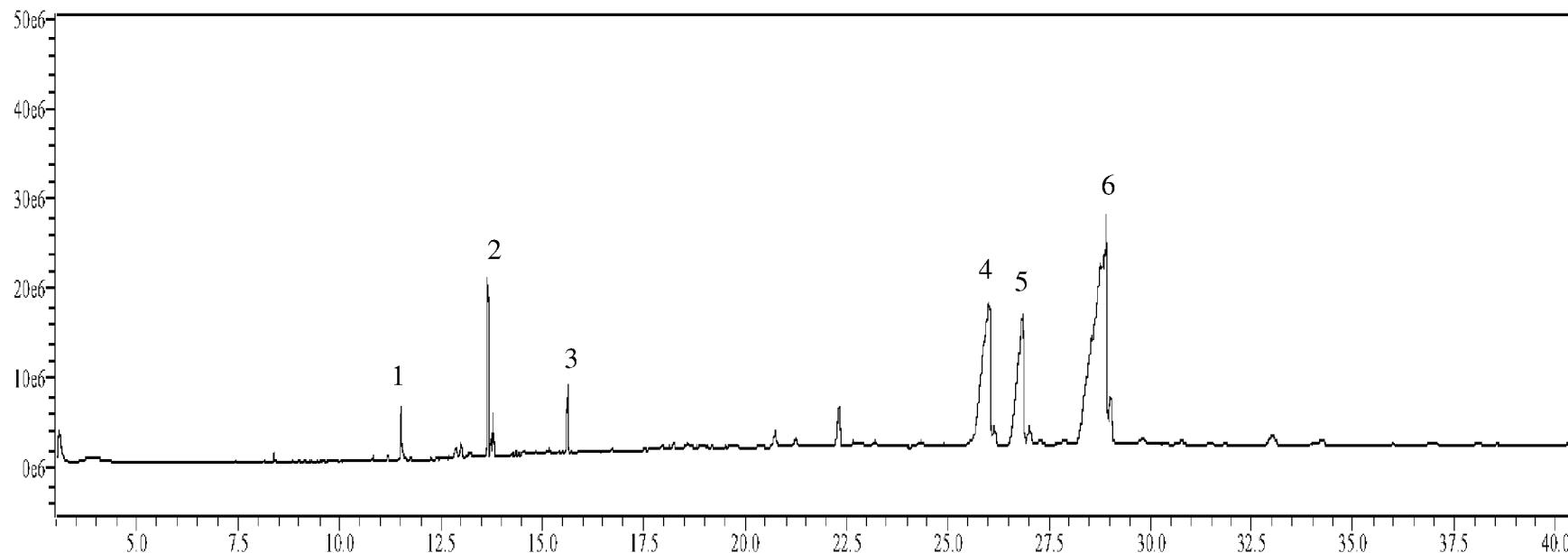


TABELA 14 - Tempos de retenção dos principais picos da subfração 14H1.

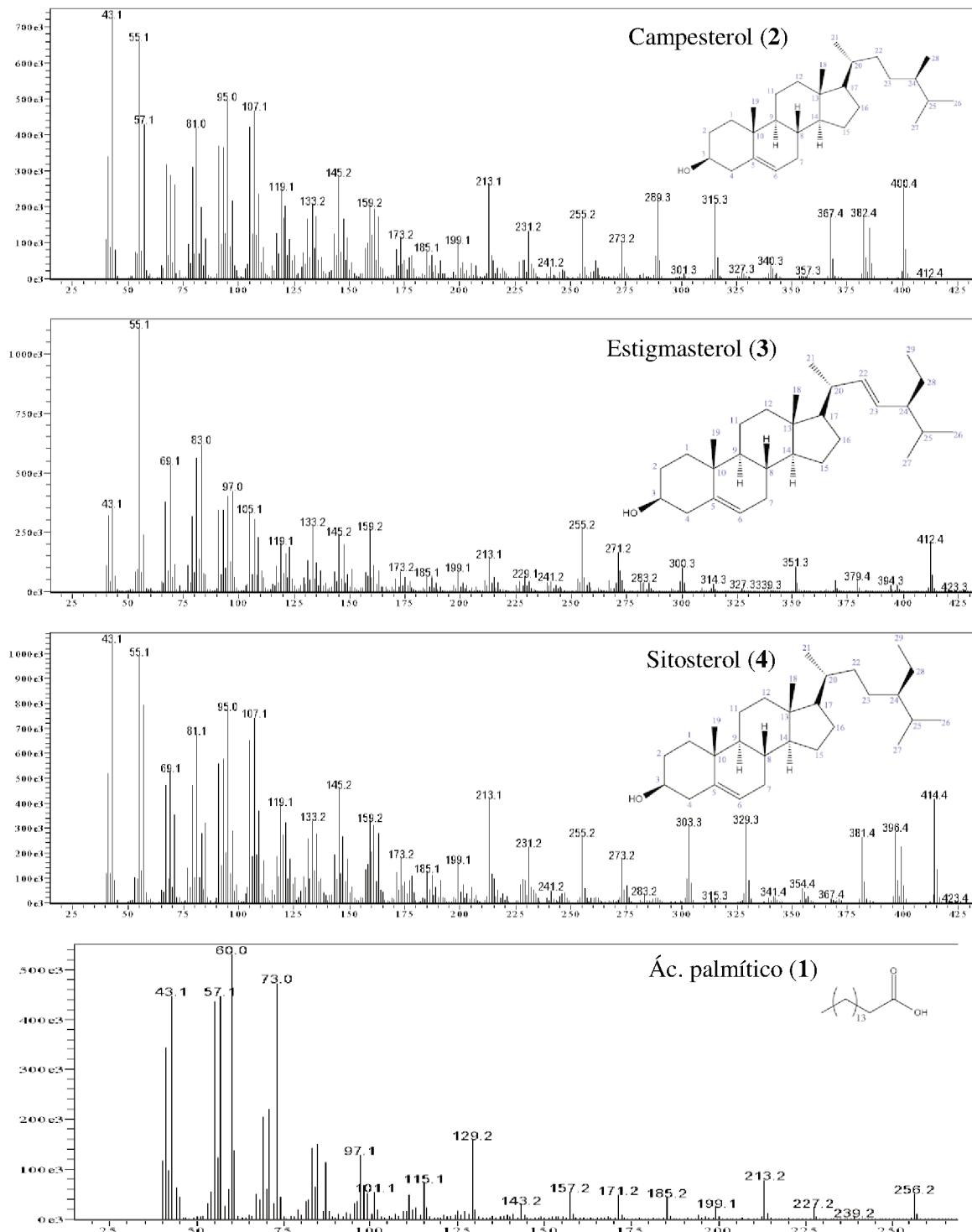
Nº do pico	Tempo de retenção (minutos)	Composto	$[M^{•+}]$ <i>m/z</i>	Nº do pico	Tempo de retenção (minutos)	Composto	$[M^{•+}]$ <i>m/z</i>
1	11,51	Ácido palmítico (1)	256	4	26,02	Campesterol (2)	400
2	13,67	Contaminante I	402	5	26,85	Estigmasterol (3)	412
3	15,64	Contaminante II	390	6	28,93	Sitosterol (4)	414

Nota: O contaminante I é o tributil-acetil citrato e o contaminante II é o dioctil-ftalato.

Fonte: A autora.

Os espectros de massas obtidos via CG-EM são apresentados na Figura 15.

FIGURA 15 - Espectros de massas dos compostos obtidos na subfração 14H1.

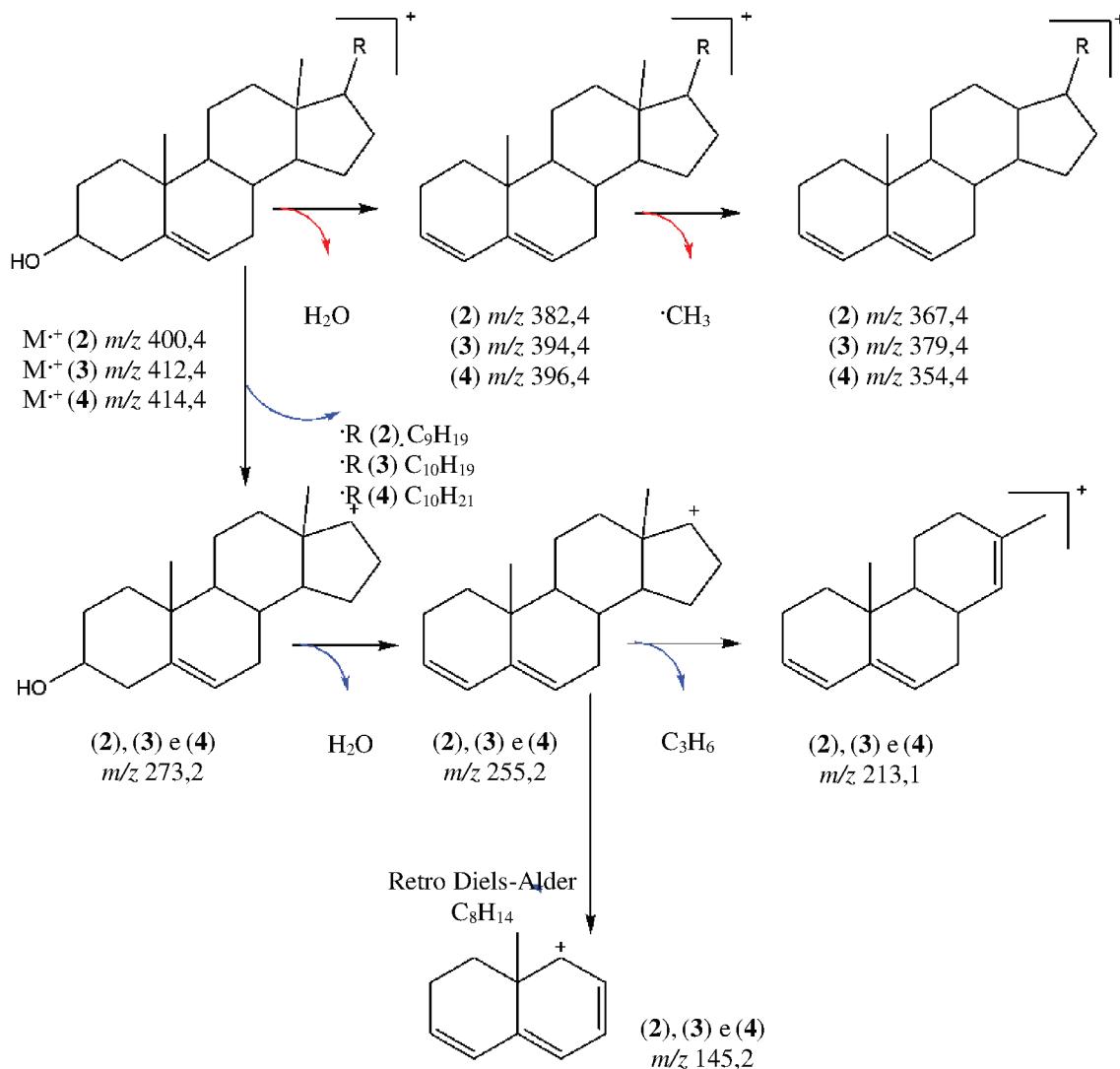


Fonte: A autora.

O ácido palmítico encontrado na subfração 14H1 foi identificado por meio de sua fragmentação característica. A obtenção do pico base m/z 60 ocorre por meio do rearranjo de Mc Lafferty, os demais picos são gerados por perdas consecutivas de 14 unidades de massa atômica (CH_2) a partir do íon molecular, por meio da quebra homolítica da cadeia hidrocarbonada (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

As propostas de fragmentação comuns para os três esteroides da subfração 14H1 são demonstradas na Figura 16 (SIMOTE, 2006; LIMA, 2016).

FIGURA 16 - Propostas de fragmentação para os esteroides da subfração 14H1.

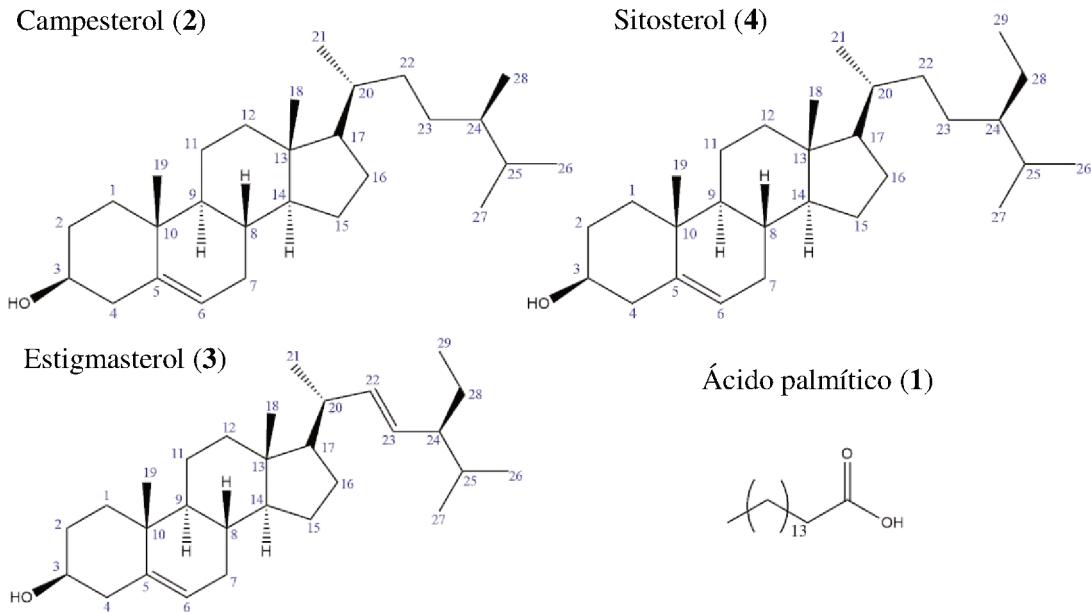


Nota: Esteroides: campesterol (2), estigmasterol (3) e sitosterol (4). R refere-se à cadeia lateral que difere cada um dos esteroides encontrados na subfração 14H1.

Fonte: Simote (2006); Lima (2016).

A Figura 17 apresenta a estrutura dos esteroides e o ácido graxo encontrados na subfração 14H1.

FIGURA 17 - Compostos identificados na subfração 14H1.



Fonte: A autora.

A partir da análise dos sinais de RMN ^{13}C , DEPT135 (Apêndice - Figuras II e III, respectivamente) e ^1H (Figura 18, p. 62) foi possível comprovar a presença desses esteroides. A Tabela 15 apresenta os valores de deslocamentos químicos e ambiente de carbono encontrados para o campesterol, estigmasterol e sitosterol, comparados com os valores obtidos em literatura (WRIGHT *et al.*, 1978; CHOI *et al.*, 2007).

TABELA 15 - Dados de RMN ^{13}C dos esteroides campesterol (**2**), estigmasterol (**3**) e sitosterol (**4**) encontrados na subfração 14H1.

(continua)

Posição	$\delta\text{ C}^{13}$ (ppm)			$\delta\text{ C}^{13}$ (ppm)	
	(WRIGHT <i>et al.</i> , 1978; CHOI <i>et al.</i> , 2007)				
	Campesterol	Estigmasterol	Sitosterol	Subfração 14H1	DEPT
C₁	37,34	37,31	37,31	37,26	CH ₂
C₂	31,76	31,69	31,57	31,67	CH ₂
C₃	71,87	71,81	71,69	71,82	CH
C₄	42,40	42,30	42,25	42,31	CH ₂
C₅	140,75	140,79	140,76	140,76	Cq
C₆	121,72	121,60	121,59	121,73	CH
C₇	31,99	31,97	31,92	31,91	CH ₂

TABELA 34 - Dados de RMN ^{13}C dos esteroides campesterol (**2**), estigmasterol (**3**) e sitosterol (**4**) encontrados na subfração 14H1.

