



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

ESTUDO FITOQUÍMICO, ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,
ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DA ESPÉCIE *Cassia*
bakeriana Craib.

Luís Carlos Scalon Cunha

UBERLÂNDIA – MG

2013



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

ESTUDO FITOQUÍMICO, ATIVIDADES ANTIOXIDANTE,
ANTIMICROBIANA E CITOTÓXICA DA ESPÉCIE *Cassia*
bakeriana Craib.

Luís Carlos Scalon Cunha

Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação em Química da Universidade
Federal de Uberlândia como requisito parcial
para obtenção do título de Doutor em Química.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes
Co-orientador: Prof. Dr. Francisco José Torres de Aquino

UBERLÂNDIA – MG

2013



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



**Ata da defesa de TESE DE DOUTORADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química,
do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE TESE DE DOUTORADO EM QUÍMICA, NÚMERO 23/COPGQ.**

DATA: 28/06/2013

DISCENTE: Luis Carlos Scalon Cunha

MATRÍCULA: 100311

TÍTULO DO TRABALHO: Estudo fitoquímico, atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica da espécie *Cassia bakeriana Craib*.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Química de Produtos Naturais

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Análise química e avaliação da atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e analgésica dos extratos das cascas da espécie *Cassia bakeriana Craib*.

Às quatorze horas do dia vinte e oito de junho do ano dois mil e treze, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, no Bloco 5I, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Mauro Luiz Begnini, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro e Antonio Eduardo Miller Crotti, da Universidade de São Paulo; Alberto de Oliveira e Antônio Otávio de Toledo Patrocínio, do Instituto de Química da UFU e Sérgio Antônio Lemos de Moraes, professor orientador e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 02/2010/COPGQ. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(a) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e Aprovou o(a) candidata(o). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será O mesmo

Esta defesa de Tese de Doutorado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 19 horas e 0 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Mauro Luiz Begnini – UFTM

Prof. Dr. Antonio Eduardo Miller Crotti – USP

Prof. Dr. Alberto de Oliveira – IQUFU

Prof. Dr. Antônio Otávio de Toledo Patrocínio –
IQUFU

Orientador : Prof. Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes – IQUFU

Universidade Federal de Uberlândia - Avenida João Naves de Ávila, nº 2121, Bairro Santa Mônica - 38.408-144 - Uberlândia - MG

+55 - 34 - 3239-4385

cpgquimica@ufu.br

<http://www.cpgquimica.iq.ufu.br>

DEDICO esta tese primeiramente a Deus por ter sido meu grande companheiro durante toda essa caminhada e principalmente pela proteção durante todas as viagens;

Aos meus pais pelo sincero apoio e dedicação, devo tudo a vocês;

À minha noiva que esteve sempre ao meu lado durante os meus momentos de trabalho e estudo.

AGRADECIMENTOS

Um trabalho quando se encerra, muitas pessoas contribuíram para que tudo desse certo e por isso nesse momento gostaria de agradecer sinceramente a todos.

Ao meu orientador professor Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes, pela orientação, pelo compromisso que teve com a tese e pela disposição com que sempre me atendeu e discutiu minhas dúvidas.

Ao professor Dr. Francisco José Torres de Aquino, primeira pessoa que me recebeu na UFU, pela amizade e pelos conhecimentos nas aulas de Química Orgânica avançada.

Ao professor Dr. Evandro Afonso do Nascimento, pelas contribuições e ensinamentos durante toda caminhada.

Ao professor Dr. Alberto de Oliveira pelas discussões e contribuições na tese e pela amizade.

Ao professor Dr. Roberto Chang, pela amizade e pelas contribuições no trabalho.

Ao professor Dr. Carlos Henrique Gomes Martins pela confiança, amizade, apoio e também pelos ensaios de atividade antimicrobiana realizados em seu laboratório.

Ao professor Dr. Robson José de Cassia Franco Afonso pelas análises de LC-MS-IT-TOF realizadas no laboratório da Universidade Federal de Ouro Preto - UFOP.

Ao professor Dr. Antônio Flávio de Carvalho Alcântara pelas análises de RMN realizadas no laboratório de espectroscopia da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG.

Aos professores Drs. Antônio Otávio de Toledo Patrocínio e Rodrigo Alejandro Abarza Munoz pela sincera amizade, companheirismo e apoio para a conclusão do doutorado.

Ao professor Dr. Antônio Eduardo Miller Crotti pela amizade de sempre e pelas contribuições e discussões a respeito da tese.

Ao professor Dr. Wilson Roberto Cunha, pela consideração, confiança e apoio para iniciar o doutorado.

Aos professores Drs. Glein Monteiro de Araújo e Ivan Schiavini do Instituto de Biologia da UFU, pela identificação da espécie *Cassia bakeriana* Craib.

Aos professores Ms. Edmilson de Oliveira Rocha, Raquel Maria Ferreira de Sousa, Mário, Kely Cristina Lamounier, Carla de Moura Martins e a professora Dra. Blyene Hatalita Pereira Alves pela sincera amizade, pelo apoio e pelas contribuições na realização de várias etapas deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Túlio Paiva Borges, Ítalo Caetano de Melo, Nayana Souto Gonçalves e Franciyara Fernandes Azevedo pela amizade e pelas contribuições nas análises.

Às alunas de iniciação científica Kenia Nara Parra, Tricya Teles Barros e Laís Cristina Ferreira Sousa pela amizade, companheirismo e ajuda incondicional no dia a dia do laboratório inclusive, domingos e feriados.

Ao meu grande amigo professor Ms. David Maikel Fernandes pela amizade e companheirismo durante todo esse tempo em Uberlândia.

Aos professores Ms. Brunno Borges Canelhas e Deusmaque Carneiro Ferreira pela amizade, companheirismo e discussões sobre a tese.

À Universidade de Uberaba na pessoa da professora Inara Barbosa Pena Elias pela confiança em meu trabalho e apoio para o término do doutorado.

À FAPEMIG (Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo suporte no desenvolvimento do projeto com número do processo APQ-01178-11.

Aos meus amigos pessoais, meus amigos de trabalho que me apoiaram e me deram força nos momentos mais difíceis.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS.....	VI
LISTA DE FIGURAS	IX
LISTA DE TABELAS	XIII
LISTA DE FLUXOGRAMAS	XV
LISTA DE GRÁFICOS.....	XVI
LISTA DE QUADROS	XVII
RESUMO.....	XVIII
ABSTRACT	XX
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1 CONSTITUINTES QUÍMICOS DA MADEIRA E CASCA.....	3
1.1.1 Celulose.....	8
1.1.2 Hemiceluloses (Polioses)	13
1.1.3 Lignina	16
1.1.4 Extrativos e cinzas.....	23
1.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS SOLVENTES UTILIZADOS EM EXTRAÇÕES	24
1.3 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	26
1.3.1 Terpenos	28
1.3.2 Compostos fenólicos	34
1.3.3 Flavonoides	36
1.3.4 Antraquinonas	41
1.3.5 Taninos.....	43
1.3.5.1 Taninos condensados (Proantocianidinas).....	44
1.3.5.2 Taninos hidrolisáveis	45
1.3.6 Alcaloides	47
1.4 ÓLEOS ESSENCIAIS.....	48
1.5 COMPOSTOS FENÓLICOS E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE	50
1.6 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE O ECOSSISTEMA BUCAL.....	54
1.6.1 Biofilme dental	57

1.6.2	Estágios do biofilme.....	61
1.6.3	Microrganismos bucais	62
1.6.4	Controle do biofilme dental	66
1.7	ESTUDOS COM ESPÉCIES DO GÊNERO CASSIA	69
1.8	A ESPÉCIE <i>Cassia bakeriana</i> Craib.....	75
2.	JUSTIFICATIVA.....	78
3.	OBJETIVOS	79
3.1	Objetivos gerais	79
3.2	Objetivos específicos.....	79
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	80
4.1	Reagentes, soluções e equipamentos.....	80
4.2.	Área de coleta	83
4.3	Secagem e preparação da amostra da casca, madeira e folhas.....	84
4.4.	Umidade	84
4.5	Preparação da madeira e casca livre de extrativos para a determinação dos constituintes macromoleculares de <i>Cassia bakeriana</i>	85
4.5.1	Pré-tratamento das cascas.....	86
4.6.	Determinação dos componentes macromoleculares	86
4.6.1	Determinação de lignina insolúvel em ácido.....	86
4.6.2	Determinação de lignina solúvel	87
4.6.3	Polissacarídeos	89
4.6.3.1	Determinação da holocelulose	89
4.6.3.2	Determinação de Hemiceluloses	90
4.7	Cinzas.....	91
4.8	Extratos brutos obtidos por soxhlet, maceração e partição líquido-líquido	91
4.8.1	Extração em soxhlet	91
4.8.2	Obtenção dos extratos brutos etanólicos por maceração e partição líquido – líquido da casca e folhas de <i>C. bakeriana</i>	93
4.8.3	Extração etanólica da madeira por maceração	95
4.9	Determinação do teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu.....	95
4.10	Determinação do teor de proantocianidinas pelo método da vanilina.....	96

4.11	Atividade antioxidante e cálculo de CE ₅₀	98
4.11.1	Curva analítica do radical DPPH	98
4.11.2	Leitura das absorvâncias das amostras	98
4.12	Extração de óleo essencial por hidrodestilação.....	100
4.12.1	Separação e identificação dos compostos voláteis	100
4.13	Atividades biológicas	102
4.13.1	Atividade antimicrobiana.....	102
4.13.1.1	Análise biológica das amostras	102
4.13.1.2	Atividade antimicrobiana dos extratos, partições e frações.....	102
4.13.1.3	Microrganismos utilizados nos ensaios	102
4.13.1.4	Meios de cultura utilizados	104
4.13.1.5	Preparo das amostras dos extratos para o método de microdiluição	108
4.13.1.6	Preparo do inóculo	108
4.13.1.7	Preparação do controle positivo	109
4.13.1.8	Controles positivos e negativos	109
4.13.1.9	Método da microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima.....	110
4.13.2	Atividade citotóxica	112
4.13.2.1	Preparo dos meios de cultura.....	113
4.13.2.2	Método da microdiluição para a determinação da atividade citotóxica.....	113
4.14	Procedimentos fitoquímicos.....	115
4.14.1	Reagentes, solventes e equipamentos.....	116
4.14.2	Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de massas.....	117
4.14.2.1	Condições utilizadas em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com detector de ionização por eletrospray (CLAE-DAD-IES/EM)...	118
4.14.2.2	Preparação da amostra	119
4.14.3	Condições da análise de RMN de ¹ H	119
4.14.4	Fracionamento dos extratos e das frações da casca de <i>C. bakeriana</i> com maior atividade antimicrobiana.....	120
4.14.4.1	Biofracionamento do extrato clorofórmio da casca (E3) obtido em soxhlet..	120
4.14.4.2	Biofracionamento da partição diclorometano da casca (Amostra PC2) obtida	

por extração líquido-líquido	121
4.14.4.3 Cromatografia em coluna da fração F11 em sephadex.....	123
4.14.4.4 Cromatografia preparativa da fração F11.3 em sílica gel 60 G e isolamento do composto ácido 1,8-diidroxi-antraquinona-3-carboxílico (ácido cássico ou rhein)	125
4.15 Análise estatística.....	126
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	127
5.1 Análise química dos componentes macromoleculares da madeira e casca..	127
5.1.1 Determinação do teor de umidade.....	127
5.1.2 Rendimento dos extrativos obtidos em soxhlet para a madeira e casca de <i>C.</i> <i>bakeriana</i>	127
5.1.3 Composição macromolecular para a madeira e casca de <i>C. bakeriana</i>	129
5.2 Obtenção dos extratos brutos da madeira, casca e folhas de <i>C. bakeriana</i> ..	135
5.2.1 Obtenção dos extratos brutos da casca de <i>C. bakeriana</i> a partir da extração em soxhlet.....	135
5.2.2 Obtenção dos extratos etanólicos brutos da casca e folhas de <i>C. bakeriana</i> e extratos obtidos por partição líquido-líquido	136
5.2.3 Extração etanólica da madeira por maceração	138
5.3 Determinação do teor de fenóis totais e proantocianidinas	138
5.3.1 Amostras avaliadas	138
5.3.2 Teor de fenóis totais dos extratos etanólicos da casca, madeira e folhas e teor de fenóis totais das partições das folhas e casca de <i>C. bakeriana</i>	139
5.3.3 Determinação de proantocianidinas pelo método da vanilina sulfúrica	146
5.3.4 Atividade antioxidante.....	153
5.4 Composição química, atividade antimicrobiana e citotoxicidade dos óleos essenciais da madeira, casca e folhas de <i>C. bakeriana</i>	162
5.4.1 Composição química dos óleos essenciais	162
5.4.2 Atividade antimicrobiana e citotoxicidade dos óleos essenciais de <i>C.</i> <i>bakeriana</i>	166
5.5 Atividade antimicrobiana dos extratos brutos e partições líquido – líquido da casca e folhas de <i>C. bakeriana</i>	170

5.5.1	Atividade antimicrobiana dos extratos brutos da casca de <i>C. bakeriana</i> obtidos em soxhlet.....	170
5.5.2	Fracionamento do extrato clorofórmio bruto da casca de <i>C. bakeriana</i> obtidos em soxhlet e atividade antimicrobiana	172
5.6	Resultados da atividade antimicrobiana dos extratos brutos etanólicos e partições da casca e folhas de <i>C. bakeriana</i>	174
5.7	Fracionamento da partição diclorometano da casca (Amostra PC2) em sílica gel 60H e atividade antimicrobiana	177
5.8	Cromatografia em coluna da fração F11 em sephadex.....	179
5.9	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas da fração F11.3	183
5.10	Cromatografia preparativa da fração F11.3 e isolamento do composto ácido 1,8-diidroxi-antraquinona-3-carboxílico.....	203
5.11	Atividade antimicrobiana do composto ácido 1,8-diidroxi-antraquinona-3-carboxílico (rhein)	214
6.	CONCLUSÕES.....	217
	REFERÊNCIAS.....	219
	APÊNDICE	246

LISTA DE ABREVIações E SÍMBOLOS

AA – Atividade antioxidante

ANDM – Amostra não dissolvida em metanol

ATCC – American Type Culture Collection

ATP – Adenosina trifosfato

BHA – Butil-hidroxi-anisol

BHT – Butil-hidroxi-tolueno

CCD – Cromatografia de camada delgada

CC₅₀ – concentração citotóxica

CE₅₀ – Concentração efetiva

CG-EM – Cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

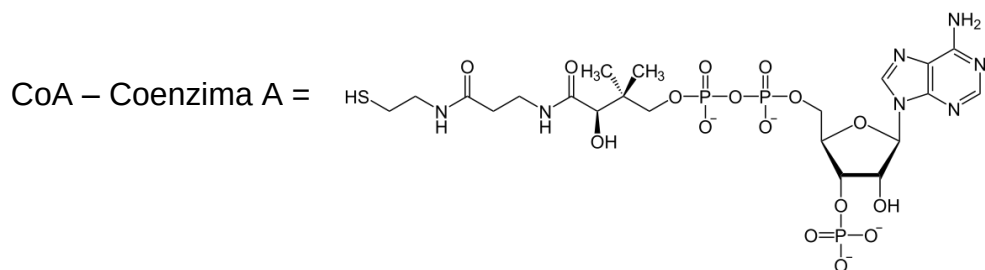
CG-EM – Cromatografia a gás-espectrometria de massas

CG – FID – Cromatografia a gás-detector de ionização de chama

CHD – Digluconato de clorexidina

CIM – Concentração inibitória mínima

CLAE-DAD-IES/EM – Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas com detector de ionização por eletrospray



COSY – Correlation spectroscopy

DMEM – Dulbecco's modified Eagle's medium

DMAPP – Dimetil-alil difosfato

DPPH – Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila

DMSO – Dimetilsulfóxido

DXP – 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato

EAG – Equivalentes de ácido gálico

ECAT – Equivalentes de catequina

EROs – Espécies reativas de oxigênio

FPP – Farnesil difosfato

GPP – Geranil difosfato

GTFs – Glicosiltransferases

HSQC – Heteronuclear single quantum correlation

IA – Índice aritmético

IVTF – Infravermelho com transformada de Fourier

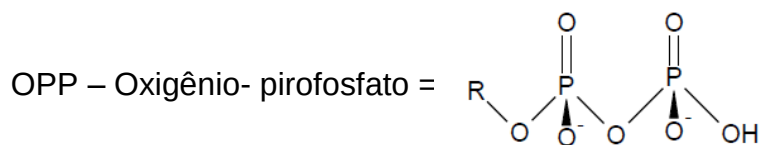
IS – Índice de seletividade

IPP – Isopentenil difosfato

IV – Infravermelho

m/z – Relação massa/carga

NADPH – Dihidronicotinamida-adenina-dinucleotideo



PA – Pureza analítica

PEC - Polissacarídeos extracelulares

pH – Potencial hidrogeniônico

Rf – Distância percorrida pela amostra/distância percorrida pela fase móvel

RMN – Ressonância magnética nuclear

t_R – Tempo de retenção

TSB – Caldo triptona de soja

TIC – Total ions chromatografics

UFC – Unidades formadoras de colônias

UV – Ultravioleta

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Aspectos macroscópicos de uma secção transversal do tronco de uma árvore	5
Figura 2 - Representação estrutural da celulose.....	8
Figura 3 - Fórmula estrutural da D-glicose	9
Figura 4 - Conformação em cadeira da D-glicose nas posições α e β	9
Figura 5 - Formação de hemiacetal na molécula de glicose	10
Figura 6 - Posições de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares.....	11
Figura 7 - Degradação oxidativa das unidades fenólicas da lignina pelo dióxido de cloro.....	13
Figura 8 - Açúcares que compõem as unidades de hemiceluloses.....	14
Figura 9 - Estrutura representativa de uma galactoglucomanana.....	15
Figura 10 - Estruturas dos álcoois precursores das ligninas	17
Figura 11 - Formação do radical fenolato no álcool coniferílico e estabilizações por ressonância	17
Figura 12 - Principais ligações entre os monômeros precursores da lignina	18
Figura 13 - Estrutura proposta para a lignina de <i>Eucalyptus grandis</i> (folhosa)	19
Figura 14 - Esquema de hidrólise ácida em ligações glicosídicas.....	21
Figura 15 - Produtos de degradação formados a partir da hidrólise ácida de polis-sacarídeos.....	22
Figura 16 - Esquema das vias do metabolismo secundário de plantas.....	27
Figura 17 - Estruturas químicas do NADPH e ATP	29
Figura 18 - Mecanismo de formação do ácido mevalônico e geranyl-pirofosfato.....	29
Figura 19 - Formação de monoterpenos e sesquiterpenos	30
Figura 20 - Biossíntese de terpenos via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato	31
Figura 21 - Monoterpenos acíclicos	31
Figura 22 - Monoterpenos, sesquiterpenos e diterpeno encontrados em plantas do Cerrado	32
Figura 23 - Estruturas químicas de diterpenos e triterpenos e do esteroide acdisona	33

Figura 24 - Exemplos de fenóis simples.....	35
Figura 25 - Mecanismos de formação de compostos fenólicos simples.....	36
Figura 26 - Estrutura básica dos flavonoides	37
Figura 27 - Principais estruturas de flavonoides.....	38
Figura 28 - Formação de flavonoides e estilbenos.....	39
Figura 29 - Flavonoides formados a partir de chalconas.....	40
Figura 30 - Biossíntese de antocianidinas.....	40
Figura 31 - Formação de antraquinona a partir do ácido chiquímico	41
Figura 32 – Estrutura básica de quinonas e numeração dos anéis.....	42
Figura 33 - Biossíntese de antraquinona derivada da via do acetato.....	42
Figura 34 - Estrutura básica de unidades de flavan-3,4-diol e flavan-3-ol.....	44
Figura 35 - Exemplo de ligação C4-C8 na formação de proantocianidinas.....	45
Figura 36 - Biossíntese de formação do ácido gálico	46
Figura 37 - Ácidos presentes nos taninos hidrolisáveis.....	46
Figura 38 - Estrutura do alcaloide nicotina e do ácido nicotínico.....	47
Figura 39 - Estrutura dos antioxidantes sintéticos BHT e BHA	52
Figura 40 - Redução do radical livre DPPH.....	53
Figura 41 - Propostas possíveis mecanismos entre compostos fenólicos e DPPH...	54
Figura 42 - Evolução microbiana do biofilme dental - a) colonizadores iniciais; b) aderência interbacteriana; c) presença de bactérias Gram-negativas estritas	58
Figura 43 - a – Lesão de cárie; b – Lesão periodontal (inflamação de gengiva e perda óssea)	59
Figura 44 - Fórmula estrutural da clorexidina	68
Figura 45 - Espécie vegetal <i>Cassia bakeriana</i>	76
Figura 46 - a- Espécie vegetal <i>Cassia bakeriana</i> Craib, b – casca do caule.....	76
Figura 47 - Extrator soxhlet	92
Figura 48 - Soluções com os extrativos das cascas.....	92
Figura 49 - Representação das etapas desenvolvidas para o método de microdiluição para os microrganismos aeróbios.....	111
Figura 50 - Microplaca com as soluções dos extratos testadas frente a <i>S. mutans</i>	

revelada com resazurina	112
Figura 51 - Câmara de anaerobiose para incubação de microrganismos anaeróbios.....	112
Figura 52 - Distribuição das amostras e controles na placa para os testes	114
Figura 53 - Reação típica do ácido gálico com o íon molibdênio presente no reagente de Folian-Ciocalteau	140
Figura 54 - Reação típica da vanilina com uma proantocianidina	147
Figura 55 - Proposta do mecanismo da reação entre a vanilina e proantocianidina	148
Figura 56 - Reação química entre um composto fenólico e o radical DPPH.....	153
Figura 57 - Componentes majoritários dos óleos das folhas (A) e casca (B) de <i>C. bakeriana</i>	165
Figura 58 - Cromatograma no UV (254 nm) da fração F11.3	186
Figura 59 - Cromatograma TIC da amostra F11.3 em modo positivo	187
Figura 60 - Cromatograma TIC da amostra F11.3 em modo negativo	187
Figura 61 - Regiões de picos no cromatograma TIC em modo negativo	188
Figura 62 - Espectro EM/EM obtido do íon precursor m/z 299,0515.....	192
Figura 63 - Espectro no UV da molécula precursora do íon de m/z 299,0515	192
Figura 64 - Íons observados a 6,75 minutos	193
Figura 65 - Espectro de massas EM/EM do íon precursor de m/z 283,0208	194
Figura 66 - Espectro UV do íon precursor m/z 283,0208	194
Figura 67 - Antraquinona ácido 1,8-diidroxi-antraquinona-3-carboxílico	195
Figura 68 - Espectro EM/EM do íon precursor de m/z 329,0679.....	198
Figura 69 - Espectro indicando as bandas de absorção do íon precursor m/z 329,0679	198
Figura 70 - Espectro EM/EM do íon precursor de m/z 313,0297.....	199
Figura 71 - Espectro no UV do íon precursor de m/z 313,0297	199
Figura 72 - Espectro de massas do íon precursor de m/z 325,1791	201
Figura 73 – Íons observados no tempo de retenção de 27,87 minutos.....	201
Figura 74 - Espectro no UV do íon precursor de m/z 283,2643	202
Figura 75 - Cromatografia em camada fina das frações F11.3c e F11.3m eluídas	

com clorofórmio/metanol (8:2)	203
Figura 76 - Espectro de massas do íon de m/z 283,0208 (Eletrospray - modo negativo).....	204
Figura 77 - Proposta de fragmentação para o composto ácido 1,8-diidroxi-antra- quinona-3-carboxílico	205
Figura 78 - Espectro de RMN de H^1 do composto ácido 1,8-diidroxi-antraquinona- 3-carboxílico isolado da espécie <i>C. bakeriana</i>	207
Figura 79 - Relação dos sinais na região dos aromáticos com o composto ácido 1,8-diidroxi-antraquinona-3-carboxílico	208
Figura 80 - Ligação de hidrogênio entre o grupo fenólico e o grupo carbonila.....	209
Figura 81 - Sinais de RMN - ^{13}C para o composto rhein em ppm	210
Figura 82 - Espectro HSQC do composto ácido 1,8-diidroxi-antraquinona-3- carboxílico (400 MHz – DMSO/ACETONA DEUTERADA).....	211
Figura 83 - Espectro COSY obtido para o composto rhein (400 MHz – DMSO/ACETONA DEUTERADA)	212
Figura 84 - Espectro no infravermelho do composto ácido 1,8-diidroxi-antraqui- nona-3-carboxílico	213

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Composição química em madeiras de coníferas e folhosas	6
Tabela 2 - Composição química em cascas de coníferas e folhosas	7
Tabela 3 - Composição química aproximada dos constituintes em cascas de folhosas	7
Tabela 4 - Separação provável dos principais metabólitos secundários presentes em plantas	25
Tabela 5 - Classificação dos compostos fenólicos de acordo com seu esqueleto básico	34
Tabela 6 - Reagentes utilizados nas análises e suas respectivas marcas	80
Tabela 7 - Equipamentos utilizados e suas especificações	81
Tabela 8 - Sistema de solventes, volume empregado no fracionamento do extrato clorofórmio da casca e frações avaliadas pelo ensaio de atividade antimicrobiana	121
Tabela 9 - Frações reunidas por CCD, sistema de eluição e volume empregado durante o fracionamento em coluna da amostra diclorometano da casca de <i>C. bakeriana</i>	123
Tabela 10 - Amostras resultantes da eluição isocrática com metanol em coluna utilizando sephadex da fração F11	124
Tabela 11 - Teor de umidade nas amostras de madeira e casca	127
Tabela 12 - Rendimento das extrações para madeira e casca de <i>C. bakeriana</i>	128
Tabela 13 - Composição química da madeira e casca de <i>C. bakeriana</i>	130
Tabela 14 - Composição macromolecular média da casca de <i>C. bakeriana</i> e da casca de outras espécies de árvores	132
Tabela 15 - Composição macromolecular média da madeira de <i>C. bakeriana</i> e da madeira de outras espécies de árvores	133
Tabela 16 - Teor de fenóis totais (expresso em mg EAG / grama de amostra) nos extratos e partições de <i>C. bakeriana</i>	141
Tabela 17 - Teor de fenóis totais na casca de <i>C. bakeriana</i> e de outras cascas de árvores	145

Tabela 18 - Teor de fenóis totais na madeira de <i>C. bakeriana</i> e de outras madeiras.....	145
Tabela 19 - Teor de proantocianidinas em mg ECAT / grama de extrato) nos extratos e partições de <i>C. bakeriana</i>	150
Tabela 20 - Teor de proantocianidinas na madeira e casca de <i>C. bakeriana</i> e de outras espécies de vegetais	152
Tabela 21 - Valores de CE ₅₀ encontrados para os diferentes extratos de <i>C. bakeriana</i>	157
Tabela 22 - Valores de CE ₅₀ da madeira, casca e folhas de <i>C. bakeriana</i> , outras plantas e padrões	159
Tabela 23 - Resultados de citotoxicidade dos extratos de <i>C. bakeriana</i> com maior atividade antioxidante e índices de seletividade.....	161
Tabela 24 - Composição química dos óleos essenciais de diferentes partes de <i>C. bakeriana</i>	162
Tabela 25 - Classificação dos compostos presentes nos óleos essenciais de diferentes partes de <i>C. bakeriana</i> pelos grupos funcionais	164
Tabela 26 - Concentrações inibitórias mínimas dos óleos essenciais contra bactérias bucais aeróbias e anaeróbias e atividade citotóxica de diferentes partes de <i>C. bakeriana</i>	167
Tabela 27 - Concentrações inibitórias mínimas dos extratos da casca obtidos em soxhlet	170
Tabela 28 - Massas das frações obtidas pelo fracionamento do extrato clorofórmio da casca de <i>C. bakeriana</i>	172
Tabela 29 - Frações obtidas por cromatografia clássica do extrato diclorometano da casca e suas respectivas massas	177
Tabela 30 - Frações obtidas em sephadex da amostra F11	180
Tabela 31 - Relação entre a região do espectro e os íons precursores encontrados no cromatograma TIC em modo negativo	188
Tabela 32 - Fórmula fornecida pelo software Formula Predictor para os íons mais abundantes da fração F11.3.....	190

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 - Proposta de obtenção dos extratos brutos e separação provável das principais classes de metabólitos secundários presentes em plantas	94
Fluxograma 2 - Extração em soxhlet da casca e as massas obtidas para cada solvente	136
Fluxograma 3 - Extração etanólica e partição líquido-líquido da casca de <i>C. bakeriana</i>	137
Fluxograma 4 - Extração etanólica e partição líquido-líquido das folhas de <i>C. bakeriana</i>	137
Fluxograma 5 - Obtenção do extrato etanólico da madeira.....	138

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Curva analítica para a determinação do teor de fenóis totais.....	140
Gráfico 2 - Fenóis totais dos extratos de <i>C. bakeriana</i>	142
Gráfico 3 - Teor de fenóis totais dos extratos etanólicos da casca, folhas e madeira de <i>C. bakeriana</i>	143
Gráfico 4 - Curva analítica para determinação de proantocianidinas	149
Gráfico 5 - Teor de proantocianidinas dos extratos de <i>C. bakeriana</i>	151
Gráfico 6 - Curva analítica para a determinação da atividade antioxidante	154
Gráfico 7 - Porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas do extrato etanólico da casca (E5)	155
Gráfico 8 - Porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas da partição hexano da casca (PC1).....	155
Gráfico 9 - Porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas da partição diclorometano da casca (PC2)	155
Gráfico 10 - Porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas da partição acetato da casca (PC3).....	155
Gráfico 11 - Porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas do extrato etanólico das folhas (E6)	155
Gráfico 12 - Porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas da partição hexano das folhas (PF1)	155
Gráfico 13 - Porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas da partição acetato das folhas (PF3)	156
Gráfico 14 - Porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas da partição acetato das folhas (PF3)	156
Gráfico 15 - Porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas da partição metanólica das folhas (PF4).....	156
Gráfico 16 - Porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas do extrato etanólico da madeira (E7)	156

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Espécies de <i>Cassia</i> estudadas, principais classes de metabólitos isolados e atividades biológicas	70
Quadro 2 - Microrganismos, procedência, morfotipos e meios de culturas utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana.....	103
Quadro 3 - Amostras de <i>C. bakeriana</i> avaliadas.....	139
Quadro 4 - Concentrações inibitórias mínimas das frações do extrato clorofórmico da casca de <i>C. bakeriana</i>	173
Quadro 5 - Resultados de CIM's para os extratos e partições da casca e folhas de <i>C. bakeriana</i>	174
Quadro 6 - Resultados da atividade antimicrobiana das frações obtidas a partir do fracionamento da amostra PC2.....	178
Quadro 7 - Resultados de atividade antimicrobiana das frações F11.1, F11.2 e F11.3	181
Quadro 8 - Concentrações inibitórias mínimas para o composto rhein	215

RESUMO

A espécie *Cassia bakeriana* Craib. é conhecida popularmente como cássia rósea e pertence ao gênero *Cassia* e à família Leguminosae. O presente trabalho teve como objetivos: determinar a composição macromolecular da madeira e da casca de *C. bakeriana*; determinar o teor de fenóis e proantocianidinas, assim como a atividade antioxidante de extratos (madeira, casca e folhas); avaliar a atividade antimicrobiana de diversos extratos de casca e folhas; caracterizar e determinar a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais (madeira, casca e folhas); realizar o estudo fitoquímico do extrato em diclorometano da casca e determinar o potencial citotóxico das amostras com maior atividade antioxidante e antimicrobiana. As porcentagens de extrativos, lignina insolúvel em ácido (Klason), lignina solúvel em ácido, holocelulose, α -celulose, hemiceluloses e cinzas para a madeira foram respectivamente 13,04; 21,0; 0,76; 67,4; 35,35; 32,06 e 2,08; e para a casca 53,88; 15,06; 0,6; 27,41; 20,32; 7,1 e 4,87. O conteúdo de fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu e proantocianidinas pelo método da vanilina sulfúrica indicaram uma correlação positiva com o aumento da polaridade dos extratos da casca e folhas, com maiores teores para a casca. Os extratos em etanol, diclorometano, acetato de etila e metanol das folhas e casca de *C. bakeriana* indicaram forte atividade antioxidante pelo método do sequestro do radical livre DPPH com valores de CE_{50} abaixo de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, com destaque para o extrato metanólico das folhas com CE_{50} de $8,67 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os mesmos extratos que indicaram forte atividade antioxidante, apresentaram baixa toxicidade para células Vero (concentração citotóxica $>512 \mu\text{g mL}^{-1}$). Os componentes dos óleos essenciais da madeira, casca e folhas de *C. bakeriana* foram identificados por CG-EM e submetidos aos testes de atividade antimicrobiana frente a microrganismos bucais aeróbios e anaeróbios pelo método da microdiluição em caldo. Embora não tenham apresentado elevada concentração de terpenos, os óleos das folhas e casca mostraram significativa atividade antimicrobiana com CIM's variando entre $62,5$ e $125 \mu\text{g mL}^{-1}$, para a maioria das bactérias utilizadas nos ensaios. De acordo com as CIM's e índice de seletividade, o óleo das folhas apresentou promissora atividade antimicrobiana e baixa citotoxicidade para células Vero. O extrato clorofórmico da casca obtido em soxhlet e o extrato em diclorometano

da casca obtido por partição líquido-líquido também mostraram atividade frente aos microrganismos bucais com valores de CIM's abaixo de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Ambos os extratos indicaram maior efeito antimicrobiano contra os microrganismos anaeróbios. O extrato em diclorometano da casca foi submetido ao fracionamento bio guiado por atividade antimicrobiana, utilizando métodos fitoquímicos, assim como pela técnica de CLAE acoplado à espectrometria de massas com ionização por eletrospray. O ácido 1,8-diidroxi-antraquinona-3-carboxílico (rhein) foi isolado da fração em diclorometano da casca e identificado por técnicas espectroscópicas de RMN- ^1H , HSQC, COSY, IVTF e espectrometria de massas. O composto rhein indicou forte atividade antimicrobiana frente a microrganismos bucais anaeróbios.

Palavras-chave: *Cassia bakeriana*, análises químicas, óleo essencial, atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, ácido 1,8-diidroxi-antraquinona-3-carboxílico.

ABSTRACT

The species *Cassia bakeriana* Craib. is popularly known as pink cassia and belongs to the genus *Cassia* and family Leguminosae. The present study had several goals: determine the macromolecular composition of the wood and bark of *C. bakeriana*; determine the content of phenolics and proanthocyanidins, as well as the antioxidant activity of extracts (wood, bark and leaves); evaluate the antimicrobial activity of various extracts of bark and leaves; characterize and determine the antimicrobial activity of essential oils (wood, bark and leaves); phytochemical study of the dichloromethane extract of the bark and the determination of the cytotoxic potential of the samples with the higher antioxidant and antimicrobial activities. The percentages of extractives, acid insoluble lignin (Klason), acid-soluble lignin, holocellulose, α -cellulose, hemicellulose and ashes, in wood were: 13.04, 21.0, 0.76, 67.4, 35.35, 32.06 and 2.08, respectively. The values found in bark: 53.88, 15.06, 0.6, 27.41, 20.32, 7.1 and 4.87. The contents of total phenols by Folin-Ciocalteu method and proanthocyanidins by vanillin in sulphuric acid indicated a positive correlation with the increasing polarity of the extracts of bark and leaves, with higher levels in the bark extracts. The extracts in ethanol, dichloromethane, ethyl acetate and methanol of leaves and bark of *C. bakeriana* showed good antioxidant activity by DPPH free radical scavenging method with CE_{50} values below $50 \mu\text{g mL}^{-1}$, and special attention to methanol extract of leaves with CE_{50} of $8.67 \mu\text{g mL}^{-1}$. The same extracts that showed good antioxidant activity, showed low toxicity to Vero cells (cytotoxic concentration $>512 \text{ mg mL}^{-1}$). The components of the essential oils from wood, bark and leaves of *C. bakeriana* were identified by GC-MS and tested for antimicrobial activity against aerobic and anaerobic oral microorganisms by broth microdilution method. Although these extracts did not showed high concentration of terpenes, the oils from leaves and bark showed significant antimicrobial activity with MIC's ranging between 62.5 and $125 \mu\text{g mL}^{-1}$, for most of the bacteria used in tests. According to the MIC's and selectivity index, the oil from the leaves showed promising antimicrobial activity and low cytotoxicity to Vero cells. The chloroform extract obtained from the bark in soxhlet extractor and the dichloromethane extract obtained by liquid-liquid partition also showed activity against oral microorganisms with MIC's below $\mu\text{g mL}^{-1}$.

¹. Both extracts showed higher antimicrobial activity against anaerobes. The dichloromethane extract of the bark was subjected to biofractioning directed by antimicrobial activity, using phytochemicals methods, as well as HPLC coupled to mass spectrometry with electrospray ionization technique. The 1,8-dihydroxy-anthraquinone-3-carboxylic acid (rhein) was isolated from the dichloromethane fraction of the bark and identified spectroscopic methods as ¹H-NMR, HSQC, COSY, FTIR and mass spectrometry. The compound rhein showed strong antimicrobial activity against oral anaerobic microorganisms.

Keywords: *Cassia bakeriana*, chemical analyzes, essential oil, antimicrobial activity, antioxidant activity, 1,8-dihydroxy-anthraquinone-3-carboxylic acid.

1. Introdução

As plantas são consideradas verdadeiros laboratórios bioquímicos complexos que, dentre várias substâncias, algumas são 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 (Newman *et al.*, 2003).

Há tempos, substâncias de origem vegetal têm sido usadas pela humanidade para o tratamento de diversos males, sendo as plantas superiores uma das maiores fontes desses medicamentos (Butler, 2004). O uso de infusões e de extratos brutos ou parcialmente purificados obtidos de folhas, galhos, frutos e raízes de plantas medicinais representam um potencial significativo no tratamento de diversos males, principalmente em países subdesenvolvidos (Rodrigues e Carvalho, 2007). Outra grande importância desempenhada pelos produtos naturais é sua utilização como protótipos ou modelos naturais para medicamentos sintéticos com atividades fisiológicas semelhantes à dos originais (Montanari e Bolzani, 2001; Danishefsky, 2010). Atualmente, o desenvolvimento de novos protótipos a partir de produtos naturais oriundos da flora, parte da informação etnofarmacológica da espécie em questão, passando por etapas de avaliação da atividade biológica associadas a processos de fracionamento e purificação a partir da matriz vegetal bruta finalizando com a caracterização estrutural da substância bioativa e avaliações de toxicidade (Filho e Yunes, 1998; Cos *et al.*, 2006; Lago *et al.*, 2009; Marques, *et al.*, 2010).

Apesar do grande desenvolvimento dos métodos de 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; Newman e Cragg, 2007).

Assim, as plantas representam um vasto arsenal na busca de produtos naturais biologicamente ativos visto que produzem e acumulam substâncias com atividades farmacológicas significativas, dentre as quais antitumoral, anti-inflamatória, antioxidante, antibiótica e antiparasitária (Filho e Yunes, 1998; Ahmad *et al.*, 2006).

Entre os diferentes biomas brasileiros, o Cerrado é a segunda maior área em abundância de plantas nativas do Brasil ocupando 23% do território nacional e mais de 6.000 espécies já foram catalogadas. Está localizado basicamente no planalto central e é considerado um complexo vegetacional de grande heterogeneidade fitofisionômica. Este bioma é apontado como grande detentor de diversidade biológica, sendo a formação savânica com maior diversidade vegetal do mundo, especialmente quando se consideram as espécies lenhosas (Neto e Moraes, 2003; Silva *et al.*, 2009).

Grande parte das espécies do Cerrado brasileiro é utilizada no tratamento de enfermidades de forma empírica, sendo uma alternativa para as classes sociais de baixa renda (Silva Júnior *et al.*, 2005). Estudos baseados em usos tradicionais das plantas do Cerrado já identificaram extratos e compostos isolados com potencial atividade biológica (Napolitano *et al.*, 2005; Coelho *et al.*, 2006; Rodrigues *et al.*, 2006; De Mesquita *et al.*, 2007; Moraes *et al.*, 2008; Nascimento *et al.*, 2009).

1.1 Constituintes químicos da madeira e casca

Dentre os materiais de origem biológica, a madeira é sem dúvida o mais conhecido e utilizado. Desde a antiguidade, a madeira não foi somente utilizada como material de construção, mas progressivamente também como importante matéria-prima para a produção de carvão, alcatrão e piche e suas cinzas utilizadas na produção de vidros e agentes branqueadores de linho e tecidos de algodão. Além disso, é a matéria-prima mais importante na produção de papel e conjuntamente com sua condição de matéria-prima renovável, torna-se um bem de inigualável valor para a humanidade. (Klock *et al.*, 2005).

A madeira apresenta composição química bastante variável. Estas variações podem ser encontradas entre espécies, entre partes diferentes de uma mesma árvore (raiz, tronco, folhas e casca) (Lamounier *et al.*, 2012) e dentro da mesma espécie devido a condições ambientais diferentes como localização, clima, solo e idade do vegetal (Silva, 2010). Todas as madeiras possuem basicamente três constituintes macromoleculares que formam sua parede celular: celulose, hemiceluloses e lignina (componentes estruturais). Encontram-se também os componentes secundários (componentes não estruturais) que possuem baixa massa molecular e são representados por compostos inorgânicos, denominados vulgarmente por cinzas e pelos compostos orgânicos, denominados de extrativos (Silva, 2010).

A madeira é mais bem definida quimicamente como um biopolímero tridimensional, formada por celulose, hemiceluloses, lignina e uma menor quantidade de extrativos e compostos inorgânicos (Rowell *et al.*, 2005).

A composição química da madeira adquire uma importância muito significativa, uma vez que, determina suas propriedades (químicas, físicas e mecânicas) e define seu uso final (Silva, 2010). A variação da quantidade de celulose, hemicelulose e lignina está relacionada à sua resistência a tração, compressão, umidade, ao ataque de insetos e patógenos, informações com grande relevância na definição dos possíveis usos de cada espécie de madeira (Fengel e Wegner, 1989). A qualidade da madeira está sempre relacionada com sua utilização. Para a indústria de papel e celulose, a madeira de boa qualidade é aquela que possui maior quantidade de celulose, fibras mais longas e pouca quantidade de extrativos. Assim, a qualidade da madeira pode ser definida como a combinação de características físicas, químicas, anatômicas e estruturais da árvore ou de suas partes que levam a um máximo de aproveitamento e uma melhor utilização para determinado fim (Trugilho *et al*, 2005).

A celulose é o principal polímero relacionado com a resistência da madeira devido ao seu elevado grau de polimerização e orientação linear, embora os outros componentes em diferentes níveis contribuam para sua resistência. As hemiceluloses agem como uma matriz para a celulose aumentando a densidade de empacotamento da parede celular. Além disso, as hemiceluloses funcionam como um elemento de ligação entre as fibras de celulose e a lignina. A lignina pode ser pensada como um “cimento” que mantém a madeira (celulose e hemiceluloses), em conjunto (Rowell *et al.*, 2005).

As árvores são vegetais constituídos por raiz, caule, folha, flor, fruto e sementes. O tronco é composto por vários materiais dispostos em bandas concêntricas. Da parte externa para a interna do tronco tem-se a casca externa, casca interna, câmbio vascular, alburno, cerne e âmago (Figura 1). A casca externa oferece proteção

mecânica para a casca interna e também, ajuda a limitar a perda de água por evaporação. A casca interna (floema) é o tecido através do qual os açúcares produzidos pela fotossíntese são transportados das folhas para as raízes. O câmbio vascular é a camada entre a casca e a madeira e é responsável pela formação de ambos os tecidos. O alburno é a “vida ativa” da madeira, responsável pela condução de água ou seiva das raízes para as folhas. O âmago no centro do tronco é o remanescente do crescimento inicial do tronco, antes da madeira ser formada (Wiedenhoeft e Miller, 2005).

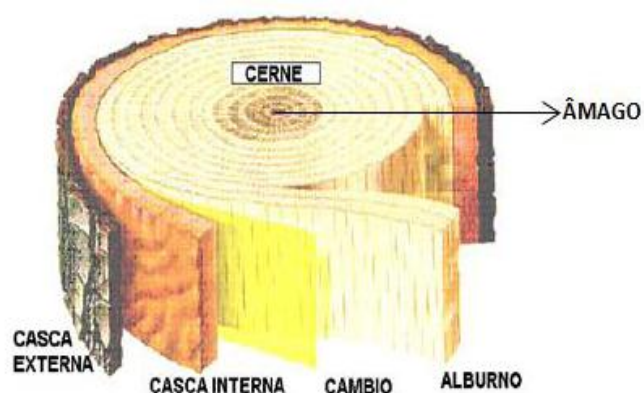


Figura 1. Aspectos macroscópicos de uma secção transversal do tronco de uma árvore (Klock *et al.*, 2005).

As madeiras de árvores classificadas como gimnospermas são denominadas madeiras moles (coníferas) e as madeiras originadas de angiospermas são denominadas de madeiras duras (folhosas) (Wiedenhoeft e Miller, 2005). Os componentes macromoleculares diferem entre as madeiras de coníferas e folhosas. A Tabela 1 apresenta a proporção aproximada dos constituintes em madeiras.

Tabela 1. Composição química em madeiras de coníferas e folhosas (Klock *et al.*, 2005)

COMPONENTES	CONÍFERAS	FOLHOSAS
Celulose	42 ± 2%	45 ± 2%
Polioses	27 ± 2%	30 ± 5%
Lignina	28 ± 2%	20 ± 4%
Extrativos	5 ± 3%	3 ± 2%

A casca é uma importante fonte de biomassa, quantificando cerca de 10 – 15% do total do peso de uma árvore. A caracterização química da casca é importante para avaliação do potencial da sua utilização, mas ainda recebe menor atenção quando comparada a madeira. Alguns métodos de análises de madeira não podem ser aplicados às cascas, tornando a determinação da composição química destas difíceis. Além disso, algumas substâncias presentes como polifenóis e suberina, podem interferir na determinação de lignina e holocelulose (Kofujita *et al.*, 1999).

A composição química das cascas é complexa e varia entre e dentro das espécies e também entre a casca interna e externa. Análises químicas em diferentes espécies indicam que os constituintes das cascas podem ser classificados em quatro grupos principais: polissacarídeos (Celulose, hemiceluloses e pectinas), lignina, polifenóis e extrativos (gorduras, óleos, ceras, taninos, terpenos, flavonoides e outros) (Rowell *et al.*, 2005).

A casca é constituída basicamente pelos mesmos constituintes macromoleculares principais e constituintes secundários que a madeira, entretanto, a composição percentual é diferente. Harkin e Rowe (1971) propuseram alguns valores médios para a composição aproximada dos componentes macromoleculares de cascas

entre coníferas e folhosas (Tabela 2). Destacaram também que análises de certas espécies poderiam estar fora desses limites.

Tabela 2. Composição química em cascas de coníferas e folhosas (Harkin e Rowe, 1971)

COMPONENTES	CONÍFERAS	FOLHOSAS
Polissacarídeos	30-48%	32-45%
Lignina	40-55%	40-50%
Extrativos	2-25%	5-10%
Cinzas	Até 20%	Até 20%

De acordo com estudos mais recentes com cascas de árvores de folhosas como os de Kofujita *et al.* (1999); Vieira *et al.* (2009), Martins (2012) e Lamounier *et al.* (2012) é possível propor outros valores para a composição dos componentes macromoleculares em cascas de folhosas (Tabela 3).

Tabela 3. Composição química aproximada dos constituintes em cascas de folhosas (Kofujita *et al.*, 1999; Vieira *et al.*, 2009; Lamounier *et al.*, 2012)

COMPONENTES	FOLHOSAS
Polissacarídeos	14 - 42 %
Lignina	18 - 42 %
Extrativos	41 - 58 %
Cinzas	1 - 8 %

A busca de novas fontes de matérias-primas de origem celulósica seja para a produção de polpa e papel, indústria moveleira ou mesmo para a produção de

combustíveis como carvão vegetal e etanol de segunda geração e a variabilidade na composição química de madeira e cascas justificam o interesse em identificar e conhecer as características químicas das espécies de madeira.

1.1.1 Celulose

A celulose é o material estrutural das plantas superiores. É constituída de cadeias não ramificadas de unidades de β -D-glicose, unidas por ligações β -1,4-glicosídicas (Figura 2). Na D-glicose, o carbono 5 é quiral, uma vez que a hidroxila deste carbono está representada no lado direito, por convenção, este composto recebe o nome de D-glicose (Figura 3) (Bruice, 2006).

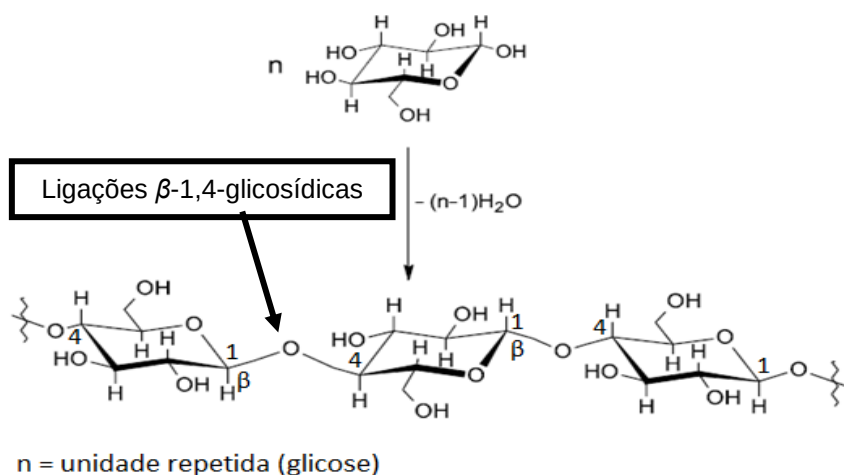


Figura 2. Representação estrutural da celulose (Morais *et al.*, 2005).

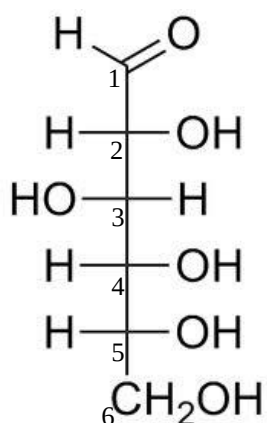


Figura 3. Fórmula estrutural da D-glicose (Bruice, 2006).

A configuração cíclica da D-glicose pode ser encontrada em duas formas dependendo da posição da hidroxila do carbono anomérico (C-1), posição β e posição α (Figura 4). Os monômeros de D-glicose na posição β são as unidades formadoras da celulose, e as unidades de D-glicose na posição α formam, por exemplo, o amido (Mc Murry, 2006). Na D-glicose, o grupo aldeído do carbono 1 (carbono anomérico), pode reagir com o grupo alcoólico do carbono 5, formando um hemiacetal. O fechamento da cadeia ocorre preferencialmente entre a carbonila do carbono 1 e o grupo hidroxila do carbono 5, pelo fato de formar um anel mais estável com seis átomos (Figura 5).

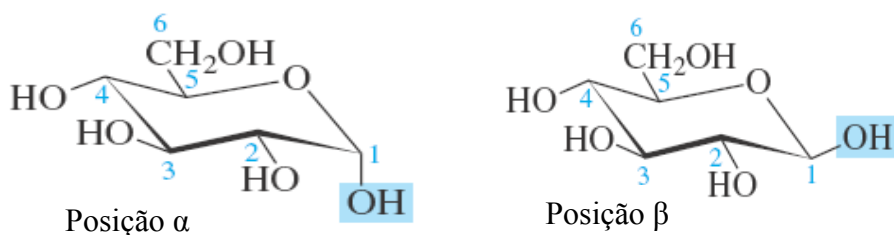


Figura 4. Conformação em cadeira da D-glicose nas posições α e β (Bruice, 2006).

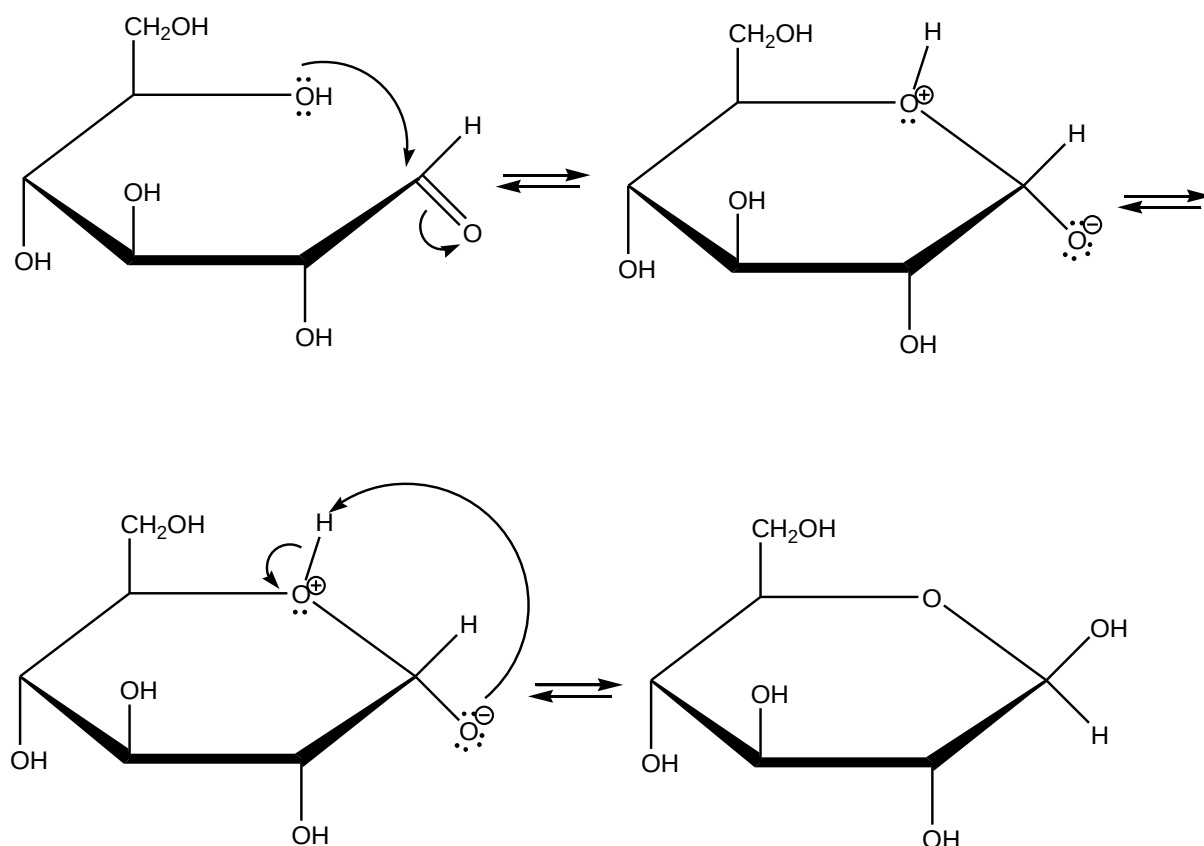


Figura 5. Formação de hemiacetal na molécula de glicose (Barbosa, 2011).

As ligações β na celulose promovem a formação de ligações de hidrogênio intramoleculares (entre unidades de glicose), conferindo as moléculas um arranjo linear. Ocorrem também, as ligações de hidrogênio intermoleculares entre cadeias adjacentes, isso torna a celulose insolúvel em água (Bruice, 2006). A Figura 6 mostra o posicionamento das ligações de hidrogênio na celulose. As ligações intramoleculares conferem certa rigidez às cadeias unitárias e as ligações intermoleculares são responsáveis pela formação da fibra vegetal. As fibras são constituídas de regiões cristalinas (altamente ordenadas) e amorfas (desordenadas). Na região cristalina a fibra tem maior resistência à tração, ao alongamento e à absorção de solventes (Fengel e

Wegener, 1989). As moléculas de celulose se alinham para formar as microfibrilas, que por sua vez, formam as fibrilas. As fibrilas se unem para formar a fibra celulósica (Klemm *et al.*, 2005).

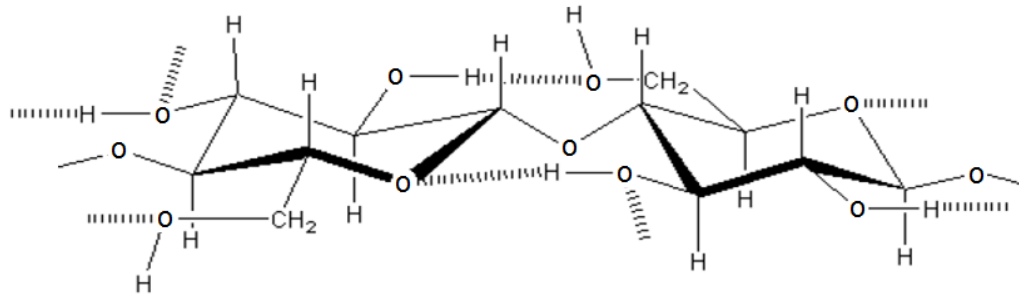


Figura 6. Posições de ligações de hidrogênio intra e intermoleculares.

As hidroxilas dos C-2, C-3 e C-6 podem sofrer reações semelhantes a dos alcoóis primários secundários. A hidroxila ligada ao C-6 é mais reativa que as hidroxilas dos C-2 e C-3, devido ao C-6 ser primário. A hidroxila do C-2 é mais reativa que a do C-3. Ambos são carbonos secundários, entretanto, a hidroxila do C-3 é menos reativa pelo fato de estar mais envolvida com ligações intramoleculares mais fortes (Krassig, 1993).

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. 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).

Na determinação da holocelulose (celulose e hemiceluloses), ocorre a solubilização da lignina e os polissacarídeos são obtidos como um resíduo sólido. O material livre de extrativos é tratado com solução de clorito de sódio em meio ácido (Browning, 1967). 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. 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. A reação que ocorre a 60 °C é: $4 \text{ClO}^- + 2 \text{HCl} \longrightarrow 2 \text{ClO}_2 + \text{ClO}_3^- + 3 \text{Cl}^- + \text{H}_2\text{O}$ (Browning, 1967). O dióxido de cloro formado no meio reacional promove a deslignificação pela reação dos grupos OH fenólicos com os radicais de dióxido de cloro iniciadas pela abstração do hidrogênio (Figura 7).

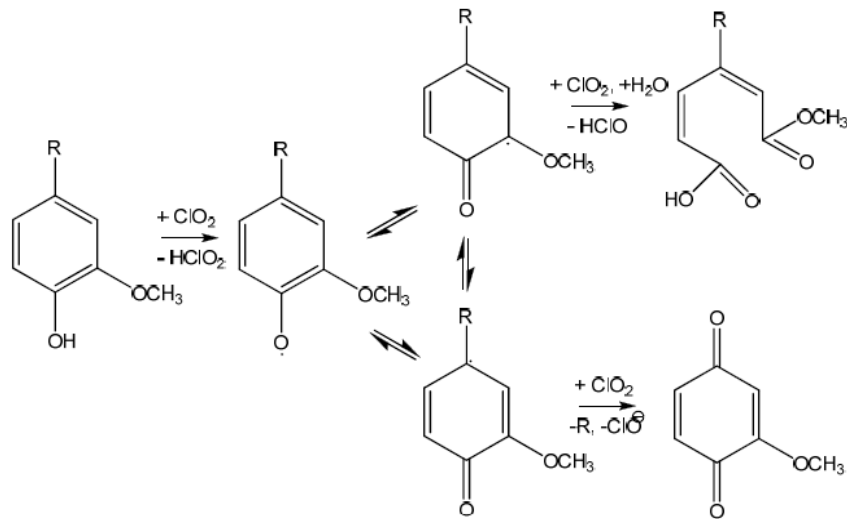


Figura 7. Degradação oxidativa das unidades fenólicas da lignina pelo dióxido de cloro (Marabezi, 2009).

1.1.2 Hemiceluloses (Polioses)

São polissacarídeos de massas moleculares relativamente baixas e estão intimamente associados à celulose nos tecidos das plantas. Enquanto a celulose contém como unidade fundamental exclusivamente β -D-glicose, as hemiceluloses são polímeros cuja composição apresenta diferentes unidades de açúcar (Figura 8) (Fengel e Wegener, 1989). Ao contrário da celulose, as hemiceluloses não são cristalinas e têm um arranjo em geral amorfo, encontrando-se as moléculas dos açúcares dispostas em cadeias com algumas ramificações (Silva, 2010). Algumas unidades de açúcar apresentam cinco átomos de carbono e são denominadas de pentoses. Outras possuem seis átomos de carbono e são denominadas hexoses. Assim os polímeros podem ser formados pela condensação de pentoses (pentosanas), ou pela condensação de hexoses (hexosanas) (Fengel e Wegener, 1989).

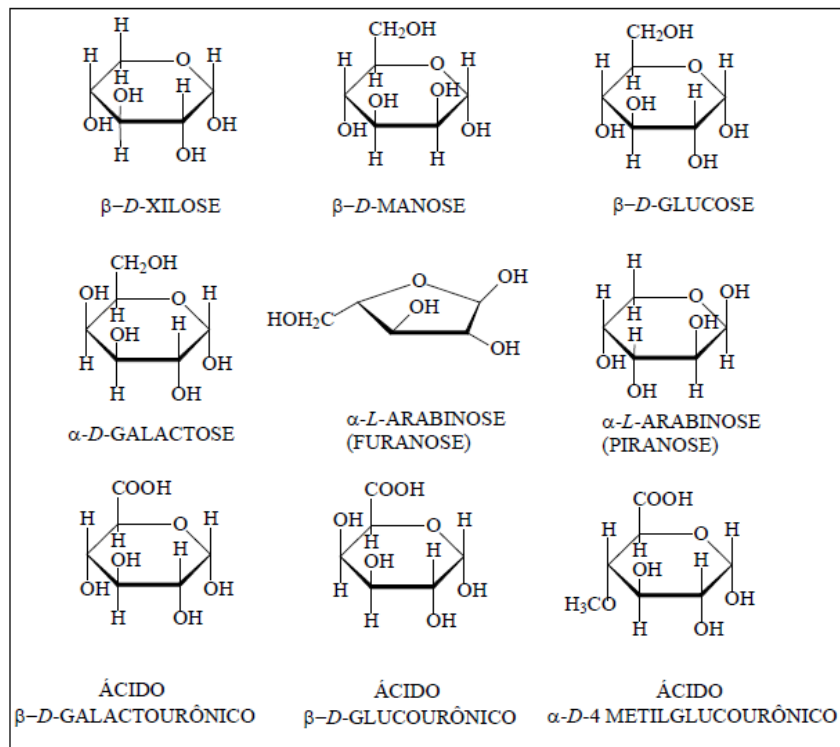


Figura 8. Açúcares que compõem as unidades de hemiceluloses (Fengel e Wegener, 1989).

As hemiceluloses apresentam-se como misturas complexas de polissacarídeos sendo os mais importantes em madeiras as glucxilanas, arabinoglucxilanas, glucomananas, arabinogalactanas e galactoglucomananas (Morais *et al.*, 2005). A Figura 9 apresenta a estrutura de uma hemicelulose (galactoglucomanana). Para um melhor entendimento da nomenclatura de polioses, um polissacarídeo formado por unidades de arabinose e galactose é denominado arabinogalactana, outro formado por unidades de arabinose, ácido glucourônico e xilose é denominado arabinoglucouranoxilana e assim por diante.

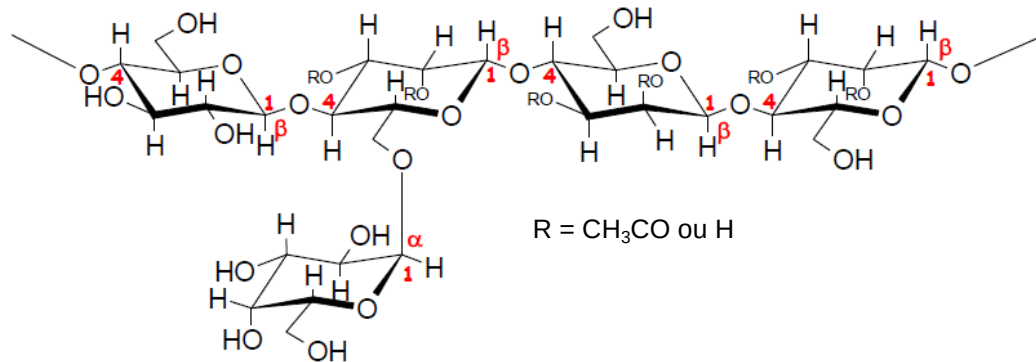


Figura 9. Estrutura representativa de uma galactoglucomanana (Morais *et al.*, 2005).

Algumas hemiceluloses contêm adicionalmente ácidos urônicos. As cadeias moleculares são mais curtas que a de celulose, podendo existir grupos laterais e ramificações em alguns casos. As folhosas, de maneira geral, contêm maior teor de políoses que as coníferas com composição diferenciada (Klock *et al.*, 2005). Geralmente as hemiceluloses de coníferas possuem uma proporção maior de unidades de manose e galactose quando comparadas às folhosas. Estas por sua vez, apresentam uma maior proporção de unidades de xilose (Fengel e Wegener, 1989).

As hemiceluloses são diferenciadas da celulose pela relativa facilidade de hidrólise por ácidos diluídos e pela solubilidade em soluções alcalinas, e dos extrativos pelo fato de serem insolúveis em solventes orgânicos neutros e na sua grande maioria são insolúveis em água.

1.1.3 Lignina

A palavra lignina vem do latim "*lignum*" e quer dizer madeira. São macromoléculas tridimensionais, que conferem rigidez a parede celular e atuam como agente de ligação entre a celulose e as polioses, gerando uma estrutura resistente ao impacto, à compressão e dobra. (Lebo *et al.*, 2004). Tem um papel importante no transporte de água, nutrientes e metabólitos, na resistência mecânica dos vegetais e protege os tecidos contra o ataque de microrganismos (Fengel e Wegener, 1989).

A lignina é o segundo material mais abundante do reino vegetal, possuindo natureza aromática e muito complexa. É um polímero derivado de unidades de fenilpropano (unidades C_9 ou C_6C_3) que tem sua origem na polimerização desidrogenativa dos álcoois cumarílico (unidade *p*-hidroxifenila), coniferílico (unidade guaiacila) e sinapílico (unidade siringila) (Figura 10) (Moraes *et al.*, 1993). A lignina de madeiras duras (folhosas) é geralmente formada por unidades guaiacilpropano (G) e siringilpropano (S), enquanto a lignina de madeiras moles (coníferas) é formada geralmente por unidades de guaiacilpropano (G). A lignina de gramíneas contém unidades guaiacilpropano (G), siringilpropano (S) e unidades de *p*-hidroxifenilpropano (H) (Kishimoto *et al.*, 2010). Além dessas duas unidades básicas, pequenas quantidades de unidades *p*-hidroxifenilpropano, também são encontradas, em coníferas e folhosas (Moraes *et al.*, 1993).

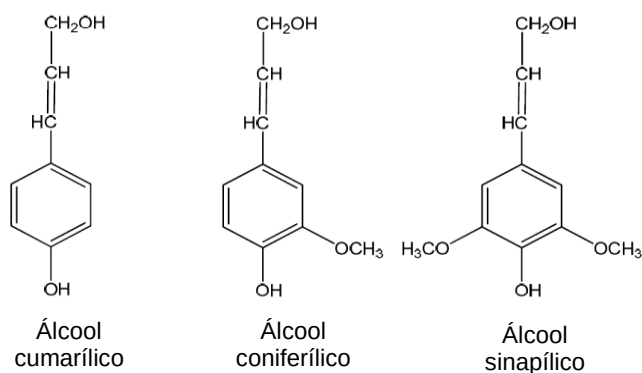


Figura 10. Estruturas dos álcoois precursores das ligninas (Morais *et al.*, 1993).

A polimerização da lignina é iniciada pela oxidação do grupo hidroxila ligada diretamente ao anel aromático (fenol). Os precursores de lignina sofrem desidrogenações enzimáticas, que são iniciadas por transferência de elétrons e estabilizações dos radicais fenolato por ressonância (Freudenberg e Neish, 1968). A Figura 11 indica a representação de formação do radical fenolato no álcool coniferílico e os sítios ativos onde podem ocorrer as polimerizações e na Figura 12 está representado as principais ligações entre os monômeros precursores da lignina.

