



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



**ESTUDO DOS POLIFENÓIS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA
DA MADEIRA E CASCA DE *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud.**

KELI CRISTINA LAMOUNIER

UBERLÂNDIA

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

**ESTUDO DOS POLIFENÓIS, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DA MADEIRA E
CASCA DE *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud.**

Keli Cristina Lamounier

Prof. Orientador: Dr Sérgio Antônio Lemos de Moraes

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos necessários à obtenção do Título de Mestre em Química.

UBERLÂNDIA

2010

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

L236e Lamounier, Keli Cristina, 1982-
Estudo dos polifenóis, atividade antioxidante e antimicrobiana da
madeira e casca de *Maclura tinctoria* (L) D. Don ex Steud [manuscrito] /
Keli Cristina Lamounier. - 2010.
113 f.

Orientador: Sérgio Antônio Lemos de Moraes.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Uberlândia, Progra-
ma de Pós-Graduação em Química.
Inclui bibliografia.

1. Amoreira - Composição - Teses. I. Moraes, Sérgio Antônio Lemos
de. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação
em Química. III. Título.

CDU: 543:582.711.712



ALUNO(A): KELI CRISTINA LAMOUNIER

NÚMERO DE MATRÍCULA: 93827

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: QUÍMICA

PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA: NÍVEL MESTRADO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO:

“Estudo dos polifenóis, atividade antioxidante e antimicrobiana da madeira e casca da Amoreira – Maclura tinctoria (L) D. Don ex Steud”

ORIENTADOR(A):

PROF. DR. SÉRGIO ANTÔNIO LEMOS DE MORAIS

A Dissertação foi **APROVADA** em apresentação pública realizada no Anfiteatro 50-A do Bloco 50, no Campus Santa Mônica, no dia 29 de julho de 2010, às 9:00 horas, tendo como Banca Examinadora:

NOME:

ASSINATURA:

Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes
(IQUFU)

Prof. Dr. Fernando Petacci
(UFG)

Prof. Dr. Alberto de Oliveira
(IQUFU)

Uberlândia, 29 de julho de 2010.

"Se eu pudesse deixar algum presente a você, deixaria aceso o sentimento de amar a vida dos seres humanos. A consciência de aprender tudo o que foi ensinado pelo tempo a fora. Lembraria os erros que foram cometidos para que não mais se repetissem. A capacidade de escolher novos rumos. Deixaria para você, se pudesse o respeito àquilo que é indispensável. Além do pão, o trabalho. Além do trabalho, a ação. E, quando tudo mais faltasse, um segredo: o de buscar no interior de si mesmo a resposta e a força para encontrar a saída."

Mahatma Gandhi

AGRADECIMENTOS

Inicialmente a Deus, por me dar saúde e forças para superar todos os obstáculos, que não foram poucos, deste trabalho.

E que, após longos momentos de obstáculos, desafios e provações, superados com o apoio de pessoas, pelas quais demonstro aqui o meu sincero agradecimento e carinho:

- ✓ Ao Professor Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes, pela orientação e apoio durante o desenvolvimento do presente trabalho.
- ✓ Ao Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca – LaPeMa, pelas análises de atividade antimicrobiana que foram realizadas com a autorização e supervisão do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.
- ✓ Aos Professores Dr. Evandro Afonso do Nascimento e Dr. Francisco José Tôrres de Aquino, por suas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.
- ✓ Ao Professor Dr. Roberto Chang, pela amizade, apoio, conselhos, paciência, orientações, além de ter contribuído à elaboração e correção do texto final.
- ✓ A Professora Msc. Blyeny Hatalita Pereira Alves, pela amizade, orientações e por todos os momentos que incansavelmente passamos (você, minha irmã e eu) trabalhando no laboratório em quanto o mundo inteiro descansava. E o último carnaval, se lembra? É, Atividade Antioxidante dá trabalho...
- ✓ Ao Professor Ms. Luis Carlos Scalon Cunha, pela amizade, orientações e por ter contribuído na realização de algumas análises e texto final.

- ✓ Aos meus amigos de laboratório, amigos que conquistei nesta caminhada: Aretha, Brunno, Carla, Cassiana, Edmilson, Franciyara, Kenia, Mario, Nayana, Thiago, Túlio e todos aqueles que o nome não tenha sido mencionado, pela amizade e apoio em tantos momentos.
- ✓ Aos meus familiares, aos meus amigos, aos meus colegas de trabalho e meus alunos, que me incentivaram e apoiaram, dando força nos momentos mais difíceis.
- ✓ Aos meus pais, Dalva e Adi, por todos estes anos de dedicação, amor e educação, que contribuíram para a formação de meu caráter. E por estarem comigo sempre, serem a minha base e minha força durante toda a minha vida. E, por entenderem e apoiarem todos os meus momentos de minha ausência, cansaço e nervosismo durante a realização deste trabalho.
- ✓ E, principalmente a minha irmã Kênia, por existir! Pelos momentos de alegria, compreensão, paciência, apoio, incentivo. Por todos os fins de semana, feriados, férias escolares, momentos incansáveis em minha companhia, que seriam de descanso, e que dispensou, inclusive acordando cedo, perdendo os programas de TV preferidos, etc. só para que eu não ficasse sozinha no laboratório. Com certeza, sem você, Kênia, a realização deste trabalho não teria sido possível.

Enfim, a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

Muitíssimo obrigada!!!

“Um homem pode ser tão grande quanto ele queira ser. Se você acredita em si mesmo e tem coragem, determinação, iniciativa competitiva e se você está disposto a sacrificar as pequenas coisas da vida e pagar o preço pelas coisas que valem à pena, isso pode ser feito.”

Vince Lombardi

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	15
1.1. PLANTAS MEDICINAIS.....	15
1.2. “AMOREIRA”	19
1.3. A MADEIRA E SEUS CONSTITUINTES.....	23
1.3.1. Constituintes da Madeira.....	24
1.3.1.1. Substâncias Macromoleculares.....	25
1.3.1.1.1. Celulose.....	25
1.3.1.1.2. Hemiceluloses.....	26
1.3.1.1.3. Lignina.....	28
1.3.1.2. Substâncias de Baixo Peso Molecular.....	30
1.3.1.2.1. Extrativos.....	31
1.3.2. Constituintes da Casca	31
1.4. CONSIDERAÇÕES ACERCA DAS TÉCNICAS EMPREGADAS NAS ANÁLISES DOS COMPOSTOS QUÍMICOS.....	33
1.4.1. Análise Química da Madeira e da Casca.....	33
1.4.1.1. Preparação da Amostra.....	33
1.4.1.2. Problemas da Análise.....	34
1.4.1.3. Extrativos.....	34
1.4.1.4. Lignina Insolúvel (Lignina de Klason)	35
1.4.1.5. Lignina Solúvel.....	35
1.4.1.6. Holocelulose.....	37
1.4.1.7. Hemiceluloses.....	37
1.4.1.7.1. Hemicelulose A.....	38
1.4.1.7.2. Hemicelulose B.....	38
1.4.1.8. Celulose	39
1.4.2. Espectrofotometria no UV-Visível.....	39
1.4.2.1. Determinação de Fenóis Totais pelo Método de Folin-Ciocalteu.....	40
1.4.2.2. Determinação de Proantocianidinas pelo Método da Vanilina.....	41

1.4.2.3. Atividade antioxidante.....	41
1.5. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	42
1.5.1. Constituição da Cavidade Bucal e Anatomia Dental.....	43
1.5.2. Microbiota Bucal.....	45
2. JUSTIFICATIVA.....	47
OBJETIVO.....	47
DESENVOLVIMENTO.....	48
2.1. MATERIAL E MÉTODOS.....	48
2.1.1. Instrumentação.....	48
2.1.2. Reagentes e Soluções.....	48
2.2. METODOLOGIA.....	50
2.2.1. Procedência e Preparação das Amostras de Madeira e da Casca.....	51
2.2.2. Determinação Teor de Umidade.....	51
2.2.3. Análise Química.....	53
2.2.3.1. Preparação das Amostras Livre de Extrativos.....	53
2.2.3.2. Tratamento Alcalino para Extração dos Ácidos Fenólicos da Casca.....	53
2.2.3.3. Determinação da Lignina Insolúvel (Lig. de Klason).....	54
2.2.3.4. Determinação da Lignina Solúvel.....	54
2.2.3.5. Determinação da Holocelulose.....	55
2.2.3.6. Determinações de Hemiceluloses e α -Celulose.....	56
2.2.4. Análise dos Polifenóis.....	57
2.2.4.1. Obtenção dos Extrativos Polifenólicos.....	57
2.2.4.1.1. Metanol-água 4:1(v v ⁻¹)	57
2.2.4.1.2. Acetona/água 7:3 (v v ⁻¹)	57
2.2.4.2. Determinação do Teor de Fenóis Totais.....	58
2.2.4.3. Determinação de Proantocianidinas	58
2.2.5. Atividade Antioxidante e Cálculo de CE ₅₀	59
2.2.6. Análise Biológica dos Extratos Brutos.....	60
2.2.6.1. Atividade Antimicrobiana.....	60
2.2.6.1.1. Microrganismos Utilizados nos Ensaios.....	61

2.2.6.1.2. Meios de Cultura Utilizados.....	62
2.2.6.1.3. Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos Vegetais.....	65
2.2.6.1.3.1. Preparo das Amostras dos Extratos para o Método de Microdiluição	65
2.2.6.1.3.2. Preparo do Inóculo.....	66
2.2.6.1.3.3. Preparação da Droga Padrão.....	66
2.2.6.1.3.4. Controles Positivos e Negativos.....	67
2.2.6.1.3.5. Método da Microdiluição para Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	67
RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	70
2.2.7. Preparação das Amostras.....	70
2.2.8. Análise Química da Madeira e da Casca.....	70
2.2.8.1. Determinação do Teor de Umidade.....	70
2.2.8.2. Extrativos.....	70
2.2.8.3. Composição Macromolecular.....	72
2.2.9. Análise dos Polifenóis.....	76
2.2.9.1. Obtenção dos Extrativos Polifenólicos.....	76
2.2.9.2. Determinação do Teor de Fenóis Totais.....	77
2.2.9.3. Determinação de Proantocianidinas	80
2.2.9.4. Atividade Antioxidante e Cálculo de CE ₅₀	82
2.2.10. Extração do Óleo Essencial da Madeira e Casca.....	86
2.2.11. Atividade Antimicrobiana.....	87
3. CONCLUSÕES.....	91
4. REFERÊNCIAS.....	92

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 - <i>Maclura tinctoria</i> (L.) D. Don. Steud., conhecida por amoreira.....	20
Figura 2 - Fruto desenvolvido de amoreira.....	21
Figura 3 – Estrutura representativa da celulose e de uma Galactoglucomanana (hemicelulose).....	27
Figura 4 - Esquema estrutural proposto para a lignina de <i>Eucalyptus grandis</i> (folhosa) (MORAIS et al., 1993).	29
Figura 5 - Representação esquemática da formação da celulose.....	39
Figura 6 - Diagrama de corte longitudinal de dente (LINDHE, 1999).....	45
Figura 7 - Fluxograma para análise química de madeiras e cascas.....	52
Figura 8 – Desenho do Aparelho Extrator de Soxhlet.....	53
Figura 9 - Representação das etapas desenvolvidas para o método de microdiluição.....	68
Figura 10 - Microplaca com as soluções dos extratos testadas frente a <i>S. mutans</i> reveladas com resazurina.	69
Figura 11 - Câmara de anaerobiose para incubação de microrganismos anaeróbios.	69
Figura 12 – Material obtido da análise química da madeira de <i>M. tinctoria</i>	75
Figura 13 – Material obtido da análise química da casca de <i>M. tinctoria</i>	75
Figura 14 – Curva de calibração do ácido gálico.....	77
Figura 15 – Curva de calibração da catequina.....	80
Figura 16 - Curva de calibração do DPPH.....	82
Figura 17 – Gráfico da atividade antioxidante em função do tempo da madeira de <i>Amoreira</i> de diferentes concentrações.....	83
Figura 18 – Gráfico do consumo de DPPH [•] em função das diferentes concentrações da madeira de <i>Maclura tinctoria</i>	83
Figura 19 - Gráfico da atividade antioxidante em função do tempo da casca de <i>Amoreira</i> de diferentes concentrações.....	84
Figura 20 – Gráfico do consumo de DPPH [•] em função das diferentes concentrações da casca de <i>Maclura tinctoria</i>	84

INDICE DE TABELAS

Tabela 1 - Composição média de madeiras de coníferas e folhosas (KLOCK et al., 2005)	24
Tabela 2 - Valores de celulose percentual para algumas espécies conhecidas. (KLOCK et al., 2005)	25
Tabela 3 - Quantidade relativa das polioses em coníferas e folhosas (KLOCK et al., 2005)	27
Tabela 4 - Diluições das Soluções-Amostra Testadas para madeira e casca de Amoreira.....	59
Tabela 5 - Microrganismos, procedência, morfotipos e meios de culturas utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana.....	61
Tabela 6 - Teores de extrativos na amoreira.....	71
Tabela 7 - Composições macromoleculares médias da casca e da madeira de Amoreira e de algumas outras madeiras para comparação.....	73
Tabela 8 - Composições macromoleculares médias das cascas de amoreira e de outras cinco plantas (KOFUJITA, 1999).....	74
Tabela 9 - Rendimento das extrações dos compostos polifenólicos.....	76
Tabela 10 - Teor de fenóis totais (mg de EAG/g de amostra).....	78
Tabela 11 - Teor de proantocianidinas (mg de EAG/g de amostra).....	80
Tabela 12 - Rendimento dos extratos brutos e quantificação de polifenóis totais e proantocianidinas da madeira e casca de <i>Maclura tinctoria</i>	81
Tabela 13 – Valores médios de CE50 da madeira e casca de amoreira, outras plantas e padrões ($\mu\text{g mL}^{-1}$).....	85
Tabela 14 - Resultados das concentrações inibitórias mínimas para os extratos da amoreira frente às bactérias aeróbias em $\mu\text{g mL}^{-1}$	87
Tabela 15 - Concentração Inibitória Mínima para os extratos da amoreira frente às bactérias anaeróbias em $\mu\text{g mL}^{-1}$	88

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

AA – extrato acetona-água 7:3 (v v⁻¹)

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

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

CE₅₀ – concentração efetiva média, concentração de amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais DPPH[·]

CG/EM – cromatógrafo gasoso acoplado à espectrometria de massas

CH₃COOH – ácido acético

CIM – concentração inibitória mínima

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

Da – Daltons

DMSO – dimetilssulfóxido

DPPH[·] – radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila

EAG – equivalentes de ácido gálico

ECAT – equivalentes de catequina

ed. – edição

g – grama

H₂SO₄ – ácido sulfúrico

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental

KOH – hidróxido de potássio

MA – extrato metanol-água 4:1 (v v⁻¹)

mL – mililitros

NaOH – hidróxido de sódio

OMS – Organização Mundial de Saúde

pH – potencial hidrogeniônico

TAPPI – (do inglês) “*Technical Association Pulp and Paper Industry*”

TSB – triptona soja

v v⁻¹ – relação volume / volume

°C – graus Celsius

RESUMO

Neste estudo inédito, a espécie *Maclura tinctoria* (L.) D. Don Ex Steud., comumente conhecida como amoreira, foi avaliada a composição dos constituintes macromoleculares, teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante e antimicrobiana da madeira e casca desta espécie. Os teores de extrativos totais, lignina insolúvel em ácido (lignina de Klason), lignina solúvel em ácido, holocelulose, hemiceluloses e α -celulose, corresponderam às médias, para a madeira de $10,79 \pm 1,98$; $21,47 \pm 1,25$; $1,28 \pm 0,00$; $69,43 \pm 2,16$; $23,59 \pm 0,36$; $46,02 \pm 1,53$ (%), e para a casca de $50,64 \pm 2,47$; $18,77 \pm 1,20$; $0,45 \pm 0,01$; $29,14 \pm 1,90$; $8,78 \pm 0,42$ e $21,4 \pm 0,77$ (%). A partir de extratos metanol/água 4:1(v/v) e acetona/água 7:3(v/v), obteve-se o teor de fenóis totais de acordo com o método de Folin-Ciocalteu foi de $38,43 \pm 0,42$ e $45,34 \pm 0,86$ para a madeira e de $35,03 \pm 0,94$ e $43,17 \pm 1,18$ para a casca, expressos em equivalente de ácido gálico/grama de amostra, já o teor de proantocianidinas foi de $5,11 \pm 0,59$ e $6,51 \pm 0,62$ para a madeira e de $3,88 \pm 0,12$ e $4,85 \pm 0,06$ para a casca em equivalentes de catequina/grama de amostra. A atividade antioxidante foi avaliada pelo método de sequestro do radical livre DPPH $^{\bullet}$ (2,2-difenil-1-picrilidrazil), obtendo-se para o extrato metanólico da madeira ($CE_{50} = 18,74 \mu\text{g mL}^{-1}$) e da casca ($CE_{50} = 20,97 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os extratos brutos da madeira e da casca de amoreira foram capazes de inibir o crescimento das bactérias periodontopatogênicas testadas, apresentando efeito antimicrobiano. As concentrações inibitórias mínimas dos extratos brutos variaram entre 200 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os extratos da madeira e 20 a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os extratos da cascas frente aos microrganismos indicadores utilizados nos ensaios.

Palavras chave: *Maclura tinctoria*, constituintes químicos, compostos fenólicos, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

In this original work, the specie *Maclura tinctoria* (L.) D. Don Ex Steud, as known as “amoreira”, was evaluated under many aspects. The macromolecular constituent's composition, the phenolic compounds level, antioxidant and antimicrobial activity of the bark and wood were studied. The corresponding percents of total extractives level, acid insoluble lignin (Klason's lignin), acid soluble lignin, holocelluloses, hemicelluloses and α -celluloses were an average of the values for the wood: 10.79 ± 1.98 ; 21.47 ± 1.25 ; 1.28 ± 0.00 ; 69.43 ± 2.16 ; 23.59 ± 0.36 ; 46.02 ± 1.53 (%), and for the bark 50.64 ± 2.47 ; 18.77 ± 1.20 ; 0.45 ± 0.01 ; 29.14 ± 1.90 ; 8.78 ± 0.42 and 21.4 ± 0.77 (%). The level of total phenols obtained with methanol/water 4:1 (v/v) and acetone/water 7:3 (v/v) extracts using Folin-Ciocalteu method for the wood was 38.43 ± 0.42 and 45.34 ± 0.86 and 35.03 ± 0.94 e 43.17 ± 1.18 for the bark, expressed in Gallic acid equivalents (GAC) per gram of sample. The proanthocyanidins level obtained was 5.11 ± 0.59 for wood and 6.51 ± 0.62 for bark, in catechin equivalents per gram of sample. The antioxidant activity was determined by DPPH (2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl) for the wood and bark extracts, with $IC_{50}=18.74$ and $IC_{50} = 20.97 \mu\text{g mL}^{-1}$, for wood and bark, respectively. The crude extracts from wood and bark from *Maclura tinctoria* (L.) has presented growth inhibition of the tested periodontopathogenic bacteria. The MIC of the crude extracts were in the range of 200 and $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ for wood extracts and from 20 to $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ for bark extracts, against the control microorganisms tested.

Keys words: *Maclura tinctoria*, macromolecular constituent's, phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity.

1. INTRODUÇÃO

1.1. PLANTAS MEDICINAIS

Os produtos naturais são utilizados pela humanidade desde tempos imemoriais, pois é tão antigo quanto a espécie humana. A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas e folhas talvez tenham sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais. A história do desenvolvimento das civilizações Oriental e Ocidental é rica em exemplos da utilização de recursos naturais na medicina, no controle de pragas e em mecanismos de defesa, merecendo destaque as civilizações Egípcia, Greco-romana e Chinesa. A medicina tradicional chinesa desenvolveu-se com tal grandiosidade e eficiência que até hoje muitas espécies e preparados vegetais medicinais são estudados na busca pelo entendimento de seu mecanismo de ação e no isolamento dos seus princípios ativos (VIEGAS Jr. et al., 2006).

Plantas medicinais são todas as plantas que contêm substâncias que podem ser utilizadas com propósitos terapêuticos ou que sejam precursoras de semi-síntese químico-farmacêutica (CONFERÊNCIA INTERNACIONAL SOBRE CUIDADOS PRIMÁRIOS DE SAÚDE, 1979).