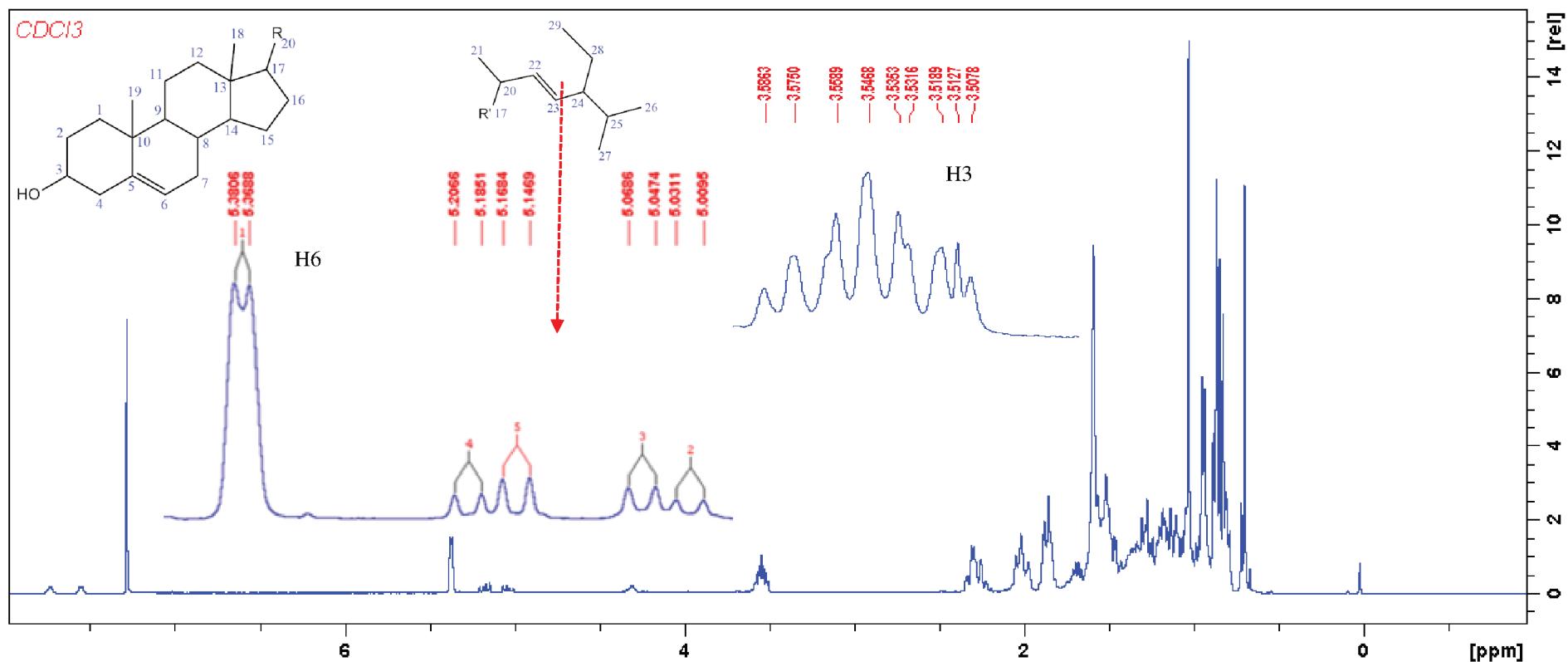
(conclusão)

Posição	$\delta \text{ C}^{13}$ (ppm)			$\delta \text{ C}^{13}$ (ppm)	
	Campesterol (WRIGHT <i>et al.</i> , 1978; CHOI <i>et al.</i> , 2007)	Estigmasterol	Sitosterol	Subfração 14H1	DEPT
C₈	31,99	31,97	31,92	31,92	CH
C₉	50,24	50,27	50,17	50,13	CH
C₁₀	36,58	36,58	36,51	36,51	Cq
C₁₁	21,16	21,16	21,11	21,09	CH ₂
C₁₂	39,86	39,77	39,81	39,78	CH ₂
C₁₃	42,40	42,30	42,25	42,31	Cq
C₁₄	56,85	56,96	56,79	56,77	CH
C₁₅	24,36	24,39	24,32	24,31	CH ₂
C₁₆	28,27	28,96	28,26	28,25	CH ₂
C₁₇	56,21	56,06	56,11	56,06	CH
C₁₈	11,90	11,90	11,87	11,86	CH ₃
C₁₉	19,44	19,42	19,40	19,40	CH ₃
C₂₀	35,96	40,54	36,17	36,15; 40,54	CH; CH
C₂₁	20,07	21,11	19,84	19,82	CH ₃
C₂₂	33,80	138,37	33,95	33,95; 138,32	CH ₂ ; CH
C₂₃	26,07	129,32	26,13	26,07; 129,28	CH ₂ ; CH
C₂₄	45,80	51,29	45,85	45,84; 51,24	CH; CH
C₂₅	30,37	31,94	29,18	29,15	CH
C₂₆	19,03	19,02	19,07	19,07	CH ₃
C₂₇	19,04	19,05	19,06	19,03	CH ₃
C₂₈	15,44	25,44	23,09	15,37; 24,31	CH ₃ ; CH ₂
C₂₉	-	12,27	12,32	12,25	CH ₃

Fonte: A autora; WRIGHT *et al.*, 1978; CHOI *et al.*, 2007.

O espectro de RMN H¹ é apresentado na Figura 18 (p. 62), por meio dele é possível verificar que os sinais relativos ao H₆ e H₃ dos esteroides apresentam deslocamentos químicos em 5,38 ppm (duploto, J = 4,72 Hz) e 3,54 ppm (multiplet), respectivamente. Esses sinais revelam a presença da ligação dupla em C5-C6 e grupo funcional ligado ao C3, demonstrando a constituição do núcleo básico dos esteroides tetracíclicos em questão (NASCIMENTO, 2014).

FIGURA 18 - Espectro de RMN ^1H da subfração 14H1.



Fonte: A autora.

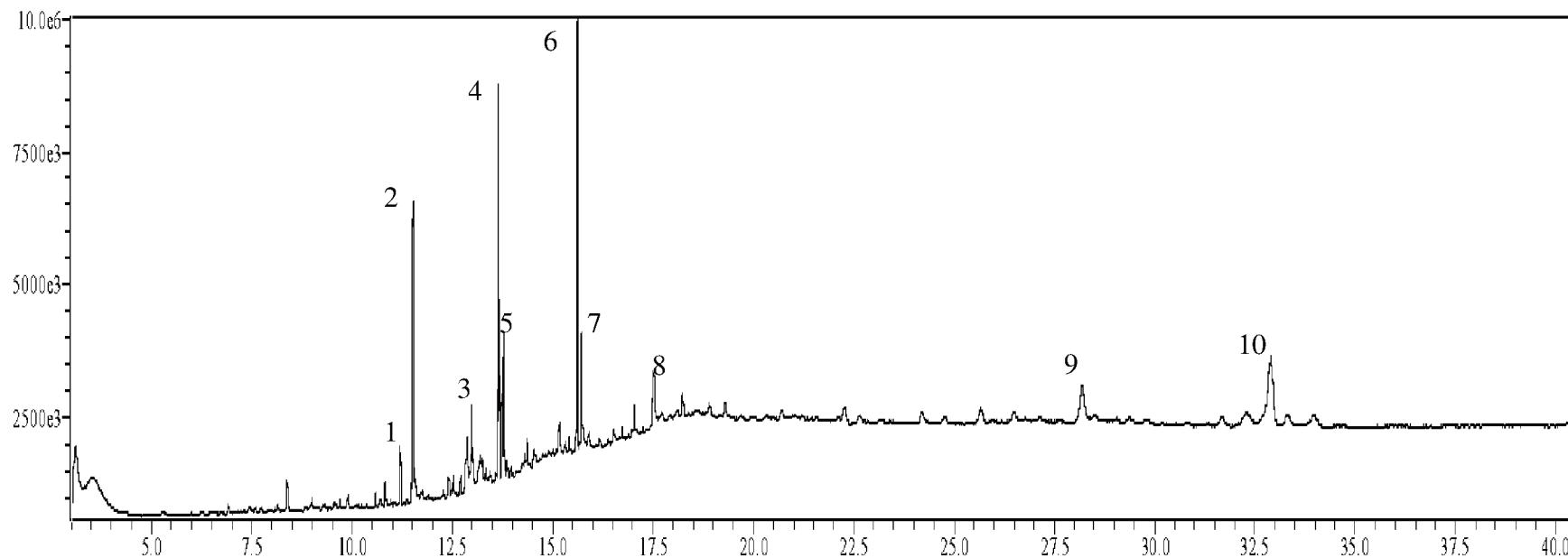
Os sinais intensos na região 0,67 ppm a 2,31 ppm correspondem aos hidrogênios metílicos (CH_3), metilênicos (CH_2) e metínicos (CH), os quais caracterizam o esqueleto esteroideal das substâncias. As estruturas dos três esteroides são idênticas até o C19 e, desse modo, apresentam deslocamentos químicos de carbono e hidrogênio semelhantes. Todavia, as diferenças podem ser identificadas na cadeia lateral, ocasionando deslocamentos químicos distintos entre o sitosterol e estigmasterol. Neste último composto o H22 apresenta deslocamento químico em 5,17 ppm (duplo dubbleto, $J = 8,60$ e $J = 14,79$) e o H23 em 5,03 ppm (duplo dubbleto, $J = 8,72$ e $J = 16,14$), característicos dos hidrogênios vinílicos presentes no estigmasterol, e ausentes no sitosterol (NASCIMENTO, 2014).

5.7.3 Subfração 18H1

Os compostos identificados na subfração 18H1 foram caracterizados por meio da comparação de dados espectrométricos com a literatura. O ácido palmítico (**1**) e o sitosterol (**4**), já identificados na subfração 14H1, também estam presentes na subfração 18H1. Além desses compostos, foi possível verificar a presença dos ácidos graxos: ácido esteárico $\text{C}_{18}\text{H}_{36}\text{O}_2$ (**6**), ácido beênico $\text{C}_{22}\text{H}_{44}\text{O}_2$ (**7**) e ácido lignocélico $\text{C}_{24}\text{H}_{48}\text{O}_2$ (**8**) e do éster: 14-metil pentadecanoato de metila $\text{C}_{17}\text{H}_{34}\text{O}_2$ (**5**).

A Figura 19 (p. 64) apresenta o cromatograma de íons totais obtido da subfração 18H1 (16,62 mg) e revela a presença de 10 picos mais intensos nos tempos de retenção indicados na Tabela 16 (p. 64).

FIGURA 19 - Cromatograma de CG-EM da subfração 18H1.



Fonte: A autora.

TABELA 16 - Tempos de retenção dos principais picos da subfração 18H1.

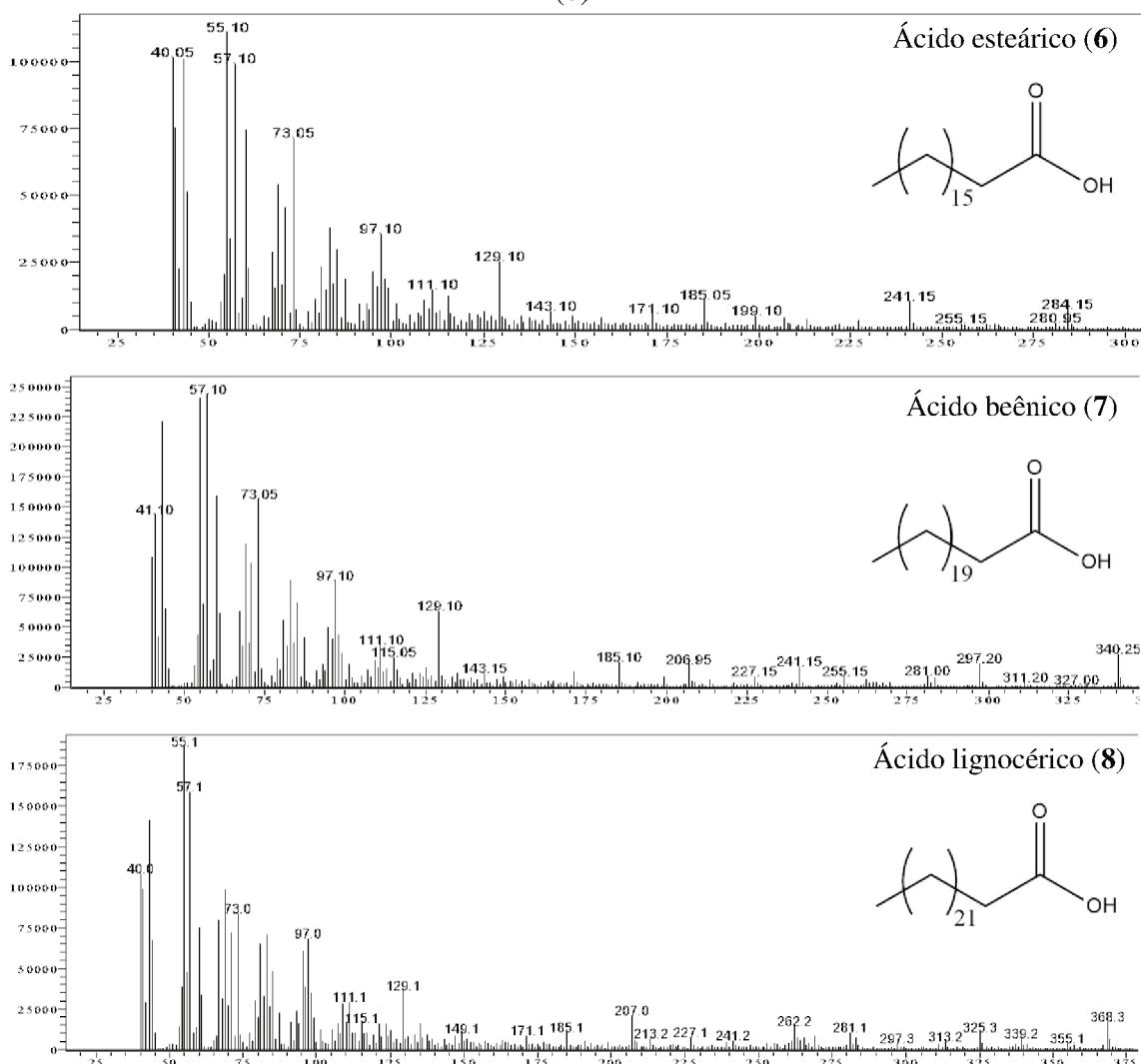
Nº do pico	Tempo de retenção (minutos)	Composto	[M•+] m/z	Nº do pico	Tempo de retenção (minutos)	Composto	[M•+] m/z
1	11,22	14-metil pentadecanoato de metila (5)	270	6	15,64	Contaminante II	390
2	11,53	Ácido palmítico (1)	256	7	15,71	Ácido behênico (28)	340
3	12,98	Ácido esteárico (6)	284	8	17,52	Ácido lignocérico (29)	368
4	13,67	Contaminante I	402	9	28,18	Sitosterol (11)	414
5	13,79	Não identificado	285	10	32,87	Não identificado	450

Nota: O contaminante I é tributil-acetyl citrato e o contaminante II é dioctil-ftalato.

Os ácidos graxos encontrados nas cascas de *C. sessilis* foram identificados por meio de suas fragmentações características. As propostas de fragmentação comum para os ácidos graxos compreendem a obtenção do pico m/z 60 por meio do rearranjo de Mc Lafferty e perdas consecutivas de 14 unidades de massa atômica (CH_2) a partir do íon molecular, por meio da quebra homolítica da cadeia hidrocarbonada (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

A Figura 20 apresenta as estruturas químicas dos ácidos esteárico (6), beênico (7) e lignocérico (8) e os espectros de massas referentes a cada um.

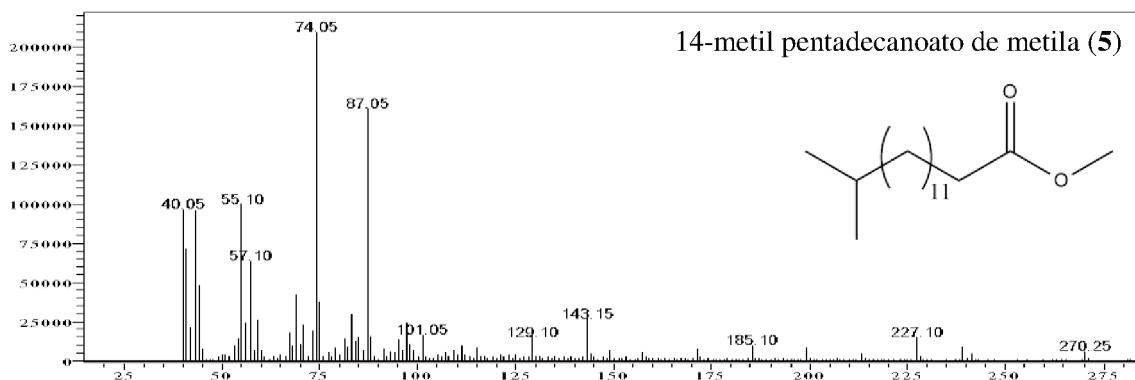
FIGURA 20 - Espectros de massas dos ácidos esteárico (6), beênico (7) e lignocérico (8).



Fonte: A autora.

O éster graxo 14-metil pentadecanoato de metila (**5**) foi identificado na subfração 18H1 por meio da dados espectrométricos comparados com a literatura. A Figura 18 apresenta o espectro de massas desse composto e sua fórmula estrutural.

FIGURA 21 - Espectro de massas do éster 14-metil pentadecanoato de metila (**5**).



Fonte: A autora.

No espectro de massas do 14-metil pentadecanoato de metila (**5**) é possível verificar a presença do pico m/z 227,10, originado a partir da quebra homolítica entre o C13 e C14, confirmando a presença da metila ligada ao C14. Nesse espectro, os picos mais intensos m/z 74,05 e m/z 87,05 são originados a partir da quebra homolítica da cadeia hidrocarbonada do 14-metil pentadecanoato de metila (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

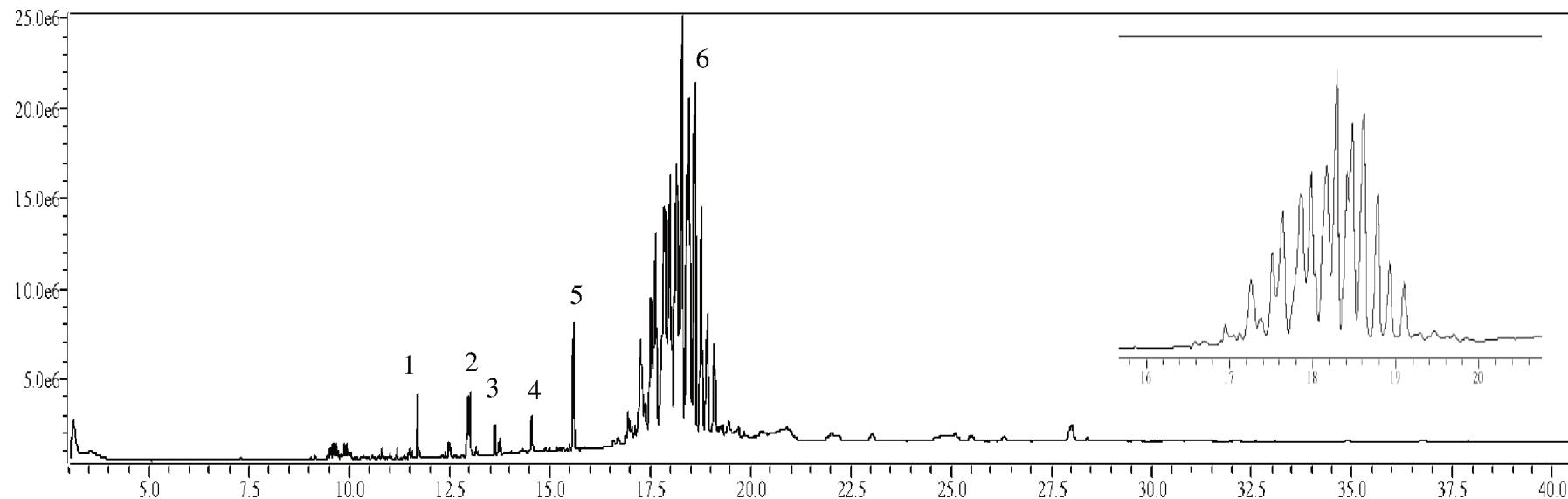
5.7.4 Refracionamento em coluna da fração em hexano das cascas (Coluna CH2)

A partir da subfração 13H1 (35,67 mg), obtida da coluna CH1, foi realizada uma segunda coluna cromatográfica, denominada Coluna CH2. As subfrações obtidas foram monitoradas e reagrupadas de acordo com seus fatores de retenção. A subfração 8H2 foi selecionada para ser submetida à análise por CG-EM, por conta da presença de uma única mancha na placa cromatográfica durante o monitoramento via CCD.