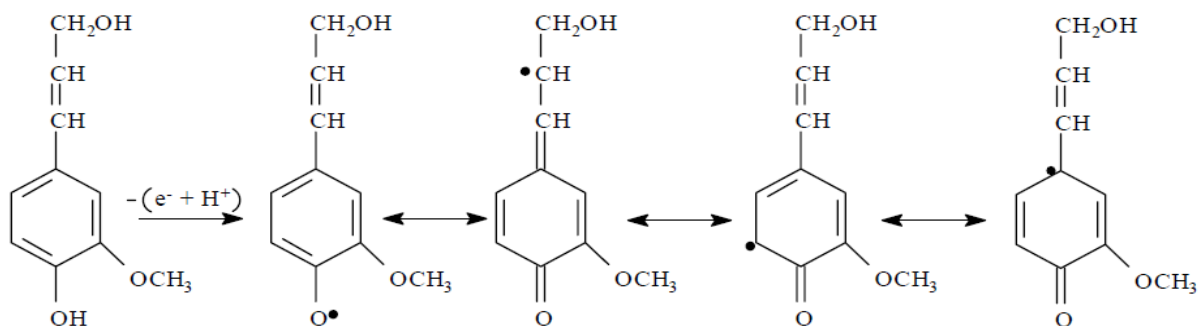


Figura 11. Formação do radical fenolato no álcool coniferílico e estabilizações por ressonância (Morais *et al.*, 1993).

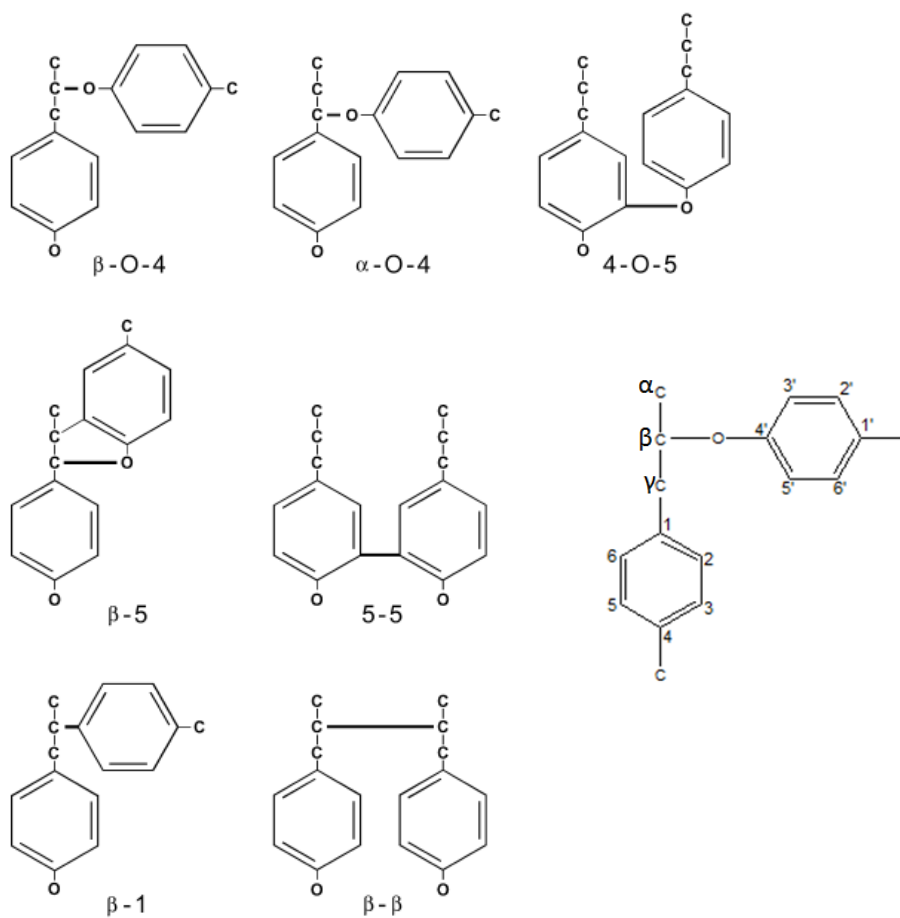


Figura 12. Principais ligações entre os monômeros precursores da lignina (Knabner-Kogel, 2002).

As ligninas apresentam estruturas bastante diversificadas entre as espécies, e até mesmo dentro de uma mesma espécie, quando são analisadas diferentes partes do vegetal (Morais *et al.*, 2001). Na Figura 13 é apresentado a estrutura proposta para a lignina de *Eucalyptus grandis* por Moraes *et al.* (1993).

Lignina

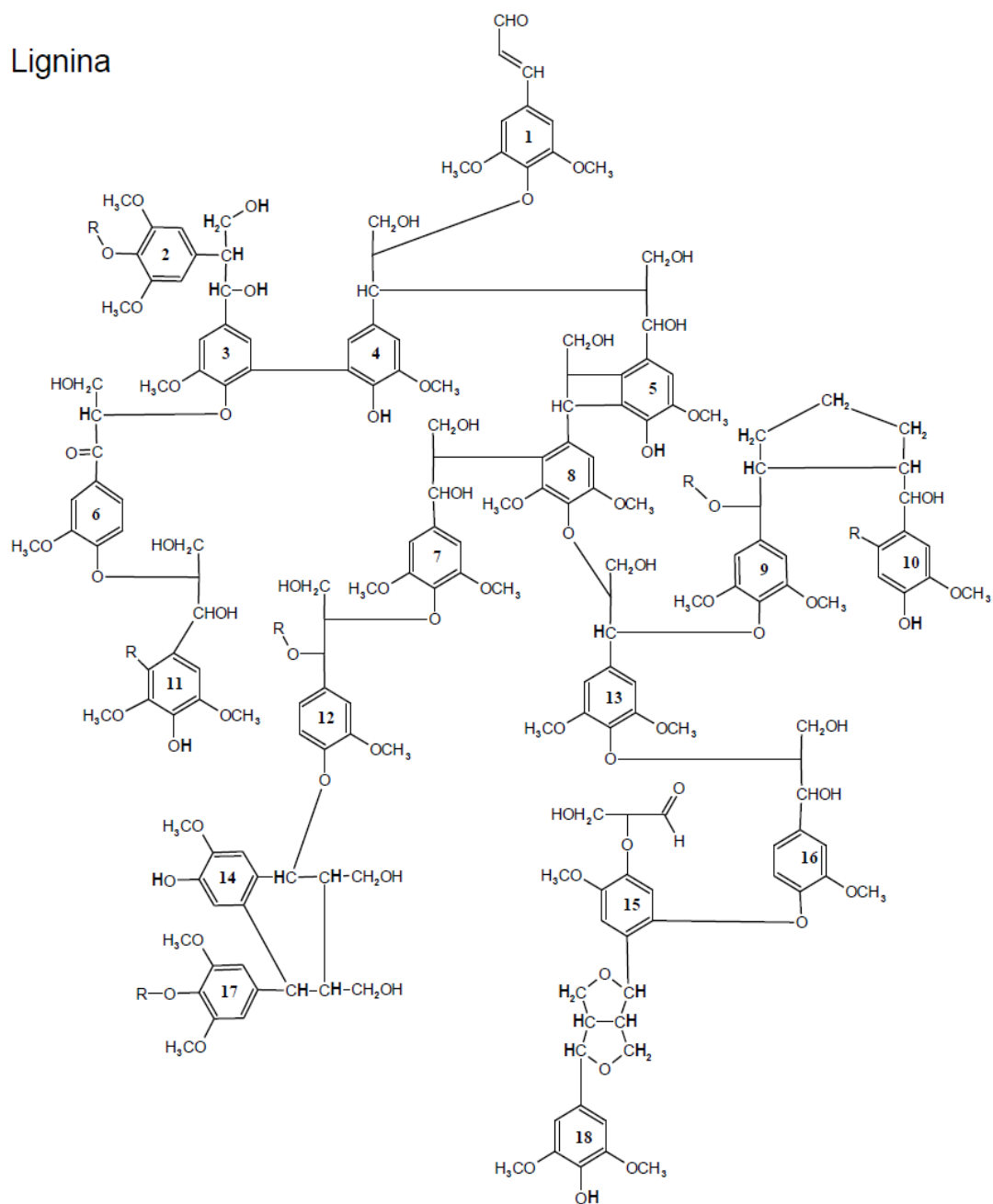


Figura 13. Estrutura proposta para a lignina de *Eucalyptus grandis* (folhosa) (Morais *et al.*, 1993).

Com relação aos métodos para determinação de lignina, nenhum é considerado totalmente satisfatório. Isso ocorre porque o isolamento da lignina gera modificações na sua estrutura, obtendo-se uma lignina diferente da nativa (*in situ*). Os métodos para as determinações de lignina podem ser divididos em métodos diretos e indiretos. No método direto a lignina é obtida como um resíduo e o método indireto a lignina pode ser calculada pela diferença entre 100% e a quantidade de polissacarídeos presentes em uma amostra livre de extrativos (Marabezi, 2009).

O método direto consiste na hidrólise ácida e na solubilização total ou parcial dos polissacarídeos (celulose e hemiceluloses) presentes na amostra, obtendo-se a lignina como um resíduo. A hidrólise é realizada com a utilização de ácidos minerais concentrados, principalmente ácido sulfúrico 72%, e o resíduo obtido é denominado lignina de Klason. A obtenção da lignina de Klason inicia com o tratamento da amostra com ácido sulfúrico a 72% à temperatura ambiente, seguida de uma diluição do ácido para 3% com aquecimento até a completa hidrólise (Browning, 1967). Esse procedimento é o método oficial das normas TAPPI – T222 om-88 (TAPPI, 1999). É possível que parte da lignina permaneça solubilizada na solução ácida sendo chamada de lignina solúvel em ácido.

A hidrólise ácida ocorre com a quebra das ligações glicosídicas e os seus respectivos mecanismos estão apresentados na Figura 14 (Fengel e Wegener, 1989).

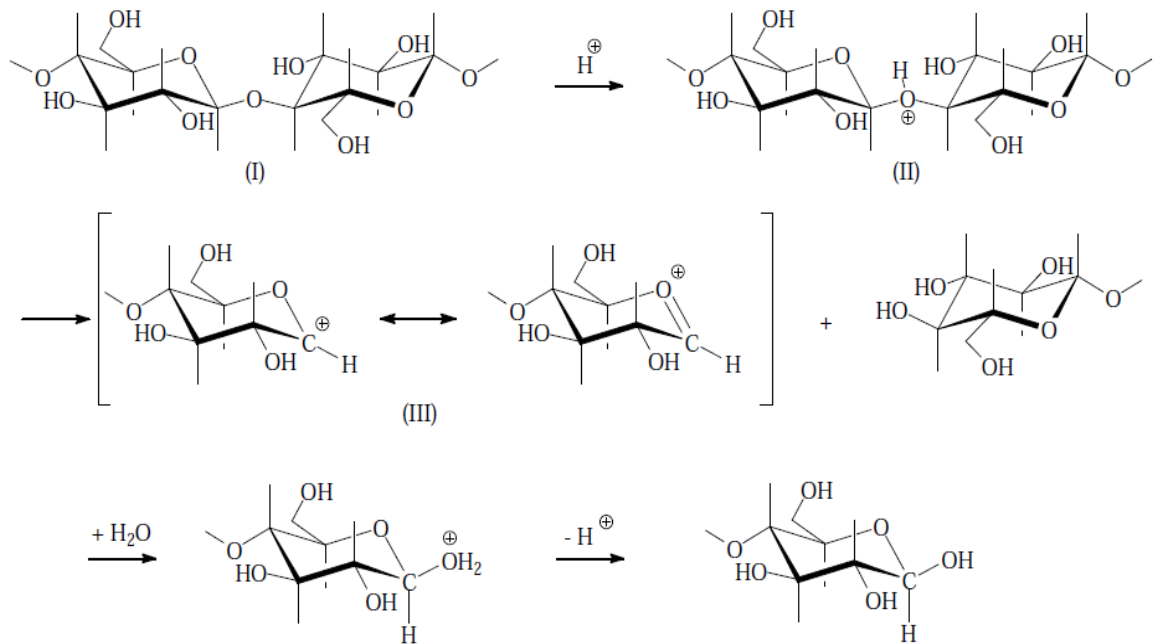


Figura 14. Esquema de hidrólise ácida em ligações glicosídicas (Marabezi, 2009).

Durante a solubilização dos polissacarídeos pelo tratamento ácido, vários produtos de degradação podem ser formados. Os principais produtos de degradação são o furfural, formado a partir de pentoses e ácidos urônicos e hidroximetilfurfural, formado a partir de hexoses. Em temperaturas elevadas, hidroximetilfurfural (HMF), pode decompor-se em ácido levulínico, formaldeído e furfural. A formação desses produtos de degradação a partir de glicose e xilose está apresentada na Figura 15 (Marabezi, 2009).

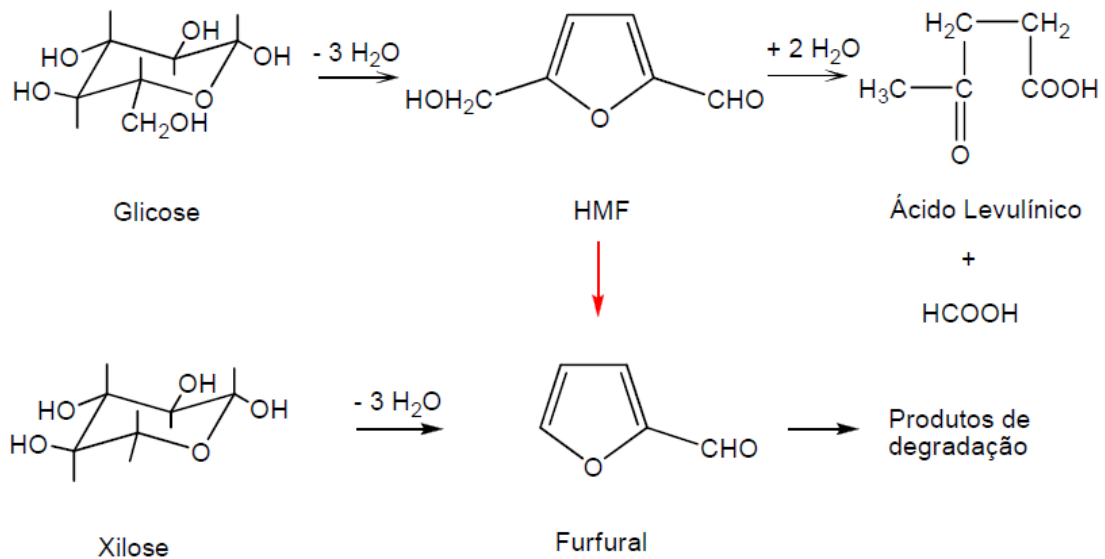


Figura 15. Produtos de degradação formados a partir da hidrólise ácida de polissacarídeos (Marabezi, 2009).

Fatores como concentração do ácido, tempo e a temperatura podem alterar o rendimento e a composição da lignina de Klason. Quando se utiliza ácido sulfúrico em concentrações abaixo de 65% (v/v), tempo de reação muito pequeno e temperatura muito baixa, os polissacarídeos não são totalmente hidrolisados, ao contrário, ácido sulfúrico com concentrações acima de 80% (v/v) pode ocorrer a degradação dos carboidratos em produtos insolúveis. Além disso, tempo de reação prolongado e temperaturas muito altas promovem um falso aumento de lignina (Lin e Dence, 1992).

1.1.4 Extrativos e cinzas

Os extrativos são componentes químicos orgânicos que podem ser extraídos de madeiras e cascas com a utilização de vários solventes. São geralmente relacionados nos vegetais como precursores para a biossíntese de outros compostos ou produzidos para fins de defesa. Os extrativos consistem principalmente de gorduras, ácidos graxos, álcoois, fenóis, terpenos, esteroides, ceras, resinas e outros compostos orgânicos em menor concentração. Podem ser encontrados na forma de monômeros, dímeros ou polímeros. O teor de extrativos em madeiras moles geralmente é maior que em madeiras duras e a maioria desses extrativos estão localizados no cerne, sendo responsáveis pela cor, cheiro e durabilidade. Geralmente, o conteúdo de extrativos nas cascas é maior que nas madeiras (Rowel, 2005).

Os métodos de análises para as madeiras não podem ser usados diretamente para as cascas. Existem compostos nas cascas que não são encontrados em madeiras. Por exemplo, a presença de suberina nas cascas limita o acesso de agentes deslignificantes, com isso, não há um fracionamento individual ideal dos componentes macromoleculares. Além da suberina, flavonoides e taninos condensados podem complicar as análises das cascas, pelo fato dessas estruturas permanecerem com a lignina ou na fração de polissacarídeos e o valor desses componentes na casca serem erroneamente mais altos (Rowel, 2005).

Os extrativos polares das cascas (taninos, polifenóis, glicosídeos) são geralmente três a cinco vezes superiores aos constituintes apolares (gorduras, ácidos graxos, terpenos e esteroides) (Harkin e Rowe, 1971).

A porção inorgânica da madeira é analisada como cinza por incineração do material orgânico madeira ou casca a 600~850°C. A porcentagem de cinzas está entre 0,2 - 0,5% no caso de madeiras de zonas temperadas, mas frequentemente valores mais altos podem ser encontrados em madeiras tropicais (Marabezi, 2009). As cinzas são normalmente determinadas em amostras que não sofreram extração, porque componentes inorgânicos podem ser removidos durante uma etapa de extração com água (Klock *et al.*, 2005). Os principais componentes das cinzas da madeira são: K, Ca e Mg, e são obtidos na incineração na forma de óxidos. Outros metais encontrados na madeira são manganês, zinco, ferro, alumínio, cromo, níquel entre outros. Os metais são encontrados como carbonatos, silicatos, oxalatos e fosfatos. A casca contém maior porcentagem de conteúdo mineral do que a madeira, os metais são encontrados como oxalatos, fosfatos, silicatos, entre outros e os principais são sódio, cálcio, potássio, manganês, zinco, fósforo e magnésio (Sjöström, 1993).

1.2 Considerações sobre os solventes utilizados em extrações

Quando se busca extrações de materiais vegetais e posteriormente a preparação de extratos brutos, alguns fatores são considerados como características do material vegetal: o seu grau de divisão, metodologias, temperatura, tempo e principalmente os solventes e suas polaridades. De acordo com a polaridade do solvente empregado, é possível selecionar os compostos que possivelmente estarão presentes em uma determinada extração. Atualmente, na maioria dos trabalhos envolvendo análises fitoquímicas objetivando o isolamento de constituintes químicos presentes em um

vegetal, a extração inicial se dá por maceração a frio utilizando os solventes etanol ou metanol. Misturas hidroalcólicas com etanol ou metanol a 80% também são frequentemente utilizadas. Isso se deve ao fato de que praticamente todos os constituintes de interesse para a análise fitoquímica apresentam alguma solubilidade em misturas etanólicas ou metanólicas a 80% (Filho e Yunes, 1998).

Quando já se tem ideia da polaridade dos compostos desejados, deve-se escolher o solvente com a polaridade que seja a mais seletiva possível. Caso contrário, deve realizar uma partição líquido-líquido do extrato alcoólico bruto com solventes em ordem crescente de polaridade como hexano, diclorometano, acetato de etila e butanol, buscando uma semi-purificação das substâncias através da polaridade. Outros solventes de polaridade similares também podem ser empregados nos processos de extração (Filho e Yunes, 1998). Alguns solventes em ordem crescente de polaridade e os respectivos metabólitos secundários extraídos por eles foram propostos por Filho e Yunes (1998) e Simões (2004) e estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4. Separação provável dos principais metabólitos secundários presentes em plantas (^aSimões, 2004; ^bFilho e Yunes, 1998)

SOLVENTES	TIPOS DE SUBSTÂNCIAS PREFERENCIALMENTE EXTRAÍDAS
Hexano	Lipídeos ^a , ceras ^a , pigmentos ^a , furanocumarinas ^a , esteroides ^b , terpenos ^b e acetofenonas ^b
Diclorometano / Clorofórmio	Bases livres de alcaloides ^a , antraquinonas livres ^a , óleos voláteis ^a , lignanas ^b , flavonoides metoxilados ^b , sesquiterpenos ^b , triterpenos ^b , lactonas ^b , cumarinas ^b
Acetato de etila	Flavonoides ^{a,b} , cumarinas simples ^a , taninos ^b , xantonas ^b , ácidos triterpênicos ^b , compostos fenólicos em geral ^b , saponinas ^b
Butan-1-ol	Flavonoides ^a , cumarinas simples ^a , flavonoides glicosilados ^b , taninos ^b , saponinas ^b , carboidratos ^b
Etanol / Metanol	Heterosídeos em geral ^a
Água acidificada	Alcaloides ^a
Água alcalinizada	saponinas ^a

No objetivo de verificar os potenciais efeitos biológicos dos extratos de um vegetal e isolar seus princípios ativos, deve-se testar todos os extratos semi-puros, e aquele que apresentar efeito biológico de interesse, deverá ser submetido aos procedimentos cromatográficos para o isolamento e a purificação dos compostos bioativos (Filho e Yunes, 1998).

1.3 Metabólitos secundários

O metabolismo em um ser vivo pode ser entendido como um conjunto de reações químicas que ocorrem em cada célula. A presença de enzimas específicas garante certo direcionamento nas reações, estabelecendo o que se denomina de rotas metabólicas. Os compostos químicos formados, degradados ou transformados são chamados de metabólitos (Simões, 2004). Alguns compostos como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, proteínas, ácidos nucleicos e lipídios são produzidos por todos os seres vivos. Por serem comuns aos organismos vivos e essenciais a sua sobrevivência, têm sido definidos como integrantes do metabolismo primário e são denominados metabólitos primários. Os vegetais a partir dos metabólitos primários produzem inúmeras outras substâncias não necessariamente relacionadas de forma direta com a manutenção da vida. Esses compostos são denominados metabólitos secundários (Dewick, 2002). Os metabólitos secundários foram considerados por muito tempo produtos de excreção do vegetal. Hoje, sabe-se que essas substâncias estão envolvidas com mecanismos de defesa contra herbívoros e microrganismos, proteção

contra raios UV, atração de polinizadores ou animais dispersores de sementes e alelopatias (Simões, 2004).

As substâncias naturais bioativas se agrupam em quatro classes principais: os terpenos (hormônios, pigmentos ou óleos essenciais), as substâncias fenólicas (flavonoides, lignina e taninos), as substâncias glicosídicas (saponinas, glicosídeos cardiotônicos, glicosídeos cianogênicos e glicosinolatos) e os alcaloides (Garcia e Carril, 2009). Os terpenos são sintetizados a partir da acetil-CoA, via rota do ácido mevalônico, ou via rota do metileritritol fosfato (MEP). Os compostos fenólicos são biossintetizados a partir de duas rotas principais, do ácido chiquímico e do ácido malônico e os compostos nitrogenados são sintetizados a partir dos aminoácidos (Figura 16) (Simões, 2004).

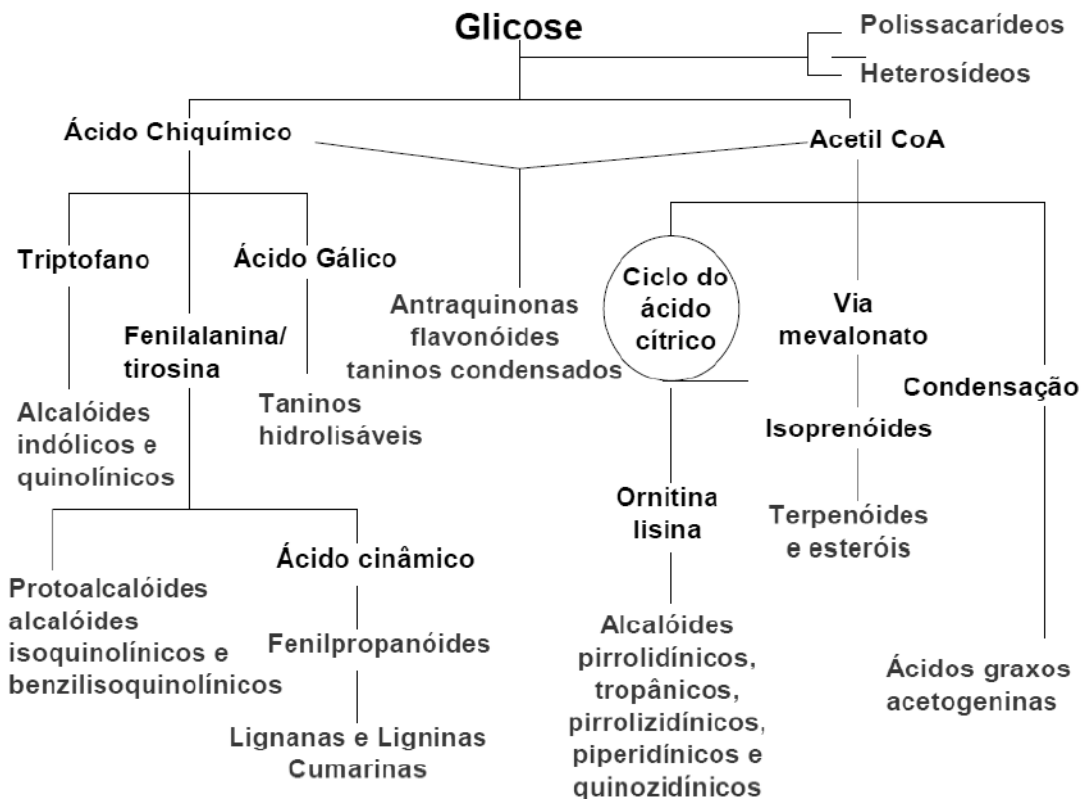


Figura 16. Esquema das vias do metabolismo secundário de plantas (Simões, 2004).

1.3.1 Terpenos

Os terpenos são metabólitos secundários derivados do isopreno (C₅) e são classificados em monoterpenos (C₁₀), sesquiterpenos (C₁₅), diterpenos (C₂₀), triterpenos (C₃₀) e tetraterpenos (C₄₀). (Dewick, 2002; Bakkali, 2008). As unidades de isopreno podem ser derivadas a partir de duas rotas: do mevalonato e do 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP).

Pela via do mevalonato, a molécula acetil-coenzima A é o precursor de terpenos. Pela condensação de Claisen, dois equivalentes de acetil-CoA produzem acetoacetil-CoA. Seguindo o padrão de uma reação de condensação aldólica, acetoacetil-CoA reage com outro equivalente de acetil-CoA como um nucleófilo de carbono para originar β -hidroxi- β -metilglutaril-CoA, em seguida, a redução enzimática com dihidronicotinamida-adenina-dinucleótido (NADPH) (Figura 17), na presença de água, obtem-se (*R*)-ácido mevalônico. A fosforilação do ácido mevalônico pelo ATP (adenosina trifosfato) (Figura 17) fornece o difosfato de ácido mevalônico que é descarboxilado e desidratado, formando o isopentenildifosfato (IPP). Este último isomeriza na presença de uma isomerase para dimetil-alil-difosfato (DMAPP) (Figura 18). O grupo eletrofílico alílico CH₂ do dimetil-alil-difosfato e o grupo nucleofílico do isopentenil-difosfato reagem produzindo o geranil-difosfato (GPP) com 10 átomos de carbono. A reação do geranil-difosfato (GPP) com outra molécula de IPP origina o farnesil difosfato (FPP), composto formado por 15 átomos de carbono e precursor dos sesquiterpenos, e assim sucessivamente até formar os politerpenos (Figura 19) (Breitmaier, 2006).

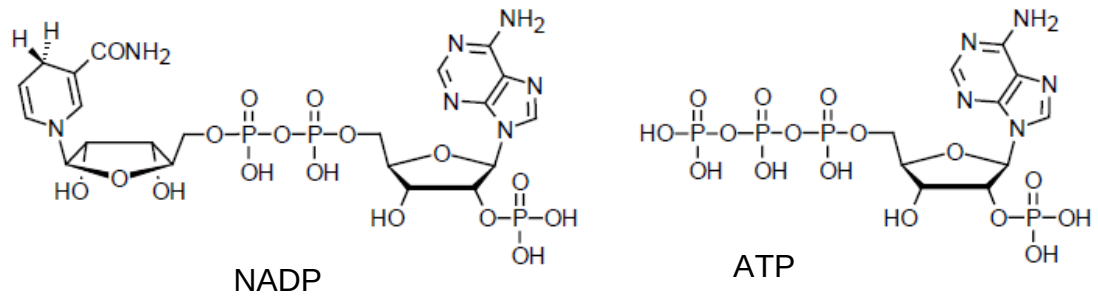


Figura 17. Estruturas químicas do NADPH e ATP (Breitmaier, 2006).

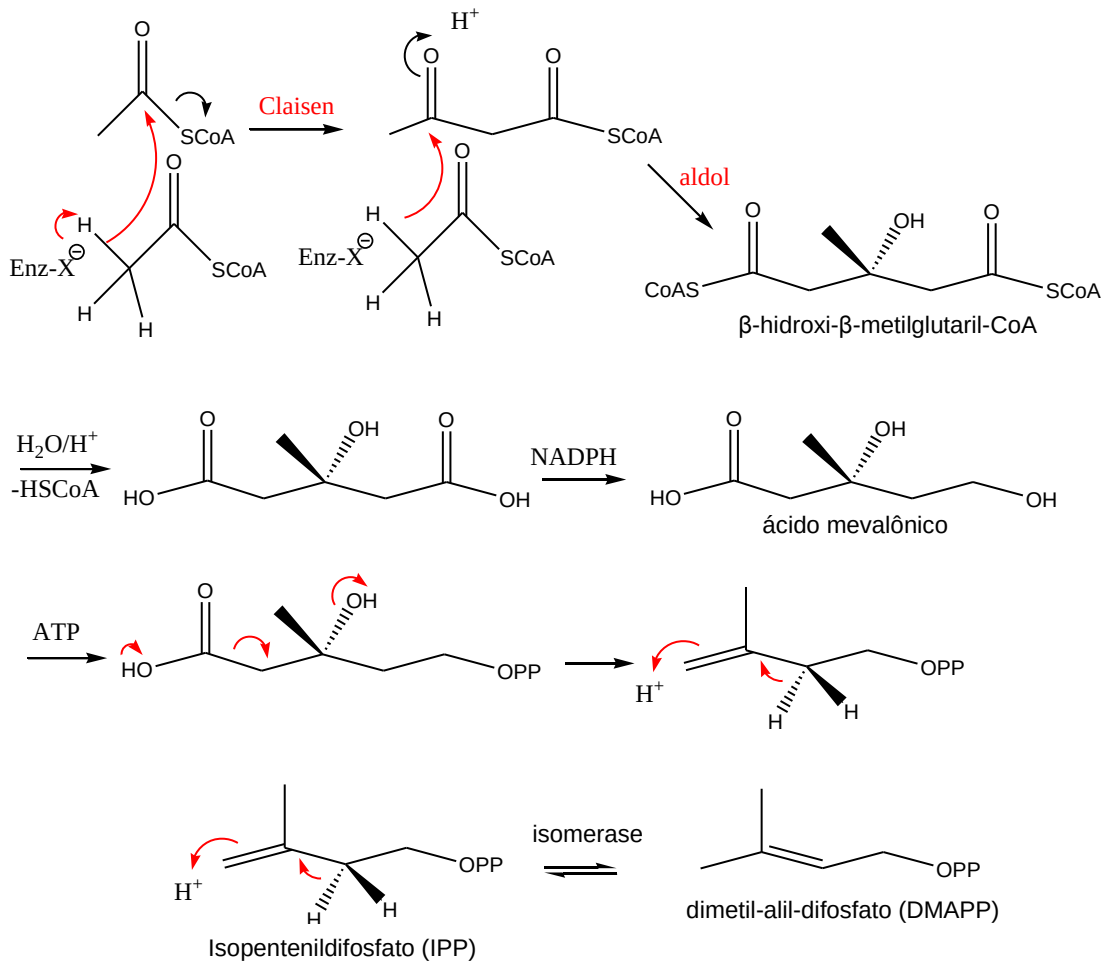


Figura 18. Mecanismo de formação do ácido mevalônico e geranyl-pirofosfato (Dewick, 2002).

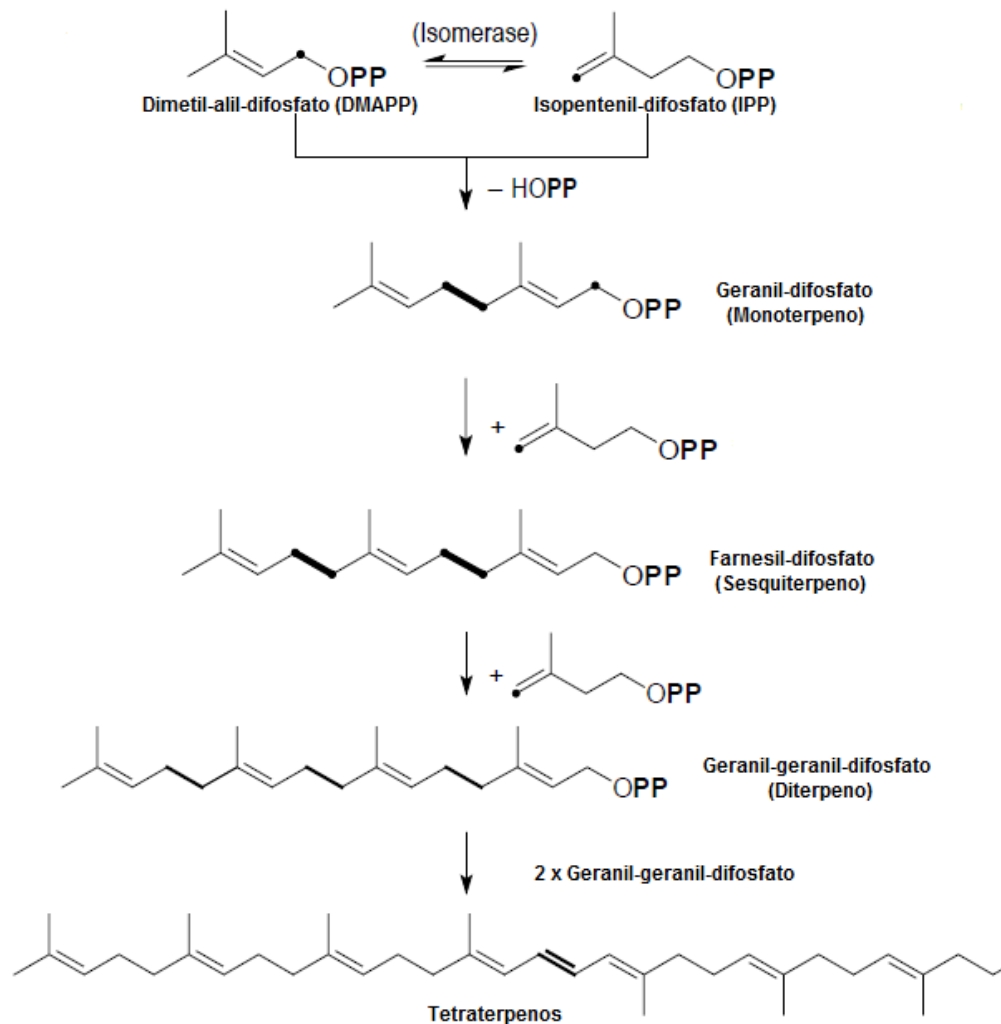


Figura 19. Formação de monoterpenos e sesquiterpenos (Breitmaier, 2006).

A produção de isopentenilpirofosfato (IPP) pode ocorrer no cloroplasto pela via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (DXP) pela condensação de uma molécula de piruvato e outra de D-gliceraldeído-3-fosfato que origina o IPP que se converte em seu isômero DMAPP (Figura 20) (Breitmaier, 2006).

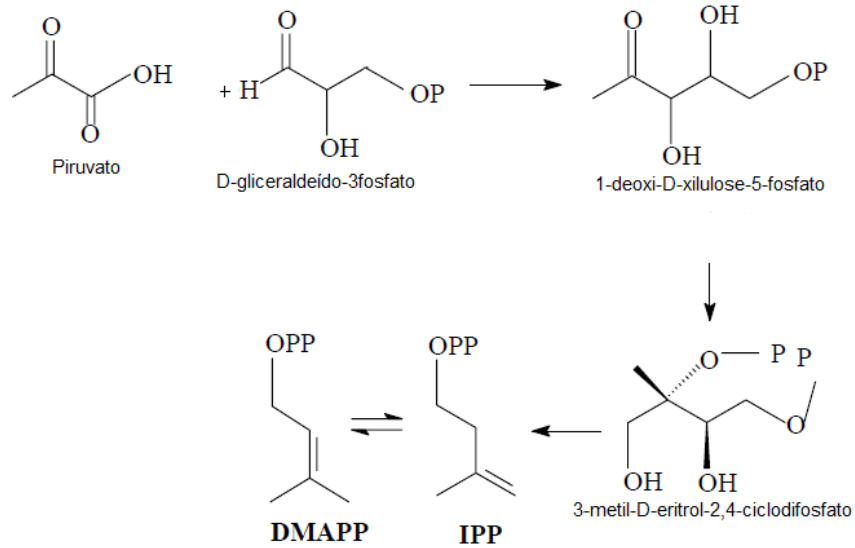


Figura 20. Biossíntese de terpenos via 1-deoxi-D-xilulose-5-fosfato (Breitmaier, 2006).

Os compostos terpênicos formados na biossíntese de vegetais podem ser hidrocarbonetos, álcoois, aldeídos, cetonas, ácidos carboxílicos e ésteres (Bakkali, 2008). Na Figura 21 estão representados alguns monoterpenos acíclicos formados a partir do geranil-difosfato.

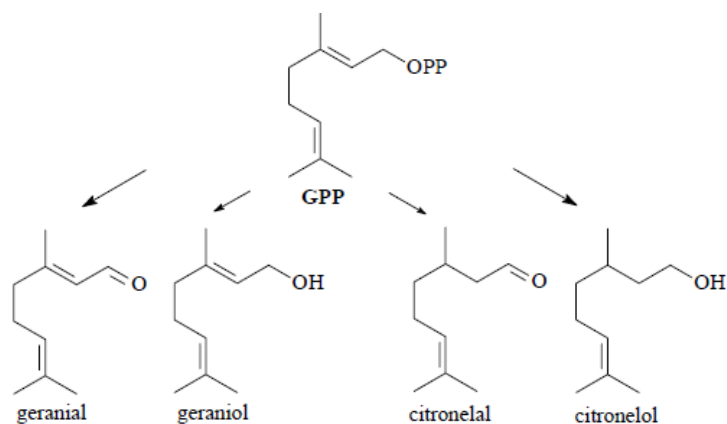


Figura 21. Monoterpenos acíclicos (Dewick, 2002).

O papel dos monoterpenos nos vegetais, ainda não é totalmente definido, mas em geral, entende-se que eles atuam na atração de polinizadores, defesa e como mediadores entre plantas e ambiente (Phillips e Croteau, 1999). Os monoterpenos são constituintes dos óleos essenciais e são importantes na indústria de perfumes e fragrâncias. Alguns compostos atuam como herbicidas, pesticidas, antimicrobianos e agentes anticarcinogênicos em alimentos (Silva, 2005).

Vários monoterpenos como, por exemplo, limoneno, α -terpineol, α -pineno e linalol; sesquiterpenos como *trans*-cariofileno e espatulenol e o diterpeno fitol têm sido identificados em análises de óleos essenciais de folhas, frutos, casca e madeira de plantas do cerrado por nosso grupo de pesquisa (Figura 22). Os principais constituintes terpênicos nesses óleos foram monoterpenos e sesquiterpenos. (Aquino *et al.*, 2013; Martins, 2012; Chang *et al.*, 2011; Londe, 2004; Queiroz, 2001).

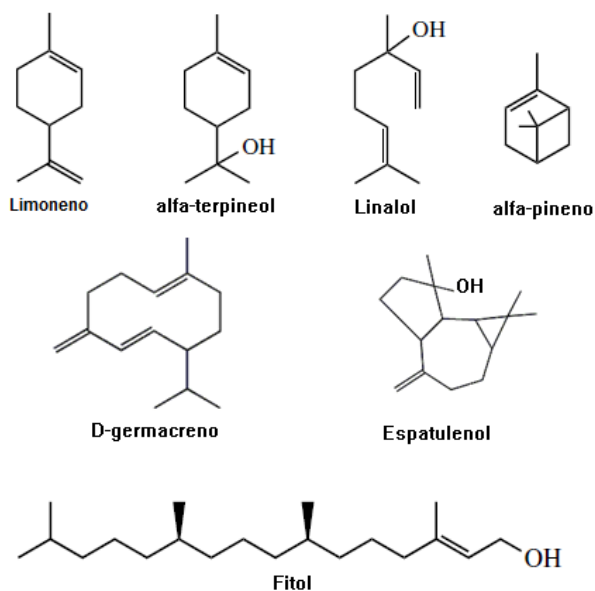


Figura 22. Monoterpenos, sesquiterpenos e diterpeno encontrados em plantas do Cerrado (Aquino *et al.*, 2013; Martins, 2012; Chang *et al.*, 2011; Londe, 2004; Queiroz, 2001).

Para exemplificar modelos de compostos diterpenos pode-se citar os compostos *ent*-15-pimareno-8 β -19-diol e o ácido *ent*-kaur-16(17)-en-19-oico (Porto *et al.*, 2009) e de triterpenos os ácidos ursólico e oleanóico (Cunha *et al.*, 2007) que são importantes protótipos para o desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos para uso farmacológicos. Além disso, os triterpenos ácidos oleanóico e ursólico possuem interessante atividade tripanocida (Figura 23) (Cunha *et al.*, 2006). Os esteroides são formados a partir dos triterpenos. Eles participam da formação das membranas celulares na planta. A ecdisona é um esteroide que possui função protetora contra insetos (Garcia e Carril, 2009).

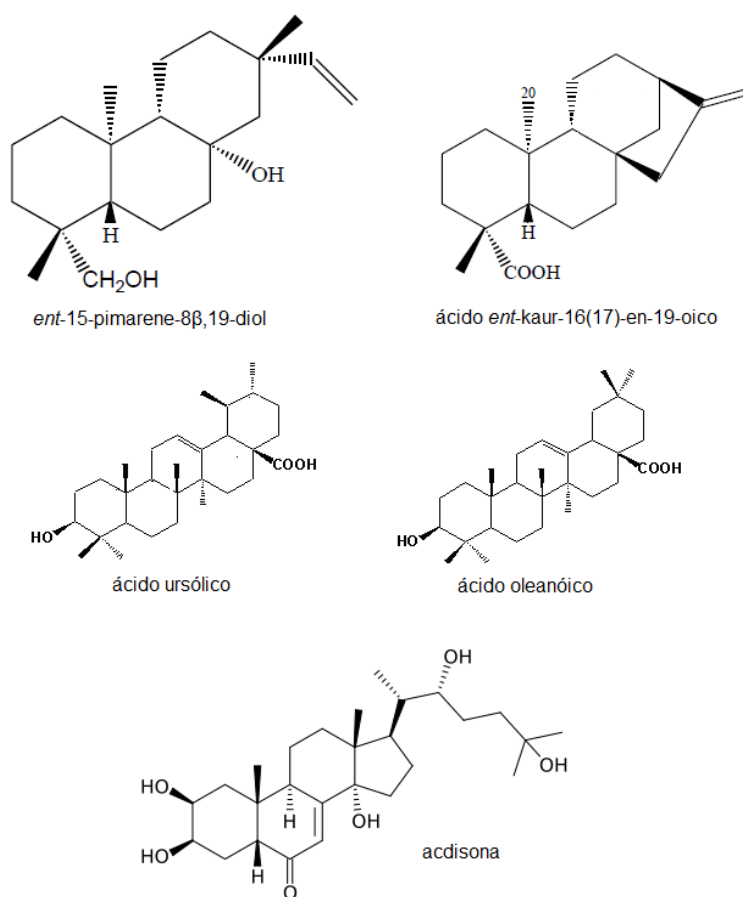


Figura 23. Estruturas químicas de diterpenos e triterpenos e do esteroide ecdisona (Porto *et al.*, 2009; Cunha *et al.*, 2006).

1.3.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos pertencem a uma classe de compostos que inclui uma grande diversidade de estruturas simples e complexas, que possuem pelo menos um anel aromático e pelo menos um hidrogênio substituído por uma hidroxila (Simões, 2004). Compreendem desde fenóis simples até sistemas de fenóis mais complexos como: lignanas, estilbenos, flavonoides, quinonas e taninos. Os compostos fenólicos podem ser classificados segundo o tipo de esqueleto principal conforme apresentado na Tabela 5.

Tabela 5. Classificação dos compostos fenólicos de acordo com seu esqueleto básico (Simões, 2004)

ESTRUTURA	CLASSE
C_6	Fenóis
C_6-C_1	Ácidos hidroxibenzoicos
C_6-C_3	Acetofenonas, ácidos fenilacéticos e hidroxicinâmicos, cumarinas e cromonas
C_6-C_4	Naftoquinonas
$C_6-C_1-C_6$	Benzofenonas e xantonas
$C_6-C_2-C_6$	Estilbenzenos e antraquinonas
$C_6-C_3-C_6$	Flavonoides: flavonóis, antocianinas, flavonas, flavanonas, flavanois e isoflavonas
$(C_6-C_3-C_6)_2$	Biflavonóides
$(C_6-C_1)_n$	Taninos hidrolisáveis
$(C_6-C_3-C_6)_n$	Taninos condensados ou proantocianidinas
C_6 – anel benzênico	

Alguns compostos fenólicos simples estão exemplificados na Figura 24. A biossíntese desses fenóis se inicia com a condensação de uma unidade de acetilcoenzima A e três unidades de malonilcoenzima A formando um composto com grupos metilênicos entre carbonilas muito reativo. Essa condição permite gerar

carbânios e enolatos tendo a tendência de formar um composto cíclico com seis membros mais estabilizado (Poli-ceto-éster). A partir dessa estrutura dois caminhos de reação podem ocorrer: condensação aldólica ou condensação de Claisen (Dewick, 2002). A reação pelas duas vias e os mecanismos sugeridos para a obtenção de compostos fenólicos simples estão apresentados na Figura 25.

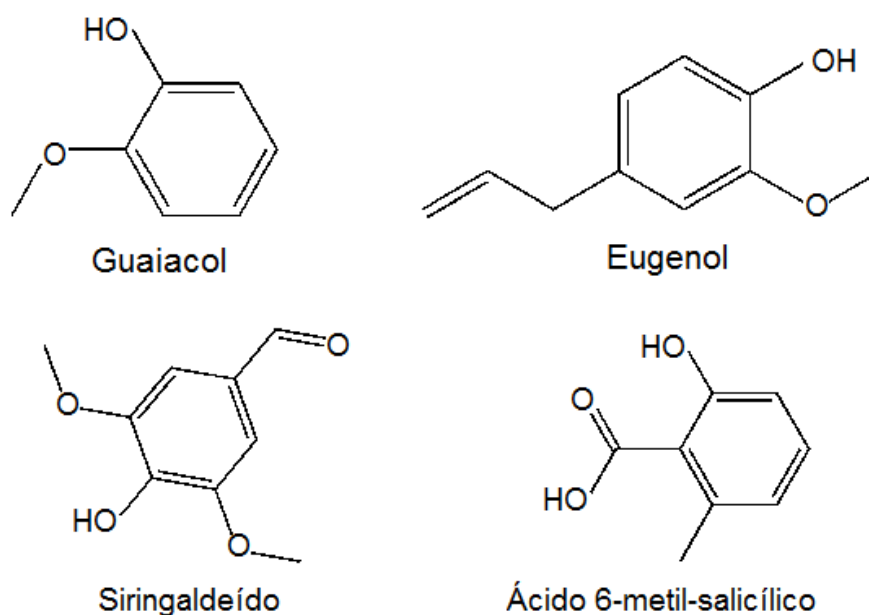


Figura 24. Exemplos de fenóis simples (Dewick, 2002).

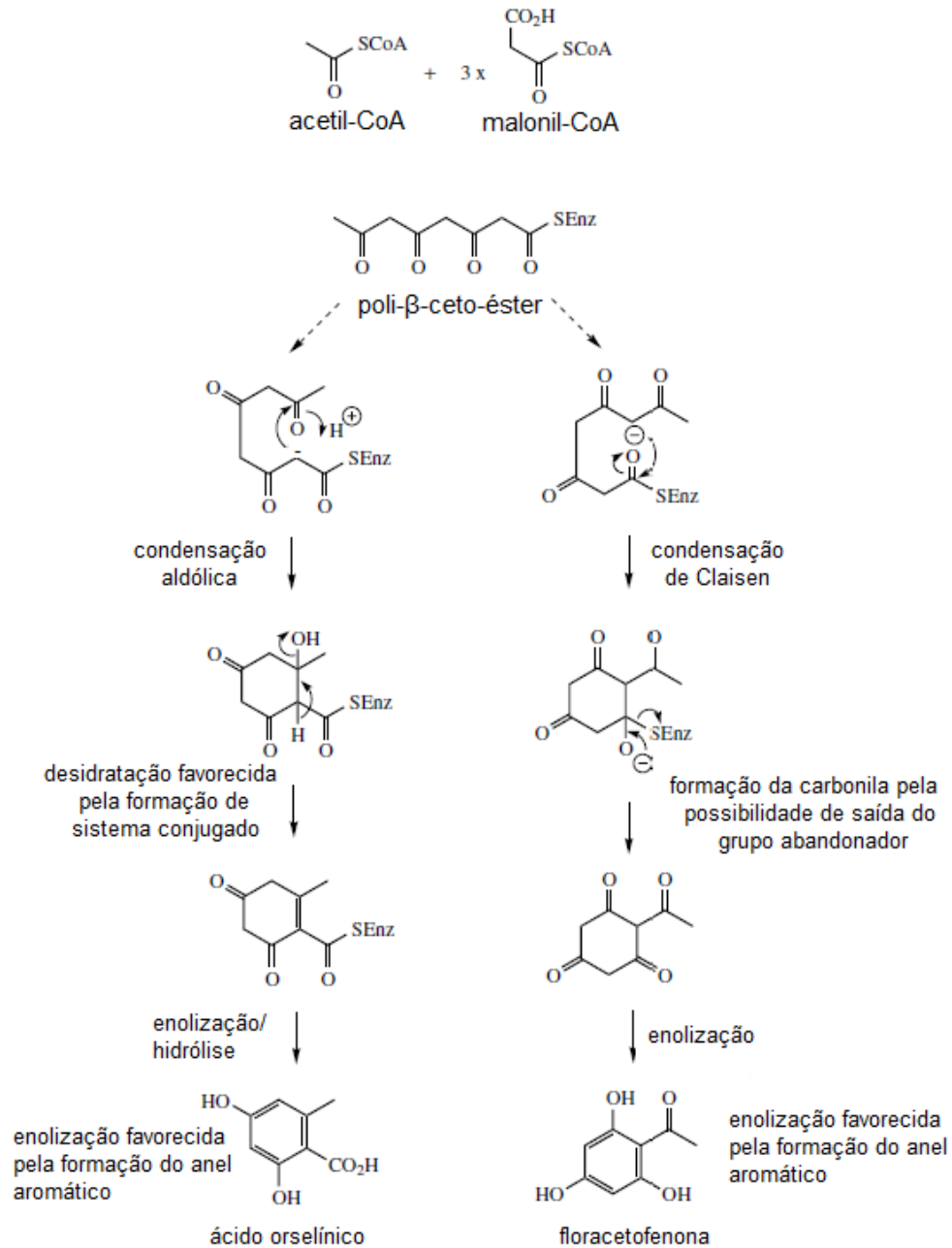


Figura 25. Mecanismos de formação de compostos fenólicos simples (Dewick, 2002).

1.3.3 Flavonoides

Os Flavonoides são estruturas polifenólicas de baixo peso molecular encontradas naturalmente nas plantas, apresentam 15 átomos de carbono em seu

núcleo fundamental constituído por dois anéis aromáticos, A e B e um anel heterocíclico oxigenado C formando um sistema (C₆-C₃-C₆) (Ignat, 2011). A Figura 26 apresenta o esqueleto básico de um flavonoide.

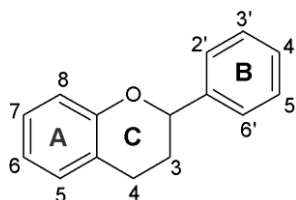


Figura 26. Estrutura básica dos flavonoides.

Os flavonoides são um importante grupo de compostos presentes nos vegetais e nenhuma outra classe de metabólitos secundários é tão creditada com tanta relevância para o crescimento e desenvolvimento das plantas. Muitas funções exercidas pelos flavonoides são fundamentais para a sobrevivência como proteção contra raios UV, defesa contra herbívoros e patógenos e interações alelopáticas. As antocianidinas são frequentemente incluídas juntamente com outros flavonoides e os ácidos hidroxicinâmicos, como protetores de radiação UV. A maioria das antocianidinas absorve a radiação UV entre 270 e 290 nm. Os pigmentos formados pelos flavonoides atuam como filtros de radiação UVB. As antocianidinas são frequentemente incluídas juntamente com outros flavonoides e os ácidos hidroxicinâmicos, como protetores de radiação UV (Andersen e Markan, 2006).

Os flavonoides possuem propriedades farmacológicas comprovadas no organismo humano, como capacidade antioxidativa, atividade anti-inflamatória, ação antialérgica, atividade contra o desenvolvimento de tumores, anti-hepatotóxica,

antiulcerogênica, atividades antiplaquetária, antimicrobianas e antivirais (Andersen e Markan, 2006). Uma das propriedades mais importantes dos flavonoides é a sua capacidade antioxidante. São compostos doadores de elétrons com a presença de ligações duplas conjugadas e grupos hidroxilas com grande potencial de estabilização sobre agentes oxidantes. Eles reagem inativando ânions superóxido, oxigênio singlete, radicais peróxidos de lipídios e/ou estabilizando radicais livres envolvidos no processo oxidativo através da hidrogenação ou complexação com espécies oxidantes (Machado *et al.*, 2008). Os flavonoides ocorrem na forma de agliconas ou heterosídeos. Uma aglicona representa o metabólito secundário livre de unidades de açúcar (Simões, 2004). A Figura 27 mostra estruturas químicas de flavonoides.

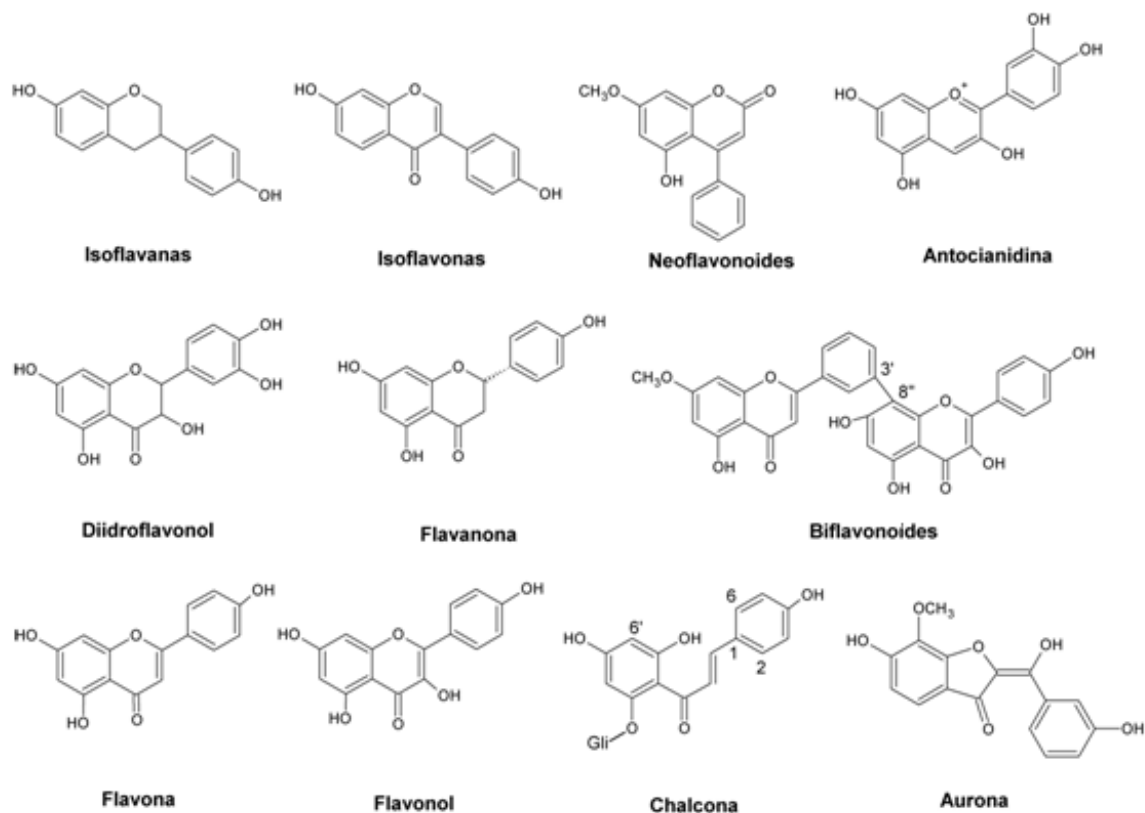


Figura 27. Principais estruturas de flavonoides (Andersen e Markan, 2006).

Flavonoides e estilbenos podem ser biossintetizados pela reação de uma molécula de cinamoil-CoA precursor originado pela rota do chiquimato com três moléculas de malonil-CoA, formando um policetídeo. A partir dessa estrutura, enzimas específicas direcionam reações aldólicas e de Claisen, seguida de enolizações formando um composto com um anel heterocíclico e dois anéis aromáticos substituídos característicos de muitos flavonoides (Dewick, 2002). A Figura 28 representa a formação da flavanona naringenina e do estilbeno resveratrol e a Figura 29 representa a formação de outros flavonoides a partir de chalconas. A Figura 30 representa os mecanismos de biossíntese de antocianidinas a partir de uma flavona.

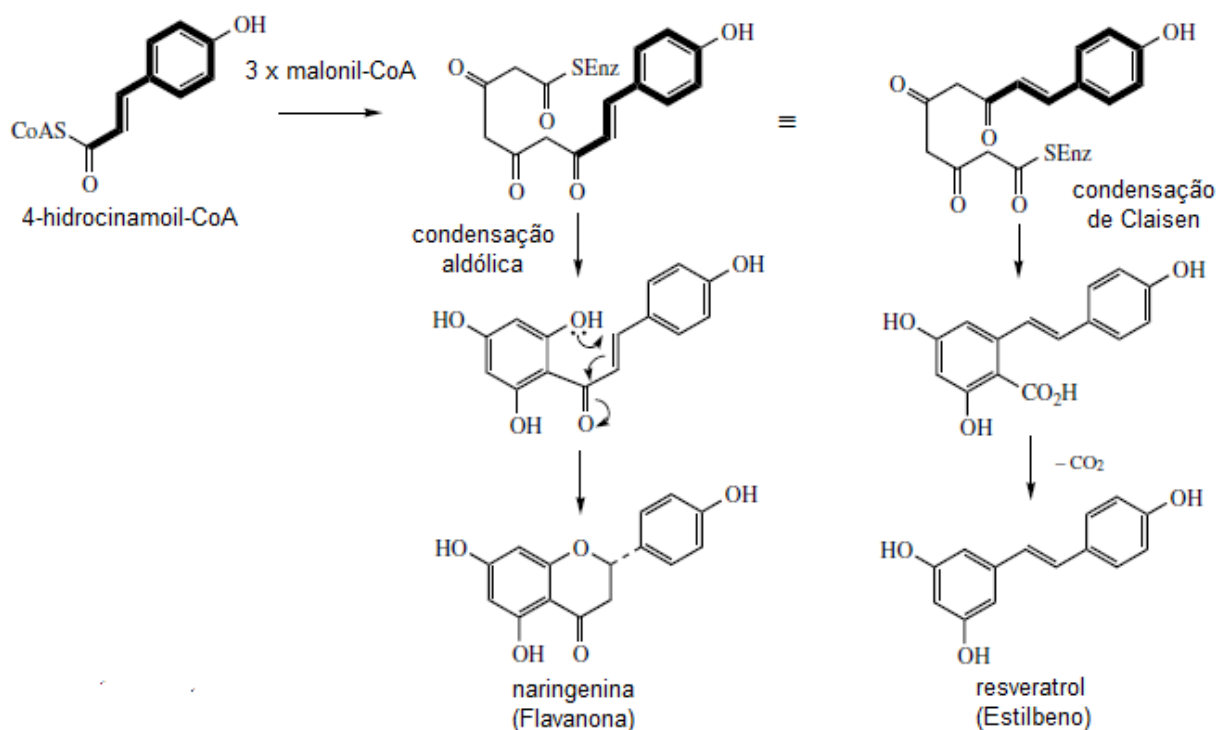


Figura 28. Formação de flavonoides e estilbenos (Dewick, 2002).

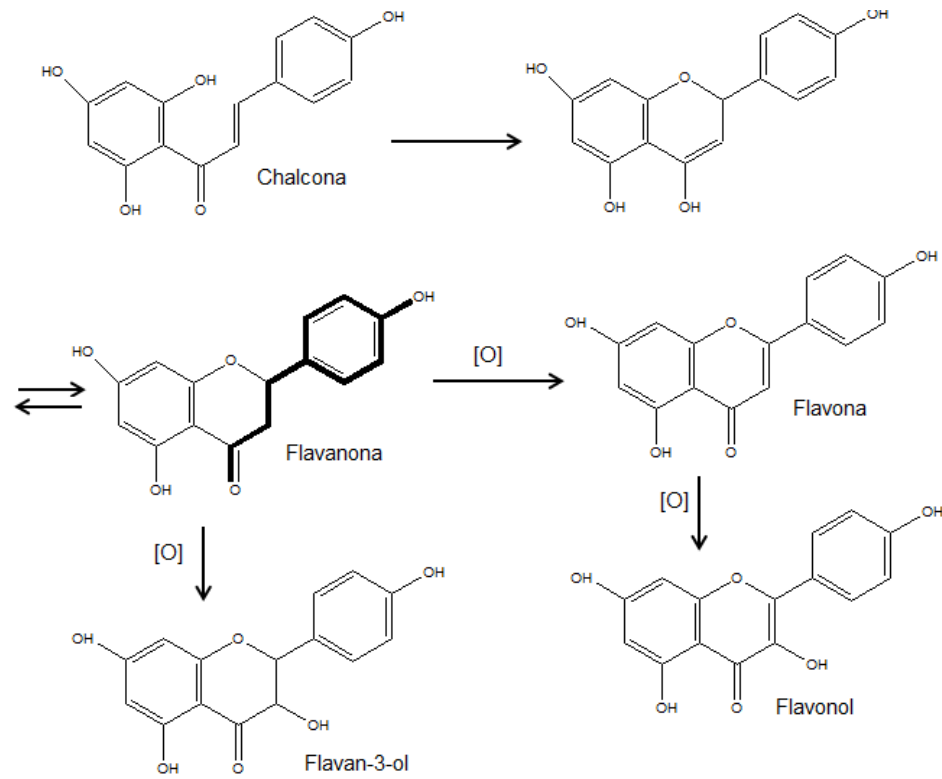


Figura 29. Flavonoides formados a partir de chalconas (Dewick, 2002).

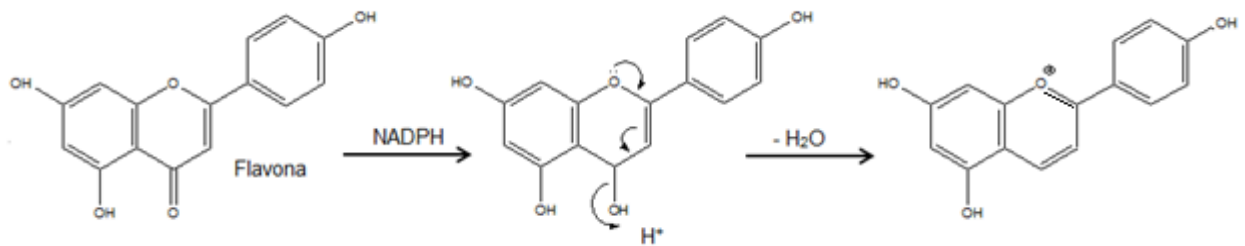


Figura 30. Biossíntese de antocianidinas (Dewick, 2002).

1.3.4 Antraquinonas

São compostos aromáticos com duas carbonilas, usualmente uma oposta à outra no anel. As antraquinonas podem ser formadas via ácido chiquímico e acetato ou totalmente pela via do acetato. No primeiro caso, o ácido chiquímico reage com o ácido α -cetoglutárico proveniente tanto da desaminação do ácido glutâmico quanto do ciclo do ácido cítrico, produzindo o ácido o-succinilbenzoico. Esse produto com o ácido mevalônico origina uma antraquinona (Figura 31).

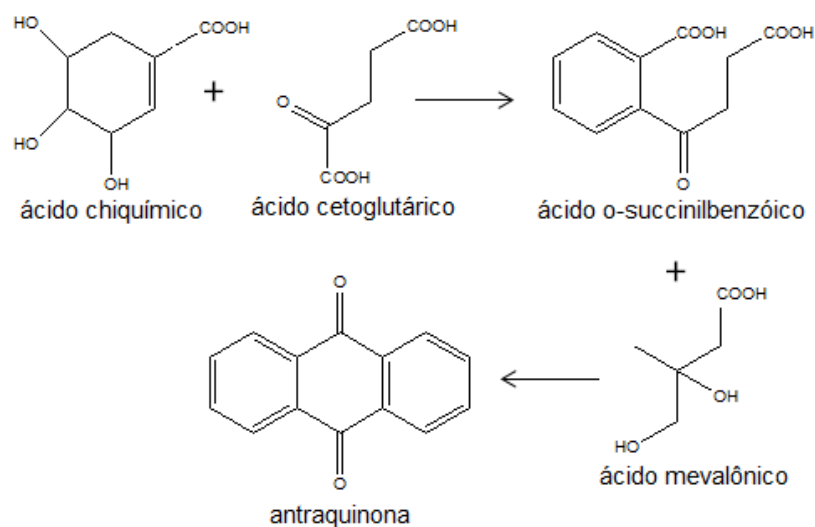


Figura 31. Formação de antraquinona a partir do ácido chiquímico (Simões, 2004).

A nomenclatura das quinonas é definida pelo esqueleto do anel aromático, estabelecendo-se as posições dos dois grupos carbonílicos na molécula nas posições 1,2 (orto) ou 1,4 (para), acrescentando o sufixo quinona. Os três grupos principais de quinonas são as benzoquinonas, naftoquinas e antraquinonas como está apresentado na Figura 32 (Simões, 2004).

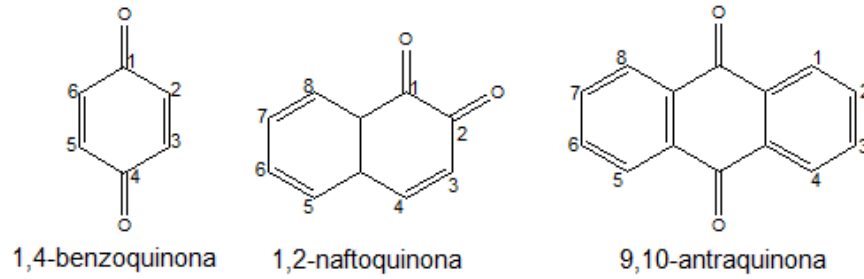


Figura 32. Estrutura básica de quinonas e numerações dos anéis.

As antraquinonas podem ser formadas exclusivamente pela via do acetato proveniente de acetil-CoA e malonil-CoA, formando um policetídeo por reações de Claisen. A Figura 33 apresenta a formação de uma antraquinona pela ciclização de um policetídeo linear (Romagni, 2005).

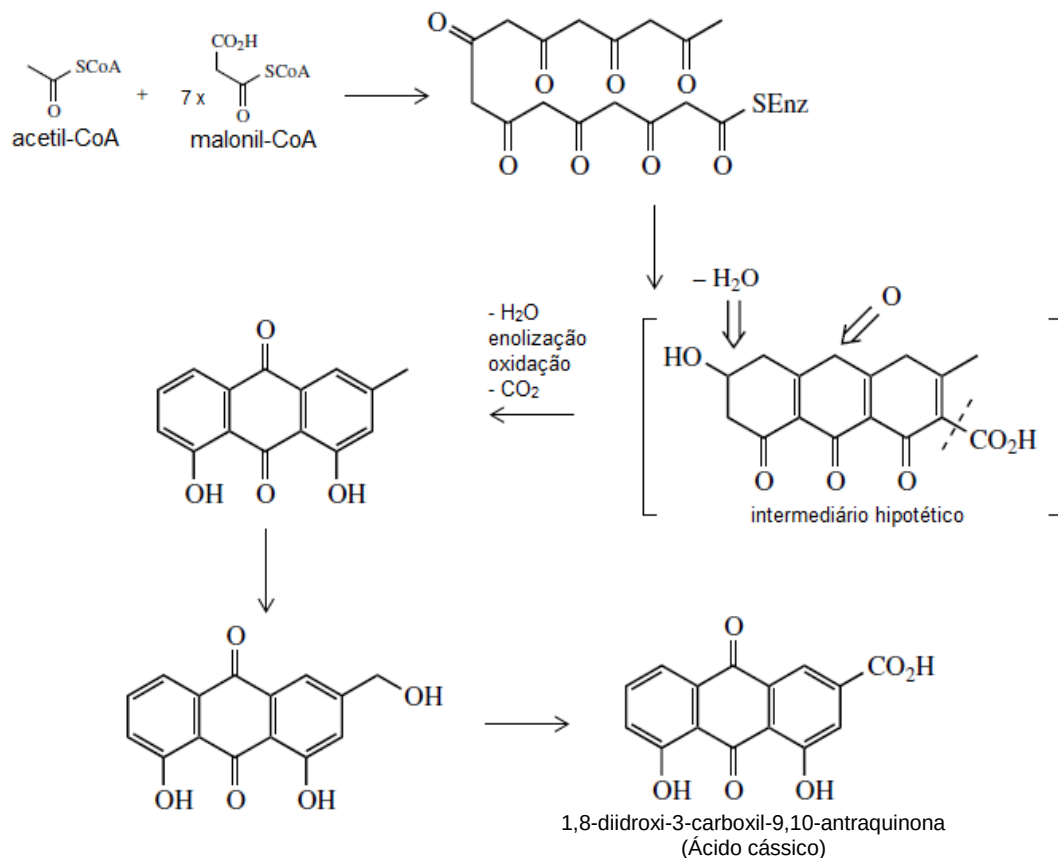


Figura 33. Biossíntese de antraquinona derivada da via do acetato (Romagni, 2005).

