



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CENTRO DE CIENCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE MEDICINA E PATOLOGIA LEGAL
REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA**

JEAN PARCELLI COSTA DO VALE

**POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE PLANTAS DA CAATINGA: ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE CONSTITUINTES FIXOS E
VOLÁTEIS DE *Vitex gardneriana* e *Croton piauhiensis***

FORTALEZA

2015

JEAN PARCELLI COSTA DO VALE

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE PLANTAS DA CAATINGA: ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE CONSTITUINTES FIXOS E VOLÁTEIS
DE *Vitex gardneriana* E *Croton piauhiensis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará/Renorbio, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Produtos Naturais.

Orientador: Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira
Coorientador: Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos

FORTALEZA

2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca de Ciências e Tecnologia

V243p Vale, Jean Parcelli Costa do.

Potencial biotecnológico de plantas da caatinga: atividade antibacteriana e antioxidante de constituintes fixos e voláteis de Vitex gardneriana e crótão piahiensis. / Jean Parcelli Costa do Vale. – 2015.

134 f. : il. color., enc.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2015.

Área de Concentração: Biotecnologia em produtos naturais.

Orientação: Prof. Dr. Edson de Holanda Teixeira.

Coorientação: Prof. Dr. Hélcio Silva dos Santos.

1. Caatinga. 2. Vegetação. 3. Bioteconologia. I. Título.

CDD 660.6

JEAN PARCELLI COSTA DO VALE

POTENCIAL BIOTECNOLÓGICO DE PLANTAS DA CAATINGA: ATIVIDADE
ANTIBACTERIANA E ANTIOXIDANTE DE CONSTITUINTES FIXOS E VOLÁTEIS
DE *Vitex gardneriana* E *Croton piauhiensis*

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Ceará/Renorbio, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia em Produtos Naturais.

Aprovada em: ____ / ____ / ____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Universidade Dr. Hélcio Silva dos Santos
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Prof. Dr. Mayron Alves Vasconcelos
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Francisco Vassiliepe Souza Arruda
Universidade Federal do Ceará (UFC)

Prof. Dr. Paulo Nogueira Bandeira
Universidade Estadual Vale do Acaraú (UVA)

Prof. Dra. Maria da Conceição Lobo Lima
Universidade Estadual do Ceará (UECE)

Aos meus pais, Francisco Manoel do Vale (In memoriam) e Teresinha Hercília do Vale.

A minha esposa Marliete e aos meus filhos Thiago e Matheus.

AGRADECIMENTOS

A Deus o criador!

A Universidade Federal do Ceará – UFC.

A Rede Nordeste de Biotecnologia – RENORBIO.

A Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA.

Ao Prof. Dr. Edson Holanda Teixeira, pela excelente orientação.

Aos professores do curso, pela dedicação e paciência nas aulas ministradas.

Aos colegas da turma e todos aqueles do curso com quem tive a oportunidade de conviver, pelas reflexões, discussões, críticas e sugestões.

Aos colegas de trabalho da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA, pelos conselhos, críticas e sugestões durante o desenvolvimento deste trabalho. Especialmente ao Professor Hélcio Silva dos Santos, Professor Paulo Nogueira Bandeira e a Professora Maria Rose Jane Albuquerque.

Ao Departamento de Química Orgânica e Inorgânica da UFC.

Ao Professor Edilberto responsável pelo Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREM), da Universidade Federal do Ceará, pelos espectros de RMN para elucidação das estruturas dos compostos isolados.

Ao professor Raimundo Braz-Filho, Setor de Química de Produtos Naturais - LCQUI – CCT da Universidade Estadual Norte Fluminense, pela contribuição na elucidação das estruturas dos compostos isolados.

Aos colegas de curso Bruno, Flávio e Nairley e aos Pós-doutorados Mayron e Vassiliepe.

A todos os colegas do Biofilm Group LIBS, Grupo de Biofilmes e BIOMOL GROUP da UFC.

Aos bolsistas voluntários e de iniciação científica da Universidade Federal do Ceará - UFC e da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA.

A todas as pessoas que direta ou indiretamente contribuíram para o desenvolvimento deste trabalho.

“Quando a gente acha que tem todas as respostas, vem a vida e muda todas as perguntas”. (Luís Fernando Veríssimo)

RESUMO

O uso de plantas com fins terapêuticos é uma das formas de prática medicinal mais antiga da humanidade. Metabólitos secundários isolados de plantas têm contribuído significativamente para o desenvolvimento de novos fármacos nos últimos anos. O principal objetivo deste trabalho foi contribuir com o conhecimento científico sobre espécies vegetais da Caatinga com potencial terapêutico para desenvolvimento de possíveis produtos Biotecnológicos. Foram caracterizados quimicamente por Espectrometria de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais, metabólitos secundários fixos e voláteis de *Vitex gardneriana* e metabólitos secundários voláteis de *Croton piauhiensis*. Isolou-se 9 (nove) constituintes fixos de *V. gardneriana*. Da casca VGC (I), mistura de Ácido Ursólico e Ácido Oleanólico. Do lenho: VGL (I) Ácido vanílico; VGL (II) Ácido *p*-hidróxi-benzóico; VGL (III) 4-hidroxi-3-metóxibenzoato de *p*-hidróxi-benzóico, (inédito na literatura); VGL (IV) Ácido $2\alpha,3\alpha,19\alpha$ -trihidroxiursan-12-en-28-óico e o VGL (V) 3-O- β -D-glicopiranosilsitosterol, (inédito na literatura). Da raiz: VGR (I) Ácido protocatecuico; VGR (II) 3-O- β -D-glicopiranosilsitosterol e o VGR (III) uma mistura de β -sitosterol e estigmasterol. Os óleos essenciais e 5 (cinco) metabólitos secundários foram testados, verificando o potencial antibacteriano nas formas planctônicas e biofilme, também foi verificado o potencial antioxidante dos mesmos utilizando quatro diferentes métodos. Realizou-se a avaliação de inibição do desenvolvimento do biofilme formado por *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. Os óleos essenciais de *C. piauhiensis* e *V. gardneriana*, comprovaram ser capazes de inibir o desenvolvimento microbiano em ambas as formas de vida bacteriana e também apresentaram poder antioxidante. Neste contexto pode-se afirmar que metabólitos secundários fixos e voláteis de *C. piauhiensis* e *V. gardneriana*, possuem potencialidades para se tornarem promissores produtos biotecnológicos.

Palavras-chave: *Vitex gardneriana*. *Croton piauhiensis*. Atividade antibacteriana. Atividade antibiofilme. Atividade antioxidante.

ABSTRACT

The use of plants for therapeutic purposes is one of the oldest forms of medical practice of humankind. Isolated plant secondary metabolites have contributed significantly to the development of new drugs in recent years. The main objective was to contribute to the scientific knowledge of plant species of the Caatinga with therapeutic potential for development of possible biotechnological products. Were chemically characterized by Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy (NMR) ¹H and ¹³C one and two-dimensional, fixed and volatile secondary metabolites of *Vitex gardneriana* and volatile secondary metabolites of *Croton piauiensis*. Was isolated nine (9) fixed constituents *V. gardneriana*. From the shell VGC (I), a mixture of ursolic acid and oleanolic acid. From the wood: VGL (I) Synthesis of vanillin; VGL (II) *p*-hydroxy-benzoic acid; VGL (III) 4-hydroxy-3-methoxybenzoate *p*-hydroxy-benzoic acid (unpublished literature); VGL (IV) acid 2 α , 3 α , 19 α -trihidroxiursan-12-en-28-oic acid and VGL (V) 3-O- β -D-glicopiranosilsitosterol (unprecedented in the literature). From the root: VGR (I) acid protocatechuic; VGR (II) 3-O- β -D-glicopiranosilsitosterol and VGR (III) a mixture of β -sitosterol and stigmasterol. The essential oils and five (5) Secondary metabolites were first tested by checking the antimicrobial activity in the planktonic and biofilm forms, was also checked the antioxidant potential using four different methods. As well, as experiments for evaluating the inhibition of the development of biofilm formation by *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 and *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 10145. The oil showed significant efficiency in biofilm inhibition assays formed with the respective bacteria, where *Croton* oil was more efficient than the oil of *Vitex*. The essential oils of *V. gardneriana* and *C. piauiensis* proved to be capable of inhibiting microbial growth in both forms of bacterial life and showed antioxidant power. In this context, it can be said that fixed and volatile secondary metabolites of *C. piauiensis* and *V. gardneriana*, have the potential to become promising biotech products.

Keywords: *Vitex gardneriana*. *Croton piauiensis*. Antibacterial activity. Antibiofilm activity. Antioxidant activity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Etapas de formação de um Biofilme.....	26
Figura 2 -	Diterpeno casbano isolado de <i>Croton nepetaefolius</i>	28
Figura 3 -	Unidade isoprênica.....	29
Figura 4 -	Ácido mevalônico.....	29
Figura 5 -	Extrator por hidrodestilação.....	32
Figura 6 -	Extrator por arraste de vapor.....	32
Figura 7 -	Extrator usando forno de microondas adaptado.....	33
Figura 8 -	Extrator usando CO ₂ supercrítico.....	34
Figura 9 -	Estrutura do α -tocoferol.....	40
Figura 10 -	Estrutura do ácido ascórbico.....	40
Figura 11 -	Representantes das principais classes de flavonoide.....	41
Figura 12 -	<i>Vitex gardneriana</i>	43
Figura 13 -	Ecdisteróide e iridóide isolados do extrato metanólico da casca do caule de <i>V. gardneriana</i>	43
Figura 14 -	<i>Croton piauhiensis</i>	44
Figura 15 -	Destilação à pressão reduzida.....	47
Figura 16 -	Pré- fracionamento dos extratos.....	48
Figura 17 -	Tratamento cromatográfico dos extratos.....	48
Figura 18 -	Placas CCD reveladas.....	49
Figura 19 -	Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>V. gardneriana</i>	56
Figura 20 -	Espectro de massas do α -pineno.....	56
Figura 21 -	Espectro de massas do β -pineno.....	56
Figura 22 -	Espectro de massas do α -cubemeno.....	57
Figura 23 -	Espectro de massas do α -copaeno.....	57
Figura 24 -	Espectro de massas do Isoledeno.....	57
Figura 25 -	Espectro de massas do E-cariofileno.....	57
Figura 26 -	Espectro de massas do α -humuleno.....	58
Figura 27 -	Espectro de massas do Germacreno D.....	58
Figura 28 -	Espectro de massas do Cis -calameneno.....	58
Figura 29 -	Espectro de massas do α -Calacoreno.....	58
Figura 30 -	Espectro de massas óxido de Cariofileno.....	59

Figura 31 -	Espectro de massas do Cubenol.....	59
Figura 32 -	Cromatograma do óleo essencial das folhas de <i>C. piauhiensis</i>	61
Figura 33 -	Espectro de massas do α -pineno.....	61
Figura 34 -	Espectro de massas do Mirceno.....	61
Figura 35 -	Espectro de massas do α -felandreno.....	62
Figura 36 -	Espectro de massas do α -Cimeno.....	62
Figura 37 -	Espectro de massas do β -felandreno.....	62
Figura 38 -	Espectro de massas do Limoneno.....	62
Figura 39 -	Espectro de massas do 1,8-Cineol.....	63
Figura 40 -	Espectro de massas do γ -Terpineno.....	63
Figura 41 -	Espectro de massas do Linalol.....	63
Figura 42 -	Espectro de massas do 4-Terpineno.....	63
Figura 43 -	Espectro de massas do α -Tocoferol.....	64
Figura 44 -	Espectro de massas do α -Copaeno.....	64
Figura 45 -	Espectro de massas do E-Cariofileno.....	64
Figura 46 -	Espectro de massas do α -Humuleno	64
Figura 47 -	Espectro de massas do Germacreno D.....	65
Figura 48 -	Espectro de massas do γ -Elemeno.....	65
Figura 49 -	Espectro de massas do δ -Cadineno.....	65
Figura 50 -	Espectro de massas do Espatulenol.....	65
Figura 51 -	Espectro de massas do Globulol.....	66
Figura 52 -	Espectro de massas do Cubenol.....	66
Figura 53 -	Espectro de massas do α -Cadinol.....	66
Figura 54 -	Quantificação da biomassa dos biofilmes de <i>S. aureus</i> ATCC 25923 e <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 após 24 horas de crescimento na presença do óleo essencial extraído de <i>C. piauhiensis</i> (a e b) e <i>V. gardneriana</i> (c e d)	69
Figura 55 -	Número de células viáveis de biofilme de <i>S. aureus</i> ATCC25923e <i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145 após 24horasde crescimento na presença do óleo essencial extraído de <i>C. piauhiensis</i> (a e b) e <i>V. gardneriana</i> (c e d)	70
Figura 56 -	Atividade antioxidante dos óleos essenciais de <i>C. piauhiensis</i> e <i>V. gardneriana</i> (DPPH)	71

Figura 57 -	Atividade antioxidante dos óleos essenciais de <i>C. piauhiensis</i> e <i>V. gardneriana</i> (FIC)	72
Figura 58 -	Atividade antioxidante (FRAP) dos óleos essenciais de <i>C. piauhiensis</i> e <i>V. gardneriana</i>	73
Figura 59 -	Atividade antioxidante (BCB) dos óleos essenciais de <i>C. piauhiensis</i> e <i>V. gardneriana</i>	74
Figura 60 -	Estrutura do Ácido Ursólico (1) e Ácido Oleanólico (2)	77
Figura 61 -	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de VGC (I)	79
Figura 62 -	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) de VGC (I)	80
Figura 63 -	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° (CDCl ₃ , 125 MHz) de VGC(I)	80
Figura 64 -	Mapa de correlação homonuclear – COSY (CDCl ₃ , 500 MHz) de VGC (I)	81
Figura 65 -	Mapa de correlação heteronuclear–HMBC (CDCl ₃ , 125 MHz) de VGC (I)	81
Figura 66 -	Mapa de correlação heteronuclear–HMQC (CDCl ₃ , 125 MHz) de VGC (I).....	82
Figura 67 -	Estrutura do Ácido Vanílico.....	86
Figura 68 -	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) do VGL (I)	87
Figura 69 -	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz) do VGL (I)	87
Figura 70 -	Mapa de correlação homonuclear – COSY (CDCl ₃ , 500 MHz) do VGL (I).	88
Figura 71 -	Mapa de correlação heteronuclear –HMBC (CDCl ₃ , 125 MHz) do VGL (I)	88
Figura 72 -	Mapa de correlação heteronuclear – HMQC (CDCl ₃ , 125 MHz) do VGL (I)	89
Figura 73 -	Mapa de correlação heteronuclear – HMQC-expandido (CDCl ₃ , 125 MHz) do VGL (I)	89
Figura 74 -	Estrutura do Ácido <i>p</i> -hidroxi-benzóico.....	90
Figura 75 -	Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) de VGL (II)	91
Figura 76 -	Espectro de RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 125 MHz) de VGL (II)	91
Figura 77 -	Mapa de correlação heteronuclear–HMBC (CD ₃ OD, 125 MHz) de VGL (II)	92

Figura 78 -	Mapa de correlação heteronuclear–HMBC-expandido (CD ₃ OD, 125MHz) de VGL (II)	92
Figura 79 -	Mapa de correlação heteronuclear – HMQC (CD ₃ OD, 125 MHz) VGL (II)	93
Figura 80 -	Mapa de correlação heteronuclear – HMQC-expandido (CD ₃ OD, 125 MHz) VGL (II)	93
Figura 81 -	Estrutura do Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoato de <i>p</i> -hidroxibenzóico VGL (III)	94
Figura 82 -	Espectro de RMN ¹ H (CD ₃ OD, 500 MHz) de VGL (III)	96
Figura 83 -	Espectro de RMN ¹³ C (CD ₃ OD, 125 MHz) de VGL (III)	96
Figura 84 -	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° (CD ₃ OD, 125 MHz) de VGL (III).....	97
Figura 85 -	Mapa de correlação homonuclear – COSY (CD ₃ OD, 500 MHz) de VGL (III)	97
Figura 86 -	Mapa de correlação heteronuclear–HMBC (CD ₃ OD, 125MHz) de VGL (III)	98
Figura 87 -	Mapa de correlação heteronuclear – HMQC (CD ₃ OD, 125 MHz) de VGL (III)	98
Figura 88 -	Estrutura do ácido 2α,3α,19α-trihidroxiursan-12-en-28-óico.....	99
Figura 89 -	Espectro de RMN ¹ H (CDCl ₃ , 500 MHz) de VGL (IV)	101
Figura 90 -	Espectro de RMN ¹³ C (CDCl ₃ , 125 MHz de VGL (IV)	102
Figura 91 -	Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° (CDCl ₃ , 125 MHz) de VGL (IV)	102
Figura 92 -	Mapa de correlação homonuclear – COSY (CDCl ₃ , 500 MHz) de VGL (IV)	103
Figura 93 -	Mapa de correlação homonuclear – COSY-expandido (CDCl ₃ , 500 MHz) de VGL (IV)	103
Figura 94 -	Mapa de correlação heteronuclear – HMBC (CDCl ₃ , 125 MHz) de VGL (IV)	104
Figura 95 -	Mapa de correlação heteronuclear – HMBC-expandido (CDCl ₃ , 125 MHz) de VGL (IV)	104
Figura 96 -	Mapa de correlação heteronuclear –HMQC (CDCl ₃ , 125 MHz) de VGL (IV)	105

Figura 97 -	Mapa de correlação heteronuclear – HMQC-expandido (CDCl_3 , 125 MHz) de VGL (IV)	105
Figura 98 -	Estrutura do 3-O- β -D-glicopiranosilsitosterol.....	107
Figura 99 -	Espectro de RMN ^1H (piridina-d ₅ , 500 MHz) de VGL(V).....	107
Figura 100 -	Espectro de RMN ^{13}C (piridina-d ₅ , 125 MHz) de VGL (V)	107
Figura 101 -	Estrutura do Ácido Protocatecuico.....	110
Figura 102 -	Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de VGR (I)	111
Figura 103 -	Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) de VGR (I)	111
Figura 104 -	Estrutura do 3-O- β -D-glicopiranosilsitosterol.....	112
Figura 105 -	Estrutura dos esteroides β -sitosterol e estigmasterol.....	113
Figura 106 -	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de VGR (II).	113
Figura 107 -	Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de VGR (II)	114
Figura 108 -	Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de VGR (III)	114
Figura 109 -	Atividade antioxidante (DPPH) de VGL (III), VGL (IV), VGC (I), VGL (I) e VGR (II) respectivamente, isolados de <i>V. gardneriana</i> ..	118
Figura 110 -	Atividade antioxidante (FIC) de VGL (III), VGL (IV), VGC (I), VGL (I) e VGR (II) respectivamente, isolados de <i>V. gardneriana</i> ..	119
Figura 111 -	Atividade antioxidante (FRAP) de VGL (III), VGL (IV), VGC (I), VGL (I) e VGR (II) respectivamente, isolados de <i>V.- gardneriana</i>	120
Figura 112 -	Atividade antioxidante (BCB) de VGL (III), VGL (IV), VGC (I), VGL (I) e VGR (II) respectivamente, isolados de <i>V. gardneriana</i> ..	120

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Infecções/doenças humanas associadas com formação de biofilmes e micro-organismos comumente envolvidos.....	26
Tabela 2 -	Aparelhos médicos colonizados por biofilmes e micro-organismos envolvidos.....	27
Tabela 3 -	Condensação de unidades isoprénicas na formação de terpenóides.....	30
Tabela 4 -	Principais fontes de óleos essenciais produzidos no Brasil e suas respectivas aplicações.....	36
Tabela 5 -	Algumas espécies de radicais livres.....	37
Tabela 6 -	Fontes exógenas e endógenas de formação de radicais livres..	37
Tabela 7 -	Algumas doenças relacionadas com os danos oxidativos.....	38
Tabela 8 -	Percentual relativo dos componentes do óleo essencial das folhas de <i>V. gardneriana</i>	55
Tabela 9 -	Percentual relativo dos componentes do óleo essencial das folhas de <i>C. piauhiensis</i>	60
Tabela 10 -	Concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) dos óleos essenciais de <i>C. piauhiensis</i> e <i>V. gardneriana</i>	67
Tabela 11 -	Solventes e respectivas massas obtidas no pré-fracionamento do extrato etanólico da casca de <i>Vitex gardneriana</i>	75
Tabela 12 -	Dados de RMN ^1H e ^{13}C de VGC (I) dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC.....	78
Tabela 13 -	Solventes e respectivas massas obtidas no pré-fracionamento do extrato do lenho de <i>V. gardneriana</i>	83
Tabela 14 -	Dados de RMN ^1H e ^{13}C de VGL (I) dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC.....	86
Tabela 15 -	Dados de RMN ^1H e ^{13}C de VGL (II) dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC.....	90
Tabela 16 -	Dados de RMN ^1H e ^{13}C de VGL (III) dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC.....	95
Tabela 17 -	Dados de RMN ^1H e ^{13}C de VGL (IV) (CD ₃ OD)	101