5.7.5 Subfração 8H2

A subfração 8H2 (9,63 mg), obtida a partir da coluna CH2, foi submetida ao fracionamento por CG-EM, o cromatograma obtido é exibido na Figura 23 (p. 68). Foram verificados 6 picos mais intensos, os tempos de retenção estão expostos na Tabela 17 (p. 68).

FIGURA 22 - Cromatograma de CG-EM da subfração 8H2.



Fonte: A autora.

TABELA 17 - Tempos de retenção dos principais picos da subfração 8H2.

Nº do pico	Tempo de retenção (minutos)	Composto	[M•+] <i>m/z</i>	Nº do pico	Tempo de retenção (minutos)	Composto	[M•+] <i>m/z</i>
1	11,63	Palmitato de etila (9)	284	4	14,57	Contaminante III	370
2	13,05	Linoleato de etila (10)	308	5	15,69	Contaminante II	390
3	13,65	Contaminante I	402	6	16,91 - 19,23	Contaminante II	390

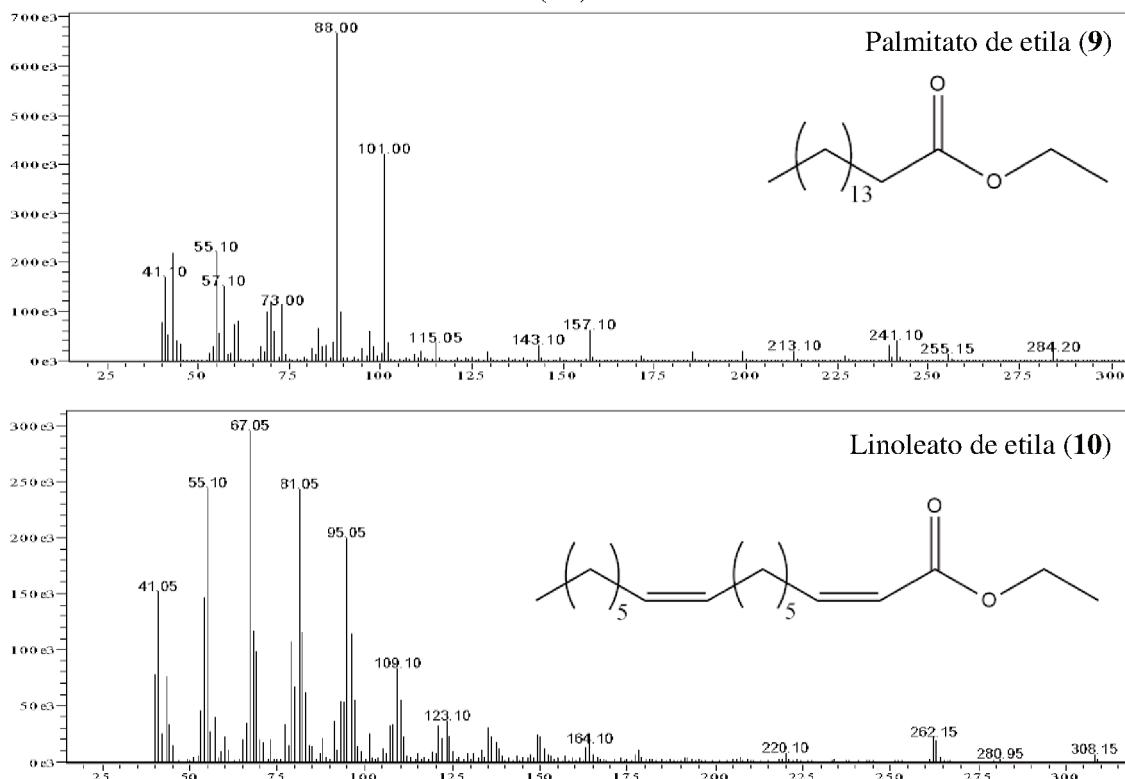
Nota: O contaminante I é o tributil-acetil citrato, o contaminante II é o dioctil-ftalato e o contaminante III é o adipato de dioctila.

Fonte: A autora.

Na subfração 8H2 foram encontrados os ésteres palmitato de etila C₁₈H₃₆O₂ (**9**) e linoleato de etila C₂₀H₃₆O₂ (**10**) na subfração 8H2. Esses compostos foram identificados por meio de dados espectrométricos em comparação com valores da literatura.

A Figura 24 revela as estruturas químicas dos ésteres graxos encontrados na subfração 8H2 e seus respectivos espectros de massas.

FIGURA 23 - Espectros de massas dos ésteres palmitato de etila (**9**) e linoleato de etila (**10**).



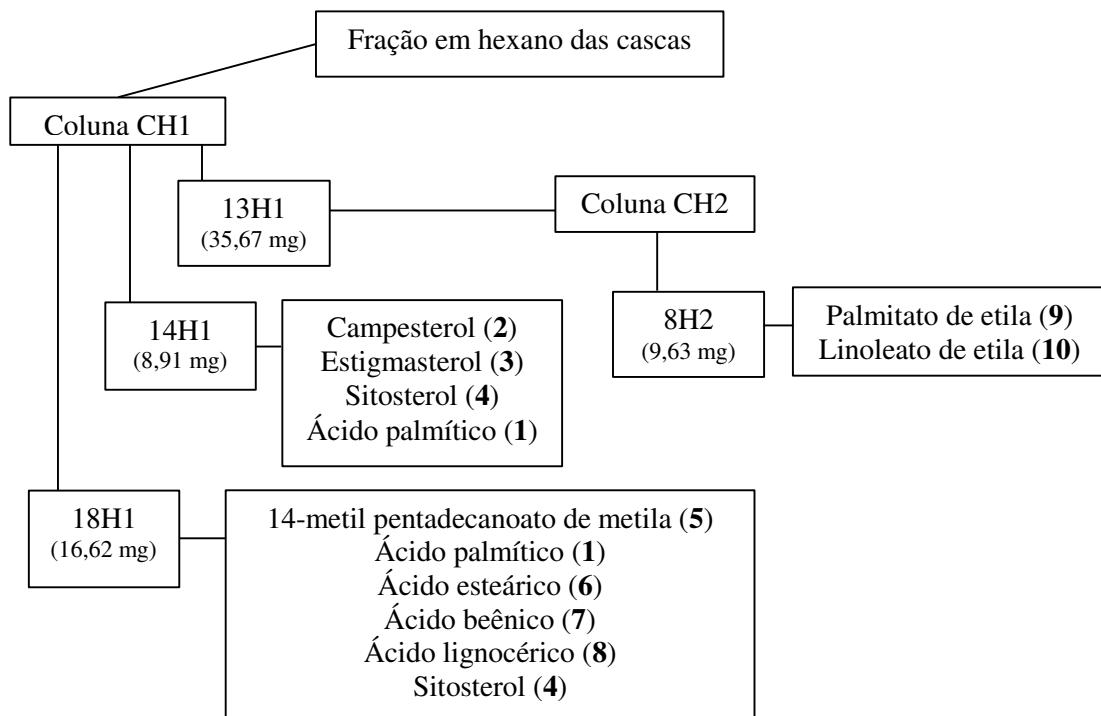
Fonte: A autora.

O éster palmitato de etila (**9**) apresenta em seu espectro de massa a presença do pico base m/z 88,00, originado a partir do rearranjo de Mc Lafferty, e outro pico mais intenso m/z 101,00 obtido a partir da quebra homolítica da ligação entre os carbonos C3 e C4 (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

No espectro de massas do linoleato de etila (**10**) verifica-se a presença dos picos m/z 67,05 e m/z 81,05 resultantes da quebra homolítica da cadeia alquênica do linoleato, fornecendo as espécies $[C_6H_9]^+$ e $[C_5H_7]^+$, respectivamente (SILVERSTEIN; WEBSTER; KIEMLE, 2007).

A Figura 25 apresenta um esquema simplificado que demonstra de modo geral os compostos identificados na fração em hexano das cascas de *C. sessilis*.

FIGURA 24 - Esquema de obtenção dos compostos da fração em hexano das cascas de *C. sessilis*.



Fonte: A autora.

5.8 Fracionamento da fração em acetato de etila das cascas e identificação de compostos

A fração em acetato de etila foi selecionada para fracionamento em coluna, pois apresentou atividade moderada frente aos microorganismos *P. gingivalis* (CIM 400 µg mL⁻¹), *A. naeslundii* (CIM 200 µg mL⁻¹), *C. albicans* e *C. tropicalis* (CIM 93,75 µg mL⁻¹ para ambas). Também foi a fração mais ativa na inibição da enzima lipase (98,4 ± 2,1%) e capacidade de sequestro do radical peroxil (2415,5 ± 157,8 µmol Trolox eq g⁻¹).

5.8.1 Fracionamento em coluna da fração em acetato de etila das cascas (Coluna CA1)

Aproximadamente 2,0 gramas da fração em acetato de etila foi submetido ao fracionamento por cromatografia em coluna (Coluna CA1), fornecendo subfrações que foram monitoradas via CCD, reagrupadas de acordo com seus fatores de retenção e denominadas “nA1”. Dentre elas, as subfrações 6A1 e 12A1 apresentavam manchas

únicas nas placas cromatográficas e foram selecionadas para ensaio espectrométrico via CLAE-EM/EM.

5.8.2 Subfração 6A1

A subfração 6A1 (33,1 mg) foi submetida ao ensaio cromatográfico via CLAE-EM/EM e apresentou um cromatograma com 4 picos mais intensos. Foram identificadas as substâncias: ácido geniposídico $C_{16}H_{22}O_{10}$ (**11**), ácido coumaroilquínico $C_{16}H_{18}O_8$ (**12**), éster metílico do ácido cafeoilquínico $C_{17}H_{20}O_9$ (**13**) e lioniresinol glucopiranosídeo $C_{28}H_{38}O_{13}$ (**14**). A identificação desses compostos ocorreu por meio da comparação dos dados obtidos da amostra com aqueles disponíveis na literatura.

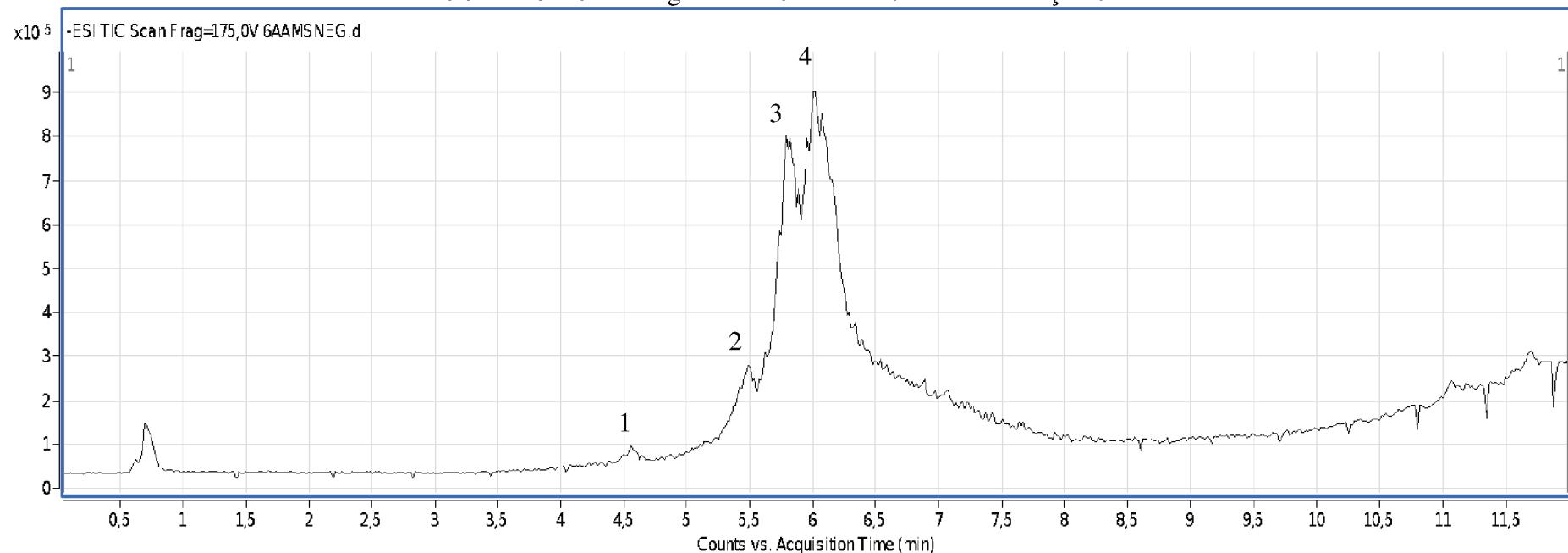
Os compostos ácido coumaroilquínico (**12**) e éster metílico do ácido cafeoilquínico (**13**) pertencem à classe de metabólitos secundários conhecida como compostos fenólicos ou fenilpropanoides, os quais são caracterizados pela presença de um grupo fenólico e apresentam diversas funções no organismo vegetal, porém a de maior destaque é a antioxidante, uma vez que esses compostos atuam como sequestradores de radicais livres, como o superóxido O_2^- , e espécies reativas de nitrogênio (CUPPETT, 1988; SOKMEN *et al.*, 2005).

O ácido geniposídico (**11**) pertence à classe dos iridoides, essa classe de metabólitos secundários apresenta diversas atividades biológicas e são amplamente distribuídos na natureza, onde desempenham função de defesa em alguns vegetais (DINDA; CHOWDURRY; MOHANTA, 2009). O lioniresinol glucopiranosídeo (**14**) é uma lignana, as quais são comumente encontradas nas paredes das células vegetais, fornecendo-lhes considerável rigidez e também estão associadas a diversas atividades biológicas (BARBOSA FILHO, 2017).

Os compostos encontrados na subfração 6A1 foram identificados por meio de dados espectrométricos em comparação com a literatura. Essa subfração foi submetida à análise de RMN porém, por conta da grande quantidade de compostos presentes na mistura, não apresentou dados que permitissem a identificação das substâncias.

A Figura 25 (p. 71) apresenta o cromatograma da subfração 6A1 e a Tabela 18 (p. 71) o tempo de rentenção dos picos principais.

FIGURA 25 - Cromatograma de CLAE-EM/EM da subfração 6A1.



Fonte: A autora.

TABELA 18 - Tempos de retenção dos principais picos da subfração 6A1.

Nº do pico	Tempo de retenção (minutos)	Composto	[M-H] ⁻ <i>m/z</i>	Nº do pico	Tempo de retenção (minutos)	Composto	[M-H] ⁻ <i>m/z</i>
1	4,56	Ácido geniposídico (9)	373,1144	4	5,79	Éster metílico do ácido cafeoilquínico ()	337,1047
2	5,49	Ácido coumaroilquínico (10)	337,0938	5	6,07	Lioniresinol glucopiranósideo ()	581,2239

Fonte: A autora.

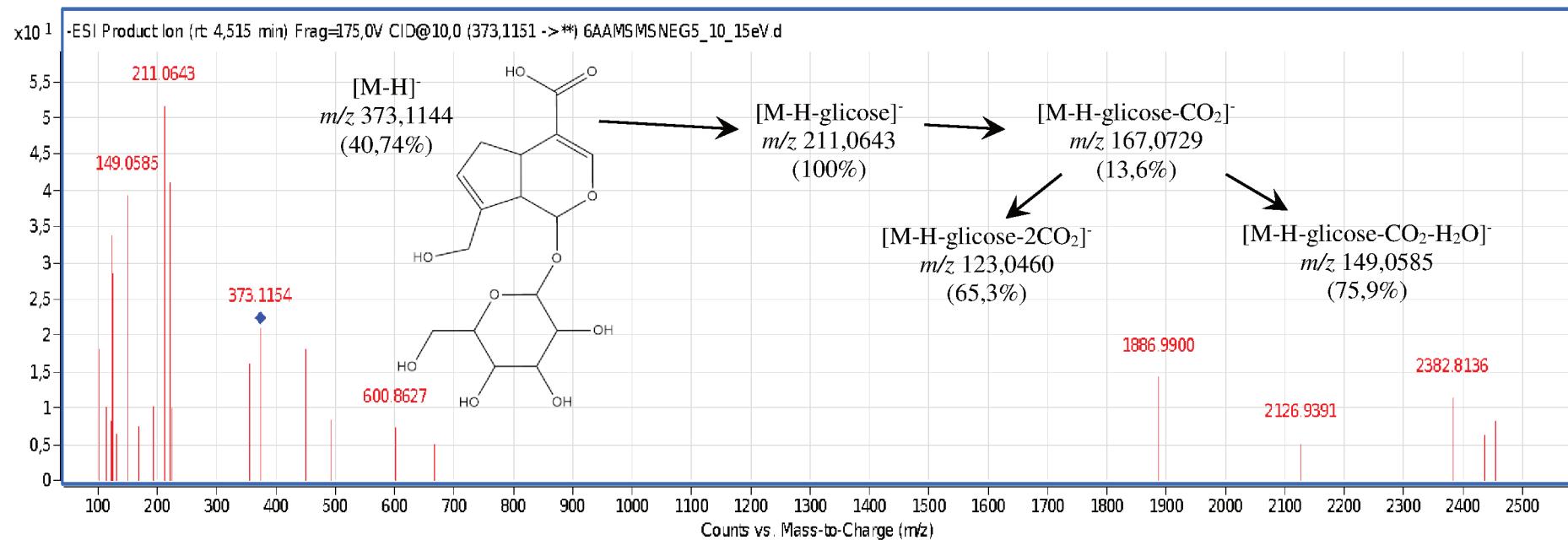
O espectro de massas EM/EM do ácido geniposídico $C_{16}H_{22}O_{10}$ (**11**) $[M-H]^- m/z$ 373,1144 (erro -1,01 ppm) foi fornecido em modo negativo (Figura 26, p. 73). Sua proposta de fragmentação revela a eliminação da glicose gerando o pico base m/z 211,0643, a consequente perda de CO_2 que fornece o pico m/z 167,0729 (13,6%) e posterior desidratação gerando o pico m/z 149,0585 (75,9%). A proposta de fragmentação também sugere a eliminação da glicose e duas moléculas de CO_2 fornecendo o pico m/z 123,0460 (65,3%) (BENTES, 2014) (Figura 26, p. 73).