1.3.5 Taninos

A palavra "tanino" é derivada do termo "tanante", significando que os taninos evitam a putrefação das peles dos animais e assim elas podem ser transformadas em couros (Monteiro *et al.*, 2005).

Os taninos são compostos fenólicos de grande interesse econômico e ecológico. São divididos em dois grupos: taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Apresentam solubilidade em água, alto peso molecular, possuindo a habilidade de formar complexos insolúveis em água com proteínas, gelatinas e alcaloides (Simões, 2004). Isso ocorre, por exemplo, no caso das proteínas, pelo fato das hidroxilas fenólicas dos taninos se ligarem com os grupamentos amida das proteínas. Interações hidrofóbicas também ocorrem pela interação dos núcleos aromáticos dos taninos com as cadeias laterais alifáticas ou aromáticas dos aminoácidos. Um mol de taninos pode ligar-se a doze moles de proteínas. Por serem compostos fenólicos são muito reativos quimicamente e formam ligações de hidrogênio, intra e intermoleculares. No vegetal têm o papel de proteção contra herbívoros e agentes antimicrobianos. Tais compostos são responsáveis pela adstringência de muitos frutos e produtos vegetais, são facilmente oxidáveis, tanto através de enzimas específicas nos vegetais quanto por influência de metais, como cloreto férrico, o que ocasiona o escurecimento de suas soluções (Simões, 2004). São considerados fortes antioxidantes, mais potentes que a vitamina C e E, têm um importante papel nas doenças imunológicas, circulatórias e também em patologias do sistema nervoso. As principais fontes alimentares de proantocianidinas além das uvas são as maçãs, ameixas, leguminosas, vinho tinto, chá, suco, cacau e chocolate (Wang *et al.*, 2011). São naturalmente encontrados em folhas, frutos,

sementes, castanhas e cascas de muitas plantas. Várias atividades farmacológicas são atribuídas aos taninos como: ação bactericida e fungicida, anti-inflamatória, antiviral entre outras. Acredita-se que essas atividades sejam devido a três características gerais dos taninos condensados e hidrolisáveis: complexação de íons metálicos, atividade antioxidante e sequestradora de radicais livres e habilidade de complexar moléculas como proteínas e polissacarídeos (Simões, 2004).

1.3.5.1 Taninos condensados (Proantocianidinas)

As proantocianidinas ou taninos condensados são polímeros de alto peso molecular que tem como unidades precursoras os flavonoides flavan-3-ol e / ou flavan-3,4-diol e suas estruturas químicas estão apresentadas na Figura 34 (Monteiro, 2005). A estrutura dos taninos condensados é formada pela ligação entre o carbono 4 de uma estrutura com o carbono 8 da outra (Figura 35). Variações no polímero podem ocorrer como diferentes números de monômeros, posição das ligações, oxigenação nos anéis e estereoquímica dos substituintes do anel C (Waterman e Mole, 1994).

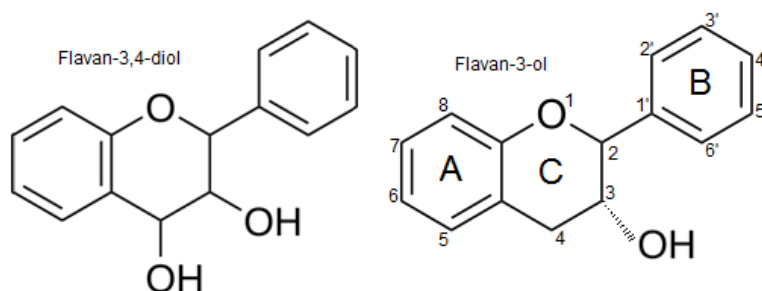


Figura 34. Estrutura básica de unidades de flavan-3,4-diol e flavan-3-ol (Monteiro, 2005).

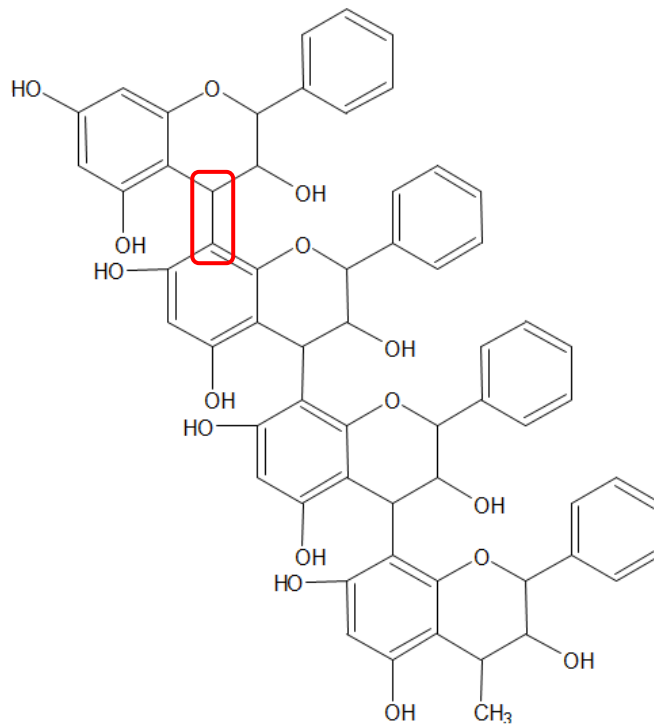


Figura 35. Exemplo de ligação C4-C8 na formação de proantocianidinas (Monteiro, 2005).

1.3.5.2 Taninos hidrolisáveis

São ésteres de ácido gálico e seus dímeros (ácido digálico e elágico) com monossacarídeos, principalmente glicose. Normalmente os taninos hidrolisáveis são divididos em galotaninos (produzem ácido gálico por hidrólise) e elagitaninos (produzem ácido elágico por hidrólise). Os ácidos presentes nos taninos hidrolisáveis são formados a partir da via do ácido chiquímico como está apresentado na Figura 36 (Dewick, 2002), e na Figura 37 está representado a estrutura química dos ácidos gálico, digálico e elágico.

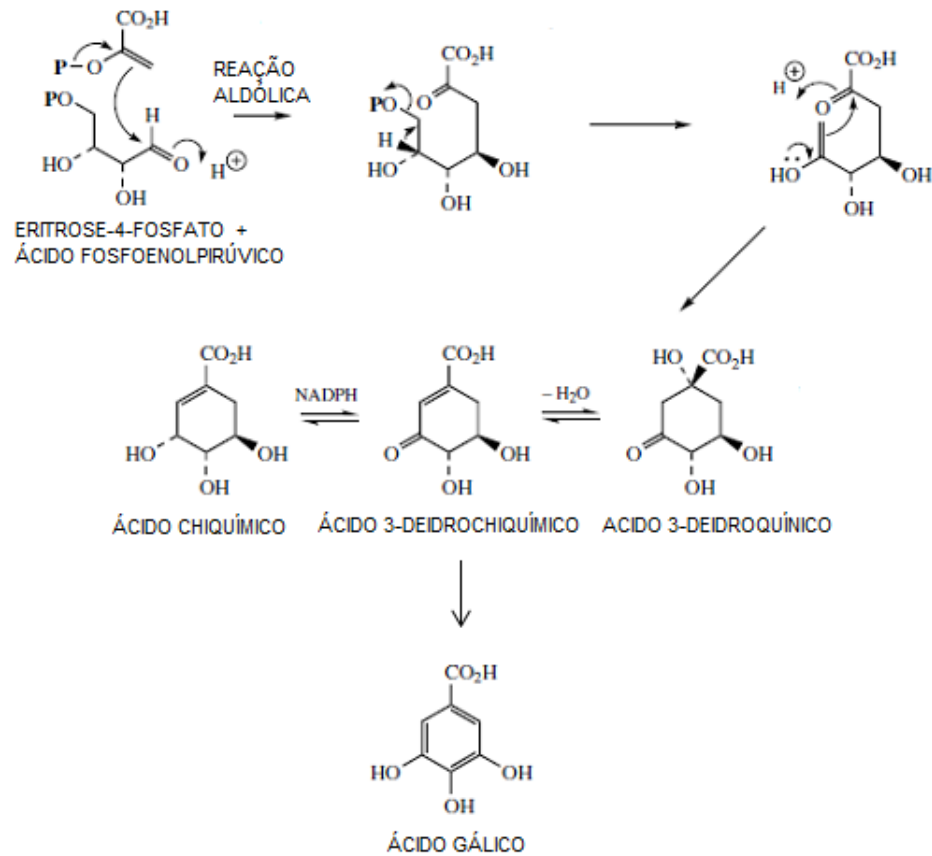


Figura 36. Biossíntese de formação do ácido gálico (Dewick, 2002).

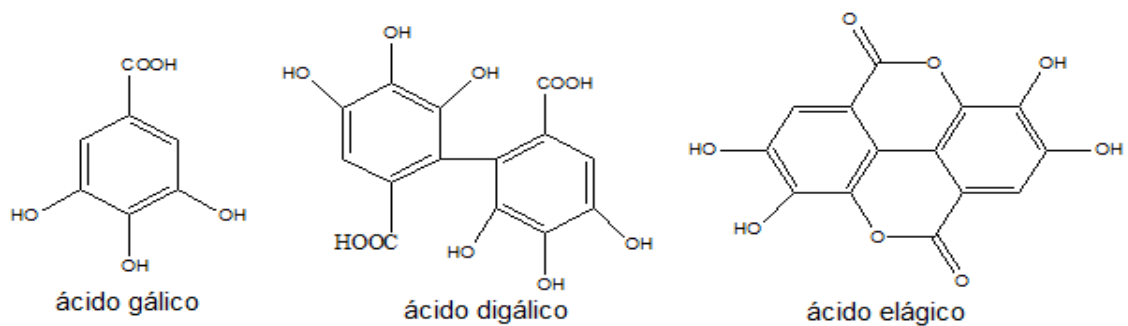


Figura 37. Ácidos presentes nos taninos hidrolisáveis (Dewick, 2002).

1.3.6 Alcaloides

Os alcaloides são bases orgânicas nitrogenadas encontradas principalmente em plantas, mas também em menor extensão em microrganismos e animais. Um ou mais átomos de nitrogênio são presentes e podem ser aminas primárias, secundárias e terciárias. Os grupos amina conferem basicidade aos alcalóides, facilitando o isolamento e purificação, uma vez que esses compostos com ácidos minerais formam sais solúveis em água. O nome alcaloide é derivado de álcali. O grau de basicidade depende da estrutura da molécula do alcaloide e da presença e localização de outros grupos funcionais (Dewick, 2002).

Os átomos de nitrogênio são originados dos aminoácidos, e em geral, a cadeia carbônica do aminoácido precursor é mantida na estrutura do alcaloide, embora o carbono do grupo ácido carboxílico é frequentemente perdido pela descarboxilação. Relativamente poucos aminoácidos são envolvidos como precursores envolvidos na biossíntese dos alcaloides, onde os principais são: ornitina, lisina, ácido nicotínico, triptofano, ácido antranílico e histidina (Dewick, 2002).

Exemplificando a estrutura de um alcaloide, é apresentada na Figura 38 a molécula de nicotina que constitui o princípio ativo do tabaco e seu precursor, o ácido nicotínico (Simões, 2004).

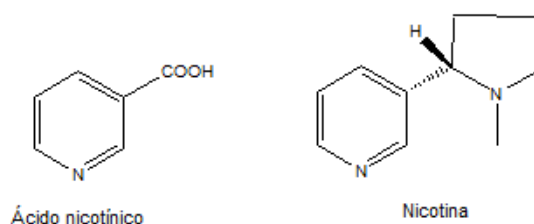


Figura 38. Estrutura do alcaloide nicotina e do ácido nicotínico (Simões, 2004).

Na sua rota biossintética, as enzimas triptofano descarboxilase e tirosina descarboxilase modificam estes aminoácidos transformando-os em precursores de alcaloides e desviando-os do processo de síntese de proteínas (Porto, 2009). Em altas concentrações estes alcaloides são tóxicos, contudo, em baixas concentrações têm ação terapêutica, agindo como relaxantes musculares, tranquilizantes e analgésicos (García e Carril, 2009), anti-inflamatórios (Souto *et al.*, 2011), antioxidantes (Maiza-Benabdesselam *et al.*, 2007) e antibacterianos (Karou *et al.*, 2005).

1.4 Óleos essenciais

Óleos essenciais são misturas complexas formadas por compostos voláteis provenientes do metabolismo secundário dos vegetais, caracterizados por forte odor. Podem conter vários compostos com concentrações bastante diferentes. Geralmente possuem dois ou três compostos majoritários compreendendo 20 a 30 % da mistura. Os óleos essenciais têm um papel importante na proteção das plantas, pois agem como antibacterianos, antivirais, antifungo, inseticida e também na defesa contra herbívoros. Podem ser sintetizados em todas as partes da planta, tais como, flores, folhas, sementes, frutos, raízes, casca e madeira. São principalmente constituídos por terpenos (principalmente monoterpenos e sesquiterpenos) e outros constituintes alifáticos e aromáticos (fenilpropanoides) (Bakkali *et al.*, 2008).

Vários fatores podem afetar a composição química dos óleos, tais como clima, qualidade do solo, época de colheita e genética. Em geral, com a baixa intensidade da

luz, a produção de monoterpenos diminui e pequenas variações diárias de temperatura podem estimular a produção de terpenos (Lima, 2008).

A composição química dos óleos essenciais presentes em plantas tem sido estudada, e estes óleos, vêm demonstrando que são fontes promissoras de metabólitos secundários. Muitos estudos indicam que os óleos apresentam propriedades biológicas importantes tais como atividade antimicrobiana (Tohidpour *et al.*, 2010; Xiong *et al.*, 2013), esquistossomicida (Magalhães *et al.*, 2012), antioxidante (Bozin *et al.*, 2006), antifúngica (Bouchra *et al.*, 2003), analgésica, anti-inflamatória, anestésica, antiespasma (Bakkali, 2008), entre outras. Recente revisão mostrou que óleos essenciais de diferentes espécies de vegetais possuem forte atividade antimicrobiana contra vários microrganismos, o que sugere a possibilidade de utilizá-los como substitutos para as drogas sintéticas devido a resistência cada vez maior de alguns agentes patogênicos (Lang e Buchbauer, 2012). Alguns trabalhos têm demonstrado que os óleos essenciais também são potenciais agentes antibacterianos contra microrganismos bucais (Takarada *et al.*, 2004; Botelho *et al.*, 2007; Cha, 2007; Chang *et al.*, 2011). Essas atividades são geralmente relacionadas com substâncias provenientes do metabolismo secundário presentes nos óleos. Vários destes compostos estão sendo testados separadamente e têm indicado significativo efeito antimicrobiano (Si *et al.*, 2006).

Devido às suas diversificadas propriedades, os óleos essenciais têm papel relevante na sociedade por serem utilizados na indústria farmacêutica, cosmética e alimentícia. Eles são utilizados como aromatizantes, flavourizantes, analgésicos, antissépticos, sedativos, expectorantes na indústria farmacêutica e na preparação de infusões para extrair os princípios ativos na medicina popular (Bizzo *et al.*, 2009).

Os principais óleos produzidos no Brasil são: óleo essencial de laranja, *Citrus cinensis*, com maior produção; óleo essencial de eucalipto, com destaque para a produção de óleo medicinal de *Eucalyptus globulus* e óleo para a perfumaria de *Eucalyptus citriodora*, rica em citronelal e *Eucalyptus staigeriana*, rica em citral; e óleo essencial de pau-rosa, *Aniba roseaodora*, onde Brasil é o único país fornecedor desse óleo no mundo. O linalol é o principal constituinte desse óleo extraído da madeira da planta e o estado de Amazonas é o maior exportador (Bizzo *et al.*, 2009).

1.5 Compostos fenólicos e atividade antioxidante

No organismo humano, são formadas espécies reativas de oxigênio (EROs) que contém um ou mais elétrons desemparelhados, sendo denominadas de radicais livres. Entre as principais espécies de radicais livres encontram-se o O_2 (oxigênio singlete), $O_2^{\cdot-}$ (radical superóxido), $OH^{\cdot}$ (radical hidroxila), $NO^{\cdot}$ (óxido nítrico) e $ONOO^-$ (peroxinítrico). São espécies muito reativas, que causam danos oxidativos às células e tecidos, as quais tem sido relacionadas com diversas doenças, dentre elas o câncer, aterosclerose e cardiopatias (Lima, 2008).

As plantas e especialmente os frutos do Cerrado contêm, além dos nutrientes essenciais e de micronutrientes (como minerais, fibras e vitaminas), diversos compostos secundários de natureza fenólica, denominados polifenóis e constituintes voláteis (Silva *et al.*, 2005). Inúmeros estudos realizados com compostos fenólicos, especialmente os flavonoides, demonstram a capacidade de sequestrar radicais livres (atividade antioxidante) (Verma e Pratap, 2010).

Existe um interesse crescente em novas fontes de antioxidantes naturais, devido ao reconhecimento do envolvimento de espécies reativas de oxigênio no aparecimento de várias doenças humanas (Aruoma, 1998; Verma e Pratap, 2010) e na degradação oxidativa de alimentos, ração animal e outros produtos como cosméticos (Aruoma, 1998).

Antioxidantes são substâncias que podem prevenir, impedir ou reduzir o dano de oxidação (Ramarathnam *et al.*, 1995). Eles minimizam os danos oxidativos ao DNA, proteínas e lipídeos atuando como sequestradores de EROs (Diplock *et al.*, 1998; Verma e Pratap, 2010). Portanto, eles são capazes de proteger o corpo humano de várias doenças (Alzheimer, artrite reumatoide, catarata, diabetes, doença de Parkinson, AIDS) atribuídas às reações de radicais (Takao *et al.*, 1994). Antioxidantes não enzimáticos envolvem muitas moléculas orgânicas de baixo peso molecular, tais como α -tocoferol, ácido ascórbico, ubiquinol, β -caroteno, etc. Muitos pesquisadores interessam principalmente nestes antioxidantes de baixo peso molecular, pois eles podem explorar o seus mecanismos de ação para proteger os sistemas biológicos, isolar substâncias de plantas para verificar as atividades antioxidantes e sintetizar antioxidantes com novas estruturas baseadas nos produtos naturais bioativos (Liu, 2010). Tem sido utilizado na indústria de alimentos, antioxidantes sintéticos tais como o BHT (butil-hidroxi-tolueno) e BHA (butil-hidroxi-anisol) para prevenir os danos dos radicais livres, mas estas substâncias também são relacionadas com doenças carcinogênicas (Diouf *et al.*, 2009), tornando atrativa a busca de compostos antioxidantes de origem natural. As estruturas do BHT e BHA estão apresentadas na Figura 39.

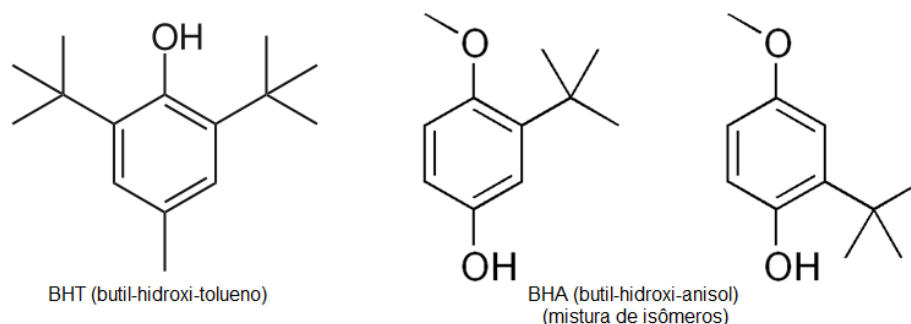


Figura 39. Estrutura dos antioxidantes sintéticos BHT e BHA.

Entre os métodos utilizados para a quantificação dos compostos fenólicos, um dos mais citados na literatura é o da reação com o reagente Folin-Ciocalteu, em que este tem capacidade de reduzir fenóis formando um complexo azul cuja intensidade é registrada a 760 nm (Queiroz, 2001).

Em função da grande diversidade química dos compostos fenólicos, vários ensaios têm sido desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante de diferentes amostras. Entre os métodos existentes, destaca-se o ensaio com o 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), em que este radical livre reage com o antioxidante que o converte para a forma reduzida. A redução dos radicais DPPH pode ser acompanhada espectrometricamente a 517 - 518 nm, pela diminuição da absorbância da solução metanólica de DPPH que é inicialmente violeta e torna-se amarela a medida que a amostra sequestra os radicais livres (Abdille *et al*, 2005). Quanto maior a atividade antioxidante menor será a coloração violeta da solução, ou seja, menor a concentração de DPPH[•] residual após certo tempo. A Figura 40 mostra um mecanismo hipotético

quando o radical DPPH reage com um antioxidante doador de hidrogênio, formando a molécula de 2,2-difenil-1-picrilhidrazina (coloração amarela).

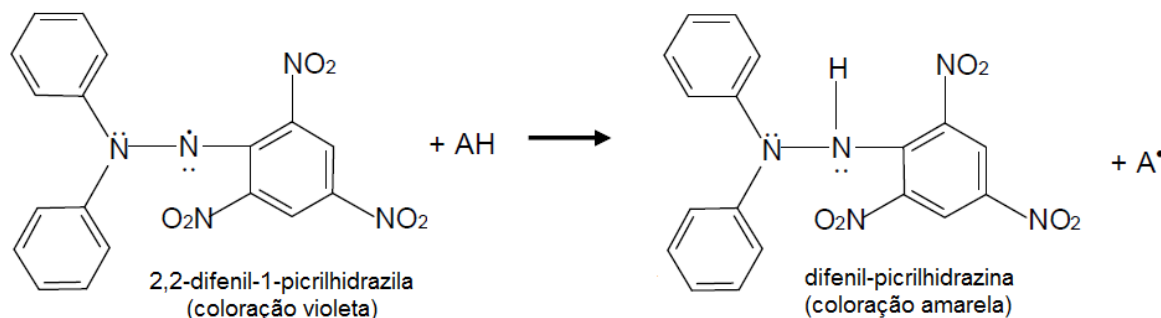


Figura 40. Redução do radical livre DPPH.

A capacidade antioxidante dos fenóis é devida principalmente as suas propriedades redutoras, cuja intensidade da ação antioxidante depende fundamentalmente do número e da posição de hidroxilas presentes na molécula (Melo *et al.*, 2008). As hidroxilas fenólicas por reação radicalar doam elétrons através do hidrogênio para os radicais DPPH, que são por sua vez estabilizados. Com a reação, radicais fenolatos e fenoxil são formados. Entretanto, são espécies bastante estabilizadas por efeitos de ressonância. As estruturas radicalares podem reagir entre si e até mesmo com os radicais DPPH (Figura 41).

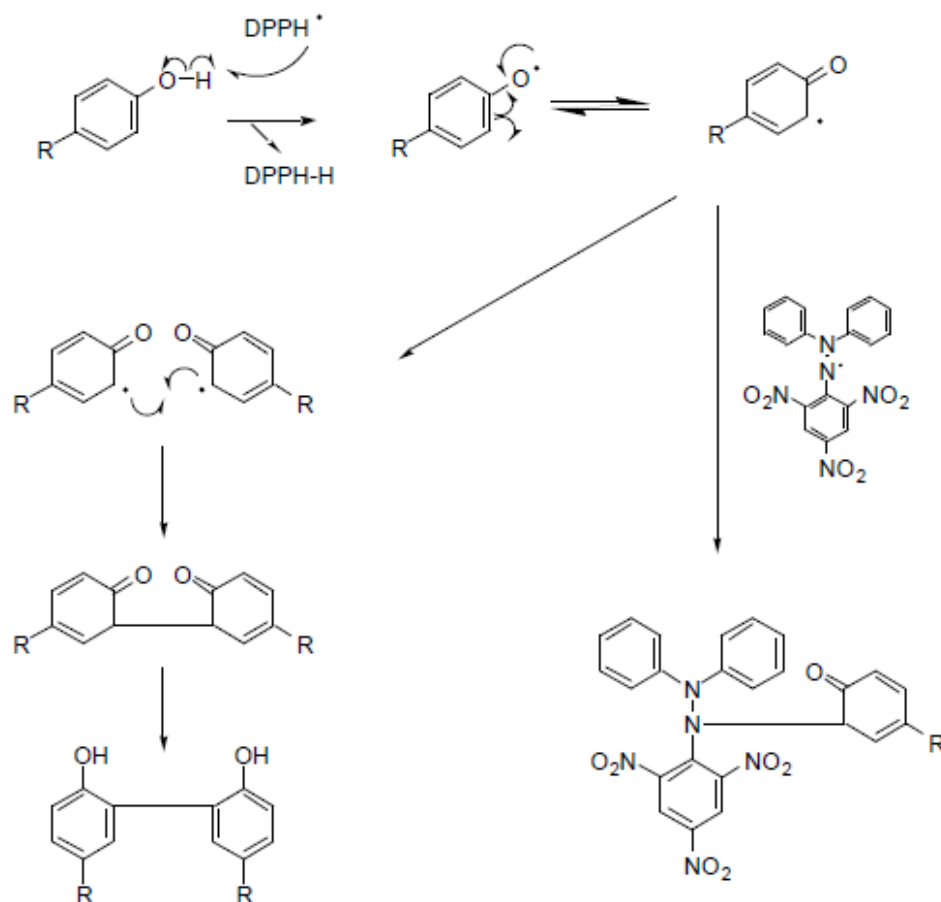


Figura 41. Propostas possíveis mecanismos entre compostos fenólicos e DPPH (Brand-Williams, 1995).

1.6 Considerações gerais sobre o ecossistema 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 diversas. 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).

Particularmente, a cavidade bucal possui estruturas anatômicas distintas, sendo compreendidas basicamente por um tecido duro (dentes) e por tecidos moles como: mucosas alveolar 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 (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, no qual mais de 50% ainda não foram cultivadas em laboratório (Aas *et al.*, 2005)

A cavidade bucal é um órgão ecologicamente especial, um local que, em função de sua complexidade anatômica, alberga uma microbiota com diferenças marcantes em sua composição, tanto no aspecto qualitativo como quantitativo (Theilade, 1990). O desenvolvimento de uma comunidade, geralmente envolve uma sucessão de populações. O processo começa com a colonização do habitat por uma população microbiana pioneira (colonizadores iniciais). O metabolismo desses colonizadores

iniciais modifica o ambiente do local, fazendo com que as condições sejam favoráveis para a aderência e crescimento de outras espécies (Marsh, 2005).

A temperatura do ambiente bucal se mantém relativamente constante (34°C a 36°C) e o pH perto da neutralidade na maioria das áreas e desta forma, suporta o crescimento de uma variedade de microrganismos. Entretanto, o meio bucal não pode ser considerado um ambiente uniforme. Existem vários habitats dentro da cavidade bucal, cada um com características físico-químicas diferentes, abrigando comunidades microbianas diferentes. As superfícies orais são constantemente banhadas por dois importantes fluidos fisiológicos: a saliva e fluido gengival. Estes fluidos são essenciais para manutenção do meio bucal. O ambiente supragengival é banhado pela saliva, enquanto que o ambiente subgengival é banhado pelo fluido gengival (Theilade, 1990).

Na saliva existem muitas proteínas, aminoácidos, carboidratos, vários lipídeos, várias vitaminas e compostos inorgânicos necessários ao metabolismo bacteriano. Por outro lado, na saliva, existem vários mecanismos que limitam o desenvolvimento microbiano, pelo fato de na sua composição estarem presentes algumas substâncias antimicrobianas, tais como: anticorpos, principalmente da classe IgA (imunoglobulina A), que além de participarem da destruição bacteriana, ainda aglutinam microrganismos, impedindo sua aderência aos tecidos; Lisozima, que tem efeito bactericida porque hidrolisa o peptidoglicano, importante componente da parede celular, fazendo com que as bactérias, principalmente as Gram-positivas, fiquem muito sensíveis a alterações osmóticas e sejam lisadas; além de outras como Lactoferrina e Lactoperoxidase que também promovem ação bactericida (Wilson *et al*, 2002).

O fluido gengival, assim como a saliva, favorece o desenvolvimento das bactérias por serem fonte de nutrientes, principalmente proteínas, em contrapartida é um recurso de defesa local por nele existirem fagócitos, linfócitos, anticorpos e o sistema complemento (C). Apesar de existirem mecanismos de defesa no meio bucal, uma microbiota persiste na cavidade bucal. As bactérias podem sobreviver, porque diante dos mecanismos de defesa, estes são menos susceptíveis ou as bactérias evitam mecanismos imunológicos (Cummins e Creeth, 1992). Também é possível, que IgA tenha efeito sobre as bactérias. No entanto, esse efeito é reduzido devido aos múltiplos fatores que mantêm a microbiota em equilíbrio com a cavidade (Marcotte e Lavoie, 1998).

1.6.1 Biofilme dental

Na vida intrauterina, a cavidade bucal é isenta de bactérias. Algumas horas após o nascimento, a boca começa ser infectada por microrganismos provenientes das pessoas que estão em maior contato com o bebê, sobretudo da mãe (De Lorenzo, 2004). Numerosos estudos mostram que as primeiras espécies que se instalam na cavidade bucal são *Streptococcus salivarius*, *Streptococcus oralis* e *Streptococcus mitis* biovar 2, mas principalmente o *S. salivarius*, que tem grande afinidade pela mucosa e por sacarose. A ausência de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sanguinis* se deve ao fato de que, estas espécies são mais comumente encontradas após a presença de elementos dentais. Em seguida, a complexidade da microbiota bucal, inicia com a erupção dos dentes, surgindo novos sítios ecológicos (Aas et al., 2008).

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). A evolução microbiana do biofilme dental está apresentada na Figura 42.

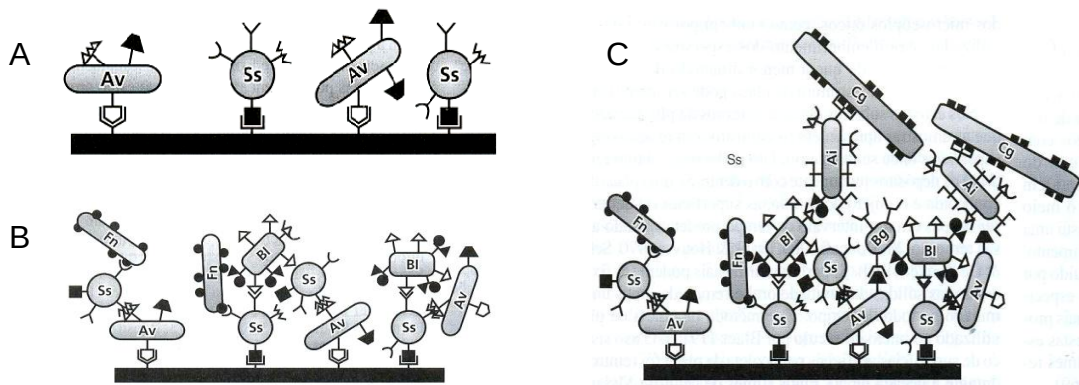


Figura 42. Evolução microbiana do biofilme dental - a) colonizadores iniciais; b) aderência interbacteriana; c) presença de bactérias Gram-negativas estritas (De Lorenzo, 2004).

O depósito de bactérias e a composição da placa bacteriana são relatados como etiologia da cárie dental e de várias formas da doença periodontal (Li *et al.*, 2004). A

cárie dentária é uma patologia oral bacteriana frequente, causada por um biofilme constituído por microrganismos presentes na superfície do dente (Ambrosio *et al.*, 2008; Allaker e Douglas, 2009). É uma doença que tem sido associado à *Streptococcus* spp., principalmente *Streptococcus mutans* e *S. sobrinus* e *Lactobacillus* spp (Chung *et al.*, 2006). A composição microbiana da placa depende do local e o estágio de desenvolvimento que ela se encontra no ambiente bucal (Marsh, 2005). O biofilme é benéfico ao hospedeiro na medida em que ajuda a prevenir a colonização de microrganismos exógenos e patógenos. Sua composição é relativamente estável, porém esta estabilidade pode ser modificada quando ocorrerem alterações do meio bucal levando a um desequilíbrio desta microbiota residente, favorecendo o estabelecimento de uma população microbiana cariogênica ou periodontopatogênica. Este biofilme patogênico pode levar ao aparecimento de algumas alterações patológicas da cavidade bucal como a cárie, doença periodontal e candidíase (Weyne, 1999). Na figura 43 estão apresentadas lesões ocasionadas por bactérias bucais.

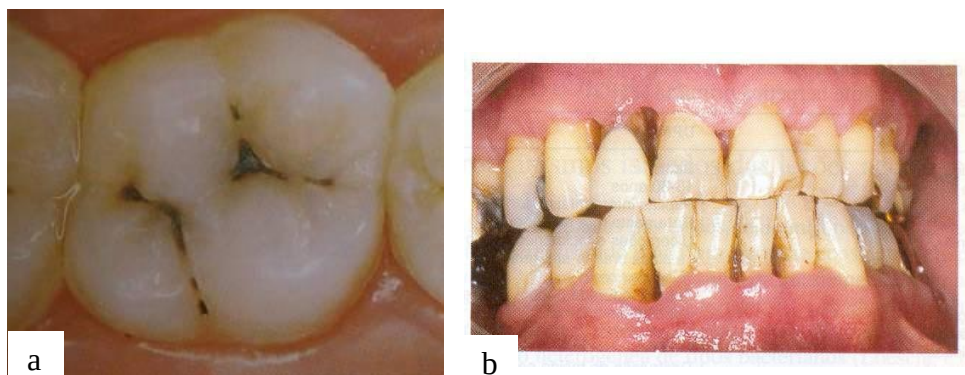


Figura 43. a – Lesão de cárie; b – Lesão periodontal (inflamação de gengiva e perda óssea) (Lindhe, 1999).

A flora bacteriana da cavidade bucal em estado de saúde é diferente da flora bacteriana na presença de patologias. Por exemplo, muitas espécies associadas especificamente com doenças periodontais, tais como, *Porphyromas gingivalis*, *Tannerella forsuthia* e *Treponema denticola* e espécies comumente envolvidas com a cárie dental tais como, *Streptococcus mutans* e *Lactobacillus* spp., não foram encontradas em placas supra e sub-gengival em cavidades bucais clinicamente sadias (Aas *et al.*, 2005).

A superfície dental propicia as condições necessárias para a instalação de bactérias que têm a capacidade de se aderir a ela, tais como: *S. sanguinis*, *S. mitis*, *S. gordonii*, *S. oralis* e algumas espécies de *Actinomyces*, consideradas colonizadoras iniciais ou pioneiras da superfície do esmalte. *Streptococcus* constituem cerca de 60 a 80% dessas bactérias pioneiras, enquanto que espécies de *Actinomyces* aparecem na proporção aproximada de 5 a 30% (Li *et al.*, 2004). *Streptococcus mutans* e *Streptococcus sobrinus* podem se implantar nas superfícies dos dentes quando existir disponibilidade freqüente de sacarose (De Lorenzo, 2004). A aderência de microrganismos envolve interações específicas entre as adesinas (macromoléculas ligantes) presentes nas superfícies das bactérias e receptores presentes nas superfícies dos dentes (Clark *et al.*, 1978). A importância dos colonizadores iniciais está no fato, de que, eles promovem aderência ou modificam o ambiente para outros colonizadores. Além disso, desempenham papel chave na sucessão microbiana que ocorre nos biofilmes dentais (Li *et al.*, 2004).

1.6.2 Estágios do biofilme

Espécies de *Actinomyces* são predominantes no biofilme coletado nas primeiras horas de sua formação. Posteriormente, *S. mitis* e *S. oralis* tornam-se mais predominantes que *Actinomyces* nas primeiras seis horas de formação do biofilme (Li et al., 2004). Neste mesmo período, pode ser identificada a presença de *Actinobacillus actinomycetemcomitans* nas superfícies dos dentes, em níveis extremamente baixos (Takahashi e Yamada, 1999). A quase que ausência de bactérias periodontopatogênicas nos estágios iniciais do biofilme pode ser explicada através dos níveis de oxigênio dentro dos biofilmes, que precisam ser reduzidos antes da colonização destas bactérias, para qual o oxigênio é tóxico. Em estágios posteriores, algumas espécies predominantes, tais como *S. mitis*, *S. oralis* e *S. sanguinis* produzem peróxido de hidrogênio no qual pode ajudar na prevenção contra a instalação de bactérias periodontopatogênicas (De Lorenzo, 2004).

As condições ambientais sofrem alterações durante o desenvolvimento do biofilme dental com o metabolismo dos colonizadores iniciais anaeróbios facultativos, uma vez que, promovem a diminuição da taxa de oxigênio, produzindo dióxido de carbono e hidrogênio. Com isso, o ambiente se torna mais susceptível ao crescimento de anaeróbios estritos (Marsh, 2003).

A colonização primária é feita predominantemente por cocos Gram-positivos anaeróbios facultativos. A placa colhida após 24 horas consiste principalmente de *Streptococcus*, sendo que o *S. sanguinis* é o mais numeroso destes microrganismos. Após a multiplicação de Gram-positivos anaeróbios facultativos, receptores de superfície nos microrganismos permitem a aderência subsequente de Gram-negativos,

que possuem pouca habilidade de aderir diretamente a película. A heterogeneidade aumenta à medida que a placa se torna madura. Mudanças ecológicas permitem uma colonização secundária por bactérias Gram-negativas anaeróbias estritas, contribuindo para aumentar a patogenicidade do biofilme (Lindhe, 1999).

1.6.3 Microrganismos bucais

Para se estabilizarem na cavidade oral, os microrganismos devem primeiro aderir à superfície dos dentes ou da mucosa. A aderência é essencial para resistir o fluxo salivar e é mediada por adesinas na superfície das bactérias e por receptores da superfície oral. As adesinas microbianas consistem de polissacarídeos, glicosiltransferases e lectinas, que são adesinas protéicas que têm afinidade específica por carboidratos. Estas adesinas são encontradas nos componentes da parede celular das bactérias ou associadas com estruturas celulares, tais como fímbrias ou fibrilas. Os receptores podem ser componentes salivares (mucinas, glicoproteínas, amilase, lisozimas, IgA, IgG, proteínas e estaterinas) ou componentes bacterianos (glicosiltransferase e glicanos), que estão ligados nas superfícies orais (Scannapieco, 1994; Rudney *et al.*, 1995). A interação hidrofóbica é outra via utilizada pelos microrganismos quando, as adesinas bacterianas e os receptores teciduais são hidrofóbicos (apolares). Em presença de água não se solubilizam promovendo adsorção na superfície dos dentes (Wilson *et al.*, 2002).

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

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

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

A coagregação é um exemplo de comensalismo e sinergismo que ocorre entre as espécies microbianas (Ochiai *et al.*, 1993). Um exemplo de interação positiva ocorre quando, bactérias anaeróbias facultativas utilizam oxigênio, reduzindo sua

concentração, permitindo a colonização de bactérias anaeróbias estritas (Theilade, 1990).

A dieta promove um aumento na proporção de microrganismos que apresentam vantagens ecológicas na presença da sacarose no meio bucal, como por exemplo, os *S. mutans*. Estes, são acidogênicos e acidúricos, sintetizam polissacarídeos extracelulares (PEC) a partir da sacarose e, além disso, sintetizam glicanos através das enzimas glicosiltransferases (GTFs). Algumas glicosiltransferases sintetizam moléculas de glicose formando os glicanos solúveis e insolúveis. Os glicanos, principalmente os insolúveis em água, permanecem mais tempo na placa e favorecem a aderência e acúmulo de *Streptococcus* cariogênicos sobre a superfície do esmalte dental (De Lorenzo, 2004).

Mecanismos de competição e antagonismo entre as bactérias bucais residentes podem ajudar o equilíbrio ecológico prevenindo um crescimento exagerado de algumas espécies bacterianas (Theilade, 1990). *S. mitis* e *S. sanguinis* produzem peróxido de hidrogênio que pode ajudar na prevenção de bactérias periodontopatogênicas. O peróxido de hidrogênio inativa *A. actinomycetemcomitans*, um patógeno muito agressivo para o periodonto adulto, e principalmente de jovens (Willcox e Drucker, 1988). O acúmulo de *Streptococcus* na superfície dental é considerado um dos fatores críticos no desenvolvimento do biofilme cariogênico, devido à produção de ácidos que proporcionam a queda do pH do biofilme dental, aumentando a possibilidade de desmineralização dos tecidos dentais. A produção de ácido lático pelo *S. mutans* e *Lactobacillus* gera um abaixamento do pH e inibe o crescimento de *S. sanguinis* e *S. oralis* bem como, bactérias Gram-negativas (Loesche, 1986).

Um elevado grau de especificidade na interação adesinas-receptores explica por que diferentes espécies bacterianas têm afinidade por diferentes estruturas da boca (Aas, *et al.*, 2005). Análises de amostras de salivas mostraram que nas primeiras seis horas após a limpeza dos dentes, os níveis de *S. mitis* e *S. oralis* são baixos na saliva, mas foram presentes em altos níveis no biofilme dental. Em contra partida outras bactérias como: *A. naeslundii*, *F. nucleatum* foram encontrados em níveis elevados na saliva e quase ausentes no biofilme dental (Li *et al.*, 2004).

Os microrganismos bucais, além de serem considerados fatores de risco de doenças bucais como a cárie e periodontites, podem atingir a corrente sanguínea desencadeando outras doenças no organismo humano como: endocardites, abscessos cerebrais, infecções de garganta, infecções nos sistemas respiratório e gastrointestinal e bacteremias (Aas *et al.* 2005). Procedimentos clínicos (extrações dentais, tratamentos endodônticos, cirurgias periodontais), infecções bucais e saúde bucal precária são alguns dos principais fatores que promovem a introdução de microrganismos na corrente sanguínea. A endocardite infecciosa é a doença cardíaca mais comum causada por bactérias da cavidade bucal. *S. sanguinis* e *S. mutans* são as bactérias mais particularmente relacionadas com esta patologia. A produção de PEC por estas bactérias favorece a aderência nas superfícies do coração, implantando-se facilmente em agregados de fibrina e plaquetas existentes na superfície das válvulas cardíacas previamente lesadas (Gendron *et al.*, 2000; Li *et al.*, 2000). Já o *S. salivarius* produz glicanos, e é a espécie predominante nas superfícies das mucosas, no qual é encontrado mais comumente no dorso da língua. *S. mitis* implanta-se tanto na mucosa como no dente (Aas *et al.*, 2005).

Os microrganismos frequentemente isolados de processos infecciosos na cavidade bucal são *Streptococcus* spp., *Enterococcus*, *Gemella*, *Actinomyces*, *Bifidobacterium*, *Bacteroides*, *Fusobacterium*, *Prevotella*, *Peptostreptococcus*, *Porphyromonas*, *Lactobacillus*, *Eubacterium*, *Veillonella* e *Propionibacterium* (Socransky; Haffajee, 1992; Aas et al., 2005; Preza et al., 2008; Aas et al., 2008).

1.6.4 Controle do biofilme dental

Um dos fatores de desequilíbrio fundamental para o aparecimento do biofilme dental cariogênico é a dieta rica e freqüente de carboidratos fermentáveis, principalmente a sacarose. Esta dieta promove um aumento da proporção de *Streptococcus* do grupo *mutans*, uma vez que estes microrganismos apresentam algumas vantagens ecológicas quando da presença deste açúcar no meio bucal, permitindo a sua aderência, colonização e posterior acúmulo na superfície lisa do esmalte dental (Loesche, 1986). Além disso, a fermentação de carboidratos da dieta pelas bactérias, principalmente sacarose, resulta na produção de ácidos e produtos que inicialmente desmineralizam o esmalte e posteriormente a dentina, sendo que, quando esse processo não é controlado, ocorre à formação das lesões cariosas (Alam et al., 2000). Estudos realizados em 258 crianças, avaliando fatores associados com lesões brancas ativas no esmalte, mostraram que há uma forte associação entre a presença do biofilme dental e o alto índice de cárie e lesões brancas no esmalte dental (Ferreira e Mendes, 2005). Deste modo, a inibição do biofilme dental seria importante na prevenção de cárie, seja inibindo o crescimento dos *Streptococcus* do grupo *mutans* na

cavidade bucal ou inibindo a aderência destas bactérias às superfícies dos dentes através da inibição da atividade das glicosiltransferases (Koo *et al.*, 2002).

A remoção de biofilmes bacterianos supra e subgengival é um componente decisivo para a prevenção e tratamento da doença periodontal. Estudos indicam que microrganismos associados com periodontites colonizam não apenas os sítios periodontais, mas também, outros habitats da cavidade bucal tais como: língua, amígdalas, mucosa bucal e gengivas. Estão presentes também em alto número na saliva (Asikainen *et al.*, 1991).

Produtos de higiene bucal, contendo diferentes ingredientes ativos, são encontrados nas prateleiras de supermercados, farmácias e lojas de cosméticos como: os dentífrícios e as soluções anti-sépticas que funcionam como coadjuvantes aos métodos mecânicos. Sendo assim, em algumas situações quando ocorre o impedimento de aplicação adequada dos métodos mecânicos e até mesmo numa tentativa de compensar a desmotivação de alguns pacientes, as substâncias químicas têm sido alvo de vários estudos. Seu impacto é bastante positivo sobre a prevenção de cáries, doenças periodontais, candidíase e outras enfermidades (Nogueira *et al.*, 2003).

O agente químico deve ser eficaz contra os microrganismos responsáveis pela inflamação e deve possuir substantividade, isto é, maior efeito residual, para que tenha tempo de contato suficiente para agir sobre a microbiota existente, e para que mantenha a inibição de placa por um período mais prolongado. Além disso, o produto necessita ser estável à temperatura ambiente por tempo considerável e ser seguro para utilização em seres humanos (Loesche, 1976).

Outras características também devem ser observadas para que um agente químico seja considerado eficaz, tais como: ausência de toxicidade, não ser alergênico,

ter comprovação clínica de reduções significantes de placa e gengivite, ser seletivo e ter especificidade para agir na microbiota patogênica, apresentar sabor agradável, ter custo acessível e ser de fácil utilização (Van der Ouderaa, 1991).

Contudo, agentes antimicrobianos contra patógenos bucais ou agentes que inibem a formação de placa e acumulação de comunidades cariogênicas no biofilme são algumas das estratégias para prevenção de cárie dental e outras doenças relacionadas com a placa bacteriana (Koo *et al.*, 1999). Várias substâncias antimicrobianas, como a ampicilina, a clorexidina, sanguinarina, metronidazol e antissépticos de amônio quaternário e fenólicos, têm sido muito eficazes na prevenção da cárie dentária (Tsui *et al.*, 2008). A clorexidina tem sido o agente antimicrobiano mais utilizado na prevenção e combate a patologias bucais. A sua estrutura está apresentada na Figura 44.

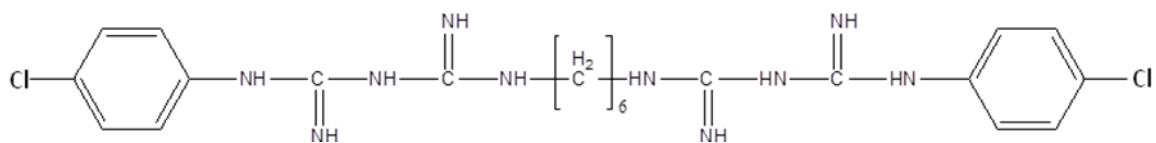


Figura 44. Fórmula estrutural da clorexidina.

No entanto, vários efeitos adversos como o manchamento dos dentes, o aumento da formação de cálculos, diarréia e desordem na flora oral e intestinal têm sido associados com o uso destes antimicrobianos (Chung *et al.*, 2006; More *et al.*, 2008). Assim, estes inconvenientes justificam a busca por novos e eficazes agentes antibacterianos que poderiam ser empregados na prevenção da cárie e outras doenças bucais.

O interesse em plantas com propriedades antimicrobianas tem reaparecido devido aos vários problemas associados ao uso intermitente de antibióticos, principalmente àqueles relacionados a resistência de algumas linhagens de microrganismos contra vários medicamentos (Kokoska *et al.*, 2002). Dessa forma, agentes antimicrobianos, oriundos de plantas, podem levar ao desenvolvimento de novos fármacos clinicamente importantes (More *et al.*, 2008; Porto *et al.*, 2009). Inúmeras substâncias naturais, principalmente obtidas de vegetais, têm sido testadas com o objetivo de se avaliar a atividade antimicrobiana sobre os microrganismos do biofilme da placa dentária, constituindo assim um vasto campo de pesquisas ainda a ser explorado (Porto *et al.*, 2009; Bernardes *et al.*, 2010).

1.7 Estudos com espécies do gênero *Cassia*

O gênero *Cassia* é constituído por mais de 600 espécies, incluindo árvores, arbustos e ervas distribuídas em regiões tropicais e subtropicais de todo o mundo (Lorenzi *et al.*, 2003).

Foi isolada uma grande diversidade de substâncias inéditas e bioativas das espécies do gênero *Cassia*. Mais de 350 metabólitos secundários de várias classes já foram isolados nas espécies desse gênero. Os grupos de substâncias mais frequentemente encontrados na maioria das espécies foram antraquinonas, flavonoides e compostos fenólicos. Alcaloides também são metabólitos encontrados em várias espécies de *Cassia*. Várias espécies de *Cassia* são indicadas pela cultura popular por

apresentarem atividade biológicas tais como: anti-ulcerogênica, antibacteriana, antifúngica, anti-inflamatória, antipirética e analgésica (Viegas Júnior *et al.*, 2006).

Três referências de revisão sobre o gênero *Cassia* levantaram várias espécies já estudadas, partes do vegetal, constituintes químicos isolados e atividades biológicas comprovadas ou recomendadas pelo uso popular (Agarkar e Jadge, 1999; Viegas Júnior *et al.*, 2006; Mazumder *et al.*, 2008) (Quadro 1). Surpreendentemente, em nenhuma dessas revisões foram encontrados estudos com isolamento de metabólitos e atividades biológicas com a espécie *C. bakeriana*.

Quadro 1. Espécies de *Cassia* estudadas, principais classes de metabólitos isolados e atividades biológicas.

Espécie estudada	Partes do vegetal	Constituintes isolados	Atividades Biológicas
<i>Cassia fistula</i>	Cascas	^{a1} Antraquinonas	^{a1} Antitumoral, hepatoprotetor
	Folhas	^{a1} Flavonoides, biflavonoides, triflavonoides, senosídeos, antraquinonas (ácido cássico, ácido cássico glicosilado), procianidinas, kaempferol, alcaloides e triterpenos ^{b1} antraquinonas e esteróides	^{a1} Cicatrização de feridas, antioxidante, antitumoral, hepatoprotetor, hipoglicêmico, antibacteriano, antidiabético e antifungicida ^{b1} Laxativa, purgativa, hepatoprotetora, antioxidante e antireumática
	Flores	^{a1} Ácido cássico (rhein), óleos voláteis, flavonoides e derivados de ceras e resinas	-
	Polpa do fruto	^{a1} Kaempferol, antraquinonas incluindo ácido cássico	-
	Sementes	^{a1} Antraquinonas incluindo ácido cássico	^{a1,b1} Antitumoral
<i>Cassia occidentalis</i>	Folhas	^{a2} Antraquinonas, biantraquinonas e flavonoides glicosilados ^{b2} Antraquinonas	^{a2} Febre amarela, dor de cabeça e conjuntivite ^{b2} Anti-inflamatório, bactericida e antimalária

	Raízes	^{a2} Antraquinonas e flavonoides	^{a2} Anti-inflamatória, antibacteriana, antimalaria, antimutagênica e hepatoprotetor
<i>Cassia alata</i>	Cascas	^{a3} Senosídeos antraquinóides, antraquinonas incluindo ácido cássico e flavonóides	^{a3} Antifungal
	Folhas	^{a3} Flavonoides	^{a3} Antibacteriana
	Flores, raízes, estemas e casca	-	^{a3} Antibacteriana, antimutagênica, antifúngica, analgésica, anti-inflamatória e hipoglicêmica
<i>Cassia italica</i>	Folhas	^{a4,b3} Cumarinas, flavonoides, antraquinonas, taninos, esteróides, triterpenos e senosídeos antraquinonas	^{a4} Antimicrobiana, antitumoral e purgative ^d Antiemética
	Vagens	^{a4,b3} Senosídeos, antraquinonas incluindo ácido cássico glicosilado, flavonoides, taninos e saponinas	^{a4} Antidepressivo, antinociceptivo e sedativo
	Planta inteita	-	^{a4} Anti-inflamatória, antipirética, analgésica, antineoplásica e antiviral ^e Hipoglicêmica
	Vagens e folhas	^{a4} Senosídeos, carboidratos, taninos, saponinas, flavonoides e antraquinonas	-
<i>Cassia tora</i>	Raízes	^{a5} Antraquinonas	^{a5} Anti-inflamatória
	Folhas	^{a5} Antraquinonas, esteróides, ácidos esteárico, palmítico, succínico e tartárico	^{a5} Antinociceptivo, relaxante muscular
	Sementes	^{a5} Antraquinonas incluindo ácido cássico	^{a5} Purgativa, antioxidante, antibacteriana e antipsioríase
<i>Cassia auriculata</i>	Folhas	^{a6} Antraquinonas	^{a6} Antidiabético
	Flores	^{a6} Antraquinonas e sitosterol	^{a6} Antidiabético e antioxidante
	Planta inteira e vagens	-	^{a6} Antidiabética e laxativa
<i>Cassia sophora</i>	Cerne	^{a7} Antraquinonas	-
	Sementes	^{a7} Triterpenos glicosilados	^{a7} Analgésica, anticonvulsivante, hipoglicêmico e hepatoprotetor
<i>Cassia javanica</i>	Sementes	^{a8} Antraquinonas	-

<i>Cassia podocarpa</i>	Folhas e frutos	^{a9} Antraquinonas	^{a9} Gonorréia, febre, controle de insetos, antiviral, purgative, laxative e antiespasmódica
<i>Cassia absus</i>	Folhas	^a Flavonoides e alcaloides	^a Cicatrização de feridas
	Raízes	^a Antraquinonas	-
	Sementes	^a Sitosterol, monoterpene, flavonoides e triterpenoides	^a Adstringente e infecções oftálmicas
<i>Cassia siamea</i>	Flores	^{a10} Antraquinonas, sitosterol e catequinas	^{a10} Antioxidante e antiespasmódico
<i>Cassia angustifolia</i>	Folhas	^{a11} Glicosídeos, senosídeos, flavonoides e antraquinonas incluindo ácido cássico	^{a11} Purgativa, catártica e vermífugo ^d Antiemética
	Frutos e vagens	^{a11} Antraquinonas e senosídeos	^{a11} Laxativa
<i>Cassia mimosoides</i>	Raízes	^a Antraquinonas	^a Anti-helmíntico e antifungo
	Folhas	^a Antraquinonas	^a Asma, problemas de estômago e antiobesidade
<i>Cassia grandis</i>	Planta inteira	-	^a Fungicida e fungistática
<i>Cassia pumila</i>	Toda parte	^{a12} Antraquinonas, diterpenos e alcaloides	^{a12} Diurético, espasmolítico e antipirético
<i>Cassia glauca</i>	Folhas e estemas	^a Antraquinonas e esteroides	^a Antidiabético e antidepressivo
<i>Cassia uniflora</i>	Sementes	^{a11} Proteínas e polifenóis	-
<i>Cassia spectabilis</i>	Flores	^{a13} Antraquinonas, flavonoides e alcaloides	-
<i>Cassia nigricans</i>	Folhas	^{a14} Antraquinonas ^{b4} Taninos, saponinas e flavonoides	^{b4} Prevenção de úlceras, problemas gastrointestinais, contraceptivo.
<i>Cassia torosa</i>	Sementes raízes e folhas	^{b5} Flavonoides, hidroantracenos, lactonas naftalênicas e antraquinonas	^{b5} Tratamento de picadas de insetos e digestivo
	Folhas e flores	^{b5} Flavonoides e antraquinonas	-
<i>Cassia cinnamon</i>	Cascas	^{c1} Taninos, terpenos, cumarinas e óleos voláteis	^{c1} Estomatites, adstringente e antiséptico
<i>Cassia zeylanicum</i>	Planta inteira	^{c2} Flavonoides e terpenos	^{c2} Antiulcerogênica e antialérgica
<i>Cassia abtusifolia</i>	Folhas	^{c3} Antraquinonas, flavonoides, esteroides, ácidos graxos	^{c3} Asma, doenças bucais, anti-helmíntico, diurético, laxativo e antifúngica
<i>Cassia purpurea</i>	Folhas	-	^d Antiemética

Cassia holosericea	Folhas	-	^d Antiemética
-------------------------------	---------------	---	--------------------------

^a Mazumder *et al.*, 2008; ^{a1} Luximon-Ramma e Bahorun, 2002 apud Mazumder *et al.*, 2008; Rao e Venkateswarlu, 1965 apud Mazumder *et al.*, 2008; Rani e Kalidhar, 1998 apud Mazumder *et al.*, 2008; Kashiwada *et al.*, 1996 apud Mazumder *et al.*, 2008; Kaji *et al.*, 1968 apud Mazumder *et al.*, 2008; Duraipandiyan e Ignacimuthu, 2007 apud Mazumder *et al.*, 2008; Kumar *et al.*, 1966 apud Mazumder *et al.*, 2008; Liptak e Szentagali, 1937 apud Mazumder *et al.*, 2008; Khanna e Chandra, 1996 apud Mazumder *et al.*, 2008; Modi e Khorana, 1952 apud Mazumder *et al.*, 2008; Misra *et al.*, 1997 apud Mazumder *et al.*, 2008; Chaminda *et al.*, 2001 apud Mazumder *et al.*, 2008; Manonmani *et al.*, 2005 apud Mazumder *et al.*, 2008; ^{a2} Anton e Duquenois, 1968 apud Mazumder *et al.*, 2008; Ginde *et al.*, 1970 apud Mazumder *et al.*, 2008; Adjanohoun *et al.*, 1965 apud Mazumder *et al.*, 2008; Rai e Ashok, 1983 apud Mazumder *et al.*, 2008; Sharma *et al.*, 2000 apud Mazumder *et al.*, 2008; Tsutomu *et al.*, 1999 apud Mazumder *et al.*, 2008; Jafri *et al.*, 1999 apud Mazumder *et al.*, 2008; ^{a3} Palanichamy *et al.*, 1988 apud Mazumder *et al.*, 2008; Harrison e Garro, 1977 apud Mazumder *et al.*, 2008; Rao; Subhashini, 1986 apud Mazumder *et al.*, 2008; Somchit *et al.*, 2003 apud Mazumder *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2001 apud Mazumder *et al.*, 2008; Benjamin *et al.*, 1980 apud Mazumder *et al.*, 2008; ^{a4} Ali *et al.*, 1997 apud Mazumder *et al.*, 2008; Kazmi *et al.*, 1994 apud Mazumder *et al.*, 2008; Assane *et al.*, 1994 apud Mazumder *et al.*, 2008; Jain *et al.*, 1997 apud Mazumder *et al.*, 2008; Kazmi *et al.*, 1994 apud Mazumder *et al.*, 2008; Nazirizadeh e Amin, 1985 apud Mazumder *et al.*, 2008; ^{a5} Malhotra *et al.*, 2005 apud Mazumder *et al.*, 2008; ^{a6} Latha e Pari, 2003 apud Mazumder *et al.*, 2008; Suresh *et al.*, 2003 apud Mazumder *et al.*, 2008; Juvekar e Halade, 2006 apud Mazumder *et al.*, 2008; Jalalpure *et al.*, 2004 apud Mazumder *et al.*, 2008); ^{a7} Jain *et al.*, 1996 apud Mazumder *et al.*, 2008; Bilal *et al.*, 2005 Mazumder *et al.*, 2008; Malhotra e Misra, 1982 apud Mazumder *et al.*, 2008; Zhao *et al.*, 2007 apud Mazumder *et al.*, 2008; Khan *et al.*, 2002 apud Mazumder *et al.*, 2008; ^{a8} Akinremi *et al.*, 2000 apud Mazumder *et al.*, 2008; ^{a9} Akomolafe *et al.*, 2004 apud Mazumder *et al.*, 2008; Warriar, 1996 apud Mazumder *et al.*, 2008; Akinremi *et al.*, 2000 apud Mazumder *et al.*, 2008; Abo *et al.*, 2000 apud Mazumder *et al.*, 2008; ^{a10} Ajaiyeoba *et al.*, 2007 apud Mazumder *et al.*, 2008; Caceres *et al.*, 1991 apud Mazumder *et al.*, 2008; ^{a11} Deachapunya *et al.*, 2005 apud Mazumder

et al., 2008; ^{a12} Fatawi *et al.*, 1986 apud Mazumder *et al.*, 2008; ^{a13} Abo *et al.*, 2000 apud Mazumder *et al.*, 2008; Deachapunya *et al.*, 2005 apud Mazumder *et al.*, 2008; ^{a14} Ayo1 *et al.*, 2007 apud Mazumder *et al.*, 2008; ^{b1} Samy, 1998 apud Viegas Júnior *et al.*, 2006; Gupta *et al.*, 1989 apud Viegas Júnior *et al.*, 2006; Bhakta *et al.*, 1998 apud Viegas Júnior *et al.*, 2006; ^{b2} Samy, 2000 apud Viegas Júnior *et al.*, 2006; ^{b3} Sharma *et al.*, 1982 apud Viegas Júnior *et al.*, 2006; Jain *et al.*, 1997 apud Viegas Júnior *et al.*, 2006; El-sayde *et al.*, 1992 apud Viegas Júnior *et al.*, 2006; ^{b4} Gupta e Mazumber, 2000 apud Viegas Júnior *et al.*, 2006; Nwafor e Okwuasaba, 2001 apud Viegas Júnior *et al.*, 2006; ^{b5} Kitanaka *et al.*, 1994 apud Viegas Júnior *et al.*, 2006; Kitanaka *et al.*, 1989 apud Viegas Júnior *et al.*, 2006; Kitanaka e Takido, 1991 apud Viegas Júnior *et al.*, 2006; ^{c1} Trease e Evans, 1994 apud Agarkar e Jadge, 1999; Wallis, 1985 apud Agarkar e Jadge, 1999; ^{c2} Trease e Evans, 1994 apud Agarkar e Jadge, 1999; ^{c3} Mastuura, 1978 apud Agarkar e Jadge, 1999; ^d Ahmed *et al.*, 2012; ^e Qamar *et al.*, 2011.

Como se pode perceber, muitas espécies de *Cassia* já foram estudadas e apresentam importantes atividades biológicas, tais como laxativa, purgativa, antibacteriana, antifúngica, antimalária, contraceptivo, hepatoprotetor, analgésica, antitumoral, antidiabética, antiviral entre outras, demonstrando o potencial farmacológico do gênero. Estudos indicam que as diferentes partes das espécies de *Cassia* são fontes de metabólitos secundários bioativos como exemplo antraquinonas, flavonoides, compostos fenólicos e alcaloides. Em nenhuma dessas revisões foi relatado compostos isolados de *C. bakeriana* bem como, possíveis atividades biológicas com esta espécie. Recentemente foi publicada uma revisão abordando características botânicas, propriedades farmacológicas, utilizações na medicina popular e compostos isolados de trinta e nove espécies de *Cassia*. Além disso, foi levantado trinta e sete antraquinonas isoladas destas espécies e suas aplicações, colocando o gênero como uma fonte de antraquinonas bioativas (Dave e Ledwani, 2012). Mais uma

vez nesta última revisão com espécies de *Cassia*, não foi relatado compostos isolados, incluindo os da classe das antraquinonas e atividades biológicas da espécie *C. bakeriana*. Diante dessa perspectiva, é possível sugerir que as diferentes partes de *C. bakeriana* também podem ser fonte de metabólitos secundários biologicamente ativos.

1.8 A espécie *Cassia bakeriana* Craib.

A planta proposta para os estudos desse projeto de pesquisa é a espécie *Cassia bakeriana* Craib. Está apresentada nas Figuras 45 e 46 a espécie *Cassia bakeriana* e, no detalhe a imagem da casca do caule. Pertence ao gênero *Cassia*, família Leguminosae-Caesalpinioideae. É uma árvore frondosa, de 12 -15 metros de altura, originária da Tailândia, de tronco robusto com casca pardo-acinzentada lisa. Ramagem longa e curvada, forte, originando copa ampla e arredondada. Folhas semi-decíduas, alternas compostas pinadas, com 12 – 15 pares de folíolos opostos, elípticos, de 2 – 4 cm de comprimento. Inflorescências em panículas densas, globosas, dispostas ao longo da ramagem, com flores grandes de cinco pétalas ovaladas, róseas, formadas de novembro a janeiro. Frutos do tipo vagem (legume), indeiscentes, lenhosos, cilíndricos, marrons, quebradiços, de 20 – 30 cm de comprimento, com sementes castanhas de formato ovalado (Lorenzi *et al.*, 2003).

Facilmente reproduzida por sementes pela abundância com que são anualmente produzidas nas condições do sudeste brasileiro. Árvore frondosa, muito florífera, é muito utilizada para uso paisagístico principalmente em plantios isolados na arborização de largas avenidas e para a composição vegetal de parques e jardins. É ótima como

árvore para sombreamento em zonas rurais e pastagens. Espécie de origem tropical úmido, contudo tolera as condições subtropicais de inverno ameno das regiões sul e sudeste do Brasil. Possui rápido crescimento (Lorenzi *et al.*, 2003).



Figura 45. Espécie Vegetal *Cassia bakeriana* (Fotos do autor).

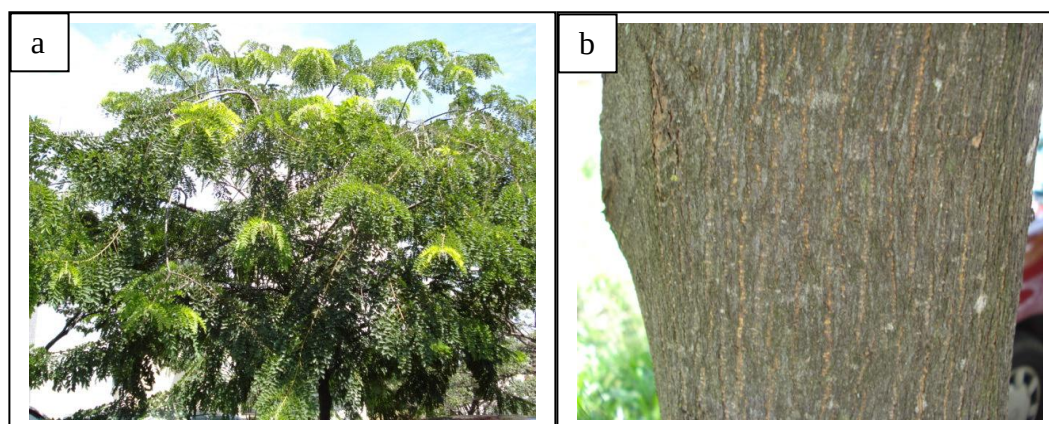


Figura 46. a- Espécie vegetal *Cassia bakeriana* Craib, b – casca do caule. (Fotos do autor).

Alguns estudos com a espécie *Cassia bakeriana* Craib. foram encontrados na literatura.

Um estudo com as folhas de cinco espécies de *Cassia*, dentre elas *C. bakeriana* (*Cassia grandis* Linn., *Cassia spectabilis* DC., *Cassia bakeriana* Craib., *Cassia sophera*

Linn. e *Cassia tora* Linn.) foi realizado na Tailândia com o objetivo de determinar os padrões de isoenzimas presentes em cada uma das espécies. As enzimas identificadas foram álcool desidrogenase, isocitrato desidrogenase, chiquimato desidrogenase, malato desidrogenase e fosfogluconato desidrogenase. Nesse estudo foi colocado que essas enzimas são significantemente diferentes e por isso, cada espécie de *Cassia* pode ser identificada através de sua isoenzima padrão (Phadungrakwitaya *et al.*, 2000).