Os estudos de Almeida et al(1993) mencionam que o início da história da fitoterapia, provavelmente, começou com Mitridates, rei de Ponto, na Anatólia (sudoeste da Ásia que corresponde, hoje, à Turquia) no Século II a.C. Ele foi o primeiro farmacologista experimental da história da humanidade. Os chineses foram precursores no estudo e utilização de plantas medicinais há mais de 5000 anos, sendo utilizadas cerca de 11.000 plantas como medicamento atualmente na China.

Acredita-se que o primeiro livro a descrever o uso de plantas medicinais é de 2700 a.C. seja de origem chinesa com a obra intitulada de Pen Ts'ao (A Grande Fitoterapia), escrito pelo Imperador Sheng-Nung. Entretanto, o primeiro tratado médico aceito e respeitado pela comunidade científica, que inclui o uso de plantas, foi o papiro decifrado em 1873, pelo egiptólogo alemão Georg Ebers, datado de aproximadamente 1500 anos antes da era Cristã, em exibição no Museu de Leipzig, e tem como frase introdutória “Aqui começa o livro relativo à preparação dos remédios para todas as partes do corpo humano” (CUNHA, 2003).

O profundo conhecimento do acervo químico da natureza pelos povos primitivos e pelos indígenas pode ser considerado fator fundamental para o descobrimento de substâncias tóxicas e medicamentosas ao longo do tempo. A convivência e o aprendizado com os mais diferentes grupos étnicos contribuem para o desenvolvimento da pesquisa em produtos naturais (VIEGAS Jr. et al., 2006).

Cerca de 70% da população mundial utiliza plantas ou extratos de plantas como medicamentos e mais de 120 medicamentos utilizados são derivados de plantas medicinais (LORENZI, 1998). A informação popular sobre o uso das plantas se constitui um importante critério de seleção de material para estudo químico, visando à sua aplicação medicinal. Remédios, repelentes de insetos, venenos para peixes usados na pesca, podem fornecer pistas para o estudo químico de produtos naturais, ao lado de plantas conhecidas como tóxicas para o homem e animais.

Lamentavelmente, nos países tropicais, esse tipo de informação tende a desaparecer por influência das comunidades mais evoluídas, cujos costumes, levados ao meio rural com o constante progresso dos meios de comunicação de massa, substituem progressivamente os velhos hábitos, além de se perder vários destes conhecimentos em função de desaparecimento de florestas e de povos indígenas, detentores do conhecimento destas plantas medicinais. Assim, o estudo de plantas medicinais também colabora com o meio ambiente no sentido preservacionista.

Ainda, segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), as práticas da medicina tradicional expandiram-se mundialmente no decorrer da última década do século XX, ganhando popularidade. Devido a isso, desde 1978 a OMS tem estimulado o desenvolvimento de políticas públicas, a fim de inserir os medicamentos fitoterápicos no sistema oficial de saúde dos cento e noventa e um Estados-membro. A inclusão do Brasil na discussão dessa política sobre fitoterápicos deve-se ao fato de o país possuir não só a maior diversidade genética do mundo, abrigando cerca de 55 mil espécies catalogadas, mas também ampla tradição no uso de plantas medicinais, estima-se que 4 mil espécies vegetais sejam utilizadas, que está intrínseca ao conhecimento popular dos brasileiros (RODRIGUES et al., 2006).

Morgan (1994) afirma que toda planta que contém um ou mais princípios ativos em sua composição e que são úteis à saúde dos seres humanos são consideradas plantas medicinais.

A diversidade dos constituintes químicos das plantas, a ocorrência de pequenas quantidades de compostos de interesse, concomitantemente com grandes quantidades de constituintes já conhecidos e muito comuns, ao lado de vários outros

fatores interferentes, dificultam o trabalho de isolamento e purificação dos princípios ativos desejados.

Tudo isso torna praticamente impossível o estabelecimento da composição química completa de uma planta. Essas dificuldades podem ser minimizadas, quando se definem objetivos específicos para o estudo químico das plantas e se aplicam técnicas de prospecção preliminares adequadas aos objetivos escolhidos.

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

Seguindo esta linha de raciocínio neste trabalho inédito será estudada a madeira e a casca de amoreira (*Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud.). Estudos preliminares com o exsudado do caule e o chá da casca desta espécie apresentam propriedades medicinais muito utilizados como cicatrizante, antiinflamatório e para combater dores na coluna (POTT e POTT, 1994).

1.2. AMOREIRA

Nome Científico: *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud.

Filo: Angiospermae ou Magnoliophyta

Grande Grupo: Eudicotiledôneas

Grupo: *Rosidae*

Família: *Moraceae*

Sinomínia Botânica: *Chlorophora tinctoria* (L.) Gaud. ex Benth. & Hook. f.

Nome popular no Brasil: Amoreira-Branca, Amarelinho, Amoreira-de-Espinho, Limaorana, Limorana, Tatajuba-de-Espinho, Taiúva, Amoreira.

Nome indígena: taiúva vem do tupi guarani e significa “árvore do leite amarelo” visto que tanto os frutos ou o tronco e galhos feridos exsudam um látex amarelado.

Ocorrência: nas mais variadas formações florestais, desde o México até o sudeste do Brasil, Bolívia, Argentina e Paraguai.

A família Moraceae, predominantemente tropical, apresenta aproximadamente 63 gêneros e 1.500 espécies. No Brasil apontam a existência de 28 gêneros com cerca de 340 espécies, representadas por árvores, arbustos, ervas, trepadeiras e até epífitas (BARROSO et al., 2002). O gênero *Maclura* é composto por 11 espécies com distribuição exclusivamente tropical. Três espécies ocorrem na América, desde os Estados Unidos até a Argentina, sendo que no Brasil ocorrem apenas *M. tinctoria* e *M. brasiliensis* (CARVALHO, 2003). *M. tinctoria* apresenta ampla distribuição Neotropical (LACHANCE et al.; 2001), no Brasil, ocorre desde a

região Amazônica até o sul do país (CARVALHO, 2003). É bastante encontrada nas formações secundárias e matas abertas, sendo rara no interior da mata primária alta e sombria (MARIANO et al., 1998). Ocorre preferencialmente em solos úmidos de planícies aluviais e início de encostas (ROMAGNOLO e SOUZA, 2000). De acordo com as características sucessionais, é classificada como pioneira (SILVA-RIOS et al.; 2001), secundária inicial (DURIGAN e NOGUEIRA, 1990) ou clímax exigente de luz (TONIATO e OLIVEIRA FILHO, 2004).

Árvore de crescimento rápido, desenvolve-se em qualquer tipo de solo com boa fertilidade natural, em solos pedregosos. Pode ser cultivada em todo o Brasil, pois resiste a geadas de até -3 °C e a secas não muito longas (Figura 1) (PAULA e ALVES, 1997).



Figura 1 – *Maclura tinctoria* (L.) D. Don. ex Steud., conhecida por amoreira.

Maclura tinctoria L. (*Chlorophora tinctoria* Gaud. segundo Barroso et al. 2002), é uma espécie arbórea, dioica, espinhenta, lactescente, semicaducifólia, com 10 a 20 m de altura e 40 a 60 cm de diâmetro. A madeira é moderadamente pesada,

dura, flexível, durável, de alta resistência ao ataque de organismos xilófagos, mesmo em condições favoráveis ao apodrecimento, sendo empregada em serviços de movelaria e marcenaria (PAULA e ALVES, 1997).

Os ramos novos têm espinhos pontiagudos e as folhas, margem serrilhada. As flores são dioicas, ocorrem em árvores separadas, sendo necessário plantar três exemplares para que ocorra a produção dos frutos produzidos apenas pelos indivíduos femininos (PAULA e ALVES, 1997).

Pode ser plantada a pleno sol ou em reflorestamentos mistos para aproveitamento da madeira e dos frutos que alimentam diversos pássaros (Figura 2). Os frutos maduros adquirem a coloração amarelo esverdeado, são muito doces - com sabor forte e agradável. Podem ser consumidos *in natura* e na forma de sucos e doces.



Figura 2 - Fruto desenvolvido da *Maclura tinctoria* (L.) D. Don. ex Steud..

As sementes são minúsculas e perdem o poder germinativo rapidamente. É melhor plantar em sementeira e depois transplantar as mudinhas para embalagens individuais. A germinação ocorre de 30 a 45 dias, e as mudas crescem rápido, mas apreciam ambiente sombreado para formação. A frutificação inicia-se com 4 a 6 anos, dependendo do solo e tratos culturais, como mostrado na Figura 2. (PAULA e ALVES, 1997).

O exsudado do caule e o chá da casca apresentam propriedades medicinais muito utilizados como cicatrizante e antiinflamatório (POTT e POTT, 1994). Além de relatos de que o chá da casca do caule é usado como antirreumático, quando cozida, para beber ou gargarejar, é tida como antiinflamatório após a extração de dentes (NETO, 2006).

A madeira da amoreira é densa ($0,76$ a $0,97 \text{ g cm}^{-3}$). Certos autores relatam que sua densidade específica pode alcançar até $1,15 \text{ g cm}^{-3}$ (LITTLE JUNIOR e DIXON, 1983). O alburno apresenta-se diferenciado do cerne, branco-amarelado. Cerne amarelo-dourado e depois castanho-claro-amarelado, ou mesmo castanho com exposição ao ar. É altamente resistente ao ataque de organismos xilófagos e imune a cupins. Apresenta baixa permeabilidade às soluções preservantes, quando submetida a tratamentos de impermeabilização com pressão. O cerne não é tratável com creosoto (óleo solúvel) e nem com solução de cobre, cromo e arsênio CCA-A (IBAMA, 1997). Não há ensaios científicos acerca da sua durabilidade, característica tida como mais importante que a resistência e a dureza. Entretanto, mesmo em contato com solo, umidade e a adversidade do clima, diz-se, popularmente, que esta espécie ao lado da aroeira “dura a vida toda”, o que pode ser visto em velhas casas e currais com esteios perfeitos – com mais de 200 anos.

1.3. A MADEIRA E SEUS CONSTITUINTES

Dentre os materiais de origem biológica, a madeira é, sem dúvida, a parte mais conhecida e utilizada desde a antiguidade. As árvores são plantas que possuem um caule lenhoso e são constituídas por raiz, caule, folha, flor, fruto e sementes. O lenho de uma árvore contém grande quantidade de substâncias que são utilizadas como matérias-primas em quase todos os campos da tecnologia (FENGEL e WEGENER, 1989).

As árvores de madeira dura são angiospermas, plantas que produzem sementes com algum tipo de cobertura. As madeiras moles, por outro lado, são gimnospermas. Estas plantas deixam as sementes cair no chão sem nenhuma cobertura. Os pinheiros, que desenvolvem as sementes em cones duros, enquadram-se nesta categoria. Em coníferas como os pinheiros, estas sementes são soltas ao vento quando amadurecem. Isto espalha as sementes da planta em uma área mais ampla. Na maioria das vezes, as árvores angiospermas perdem suas folhas durante o clima frio, enquanto as gimnospermas mantêm suas folhas o ano todo (FENGEL e WEGENER, 1989).

Uma madeira dura não é, necessariamente, um material mais duro (mais denso) e uma madeira mole não precisa ser um material mais mole (menos denso). A distinção entre madeira dura e mole tem a ver com a reprodução da planta. A terminologia madeira mole/dura certamente faz algum sentido. Então, também é certo dizer que as árvores que estão sempre verdes são madeiras moles e as que perdem folhas são madeiras duras. As árvores sempre verdes tendem a ser menos densas do que as que perdem as folhas, e, portanto, mais fáceis de cortar, enquanto

que as maiorias das madeiras duras tendem a ser mais densas, e, portanto, mais firmes (FENGEL e WEGENER, 1989).

Desde a antiguidade, a madeira era usada como combustível e artefatos para construção de ferramentas. Atualmente, sua importância se dá no uso como matéria-prima em transformações químicas na produção de carvão vegetal, piche e alcatrão, além de ser uma substância básica para obtenção de polpa e papel, filmes, aditivos, extrativos terapêuticos e outros produtos (FENGEL e WEGENER, 1989).

1.3.1. Constituintes da Madeira

De acordo com Klock et al. (2005), do ponto de vista da análise dos componentes da madeira, uma distinção precisa ser feita entre os principais componentes macromoleculares e extrativos (Tabela 1). Os constituintes da parede celular são principalmente a celulose, as hemiceluloses e a lignina que estão presentes em todas as madeiras. Além de outros componentes minoritários de baixo peso molecular, extrativos e substâncias minerais, os quais são geralmente mais relacionados à madeira de certas espécies, no tipo e quantidade. A celulose é um componente uniforme da madeira, sendo que as proporções e a composição química da lignina e polioses diferem em coníferas e folhosas.

Tabela 1 - Composição média de madeiras (KLOCK et al., 2005)

Constituintes	CONÍFERAS	FOLHOSAS
	(Gimnospermas)	(Angiospermas)
Celulose	42 ± 2%	45 ± 2%
Hemicelulose	27 ± 2%	30 ± 5%
Lignina	28 ± 2%	20 ± 4%
Extrativos	5 ± 3%	3 ± 2%

1.3.1.1. Substâncias Macromoleculares

1.3.1.1.1. Celulose

A celulose é o composto orgânico mais comum na natureza. Ela constitui entre 40 e 50% da maioria das plantas. Há estimativas de que cerca de 50 bilhões de toneladas são produzidas por ano. A celulose está localizada principalmente na parede secundária das células vegetais. (KLOCK et al., 2005)

A Tabela 2 exemplifica o conteúdo médio de celulose em várias plantas.

Tabela 2 - Valores de celulose percentual para algumas espécies conhecidas (KLOCK et al., 2005).

Planta	Celulose (%)
Algodão	95 – 99
Rami	80 – 90
Bambú	40 – 50
Madeira	40 – 50
Casca de árvores	20 – 30
Musgos	25 – 30
Bactéria	20 – 30

Para o isolamento da celulose em plantas, ela deve ser separada dos extrativos, da lignina e dos outros compostos não celulósicos. Nos métodos comumente usados para o isolamento e determinação da celulose, os outros constituintes da madeira são removidos o mais completamente possível por técnicas de extração ou solubilização, deixando um resíduo que é constituído praticamente

por celulose pura. A etapa mais importante é a remoção da lignina sendo, portanto, o isolamento da celulose um processo primariamente de deslignificação (BROWNING, 1967).

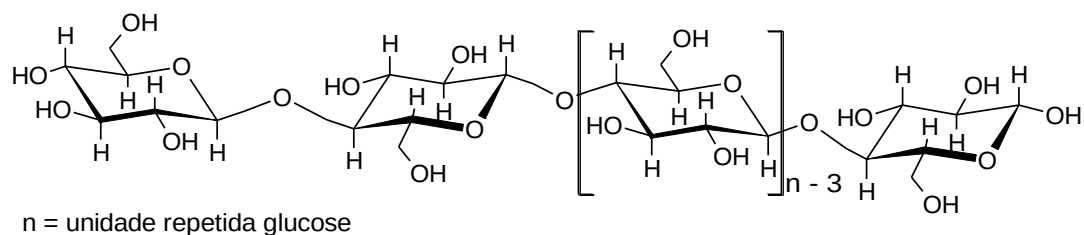
A celulose se distingue analiticamente dos extrativos pela sua insolubilidade em água e solventes orgânicos, das hemiceluloses pela sua insolubilidade em soluções alcalinas aquosas e da lignina pela sua relativa resistência a agentes oxidantes e susceptibilidade a hidrólises de ácidos (BROWNING, 1967).

1.3.1.1.2. Hemiceluloses (Polioses)

Hemiceluloses são polissacarídeos presentes na madeira em menor grau de polimerização que a celulose. As massas moleculares, normalmente, variam entre 25.000 a 35.000 Da. Estão associadas à celulose e à lignina nos tecidos vegetais (KLOCK et al., 2005).

Enquanto a celulose é um polímero de cadeia longa composto de um só monômero (glucose), as hemiceluloses são polímeros formados de uma mistura de hexoses, pentoses e ácidos urônicos. É de natureza amorfa, peso molecular relativamente baixo, podendo ser lineares ou ramificados. A figura 3 apresenta o esquema estrutural da celulose e de uma hemicelulose (MORAIS et al. 2005).

Celulose



Hemicelulose

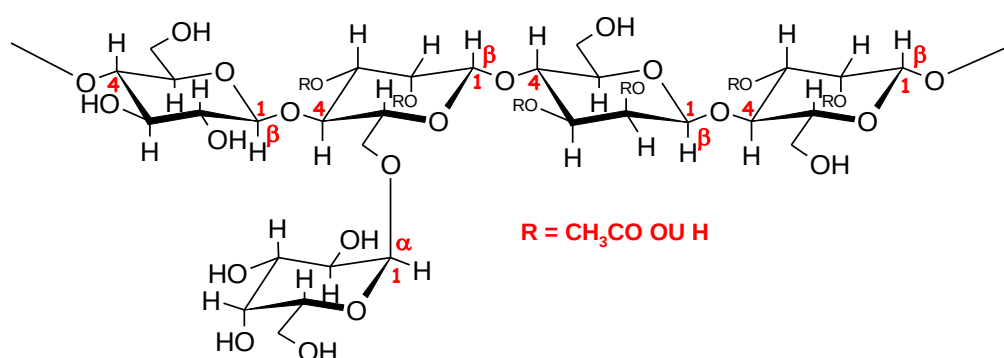


Figura 3 – Estrutura representativa da celulose e de uma galactoglucomanana (hemicelulose).

As folhosas, de maneira geral, contêm maior teor de hemiceluloses que as coníferas e a composição química são diferenciadas (Tabela 3).

Tabela 3 - Quantidade relativa das polioses em coníferas e folhosas (KLOCK et al., 2005)

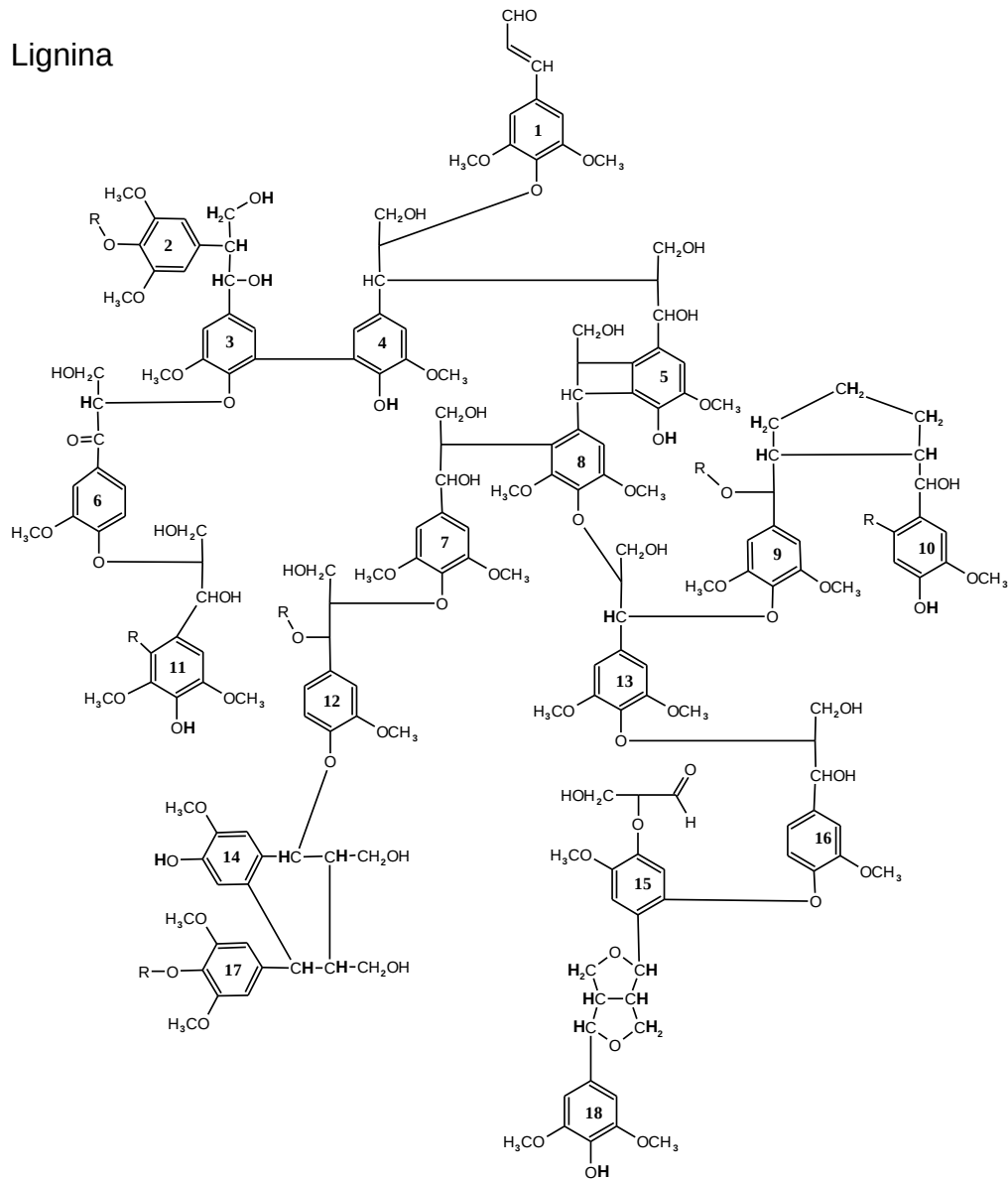
Polioses	Folhosas	Coníferas
Glucouranoxilana	muito grande (20 a 35%)	pequena (-)
Arabinoglucouranoxilana	traços (-)	pequena a média (5~12%)
Glucomananas	pequena (2~5%)	grande (18~25%)
Galactoglucomanana	muito pequena (1%)	pequena a média (8~20%)
Arabinogalactana	pequena (1~3%)	muito pequena (~1%)

1.3.1.1.3. Lignina

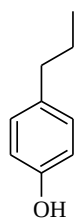
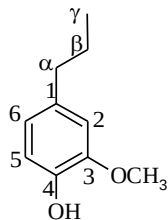
Em 1897, Peter Klason estudou a composição de lignossulfonatos, provenientes da polpação sulfito da madeira, e sugeriu que a lignina é, quimicamente, relacionada com o álcool coniferílico. Em 1907, ele propôs que a lignina era uma substância macromolecular e, 10 anos mais tarde, que as unidades de álcool coniferílico eram unidas principalmente por ligação éter. A lignina é a terceira substância macromolecular componente da madeira, ocorrendo entre 15 e 35% de seu peso. As moléculas de lignina são formadas completamente diferentes dos polissacarídeos, pois são constituídas por um sistema aromático composto de unidades de fenilpropano (KLOCK et al., 2005).