Tabela 18 -	Dados de RMN ¹³ C de VGL (V) em piridina-d ₅ comparados com valores da literatura.....	106
Tabela 19 -	Solventes e respectivas massas obtidas no pré-fracionamento do extrato da raiz de <i>V. gardneriana</i>	108
Tabela 20 -	Dados de RMN ¹ H e ¹³ C de VGR (I) dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC.....	110
Tabela 21 -	Dados de RMN ¹³ C de VGR (I) em piridina-d ₅ e VGR (II) em CDCl ₃ comparados com valores da literatura.....	115
Tabela 22 -	Metabólitos secundários isolados da casca, do lenho e da raiz de <i>Vitex gardneriana</i>	117

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 1 -	Isolamento de VGC (I) da casca do lenho de <i>V. gardneriana</i>	76
Fluxograma 2 -	Isolamento de VGL (I), VGL (II), VGL (III), VGL (IV) e VGL (V) respectivamente, do lenho de <i>V. gardneriana</i>	84
Fluxograma 3 -	Isolamento de VGR (I), VGR (II) e VGR (III) respectivamente, da raiz de <i>V. gardneriana</i>	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

coEt	Acetato de etila
a.C.	Antes de Cristo
AIDS	Síndrome da Imuno Deficiência Adquirida
ATCC	American Type Culture Collection
BHA	Butilhidroxianisol
CENAUREM	Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CBM	Concentração Bactericida Mínima
CG/EM	Cromatógrafo de Gás / Espectrômetro de Massa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COSY	Correlação espectroscópica Homonuclear
DEPT	Distortionless Enhancement of Polarisation Transfer
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetil Sulfóxido
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
EECVG	Extrato Etanólico da casca de <i>Vitex gardneriana</i>
EELVG	Extrato Etanólico do lenho de <i>Vitex gardneriana</i>
EERVG	Extrato Etanólico da raiz de <i>Vitex gardneriana</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-acético
ELISA	enzyme-linked immunosor- bent assay
EM	Especrometro de Massa
EPS	Poliestireno Expandido
ERN	Espécies Reativas de Nitrogênio
ERRO	Espécie Reativa de Oxigênio
FRAP	Poder Antioxidante de Redução Férrica
FIC	Quelação do íon Ferroso
HIV	Vírus da Imuno Deficiência Humana
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple-Quantum Correlation
M	Molar

M	Metro
MHz	Mega-hertz
Mg	Miligramma
Min	Minuto
MI	Mililitro
mM	Milimol
µL	Microlitro
NDM-1	New Délhi Metallo-b Lactamese
OE	Óleo Essencial
OMS	Organização Mundial de Saúde
RNA	Ácido Ribonucleico
RNM	Ressonância Magnética Nuclear
RPM	Rotações por Minuto
TMS	Tetrametilsilano
pH	Potencial Hidrogeniônico
TSA	Agar Triptona de Soja
TSB	Caldo de Triptona de Soja
UEFS	Universidade Estadual de Feira de Santana
UFC	Universidade Federal do Ceará
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
UVA	Universidade Estadual Vale do Acaraú
V/V	Volume/Volume
VGC	Casca <i>Vitex gardneriana</i>
VGL	Lenho <i>Vitex gardneriana</i>
VGR	Raiz <i>Vitex gardneriana</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

M	Molar
M	Metro
MHz	Mega-hertz
Mg	Miligrama
Min	Minuto
ML	Mililitro
mM	Milimol
µL	Microlitro
°C	Graus Celsius
G	Gramma
Ev	Eletro volt
Nm	Nanômetro

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	REFERENCIAL TEÓRICO.....	25
2.1	Generalidades.....	25
2.2	Atividade antimicrobiana de vegetais.....	25
2.3	Micro-organismos patogênicos.....	26
2.4	Biofilmes.....	26
2.5	Substâncias vegetais com atividade microbiana.....	29
2.6	Óleos essenciais.....	30
2.6.1	Processos de extração de óleos essenciais.....	32
2.6.1.1	<i>Processo de extração por hidrodestilação.....</i>	32
2.6.1.2	<i>Processo de extração por arraste de vapor.....</i>	33
2.6.1.3	<i>Processo de extração por CO₂ supercrítico.....</i>	34
2.6.2	Atividade biológica e usos de óleos essenciais.....	36
2.6.3	Radicais livres.....	37
2.6.4	Atividades Farmacológicas de substância vegetais.....	41
3	OBJETIVOS.....	45
3.1	Objetivo geral.....	46
3.2	Objetivos específicos.....	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1	Material biológico.....	47
4.2	Obtenção e identificação dos constituintes voláteis.....	47
4.3	Obtenção do extratos e isolamento dos constituintes fixos.	48
4.4	Determinação estrutural dos constituintes isolados.....	50
4.4.1	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN ¹H) e de Carbono -13 (RMN ¹³C)	50
4.5	Avaliação da atividade antimicrobiana.....	51
4.5.1	Cultivo das cepas bacterianas.....	51
4.5.2	Atividade antimicrobiana.....	51
4.5.3	Avaliação da atividade antibiofilme.....	52
4.5.4	Quantificação da biomassa.....	52

4.5.5	<i>Contagem de UFC's.....</i>	52
4.6	Atividade antioxidante.....	53
4.6.1	<i>Ensaio de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)</i>	53
4.6.2	<i>Atividade quelante de íons ferrosos (FIC)</i>	53
4.6.3	<i>Método de redução do ferro (FRAP)</i>	54
4.6.4	<i>Método de inibição da oxidação do β-caroteno (BCB)</i>	54
4.7	Análise estatística.....	55
5	RESULTADOS E DISCUSÕES.....	56
5.1	Estudo da composição volátil das folhas de <i>V. gardneriana</i>	56
5.1.1	<i>Identificação dos constituintes do óleo essencial das folhas de <i>V. gardneriana</i>.....</i>	57
5.2	Estudo da composição volátil das folhas de <i>C. piauhiensis</i>...	61
5.2.1	<i>Identificação dos constituintes do óleo essencial das folhas de <i>C. piauhiensis</i>.....</i>	62
5.3	Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de <i>V. gardneriana</i> e <i>C. piauhiensis</i>.....	68
5.4	Atividade antioxidante dos óleos essenciais de <i>C. piauhiensis</i> e <i>V. gardneriana</i>.....	72
5.4.1	<i>Ensaio de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)</i>	72
5.4.2	<i>Ensaio da atividade quelante de íons ferrosos (FIC)</i>	73
5.4.3	<i>Ensaio da atividade Antioxidante pelo Método de redução do ferro (FRAP)</i>	74
5.4.4	<i>Ensaio de inibição da oxidação do β-caroteno (BCB)</i>	75
5.5	Estudo da composição fixa da casca do lenho de <i>V. gardneriana</i>.....	76
5.5.1	<i>Obtenção dos constituintes.....</i>	76
5.5.2	<i>Determinação estrutural do constituinte VGC (I).....</i>	78

5.5.2.1	<i>Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN 1H) e de Carbono -13 (RMN ^{13}C) uni e bidimensionais de VGL (I)</i>	80
5.6	Estudo da composição fixa do lenho de <i>V. gardneriana</i>.....	83
5.6.1	Obtenção dos Constituintes.....	83
5.6.2	Determinação estrutural do constituinte VGL (I).....	86
5.6.2.1	<i>Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN 1H) e de Carbono -13 (RMN ^{13}C) uni e bidimensionais de VGL (I).....</i>	88
5.6.3	Determinação estrutural do constituinte VGL (II).....	91
5.6.3.1	<i>Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN 1H) e de Carbono -13 (RMN ^{13}C) uni e bidimensionais de VGL (II).....</i>	92
5.6.4	Determinação estrutural do constituinte VGL (III).....	95
5.6.4.1	<i>Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN 1H) e de Carbono -13 (RMN ^{13}C) uni e bidimensionais de VGL (III).....</i>	97
5.6.5	Determinação estrutural do constituinte VGL (IV).....	100
5.6.5.1	<i>Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN 1H) e de Carbono -13 (RMN ^{13}C) uni e bidimensionais de VGL (IV).....</i>	102
5.6.6.	Determinação estrutural do constituinte VGL (V).....	107
5.6.6.1	<i>Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN 1H) e de Carbono -13 (RMN ^{13}C) uni e bidimensionais de VGL (V).....</i>	109
5.7	Estudo da composição fixa das raízes de <i>V. gardneriana</i>.....	110
5.7.1	Obtenção dos Constituintes.....	110
5.7.2	Determinação estrutural do constituinte VGR (I).....	112
5.7.2.1	<i>Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio-1 (RMN 1H) e de carbono -13 (RMN ^{13}C), uni e bidimensionais de VGR (I).....</i>	113
5.7.3	Determinação estrutural do constituinte de VGR (II) e (III)....	114

5.7.3.1	<i>Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN ¹H) e de Carbono -13 (RMN ¹³C) uni e bidimensionais de VGR (II) e (III).....</i>	115
5.8	Atividade antibacteriana de VGL (III), VGL (IV), VGC (I), VGL (I) e VGR (II) respectivamente, compostos fixos isolados de <i>V. gardneriana</i>.....	119
5.9	Atividade antioxidante de VGL (III), VGL (IV), VGC (I), VGL (I) e VGR (II) respectivamente, compostos fixos isolados de <i>V. gardneriana</i>.....	120
5.9.1	<i>Ensaio de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH).....</i>	120
5.9.2	<i>Ensaio da atividade quelante de íons ferrosos (FIC).....</i>	121
5.9.3	<i>Ensaio da atividade Antioxidante pelo Método de redução do ferro (FRAP).....</i>	121
5.9.4	<i>Método de inibição da oxidação do β-caroteno (BCB).....</i>	122
6	CONCLUSÃO.....	123
	REFERÊNCIAS	125

1 INTRODUÇÃO

Os vegetais para sobreviverem e evoluírem travam uma verdadeira guerra por espaços e também para se defenderem dos ataques de herbívoros e de pragas patogênicas de toda espécie. Nesta competição durante milhares de anos, estes, desenvolveram uma série de defesas físicas e químicas. Esta é a razão e o porquê de grande complexidade da constituição química dos vegetais, e dos mesmos biosintetizarem substâncias que atuam em alvos específicos de seus predadores (FERREIRA; PINTO, 2010).

O uso de plantas medicinais com fins terapêuticos é uma tradição milenar presente nas culturas de várias nações constituindo ainda hoje, um recurso alternativo de grande aceitação. Este comportamento vem chamando a atenção da comunidade científica no sentido de comprovar a eficácia e promover o uso seguro desses recursos naturais (CAVALCANTE *et al.*, 2013). De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 400 milhões de pessoas no mundo buscam na medicina tradicional os cuidados básicos de saúde (DEY; NATH, 2012).

Plantas que apresentam atividade antioxidante são de grande interesse visto que a presença de radicais livres está associada a diversos fatores como mutação do DNA, oxidação de proteína e peroxidação lipídica, que tem relação direta com a formação de ateromas e ateroscleroses. Assim, plantas que apresentam atividade antimicrobiana e antibiofilme também são de extrema relevância, pelo fato de muitos micro-organismos apresentarem resistência, não somente aos antibióticos já pré-estabelecidos, como também aos de última geração, causando crescente problema de saúde pública mundial (SILVA *et al.*, 2012).

Os óleos essenciais são produtos aromáticos de metabolismo secundário de plantas, normalmente produzidos por células secretoras ou grupos de células. São comumente concentrados em uma região do vegetal, como nas folhas, casca, caule, flores ou frutos, e frequentemente apresentam composição diferente. (ANDRADE, *et al.*, 2012). Os óleos essenciais vêm sendo usados desde a antiguidade como aromatizantes. Apresentam grande importância em vários setores, sendo bastante utilizados na indústria de alimentos e bebidas, na indústria

farmacêutica e de cosméticos devido ao grande espectro de suas atividades biológicas (BARROS, 2008).

Biofilmes microbianos são definidos como comunidades sésseis complexas, formadas por células bacterianas embebidas numa matriz polimérica extracelular autoproduzido consistindo de exopolissacáridos (EPS), proteínas e DNA,aderidos a uma superfície viva ou inerte, protegendo as bactérias contra os efeitos deletérios de agentes antimicrobianos e aumento da resistência ao sistema imunitário do hospedeiro (DONLAN; COSTERTON, 2002). Os biofilmes, tem a capacidade de aderirem às superfícies abióticas, tais como o vidro, poliestireno, e até mesmo de aço inoxidável e superfícies bióticas, tais como células e tecidos (DAVEY; O'TOOLE, 2000). Devido a estas características, os biofilmes podem causar problemas sérios em dispositivos médicos, bem como enfermidades após a sua formação (HANCOCK, et al., 2011).

Neste contexto, os gêneros *Croton* (*Euphorbiaceae*) e *Vitex* (*Lamiaceae*) são extremamente importantes, uma vez que estudos fitoquímicos realizados com espécies dos referidos gêneros têm mostrado a presença de terpenoides, alcaloides, flavonoides, esteroides e ligninas. Podemos destacar os diterpenos e flavonoides, por apresentarem uma vasta variedade de atividades farmacológicas, principalmente atividade antimicrobiana e antioxidante (CARNEIRO et al., 2011; SÁ et al., 2012; RANI; SHARMA, 2013; OLIVEIRA et al., 2014).

Vitex gardneriana é uma árvore de médio porte encontrada no sertão nordestino, frequentemente as margens dos rios. Conhecida popularmente por “Jaramataia”, tem sido utilizada no tratamento de doenças inflamatórias. A literatura descreve apenas o estudo fitoquímico do extrato metanólico das cascas do caule que resultou no isolamento de um ecdisteróide e um iridóide além das atividades molusicida e de toxicidade aguda do mesmo extrato (SÁ-BARRETO et al., 2005;2008).

A espécie *Croton piauhiensis* (*Euphorbiaceae*), um pequeno arbusto nativo do sertão nordestino e não foram encontrados na literatura relatos fitoquímico ou farmacológicos do mesmo. Espécies de *Croton*, como *Croton nepetaefolius*, cujo diterpeno casbano isolado do seu caule revelou promissora atividade antimicrobiana, por exemplo (VASCONCELOS et al., 2014; CARNEIRO et al., 2011).

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2. 1 Generalidades

A Caatinga é o mais importante tipo de vegetação do Semiárido do Nordeste brasileiro, caracterizada por espécies herbáceas anuais e espécies lenhosas arbustivas, com patrimônio bastante diversificado e ocorrência de espécies endêmicas, sendo o único bioma exclusivamente brasileiro. Ocupando aproximadamente 750.000 km², representa cerca de 10% do território brasileiro e 60% da região Nordeste. Muitas espécies de plantas desse bioma são amplamente conhecidas e utilizadas na medicina popular e na produção comercial de produtos fitoterápicos (FERNADA *et al.*, 2013).

Uma pesquisa, realizada pela organização Mundial da Saúde (OMS), para compostos puros de origem vegetal utilizados como medicamentos, revelou que dos 122 compostos identificados, 80 % foram usados para fins etnomedicinais. Alguns exemplos relevantes são quelina, uma furanocromona, isolada de *Ammi visnaga*, a qual levou ao desenvolvimento da Cromolina, um broncodilatador, o alcaloide galegina, obtido de *Galega officinalis L.*, modelo para a síntese de outros fármacos antidiabéticos e o alcaloide papaverina, isolado da espécie *Papaver somniferum*, o qual formou a base para o medicamento verapamil, utilizado no tratamento da hipertensão (CRAGG; NEWMAN, 2013).

2.2 Atividade antimicrobiana de vegetais

Plantas que apresentam atividade antibacteriana e antibiofilme são de extrema importância, devido ao fato de muitos micro-organismos apresentarem resistência, não somente aos antibióticos já pré-estabelecidos, como também aos de última geração, agravando este grande problema de saúde pública mundial (SILVA *et al.*, 2012). Recentemente, o aparecimento de “superbactérias”, micro-organismos com habilidade de resistir a quase todos os antibióticos, gerou o medo devido à possibilidade do surgimento de uma nova pandemia.

Durante a última década, tornou-se claro que os antibióticos estão gradativamente perdendo sua eficácia contra os microrganismos. O uso

indiscriminado dessas drogas promoveu uma seleção natural “induzida” em bactérias patogênicas tornando alguns desses micro-organismos resistentes à maioria dos agentes antimicrobianos desenvolvidos (HANCOCK, 2007). Além disso, a capacidade de diversas bactérias de se desenvolverem em biofilmes microbianos também confere uma maior resistência a antibióticos, mesmo quando utilizados em maiores concentrações (HØIBY *et al.*, 2010).

2.3 Micro-organismos patogênicos

Os micro-organismos patogênicos associados em biofilmes são o foco de uma intensa rede de pesquisas devido ao seu envolvimento em um grande número de doenças infecciosas crônicas (DONLAN; COSTERTON, 2002; BJARNSHOLT *et al.*, 2008, 2009a, b; JAMES *et al.*, 2008; HOMOE *et al.*, 2009). Acredita-se que a formação de biofilme desempenhe um papel importante na imunidade da infecção e na proteção contra antimicrobianos (VUONG *et al.*, 2004).

A presença do gene (NDM-1) em dois tipos comuns de bactérias - *Klebsiella pneumoniae* e *Escherichia coli* foi identificado como responsável pela resistência dessas bactérias aos principais grupos de antibióticos, incluindo os carbapenens, normalmente utilizados como última tentativa de tratamento emergencial em pacientes cuja antibioticoterapia convencional não possui um efeito satisfatório (KUMARASAMY *et al.*, 2010). Além disso, a capacidade de diversas bactérias de se desenvolverem em biofilmes microbianos também confere uma maior resistência a antibióticos, mesmo quando utilizados em maiores concentrações (HØIBY *et al.*, 2010).

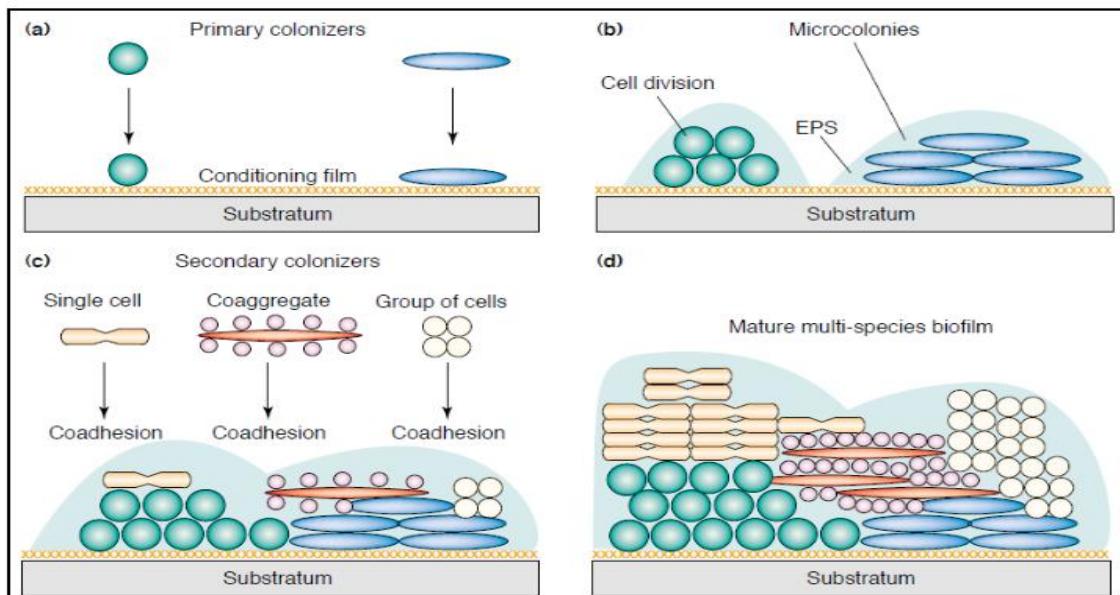
2.4 Biofilmes

Biofilme é um consórcio estruturado de bactérias capazes de produzir uma matriz polimérica que consiste de polissacarídeos, proteínas e DNA (FIGURA 1).

Estas comunidades podem estabelecer-se em uma ampla variedade de superfícies que além da capacidade de produzir biopolímeros extracelulares, as

células em comunidades apresentam padrão de crescimento reduzido e genes específicos regulados para mais ou para menos (ABEE *et al.*, 2010).

Figura 1 - Etapas de formação de um Biofilme



Fonte: Adaptado de Rickard *et al.*, 2003

Bactérias crescendo em biofilmes causam infecções crônicas que são caracterizadas por inflamação persistente e dano tecidual. Infecções crônicas (TABELA 1), incluindo infecções de corpo estranho, são infecções que persistem à despeito de antibioticoterapia, sistema imune inato e adaptativo e resposta inflamatória do hospedeiro é em contraste à colonização, são caracterizados por resposta imune e persistência patológicos (HØIBY *et al.*, 2010).

Tabela 1 - Infecções/doenças humanas associadas com formação de biofilmes e micro-organismos comumente envolvidos.

Doenças associadas a biofilmes / Principais micro-organismos envolvidos

Endocardite valvular nativa *S. aureus*

Otite *S. aureus*, *S. epidermidis*, *P. aeruginosa*, *S. pneumoniae*

Infecção do trato urinário *S. saprophyticus*

Fibrose cística	<i>P. aeruginosa</i> , <i>S. aureus</i> , <i>H. influenzae</i> , <i>S. pneumoniae</i>
Doenças periodontais	<i>P. gingivalis</i> , <i>A. actinomycetemcomitans</i> , <i>Bacteroides forsythus</i> , <i>T. denticola</i>
Cárie	<i>S. mutans</i>
Artrite séptica aguda	<i>S. aureus</i>
Prostatite bacteriana crônica	<i>P. aeruginosa</i> , <i>Staphylococcus coagulase-negativo</i>

Fonte: BATONI *et al.*, 2011 com modificações.