Trabalhos realizados na Tailândia apontam as espécies de *Cassia* como uma das principais fontes de antraquinonas. Essas substâncias são bastante conhecidas pelas suas propriedades laxativas e anti-fúngicas. As espécies *Cassia alata* (folhas), *C. fistula* (vagens), *C. tora* (sementes) e *C. angustifolia* (folhas e vagens) são usadas popularmente como agentes laxativos na Tailândia e *C. alata* (folhas) como antifúngico. Nos estudos de Gritsanapan *et al.* (2005) foi determinado o teor de antraquinonas glicolisadas em nove espécies de *Cassia* (*C. siamea*, *C. fistula*, *C. alata*, *C. surattensis*, *C. grandis*, *C. spectabilis*, *C. bakeriana*, *C. sophera* e *C. tora*) buscando novas fontes de agentes laxativos. Os maiores conteúdos foram encontrados nas folhas de *C. alata* (1,24 % do peso seco) e *C. bakeriana* (0,93 % do peso seco) coletadas durante o verão, indicando as folhas desses vegetais como promissoras fontes de antraquinonas e de drogas laxativas.

2. Justificativa

Uma avaliação cuidadosa na literatura sobre trabalhos realizados com a espécie *Cassia bakeriana* Craib, indica que até o presente momento, não foram encontrados trabalhos relacionados com análises químicas da casca, madeira, folhas e constituintes voláteis desta espécie, bem como avaliações de atividades biológicas como antimicrobiana e antioxidante com extratos e substâncias isoladas desta espécie vegetal. Mesmo não apresentando na medicina popular relatos de propriedades farmacológicas de alguma das partes do vegetal, estudos com outras espécies de *Cassia* são um indicativo que essa espécie pode ser uma promissora fonte de compostos biologicamente ativos. Desta forma, foi possível perceber a importância de se investigar os extratos, frações e constituintes químicos desta planta.

3. Objetivos

3.1 Objetivos gerais

Este trabalho teve como objetivo analisar e quantificar os constituintes químicos da casca, madeira, folhas e óleos essenciais, bem como avaliar as atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica dos extratos e óleos essenciais da espécie *C. bakeriana*, conhecida popularmente como cássia rósea.

3.2 Objetivos específicos

- a) Coletar o material vegetal, identificar, preparar a escicata, depositar e obter o registro no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia;
- b) Analisar e quantificar os constituintes macromoleculares da madeira e casca;
- c) Determinar o teor de fenóis totais, proantocianidinas e o potencial antioxidante dos extratos da madeira, casca e folhas;
- d) Quantificar e caracterizar os constituintes voláteis das folhas, casca e madeira da espécie *Cassia bakeriana*;
- e) Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos da casca, folhas e óleos essenciais;
- f) Avaliar a atividade citotóxica de extratos, frações e óleos essenciais que indicaram maiores atividades antimicrobiana e antioxidante;
- g) Realizar o estudo fitoquímico da espécie *C. bakeriana* guiado por atividade antimicrobiana frente a microrganismos bucais.

4. Materiais e métodos

4.1 Reagentes, soluções e equipamentos

Os reagentes e equipamentos utilizados para as determinações dos componentes macromoleculares, extrações, teor de fenóis, teor de proantocianidinas, atividade antioxidante e análises de óleos voláteis estão apresentados nas Tabelas 6 e 7, respectivamente.

Tabela 6. Reagentes utilizados nas análises e suas respectivas marcas

REAGENTES	MARCA
Etanol PA	Cromoline
Reagente de Folin-Ciocalteu	Cromoline
Metanol PA	Vetec
Carbonato de sódio PA	Reagen
Ácido gálico PA	Vetec
Vanilina PA	Isofor
Ácido sulfúrico PA	Vetec
Catequina PA	Sigma Aldrich
2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH) PA	Sigma Aldrich
Butilidroxitolueno (BHT) PA	Sigma Aldrich
Cloreto de Potássio PA	Vetec
Ácido Fosfórico PA	Vetec
Hidróxido de sódio PA	Vetec
Diclorometano PA	Vetec
Padrão de alcanos C8-C32	Sigma Aldrich
Dimetilsulfóxido (DMSO) PA	Synth
Ácido acético glacial	Synth
Acetato de sódio PA	Synth
Clorito de sódio PA	Synth
Hidróxido de potássio PA	Synth
Hexano PA	Synth
Cicloexano PA	Synth
Acetato de etila PA	Synth
Clorofórmio PA	Synth

Tabela 7. Equipamentos utilizados e suas especificações

EQUIPAMENTOS	ESPECIFICAÇÕES
Espectrofotômetro UV-VIS	Hitachi U-2000
Cromatógrafo a gás acoplado a detector de massas	Shimadzu GC17A/QP5000
Cromatógrafo a gás acoplado a detector de ionização de chama	Shimadzu, modelo 2014
Balança analítica	Shimadzu AUW 220D
Balança de luz infravermelha	Kett FD-600
Estufa	Fanem 315 SE
Evaporador rotativo	IKA® HB 10
Ressonância magnética nuclear	Brüker DRX400 AVANCE
HPLC – MS	LC-IT-TOF-MS-Shimadzu LC-20AD
IVTF	Shimadzu IR - Prestige-21
Determinador de ponto de fusão	Instrutherm DF-3600

Preparo das soluções:

- 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 mL e completou-se o volume com água destilada.
- Solução de ácido gálico 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$: Pesou-se 2,0 mg de ácido gálico, a massa foi transferida para um balão volumétrico de 25 mL, completando o volume com metanol. A partir desta solução, foram feitas diluições para as concentrações 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$.
- Solução de vanilina 0,01 g mL^{-1} , em Ácido sulfúrico 70% (v/v): Preparou-se a solução de ácido sulfúrico em um balão volumétrico de 50 mL, transferiu-se 35,0 mL do ácido e completou-se o volume com água destilada. Pesou-se 0,5 g de vanilina em um béquer e dissolveu-se essa massa com uma solução de ácido sulfúrico 70%.

Transferiu-se esta solução para um balão volumétrico de 50 mL e completou-se o volume com a solução de ácido sulfúrico 70%.

- Solução de catequina 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$: Pesou-se 0,005 g de catequina, a massa foi transferida para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com metanol. A partir desta solução, foram feitas diluições para as concentrações de 2, 4, 7, 10, 13, 16, 18 e 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$.
- Solução do reativo de Folin-Ciocalteu 10% (v/v): Em um balão volumétrico de 100 mL adicionou-se 10 mL do reagente de Folin e completou-se o balão com água destilada.
- Solução de DPPH $^{\cdot}$ 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$: Pesou-se 0,0025 g DPPH $^{\cdot}$, a massa foi transferida para um balão de 50 mL. Completou-se o volume do 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 mL e completou-se o volume com água destilada.
- Solução de ácido acético 10%: Utilizou-se um balão volumétrico de 100 mL. Transferiu-se 10 mL do ácido para o balão e completou-se o volume com água destilada.
- Solução de ácido sulfúrico 72%: Utilizou-se um balão volumétrico de 50 mL, com 36,7 mL do ácido e completou-se o volume com 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 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 mL e completou-se o volume com água destilada.
- Solução de hidróxido de potássio 24%: Dissolveu-se cerca de 24,0 g de hidróxido de potássio em água destilada em um béquer. Transferiu-se para um balão volumétrico de 100 mL e completou-se o volume com água destilada.

4.2. Área de coleta

Amostras de madeira, casca e folhas da espécie *Cassia bakeriana* Craib. com idade de aproximadamente 8 anos, foram coletadas em uma árvore localizada no estacionamento da Universidade Federal de Uberlândia próximo ao Instituto de Química – UFU, Minas Gerais, Brasil (18°55'8.95"S; 48°15'34.01"W) nos dias 19/03/2009. A espécie foi identificada no Instituto de Biologia da Universidade Federal de Uberlândia pelos professores doutores Glein Monteiro de Araújo e Ivan Schiavini e sua exsicata depositada no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia com número 63584.

A coleta da madeira, casca e folhas de *C. bakeriana* para as extrações dos óleos essenciais foi realizada em Junho de 2011.

4.3 Secagem e preparação da amostra da casca, madeira e folhas

O processo de obtenção das amostras da casca, madeira e folhas de *C. bakeriana*, seguiu as seguintes etapas:

Coleta: caules da espécie *C. bakeriana* foram coletados e descascados, tendo a casca separada da madeira, e em seguida, a casca e madeira foram moídas em moinho de bolas.

Secagem: casca, madeira e folhas foram secas e estabilizadas em estufa com temperatura aproximada de 40°C, durante dez dias.

Moagem: casca e madeira passaram por processo de trituração até a forma de pó em moinho de bolas durante sete dias. As folhas foram trituradas em liquidificador industrial. Transferiu-se o material vegetal para frascos de vidro e em seguida, foi estocado em freezer (- 10 °C) até o momento das análises.

4.4 Umidade

Para a determinação da umidade utilizou-se uma balança de luz infravermelha da marca Kett, modelo FD-600. Cerca de 1,0 g das amostras foram deixadas a uma temperatura de 105 ± 5 °C por quinze minutos até que o teor de umidade permanecesse constante.

4.5 Preparação da madeira e casca livre de extrativos para a determinação dos constituintes macromoleculares de *Cassia bakeriana*

Amostras de aproximadamente 20 g do pó da casca e da madeira de *C. bakeriana* foram colocadas em cartuchos de papel filtro e adaptado ao extrator soxhlet. Realizou-se quatro extrações com 300 mL dos solventes: cicloexano, cicloexano:etanol (2:1_{v/v}), clorofórmio e água sucessivamente no aparelho soxhlet. Todas as extrações foram feitas por um período de 10 a 15 horas ou até a visualização do término da extração. Em seguida, o material vegetal livre de extrativos foi retirado do aparelho soxhlet e deixado em dessecador até a evaporação completa do solvente (Amostra A). Esse procedimento de extração foi realizado por mais duas vezes, obtendo-se as amostras B e C, realizando o processo extrativo em triplicata. Essas amostras foram utilizadas nas determinações de lignina solúvel e insolúvel, determinação de holocelulose, hemiceluloses e α -celulose. As soluções de cicloexano, cicloexano/etanol, clorofórmio e água com os seus respectivos extrativos, tiveram seus solventes evaporados à pressão reduzida com temperatura de 40 °C, resultando em quatro extratos brutos, que posteriormente, foram submetidos a testes de atividade antimicrobiana utilizando o método da microdiluição em caldo para a determinação da concentração inibitória mínima frente a microrganismos da cavidade bucal.

4.5.1 Pré-tratamento das cascas

Para a determinação de lignina de Klason e holocelulose em casca é necessário a realização de um pré-tratamento dessa em meio básico para solubilização de substâncias que também são insolúveis em ácidos minerais e seriam contabilizadas como lignina ou holocelulose no rendimento final (Browning, 1967).

Nesse pré-tratamento, cerca de 20,0 g de cada uma das amostras A, B e C foram tratadas com uma solução de hidróxido de sódio 1% (m/v) a 90 °C durante 1 hora. O resíduo obtido foi filtrado em cadinho de vidro sinterizado, lavado sucessivamente com 100,0 mL de água destilada quente, 50,0 mL de ácido acético 10% (v/v) e novamente com 200,0 mL de água destilada quente, seco a 105 ± 5 °C e pesado (Browning, 1967). Calculou-se o rendimento.

4.6. Determinação dos componentes macromoleculares

4.6.1 Determinação de lignina insolúvel em ácido

O método direto mais firmemente estabelecido é a determinação de acordo com Klason, lignina de Klason. A hidrólise é realizada tratando-se amostras de madeira livre de extrativos, ou polpa não branqueada com H₂SO₄ a 72% e uma etapa final com H₂SO₄ a 3% sob condições definidas (Klock *et al.*, 2005).

Para a determinação de lignina de Klason em casca é necessário a realização de um pré-tratamento da casca em meio básico para solubilização de substâncias que

também são insolúveis em ácidos minerais e seriam contabilizadas como lignina no rendimento final.

A lignina de Klason foi determinada de acordo com o método descrito por Browning (1967). Cerca de 1,00 g (40-60 meshes) da madeira livre de extrativos ou casca livre de extrativos e pré-tratada, foi colocada em um béquer e adicionados 15,0 mL de uma solução de ácido sulfúrico 72%, de forma lenta, sob agitação constante. A mistura é deixada em repouso por duas horas à temperatura ambiente, agitando a cada 10 minutos. Em seguida, a mistura foi diluída em um balão de destilação adicionando 560 mL de água destilada e refluxada por quatro horas. Depois disso, a solução foi resfriada, filtrada e o resíduo lavado com água destilada até pH neutro. O resíduo foi seco em estufa a $105 \pm 5^{\circ}\text{C}$ até massa constante. Determinou-se o rendimento pela diferença entre as massas da amostra pré-tratada e o resíduo obtido.

4.6.2 Determinação de lignina solúvel

O filtrado do procedimento anterior foi colocado em um balão volumétrico de 1 L e completado com água destilada até o volume do balão. A partir dessa solução, retirou-se 10 mL e acrescentou-se mais 5 mL de água destilada, formando assim uma segunda solução. A partir dessa nova solução foi possível determinar quantitativamente a lignina solúvel por espectroscopia ultravioleta (UV) a partir da análise das bandas de absorção nas regiões de 215 e 280 nm do espectro (Queiroz, 2001; Browning, 1967; Moraes *et al*, 2005). Foi feito um controle realizando o mesmo procedimento para

determinação de lignina insolúvel, entretanto, sem a presença de casca livre de extrativos. A concentração de lignina solúvel foi calculada segundo a equação:

$$C_{L.S.} = \frac{4,53A_{215} - A_{280}}{300} \quad \text{em que:}$$

$C_{L.S.}$ = concentração em g L⁻¹ de lignina na amostra;

A_{215} = absorvância da solução a 215 nm menos a absorvância do branco a 215 nm

A_{280} = absorvância da solução a 280 nm menos a absorvância do branco a 280 nm.

A equação acima é resultante da resolução simultânea de duas equações:

$$A_{280} = 0,68 C_D + 18 C_L$$

$$A_{215} = 0,15 C_D + 70 C_L$$

Onde:

A_{215} = absorvância da solução a 215 nm menos a absorvância do branco a 215 nm

A_{280} = absorvância da solução a 280 nm menos a absorvância do branco a 280 nm

C_L = concentração em g L⁻¹ de lignina solúvel

C_D = concentração em g L⁻¹ dos carboidratos

Os valores 0,68 e 0,15 são as absortividades molares dos carboidratos em 280 e 215 nm, respectivamente, e os valores 18 e 70 são as absortividades molares da lignina solúvel em 280 e 215 nm, respectivamente.

A leitura a 280 nm é uma correção pela presença de açúcares dissolvidos e produtos derivados como furfural e hidroximetilfurfural gerados durante a hidrólise da madeira e casca que interferem na determinação do teor de lignina solúvel e a leitura a

215 nm representa a absorvância da concentração de lignina solúvel. Os aldeídos derivados de açúcares apresentam absorção máxima no comprimento de onda de 280 nm e a absorvância desses compostos em comprimentos de onda mais baixos é relativamente pequena. Mesmo que pouca, é possível que o filtrado de lignina que absorva na região entre 205 – 215 nm sofra alguma interferência.

4.6.3 Polissacarídeos

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

4.6.3.1 Determinação da holocelulose

Em um erlenmeyer de 1 L foram adicionados cerca de 4,0 g de madeira ou casca livre de extrativos e pré-tratada (40/60 mesh). Em seguida, foram adicionados 110 mL de água destilada, 3 mL de ácido acético glacial, 22 mL de solução de acetato de sódio a 20% (m/v) e 9 mL de clorito de sódio a 40% (m/v), respectivamente. A mistura foi homogeneizada com agitação, tampada com um erlenmeyer de 100 mL invertido para evitar a saída prematura de gases e colocada em banho aquecido a 75 °C por 60 minutos, sob agitação frequente. A adição dos reagentes foi repetida por mais três vezes a cada intervalo de 60 minutos, até que se observou a holocelulose com

coloração branca. Em seguida, a solução foi filtrada em cadinho de vidro sinterizado sob vácuo. O filtrado lavado com cerca de 1 L de água destilada, duas porções pequenas de acetona (cerca de 10 mL cada porção) e aspirada até a holocelulose ficar relativamente seca. O produto é secado em estufa a 105 °C e o rendimento calculado.

4.6.3.2 Determinação de hemiceluloses

Uma amostra de três gramas de holocelulose foram pesadas e transferidas para um frasco de erlenmeyer de 250 mL. Sob atmosfera de nitrogênio, foram adicionados 100 mL de solução de hidróxido de potássio a 24%, a 25 °C. A solução foi homogeneizada, o frasco foi vedado e colocado em banho aquecido a 25 °C por 120 minutos, agitando-se a cada 10 minutos. A mistura é filtrada em cadinho de vidro sinterizado de porosidade média previamente tarado, e o filtrado foi recolhido em um frasco kitassato de 500 mL.

Em seguida, o resíduo fibroso (α -celulose) foi lavado com 25 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) 24%, 50 mL de água destilada, 25 mL de ácido acético a 10% e água destilada até pH neutro. A seguir, o resíduo foi lavado com 50 mL de acetona e secado na estufa a 105 ± 5 °C até a massa permanecer constante. O resíduo obtido é a α -celulose, sendo então o seu rendimento calculado. O teor de hemiceluloses foi obtido por diferença entre o teor de holocelulose e de celulose.

4.7 Cinzas

As cinzas são normalmente determinadas em amostras que não sofreram extração, porque componentes inorgânicos podem ser removidos durante a etapa de extração com água (Klock *et al.*, 2005).

Para a determinação de cinzas, cerca de 2,0 g de amostra da madeira ou casca foi transferido para cadinhos de porcelana previamente calcinados, esfriados e pesados. Após a distribuição uniforme das amostras nos cadinhos, as mesmas foram incineradas na temperatura de aproximadamente 600 °C por 6 horas. Após esta etapa foram calculadas as porcentagens de cinzas em relação ao pó que foi submetido ao processo de secagem. Essas medidas foram realizadas em três repetições para cada amostra (Browning, 1967).

4.8 Extratos brutos obtidos por soxhlet, maceração e partição líquido-líquido

4.8.1 Extração em soxhlet

A extração em soxhlet foi realizada com aproximadamente 20 g de madeira ou casca moída. A sequência de solventes utilizada foi cicloexano, cicloexano:etanol (2:1_{v/v}), clorofórmio e água sucessivamente. As soluções para cada sistema de solvente foram agrupadas. Em seguida, as soluções foram concentradas sob pressão reduzida, obtendo-se os extratos brutos cicloexano, cicloexano:etanol (2:1_{v/v}), clorofórmio e água

denominados respectivamente por de E1, E2, E3 e E4. Nas Figuras 47 e 48 estão apresentadas as extrações em soxhlet e as soluções obtidas após a extração da casca.

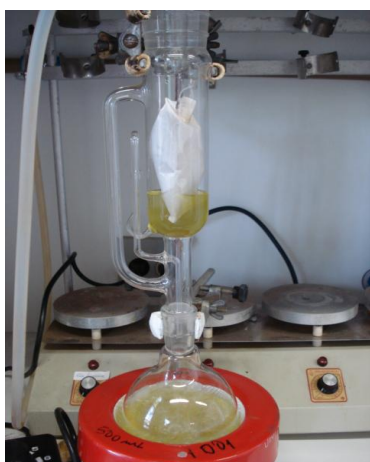


Figura 47. Extrator soxhlet.
(Próprio autor)

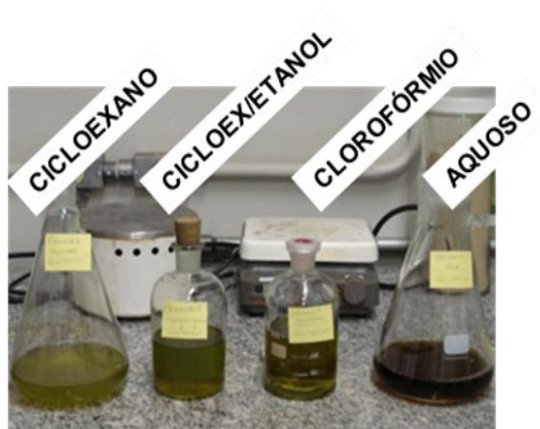


Figura 48. Soluções com os extrativos das cascas.
(Próprio autor)

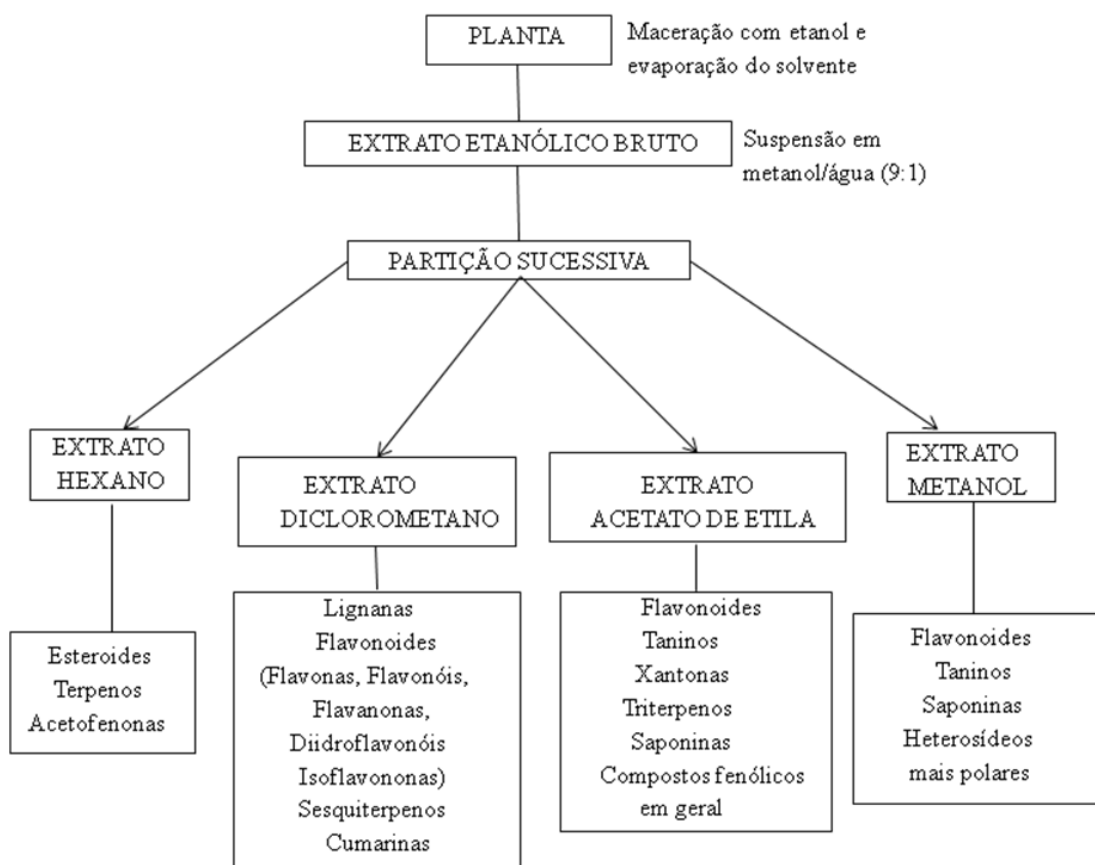
A partir dos extratos brutos da casca obtidos em soxhlet foi realizada a avaliação da atividade antimicrobiana frente a microrganismos da cavidade bucal. Esses ensaios de atividade antimicrobiana foram realizados com o objetivo de se fazer uma avaliação inicial do potencial antimicrobiano da casca, ou seja, verificar se nos extratos da casca existem metabólitos biologicamente ativos que justifiquem extrações em maior escala, partições e procedimentos cromatográficos de isolamento. Não foi realizado ensaios de atividade antimicrobiana com os extratos da madeira, pelo fato de que a madeira geralmente possui menor quantidade de extrativos do que cascas e folhas. Além disso, é bem mais relevante a quantidade de estudos fitoquímicos na literatura com cascas e folhas de vegetais comprovando seus efeitos biológicos.

4.8.2 Obtenção dos extratos brutos etanólicos por maceração e partição líquido – líquido da casca e folhas de *C. bakeriana*

Colocou-se cerca de 1,0 kg da casca (seca em estufa a 40 °C e moída em moinho de bolas) 1,0 kg de folhas (secas em estufa a 40 °C e picadas em liquidificador industrial) em frascos de 5 L, em seguida, acrescentou-se etanol em cada um dos frascos (2 L) até cobrir todo o material vegetal. A extração aconteceu por um período de sete dias. A solução com os extrativos foi filtrada e evaporada com pressão reduzida e temperatura em torno de 40 °C. Deixou-se o extrato remanescente em temperatura ambiente até que todo solvente fosse evaporado, obtendo-se os extratos etanólicos brutos da casca e folhas denominados E5 e E6, respectivamente. Repetiu-se a extração com o mesmo material vegetal por mais três vezes.

Uma amostra do extrato etanólico bruto das folhas (70,0 g) e uma amostra do extrato etanólico bruto da casca (60,0 g) foram ressuspensas em 250 mL de solução metanol/água (9:1). Executou-se em funil de decantação a partição líquido - líquido com a seguinte sequência de solventes para o extrato etanólico das folhas: hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol e para o extrato etanólico das cascas: hexano, diclorometano e acetato de etila. Utilizou-se um total de 600 mL de cada um dos solventes (3 x 200 mL). As soluções com os respectivos extrativos, tiveram seus solventes evaporados a pressão reduzida com temperatura de 40 °C, resultando quatro extratos brutos para as folhas (hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol) e três extratos brutos para a casca (hexano, diclorometano e acetato de etila), que posteriormente foram submetidos a testes biológicos de atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição em caldo frente a microrganismos da cavidade bucal, atividade

antioxidante pelo método de sequestro do radical livre DPPH. Ainda com os extratos brutos etanólicos e as partições das folhas e cascas realizaram-se às determinações de fenóis totais e proantocianidinas. O esquema da partição líquido-líquido e a separação provável das principais classes de compostos presentes em plantas de acordo com a polaridade do solvente empregado está representado no Fluxograma 1. As partições hexano, diclorometano e acetato de etila para a casca foram denominadas PC1, PC2 e PC3, respectivamente. E as partições das folhas hexano, diclorometano, acetato de etila e metanol foram denominadas PF1, PF2, PF3 e PF4, respectivamente.



Fluxograma 1. Proposta de obtenção dos extratos brutos e separação provável das principais classes de metabólitos secundários presentes em plantas (Filho e Yunes, 1998).

4.8.3 Extração etanólica da madeira por maceração

Colocou-se cerca de 100 g de madeira (seca em estufa e moída em moinho de bolas) em frasco de 1 L, em seguida, acrescentou-se em cada um dos frascos etanol (cerca de 300 mL) até cobrir todo o material vegetal. A extração aconteceu por um período de sete dias. A solução com os extrativos foi filtrada e evaporada com pressão reduzida e temperatura em torno de 40 °C. Repetiu-se a extração com o mesmo material vegetal por mais uma vez. Deixou-se o remanescente em temperatura ambiente até que todo solvente seja evaporado. O extrato etanólico bruto foi utilizado na determinação de atividade antioxidante, fenóis totais e proantocianidinas.

4.9 Determinação do teor de fenóis totais pelo método de Folin-Ciocalteu

A determinação do teor de fenóis totais dos extratos brutos etanólicos da madeira, casca e folhas e partições obtidas da casca e folhas de *C. bakeriana* foi realizada por meio de espectroscopia na região do visível (760 nm) utilizando o método de Folin–Ciocalteu (Sousa *et al.*, 2007).

Preparou-se inicialmente uma solução com concentração de 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de cada um dos extratos brutos secos dissolvendo-se 2,0 mg de amostra em metanol, que foi transferido para um balão volumétrico de 5 mL e em seguida teve seu volume completado com metanol. Desta solução retirou-se uma alíquota de 0,5 mL que foi transferida para um tubo de ensaio. Adicionaram-se 2,5 mL de uma solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteu a 10% (v/v) e 2 mL de solução aquosa de carbonato de

sódio a 7,5% (m/v). A mistura contida no tubo de ensaio foi mantida em banho aquecido a 50 °C por 5 minutos. Após resfriar a amostra, foi feita a medida de sua absorvância a 760 nm. O teor de fenóis totais das amostras foi determinado empregando-se a equação da reta obtida pela curva analítica construída com soluções metanólicas de ácido gálico com diferentes concentrações e expressos em mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por grama de extrato.

A curva analítica foi realizada a partir do preparo de uma solução inicial de ácido gálico. Pesou-se cerca de 2,0 mg de ácido gálico, transferiu-se a massa para um balão volumétrico de 25 mL e seu volume foi completado com metanol ($80 \mu\text{g mL}^{-1}$). A partir dessa solução foram feitas diluições para as concentrações de 50, 40, 30, 25, 20, 15, 10 e $5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em tubos de ensaio foram colocados 0,5 mL de cada uma das soluções supra citadas juntamente com 2,5 mL de solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteu a 10% (v/v) e 2,00 mL de carbonato de sódio a 7,5% (m/v). Os tubos foram aquecidos durante 5 minutos em banho aquecido a 50 °C, após o resfriamento, foi feito o registro da absorvância a 760 nm. As leituras foram feitas descontando-se o valor do branco que é preparado nas mesmas condições anteriores com a substituição da amostra e das soluções de ácido gálico por metanol (Sousa *et al.*, 2007).

4.10 Determinação do teor de proantocianidinas pelo método da vanilina

Preparou-se inicialmente uma solução com concentração de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ de cada um dos extratos etanólicos brutos e partições da casca e folhas de *C. bakeriana* dissolvendo-se 1,00 mg de cada amostra em metanol, que foi transferido para um balão

volumétrico de 10,00 mL e em seguida teve seu volume completado com metanol. Em um tubo de ensaio, colocou-se 2 mL do extrato diluído e adicionou-se 3 mL de uma solução 0,5 % em massa/volume de vanilina em ácido sulfúrico 70% recém-preparada. Aqueceu-se a solução resultante em banho aquecido a 50 °C por 15 minutos. Após o resfriamento das amostras, registrou-se a absorvância a 500 nm. As leituras foram feitas descontando-se o valor do branco (2 mL de metanol e 3 mL de solução de vanilina sulfúrica.). O teor de taninos condensados foi determinado empregando-se a equação da reta obtida pela curva analítica construída com soluções de catequina com diferentes concentrações. A curva analítica foi construída nas mesmas condições da reação em que a amostra foi substituída pela catequina. Os resultados foram expressos como mg de ECAT (equivalentes de catequina) por grama de extrato.

A curva analítica foi realizada a partir do preparo de uma solução inicial de 50 µg mL⁻¹ catequina. Pesou-se cerca de 0,005 g de catequina, transferiu-se a massa para um balão volumétrico de 100 mL e seu volume foi completado com metanol. A partir dessa solução foram feitas diluições para as concentrações de 20, 18, 16, 13, 10, 7, 4 e 2 µg mL⁻¹ e preparou-se uma curva analítica com catequina. Tanto as amostras quanto os padrões da curva de calibração passaram pelo mesmo tratamento. A leitura foi feita contra um branco que foi preparado adicionando 2 mL de metanol a 3 mL de solução de vanilina sulfúrica (Morais *et al.*, 2009).

4.11 Atividade antioxidante e cálculo de CE_{50}

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante dos extratos etanólicos e partições foi realizada monitorando o consumo do radical livre DPPH na presença das amostras em diferentes concentrações, pelo registro do decréscimo da absorbância. Estas medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda 517 nm (Sousa *et al.*, 2007).

4.11.1 Curva analítica do radical DPPH[·]

Primeiramente foi preparado 50 mL de solução estoque de DPPH em metanol na concentração de $50,0 \mu\text{g mL}^{-1}$, mantida sob refrigeração e protegida da luz. Foram feitas diluições de 45, 40, 35, 30, 25, 20 e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$. A curva analítica foi construída a partir dos valores da absorbância a 517 nm de todas as soluções (10 a $50 \mu\text{g mL}^{-1}$), medidas em cubetas de vidro com percurso óptico de 1 cm e tendo como branco o metanol. As medidas de absorvância foram efetuadas em triplicata.

4.11.2 Leitura das absorvâncias das amostras

A atividade antioxidante do extrato é determinada, através do radical livre estável 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH) seguindo o método descrito por Sousa *et al.* (2007).

Inicialmente foram preparadas soluções metanólicas dos extratos e partições na concentração de aproximadamente $800 \mu\text{g mL}^{-1}$ (denominada de solução 100%). A partir da solução 100%, ainda foram feitas cinco diluições (83, 66, 49, 32 e 15%). Para a solução 100% e para cada diluição foi tomada uma amostra de 0,3 mL e adicionado 2,7 mL de solução de DPPH de concentração de $40 \mu\text{g mL}^{-1}$ em metanol. Foram feitos dois controles: controle 1 (0,3 mL de metanol + 2,7 mL de DPPH) e controle 2 (0,3 mL de amostra + 2,7 mL de metanol). Após a adição do DPPH, registrou-se as absorvâncias imediatamente no comprimento de onda de 517 nm durante uma hora, com intervalos de cinco minutos entre cada leitura. A porcentagem de DPPH que reagiu (atividade antioxidante) foi calculada pela expressão:

$$\text{DPPH}_{\text{seq.}}(\%) = \frac{\text{AbvC1} - (\text{AbvA} - \text{AbvC2}) \times 100}{\text{AbvC1}}$$

Onde:

AbvC1 corresponde a absorvância do controle 1 (0,3 mL de metanol + 2,7 mL de DPPH); AbvA corresponde a absorvância da amostra ao final de 60 minutos e AbvC2 corresponde a absorvância do controle 2 (0,3 mL de amostra + 2,7 mL de metanol).

A concentração efetiva (CE_{50}), que representa a concentração de amostra necessária para seqüestrar 50% dos radicais de DPPH, foi calculada plotando-se a porcentagem de DPPH sequestrado versus as concentrações testadas de cada amostra (Sousa *et al.*, 2007).

Os padrões BHT (butil-hidroxi-tolueno) e ácido gálico foram utilizados como controle positivo, tendo seus valores de CE_{50} comparados aos valores das amostras de *C. bakeriana* testadas.

4.12 Extração de óleo essencial por hidrodestilação

Amostras frescas de folhas, casca e madeira de *C. bakeriana* foram coletadas no período da manhã. O processo de extração foi realizado por hidrodestilação utilizando aparelho Clevenger. Cerca de 400,0 g de cada amostra foram picadas e colocadas em um balão de 1 L com 500 mL de água. Após o tempo de 4 horas do material vegetal em ebulição, o óleo que foi arrastado pela água, é recolhido em um funil de separação, com a adição prévia no aparelho Clevenger de 15 mL de diclorometano. O óleo dissolvido no diclorometano é transferido para um béquer que posteriormente é filtrado com sulfato de sódio anidro para retirar a água que pode estar presente na amostra. Em seguida, o filtrado é deixado em temperatura ambiente até a evaporação completa do solvente. O óleo extraído é estocado em frascos de vidro de 10 mL, tampado e armazenado em freezer a -15,0 °C até sua utilização (Morais *et al.*, 2009). O rendimento foi calculado relativo a massa seca da amostra inicial. Os óleos foram submetidos ao teste de atividade antimicrobiana e citotoxicidade, seus constituintes foram separados e identificados por cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas.

4.12.1 Separação e identificação dos compostos voláteis

Os óleos foram analisados por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (CG-MS), modelo CG-17A/QP-5000, Shimadzu, equipado com uma coluna capilar DB-5 de 30 metros. Foi utilizado hélio como gás de arraste com fluxo de 1 mL/min com temperaturas do detector e injetor de 220 °C e 240 °C, respectivamente. O

volume injetado foi de 1 μL com injetor no modo split 1:50. A programação de temperatura foi de 60 – 240 $^{\circ}\text{C}$ a 3 $^{\circ}\text{C min}^{-1}$. O detector de massas com energia de impacto do detector de massas foi de 70 eV, foram captados fragmentos de 40 a 650 u, temperatura da interface de 240 $^{\circ}\text{C}$, temperatura do quadrupolo de 150 $^{\circ}\text{C}$ e temperatura da fonte de íons de 240 $^{\circ}\text{C}$. A concentração relativa dos constituintes dos óleos foi realizada em um aparelho Shimadzu equipado com detector de ionização de chama (CG – FID) sob as mesmas condições empregadas no CG – MS, utilizando $\text{N}_2/\text{Air}/\text{H}_2$ como gás de queima e gás de arraste.

A identificação dos compostos foi realizada por meio das bibliotecas de espectros de massas Willey e índices de Kovat (Adams, 2007). Os índices de retenção foram determinados em relação a uma série de *n*-alcanos (C_8 – C_{32}) nas mesmas condições de operação. Os óleos foram quantificados por CG - FID sob as mesmas condições. A concentração de cada componente correspondeu à área relativa de seu pico no cromatograma.

A identificação de cada um dos componentes dos óleos essenciais foi realizada de acordo com o índice de aritmético em coluna DB-5, tendo como referências os padrões registrados na literatura e pela comparação com as bibliotecas de espectros de massas NIST 27 e 147 e Wiley 7, 139 e 229 (Adams, 2007; Nist, 2013). Os índices aritméticos (IA) foram calculados com base nos padrões de alcanos lineares C_8 – C_{40} utilizando a equação: $\text{IA} (x) = 100 + 100 \text{ Pz} [(t (x) - t (\text{Pz})) / t (\text{Pz} + 1) - t (\text{Pz}))]$, em que x: composto no tempo t, Pz: alcano anterior ao x, e Pz + 1: alcano posterior ao x (Adams, 2007).

4.13 Atividades biológicas

4.13.1 Atividade antimicrobiana

4.13.1.1 Análise biológica das amostras

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.

4.13.1.2 Atividade antimicrobiana dos extratos, partições e frações

A atividade antimicrobiana foi determinada utilizando o método da microdiluição em caldo segundo Carvalho *et al.* (2011), CLSI para os microrganismos aeróbios (CLSI, 2006) e CLSI para os microrganismos anaeróbios (CLSI, 2007).

4.13.1.3 Microrganismos utilizados nos ensaios

Para a determinação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos, partições e frações e óleos essenciais 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), *Enterococcus faecalis* (ATCC 4082), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478), *Agregactbacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43717), *Actinomyces naeslundii*, (ATCC 19039), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Prevotella nigrescens* (ATCC 33533) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) (Quadro 2).

Quadro 2. Microrganismos, procedência, morfotipos e meios de culturas utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana.

Microrganismo/Cepas Padrão ATCC	Morfotipo	Meio de cultura do inóculo	Meio de cultura do teste
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	Coco Gram positivo	TSB Ágar	TSB
<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456	Coco Gram positivo	TSB Ágar	TSB
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Coco Gram positivo	TSB Ágar	TSB
<i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478	Coco Gram positivo	TSB Ágar	TSB
<i>Enterococcus faecalis</i> ATCC 4082	Coco Gram positivo	TSB Ágar	TSB
<i>Agregactbacter actinomycetemcomitans</i> ATCC 43717	Bacilo Gram negativo	TSB Ágar	TSB
<i>Actinomyces 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 33277	Bacilo Gram negativo	Schaedler Ágar	Schaedler

De acordo com os dias em que eram realizadas as análises de atividade antimicrobiana, algum microrganismo pode não ter sido testado ou ter feito uma substituição por outra bactéria. Isso ocorreu pelo fato de que uma determinada bactéria não apresentou crescimento para a realização dos testes naquele dia.

4.13.1.4 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 (BD®) e Ágar Schaedler (BD®) suplementado para bactérias anaeróbias e caldo triptona de soja (TSB) e Ágar sangue para bactérias aeróbias descritas abaixo. O preparo dos meios seguiu as orientações do fabricante.

a) Caldo Schaedler (BD®)

Composição:

Digestão Pancreática de Caseína	8,10g
Digestão Peptídica de Tecido Animal	2,50 g
Digestão Papaínica de farelo de soja	1,00 g
Dextrose	5,82 g
Extrato de Levedura	5,00 g
Cloreto de Sódio	1,70g
Fosfato dipotássico	0,82g
Hemina	0,01g

L-Cystina	0,40g
TRIS (hidroximetil) aminometano	3,00g

Preparação: A 28,4 g do pó foram adicionados 1 L de água destilada. A mistura foi homogeneizada e autoclavada por 15 minutos a 121 °C. Em seguida, foi suplementada com 1 mL de solução de hemina a 5,0 mg mL⁻¹ e 1 mL de solução de menadione a 1,0 mg mL⁻¹.

b) 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: A 30,0 g do pó de TSB foram adicionados 1000 mL de água destilada. A mistura foi homogeneizada e autoclavada por 15 minutos a 121 °C.

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: A 40,0 g do pó foram adicionados 1000 mL de água destilada. A mistura foi homogeneizada com aquecimento até a completa dissolução do pó e autoclavada por 15 minutos a 121 °C. Após o resfriamento da base (45 a 50 °C) foi adicionado 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Cada placa de Petri recebeu 25 mL dessa mistura.

d) 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: A 41,9 g do pó foram adicionados 1 L de água destilada. A mistura foi homogeneizada com aquecimento até a completa dissolução do pó e autoclavada

por 15 minutos a 121 °C. Em seguida, foi suplementada com 1 mL de solução de hemina a 5mg mL⁻¹, 1 mL de solução de menadione a 1mg mL⁻¹ e 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Após a preparação do meio cada placa de Petri recebeu um volume de 30 mL .

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

e) Solução Hemina

Em um balão de 100 mL foi colocado 0,5 g de hemina e acrescentado 10 mL de NaOH a 1,0 mol L⁻¹ em seguida adicionou-se água destilada esterilizada até completar o volume do balão. A solução obtida na concentração final de 5 mg mL⁻¹, foi filtrada em membrana filtrante de 0,22 µm e estocada em frasco esterelizado..

f) Solução Menadione

Em um balão de 100 mL esterilizado foi colocado 0,1 g de menadione e o volume completado com etanol absoluto, obtendo-se uma solução na concentração de 1,0 mg mL⁻¹.

4.13.1.5 Preparo das amostras dos extratos para o método de microdiluição

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

Em seguida, preparou-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 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 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

4.13.1.6 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 % 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 Mc Farland. Esta preparação do inóculo foi realizada para todas as bactérias.

4.13.1.7 Preparação do controle positivo

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 mL de água destilada esterilizada, tendo uma concentração de 0,1 mg mL⁻¹. Após, transferiu 1 mL dessa primeira diluição para um tubo, contendo 4 mL de caldo Schaedler suplementado, essa última diluição de concentração de 0,02 mg mL⁻¹ foi a solução usada para a realização da técnica.

4.13.1.8 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 digluconato de clorexidina variaram de 0,0115 µg mL⁻¹ a 5,9 µg 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.

4.13.1.9 Método da microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima

A determinação de concentração inibitória mínima das soluções dos extratos, partições, frações e óleos essenciais 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.

Avaliaram-se as amostras nas seguintes concentrações: 400,0 a 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e as amostras que evidenciaram CIM de 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram submetidas a uma nova avaliação testando diluições entre 20,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 0,39 $\mu\text{g mL}^{-1}$. 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*, *S. mitis*, *S. sobrinus*, *E. faecalis* e *A. actinomycetemcomitans* 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 49). 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 50). Os microrganismos anaeróbios são incubados por 48 a 72 horas em câmara de anaerobiose a 36 °C (Figura 51). Em seguida, utiliza-se o mesmo revelador (resazurina) para a determinação das concentrações inibitórias mínimas frente aos anaeróbios.

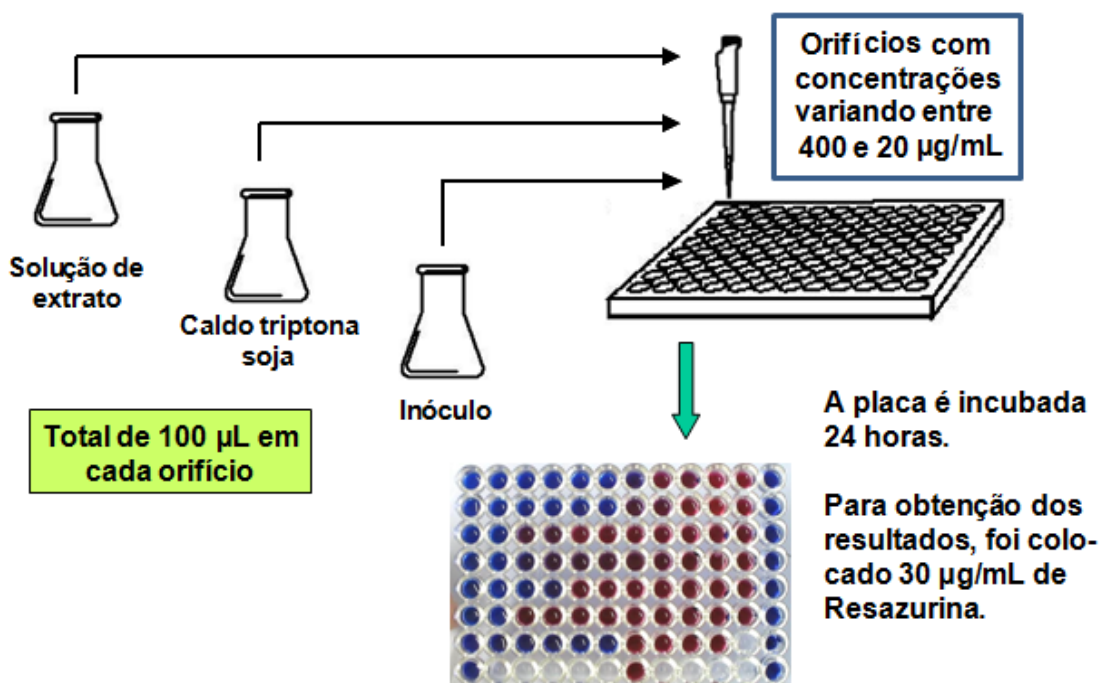


Figura 49. Representação das etapas desenvolvidas para o método de microdiluição para os microrganismos aeróbios (Próprio autor).

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.

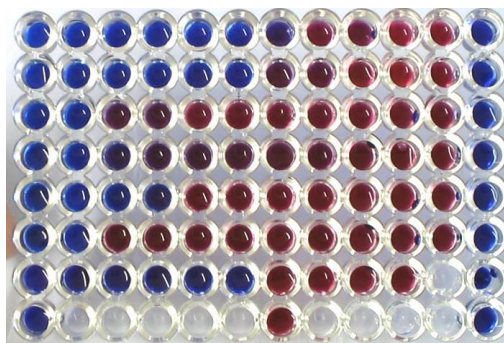


Figura 50. Microplaca com as soluções dos extratos testadas frente a *S. mutans* revelada com resazurina (Próprio autor).



Figura 51. Câmara de anaerobiose para incubação de microrganismos anaeróbios (Próprio autor).

4.13.2 Atividade citotóxica

As análises de citotoxicidade foram realizadas no Laboratório de Tripanosomatídeos – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia pelo professor Ms. Mário Machado Martins e pelo mestrando Fabrício Castro Machado com a colaboração e supervisão do professor Dr. Cláudio Vieira da Silva.

4.13.2.1 Preparo dos meios de cultura

O meio *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina (2 mM), D-glicose (4500 mg L⁻¹), bicarbonato de sódio (2000 mg L⁻¹), HEPES (2380 mg L⁻¹), piruvato de sódio (1100 mg L⁻¹), penicilina (60 mg . L⁻¹), gentamicina (40 mg L⁻¹) e estreptomicina (10 mg . L⁻¹). O caldo *Brain Heart Infusion* (BHI) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. O caldo foi suplementado com 5% de soro fetal bovino (SFB) e L-glutamina (2 mM).

4.13.2.2 Método da microdiluição para a determinação da atividade citotóxica

As amostras dos óleos essenciais e dos extratos foram dissolvidas em metanol, e diluídos com DMEM suplementado, obtendo-se uma solução mãe de concentração 640 µg mL⁻¹. O teste de viabilidade celular foi realizado com a célula Vero ATCC CCL 81 (fibroblastos de rim de macaco verde da África). Para avaliação da citotoxicidade utilizou-se o método de diluição em microplaca. Uma solução contendo 1 x 10⁶ células em 10,0 mL de meio DMEM suplementado foi preparada, em seguida, 100 µL desta solução foi pipetado para cada poço da análise, a placa foi então incubada por 6 horas à 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO₂, ocorrendo a adesão das células no fundo do poço. Depois de aderidas, o meio de cultura de cada poço foi retirado e em seguida adicionou-se soluções das amostras a serem testadas nas concentrações de 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 µg mL⁻¹, partindo-se da solução mãe recém preparada. O volume

final de cada poço foi de 100 μL e a concentração de células presentes em cada poço foi de 1×10^4 células. A concentração final de metanol em cada poço não excedeu 3%. Controle de crescimento, controle negativo (100% de células lisadas), controle do solvente e controle das amostras foram também preparados. Após serem preparadas, as placas foram incubadas por 48 horas à 37°C com atmosfera úmida e 5% de CO_2 . Em seguida, adicionou-se 10 μL de solução reveladora de resazurina a 3mM em PBS em cada poço da placa (Gómez-Barrio *et al.*, 2006), e novamente as placas foram incubadas por 24 horas nas mesmas condições. A leitura da absorvância foi realizada a 590 nm em um espectrofotômetro de microplaca. O ensaio foi realizado em triplicata e a partir das absorvâncias de cada concentração testada, a viabilidade celular foi calculada de acordo com o controle de crescimento (Controle positivo). A concentração citotóxica (CC_{50}) (concentração em que 50% das células estão vivas) foi calculada por meio de um gráfico dose-resposta com regressão não linear (Chibale *et al.*, 2007). A estrutura da placa de 96 poços com as concentrações e os controles está expressa na Figura 52.

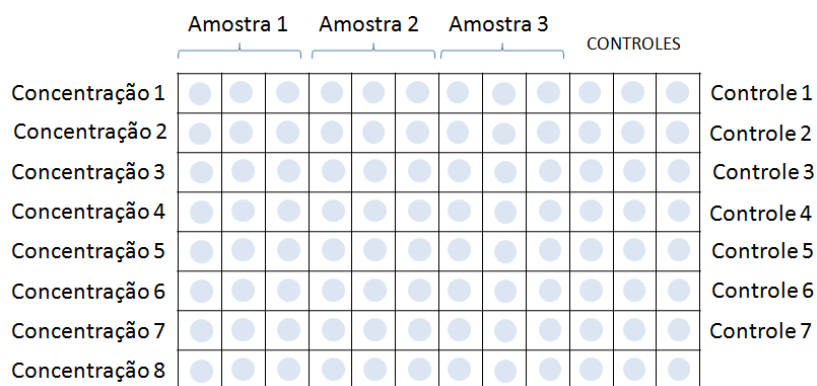


Figura 52. Distribuição das amostras e controles na placa para os testes.

Onde:

Amostras testadas:

- Amostra 1: extrato; Amostra 2: extrato; Amostra 3: extrato

Controles:

- Controle 1: controle positivo (crescimento)
- Controle 2: controle do metanol 3%
- Controle 3: controle negativo (100 % de células lisadas) com 30 μL de solução de Triton X-100 a 0,5% para lise celular
- Controle 4: controle do meio de cultura sem parasita
- Controle 5: controle da amostra 1 sem parasita
- Controle 6: controle da amostra 2 sem parasita
- Controle 7: controle da amostra 3 sem parasita

Concentrações testadas:

Concentração 1: $512 \mu\text{g mL}^{-1}$; Concentração 2: $256 \mu\text{g mL}^{-1}$; Concentração 3: $128 \mu\text{g mL}^{-1}$; Concentração 4: $64 \mu\text{g mL}^{-1}$; Concentração 5: $32 \mu\text{g mL}^{-1}$; Concentração 6: $16 \mu\text{g mL}^{-1}$; Concentração 7: $8 \mu\text{g mL}^{-1}$; Concentração 8: $4 \mu\text{g mL}^{-1}$.

4.14 Procedimentos fitoquímicos

Os procedimentos de separação cromatográfica e isolamento foram realizados com o extrato diclorometano da casca pelo fato de ter sido considerado relevante os

resultados de atividade antimicrobiana frente aos microrganismos bucais aeróbios e anaeróbios avaliados. Diante dessa situação foi proposto um biofracionamento guiado por atividade antimicrobiana do extrato diclorometano, buscando identificar e caracterizar os possíveis compostos biologicamente ativos presentes no extrato.

4.14.1 Reagentes, solventes e equipamentos

As amostras dos extratos e frações foram semi-purificadas e purificadas por cromatografia em coluna, onde foi utilizado como fase estacionária sílica gel 60 G Vetec (70-230 Mesh). O comprimento e diâmetro das colunas e a quantidade de sílica variaram conforme a quantidade de amostra a ser utilizada no procedimento cromatográfico. Foi utilizado também sephadexTM GE Healthcare LH-20 como fase estacionária.

As frações foram monitoradas por cromatografia em camada delgada (CCD), utilizando sílica gel 60G F 254 Vetec (5-40 µm) e sílica Gel 60 G vetec (5-40 µm). A sílica foi ressuspensa em água destilada na proporção de 1:2 e distribuída em placas de vidro por meio de um espalhador mecânico. Utilizou-se também, placas de óxido de alumínio F, neutro para os procedimentos cromatográficos em camada delgada.

Os solventes utilizados nas eluições para cromatografia em coluna e camada delgada e recristalizações foram hexano PA, diclorometano PA, acetato de etila PA, clorofórmio PA e etanol PA e metanol PA (Sinth e Vetec).

Os compostos foram revelados nas placas de sílica e óxido de alumínio por luz UV nos comprimentos de onda 254 nm e 366 nm. As soluções reveladoras utilizadas

foram: Anisaldeído, vanilina sulfúrica, sulfato cérico, solução aquosa de cloreto férrico 10% m/v, solução metanólica de cloreto de alumínio 1% m/v, solução etanólica de hidróxido de potássio a 10% (reagente de Borntrager) e Liebermann-Burchard. Além disso foi utilizado nas revelações vapores de iodo e vapores de amônia (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008; Wagner e Bladt, 2009).

As frações foram concentradas em evaporador rotativo sob pressão reduzida (IKA – RV10Basic) ou à temperatura ambiente em capela de exautão.

Foi adotado como critério de pureza para a substância isolada à obtenção de apenas uma mancha na placa cromatográfica, após a eluição de diferentes sistemas de solventes.

No preparo das amostras, a dissolução das mesmas ocorreu em aparelho ultrassom USC 750 Ultra-Sonic cleaner com banho de água à temperatura ambiente.

Uma das frações mais ativas nos testes de atividade antimicrobiana foi analisada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a um detector de ionização por eletrospray (CL-EM/EM-IES).

Foi isolado um composto que foi submetido à caracterização química por RMN de ^1H , IVTF e espectro de massas. O ponto de fusão também foi determinado.

4.14.2 Cromatografia líquida de alta eficiência com detector de massas

As análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização Molecular – Espectrometria de Massas da Universidade Federal de Ouro Preto com a supervisão do professor Dr. Robson José de Cassia Franco Afonso.

4.14.2.1 Condições utilizadas em cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com detector de ionização por eletrospray (CLAE-DAD-IES/EM)

As análises foram realizadas em um cromatógrafo líquido Shimadzu, equipado com um sistema de distribuição de solventes quaternário de alta pressão (LC-20AD), injetor automático (autosampler) (SIL 20AC), desgaseificador, forno para coluna e detector UV/VIS DAD (arranjo de diodo) modelo SPD-M20A. A separação cromatográfica foi realizada em uma coluna de fase reversa C18 de 50 mm x 2.10 mm de comprimento, 2,6 μm de granulometria, phenomenex mantida a 40 °C em forno. O volume injetado foi de 5 μL com fluxo de 0,13 mL min^{-1} utilizando como fase móvel água acidificada com ácido fórmico (0,1% v/v) (fase móvel A) e metanol (Fase móvel B). A programação do gradiente foi a seguinte: 15-30 % de B (0-5 min); 30-50 % de B (5-10 min), 50-70 % de B (10-15 min); 70-100 % de B (15-30 min); 100 % de B (30-35 min), 100-15 % de B (35-40 min) e 15 % de B (40-43 min). O detector UV/VIS foi programado para monitorar compostos nos comprimentos de onda entre 190 - 800 nm.

A detecção por espectrometria de massas foi realizada utilizando o equipamento Shimadzu LC-IT-TOF com quadrupolo “ion trap” (IT) e “time of flight” (TOF) (analisador de massas por tempo de voo) trabalhando com as seguintes condições: ionização por electrospray em modo negativo e modo positivo, gás nebulizador (N_2): 1,5 L min^{-1} , temperatura de linha de curva de desorção (CDL): 200 °C, gás de secagem: 100kPa, voltagem do detector 1,7 kV, tempo de acumulação do íon: 10 ms. Os cromatogramas TIC foram obtidos com a detecção de íons positivos e negativos com m/z 50–1000 para ambos os modos. O aparelho foi programado para obter automaticamente dados de

espectros de massas nos modos positivo e negativo, e também para selecionar automaticamente e obter o espectro de massas dos íons precursores obtidos (EM/EM).

A fórmula molecular proposta foi selecionada de acordo com uma lista sugerida pelo Software Formula Predictor[®] seguindo a mais baixa diferença entre a massa experimental e a massa teórica e também pela análise da real possibilidade de existência da fórmula, equivalência de ligações dupla, regra do nitrogênio e erro em ppm e mDa.

As sugestões de possíveis estruturas, fragmentos e classe de metabólitos referentes às fórmulas moleculares encontradas foram propostas de acordo com outros trabalhos na Literatura, analisando sistema de solventes, tempos de retenção, espectro ultravioleta (UV) e espectro de massas.

4.14.2.2 Preparação da amostra

A fração analisada foi preparada na concentração de 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$, colocada em ultrassom em banho de água a temperatura ambiente. Em seguida a solução foi filtrada em filtro millipore e uma alíquota de 5 μL foi utilizada para a análise.

4.14.3 Condições da análise de RMN de ^1H

Os espectros de RMN foram registrados num aparelho Brüker DRX400 AVANCE, operado a uma frequência 400,130 MHz, com pulso de 9,5 μs , intervalo entre pulsos de

3,95 s. A amostra foi dissolvida em uma mistura de DMSO e acetona deuterada (1:1v/v).

4.14.4 Fracionamento dos extratos e das frações da casca de *C. bakeriana* com maior atividade antimicrobiana

4.14.4.1 Biofracionamento do extrato clorofórmio da casca (E3) obtido em soxhlet

O fracionamento foi realizado com o extrato clorofórmico da casca obtido em soxhlet pelo fato de ter apresentado maior atividade antimicrobiana comparada aos outros extratos da casca obtidos pelo mesmo processo de extração.

Com esse extrato (0,7 g), foi feita cromatografia clássica em coluna, utilizando-se para isso uma coluna de vidro de 4 cm de diâmetro por 60 cm de altura. Foram utilizados cerca de 50 g de sílica gel do tipo 60H como fase estacionária. O empacotamento foi feito utilizando cicloexano como solvente. A amostra foi previamente submetida à cromatografia em camada delgada e a sequência de solventes seguiu a seguinte ordem crescente de polaridade: cicloexano (300 mL), cicloexano/clorofórmio 1:1 (300 mL), cicloexano/clorofórmio/acetato de etila 1:1:1 (300 mL), acetato de etila (300 mL), acetato de etila/etanol 1:1 (300 mL) e etanol (400 mL). A Tabela 8 apresenta a sequência dos solventes utilizada, o volume empregado e as frações que posteriormente foram avaliadas frente a bactérias bucais pelo método da microdiluição em caldo.

Tabela 8. Sistema de solventes, volume empregado no fracionamento do extrato clorofórmio da casca e frações avaliadas pelo ensaio de atividade antimicrobiana

Solvente Utilizado	Volume Utilizado (mL)	Fração
Cicloexano	300	A1
Cicloex/Clorof 1:1	300	A2
Cicloex/Clorof/AcOEt 1:1:1	300	A3
Acetato de etila 1	300	A4
Acetato de etila 2	300	A5
Acet/Etanol 1:1	300	A6
Etanol	400	A7

4.14.4.2 Biofracionamento da partição diclorometano da casca (Amostra PC2) obtida por extração líquido-líquido

O fracionamento foi realizado com a partição diclorometano da casca por ser o extrato que apresentou maior atividade antimicrobiana comparada aos outros extratos da casca e folhas obtidos por maceração ou extração líquido-líquido.

Com o extrato diclorometano (7,0 g), foi realizada a cromatografia clássica, utilizando-se uma coluna de vidro de 10 cm de diâmetro por 50 cm de altura. Foram utilizados cerca de 175 g de sílica gel do tipo 60H como fase estacionária. A proporção entre amostra e sílica utilizada foi de 1:25. A sílica foi suspensa em hexano e transferida para a coluna. A polaridade do sistema de eluição foi aumentada gradativamente buscando alterações não tão bruscas e uma melhor separação dos compostos, começando com misturas de hexano e diclorometano, passando por

acetato de etila e finalmente com metanol. Previamente foi realizado com a amostra, cromatografia em camada delgada (CCD) para estabelecer os solventes e o esquema de eluição utilizado na coluna. A sequência de solventes utilizada como fase móvel foi: 400 mL (hexano/diclorometano 1:1), 400 mL (hexano/diclorometano 2:3), 400 mL (diclorometano), 2,1 L (diclorometano/acetato 3:2), 400 mL (diclorometano/acetato 1:1), 200 mL (diclorometano/acetato 2:3), 1 L (diclorometano/acetato 1:4), 2,4 L (acetato), 900 mL (acetato/metanol 1:1), 2 L (metanol) e 400 mL (água). Foram coletadas 24 frações. As frações 1-3, 4-5, 9-11, 15-16, 18-20, foram agrupadas após análise comparativa por cromatografia em camada delgada (CCD) utilizando-se diferentes sistemas de eluição e agentes reveladores. Soluções de vanilina sulfúrica, anisaldeído, Liebermann-Burchard, cloreto férrico, cloreto de alumínio, hidróxido de potássio a 10% e sulfato cérico foram utilizadas para a revelação das placas cromatográficas, além de revelação com vapores de iodo e monitoramento em lâmpada UV nos comprimentos de onda 254 nm e 366 nm (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008; Wagner e Bladt, 2009). Após as frações serem reunidas, quinze amostras denominadas F1, F2, F3, F4, F5, F6, F7, F8, F9, F10, F11, F12, F13, F14 e F15 foram obtidas e submetidas à avaliações de atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição em caldo com exceção da amostra denominada F15 obtida com água, que não pôde ser submetida ao teste de atividade antimicrobiana e nem determinada sua massa. Ao deixar em temperatura ambiente para completa evaporação do solvente, ocorreu a proliferação de fungos e por esse motivo foi descartada. Na Tabela 9 estão representadas as frações que foram reunidas por CCD, o sistema de eluição, os respectivos volumes empregados durante o fracionamento por cromatografia em coluna da amostra diclorometano da casca de *C. bakeriana* e as amostras resultantes ao final do procedimento cromatográfico.

Tabela 9. Frações reunidas por CCD, sistema de eluição e volume empregado durante o fracionamento em coluna da amostra diclorometano da casca de *C. bakeriana*

Frações reunidas por CCD	Sistema de Eluição	Volume (mL)	Fração obtida
1-3	Hexano/Diclorometano (1:1 / 2:3)	800	F1
4-5	Diclorometano	400	F2
6	Diclorometano/Acetato de etila (3:2)	350	F3
7	Diclorometano/Acetato de etila (3:2)	350	F4
8	Diclorometano/Acetato de etila (3:2)	350	F5
9-11	Diclorometano/Acetato de etila (3:2)	350	F6
12-13	Diclorometano/Acetato de etila (3:2)	350	F7
14	Diclorometano/Acetato de etila (3:2)	350	F8
15-16	Diclorometano/Acetato de etila (1:1)	400	F9
17	Diclorometano/Acetato de etila (2:3 / 1:4)	600	F10
18-20	Acetato de etila	2400	F11
21	Acetato de etila/metanol (1:1)	900	F12
22	Metanol	1000	F13
23	Metanol	1000	F14
24	Água	400	F15

4.14.4.3 Cromatografia em coluna da fração F11 em sephadex

O fracionamento foi realizado com a amostra F11 pelo fato de ter indicado maior atividade antimicrobiana frente aos microrganismos bucais testados.

Uma massa de 380 mg da fração F11 foi ressuspensa em 5 mL de metanol. A mistura foi colocada em ultrasom durante dois minutos e em seguida filtrada. Da massa total, apenas 208 mg dissolveu nesse volume. A massa dissolvida foi quantificada por diferença de massa entre a massa total (380 mg) e a massa que precipitou (172 mg). O filtrado foi transferido para a coluna e cromatografado em sephadex. Foi utilizada uma

massa de 45 g de sephadex como fase estacionária. Essa massa foi suspensa em metanol e transferida para uma coluna de 5 cm de diâmetro e 50 cm de altura. O solvente utilizado como fase móvel foi exclusivamente o metanol. Foram coletadas 60 frações de 5 mL que foram analisadas comparativamente por cromatografia em camada delgada utilizando como agente revelador solução de cloreto de alumínio com monitoramento em lâmpada UV nos comprimentos de onda 254 nm e 366 nm, permitiu agrupar as frações 1-15, 16-21, 22-33, 34-36, 37-42, 43-47, 48-51 e 52-60 como pode ser observado na Tabela 10. As novas amostras resultantes após o agrupamento frações foram denominadas de F11.1 a F11.8.

Tabela 10. Amostras resultantes da eluição isocrática com metanol em coluna utilizando sephadex da fração F11

Frações reunidas por CCD	Amostras obtidas
1-15	F11.1
16-21	F11.2
22-33	F11.3
34-36	F11.4
37-42	F11.5
43-47	F11.6
48-51	F11.7
52-60	F11.8

As amostras F11.1, F11.2 e F11.3 e a amostra remanescente que não dissolveu em metanol denominada de ANDM (amostra não dissolvida em metanol) foram novamente avaliadas frente às bactérias bucais por apresentar quantidade de massa suficiente para os ensaios antimicrobianos. A fração F11.3 indicou maior atividade antimicrobiana, por esse motivo foi analisada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas e avaliada por CCD utilizando vários solventes e misturas de solventes. Os reveladores utilizados nesta etapa foram: solução de cloreto de alumínio, solução etanólica a 10% de KOH e vapores de amônia com monitoramento em lâmpada UV nos comprimentos de onda 254 nm e 366 nm. As manchas também foram visualizadas em luz UV no comprimento de onda 254 nm sem a presença de agentes reveladores.

4.14.4.4 Cromatografia preparativa da fração F11.3 em sílica gel 60 G e isolamento do composto ácido 1,8-diidroxi-antraquinona-3-carboxílico (ácido cássico ou rhein)

Os procedimentos de isolamento foram realizados com a amostra F11.3 pelo fato de ter indicado menores valores de concentrações inibitórias mínimas frente aos microrganismos bucais avaliados. Primeiramente foi testado a solubilidade da fração F11.3 em vários solventes. Quando foi realizado o teste de solubilidade da fração F11.3 em metanol, parte não solubilizou e quando procedeu o teste de solubilidade em clorofórmio, parte da fração também não solubilizou. Com isso foi decidido realizar uma partição da amostra com clorofórmio e metanol, obtendo-se duas fases: fase clorofórmica (F11.3c) e fase metanólica (F11.3m). A Cromatografia em camada fina das

fases F11.3c e F11.3m eluídas com clorofórmio/metanol (8:2), indicou a presença para ambas amostras de uma mancha com Rf de 0,38. As frações F11.3c e F11.3m foram submetidas à separação cromatográfica preparativa em placas de vidro de 10 cm x 20 cm com sílica gel 60 G. A eluição foi realizada com clorofórmio/metanol (8:2). O composto que apresentou Rf de 0,38 foi retirado das placas com a sílica, extraído com metanol/clorofórmio (1:1) e em seguida, a mistura foi filtrada. O solvente foi removido em evaporador rotativo com pressão reduzida obtendo-se um sólido amarelo. Com esse sólido foram realizadas análises espectroscópicas de infravermelho por transformada de Fourier (IVTF), ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de H^1), ressonância em duas dimensões (HSQC e COSY) e determinação do ponto de fusão.

4.15 Análise estatística

Todos os resultados das análises químicas foram obtidos a partir da média de três repetições com o seu desvio padrão. Para as análises de citotoxicidade os testes foram realizados em triplicata e com a média das absorvâncias foi construído o gráfico para o cálculo da CC_{50} . Com relação aos testes de atividade antimicrobiana, as amostras foram avaliadas em triplicata, entretanto foi dado apenas um valor como resultado.

5. Resultados e discussão

5.1 Análise química dos componentes macromoleculares da madeira e casca

5.1.1 Determinação do teor de umidade

O teor de umidade encontrado na amostra de madeira e da casca de *C. bakeriana* está apresentado na Tabela 11.

Tabela 11. Teor de umidade nas amostras de madeira e casca

Amostra	Teor de umidade (%)
Madeira	10,4% $\pm$ 0,3
Casca	8,1 $\pm$ 0,2

Uma vez encontrado estes valores, passou-se a considerá-lo nos cálculos referentes à composição geral da madeira e casca.