Há maior teor de lignina em coníferas do que em folhosas, e existem algumas diferenças estruturais entre a lignina encontrada nas coníferas e nas folhosas. As ligninas de madeiras de coníferas são compostas quase que exclusivamente por unidades guaiacilpropano, sendo denominadas de ligninas tipo G e as ligninas de madeiras de folhosas apresentam tanto unidades guaiacilpropano como siringilpropano normalmente em proporções que variam de madeira para madeira e são designadas como ligninas do tipo GS. Além dessas duas unidades básicas pequenas quantidades de unidades *p*-hidroxifenilpropano, também são encontradas, tanto em coníferas como em folhosas. A Figura 4 apresenta o esquema estrutural de uma molécula de lignina (MORAIS et al., 1993).

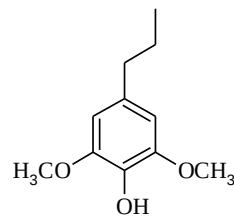
Lignina



Precursores

*p*-Hydroxifenilpropano

Guaiacilpropano



Siringilpropano

Figura 4 - Esquema estrutural proposto para a lignina de *Eucalyptus grandis* (folhosa) (MORAIS et al., 1993).

Do ponto de vista morfológico, a lignina é uma substância amorfa localizada na lamela média composta, bem como na parede secundária. Durante o desenvolvimento das células, a lignina é incorporada como o último componente na parede, interpenetrando as fibrilas e assim fortalecendo, enrijecendo as paredes celulares. Segundo Klock et al. (2005), considerando-se a estrutura da lignina pode-se relacionar como suas principais funções nas plantas as seguintes:

- aumentar a rigidez da parede celular,
- unir as células umas às outras,
- reduzir a permeabilidade da parede celular à água, e
- proteger a madeira contra microrganismos (sendo essencialmente fenólica, a lignina age como um fungicida).

1.3.1.2. Substâncias de Baixo Peso Molecular

Além dos componentes da parede celular existem numerosas substâncias que são chamadas de extrativos.

Estes materiais são responsáveis muitas vezes por certas propriedades da madeira como: cheiro, gosto, cor, etc. Embora estes componentes contribuam somente com uma pequena porcentagem da massa da madeira, podem apresentar uma grande influência nas propriedades e na qualidade de processamento das madeiras. Alguns componentes, como certos metais são essenciais para a árvore viva. As substâncias de baixo peso molecular pertencem a classes muito diferentes em termos de composição química e, portanto, há dificuldades em se encontrar um sistema claro e compreensivo de classificação (KLOCK et al., 2005).

1.3.1.2.1. Extrativos

Os extrativos são resultados de modificações sofridas pelos carboidratos no processo fisiológico da árvore. Os locais de formação e posterior deslocamento para um local definitivo na madeira dependem da função do extrativo. Se o extrativo consiste numa substância de reserva, seu teor atinge um valor máximo pouco antes de iniciar a estação desfavorável e passa pelo seu mínimo ao final desta estação (KLOCK et al., 2005).

Os extrativos são, frequentemente, responsáveis por determinadas características da madeira como: cor, cheiro, resistência natural ao apodrecimento, gosto e propriedades abrasivas. Sua composição e quantidade relativa dependem de diversos fatores, como espécie, idade e região de procedência, etc. Aproximadamente de 3 - 10% da madeira seca é constituída de extrativos sendo que, geralmente, para as madeiras de coníferas esse teor fica na faixa de 5 - 8% e para as folhosas de regiões temperadas na faixa de 2 - 4%, podendo chegar a valores superiores a 10% na madeira de espécies de regiões tropicais.

1.3.2. Constituintes da Casca

A determinação da composição química da casca apresenta alguns problemas e a aplicação de alguns procedimentos comuns sem modificações podem fornecer conclusões errôneas. As cascas são muito mais variáveis na composição do que madeiras, e nenhum esquema é completamente aplicável para a separação desses componentes (BROWNING, 1967).

Geralmente, os extrativos são muito mais numerosos e se apresentam em maior quantidade na casca do que na madeira. Os métodos convencionais para isolamento da lignina na madeira e sua determinação quantitativa são totalmente insatisfatórios quando aplicados à casca. A casca contém uma mistura de substâncias, algumas dessas são solúveis em soluções alcalinas. Uma considerável parte desse material, se não for devidamente removida por uma pré-extração alcalina, não é solubilizada e aparece como lignina. Por causa dessas dificuldades no isolamento da lignina e das frações de carboidratos, as análises somatórias da casca são geralmente insatisfatórias (BROWNING, 1967).

1.4. CONSIDERAÇÕES ACERCA DAS TÉCNICAS EMPREGADAS NAS ANÁLISES DOS COMPOSTOS QUÍMICOS

1.4.1. Análise Química da Madeira e da Casca

1.4.1.1. Preparação da Amostra

De forma geral, para propósito de análise química, a madeira precisa ser desintegrada, isto é, moída, para se conseguir uma completa penetração dos reagentes e para se assegurar reações uniformes.

O primeiro passo é a transformação da madeira em cavacos, ou operações semelhantes com serras ou outras que transformem a madeira em partículas pequenas.

Redução posterior pode ser obtida por moagem em equipamentos apropriados como moinhos de martelo, de disco, etc. O aquecimento deve ser evitado, bem como a produção de partículas muito finas.

Como o tamanho das partículas após a moagem normal não é homogêneo, a mesma deverá ser peneirada (classificada) para eliminar o material muito fino, que pode causar problemas de entupimento de filtros muito finos, ou até passar por filtros mais grossos. Também resultados anormais podem ser obtidos com as frações mais finas.

O material mais grosso deve ser moído novamente. Não há regra geral para o menor tamanho das partículas para uso na análise da madeira, porém uma faixa entre 40 e 80 mesh, ou dimensões entre 0,05 e 0,4 mm são usuais.

1.4.1.2. Problemas da Análise

A análise química da madeira compreende a determinação da sua composição, bem como a extração, purificação e caracterização de seus constituintes.

A análise pode ser conduzida determinando-se somente os principais componentes da parede celular, ou seja, os polissacarídeos e lignina, extrativos e cinzas. Ou análises muito detalhadas que fornecem a determinação de grupos funcionais e dos padrões individuais dos polissacarídeos.

1.4.1.3. Extrativos

A preparação dos extratos brutos das plantas é o ponto da partida dessa etapa do isolamento e purificação dos constituintes químicos fixos das plantas. A escolha do solvente para extração deve ser feita tendo-se em vista os objetivos do estudo e os resultados da abordagem.

Deve-se ter em conta que solventes pouco polares (éter de petróleo, hexano, benzeno, clorofórmio) extraem da planta, mais facilmente, mistura de compostos de baixa polaridade e compostos polares, porém pouco hidrófilos. Compostos mais polares e hidrófilos são também, com mais facilidade, extraídos com etanol ou metanol.

Especial cuidado deve ser observado para extração de compostos polares quando a planta é rica em taninos. Esse grupo de substâncias é muito solúvel nos solventes hidrofílicos. Nesse caso, é útil proceder-se uma extração preliminar com hexano para desengordurar o material, isto é, para retirar os constituintes

lipossolúveis e facilitar o contato do solvente mais polar com os constituintes mais polares na planta triturada e, em seguida, usar éter, ao invés de álcool, para extração dos compostos polares desejados. Os taninos são muito pouco solúveis em éter.

Assim, não existe um único solvente universal capaz de solubilizar todos os extrativos da madeira, sendo necessário utilizar combinações diferentes de solventes. Os extrativos da madeira solubilizados pela mistura bifásica etanol 95%: cicloexano (1:2, v/v) são as graxas, ácidos graxos, gorduras, ceras, gliceróis e ésteres de ácidos graxos. O etanol tem a finalidade de solubilizar os taninos e outros polifenóis. Já na água, solubilizaram os sais orgânicos, açúcares, polissacarídeos e algumas substâncias fenólicas.

1.4.1.4. Lignina Insolúvel (Lignina de Klason)

A quantificação da lignina é baseada na hidrólise dos polissacarídeos com ácidos minerais fortes. O resíduo restante é o que se classifica como lignina insolúvel.

1.4.1.5. Lignina Solúvel

A lignina solúvel é aquela que permanece no filtrado obtido no procedimento para a lignina de Klason.

O teor de lignina solúvel em ácido é calculado a partir dos valores de absorvância nos comprimentos de onda de 215 e 280 nm registrados no espectro de

ultravioleta-visível (UV-Visível.) e aplicados à equação 1 para calcular a concentração em g L⁻¹ (GOMIDE, 1986)

Furfural e hidroximetilfurfural normalmente são formados pelo tratamento ácido dos carboidratos nas condições de hidrólise utilizadas. Entretanto, as curvas de absorção destes aldeídos derivados de açúcares apresentam o máximo de absorção no comprimento de onda de 280 nm, enquanto que a absorvância em comprimentos de ondas mais baixos é relativamente pequena. Considerando-se que o filtrado de lignina tem máxima absorvância na região de 205 – 210 nm, é de se esperar que os compostos de furfural derivados da decomposição de carboidratos não são fontes importantes de absorção e, portanto, devem ter pouca influência na quantificação da lignina. A concentração de lignina solúvel da madeira de álamo foi estimada a partir da absorvância do filtrado a 208 nm. Neste comprimento de onda, os produtos de degradação dos carboidratos causam muito pouca interferência. Por isso, como observado na equação 1, faz-se a subtração para absorvância obtida 280 nm.

$$C_{LS} = \frac{4,53(A_{215}-A_{280})}{300} \quad (1)$$

Em que:

C_{LS} = concentração em g L⁻¹ de lignina na amostra;

A_{215} = absorvância da solução a 215 nm;

A_{280} = absorvância da solução a 280 nm.

Esta equação aplica os mesmos princípios da lei de Lambert-Beer. Os dois valores de absorvância refletem a necessidade de se fazer uma correção para os compostos de furfural gerados durante a hidrólise da madeira e que interferem na medição da lignina solúvel. A absorvância em 280 nm é, na verdade, uma correção

para os compostos de furfural, enquanto a de 215 nm é uma medida da concentração de lignina solúvel.

A quantidade de lignina solúvel, normalmente, é pequena nas madeiras de fibra longa, com valores cerca de ou inferiores a 1%. As madeiras de fibra curta e gramíneas podem possuir de 1% a 4% ou até mais, o que é uma fração significativa da lignina total.

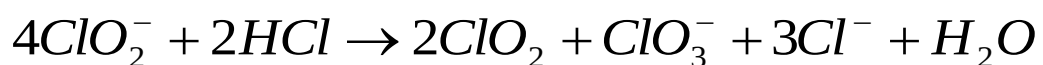
1.4.1.6. Holocelulose

A holocelulose é constituída de celulose e hemiceluloses A e B. Sendo, portanto, a soma desses três constituintes igual ao valor da holocelulose.

O método do clorito ácido é o mais empregado devido sua praticidade e facilidade no manuseio do agente oxidante. O dióxido de cloro é mais seletivo que o cloro durante a deslignificação e por isso os métodos envolvendo dióxido de cloro são preferidos em relação a outros (BROWNING, 1967).

O método do clorito ácido consiste em reagir clorito de sódio com ácido, formando ácido cloroso, que se decompõe formando dióxido de cloro, como produto principal, e íons clorato e cloreto como subproduto. As reações que ocorrem num sistema de clorito ácido não são bem definidas uma vez que os produtos formados dependem da temperatura, pH e outros fatores (BROWNING, 1967).

A 60 °C a seguinte reação ocorre:



1.4.1.7. Hemiceluloses

As hemiceluloses são quase sempre isoladas da madeira com soluções alcalinas aquosas. Depois das hemiceluloses serem solubilizadas, usa-se no filtrado uma combinação de tratamentos, como por exemplo, uma mistura que contenha etanol e uma quantidade de ácido em excesso para neutralizar o álcali e precipitar as hemiceluloses (BROWNING, 1967). Embora seja possível quantificar por tratamento alcalino as hemiceluloses A e B, os resultados baseados nessas diferenças de solubilidades não são satisfatórios, sendo mais indicado determinar os teores de hemiceluloses totais.

1.4.1.7.1. Hemicelulose A

Na extração da holocelulose, uma primeira extração com KOH 5% remove os polissacarídeos mais solúveis. Esta solução menos concentrada é usada primeiramente para evitar inchaço excessivo que ocorre quando a holocelulose é tratada diretamente com KOH 5%. As glucuronoxilanas são facilmente dissolvidas pelas soluções de KOH diluídas (BROWNING, 1967).

1.4.1.7.2. Hemicelulose B

A segunda extração da holocelulose é feita com KOH 24% para remover os demais polissacarídeos denominados glucomananos (BROWNING, 1967).

1.4.1.8. Celulose

O resíduo fibroso que não se solubilizou em soluções alcalinas é o que se denomina α -celulose. Na formação da molécula de celulose, acontecem reações sucessivas entre hidroxilas do carbono 1 de β -D-glucoses, com hidroxilas do carbono 4 de outras β -D-glucoses, dando origem a um polímero linear formado exclusivamente por unidades de β -D-glucose (Figura 5).

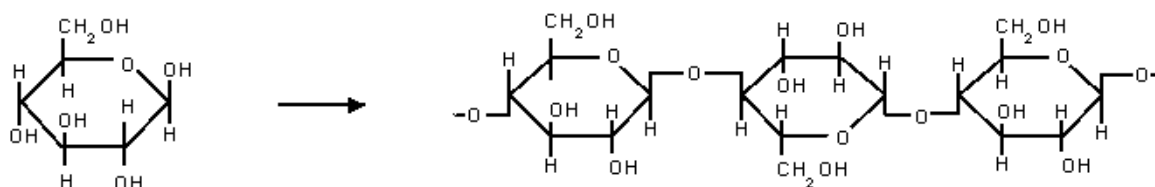


Figura 5 – Representação esquemática da formação da celulose.

1.4.2. Espectrofotometria no UV- Visível

A principal função da espectrofotometria no UV-Visível, neste trabalho, foi identificar e quantificar cromóforos que exibem a característica de absorver luz na faixa compreendida entre 200 a 850 nm. A espectroscopia na faixa do visível (400 a 850 nm) para compostos fenólicos só é possível através de uma reação específica de modo a se obter um produto colorido em proporção linear ou direta à quantidade de material fenólico presente nas amostras (CHANG, 2000). Estes ensaios colorimétricos têm pontos de absorção máximos pré-definidos.

Ensaio realizado com ajuda de um espectrofotômetro:

- Determinação de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.
- Determinação de proantocianidinas pelo método da vanilina.
- Atividade antioxidante pelo método da redução do radical livre DPPH[·].

1.4.2.1. Determinação de Fenóis Totais pelo Método de Folin-Ciocalteu

Um dos métodos mais utilizados para esta determinação está baseado nos estudos de Singleton e Rossi, que estudaram as características do reagente de Folin-Ciocalteu (SINGLETON e ROSSI, 1965).

O ensaio para a determinação de fenóis totais emprega o reagente de Folin-Ciocalteu, que nada mais é que uma solução ácida de polímeros complexos dos ácidos fosfomolibdídico e fosfotungstístico, na qual o molibdênio e o tungstênio encontram-se no estado de oxidação 6⁺, porém, em presença de certos agentes redutores, como os compostos fenólicos, formam-se os chamados molibdênio azul e tungstênio azul, nos quais a média do estado de oxidação dos metais está entre 5 e 6 e cuja coloração permite a determinação da concentração das substâncias redutoras, que não necessariamente precisam ter natureza fenólica (NACZK e SHAHIDI, 2004; IKAWA et al., 2003). Este reagente de cor amarela oxida os fenolatos e reduz os ácidos deste reativo para dar lugar a um complexo azul de molibdênio-tungstênio, registrado a 760 nm.

1.4.2.2. Determinação de Proantocianidinas pelo Método da Vanilina

Este ensaio é amplamente utilizado na determinação quantitativa de taninos condensados em extratos vegetais e se baseia na reação da vanilina com o anel A substituído na posição meta de um flavanol que leva à formação de um grupo cromóforo que absorve na faixa em torno de 500 nm.

1.4.2.3. Atividade Antioxidante

Em 1954, Gershman e Gilbert propuseram que a maioria dos efeitos danosos causados pelas concentrações elevadas de oxigênio nos organismos vivos podia ser atribuída à formação de radicais livres. Entretanto, essa ideia não despertou interesse de muitos pesquisadores até a descoberta, em 1968, de uma enzima que é específica para a remoção catalítica de um radical de oxigênio (McCORD e FRIDOVICH, 1969). Essa enzima, denominada superóxido dismutase, juntamente com outras duas – catalase e glutathione peroxidase – são as principais defesas antioxidantes que atuam nos organismos superiores (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1989).

Os compostos antioxidantes protegem os sistemas biológicos contra os efeitos maléficos de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio derivados do metabolismo normal ou de origem externa que podem danificar vários tipos de macromoléculas celulares como lipídios, proteínas e DNA. Entre os compostos vegetais com atividade antioxidante, destacam-se os polifenóis. A principal classe de

compostos fenólicos é representada por ácidos hidroxicinâmicos, encontrados em quase todas as plantas (NEBESNY e BUDRYN, 2003).

O processo de extração de antioxidantes naturais constitui mecanismo complexo e envolve diversas técnicas, dentre as quais a extração convencional e a supercrítica. Exige controle rigoroso de fatores como a polaridade do solvente utilizado, o tempo e a temperatura de extração, pois pode ocorrer perda ou destruição dos compostos antioxidantes (ANDREO e JORGE, 2006).

1.5. ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Há séculos o homem busca, na natureza, principalmente nos vegetais, as curas para os males que o afligem. Os vegetais são considerados verdadeiros laboratórios bioquímicos complexos que, dentre várias substâncias, sintetizam os princípios ativos naturais. No início do século XIX, com o desenvolvimento da química farmacêutica, as plantas passaram a representar a primeira fonte de substâncias para o desenvolvimento de medicamentos. Atualmente, apesar do grande desenvolvimento da síntese orgânica e de novos processos biotecnológicos, 25% dos medicamentos prescritos nos países industrializados são originários de plantas. De fato, os produtos naturais estão envolvidos no desenvolvimento de 44% de todos os novos fármacos. Em algumas áreas, como aquelas que envolvem doenças como o câncer e doenças infecciosas, em torno de 60% dos fármacos, são de origem natural (NEWMAN et al., 2003).