O ácido coumaroilquínico (**12**) foi identificado por meio de dados espectrométricos. O espectro de massas EM/EM (modo negativo) do ácido coumaroilquínico $C_{16}H_{18}O_8$ (**12**) $[M-H]^- m/z$ 337,0938 (erro -2,338 ppm) é apresentando na Figura 27 (p. 74). A proposta de fragmentação sugere a perda do coumaroil fornecendo o pico base m/z 191,0556, em seguida ocorre desidratação gerando o pico m/z 173,0449 (14,2%) que caracteriza a posição (C5) do coumaroil no anel do ácido quínico (CLIFFORD *et al.*, 2003; BRESCIANI *et al.*, 2014). O ácido coumaroilquínico perde o quinoil ácido, gerando o pico m/z 163,0353 (18,9%) e posteriormente elimina CO_2 fornecendo o pico m/z 119,0476 (43,9%) (KREUTZMANN; CHRISTENSEN; EDELENBOS, 2008) (Figura 27, p. 74).

O éster metílico do ácido cafeoilquínico $C_{17}H_{20}O_9$ (**13**) $[M-H]^- m/z$ 367,1047 (erro -1,22 ppm) também foi encontrado na subfração 6A1 e sua identificação foi realizada por meio dos dados espectrométricos, obtidos via CLAE-EM/EM (modo negativo) (Figura 28, p. 75). A proposta de fragmentação para o éster metílico do ácido cafeoilquínico sugere a perda do ácido cafeico seguida da desidratação, fornecendo o pico base m/z 161,0245. A eliminação do ácido cafeico e uma molécula de CO_2 fornece o pico m/z 135,0431 (36,3%) (CHEN *et al.*, 2015). Segundo Jaiswal e Kuhnert (2011), a presença do pico base em m/z 161 e a ausência do pico m/z 297 sugerem a posição (C4) do cafeoil no anel do ácido quínico (Figura 28, p. 75).

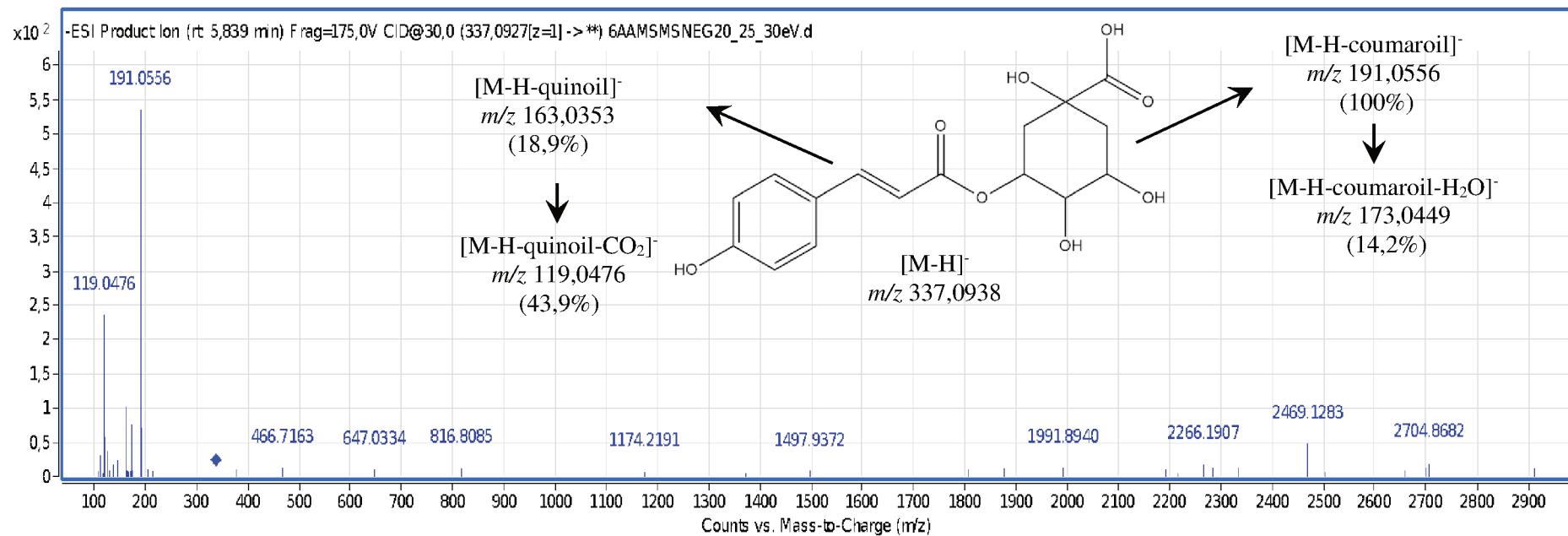
O lioniresinol glucopiranosídeo (**14**) $C_{28}H_{38}O_{13}$ $[M+H]^+ m/z$ 583,2391 (erro 0,53 ppm) foi identificado por meio de dados espectrométricos. O espectro de massas EM/EM (modo positivo) (Figura 29, p. 76) forneceu o pico m/z 1165,7966 (18,7%) que corresponde a um dímero do composto em questão carregado com H^+ . A proposta de fragmentação do lioniresinol glucopiranosídeo sugere a perda da glicose que fornece o pico m/z 421,1868 (17,2%). O pico base m/z 267,1232 é formado pela perda do fenol (quebra da ligação C1'-C4) e em seguida, há desidratação fornecendo o pico m/z 249,1132 (33,8%) (ACHENBACH *et al.*, 1997; 1992) (Figura 29, p. 76).

FIGURA 26 - Espectro de massas EM/EM do ácido geniposídico (**11**).



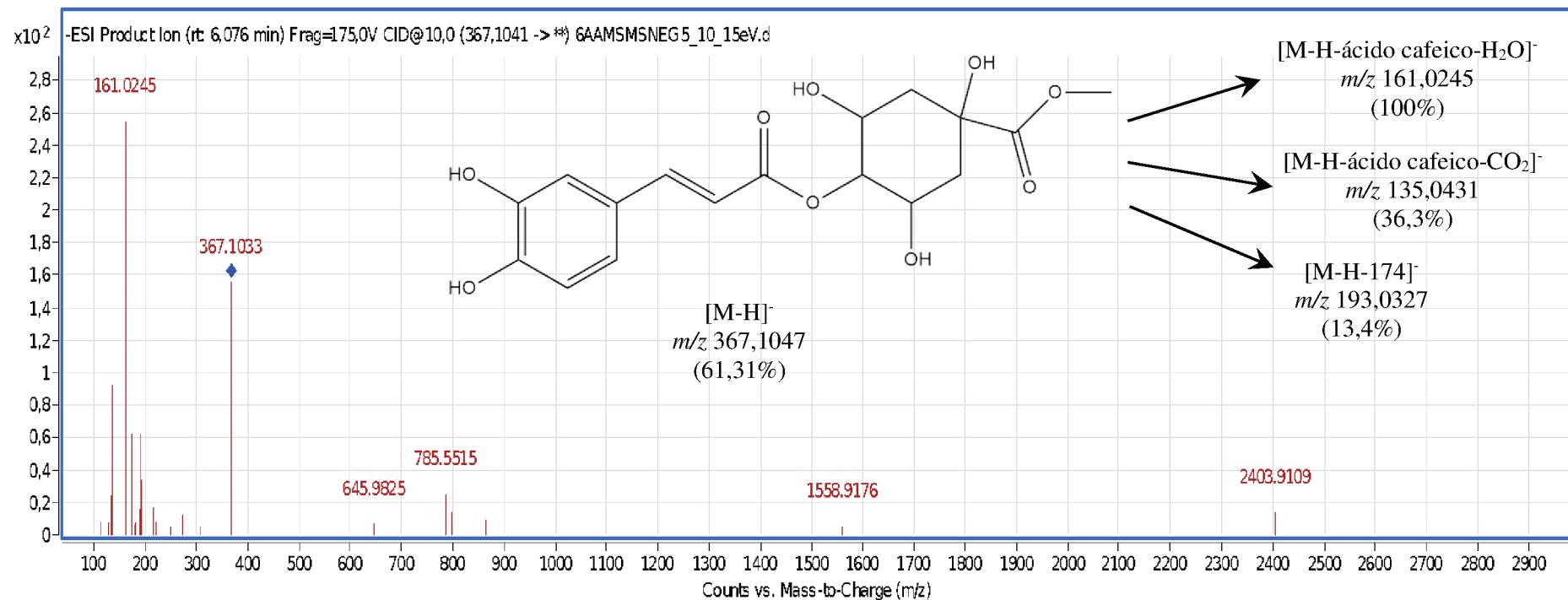
Fonte: Bentes (2014).

FIGURA 27 - Espectro EM/EM do ácido coumaroilquínico (**12**).



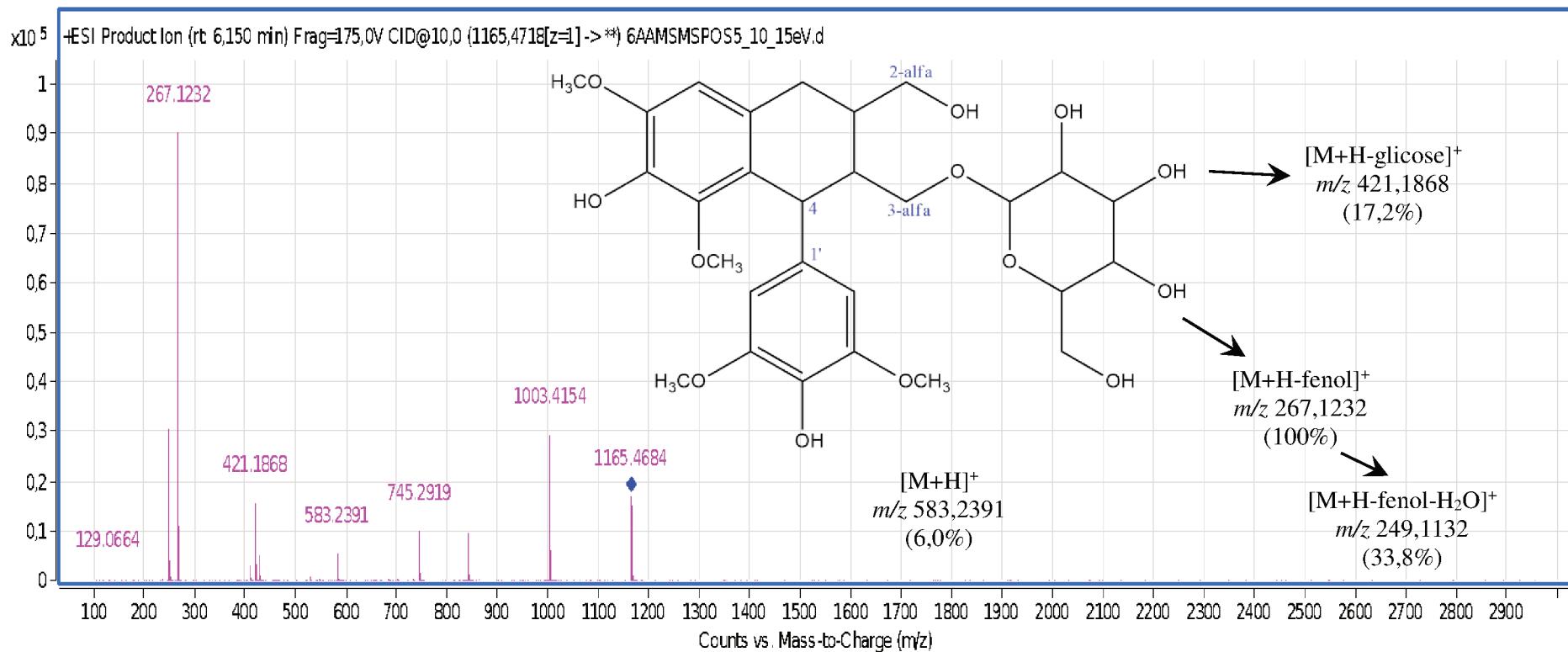
Fonte: Kreutzmann; Christensen; Edelenbos (2008); Bresciani *et al.* (2014).

FIGURA 28 - Espectro de massas EM/EM do éster metílico do ácido cafeoilquínico (**13**)



Fonte: Chen *et al.*, (2015); Jaiswal; Kuhnert (2011).

FIGURA 29 - Espectro de massas EM/EM do lioniresinol glucopiranosídeo (**14**).

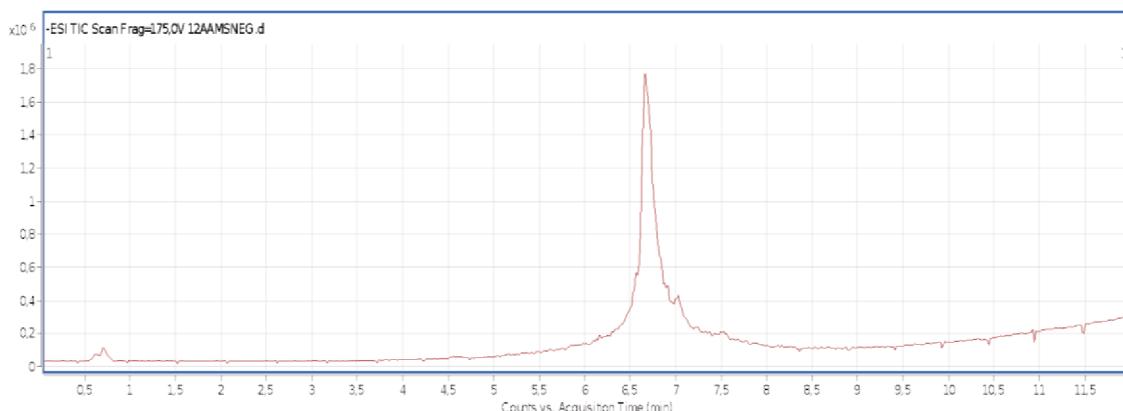


Nota: Foi representada a estrutura de lyoniresinol 3α -glucopiranosídeo para justificar os fragmentos, todavia a posição da glicose não foi confirmada (C 2α e C 3α).
Fonte: Achenbach *et al.* (1997); (1992).

5.8.3 Subfração 12A1

A subfração 12A1 (6,7 mg) apresentou em seu cromatograma (Figura 30) um pico mais intenso no tempo de rentenção 6,05 minutos que refere-se ao ácido dicafeoilquínico $C_{25}H_{24}O_{12}$ (**15**).

FIGURA 30 – Cromatograma de CLAE-EM/EM da subfração 12A1.

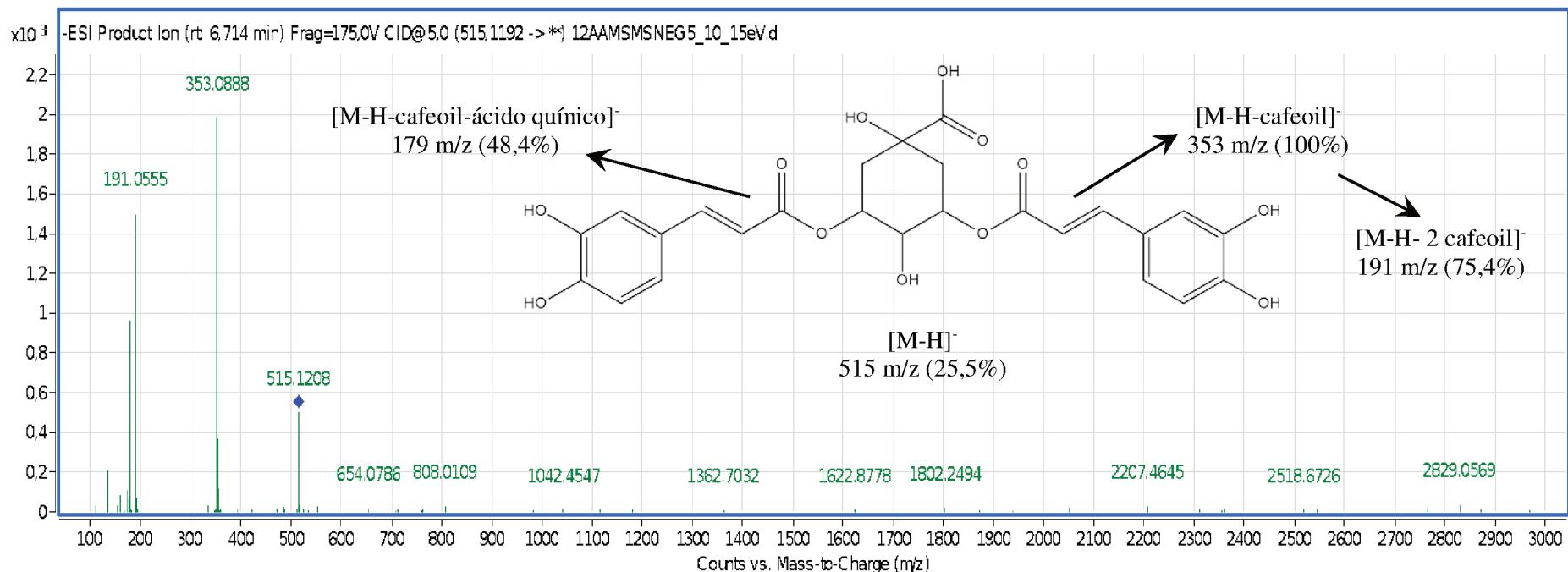


Fonte: A autora.