5.1.2 Rendimento dos extrativos obtidos em soxhlet para a madeira e casca de *C. bakeriana*

A extração para a obtenção da madeira e casca livre de extrativos foi realizada em soxhlet. Embora o calor nem sempre possa ser empregado pelo fato de que muitos metabólitos são termossensíveis, a utilização de solventes em alta temperatura provoca

um aumento de solubilidade da maioria das substâncias, motivo pelo qual os métodos de extração a quente, são sempre mais rápidos que aqueles realizados em temperatura ambiente. A Tabela 12 apresenta os rendimentos das extrações em cada solvente empregado.

Tabela 12. Rendimento das extrações para madeira e casca de *C. bakeriana*

Solventes	Casca	Madeira
Cicloexano	2,34 ± 0,87	0,0875 ± 0,006
Cicloexano: etanol (2:1)	5,31 ± 0,33	1,61 ± 0,17
Clorofórmio	0,65 ± 0,19	0,36 ± 0,08
Água	12,98 ± 1,28	11,74 ± 0,42
Solução de NaOH 1%	32,60 ± 1,21	---
Total de extrativos	53,88 ± 4,5	13,79 ± 2,0

De acordo com os resultados encontrados, as cascas apresentaram maior teor de extrativos que a madeira, 53,88 % para a casca do peso seco e 13,79 % para a madeira do peso seco. Segundo Rowell (2005), as cascas geralmente apresentam maior teor de extrativos. Estudos recentes com casca e madeira das espécies arbóreas *Maclura tinctoria* (Lamounier *et al.*, 2012) e *Kielmeyera coriacea* (Martins, 2012) confirmaram resultados semelhantes, 10,8 % para madeira e 50,6 % para a casca e 5 % para a madeira e 45 % para a casca, respectivamente. É possível sugerir que grande parte dos grupos de compostos presentes na madeira e casca de *C. bakeriana* são polares, uma vez que as extrações com água apresentaram maior teor de extrativos. Os extrativos obtidos com água quente e solução aquosa de NaOH 1 % representaram 84,6 % do total de extrativos da casca e a extração com água quente representou 85 % do total de extrativos da madeira. O teor de extrativos encontrado para a casca de *C.*

bakeriana está dentro do esperado para folhosas (41 – 58%) segundo os estudos de Kofujita *et al.* (1999), Lamounier *et al.* (2012) e Martins, (2012).

O teor de extrativos encontrado para a madeira foi de 13,79 %. É um valor alto para madeiras de folhosas se compararmos o sugerido por Klock *et al.* (2005), embora em estudos anteriores é colocado que a porcentagem de extrativos em algumas espécies de madeira pode variar entre 2 – 20 % (Foelkel, 2005). As madeiras de árvores tropicais possuem amplos diâmetros, elevada durabilidade, resistência a deterioração e são usadas em diferentes processos industriais (Kilic e Niemz, 2012). A resistência da madeira a biodegradação pode ser atribuída principalmente ao teor e a composição dos extrativos. A presença de certas substâncias como tanino e outros compostos fenólicos ajudam na preservação da madeira, principalmente diante de organismos xilófagos (Findlay, 1985; Paes, 2002). Além dos extrativos, a porcentagem de celulose, a composição das hemiceluloses, o tipo de lignina e a associação destes componentes influenciam certas características da madeira como resistência à tração e compressão e também pode contribuir como mecanismo de defesa ao ataque de insetos e patógenos (Fengel e Wegener, 1989).

5.1.3 Composição macromolecular para a madeira e casca de *C. bakeriana*

A análise utilizada para a determinação dos componentes macromoleculares da madeira e casca de *C. bakeriana* foi a chamada análise somativa. Esta análise tem como objetivo separar e quantificar os componentes macromoleculares individualmente.

Uma análise satisfatória é a soma de aproximadamente 100% para todos os componentes determinados. Este objetivo é difícil de ser conseguido, especialmente se o número de análises individuais aumenta. Pode ocorrer sobreposição de resultados combinados a erros individuais (Klock *et al.*, 2005). Na literatura são encontrados trabalhos que indicam valores de rendimento de análises somativas entre 98 % e 107 % (Lamounier *et al.*, 2012; Martins, 2012; Moraes *et al.*, 2005; Fengel e Wegener, 1989).

A Tabela 13 indica os valores de extrativos, holocelulose, lignina e cinzas encontrados para a madeira e casca de *C. bakeriana*.

Tabela 13. Composição química da madeira e casca de *C. bakeriana*

Componentes químicos		Madeira	Casca
Extrativos (%)	Cicloexano	0,087 ± 0,006	2,34 ± 0,87
	Cicloexano/etanol (2:1 v/v)	1,61 ± 0,17	5,31 ± 0,33
	Clorofórmio	0,36 ± 0,08	0,65 ± 0,19
	Água	11,74 ± 0,42	12,98 ± 1,28
	Solução NaOH 1 %	---	32,60 ± 1,21
	Total	13,79 ± 2,0	53,88 ± 4,5
Composição macromolecular (%)	Total de extrativos	13,79 ± 2,0	53,88 ± 4,5
	Lignina insolúvel em ácido (Lignina de Klason)	21,0 ± 0,47	15,06 ± 0,36
	Lignina solúvel em ácido	0,76 ± 0,15	0,61 ± 0,07
	Holocelulose	67,41 ± 1,52	27,41 ± 0,79
	α-celulose	35,35 ± 0,32	20,32 ± 0,20
	Hemiceluloses	32,06 ± 0,28	7,1 ± 0,68
	Cinzas	2,08 ± 0,72	4,87 ± 0,27
	Total	105,03	101,8

n.e: não encontrado

Os valores totais dos constituintes da madeira e casca foram 105,03 % e 101,8 %, respectivamente. Embora os resultados encontrados estão acima de 100 %, são valores aceitáveis para análises de madeira e casca de árvores. Essa discrepância é considerada normal e reflete a dificuldade de análises realizadas com materiais de madeiras e cascas. Na determinação da lignina de Klason e holocelulose, os extrativos podem provocar erros, pois durante os procedimentos pode ocorrer a formação de produtos insolúveis que são contabilizados como lignina e holocelulose. (Browning, 1967; Moraes *et al.*, 2005, Klock *et al.*, 2005).

Poucos trabalhos são encontrados na literatura com relação à composição macromolecular de cascas de árvores quando comparado a análises de madeira, sendo notória a variação dos constituintes macromoleculares de casca dentro de uma mesma espécie de árvore e entre espécies diferentes (Kofujita *et al.*, 1999; Vieira *et al.*, 2009, Lamounier *et al.*, 2012; Martins, 2012). No estudo de Vieira *et al.* (2009) com a espécie de folhosa *Tabebuia pentaphyla* coletada em quatro diferentes bairros da cidade do Rio de Janeiro foi analisado os teores de holocelulose e lignina de Klason. A mesma espécie apresentou diferentes porcentagens com relação a esses componentes. Uma variação entre 29 % - 42 % para lignina e 31 % - 42 % para holocelulose foi encontrada.

A comparação da composição química da casca de *C. bakeriana* com a casca de outras espécies está apresentada na Tabela 14.

Tabela 14. Composição macromolecular média da casca de *C. bakeriana* e da casca de outras espécies de árvores

Constituintes (%)	<i>C. bakeriana</i>	<i>MacLura tinctoria</i> (Lamounier et al., 2012)	<i>Pinus densiflora</i> (Kojujita et al., 1999)	<i>Larix leptolepis</i> (Kojujita et al., 1999)	<i>Cryptomeria japonica</i> (Kojujita et al., 1999)	<i>Fagus crenata</i> (Kojujita et al., 1999)	<i>Quercus mongolica</i> (Kojujita et al., 1999)	<i>Tabeuia pentaphylla</i> (Vieira et al., 2009)
Extrativos	53,88	50,6	58,0	57,0	49,0	41,4	47,6	---
Lignina de Klason	15,06	18,8	23,8	23,4	27,1	31,4	22,4	29-42
Lignina solúvel em ácido	0,6	0,4	1,1	0,8	1,1	3,2	2,5	---
Holocelulose	27,41	29,1	14,6	16,5	20,6	15,3	20,7	31-42
α-celulose	20,32	21,2	---	---	---	---	---	---
Hemiceluloses	7,1	8,7	---	---	---	---	---	---
Cinzas	4,87	---	2,2	1,2	2,3	7,3	5,7	---
Total	101,8	99,0	99,7	98,9	100,4	98,6	98,9	---

(---) não foi determinado no estudo.

Os dados obtidos para a casca foram comparados com os estudos de Kofujita et al. (1999); Vieira et al. (2009) e Lamounier et al. (2012).

Os resultados encontrados de extrativos, lignina de Klason, lignina solúvel em ácido, holocelulose e cinzas foram respectivamente 53,88 %, 15,06 %, 0,61 %, 27,41 % e 4,87 %. Os rendimentos encontrados para a casca de *C. bakeriana* estiveram entre outros valores encontrados na literatura para casca de árvores de folhosas, exceto para o teor de lignina que esteve abaixo do esperado (15,0 %).

O teor total de lignina encontrado na casca foi de 15,66 %, valor mais baixo que o encontrado para a madeira 21,76 %. Geralmente os teores de lignina na casca são inferiores aos teores de lignina em madeira de uma mesma árvore (Foelkel, 2005). A

casca de *C. bakeriana* pode ser considerada uma fonte alternativa de fibras pelo fato de ter apresentado 20,32 % de α -celulose do peso seco total.

É possível sugerir que a casca de *C. bakeriana* pode ser utilizada como fonte alternativa de matéria-prima fibrosa, como combustível e como fonte de valiosos metabólitos secundários devido ao seu alto teor de extrativos. A Tabela 15 apresenta a composição dos constituintes macromoleculares da madeira de *C. bakeriana* e da madeira de outras espécies de árvores.

Tabela 15. Composição macromolecular média da madeira de *C. bakeriana* e da madeira de outras espécies de árvores

Constituintes (%)	<i>C. bakeriana</i>	<i>Maclura tinctoria</i> (Lamounier et al, 2012)	<i>Kielmeyera coriacea</i> (Martins, 2012)	<i>Tabebuia pentaphylla</i> (Vieira et al., 2009)	<i>Acacia mangium</i> (Pinto et al., 2005)	<i>Astronium urundeuva</i> (Morais et al., 1999)	<i>Eucalyptus citriodora</i> (Severo et al., 2006)	<i>Cecropia adenopus</i> (Londe, 2004)	<i>Moquinia polimorpha</i> (Morais et al., 2005)	<i>Cedrela fissilis</i> (Morais et al., 2003)	<i>Pinus oocarpa</i> (Lima et al., 2007)	<i>Eucalyptus urophylla</i> (Fengel e Wegener, 1989)
Extrativos totais	13,79	10,79	5,0	---	9,83	18,2	5-10	3,86	11,0	10,7	11,7	6,4
Lignina de Klason	21,0	21,47	28,0	31-40	27,1	23,8	20-21	25,0	21,3	28,6	22,4	27,7
Lignina solúvel em ácido	0,76	1,28	n.e	---	0,54	---	---	---	---	---	---	---
Holocelulose	67,4	69,4	71,7	41-50	70,9	63,0	69-75	71,9	61,1	64,6	71,4	71,9
α-celulose	35,35	46,0	---	---	46,5	34,86	---	59,2	44,9	47,7	52,4	44,9
Hemiceluloses	32,06	23,6	---	---	---	18,8	---	12,7	22,5	16,6	18,8	26,6
Cinzas	2,08	---	0,7	---	0,22	---	---	0,3	---	---	---	---
Total	105,03	102,9	99,7	---	98,9	105,0	---	101,1	98,1	103,3	105,5	106,0

(n.e) não encontrado; (---) não foi determinado no estudo.

O conteúdo de extrativos determinado na madeira de *C. bakeriana* foi mais alto comparado com o de outras madeiras. Quando foi realizada a extração sequencial com

os solventes, o conteúdo mais alto de extrativos foi obtido com água, representando 85 % do total dos extrativos. O alto teor de extrativos na madeira de *C. bakeriana* pode ser um ponto negativo se for utilizada como fonte de fibras, uma vez que os extrativos aumentam os gastos com agentes químicos durante o processo de polpação e branqueamento, além disso, pode levar a formação de depósitos no maquinário do moinho, requerendo altos custos de manutenção no processo de produção de polpa e papel, diminuição da taxa de deslignificação e diminuição do rendimento e da qualidade da pasta celulósica (Foelkel, 2005). Já para utilizações da madeira em estruturas ou aplicações exteriores, um teor elevado de extrativos pode ter vantagens, pois contribui para o aumento da durabilidade da madeira.

O teor de lignina total encontrado na madeira de *C. bakeriana* foi de 21,76 %, valor esperado para a madeira de folhosas (madeiras duras), cerca de 18 a 25 % (Klock *et al.*, 2005; Foelkel, 2005, Rowell, 2005), valor baixo comparado aos das espécies *Cedrela fissilis*, *Eucalyptus urophylla*, *Acacia mangium*, *Tabebuia pentaphylla* e *Kielmeyera coriacea*, mas próximo ao das espécies *Maclura tinctoria* e *Astronium urundeuva*, que são reconhecidamente classificadas como madeiras duras por aspectos botânicos.

A fração total de polissacarídeos na madeira de *C. bakeriana* compreende 67.0 % do peso seco da madeira livre de extrativos, sendo 35% de α -celulose e 32 % de hemiceluloses. O teor obtido de holocelulose para *C. bakeriana* esteve entre os valores determinados para outras espécies de madeira. Entretanto, o teor de α -celulose (35.0 %) foi mais baixo quando comparado com as outras madeiras, exceto *Astronium urundeuva* que foi ligeiramente maior. Algumas espécies se destacam pelos seus altos conteúdos de α -celulose, como por exemplo, *Pinus oocarpa* (conífera) (Lima *et al.*,

2007) e espécies de *Eucalyptus* (Botelho *et al.*, 2000). Essas espécies pelo alto potencial de produção de celulose vêm sendo largamente utilizadas no Brasil para a produção de papel (Morais *et al.*, 2005). Em outro estudo, seis espécies de madeira (*Sonneratia apetala*, *Excoecaria agallocha*, *Avicennia alba*, *Heritiera fomes*, *Xylocarpous mekongests* e *Bruguiera gymnorhiza*) também apresentaram baixos valores de α -celulose, entre 30 e 38 % (Mun *et al.*, 2011).

O valor médio de cinzas 2,08 % encontrado na madeira de *C. bakeriana* indica que esta possui um teor de compostos inorgânicos mais elevados quando comparado com o de outras madeiras.

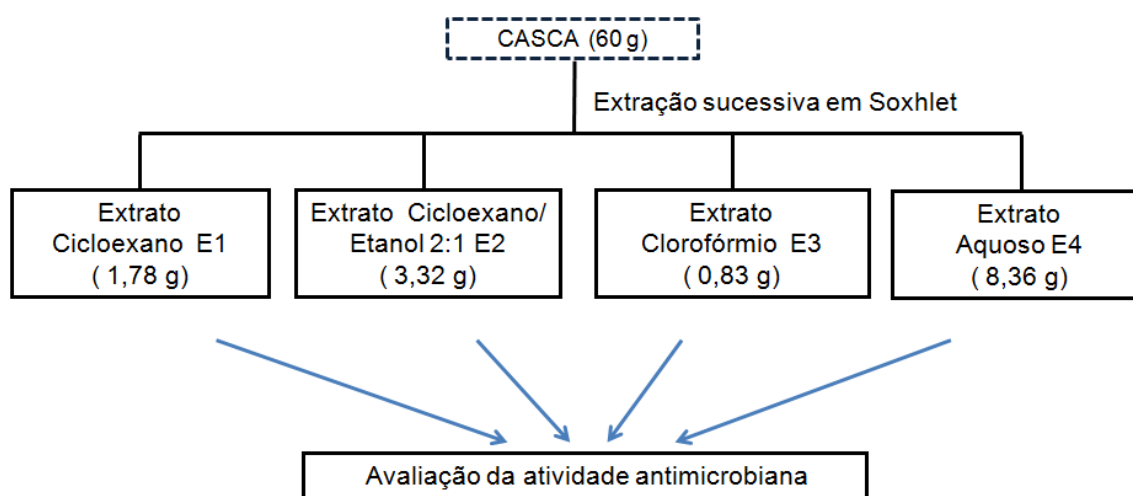
Quando se observa as Tabelas 14 e 15 verifica-se que a composição da madeira, assim como da casca não apresentam composições químicas definidas. Isso pelo fato dos componentes macromoleculares variarem nas diferentes partes da árvore, com a idade, tipo de lenho e com as condições ambientais de crescimento (Silva, 2010).

5.2 Obtenção dos extratos brutos da madeira, casca e folhas de *C. bakeriana*

5.2.1 Obtenção dos extratos brutos da casca de *C. bakeriana* a partir da extração em soxhlet

A extração em soxhlet e as massas de cada extrato obtido estão representadas no Fluxograma 2. Essa extração foi realizada em triplicata. Portanto, a massa total de

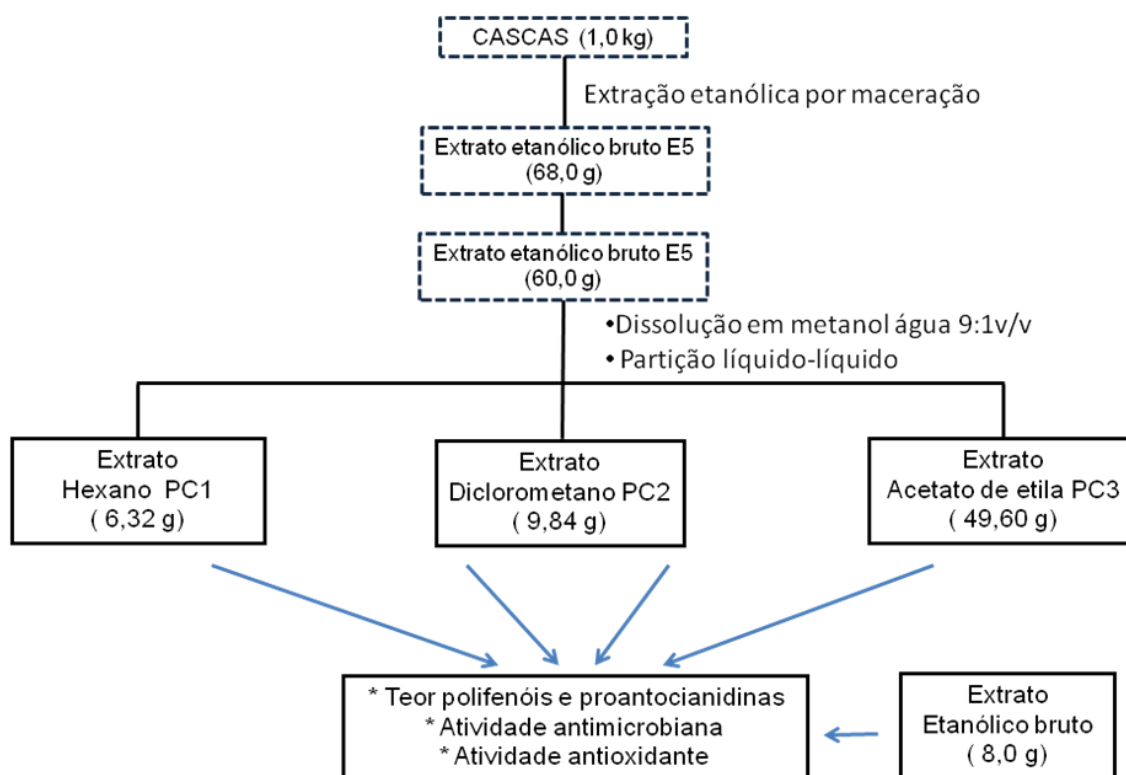
casca extraída foi de 60,0 g. As soluções para cada sistema de solvente foram agrupadas gerando um único extrato bruto.



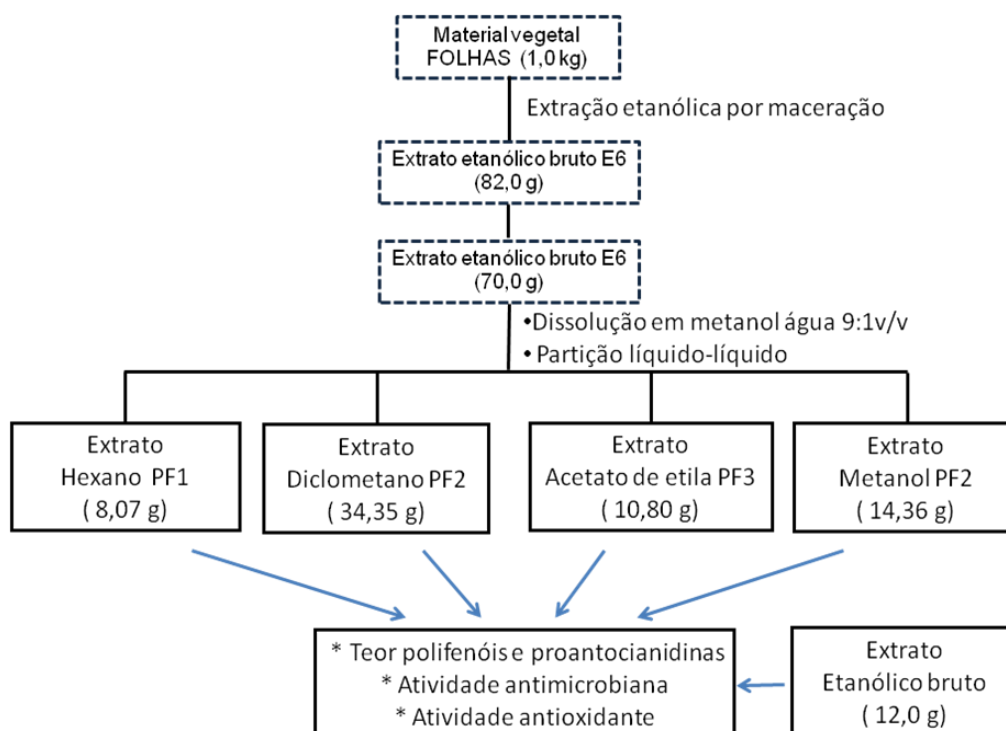
Fluxograma 2. Extração em soxhlet da casca e as massas obtidas para cada solvente.

5.2.2 Obtenção dos extratos etanólicos brutos da casca e folhas de *C. bakeriana* e extratos obtidos por partição líquido-líquido

A extração etanólica por maceração, obtenção das partições e as massas de cada extrato obtidas da casca e folhas estão representadas nos Fluxograma 3 e Fluxograma 4, respectivamente. A partir dos extratos etanólicos brutos obtidos e das partições foram realizadas análises de polifenóis, proantocianidinas e atividades antimicrobiana e antioxidante.



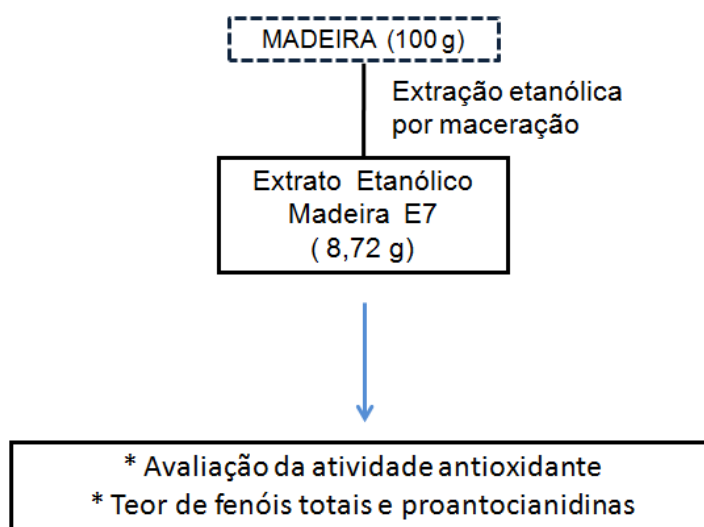
Fluxograma 3. Extração etanólica e partição líquido-líquido da casca de *C. bakeriana*.



Fluxograma 4. Extração etanólica e partição líquido-líquido das folhas de *C. bakeriana*.

5.2.3 Extração etanólica da madeira por maceração

No Fluxograma 5 está representada a obtenção do extrato etanólico bruto da madeira de *C. bakeriana* que posteriormente foi utilizado para a determinação da atividade antioxidante, teor de fenóis totais e proantocianidinas.



Fluxograma 5. Obtenção do extrato etanólico da madeira.

5.3 Determinação do teor de fenóis totais, proantocianidinas e atividade antioxidante

5.3.1 Amostras avaliadas

As amostras que foram submetidas à determinação de fenóis totais pelo método Folin Ciocalteau, proantocianidinas método da vanilina e atividade antioxidante pelo de seqüestro do radical livre DPPH estão apresentadas no Quadro 3.

Quadro 3. Amostras de *C. bakeriana* avaliadas.

Parte do vegetal	Nome da amostra	Tipo de extração
CASCA	E5 – Extrato etanólico	Maceração
	PC1 – Partição hexano	Partição liq-líq
	PC2 – Partição diclorometano	Partição liq-líq
	PC3 – Partição Acetato de etila	Partição liq-líq
FOLHAS	E6 – Extrato etanólico	Maceração
	PF1 – Partição hexano	Partição liq-líq
	PF2 – Partição diclorometano	Partição liq-líq
	PF3 – Partição Acetato de etila	Partição liq-líq
	PF4 – Partição metanólica	Partição liq-líq
MADEIRA	E7 – Extrato etanólico	Maceração

5.3.2 Teor de fenóis totais dos extratos etanólicos da casca, madeira e folhas e teor de fenóis totais das partições das folhas e casca de *C. bakeriana*

O reagente de Folin–Ciocalteu contém uma mistura dos ácidos fosfomolibídico ($\text{H}_3\text{PMo}_{12}\text{O}_{40}$) e fosfotungstíco ($\text{H}_3\text{PW}_{12}\text{O}_{40}$) formando uma solução de coloração amarela com absorção máxima em 760 nm. Em meio básico, ocorre a desprotonação dos compostos fenólicos, gerando ânions fenolatos. Em seguida, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion gerado e o reagente de Folin, no qual os ácidos fosfomolibídico e fosfotungstíco sofrem redução, ocasionando a mudança de cor do meio reacional de amarela para azul e o composto fenólico é oxidado, como pode ser observado na Figura 53 (Oliveira *et al.*, 2009; Messerschmidt *et al.*, 2011).

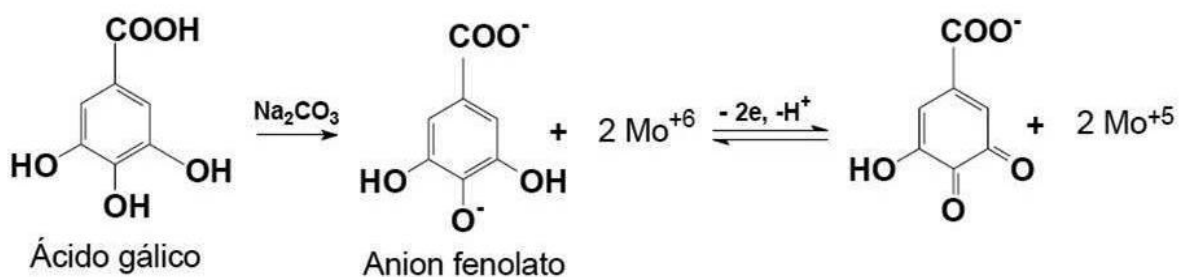
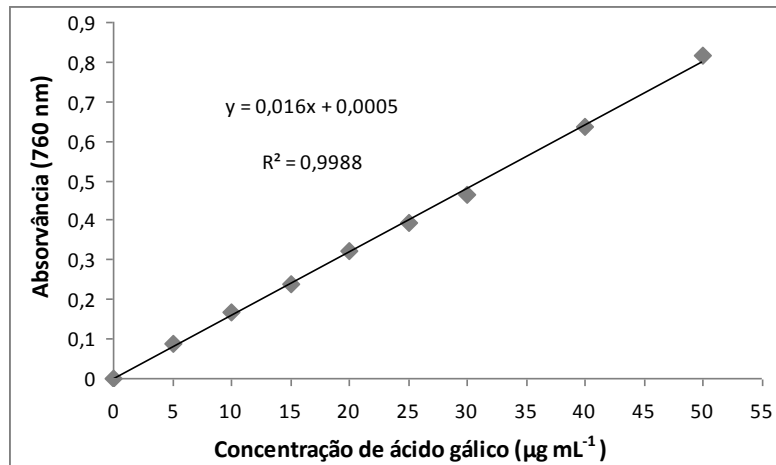


Figura 53. Reação típica do ácido gálico com o íon molibdênio presente no reagente de Folin–Ciocalteu (Oliveira *et al.*, 2009).

A partir da determinação das absorvâncias obtidas para as amostras de concentrações conhecidas de ácido gálico, foi traçado uma curva analítica, apresentada no Gráfico 1.

Gráfico 1. Curva analítica para a determinação do teor de fenóis totais.



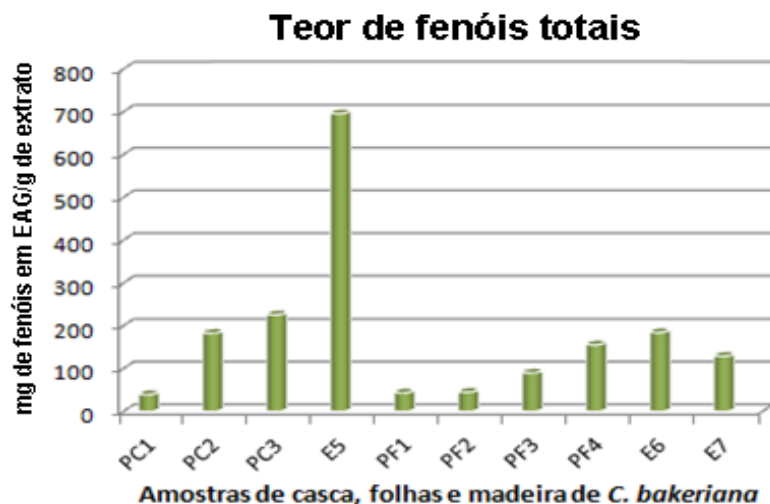
A partir dos valores de absorvância medidos das amostras em 760 nm e empregando-se a equação da reta obtida pela curva analítica do ácido gálico, foram obtidos os teores de fenóis totais, expressos em miligramas equivalentes de ácido

gálico (EAG) por grama de extrato (mg EAG / grama de extrato), mostrados na Tabela 16.

Tabela 16. Teor de fenóis totais (expresso em mg EAG / grama de amostra) nos extratos e partições de *C. bakeriana*

Amostras de <i>C. bakeriana</i>			(mg EAG/grama de extrato)
Casca	E5	Extrato etanólico	696,5 ± 0,9
	PC1	Partição hexano	39,81 ± 2,0
	PC2	Partição diclorometano	183,45 ± 2,0
	PC3	Partição Acetato de etila	226,27 ± 2,0
Folha	E6	Extrato etanólico	184,82 ± 2,0
	PF1	Partição hexano	43,77 ± 0,7
	PF2	Partição diclorometano	45,64 ± 2,0
	PF3	Partição Acetato de etila	90,67 ± 1,0
	PF4	Partição metanólica	106,35 ± 0,7
Madeira	E7	Extrato etanólico	129,42 ± 1,0

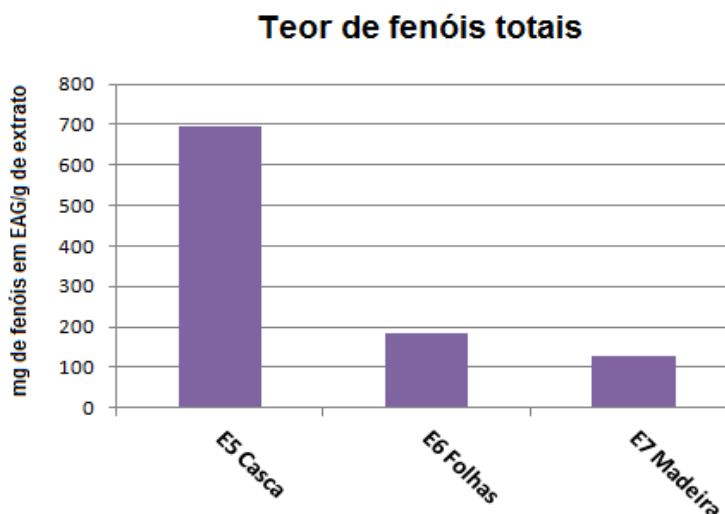
Os mesmos resultados estão representados no Gráfico 2 em forma de barras. Os maiores teores de fenóis foram encontrados no extrato etanólico da casca e partição acetato de etila da casca, 696,5 e 226,27 mg EAG / grama de extrato, respectivamente. Em seguida, os valores mais altos encontrados foram os da partição diclorometano da casca e extrato etanólico das folhas com valores muito próximos 183,45 e 184,82 mg EAG / grama de extrato.

Gráfico 2. Fenóis totais dos extratos de *C. bakeriana*.

Os extratos hexânicos da casca (PC1) e folhas (PF1) apresentaram menor conteúdo de fenóis totais comparado aos outros extratos, como pode ser observado no Gráfico 2. Resultados semelhantes foram encontrados por Martins, (2012) onde as partições cicloexânicas das cascas externa e interna de *Kielmeyera coriacea* apresentaram os mais baixos teores de fenóis totais. Os compostos fenólicos apresentam grupos hidroxila na sua estrutura, conferindo caráter polar. Por esse motivo possuem menor afinidade por solventes apolares como hexano e cicloexano e maior afinidade por solventes mais polares como metanol e etanol. Para as partições tanto da casca quanto das folhas houve uma correlação positiva entre o aumento da polaridade do solvente e o teor de fenóis totais.

No Gráfico 3 está representada uma comparação do teor de fenóis totais entre os extratos etanólicos da casca, folhas e madeira de *C. bakeriana*.

Gráfico 3. Teor de fenóis totais dos extratos etanólicos da casca, folhas e madeira de *C. bakeriana*.



Verificou-se maior conteúdo de fenóis pelo método Folin-Ciocalteu no extrato etanólico da casca (696,5 mg EAG/grama de extrato) em relação a madeira e folhas de *C. bakeriana*. O teor de fenóis em mg EAG/ grama de extrato encontrado na casca é 5,4 vezes maior que o encontrado na madeira e 3,77 vezes o encontrado nas folhas. O estudo com a casca da espécie arbórea *Kielmeyera coriacea* apresentou valores de 346,0 e 77,0 mg EAG/grama de extrato para os extratos etanólicos da casca interna e externa (Martins, 2012). Os extratos etanólicos das cascas de *Eucalyptus globulus* e *Castanea sativa* indicaram 119,0 e 266,0 mg EAG/grama de extrato, respectivamente (Vázquez *et al.*, 2008); extrato hidroalcólico da casca de *Trichilia catigua* indicou 486,0 mg EAG/grama de extrato (Brighente *et al.*, 2007); extrato etanólico da casca da espécie de conífera *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana* com 50,8 mg EAG/grama de extrato (Marimuthu *et al.*, 2008), conteúdos de fenóis mais baixos do que o encontrado para a casca de *C. bakeriana*. O valor 696,5 mg EAG/grama de extrato da casca de *C. bakeriana* equivale a 57,1 mg EAG/grama de casca. Comparando com a casca da

espécie *Maclura tinctoria* que apresentou um total de fenóis de 35,0 mg EAG/grama de casca com extração metanol/água 4:1v/v e 43,2 mg EAG/grama de casca com extração acetona/água 7:3 v/v (Lamounier *et al.*, 2012), o conteúdo de fenóis na casca de *C. bakeriana* foi mais alto.

O teor de fenóis encontrado no extrato etanólico da madeira de *C. bakeriana* (129,4 mg EAG/grama de extrato) equivale a 11,2 mg EAG/grama de madeira. É um conteúdo mais baixo do que o encontrado nas madeiras de outras espécies, como no extrato metanol:água (4:1v/v) de *Maclura tinctoria* (Lamounier *et al.*, 2012), extrato metanol:água (8:2v/v) e acetona:água (7:3v/v) de *Astronium urundeuva* conhecida como aroeira preta (Queiroz *et al.*, 2001), extrato metanol/água de *Eucalyptus grandis* (Morais *et al.*, 1991) e mais alto que os extratos metanol/água e acetona/água de *Moquinia polymorpha* conhecida como candeia (Lima *et al.*, 2007). O valor de fenóis totais para a madeira de *C. bakeriana* esteve entre os valores encontrados para as madeiras de *Eucalyptus camaldulensis*, *Eucalyptus globulus* e *Eucalyptus rudis* (Conde *et al.*, 1996).

As folhas de *C. bakeriana* indicaram ser fonte de compostos fenólicos com um teor de 184,82 mg EAG/grama de extrato etanólico. Valor mais alto do que de outros extratos de folhas utilizando o mesmo solvente como de *Campomanesia pubescens* foi de 115 mg EAG/grama de extrato (Chang *et al.*, 2011), *Baccharis platypoda* (149,13 mg g⁻¹) (Brighente *et al.*, 2007) e mais baixo que *Kielmeyera coriacea* (309,0 mg g⁻¹) (Martins, 2012) e *Baccharis illinita* (351,0 mg g⁻¹) (Brighente *et al.*, 2007). As Tabelas 17 e 18 apresentam uma comparação entre os teores de fenóis totais encontrados para a madeira e casca de *C. bakeriana* com outras espécies de vegetais.

Tabela 17. Teor de fenóis totais na casca de *C. bakeriana* e de outras cascas de árvores

Amostras de cascas		(mg EAG/grama de extrato)
---	<i>Cassia bakeriana</i>	696,5 (etanol)
(Martins, 2012)	<i>Kielmeyera coriacea</i>	346,0 (etanol)
(Vázquez <i>et al.</i> , 2008)	<i>Eucalyptus globulus</i>	119,0 (etanol)
(Vázquez <i>et al.</i> , 2008)	<i>Castanea sativa</i>	266,0 (etanol)
(Brighente <i>et al.</i> , 2007)	<i>Trichilia catigua</i>	486,0 (etanol/água)
(Marimuthu <i>et al.</i> , 2008)	<i>Chamaecyparous obtusa</i>	50,8 (etanol)
		(mg EAG/grama de casca)
---	<i>Cassia bakeriana</i>	57,1 (etanol)
(Lamounier <i>et al.</i> , 2012)	<i>Maclura tinctoria</i>	35,0 (m/ág) e 43,2 (acet/ág)
(Queiroz <i>et al.</i> , 2001)	<i>Astronium urundeuva</i>	43,8 (acet/ág) e 37,7 (m/ág)

(m/ág): metanol/água; (acet/ág): acetona/água.

Tabela 18. Teor de fenóis totais na madeira de *C. bakeriana* e de outras madeiras

Amostras de madeiras		(mg EAG/grama de extrato)
---	<i>Cassia bakeriana</i>	129,4 (etanol)
(Martins, 2012)	<i>Kielmeyera coriacea</i>	130,0 (etanol)
		(mg EAG/grama de madeira)
---	<i>Cassia bakeriana</i>	11,2 (etanol)
(Lamounier <i>et al.</i> , 2012)	<i>Maclura tinctoria</i>	38,4 (m/ág) e 45,3 (acet/ág)
(Queiroz <i>et al.</i> , 2001)	<i>Astronium urundeuva</i>	43,8 (acet/ág) e 37,7 (m/ág)
(Lima <i>et al.</i> , 2007)	<i>Moquinia polymorpha</i>	0,93 (m/ág) e 1,56 (acet/ág)

(m/ág): metanol/água; (acet/ág): acetona/água.

Devido ao alto teor de compostos fenólicos na casca de *C. bakeriana* é possível sugerir que a casca pode oferecer resistência e proteger a madeira contra a biodegradação (Klock *et al.*, 2005).

É difícil a comparação entre os teores de fenóis totais encontrados nos vegetais, uma vez que, além das diferenças ambientais que cada espécie se encontra, os diferentes sistemas de solventes utilizados durante as extrações, influenciam na quantificação dos compostos fenólicos (Vázquez *et al.*, 2008).

A presença de fenóis totais pelo método Folin-Ciocalteu presentes nos extratos da casca, madeira e folhas sugere a existência de substâncias com atividade antioxidante, uma vez que os compostos fenólicos presentes em vegetais têm recebido considerável atenção por serem os principais componentes com atividade antioxidante, embora não sejam os únicos (Lima *et al.*, 2006).

5.3.3 Determinação de proantocianidinas pelo método da vanilina sulfúrica

As proantocianidinas são estruturas fenólicas complexas. Estão presentes na maioria das cascas e em algumas madeiras, mas poucas espécies possuem quantidade suficiente para exploração econômica, têm maior produção em plantas lenhosas do grupo das angiospermas e com menor frequência nas gimnospermas; são responsáveis pela defesa contra microrganismos patogênicos (Klock *et al.*, 2005).

A metodologia empregada baseia-se na reação da vanilina com os taninos condensados, formando compostos vermelhos que absorvem em 500 nm (Figura 54).

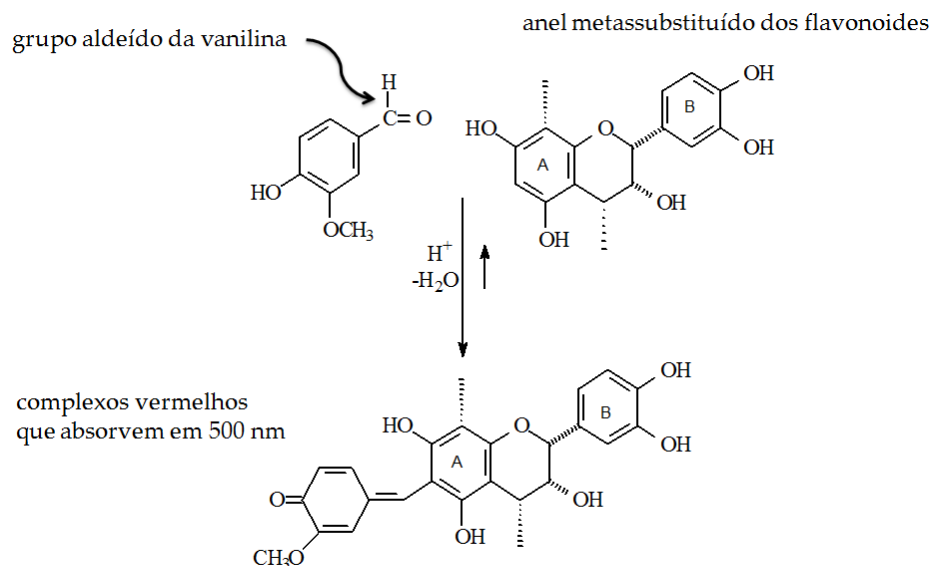
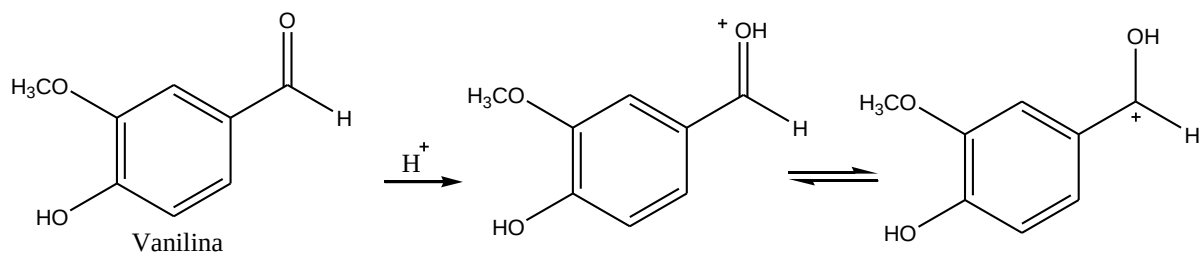


Figura 54. Reação típica da vanilina com uma proantocianidina. (Schofield *et al.*, 2001)

O mecanismo mais detalhado da reação entre a vanilina e a estrutura de uma proantocianidina está representado na Figura 55. O método depende do solvente usado, da concentração do ácido, do tempo da reação, da temperatura e da concentração da vanilina (Schofield *et al.*, 2001).



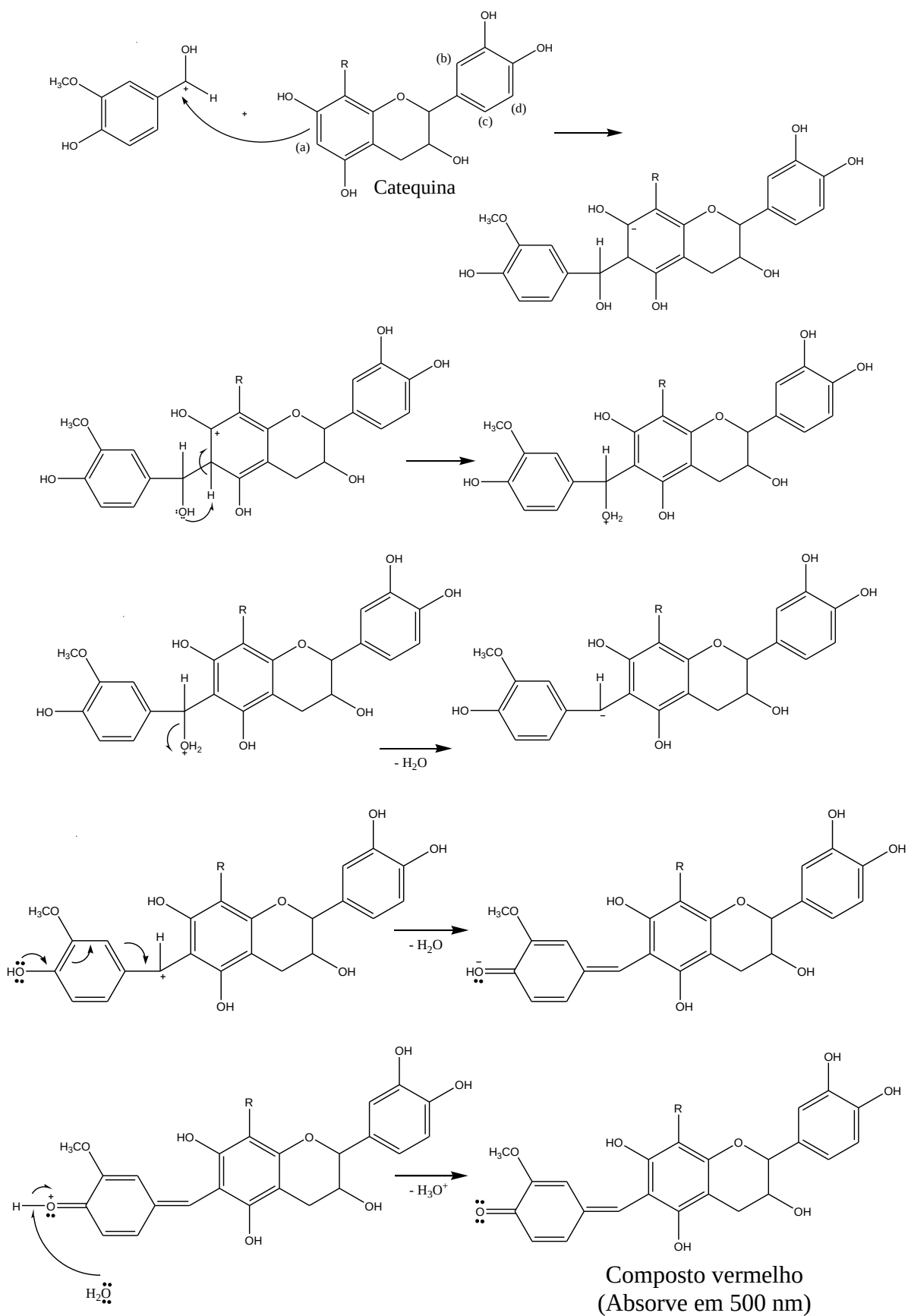
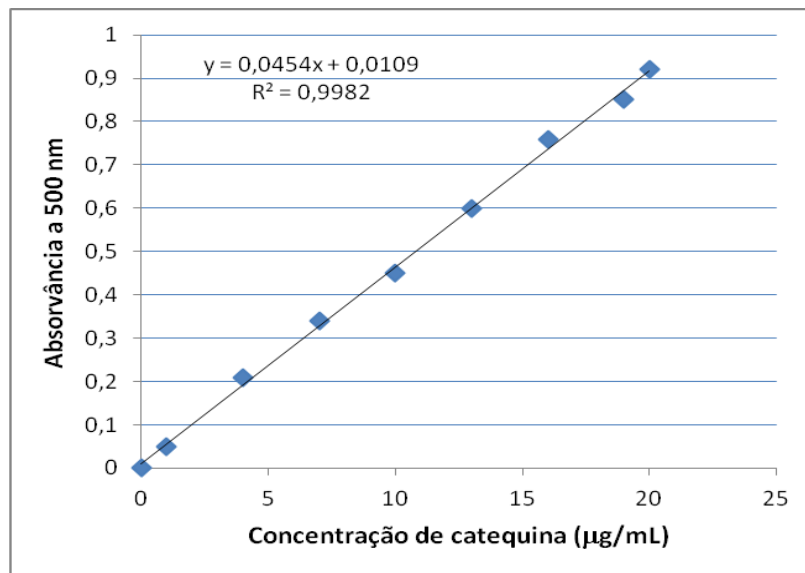


Figura 55. Proposta do mecanismo da reação entre a vanilina e proantocianidina.

A partir da determinação das absorvâncias a 500 nm para as amostras de concentrações conhecidas de catequina, foi traçada uma curva analítica, apresentada no Gráfico 4.

Gráfico 4. Curva analítica para determinação de proantocianidinas

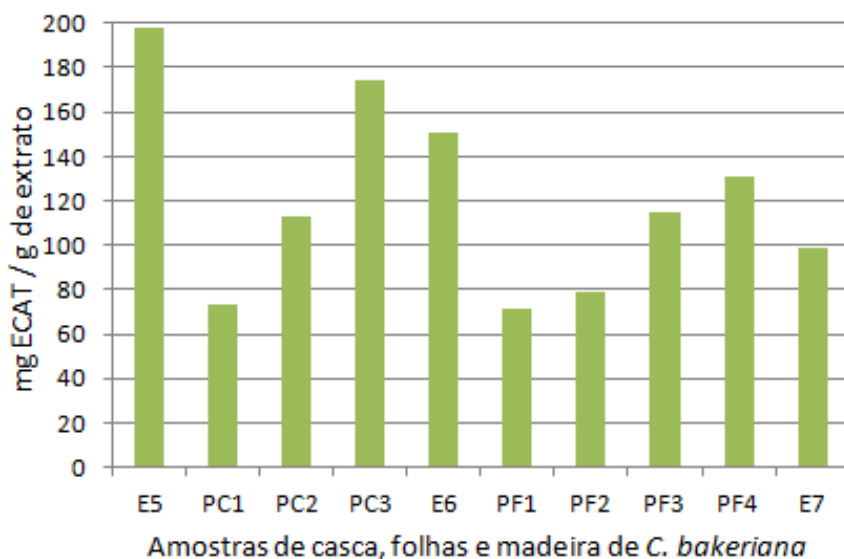


A partir dos valores de absorvância das amostras medidos em 500 nm e empregando-se a equação da reta obtida pela curva analítica de catequina, foram obtidos os teores de proantocianidinas, expressos em miligramas equivalentes de catequina (ECAT) por grama de extrato (mg ECAT / grama de extrato), mostrados na Tabela 19.

Tabela 19. Teor de proantocianidinas em mg ECAT / grama de extrato) nos extratos e partições de *C. bakeriana*

Amostras de <i>C. bakeriana</i>			(mg EAG/grama de extrato)
Casca	E5	Extrato etanólico	197,76 ± 8,0
	PC1	Partição hexano	73,35 ± 6,0
	PC2	Partição diclorometano	112,48 ± 2,0
	PC3	Partição Acetato de etila	174,56 ± 5,7
Folha	E6	Extrato etanólico	150,93 ± 9,0
	PF1	Partição hexano	71,50 ± 7,4
	PF2	Partição diclorometano	78,71 ± 11,4
	PF3	Partição Acetato de etila	115,06 ± 7,7
	PF4	Partição metanólica	130,45 ± 9,0
Madeira	E7	Extrato etanólico	98,70 ± 2,7

Os resultados dos teores de proantocianidinas também podem ser observados no Gráfico 5. Os maiores conteúdos de proantocianidinas foram encontrados no extrato etanólico da casca (197,76 mg ECAT / grama de extrato), seguido da partição acetato de etila da casca e extrato etanólico das folhas 174,56 e 150,93 mg EAG / grama de extrato, respectivamente.

Gráfico 5. Teor de proantocianidinas dos extratos de *C. bakeriana*.

A casca de *C. bakeriana* demonstrou mais alto teor em proantocianidinas quando comparado com o da madeira e folhas. O valor 197,76 mg ECAT / g de extrato que corresponde a 16,22 mg ECAT / g de casca, é maior do que o encontrado para os extratos metanol/água e acetona/água da madeira e da casca de *M. tinctoria* (Lamounier *et al.*, 2012), extratos etanólicos das raízes, estemas e frutos de *Campomanesia pubescens* (Chang *et al.*, 2011) e extratos etanólicos das folhas, casca externa e madeira de *K. coriacea* (Martins, 2012).

O extrato etanólico da madeira de *C. bakeriana* apresentou maior conteúdo de proantocianidinas que o extrato metanol/água e acetona/água da madeira de *Maclura tinctoria* (Lamounier *et al.*, 2012), extratos metanol/água e acetona/água da madeira *Moquinia polymorpha* conhecida como candeia (Lima *et al.*, 2007), extrato metanol/água de *A. urundeuva* (Morais *et al.*, 1999), extratos aquosos da casca e madeira de *Tabebuia penthaphylla* (Vieira *et al.*, 2009). A Tabela 20 apresenta os

teores de proantocianidinas encontrados para a madeira e casca de *C. bakeriana* comparados com outras espécies.

Tabela 20. Teor de proantocianidinas na madeira e casca de *C. bakeriana* e de outras espécies de vegetais

Amostras de cascas	(mg ECAT/g de extrato)	(mg ECAT/g de casca)
<i>Cassia bakeriana</i>	197,76	16,22 (et)
<i>Maclura tinctoria</i> (Lamounier <i>et al.</i> , 2012)	---	3,9 (m/ág) e 4,9 (acet/ág)
<i>Kielmeyera coriacea</i> (Martins, 2012)	19,9 (et)	---
Amostras de madeiras	(mg ECAT/g de extrato)	(mg ECAT/g de madeira)
<i>Cassia bakeriana</i>	98,7 (et)	8,60 (et)
<i>Maclura tinctoria</i> (Lamounier <i>et al.</i> , 2012)	38,4 (m/ág) e 45,3 (acet/ág)	5,1 (m/ág) e 6,5 (acet/ág)
<i>Astronium urundeuva</i> (Queiroz, 2001)	----	6,1 (acet/ág) e 31,2 (m/ág)
<i>Moquinia polymorpha</i>		0,29 (m/ág) e 0,58 (acet/ág)

A presença de compostos fenólicos e proantocianidinas em associação com os componentes macromoleculares na madeira e casca de *C. bakeriana* podem contribuir com a resistência a degradação biológica desta espécie.

5.3.4 Atividade antioxidante

A metodologia utilizada para verificar a capacidade antioxidante consistiu em avaliar a atividade sequestradora do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), de coloração púrpura, que tem máximo de absorção em um comprimento de onda de 516 - 517 nm. Por ação de um antioxidante ou uma espécie radicalar ($R^\bullet$), o DPPH é reduzido formando 2,2-difenilpicril-hidrazina (DPPH-H), de coloração amarela, com consequente desaparecimento da banda de absorção (Oliveira *et al.*, 2009). A partir do decréscimo das absorvâncias, determinou-se a porcentagem de atividade antioxidante pela quantidade de DPPH consumida e/ou pela porcentagem de DPPH remanescente no meio reacional. Na Figura 56 abaixo está representado a reação entre um composto fenólico e o radical DPPH.

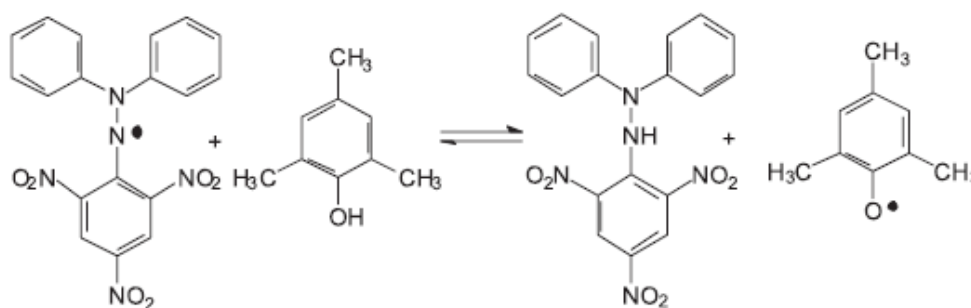
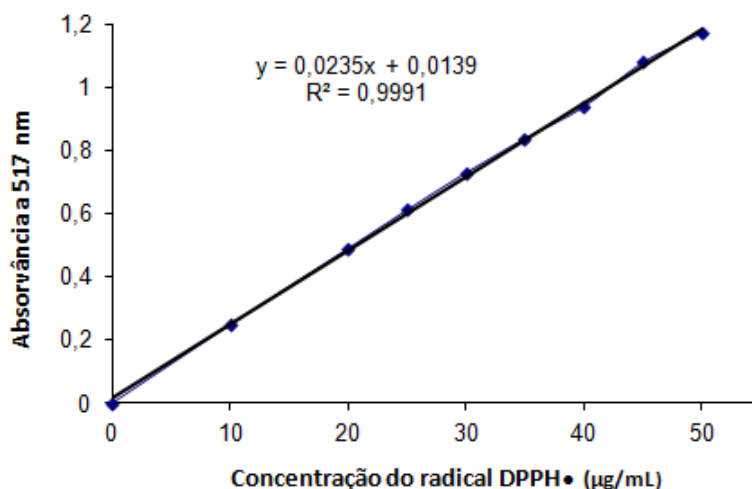


Figura 56. Reação química entre um composto fenólico e o radical DPPH (Oliveira *et al.*, 2009).

A partir da determinação das absorvâncias a 517 nm para as amostras de concentrações conhecidas do radical DPPH, foi obtido uma curva analítica, apresentada na Gráfico 6.

Gráfico 6. Curva analítica para a determinação da atividade antioxidante

Com relação às amostras testadas, soluções iniciais foram preparadas com concentrações de $800,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ (denominada de solução 100%). De acordo com o decaimento da absorvância inicial dessa solução 100%, verificou-se a necessidade de diluir ou concentrar a amostra a ser avaliada pelo método do radical DPPH. Em seguida, concentrações de 83, 66, 49, 32 e 15% a partir da solução 100% foram testadas. Um gráfico relacionando as concentrações testadas e as porcentagens sequestradas do radical DPPH após uma hora de reação foi plotado. Dessa forma, foi possível obter o valor de CE_{50} , a concentração necessária para absorver 50% dos radicais livres.

Abaixo estão representados os gráficos 7 a 16 obtidos das amostras da casca, folhas e madeira de *C. bakeriana* avaliadas pelo método do radical livre DPPH. Embora todas as amostras tenham sido testadas em triplicata, é mostrado apenas um dos resultados.

Gráfico 7. Porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas do extrato etanólico da casca (E5).

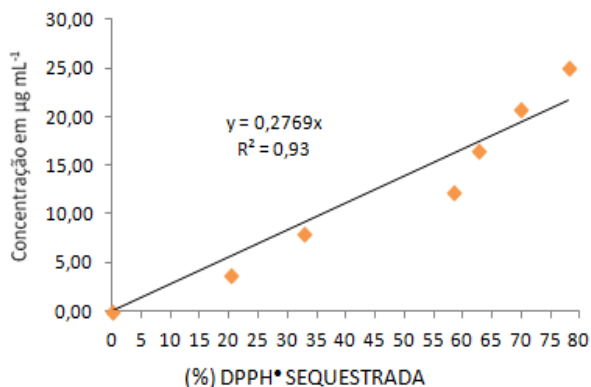


Gráfico 8. Porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas da partição hexano da casca (PC1).

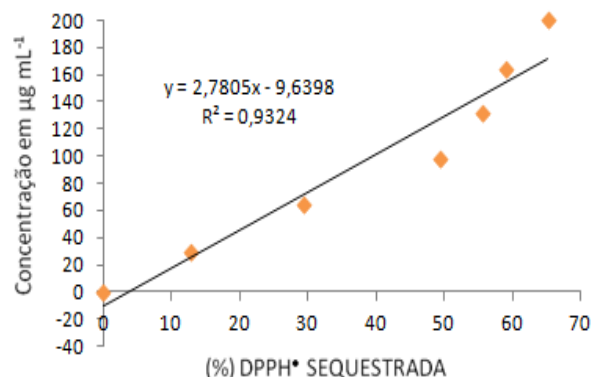


Gráfico 9. Porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas da partição diclorometano da casca (PC2).

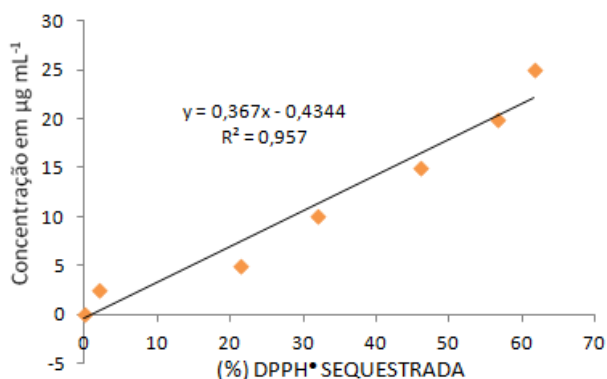


Gráfico 10. Porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas da partição acetato da casca (PC3).

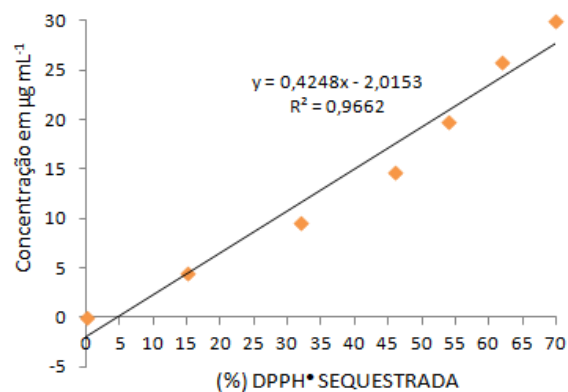


Gráfico 11. Porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas do extrato etanólico das folhas (E6).

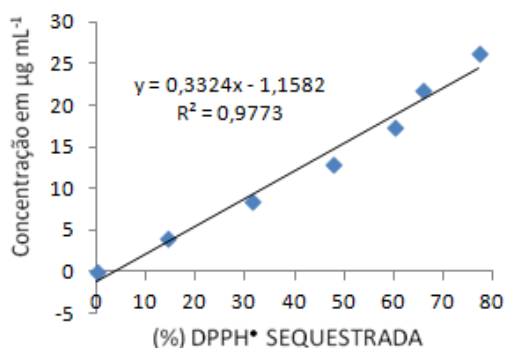


Gráfico 12. Porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas da partição hexano das folhas (PF1).

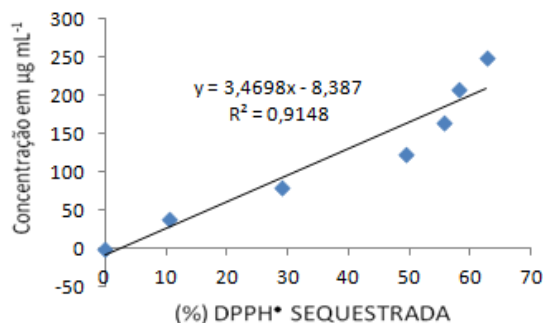


Gráfico 13. Porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas da partição diclorometano das folhas (PF2).

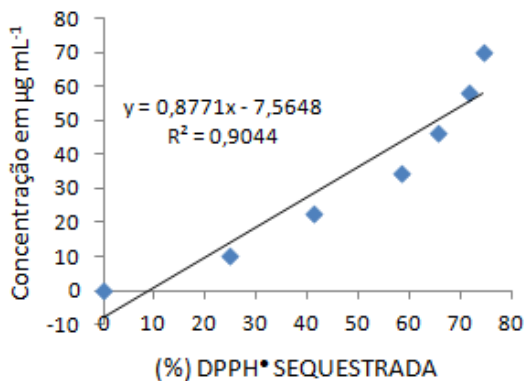


Gráfico 14. Porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas da partição acetato das folhas (PF3).

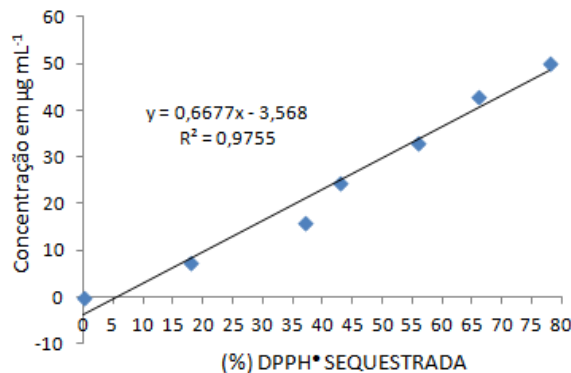


Gráfico 15. Porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas da partição metanólica das folhas (PF4).

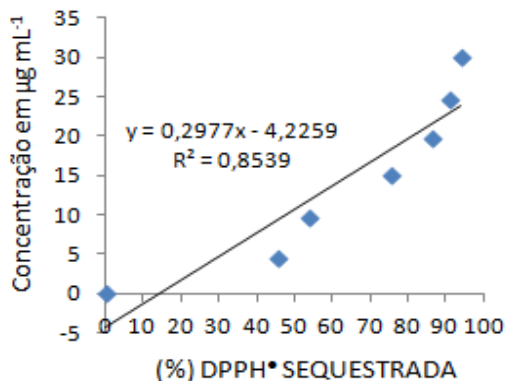
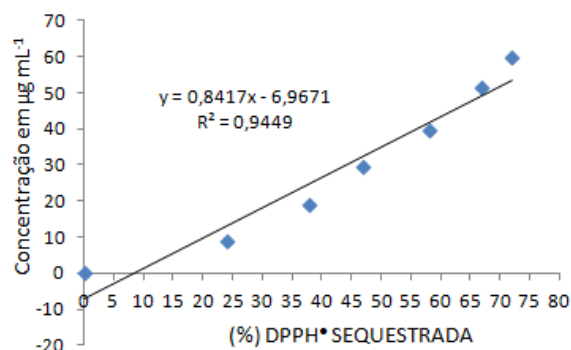


Gráfico 16. Porcentagem de DPPH sequestrado em função das diferentes concentrações testadas do extrato etanólico da madeira (E7).



Substituindo o valor de “x” por 50 nas equações acima, obtém-se os valores de CE_{50} em $\mu\text{g mL}^{-1}$ que estão apresentados na Tabela 21.

Tabela 21. Valores de CE₅₀ encontrados para os diferentes extratos de *C. bakeriana*

Amostras	Fenóis totais ($\mu\text{g mL}^{-1}$)	CE₅₀ ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
E5	696,5 $\pm$ 0,9	17,92 $\pm$ 0,4
PC1	39,81 $\pm$ 1,5	129,45 $\pm$ 3,0
PC2	183,45 $\pm$ 2,0	26,75 $\pm$ 2,0
PC3	226,27 $\pm$ 2,0	19,38 $\pm$ 0,7
E6	184,82 $\pm$ 1,7	17,04 $\pm$ 0,7
PF1	43,77 $\pm$ 0,7	165,10 $\pm$ 0,3
PF2	45,64 $\pm$ 1,6	33,68 $\pm$ 1,7
PF3	90,67 $\pm$ 0,9	29,55 $\pm$ 3,5
PF4	106,35 $\pm$ 0,7	8,67 $\pm$ 0,5
E7	129,42 $\pm$ 1,0	35,89 $\pm$ 0,2
Á. gálico	--	3,63 $\pm$ 0,2
BHT	--	7,17 $\pm$ 0,4

De acordo com resultados apresentados na Tabela 21, com exceção dos extratos hexano da casca e hexano das folhas que indicaram moderado efeito antioxidante, todos os demais indicaram forte atividade antioxidante pelo método do radical livre DPPH. Quanto mais baixo o valor de CE₅₀ maior é o efeito antioxidante. Amostras com valores de CE₅₀ abaixo de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ são consideradas muito ativas, entre 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ moderadamente ativas, entre 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ pouco ativa e acima de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ o extrato é considerado inativo (Reynertson *et al.*, 2005). Tanto para os extratos da casca quanto para os das folhas, houve uma correlação

positiva entre o teor de fenóis e a atividade antioxidante. As amostras que evidenciaram os mais baixos valores de CE_{50} foram E5, E6, PC3 e PF4. A força redutora das amostras mais ativas seguiu a seguinte ordem decrescente: fração PF4 > Extrato E6 > Extrato E5 > fração PC3. Comparando essas quatro amostras mais ativas, o extrato metanólico das folhas (PF4), mesmo apresentando menor conteúdo de fenóis totais, indicou menor valor de CE_{50} , próximo ao encontrado para o BHT, padrão purificado utilizado neste trabalho como controle positivo e analisado sob as mesmas condições que as amostras dos extratos. Isso pode estar relacionado ao fato de que, durante a partição líquido-líquido do extrato etanólico bruto das folhas, com a semi - purificação dos compostos, ocorreu um aumento da concentração de constituintes com maior potencial redutor na fase metanólica.