A busca de substâncias com atividades antimicrobianas tem direcionado a atenção sobre os produtos naturais e, entre estes, os derivados das plantas superiores têm, nos últimos anos, despertado a investigação para o potencial da

flora brasileira (ALMEIDA et al., 1998; ALVES et al., 2000; RATES, 2001; SUFFREDINI et al., 2004; MICHELIN et al., 2005; LIMA et al., 2006).

O interesse em plantas com propriedades antimicrobianas tem reaparecido devido aos vários problemas associados ao uso intermitente de antibióticos, principalmente àqueles relacionados com a resistência de algumas linhagens de microrganismos contra vários medicamentos (SOUZA et al., 2002; KOKOSKA et al., 2002). Segundo Baquero e Blázquez (1997) o consumo de mais de uma tonelada diária de antibióticos em alguns países da Europa tem resultado na resistência de populações bacterianas, causando assim um sério problema de saúde pública. Esses autores relataram o perigo do retorno a uma era pré-antibiótico, particularmente considerando que nenhuma nova classe de antibiótico foi descoberta nos últimos anos, apesar das intensas pesquisas das indústrias farmacêuticas. Em vista do presente cenário, a busca por novas substâncias antimicrobianas a partir de fontes naturais, incluindo plantas, tem ganhado importância nas companhias farmacêuticas.

1.5.1. Constituição da Cavidade Bucal e Anatomia Dental

A cavidade bucal possui estruturas anatômicas distintas, sendo compreendidas basicamente por um tecido duro (dentes) e por tecidos moles como mucosas alveolares e ceratinizada e língua. A renovação constante das superfícies por descamação previne o acúmulo de microrganismos. Entretanto, os dentes apresentam uma superfície dura não-descamativa que favorece o desenvolvimento de grandes depósitos bacterianos. Já a mucosa bucal é caracterizada por contínua

descamação das células epiteliais permitindo a rápida eliminação de bactérias aderidas na mucosa (MARCOTTE e LAVOIE, 1998).

A cavidade bucal compreende os seguintes elementos (Figura 6):

A) Dente:

A.1- Dentina – Composto de 70% de substâncias inorgânicas, 18% de substâncias orgânicas e 12 % de água.

A.2- Esmalte – Composto de 92 a 96% de substâncias inorgânicas, 1 a 2% de substâncias orgânicas e 3 a 4% de água. As formas moleculares são: 60% de cristais de apatita, 30% de fosfato tricálcico, 1% de carbonatos livres e 9% de matéria orgânica e compostos minerais pouco abundantes. É composto de 90% de hidroxiapatita sendo o radical OH substituído pelo flúor formando a fluorapatita, sendo com isso mais resistente à descalcificação.

A.3- Polpa – Ocupa a cavidade central do dente, é constituída por tecido conjuntivo frouxo, composto por fibras colágenas e reticulares, substância fundamental amorfa, fluido intercelular, arteríolas, vênulas, vasos linfáticos e suprimento nervoso (NISENGARD e NEWMAN., 1994). Neste tecido, estão presentes células mesenquimais indiferenciadas, odontoblastos, fibroblastos e células de defesa, imunocompetentes. Este tecido é circundado por parede destinaria rígida que fisicamente restringe o tecido (BARBOSA, 1999).

B) Periodonto:

B.1- Gengiva – Tecido mole que cobre o osso alveolar

B.2- Cimento – Reveste a raiz anatômica dos dentes, é semelhante em vários aspectos ao tecido ósseo, diferindo por ser avascular.

B.3- Ligamento periodontal – Tecido ricamente vascularizado e mole que está em torno da raiz do dente e une o cemento com a lâmina dura do osso alveolar.

B.4 - Osso alveolar – O processo alveolar é a parte da mandíbula e das maxilas em que os dentes estão inseridos.

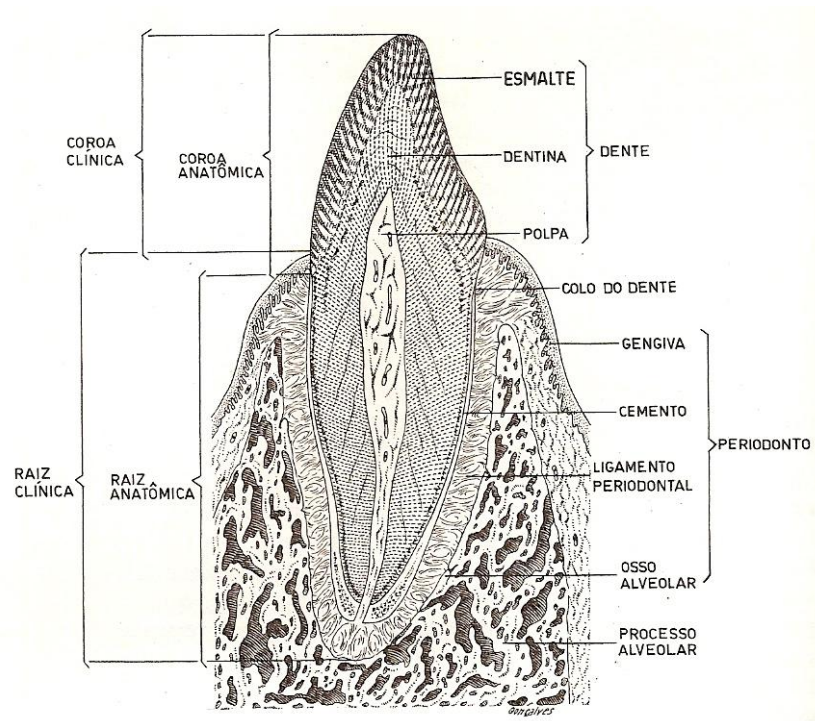


Figura 6 - Diagrama de corte longitudinal de dente (LINDHE, 1999).

1.5.2. Microbiota Bucal

Durante a vida, todas as superfícies do corpo são expostas à colonização por uma grande variedade de microrganismos (LINDHE, 1999). Vários compartimentos orgânicos do corpo humano abrigam uma série de microrganismos que infectam esses locais, mesmo no estado saudável, constituindo a microbiota própria de cada local. O motivo da não existência de uma microbiota única em todas as partes do

corpo deve-se inicialmente ao fato de cada região ser um habitat diferente, com condições ambientais diferentes. As composições teciduais, os nutrientes necessários para cada microrganismo, teores de umidade, pH, taxas de oxigênio, receptores para aderência bacteriana, entre outros, se diferem em cada parte do corpo. Com isso, os microrganismos colonizam certa região e se adaptam às suas condições ecológicas (DE LORENZO, 2004).

A cavidade bucal é um órgão ecologicamente especial, um local que, em função de sua complexidade anatômica, comporta uma microbiota com diferenças marcantes em sua composição, tanto no aspecto qualitativo como quantitativo (THEILADE, 1990). A microbiota bucal é uma das mais complexas de todo o corpo humano. Mais de 700 espécies bacterianas já foram detectadas através de métodos moleculares, das quais somente 40% foram cultivadas em laboratório (AAS et al., 2005).

Os microrganismos são encontrados na saliva em populações não aderidas e em comunidades organizadas, dentro de uma matriz complexa de produtos extracelulares microbianos e compostos salivares crescendo nas superfícies do esmalte dental, conhecida como biofilme (MARSH, 2005), podendo estar aderidos nas superfícies do dente e língua.

Após a limpeza dos dentes, macromoléculas hidrofóbicas são adsorvidas pelas superfícies, formando um filme condicionante denominado película adquirida. Este filme é composto por uma variedade de glicoproteínas salivares (mucinas), anticorpos, peptídeos e outras moléculas orgânicas (CLARK et al., 1978). A película altera a carga e a energia livre de superfície, aumentando a eficiência da adesão bacteriana (LINDHE, 1999). A firme aderência de bactérias à superfície dental revestida pela película salivar é o primeiro passo essencial para a formação do

biofilme dental (Placa Dental). O biofilme dental é uma comunidade microbiana organizada, dentro de uma matriz complexa composta de produtos extracelulares microbianos e compostos salivares crescendo nas superfícies do esmalte (MARSH, 2005)

2. JUSTIFICATIVA

Estudos preliminares e relatos da medicina popular indicam que o exsudado do caule e o chá da casca de amoreira apresentam propriedades medicinais, utilizados com ação cicatrizante, antiinflamatório e até analgésica. Além disso, esta madeira é largamente empregada como madeira de lei, pois mesmo em contato com solo, umidade e a adversidade do clima, construções com esta espécie pode perdurar por muitos e muitos anos. Portanto, o conhecimento da composição desta madeira é bastante importante.

OBJETIVOS

Esse estudo tem como objetivo quantificar e caracterizar os constituintes macromoleculares, constituintes voláteis, polifenóis, atividades antioxidante e antimicrobiana da madeira e casca da amoreira (*Maclura tinctoria* L.).

DESENVOLVIMENTO

2.1. MATERIAL E MÉTODOS

2.1.1. Instrumentação

- Balança de Luz Infravermelha da marca Kett, modelo FD-600.
- Balança Analítica da marca Ohaus-Marte modelo AS120, de precisão $\pm 0,1$ mg.

2.1.2. Reagentes e Soluções

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

- Solução de Carbonato de Sódio 7,5%: Dissolveu-se 3,75 g de carbonato de sódio em água destilada, em um béquer. Transferiu-se para um balão volumétrico de 50,0 mL e completou-se o volume com água destilada.
- Solução de Ácido Gálico $50 \mu \text{ mL}^{-1}$: Pesou-se 12,5 mg de ácido gálico, a massa foi transferida para um balão volumétrico de 250,0 mL. A partir desta solução, foram feitas diluições para as concentrações 1, 10, 20, 30 e $40 \mu \text{ mL}^{-1}$.
- Solução de Vanilina $0,01 \text{ g mL}^{-1}$, em Ácido Sulfúrico 70% (v/v): A solução de ácido sulfúrico foi preparada, em um balão volumétrico de 50,0 mL,

com 35,0 mL do ácido e 15,0 mL de água destilada. Pesou-se 0,500 g de vanilina, que foi dissolvida em um béquer com uma solução de ácido sulfúrico 70%. Transferiu-se esta solução para um balão volumétrico de 50,0 mL, completou-se o seu volume com a solução de ácido sulfúrico 70%.

- Solução de Catequina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$: Pesou-se 0.500 g de catequina, a massa foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL. A partir desta solução, foram feitas diluições para as concentrações de 05, 10, 15, 20, 25, 35 e 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$.
- Solução do reativo de Folin-Ciocalteu 10%: Em um balão volumétrico de 100,0 mL adicionou-se 10,0 mL do reativo de Folin (VETEC) e completou-se o balão com água destilada.
- Solução de DPPH' 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$: Pesou-se 0,002 g DPPH', a massa foi transferida para um balão de 50,0 mL. Completou-se o balão com metanol.
- Solução de hidróxido de sódio 1%: Dissolveu-se 2,5 g de hidróxido de sódio em água destilada em um béquer. Transferiu-se para um balão volumétrico de 250,0 mL e completou-se o volume com água destilada.
- Solução de ácido acético 10%: Utilizou-se um balão volumétrico de 100,0 mL, com 10,0 mL do ácido e 90,0 mL de água destilada.
- Solução de ácido sulfúrico 72%: Utilizou-se um balão volumétrico de 50,0 mL, com 36,0 mL do ácido e 14,0 mL de água destilada.

- Solução de acetato de sódio 20%: Dissolveu-se 20,0 g de acetato de sódio em água destilada em um béquer. Transferiu-se para um balão volumétrico de 100,0 mL e completou-se o volume com água destilada.
- Solução de clorito de sódio 40%: Dissolveu-se 40,0 g de clorito de sódio em água destilada em um béquer. Transferiu-se para um balão volumétrico de 100,0 mL e completou-se o volume com água destilada.
- Solução de hidróxido de potássio 5%: Dissolveu-se cerca de 5,00 g de hidróxido de potássio em água destilada em um béquer. Transferiu-se para um balão volumétrico de 100,0 mL e completou-se o volume com água destilada.
- Solução de hidróxido de potássio 24%: Dissolveu-se cerca de 24,00 g de hidróxido de potássio em água destilada em um béquer. Transferiu-se para um balão volumétrico de 100,0 mL e completou-se o volume com água destilada.

2.2. METODOLOGIA

Os ensaios químicos foram realizados no Laboratório de Química dos Produtos Naturais da Universidade Federal de Uberlândia – UFU. Já as análises de atividade antimicrobiana foram feitas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada – LAPEMA – da Universidade de Franca – UNIFRAN.

2.2.1. Procedência e Preparação das Amostras de Madeira e da Casca

A amoreira, com idade de 8 anos, foi coletada em fevereiro de 2007, entre 0,7 e 1,30 m acima do solo, com 15 cm de diâmetro, foi coletada em uma reserva natural particular de 21,0 ha, localizada no Sítio da Cascata (latitude 21° 6'3.97"S; longitude 45° 5'20.82"O), em altitude de 850 m, situado no município de Perdões, MG.

Essa madeira foi cortada em forma de tronco que, posteriormente, foi descascada, transformada em discos de aproximadamente 2,0 cm, moídos em moinho de bolas. A serragem resultante foi separada em peneiras de 80 mesh. A casca, também, passou pelo mesmo processo de moagem e peneiração. Todos os testes realizados com essas amostras (madeira e casca moídas) foram em triplicata e os resultados correspondem à média $\pm$ o desvio padrão.

2.2.2. Determinação do Teor de Umidade

Para a determinação da umidade, utilizou-se uma balança de luz infravermelha da marca Kett, modelo FD-600. As amostras de aproximadamente 1,00 g foram deixadas a uma temperatura de 105 °C por quinze minutos até que o teor de umidade ficasse constante. Calculou-se o rendimento.

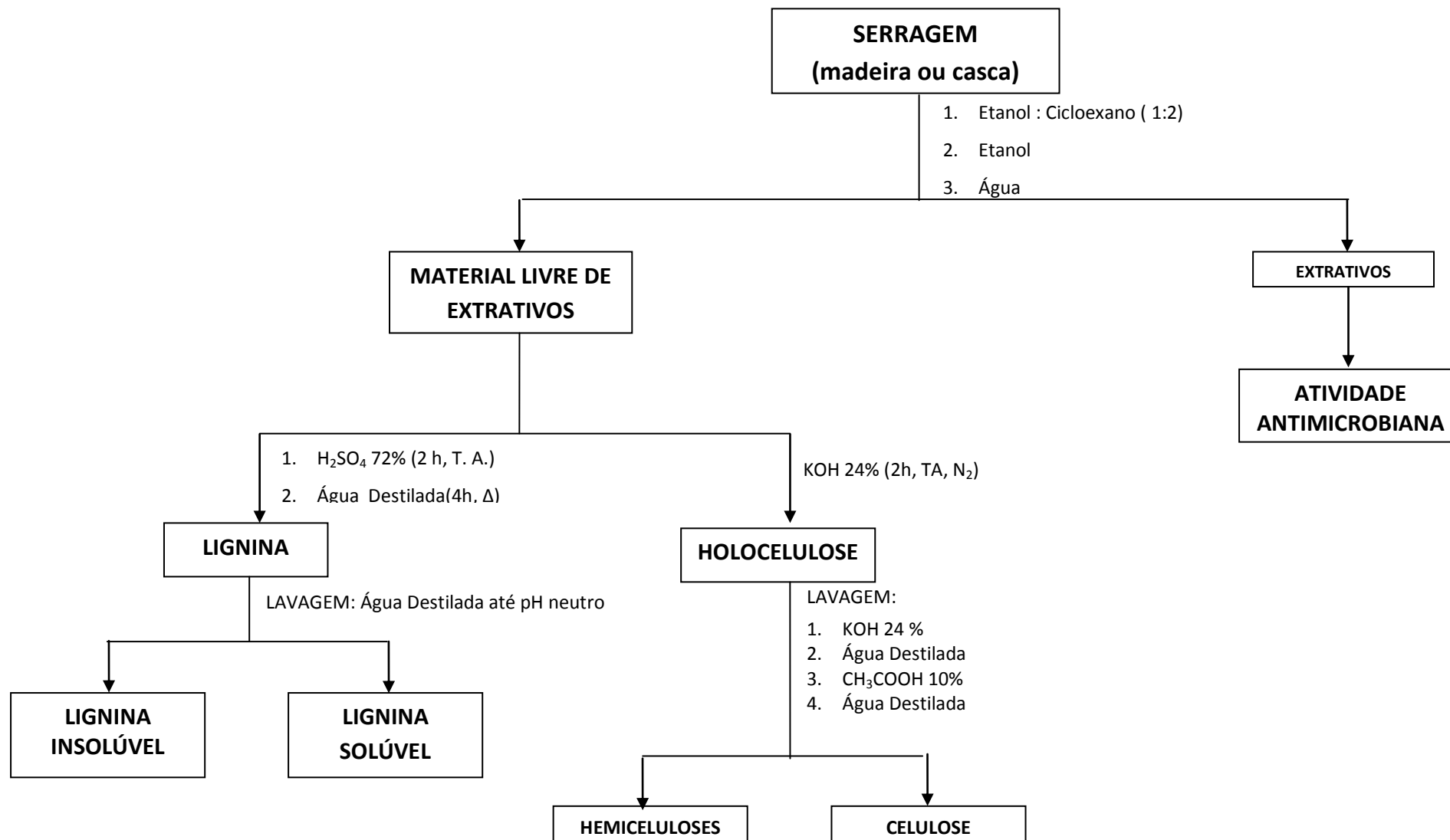


Figura 7 – Fluxograma para a análise química de madeiras e cascas.

2.2.3. Análise Química

2.2.3.1. Preparação Livre de Extrativos

Cerca de 4,00 g de amostra foi colocada em um cartucho de papel de filtro e levada ao extrator de Soxhlet (Figura 8). Foram feitas três extrações com solventes distintos em sequência. A primeira extração teve como solvente uma mistura bifásica etanol (95%): cicloexano ($1:2 \text{ v v}^{-1}$). Na segunda o solvente utilizado foi o etanol 95% e, por último, a extração foi feita com água. Todas as extrações foram feitas até se verificar a total descoloração do solvente sifonado. Calculou-se o rendimento.



Figura 8 – Desenho do Aparelho Extrator de Soxhlet.

2.2.3.2. Tratamento Alcalino para Extração dos Ácidos Fenólicos da Casca

Cerca de 2,00 g de casca, livre de extrativos, foi tratada por 1 h a 90 °C com 200,0 mL de solução aquosa de hidróxido de sódio 1%. O resíduo foi filtrado, em cadinho de vidro, e lavado sucessivamente com 100,0 mL de água quente, 50,0 mL

de ácido acético 10% e 200,0 mL de água quente, seco e pesado. Do resíduo obtido, fizeram-se as determinações de lignina de Klason e de holocelulose.

2.2.3.3. Determinação da Lignina Insolúvel (Lignina de Klason)

A lignina de klason foi determinada de acordo com o método TAPPI (TAPPI T 222 om-88, 1999). Cerca de 1,00 g absolutamente seca de amostra, livre de extrativos e tratada com NaOH 1%, foi colocada em um béquer e adicionou-se 15,0 mL de uma solução de ácido sulfúrico 72%, de forma lenta e sob agitação constante. A mistura foi deixada em repouso por duas horas à temperatura ambiente, agitando-se a cada 10 minutos. Em seguida, foram adicionados 560,00 mL de água destilada, deixou-se a solução em banho-maria por quatro horas, com periódica agitação e adição de água para manter o volume constante. Depois disso, a solução foi resfriada, filtrada e o resíduo lavado com água destilada até pH neutro. O resíduo foi seco em estufa a $105 \pm 3^{\circ}\text{C}$, até massa constante. Determinou-se o rendimento pela diferença entre as massas.

2.2.3.4. Determinação da Lignina Solúvel

A determinação de lignina solúvel foi calculada de acordo com o procedimento descrito por Gomide e Demuner (1986). O filtrado da solução anterior (Item 2.2.3.3) foi colocado em um balão volumétrico de 1,0 L e completado com água destilada até ajustar o menisco. A partir dessa solução, retirou-se 10,0 mL e acrescentou-se mais 5,0 mL de água destilada, formando assim uma segunda

solução. Partindo dessa segunda solução, registrou-se o espectro no ultravioleta (UV) na faixa de 205 a 280 nm.

As leituras de absorvância foram ajustadas para estarem entre 0,3 e 0,7. Se necessário, a solução deve ser diluída com uma quantidade conhecida de solução em branco. Se a absorvância for muito baixa, deve-se concentrar a solução através de evaporação. A absorvância do branco não deve ser superior a 0,01.