Esse tipo de associação microbiana pode se desenvolver em superfícies bióticas e abióticas, incluindo tecidos vivos, dispositivos médicos e/ou indústrias, sistemas de tubulação de água ou até mesmo em ambientes marinhos (TABELA 2). Na medicina, as superfícies, tais como dentes, cateteres, válvulas cardíacas e lentes de contato podem ser fortemente colonizadas (ONURDAĞ *et al.*, 2010).

Tabela 2 - Aparelhos médicos colonizados por biofilmes e micro-organismos envolvidos

Aparelhos médicos colonizados por biofilmes/ Principais micro-organismos envolvidos	
Válvulas do coração	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>S. sanguis</i> , <i>Streptococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>Candida</i> spp.
Cateter venoso central	<i>S. aureus</i> , <i>S. epidermidis</i> , <i>C. albicans</i> , <i>P. aeruginosa</i> , <i>K. pneumoniae</i>
Cateter urinário	<i>Staphylococcus</i> spp., <i>Enterococcus</i> spp., <i>K. pneumoniae</i> , <i>P. aeruginosa</i>
Acrílicos dentais	<i>C. albicans</i>
Aparelhos intra-uterinos	<i>S. aureus</i> , <i>Enterococcus</i> spp., <i>C. albicans</i>

Fonte: BATONI *et al.*, 2011 com modificações.

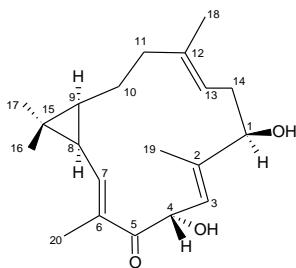
2.5 Substâncias vegetais com atividade antimicrobiana

Agentes antimicrobianos que possuem uma pequena massa molecular, podem ser efetivos para desestabilizar a matriz polissacarídica do biofilme e permitir a sua desestruturação. Assim, classes de substâncias com estas propriedades merecem destaque especial, uma vez que são efetivos contra o crescimento de bactérias e fungos, como também sobre comunidades estruturadas de microrganismos, denominadas biofilmes (CARNEIRO *et al.*, 2011).

O que pode ser evidenciado pelo potencial antimicrobiano do terpenoide isolado de *Xanthorrhiza curcuma*, que se mostrou ativo contra diferentes microrganismos mesmo após um tratamento térmico e uma elevada variação de pH, sugerindo fortemente sua utilização como um conservante natural para impedir o crescimento de patógenos (LEE *et al.*, 2008) e do diterpeno salvipisone isolado de *Salvia sclarea*, que é efetivo contra a formação e desenvolvimento de biofilmes de *Staphylococcus sp.* reduzindo significativamente o número de células viáveis do biofilme. Sendo o primeiro composto derivado de plantas a demonstrar efeito contra agregados celulares de estafilococcus (KUŽMA *et al.*, 2007; HERNÁNDEZ *et al.*, 1999).

Além da promissora atividade bactericida, bacteriostática e antibiofilme do diterpeno casbano isolado de *Croton nepetaefolius* (FIGURA 2) contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas e espécies de *Candida* (VASCONCELOS *et al.*, 2014; CARNEIRO *et al.*, 2011). Vale ressaltar que o diterpeno casbano isolado de *Croton nepetaefolius*, também inibiu o crescimento de bactérias orais em biofilme, principalmente *Streptococcus mutans* (UA 159) principal agente etiológico causador da cárie (SA *et al.*, 2012).

Figura 2 - Diterpeno casbano isolado de *Croton nepetaefolius*



2.6 Óleos essenciais

Os óleos essenciais obtidos a partir das várias partes das plantas já vêm sendo usados desde a antiguidade como aromatizantes. Apresentam grande importância em vários setores indústrias, sendo bastante utilizados na indústria de alimentos e bebidas, na indústria farmacêutica e de cosméticos devido as suas atividades.

Os óleos essenciais são misturas complexas de compostos voláteis. Geralmente possuem aroma forte e se apresentam no estado líquido em temperatura ambiente. Podendo ser obtidos de todos os órgãos vegetais: folhas, flores, frutos, ramos e raízes, através de processos físicos de extração (SILVA, 2007).

Os compostos químicos que constituem os óleos essenciais variam de hidrocarbonetos terpênicos, álcoois simples e terpênicos, aldeídos, cetonas, fenóis, ésteres, éteres, óxidos, peróxidos, furanos, ácidos orgânicos, lactonas, cumarinas até compostos com enxofre. Sendo que as misturas de terpenos preponderam (SILVA, 2007).

Os terpenos são substâncias cuja origem biossintética deriva de unidades do isopreno (FIGURA 3). A unidade isoprênica origina-se a partir do ácido mevalônico (FIGURA 4). Os esqueletos carbonados dos terpenos (TABELA 3) são formados pela condensação de um número variável de unidades pentacarbonadas. Os compostos terpênicos mais comuns nos óleos essências são os monoterpenos, cerca de 90% e os sesquiterpenos (SIMÕES *et al.*, 1999).

Figura 3 – Unidade isoprênica

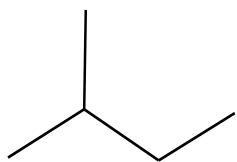
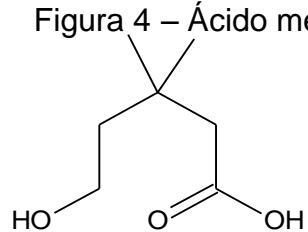


Figura 4 – Ácido mevalônico



Os monoterpenos podem ser divididos em três subgrupos, por exemplo: acíclicos (mirceno, linalol, geraniol), monocíclicos (α -tocoferol e terpinoleno), bicíclicos (α -pineno, tujona, cânfora e fenchona). Enquanto os sesquiterpenos mais freqüentes são: humulano, bisabolano, elemano, germacreno, cariofilano,

eudesmano, cadinano, eremofilano, guaiano, malieno e aromadendreno (SIMÕES *et al.*, 1999; ALMEIDA, *et al.*, 2010).

Tabela 3 - Condensação de unidades isoprênicas na formação de terpenóides

Nº de unidades	Número de átomos de carbono / Estrutura	Classificação
1	5 	Isopreno
2	10 	Monoterpenóides
3	15 	Sesquiterpenóides
4	20 	Diterpenóides
5	25 	Sesterpenos
6	30 	Triterpenóides
8	40 	Tetraterpenóides
N	N	Polisoprenóides

Fonte: Elaborada pelo autor.

A composição química do óleo essencial de uma planta depende de vários fatores, tais como: localização geográfica, estágio do ciclo vegetativo da planta, condições edafoclimáticas, as técnicas de cultivo, variações sazonais e circadianas. As técnicas de obtenção de óleos essenciais podem levar a perda de constituintes importantes e modificar a composição química original do óleo.

2.6.1 Processos de extração de óleos essenciais

Para a extração de óleos essenciais devem ser selecionadas técnicas eficientes, menos trabalhosas e que evitem a modificação da composição original do óleo. Conforme SILVA (2007), as técnicas de obtenção que têm surgido nos últimos anos, visam assegurar que o óleo obtido possua composição química o mais próximo possível da composição da planta viva, apresentem aroma original, sem conter artefatos de extração, aumentando assim a qualidade e portanto, o valor comercial do óleo.

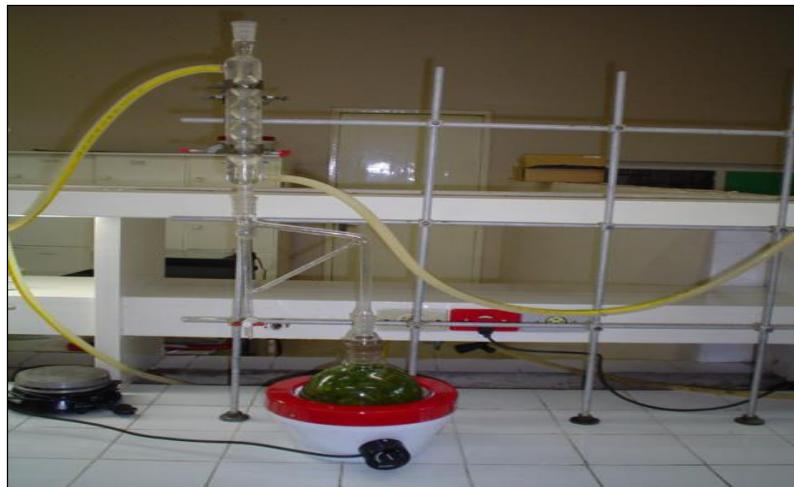
Desde os anos 3000 a.C. já se encontravam registros sobre a hidrodestilação como técnica para extração de óleo essencial. Os aparelhos tipo Clevenger são amplamente utilizados para esta técnica como recomendação da Organização mundial de Saúde (OMS), devido à praticidade e ao baixo custo (PRINS *et al.*, 2006)

2.6.1.1 Processo de extração por hidrodestilação

Neste método (FIGURA 5), o material vegetal é imerso em água sob aquecimento até a fervura, resultando na formação de vapores que arrastam os constituintes voláteis, os quais, após condensação, separam-se da fase aquosa por decantação. Após a separação, o óleo deverá passar por um tratamento com sulfato de sódio anidro para retirar possíveis moléculas de água ainda presentes. Em seguida, o óleo obtido deverá ser armazenado em ambiente refrigerado (PRINS *et al.*, 2006).

Na hidrodestilação, a composição dos óleos essenciais pode sofrer modificação devido ao contato com a água, o tempo de extração e a velocidade do aquecimento, que é regulada segundo graduação do equipamento variando de 1 a 10 °C (PRINS *et al.*, 2006).

Figura 5 – Extrator por hidrodestilação



Fonte: O autor

2.6.1.2 Processo de extração por arraste de vapor

Na extração por arraste com vapor d'água (FIGURA 6), a amostra é submetida à temperatura de 100°C, e o óleo essencial poderá sofrer modificação em sua composição química, como isomerizações, decomposições, e outras reações indesejadas. As modificações que podem ocorrer nesta técnica de extração levam à obtenção de óleos cujo aroma difere daquele da planta de origem, levando também a perda de constituintes importantes para a indústria química (SILVA, 2007).

Figura 6 – Extrator por arraste de vapor

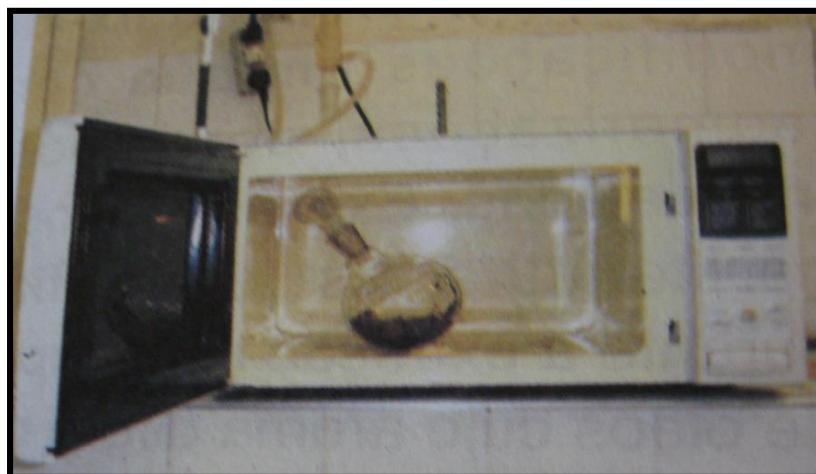


Fonte: Silva, 2007.

Constituintes importantes podem estar se perdendo nos processos de

extração, advindo daí a vantagem da técnica de extração pelo processo de utilização das microondas, além da possibilidade de se obter óleo essencial a partir de pequenas quantidades de material. A extração com o uso de microondas (FIGURA 7) pode ser realizada utilizando um forno de microondas doméstico adaptado. Nessa técnica, utiliza-se quantidade menor de material vegetal, 30 a 40g, e o tempo de exposição é de apenas 4 a 8 minutos (SILVA, 2007).

Figura 7 – Extrator usando forno de microondas adaptado



Fonte: Silva, 2007.

O material é colocado com água em um balão e exposto as microondas que aquecem as moléculas de água existentes no vegetal, fazendo com que o óleo seja arrastado pelo vapor formado. O óleo essencial obtido assemelha-se com àquele extraído por arraste com vapor de água (SILVA, 2007).

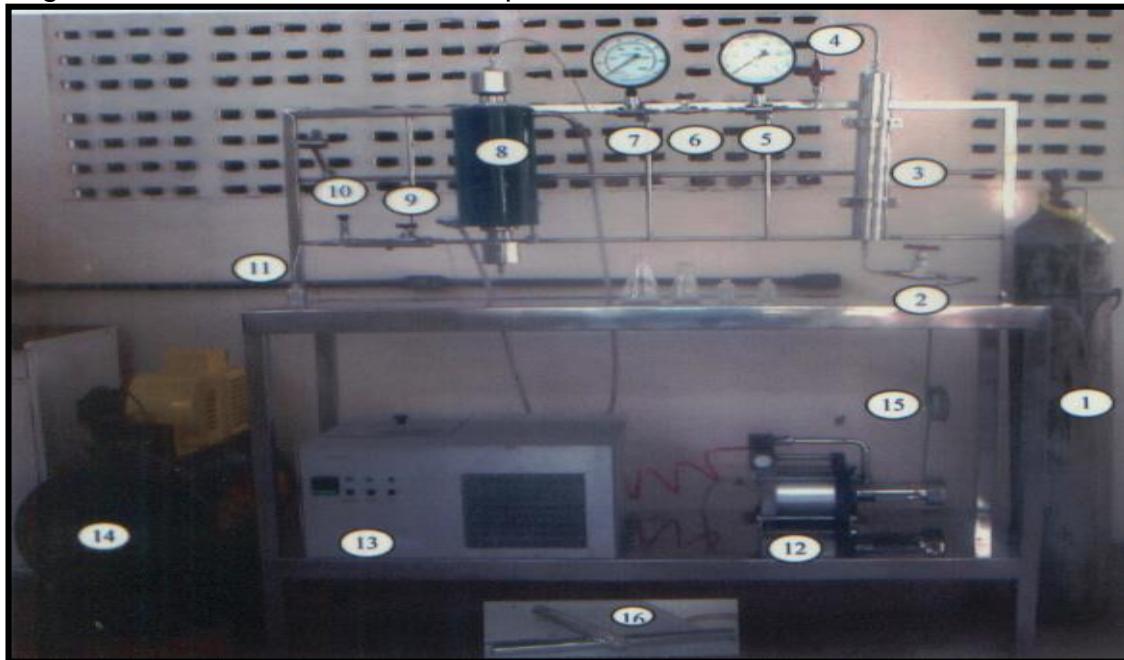
2.6.1.3 Processo de extração por CO₂ supercrítico

Dentre as técnicas de obtenção de óleo essencial, a extração por CO₂ supercrítico (FIGURA 8), é atualmente o método mais escolhido pelas indústrias, pois, através desta técnica, obtém-se um produto mais puro do que aqueles obtidos por outras técnicas (SIMÕES *et al.*, 1999).

Para extrações com CO₂ supercrítico, utiliza-se quantidade maior de material vegetal, que deve ter sido seco a temperatura ambiente. Com a temperatura de trabalho baixa, aproximadamente 32°C, com isso pode-se extrair constituintes termicamente lábeis. Este fato somado à capacidade de solvatação do CO₂ possibilita a obtenção de óleo essencial mais puro, com aroma original e

livre de solventes, pois o CO₂ pode ser retirado do sistema apenas com modificações na temperatura e pressão (SILVA, 2007).

Figura 8 – Extrator usando CO₂ supercrítico



- | | | |
|-------------------------------------------------|--------------------------------------|------------------------------|
| 1. Cilindro de CO ₂ | 7. Manômetro 2 | 11. Restritor |
| 2. Válvula para entrada de CO ₂ em 3 | 8. Camisa de aquecimento do cilindro | 12. Bomba Pneumática |
| 3. Vaso de pressurização | 9. Válvula de saída da cela extração | 13. Sistema de aquec.e resf. |
| 4. Válvula de saída de CO ₂ de 3 | 10. Válvula de regulagem de pressão | 14. Compressor |
| 5. Manômetro 1 | | 15. Tubos de Transmissão |
| 6. Válvula intermediadora | | 16. Cela de Extração |

Fonte: Silva, 2007.

2.6.2 Atividade Biológica e usos de óleos essenciais

São várias as atividades apresentadas pelos óleos essenciais. Dentre elas, destacam-se as atividades: antimicrobiana, anestésica, antitumoral, antioxidante, analéptica, analgésica, anti-helmíntica, antiepilética, anti-HIV e outras (SILVA, 2007).

Conforme SIMÕES *et al.*, (1999), algumas propriedades farmacológicas estão bem estabelecidas, tais como:

- Ação carminativa: produção de anestesia sobre a cárda, permitindo seu relaxamento e consequente expulsão do ar do gastrointestinal.

- Ação antiespasmódica: relaxamento da musculatura lisa intestinal, diminuindo ou suprimindo espasmos (cólicas).
- Ação secretolítica: provoca a atividade secretora do epitélio respiratório, facilitando a fluidificação e a expulsão dos mocos em alguns casos respiratórios.
- Ação anestésica local: presença de alto nível de eugenol.
- Ação anti-séptica: inibição do crescimento de várias bactérias e fungos, devido à presença de compostos fenólicos, aldeídos e álcoois.
- Ação antioxidante: capacidade de retardar ou inibir a oxidação.

Os óleos essenciais têm uma grande importância na indústria devido principalmente ao seu vasto uso como aromatizante ou flavorizante e suas propriedades terapêuticas.

O Brasil é um exportador de óleos essenciais “*in natura*”, sem qualquer modificação, esses óleos muitas vezes voltam ao país, após terem sido submetidos a processos de purificação e separação, ou sob forma de derivados e constituintes químicos isolados, chegando com um preço bem mais elevado (SILVA, 2007).

São vários os tipos de óleos essenciais produzidos no Brasil que tem escala comercial (TABELA 4), inclusive possui um grande potencial de óleos essenciais orgânicos, que é um mercado em ascensão (SILVA, 2007).

Tabela 4 – Principais fontes de óleos essenciais produzidos no Brasil e suas respectivas aplicações

Tipo de óleo	Aplicações principais
Limão	Comestíveis, farmacêuticos e perfumaria
Laranja	Comestíveis, farmacêuticos e perfumaria
Patchouli	Perfumaria
Menta	Comestíveis, farmacêuticos, confeitaria e bebidas
Pau rosa	(mentol)

Sassafrás	Produção de linalol e derivados
Eucalipto	Produção de safrol (heliotropina)
Citronela	Perfumaria, farmacêuticos e síntese orgânica
Vetiver	Perfumes, inseticidas e síntese orgânica
	Perfumes e produção de vetiverol

Fonte: Silva, 2007

2.6.3 Radicais livres

As moléculas e átomos que contêm um ou mais elétrons desemparelhados com existência independente, podem ser classificados como radicais livres. Essa configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Esses radicais livres (TABELA 5) cujo elétron desemparelhado encontra centrado nos átomos de oxigênio ou nitrogênio são denominadas espécie reativa de oxigênio (ERO) ou espécie reativa de nitrogênio (ERN) (BARREIROS *et al.*, 2006).

Tabela 5 - Algumas espécies de radicais livres

$^1\text{O}_2$	Oxigênio singlete
O_2^-	Radical superóxido
OH^\cdot	Radical hidroxila
NO^\cdot	Óxido nítrico
ONOO^-	Peroxinitrito
Q^\cdot	Radical semiquinona

Fonte: BARREIROS *et al.*, 2006

No organismo, os radicais livres, estão envolvidos na produção de

energia, fagocitose, regulação de crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias biológicas importantes. No entanto, seu excesso apresenta efeitos prejudiciais e encontram-se relacionados com várias patologias, como artrite, choque hemorrágico, doenças de coração, catarata, disfunções cognitivas, câncer e AIDS. (BARREIROS *et al.*, 2006)

A formação de radicais livres ocorre naturalmente no organismo dos seres vivos, via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferência de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos (TABELA 6). Contudo na condição de pró-oxidante a concentração desses radicais livres pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência dos mecanismos antioxidantes. (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Tabela 6 - Fontes exógenas e endógenas de formação de radicais livres

ENDÓGENAS	EXÓGENAS
Respiração aeróbica	Ozônio
Inflamações	Radiações gama e ultravioleta
Peroxissomos	Medicamentos
Enzimas do citocromo P450	Dieta e Cigarro

Fonte: BIANCHI; ANTUNES, 1999.