A Tabela 22 apresenta uma comparação de valores de CE_{50} encontrado para a casca, folhas e madeira de *C. bakeriana* das amostras mais ativas com diversas amostras de outras espécies de vegetais e padrões encontrados na literatura.

Tabela 22. Valores de CE₅₀ da madeira, casca e folhas de *C. bakeriana*, outras plantas e padrões

ESPÉCIE VEGETAL	EXTRATO	CE ₅₀ (µg mL ⁻¹)		
		Casca	Folhas	Madeira
<i>C. bakeriana</i>	Etanol	17,92	17,04	35,89
<i>C. bakeriana</i>	Fase Acetato de etila	19,38	---	---
<i>C. bakeriana</i>	Fase metanol	---	8,67	---
<i>Maclura tinctoria</i> (Lamounier et al., 2012)	Metanólico	20,9	---	18,7
<i>Campomanesia pubescens</i> (Chang et al., 2011)	Etanólico	---	6,6	---
<i>Cordia sessilis</i> (Aquino et al., 2013)	Etanólico	---	38,9	---
<i>Cordia sessilis</i> (Aquino et al., 2013)	Fase acetato de etila	---	17,9	---
<i>Baccharis illinita</i> (Brighente et al., 2007)	Hidroalcoólico	---	21,5	---
<i>Baccharis platypoda</i> (Brighente et al., 2007)	Hidroalcoólico	---	38,0	---
<i>Cyathea phalerata</i> (Brighente et al., 2007)	Hidroalcoólico	---	9,0	20,0
<i>Cyathea phalerata</i> (Brighente et al., 2007)	Fase acetato de etila	---	---	7,0
<i>Cyathea phalerata</i> (Brighente et al., 2007)	Fase aquosa	---	---	17,0
<i>Trichilia catigua</i> (Brighente et al., 2007)	Hidroalcoólico	2,10	---	---
<i>Chamaecyparis obtusa</i> (Marimuthu et al., 2008)	Etanólico	31,07	---	---
<i>Calocedrus formosana</i> (Wang et al., 2004)	Etanólico	23,0	---	23,0
<i>Nephelium lappaceum</i> (Thitilertdech et al., 2008)	Metanólico	4,94	---	---
<i>Cassia didymotrya</i> (El-Hashah et al., 2010)	Metanólico	---	202,75	---
<i>Cassia fistula</i> (El-Hashah et al., 2010)	Metanólico	---	132,86	---
<i>Cassia glauca</i> (El-Hashah et al., 2010)	Metanólico	---	18,53	---
<i>Cassia grandis</i> (El-Hashah et al., 2010)	Metanólico	---	50,37	---
<i>Cassia nodosa</i> (El-Hashah et al., 2010)	Metanólico	---	75,15	---
<i>Cassia occidentalis</i> (El-Hashah et al., 2010)	Metanólico	---	213,48	---
<i>Cassia sophera</i> (El-Hashah et al., 2010)	Metanólico	---	225,88	---
Naringenina (Brighente et al., 2007)	---	18,0		
Luteolina (Brighente et al., 2007)	---	4,5		
Apigenina (Brighente et al., 2007)	---	31,0		
Kaempferol (Brighente et al., 2007)	---	15,0		

O extrato etanólico da madeira de *C. bakeriana* embora tendo apresentado considerável atividade antioxidante, com CE₅₀ de 35,89 µg mL⁻¹, apresentou valor

superior as outras espécies de madeira. Como se pode observar na Tabela 21, a fase metanólica das folhas (PF4) de *C. bakeriana* apresentou valor de CE_{50} 8,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$, menor que 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ indicando forte atividade antioxidante. Além disso, esta mesma amostra obteve CE_{50} mais baixo que as folhas de outras espécies de *Cassia*; folhas, casca e madeira de várias outras espécies de vegetais e também de flavonoides como naringenina, apigenina e kaempferol. A fase metanólica das folhas de *C. bakeriana* indicou valor de CE_{50} mais alto que o extrato etanólico das folhas de *C. pubescens*, extrato hidroalcoólico da casca de *T. catigua*, extrato metanólico de *N. lappaceum*, fase acetato de etila de *C. phalerata* e do padrão luteolina.

A Tabela 23 apresenta a relação entre os valores de CE_{50} das frações mais ativas, resultados de citotoxicidade e índices de seletividade. A comparação entre a citotoxicidade para células Vero e atividade antioxidante das amostras mais ativas foi realizada utilizando o índice de seletividade (IS), que consistiu na razão entre a concentração citotóxica 50% (CC_{50}) para células Vero e concentração necessária para sequestrar 50% dos radicais livres (CE_{50}) ($IS = CC_{50} / CE_{50}$) (Case *et al.*, 2006). Foi considerado que quanto maior o valor do IS, maior é o potencial da amostra como agente antioxidante, apresentando menor efeito citotóxico. Se ocorrerem valores de IS menores que zero, é um indicativo que a amostra é mais tóxica para células Vero, do que seletiva para o sequestro dos radicais livres DPPH.

Tabela 23. Resultados de citotoxicidade dos extratos de *C. bakeriana* com maior atividade antioxidante e índices de seletividade

Amostra	Atividade antioxidante	Atividade citotóxica	Índice de seletividade (IS)
	CE ₅₀ (µg mL ⁻¹)	Células Vero CC ₅₀ (µg mL ⁻¹)	
E5	17,92	>512	> 28,57
E6	17,04	>512	> 30,04
PC3	19,97	271±22	13,57
PF4	8,67	>512	> 59,05

As amostras E5, E6, PC3 e PF4 apresentaram resultados bastante significativos, uma vez que, apresentaram baixa toxicidade para células Vero em concentrações que indicaram forte atividade antioxidante, com destaque para a fase metanólica das folhas (PF4), que exibiu maior índice de seletividade. As amostras E5 e E6 foram no mínimo 28 vezes mais seletiva para os radicais livres DPPH que tóxica para células Vero. Já a amostra PF4, foi no mínimo 59 vezes mais seletiva para o sequestro dos radicais livres que para células Vero.

Embora outros testes de citotoxicidade serão futuramente realizados com as amostras mais ativas de *C. bakeriana*, é possível sugerir a utilização desses extratos como agentes sequestradores de radicais em substituição a produtos sintéticos como o BHT.

5.4 Composição química, atividade antimicrobiana e citotoxicidade dos óleos essenciais da madeira, casca e folhas de *C. bakeriana*

5.4.1 Composição química dos óleos essenciais

A Tabela 24 mostra a composição de óleos essenciais das folhas, casca e madeira de *C. bakeriana*. A Tabela 25 apresenta a classificação dos compostos por grupos funcionais nas composições dos óleos essenciais de diferentes partes de *C. bakeriana*. As folhas tiveram o maior rendimento de óleo essencial com $0,94 \pm 0,03$ %, seguido da casca com $0,46 \pm 0,08$ %, e a madeira com $0,12 \pm 0,02$ %. Surpreendentemente, os terpenóides foram representados apenas por linalol (3,55%) e fitol (4,45 %) no óleo essencial das folhas.

Tabela 24. Composição química dos óleos essenciais de diferentes partes de *C. bakeriana*

Composto	IA Referência	IA (Calculado)	Método de identificação	Composição (%)		
				Madeira	Casca	Folhas
Hexanal	801	806	a, b, c	1,13	0,82	-
Furfural	828	830	a, b, c	1,27	-	-
(E)-Hex-2-enal	846	847	a, b, c	-	-	10,48
(Z)-Hex-3-en-1-ol	850	851	a, b, c	1,56	6,73	34,90
Hex-2-en-1-ol	854	855	a, b, c	-	-	0,95
Hexan-1-ol	863	862	a, b, c	1,03	0,72	-
Octanal	998	1001	a, b, c	-	0,87	-
Acetato de hex-3-en-1-ila	1004	1007	a, b, c	-	-	8,68
Fenilacetaldéido	1036	1038	a, b, c	3,76	-	-
Octan-1-ol	1063	1065	a, b, c	-	2,82	-
Linalol	1097	1097	a, b, c	-	-	3,55
Nonanal	1100	1099	a, b, c	-	14,42	-
Nonanol	1165	1170	a, b, c	-	0,98	-
Salicilato de metila	1190	1193	a, b, c	-	1,27	-
Ácido octanoico (ácido caprílico)	1192	1196	a, c, d	-	1,53	-
Decanal	1201	1201	a, b, c	-	0,89	-
Cis-dec-2-enal	1261	1262	a, b, c	-	6,17	-

Ácido nonanoico (ácido pelargônico)	1293	1291	a, c, d	-	5,77	-
2-metoxi-4-vinilfenol (4-vinilguaiaicol)	1309	1314	a, b, c	-	-	2,41
2-metoxi-4-propilfenol (4-propilguaiaicol)	1374	1367	a, b, d	3,92	-	-
(E)-nerolidol	1561	1564	a, b, c	-	4,70	-
Ácido dodecanoico (ácido láurico)	1565	1566	a, c, d	-	1,92	0,93
Ácido tridecanoico (ácido tridecílico)	1662	1660	a, c, d	-	0,79	-
Ácido tetradecanoico (ácido mirístico)	1770	1764	a, c, d	-	1,45	-
N. I.	-	-	-	0,93	-	-
Ácido hexadecanoico (ácido palmítico)	1959	1958	a, c, d	58,14	34,80	5,89
N. I.	-	-	-	1,05	-	-
Fitol	2114	2110	a, c, d	-	-	4,45
Ácido (Z,Z)-octadeca-9,12-dienóico (ácido Linoleico)	2132	2149	a, c, d	8,46	2,09	-
Ácido (Z)-octadec-9-enóico (ácido oleico)	2132	2149	a, c, d	15,22	2,20	-
Ácido octadecanoico (ácido esteárico)	2158	2155	a, c, d	3,53	0,72	-
Tricosano	2300	2300	a, b, c	-	0,69	1,03
Tetracosano	2400	2400	a, b, c	-	-	1,14
N. I.	-	-	-	-	-	2,38
Pentacosano	2500	2500	a, b, c	-	1,33	-
Heptacosano	2700	2700	a, b, c	-	-	8,27
N. I.	-	-	-	-	3,62	-
Octacosano	2800	2800	a, b, c	-	0,74	2,07
N. I. (hidrocarboneto)	-	-	-	-	2,06	12,57
N. I. (hidrocarboneto)	-	-	-	-	0,93	-

Compostos identificados (%) 98,02 93,39 86,05

IA = Índice aritmético sobre uma coluna DB5 (comparação com n-alcanos C₈-C₄₀); N.I = Não identificado. Método de indentificação: ^{a)} Índice aritmético; ^{b)} Biblioteca de espectros de massas e índice de retenção Adams; ^{c)} Comparação dos espectros de massas com a biblioteca *Wiley*; ^{d)} Comparação dos índices aritméticos e espectros de massas com NIST 2011.

Tabela 25. Classificação dos compostos presentes nos óleos essenciais de diferentes partes de *C. bakeriana* pelos grupos funcionais

Grupos funcionais	Madeira	Casca	Folhas
Álcoois	2,59	11,15	37,15
Aldeídos	6,16	23,17	10,48
Ésteres	-	-	8,68
Monoterpenos oxigenados	-	-	3,55
Sesquiterpenos oxigenados	-	4,70	-
Diterpenos oxigenados	-	-	4,45
Alcanos de cadeia longa	-	2,76	12,78
Fenólicos	3,92	-	2,41
Ácidos graxos	85,35	51,27	6,82
Compostos não identificados	1,98	6,61	13,95

Os componentes majoritários identificados nos óleos essenciais das folhas foram (Z)-hex-3-en-1-ol (34,90%), heptacosane (8,27%), acetato de hex-3-en-1-ila (8,6%), (E)-hex-2-enal (10,48%), ácido hexadecanoico (5,89%), diterpeno oxigenado fitol (4,45%) e o sesquiterpeno oxigenado linalol (3,55%) (Figura 56). A composição química dos óleos das folhas de algumas espécies de *Cassia* já foi determinada, como a de *Cassia alata* (Agnaniet *et al.*, 2005; Ogunwande *et al.*, 2010) e *Cassia fistula* (Tzakou *et al.*, 2007). A maioria dos compostos encontrados para as folhas de *C. bakeriana* diferem dos encontrados para outras espécies de *Cassia*. Em estudos anteriores com o óleo essencial das folhas de *C. alata*, os compostos majoritários foram linalol (23,0%), borneol (8,6%) e pentadecanal (9,3%) (Agnaniet *et al.*, 2005) e 1,8-cineol (39,8%), β -cariofileno (19,1%) e óxido de cariofileno (12,7%) (Ogunwande *et al.*, 2010). Os principais constituintes das folhas de *C. fistula* foram fitol (16,1%), tetradecano (10,5%) e hexadecano (8,7%) (Tzakou *et al.*, 2007). A composição química dos óleos podem variar entre espécies, entre as mesmas espécies e entre as suas diferentes partes.

Estas diferenças são devido a vários fatores que afetam a composição química dos óleos, tais como clima, qualidade do solo, época de colheita e características genéticas. Em geral, a baixa intensidade da luz diminui a produção de monoterpenos e uma pequena variação diária da temperatura pode estimular a produção de terpenoides (Lima, 2008).

O óleo de madeira contém ácidos graxos como componentes majoritários, o que representou 85,35% do total, incluindo os ácidos palmítico (58,14%), oleico (15,22%) e linoleico (8,46%) como os majoritários. Fenilacetaldéido (3,76%) e 4-propilguaiaicol (3,92%) estão também presentes em quantidades significativas.

O óleo de casca é rico em ácido hexadecanoico (34,80%), nonanal (14,42%), (Z)-hex-3-en-1-ol (6,73%), (Z)-dec-2-enal (6,17%) , ácido nonanoico (5,77%) e o sesquiterpeno oxigenado (E)-nerolidol (4,70%) (Figura 57). A classe predominante dos compostos nos óleos essenciais de casca e da madeira foi a dos ácidos graxos representando 51,27 e 85,35%, respectivamente.

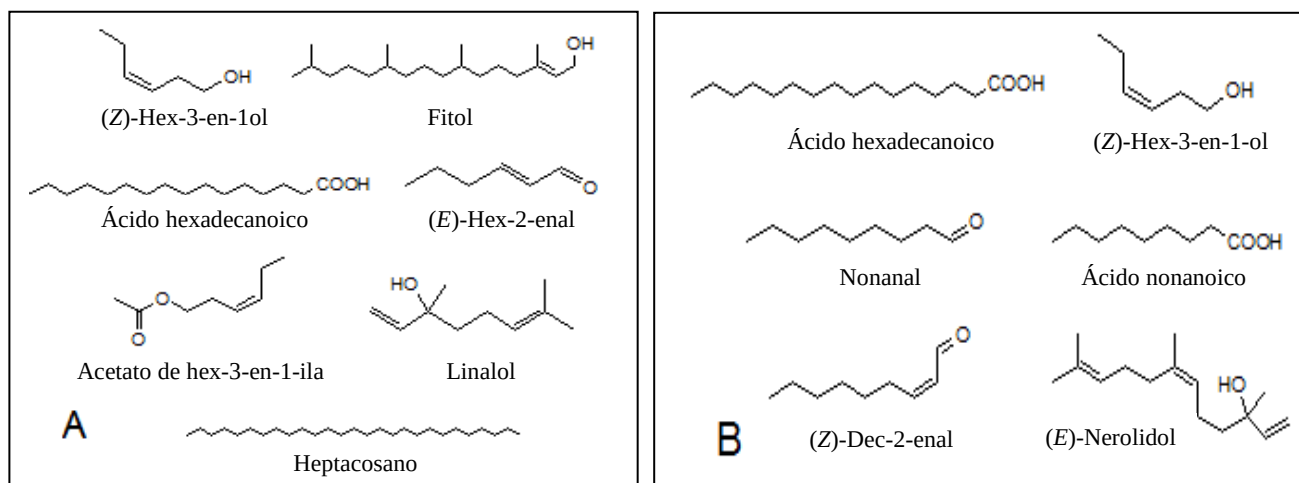


Figura 57. Componentes majoritários dos óleos das folhas (A) e casca (B) de *C. bakeriana*.

5.4.2 Atividade antimicrobiana e citotoxicidade dos óleos essenciais de *C. bakeriana*

A atividade antimicrobiana dos óleos essenciais de diferentes partes de *C. bakeriana* foi determinada frente a microrganismos bucais aeróbicos e anaeróbicos. Os resultados da actividade antimicrobiana e citotoxicidade são apresentados na Tabela 26. Os óleos da casca e folhas indicaram forte atividade antibacteriana, mostrando inibição para ambos os tipos de microrganismos. Os valores de CIM variaram entre 62,5 e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para a maioria das bactérias testadas. Todas as bactérias apresentaram algum grau de sensibilidade para os óleos essenciais nas concentrações testadas. Os microrganismos mais suscetíveis foram *A. naeslundii*, *P. gingivalis* e *B. fragilis* (bactérias anaeróbias) e *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguinis* e *A. actinomycetemcomitans* (bactérias aeróbias), enquanto *F. nucleatum* foi mais resistente. O óleo essencial da madeira demonstrou menor atividade contra as bactérias investigadas, com CIMs variando de 500 a 2000 (ou superior) $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Tabela 26. Concentrações inibitórias mínimas dos óleos essenciais contra bactérias bucais aeróbias e anaeróbias e atividade citotóxica de diferentes partes de *C. bakeriana*

Amostras dos óleos essenciais	Concentração inibitória mínima (CIM) – µg mL ⁻¹								Atividade citotóxica CC ₅₀ – µg mL ⁻¹
	Microrganismos								
	Anaeróbicos				Aeróbicos				
	^c F. nucleatum (ATCC 25586)	^b A. naeslundii (ATCC 19039)	^c P. gingivalis (ATCC 33277)	^c B. fragilis (ATCC 25285)	^b S. sanguinis (ATCC 10556)	^b S. mitis (ATCC 49456)	^b S. mutans (ATCC 25175)	^c A. actionmycetemcomitans (ATCC 43717)	
Folhas	1000	62,5	125	62,5	125	62,5	62,5	125	153 ± 13
Casca	1000	125	125	62,5	125	62,5	62,5	125	119 ± 2
Madeira	2000	1000	500	1000	1000	500	2000	1000	93 ± 3
^a CHD	1,84	1,84	3,68	1,84	1,84	3,68	0,92	7,37	----

^aCHD: controle positivo (digluconato de clorexidina), ^bbactéria Gram-positiva, ^cbactéria Gram-negativa.

Comparando as Tabelas 25 e 26, os resultados similares de CIMs apresentados pelos óleos essenciais das folhas e casca pode estar relacionado com os álcoois alifáticos e aldeídos identificados. Os ácidos graxos presentes em concentrações elevadas no óleo essencial de madeira, aparentemente não apresentaram efeitos inibitórios sobre as bactérias testadas. Geralmente, as propriedades biológicas dos óleos essenciais são determinadas pelas características dos compostos majoritários (Bakkali *et al.*, 2008). A atividade antimicrobiana neste estudo pode estar relacionada

com um metabólito específico que está em concentração mais elevada na composição de óleo ou com sinergismo entre os compostos majoritários e minoritários na mistura. Os compostos não identificados nos óleos também podem ser contribuintes para os efeitos antimicrobianos. Alguns compostos encontrados nos óleos essenciais de *C. bakeriana*, já são bem conhecidos como agentes antimicrobianos, tais como o (Z)-hex-3-en-1-ol e linalol (Dorman e Deans, 2000), ácido caprílico (Kollanoor *et al.*, 2007), os ácidos láurico e linoleico (Outtara *et al.*, 1997), aldeídos, especialmente (E)-hex-2-enal (Patrignani *et al.*, 2008), salicilato de metila (Chung *et al.*, 2006), (E)-nerolidol (Skaltsa *et al.*, 2000) e octan-1-ol (Togashi *et al.*, 2007).

Embora não tenham uma elevada composição de terpenos, os óleos essenciais das folhas e cascas de *C. bakeriana* apresentaram significativa atividade antimicrobiana contra os patógenos bucais avaliados. Extratos ou óleos de espécies vegetais, com valores de CIM inferiores a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados promissores como potenciais agentes antimicrobianos (Rios e Recio, 2005). Os óleos essenciais das folhas e cascas de *C. bakeriana* exibiram forte efeito antibacteriano contra microrganismos bucais com valores de CIM inferiores a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e menor que outros estudos na literatura. O óleo de folha de *Lippia sidoides* e os padrões puros de monoterpenos (timol e carvacrol) exibiram contra *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis* e *S. salivarius*, valores de CIMs entre $2500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $10000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Botelho *et al.*, 2007). Os valores de CIMs para os óleos essenciais de *C. pubescens* para os mesmos microrganismos estudados neste trabalho variaram entre $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $2000 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Chang *et al.*, 2011). Óleos de *Leptospermum scoparium*, *Melaleuca alternifolia*, *Eucalyptus radiata* e *Lavandula officinalis* inibiram o crescimento de *S. mutans*, *S. sobrinus*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* e *F. nucleatum* com CIMs variando entre $300 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $10000 \mu\text{g mL}^{-1}$.

(Takarada *et al.*, 2004) O óleo essencial de *Artemisia iwayomogi* foi avaliado contra quinze bactérias bucais, e as CIMs variaram entre $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $3200 \mu\text{g mL}^{-1}$, com exceção para *P. gingivalis* com CIM de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ (Cha, 2007).

Utilizando uma concentração de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$, os óleos das folhas e casca de *C. bakeriana* inibiram o crescimento de *S. mutans*, principal agente etiológico da cárie dentária. Os resultados são ainda mais promissores, porque ambos os óleos apresentaram maior toxicidade para os microrganismos do que para as células Vero na mesma concentração. A comparação da citotoxicidade para as células Vero e atividade antimicrobiana foi realizada utilizando o índice de selectividade, que foi calculado pelo logaritmo da razão entre a concentração citotóxica (CC_{50}) e o valor de CIM para os microrganismos ($\text{IS} = \log [\text{CC}_{50}] / [\text{MIC}]$). Um valor positivo representa maior seletividade contra microrganismos que toxicidade para as células Vero, e um valor negativo indica uma maior toxicidade para as células Vero do que para as bactérias (Case *et al.*, 2006). O índice de seletividade para o óleo das folhas nas concentrações inibitórias de $62,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $125 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram de 0,38 e 0,08, respectivamente, e para o óleo da casca, nas mesmas concentrações foram de 0,28 e -0,021, respectivamente. Para o óleo de madeira os valores de IS obtidos foram -0,73 e -1,03, nas concentrações de 500 e $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente, o que indica uma maior toxicidade para as células Vero e baixa atividade contra patógenos bucais. De acordo com os valores de CIM e os índices de seletividade, o óleo das folhas apresentou promissora atividade antibacteriana enquanto exibiu baixo efeito citotóxico para células Vero.

5.5 Atividade antimicrobiana dos extratos brutos e partições líquido – líquido da casca e folhas de *C. bakeriana*

5.5.1 Atividade antimicrobiana dos extratos brutos da casca de *C. bakeriana* obtidos em soxhlet

A metodologia empregada nesse estudo para determinação da atividade antimicrobiana (microdiluição em caldo) é quantitativa. O método da microdiluição em caldo é considerado a melhor opção para avaliação da atividade antibacteriana de produtos naturais (Alves *et al.*, 2008).

Os resultados das concentrações inibitórias mínimas (CIM's) dos extratos obtidos em soxhlet da casca *C. bakeriana* frente a bactérias bucais aeróbias e anaeróbias estão apresentados na Tabela 27.

Tabela 27. Concentrações inibitórias mínimas dos extratos da casca obtidos em soxhlet

Microrganismos		Concentração Inibitória Mínima (CIM) – $\mu\text{g mL}^{-1}$				
		Extratos brutos				^a CHD
		Cicloexano	Cicloexano/etanol (2:1v/v)	Clorofórmio	Água	
Anaeróbicos	^c <i>F. nucleatum</i> (ATCC 25586)	>400	>400	20	>400	1,84
	^b <i>A. naeslundii</i> (ATCC 19039)	>400	>400	30	>400	1,84
	^c <i>P. gingivalis</i> (ATCC 33277)	300	60	30	200	3,68
	^c <i>B. fragilis</i> (ATCC 25285)	>400	>400	20	>400	1,84
	^c <i>P. nigrescens</i> (ATCC 33563)	400	300	20	300	1,84

Aeróbicos	^b <i>S. sanguinis</i> (ATCC 10556)	300	200	200	200	1,84
	^b <i>S. mitis</i> (ATCC 49456)	400	>400	100	>400	3,68
	^b <i>S. mutans</i> (ATCC 25175)	300	200	200	300	0,92

^aCHD: controle positivo (digluconato de clorexidina), ^b bactéria Gram-positiva,

^c bactéria Gram-negativa.

As extrações em soxhlet de cascas e madeiras são geralmente realizadas para determinar o rendimento de extrativos presentes nessas amostras e obter a madeira ou casca livre de extrativos para posteriores análises de determinação de lignina e holocelulose. Em seguida, esses extrativos são descartados. Ao invés de se descartar os extrativos, foi decidido neste trabalho avaliar a atividade antimicrobiana dos mesmos, verificando se na casca existe compostos bioativos com propriedade antibacteriana contra microrganismos bucais. Como se pode observar na tabela 26, os extratos da casca obtidos pela extração em soxhlet inibiram o crescimento dos microrganismos bucais com valores de CIM entre 20 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O extrato clorofórmio mostrou-se mais ativo contra as bactérias anaeróbias com CIM's variando entre 20 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Parece estar bem estabelecido entre os pesquisadores, que valores de concentrações inibitórias mínimas abaixo de 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para extratos brutos de produtos naturais e concentrações inibitórias mínimas para substâncias puras abaixo de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ são consideradas promissoras (Rios e Recio, 2005). Os resultados dessa avaliação inicial foram considerados relevantes, uma vez que, os dados de CIM para os microrganismos anaeróbios são valores próximos de atividades consideradas promissoras para compostos isolados.

5.5.2 Fracionamento do extrato clorofórmio bruto da casca de *C. bakeriana* obtidos em soxhlet e atividade antimicrobiana

Considerando os resultados de atividade antimicrobiana encontrados para o extrato clorofórmio, foi proposto seu fracionamento em coluna de sílica gel-60, mesmo sabendo que a quantidade de amostra do extrato clorofórmico era pequena devido ao baixo rendimento obtido com clorofórmio na extração em soxhlet. Após o fracionamento em cromatografia em coluna foram obtidas sete frações denominadas A1, A2, A3, A4, A5, A6 e A7, que novamente foram todas submetidas ao teste de atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição em caldo. As massas obtidas e os resultados das concentrações inibitórias das frações estão apresentados na Tabela 28 e no Quadro 4, respectivamente.

Tabela 28. Massas das frações obtidas pelo fracionamento do extrato clorofórmio da casca de *C. bakeriana*

Sistema de solvente Utilizado	Fração	Massa da fração (mg)
Cicloexano	A1	223,0
Cicloex/Clorof 1:1	A2	89,0
Cicloex/Clorof/Acet 1:1:1	A3	27,0
Acetato de etila 1	A4	151,0
Acetato de etila 2	A5	65,0
Acet/Etanol 1:1	A6	38,0
Etanol	A7	72,0

Quadro 4. Concentrações inibitórias mínimas das frações do extrato clorofórmico da casca de *C. bakeriana*.

Microrganismos		Concentração Inibitória Mínima (CIM) – µg mL ⁻¹							^a CHD
		Frações obtidas do extrato clorofórmio							
		A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	
Anaeróbicos	^c <i>F. nucleatum</i> (ATCC 25586)	>400	>400	80	400	400	>400	>400	1,84
	^b <i>A. naeslundii</i> (ATCC 19039)	200	200	200	200	200	>400	200	1,84
	^c <i>P. gingivalis</i> (ATCC 33277)	200	>400	30	400	>400	300	200	3,68
	^c <i>B. fragilis</i> (ATCC 25285)	>400	>400	20	40	90	>400	>400	1,84
	^c <i>P. nigrescens</i> (ATCC 33563)	>400	400	200	300	300	>400	400	1,84
Aeróbicos	^b <i>S. sanguinis</i> (ATCC 10556)	>400	>400	100	>400	>400	>400	>400	1,84
	^b <i>S. mitis</i> (ATCC 49456)	400	400	90	300	300	300	300	3,68
	^b <i>S. mutans</i> (ATCC 25175)	>400	>400	200	>400	>400	>400	>400	0,92

^aCHD: controle positivo (digluconato de clorexidina), ^b bactéria Gram-positiva,

^c bactéria Gram-negativa.

Como pode ser observado no Quadro 4, a fração A3 foi a que indicou maior efeito antimicrobiano pelo fato de ter apresentado os menores valores de CIM's, inibindo microrganismos aeróbios e anaeróbios. As concentrações inibitórias mínimas da fração A3 para as bactérias anaeróbias *F. nucleatum*, *A. naeslundii* e *P. nigrescens* foram mais altas quando se compara com as CIM's do extrato bruto clorofórmico, indicando diminuição do efeito antimicrobiano. Já para as bactérias aeróbias *S. sanguinis* e *S. mitis*, as CIM's foram mais baixas, indicando aumento da atividade antimicrobiana. A fração A3 inibiu o crescimento *Bacteroides fragilis* e *Porphyromonas gingivalis* com baixas CIM's, 20 e 30 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente. Tanto no extrato bruto

clorofórmico, quanto na fração A3, existem compostos bioativos com potencial antimicrobiano frente a bactérias bucais. A quantidade de amostra do extrato clorofórmio bruto e da fração A3, não permitiu a continuidade do fracionamento, mas esse estudo inicial justifica extrações e fracionamentos em maior escala, uma vez que, a casca de *C. bakeriana* evidenciou ser fonte de metabólitos com atividade antimicrobiana contra bactérias bucais aeróbias e anaeróbias.

5.6 Resultados da atividade antimicrobiana dos extratos brutos etanólicos e partições da casca e folhas de *C. bakeriana*

Os resultados de atividade antimicrobiana dos extratos e partições da casca e folhas de *C. bakeriana* avaliadas *in vitro* pelo método da microdiluição em caldo estão apresentados no Quadro 5.

Quadro 5. Resultados de CIM's para os extratos e partições da casca e folhas de *C. bakeriana*.

BACTÉRIAS	Concentrações inibitórias mínimas (CIM's) em $\mu\text{g mL}^{-1}$									
	EXTRATOS – <i>C. bakeriana</i>									
	CASCA				FOLHAS					Controle +
	E5	PC1	PC2	PC3	E6	PF1	PF2	PF3	PF4	^a CHD
^b <i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	400	>400	100	400	>400	>400	>400	>400	>400	1,84
^b <i>S. mitis</i> ATCC 49456	>400	300	200	200	>400	>400	>400	>400	>400	3,68

^b <i>S. mutans</i> ATCC 25175	>400	25	400	>400	>400	>400	12,5	>400	>400	0,92
^b <i>S. sobrinus</i> ATCC 33478	>400	25	100	>400	>400	>400	25	>400	>400	1,84
^b <i>E. faecalis</i> ATCC 4082	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	>400	7,37
^c <i>B. Fragilis</i> ATCC 25285	>400	200	20	>400	100	200	400	400	>400	1,84
^c <i>P. nigrescens</i> ATCC 33563	>400	>400	200	400	>400	>400	>400	>400	>400	1,84
^b <i>A. naeslundii</i> ATCC 19039	>400	>400	12,5	400	>400	>400	>400	>400	>400	1,84
^c <i>F. Nucleatum</i> ATCC 25586	>400	200	12,5	200	>400	>400	>400	>400	400	1,84
^c <i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	>400	400	100	>400	>400	>400	200	400	>400	3,68

^aCHD: controle positivo (digluconato de clorexidina), ^b bactéria Gram-positiva,
^c bactéria Gram-negativa.

Os extratos etanólicos brutos da casca e folhas não evidenciaram atividade antimicrobiana nas concentrações testadas, com exceção do extrato etanólico da casca frente a *S. sanguinis* com concentração inibitória mínima de 400 µg mL⁻¹ e do extrato etanólico da folha frente a *B. fragilis* com CIM de 100 µg mL⁻¹. As partições da casca e folhas evidenciaram atividade antimicrobiana entre 12,5 e 400 µg mL⁻¹. As mais baixas concentrações inibitórias foram encontradas para a partição PC2 da casca (partição diclorometano da casca) com valores de 12,5 µg mL⁻¹ diante de *A. naeslundii* e *F. nucleatum* e 20 µg mL⁻¹ frente a *B. fragilis*. A mesma partição inibiu o crescimento de todos os microrganismos avaliados, exceto *E. faecalis*, porém com maior efeito antibacteriano frente aos anaeróbios, onde foi encontrado os menores valores de CIM. Os valores encontrados para a partição diclorometano da casca vêm de encontro ao

“screening” inicial realizado com os extratos obtidos em soxhlet, onde a extração clorofórmio da casca apresentou relevante atividade antimicrobiana com destaque para os microrganismos anaeróbios. Uma vez que as polaridades dos solventes diclorometano e clorofórmio são próximas, é possível sugerir com esses dados de CIM’s que a casca de *C. bakeriana* apresenta nessa polaridade compostos bioativos contra bactérias bucais aeróbias e anaeróbias. Nenhum extrato foi ativo frente a *E. faecalis* em concentrações iguais ou abaixo de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$, mostrando-se o microrganismo mais resistente aos extratos. Destaca-se mais uma vez neste trabalho, as considerações de Rios e Recio (2005), quando enfatizam que extratos brutos e compostos isolados de produtos naturais são promissores quando indicam valores de CIM’s abaixo de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e $10 \mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente.

Resultados importantes foram encontrados para os extratos PC1 (partição hexano da casca) e PF2 (partição diclorometano das folhas), uma vez que inibiram *S. mutans* e *S. sobrinus*, importantes agentes etiológicos da cárie dental com concentrações inibitórias mínimas entre $12,5$ e $25 \mu\text{g mL}^{-1}$. As amostras PC1 e PF2 foram analisadas por cromatografia à gás acoplada a espectrometria de massas, mas não foi possível identificar compostos nessas amostras por essa técnica. Posteriormente, estudos fitoquímicos serão realizados com essas amostras, haja vista a importância dos valores de CIM diante desses microrganismos e a importância dos mesmos em várias infecções bucais.

Pelo fato do extrato diclorometano da casca ter apresentado atividade antibacteriana contra a maioria dos microrganismos bucais aeróbios e anaeróbios avaliados, valores de CIM’s iguais ou abaixo de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ para várias bactérias e massa suficiente, foi determinado que com essa amostra, seria iniciado os

procedimentos cromatográficos objetivando a separação e identificação de metabólitos bioativos contra microrganismos bucais.

5.7 Fracionamento da partição diclorometano da casca (Amostra PC2) em sílica gel 60H e atividade antimicrobiana

As frações e as massas resultantes do fracionamento do extrato diclorometano da casca estão apresentadas na Tabela 29. Cada fração foi novamente submetida ao teste de atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição em caldo.

Tabela 29. Frações obtidas por cromatografia clássica do extrato diclorometano da casca e suas respectivas massas

Sistema de Eluição	Fração obtida	Massa (mg)
Hexano/Diclorometano (1:1 / 2:3)	F1	136,0
Diclorometano	F2	130,0
Diclorometano/Acetato de etila (3:2)	F3	168,0
Diclorometano/Acetato de etila (3:2)	F4	660,0
Diclorometano/Acetato de etila (3:2)	F5	288,0
Diclorometano/Acetato de etila (3:2)	F6	196,0
Diclorometano/Acetato de etila (3:2)	F7	160,0
Diclorometano/Acetato de etila (3:2)	F8	66,0
Diclorometano/Acetato de etila (1:1)	F9	41,0
Diclorometano/Acetato de etila (1:4)	F10	243,0
Acetato de etila	F11	390,0
Acetato de etila/metanol (1:1)	F12	1412,0
Metanol	F13	366,0
Metanol	F14	871,0
Água	F15	-

Os resultados das concentrações inibitórias mínimas das frações F1 a F14 estão apresentados no Quadro 6.

Quadro 6. Resultados da atividade antimicrobiana das frações obtidas a partir do fracionamento da amostra PC2.

FRAÇÕES	Concentrações inibitórias mínimas (CIM's) em $\mu\text{g mL}^{-1}$								
	ANAERÓBIAS				AERÓBIAS				
	<i>A. naeslundii</i> ATCC 19039	<i>F. Nucleatum</i> ATCC 25586	<i>B. Fragilis</i> ATCC 25285	<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	<i>E. faecalis</i> ATCC 4082	<i>S. mitis</i> ATCC 49456	<i>A. Actinom.</i> ATCC 43717	<i>S. mutans</i> ATCC 25175
F1	> 400	> 400	> 400	300	> 400	> 400	200	200	300
F2	> 400	400	300	200	400	> 400	400	400	400
F3	> 400	400	> 400	25	400	> 400	25	200	300
F4	100	200	> 400	25	100	> 400	100	200	200
F5	100	400	> 400	100	400	> 400	200	400	> 400
F6	100	400	> 400	100	400	> 400	100	200	200
F7	---	---	---	---	---	---	---	---	---
F8	> 400	400	> 400	200	> 400	> 400	400	400	400
F9	---	---	---	---	---	---	---	---	---
F10	100	400	> 400	100	400	> 400	200	200	> 400
F11	100	62,5	50	0,78	100	200	100	25	100
F12	> 400	200	> 400	6,25	> 400	> 400	400	400	> 400
F13	> 400	200	> 400	6,25	> 400	> 400	400	400	400
F14	200	50	100	3,12	400	> 400	200	200	> 400
^a CHD	1,84	1,84	1,84	3,68	1,84	7,37	3,68	7,37	0,92

---: Não apresentou massa suficiente para a avaliação antimicrobiana, ^aCHD: controle positivo (digluconato de clorexidina).

Comparando os valores das concentrações inibitórias mínimas obtidas pelas frações F1 a F14, os menores valores de CIM foram encontrados com a fração F11.

Com relação aos microrganismos aeróbios, a fração F11 apresentou menores valores de CIM comparado à amostra PC2 (partição diclorometano da caca), indicando aumento de atividade antimicrobiana. *E. faecalis* que foi resistente a todos os extratos da casca e folhas de *C. bakeriana*, a fração F11 conseguiu inibir seu crescimento com CIM de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$. Nessa etapa não foi possível realizar os testes com a bactéria aeróbia *S. sobrinus* devido a problema de crescimento desse microrganismo, por esse motivo, foi substituído pela bactéria anaeróbia facultativa Gram-negativa *H. actinomycetemcomitans*, patógeno bucal bastante agressivo, envolvido nos casos de periodontites severas em jovens e adultos (De Lorenzo, 2004). A fração F11 inibiu esse microrganismo com CIM de $25 \mu\text{g mL}^{-1}$. Os valores das CIM's da fração F11 comparados com os da amostra PC2 com relação aos microrganismos anaeróbios foram mais altos, embora as CIM's ainda indicam significativa atividade antimicrobiana com valores de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ e abaixo. Resultado bastante relevante foi encontrado com a fração F11 contra *P. gingivalis*, onde a concentração inibitória foi de $0,78 \mu\text{g mL}^{-1}$, valor mais baixo do que o encontrado pelo controle positivo.

Com a fração F11 foi realizada análise por cromatografia em camada delgada e posteriormente cromatografia em coluna utilizando sephadex como fase estacionária.

5.8 Cromatografia em coluna da fração F11 em sephadex

O fracionamento foi realizado com a amostra F11 pelo fato de ter indicado maior atividade antimicrobiana frente aos microrganismos bucais. A fração F11, quando teve a massa total de 380 mg ressuspensa em 5 mL de metanol para ser cromatografada em

sephadex, 172 mg não foi dissolvida, portanto, a massa transferida para a coluna foi de 208 mg. É possível que ocorreu a saturação da amostra F11 no volume de 5 mL de metanol ocorrendo precipitação de parte da amostra, não sendo necessariamente insolúvel em metanol. Com a fase móvel metanólica, foram obtidas 60 frações a partir da cromatografia em coluna da fração F11, que em seguida, foram monitoradas por cromatografia em camada delgada e agrupadas em 8 frações, sendo denominadas F11.1 F11.2, F11.3, F11.4, F11.5, F11.6, F11.7 e F11.8 (Tabela 30).

Tabela 30. Frações obtidas em sephadex da amostra F11

Frações reunidas por CCD	Fração obtida	Massa obtida (mg)
1-15	F11.1	79,0
6-21	F11.2	55,0
22-33	F11.3	67,0
34-36	F11.4	1,0
37-42	F11.5	1,3
43-47	F11.6	1,9
48-51	F11.7	1,4
52-60	F11.8	1,0

As amostras F11.1, F11.2 e F11.3 e a amostra remanescente que não dissolveu em metanol, denominada de ANDM (amostra não dissolvida em metanol) foram novamente submetidas aos ensaios de atividade antimicrobiana e os resultados estão no Quadro 7. As demais amostras F11.4 a F11.8 não foram avaliadas pela limitação de massa para os ensaios.

Quadro 7. Resultados de atividade antimicrobiana das frações F11.1, F11.2 e F11.3.

MICROORGANISMOS	Concentrações inibitórias mínimas (CIM's) em $\mu\text{g mL}^{-1}$				
	AMOSTRAS				
	F11.1	F11.2	F11.3	ANDM	CHD
<i>A. naeslundii</i> ATCC 19039	≥ 400	≥ 400	100	200	1,84
<i>F. Nucleatum</i> ATCC 25586	≥ 400	≥ 400	50	200	1,84
<i>B. Fragilis</i> ATCC 25285	≥ 400	≥ 400	50	25	1,84
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	≥ 400	≥ 400	12,5	100	3,68
<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	≥ 400	≥ 400	25	50	1,84
<i>E. faecalis</i> ATCC 4082	≥ 400	≥ 400	200	300	7,37
<i>S. mitis</i> ATCC 49456	≥ 400	≥ 400	12,5	50	3,68
<i>A. Actinom.</i> ATCC 43717	≥ 400	≥ 400	25	50	7,37
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	≥ 400	≥ 400	50	100	0,92

CHD: controle positivo (digluconato de clorexidina); ANDM: amostra não dissolvida em metanol.

Das quatro amostras testadas, a fração F11.3 apresentou os menores valores de CIM's. Comparando a fração F11 com a F11.3, o fracionamento possibilitou aumento de atividade antimicrobiana para os microrganismos *F. nucleatum*, *S. sanguinis*, *S. mitis* e *S. mutans*, as concentrações inibitórias mantiveram constante para *A. naeslundii*, *E.*

faecalis e *A. actinomycetecomitans*, houve perda de atividade apenas para a bactéria *P. gingivalis* com CIM de $0,78 \mu\text{g mL}^{-1}$ para $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$. Em estudos de atividades antimicrobianas de extratos brutos e frações de produtos naturais, o efeito antimicrobiano muitas vezes não se deve a um único composto, mas a um conjunto de substâncias presentes em uma amostra agindo de forma sinérgica (Cunha, 2006). O aumento da atividade antimicrobiana pode estar relacionado ao fato de que o composto ativo ou os compostos ativos estejam em mais alta concentração numa determinada fração após os procedimentos de separação cromatográfica. Em contrapartida, durante o fracionamento os compostos bioativos podem ser separados, ocorrendo diminuição do efeito antibacteriano. A amostra ANMD conseguiu inibir o crescimento de todos os microrganismos indicadores e alguns valores com CIM's abaixo de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$. Diante desses resultados, a fração AMND juntamente com a fração F11.3 foi avaliada por cromatografia em camada delgada para se ter o perfil cromatográfico das mesmas. Percebeu-se que na amostra F11.3 existia um menor número de compostos, por esse motivo, e pelos resultados de CIM's obtidos diante dos microrganismos bucais, continuou-se os procedimentos de isolamento com essa fração. Nessas análises em CCD, foi observada a presença de manchas de coloração entre amarelo-laranja, amarelo-verde e verde-azul quando reveladas com cloreto de alumínio e observadas a 254 nm, sugerindo a presença de flavonoides na amostra. Na revelação com solução etanólica de KOH a 10%, foi observado a presença de uma mancha de coloração entre o rosa e vermelho a 365 nm, sugerindo a presença de antraquinonas (Waksmundzka-Hajnos *et al.*, 2008; Wagner e Bladt, 2009). Em seguida, a fração F11.3 foi avaliada por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas.

5.9 Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas da fração F11.3

Foi proposta a análise cromatográfica por CLAE acoplada à espectrometria de massas antes de continuar os procedimentos de isolamento com essa amostra, para garantir algumas informações tais como o perfil cromatográfico da amostra, a relação massa/carga (m/z) dos íons, os espectros de massas e os espectros no ultravioleta dos compostos presentes na fração F11.3, verificando posteriormente, a possibilidade de sugerir a fórmula molecular de algum composto e a até mesmo sua estrutura ou parte dela por comparação das massas e dos espectros de massas já publicados na literatura. Foi considerada indispensável essa análise, pois não era possível ter certeza de um possível isolamento, identificação e caracterização de algum composto na amostra bioativa F11.3.

Nessa análise já se pensava na possibilidade de duas classes de metabólitos secundários, flavonoides e antraquinonas. Foram considerados dois pontos importantes, o primeiro a revelação dos compostos da fração F11.3 com solução de cloreto de alumínio e hidróxido de potássio, reagentes indicativos da possível presença de flavonoides e antraquinonas na amostra. Segundo, o fato do isolamento desses grupos de substâncias em várias espécies de *Cassia* (Júnior *et al.*, 2006; Mazumder *et al.*, 2008; Agarkar e Jadge, 1999).

Foi realizada inicialmente a comparação entre os picos obtidos no cromatograma detectados por UV/VIS DAD (Diode Array Detector - Detetor Espectrofotométrico com Arranjo do Diodo) com varredura entre 190 e 800 nm com os respectivos íons detectados por ionização por eletrospray no mesmo tempo de retenção. Foram

anotados todos os íons observados no TIC, os espectros de massas dos íons precursores e o espectro no UV que os respectivos compostos apresentaram.

O espectro das bandas de absorção dos compostos no UV/VIS é uma importante ferramenta na identificação de metabólitos, uma vez que determinadas classes de compostos apresentam bandas características no UV como é o caso dos flavonoides e antraquinonas. Os flavonoides apresentam duas principais bandas de absorção características: Banda I (300 nm – 400 nm) e banda II (240 nm – 285 nm) (Lv *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2008), enquanto as antraquinonas têm uma banda de absorção aproximadamente em 230 nm, uma segunda entre 240 nm e 260 nm (Dionex, 2009).

Numa etapa seguinte, foram propostas as fórmulas moleculares correspondentes de alguns compostos utilizando o software Fórmula Predictor. Observou-se a diferença de massa entre a massa experimental do íon e a massa teórica da fórmula prevista pelo software. O erro em ppm entre as massas foi calculado pela diferença entre a massa experimental e a massa teórica, o resultado foi dividido pela massa teórica e multiplicado por 10^6 (Mao *et al.*, 2012; Brenton e Godfrey, 2010). O erro em mDalton (mDa) foi calculado pela diferença entre a massa teórica e a massa exata, e o resultado multiplicado por 10^3 (Brenton e Godfrey, 2010). A massa experimental correspondeu a uma média das massas observadas no TIC em cada injeção.

A terceira etapa foi buscar dados já publicados na literatura sobre flavonoides e antraquinonas, comparando-os com relações massa/carga dos íons $[M-H]^+$, espectros de massas, fragmentações, tempos de retenção e espectros de ultravioleta obtidos neste estudo.

A Identificação de compostos utilizando cromatografia líquida com UV – DAD acoplado ao espectrômetro de massas utilizando a técnica IES – EM/EM

(Espectrometria de massas sequencial com “ionização” por electrospray (electrospray ionisation tandem mass spectrometry) tem-se mostrado uma técnica mais potente que a utilização exclusiva de IES – EM/EM. A determinação estrutural normalmente é conseguida através da combinação de tempos de retenção, espectros de massa (EM/EM) e de UV e espectros de massas de padrões existentes na literatura ou em bibliotecas acopladas ao equipamento. Entretanto, diferentemente da cromatografia a gás acoplada à espectrometria de massas, existe a dificuldade de se estabelecer bibliotecas confiáveis utilizando dados de EM/EM obtidos em diferentes equipamentos de cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (Dias *et al.*, 2006). Nas análises realizadas neste trabalho por CL–EM/EM (cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas em série), não foram utilizados padrões pelo fato de ainda não se ter conhecimento de nenhuma estrutura isolada com a espécie *C. bakeriana*, entretanto, foi utilizado um espectrômetro de massas de alta resolução com um software que fornece as fórmulas moleculares que mais se aproximam da molécula considerada.

Não foi encontrado na fração F11.3 íons no modo positivo. Produtos naturais que apresentam grupos ácidos podem ser desprotonados, o que permite a análise dos íons desses compostos em modo negativo $[M-H]^-$. Por outro lado, substâncias com grupamentos básicos podem ser protonadas gerando íons positivos, sendo mais adequada a análise em modo positivo. Provavelmente, a presença em baixa concentração ou até mesmo a ausência de compostos com caráter básico na amostra, não permitiu a observação de íons positivos no TIC.

A seguir serão discutidos alguns dos íons encontrados na fração F11.3 analisada por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada ao detector de ionização por

eletrospray (IES-EM/EM) e detector UV/VIS - DAD, buscando sugerir, para algumas moléculas, a estrutura e a classe de metabólitos a qual pertencem.

Na Figura 58 esta representado o cromatograma obtido da fração F11.3 no comprimento de onda 254 nm, onde na ordenada tem-se a intensidade do sinal e na abscissa o tempo de retenção dos compostos. A Figura 59 mostra o TIC em modo positivo e na Figura 60 mostra o TIC em modo negativo da fração F11.3, onde na ordenada tem-se a intensidade do sinal e na abscissa o tempo de retenção dos compostos.

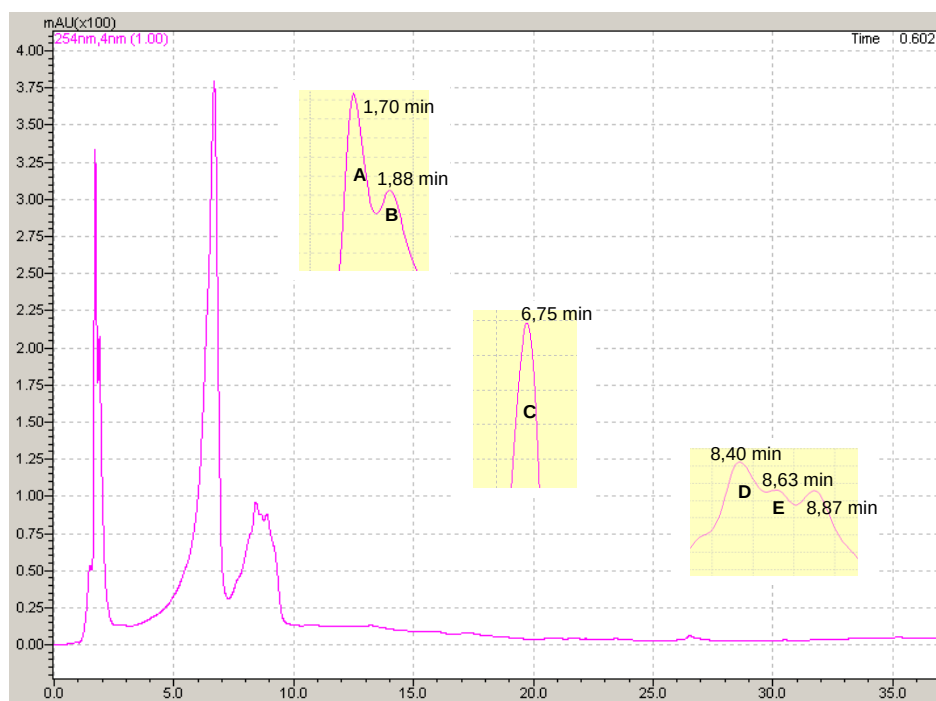


Figura 58. Cromatograma no UV (254 nm) da fração F11.3.

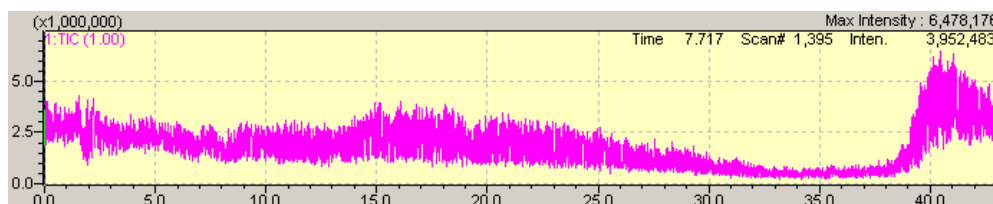


Figura 59. Cromatograma TIC da amostra F11.3 em modo positivo.

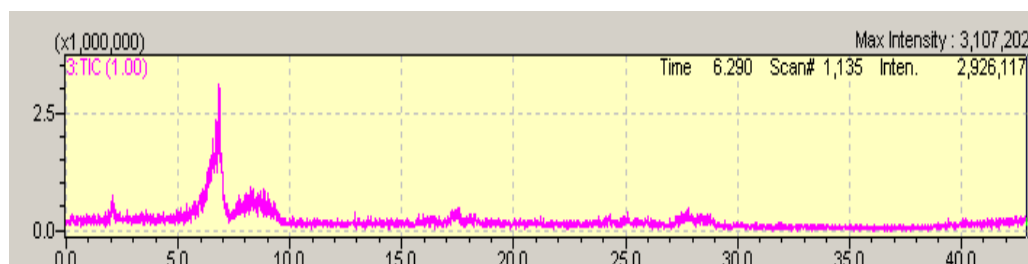


Figura 60. Cromatograma TIC da amostra F11.3 em modo negativo.

O cromatograma obtido no comprimento de onda 254 nm da amostra F11.3 coincide com o seu respectivo TIC em modo negativo no intervalo de 1 a 10 minutos, não na intensidade, mas nos componentes presentes. Isso indica que os compostos identificados no TIC nesse intervalo de tempo absorvem na região do UV.

Acima de 10 minutos, alguns picos observados no TIC detectados por fonte de ionização por eletrospray não foram observados no cromatograma com detector UV/VIS. Esse fato pode estar relacionado com a presença de compostos que não são detectados por UV/VIS ou a concentração dos mesmos está abaixo do limite de detecção para o UV/VIS.

Analisando de forma semiquantitativa o cromatograma TIC, em modo negativo, é possível obter algumas informações sobre quais componentes estão em maior concentração na amostra F11.3. Podemos observar cinco regiões no cromatograma TIC onde aparecem os picos no espectro (Figura 61).

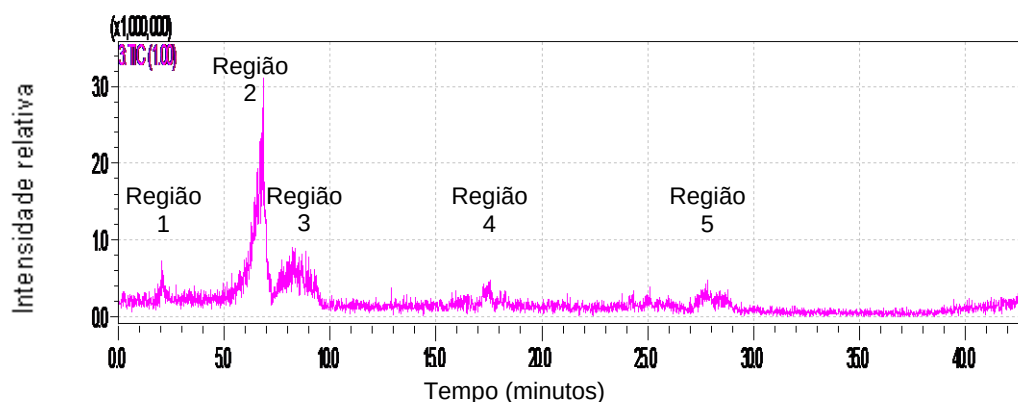


Figura 61. Regiões de picos no cromatograma TIC em modo negativo.

Na Tabela 31 estão apresentados os íons $[M - H]^-$ encontrados em cada região do espectro, intervalo de tempo e a intensidade relativa de cada uma das regiões.

Tabela 31. Relação entre a região do espectro e os íons precursores encontrados no cromatograma TIC em modo negativo

REGIÃO NO ESPECTRO	INTERVALO DE TEMPO (minutos)	ÍONS $[M - H]^-$ (m/z)	INTENSIDADE RELATIVA ($\times 10^6$)
REGIÃO 1	1,50 – 2,52	106,3068 / 180,0154 / 208,9543 / 223,1799 / 235,9868 / 184,5236 / 189,9938 / 233,0500 / 282,9341 / 290,5430 / 170,0117 / 235,0497 / 283,0215* / 299,0512* / 315,0425	0,8
REGIÃO 2	5,20 – 6,75	299,0515* / 283,0208* / 239,0322	3,2
REGIÃO 3	7,64 – 8,87	329,0679* / 313,0358* / 351,4649 / 254,0238 / 269,0443	0,9
REGIÃO 4	17,04 – 17,63	146,9618 / 294,3612 / 297,8746 / 321,3907 / 325,1790* / 325,4227 / 326,1977	0,6
REGIÃO 5	27,30 – 28,85	269,2540 / 283,2632* / 284,2677	0,6

* ÍONS PRESENTES EM MAIOR CONCENTRAÇÃO EM CADA REGIÃO DO ESPECTRO

Os íons precursores principais na amostra F11.3 são 283,0215, 299,0512 (Região 1), 299,0515, 283,0208 (Região 2), 329,0679, 313,0358 (Região 3), 325,1790 (Região 4) e 283,2677 (Região 5). Entretanto, a importância relativa dos íons encontrados nas regiões 1, 3, 4 e 5 na amostra em termos de concentração, é pequena, uma vez que, a intensidade máxima encontrada nessas regiões foi de $0,9 \times 10^6$. Verificando a intensidade relativa da região 2 ($3,2 \times 10^6$), é possível sugerir que os compostos referentes aos íons observados nessa região, estão em mais alta concentração na amostra F11.3. Analisando o cromatograma a 254 nm no mesmo intervalo de tempo (5 – 7 minutos), observa-se um pico, na mesma região 2 do cromatograma TIC, com a maior intensidade relativa, reforçando a maior concentração desses compostos na amostra e a absorção dos mesmos na região do UV. Um detalhe interessante foi a presença dos íons de m/z 283 e 299 nas regiões 1 e 2 do espectro, com massas muito próximas. É possível que estes compostos sejam de isômeros, embora os compostos da região 1 apresentem maior caráter polar.

Na Tabela 32 estão apresentados o tempo de retenção, a massa experimental do íon, a massa exata, a fórmula proposta pelo software, índice de deficiência de hidrogênio (IDH) e o erro em ppm (partes por milhão) e em mDa (milidalttons) dos íons presentes em maior concentração na amostra F11.3.

Tabela 32. Fórmula fornecida pelo software Formula Predictor para os íons mais abundantes da fração F11.3

Tempo de retenção (min)	Massa experimental [M-H] ⁻	Massa teórica [M-H] ⁻	Fórmula sugerida	IDH	Erro (ppm)	Erro (mDa)
5,99	299,0536	299,0555	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	11	- 6,3	- 1,9
6,75	283,0214	283,0242	C ₁₅ H ₈ O ₆	12	- 9,9	- 2,8
7,83	329,0651	329,0661	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	11	- 3,0	- 1,0
8,53	313,0336	313,0348	C ₁₆ H ₁₀ O ₇	12	- 3,8	- 1,2
17,39	325,1790	----	*----	----	----	----
27,83	283,2637	283,2637	C ₁₈ H ₃₆ O ₂	1	0	0

* Os dados não permitiram determinar a fórmula molecular

Como pode ser observado na Tabela 32, os íons m/z 299,0536 e m/z 283,0214 apresentaram os erros em ppm acima de 5, ou seja, valores maiores do que o recomendado para relacionar o íon [M-H]⁻ com a fórmula correspondente (Brenton e Godfrey, 2010). Com relação a essa diferença entre as massas teórica e experimental, fatores como temperatura, umidade, vibração e campo magnético local podem alterar a estabilidade de instrumentação e consequentemente a reprodutibilidade dos resultados. As variações desses fatores podem levar a medições de massa menos precisas (Webb *et al.*, 2004). Pequenas contaminações por outros compostos de mesma massa aumentam também o erro.

No cromatograma a 254 nm, no tempo de retenção 1,70 minutos observou-se um pico denominado de A (Figura 58). No mesmo tempo foi observado no cromatograma TIC, na mesma região do pico A, em modo negativo a presença dos íons de m/z 184,5236; 189,9938; 233,0500; 282,9341 e 290,5430, todos com relação de intensidade

66,67 e com relação de intensidade 100 foi encontrado o íon m/z 271,0417. No cromatograma a 254 nm, a esquerda do pico A, no tempo de retenção de 1,50 minutos foi encontrado um ombro, indicando a possível presença de outros componentes na amostra, como foi confirmado no cromatograma TIC em modo negativo. Foram observados os íons de m/z 106,3068; 180,0154; 208,9543; 223,1799 e 235,9868.

Entre 1,88 minutos até aproximadamente 2,14 minutos foi observado no cromatograma a 254 nm o pico B. Nesse mesmo intervalo de tempo foram encontrados no TIC em modo negativo os íons com m/z 170,0117 (46,27); 235,0497 (31,04); 283,0215 (69,25); 299,0512 (100) e 315,0425 (31,04). Comparando-se as relações de intensidade, os principais íons presentes nesse pico são 283,0215 e 299,0512. Mesmo programando-se o aparelho para gerar o EM/EM, a partir do EM dos precursores, o detector de ionização por eletrospray não indicou o espectro de massas de nenhum dos íons supracitados no intervalo de 1,50 minutos a 2,14 minutos. Isto indica que esses compostos apresentam forte absorção de luz no UV, mas tem fraca resposta no detector de massas com ionização por eletrospray.

No tempo de retenção 5,99 minutos, foi observado no cromatograma TIC o íon m/z 299,0515 como precursor, que por sua vez, apresentou no EM/EM o íon m/z 284,0288 (100) como pico base (Figura 62). Os fragmentos 255,0622 (40,78), 240,0365 (20,77), 227,0304 (1,08) e 211,0351 (0,54) também foram encontrados. Na Figura 63 está apresentado o espectro UV/VIS encontrado para o íon 299,0515.

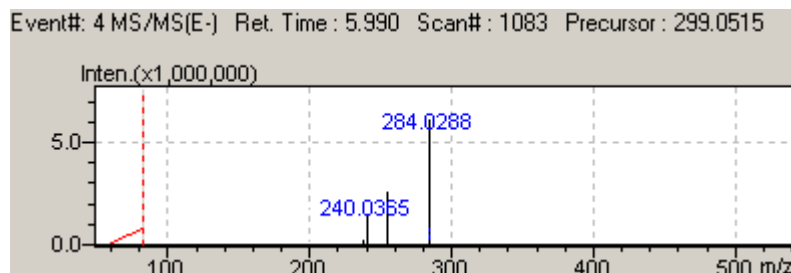


Figura 62. Espectro EM/EM obtido do íon precursor m/z 299,0515.

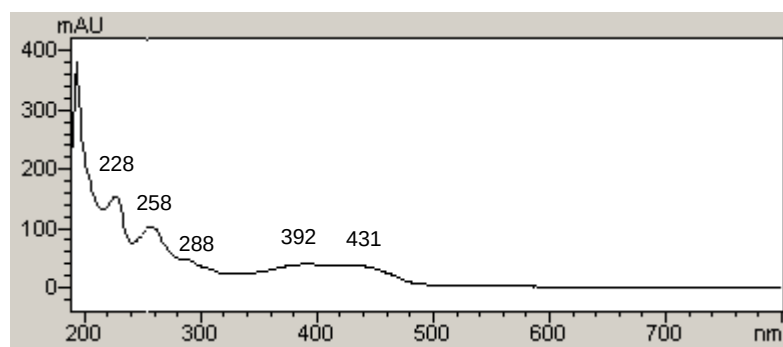


Figura 63. Espectro no UV da molécula precursora do íon de m/z 299,0515.

A fórmula molecular sugerida para a molécula precursora do íon m/z 299,0515 foi $C_{16}H_{12}O_6$ com um erro de -6.3 ppm. Analisando o espectro de massas desse íon, verifica-se que a fragmentação do composto iniciou com a perda de um radical metila $[CH_3^\bullet]$ originando o íon $[(M - H) - CH_3]^\bullet$ de m/z 284,0288 como o mais abundante. Geralmente os íons $[M - H]^-$ de antraquinonas e flavonoides com o grupo metoxila $[OCH_3]$ perdem inicialmente o radical $[CH_3^\bullet]$, originando o fragmento predominante (Justesen, 2001; Rafaelly *et al.*, 2008). A formação do fragmento m/z 255,0622 pode ser devido a perda de $HCO^\bullet$ (29u) a partir do íon $[M-H-CH_3]^\bullet$. O fragmento de m/z 240,0365 sugere que composto pode ser um ácido que libera facilmente CO_2 a partir do grupo $-COOH$. Esse tipo de clivagem parece ser bem característico quando existe a

presença do grupo carboxila no composto (Derksen *et al.*, 2002; Puchalska *et al.*, 2003). A perda de CO₂ por metabólitos secundários como flavonoides que não possuem o grupo carboxila também é relatada (Ablajan, 2011). Portanto, os fragmentos encontrados são bem característicos de antraquinonas e flavonoides que apresentam como [M-H]⁻ o íon *m/z* 299 (Justesen, 2001; Derksen *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2008).

Algumas antraquinonas foram encontradas na literatura com o mesmo perfil no espectro UV, principalmente a alizarina de massa molar de 240u (Derksen., *et al.*, 2002; Rafaelly *et al.*, 2008). Portanto, a partir dos resultados acima, a estrutura mais plausível para o composto de massa molar 300u é a de uma antraquinona ácida metoxilada.

No tempo de retenção 6,75 minutos, foi observado no cromatograma a 254 nm um pico, e na mesma região no TIC foram observados os íons [M – H]⁻ de *m/z* 283,0208; 239,0322 e 299,0531 (Figura 64). Na Figura 65 é apresentado o espectro de massas do íon 283,0208.

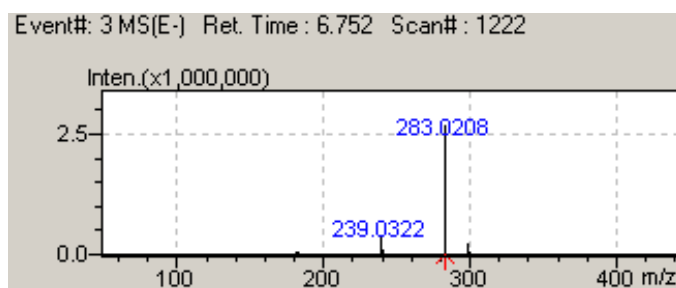


Figura 64. Íons observados a 6,75 minutos.

Nesse mesmo tempo de retenção de 6,752 minutos foi obtido o espectro de massas apenas do íon precursor *m/z* 283,0208 que apresentou como pico base o íon de *m/z* de 239,0333 (Figura 65). Na Figura 66 está apresentado o espectro do UV/VIS

gerado para o íon com m/z 283,0208. As bandas de absorção no UV ocorreram nos comprimentos de onda 228, 258, 290 e 433 nm.