2.2.3.5. Determinação da Holocelulose

Os teores de holocelulose, hemiceluloses e α -celulose foram determinados pelos métodos descritos por Browning (1967).

Em um erlenmeyer de 1,0 L foram adicionados cerca de 4,00 g de amostra livre de extrativos. Em seguida, foram adicionados 110,0 mL de água destilada, 3,0 mL de ácido acético glacial, 22,0 mL de solução de acetato de sódio a 20 % e 9,0 mL de clorito de sódio a 40%, respectivamente. A mistura foi homogeneizada, com agitação, tampada e colocada em banho-maria a 75 °C por 30 minutos, com agitação frequente.

A adição dos reagentes foi repetida por mais três vezes. Em seguida, a solução foi filtrada em cadinho de vidro sintetizado, sob vácuo. O filtrado foi lavado com cerca de 1,0 L de água destilada, sob vácuo, em seguida com duas porções pequenas de acetona (cerca de 10,0 mL em cada) e aspirada até a holocelulose ficar relativamente seca. O produto foi seco em um dessecador, sob vácuo, até massa constante e o rendimento calculado.

2.2.3.6. Determinações de Hemiceluloses e α -Celulose

Cerca de três gramas de holocelulose (Item 2.2.3.5) foram pesadas e transferidas para um frasco de erlenmeyer de 250,0 mL, em atmosfera de nitrogênio; foram adicionados 100,0 mL de hidróxido de potássio a 24%, a 25 °C. A solução foi homogeneizada, o frasco vedado e colocado em banho-maria a 25 °C por 120 minutos, agitando-se a cada 10 minutos. Após a extração, a mistura foi lavada no mesmo cadinho filtrante usado anteriormente, utilizando-se um kitassato de 500,0 mL e lavada sucessivamente com 25,0 mL de solução de KOH 24%, 50,0 mL de água destilada, 25,0 mL de ácido acético a 10% e 100,0 mL de água destilada e transferida para um vidro de relógio e seco em um dessecador, sob vácuo, até massa constante. O precipitado obtido foi a α -celulose e as hemiceluloses foram calculadas por diferença de massa.

2.2.4. Análise dos polifenóis

2.2.4.1. Obtenção dos Extrativos Polifenólicos

2.2.4.1.1. Metanol-água 4:1(v v⁻¹)

Cerca de 10,00 g de amostra foram colocadas em um béquer com 300,0 mL da mistura metanol-água 4:1(v v⁻¹). A mistura foi deixada por 24 horas em temperatura ambiente, com agitação e no escuro, quando foi filtrada. Do filtrado obtido retirou-se uma alíquota de 10,0 mL para cálculo de rendimento. Essa alíquota foi levada à secar em béquer previamente tarado e sua massa foi pesada após 18

horas em estufa a 105 °C. O restante do filtrado obtido foi evaporado à temperatura igual ou inferior a 40 °C para eliminar o metanol. A esse extrato foi dado o nome de MA.

2.2.4.1.2. Acetona-água 7:3 ($v\ v^{-1}$)

Cerca de 10,00 g de amostra moída foram colocadas em um béquer com 300,0 mL da mistura acetona-água 7:3 ($v\ v^{-1}$). A mistura foi deixada por 24 horas em temperatura ambiente, com agitação e no escuro, quando foi filtrada. Do filtrado obtido retirou-se uma alíquota de 10,0 mL para cálculo de rendimento. Essa alíquota foi levada à secura em béquer previamente tarado e sua massa pesada após 18 horas em estufa a 105 °C. O restante foi evaporado à temperatura inferior ou igual a 40 °C para eliminar a acetona. A esse extrato foi dado o nome de AA.

2.2.4.2. Determinação do Teor de Fenóis Totais

Retirou-se 0,1 mL dos extratos brutos (MA e AA) e diluiu-se com água até o volume de 50,0 mL. Desta solução, retirou-se uma alíquota de 0,5 mL que foi transferida para um tubo de ensaio. Adicionou-se 2,5 mL de uma solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteu a 10 % e 2,0 mL de uma solução recém-preparada de carbonato de sódio a 7,5 %. A mistura foi mantida por 5 minutos em banho aquecido a 50 °C; em seguida, leu-se a absorbância a 760 nm. Fez-se, também, uma curva de calibração com soluções aquosas de ácido gálico em diversas concentrações contra um branco sob as mesmas condições. A concentração das amostras foi determinada a partir da equação da reta obtida.

2.2.4.3. Determinação de Proantocianidinas

Retirou-se 0,1 mL de cada extrato bruto (MA e AA), da casca e da madeira, e diluiu-se com água até o volume de 10,0 mL. Em um tubo de ensaio, colocou-se 1,0 mL do extrato diluído e adicionaram-se 2,0 mL de uma solução recém-preparada de vanilina em ácido sulfúrico 70% na concentração de 10,0 g L⁻¹. Aqueceu-se a solução resultante em banho de água a 50 °C por 15 minutos. Registrou-se a absorvância a 500 nm. Juntamente com os extratos, preparou-se uma curva de calibração com catequina. Tanto as amostras quanto os padrões da curva de calibração passaram pelo mesmo tratamento. A leitura foi feita contra um branco. Os resultados estão expressos em equivalentes de catequina (HAGERMAN, 2006). A concentração das amostras foi determinada a partir da equação da reta obtida.

2.2.5. Atividade Antioxidante e Cálculo de CE₅₀

A atividade antioxidante foi determinada, através do radical livre estável 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH•) seguindo o método descrito por Brand-Williams et al. (1995) e modificado por Yildirim et al. (2001). A amostra moída foi submetida à extração com metanol (cerca de 1,00 g em 10,00 mL por 15 min a 65°C). A solução obtida, para a casca, foi filtrada e teve seu volume ajustado para 25,00 mL, enquanto que, para a madeira, o volume foi ajustado para 75 mL. Para quantificação dos extrativos solúveis 1,00 mL desta solução foi recolhida e seca num frasco tarado a 105 °C, durante 6 horas, resfriado à temperatura ambiente e pesado. O filtrado foi submetido a 5 diluições sucessivas (Tabela 4). Para cada solução, foi tomada uma amostra de 0,10 mL e adicionado 3,90 mL de solução de DPPH• de concentração

aproximada de $80 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol. Também, foi feito um branco nas mesmas condições, mas sem o DPPH•. Após a adição do radical DPPH•, as soluções foram deixadas em repouso e suas absorvâncias registradas no comprimento de onda de 517 nm durante uma hora, em intervalos de cinco minutos entre cada leitura. A porcentagem de DPPH-H que reagiu (atividade antioxidante) foi calculada pela expressão:

$$\text{DPPH}_{\text{reagido}}(\%) = \frac{\text{AbvC} - (\text{AbvA} - \text{AbvB}) \times 100}{\text{AbvC}} \quad (3)$$

Onde:

AbvC, AbvB e AbvA correspondem às absorvâncias do controle, branco e amostra, respectivamente.

Tabela 4 - Diluições feitas a partir da solução-amostra testada para madeira e casca de amoreira.

CONCENTRAÇÃO DA SOLUÇÃO TESTADA*	V _{EXTRATO} (mL) (madeira ou casca)	V _{METANOL} (mL)
100%	1,00	-
83%	1,00	0,20
66%	1,00	0,50
49%	1,00	1,00
32%	1,00	2,20
15%	1,00	5,70

*Solução preparada a partir da diluição do extrato inicial da madeira ou da casca para a realização do teste de atividade antioxidante.

Cálculo do CE₅₀ (quantidade de antioxidante necessário para decrescer a concentração inicial de DPPH• para 50%). Primeiramente fez-se uma curva analítica de calibração para o radical DPPH• em diferentes concentrações. Em seguida,

calcularam-se as porcentagens de DPPH remanescentes (CE_{50}), ou seja, a quantidade de DPPH• que não reagiu com os antioxidantes através da Equação 4:

$$CE_{50} = \frac{[DPPH]_t}{[DPPH]_{t_0}} \times 100 \quad (4)$$

Onde: t = tempo onde absorvância do DPPH estável

t_0 = é o tempo zero.

A concentração efetiva média (CE_{50}), que representa a concentração de amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH•, foi calculada plotando-se a porcentagem de DPPH-H versus as concentrações dos extratos de cada amostra (ARGOLO et al., 2004).

2.2.6. Análise Biológica dos Extratos Brutos

As análises de atividade antimicrobiana foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca, LaPeMa, com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins.

2.2.6.1. Atividade Antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi determinada utilizando o método da microdiluição em caldo segundo o CLSI para os microrganismos aeróbios (CLSI, 2006) e CLSI para os microrganismos anaeróbios (CLSI, 2007).

2.2.6.1.1. Microrganismos Utilizados nos Ensaios

Para a determinação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos, obtidos a partir das seguintes extrações em aparelho de soxhlet, etanol:cicloexano(1:2 v v⁻¹), etanol e água (Item 2.2.3.1); e de maceração em metanol/água(4:1 v v⁻¹) e acetona/água (7:3 v v⁻¹) (Item 2.2.4), da madeira e da casca da amoreira foram utilizadas as seguintes cepas padrão provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Actinomices naeslundii*, (ATCC 19039), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Prevotella nigrescens* (ATCC 33533) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 49417) (Tabela 5).

Tabela 5 - Microrganismos, procedência, morfotipos e meios de culturas utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana

Microrganismo/Cepas Padrão ATCC	Morfotipo	Meio de cultura do inoculo	Meio de cultura do teste
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	Coco Gram positivo	TSB Ágar	TSB
<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456	Coco Gram positivo	TSB Ágar	TSB
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Coco Gram positivo	TSB Ágar	TSB
<i>Actinomices naeslundii</i> ATCC 19039	Bacilo Gram positivo	Schaedler Ágar	Schaedler
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	Bacilo Gram negativo	Schaedler Ágar	Schaedler
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	Bacilo Gram negativo	Schaedler Ágar	Schaedler
<i>Prevotella nigrescens</i> ATCC 33563	Bacilo Gram negativo	Schaedler Ágar	Schaedler
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 49417	Bacilo Gram negativo	Schaedler Ágar	Schaedler

TSB: Triptona de soja

2.2.6.1.2. Meios de Cultura Utilizados

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

Caldo Schaedler (BD[®])

Composição:

Digestão Pancreática de Caseína	8,1g
Digestão Peptídica de Tecido Animal	2,5 g
Digestão Papaínica de farelo de soja	1,0 g
Dextrose	5,82 g
Extrato de Levedura	5,0 g
Cloreto de Sódio	1,7g
Fosfato dipotássico	0,82g
Hemina	0,01g
L-Cystina	0,4g
TRIS (hidroximetil) aminometano	3,0g

Preparação:

Dissolveu-se aproximadamente 28,4 g do pó em 1000,0 mL de água destilada, o qual foi homogeneizado e autoclavado por 15 minutos a 121 °C. Após a autoclavação, foi suplementado com 1,0 mL de solução de Hemina a 5mg mL⁻¹ e 1,0 mL de solução de menadione a 1mg mL⁻¹.

Caldo triptona de soja- TSB (BD®)

Composição:

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

Preparação:

Dissolveu-se cerca de 30,0 g do pó de TSB em 1000,0 mL de água destilada, o qual foi homogeneizado e autoclavado por 15 minutos a 121 °C.

Base para ágar sangue (BD®)

Composição:

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

Preparação:

Dissolveu-se cerca de 40,0 g do pó em 1000,0 mL de água destilada, o qual foi aquecido e homogeneizado até a dissolução do pó e autoclavado por 15 minutos a 121 °C. Após a autoclavação, a base foi resfriada de 45 a 50 °C e adicionado 5% de sangue desfibrinado de carneiro e 25,0 mL dessa mistura colocados em placas de Petri.

Ágar Schaedler (BD[®])

Composição:

Digestão Pancreática de Caseína	8,2g
Digestão Peptídica de Tecido Animal	2,5g
Digestão Papaínica de farelo de soja	1,0g
Dextrose	5,8g
Extrato de Levedura	5,0g
Cloreto de Sódio	1,7g
Fosfato dipotássio	0,8g
Hemina	0,01g
L-Cystina	0,4g
TRIS (hidroximetil) aminometano	3,0g
Ágar.....	13,5 g

Preparação:

Dissolveu-se aproximadamente 41,9 g do pó em 1000,0 mL de água destilada, o qual foi aquecido e homogeneizado até a completa dissolução do pó, após foi autoclavado por 15 minutos a 121 °C. Logo em seguida, foi suplementado com 1,0 mL de solução de Hemina a 5mg mL⁻¹, 1,0 mL de solução de menadione a 1mg mL⁻¹ e 5% de sangue desfibrinado de carneiro e distribuídos 30,0 mL em placas de Petri.

O vocábulo “suplementado”, no decorrer do texto, deve ser considerado como a adição de 1,0 mL de solução de Hemina a uma concentração de 5 mg mL⁻¹ e 1,0 mL de menadione a uma concentração de 1,0 mg mL⁻¹ para cada 1,0 L de meio de cultura.

Solução Hemina

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

Solução Menadione

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

2.2.6.1.3. Avaliação da Atividade Antimicrobiana dos Extratos Vegetais

A atividade antimicrobiana dos extratos brutos da madeira e casca da amoreira foi determinada, utilizando método da microdiluição em caldo para determinação da concentração inibitória mínima (CIM).

2.2.6.1.3.1. Preparo das Amostras dos Extratos para o Método de Microdiluição

Para a realização da técnica de microdiluição em microplaca, todas as amostras selecionadas foram inicialmente preparadas com concentrações de aproximadamente $8000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (solução de partida). Para conseguir esta concentração, dissolveu-se 2,0 mg de cada amostra em 250 μL de DMSO.

Em seguida, preparam-se as seguintes soluções:

- Solução-mãe para o teste de microdiluição em caldo para aeróbios: Retirou-se 125 μL da solução de partida, colocou-se em um frasco de 10,0 mL e acrescentou-se 1875 μL de caldo TSB, obtendo-se uma nova solução de concentração 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.
- Solução-mãe para o teste de microdiluição em caldo para anaeróbios: Retirou-se 162,5 μL da solução de partida e acrescentou-se 2437,5 μL de caldo Schaedler suplementado, obtendo-se uma nova solução de concentração 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

2.2.6.1.3.2. Preparo do Inóculo

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

2.2.6.1.3.3. Preparação da Droga Padrão

A droga padrão utilizada para validação da técnica foi dicloridrato de clorexidina. Primeiro pesou-se cerca de 1,0 mg da droga e diluiu-se em 10,0 mL de água destilada esterilizada, tendo uma concentração de 0,1 mg mL^{-1} . Após, transferiu 1,0 mL dessa primeira diluição para um tubo, contendo 4,0 mL de caldo Schaedler suplementado; essa última diluição de concentração de 0,02 mg mL^{-1} é a

solução usada para a realização da técnica. Levou-se em consideração a potência de 100% da droga.

2.2.6.1.3.4. Controles Positivos e Negativos

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

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

2.2.6.1.3.5. Método da Microdiluição para Determinação da Concentração Inibitória Mínima

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

Realizou-se todo procedimento em capela de fluxo laminar, com os cuidados necessários; as vidrarias, ponteiras e os meios de cultura foram esterilizados. Foram utilizados microplacas estéreis com 96 orifícios. Cada orifício recebeu inóculo, caldo triptona soja ou caldo Schaedler e amostra das soluções preparadas, de tal maneira

que o volume final em cada orifício foi de 100,0 μL para os microrganismos aeróbios e 200,0 μL para os anaeróbios (Figura 09).

Avaliaram-se as amostras das soluções nas seguintes concentrações: 400,0 a 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Determinou-se, então, a menor concentração de cada amostra capaz de inibir o crescimento dos microrganismos indicadores.

As microplacas foram seladas com parafilme e incubadas a 37 °C por 24 horas. As placas que contêm *S. mutans*, *S. sanguinis* e *S. mitis* foram incubadas em microaerofilia pelo sistema de chama de vela. Após o período de incubação, foram adicionados em cada orifício 30,0 μL de resazurina (Sigma) preparado em solução aquosa (0,01%) para bactérias (Figura 09). Este sistema revelador permite a observação imediata da atividade antimicrobiana da amostra testada, sendo que a cor azul representa ausência de crescimento bacteriano e a cor vermelha, a presença de crescimento bacteriano (Figura 10). Os microrganismos anaeróbios são incubados por 48 a 72 horas em câmara de anaerobiose a 36 °C (Figura 11). Em seguida, utiliza-se o mesmo revelador (resazurina) para a determinação das concentrações inibitórias mínimas frente aos anaeróbios.

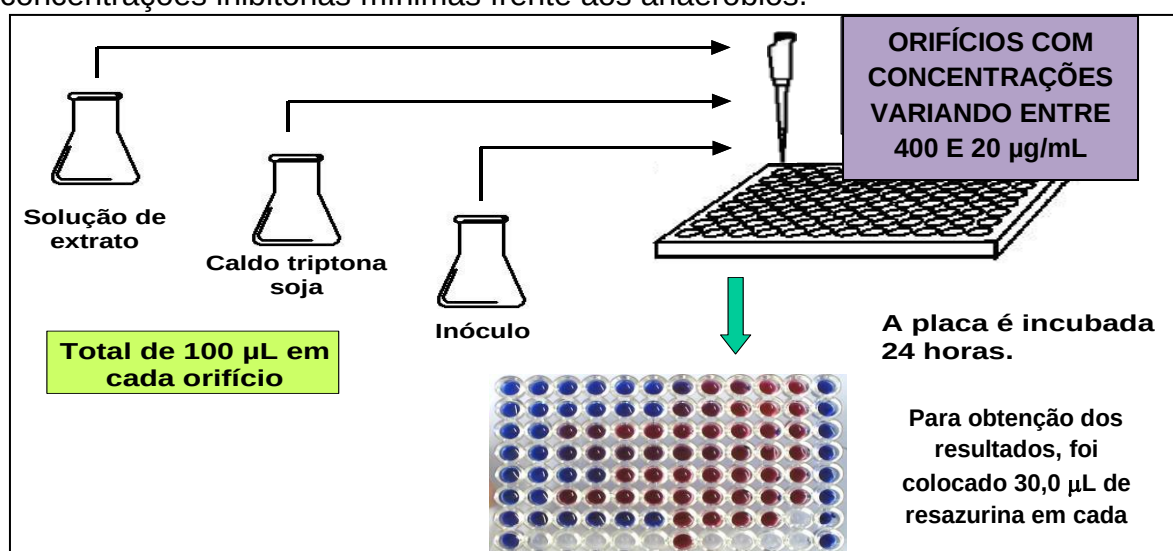


Figura 9 – Representação das etapas desenvolvidas para o método de microdiluição.

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

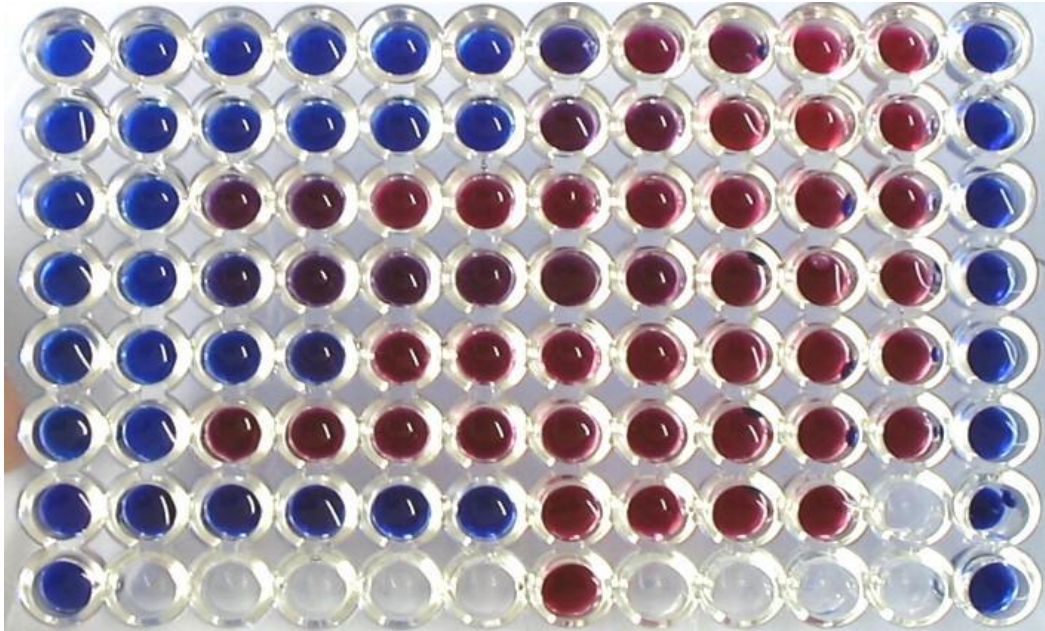


Figura 10 – Microplaca com as soluções dos extratos testadas frente a *S. mutans* reveladas com resazurina.