Os radicais livres podem ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana e o seu alvo celular: proteínas, carboidratos e DNA, está relacionado com o seu sítio de formação. A produção contínua de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de muitos mecanismos de defesa antioxidante, para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos. (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

O desequilíbrio entre moléculas oxidantes e antioxidantes que resulta na indução de danos celulares causados pelos radicais livres, tem sido chamado de estresse oxidativo (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Os radicais livres promovem reações com substratos biológicos, podendo ocasionar danos às biomoléculas e,

consequentemente, afetar a saúde humana. (BARREIROS *et al.*, 2006)

Os danos oxidativos induzidos nas células tecidos têm sido relacionados com a etiologia de várias doenças, incluindo doenças degenerativas, tais como as cardiopatias, aterosclerose e problemas pulmonares (TABELA 7). Os danos mais graves são aqueles causados ao DNA e RNA, uma vez que o DNA é a molécula responsável por todas as informações genéticas das células de um organismo vivo. (BARREIROS *et al.*, 2006).

Tabela 7 - Algumas doenças relacionadas com os danos oxidativos

Artrite	Disfunção cerebral
Aterosclerose	Cardiopatias
Diabetes	Enfisema
Catarata	Envelhecimento
Esclerose múltipla	Câncer
Inflamações crônicas	Doenças do sistema imune

Fonte: BARREIROS *et al.*, 2006

Os organismos vivos interagem com o meio ambiente que favoreça a sobrevivência, o crescimento e a reprodução. O oxigênio molecular (O_2) obtido da atmosfera é vital para os organismos aeróbios; contudo os radicais livres formados intracelularmente, a partir do oxigênio, ameaçam a integridade celular por meio da oxidação de biomoléculas, e podem comprometer processos biológicos importantes (MORAIS, 2006; CERQUEIRA *et al.*, 2007).

A produção permanente de radicais livres durante os processos metabólicos levou ao desenvolvimento de mecanismos de defesa antioxidante, para limitar os níveis intracelulares e impedir a indução de danos (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

Os antioxidantes são substâncias que presentes em baixas concentrações quando comparada ao do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Contudo,

também existem os pró-oxidantes que são substâncias endógenas ou exógenas capazes de oxidar moléculas (CERQUEIRA *et al.*, 2007).

São vários os níveis de proteção dos antioxidantes nos organismos:

- Defender contra os radicais livres e impedir sua formação, principalmente, pela inibição das reações em cadeia com o ferro e o cobre;
- Impedir o ataque dos radicais livres sobre os lipídeos, os aminoácidos das proteínas, a dupla ligação dos ácidos graxos poliinsaturados e as bases do DNA, evitando a formação de lesões e a perda da integridade celular. Os antioxidantes obtidos na dieta, tais como as vitaminas A, C e os flavonoides e carotenoides são importantes na intercepção dos radicais livres;
- Remover danos das moléculas de DNA e reconstituir as membranas celulares danificadas.

O desempenho dos antioxidantes depende dos fatores: tipos de radicais livres formados; onde e como são formados esses radicais, e quantidades ideais para obter proteção. Assim, é possível que um agente antioxidante atue como protetor em determinado sistema, mas falhe na proteção, ou mesmo aumente as lesões induzidas em outros sistemas (BIANCHI; ANTUNES, 1999).

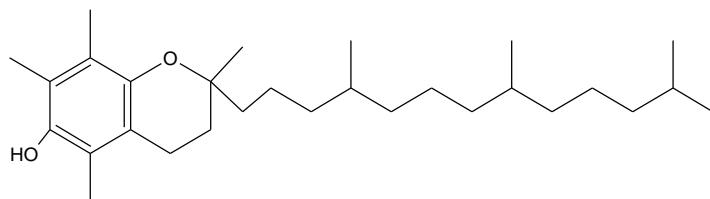
A classificação mais comum para os antioxidantes é a que os divide em dois sistemas, o enzimático, composto pelas enzimas produzidas no organismo, e o não-enzimático, fazendo parte deste grupo às vitaminas e outras substâncias, como flavonoides, licopeno, zinco e selênio (SANTOS; CRUZ, 2001).

Os alimentos que fazem parte da dieta humana, tais como vitaminas A, C e E, flavonoides e minerais são fontes naturais de substâncias antioxidantes.

2.6.4 Atividades Antioxidante de substância vegetais

Os tocoferóis são encontrados em quatro formas na natureza: α , β , γ e δ -tocoferol. Sendo o α -tocoferol (FIGURA 9) a forma antioxidante mais importante e amplamente distribuída nos tecidos e no plasma (BIANCHI; ANTUNES, 1999). O potencial antioxidante dos tocoferóis em meio biológico é diferente, sendo $\alpha >> \gamma > \delta > \beta$ (CERQUEIRA *et al.*, 2007).

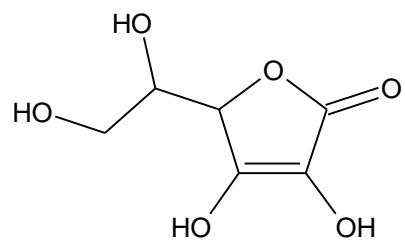
Figura 9 – Estrutura do α -tocoferol



A vitamina E é encontrada em grandes quantidades nos óleos vegetais. Essa vitamina impede ou minimiza os danos provocados pelos radicais livres associados com doenças específicas incluindo o câncer, artrite, catarata e o envelhecimento precoce (BIANCHI; ANTUNES, 1999). A adição de vitamina E na dieta de pacientes oncológicos, reduz alguns efeitos causados pelo tratamento quimioterápico, tais como queda de cabelo e lesões renais (SANTOS ; CRUZ, 2001).

O ácido ascórbico (FIGURA 10) ou vitamina C, é uma vitamina hidrossolúvel e um importante antioxidante. Faz-se presente na dieta humana, sendo absorvido através de alimentos, como laranja, cajú, goiaba, acerola entre outras frutas, legumes e hortaliças.

Figura 10 – Estrutura do ácido ascórbico



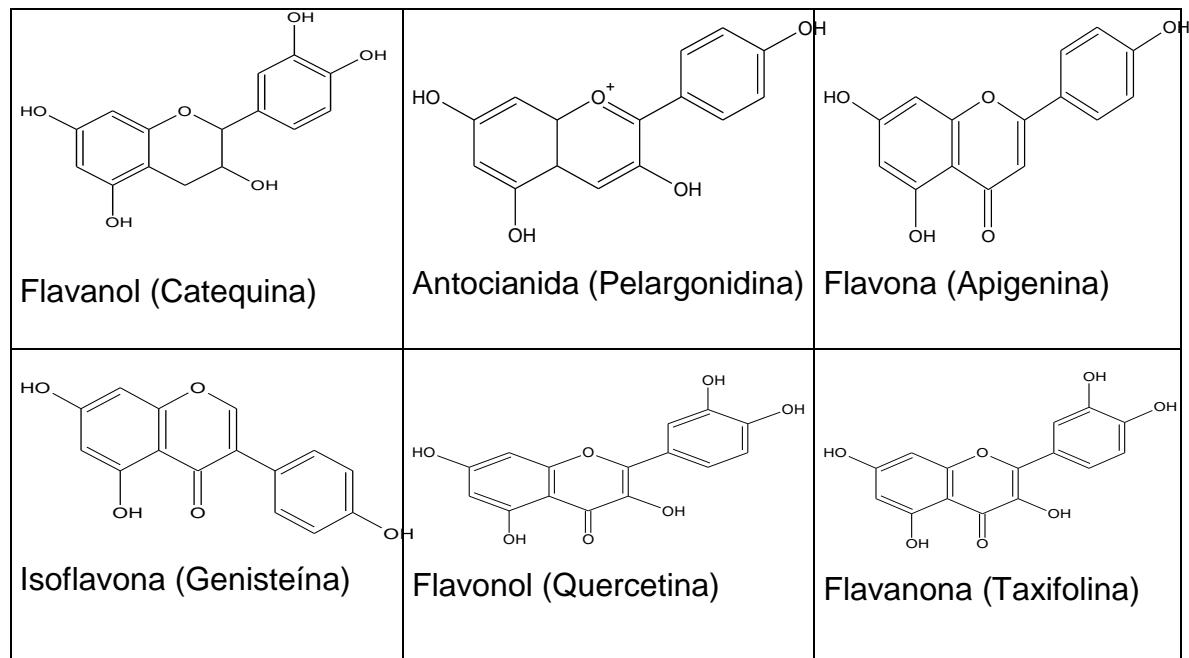
Além da capacidade de captar radicais livres, a vitamina C é importante na absorção de ferro dietético, regenera a vitamina E, participa do mecanismo

protetor contra lipoperoxidação e na prevenção do câncer (CERQUEIRA *et al.*, 2007).

A privação prolongada de vitamina C na dieta pode levar o indivíduo ao escorbuto, uma doença caracterizada por edema, anemia, hemorragias subcutâneas e mudanças patológicas nos dentes e gengivas (CONN; STUMPF, 1990). O escorbuto pode ser prevenido pelo consumo diário de 10mg de vitamina C, doses mais elevadas são necessárias para a manutenção de uma saúde desejável (CERQUEIRA *et al.*, 2007).

Os polifenóis são os antioxidantes mais abundantes da dieta. Seus efeitos na saúde humana tornaram-se foco de atenção apenas a partir da década de 90, apesar de sua abundante distribuição em plantas. São os antioxidantes mais consumidos, atingindo 1g o consumo diário (CERQUEIRA *et al.*, 2007). Os compostos fenólicos e polifenólicos sintetizados pelas plantas possuem variadas estruturas e funções. Entre os antioxidantes presentes nos vegetais os mais estudados e os mais ativos são os flavonoides (FIGURA 11), que têm em comum a estrutura C₆ – C₃ – C₆, consistindo de dois anéis aromáticos ligados por um heterocíclico oxigenado (BIANCHI; ANTUNES, 1999; CERQUEIRA *et al.*, 2007).

Figura 11 – Quadro dos representantes das principais classes de flavonoides



Fonte: Elaborada pelo autor

As propriedades benéficas desses compostos podem ser atribuídas à sua capacidade de sequestrar os radicais livres (BIANCHI; ANTUNES, 1999). Além dos efeitos antioxidantes, os polifenóis podem exercer efeitos diretos no trato gastrointestinal, prevenir contra câncer e diminuir os riscos de desenvolvimento de doenças cardiovasculares (CERQUEIRA *et al.*, 2007).

O ácido caféico, o ácido gálico e o ácido elágico apresentam uma considerável significância na dieta, podendo inibir o processo de peroxidação lipídica. O ácido elágico, encontrado na uva, morango e nozes, tem efeito na prevenção do desenvolvimento do câncer induzido pelas substâncias do cigarro (BIANCHI ; ANTUNES, 1999).

Os compostos fenólicos podem inibir os processos de oxidação em certos sistemas, mas isso não significa que eles possam proteger as células e tecidos de todos os tipos de danos oxidativos. Esses compostos também podem apresentar atividade pró-oxidante em determinadas condições (BIANCHI ; ANTUNES, 1999).

Os compostos fenólicos de plantas enquadram-se em diversas categorias, como fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonóides, estilbenos, ligninas e taninos condensados e hidrolisáveis. Dentre as diversas classes de substâncias antioxidantes de ocorrência natural, os compostos fenólicos têm recebido muita atenção nos últimos anos, sobretudo por inibirem a peroxidação lipídica e a lipooxigenase (VASCONCELOS *et al.*, 2014; SILVA *et al.*, 2010).

Neste contexto, os gêneros *Croton* (*Euphorbiaceae*) e *Vitex* (*Lamiaceae*) são extremamente importantes, uma vez que estudos fitoquímicos realizados com espécies dos referidos gêneros têm mostrado a presença de terpenóides, alcalóides, flavonóides, triterpenos, esteróides e ligninas. Dentre os quais, podemos destacar os diterpenos e flavonóides, por apresentarem uma vasta variedade de atividades farmacológicas, principalmente atividade antimicrobiana e antioxidante (CARNEIRO *et al.*, 2011; SA *et al.*, 2012; OLIVEIRA *et al.*, 2014 RANI; SHARMA, 2013).

Além do fato de óleos essenciais de espécies de *Croton* e *Vitex* terem demonstrado promissora atividade antimicrobiana (FONTENELLE *et al.*, 2008). No

entanto, poucos são os relatos da literatura no que concerne à atividade antibiofilme de óleos essenciais (BUDZYNSKA *et al.*, 2011).

Vitex gardneriana (Lamiaceae) (FIGURA12), é uma árvore de porte médio (arbustiva) encontrada no sertão nordestino, frequentemente as margens dos rios. Conhecida popularmente por “Jaramataia”, tem sido utilizada no tratamento de doenças infamatórias.

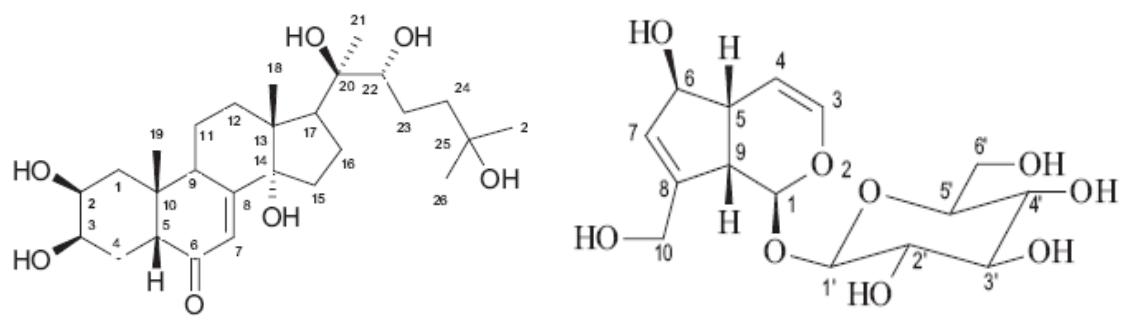
Figura 12 - *Vtex gardneriana*



Fonte: O autor

A literatura descreve apenas o estudo fitoquímico do extrato metanólico das cascas do caule que resultou no isolamento de um ecdisteróide e um iridóide(FIGURA13), além das atividades molusicida e de toxicidade aguda do mesmo extrato (SÁ-BARRETO *et al.*, 2005; 2008).

Figura 13 - Ecdisteróide e iridóide isolados do extrato metanólico da casca do caule de *Vitex gardneriana*



Com relação a espécie *Croton piauhiensis* (FIGURA 14), não foram encontrados na literatura relatos fitoquímicos e/ou farmacológicos deste vegetal.

Figura 14 – *Croton piauhiensis*



Fonte: O autor

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Investigar a composição química fixa e volátil de espécies da região Norte do Ceará como *C. piauhiensis* e *V. gardneriana*. Além de avaliar o potencial antimicrobiano, antibiofilme e antioxidante de constituintes isolados e óleos essenciais extraídos

3.2 Objetivos específicos

1. Extrair e analisar óleos essenciais obtidos de *C. piauhiensis* e *V. gardneriana*;
2. Submeter os óleos essenciais obtidos de *C. piauhiensis* e *V. gardneriana* a bioensaios de atividade antimicrobiana, antibiofilme e antioxidante;
3. Realizar fracionamento cromatográfico dos extratos obtidos de *C. piauhiensis* e *V. gardneriana* utilizando colunas cromatográficas contendo sílica gel e sephadex LH-20, visando o isolamento de metabólitos secundários;
4. Determinar a estrutura química dos compostos isolados utilizando técnicas de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais;
5. Submeter os metabólitos secundários isolados de *C. piauhiensis* e *V. gardneriana* a bioensaios de atividade antimicrobiana, antibiofilme e antioxidante;
6. Divulgação dos resultados;
7. Publicação dos resultados em periódicos nacionais e internacionais.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Material biológico

O material biológico da espécie *V. gardneriana*, foi coletado na cidade de Sobral/CE, na fazenda experimental da Universidade Estadual Vale do Acaraú – UVA (latitude Sul 03°37'15,34" e Longitude West 40°80'41,36"). A espécie foi identificada pelo Botânico Professor Dr. Elnatan Bezerra de Souza, e a exsicata testemunho encontra-se depositada no Herbário Prof. Francisco José de Abreu Matos da referida universidade, sob o Nº 17.703. O material biológico da espécie *C. piauhiensis* foi coletada no distrito de Bomfim na cidade de Sobral/CE (Latitude Sul 03°37'15,34" e Longitude West 40°80'41,36"), a espécie foi identificada pela Professora Dra. Daniela Santos Carneiro Torres da Universidade Estadual de Feira de Santana UEFS e a exsicata testemunho encontra-se depositada no Herbário da Universidade Estadual de Feira de Santana/ BA, Nº 14.989.

4.2 Obtenção e identificação dos constituintes voláteis

As folhas das espécies *C. piauhiensis* e *V. gardneriana*, recém coletadas e identificadas, foram colocados em um balão de vidro de 5L, juntamente com 2L de água e mantido por duas horas em ebulição. Após este período, a mistura água/óleo contida no doseador foi separada em funil de separação através de partição com éter etílico. A fase orgânica foi seca com sulfato de sódio anidro (Na_2SO_4) e concentrada sob pressão reduzida, fornecendo os respectivos óleos essenciais.

A análise dos óleos essenciais foi feita por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) em aparelho da Hewlett-Parkard 5971. Condições programadas no aparelho: coluna capilar de DB-1 (dimetil-polisiloxane) com 30 m de comprimento e 0,2 mm de diâmetro interno; gás de arraste: Hélio (1 mL/min); programa: 50-180 °C a 4 °C/min e, depois, 180-220 °C a 20 °C/min; temperatura no injetor: 220 °C; modo de injeção: 0,1 µL (solução 10%), split 1:20, 500 ng/na coluna. Os espectros de massas foram produzidos por impacto eletrônico (70 eV).

Os espectros de massas dos constituintes foram comparados com padrões existentes na quimioteca Wiley do computador do aparelho. Em seguida, foram feitas comparações visuais com espectros de massas de substâncias encontradas na literatura (ADAMS, 2007; MAIA, et al., 2010).

Os tempos de retenção dos picos maiores, mais facilmente identificados no espectro de massas, foram comparados com os tempos de retenção destas substâncias registrados na literatura, observando-se a diferença que se manteve aproximadamente constante para as demais substâncias identificadas pelo computador do aparelho.

4.3 Obtenção dos extratos e isolamento dos constituintes fixos

O material vegetal constituído de, casca, caule e raízes de *C. piauiensis* e *V. gardneriana*, foram secos à temperatura ambiente, triturado e submetido a extração à frio, com etanol. As soluções obtidas foram destiladas sob pressão reduzida, à temperatura média de 60 °C (FIGURA 15).

Figura 15 – Destilação à pressão reduzida



Fonte: O autor

Para obtenção dos extratos hexânico, clorofórmico, acetático e metanólico, foi realizado um pré-fracionamento a partir do extrato etanólico. Cada extrato foi adsorvido em quantidade apropriada de sílica-gel por meio de atrito mecânico em gral de porcelana e acondicionado sobre sílica-gel em coluna cromatográfica e eluído com hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, para obtenção dos respectivos eluatos, (FIGURA 16).

Figura 16 – Pré-fracionamento dos extratos.



Fonte: O autor

Os metabólitos secundários existentes nos eluatos foram isolados e purificados após sucessivos tratamentos cromatográficos (FIGURA 17), onde os eluatos foram adsorvidos e empacotados em colunas cromatográficas contendo sílica-gel. O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com a quantidade de amostra a ser submetida à cromatografia. As quantidades de sílica-gel utilizadas foram variáveis para cada fracionamento, conforme a quantidade e o grau de pureza da amostra.

Figura 17 –Tratamento cromatográfico dos extractos



Fonte: O autor

As revelações das substâncias nas cromatoplacas analíticas foram realizadas por meio da exposição destas, com solução de vanilina, seguida de aquecimento (FIGURA 18).

Figura 18 – Placas (CCD) reveladas



Fonte: O autor

4.4 Determinação estrutural dos constituintes isolados

Os dados espectroscópicos de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C uni e bidimensionais necessários para a determinação estrutural dos constituintes isolados foram obtidos no Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREM), da Universidade Federal do Ceará.

4.4.1 Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN ^1H) e de Carbono-13 (RMN ^{13}C)

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker DRX-300 e DPX-500 (^1H : 300 e 500 MHz; ^{13}C : 75 e 125 MHz), utilizando solventes deuterados e TMS como padrão interno.

4.5 Avaliação da atividade antimicrobiana

Os testes de atividade antimicrobiana, antibiofilme e antioxidante com os metabólitos secundários e óleos essenciais de *C. piauhiensis* e *V. Gardneriana* foram realizados no Biomar-Lab, Laboratório da Engenharia de pesca da Universidade Federal do Ceará - UFC.

4.5.1 Cultivo das cepas bacterianas

As bactérias foram cultivadas em Agar Triptona de Soja (TSA; Himedia, Índia) e incubadas a 37 °C durante 24 horas. Após o crescimento uma colônia isolada foi removida e inoculada em 10 mL de Caldo de Triptona de Soja (TSB; Himedia, Índia) e incubada a 37 °C por 18 horas sob agitação constante. Em seguida, a concentração de células de cada inoculo foi ajustada para 2×10^6 células/mL, através de turbidimetria (620 nm) e curvas de calibração previamente determinada para cada bactéria.