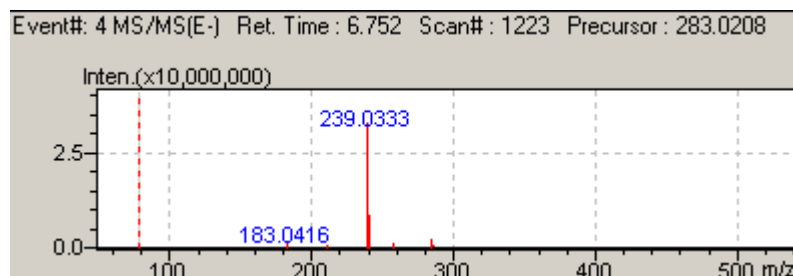


Figura 65. Espectro de massas EM/EM do íon precursor de m/z 283,0208

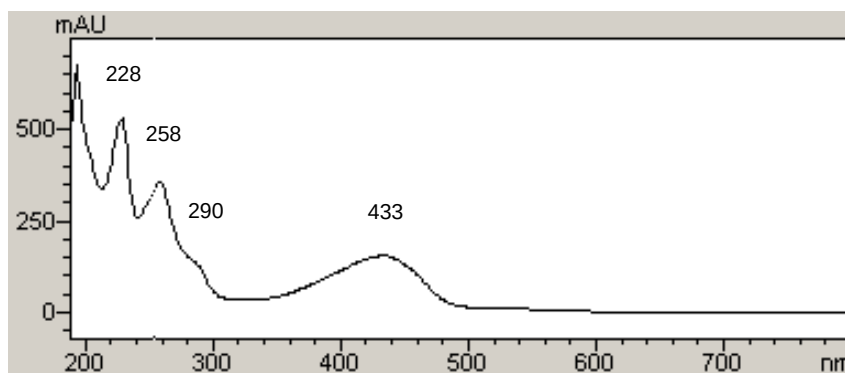


Figura 66. Espectro UV do íon precursor m/z 283,0208.

A fórmula molecular sugerida para o íon m/z 283,0208 foi $C_{15}H_8O_6$. Mesmo com o erro em ppm acima de 5%, a fórmula molecular proposta foi mantida pelos seguintes pontos: verificação da não possibilidade de outras fórmulas sugeridas pelo software, do levantamento na literatura sobre trabalhos já publicados com íons m/z 283, pela comparação do espectro de massas e UV de padrões já estudados e pela possibilidade já aventada de haver pequena contaminação por outro composto de massa molar 284.

De acordo com a comparação dos dados obtidos neste trabalho com os relatados por Duraipandiyar e Ignacimuthu (2010), Jiang *et al.* (2012), Ye *et al.* (2007), Fuh e Lin (2003); Wei *et al.* (2003) e Dionex (2009), foi possível propor que o íon de m/z 283 poderia corresponder a estrutura da antraquinona ácido 1,8-diidroxi-antraquinona-3-carboxílico, também conhecida por ácido cássico ou rhein (Figura 67) ou de algum isômero deste composto.

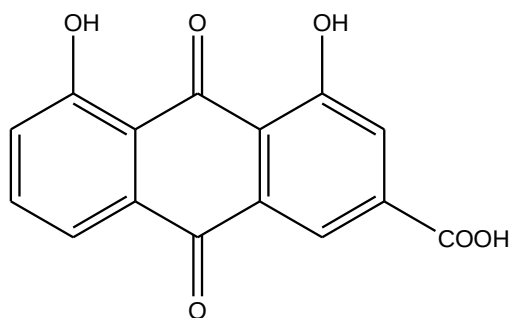


Figura 67. Antraquinona ácido 1,8-diidroxi-antraquinona-3-carboxílico.

Os fragmentos observados no EM/EM para o íon m/z 283,0208 foram também encontrados por Duraipandiyar *et al.* (2012), Duraipandiyar e Ignacimuthu (2010), Ye *et al.* (2007), Wei *et al.* (2003), e Fuh e Lin (2003). O espectro UV do íon m/z 283 foi similar ao espectro do composto rhein determinado por Dionex (2009). Além disso, outro indício forte de que essa antraquinona realmente pode estar presente na espécie *C. bakeriana*, é o fato de já ter sido isolada em várias outras espécies de *Cassia* (Mazumber *et al.*, 2008; Júnior *et al.*, 2006; Duraipandiyar e Ignacimuthu, 2010; Duraipandiyar *et al.* 2012). Outra avaliação realizada, mesmo diante das variáveis que ocorrem, foi o tempo de retenção do composto rhein encontrado em outros estudos.

A comparação do tempo de retenção de metabólitos secundários é bastante difícil, uma vez que, os trabalhos apresentam condições experimentais diferentes. É sabido que a polaridade dos solventes utilizados, o pH da fase móvel, o gradiente empregado na corrida cromatográfica, o tipo de coluna e as condições do aparelho interferem no tempo de retenção dos compostos, mesmo analisando analitos idênticos. Mas é possível ter uma noção diante das condições utilizadas, se é aceitável ou não um determinado composto apresentar um certo tempo de retenção comparado com as condições de outros trabalhos. No trabalho de Gómez-Romero *et al*, (2010), verificou-se que padrões de ácidos orgânicos apresentaram tempo de retenção (t_R) entre 1,5 a 8,5 minutos, enquanto padrões de ácidos hidroxibenzoicos indicaram t_R de 4,5 a 20,5 minutos quando foi utilizado coluna apolar e gradiente com acetonitrila/água acidificada como fase móvel. Se avaliarmos o tempo de retenção desse íon dentro da proposta dos grupos funcionais sugeridos, está de acordo com o esperado para um gradiente metanol/água em coluna apolar. As antraquinonas alizarina (1,2-diidroxi-9,10-antraquinona) e purpurina (1,2,4-triidroxi-9,10-antraquinona) apresentaram t_R entre 6 e 7 minutos em coluna apolar com solução metanólica (50% v/v) como fase móvel (Puchalska *et al.*, 2003).

Neste estudo o tempo de retenção para o íon de m/z 283 foi de 6,75 min com fase móvel metanol-água acidificada com ácido fórmico a 0,1% e coluna em fase reversa. Jiang *et al.* (2012), utilizando acetonitrila-água acidificada com ácido fórmico a 0,2% e coluna em fase reversa encontrou para o rhein o tempo de retenção de 8,5 minutos, sendo detectado pela ionização por eletrospray em modo negativo o íon de m/z 283. Os mesmos autores consideraram o rhein como um composto de média polaridade.

Em outro estudo, foi investigado em coluna de fase reversa, o efeito da variação do pH da fase móvel acetonitrila - água acidificada com solução tampão ácido acético/acetato de amônio na separação oito componentes padrão, incluindo rhein. Quando o pH foi da fase móvel foi alterado de 4,02 a 6,80 o tempo de retenção do rhein variou de 7,5 a 12,5 minutos respectivamente (Dionex, 2009). O íon m/z 283,0208 neste estudo apresentou tempo de retenção menor, condição considerada aceitável uma vez que a fase móvel com metanol é mais polar, permitindo uma eluição na coluna mais rápida.

Analisando o espectro de massas foi identificado o íon molecular com m/z 284,0268, no qual está de acordo com a fórmula molecular $C_{15}H_8O_6$. O fragmento com m/z 239,0333 predominante no EM/EM pode ter sido formado a partir da clivagem do grupo carboxila (CO_2) do íon $[M-H]^-$ de m/z 283,0208. O fragmento m/z 257,2652 pode ter resultado da degradação do anel aromático com perda de acetileno (C_2H_2) pelo íon $[M-H]^-$. Os fragmentos m/z 255 e m/z 211 podem ter originado a partir das perdas $[M-H-CO]^-$ e $[M-H-CO_2-CO]^-$, respectivamente.

No intervalo de tempo entre 7,64 minutos e 8,87 minutos foram encontrados os seguintes íons precursores pelo detector de ionização por eletrospray m/z 329,0679; 313,0358; 351,4649; 254,0238 e 269,0443. Entretanto, foi obtido o EM/EM apenas dos íons 329,0679 e 313,0297, e eles podem ser observados nas Figuras 68 e 70.

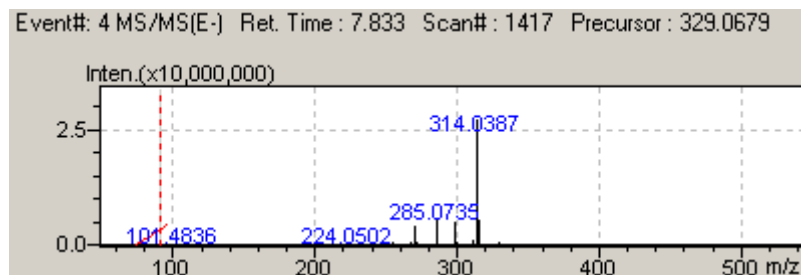


Figura 68. Espectro EM/EM do íon precursor de m/z 329,0679.

No espectro de massas do íon precursor de m/z 329,0679 $[M-H]^-$, o pico predominante foi o íon m/z 314,0387 (100), além dos fragmentos 299,0165 (13,68), 285,0735 (19,97), e 270,0496 (13,53). O espectro no UV obtido para o íon m/z 329,0679 está mostrado na Figura 69.

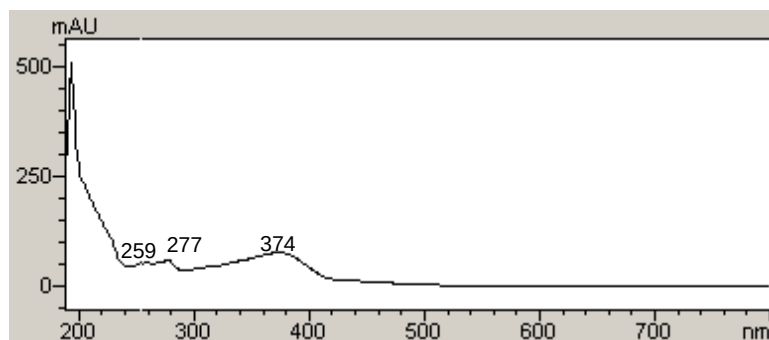


Figura 69. Espectro indicando as bandas de absorção do íon precursor m/z 329,0679.

O erro em ppm - 3.3, abaixo de 5%, sugere fortemente a fórmula molecular $C_{17}H_{14}O_7$ como provável para o íon $[M-H]^-$ com m/z 329,0679. As fragmentações observadas no EM/EM do íon 329,0679 parecem ser características de flavonoides (Duarte-Almeida *et al.*, 2007), assim como as absorções encontradas no espectro UV (Lv *et al.*, 2011, Wang *et al.*, 2008). Os fragmentos predominantes no espectro de

massas (Figura 66) são o de m/z 314,0679 $[M-H]^-$ bem como os fragmentos de m/z 299,0165; 285,0735 e 270,0496. Eles podem ter sido originados a partir da formação dos seguintes íons $[M-H-CH_3]^-$, $[M-H-CH_3-CHO]^-$ e $[M-H-CH_3-CO_2]^-$, respectivamente.

No tempo 8,53 minutos foi observado o íon molecular precursor $[M-H]^-$ de m/z 313,0297, cujo espectro de massas apresentou o íon de m/z 269,0421 como pico predominante. Ainda verificou-se no espectro de massas os fragmentos m/z 299,0151 (10,61), 287,0502 (4,92) e 254,0176 (18,45) (Figura 70). O espectro no UV obtido para o íon de m/z 313,0297 está mostrado na Figura 71.

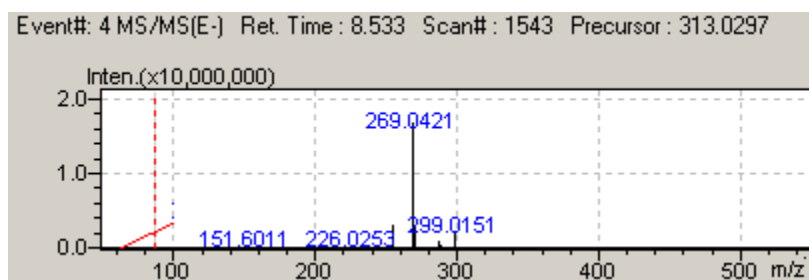


Figura 70. Espectro EM/EM do íon precursor de m/z 313,0297.

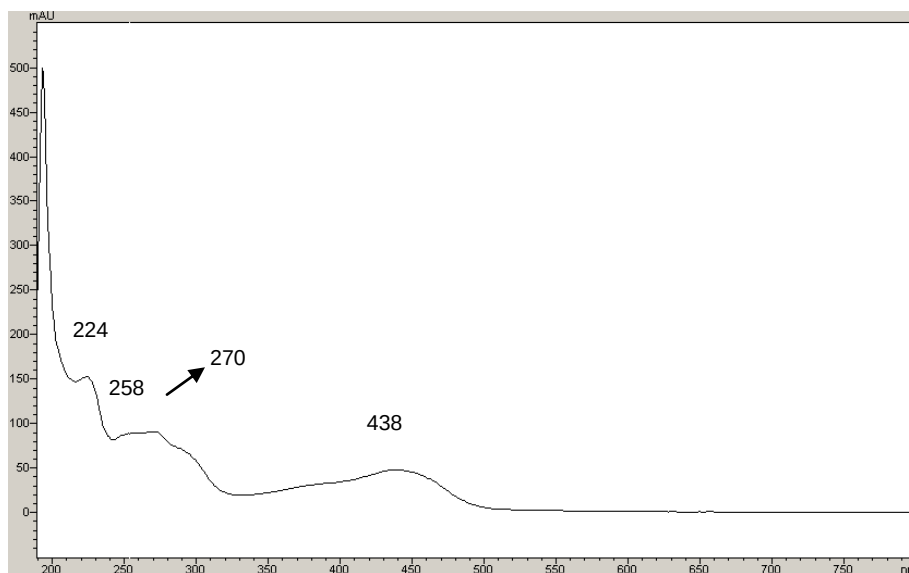


Figura 71. Espectro no UV do íon precursor de m/z 313,0297.

A fórmula molecular proposta para o composto relacionado ao íon $[M-H]^-$ com m/z 313,0297 é $C_{16}H_{10}O_7$. As fragmentações prováveis que ocorreram para originar os íons de m/z 299, 269 e 254 foram $[M-CH_3]^-$, $[M-H-CO_2]^-$ e $[M-H-CO_2-CH_3]^-$. Não foi encontrado na literatura um espectro de massas ou de UV para o íon m/z 313 que pudesse sugerir de forma conclusiva a estrutura de um flavonoide ou de uma antraquinona, embora as perdas que ocorreram no espectro de massas são bem conhecidas nesses tipos de metabólitos. É possível que a presença de traços de outros analitos, juntamente com o íon 313, interfira no espectro UV/VIS não deixando o mesmo claramente resolvido, dificultando, assim, uma possível identificação (Gomez-Romero *et al.*, 2010). Entretanto, os resultados obtidos acima, principalmente o espectro no UV, sugerem que o composto de massa molar 314 se trata de uma antraquinona com um grupo ácido e dois grupos metoxila.

No tempo de retenção 17,39 minutos, é observado no cromatograma TIC um pico que foi detectado em modo negativo pelo íon de m/z 325,1791 $[M-H]^-$ e o seu espectro de massas indicou o pico predominante de m/z 183,0113 como mostra a Figura 72. Analisando o cromatograma nesse tempo de retenção não foi observado nenhum pico, indicando que não houve absorção do componente por UV/VIS. Esse composto detectado no TIC por ionização por eletrospray no tempo 17,39 minutos, parece não ser detectado por UV/VIS ou a concentração do composto não esteve dentro do limite de detecção.

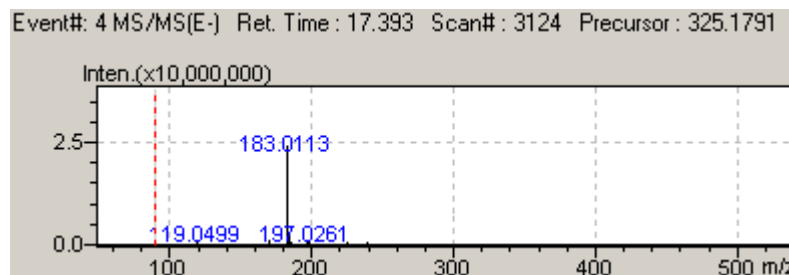


Figura 72. Espectro EM/EM do íon precursor de m/z 325,1791.

Para o íon precursor com m/z 325.1791, o espectro de massas apresentou como pico base o íon de m/z 183,0113 com intensidade 100, além dos fragmentos 197,0261 (2,22), 170,00 (3.29) e 119,0499 (3.84). Não foi possível propor uma fórmula molecular consistente para o íon 325,1791 com os dados obtidos na espectrometria de massas e pelo espectro no UV.

No tempo 27,87 minutos foram observados os íons de m/z 269,2540, 283,2632 e 284,2677 com relações de intensidade 9,37, 100 e 9,37, respectivamente (Figura 73). Não foi gerado o espectro de massas de nenhum dos precursores citados acima.

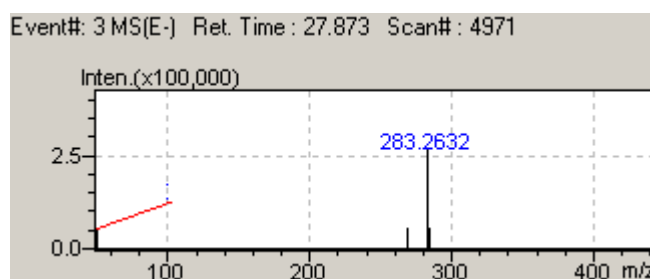


Figura 73. Íons observados no tempo de retenção de 27,87 minutos.

Foi proposta a fórmula molecular $C_{18}H_{36}O_2$ para o íon m/z 283,2632 $[M-H]^-$, onde o índice de deficiência de hidrogênio para a fórmula foi 1. Os valores das massas

teórica e experimental foram coincidentes, assim, o valor do erro em ppm entre essas massas foi 0, deixando consistente a sugestão da fórmula proposta. A fórmula molecular e o valor da massa do íon apontam para a estrutura de um ácido graxo, mais precisamente o ácido octadecanoico (ácido esteárico). O tempo de retenção encontrado para o íon de m/z 283,2632 esteve dentro da faixa de tempo de retenção esperado para ácidos graxos segundo proposto por Gomez-Romero *et al.* (2010). Nesse mesmo trabalho o íon m/z 283,2643 foi apontado como sendo o ácido octadecanoico (esteárico) (Gomez-Romero *et al.*, 2010). A Figura 74 mostra o espectro no UV/VIS do íon $[M - H]^-$ de m/z 283,2643. Não houve absorvância em nenhum comprimento de onda, o que fortalece a sugestão da presença do ácido esteárico.

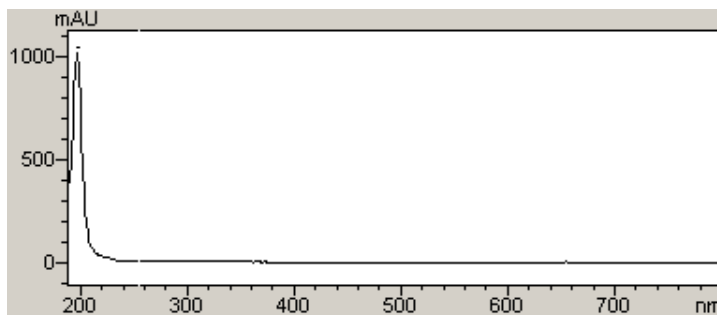


Figura 74. Espectro no UV do íon precursor de m/z 283,2643.

Após a análise dos espectros de massas, fragmentações e espectros no UV da amostra F11.3, foi possível sugerir que os principais componentes dessa fração são antraquinonas e flavonoides, podendo haver também a presença de ácidos graxos.

5.10 Cromatografia preparativa da fração F11.3 e isolamento do composto ácido 1,8-diidroxi-antraquinona-3-carboxílico

Uma massa de 65 mg da fração F11.3 foi submetida a partição com os solventes clorofórmio e metanol, originando duas novas fases denominadas F11.3c e F11.3m, respectivamente. Após a evaporação dos solventes, foi obtido com a fase F11.3c uma massa de 36 mg e com a fase F11.3m uma massa de 29 mg. A Cromatografia em camada delgada dessas frações eluídas com clorofórmio/metanol (8:2), indicou uma mancha com Rf de 0,38 para ambas as frações como se observa na Figura 75.

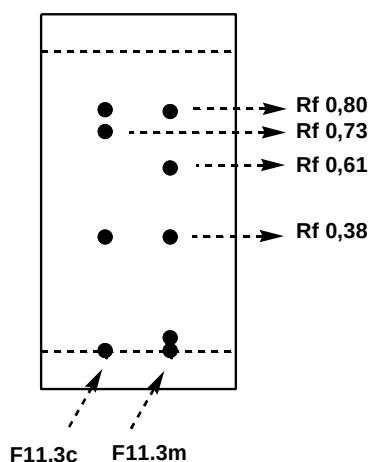


Figura 75. Cromatografia em camada delgada das frações F11.3c e F11.3m eluídas com clorofórmio/metanol (8:2).

As frações F11.3c (36 mg) e F11.3m (29 mg) foram submetidas à separação cromatográfica preparativa em placas de vidro com sílica gel 60 G de 10 cm x 20 cm. A eluição foi realizada com clorofórmio/metanol (8:2). O composto que apresentou Rf de

0,38 foi retirado das placas com a sílica, extraído com metanol/clorofórmio (1:1v/v) e em seguida, a mistura foi filtrada. O solvente foi removido em evaporador rotativo com pressão reduzida obtendo-se 8 mg de um sólido de cor amarela. Em seguida, a amostra foi submetida às análises espectroscópicas de RMN de H^1 , COSY, HSQC e IVTF.

A identificação estrutural foi realizada por espectrometria de massas, e espectroscopia de RMN de H^1 , espectroscopia no IVTF e ponto de fusão. Através das análises dos resultados o composto identificado foi ácido 1,8-diidroxi-antraquinona-3-carboxílico (ácido cássico ou rhein).

No espectro de massas do íon $[M-H]^-$ de m/z 283,0208 (Figura 76) foram encontrados os picos de m/z 284, 257, 256, 240, 211 e 183, mostrando como íon molecular o pico de m/z 284, cuja fórmula molecular proposta foi $C_{15}H_8O_6$.

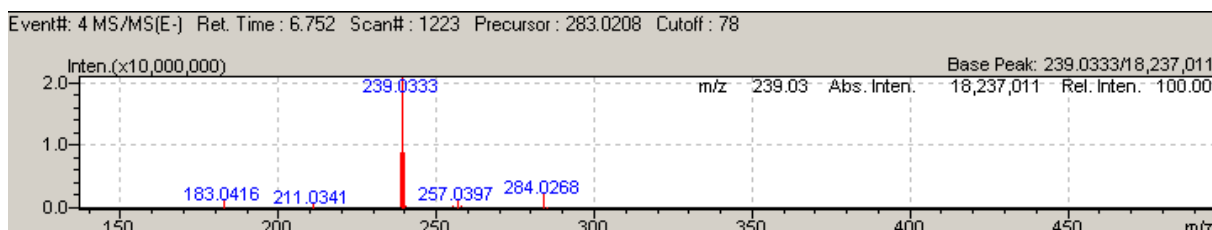


Figura 76. Espectro de massas do íon de m/z 283,0208 (Eletrospray - modo negativo).

As fragmentações no espectro de massas para o íon $[M-H]^-$ m/z 283 confirmam a estrutura do composto rhein (Figura 77).

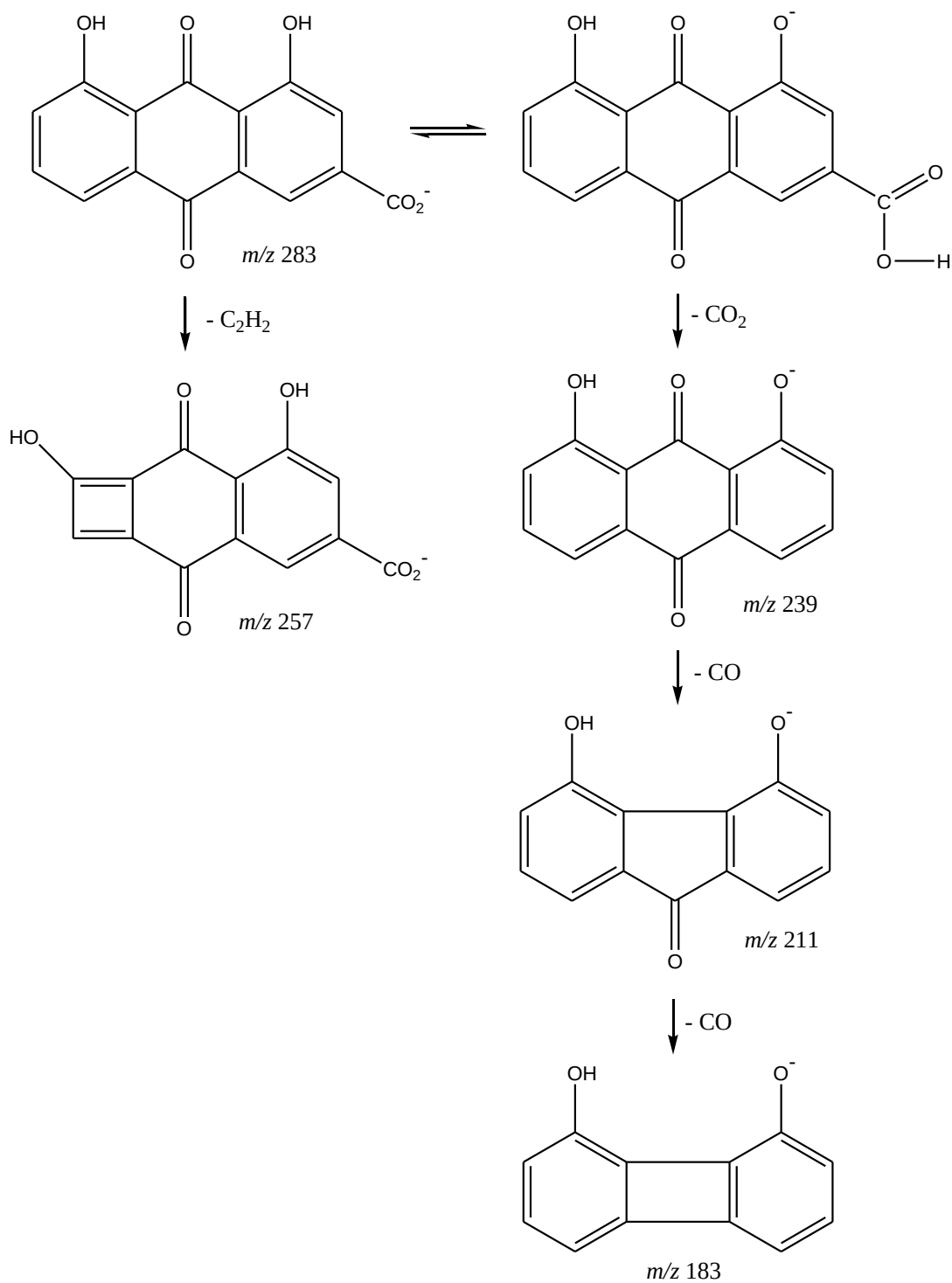


Figura 77. Proposta de fragmentações para o composto ácido 1,8-diidroxiantraquinona-3-carboxílico.

O ponto de fusão encontrado para a amostra foi de 320 °C, coerente com o encontrado por Gavit e Laddha (2010) para o composto rhein.

O RMN de H^1 (400 MHz, DMSO/ACETONA DEUTERADA) apresentou os seguintes sinais δ ppm: 11,9 (3H, largo, COOH, C_1 -OH, C_8 -OH), 8,21 (1H, s, C_4 -H), 7,36 (1H, d, $J = 8,0$ Hz, C_7 -H), 7,82 (1H, t, $J = 8,0$ Hz, C_6 -H), 7.76 – 7.74 (2H, m, C_2 -H e C_5 -H), que comparados com os estudos da Danielsen *et al.* (1992), corresponde ao composto ácido 1,8-diidroxi-antraquinona-3-carboxílico (ácido clássico ou rhein). O espectro de RMN de H^1 obtido do composto rhein está representado na Figura 78. A Figura 79 mostra a ampliação RMN de H^1 na região de aromáticos e a correspondência desses sinais com o composto rhein.

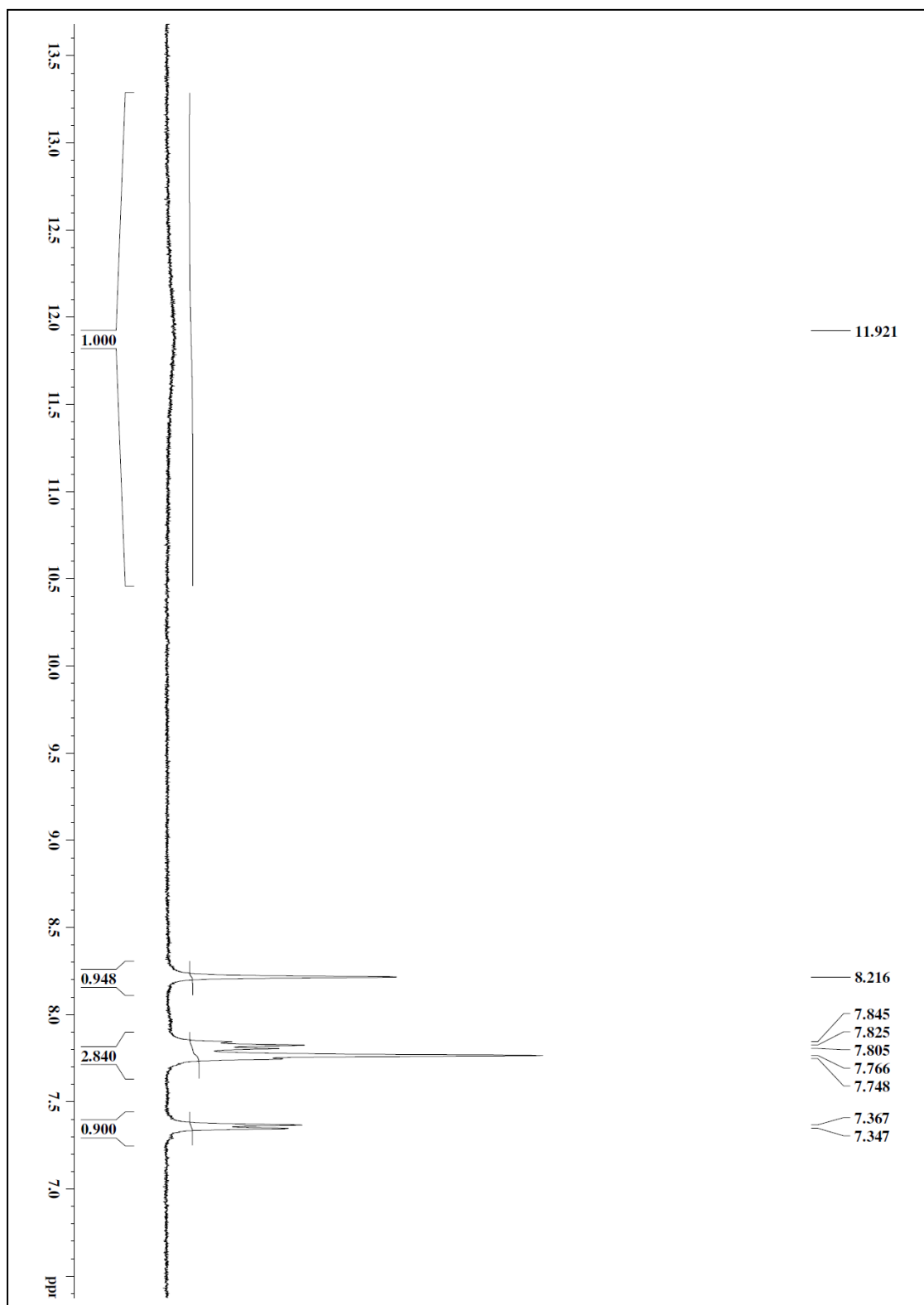


Figura 78. Espectro de RMN de H^1 (400 MHz, DMSO/ACETONA) do composto ácido 1,8-diidroxi-antraquinona-3-carboxílico isolado da espécie *C. bakeriana*.

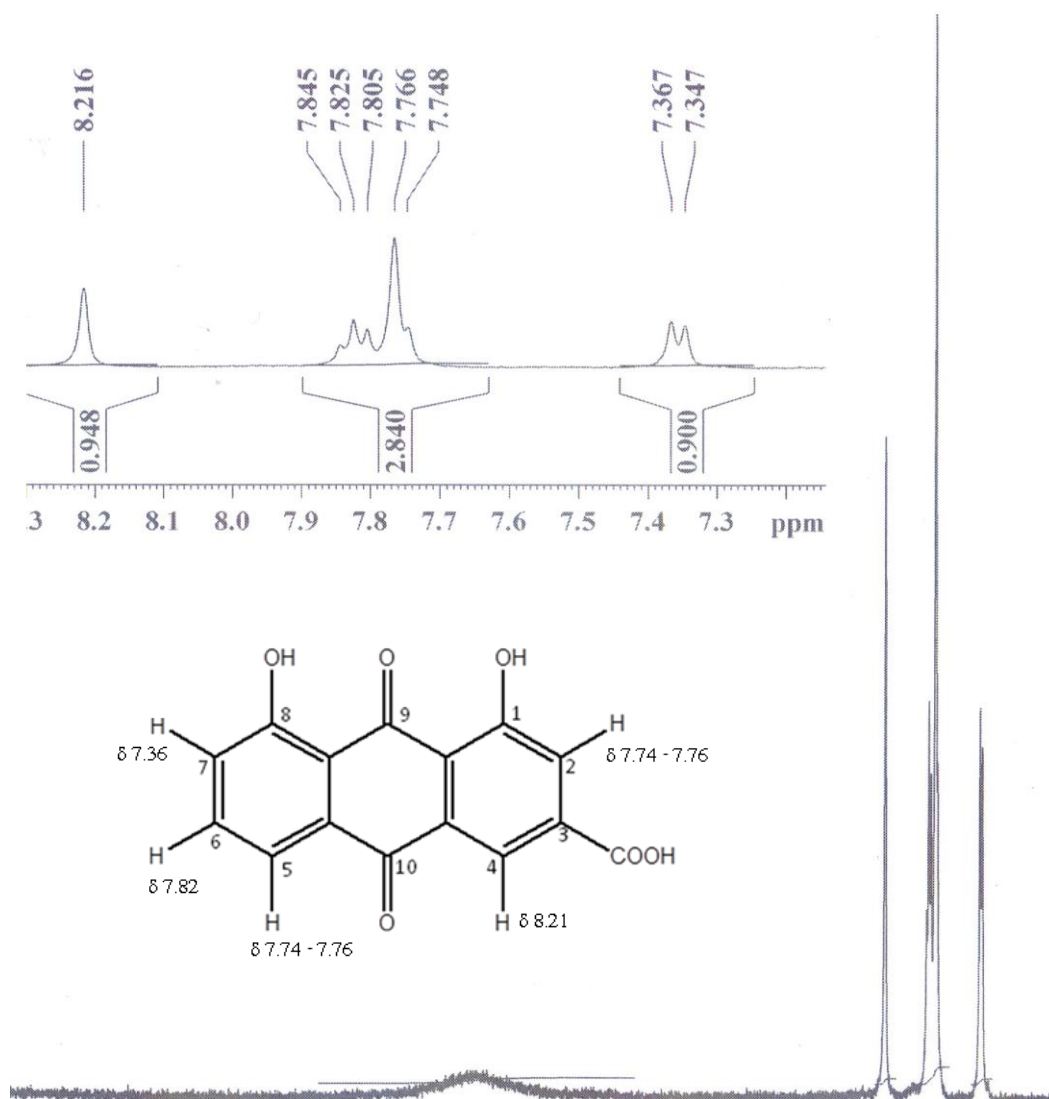


Figura 79. Relação dos sinais na região dos aromáticos com o composto ácido 1,8-diidroxi-antraquinona-3-carboxílico.

O sinal correspondente do hidrogênio fenólico é usualmente, um singlete agudo, ocorrendo geralmente um sinal entre δ 7,5 e 4,0. Entretanto, a presença de um grupo carbonila formando um sistema conjugado com o fenol, desloca a absorção do próton da hidroxila fenólica para a faixa entre δ 12,0 e 10,0 devido à formação de ligação de hidrogênio intramolecular (Figura 80) (Silverstein, *et al.*, 2007). Por esse motivo, os

sinais dos hidrogênios fenólicos ($C_1\text{-OH}$ e $C_8\text{-OH}$) estão em δ 11,9, juntamente com o sinal do hidrogênio do grupo carboxila.

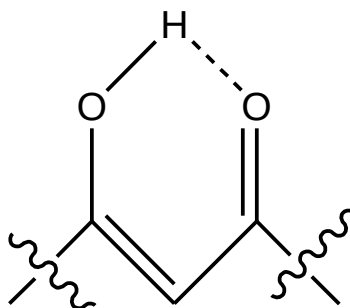


Figura 80. Ligação de hidrogênio entre o grupo fenólico e o grupo carbonila.

O RMN de H^1 indicou a presença de cinco prótons aromáticos na região entre δ 8,3 e δ 7,3. Um tripleto em δ 7,82 ($J = 8.0$ Hz) indica que o hidrogênio do carbono 6 ($C_6 - H$) está acoplado a outros dois hidrogênios. O hidrogênio do carbono 7 ($C_7 - H$) apresentou um duplete em δ 7,36 ($J = 8.0$ Hz), enquanto que o sinal do hidrogênio do carbono 5 ($C_5 - H$) está em δ 7,74 - 7,76. Era esperado um duplete para esse hidrogênio devido ao acoplamento com o $C_6 - H$. Entretanto, os hidrogênios dos carbonos 2 e 5 estão na mesma região em δ 7,74 - 7,76, ocorrendo a presença de um multiplete devido a sobreposição dos sinais.

Danielsen *et al.* (1992) propuseram a partir do RMN de ^{13}C para o rhein os seguintes sinais apresentados na Figura 81.

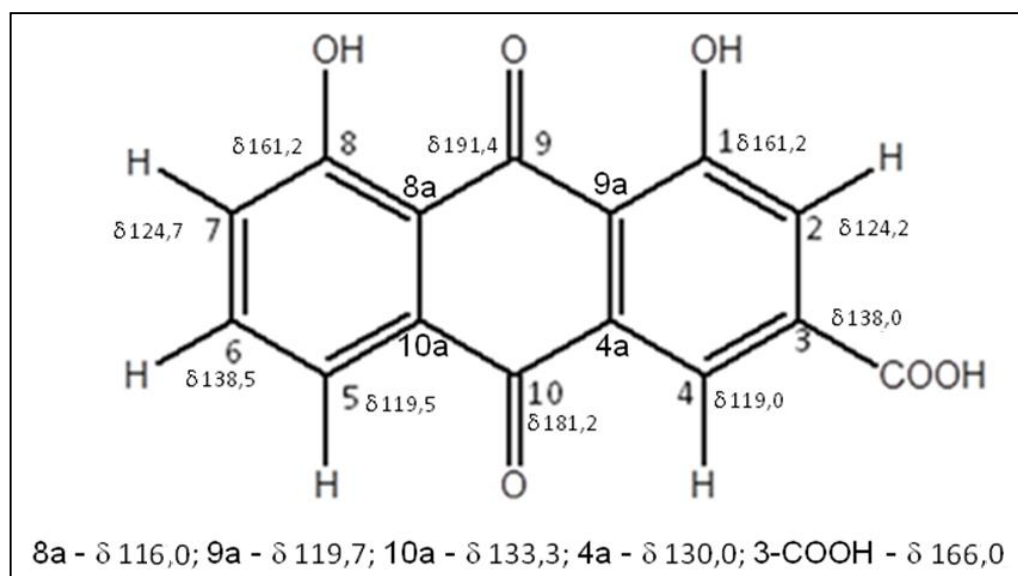


Figura 81. Sinais de RMN - ^{13}C para o composto rhein em ppm (Danielsen *et al.*, 1992).

Não foi possível obter o espectro RMN - ^{13}C para o composto isolado neste trabalho. Entretanto, através dos espectros HSQC foram extraídos os sinais de ^{13}C e comparados com valores já determinados na literatura.

Na Figura 82 está apresentado o espectro HSQC correspondente ao composto ácido 1,8-diidroxiantraquinona-3-carboxílico isolado da casca da espécie *C. bakeriana*. O espectro HSQC correlaciona acoplamentos de ligações ^1H - ^{13}C .

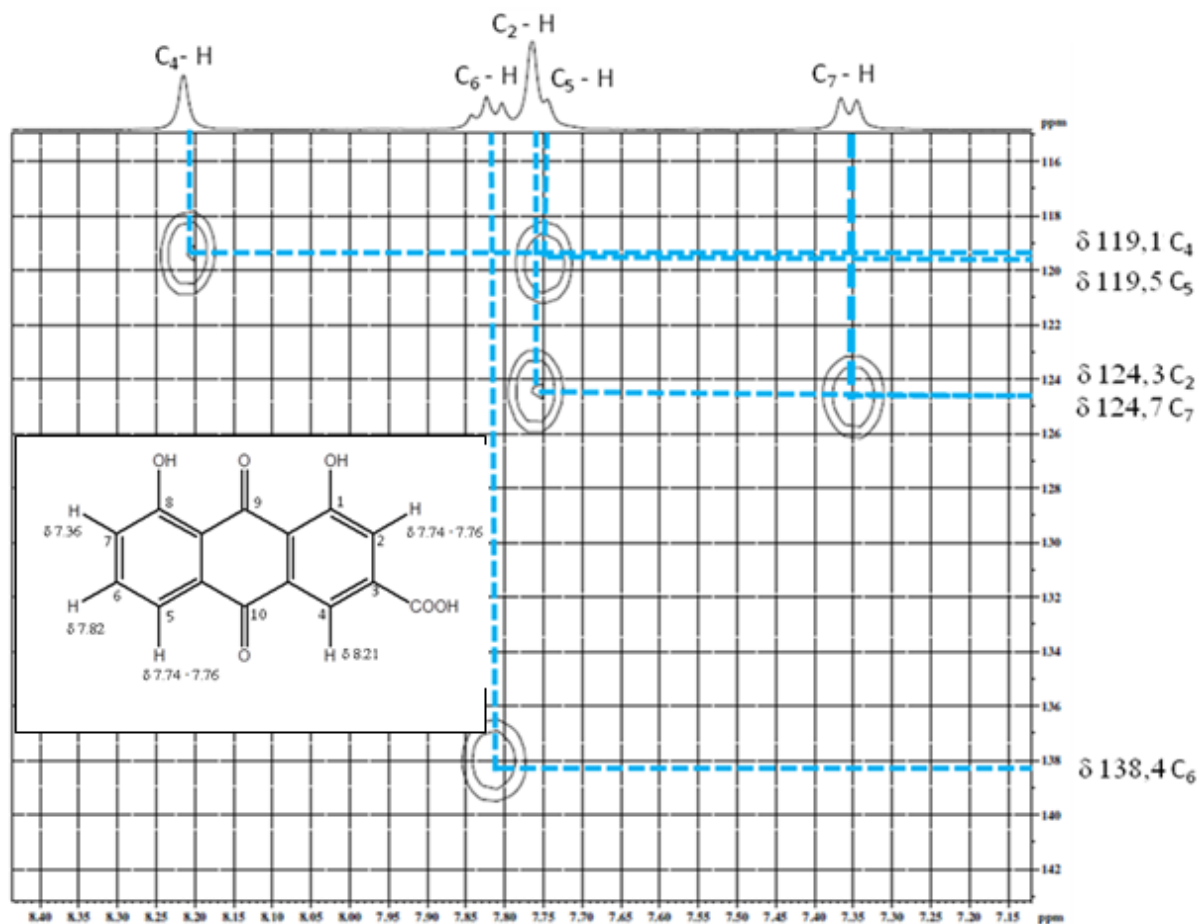


Figura 82. Espectro HSQC do composto ácido 1,8-diidroxi-antraquinona-3-carboxílico (400 MHz – DMSO/ACETONA DEUTERADA).

Correlacionando os sinais dos hidrogênios aromáticos com os respectivos sinais de ^{13}C , foi encontrado os seguintes valores em ppm: 119,1 (C_4), 119,5 (C_5), 124,7 (C_7), 138,4 (C_6) e 124,3 (C_2). Esse valores correspondem ao encontrado por Danielsen *et al.* (1992) no espectro de ^{13}C para o composto rhein. Foi atribuído na região de δ 7,74 - 7,76 do espectro de RMN de ^1H os sinais dos hidrogênios ligados aos carbonos 2 e 5. Pelo espectro HSQC, dois sinais de carbono estão correlacionados com os dois hidrogênios nessa região, um com δ 119,3 e outro com δ 124,3 sinais coincidentes aos encontrados na literatura para os carbonos 5 e 2 do composto rhein, respectivamente

(Danielsen *et al.*, 1992). Com isso, pelo HSQC foi possível atribuir que o sinal do hidrogênio 5 está em δ 7,74 e que o sinal do hidrogênio 2 está em δ 7,76.

Foi obtido também o espectro COSY para a amostra isolada. O experimento COSY ^1H - ^1H mostrou o acoplamento entre os hidrogênios vizinhos H – 6 (δ 7,82) e H – 7 (δ 7,36). Indicou também que o hidrogênio do carbono 4 não está acoplado com nenhum hidrogênio. No espectro ainda é mostrado um sinal intenso dos prótons 6, 5 e 2, entretanto, não foi possível determinar o acoplamento pelo fato dos sinais desses estarem todos na mesma região. A Figura 83 mostra o espectro COSY obtido para o composto isolado rhein.

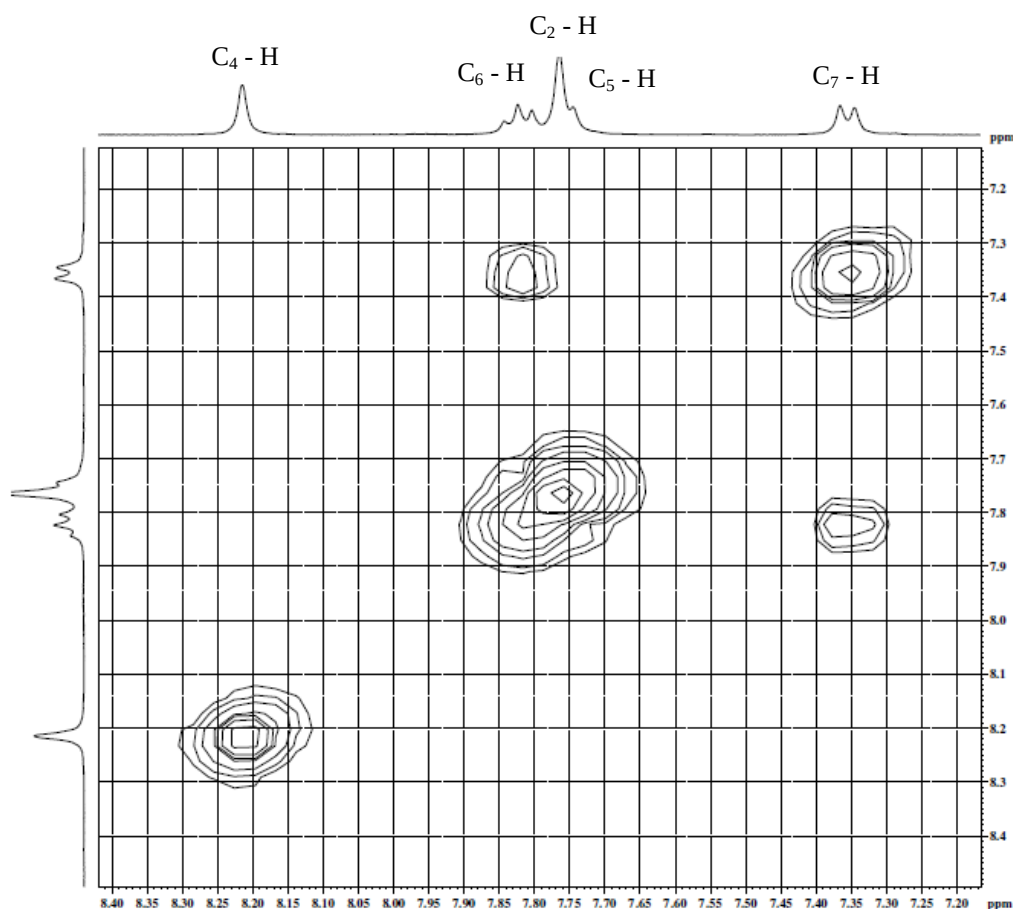


Figura 83. Espectro COSY obtido para o composto rhein (400 MHz – DMSO/ACETONA DEUTERADA).

O espectro no infravermelho do composto isolado rhein está representado na Figura 84.

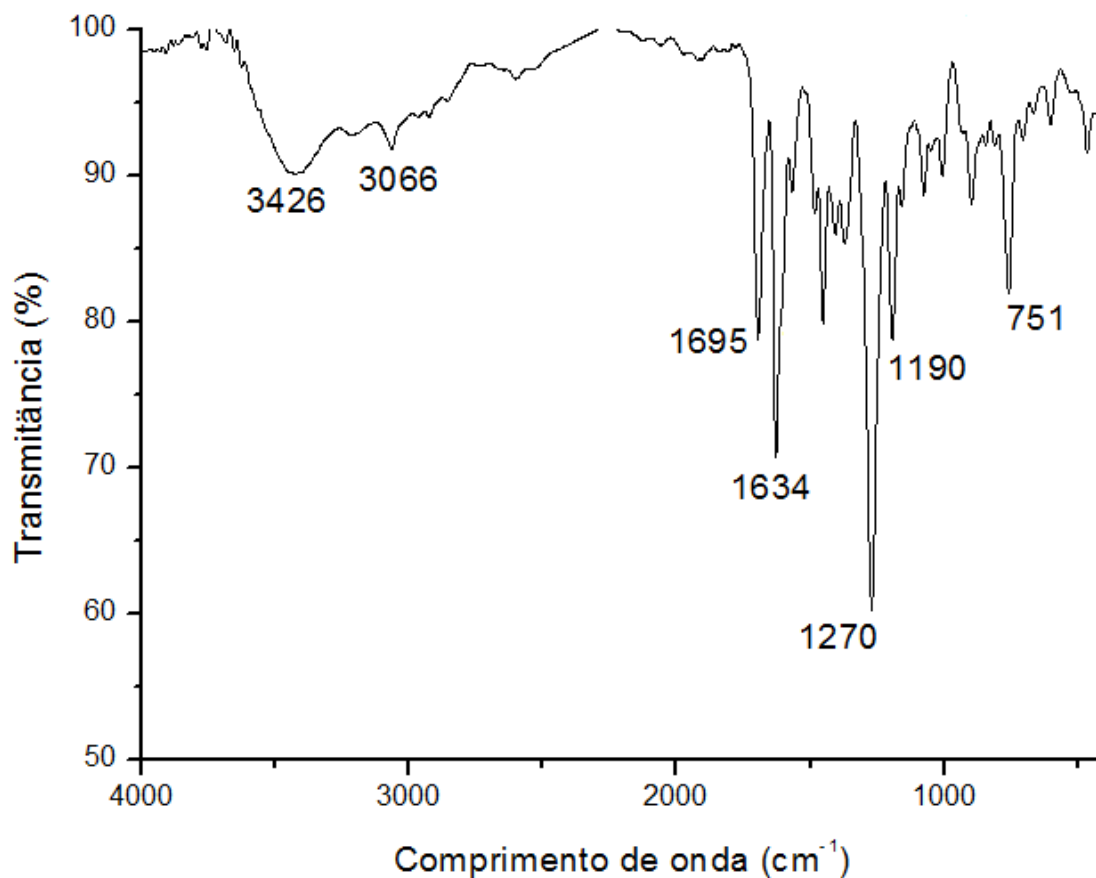


Figura 84. Espectro no infravermelho do composto ácido 1,8-diidroxi-antraquinona-3-carboxílico.

Na análise espectroscópica no infravermelho foi observado na faixa de 3200 e 3630 cm^{-1} , uma banda indicando o estiramento OH. Em 3066 cm^{-1} , estiramento C-H de aromático; 1695 cm^{-1} , estiramento C=O (carboxila); 1634 cm^{-1} , estiramento C=O (carbonila); 1270 cm^{-1} , estiramento C-O; 1190 cm^{-1} , deformação angular C=O; 751 cm^{-1} , deformação angular C-H de aromático. Entre 1700 e 2000 cm^{-1} , harmônicas.

O composto rhein foi confirmado pela comparação de infravermelho, RMN de H^1 , HSQC, COSY, espectro de massas e ponto de fusão com dados já publicados na literatura sobre o composto.

O composto rhein já foi isolado em várias outras espécies de *Cassia* como já foi mencionado (Mazumber *et al.*, 2008; Júnior *et al.*, 2006; Duraipandiyan e Ignacimuthu, 2010; Duraipandiyan *et al.* 2012) e é relacionado com várias atividades biológicas tais como antibacteriana (Kavanagh, 1947), antiviral (Barnard *et al.*, 1992), antioxidante (Vargas *et al.*, 2004), antiangiogênica (He, *et al.*, 2011), antifúngica (Duraipandiyan e Ignacimuthu, 2010) e anticâncer (Duraipandiyan *et al.*, 2012).

O composto isolado neste trabalho já é bastante conhecido na literatura. Várias propriedades farmacológicas estão bem estabelecidas para o composto rhein. Portanto, destaca-se aqui, a importância de se descobrir na espécie *C. bakeriana*, mais uma fonte deste componente bioativo.

5.11 Atividade antimicrobiana do composto ácido 1,8-diidroxi-antraquinona-3-carboxílico (rhein)

Está apresentado no quadro 8 os valores das concentrações inibitórias mínimas encontradas para o composto (rhein).

Quadro 8. Concentrações inibitórias mínimas para o composto rhein.

Amostras avaliadas	Concentração inibitória mínima (CIM) – µg mL ⁻¹									Atividade citotóxica CC ₅₀ – µg mL ⁻¹	ÍNDICE DE SELETIVIDADE
	Microrganismos										
	Anaeróbicos					Aeróbicos					
	<i>F. nucleatum</i> (ATCC 25586)	<i>A. naeslundii</i> (ATCC 19039)	<i>P. gingivalis</i> (ATCC 33277)	<i>B. fragilis</i> (ATCC 25285)	<i>P. nigrescens</i> (ATCC 33563)	<i>S. sanguinis</i> (ATCC 10556)	<i>S. mitis</i> (ATCC 49456)	<i>S. mutans</i> (ATCC 25175)	<i>E. faecalis</i> (ATCC 4082)	Células Vero (ATCC CCL 81)	IS = log [CC ₅₀] / [MIC]
PC2	12,5	12,5	100	20	200	100	200	400	>400	325±24	0,21
F11.3	50	100	12,5	50	---	25	12,5	50	200	196±24	0,29
Rhein	*	20	25	*	3,12	>200	>200	>200	*	*	*
CHD	1,84	1,84	3,68	1,84	1,84	1,84	3,68	0,92	7,35	--	--

*: Não foi determinado (quantidade de amostra insuficiente para o ensaio); ---: não foi realizado; PC2: partição diclorometano da casca; F11.3: fração F11.3; rhein: composto isolado; CHD: controle positivo – digluconato de clorexidina.

Por se tratar de um composto purificado, o protocolo da atividade antimicrobiana para o composto rhein foi reduzido avaliando concentrações inibitórias mínimas entre 0,78 e 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Houve também uma redução no número de microrganismos utilizados nos ensaios, pelo fato de não haver quantidade suficiente de amostra para os testes. De acordo com os resultados de CIM's no quadro 8, observa-se que o composto rhein não mostrou-se ativo contra as bactérias aeróbicas quando testadas concentrações de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ou abaixo. Houve perda de atividade antimicrobiana quando as CIM's do composto isolado são comparadas com as CIM's da fração F11.3 e do extrato diclorometano (amostra PC2). É possível que a atividade antimicrobiana do extrato PC2

e da fração F11.3 esteja relacionada a um sinergismo de compostos presentes nas amostras. O composto isolado não é ativo frente aos microrganismos bucais aeróbios testados em baixas concentrações. Entretanto, quando se observa os valores das concentrações inibitórias mínimas do composto rhein frente aos microrganismos anaeróbios, percebeu-se que os valores das CIM's estiveram em baixas concentrações entre 3,12 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$, indicando forte atividade contra os anaeróbios, com valores próximos e abaixo do que é considerado promissor para compostos isolados de produtos naturais, que é de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Rios e Recio, 2005).

Com relação aos ensaios de citotoxicidade, a fração F11.3 indicou menor valor de concentração citotóxica (CC_{50}) quando comparada ao extrato diclorometano, indicando maior toxicidade. Entretanto, considerando valores de CIM's até 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o extrato diclorometano e até 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a fração F11.3, observa-se que as concentrações citotóxicas estão acima desses valores respectivamente para cada uma das amostras, além disso, os índices de seletividade com valores positivos indicam que ambas as amostras apresentam maior seletividade contra os microrganismos bucais, que toxicidade para células Vero (Case *et al.*, 2006). Não foi realizado com o composto rhein, o ensaio de citotoxicidade. O composto rhein indicou maior especificidade contra os microrganismos anaeróbios. Outros testes de citotoxicidade serão futuramente realizados para avaliar com mais propriedade a toxicidade das amostras bioativas PC2 e F11.3 e do composto rhein.

Futuramente serão propostas modificações na estrutura do composto rhein para avaliações de estrutura – atividade e ensaios de citotoxicidade.

6. Conclusões

A casca de *C. bakeriana* possui maior teor de extrativos que a madeira, embora o teor de extrativos na madeira seja elevado comparado com outras madeiras de folhosas. Isso sugere que a madeira de *C. bakeriana* pode ser resistente aos processos de biodegradação. A presença de compostos fenólicos e proantocianidinas nos extrativos da madeira podem garantir a sua preservação.

O extrato etanólico da casca apresentou maior teor de fenóis e proantocianidinas que o extrato etanólico da madeira. Comparando a madeira de *C. bakeriana* com outras espécies de madeira, a de *C. bakeriana* possui elevado teor de proantocianidinas.

Analisando os extratos da casca e das folhas separadamente, o teor de fenóis totais e proantocianidinas aumentou com o aumento da polaridade da amostra.

Os extratos da madeira, casca e folhas de *C. bakeriana*, evidenciaram forte atividade antioxidante, com exceção dos extratos hexânicos. Analisando os resultados de CE_{50} para as folhas e casca, houve aumento da atividade antioxidante com o aumento da concentração de fenóis. As amostras mais ativas, E₅, E₆ e PF₄ apresentaram baixa toxicidade para células Vero.

O extrato metanólico das folhas apresentou a maior atividade antioxidante com CE_{50} de 8,67 $\mu\text{g mL}^{-1}$, valor próximo ao encontrado para o BHT, utilizado na indústria alimentícia e como controle positivo neste trabalho.

Os óleos essenciais das folhas e casca indicaram baixa concentração de terpenos e forte atividade antimicrobiana com CIM's entre 62,5 e 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra bactérias bucais aeróbias e anaeróbias. O índice de seletividade indicou que os óleos são mais ativos contra as bactérias que tóxicos para células Vero.

A desreplicação da amostra F11.3 originada do fracionamento do extrato diclorometano da casca, indica que a mesma pode ser constituída principalmente de flavonoides, antraquinonas e ácidos graxos.

O composto ácido 1,8-diidroxi-antraquinona-3-carboxílico (rhein) foi isolado da fração F11.3 e identificado por RMN de H^1 , HSQC, COSY, IVTF, espectro de massas e ponto de fusão. O íon de m/z 283,0208 presente na fração F11.3 é o composto 1,8-diidroxi-antraquinona-3-ácido carboxílico (rhein).

A fração F11.3 indicou promissora atividade antimicrobiana com CIM's entre 12,5 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para a maioria das bactérias bucais indicadoras.

Um dos componentes bioativos na amostra F11.3 é o composto rhein, que apresentou maior atividade antimicrobiana contra as bactérias bucais anaeróbias.

O composto rhein é um promissor agente antimicrobiano contra bactérias bucais anaeróbias.

REFERÊNCIAS

- AAS, J. A., GRIFFEN, A. L., DARDIS, S. R., LEE, A. M., OLSEN, I., DEWHIRST, F. E. Bacteria of dental caries in primary and permanent teeth in children and young adults. ***Journal of Clinical Microbiology***, v. 46, n. 4, p. 1407-1417, 2008.
- AAS, J. A., PASTER, J. B., STOKES, N. L., OLSEN, I., DEWHIRST, E. F. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. ***Journal of Clinical Microbiology***, v. 43, n. 11, p. 5721-5732, 2005.
- ABDILLE, M. H., SINGH, R. P., JAYAPRAKASHA, G. K., JENA, B. S. Antioxidant activity of the extracts from *Dillenia indica* fruits. ***Food Chemistry***, v. 90, n. 4, p. 891-896, 2005.
- ABLAJAN, K. A study of characteristic fragmentation of isoflavonoids by using negative ion ESI-MSⁿ. ***Journal of Mass Spectrometry***. v. 46, p. 77-84, 2011.
- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy**. 4. ed. Carol Stream, Illinois: Allured Publishing Corporation, 2007. p 803.
- AGARKAR, S. V., JADGET, D. R. Phytochemical and pharmacological investigations of Genus Cassia: A review. ***Asian Journal of Chemistry***, v. 11, n. 2, p. 295-299, 1999.
- AGNANIET, H., BIKANGA, R., BESSIÈRE, J. M., MENUT, C. Essential oil constituents of *Cassia alata* (L.) from Gabon. ***Journal of Essential Oil Research***, v. 17, n. 4, p. 410–412, 2005.
- AHMAD, I., AQIL, F., OWAIS, M. **Modern Phytochemistry – Turning medicinal plants into drugs**. Weinheim: Wiley-VCH, 2006.
- AHMED, S., ZAHID, A., ABIDI, S., MEER, S. Anti-emetic activity of four species of Genus *Cassia* in chicks. ***Journal of Pharmacy***, v. 2, n. 3, p. 380-384, 2012.

ALAM, S., BRAILSFORD, S.R., ADAMS, S., ALLISON, C., SHEEHY, E., ZOITPOULOS, L., KIDD, E.A., BEIGHTON, D. Genotypic heterogeneity of *Streptococcus oralis* and distinct aciduric subpopulations in human dental plaque. ***Applied Environment Microbiology***, v. 66, n. 8, p. 3330-3336, 2000.

ALLAKER, R. P., DOUGLAS, C. W. I. Novel anti-microbial therapies for dental plaque-related diseases. ***International Journal Antimicrobial Agents***, v. 33, n. 1, p. 8-13, 2009.

AMBROSIO, S. R., FURTADO, N. A. J. C., DE OLIVEIRA, D. C. R., DA COSTA, F. B., MARTINS, C. H. G., DE CARVALHO, T. C., PORTO, T. S., VENEZIANI, R. C. S. Antimicrobial activity of kaurane diterpenes against oral pathogens. ***Zeitschrift für Naturforsch***, v. 63, n. 5-6, p. 326-330, 2008.

ANDERSEN, O. M., MARKHAN, K. R. **Flavonoids – chemistry, biochemistry and applications**. New York: Taylor & Francis group, 2006. 1212 p.

AQUINO, F. J. T., CANELHAS, B. B., CUNHA, L. C. S., SOUZA, L. C., BARROS, T. T., CHANG, R., NASCIMENTO, E. A., SOUZA, M. G. M., CUNHA, W. R., MARTINS, C. H. G. Essential oil composition and extracts of *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze with antioxidant and antimicrobial activity. ***Latan American Journal of Pharmacy***, v. 32, n. 3, p. 371–377, 2013.

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, n. 5, p. 1224-1229, 2008.

ARUOMA, O. Free radicals, oxidative stress, and antioxidants in human health and disease. ***Journal of the American Oil Chemist's Society***, v. 75, n. 2, p. 199-212, 1998.

ASIKAINEN, S., ALALUUSUA, S., SAXEN, L. Recovery of *A. actinomycetemcomitans* from teeth, tongue, and saliva. ***Journal of Periodontology***. v. 62, n. 3, p. 203-206, 1991.

BAKKALI, F., AVERBECK, S., AVERBECK, D., IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils - A review. ***Food and Chemical Toxicology***, v. 46, n. 2, p. 446–475, 2008.

BARBOSA, L. C. A. **Introdução à Química Orgânica**. 2. ed. São Paulo: Pearson Prentice Hall, 2011.

BARNARD, D. L., HUFFMAN, J. H., MORRIS, J. L, WOOD, S. G., HUGHES, B. G., SIDWELL, R. W. Evaluation of the antiviral activity of anthraquinones, anthrones and anthraquinone derivatives against human cytomegalovirus. ***Parasitology Research***, v. 17. n.1, p. 63-77, 1992.

BERNARDES, W. A., LUCARINI, R., TOZATTI, M. G., SOUZA, M. G. M., ANDRADE SILVA, M. L., DA SILVA FILHO, A. A., MARTINS, C. H. G., MILLER CROTTI, A. E., PAULETTI, P. M., GROPPPO, M., CUNHA, W. R. Antimicrobial activity of *Rosmarinus officinalis* against Oral Pathogens: Relevance of carnosic acid and carnosol. ***Chemistry & Biodiversity***, v. 7, n. 7, p. 1835-1840, 2010.

BIZZO, H. R., HOVELL, A. M. C., REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. ***Química Nova***, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. Use a free radical method to evaluate antioxidant activity. ***Food Science and Technology***, v.28, n. 1, p.25-30, 1995.

BREITMAIER, E. **Terpenes: flavors, fragrances, pharmaca and pheromones**. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2006. 214 p.

BRENTON, A. G., GODFREY, A. R. Accurate mass measurement: terminology and treatment of data. ***Journal of the American Society for Mass Spectrometry***, v. 21, n. 11, p. 1821-35, 2010.

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, n. 2, p.156-161, 2007.

BROWNING, B. L. **Methods of Wood Chemistry**. New York: Interscience, 1967. 496 p. v. 2.

BRUICE, P. Y. **Química Orgânica**. Brasil: Pearson Education, 2006. 704 p. v. 2.

BOTELHO, G. M. L., SANTANA, M. A. E., ALVES, M. V. S. Caracterização química, durabilidade natural e tratabilidade da madeira de seis espécies de eucaliptos plantados no Distrito Federal. ***Revista Árvore***, v. 24, n. 1, p. 115-121, 2000.

BOTELHO, M. A., NOGUEIRA, N. A., BASTOS, G. M., FONSECA, S. G., LEMOS, T. L., MATOS, F. J., MONTENEGRO, D., HEUKELBACH, J., RAO, V. S., BRITO, G. A. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. ***Brazilian Journal of Medical and Biological Research***, v. 40, n. 3, p. 349–356, 2007.

BOUCHRA, C., ACHOURI, M., HASSANI, L. M. I., HMAMOUCI, M. Chemical composition and antifungal activity of essential oils of seven *Moroccan Labiatae* against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 89, n. 1, p. 165–169, 2003.

BOZIN, B., MIMICA-DUKIC, N., SIMIN, N., ANACKOV, G. Characterization of the volatile composition of essential oils of some lamiaceae spices and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 54, n. 5, p. 1822–1828, 2006.

BUTLER, M. S. The role of natural product chemistry in drug discovery. **Journal of Natural Products**, v. 67, n. 12, p. 2141-2153, 2004.

CARRIL, E. P. U., GARCÍA, A. A. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca**, v.2, n. 3, p. 119-145, 2009.

CARVALHO, T. C., SIMÃO, M. R., AMBRÓSIO, S. R., FURTADO, N. A., VENEZIANI, R. C., HELENO, V. C., DA COSTA, F. B., GOMES, B. P., SOUZA, M. G., REIS, R. B. Antimicrobial activity of diterpenes from *Viguiera arenaria* against endodontic bacteria. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 543–551, 2011.

CASE, R. J., FRANZBLAU, S. G., WANG, Y., CHO, S. H., SOEJARTO, D. D., PAULI, G. F. Ethnopharmacological evaluation of the informant consensus model on anti-tuberculosis claims among the Manus. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 106, n. 1, p. 82–89, 2006.

CHA, J. D. Chemical composition and antibacterial activity against oral bacteria by the essential oil of *Artemisia iwayomogi*. **Journal of Bacteriology and Virology**, v. 37, n. 3, p. 129–136, 2007.

CHANG, R., MORAIS, S. A. L., NASCIMENTO, E. A., CUNHA, L. C. S., ROCHA, E. O., AQUINO, F. J. T., SOUZA, M. G. M., CUNHA, W. R., MARTINS, C. H. G. Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of *Campomanesia pubescens* O. Berg, Native of Brazilian Cerrado. **Latan American Journal of Pharmacy**, v. 30, n. 9, p. 1843–1848, 2011.

CHIBALE, K., CHOUTEAU, F., LATEGAN, C. A., MAHARAJ, V. J., PILLAY, P., SMITH, P. J., VLEGGAAR, R. Antiplasmodial hirsutinolides from *Vernonia staehelinoides* and their utilization towards a simplified pharmacophore. **Phytochemistry**, v. 68, n. 8, p. 1200–1205, 2007.

CHUNG, J. Y., CHOO, J. H., LEE, M. H., HWANG, J. H. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. ***Phytomedicine***, v. 13, n. 4, p. 261–266, 2006.

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, n. 3, 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, 7 ed., v. 26, 2006.

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

COELHO, A. A. M., PAULA, J. E. D., ESPÍNDOLA, L. S. Insecticidal activity of cerrado plant extracts on *Rhodnius milesi* Carcavallo, Rocha, Galvão & Jurberg (Hemiptera: Reduviidae), under laboratory conditions. ***Neotropical Entomology***, v. 35, n. 1, p. 133-138, 2006.