Figura 11 - Câmara de anaerobiose para incubação de microrganismos anaeróbios.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

2.2.7. Preparação das Amostras

A moagem da madeira foi a etapa mais problemática, visto que ela apresentou uma resistência bem grande ao processo, ficando inclusive no moinho de bolas durante semanas, processo que foi feito várias vezes, e nem assim conseguiu-se uma quantidade excedente às análises. Devido aos longos tempos de moagem, o moinho estragou três vezes, delongando vários meses para o conserto.

2.2.8. Análise Química da Madeira e da Casca

2.2.8.1. Determinação do Teor de Umidade

A determinação da umidade se faz necessária para a obtenção de amostras secas para as análises às quais serão submetidas. O teor de umidade da madeira foi de $15 \pm 0,5\%$ e da casca de $10 \pm 0,5\%$.

2.2.8.2. Extrativos

A Tabela 6 apresenta os teores de extrativos determinados para a madeira e casca de amoreira.

Tabela 6 - Teores de extrativos na amoreira obtidos em diversos solventes(%)

SOLVENTES	Madeira	Casca
Etanol:cicloexano	2,77 ± 0,41	20,77 ± 0,22
Etanol	3,87 ± 0,65	1,43 ± 0,71
Água quente	4,15 ± 0,92	12,48 ± 1,54
NaOH 1%	-	15,96 ± 0,80
TOTAL MÉDIO	10,79 ± 1,98	50,64 ± 3,47

Os extrativos com etanol:cicloexano e com água quente, apresentaram maior teor para casca do que com madeiras. Por outro lado, o extrato etanólico foi maior para a madeira. As cascas normalmente possuem teores dessas substâncias extraíveis superiores que suas respectivas madeiras. O que se confirma ao compararem-se os resultados da casca aos da madeira da mesma planta (CHOW et al., 2008; FENGEL e WEGENER, 1989).

Os elevados valores obtidos para o teor de extrativos ou mais provavelmente a sua composição podem justificar a dureza e resistência da madeira de amoreira a ataques mecânicos e de organismos xilófagos, mesmo em condições favoráveis ao apodrecimento. Estudos como os Findlay (1985), Lelles e Rezende (1986) e Paes (2002) sugerem que a resistência a biodeterioração é atribuída principalmente à presença de certas substâncias no lenho, como tanino ou outras substâncias fenólicas complexas, as quais são difícil decomposição pelos organismos xilófagos.

Deve-se levar em consideração que só o teor de extrativos não justifica a sua resistência. Como exemplo, pode-se citar a madeira de *Eucalyptus grandis* que possui aproximadamente 10% de extrativos e é uma madeira de degradação fácil em clima tropical (QUEIROZ, 2001). Segundo Fengel e Wegener (1989) além dos extrativos, a variação da quantidade de celulose, composição das hemiceluloses e o tipo de lignina e a associação destes constituintes que resultam na estrutura tridimensional das paredes celulares com características específicas para cada espécie de madeira, explica resistência à tração, compressão, umidade e também pode contribuir para a defesa ao ataque de insetos e patógenos.

2.2.8.3. Composição Macromolecular

Analisando os resultados da tabela 7, constata-se que amoreira se enquadra no perfil das folhosas, quando se compara o teor de lignina (CARVALHO et al., 2009). Observa-se que esta madeira possui um teor de α -celulose superior às madeiras de *Astronium urundeuva*, conhecida como aroeira-preta (QUEIROZ, 2001), de *Moquinia polymorpha*, conhecida popularmente como candeia (MORAIS et al., 2005), e de *Eucalyptus urophylla* (FENGEL e WEGENER, 1989), mas inferior às madeiras de *Cedrela fissilis*, chamada de cedro (MORAIS et al., 2003) e *Pinus oocarpa* (LIMA et al., 2007). O teor de lignina está dentro do esperado para folhosas (FENGEL e WEGENER, 1989). Nota-se que ela possui um teor de lignina inferior a madeiras de *Astronium urundeuva* (MORAIS, 1999; QUEIROZ, 2001), de *Cedrela fissilis* (MORAIS et al., 2003), de *Eucalyptus urophylla* (FENGEL e WEGENER, 1989) e de *Pinus oocarpa* (LIMA et al., 2007), sendo superior apenas a de *Moquinia polymorpha* (MORAIS et al., 2005). Portanto, a amoreira, assim como a aroeira-

preta, apesar de madeiras muito resistentes, apresentam teores relativamente abaixo de celulose e lignina em relação às demais madeiras.

Tabela 7 - Composições macromoleculares médias da casca e da madeira de amoreira e de algumas outras madeiras (%).

CONSTITUINTES	<i>Maclura tinctoria</i> L. (casca)	<i>Maclura tinctoria</i> L. (madeira)	<i>Astronium urundeuva</i> (QUEIROZ, 2001)	<i>Pinus oocarpa</i> (LIMA et al., 2007)	<i>Eucalyptus urophylla</i> (FENGEL e WEGENER, 1989)	<i>Cedrela fissilis</i> (MORAIS et al., 2003)	<i>Moquinia polymorpha</i> (MORAIS et al., 2005)
Lignina Solúvel	0,45 ± 0,01	1,28 ± 0,00	-	-	-	-	-
Lignina Insolúvel	18,77 ± 1,20	21,47 ± 1,25	23,84	22,40	27,71	28,60	21,34
Holocelulose	29,14 ± 1,90	69,43 ± 2,16	63,00	71,40	71,93	64,63	65,10
Celulose	21,14 ± 0,77	46,02 ± 1,53	34,86	52,41	44,91	47,69	44,98
Hemiceluloses	8,78 ± 0,42	23,59 ± 0,86	18,81	18,88	26,63	16,63	22,59
Extrativos Totais	50,64 ± 3,47	10,79 ± 1,98	18,19	11,70	6,40	10,17	11,07
ANÁLISE SOMATIVA	99,00 ± 6,58	102,97 ± 5,39	100,03	105,50	106,04	103,30	98,14

*Valores corrigidos para a madeira bruta.

A Tabela 8 mostra a composição macromolecular média da casca de amoreira comparada com outras cascas.

Tabela 8 - Composições macromoleculares médias das cascas de amoreira e de outras cinco plantas (KOFUJITA et al., 1999).

CONSTITUINTES	<i>M. tinctoria</i>	<i>P. densiflora</i>	<i>L. leptolepis</i>	<i>C. japonica</i>	<i>F. crenata</i>	<i>Q. mongolica</i>
Cinzas	-	2,2	1,2	2,3	7,3	5,7
Lignina Solúvel	0,45 ± 0,01	1,1	0,8	1,1	3,2	2,5
Lignina Insolúvel	18,77 ± 1,20	23,8	23,4	27,1	31,4	22,4
Holocelulose	29,14 ± 1,90	14,6	16,5	20,6	15,3	20,7
Extrativos	50,64 ± 3,47	58,0	56,9	49,3	41,4	47,6
ANÁLISE SOMATIVA	99,0 ± 6,58	99,7	98,9	100,4	98,6	98,9

Observa-se que a casca de amoreira possui um teor de holocelulose bem superior às cascas das plantas estudadas por Kofujita et al. (1999) (Tabela 8). Já em relação à lignina, tanto solúvel quanto insolúvel, possui um teor inferior às cascas das demais plantas. Mas o teor de extrativos está entre os valores encontrados na tabela 8, cujos teores variaram entre 41,4 e 58,0%.

A análise somativa pode ser considerada satisfatória, quando a soma é de aproximadamente 100% para todos os componentes determinados. Mas este objetivo é difícil de ser atingido ou obtido, especialmente se o número de análises individuais aumenta, causando lapsos ou sobrepondo resultados combinados com a adição de erros individuais.



Figura 12 – Material obtido da análise química da madeira de *M. tinctoria*.



Figura 13 - Material obtido da análise química da casca de *M. tinctoria*.

2.2.9. Análise dos Polifenóis

2.2.9.1. Obtenção dos Extrativos Polifenólicos

Os rendimentos obtidos por meio das extrações dos componentes polifenólicos da madeira e da casca de amoreira estão apresentados na Tabela 9.

Tabela 9 – Rendimento das extrações dos compostos polifenólicos (%)

AMOSTRA	Metanol/água (4:1, v v ⁻¹)	Acetona/água (7:3, v v ⁻¹)
Madeira	14,44 ± 0,56	20,48 ± 0,13
Casca	6,64 ± 0,84	8,41 ± 0,62

Com base nos resultados obtidos, pode-se dizer que as extrações realizadas em acetona/água foram mais eficientes do que as em metanol/água. O rendimento obtido é bastante superior aos descritos para madeiras de *Eucalyptus* (*E. camaldulensis*, *E. globulus*, *E. rudis*, *E. grandis*, *E. urophila*) que variam entre 2,6 e 12,0 %, quando obtidos em metanol-água e inferior aos extratos encontrados para a madeira de aroeira que foram de 18,7 e 22,4 para os extratos em metanol/água e acetona/água , respectivamente (QUEIROZ, 2001). O elevado teor de extrativos para a madeira de amoreira pode ser um indicativo da alta resistência desta madeira ao ataque de organismos xilófagos, mesmo em condições adequadas ao apodrecimento.

2.2.9.2. Determinação do teor de fenóis totais

A partir da determinação das absorvâncias obtidas para as amostras de concentrações conhecidas de ácido gálico, foi traçada uma curva analítica de calibração da absorvância pela concentração em $\mu\text{g mL}^{-1}$.

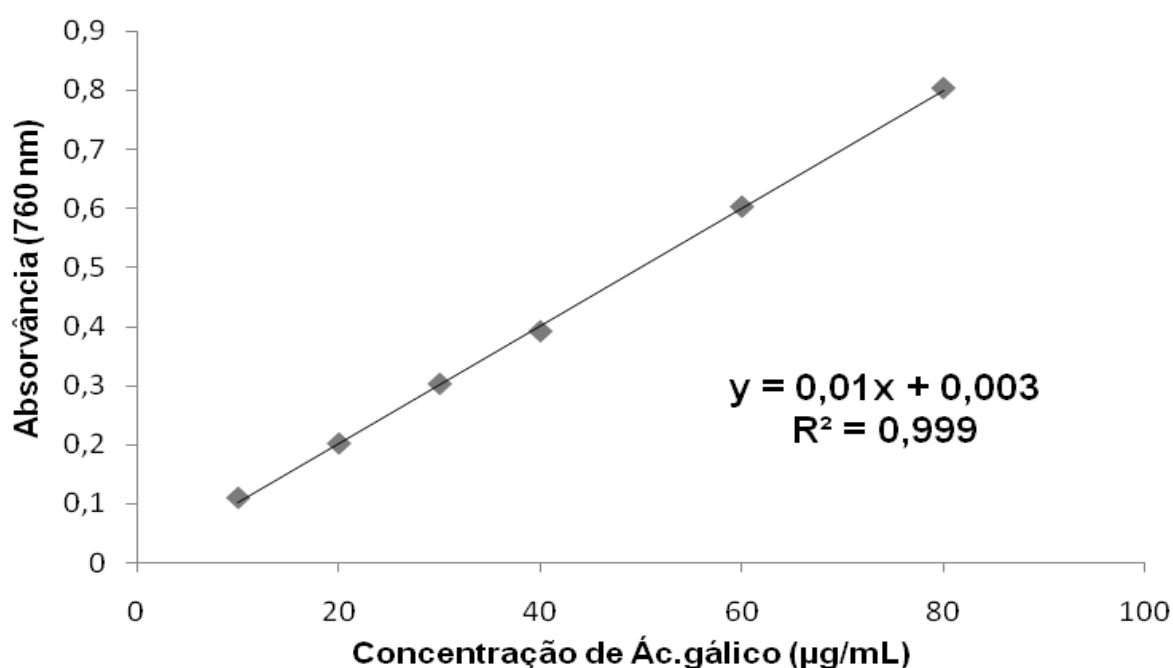


Figura 14 – Curva de calibração do ácido gálico.

No Brasil, os dois órgãos que regulamentam a validação de métodos analíticos são a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental (INMETRO), sendo que a ANVISA recomenda um coeficiente de correlação maior ou igual a 0,99 e o INMETRO considera um valor de r maior que 0,90 como sendo o usualmente requerido. Sendo assim, todas as curvas analíticas (Figuras 14, 15 e 16) estão dentro dos parâmetros brasileiros, além de apresentarem boa linearidade e todos os

coeficientes de correlação de equação da reta estão próximos de 1,0, indicando assim o quanto a reta pode ser adequada como modelo matemático.

Os resultados obtidos, valendo-se da curva de calibração e aplicando o método analítico de padronização externa (BOTTOLI et al., 2004), mostram o teor de fenóis totais, expressos em equivalentes ácido gálico/grama de amostra na Tabela 10.

Tabela 10 – Teor de fenóis totais (mg de EAG/g de amostra)

AMOSTRA	Metanol/água (4:1, v v⁻¹)	Acetona/água (7:3, v v⁻¹)
Madeira	38,43 ± 0,42	45,34 ± 0,86
Casca	35,03 ± 0,94	43,17 ± 1,18

A partir dos resultados obtidos, foi possível confirmar a presença e quantificar o teor de fenóis totais nos extratos testados. A madeira apresentou maior teor de fenóis totais que a casca, embora os resultados sejam próximos e, no caso da extração com acetona/água, as diferenças não foram significativas. Portanto, comparados os teores de fenóis totais com os teores de extrativos obtidos dos extratos metanol/água e acetona/água, constata-se que a madeira de amoreira deve apresentar outros constituintes, além dos fenóis totais quantificados pela metodologia de Folin-Ciocalteu, uma vez que o rendimento destes extratos foi bem superior na madeira (Tabela 9). Normalmente os teores de extrativos da casca são superiores aos da madeira (CHOW et al., 2008, FENGEL e WEGENER, 1989) e consequentemente o teor de fenóis totais, embora resultados relatando teores de fenóis bem mais elevados para madeiras, principalmente tratando-se do cerne, são relatados na literatura (CHANG, et al., 2001; WANG et al., 2004).

Na literatura são citados valores médios entre 5,9 e 17,5 mg g⁻¹ para o teor de fenóis totais para madeira de três espécies de *Eucalyptus* (*E. camaldulensis*, *E. globulus* e *E. rudis*) e para a casca destas mesmas três espécies supracitadas, encontraram-se valores entre 2,5 e 91,6 mg g⁻¹ para o teor de fenóis totais. Vázquez et al. (2008) encontraram 18,3 mg g⁻¹ para o teor de fenóis totais para cascas de *Eucalyptus globulus*. Em outros estudos, envolvendo a análise de compostos fenólicos em cascas de plantas, foram encontrados valores bem variados para os teores destes compostos, como se pode observar, comparando os resultados da casca de amoreira com os teores de fenóis totais nas cascas de *Acacia auriculiformis*, no extrato bruto metanólico foi de 10,9 mg g⁻¹ (SINGH et al, 2007a) e no extrato bruto em acetona foi de 300 mg g⁻¹ (SINGH et al, 2007b). Para a casca de *Terminalia brasiliensis*, no extrato etanólico, foram de 45,82 mg g⁻¹ (SOUSA et al, 2007).

Para às madeiras de *Astronium urundeuva*, conhecida como aroeira-preta (QUEIROZ, 2001), os valores encontrados foram de 43,8 mg g⁻¹ para o extrato acetona/água e de 37,7 mg g⁻¹ para o extrato metanol/água. Portanto, os valores determinados para a amoreira são muito próximos aos encontrados para madeira de aroeira, e bem superiores aos encontrados para algumas espécies de *Eucalyptus* estudadas, aproximando-se mais dos teores obtidos com cascas de vegetais. Dessa forma, o elevado teor de fenóis totais para a madeira de amoreira, assim como na aroeira, pode ser um indicativo da alta resistência desta madeira ao ataque de organismos xilófagos, mesmo em condições propícias ao apodrecimento (FINDLAY, 1985; LELLES e REZENDE, 1986; PAES, 2002).

2.2.9.3. Determinação de Proantocianidinas

A partir das absorvâncias das amostras de catequina em concentrações conhecidas, traçou-se uma curva analítica de calibração, apresentada na Figura 15.

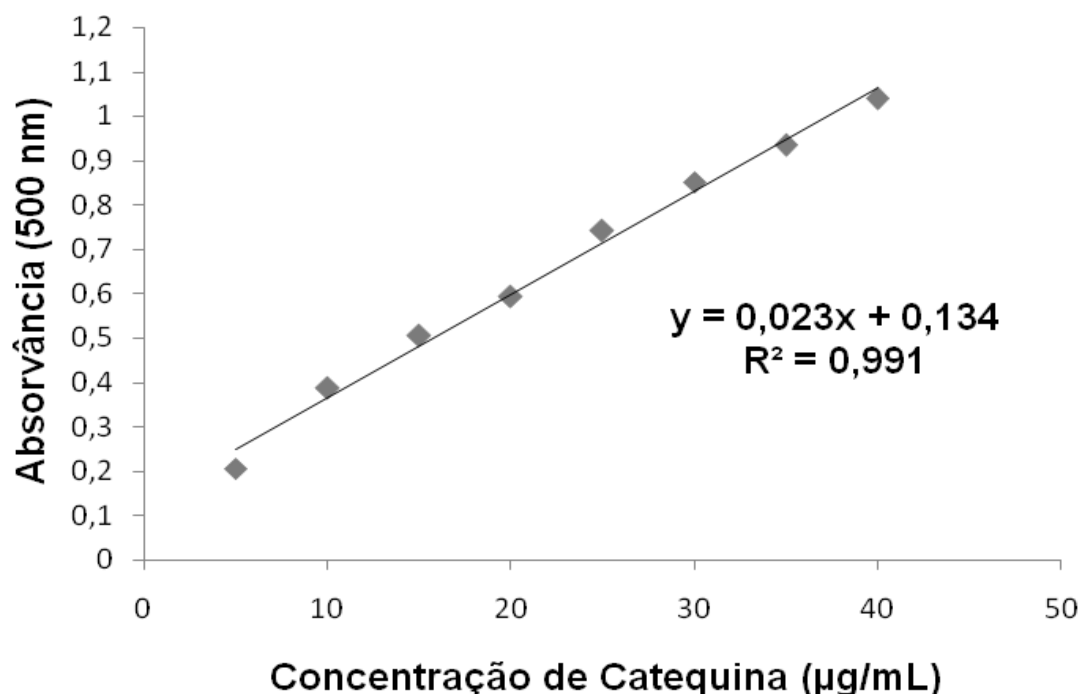


Figura 15 – Curva de calibração da catequina.

Os resultados obtidos, valendo-se da curva de calibração, mostram o teor de proantocianidinas, expressos em equivalentes de catequina, apresentados na tabela 11.

Tabela 11 - Teor de proantocianidinas (mg de ECAT/g de amostra).

AMOSTRA	Metanol/água (4:1, v v ⁻¹)	Acetona/água (7:3, v v ⁻¹)
Madeira	5,11 ± 0,59	6,51 ± 0,62
Casca	3,88 ± 0,12	4,85 ± 0,06

Em relação à casca, observou-se que a madeira da amoreira possui maior teor de proantocianidinas e o extrato acetona/água apresentou um rendimento maior. Esses resultados foram menores do que aqueles encontrados para as madeiras de *Astronium urundeuva*, conhecida como aroeira-preta, nos mesmos solventes, acetona/água de 6,1 mg g⁻¹ e metanol/água de 31,2 mg g⁻¹ (MORAIS, 2002). Para os extratos metanol/água de madeiras de *Eucalyptus* nas mesmas condições, os rendimentos variaram entre 0,72 e 6,58 mg g⁻¹. Portanto, os teores de proantocianidinas da amoreira são muito inferiores ao encontrado para o extrato metanol/água da aroeira, comparando-se com os do extrato acetona/água da aroeira e com as madeiras de *Eucalyptus* citadas (QUEIROZ, 2001).

Os resultados demonstram que os teores de proantocianidinas, provavelmente, não são responsáveis pela alta resistência da madeira de amoreira, pois os valores estão na média dos descritos na literatura para outras espécies que não apresentam tal durabilidade como os eucaliptos.