4.5.2 Atividade antimicrobiana

O efeito dos óleos essenciais sobre o crescimento planctônico das bactérias foi determinado pelo método de microdiluição em caldo utilizando placas de poliestireno de 96 poços. Previamente, cada óleo foi diluído à 10% em (meio TSB contendo 10 % de tween) originando concentrações que variavam na placa de 5 a 0,039 % (v/v). Em cada poço da microplaca foi adicionado 100 µL de meio contendo concentrações variadas dos óleos e em seguida adicionado 100 µL de cada uma das bactérias separadamente (2×10^6 células/mL). As placas foram então incubadas a 37 °C durante 24 horas em agitação constante. O crescimento bacteriano foi mensurado através da densidade óptica do conteúdo de cada poço, a um comprimento de onda de 620 nm, usando um leitor de microplacas. A concentração inibitória mínima (CIM) foi considerada a menor diluição do composto que não apresentou crescimento visível dos micro-organismos. Para determinação da CBM (Concentração Bactericida Mínima) foi inoculado 10 µL dos poços que não houve um crescimento microbiano visível em placas de petri com meio TSA. Foi considerado CBM a menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento microbiano nas placas.

4.5.3 Avaliação da atividade antibiofilme

A metodologia utilizada para o desenvolvimento dos biofilmes foi baseada na metodologia desenvolvida por Stepanovic e colaboradores (2000) com algumas modificações. Placas de 96 poços de polipropileno foram preparadas usando um procedimento similar ao ensaio de CIM, utilizando as mesmas concentrações de bactérias e dos óleos, assim como os mesmos padrões de incubação. Após o crescimento dos biofilmes na presença e ausência do composto, o conteúdo de cada poço foi removido e o biofilme aderido à placa foi lavado três vezes usando 200 µL de água estéril por poço. Posteriormente os biofilmes foram avaliados por quantificação da biomassa e enumeração do número de células viáveis.

4.5.4 Quantificação da biomassa

A quantificação da biomassa dos biofilmes foi determinada pelo método de coloração com cristal de violeta. Após a lavagem dos biofilmes contidos em cada poço, os mesmos foram fixados pela adição de 200 µL de metanol absoluto em cada poço por 15 minutos. Em seguida, o metanol foi removido e a placa foi deixada secar a 25 °C. Após a secagem das placas, foram então adicionados 200 µL de cristal de violeta em cada poço e após 5 minutos o excesso de cristal de violeta foi removido e as placas lavadas utilizando água estéril. Para dissolver o cristal de violeta remanescente nos poços foram adicionados 200 µL de ácido acético (33%, v/v) e a densidade óptica foi mensurada a 590 nm.

4.5.5 Contagem de UFC's

Após a formação dos biofilmes, 200 µL de água estéril foi adicionado a cada poço e as placas foram levadas em banho sônico operando a 50 kHz durante 8 minutos. O conteúdo dos poços foi retirado e diluições seriadas de cada suspensão obtida foram plaqueadas em TSA. As placas foram então incubadas por 24 horas a 37 °C e o número de unidades formadoras de colônias (UFC) por volume da placa de microtitulação foram enumerados (log UFC/mL).

4.6 Atividade antioxidante

4.6.1 Ensaio de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

A capacidade dos óleos em sequestrar os radicais DPPH foi realizada através do método descrito por Duan e colaboradores (2006). Uma solução metanólica contendo 0,16 mM de DPPH foi adicionado aos óleos, em diferentes concentrações (de 500 a 7,8 µg/mL). Os resultados foram comparados com o branco (apenas os óleos) e o controle do ensaio (apenas a solução 0,16 mM de DPPH). As amostras foram incubadas na ausência de luz a 25 °C durante 30 minutos e a densidade óptica foi mensurada a 517 nm utilizando um leitor de microplacas (Biochrom Asys UVM 340). Ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo. A porcentagem do efeito do sequestro do radical DPPH foi calculada através da seguinte equação:

$$\text{Sequestro de DPPH}(\%) = \left[1 - \frac{(O.Damostra - O.Dbranco)}{O.Dcontrole} \right] \times 100\%$$

4.6.2 Atividade quelante de íons ferrosos (FIC)

O ensaio de atividade quelante de íons ferrosos foi realizado de acordo com Wang e colaboradores (2009). As soluções dos óleos foram preparadas utilizando água deionizada de modo a obter concentrações de 500 a 7,8 µg/mL sendo adicionados 2 mM de cloreto ferroso (FeCl_2) e 5 mM de ferrozina. O branco e o controle foram preparados com água destilada, substituindo a ferrozina e os óleos, respectivamente. As amostras foram incubadas a 25 °C durante 10 minutos e a densidade óptica foi mensurada a 562 nm utilizando um leitor de microplacas (Biochrom Asys UVM 340). O EDTA (ácido etilenodiamino tetra-acético) foi utilizado como controle positivo. A atividade FIC foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Atividade quelante do íon ferro}(\%) = \frac{[O.Dcontrole - (O.Damostra - O.Dbranco)]}{O.Dcontrole} \times 100\%$$

4.6.3 Método de redução do ferro (FRAP)

O poder antioxidant de redução férrica dos óleos foi determinado através do método descrito por Ganesan e colaboradores (2008). Inicialmente os óleos foram diluídos em tampão fosfato de sódio 0,2 M (pH 6,6) com 1% de ferricianeto de potássio, em concentrações que variaram de 500 a 7,8 µg/mL. As amostras foram incubadas a 50 °C por 20 minutos. Após arrefecimento, foram adicionados 10% de ácido tricloroacético. Uma alíquota foi misturada com 0,1% de cloridrato de ferro em água destilada. Após 10 minutos, a densidade óptica foi mensurada a 700 nm utilizando um leitor de microplacas (Biochrom Asys UVM 340). Butilhidroxianisol (BHA) foi utilizado como controle positivo. Quanto maior a densidade óptica, maior capacidade do composto em reduzir o ferro.

4.6.4 Método de inibição da oxidação do β-caroteno (BCB)

A capacidade dos óleos em inibir a oxidação do β-caroteno e do ácido linoléico foi determinada através do método descrito por Chew e colaboradores (2008). O reagente para a realização deste ensaio é constituído por 3 mL de 0,1mg/mL de β-caroteno dissolvido em clorofórmio, 40 mg de ácido linoléico e 400 mg de Tween 40. O clorofórmio foi evaporado utilizando um rotoevaporador, e em seguida água ultrapura (Milli-Q) foi adicionada a solução. Os óleos nas concentrações de 500 a 7,8 µg/mL. A densidade óptica das soluções foi mensurada inicialmente a 470 nm utilizando um leitor de microplacas (Biochrom Asys UVM 340), em seguida, novamente após 3 horas de incubação a 50 °C. BHA foi utilizado como controle positivo para este ensaio. A atividade antioxidant foi calculada pela seguinte equação:

$$\text{Atividade antioxidant} (\%) = \left(\frac{O.D_{final}}{O.D_{inicial}} \right) \times 100\%$$

4.7 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada com o auxílio do software GraphPad Prism 5,0. Para os ensaios antibacterianos, os resultados foram expressos como média dos valores \pm S.D para n experimentos. A avaliação estatística foi combinada pela análise de variância (ANOVA) para múltiplas comparações, seguida pelo teste de Bonferroni. Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

Para os ensaios antioxidantes, os valores percentuais obtidos nos ensaios de DPPH, FIC e BCB para cada uma das concentrações testadas foram convertidos para valores absolutos, submetidos à transformação angular e comparados através do teste t Student's para valores independentes. Os valores de densidade óptica obtidos no ensaio FRAP também foram analisados usando o teste t Student's para valores independentes. Valores de $p<0,05$ foram considerados estatisticamente significantes.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 Estudo da composição volátil das folhas de *V. gardneriana*

Os resultados da análise por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (CG/MS), constam (TABELA 8), os quais permitiram a identificação e quantificação de 12 (doze) compostos organizados por ordem de eluição na coluna DB-5 correspondendo a 74,86% da composição química do óleo, tendo como principais constituintes, Cis-Calameneno (28,15%), Isoledeno (13,07%), α-copaeno (9,28%) e E-Cariofileno (6,45%). A análise mostrou que a constituição predominante do óleo é de sesquiterpenos (66,34%).

Tabela 8 - Percentual relativo dos componentes do óleo essencial das folhas de *V. gardneriana*.

Constituintes	IK	%
α-pineno	939	1,41
β-pineno	979	2,06
α-cubebeno	1348	3,46
α-copaeno	1335	9,28
Isoledeno	1376	13,07
E-Cariofileno	1418	6,45
α-humuleno	1454	1,46
Germacreno D	1485	2,18
Cis-calameneno	1529	28,15
α-calacoreno	1543	2,29
Óxido de Cariofileno	1583	4,02
Cubenol	16,46	1,75

Fonte: Elaborada pelo autor.

*IK (índice de Kovats)

5.1.1 Identificação dos constituintes do óleo essencial das folhas de *V. gardneriana*

O cromatograma do OE das folhas de *V. gardneriana* e os espectros de massas dos constituintes são apresentados a seguir, (FIGURAS 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30 e 31).