CONDE E., CADAHIA E., DIEZ-BARRA R., GARCIA-VALLEJO M. C. Polyphenolic composition of bark extracts from *Eucalyptus camaldulensis*, *E. globulus* and *E. rudis*. ***Holz als Roh—und Werkstoff***, v. 54, n. 3, p. 175–181, 1996.

COS, P., VLIETINCK, A. J., BERGHE, D. V., MAES, L. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro 'proof-of-concept'. ***Journal of Ethnopharmacology***, v. 106, n. 3, p. 290-302, 2006.

CUMMINS, D., CREETH, J. E. Delivery of antiplaque agents from dentifrices, gels, and mouthwashes. ***Journal Dental Research***, v. 71, n. 7, p. 1439-1449, 1992.

CUNHA, L. C. S., SILVA, M. L. A., FURTADO, N. A. J. C., VINHÓLIS, A. H. C., MARTINS, C. H. G., FILHO, A. A. S., CUNHA, W. R. Antibacterial activity of triterpene acids and semi-synthetic derivatives against oral pathogens. **Zeitschrift für Naturforsch**, v. 62c, n. 9-10, p. 668-672, 2007.

CUNHA, W. R., CREVELIN, E. J., ARANTES, G. M., CROTTI, A. E. M., SILVA, M. L. A., FURTADO, N. A. J. C., ALBUQUERQUE, S., FERREIRA, D. S. A study of the trypanocidal activity of triterpene acids isolated from Miconia species. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 6, p. 474-478, 2006.

DANIELSEN, K., AKSNES, D. W., FRANCIS, G. W. NRM Study of some anthraquinones from Rhubard. **Magnetic Resonance in Chemistry**, v. 30, p. 359-363, 1992.

DANISHEFSKY, S. On the potential of natural products in the discovery of pharma leads: A case for reassessment. **Natural Products Reports**, v. 27, n. 8, p. 1114-1116, 2010.

DAVE, H., LEDIWANE, L. A review on anthraquinones isolated from Cassia species and their applications. **Indian Journal of Natural Products Resources**, v. 3, n. 3, p. 291-319, 2012.

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

DE MESQUITA, M. L., GRELLIER, P., MAMBU, L., DE PAULA, J. E., ESPINDOLA, L. S. *In vitro* antiplasmodial activity of Brazilian Cerrado plants used as traditional remedies. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 1, p. 165-170, 2007.

DERKSEN, G. C. H., NIEDERLANDERB, H. A. G., VAN BEEK, T. A. Analysis of anthraquinones in *Rubia tinctorum* L. by liquid chromatography coupled with diode-array UV and mass spectrometric detection. **Journal of Chromatography A**, v. 978, n. 1-2, p. 119–127, 2002.

DEWICK, P. M. **Medicinal natural products: a biosynthetic approach**. 2. ed. Ottawa: John Wiley & sons, 2002. 507 p.

DIAS, H. J., MELO, N. I., CROTTI, A. E. M. **Electrospray ionization tandem mass spectrometry as a tool for the structural elucidation and dereplication of natural products: an overview**. In: Jeevan K. Prasain. (Org.). *Tandem Mass Spectrometry - Applications and Principles*. : InTech, 2012.

DIONEX. **Determination of anthraquinones and stilbenes in giant knotweed rhizome by HPLC with UV detection**. Application Note 232, Tehermo Scientific. Disponível em <<http://www.dionex.com/en-us/webdocs/77633-AN232-LC-Anthraquinones-Knotweed-21Aug2009-LPN2280-01.pdf>>. Acesso em: 10 out. 2012.

DIOUF, P., STEVANOVIC, T., CLOUTIER, A. Antioxidant properties and polyphenol contents of trembling aspen bark extracts. ***Wood Science and Technology***, v. 43, n. 5, p. 457-470, 2009.

DIPLOCK, A. T., CHARULEUX, J.-L., CROZIER-WILLI, G., KOK, F. J., RICE-EVANS, C., ROBERFROID, M., STAHL, W., VIÑA-RIBES, J. Functional food science and defence against reactive oxidative species. ***The British Journal of Nutrition***, v. 80, n. 1, S77-112, 1998.

DORMAN, H. J. D., DEANS, S. G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. ***Journal of Applied Microbiology***, v. 88, n. 2, p. 308–316, 2000.

DUARTE-ALMEIDA, J. M., NEGRI, G., SALATINO, A., CARVALHO, J. E., LAJOLO, F. M. Antiproliferative and antioxidant activities of an tricin glycoside from sugarcane (*Saccharum officinarum*) juice. ***Phytochemistry***, v. 68, n. 8, p. 1165–1171, 2007.

DURAIPANDIYAN, V., IGNACIMUTHU, S. Antifungal activity of rhein isolated from *Cassia fistula* L. flower. ***WebmedCentral PHARMACOLOGY***, v. 1, n. 9, WMC00687, 2010.

DURAIPANDIYAN, V., BASKAR, A. A., IGNACIMUTHU, S., MUTHUKUMAR, C., AL-HARBI, N. A. Anticancer activity of rhein isolated from *Cassia fistula* L. flower. ***Asian Pacific Journal of Tropical Disease***, v. 2012, p. 517-523, 2012.

EL-HASHASH, M. M., ABDEL-GAWAD, M. M., EL-SAYED, M. M., SABRY, W. A., ABDEL-HAMEED, E. S., ABDEL-LATEEF, E. E. Antioxidant properties of methanolic extracts of the leaves of seven Egyptian *Cassia* species. ***Acta Pharmaceutica***, v. 60, p. 361–367, 2010.

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

FERREIRA, M. A. F., MENDES, N. S. Factors associated with active white enamel lesions. ***International Journal of Pediatric Dentistry***, v. 45, n. 5, p. 327, 2005.

FILHO, V. C., YUNES, R. A. Estratégias para a obtenção de compostos farmacologicamente ativos a partir de plantas medicinais: conceitos sobre modificação estrutural para otimização da atividade. ***Quimica Nova***, v. 21, n.1, p. 99-105, 1998.

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

FOELKEL, C. Casca da árvore do eucalipto: aspectos morfológicos, fisiológicos, florestais, ecológicos e industriais, visando a produção de celulose e papel. ***Eucalyptus Online Book & Newsletter***, n. 1, jun. 2005. Disponível em: <http://www.eucalyptus.com.br/capitulos/capitulo_casca.pdf>. Acesso em: 14 nov. 2012.

FREUDENBERG, K., NEISH, A. C. **Constitution and Biosynthesis of Lignin**. Berlin, Heidelberg, New York: Springer, 1968. 129 p.

FUH, M. R. S., LIN, H. J. Analysis of Rhubarb by Liquid Chromatography-Electrospray-Mass Spectrometry. ***Tamkang Journal of Science and Engineering***, v. 6, n. 1, p. 31-36, 2003.

GARCÍA, A. A., CARRIL, E. P-U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca** (Biología). Serie Fisiología Vegetal, Madrid, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GAVIT, R. S., LADDHA, K. S. Synthesis of 4,5-dihydroxy-9,10-dioxoanthracene-2-benzyl carboxylate ester from rhein. **International Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, n. 10, p. 60-64, 2010.

GENDRON, R., GRENIER, D., MAHEU-ROBERT, L.F. The oral cavity as a reservoir of bacterial pathogens for focal infections. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 8, p. 897-906, 2000.

GÓMEZ-BARRIO, A., VEJA, C., ESCARIO, J. A., ROLÓN, M. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 99, n. 2, p. 103–107, 2006.

GÓMEZ-ROMERO, MARÍA., SEGURA-CARRETERO, A., FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A. Metabolite profiling and quantification of phenolic compounds in methanol extracts of tomato fruit. **Phytochemistry**, v. 71, n 16, p. 1848–1864, 2010.

GRITSANAPAN, W., PHADUNGRAKWITYA, R., NUALKAEW, S. **Investigation of alternative anthraquinone sources from *Cassia* spp.**. In International Conference on Development of Botanicals, Kolkata, India, 2005.

HARKIN, J. M., ROWE, J. W. **Bark and its possible uses**. Madson: Chemist Forest - Department of Agriculture, 1971. 60 p.

HE, Z. H., ZHOU, R., HE, M. F., LAU, C. B., YUE, G. G., GE, W., BUT, P. P. Anti-angiogenic effect and mechanism of rhein from *Rhizoma Rhei*. **Phytomedicine**, v. 18, n. 6, p. 470-478, 2011.

IGNAT, I., IRINA, V., POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.

JIANG, J., YANG, M., QIAN, W., LIN, H., GENG, Y., ZHOU, Z., XIAO, D. Quantitative determination of rhein in human plasma by liquid chromatography–negative electrospray ionization tandem mass/mass spectrometry and the application in a pharmacokinetic study. ***Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis***, v. 57, p. 19– 25, 2012.

JUSTESEN, U. Collision-induced fragmentation of deprotonated methoxylated flavonoids, obtained by electrospray ionization mass spectrometry. ***Journal of Mass Spectrometry***, v. 36, n. 2, p. 169–178, 2001.

KAROU, D., SAVADOGO, A., CANINI, A., YAMEOGO, S., MONTESANO, C., SIMPORE, J., COLIZZI, V., TRAORE, A. S. Antibacterial activity of alkaloids from *Sida acut*. ***African Journal of Biotechnology***, v. 4, n. 12, p. 1452-1457, 2005.

KAVANAGH, E. Activities of twenty-two antibacterial substances against nine species of bacteria. ***Journal of Bacteriology***, v. 54, n. 6, p. 761–766, 1947.

KILIC, A., NIEMZ, P. Extractives in some tropical woods. ***European Journal of Wood and Wood Products***, v. 70, n. 1-3, p. 79-83, 2012.

KISHIMOTO, T., CHIBA, W., FUKUSHIMA, K., URAKI, Y., UBUKATA, M. Influence of syringyl to guaiacyl ratio on the structure of natural and synthetic lignins. ***Journal of Agricultural and Food Chemistry***, v. 58, n. 2, p. 895-901, 2010.

KLEMM, D., HEUBLEIN, B., FINK, H.P., BOHN, A. Cellulose: fascinating biopolymer and sustainable raw material. ***Angewandte chemie international edition***, v. 44, n. 22, p. 3358-3393, 2005.

KLOCK, U., MUÑIZ, G. I. B., HERNANDEZ, J. A., ANDRADE A. S. ***Química da Madeira***. 3 ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005. 86 p.

KNABNER-KOGEL, I. The macromolecular organic composition of plant and microbial residues as input to soil organic matter. ***Soil biology e biochemistry***, v. 34, n. 2, p. 139-162, 2002.

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, n. 3, p. 223-228, 1999.

KOKOSKA, L., POLESNY, Z., RADA, V., NEPOVIM, A., VANEK, T. Screening of some Siberian medicinal plants for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 82, n. 1, p. 51-53, 2002.

KOLLANOOR, A., VASUDEVAN, P., NAIR, M. K. M., HOAGLAND, T., VENKITANARAYANAN, K. Inactivation of bacterial fish pathogens by medium-chain lipid molecules (caprylic acid, monocaprylin and sodium caprylate). **Aquaculture Research**, v. 38, n. 12, p. 1293–1300, 2007.

KOO, H., ROSALEN, P. L., CURY, J. A., PARK, Y.K., BOWEN, W. H. Effect of compounds found in propolis on *Streptococcus mutans* growth and on glucosyl transferase activity. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 46, n. 5, p. 1302-1309, 2002.

KOO, H., ROSALEN, P. L., CURY, J. A. Effect of *Apis mellifera* propolis from two Brazilian regions on caries development in desalivated rats. **Caries Research**. v. 33, n. 5, p. 393-400, 1999.

KRASSIG, H. A. **Cellulose**: structure, accessibility and reactivity. Singapore: Gordon and breach science publishers, 1993.

LAGO, J. H. G., CHEN, A., YOUNG, M. C. M., GUIMARÃES, E. F., DE OLIVEIRA, A., KATO, M. J. Prenylated benzoic acid derivatives from *Piper aduncum* L. and *P. hostmannianum* C. DC. (Piperaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 2, n. 3, p. 96-98, 2009.

LAMOUNIER, K. C., CUNHA, L. C. S., MORAES, S. A. L., AQUINO, F. J. T., NASCIMENTO, E. A., SOUZA, M. G. M., MARTINS, C. H. G., CUNHA, W. R. Chemical

analysis and study of phenolics, antioxidant activity and antibacterial effect of the wood and bark of *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. ***Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine***, v. 2012, p. 1-7, 2012.

LANG, G., BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. ***Flavour and Fragrance Journal***, v. 27, n. 1, p. 13-39, 2012.

LEBO, S. E., GARLGULAK, J. D., MCNALLY, T. J. Lignin, In: ***Encyclopedia of Polymer Science and Technology***. v. 3, New York: John Wiley & Sons, 2004.

LEMOES, A. R. **Caracterização físico-química, bioquímica e avaliação da atividade antioxidante em genótipos de urucueiros (*Bixa orellana* L.)**. 2008. 69 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2008.

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

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

LIMA, A. R., BARBOSA V. C., FILHO, P. R. S., GOUVÊA, C. M. C.P. Avaliação in vitro da atividade antioxidante do extrato hidroalcoólico de folhas de bardana. ***Revista Brasileira de Farmacognosia***, v. 16, n. 4, p. 531-536, 2006.

LIMA, R. K. **Óleos essenciais de *Myristica fragrans* Houtt. e de *Salvia microphylla* H.B.K.: caracterização química, atividade biológica e antioxidante**. 2008. 162 f. Tese (Doutorado em Agroquímica), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.

LIMA, S. R., OLIVEIRA, G. S., MORAIS, S. A. L., NASCIMENTO, E. A., CHANG, R. Estudo dos constituintes macromoleculares, extrativos voláteis e compostos fenólicos

da madeira de candeia – *Moquinia polymorpha* (Less.) Dc. ***Ciência Florestal***, v.17, n. 2, p. 145-155, 2007.

LIN, S. Y., DENCE, C. W. **Methods in lignin chemistry**. New York: Springer-Verlag, 1992. 578 p.

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

LIU, R., LI, A., SUN, A. Preparative isolation and purification of hydroxyanthraquinones and cinnamic acid from the Chinese medicinal herb *Rheum officinale* Baill. by high-speed counter-current chromatography. ***Journal of Chromatography A***, v. 1052, n. 1-2, p. 217–221, 2004.

LIU, Z. Q. Chemical methods to evaluate antioxidant ability. ***Chemical Reviews***, v. 110, n. 10, p. 5675-5691, 2010.

LOESCHE, W. Chemotherapy of dental plaque infections. ***Oral Sciences Reviews***, v. 9, p. 65-107, 1976.

LOESCHE, W. J. Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. ***Microbiology Reviews***, v. 50, n. 4, p.353-380, 1986.

LONDE, G. B. **Análise química da Cecropi adenopus (embaúba)**. 2004. 116 f. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2004.

LORENZI, H., SOUZA, H. M., TORRES, M. A. V., BACHER, L. B. **Árvores Exóticas no Brasil - madeireiras, ornamentais e exóticas**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. 2003. 166 p.

LV, Z., DONG, J., ZHANG, B. Rapid identification and detection of flavonoid compounds from bamboo leaves by LC-(ESI)-IT-TOF/MS. **Bioresources**, v. 7, n. 2, p. 1407-1418, 2011.

MACHADO, H.; NAJEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1-2, p. 33-39, 2008.

MAGALHÃES, L. G., SOUZA, J. M., WAKABAYASHI, K. A. L., LAURENTIZ, R., VINHÓLIS, A. H. C., REZENDE, K. C. S., SIMARO, G. V., BASTOS, J. K., RODRIGUES, V., ESPERANDIM, V. R., FERREIRA, D. S., CROTTI, A. E. M., CUNHA, W. R., SILVA, M. L. A., *In vitro* efficacy of the essential oil of *Piper cubeba* L. (Piperaceae) against *Schistosoma mansoni*, **Parasitology Research**, v. 110, n. 5, p. 1747–1754, 2012.

MAIZA-BENABDESSELAM, F., KHENTACHE, S., BOUGOFFA, K., CHIBANE, M., ADACH, S., CHAPELEUR, Y., MAX, H., LAURAIN-MATTAR, D. Antioxidant activities of alkaloid extracts of two Algerian species of *Fumaria* : *Fumaria capreolata* and *Fumaria bastardii*. **Records of natural products**, v. 1, n. 2-3, p. 28-35, 2007.

MAO, Q., YANG, J., CUI, X. M., LI, J. J., QI, Y. T., ZHANG, P. H., WANG, Q. Target separation of a new anti-tumor saponin and metabolic profiling of leaves of *Panax notoginseng* by liquid chromatography with electrospray ionization quadrupole time-of-flight mass spectrometry. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 59, p. 67– 77, 2012.

MARABEZI, K. **Estudo sistemático das reações envolvidas na determinação dos teores de lignina e holocelulose em amostras de bagaço e palha de cana-de-açúcar**. 2009. 158 f. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

MARCOTTE, H., LAVOIE, M. C. Oral microbiology ecology and the role of salivary immunoglobulin A. ***Microbiology and molecular biology reviews***, v. 62, n. 1, p. 71-109, 1998.

MARIMUTHU, P., WU, C. L., CHANG, H. T., CHANG, S. T. Antioxidant activity of the ethanolic extract from the bark of *Chamaecyparis obtusa* var. *formosana*. ***Journal of the Science of Food and Agriculture***, v. 88, n. 8, p. 1400–1405, 2008.

MARQUES, J. V., OLIVEIRA, A., RAGGI, L., YOUNG, M. C. M., KATO, M. J. Antifungal activity of natural and synthetic amides from *Piper* species. ***Journal Brazilian Chemical Society***, v. 21, n. 10, p. 1807-1813, 2010.

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

MARSH, P. D. Dental plaque as a microbial biofilm. ***Caries Research***, v. 38, n. 3, p. 204-211, 2004.

MARSH, P. D. Are dental diseases examples of ecological catastrophes?. ***Microbiology***, v. 149, n. 2, p. 279-294, 2003.

MARTINS, C. M. **Estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc (Pau-santo) do cerrado**. 2012. 116 f. Dissertação de mestrado – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

MAZUMDER, P. M., PERCHA, V., FARSWAN, M., UPAGANLAWAR, A. Cassia: A Wonder Gift to Medical Sciences. ***International Journal of Community Pharmacy***, v. 1, n. 2, p. 16-38, 2008.

MCMURRY, J. **Química Orgânica**. Brasil: Cengage Learning, 2006. 688 p.

MELO, E. A., DE MACIEL, M. I. S., LIMA, V. L. A. G., NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de frutas. **Revista Brasileira de Ciências farmarmacêuticas**, v. 44, n. 2, p. 193-201, 2008.

MESSERSCHMIDT, I., PERALTA-ZAMORA, P., GALLICE, W. C. Caracterização espectroscópica multivariada do potencial antioxidante de vinhos. **Química Nova**, v. 34, n. 3, p. 397- 403, 2011.

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

MONTEIRO, J. M., ALBUQUERQUE, U. P., ARAÚJO, E. L., AMORIN, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

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

MORAIS, S. A. L., AQUINO, F. J. T. D., NASCIMENTO, E. A. D., OLIVEIRA, G. S. D., CHANG, R., SANTOS, N. C. D., ROSA, G. M. Bioactive compounds, acids groups and antioxidant activity analysis of arabic coffee (*Coffea arabica*) and its defective beans from the Brazilian savannah submitted to different roasting degrees. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 198-207, 2008.

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

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, n. 6, p. 447-452, 1999.

MORAIS, S. A. L., NASCIMENTO, E. A., PILÓ-VELOSO, D. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Química Nova**, v. 16, n. 5, p. 435-448, 1993.

MORAIS, S. A. L., NASCIMENTO, E. A., PILÓ-VELOSO, D. Studies of *Eucalyptus grandis* Lignin. Part I: estimation of lignin and polyphenols content in *Eucalyptus grandis* by infrared spectroscopy. **Journal Brazilian Chemical Society**, v. 2, n. 3, p. 129-132, 1991.

MORAIS, S. A. L., SALIBA, E. O. S. S., RODRIGUEZ, N. M., PILO-VELOSO, D., Ligninas – Métodos de obtenção e caracterização química. **Ciência Rural**, v. 31, n. 5, p. 917-928, 2001.

MORE, G., TSHIKALANGE, T. E., LALL, N., BOTHA, F., MEYER, J. J. M. Antimicrobial activity of medicinal plants against oral microorganisms. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 119, n. 3, p. 473-477, 2008.

MUN, S. P., JAHAN, M. S., AL-MARUF, A., CHOWDHURY, D. A. N. Chemical characterization of six mangrove species in Bangladesh. **Wood Science and Technology**, v. 45, n. 2, p. 281–288, 2011.

NAPOLITANO, D. R., MINEO, J. R., SOUZA, M. A., PAULA, J. E., ESPINDOLA, L. S., ESPINDOLA, F. S. Down-modulation of nitric oxide production in murine macrophages treated with crude plant extracts from the Brazilian Cerrado. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 99, n. 1, p. 37-41, 2005.

NASCIMENTO, E. A., TERRONES, M. G. H., MORAIS, S. A. L., CHANG, R., ANDRADE, G. A., SANTOS, D. Q., PEREIRA, B. H. A. Allelopathic activity of *Cenchrus echinatus* L. extracts on weeds and crops. **Allelopathy Journal**, v. 24, n. 2, p. 363-372, 2009.

NETO, G. G., MORAIS, R. G. D. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botanica Brasilica**, v. 17, n. 4, p. 561-584, 2003.

NEWMAN, D. J., CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. ***Journal of Natural Products***, v. 70, n. 3, 461-477, 2007.

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

NIST **Standard Reference Data**. <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>. Last updated: 18 January, 2013.

NOGUEIRA FILHO, G. R., PERUZZO, D., DUARTE, P. M., SALLUM, A. W. **Como avaliar criticamente os produtos para o controle do biofilme dental bacteriano?** Periodontia e Implantodontia. Desmistificando a Ciência. São Paulo: Artes Médicas, 2003. p. 455-462.

OCHIAI, K.T., KURITA-OCHIAI, Y., KAMINO, T. Effect of co-aggregation on the pathogenicity of oral bacteria. ***Journal Medical Microbiology***, v.39, n. 3, p.183-190, 1993.

OGUNWANDE, I. A., FLAMINI, G., CIONI, P. L., OMIKOREDE, O., AZEEZ, R. A., AYODELE, A. A., KAMIL, Y. O. Aromatic plants growing in Nigeria: Essential oil constituents of *Cassia alata* (Linn.) Roxb. and *Helianthus annuus* L. ***Records of Natural Products***, v. 4, n. 4, p. 211–217, 2010.

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

OUATTARA, B., SIMARD, R. E., HOLLEY, R. A., PIETTE, G. J. P., BÉGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. ***International Journal of food microbiology***, v. 37, n. 2-3, 155–162, 1997.

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, n. 6, p. 761-767, 2002.

PATRIGNANI, F., IUCCI, L., BELLETTI, N., GARDINI, F., GUERZONI, M. E., LANCIOTTI, R. Effects of sub-lethal concentrations of hexanal and 2-(E)-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile compounds of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli*. **International Journal of food microbiology**, v. 123, n. 1-2, p. 1–8, 2008.

PHADUNGRAKWITAYA, R., SURIYAPANANONT, S., GRITSANAPAN, W. **The characterization of isozymes in *Cassia bakeriana***. In 26th Congress on Science and Technology of Thailand, Bangkok, Thailand, 2000.

PHILLIPS, M. A., CROTEAU, R. Resin-based defenses in conifers. **Trends in plant science**, v. 4, n. 5, p. 184-190, 1999.

PORTO, D. D. **Papel do alcaloide branquicerina na resposta ao estresse por radiação ultravioleta e dano mecânico em *Psychotria brachyceras* Müll Arg.** 2009. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências)-Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PORTO, T., RANGEL, R., FURTADO, N., DE CARVALHO, T., MARTINS, C., VENEZIANI, R., DA COSTA, F., VINHOLIS, A., CUNHA, W., HELENO, V., AMBROSIO, S. Pimarane-type diterpenes: antimicrobial activity against oral pathogens. **Molecules**, v. 14, n. 1, p. 191-199, 2009.

PREZA, D., OLSEN, I., AAS, J. A., WILLUMSEN, T., GRINDE, B., PASTER, B. J. Bacterial profiles of root caries in elderly patients. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 2015-202, 2008.

PUCHALSKA, MARIA., ORLINSKA, MAGDALENA., ACKACHA, M. A., POŁEC-PAWLAK, K., JAROSZ, M. Identification of anthraquinone coloring matters in natural red

dyes by electrospray mass spectrometry coupled to capillary electrophoresis. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 12, p. 1252–1258, 2003.

QAMAR, F., AFROZ, S., FERROZ, Z., SIDDIQUI, S., ARA, A. Evaluation of hypoglycemic effect of *Cassia italica*. **Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 7, n. 1, p. 61-64, 2011.

QUEIROZ, C. R. A. A. **Análise da lignina e dos polifenóis da aroeira-preta (*Astronium urundeuva*)**. 2001. 143 f. Dissertação de Mestrado – Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2001.

RAFAELLY, L., HERON, S., NOWIK, W., TCHAPLA, A. Optimisation of ESI-MS detection for the HPLC of anthraquinone dyes. **Dyes and Pigments**, v. 77, n. 1, p. 191-203, 2008.

RAMARATHNAM, N., OSAWA, T., OCHI, H., KAWAKISHI, S. The contribution of plant food antioxidants to human health. **Trends in Food Science & Technology**, v. 6, p. 75-82, 1995.

REYNERTSON, K. A., BASILE, M. J. B., KENNELLY, E. J. Antioxidant Potential of Seven Myrtaceous Fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 3, p. 025-035, 2005.

RIOS, J. L., RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, n. 1-2, p. 80–84, 2005.

RODRIGUES, A. M. S., DE PAULA, J. E., DEGALLIER, N., MOLEZ, J. F., ESPANDOLA, L. S. Larvicidal activity of some Cerrado plant extracts against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, v. 22, n. 2, p. 314-317, 2006.

RODRIGUES, V. E. G., CARVALHO, D. A. Ethnobotanical survey of medicinal plants in the dominion of meadows in the region of the Alto Rio Grande - Minas Gerais. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 9, n. 2, p. 17-35, 2007.

ROMAGNI, J. G. **Chemical ecology – Biosynthesis of chemical signal – De novo synthesis and secondary metabolites**. Encyclopedia of life support systems. Depart. Of Biology, University of St. Tomaz Houston, TX, USA, 2005.

ROWELL, R. M., PETTERSEN, R., HAN, J.S., ROWELL, J. S., TSHABALALA, M. A. Cell wall chemistry. In: ROWELL, R. M. **Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites**. New York: CRC Press, 2005. 35-74 p.

RUDNEY, J. D., Z, J. I., LARSON, C. J., LILJEMARK, W. F., HICKEY, K. L. Saliva protein binding to layers of oral streptococci in vitro and in vivo. **Journal Dental Research**, v. 74, n. 6, p. 1280-1288, 1995.

SCANNAPIECO, F. A. Saliva-bacterium interactions in oral microbial ecology. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v.5, n. 3, p. 203-248, 1994.

SCHOFIELD, P., MBUGUA, D. M., PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, v. 91, n. 1-2, p. 21-40, 2001.

SEVERO, E. T. D., CALONEGO, F. W., SANSÍGOLO, C. A. Composição química da madeira de *Eucalyptus citriodora* em função das direções estruturais. **Silva Lusitana**, v. 14, n. 1, p. 113-126, 2006.

SI, W., GONG, J., TSAO, R., ZHOU, T., YU, H., POPPE, C., JOHNSON, R., DU, Z. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 2, p. 296–305. 2006.

SILVA, C. P. **Poiretia latifolia e Poiretia tetraphylla**: estudo dos óleos voláteis e atividades biológicas preliminares. 2005. 120f. Dissertação (Mestrado em Química)- Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

SILVA, F. M., PAULA, J. E. D., ESPINDOLA, L. S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Mycoses**, v. 52, n. 6, p. 511-517, 2009.

SILVA, M. E. C. M. **Apontamentos de tecnologia dos produtos florestais- Composição química da Madeira**. UTAD, 2010. Disponível em: <www.cifap.utad.pt/Composicao_quimica_madeira.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2012.

SILVA JÚNIOR, M. C., SANTOS, G. C. D., NOGUEIRA, P. E., MUNHOZ, C. B., RAMOS, A. E. **100 Árvores do Cerrado - Guia de Campo**. Brasília: Rede de Sementes do Cerrado, 2005. 278 p.

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

SIMÕES, C. M. O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5 ed. Porto Alegre/Florianópolis: UFRGS, 2004. 1104 p.

SJÖSTRÖM, E. **Wood Chemistry: fundamentals and applications**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1993.

SKALTSA, H. D., LAZZARI, D. M., MAVROMATI, A. S., TILIGADA, E. A., CONSTANTINIDIS, T. A. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria albida* ssp. *albida* from Greece. **Planta Medica**, v. 66, n. 7, p. 672–674, 2000.

SOCRANSKY, S. S., HAFFAJEE, A. D. The bacterial etiology of destructive periodontal disease: current concepts. **Journal of Periodontology**, v. 63, n. 4, p. 322-31, 1992.

SOUSA, C. M. M., SILVA, H. R., VIEIRA-JR, G. M., AYRES, M. C. C., DA COSTA C. L. S., ARAÚJO, D. S., CAVALCANTE, L. C. D., BARROS, E. D. S., ARAÚJO, P. B. M., BRANDÃO, M. S., CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUTO, A. L., TAVARES, J. F., SILVA, M. S., DINIZ, M. F. F. M., ATHAYDE FILHO, P. F., BARBOSA-FILHO, J. M. Anti-Inflammatory activity of alkaloids: An update from 2000 to 2010. **Molecules**, v. 16, n. 10, p. 8515-8534, 2011.

TAIZ, L., ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TAKAHASHI, N., YAMADA, T. Glucose and lactate metabolism by *Actinomyces naeslundii*. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 10, n. 4, p. 487-503, 1999.

TAKAO, T., KITATANI, F., WATANABE, N., YAGI, A., SAKATA, K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine bacteria from fish and shellfish. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 58, n. 10, p. 1780-1783, 1994.

TAKARADA, K., KIMIZUKA, R., TAKARASHI, R., HONMA, K., OKUDA, K., KATO, T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 19, n. 1, p. 61–64, 2004.

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

THEILADE, E. 1990 apud MARCOTTE, H., LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of salivary immunoglobulin A. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v. 62, n. 1, p. 71-109, 1998.

THITILERTDECHA, N., TEERAWUTGULRAG, A., RAKARIYATHAM, N. Antioxidant and antibacterial activities of *Nephelium lappaceum* L. extracts. **Food Science and Technology**, v. 41, n. 10, p. 2029-2035, 2008.

TOGASHI, N., SHIRAISHI, A., NISHIZAKA, M., MATSUOKA, K., ENDO, K., HAMASHIMA, H., INOUE, Y. Antibacterial activity of long-chain fatty alcohols against *Staphylococcus aureus*. **Molecules**, v. 12, n. 2, p. 139–148, 2007.

TOHIDPOUR, A., SATTARI, M., OMIDBAIGI, R., YADEGAR, A., NAZEMI, J. Antibacterial effect of essential oils from two medicinal plants against Methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). **Phytomedicine**, v. 17, n. 2, p. 142–145, 2010.

TRUGILHO, P. F., BIANCHI, M. L., GOMIDE, J. L., LIMA, J. T., MENDES, L. M., MORI, F. A., GOMES, D. F. F. Clones de *Eucalyptus* versus a produção de polpa celulósica. **Ciência Florestal**, v. 15, n. 2, p. 145-155, 2005.

TSUI, V. W. K., WONG, R. W. K., RABIE, A. B. M. The inhibitory effects of naringin on the growth of periodontal pathogens in vitro. **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 3, p. 401-406, 2008.

TZAKOU, O., LOUKIS, A., SAID, A. Essential oil from the flowers and leaves of *Cassia fistula* L. **Journal of Essential Oil Research**, v. 19, n. 4, p. 360–361, 2007.

VAN DER OUDERAA, F. J. G. Anti-plaque agents. Rationale and prospects for prevention of gingivitis and periodontal disease. **Journal Clinical Periodontology**, v. 18, n. 6, p. 447-54, 1991.

VARGAS, F., DÍAZ, Y., CARBONELL K. Antioxidant and scavenging activity of emodin, aloe-emodin, and rhein on free-radical and reactive oxygen species. **Pharmaceutical Biology**, v. 42, n. 4-5, p. 342-348, 2004.

VÁZQUEZ, G., FONTENLA, E., SANTOS, J., FREIRE, M. S., GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, J., ANTORRENA, G. Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. **Industrial crops and products**, v. 28, n. 3, p. 279-285, 2008.

VERMA, A. K., PRATAP, R. The biological potential of flavones. **Natural Product Report**, v. 27, n. 11, p. 1571-1593, 2010.

VIEGAS JÚNIOR, C., REZENDE, A., SILVA, D. H. S., CASTRO-GAMBÔA, I., BOLZANI, V. S. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1279–1286, 2006.

VIEIRA, M. C., AVELINO, E. F., DE ALMEIDA, R. R., LELIS, R. C. C. Caracterização química da casca e da madeira da espécie *Tabebuia pentaphylla* (Linn.) Hemsl. Oriunda da arborização urbana do Rio de Janeiro – RJ. **Revista de Ciências da Vida**, v. 29, n. 1, p. 39-49, 2009.

WAGNER, H., BLADT, S. **Plant drug analysis – A thin layer chromatography atlas**. 2. ed. London/New York: Springer, 2009.

WAKSMUNDZKA-HAJNOS, M., SHERMA, J., KOWALSKA, T. **Thin layer chromatography in phytochemistry**. Boca Raton/London/New York: CRC Press, 2008.

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.

WANG, Y., CHUNG, S. J., SONG, W. O., CHUN, O. K. Estimation of daily proanthocyanidin intake and major food sources in the U.S. diet. **The Journal of Nutrition**, v. 141, n. 3, p. 447-452, 2011.

WANG, Y., YANG, L., HE, Y. Q., WANG C. H., WELBECK, E. W., BLIGH, S. W. A., WANG, Z. T. Characterization of fifty-one flavonoids in a Chinese herbal prescription Longdan Xiegan Decoction by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ionization tandem mass spectrometry and photodiode array detection. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 22, p. 1767–1778, 2008.

WATERMAN, P. G., MOLE, S. **Analysis of phenolic plant metabolites**. Londres: Blackwell Scientific Publications, 1994.

WEBB, K., BRISTOW, T., SARGENT, M., STEIN, B. **Methodology for accurate mass measurement of small molecules**. Teddington: LGC Limited, 2004. p 37.

WEI, Y., ZHANG, T., ITO, Y. Preparative separation of rehin from Chinese traditional herb by repeated high-speed counter-current chromatography. ***Journal of Chromatography A***, v. 1017, n. 1-2, p. 125–130, 2003.

WEYNE, S. C. **A construção do paradigma de promoção de saúde**. In Kriger, L. *ABOPREV - Promoção de Saúde Bucal*. 2. ed. São Paulo: Artes Médicas. cap. 1, p. 1-26. 1999.

WIEDENHOEFT, A. C., MILLER, R. B. Structure and function of wood. In: ROWELL, R. M. **Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites**. New York: CRC Press, 2005. p. 9-33.

WILSON, M., MCNAB, R., HENDERSON, B. **Bacterial disease mechanisms. An introduction to cellular microbiology**. Cambridge: Cambridge University Press, 2002.

XIONG, L., PENG, C., ZHOU, Q. M., WAN, F., XIE, X. F., GUO, L., LI, X. H., HE, C. J., DAI, O. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from different parts of *Leonurus japonicus* Houtt. ***Molecules***, v. 18, n. 1, p. 963–973, 2013.

YE, M., HAN, J., CHEN, H., ZHENG, J., GUO, D. Analysis of phenolic compounds in rhubarbs using liquid chromatography coupled with electrospray ionization mass spectrometry. ***Journal of the American Society for Mass Spectrometry***, v. 18, n. 1, p. 82–91, 2007.

APÊNDICE – Artigo publicado no Jornal *Molecules*

Molecules **2013**, *18*, 4588–4598; doi:10.3390/molecules18044588

OPEN ACCESS

molecules

ISSN 1420-3049

www.mdpi.com/journal/molecules

Article

Chemical composition, cytotoxic and antimicrobial activity of essential oils from *Cassia bakeriana* Craib. against aerobic and anaerobic oral pathogens

Luís C. S. Cunha¹, Sérgio A. L. de Moraes^{1*}, Carlos H. G. Martins², Mário M. Martins¹, Roberto Chang¹, Francisco J. T. de Aquino¹, Alberto de Oliveira¹, Thaís S. Moraes², Fabrício C. Machado³, Cláudio V. da Silva³ and Evandro A. do Nascimento¹

¹Chemistry Institute, Laboratory of Natural Products and chromatography, Federal University of Uberlândia, Brazil.

²Nucleus of Research in Sciences and Technology, University of Franca, Brazil.

³Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia, Brazil.

* Author to whom correspondence should be addressed; E-Mail: salemos@ufu.br;
Tel.: + 55-34-32394341

Received: / Accepted: / Published:

Abstract: The chemical composition of the essential oils from leaves, bark and wood of *Cassia bakeriana* Craib. was determined by Gas chromatography (GC) and chromatography–mass spectrometry (GC-MS). Alcohols, aldehydes and fatty acids were the major components in leaf oil and bark, and the wood essential oil was rich in fatty acids. Terpenes such as linalool, (*E*)-nerolidol and phytol were present in low concentrations. The antimicrobial activity was evaluated using the microdilution method against aerobic and anaerobic oral bacteria. The cell viability test was carried out with Vero cells using the microdilution method. The oils from leaves and bark showed high antimicrobial activity with minimum inhibitory concentrations between 62.5 and 125 µg mL^{−1} for most of the tested bacteria, including *Streptococcus mutans*,

the main etiological agent of dental caries. Leaves oil displayed the lowest cytotoxic effect (EC_{50} of $153 \mu\text{g mL}^{-1}$) while wood oil exhibited the highest toxicity to Vero cells. *C. bakeriana* oils are a source of biologically active compounds against aerobic and anaerobic oral microorganisms. This study is the first report on the chemical composition, antimicrobial activity as well as cytotoxicity of the *C. bakeriana*.

Keywords: *Cassia bakeriana*; essential oil; antimicrobial activity; cytotoxicity.

1. Introduction

Cassia bakeriana Craib. is a tree belonging to the genus *Cassia* and the Fabaceae-Leguminosae family and is native to Thailand. It is also known as pink cassia and can reach 12 to 15 metres high. Its climate is humid tropical but tolerates subtropical conditions of mild winter from Brazil's south and southeast regions [1]. This plant has rapid growth and good adaptation to the Brazilian cerrado. Many species of *Cassia* are used in folk medicine with different pharmacological properties, such as laxative, purgative, antibacterial, antifungal and antimalarial, demonstrating the pharmacological potential of this plant genus. Studies from various parts of these species have reported the isolation of bioactive secondary metabolites, such as anthraquinones, flavonoids and other phenolic compounds being the most common constituents present [2]. *C. bakeriana* leaves are considered as an alternative source of drug laxative and they exhibit significant content of anthraquinones glycosylated [3]. The chemical composition of essential oils present in plants has been studied, and these oils are promising sources of secondary metabolites with important biological properties, including antimicrobial activity [4]. A recent review revealed that several essential oils possess strong antimicrobial activity against various microorganisms, suggesting the possibility of using these oils as replacements of synthetic drugs to overcome the increasing resistance of some pathogens [5]. Some works have shown that essential oils are potential antibacterial agents against oral microorganisms [6-9]. These activities are generally related to substances from the secondary metabolism present in the oils. Several of these compounds are being tested separately and have shown significant antimicrobial effects [10]. The chemical composition of the oils leaves of some species of *Cassia* has been determined, as *Cassia alata* [11, 12] and *Cassia fistula* [13].

The microorganisms evaluated in this study are considered to be risk factors for oral diseases such as caries and periodontitis; they can also reach the bloodstream triggering other diseases in the human body, like endocarditis, brain abscesses, throat infections, infections in respiratory and gastrointestinal systems and bacteremia. The oral microbiota is one of the most complex in the human body [14]. The search for new natural products or prototypes with antibacterial activity

would be very important for the control and prevention of oral and systemic diseases in human health.

Given this perspective, the aim of the present study was to determine the chemical composition, investigate the antimicrobial potential of essential oils against aerobic and anaerobic oral pathogens and cytotoxic effect of the essential oils from leaves, bark and wood of *C. bakeriana*. This is the first report involving the chemical composition and biological activity of essential oils of *C. bakeriana*.

2. Results and Discussion

2.1 Chemical composition of the essential oils

Table 1 shows the composition of essential oils from the leaves, barks and wood of *C. bakeriana*. Table 2 shows the classification of compounds in the essential oil from different parts of *C. bakeriana* by functional groups. The leaves had the highest essential oil yield of $0.94 \pm 0.03\%$, followed by barks at $0.46 \pm 0.08\%$, and wood at $0.12 \pm 0.02\%$. Surprisingly, terpenoids are represented only by linalool (3.55%) and phytol (4.45%) in the leaves' essential oil.

Table 1. Chemical composition of essential oil from different parts of *C. bakeriana*.

Compound	AI	AI	Identification method	Composition (%)		
	Reference	(Calculated)		Wood	Barks	Leaves
Hexanal	801	806	a, b, c	1.13	0.82	-
Furfural	828	830	a, b, c	1.27	-	-
(E)-Hex-2-enal	846	847	a, b, c	-	-	10.48
(Z)-Hex-3-en-1-ol	850	851	a, b, c	1.56	6.73	34.90
Hex-2-en-1-ol	854	855	a, b, c	-	-	0.95
Hexan-1-ol	863	862	a, b, c	1.03	0.72	-
Octanal	998	1001	a, b, c	-	0.87	-
Hex-3-en-1-ol , acetate	1004	1007	a, b, c	-	-	8.68
Phenylacetaldehyde	1036	1038	a, b, c	3.76	-	-
Octan-1-ol	1063	1065	a, b, c	-	2.82	-
Linalool	1097	1097	a, b, c	-	-	3.55
Nonanal	1100	1099	a, b, c	-	14.42	-
Nonanol	1165	1170	a, b, c	-	0.98	-
Methyl salicylate	1190	1193	a, b, c	-	1.27	-
Octanoic acid (caprylic acid)	1192	1196	a, c, d	-	1.53	-
Decanal	1201	1201	a, b, c	-	0.89	-
Cis-dec-2-enal	1261	1262	a, b, c	-	6.17	-
Nonanoic acid (pelargonic acid)	1293	1291	a, c, d	-	5.77	-
4-Vinylguaiacol	1309	1314	a, b, c	-	-	2.41
4-propylguaiacol	1374	1367	a, b, d	3.92	-	-
(E)-Nerolidol	1561	1564	a, b, c	-	4.70	-
Dodecanoic acid (Lauric acid)	1565	1566	a, c, d	-	1.92	0.93

Tridecanoic acid (tridecylic acid)	1662	1660	a, c, d	-	0.79	-
Tetradecanoic acid (myristic acid)	1770	1764	a, c, d	-	1.45	-
N. I.	-	-	-	0.93	-	-
Hexadecanoic acid (palmitic acid)	1959	1958	a, c, d	58.14	34.80	5.89
N. I.	-	-	-	1.05	-	-
Phytol	2114	2110	a, c, d	-	-	4.45
(Z,Z)-Octadeca-9,12-dienoic acid (Linoleic acid)	2132	2149	a, c, d	8.46	2.09	-
(z)-Octadec-9-enoic acid (oleic acid)	2132	2149	a, c, d	15.22	2.20	-
Octadecanoic acid (stearic acid)	2158	2155	a, c, d	3.53	0.72	-
Tricosane	2300	2300	a, b, c	-	0.69	1.03
Tetracosane	2400	2400	a, b, c	-	-	1.14
N. I.	-	-	-	-	-	2.38
Pentacosane	2500	2500	a, b, c	-	1.33	-
Heptacosane	2700	2700	a, b, c	-	-	8.27
N. I.	-	-	-	-	3.62	-
Octacosane	2800	2800	a, b, c	-	0.74	2.07
N. I. (hydrocarbon)	-	-	-	-	2.06	12.57
N. I. (hydrocarbon)	-	-	-	-	0.93	-
Total identified (%)				98.02	93.39	86.05

AI = Arithmetic index on a DB5 column (comparison with n-alkanes C₈-C₄₀); N. I. = Not Identified. Identification method: ^a)Arithmetic index; ^b)Adams mass spectral-retention index library; ^c) Mass spectrum comparison with Wiley library; ^d)mass spectrum and Arithmetic index comparison with NIST Standard Reference Data (Nist 2011).

Table 2. Classification of compounds in the essential oil from different parts of *C. bakeriana* by functional groups.

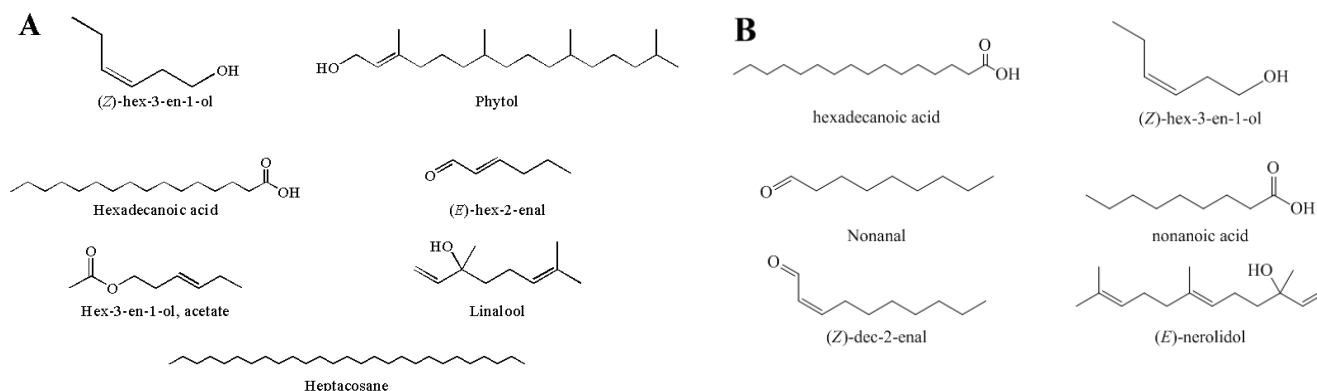
Functional groups	Wood	Bark	Leaves
Alcohols	2.59	11.15	37.15
Aldehydes	6.16	23.17	10.48
Esters	-	-	8.68
Oxygenated monoterpenes	-	-	3.55
Oxygenated sesquiterpenes	-	4.70	-
Oxygenated diterpenes	-	-	4.45
Long chain alkanes	-	2.76	12.78
Phenolics	3.92	-	2.41
Fat acids	85.35	51.27	6.82
N. I. compounds	1.98	6.61	13.95

The major components identified in the leaves were (Z)-hex-3-en-1-ol (34.90%), heptacosane (8.27%), hex-3-en-1-ol, acetate (8.6%), (E)-hex-2-enal (10.48%), hexadecanoic acid (5.89%), oxygenated diterpene phytol (4.45%) and oxygenated sesquiterpene linalool (3.55%) (Figure 1). Most of these compounds differ significantly from those found in other species of *Cassia*. In previous studies of essential oil of *C. alata* leaves, the major compounds were linalool (23.0%), borneol (8.6%) and pentadecanal (9.3%) [11], and 1,8-cineole (39.8%), β -caryophyllene (19.1%) and caryophyllene oxide (12.7%) [12]. Leaves of *C. fistula* contained as the main constituents phytol (16.1%), tetradecane (10.5%) and hexadecane (8.7%) [13]. The chemical composition of the oils can vary among species, among same species and their different parts. These differences are due to several factors that affect the oil chemical composition such as climate, soil quality, harvest season and genetics. In general, at low intensity of light the production of monoterpenes decreases and a small daily variation of temperature can stimulate the production of terpenoids [15].

The wood oil contained fatty acids as the major components, which accounted for 85.35% of the total, including palmitic (58.14%), oleic (15.22%) and linoleic (8.46%) acids as the majority. Phenylacetaldehyde (3.76%) and 4-propylguaiaicol (3.92%) were also present in significant amounts.

The bark oil was rich in hexadecanoic acid (34.80%), nonanal (14.42%), (Z)-hex-3-en-1-ol (6.73%), (Z)-dec-2-enal (6.17%), nonanoic acid (5.77%) and in the oxygenated sesquiterpene (E)-nerolidol (4.70%) (Figure 1). The predominant class of compounds in the essential oils of bark and wood was fatty acids at 51.27 and 85.35%, respectively.

Figure 1. Major components in the leaf oil (A) and bark (B) of *C. bakeriana*.



2.2 Antimicrobial activity of essential oils

The antimicrobial activity of different plant parts was determined against aerobic and anaerobic oral microorganisms. The results of antimicrobial activity and cytotoxicity are shown

in Table 3. The leaves and bark oils indicated strong antibacterial activity, showing inhibition of both types of microorganisms. The MIC values ranged from 62.5 to 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ for most of the bacteria tested. All bacteria demonstrated some degree of sensitivity to the essential oils within the concentrations tested. The microorganisms more susceptible were *A. naeslundii*, *P. gingivalis* and *B. fragilis* from anaerobic bacteria and *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguinis* and *A. actinomycetemcomitans* from aerobic bacteria, while *F. nucleatum* was more resistant. The wood essential oil exhibited lower activity against investigated bacteria with MICs ranging from 500 to 2000 (or higher) $\mu\text{g mL}^{-1}$.

TABLE 3. Inhibitory effect of essential oils against aerobic and anaerobic oral bacteria and cytotoxic activity of different parts of *C. bakeriana*.

Microorganisms		Minimum inhibitory concentration (MIC) – $\mu\text{g mL}^{-1}$			
		Samples of Essential Oils			
		Leaves	Bark	Wood	^a CHD
Anaerobic	^c <i>F. nucleatum</i> (ATCC 25586)	1000	1000	2000	0.922
	^b <i>A. naeslundii</i> (ATCC 19039)	62.5	125	1000	1.844
	^c <i>P. gingivalis</i> (ATCC 48417)	125	125	500	3.68
	^c <i>B. fragilis</i> (ATCC 25285)	62.5	62.5	1000	1.844
Aerobic	^b <i>S. sanguinis</i> (ATCC 10556)	125	125	1000	3.68
	^b <i>S. mitis</i> (ATCC 49456)	62.5	62.5	500	3.68
	^b <i>S. mutans</i> (ATCC 25175)	62.5	62.5	2000	0.922
	^c <i>A. actinomycetemcomitans</i> (ATCC 43717)	125	125	1000	14.7
Cytotoxic activity EC_{50} - $\mu\text{g mL}^{-1}$ Vero cells (ATCC CCL 81)		153 $\pm$ 13	119 $\pm$ 2	93 $\pm$ 3	----

^aCHD: positive control (chlorhexidine dihydrochloride), ^bGram-positive bacteria, ^cGram-negative bacteria.

Comparing Tables 1 and 3, the similar results presented by leaf and bark essential oils could be assigned to the identified aliphatic alcohols and aldehydes. On the other hand, fatty acids, were present in high concentrations in the wood essential oil, apparently with no inhibitory effects on the tested bacteria. Usually, the biological properties of essential oils are determined by the characteristics of the major compounds [16]. The antimicrobial activity in this study may be

related to a specific metabolite that is in highest concentration in the oil composition or a synergism between major and minor compounds in the mixture. Unidentified compounds in oils can be contributors to the antimicrobial effects by reinforcement or synergistic interactions. Some compounds found in the essential oils are well-known antimicrobial agents, such as (*Z*)-hex-3-en-1-ol, linalool [17], caprylic acid [18], lauric and linoleic acids [19], aldehydes, particularly (*E*)-hex-2-enal [20], methyl salicylate [21], (*E*)-nerolidol [22] and octan-1-ol [23].

Although they did not have a high composition of terpenes, the essential oils of the leaves and bark of *C. bakeriana* showed significant antimicrobial activity against the oral pathogens evaluated. Extracts or oils from plant species with MIC values below 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ are considered promising as potential antimicrobial agents [24]. The essential oils of the leaves and barks of *C. bakeriana* exhibited strong antibacterial effect against oral microorganisms showing MIC values lower than 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and lower than other studies in the literature. The leaf oil of *Lippia sidoides* and pure standards of monoterpenes (thymol and carvacrol) against *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis* and *S. salivarius*, showed MICs from 2500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 10000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [7]. The MIC values of the essential oil of *C. pubescens* for the same microorganisms studied in this work ranged from 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 2000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [9]. Oils of *Leptospermum scoparium*, *Melaleuca alternifolia*, *Eucalyptus radiata* e *Lavandula officialis* inhibited the growth of *S. mutans*, *S. sobrinus*, *A. actinomycetemcomitans*, *P. gingivalis* and *F. nucleatum* with MICs ranging from 300 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 10000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [6]. The essential oil of *Artemisia iwayomogi* was evaluated against fifteen oral bacteria, and inhibitions occurred with values between 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ to 3200 $\mu\text{g mL}^{-1}$, except for *P. gingivalis* with an MIC of 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ [8]. Using a concentration of 62.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$, leaf and bark oils of *C. bakeriana* inhibited the growth of *S. mutans*, principal etiological agent of dental caries. The results are even more promising because both oils exhibited higher toxicity to the microorganisms than to Vero cells at the same concentration. A comparison of the cytotoxicity to Vero cells and antimicrobial activity was performed using the selectivity index, which was calculated by the logarithm of the ratio of cytotoxic concentration (EC_{50}) and the MIC value for microorganisms ($\text{SI} = \log [\text{EC}_{50}] / [\text{MIC}]$). A positive value represents higher selectivity against microorganisms than toxicity to Vero cells, and a negative value indicates a higher toxicity to Vero cells than to bacteria [25]. The selectivity index for the leaf oil at inhibitory concentrations of 62.5 $\mu\text{g mL}^{-1}$ and 125 $\mu\text{g mL}^{-1}$ were 0.38 and 0.08 respectively and for the bark oil in the same concentrations were 0.28 and -0.021 respectively. For the oil wood the obtained SI indexes were -0.73 and -1.03 at the concentrations of 500 and 1000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectively, indicating greater toxicity to Vero cells and low activity against oral pathogens. According to the MIC values and selectivity indexes, the leaf oil showed promising antibacterial activity while displaying low cytotoxic effect to Vero cells.

3. Experimental

3.1 Plant material

Different parts of *C. bakeriana* (leaf, bark and wood) were collected in June 2011 at the Federal University of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil (18°55'8.95"S; 48°15'34.01"W). The plant is located in the Cerrado area (savannah). The plant was identified by a specialist, and a voucher specimen was deposited in the Uberlandenses Herbarium, under number 63584, in Uberlândia.

3.2 Essential oil isolation

Flesh leaves, barks and wood of *C. bakeriana* were separately cut and about 400 grams of each part was extracted by hydrodistillation using a Clevenger-type apparatus for four hours. The oil obtained was extracted with 5.0 mL of dichloromethane, the organic layer was separated and this fraction was dried with anhydrous sodium sulfate, filtered and kept in a closed vial under refrigeration (-10 °C) for further analysis. The percent yield was calculated relative to the dried mass of the initial sample.

3.3 Analysis of the essential oils

The oil was analysed by a gaseous chromatograph coupled to a mass spectrometer (GC-MS) Shimadzu brand, model CG-17A/QP-5000, equipped with a 30-m DB-5 capillary column. The carrier gas used was helium at a flow rate of 1 ml/min, detector and injector temperatures were 220° and 240° C, respectively, and the injection volume was 1 µl and the split ratio was 50:1. The oven temperature was programmed from 60 to 240 °C at 3 °C/min. The electron impact energy was set at 70 eV and fragments from 40 to 650 m/z were collected. The quantification of oils were performed in a Shimadzu brand CG/flame ionization detector (CG/FID) model 2014 under the same conditions employed in the CG/MS, using N₂/Air/H₂ as burning and carrier gas.

3.4 Identification of the constituents

Identification of each individual constituent of the essential oils was achieved based on Arithmetic Index on DB-5 in reference do standard compounds; and by comparison of their mass spectral fragmentation patterns (NIST database/ChemStation data system and Wiley library/ChemStation data system of mass spectral database) [26,27]. For calculation of arithmetic indexes for linear C₈-C₄₀ alkanes were calculate by equation based on alkane standards: $AI(x) = 100 P_z + 100[(t(x) - t(P_z)) / t(P_{z+1}) - t(P_z)]$; where x: compound at time t; P_z: alkane before x; and P_{z+1}: alkane after x [26].

3.5 Microbial strains

The tested strains were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The following microorganisms were used in the present work: aerobic *Streptococcus mutans* (ATCC

25175), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556) and *Agregatibacter actinomycetemcomitans* (ATCC 43717) and anaerobic *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Actinomyces naeslundii* (ATCC 19039) and *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 48417).

3.6 Antimicrobial activity

The MIC (minimal inhibitory concentration) value is the lowest concentration of the compound, extract or oil capable of inhibiting microorganism growth. The essential oils of different parts of *C. bakeriana* were determined in triplicate by using the microdilution broth method in 96-well microplates [28]. Samples were dissolved in dimethyl sulfoxide (DMSO; Synth) at $8000\ \mu\text{g mL}^{-1}$, followed by dilution in tryptic soy broth (Difco) for aerobic and Schaedler broth (Difco) supplemented with hemin ($5.0\ \mu\text{g mL}^{-1}$) and vitamin K1 ($10.0\ \mu\text{g mL}^{-1}$) for anaerobic; concentrations tested ranged from 2000 to $10\ \mu\text{g mL}^{-1}$. The final DMSO content was 4% (v/v), and this solution was used as a negative control. The inoculum was adjusted for each organism, to yield a cell concentration of 5×10^5 colony forming units (CFU) per mL, according to NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standard) [29]. The microplates (96 wells) with the aerobic microorganisms were closed with a sterile plate sealer and incubated aerobically at $37\ ^\circ\text{C}$ for 24 h. The anaerobic microorganisms were closed with a sterile plate sealer and incubated for 48–72 hours in an anaerobic chamber (Don Whitley Scientific, Bradford, UK), in 5–10% H_2 , 10% CO_2 , 80–85% N_2 atmosphere at $37\ ^\circ\text{C}$. After that, resazurin ($30\ \mu\text{L}$) in aqueous solution (0.01%) was added to the microplates, to indicate microorganism viability for the determination of minimal inhibitory concentration [28]. Chlorhexidine dihydrochloride (CHD) was used as a positive control, and the concentrations ranged from $0.0115\ \mu\text{g mL}^{-1}$ to $5.9\ \mu\text{g mL}^{-1}$. The controls of sterility of TSB and Schaedler broths, control culture (inoculum), chlorhexidine dihydrochloride sterility, sterility of the extracts and control DMSO were performed.

3.7 Cytotoxic activity

Samples of the essential oils were dissolved in methanol and diluted in culture medium DMEM supplemented until form a solution with a concentration of $640\ \mu\text{g mL}^{-1}$. The cell viability test was performed with Vero ATCC CCL 81 cells (kidney fibroblasts African green monkey). For evaluation of cytotoxicity was used microplate dilution method. A solution was prepared containing 1.10^6 cells in $10\ \mu\text{L}$ DMEM supplemented, $100\ \mu\text{L}$ of this was pipetted into each well and then the plate was incubated for 6 hours at $37\ ^\circ\text{C}$ with humidified atmosphere and 5% CO_2 , occurring cell adhesion in the well. Once attached, the culture medium was removed and added solutions of the samples at concentrations of 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 and $4\ \mu\text{g mL}^{-1}$, starting from the initial solution of DMEM. The final volume in each well was $100\ \mu\text{L}$ and the

concentration of cells present in each well was 1.10^4 cells. The final concentration of methanol in each well did not exceed 3%. Controls growth, negative (100% lysed cells), solvent (methanol) and samples were also prepared. The plates were incubated for 48 hours at 37 ° C with humidified atmosphere and 5% CO₂. After, 10 uL of developing solution of 3 mM resazurin in PBS was added to each well [30] and the plate was incubated again for 24 hours under the same conditions. Readings of absorbance at 590 nm was performed in a microplate spectrophotometer. The assays were carried out in triplicate and the results of the absorbances for each concentration tested were calculated according to the growth control. The EC₅₀ (concentration at which 50% of the cells are viable) was calculated by a dose-response graph nonlinear regression [31].

3.8 Statistical Analysis

All data on the biological tests were submitted to treatment ANOVA with a significance level of 5%, using the Tukey method in GraphPad Prism 5.

4. Conclusions

The essential oils of *C. bakeriana* leaves and barks have shown promising activity against oral pathogens, including aerobic and anaerobic bacteria. Saturated and unsaturated aliphatic alcohols and aldehydes and terpenes or synergistic interactions between the major and minor constituents within the oils could be responsible for the inhibitory effects. The oil leaves indicated higher selectivity against oral pathogens than toxicity to Vero cells in the concentrations that inhibited the growth of most microorganisms evaluated. Our results indicated that some active components are present in oils, so this makes them particularly interesting for future studies and development of novel antimicrobial agents.

Acknowledgments

The authors acknowledge FAPEMIG (Foundation for Research Support of the Minas Gerais State) and IQUFU (Chemistry Institute and Postgraduate Program-Federal University of Uberlandia) for financial and infrastructural support. The authors are also grateful to CNPq for fellowships.

References

1. Lorenzi, H.; Souza, H.M.; Torres, M.A.V.; Bacher, L.B. *Árvores Exóticas no Brasil - madeireiras, ornamentais e exóticas*; Editora Plantarum: Nova Odessa, São Paulo, Brasil, 2003; p. 166.
2. Júnior, C.V.; Rezende, A.; Silva, D.H.S.; Castro-Gambôa, I.; Bolzani, V.S. Aspectos químicos, biológicos e etnofarmacológicos do gênero *Cassia*. *Quim. Nova* 2006, 29, 1279–1286.

3. Gritsanapan, W.; Phadungrakwitya, R.; Nualkaew, S. Investigation of alternative anthraquinone sources from *Cassia* spp.. In *International Conference on Development of Botanicals*, Kolkata, India, 2005; 595.
4. Xiong, L.; Peng, C.; Zhou, Q.M.; Wan, F.; Xie, X.F.; Guo, L.; Li, X.H.; He, C.J.; Dai, O. Chemical composition and antibacterial activity of assential oils from different parts of *Leonurus japonicus* Houtt. *Molecules* 2013, 18, 963–973.
5. Lang, G.; Buchbauer, G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals. A review. *Flav. Frag. J.* 2012, 27, 13–39.
6. Takarada, K.; Kimizuka, R.; Takarashi, R.; Honma, K.; Okuda, K.; Kato, T. A comparison of the antibacterial efficacies of essential oils against oral pathogens. *Oral Microbiol. Immunol.* 2004, 19, 61–64.
7. Botelho, M.A.; Nogueira, N.A.; Bastos, G.M.; Fonseca, S.G.; Lemos, T.L.; Matos, F.J.; Montenegro, D.; Heukelbach, J.; Rao, V.S.; Brito, G.A. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2007, 40, 349–356.
8. Cha, J.D. Chemical composition and antibacterial activity against oral bacteria by the essential oil of *Artemisia iwayomogi*. *J. Bacteriol. Virol.* 2007, 37, 129–136.
9. Chang, R.; Morais, S.A.L.; Nascimento, E.A.; Cunha, L.C.S.; Rocha, E.O.; Aquino, F.J.T.; Souza, M.G.M.; Cunha, W.R.; Martins, C.H.G. Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of *Campomanesia pubescens* O. Berg, Native of Brazilian Cerrado. *Lat. Am. J. Pharm.* 2011, 30, 1843–1848.
10. Si, W.; Gong, J.; Tsao, R.; Zhou, T.; Yu, H.; Poppe, C.; Johnson, R.; Du, Z. Antimicrobial activity of essential oils and structurally related synthetic food additives towards selected pathogenic and beneficial gut bacteria. *J. of Appl. Microb.* 2006, 100, 296–305.
11. Agnani, H.; Bikanga, R.; Bessière, J.M.; Menut, C. Essential oil constituents of *Cassia alata* (L.) from Gabon. *J. Essent. Oil Res.* 2005, 17, 410–412.
12. Ogunwande, I.A.; Flamini, G.; Cioni, P.L.; Omikorede, O.; Azeez, R.A.; Ayodele, A.A.; Kamil, Y.O. Aromatic plants growing in Nigeria: Essential oil constituents of *Cassia alata* (Linn.) Roxb. and *Helianthus annuus* L. *Rec. Nat. Prod.* 2010, 4, 211–217.
13. Tzakou, O.; Loukis, A.; Said, A. Essential oil from the flowers and leaves of *Cassia fistula* L. *J. Essent. Oil Res.* 2007, 19, 360–361.
14. Aas, J.A.; Paster, J.B.; Stokes, N.L.; Olsen, I.; Dewhirst, E.F. Defining the normal bacterial flora of the oral cavity. *J. Clin. Microbiol.* 2005, 43, 5721–5732.
15. Lima, R.K. Essential oils of *Myristica fragrans* Houtt. and of *Salvia microphylla* H.B.K.: chemical characterization, biological and antioxidant activity. PhD Thesis, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2008.
16. Bakkali, F.; Averbeck, S.; Averbeck, D.; Idaomar, M. Biological effects of essential oils - A review. *Food Chem. Toxicol.* 2008, 46, 446–475.
17. Dorman, H.J.D.; Deans, S.G. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. of Appl. Microbiology* 2000, 88, 308–316.
18. Kollanoor, A.; Vasudevan, P.; Nair, M.K.M.; Hoagland, T.; Venkitanarayanan, K. Inactivation of bacterial fish pathogens by medium-chain lipid molecules (caprylic acid, monocaprylin and sodium caprylate). *Aquaculture Res.* 2007, 38, 1293–1300.
19. Ouattara, B.; Simard, R.E.; Holley, R.A.; Piette, G.J.P.; Bégin, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. *Int. J. food microbial.* 1997, 37, 155–162.

20. Patrignani, F.; Iucci, L.; Belletti, N.; Gardini, F.; Guerzoni, M.E.; Lanciotti, R. Effects of sub-lethal concentrations of hexanal and 2-(E)-hexenal on membrane fatty acid composition and volatile compounds of *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Salmonella enteritidis* and *Escherichia coli*. *Int. J. food microbial*. 2008, 123, 1–8.
21. Chung, J.Y.; Choo, J.H.; Lee, M.H.; Hwang, J.H. Anticariogenic activity of macelignan isolated from *Myristica fragrans* (nutmeg) against *Streptococcus mutans*. *Phytomedicine* 2006, 13, 261–266.
22. Skaltsa, H.D.; Lazzari, D.M.; Mavromati, A.S.; Tiligada, E.A.; Constantinidis, T.A. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria albida* ssp. *albida* from Greece. *Planta Med.* 2000, 66, 672–674.
23. Togashi, N.; Shiraishi, A.; Nishizaka, M.; Matsuoka, K.; Endo, K.; Hamashima, H.; Inoue, Y. Antibacterial activity of long-chain fatty alcohols against *Staphylococcus aureus*. *Molecules* 2007, 12, 139–148.
24. Rios, J.L.; Recio, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 2005, 100, 80–84.
25. Case, R.J.; Franzblau, S.G.; Wang, Y.; Cho, S.H.; Soejarto, D.D.; Pauli, G.F. Ethnopharmacological evaluation of the informant consensus model on anti-tuberculosis claims among the Manus. *J. Ethnopharmacol.* 2006, 106, 82–89.
26. Adams, R.P. *Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy*. 4th ed.; Allured Publishing Corporation, Carol Stream, Illinois, 2007; p. 803.
27. NIST Standard Reference Data. <http://webbook.nist.gov/chemistry/name-ser.html>. Last updated: 18 January, 2013.
28. Carvalho, T.C.; Simão, M.R.; Ambrósio, S.R.; Furtado, N.A.; Veneziani, R.C.; Heleno, V.C.; Da Costa, F.B.; Gomes, B.P.; Souza, M.G.; Reis, R.B.; Martins, C.H. Antimicrobial activity of diterpenes from *Viguiera arenaria* against endodontic bacteria. *Molecules* 2011, 16, 543–551.
29. National Committee for Clinical Laboratory Standards. *NCCLS document M7-A6 - Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically*; NCCLS: Wayne, PA, USA, 2003.
30. Gómez-Barrio, A.; Veja, C.; Escario, J.A.; Rolón, M. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Parasitology Res.* 2006, 99, 103–107.
31. Chibale, K.; Chouteau, F.; Lategan, C.A.; Maharaj, V.J.; Pillay, P.; Smith, P.J.; Vleggaar, R. Antiplasmodial hirsutinolides from *Vernonia staehelinoides* and their utilization towards a simplified pharmacophore. *Phytochemistry* 2007, 68, 1200–1205.

Sample Availability: Samples of the essential oil of *Cassia bakeriana* are available from the authors.

© 2013 by the authors; licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).