O ácido dicafeoilquínico $C_{25}H_{24}O_{12}$ (**15**) $[M-H]^- m/z 515,1204$ (erro -3,02 ppm) é um composto fenólico e foi identificado por meio dos dados espectrométricos fornecidos via CLAE-EM/EM (modo negativo) (Figura 31, p. 78). A proposta de fragmentação para o ácido dicafeoilquínico sugere a perda de um dicafeoil fornecendo o pico base m/z 353,0888, em seguida ocorre a perda do outro dicafeoil gerando o pico m/z 191,0555 (75,39%). Para gerar o pico m/z 179,0344 (48,4%) acontece a eliminação de um cafeoil e do ácido quínico (CLIFFORD; KNIGHT; KUHNERT, 2005; CLIFFORD *et al.*, 2003) (Figura 31, p. 78).

De acordo com Clifford *et al.* (2003) a ausência dos picos m/z 173,5 e m/z 335,5 sugere a posição de dois cafeois nos carbonos 3 e 5 do anel de ácido quínico. O pico m/z 335,5 indica a desidratação no ácido quínico, possibilitada pela perda do cafeoil ligado ao C4 e o pico m/z 173,5 indica a perda de outro cafeoil, como houve ausência desses picos no espectro de massas é possível atribuir o pico m/z 515,1204 ao isômero posicional ácido 3,5-dicafeoilquínico.

FIGURA 31 - Espectro de massas EM/EM do ácido dicafeoilquínico (15).

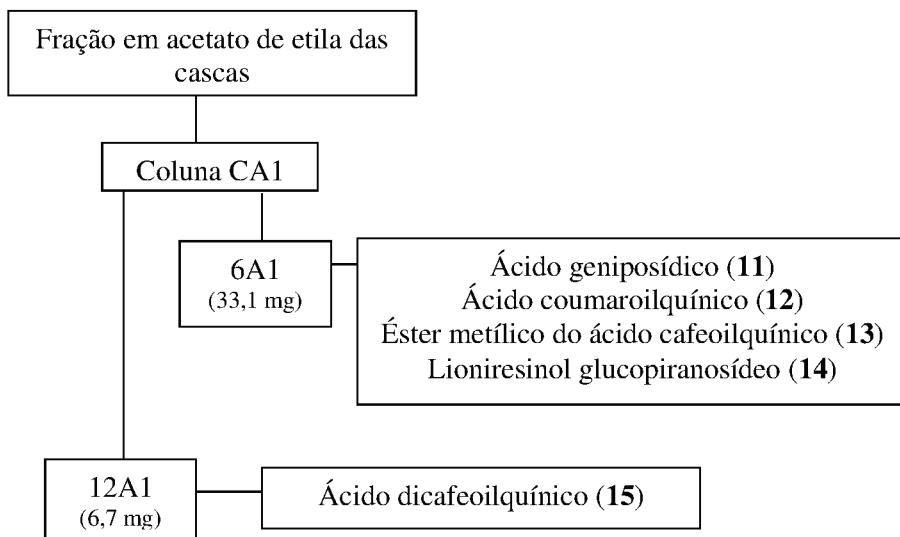


Nota: Estrutura química do ácido dicafeoilquínico.

Fonte: Clifford; Knight; Kuhnert (2005); Clifford *et al.* (2003).

A Figura 32 apresenta um fluxograma que esquematiza a obtenção dos compostos identificados na fração em acetato de etila das cascas de *C. sessilis*.

FIGURA 32 - Esquema de obtenção dos compostos bioativos da fração em hexano das cascas de *C. sessilis*.



Fonte: A autora.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O extrato etanólico das cascas de *C. sessilis*, assim como as frações em diclorometano e *n*-butanol mostraram-se moderadamente ativas frente às bactérias aeróbias e anaeróbias bucais. Entretanto, as folhas, que são utilizadas para tratar afecções na pele, segundo conhecimento popular, não apresentaram resultados satisfatórios frente às bactérias testadas. O extrato etanólico e as frações mais polares das cascas e folhas demonstraram resultados promissores na inibição do crescimento das leveduras do gênero *Candida* spp.

No teste que avalia a capacidade de sequestro do radical peroxil, as frações em acetato de etila das cascas e folhas apresentaram resultados tão eficientes quanto ao controle positivo utilizado no teste, o ácido ascórbico. Esse valor favorável está relacionado com a presença de compostos fenólicos e flavonoides presentes na fração em acetato de etila, uma vez que essas substâncias possuem propriedades antioxidantes.

Na avaliação de inibição das enzimas α -amilase e α -glicosidase, as amostras de cascas e folhas testadas não se sobressaíram ao controle positivo, como ocorreu no teste para verificação da inibição da enzima lipase. A fração em acetato de etila das cascas

apresentou percentual de inibição da lipase tão alto quanto o controle positivo Orlistat, um medicamento atualmente utilizado no combate à perda de peso.

Nos testes biológicos, os resultados das amostras de cascas sobressaíram-se às folhas, portanto foram selecionadas as frações em hexano e acetato de etila das cascas para fracionamento em coluna cromatográfica. A partir da fração em hexano foram obtidas as subfrações 14H1, 18H1 e 8H2 em que foram identificados, por CG-EM e RMN, os compostos: campesterol (**2**), estigmasterol (**3**) e sitosterol (**4**), ácido palmítico (**1**), ácido esteárico (**6**), beênico (**7**) e lignocérico (**8**), 14-metil pentadecanoato de metila (**5**), palmitato de etila (**9**) e linoleato de etila (**10**).

A fração em acetato de etila foi submetida ao fracionamento em coluna e forneceu as subfrações 6A1 e 12A1, nas quais foram identificados, por CLAE-EM/EM, os compostos: ácido geniposídico (**11**), ácido coumaroilquínico (**12**), éster metílico do ácido cafeoilquínico (**13**), lioniresinol glicopiranosídeo (**14**) e ácido dicafeoilquínico (**15**). Os compostos identificados nas cascas de *C. sessilis*, possuem reconhecida atividade biológica e conferem valor biológico às cascas da espécie. A investigação realizada neste estudo revela que há no Cerrado um vegetal com propriedades que devem ser valorizadas.

REFERÊNCIAS

- ACHENBACH, H.; BENIRSCHKE, M.; TORRENEGRA, R. Alkaloids and other compounds from seeds of *Tabernaemontana cymosa*. **Phytochemistry**, v. 45, nº 2, p. 325-335, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00645-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00645-0)
- ACHENBACH, H.; LÖWEL, M.; WAIBEL, R.; GUPTA, M.; SOLIS, P. New lignan glucosides from *Stemmadenia minima*. **Planta Medica**, v. 58, p. 270-272, 1992. DOI: 10.1055/s-2006-961451
- AQUINO, F. J. T.; CANELHAS, B. B.; CUNHA, L. C. S.; SOUZA, L. C.; BARROS, T. T.; OLIVEIRA, A. de; MORAIS, S. A. L.; CHANG, R.; NASCIMENTO, E. A. do; SOUZA, M. G. M. de; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Essential oil composition and extracts of *Cordiera sessilis* (Vell.) Kuntze with antioxidant and antimicrobial activity. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 32, nº 3, p. 371-377, 2013. <https://www.researchgate.net/publication/234094160>
- ALBUQUERQUE, M. L. S.; GUEDES, I.; ALCANTARA JUNIOR, P.; MOREIRA, S. G. C.; BARBOSA NETO, N. M.; CORREA, D. S.; ZILIO, S. C. Characterization of Buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil by absorption and emission espectroscopies. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 16, nº 6, p. 1113-1117, 2005. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532005000700004>
- ALBUQUERQUE, U. P. de; HANAZAKI, N. As pesquisas etnodirigidas na descoberta de novos fármacos de interesse médico e farmacêutico: fragilidades e perspectivas. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.16 (Supl.), p. 678-689, 2006. <https://www.researchgate.net/publication/255653991>
- ALMEIDA, T. S. de; ROCHA, J. B. T.; RODRIGUES, F. F. G.; CAMPOS, A. R.; COSTA, J. G. M. da. Chemical composition, antibacterial and antibiotic modulatory effect of *Croton campestris* essential oils. **Industrial Crops and Products**, v. 44, p. 630-633, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.09.010>
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação da atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, nº 10, p. 2202-2210, 2010. ISSN: 1678-7064. <http://www.repositorio.ufba.br/ri/handle/ri/3769>
- AYELESO, A. O.; OGUNTIBEJU, O. O.; BROOK, N. L. In vitro on the antioxidant potentials of the leaves and fruits of *Nauclea latifolia*. **The Scientific World Journal**, v. 2014, 2014. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/437081>
- BARBOSA, D. de A. **Avaliação fitoquímica e farmacológica de *Genipa americana* L. (Rubiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.
- BARBOSA FILHO, J. M. Lignanas, neolignanas e seus análogos. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. O.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

BENTES, A. de S. **Compostos bioativos de jenipapo, laranja e manga: composição e desenvolvimento de métodos de extração.** Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual Paulista. Campinas, 2014. <http://repositorio.unicamp.br/jspui/handle/REPOSIP/256560>

BERMEJO, P.; ABAD, M. J.; DÍAZ, A. M.; FERNÁNDEZ, L.; SANTOS, J. de; SANCHEZ, S.; VILLAESOUSA, L.; CARRASCO, L.; IRURZUN, A. Antiviral activity of seven iridoids, three saikogenins and one phenylpropanoid glycoside extracted from *Bupleurum rigidum* and *Scrophularia scorodonia*. **Planta Medica**, v. 68, nº 2, p. 106-110, 2002. DOI: 10.1055/s-2002-20238

BOLZANI, V. da S.; OLEA, R. S. G.; ROQUE, N. F. Acylated Flavonol Glycosides and Terpenoids from the Leaves of *Alibertia sessilis*. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 8, nº 3, p. 257-259, 1997. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50531997000300013>

BRAGA, F. C.; CASTILHO, R. O. Potencialidades do Cerrado como fonte de substâncias bioativas e de espécies medicinais para o desenvolvimento de fitoterápicos. In: SOUZA, G. H. B. de; MELLO, J. C. P.; LOPES, N. P. **Farmacognosia - Coletânea Científica**. Ouro Preto: Editora UFOP, 2012.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (Brasil). **Pesquisa de Orçamentos familiares 2008-2009: antropometria e estado nutricional de crianças, adolescentes e adultos no Brasil**. Rio de Janeiro: IBGE, 2010.

BRAZ FILHO, R. Contribuição da fitoquímica para o desenvolvimento de um país emergente. **Química Nova**, v. 33, nº 1, p. 229-239, 2010.

BRESCIANI, L.; CALINI, L.; BRUNI, R.; BRIGHENTI, F.; DEL RIO, D. Phenolic composition, caffeine content and antioxidant capacity of coffee silverskin. **Food Research International**, v. 61, p. 196-201, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.10.047>

CALDERONI, R. A.; FONZI, W. A. Virulence factors of *Candida albicans* Trends. **Microbiology**, v. 9 nº 7, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0966-842X\(01\)02094-7](https://doi.org/10.1016/S0966-842X(01)02094-7)

CANELHAS, B. B. **Estudo químico, análise do óleo essencial e avaliação das atividades antioxidante e antibacteriana do Marmelinho [*Cordiera sessilis* (Vell.) Kuntze (Rubiaceae)].** (Dissertação) Mestrado em Química de Produtos Naturais. Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012. <https://repositorio.ufu.br/handle/123456789/17360>

CARVALHO, T. C.; SIMÃO, M. R.; AMBRÓSIO, S. R.; FURTADO, N. A.; VENEZIANI, R. C.; HELENO, V. C.; DA COSTA, F. B.; GOMES, B. P.; SOUZA, M. G.; REIS, R. B. Antimicrobial activity of diterpenes from *Viguiera arenaria* against endodontic bacteria. **Molecules**, v. 16, nº 1, p. 543-551, 2011. <https://doi.org/10.3390/molecules160100543>

CASTELLARIN, M.; WARREN, R. L.; FREEMAN, J. D.; DREOLINI, L.; KRZYWINSKI, M.; STRAUSS, J.; BARNES, R.; WATSON, P.; ALLEN-VERCOE, E.; MOORE, R. A.; HOLT, R. A. *Fusobacterium nucleatum* infection is prevalent in human

colorectal carcinoma. **Genome Research.** v. 22, p. 299-306, 2011. <http://www.genome.org/cgi/doi/10.1101/gr.126516.111>.

CESCHINI, L.; CAMPOS, E. G. Cytotoxic effects of *Cochlospermum regium* (Mart & Schrank) Pilger aqueous root extract an mammalian cells. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, nº 2, p. 302-305, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.07.026>

CHEN, P.; WANG, Y.; CHEN, L.; JIANG, W.; NIU, Y.; SHAO, Q.; GAO, L.; ZHAO, Q.; YAN, L.; WANG, S. Comparison of the anti-inflammatory active constituents and hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids in two *Senecio* plants and their preparations by LC-UV and LC-MS. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 115, p. 260-271, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.07.014>

CHOI, J-M.; LEE, E-O.; LEE, H. J.; KIM, K. H.; AHN, K. S.; SHIM, B. S.; KIM, N-I.; SONG, M. C.; BAEK, N. I.; KIM, S. H. Identification of campesterol from *Chrysanthemum coronarium* L. and its antiangiogenic activities. **Phytotherapy Research**, v. 21, p. 954-959, 2007. <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1002/ptr.2189>

CLIFFORD, M. N.; JOHNSTON, K. L.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Hierarchical scheme for LC-MSⁿ identification of chlorogenic acids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 2900-2911, 2003. <https://doi.org/10.1021/jf026187q>

CLIFFORD, M. N.; KNIGHT, S.; KUHNERT, N. Discriminating between the six isomers of dicaffeoylquinic acid by LC-MSⁿ. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 3821-3832, 2005. <https://doi.org/10.1021/jf050046h>

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, in: 34 (Ed.), **CLSI document M 27-A3**. PA, Wayne, p. 27, 2008.

CLSI. Methods for Antimicrobial Susceptibility Testing of Anaerobic Bacteria. **CLSI Document M11-A8, 8th ed.** PA, Wayne, USA, 2012a.

CLSI. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for BacteriaThat Grow Aerobically. **CLSI Document M7-A9, 9th ed.** PA, Wayne, USA, 2012b.

COELHO, J. M. **Avaliação toxicogenética, bioquímica e da reparação tecidual em modelo experimental submetido a tratamentos com extratos de *Handroanthus impetiginosus* (Mart. ex DC) Mattos (ipê-roxo) e de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (barbatimão).** Tese de Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso de Sul, Campo Grande, 2015.

COSMOSKI, A. C. O. F.; ROEL, A. R.; PORTO, K. R. de A.; MATIAS, COELHO, R. M.; HONER, M. R.; MOTTI, P. R. Phytochemistry and larvicidal activity of *Spermacoce latifolia* Aubl. (Rubiaceae) in the control of *Aedes aegypti* L. (Culicidae). **Bioescience Journal**, v. 31, nº 5, p. 1512-1518, 2015. <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v31n5a2015-26333>

COUTINHO, L. M. **O bioma do Cerrado**. In: KLEIN, A. L. (Org.). Eugen Warming e o Cerrado brasileiro: um século depois. São Paulo: Editora UNESP, 2002.

COUTINHO, W. The first decade of sibutramine and orlistat; a reappraisal of their expanding roles in the treatment of obesity and associated conditions. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, nº 2, p. 262-270, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0004-27302009000200018>

CUNHA, L. C. S.; MORAIS, S. A. L. de; AQUINO, F. J. T. de; CHANG, R.; OLIVEIRA, A. de; MARTINS, M. M.; MARTINS, C. H. G.; SOUSA, L. C. F.; BARROS, T. T.; SILVA, C. V. da, NASCIMENTO, E. A. do. Bioassay-guided fractionation and antimicrobial and cytotoxic activities of *Cassia bakeriana* extracts. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 27, p. 91-98, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.002>

CUPPETT, S. L. Antioxidant activity of Lamiaceae. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 42, p. 245-271, 1998.

DELGADO-MENDEZ, P.; HERRERA, N.; CHAVEZ, H.; ESTEVEZ-BRAUN, A.; RAVELO, A.G.; CORTES, F.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. New terpenoids from *Maytenus apurimacensis* as MDR reversal agents in the parasite Leishmania. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 16, nº 3, p. 1425-1430, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2007.10.071>

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach**, 3º ed. Reino Unido: Wiley, 2009.

DIAS, J. E.; LAUREANO, O. L. (Coord.). **Farmacopeia popular do Cerrado**. Goiás: Articulação Pacari, 2009.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, nº 4, p. 337-353, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0024-3205\(99\)00120-4](https://doi.org/10.1016/S0024-3205(99)00120-4)

DIEGE I.; RAARUP, M. K.; NYENGAARD, J. R.; KILIAN, M.; NYVAD, B. *Actinomyces naeslundii* in initial dental biofilm formation. **Microbiology**, v. 155, p. 2116–2126, 2009. [10.1099/mic.0.027706-0](https://doi.org/10.1099/mic.0.027706-0)

DINDA, B.; CHOWDHURY, D. R.; MOHANTA, B. C. Naturally occurring iridoids, secoiridoids and their bioactivity; an updated review, part 3. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 57, nº 8, p. 765-796, 2009. <https://doi.org/10.1248/cpb.57.765>

DOMINGO, V.; ARTEAGA, J. F.; DEL MORAL, J. F. Q.; BARRERO, A. F. Unusually cyclized triterpenes: occurrence, biosynthesis and chemical synthesis. **Natural Product Report**, v. 26, nº 1, p. 115-134, 2009. <https://doi.org/10.1039/B801470C>

ETO, F. S.; RASLAN, S. A.; CORTELLI, J. R. Características microbianas na saúde e doença periodontal. **Revista de Biociência**, v. 9, nº 2, p.45-51, 2003.