Figura 19 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *V. gardneriana*

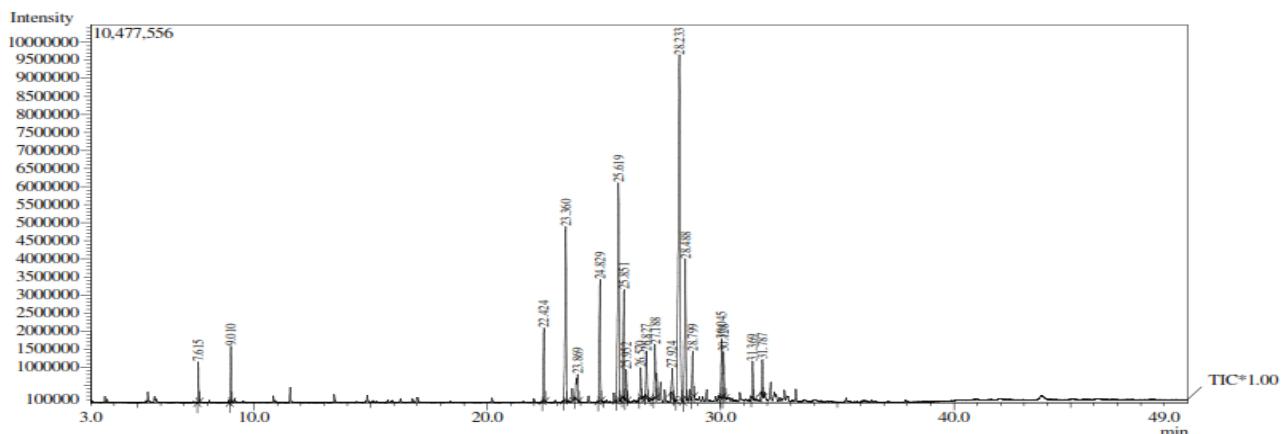


Figura 20 - Espectro de massas do α -pineno

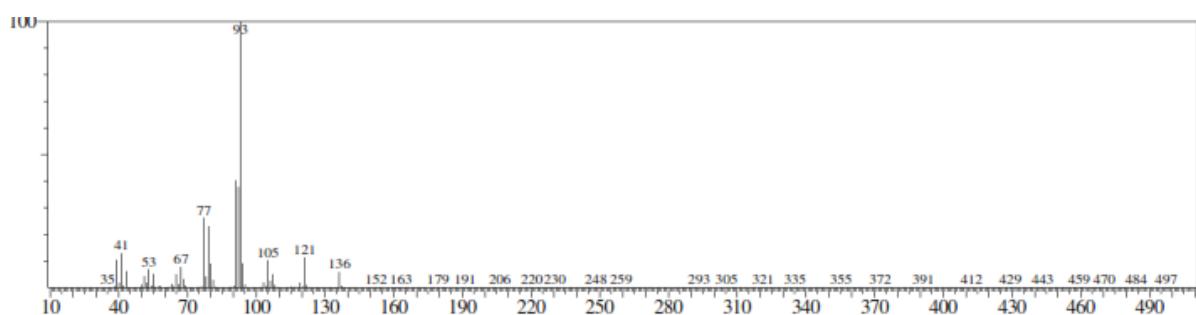


Figura 21 - Espectro de massas do β -pineno

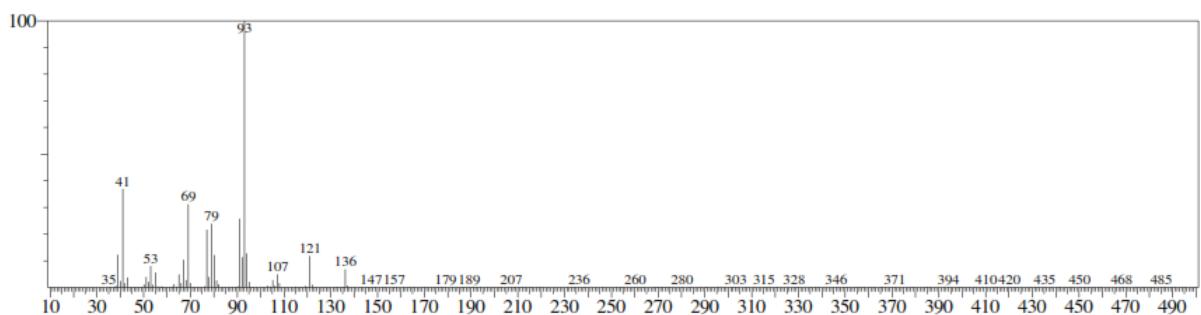


Figura 22 - Espectro de massas do α -cubemeno

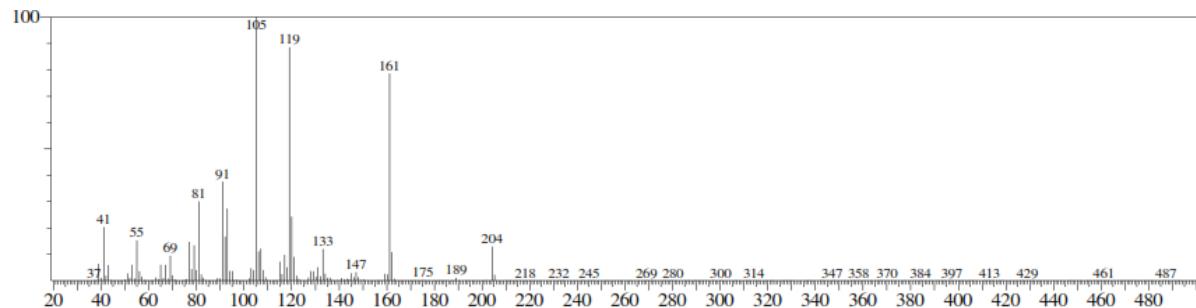


Figura 23 - Espectro de massas do α -copaeno

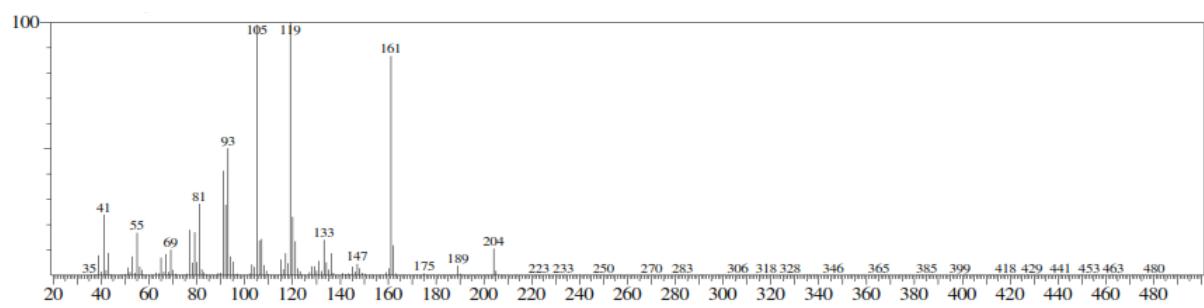


Figura 24 - Espectro de massas do Isoledeno

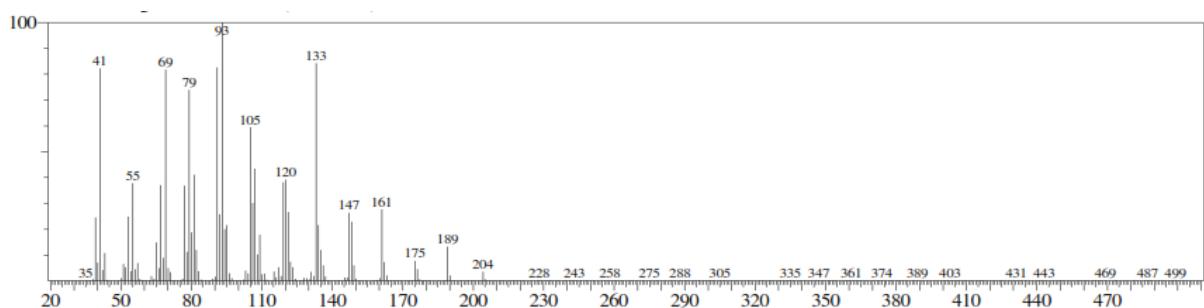


Figura 25 - Espectro de massas do E-cariofileno

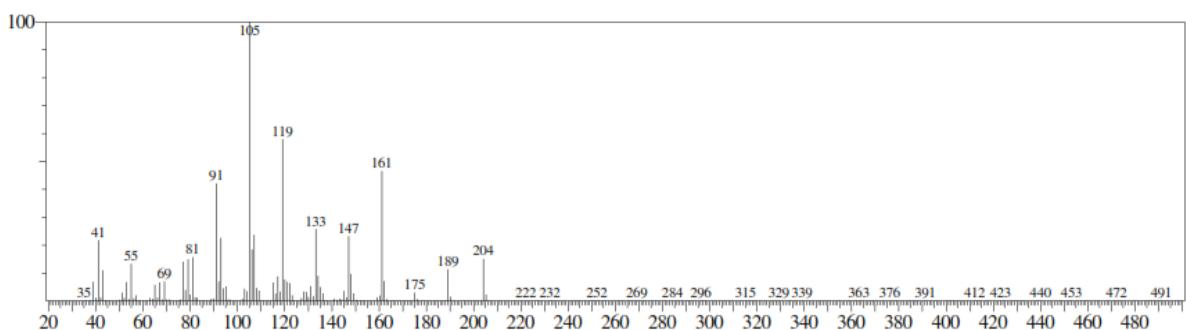


Figura 26 - Espectro de massas do α -humuleno

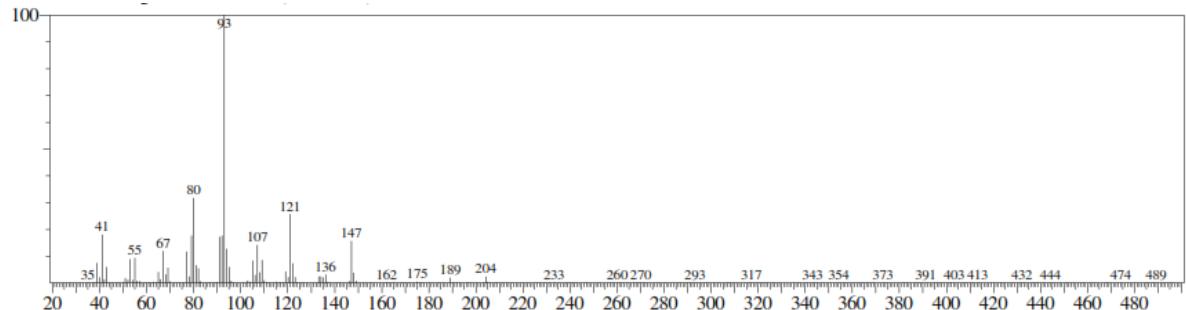


Figura 27 - Espectro de massas do Germacreno D

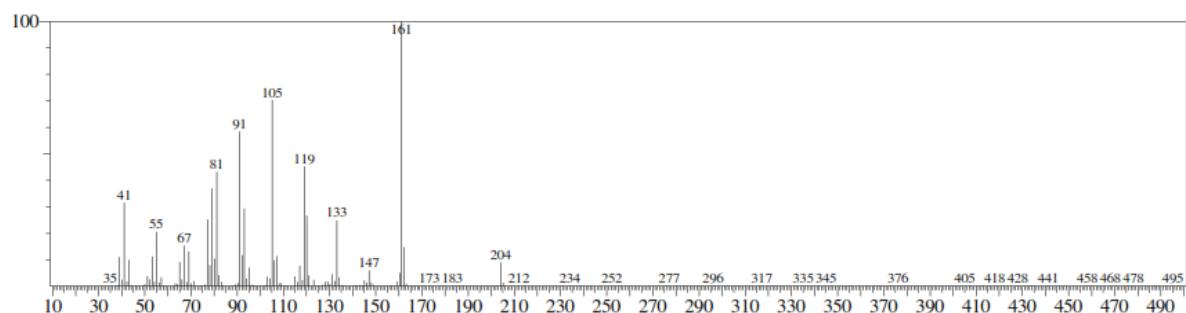


Figura 28 - Espectro de massas do Cis-calameneno

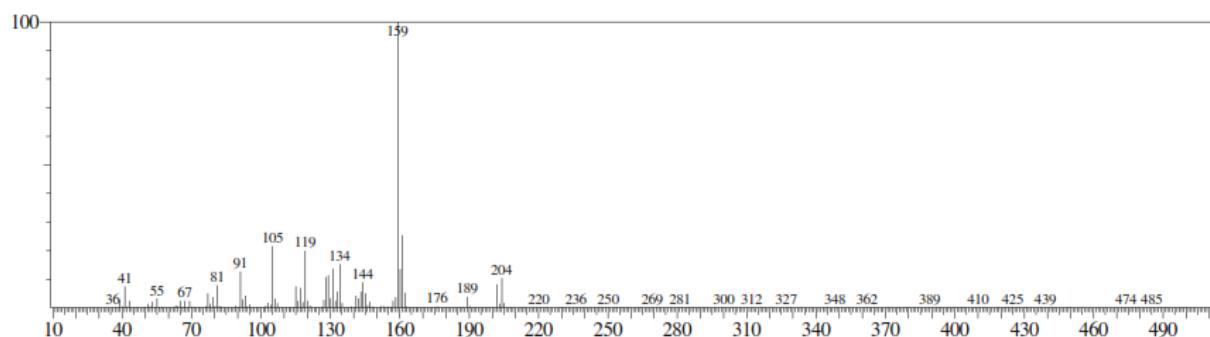


Figura 29 - Espectro de massas do α -Calacoreno

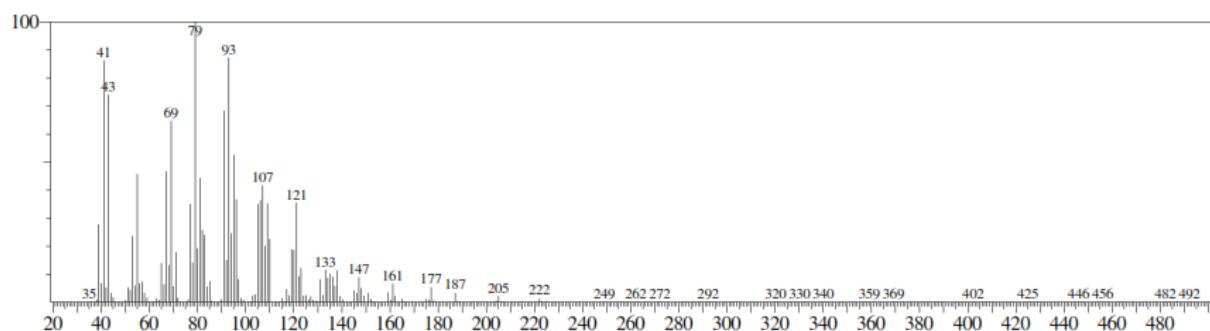


Figura 30 - Espectro de massas do Óxido de Cariofileno

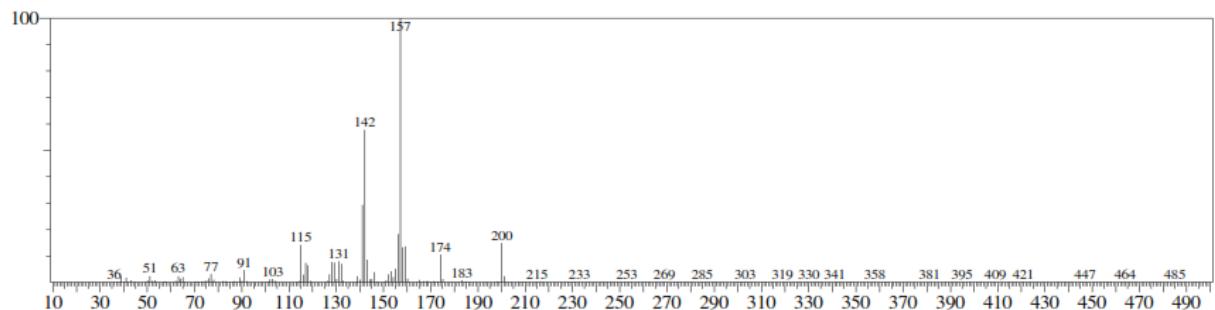
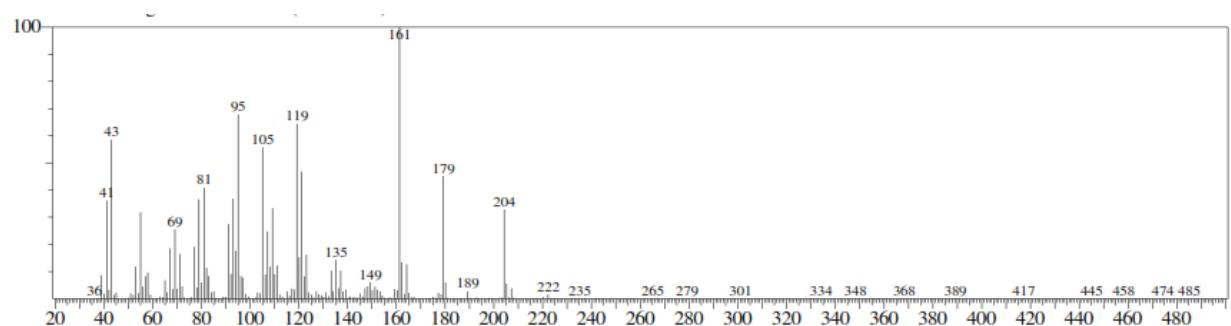


Figura 31 - Espectro de massas do Cubenol



5.2 Estudo da composição volátil das folhas de *C. piauhiensis*

A análise por CG/MS permitiu a identificação e quantificação de 21 compostos de *C. piauhiensis*, correspondendo a 87,96% da composição química (Tabela 8), constituído principalmente por: E-Cariofileno (19,03%), Limoneno (11,74%), Germacreno D (9, 83%), -Elemeno (8,64%), com predominância de (42,63%) de sesquiterpenos, (TABELA 9).

Tabela 9 - Percentual relativo dos componentes do óleo essencial das folhas de *C. piauhiensis*.

Composto	IK	%
α-pineno	939	1,40
Mirceno	990	4,06
α-felandreno	1002	0,47
ο-cimeno	1025	4,02
β-felandreno	1029	0,70
Limoneno	1029	11,74
1,8-Cineol	1031	3,76
γ-Terpineno	1059	6,78
Terpinoleno	1088	1,15
Linalol	1096	1,82
4-terpineol	1177	1,35
α-terpineol	1188	0,98
α-copaeno	1376	0,89
E-cariofileno	1419	19,03
α-humuleno	1454	2,58
Germacreno D	1485	9,83
γ-elemeno	1436	8,64
δ-cadineno	1523	1,98
Espatulenol	1578	4,32
Globulol	1590	0,98
α-cadinol	1654	1,48

Fonte: Elaborada pelo autor.

*IK (índice de Kovats)

5.2.1 Identificação dos constituintes do óleo essencial das folhas de *C. piauhiensis*

O cromatograma do OE das folhas de *C. piauhiensis* e os espectros de massas dos constituintes são apresentados a seguir, (FIGURAS 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52 e 53).