Tabela 12 - Rendimento dos extratos brutos e quantificação de polifenóis totais e proantocianidinas da madeira e casca de *Maclura tinctoria*.

EXTRATOS	Rendimento (%)		Polifenóis totais (mg EAG/g)		Proantocianidinas (mg ECAT/g)	
	Madeira	Casca	Madeira	Casca	Madeira	Casca
Metanol:água (4:1, v/v)	14,44 ± 0,56	6,64 ± 0,84	38,43 ± 0,42	35,03 ± 0,94	5,11 ± 0,59	3,88 ± 0,12
Acetona:água (7:3, v/v)	20,48 ± 0,13	8,41 ± 0,62	45,34 ± 0,86	43,17 ± 1,18	6,51 ± 0,62	4,85 ± 0,06

2.2.9.3.1. Atividade antioxidante e cálculo de CE_{50}

Um dos métodos para se determinar o potencial antioxidante de uma amostra é através da quantificação da ação sequestrante do radical livre $DPPH^{\cdot}$. A partir da leitura das absorvâncias obtidas para as amostras de concentração conhecida do radical livre $DPPH^{\cdot}$, é traçada uma curva de calibração, apresentada na Figura 16.

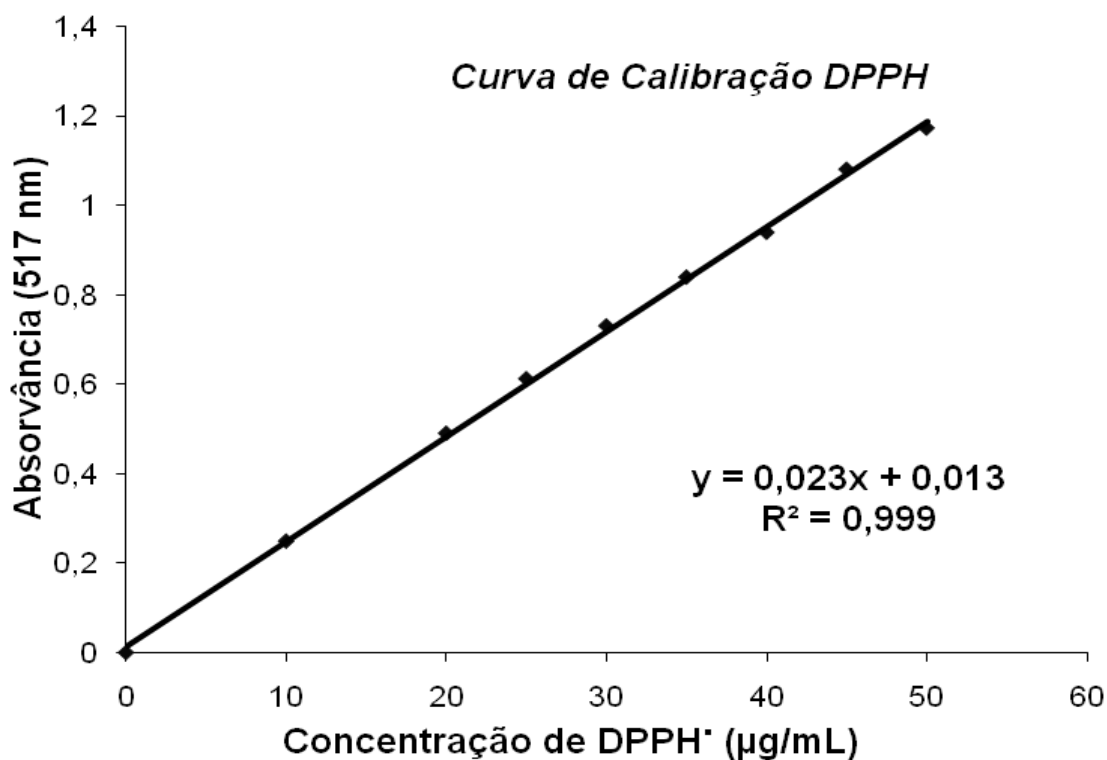


Figura 16 - Curva de calibração do $DPPH^{\cdot}$.

Através dos resultados obtidos pela equação 3 (item 2.2.5 - metodologia), traçaram-se os gráficos das atividades antioxidantes em função do tempo para a madeira e casca de amoreira (Figuras 17 e 19). A partir das absorvâncias, traçaram-se os gráficos de consumo de $DPPH^{\cdot}$ em função das diferentes concentrações dos extratos metanólicos da madeira e da casca da amoreira (Figura 18 e 20).

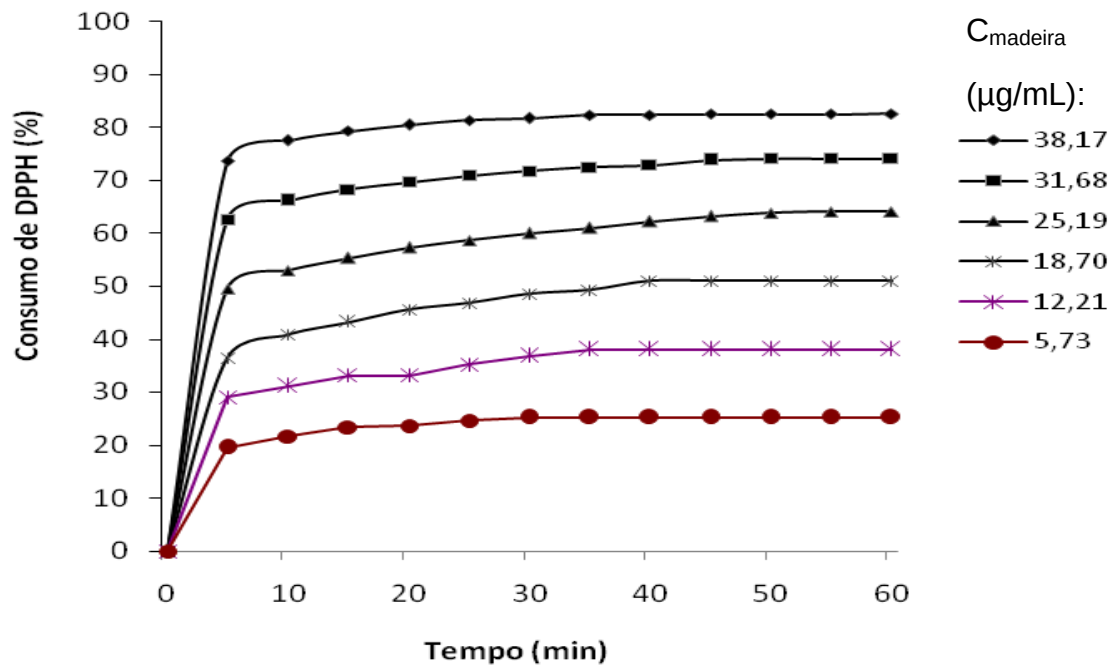


Figura 17 – Gráfico da atividade antioxidante em função do tempo da madeira de amoreira de diferentes concentrações.

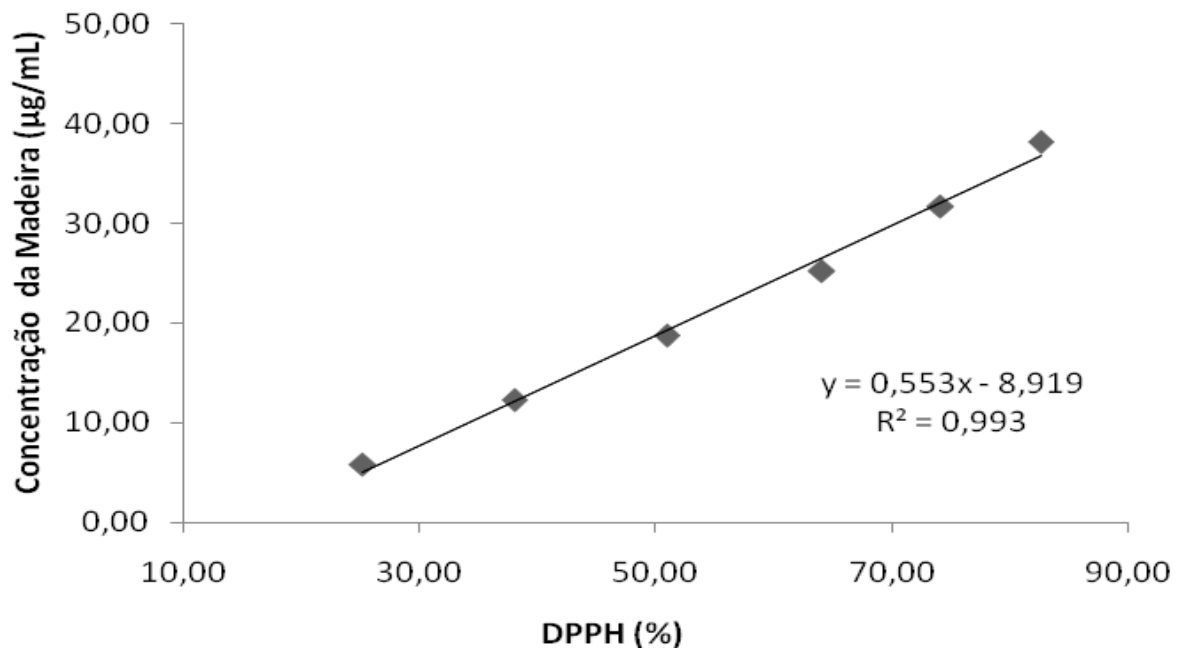


Figura 18 – Gráfico do consumo de DPPH em função das diferentes concentrações da madeira de amoreira.

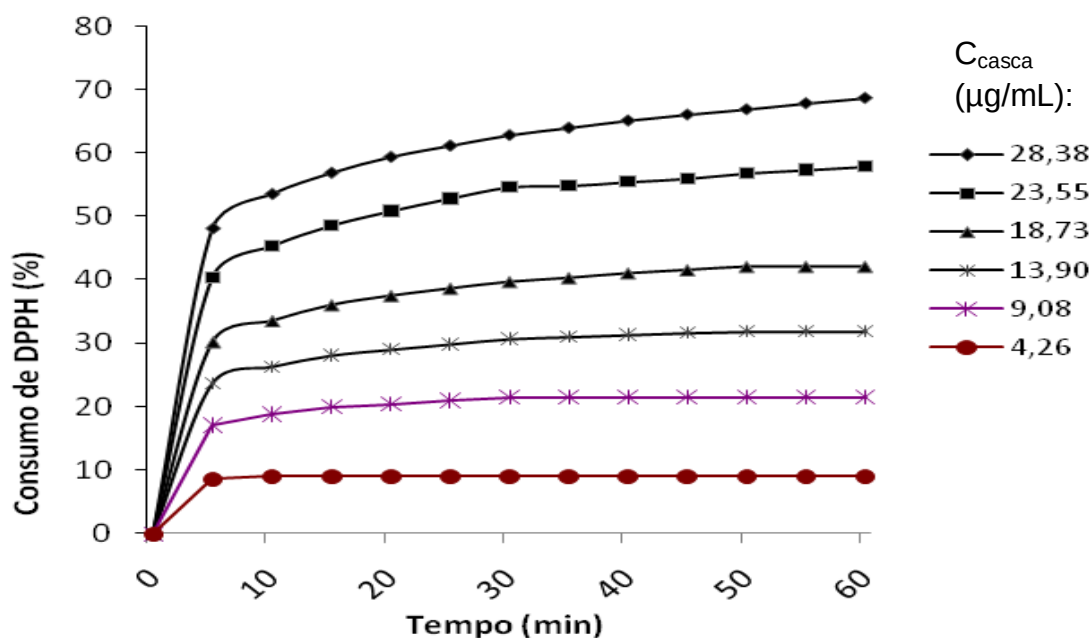


Figura 19- Gráfico da atividade antioxidante em função do tempo da casca de amoreira de diferentes concentrações.

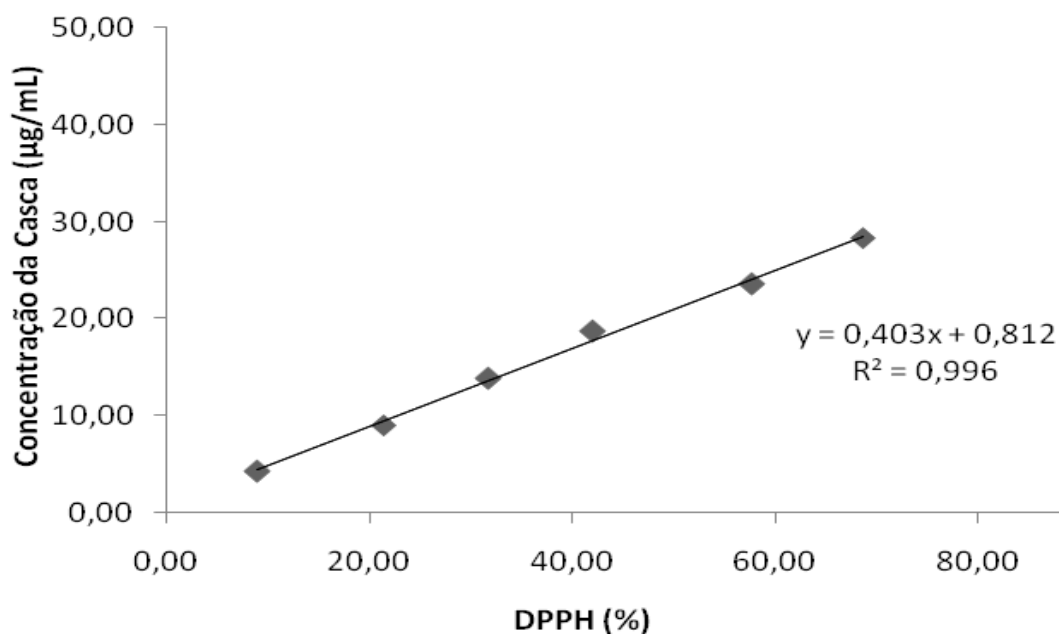


Figura 20 – Gráfico do consumo de DPPH em função das diferentes concentrações da casca de amoreira.

A tabela 13 apresenta a comparação dos valores de CE_{50} calculados para a madeira de amoreira com outras plantas e com padrões (WANG et al., 2004; DIOUF, et al., 2006; SOUZA et al., 2007; TUNG et al. 2007; THITILERTDECHA et al., 2008; ENAYAT e BANERJEE, 2009).

Tabela 13 – Valores médios de CE₅₀ da madeira e casca de amoreira, outras plantas e padrões (µg mL⁻¹)

Espécie/Padrão	CE ₅₀ (µg mL ⁻¹)	
	Madeira	Casca
<i>Maclura tinctoria</i>	18,74 ± 0,54	20,97 ± 0,65
<i>Terminalia brasiliensis</i> (SOUSA et al., 2007)	-	27,59
<i>Nephelium lappaceum</i> (THITILERTDECHA et al., 2008)	4,94	-
<i>Acacia confusa</i> (TUNG et al., 2007)	-	3,50
<i>Chamaecyparis obtusa</i> (MARIMUTHU et al., 2008)	31,07	-
<i>Salix aegyptiaca</i> (ENAYAT E BANERJEE, 2009)	-	19,00
<i>Calocedrus formosana</i> (WANG et al., 2004)	23,00	23,00
<i>Cyathea phalerata</i> (BRIGHENTE et al., 2007)	20,00	-
<i>Trichilia catigua</i> (BRIGHENTE et al., 2007)	-	2,10
Ácido gálico (BRIGHENTE et al., 2007)	2,60	
Butilidroxitolueno (BHT) (BRIGHENTE et al., 2007)	17,30	
Catequina (WANG et al., 2004)	5,00	
Ácido ascórbico (BRIGHENTE et al., 2007)	8,40	

Tanto o extrato da madeira quanto o da casca da amoreira demonstraram ter atividade antioxidante, encontrando-se os melhores resultados para a madeira. Quanto maior o consumo de DPPH[•] por uma amostra, menor será a sua CE₅₀ e maior a sua atividade antioxidante; portanto, pode-se concluir com base nos resultados obtidos, que a madeira da amoreira possui maior atividade antioxidante que a casca, e esta se encontra diretamente relacionada com o teor de compostos fenólicos (WANG et al., 2004; CHANG et al., 2001).

Comparando-se os resultados, observa-se que tanto a madeira quanto a casca da amoreira possui os valores de CE₅₀ muito bons e condizentes com valores

das cascas e madeiras de plantas encontradas na literatura: inferior ao da *T. brasiliensis* (SOUSA et al., 2007) e da *C. obtusa* (MARIMUTHU et al., 2008), superior ao da *A. confusa* (TUNG et al., 2007), da *N. lappaceum* (THITILERTDECHA et al., 2008) e da *T. catigua* (BRIGHENTE et al., 2007), muito semelhante ao da *S. aegyptiaca* (ENAYAT e BANERJEE, 2009), da *C. formosana* (WANG, et al., 2004) e da *C. phalerata* (BRIGHENTE et al., 2007).

Comparando-se com padrões que são bastante conhecidos pelas suas atividades antioxidantes como o ácido gálico, a catequina e o BHT, os valores referência de CE₅₀, tanto a casca como a madeira de amoreira apresentaram valores mais eficientes do que o ácido gálico (SOUZA et al., 2007) e menos eficiente do que o BHT (BRIGHENTE et al., 2007) e a catequina (DIOUF, et al., 2006).

2.2.10. Extração do Óleo Essencial da Madeira e da Casca

Tanto a madeira como a casca não apresentaram, nas condições experimentais empregadas, rendimento de óleo essencial em quantidade significativa para caracterização e identificação de constituintes voláteis.

2.2.11. Atividade Antimicrobiana

A avaliação da atividade antibacteriana foi realizada, utilizando o método da microdiluição em caldo, objetivando a determinação da concentração inibitória mínima das amostras testadas. Outras técnicas poderiam ter sido empregadas para avaliar a susceptibilidade dos microrganismos frente às amostras dos extratos. Entretanto, o método da diluição em caldo é considerado a melhor opção segundo trabalho realizado, comparando quatro diferentes técnicas mais comumente utilizadas nos laboratórios para avaliação de atividade antimicrobiana (ALVES et al., 2008).

Os extratos brutos da casca e da madeira de amoreira evidenciaram atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição em caldo, diante de microrganismos indicadores aeróbios e anaeróbios avaliados; os resultados estão apresentados nas Tabelas 14 e 15.

TABELA 14 - Resultados das concentrações inibitórias mínimas para os extratos da amoreira frente às bactérias aeróbias ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

EXTRATOS	MADEIRA			CASCA		
	<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456	<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456
Cicloex/Etanol	250	250	> 400	400	>400	200
Etanol	400	400	>400	>400	>400	300
Aquoso	400	400	>400	400	>400	400
Metanol: Água	400	400	>400	>400	80	>400
Acetona: Água	300	350	>400	>400	>400	400
Controle (+)	0,3688	0,0922	0,3688	0,3688	0,1844	0,3688

TABELA 15 - Concentração Inibitória Mínima para os extratos da amoreira frente às bactérias anaeróbias ($\mu\text{g mL}^{-1}$).

EXTRATOS	MADEIRA					CASCA		
	<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	<i>Prevotella nigrescens</i> ATCC 33563	<i>Actinomyces naeslundii</i> ATCC 19039	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 49417	<i>Prevotella nigrescens</i> ATCC 33563	<i>Actinomyces naeslundii</i> ATCC 19039	<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 49417
Cicloex/Etanol	300	400	300	200	200	< 20	60	60
Etanol	400	>400	300	400	200	200	200	90
Aquoso	>400	>400	300	>400	300	300	400	300
Metanol: Água	400	>400	400	>400	300	200	>400	300
Acetona: Água	400	>400	300	400	200	200	>400	100
Controle (+)	0,1844	0,0922	0,0922	0,0922	0,3688	0,0922	0,1844	0,3688

Os resultados das concentrações inibitórias mínimas (CIM's), para os extratos brutos da madeira e casca de amoreira, evidenciaram que esta espécie possui efeito antibacteriano, frente aos microrganismos bucais *S. sanguinis*, *S. mutans* e *S. mitis* (bactérias aeróbias facultativas Gram-positivas). Os valores de CIM estiveram entre 80 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Todos os extratos da madeira foram ativos contra *S. sanguinis* e *S. mutans* e os menores valores de CIM foram encontrados para o extrato cicloexano/etanol (250 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Nenhum extrato da madeira conseguiu inibir o crescimento de *S. mitis* nas concentrações testadas. Já o extrato cicloexano/etanol da casca apresentou um valor de CIM igual a 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a mesma bactéria. Resultado bastante relevante foi a concentração inibitória mínima de 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$ encontrado para o extrato metanol/água da casca em relação à *S. mutans*, uma vez que, valores de CIM abaixo de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para extratos brutos são muito promissores. Vários autores relatam que experimentos com CIM inferiores a 8.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e superiores a 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os extratos brutos são considerados de

pouca atividades e para os compostos isolados com CIM superior a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ devem ser considerados de pouca atividade e devem ser evitados e até descartados, ao passo que a presença de atividade com concentrações abaixo de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ para extratos brutos e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ para compostos isolados são muito promissores (GIBBONS, 2004; RÍOS e RECIO, 2005; VAN-VUUREN, 2008). A importância de controlar o crescimento *Streptococcus* do grupo *mutans* está no fato de que é considerado o principal agente etiológico da cárie dental (DE LORENZO, 2004).