EL BABILI, F.; NABRE, N.; MOULIS, C.; FOURASTE, I. Molluscicidal activity against *Bulinus truncatus* of *Croton campestris*. **Phytotherapy**, v. 77, nº 5, p. 384-387, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2006.03.003>

EL BABILI, F.; FOURASTE, I.; MOULIS, C.; BESSIÈRE, J. M.; ROQUES, C.; HADDIOUI, L. Essential oil of leaves of *Croton campestris* St. Hilare, its secretory elements, and its biological activity. **Journal of Essential Oil Research**, v. 21, nº 3, p. 272-275, 2009. <https://doi.org/10.1080/10412905.2009.9700168>

FARIA, E. M.; MANCINI, M. C.; MELO, M. E. de.; CERCATO, C.; HALPERNA, A. Processos recentes e novas perspectivas em farmacopeia da obesidade. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 54, nº 6, p. 516-529, 2010. <http://producao.usp.br/handle/BDPI/10540>

FERNANDES, V. C.; PEREIRA, S. I. V.; COPPEDÉ, J.; MARTINS, J. S.; RIZO, W. F.; BELEBONI, R. O.; MARINS, M.; PEREIRAM P. S.; PEREIRA, A. M. S.; FACHIN, A. L. The epimer of kaurenoic acid from *Croton antisyphiliticus* is cytotoxic toward B-16, and HeLa tumors alls trough apoptosis induction. **Genetics and Molecular Research**, v. 12, nº 2, p. 1005-1011, 2013. <https://www.researchgate.net/publication/236277194>

FERREIRA, V. F.; PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Química Nova**, v. 33, nº 9, p. 1829, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422010000900001>

FIGUEIREDO-GONZALES, M.; GROSSO, C.; VALENTÃO, P.; ANDRADE, P. B. α -Glucosidase and α -amylase inhibitors from *Myrcia* spp.: a stronger alternative to acarbose? **Journal of Pharmaceutical and Biomedicinal Analysis**, v. 11, p. 322-327, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.jpba.2015.10.042>

FIRMO, W. da C. A.; MENEZES, V. de J. M. de; PASSOS, C. E. de C.; DIAS, C. N.; ALVES, L. P. L.; DIAS, I. C. L.; NETO, M. S.; OLEA, R. S. G. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Cadernos de Pesquisa**, v. 18, nº especial, p. 90-95, 2011.

FIRMO, W. da C. A.; MIRANDA, M. V.; COUTINHO, G. S. L.; SILVEIRA, L. M. da S.; OLEA, R. S. G. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antibacteriana de *Lafoensia pacari* (Lythraceae). **Revista Publicações Biológicas**, v. 20, nº 1, p. 7-12, 2014. <http://dx.doi.org/10.5212/publicatio%20uepg.v20i1.6541>

FRANÇA, F. L. de; REBER, G.; MEIRELES, M. A. M.; MACHADO, N. T.; BRUNNER, G. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from de Amazon region. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 14, nº 3, p. 247-256, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0896-8446\(98\)00122-3](https://doi.org/10.1016/S0896-8446(98)00122-3)

GALDINO, P. M.; NASCIMENTO, M. V. M.; SAMPAIO, B. L.; FERREIRA, R. N.; PAULA, J. R.; COSTA, E. A. Antidepressant-like effect of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil. ethanolic extract and fractions in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 124, nº 3, p. 581-585, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2009.05.001>

GERSHENZON, J.; DUDAREVA, N. The function of terpene natural products in the natural world. **Nature Chemical Biology**, v. 3, nº 7, p. 408-414, 2007. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.2007.5>

GIOIELLI, L. A. Óleos e gorduras vegetais: composição e tecnologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 5, nº 2, p. 211-232, 1996. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X1996000200008>

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, nº 2, p. 374-381, 2007.

GOTLIEB, O. R. **Micromolecular evolution, systematics and ecology, an essay into a novel botanical discipline**. Heidelberg: Springer, 1982.

GOUGHENOUR, K. D.; BALADA-LLASAT, J-M.; RAPPLEYE, C. A. Quantitative microplate-based growth assay for determination of antifungal susceptibility of histoplasma capsulatum yeasts. **Journal Clinical Microbiology**. v. 53, p. 3286–3295, 2015. <http://dx.doi.org/10.1128/JCM.00795-15>.

GOUVEIA, N. M. de; ALVES, F. V.; FURTADO, F. D.; SCHERER, D. L.; MUNDIM, A. V.; ESPINDOLA, F. S. An in vitro and in vivo study of the alpha-amylase activity of phaseolamin. **Journal of Medicinal Food**, v. 17, nº 8, p.915-920, 2014. <https://doi.org/10.1089/jmf.2013.0044>

GUPTA, N.; RATHI, P.; GUPTA, R. Simplified para-nitrophenyl palmitate assay forlipases and esterases. **Analitical Biochemistry**, v. 311, p. 98–99, 2002.

HARAGUCHI, H.; ISHIKAWA, H.; MIZUTANI, K.; TAMURA, Y.; KINOSHITA, T. Antioxidative and superoxide scavenging activities of retrochalcones in *Glycyrrhiza inflata*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 6, p. 339-347, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0968-0896\(97\)10034-7](https://doi.org/10.1016/S0968-0896(97)10034-7)

HEGNAUER, R.; KOOIMAN, P. Die systematische Bedeutung von iridoiden Inhaltsstoffen im Rahmen von Wettstein's Tubiflorae. **Journal of Medicinal Plant Research**, v. 33, nº 1, p. 1-33, 1978.

HELPAND, W. H.; COWEN, D. L. **Pharmacy - an illustrated history**. New York: Harry M. Abrams, 1990.

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G.L.; SANCHES, N.R.; CORTEZ, D.A.; NAKAMURA, C.V. Screening of some plants used in the Brazilian folk medicine for the treayment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.97, p. 1027-1031, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>

HOLT, S.; KESAVALU, L.; WALKER, S.; GENCO, C.A. Virulence of *Porphyromonas gingivalis*. **Periodontology 2000**, v. 20, p. 168-238, 1999. <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1111/j.1600-0757.1999.tb00162.x>

IONKOVA, I. Anticancer lignans: from discovery to biotechnology. **Mini-Reviews in Medicinal Chemistry**, v. 11, nº 10, p. 843-856, 2011. <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.2174/138955711796575425>

ISHIGURO, K.; YAMAKI, M.; TAKAGI, S.; IKEDA, Y.; KAWAKAMI, K.; ITO, K.; NOSE, T. Studies on iridoid-related compounds. V. antitumor activity of iridoid dervs.

Periodate Oxidant Products. **Journal of Pharmacobia - Dynamics**, v. 11, nº 2, p. 131-136, 1988. <https://doi.org/10.1248/bpb1978.11.131>

JAISWAL, R.; KUHNERT, N. How to identify and discriminate between the methyl quinates of chlorogenic acids by liquid chromatography - tandem mass spectrometry. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 46, p. 269-281, 2011. <https://doi.org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1002/jms.1889>

JUNIOR, F. E. B.; OLIVEIRA, D. R. de; BENTO, E. B.; LEITE, L. H. I.; SOUZA, D. O.; SIEBRA, A. L. A.; SAMPAIO, R. R.; MARTINS, A. O. P. B.; RAMOS, A. G. B.; TINTINO, S. R.; LACERDA-NETO, L. J.; FIGUEIREDO, P. L. L.; OLIVEIRA, L. R.; RODRIGUES, C. K. S.; SALES, V. S.; FIGUEIREDO, F. R. S. D. N.; NASCIMENTO, E. P.; MONTEIRO, A. B.; AMARO, E. N.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M.; MENEZES, I. R. A. de; KERNTOPF, M. R. Antiulcerogenic activity of the hydroalcoholic extract of leaves of *Croton campestris* A. St.-Hill in rodents. **Hindawi Publishing Corporation**, v. 2013, p. 1-10, 2013. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/579346>

KANJILAL, S.; KAKI, S. S.; RAO, B. V. S. K.; SUGASINI, D.; RAO, Y. P.; PRASAD, R. B. N.; LOKESH, B. R. Hypocholesterolic effects of low calorie structured lipids on rats and rabbits fed on normal and atherogenic diet. **Food Chemistry**, v. 136, nº 1, p. 259-265, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.07.116>

KOOLEN, H. H. F.; SILVA, F. M. A. da; GOZZO, F. C.; SOUZA, A. O. L. de; SOUZA, A. D. L. de. Antioxidant, antimicrobial activities and characterization of phenolic compounds from buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.) by HPLC-ESI-MS/MS. **Food Research International**, v. 51, nº 2, p. 467-473, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.039>

KOJIMA, M.; ARISHIMA, T.; SHIMIZU, R.; KOHNO, M.; KIDA, H.; HIROTSUKA, M.; IKEDA, I. The consumption of a structured triacylglycerol containing behenic and oleic acids increases faecal fat excretion in humans. **Journal of Oleo Science**, v. 62, nº 12, p. 997-1001, 2013. <https://doi.org/10.5650/jos.62.997>

KREUTZMANN, S.; CHRISTENSEN, L. P.; EDELENBOS, M. Investigation of bitterness in carrots (*Daucus carota* L.) based on quantitative chemical and sensory analyses. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, nº 2, p. 193-205, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2007.02.024>

KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and biological activities of flavonoids: an overview. **The Scientific World Journal**, v. 2013, ID 162750, 16 páginas. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/162750>

LIÃO, M. L.; VIEIRA, P. C.; RODRIGUES FILHO, E.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. da. Sesquiterpene pyridine alkaloids from *Peritassa campestris*. **Phytochemistry**, v. 58, nº 8, p. 1205-1207, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(01\)00315-6](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(01)00315-6)

LIÃO, M. L.; VIEIRA, P. C.; RODRIGUES FILHO, E.; FERNANDES, J. B.; SILVA, M. F. G. F. da. Isomeric triterpenoids from *Peritassa campestris*. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 57, nº 3, p. 403-406, 2014. <https://doi.org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1515/znc-2002-3-433>

LIMA, A. de. **Caracterização química, avaliação a atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo* e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.).** Tese (Doutorado em Alimentos) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008a. <https://doi:10.11606/T.9.2008.tde-30042008-090010>

LIMA, G. S. de. **Estudo químico biomonitorado de extratos das folhas e do caule de *Guettarda grazielae* M.R.V. Barbosa (Rubiaceae).** Dissertação (Mestrado em Química e Biotecnologia) - Instituto de Química e Biotecnologia, Universidade Federal de Alagoas, Maceió, 2008b. <http://www.repositorio.ufal.br/handle/riufal/1072>

LIMA, S. **Constituintes químicos isolados de *Salvinia auriculata* Aubl. e atividade antibacteriana de extratos butos sobre estirpes de *Staphylococcus aureus* causadoras de mastite bovina.** Tese (Doutorado em Bioquímica) - Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2016. <http://www.locus.ufv.br/handle/123456789/9380>

MACEDO, F. M. de; MARTINS, G. T.; RODRIGUES, C. G.; OLIVEIRA, D. A. de. Triagem fitoquímica do Barbatimão [*Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville]. **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 1166-1168, 2007.

MACIEL, M. A. M; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVERRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, nº 3, p. 429-438, 2002.

MATIAS, E. F.; SANTOS, K. K.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. C.; COUTINHO, H. D. Atividade antibacteriana *in vitro* de *Croton campestris* A., *Ocimum gratissimum* L. e *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 8, nº 3, p. 294-298, 2010. <http://www.ufrgs.br/seerbio/ojs/index.php/rbb/article/view/1428>

MATIAS, E. H. F.; SANTOS, K. K. A.; ALMEIDA, T. S.; COSTA, J. G. M.; COUTINHO, H. D. M. Phytochemical prospection and modulation of aminoglycoside antibiotic activity by *Croton campestris* A. **Chemotherapy**, v. 57, nº 4, p. 305-309, 2011. <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1159/000328975>

MATSUOKA, L. G. **Morfo-anatomia dos ovários e dos frutos e sistemática de *Alibertia* e *Cordiera* (Rubiaceae, Gardenieae).** Dissertação (Mestrado em Biologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2008.

MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Avaliação da atividade laxante de *Operculina macrocarpa* L. Urban (Convolvulaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 14, nº 2, p. 105-109, 2004. <https://www.researchgate.net/publication/262589621>

MICHELIN, D. C. **Estudo químico-farmacológico de *Operculina macrocarpa* L. Urb. (Convolvulaceae).** Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2008. <https://orcid.org/0000-0003-3032-2556>

MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Secretaria de Atenção Básica à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Diabetes Mellitus**. Cadernos de Atenção Básica, nº 16, 2006.

MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; NASCIMENTO, E. A.; OLIVEIRA, G. S.; CHANG, R.; SANTOS, N. C.; ROSA, G. M. Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e da atividade antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de seus grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, p. 198-207, 2008.
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=395940090031>

NASCIMENTO, M. N. G. do. **Estudo químico de *Erythroxylum suberosum* (Erythroxylaceae) frente às catepsinas K, L e V.** Dissertação (Mestrado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Goiás, Catalão, 2014.
<http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tede/3970>

OLIVEIRA, A. L. S.; FIGUEIREDO, A. D. L. Prospecção fitoquímica das folhas de *Stryphnodendron adstringens* (Mart.) Coville (Leguminosae-Mimosoidae). **Revista Brasileira de Biociências**, v. 5, supl. 2, p. 384-386, 2007.

OLIVEIRA, D. M. de; SIQUEIRA, E. P.; NUNES, Y. R. F.; COTA, B. B. Flavonoids from leaves of *Mauritia flexuosa*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 23, nº 4, p. 614, 620, 2003. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2013005000061>

OLIVEIRA, F. C. de; ALBUQUERQUE, U. P. de; FONSECA-KRUEL, V. S. da; HANAZAKI, N. Avanços nas pesquisas etnobotânicas no Brasil. **Acta Botanica Brasilica**, v. 23, p. 590-605, 2009a.

OLIVEIRA, A. C. D.; 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**, v. 32, nº 3, p. 689-702, 2009b.

OLIVEIRA, P. L. de. **Contribuição ao estudo de espécies da família Rubiaceae: fitoquímica da espécie *Amaioua guianensis* Aulb.** Dissertação (Mestrado em Química) - Instituto de Química, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2009.
<http://repositorio.bc.ufg.br/tede/handle/tde/1062>

OLIVEIRA, O. F. de. **Morfoanatomia, caracterização fitoquímica e avaliação das atividades biológicas de *Psychotria fractistipula* L. B. Sm., Klein e Delprete (Rubiaceae).** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2015. <http://hdl.handle.net/1884/37389>

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. das G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, nº 4, p. 146-152, 2012.

PEREIRA, S.; TALEB-CONTINI, S.; COPPEDÉ, J.; PEREIRA, P.; BERTONI, B.; FRANÇA, A.; PEREIRA, A. M. An ent-kaurane-type diterpene in *Croton antisiphiliticus* Mart. **Molecules**, v. 17, nº 8, p. 8851-8858, 2012.
<https://doi.org/10.3390/molecules17088851>

PERSSON, C. Phylogeny of the neotropical Alibertia group (Rubiaceae), with emphasis on the genus Alibertia, inferred from its and 5s Ribosomal DNA sequences1. **American Journal of Botany**. v. 87, nº 7, p. 1018-1028, 2000. <https://doi.org/ez34.periodicos.capes.gov.br/10.2307/2657002>

PETROLINI, F. V. B.; LUCARINI, R.; SOUZA, M. G. M.; PIRES, R. H.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Evaluation of the antibacterial potential of *Petroselinum crispum* and *Rosmarinus officinalis* against bacteria that cause urinary tract infections. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, nº 3, p. 829-834, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S1517-83822013005000061>

PIERDONÁ, T.M.; LIMA, N.R.; RODRIGUES, R. C. M.; TEIXEIRA, J. P.; GONÇALVES, R. P.; FONTENELE, J. B. The *Operculina macrocarpa* (L.) Urb. (Jalapa) tincture modulates human blood platelet aggregation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 151, nº 1, p. 151-157, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.10.008>

PORFÍRIO, Z.; MELO-FILHO, G. C.; ALVINO, V.; LIMA, M. R. F.; SANT'ANA, A. E. G. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoólicos de *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, frente a bactérias multirresistentes de origem hospitalar. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, nº 3, p. 785-788, 2009. <https://www.researchgate.net/publication/262593081>

PRIOR, R. L.; HOANG, H.; WU, X.; BACCHIOCA, M.; HOWARD, L.; HAMPSCH-WOODILL, M.; HUANG, D.; OU, B.; JABOB, R. Assays for hydrophilic andlipophilic antioxidant capacity (oxygenradical absorbancecapacity (ORAC(FL)) of plasma and other biological and food samples. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, nº 11, p. 3273-3279, 2003. DOI: 10.1021/jf0262256

RÉCIO, M. del C.; GINER, R. M.; MÁÑEZ, S.; RÍOS, J. L. Structural considerations on the iridoids as anti-inflammatory agents. **Planta Medica**, v. 60, nº 3, p. 232-234, 1994. DOI: 10.1055/s-2006-959465

REGINATTO, F. H. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. O.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

REIS, G. O. dos; VICENTE, G.; CARVALHO, F. K. de; HELLER, M.; MICKE, G. A.; PIZZOLATTI, M. G.; FRÖDE, S. T. *Croton antisypiliticus* Mart. attenuates the inflammatory response to carrageenan-induced pleurisy in mice. **Inflammopharmacology**, v. 22, nº 2, p. 115-126, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10787-013-0184-6>

RIBEIRO, R. F. **Cerrado, o coração do Brasil**. In: DIAS, J. E.; LAUREANO, O. L. (Coord.). Farmacopeia popular do Cerrado. Goiás: Articulação Pacari, 2009.