Figura 32 - Cromatograma do óleo essencial das folhas de *C. piauhiensis*

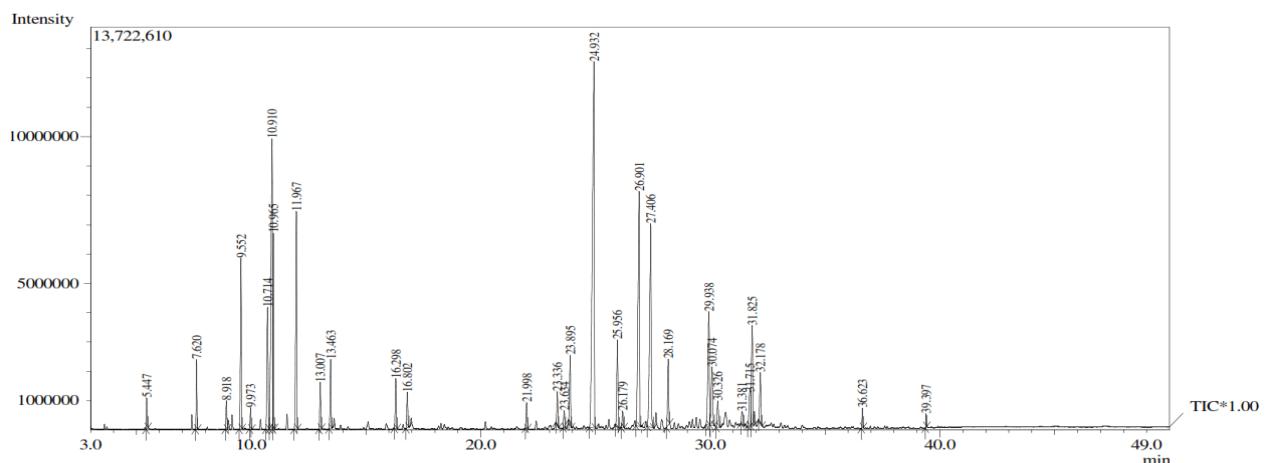


Figura 33 -Espectro de massas do α-pineno

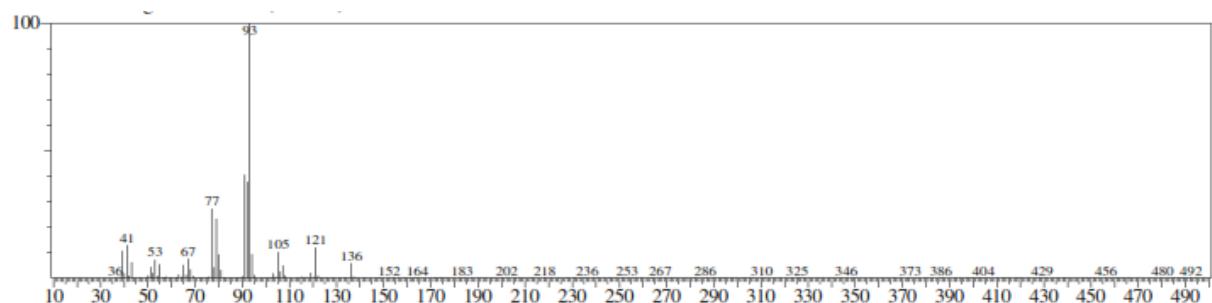


Figura 34 -Espectro de massas do Mirceno

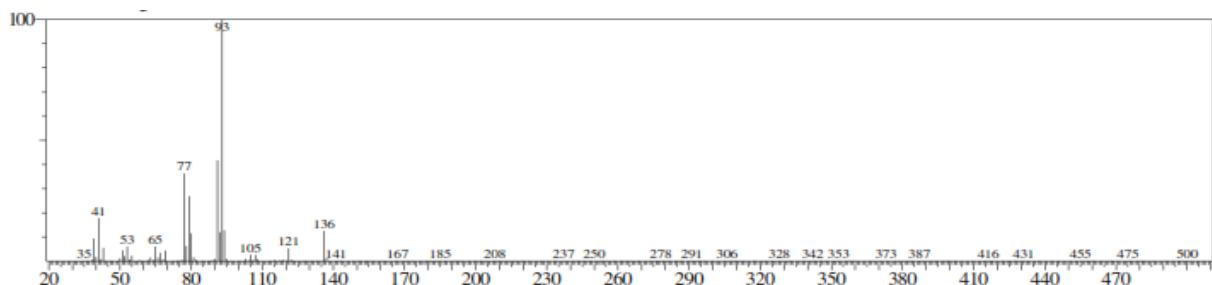


Figura 35 -Espectro de massas do α -felandreno

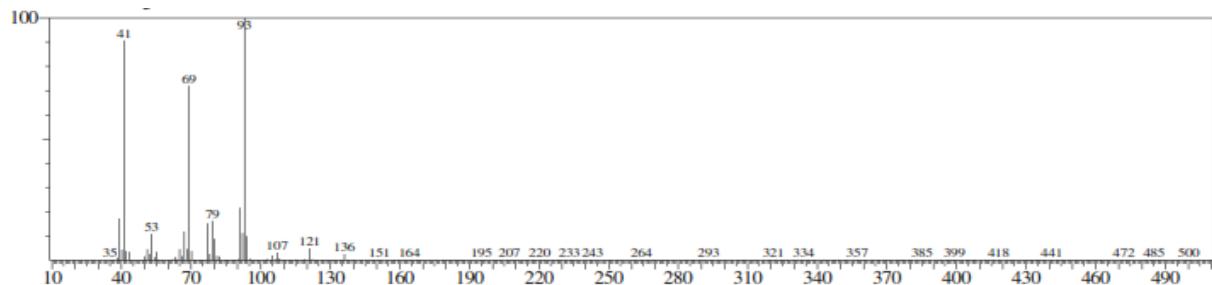


Figura 36 -Espectro de massas do α -Cimeno

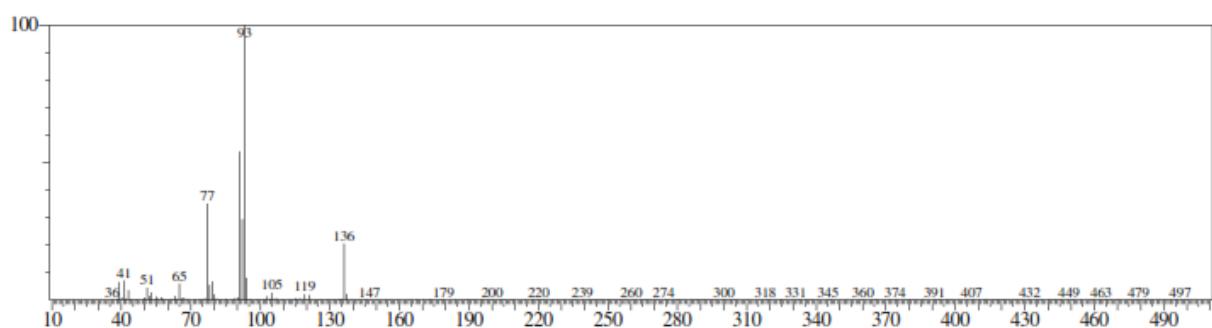


Figura 37 -Espectro de massas do β -felandreno

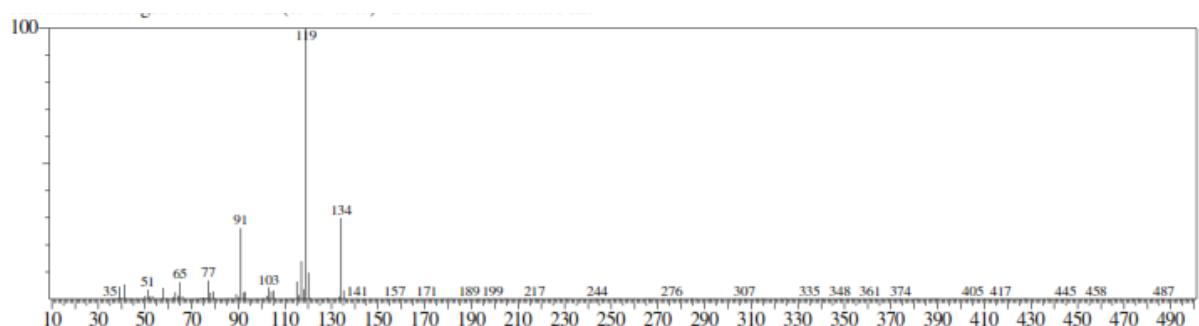


Figura 38-Espectro de massas do Limoneno

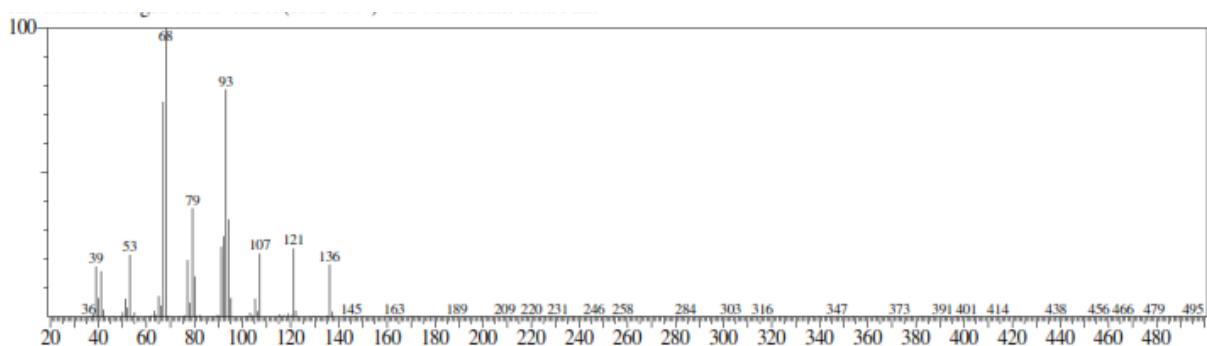


Figura 39 -Espectro de massas do 1,8-Cineol

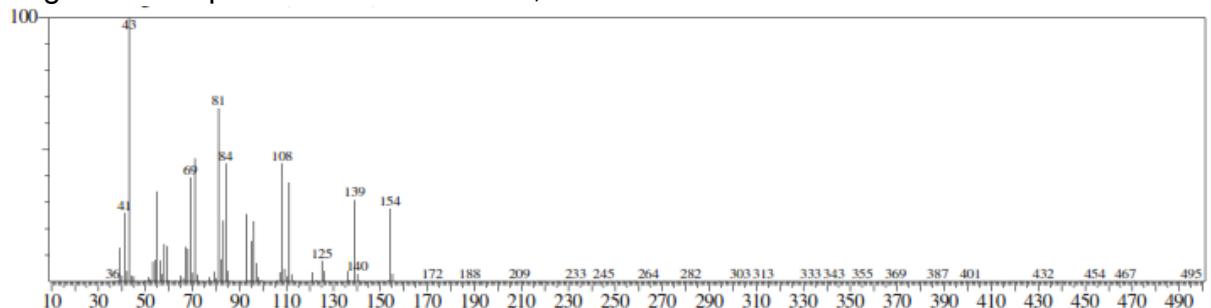


Figura 40 -Espectro de massas do γ -Terpineno

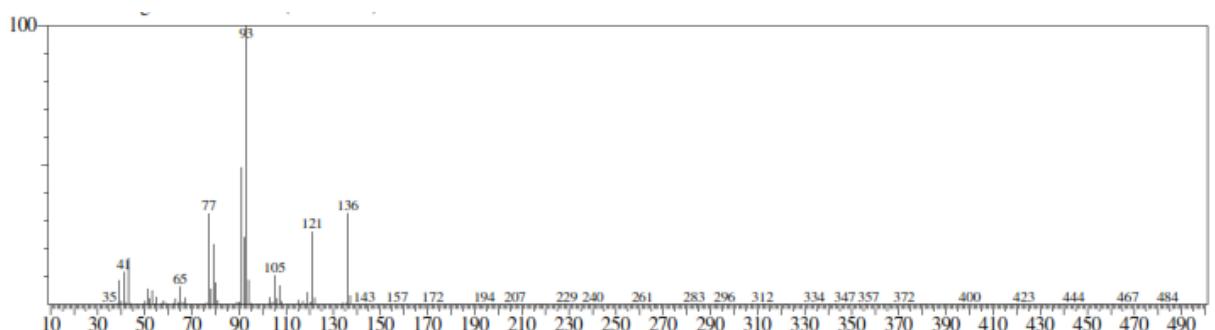


Figura 41-Espectro de massas do Linalol

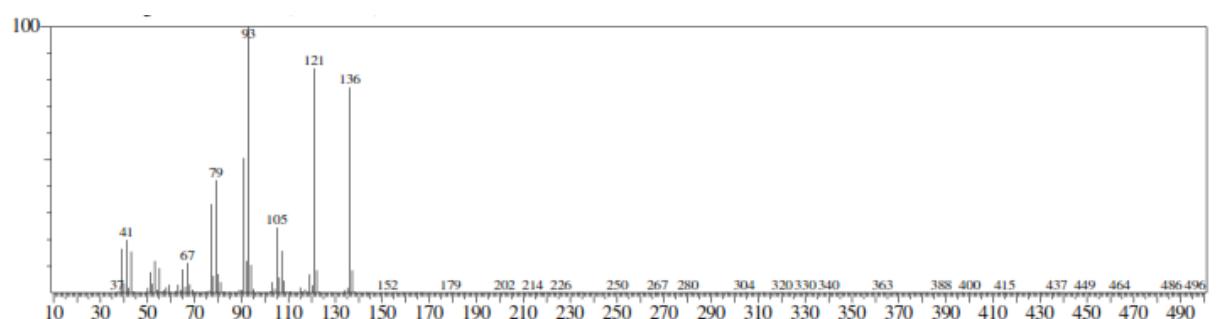


Figura 42 -Espectro de massas do 4-Terpineno

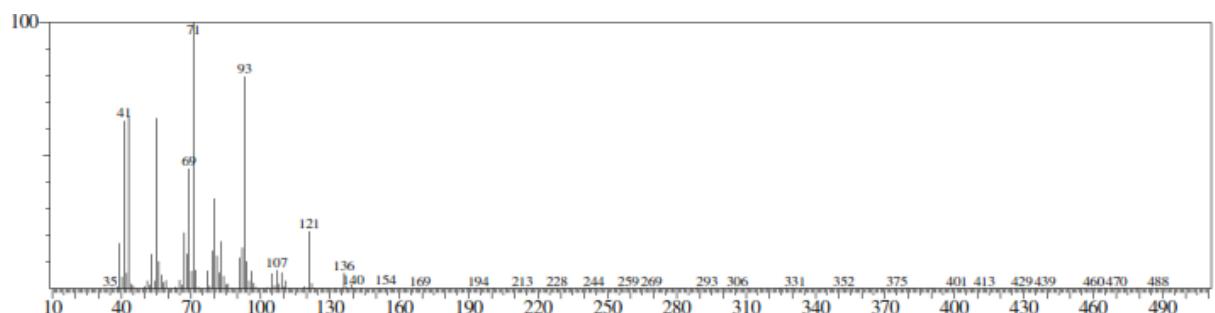


Figura 43 -Espectro de massas do α -Tocoferol

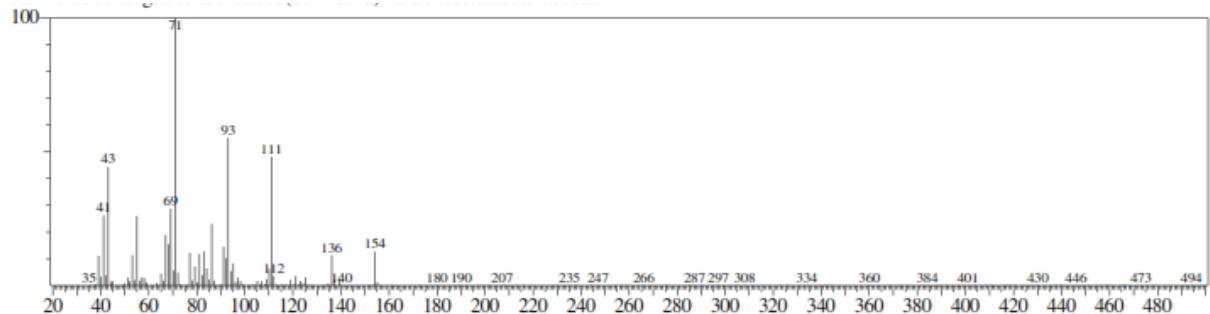


Figura 44 -Espectro de massas do α -Copaeno

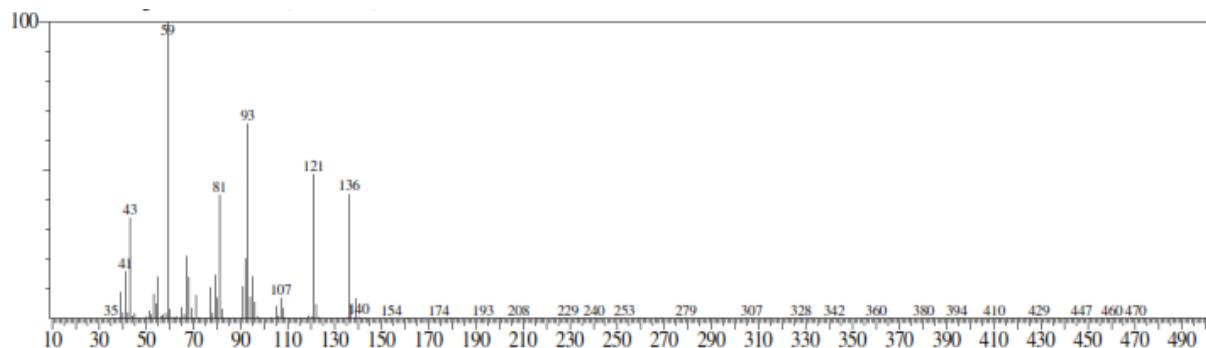


Figura 45 -Espectro de massas do E-Cariofileno

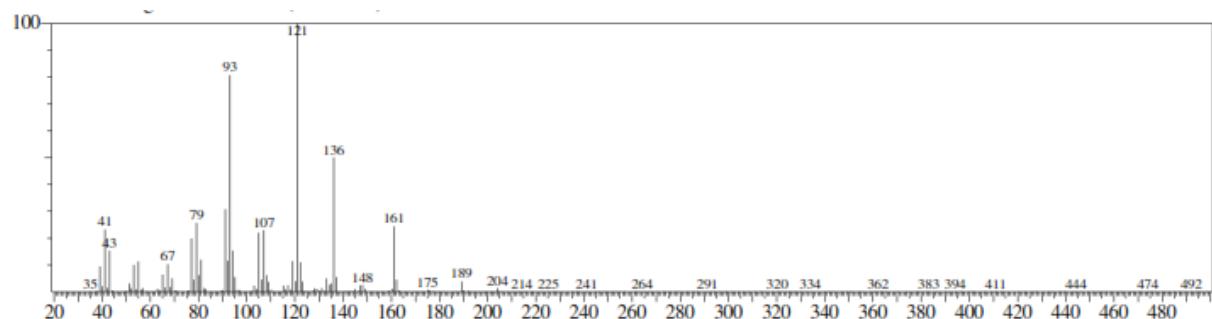


Figura 46 -Espectro de massas do α -Humuleno

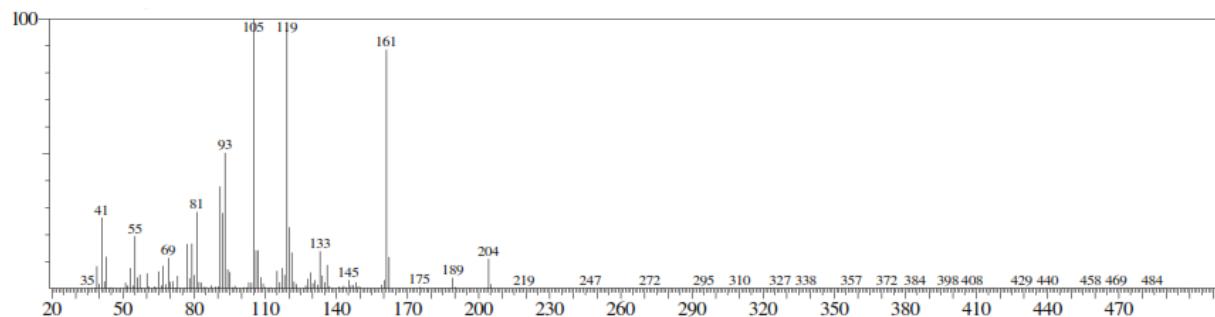


Figura 47 -Espectro de massas do Germacreno D

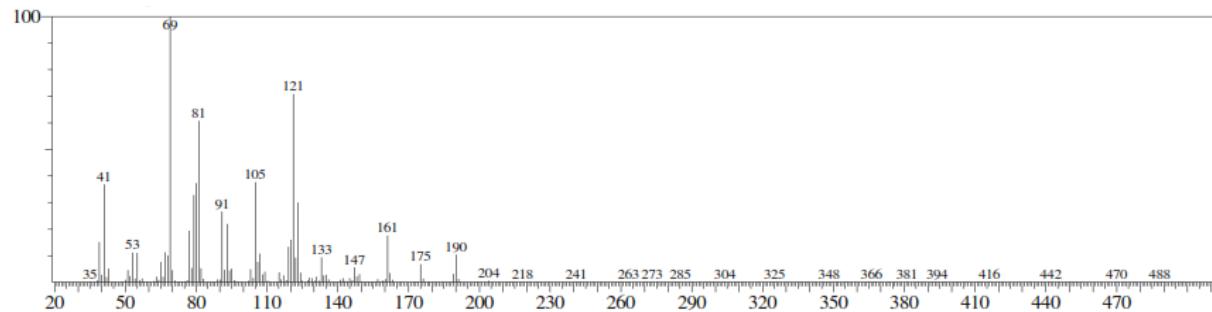


Figura 48 -Espectro de massas do γ -Elemeno

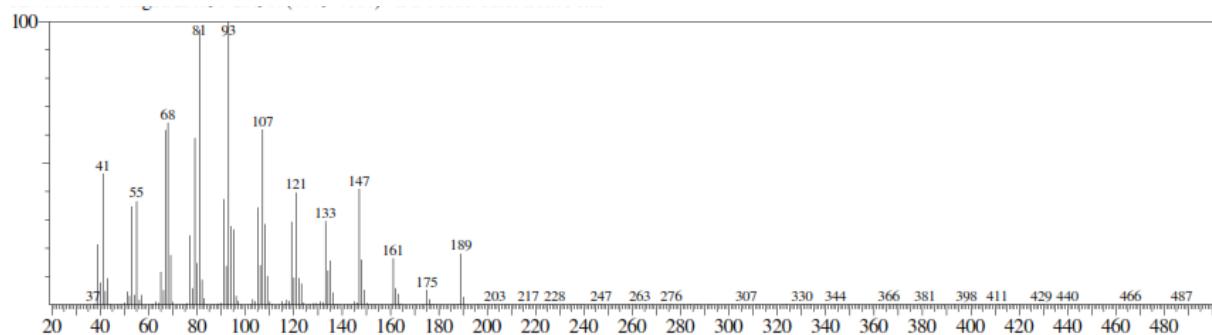


Figura 49 -Espectro de massas do δ -Cadineno

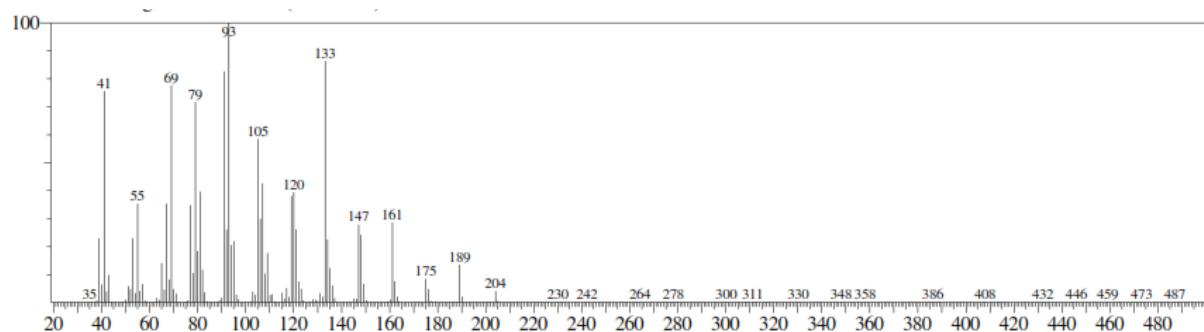


Figura 50 -Espectro de massas do Espanulenol

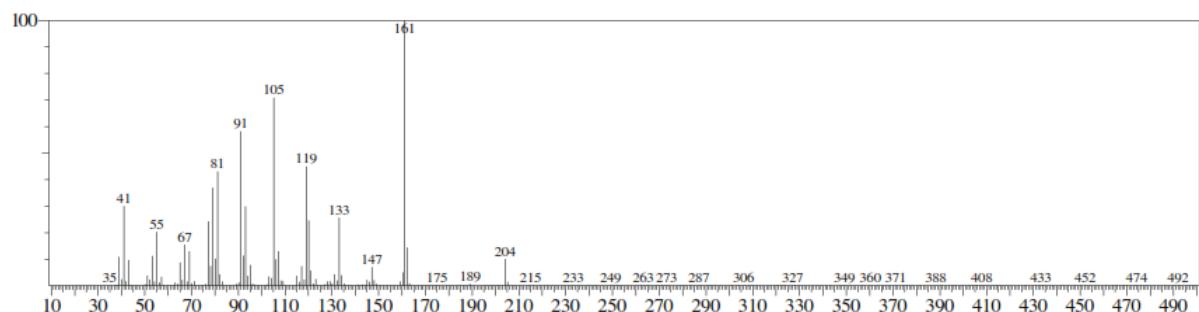


Figura 51 -Espectro de massas do Globulol

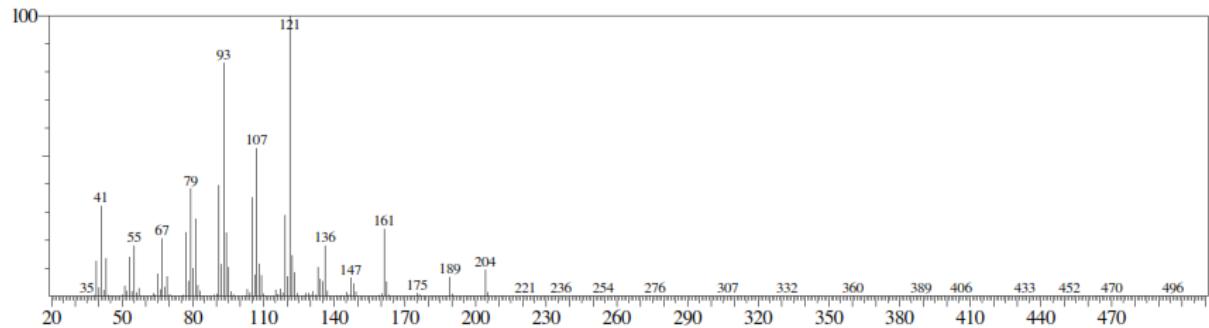


Figura 52 -Espectro de massas do Cubenol

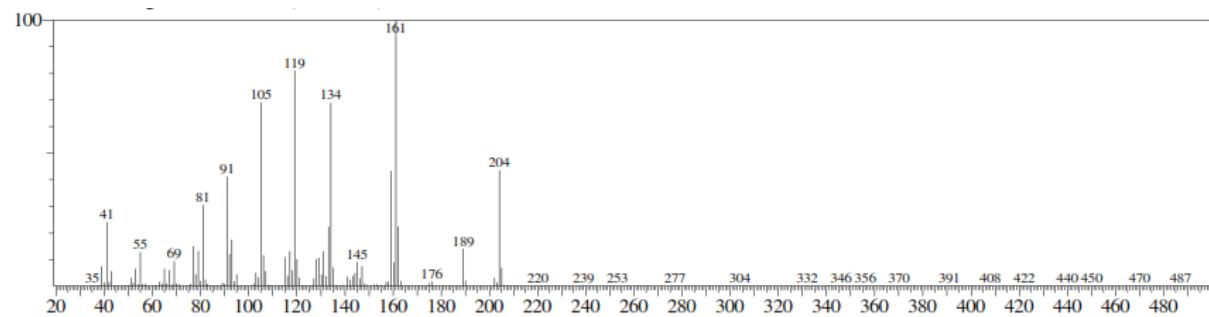
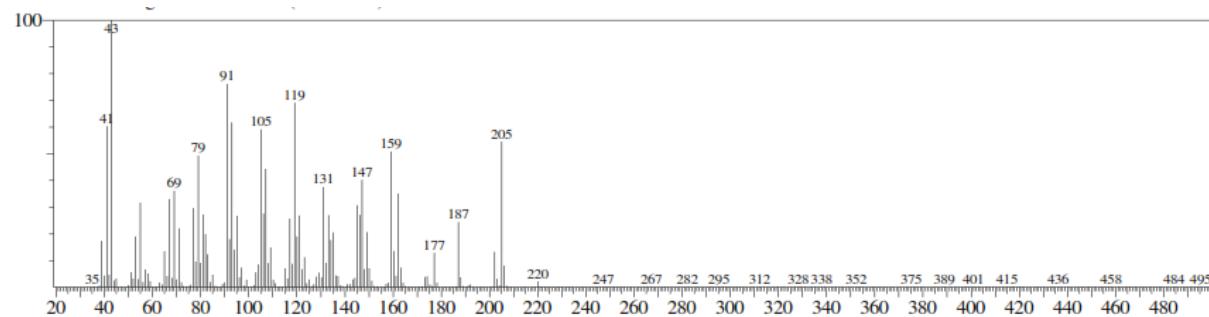


Figura 53 -Espectro de massas do α -Cadinol



5.3 Atividade antibacteriana dos óleos essenciais de *V. gardneriana* e *C. piauhiensis*

Em relação à atividade antibacteriana, o óleo essencial de *C. piauhiensis* mostrou atividade bacteriostática e bactericida apenas em *S. aureus*, em concentrações de 5,00 até 0,15 % (v/v). Por outro lado, o óleo essencial de *V. gardneriana* mostrou apenas atividade bacteriostática de 5,00 até 0,31 % (v/v), (TABELA 10). De fato, vários estudos têm relatado a ação antimicrobiana de óleos essenciais extraídos de plantas (CUI *et al.*, 2015; CHAFTAR *et al.*, 2015; ALIMPÍC *et al.*, 2015). Além disso, vários óleos essenciais obtidos a partir de espécies de *Croton* mostraram atividade antibacteriana (ALVIANO *et al.*, 2005; COSTA *et al.*, 2013).

Tabela 10 - Concentração inibitória mínima e a concentração bactericida mínima do óleo essencial de *C. piauhiensis* e *V. gardneriana*.

	<i>C. piauhiensis</i>	<i>V. gardneriana</i>		
	CIM	CBM	CIM	CBM
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	0,15	0,15	0,31	-
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 10145	-	-	-	-

Fonte: Elaborada pelo autor.

* Resultados de CIM e CBM são dados em termos de % (v/v)

Muita atenção tem sido dada aos óleos essenciais obtidos a partir de plantas, pelo fato de serem utilizados em várias aplicações na indústria alimentícia e farmacêuticas, como uma fonte de compostos biologicamente ativos.

A composição química dos óleos essenciais obtidos de *C. piauhiensis* e *V. gardneriana* mostrou uma maior abundância de monoterpenos e sesquiterpenos. Esse resultado corrobora com os dados encontrados para gênero *Croton*, com o OE sendo caracterizado por uma predominância de monoterpenos e sesquiterpenos (MECCIA *et al.*, 2000; FONTENELLE *et al.*, 2008, COSTA *et al.*, 2013). Além disso, os principais constituintes presentes no OE foram E-cariofileno, limoneno, Germacreno D e γ -elemeno, respectivamente.

De fato, em vários estudos relatam estes compostos majoritários em óleos essenciais obtidos em espécies de *Croton* (RADULOVIC' *et al.*, 2006; COSTA *et al.*, 2013; SILVA-ALMEIDA *et al.*, 2015). Além disso, em algumas

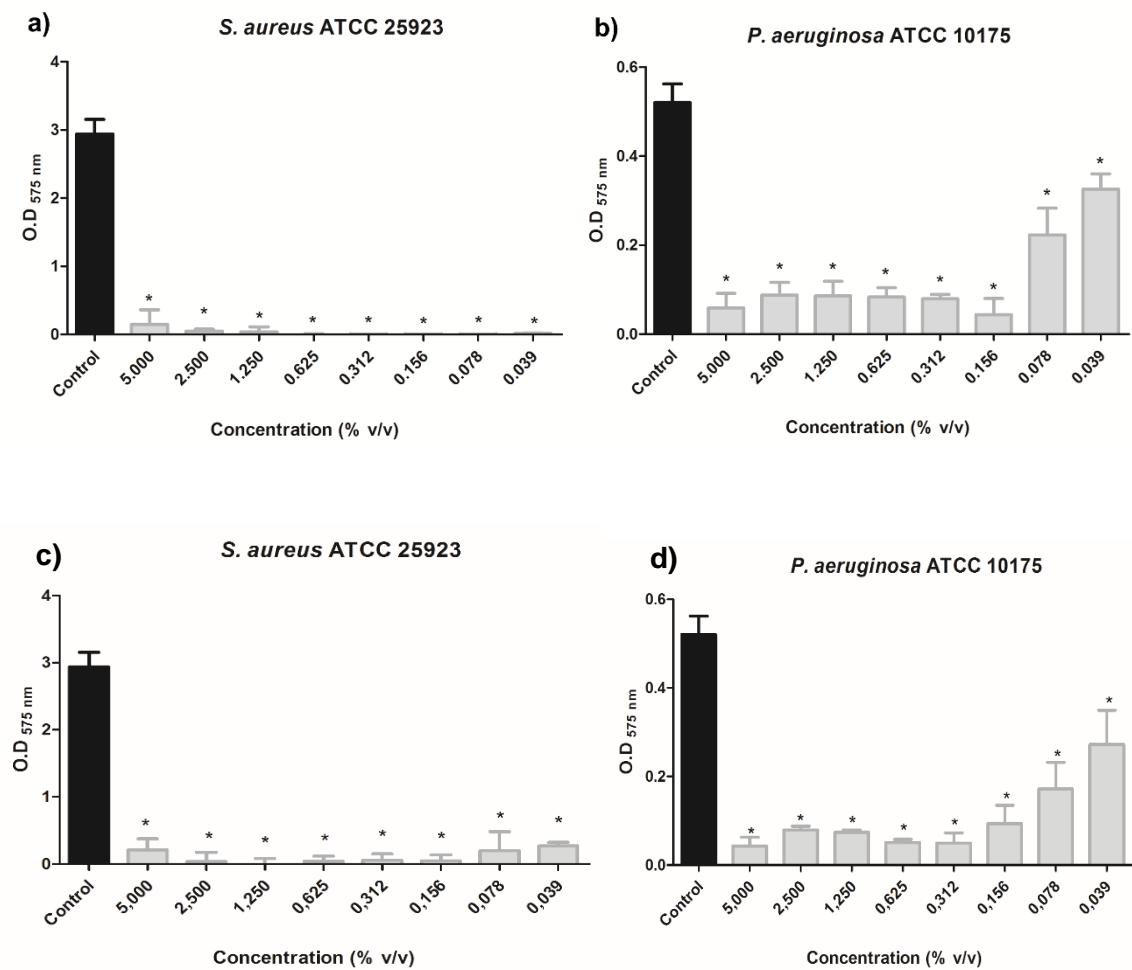
espécies de *Croton*, tais como, *C. rhamnifolioides*, *C. conduplicatus*, *C. decaryi* and *C. geayi*, onde o *E*-cariofileno apresenta-se como o composto mais abundante em seus óleos essenciais (RADULOVIC' et al 2006; COSTA et al., 2013; SILVA ALMEIDA et al., 2015). Neste estudo, *S. aureus* foi mais sensível aos óleos essenciais do que as bactérias Gram-negativas (ALIVIANO et al., 2005; DA COSTA et al., 2008; COSTA et al., 2013). É possível que a membrana externa presente apenas nas bactérias Gram-negativas constitua uma barreira contra agentes antimicrobianos, inibindo assim a ação dos óleos essenciais. O mecanismo de ação pelo qual os óleos demonstram sua atividade antimicrobiana ainda não está muito claro, no entanto, especula-se que envolve danos causados à membrana das bactérias, por compostos lipofílicos presentes em óleos essenciais (BURT, 2004).