Os microrganismos anaeróbios escolhidos para os ensaios foram: *Bacteroides fragilis*, *Prevotella nigrescens*, *Fusobacterium nucleatum*, *Porphyromonas gingivalis* e *Actinomyces naeslundii*. Os resultados das concentrações inibitórias mínimas (CIM's) indicaram que os extratos da madeira e da casca de amoreira foram capazes de inibir o crescimento das bactérias periodontopatogênicas testadas, apresentando efeito antimicrobiano. As CIM's variaram entre 200 e $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os extratos da madeira e 20 a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ para os extratos das cascas frente aos microrganismos indicadores utilizados nos ensaios. Os extratos cicloexano/etanol da madeira e da casca apresentaram atividade diante de todos os microrganismos anaeróbios. Entretanto, quando se comparam as bactérias *Prevotella nigrescens*, *Porphyromonas gingivalis* e *Actinomyces naeslundii*, os valores de CIM, encontrados para o extrato cicloexano/etanol da casca, estiveram abaixo de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ consideravelmente abaixo do que os resultados encontrados para o extrato cicloexano/etanol da madeira.

Não foi possível comparar os resultados de atividade antimicrobiana obtidos pela técnica da microdiluição em caldo, já que não foram publicados trabalhos

demonstrando concentrações inibitórias mínimas de extratos de amoreira frente aos microrganismos bucais presentes neste trabalho.

Além disso, quando se comparam estudos de atividade antimicrobiana de extratos de plantas, é significativa a dificuldade de comparação entre os resultados, pois as variáveis compreendem os aspectos climáticos que exercem influência na composição química do vegetal, estágio de desenvolvimento do vegetal quando ocorreu sua coleta, parte da planta estudada, forma de preparo do material e, principalmente, os protocolos seguidos nos experimentos (ALVES et al., 2008).

Os resultados das CIM's mostram que os extratos de amoreira possuem efeito antibacteriano em relação às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e com maior atividade frente às bactérias anaeróbias, com destaque para o extrato cicloexano/etanol. Desta forma, podem atuar como agentes antiplaca, prevenindo a cárie, bem como lesões mais complexas como as periodontites (perda de fibras e osso) e infecções endodônticas (infecção no canal do dente).

Estudo de biofracionamento com os extratos de amoreira estão sendo realizados com o objetivo de identificar e caracterizar o composto ou os possíveis compostos presentes nos extratos responsáveis pela ação antimicrobiana.

3. CONCLUSÕES

O resultado de 19,22 % para o cálculo da LK indica que amoreira se enquadra no perfil das folhosas, quando se compara o teor de lignina. O teor de extrativos e os constituintes macromoleculares calculados para esta madeira não é razão suficiente para justificar a dureza e a resistência ao ataque de organismos xilófagos, mesmo em condições apropriadas ao apodrecimento, uma vez que existem madeiras como o *E. grandis* que, embora possua aproximadamente 10% extrativos, é de fácil degradação. O teor de extrativos da casca de amoreira corresponde a 50,64% do peso seco da amostra, valor que está de acordo com os obtidos em estudos de outras cascas.

A madeira da amoreira (cerne + alburno) apresentou teor de fenóis totais maiores que a casca, o que não é comum, embora os resultados sejam próximos. Os teores de fenóis totais também foram altos, se comparados a outras espécies de madeira como a de *Eucalyptus* e muito parecidos com os valores da aroeira. O elevado teor de fenóis totais pode justificar a alta resistência desta madeira ao ataque de organismos xilófagos, mesmo em condições favoráveis ao apodrecimento.

Os extratos brutos de amoreira possuem efeito antibacteriano frente às bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e com maior atividade frente às bactérias anaeróbias, com ênfase para o extrato bruto cicloexano/etanol. Os resultados apontam que tanto a casca como a madeira de amoreira apresentam potencial antibacteriano para uso na prevenção da cárie dentária.

Assim, estudos posteriores poderão ser realizados com os extratos de amoreira com o objetivo de identificar e caracterizar os possíveis compostos presentes nos extratos responsáveis pela ação antimicrobiana.

4. REFERÊNCIAS

AAS, J. A.; PASTER, J. B.; STOKES, N. L.; OLSEN, I.; DEWHIRST, E. F. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, p. 5721-5732, 2005.

ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: Espécies vegetais úteis**. Planatina: Embrapa, 1998. 464p.

ALMEIDA, E. R. **As plantas medicinais brasileiras**. São Paulo: Hemus, 1993. 339p.

ALVES, E. A.; VINHÓLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras de *Miconia*. **Química Nova**, v. 31, p. 1224-1229, 2008.

ALVES, T. M. A.; SILVA, A. F.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T. S. M.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JUNIOR, A.; ZANI, C.L. Biological screening of Brazilian medicinal plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, p.367-373, 2000.

ALVES, B. H. P. **Análise comparativa da composição química de cafés do cerrado mineiro e do sul de Minas Gerais**. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 91f, 2004.

ANDREO, D.; JORGE, N. Antioxidantes Naturais: Técnicas de Extração. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos - CEPPA**, v. 24, p. 319-336, 2006.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, 48, suppl. S1. p. 5-16. 2001.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: Agosto. 2010.

ARGOLO, A. C.; SANTANA, A. E. G.; PLETSCH, M.; COELHO, L. C. B. B.. Antioxidant activity of leaf extracts from *Bauhinia monandra*. **Bioresource Technology**, v. 95, p. 229-233, 2004.

BAQUERO, F.; BLÁZQUEZ, J. Evolution of antibiotic resistance, **Trends in Ecology & Evolution**, v. 12 p. 482-487, 1997.

BARBOSA, S. V. **Terapêutica Endodôntica**. São Paulo: Santos; 1999. 254 p.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; COSTA, C. G. **Sistemática de Angiospermas do Brasil**. v.1, 2ª ed. Viçosa, MG, UFV, 2002. 309p.

BOTTOLI, C. B. G.; RIBANI, M.; COLLINS, C. H.; JARDIM, I. C. S. F.; MELO, L. F. C. Validação em métodos cromatográficos e eletroforéticos. **Química Nova**, v. 27, p. 771-780, 2004.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRIGHENTE, I. M. C.; DIAS, M.; VERDI, L. G.; PIZZOLATTI, M. G. Antioxidant activity and total phenolic content of some Brazilian species. **Pharmaceutical Biology**, v. 45, p.156-161, 2007.

BROWNING, B. L. **Methods of Wood Chemistry**. v. 2., New York: Interscience1967. 496 p.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. Curitiba, Embrapa Florestas, 2003. 637p.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; FERRAZ, A.; MILAGRES, A. M. F. Uma visão sobre a estrutura, composição e biodegradação da madeira. **Química Nova**, v. 32, p. 2191-2195, 2009.

CHANG, R. **Análises dos compostos fenólicos da madeira do *E. grandis* e do *E. urophilla* do triangulo mineiro**. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2000.

CHANG, S. T.; WU, J.H.; WANG, S. Y.; KANG, P. L.; YANG, N. S.; SHYUR, L. F.; Antioxidant activity of extracts from *Acacia confusa* bark and heartwood. **J. Agric. Food Chem.**, v. 49, p. 3420-3424, 2001.

CHOW, P.; NAKAYAMA, F. S.; BLAHNIK, B.; YOUNGQUIST, J. A.; COFFELT, T. A. Chemical constituents and physical properties of guayule wood and bark. **Industrial Crops and products**, v. 28, p. 303–308, 2008.

CLARK, W. B.; BAMMANN, L. L.; GIBBONS, R. J. Comparative estimates of bacterial affinities and adsorption sites on hydroxyapatite surfaces. **Infection and Immunity**, v.19, p.846-853, 1978.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE; *Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically, approved standard* - M7-A7, ed. 7, vol. 26, 2006.

CLSI - CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE; *Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, approved standard* - M11-A7, ed. 7, vol. 27, 2007.

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

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

DE LORENZO, J. L. **Microbiologia para o estudante de odontologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2004. 671 p.

DIOUF, P.-N.; MERLIN, A.; PERRIN, D. Antioxidant properties of wood extracts and colour stability of woods. **Annals of Forest Science**, v. 63, p. 525-534, 2006.

DURIGAN, G.; NOGUEIRA, J. C. B. **Recomposição de matas ciliares**. Instituto Florestal. São Paulo, IF Série Registros 4, 1990. 14p.

ENAYAT, S.; BANERJEE, S. Comparative antioxidant activity of extracts from leaves, bark and catkins of *Salix aegyptiaca* sp. **Food Chemistry**, v.116, p. 23-28, 2009.

FENGEL, D.; WEGENER, G. **Wood – chemistry, ultrastructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 613 p.

FINDLAY, W. P. K. Preservation of timber in the tropics. Dordrecht: W. Junk Publishers, p.1-13, 1985.

GODEFROOT, M.; SANDRA, P.; VERZELE, M. New method for quantitative essential Oil analysis. **Journal of Chromatography**, v.203, p. 325-335, 1981.

GOMIDE, J. L.; DEMUNER, B. J. Determinação do teor de lignina em material lenhoso: Método Klason modificado. **O Papel**, v.47, p.36-38, 1986.

GIBBONS, S. Anti-staphylococcal plant natural products. **Natural Products Report**, v. 21, p. 263-277, 2004.

HAGERMAN, A. E. **Tannin chemistry**. Oxford: Miami University, 1998. Disponível em: <<http://www.users.muohio.edu/hagermae/tannin.pdf>> Acesso em: Out. 2009.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. **Free radicals in Biology and Medicine**. Oxford: Clarendon Press, 1989, 543p.

IBAMA - INSTITUTO BRASILEIRO DO MEIO AMBIENTE E DOS RECURSOS NATURAISRENOVÁVEIS – IBAMA. **Madeiras tropicais brasileiras**. Brasília: IBAMA-LPF, 1997.152p.

INMETRO – Instituto Nacional de Metrologia, Normalização e Qualidade Instrumental. Disponível em: <<http://www.inmetro.gov.br>>. Acesso em: Agosto. 2010.

IKAWA, M.; SCHAPER, T. D.; DOLLARD, C. A.; SASNER, J.J. Utilization of Folin-Ciocalteu phenol reagent for the detection of certain nitrogen compounds. **J. Agric. Food Chem.**, v. 51, p.1811–1815, 2003.

KLOCK, U.; MUÑIZ, G. I. B. de; HERNANDEZ, J. A.; ANDRADE, A. S. **Química da madeira**. 3^a Ed., Univ. Fed. do Paraná. Curitiba, 2005. 81p.

KOFUJITA, H.; ETTYU, K.; OTA, M. Characterization of the major components in bark from five Japanese tree species for chemical utilization. **Wood Science and Technology**, v. 33, p. 223-228, 1999.

KOKOSKA, L.; POLESNY, Z.; RADA, V.; NEPOVIN, A.; VANEK, T. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, p.51-53, 2002.

LACHANCE, M. A.; KLEMENS, J. A.; BOWLES, J. M.; JANZEN, D. H. The yeast community of sap fluxes of Costa Rican *Maclura* (*Chlorophora*) tinctoria and description of two new yeast species, *Candida galis* and *Candida ortonii*. **FEMS Yeast Research**, v. 1, p. 87-92, 2001.

LELLES, J.G.; REZENDE, J. L. P. Considerações gerais sobre tratamento preservativo da madeira de eucalipto. **Informe Agropecuário**, v. 12, p. 83-90, 1986.

LIMA, M. R. F.; XIMENES, C. P. A.; LUNA, J. S.; SANT'ANA, A. E. G. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.16, p. 300-306, 2006.

LIMA, S. R. de; OLIVEIRA, G. S. de; MORAIS, S. A. L. de; NASCIMENTO, E. A. do; CHANG, R. Estudo dos constituintes macromoleculares, extrativos voláteis e compostos fenólicos da madeira de candeia – *Moquinia Polymorpha* (Less.) Dc. **Ciência Florestal**, v.17, p. 145-155, 2007.

LINDHE, J. **Tratado de Periodontia Clínica e Implantologia Oral**. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1999. 720 p.

LITTLE JUNIOR, E. L.; DIXON, R. G. **Arboles comunes de la provincia de Esmeraldas, Ecuador**. Washington: Peace Corps, 1983. 536p.

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

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, p.71-109, 1998.

MARIANO, G.; CRESTANA, C. S. M.; BATISTA, E. A.; GIONNOTTI, E.; COUTO, H. T. Z. Regeneração natural em área à margem de represa, no município de Piracicaba, Sp. **Revista do Instituto Florestal**, São Paulo, v. 10, p. 81-93, 1998.

MARSH, P. D. Dental plaque: biological significance of a biofilm and community life-style. **Journal of Clinical Periodontology**, v. 32, supl. 6, p.7-15, 2005.

McCORD, J. M.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocuprein (hemocuprein). **Journal of Biological Chemistry**, v.244, p. 6049-6055, 1969.

MICHELIN, D. C.; MORESCHI, P. E.; LIMA, A. C.; NASCIMENTO, G. G. F; PAGANELLI, M. O.; CHAUD, M. V. Avaliação da atividade antimicrobiana de extratos vegetais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.15, p. 316-320, 2005.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; PILÓ-VELOSO, D. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Química Nova**, v.16, p. 435-448, 1993.

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

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; QUEIROZ, R. A. A.; PILÓ-VELOSO, D.; DRUMOND, M. G. Studies on polyphenols and lignin of *Astronium urundeuva* wood. **Journal of Brazilian Chemical Society**, v.10, p. 447-452, 1999

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; QUEIROZ, R. A. A Caracterização dos taninos da aroeira-preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, v.26, p. 493-497, 2002.

MORAIS, S. A. L. de; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise da madeira de *Pinus oocarpa* parte I – estudo dos constituintes macromoleculares e extrativos voláteis. **Revista Arvore**, v.29, p.461-470, 2005.

MORAIS, S. A. L. de; NASCIMENTO, E. A.; MELO, D. C. Análise da madeira do *Pinus oocarpa* parte II – caracterização estrutural da lignina de madeira moída. **Revista Arvore**, v.29, p.471-478, 2005.

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

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extractions and analysis of phenolics in food. **Journal Chromatography A**, v.1054, p. 95-111, 2004.

NEBESNY, E.; BUDRYN, G. Antioxidative activity of green and roasted coffee beans as influenced by convention and microwave roasting methods and content of certain compounds. **European Food Research and Technology**, v.217, p.. 157-163, 2003.

NETO, G. G.; O Saber Tradicional Pantaneiro: As Plantas Medicinais e a Educação Ambiental. **Revista Eletrônica do Mestrado em Educação Ambiental**. v.17, 2006. Disponível em: <<http://www.remea.furg.br/edicoes/vol17/art34v17a5.pdf>>. Acesso em: Jul. 2009.

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

NISENGARD, R. J.; NEWMAN, M. G. **Oral Microbiology and Immunology**. 2nd ed. Philadelphia: W.B. Saunders Company, 1994. Cap. 30, 477p.

PAES, J. B. Resistência natural de madeira de *Corymbia maculata* (Hook.) K.D. Hill & L.A.S. Johnson a fungos e cupins xilófagos, em condições de laboratório. **Revista Árvore**, v. 26, p. 761-767, 2002.

PAULA, J. E.; ALVES, J. L. H. **Madeiras nativas – anatomia, dendrologia, dendrometria, produção e uso**. Brasília, Fundação Mokiti Okada – MOA, 1997. 543p.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do Pantanal**. Brasília: Embrapa, 1994. 320 p.

QUEIROZ, C. R. A. dos A. **Análise da Lignina e dos Polifenóis da Aroeira-Preta (*Astronium urundeuva*)**. Dissertação (Mestrado em Química) – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2001. 175p.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603-613, 2001.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.100, p. 80-84, 2005.

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

ROMAGNOLO, M. B.; SOUZA, M. C. Análise florística e estrutural de florestas ripárias do alto rio Paraná, Taquaruçu, MS. **Acta Botanica Brasilica**, v.14, p.163-174, 2000.

SILVA-RIOS, M. N.; RIBEIRO, J. F.; RESENDE, M.E. **Propagação vegetativa: enraizamento em estacas de espécies nativas de Mata de Galeria**. In: J.F. Ribeiro; C.E.L. Fonseca & J.C. Souza-Silva. Cerrado – Caracterização e Recuperação de Matas de Galeria. Planaltina, Embrapa/Cerrados. p. 455-491. 2001.

SINGH, R.; SINGH, S.; KUMAR, S.; ARORA, S. Studies on antioxidant potencial of methanol extract/fractions of *Acacia auriculiformis* A. Cunn. **Food Chemistry**, v.103, p. 505-511, 2007a.

SINGH, R.; SINGH, S.; KUMAR, S.; ARORA, S. Free radical-scavenging activity of acetone extract/fractions of *Acácia auriculoformis* A. Cunn. **Food Chemistry**, v.103, p. 1403-1410, 2007b.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal for Enology and Viticulture**, v.16, p. 144-158, 1965.

SOARES, S. P.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Atividade antibacteriana do extrato hidroalcoólico bruto de *Stryphnodendron adstringens* sobre microrganismos da cárie dental. **Revista Odonto Ciência**, v. 23, p. 141-144, 2008.

SOUSA, C. M. de M.; SILVA, H. R. e; VIEIRA JÚNIOR, G .M; AYRES, M. C. C.; COSTA, L. S. da; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAUJO, P. B. de M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, p. 351-355, 2007.

SOUZA, L. K. H.; OLIVEIRA, C. M. A.; FERRI, P. H.; OLIVEIRA JÚNIOR, J. G.; MIRANDA, A. T. B.; LIÃO, L. M.; SILVA, M. R. R. Antifugal properties of Brazilian cerrado plants. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 33, p. 247, 2002.

SUFFREDINI, I. B.; SADER, H. S.; GONÇALVES, A. G.; REIS, A. O.; GALES, A. C.; VARELLA, A. D.; YOUNES, R. N. Screening of antibacterial extracts from plants native to the Brazilian Amazon Rain Forest and Atlantic Forest. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 37, p. 379-384, 2004.

TAPPI TEST METHOD T222 om-88, **Acid-insoluble lignin in wood and pulp**. In: Tappi Test Methods. Atlanta: Tappi Press, 1999.

THITILERTDECHA, N.; TEERAWUTGULRAG, A.; RAKARIYATHAM, N. Antioxidant and antibacterial activities of *Nephelium lappaceum* L. extracts. **Food Science and Technology**, v. 41 p. 2029-2035, 2008.

TONIATO, M. T. Z.; OLIVEIRA FILHO, A.T. Variations in tree community composition and structure in a fragment of tropical semideciduous forest in southeastern Brazil related to different human disturbance histories. **Forest Ecology and Management**, v. 198, p. 319-339, 2004.

TUNG, Y. T.; WU, J. H.; KUO, Y. H.; CHANG, S. T. Antioxidant activities of natural phenolic compounds from *Acacia confusa* bark. **Bioresource Technology**, v. 98, p. 1120-1123, 2007.

VAN-VUUREN, S. F. Antimicrobial activity of South African medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 19, p. 462–472, 2008.

VÁZQUEZA, G.; FONTENLAA, E.; SANTOSA, J.; FREIREA, M. S.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, J. Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. **Industrial Crops and Products**, v. 28 p. 279-285, 2008.

VIEGAS, J. R. C.; BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. S. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, p. 326-337, 2006.

WANG, S. Y.; WU, J. H.; CHENG, S. S.; LO, C. P.; CHANG, H. N.; SHYUR, L. F.; CHANG, S. T.; Antioxidant activity of extracts from *Calocedrus formosana* leaf, bark and heartwood. **Journal of Wood Science**, v. 50, p. 422-426, 2004.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 4083-4089, 2001.