RIOS, J. L.; RECIO, M. Medicinal plants and antimicrobial plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80-84, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>

ROBERTS, S. C. Production and engineering of terpenoids in plant cell culture. **Nature Chemical Biology**, v. 3, nº 7, p. 387-395, 2007. <http://dx.doi.org/10.1038/nchembio.2007.8>

RODRIGUES, W.; BARBOSA, G. F. Plantas medicinais: uma alternativa econômica para conservação do Cerrado brasileiro? **Informe Gepec**, v. 16, nº 1, p. 160-175, 2012.

ROGÉRIO, A. P.; FONTANARI, C.; MELO, M. C. C.; AMBROSIO, S. R.; SOUZA, G. E. P. de; PEREIRA, P. S. FRANÇA. S. C.; COSTA, F. B. da; ALBUQUERQUE, D. A.; FACCIOLEI, L. H. Anti-inflammatory, analgesic and anti-oedematous effects of *Lafoensia pacari* extract na ellagic acid. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 58, nº 9, p. 1265-1273, 2006. <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1211/jpp.58.9.0014>

SALEEM, M.; KIM, H. J.; ALI, M.S.; LEE, Y. S. An update on bioactive plant lignans. **Natural Product Report**, v. 22, nº 6, p. 696-716, 2005. <http://dx.doi.org/10.1039/B514045P>

SANTOS, L. M. P. Nutritional and ecological aspects of buriti or aguaje (*Mauritia flexuosa* Linnaeus filius): a carotene-rich palm fruit from Latin America. **Ecology of Food and Nutrition**, v. 14, nº 5, p. 345-358, 2005. <https://doi.org/10.1080/03670240500253369>

SANTOS, S. C.; COSTA, W. F.; RIBEIRO, J. P.; GUIMARÃES, D. O.; FERRI, P. O.; FERREIRA, H. D.; SERAPHIN, J. C. Tanin composition of barbatimão species. **Fitoterapia**, v. 73, p. 292-299, 2002. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00081-3](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00081-3)

SANTOS, T. V. S.; TEIXEIRA, R. R.; FRANCO, D. L.; MADURRO, J. M.; BRITO-MADURRO, A. G.; ESPINDOLA, F. S. Bioelectrode for detection of human salivar amylase. **Material Science and Engneering C**, v. 32, p. 530-535, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2011.12.005>

SERAFINI, M.; PELUZO, I.; RAGUZZINI, A. Flavonoids as anti-inflammatory agents. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 69, nº 3, p. 273-278, 2010. <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1017/S002966511000162X>

SHAN, X.; LIU, X.; HAO, J.; CHAO, C.; FAN, F.; DUN, Y.; ZHAO, X.; LIU, X.; LI, C.; YU, G. In vitro and in vivo hypoglycemic effects of brown algal fucoidans. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 249-255, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.11.036>

SHARMA, N.; SHARMA, V. K.; SEO, S. V. Screening off some medicinal plants for anti-lipase activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 97, nº 3, p. 453-456, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.11.009>

SILVA, A. N.; CARDOSO, R.; CERESER, K. M. M.; MASCARENHAS, M. A. Estudo químico-farmacêutico e aspectos bioquímicos do orlistat no controle da obesidade. **Revista Brasileira de Medicina**, v. 58, p. 26-38, 2002. Disponível em: <http://www.moreirajr.com.br/revistas.asp?fase=r003&id_materia=1796> Acesso em: 15 de junho de 2017.

SILVA, T. L. L.; BECKER, F. S.; TOGUCHI, M. Y.; VILAS BOAS, E. V. de B.; DAMIANI, C. Aplicabilidade tecnológica da marmelada-de-cachorro (*Alibertia sessilis* Schum.). **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, nº 3, p. 263-271, 2013. DOI: 10.15871/1517-8595/rbpa.v15n3p263-271

SILVA JUNIOR, I. F.; RAIMONDI, M.; ZACCHINO, S.; FILHO, V. C.; NOLDIN, V. F.; RAO, V. S.; LIMA, J. C. S.; MARTINS, D. T. O. Evaluation of the antifungal activity and mode of action of *Lafoensia pacari* A. St.-Hil., Lythraceae, stem-bark

extracts, fractions and ellagic acid. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 20, nº 3, p. 422-428, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010000300021>

SILVA, S. M.; SAMPAIO, K. A.; TAHAM, T.; ROCCO, S. A.; CERIANI, R.; MEIRELES, A. J. A. Characterization of oil extracted from Buriti fruit (*Mauritia flexuosa*) grown in the Brazilian Amazon Region. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 86, nº 7, p. 611-616, 2009. <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1007/s11746-009-1400-9>

SILVA, V. da; BOLZANI, V. da S.; YOUNG, M. C. M.; LOPES, M. N. A new antifungal phenolic glycoside derivative, iridoids and lignans from *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. (Rubiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 18, nº 7, p. 1405-1409, 2007a. <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-50532007000700017>

SILVA, V. da; SILVA, G. H.; BOLZANI, V. da S.; LOPES, M. N. Isolation of lignans glycosides from *Alibertia sessilis* (Vell.) K. Schum. (Rubiaceae) by preparative high-performance liquid Chromatography. **Eclética Química**, São Paulo, v. 31. Nº 4, p. 55-58, 2006. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-46702006000400008>

SILVA, V. C. da; GIANNINI, M.J.S.M.; CARBONE, V.; PIAGENTE, S.; PIZZA, C.; BOLZANI, V. da S.; LOPES, M. N. New antifungal terpenoid glycosides from *Alibertia edulis* (Rubiaceae). **Helvetica Chimica Acta**, v.91, p.1355-1362, 2008. <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1002/hlca.200890147>

SILVA, E. M.; SOUSA, J. N. S.; ROGEZ, H.; REES, J. F.; LARONDELLE, V. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, v. 101, nº 3, p. 1012-1018, 2007b. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.055>

SILVERSTEIN, R. M.; WEBSTER, F. X.; KIEMLE, D. J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos**. 7. ed. Rio de Janeiro: LTC, 2007.

SIMOTE, S. V. **Estudo fitoquímico de *Helietta puberula* (Rutaceae), *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) e busca de um processo de microencapsulação de compostos ativos, visando o controle de formigas cortadeiras**. Tese (Doutorado em Química) – Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia, Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006. <https://repositorio.ufscar.br/handle/ufscar/6074>

SOKMEN, M.; ANGELOVAB, N.; KRUMOVA, E.; PASHOVA, S.; IVANCHEVA, S.; SOKMEN, A.; SEKEDJEVA, J. In vitro antioxidant activity of polyphenol extracts with antiviral properties from *Geranium sanguinum* L. **Life Sciences**, v. 76, p. 2981-2993, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2004.11.020>

SOLON, S. **Análise fitoquímica e farmacognóstica da raiz de *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilge, Cochlospermaceae**. Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) – Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Campo Grande, 2009. <http://repositorio.unb.br/handle/10482/4856>

SOUZA, P. M. **Atividade de inibição enzimática por espécies vegetais do bioma Cerrado**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Programa de Pós Graduação

em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, Brasília, 2011.
<http://repositorio.unb.br/handle/10482/935>

SOUZA, S. P. de. **Ação inibitória de extratos de plantas sobre lipase pancreática com ênfase em *Baccharis trimera* (Less.) DC.** Dissertação (Mestrado em Agroquímica) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009. <http://repositorio.ufla.br/jspui/handle/1/2531>

SOUZA, R. K. D.; MENDONÇA, A. C. A. M.; SILVA, M. A. P. da. Aspectos etnobotânicos, fitoquímicos e farmacológicos de espécies de Rubiaceae no Brasil. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 8, nº 1, p. 140-156, 2013. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1028-47962013000100016&lng=es&nrm=iso

SOUZA, J. N. de P.; CANDOTTI, J. G.; AMPARO, T. R.; COELHO, F. F.; RODRIGUES, I. V.; SANTOS, O. D. H. dos; MEDEIROS, L. F. T. de; FURTADO, N. A. J. C.; SOUSA, H. C. de; SOUZA, G. H. B. de. Bioprospecção das atividades antioxidante e antimicrobiana de espécies vegetais coletadas em Ouro Preto - MG. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. X, nº 1, p. 1-15, 2013. <http://www.repositorio.ufop.br/handle/123456789/7368>

SRINIVAS, N. R. Recent trends in preclinical drug-drug interaction studies of flavonoids. Review of case studies, issues and perspectives. **Phytotherapy Research**, v. 29, nº 11, p. 1679-1991, 2015. <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1002/ptr.5447>

STEINERT, J.; KHALAF, H.; RIMPLER, M. High-performance liquid chromatography separation of some natural occurring naphtoquinones and antraquinones. **Journal of Chromatography A**, v. 723, nº 2, p. 2016-209, 1996. [https://doi.org/10.1016/0021-9673\(95\)00841-1](https://doi.org/10.1016/0021-9673(95)00841-1)

SU, C. H.; LAI, M. N.; NG, L. T.; Inhibitory of medicinal mush-rooms on α -amylase and α -glucosidase - enzymes related to hyperglycemia. **Food Function**, v. 4, p. 644-649, 2013. <http://dx.doi.org/10.1039/C3FO30376D>

SUDHALAR, V.; KUMAR, S. A.; SUDHARSAN, P. T.; VARALAKSHMI, P. Protective effect of lupeol and its eter on cardiac abnormalities in experimental hypercholesterolemia. **Vascular Phytochemistry**, v. 46, nº 6, p. 412-418, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.vph.2006.12.005>

TOLEDO, M. I.; SIQUEIRA, J. M.; ARAÚJO, L. C. L.; OGA, S. Acute and subacute toxicity of *Cochlospermum regium* (Mart. & Schr.) Pilger. **Phytotherapy Research**, v. 14, nº 5, p. 359-361, 2000. [https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1002/1099-1573\(200008\)14:5<359::AID-PTR642>3.0.CO;2-0](https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1002/1099-1573(200008)14:5<359::AID-PTR642>3.0.CO;2-0)

TOMA, A.; MAKONNEN, E.; MEKONNEN, Y.; DEBELLA, A.; ADDISAKWATTANA, S. Intestinal α -glucosidase and some pancreatic enzymes inhibitory effect of hydroalcholic extract of *Moringa stenopetala* leaves. **BMC Complementary and Alternative Medicine**, London, v. 14, nº 180, p. 2-5, 2014. <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1186/1472-6882-14-180>

VECHIA, L. D.; GNOATTO, S. C. B.; GOSMANN, G. Derivados olejanos e ursanos e a sua importância na descoberta de novos fármacos com atividade antitumoral, anti-inflamatória e antioxidante. **Química Nova**, v. 32, nº 5, p. 1245-1252, 2009. <http://hdl.handle.net/10183/72877>

VIANNI, R.; BRAZ FILHO, R. Ácidos graxos naturais: importância e ocorrência em alimentos. **Química Nova**, v. 19, nº 4, p. 400-407, 1996.

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, nº 1, p. 13-36, 2000.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlin: Springer, 384 p. 2001.

WAGNER, H.; KREHER, H.; LOTTER, H.; HAMBURGER, M. O.; CORDELL, G. A. Structure determination of new isomeric naphto[2,3-b]furan-4,9-diones from *Tabelia avellaneda* by the selective - INEPT technique. **Helvetica Chimica Acta**, v. 72, nº 4, p. 659-667, 1989. <https://doi-org.ez34.periodicos.capes.gov.br/10.1002/hlca.19890720406>

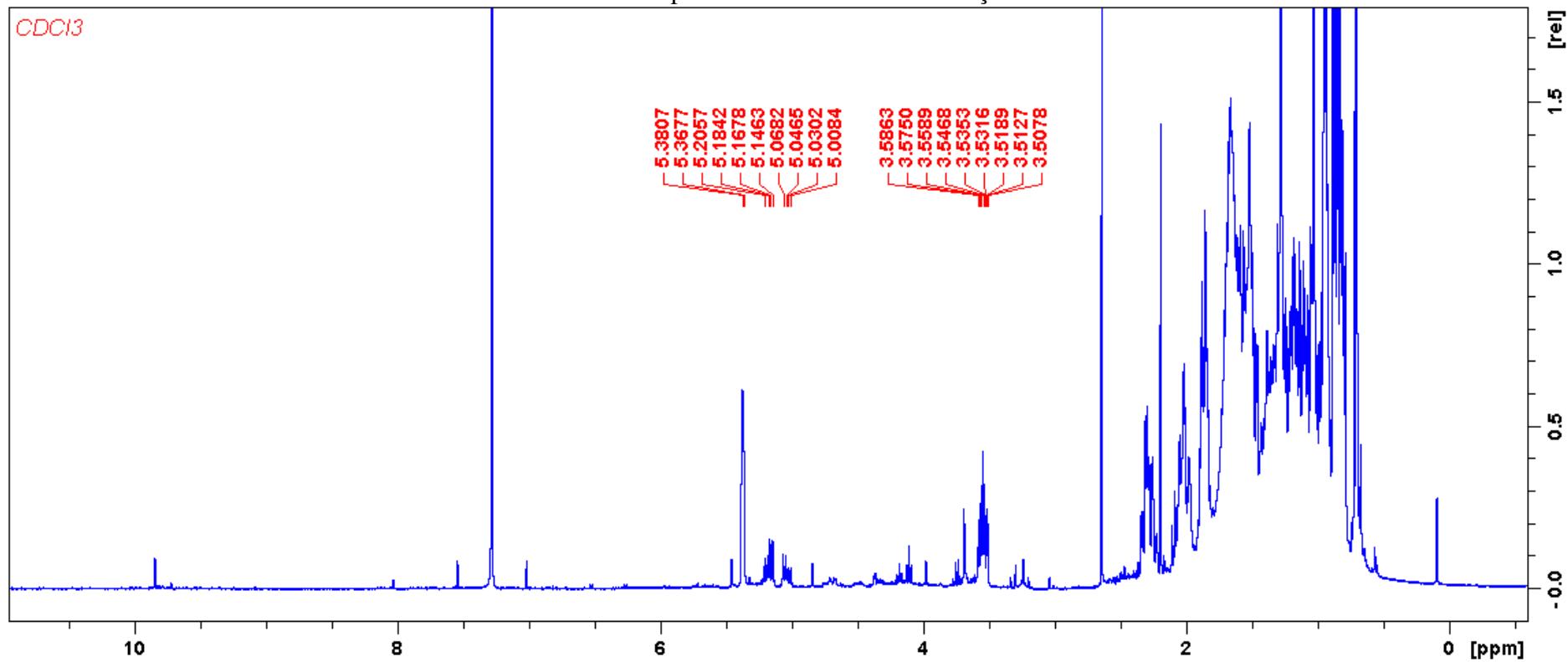
WRIGHT, J. L. C.; NICNESS, A. G.; SHIMIZUD, S.; SMITH, G.; WALTER, J. A. KHALIL, W. Identification of C-24 alkyl epimers of marine sterols by ¹³C nuclear magnetic resonance spectroscopy. **Canadian Journal of Chemistry**, v.56, nº 14, p. 954-959, 2007. <https://doi.org/10.1139/v78-308>

YAMAGUCHI, M.; TERAO, Y.; OGAWA, T.; TAKAWASHI, T.; HAMADA, S.; KAWABATA, S. Role of *Streptococcus sanguinis* sortase A in bacterial colonization. **Microbes and Infection**. v. 8, nº 12-13, p. 2791-2796, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2006.08.010>

ZUANAZZI, J. A. S.; MONTANHA, J. A.; ZUCOLOTTO, A. M. Flavonoides. In: SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. O.; MELLO, J. C. P. de; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. Porto Alegre: Artmed, 2017.

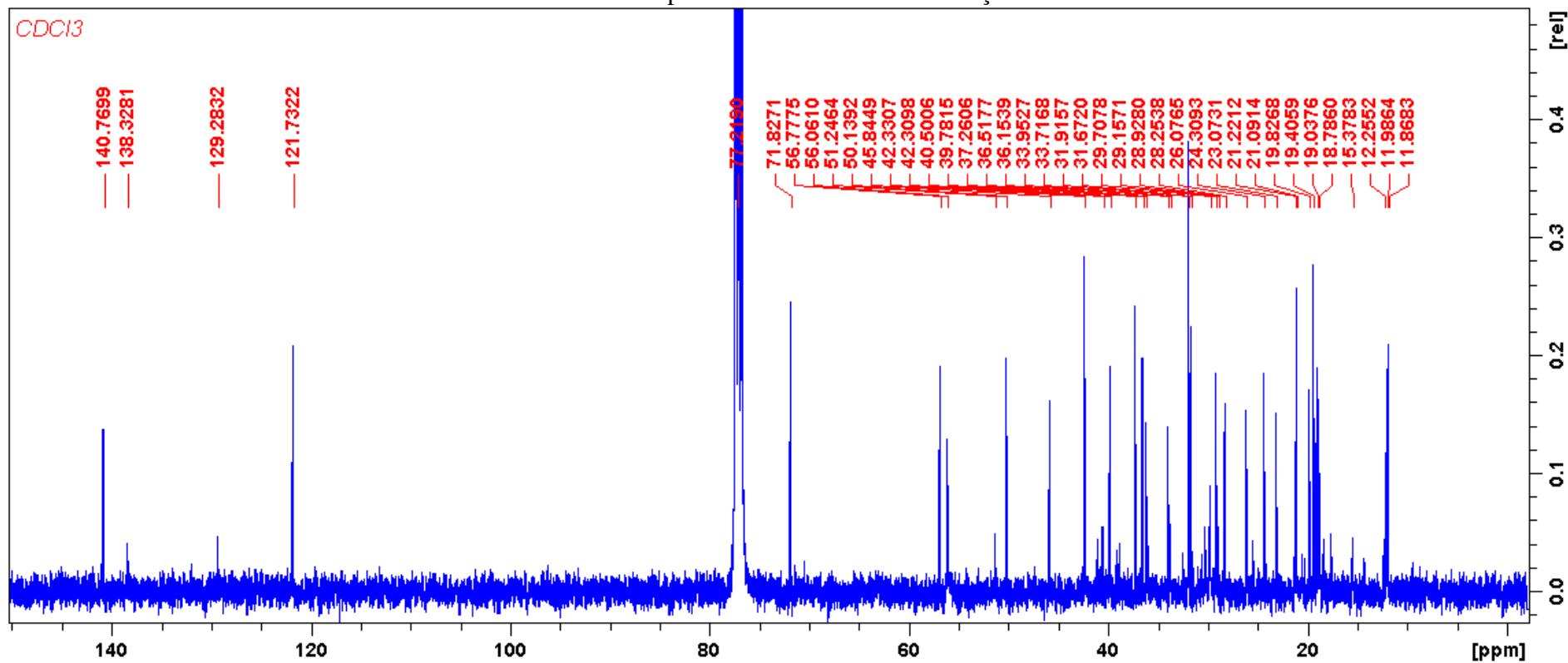
APÊNDICE

FIGURA I – Espectro de RMN H¹ da subfração 14H1.



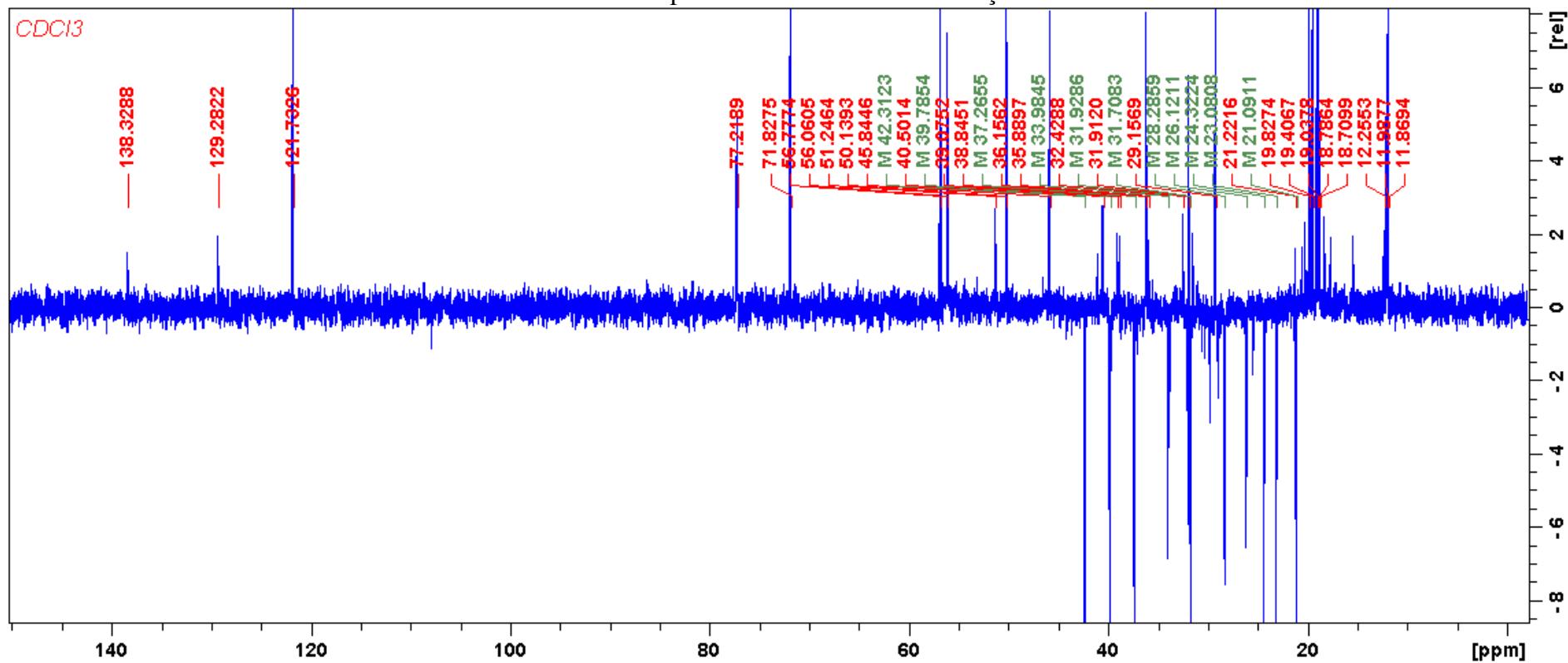
Fonte: A autora.

FIGURA II – Espectro de RMN C¹³ da subfração 14H1.



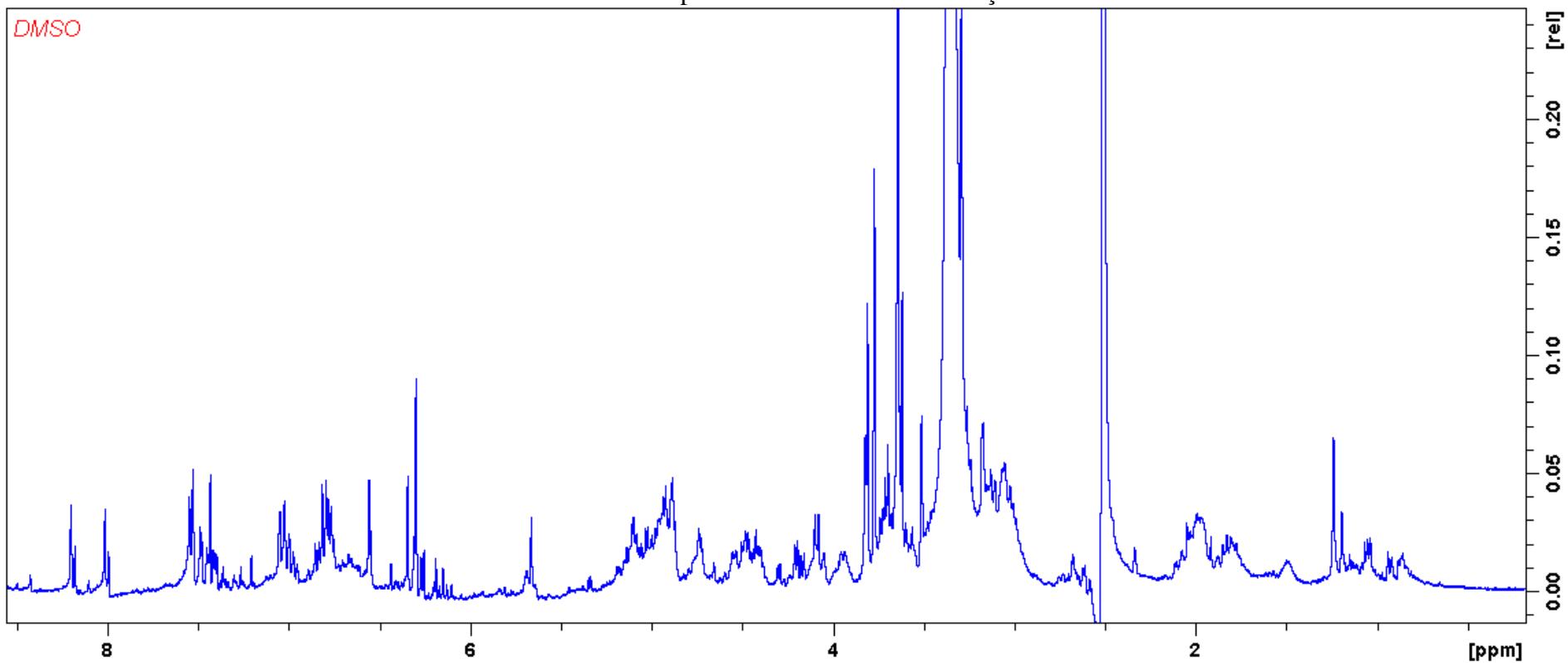
Fonte: A autora.

FIGURA III – Espectro de DEPT135 da subfração 14H1.



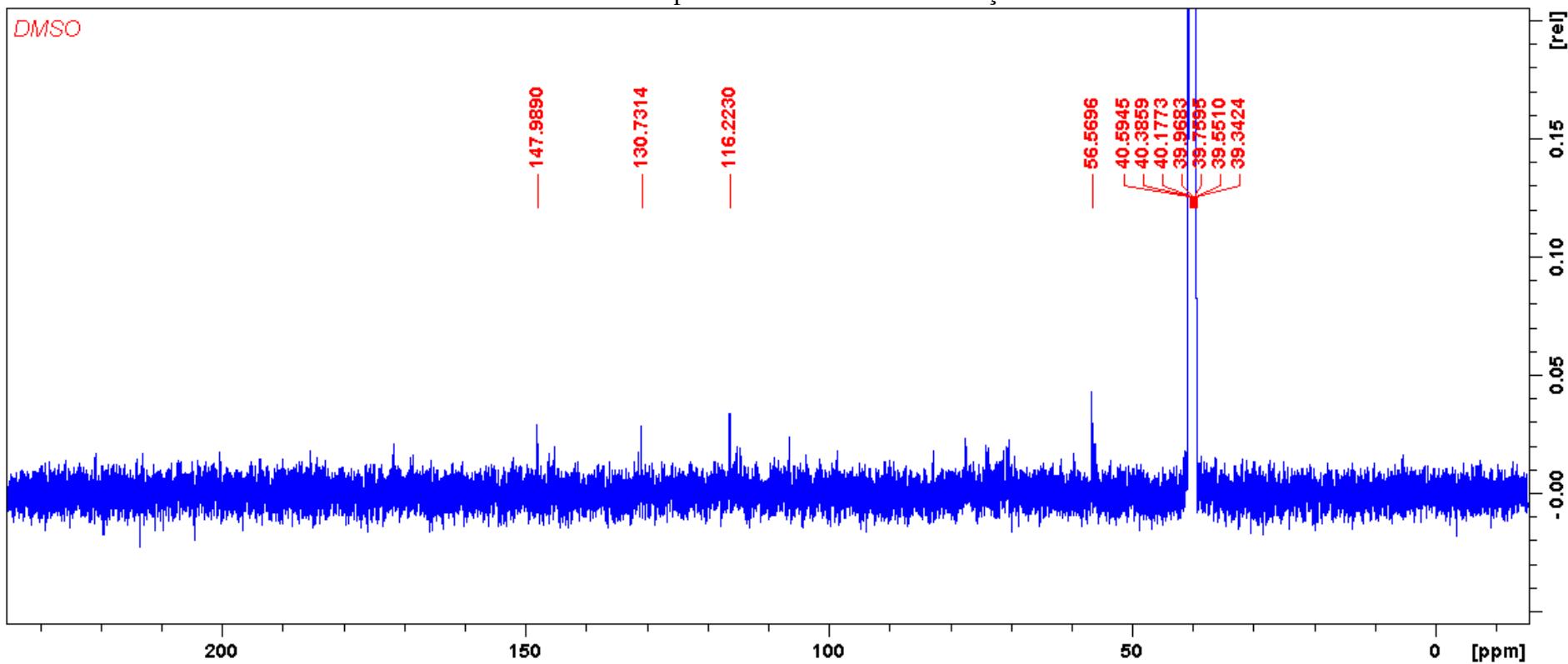
Fonte: A autora.

FIGURA IV – Espectro de RMN H¹ da subfração 6A1.



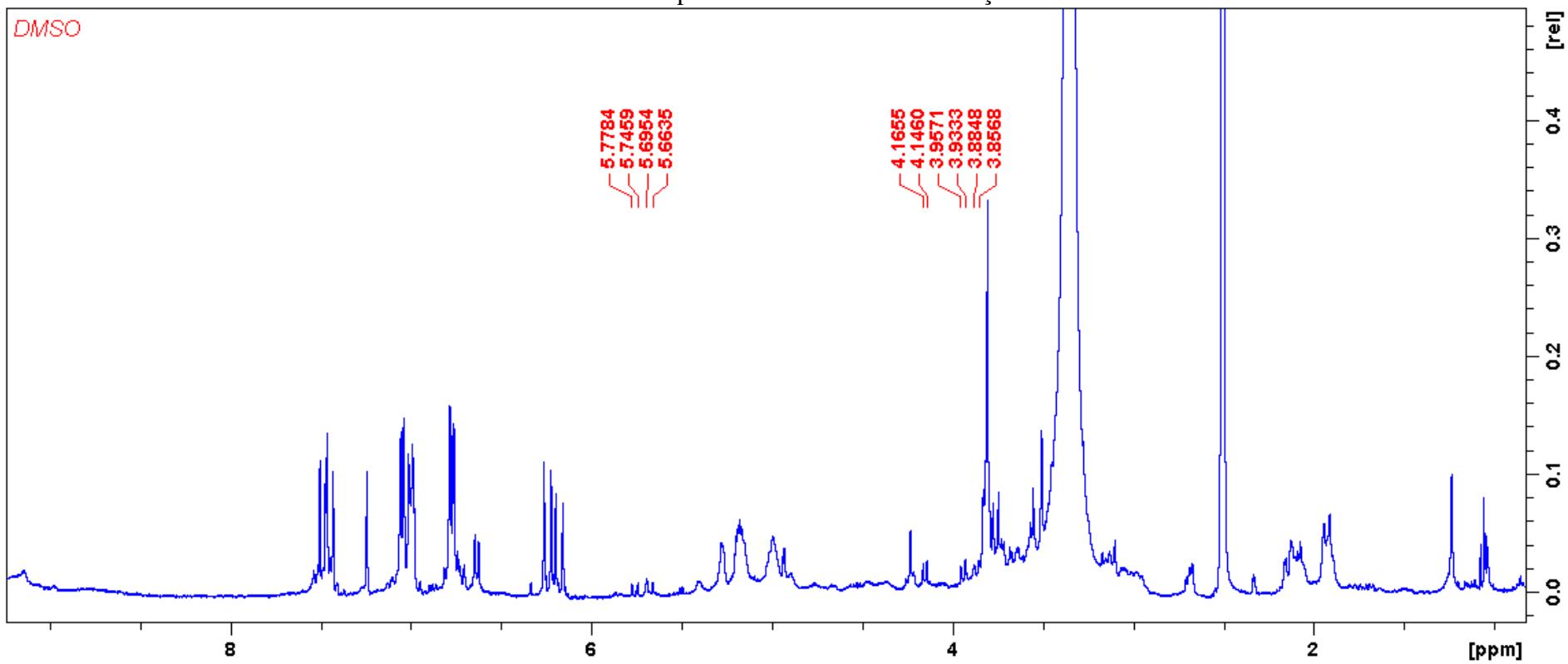
Fonte: A autora.

FIGURA V – Espectro de RMN C¹³ da subfração 6A1.



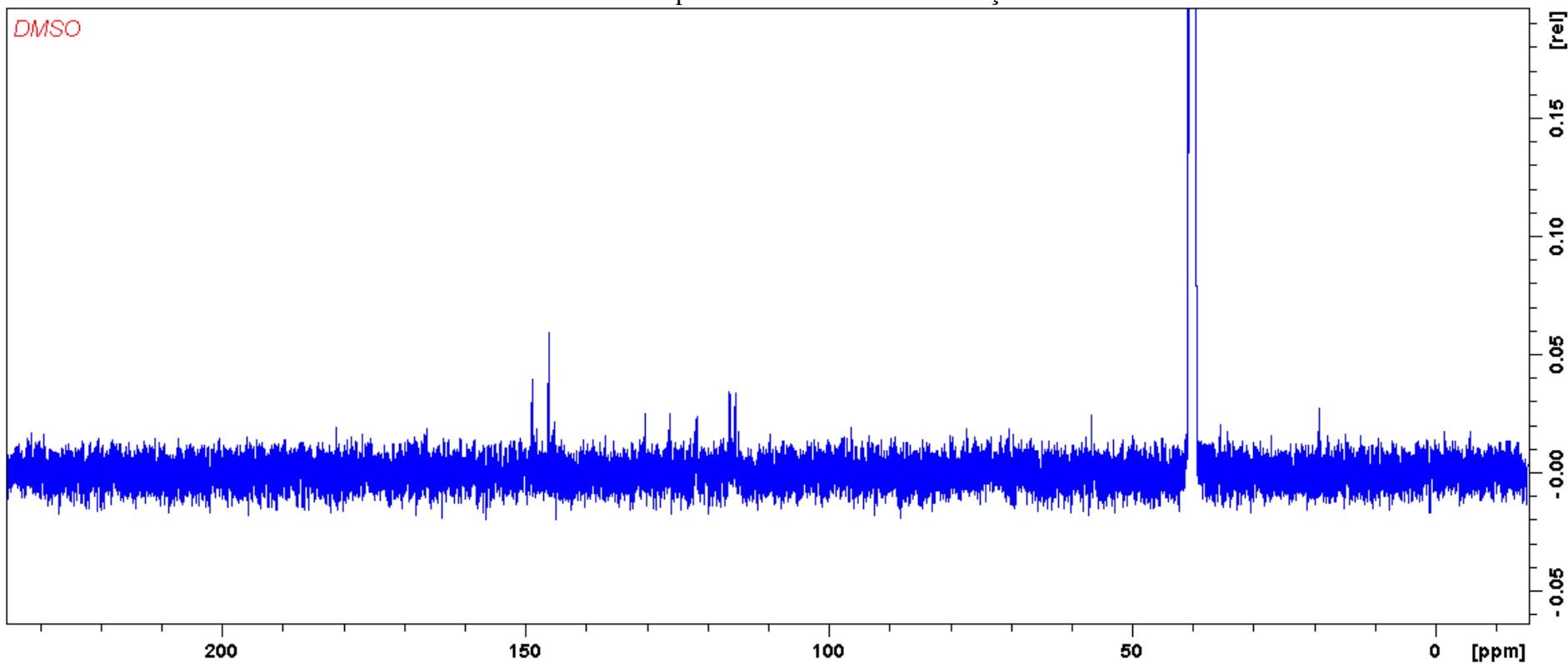
Fonte: A autora.

FIGURA VI – Espectro de RMN H¹ da subfração 12A1



Fonte: A autora.

FIGURA VII – Espectro de RMN C¹³ da subfração 12A1.



Fonte: A autora.

FIGURA VIII – Curva de calibração do ácido gálico.

Curva de calibração ácido gálico