Além disso, os compostos principais constituintes presentes no OE de *C. piauhiensis* como *E*-cariofileno, limoneno e germacreno D, mostraram ter atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas, incluindo *S. aureus*. Provavelmente, a atividade antimicrobiana do óleo é devido à combinação da ação destes compostos.

Curiosamente, embora os óleos essenciais estudados apresentem atividade bactericida para a forma planctônico de *S. aureus* e não de *P. aeruginosa*, os mesmos, foram capazes de inibir a formação de biofilmes de ambas bactérias. Os óleos essenciais são conhecidos como tendo a atividade sobre os biofilmes em uma ampla variedade de micro-organismos, incluindo bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (MILEZZI et al., 2013; BENBELAÏD et al., 2014; NOSTRO et al. 2007; NITHYANAND et al., 2009). Corroborando com esse trabalho, Kavanaugh e Ribbec (2012) avaliaram vários óleos essenciais em biofilme de *S. aureus* e *P. aeruginosa*, curiosamente o óleo de tomilho vermelho foi eficaz contra biofilme, mas não foi capaz de matar células planctônicas.

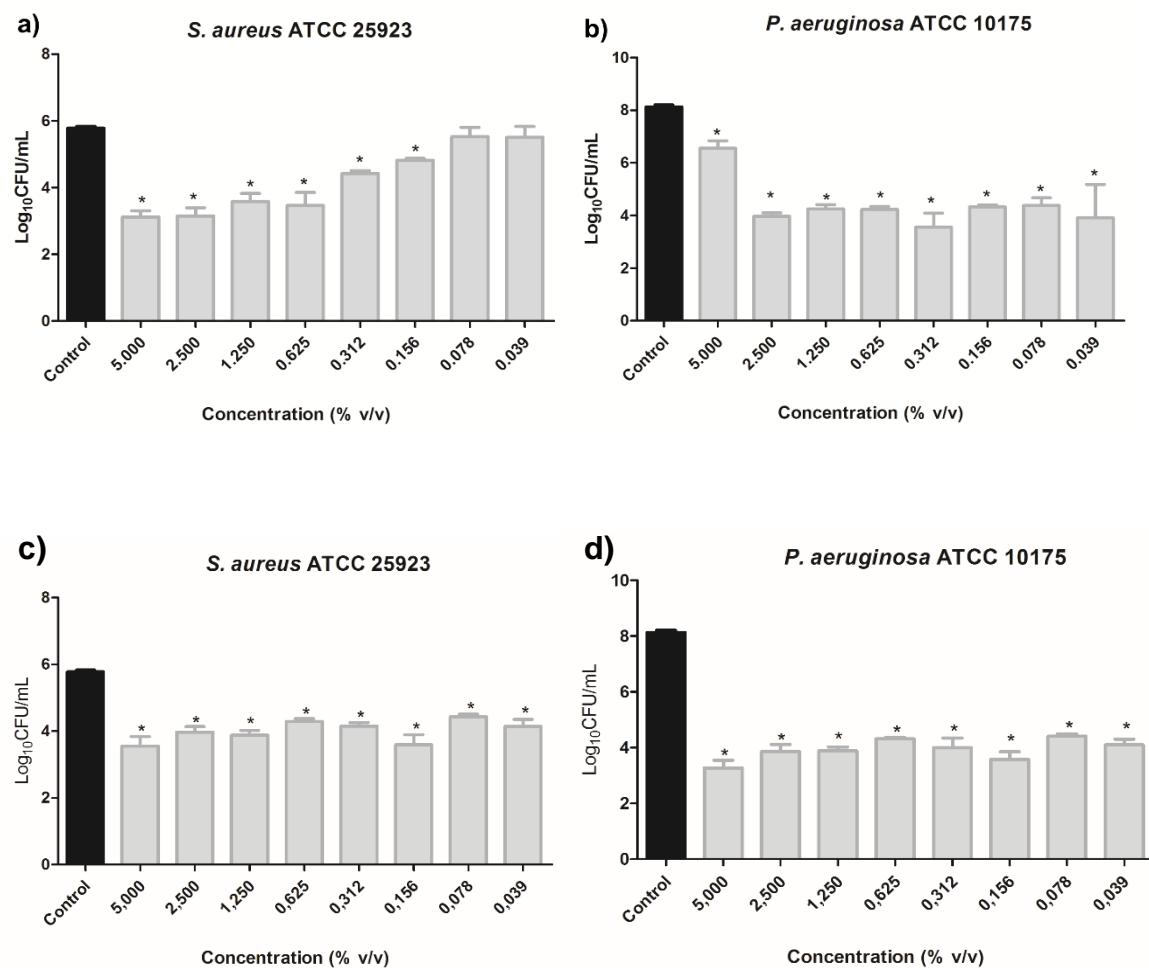
Neste contexto, Nadoshan et al., (2009) mostraram que concentrações sub-inibitórias dos óleos de *Mentha spicata* e *Cumminum cyminum* reduziram a produção de alginato, adesão e inibição da formação de biofilmes de *P. aeruginosa*, estes resultados podem explicar o fato dos óleos não causarem danos a cultura planctônica de *P. aeruginosa* (FIGURAS 54, 55) e ser capaz de inibir a formação de biofilme (DRENKARD, 2003).

Figura 54 - Quantificação da biomassa dos biofilmes de *S. aureus* ATCC25923 e *P. aeruginosa* ATCC10145 após 24 horas de crescimento na presença do óleo essencial extraído de *C. piauhiensis* (a e b) e *V. gardneriana* (c e d). *P<0,05 comparado com o grupo de controle.



Fonte: Elaborados pelo autor.

Figura 55 - Número de células viáveis de biofilme de *S. aureus* ATCC25923 e *P. aeruginosa* ATCC10145 após 24 horas de crescimento na presença do óleo essencial extraído de *C. piauhiensis* (a e b) e *V. gardneriana* (c e d). *P<0,05 comparado com o grupo de controle.



Fonte: Elaborados pelo autor.

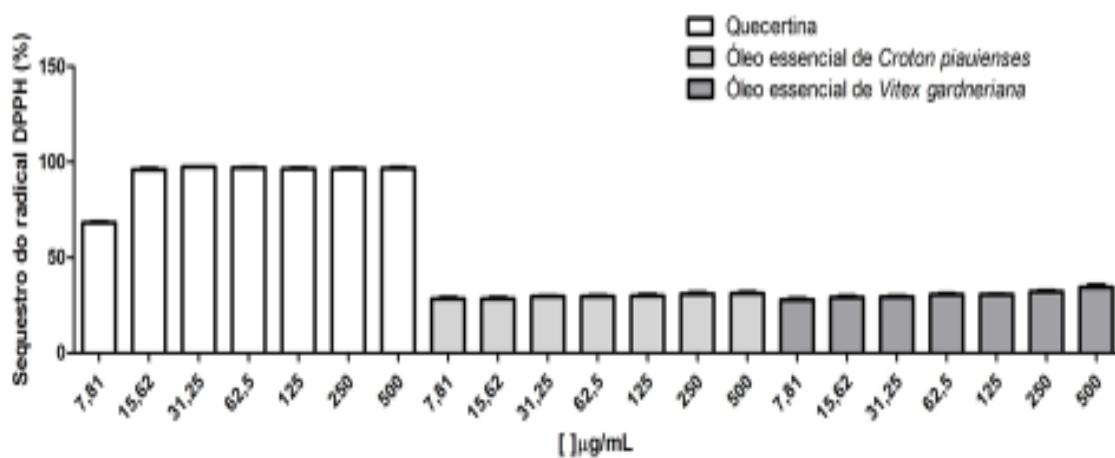
5.4 Atividade antioxidante dos óleos essenciais de *C. piauhiensis* e *V. gardneriana*

A atividade antioxidante dos OE's foi avaliada utilizando-se quatro métodos diferentes: Sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), Atividade quelante de íons ferrosos (FIC), Atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP) e Método de inibição da oxidação do β-caroteno(BCB).

5.4.1 Ensaio de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

Observou-se que a capacidade dos óleos em sequestrar o radical em todas as concentrações avaliadas, foi de aproximadamente 30%, não havendo diferença significativa entre cada um dos óleos. O controle positivo utilizado foi quecertina, que em geral, realiza uma atividade antioxidante de 100%, (FIGURA 56).

Figura 56 - Atividade antioxidante dos óleos essenciais de *C. piauhiensis* e *V. gardneriana*, (DPPH).

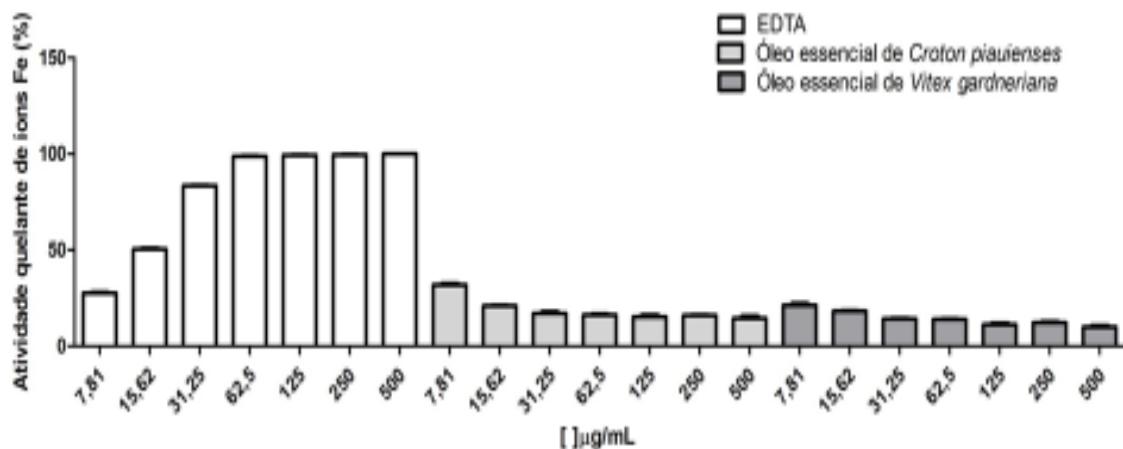


5.4.2 Ensaio da atividade quelante de íons ferrosos (FIC)

Utilizando o ensaio de FIC, os óleos de *C. piauiensis* e *V. gardnerianas* mostraram capacidade quelante sobre o íon ferroso de aproximadamente, 40, 32, 28, 25, 25, 25, e 20%; 35, 30, 25, 25, 20, 22, e 18% respectivamente, em concentrações de 0,078 a 5,00 µg/mL, enquanto que o controle positivo (EDTA) mostrou significativamente maior atividade do que os óleos. Em concentrações mais elevadas, o EDTA mostrou aproximadamente 100% de atividade (FIGURA 57).

Foi observado uma leve diferença de atividade antioxidante entre os dois óleos, onde óleo de *C. piauiensis* mostrou-se mais eficaz como antioxidante em relação ao óleo de *V. gardneriana*.

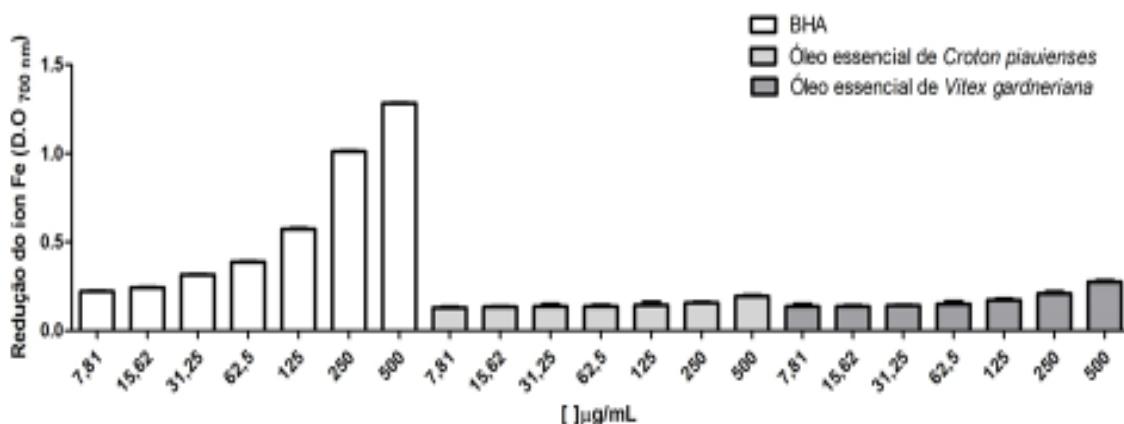
Figura 57 - Atividade antioxidante dos óleos essenciais de *C. piauiensis* e *V. gardneriana*, (FIC).



5.4.3 Ensaio da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

Óleos de *C. piauiensis* e *V. gardneriana* foram avaliados por ensaio de potencial de redução férrico/potencial antioxidante, determinando-se a capacidade dos mesmos para reduzir o Fe³⁺ a Fe²⁺. Enquanto que o BHA, o controle positivo, revelou um aumento abrupto de 0,286 para 1,000 em densidade óptica com o incremento da concentração, a mesma tendência não foi verificada pelos óleos, que permaneceu constante cerca de 0,200 para todas as concentrações estudadas (FIGURA 58).

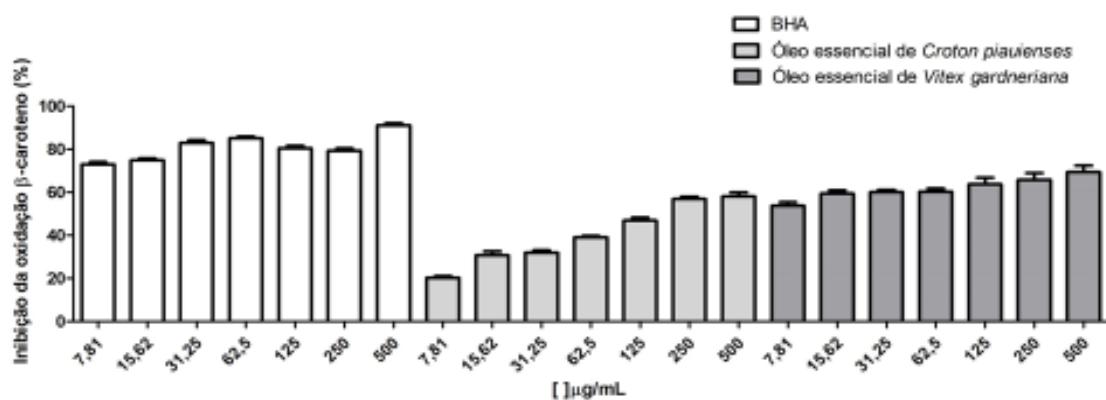
Figura 58 - Atividade antioxidante dos óleos essenciais de *C. piauiensis* e *V. gardneriana*, (FRAP).



5.4.4 Ensaio de inibição da oxidação do β -caroteno (BCB)

A capacidade de óleos para inibir a oxidação β -caroteno foi avaliada. Os óleos apresentaram uma elevada atividade antioxidante, mostrando ser a maissignificativa dentre os quatro métodos avaliados, variando de 60,2 a 74,5% em relação ao BHA, controle positivo. Além disso, o óleo de *V. gardneriana* mostrou uma atividade antioxidante mais significativa que o óleo do *C. piauhiensis* (FIGURA 59).

Figura 59 -Atividade antioxidante dos óleos essenciais de *C. piauhiensis* e *V. gardneriana* (BCB).



Os óleos de *C. piauhiensis* e *V. gardneriana* mostraram potencial atividade antioxidante, inibindo a oxidação do β -caroteno. De fato, óleos essenciais e seus constituintes têm sido relacionados como agentes antioxidantes (AMORATI *et al.*, 2013). O mecanismo de ação antioxidante causada pelos óleos essenciais está diretamente relacionado à sua composição (AMORATI *et al.*, 2013). Os principais componentes os óleos de *C. piauhiensis* e *V. gardneriana* são terpenoides e estes compostos têm demonstrado potencial atividade antioxidante (GRASSMANN 2005). Entretanto, não é possível afirmar que um único composto é responsável pela atividade oxidante observado nos óleos, uma vez que, a atividade antioxidante de óleos essenciais pode ser devido aos efeitos sinérgicos de vários compostos nele presentes.

5.5 Estudo da composição fixa da casca do lenho de *V. gardneriana*

5.5.1 Obtenção de constituintes

O material vegetal, casca (900 g), foi seco à temperatura ambiente, por aproximadamente 72 h, em seguida trituradas. O material foi submetido à extração exaustiva com etanol a temperatura ambiente. Após este período, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo à pressão reduzida, obtendo-se (79,4g) de extrato bruto.

O extrato etanólico das cascas de *V. gardneriana* (EECVG), foi submetido a um pré-fracionamento em coluna, utilizando sílica gel. O extrato foi adsorvido em sílica, usando-se os seguintes solventes puros em ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol. Cada uma das frações foi destilada à pressão reduzida, obtendo-se as massas de acordo com a (TABELA 11) abaixo.

Tabela 11 – Solventes e respectivas e massas obtidas no pré-fracionamento do extrato da casca de *V. gardneriana*

SOLVENTE	MASSA(g)
Hexano	4,3
Clorofórmio	6,1
Clorofórmio	6,1
Metanol	43,6
Massa Total	72,4

Fonte: Elaborada pelo autor.

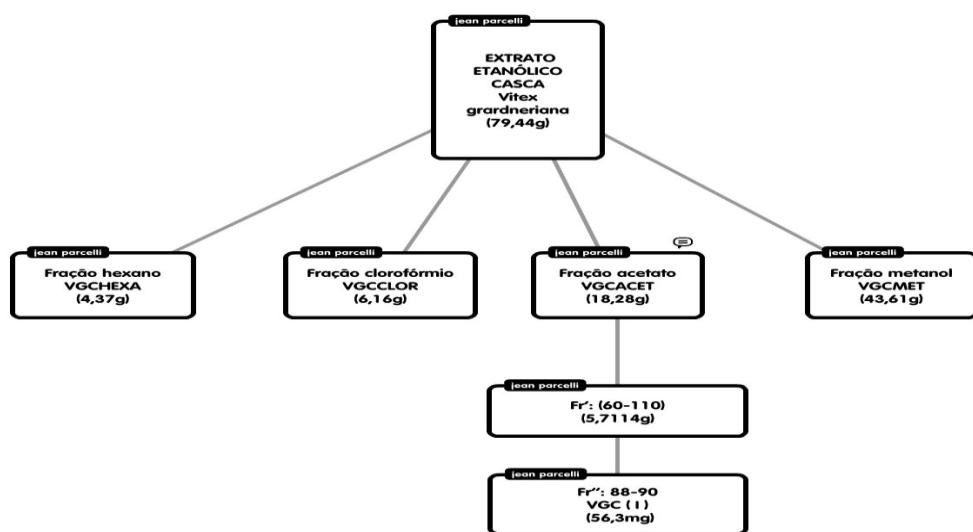
A fração acetato de etila (18,2), foi recromatografada em coluna utilizando sílica gel, usando os eluatos em ordem crescente de polaridade a um gradiente de 10 % em volume: hexano (100%), hexano/clorofórmio (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), clorofórmio (100%), clorofórmio/AcoEt (9:1, 8:2, 7:3, 6:4,

1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), AcoEt (100%), AcoEt/metanol (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9) e metanol (100%), fornecendo 390 frações. Todas as frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD).

As frações (F'150-171), resultante da extração em clorofórmio/acetato de etila 1:1 foram agrupadas por similaridade, fornecendo um material ceroso/amarelado 1,5g que foi recromatografado em coluna, obtendo-se 134 frações, utilizando clorofórmio (100%), clorofórmio/AcoEt (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), AcoEt(100%), AcoEt/metanol (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), e metanol puro, fornecendo 390 frações (15 ml). Todas as frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada.

As frações F'60-110 resultante da extração em clorofórmio/acetato de etila (1:1; 4:6; 3:7), foram agrupadas utilizando o procedimento anterior, 5,7g, as quais foram também recromatografadas em coluna, utilizando clorofórmio (100%), clorofórmio/AcoEt (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), AcoEt(100%), AcoEt/metanol (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), e metanol puro, fornecendo 384 frações. As frações (F''88-90) resultante da extração em AcoEt/metanol (2:8) foram reunidas e lavadas em clorofórmio, obtendo-se um precipitado branco, denominado VGC (I) (56,3 mg) (FLUXOGRÁFICO 1).

Fluxograma 1 - Isolamento de VGC (I) da casca do caule de *V. gardneriana*



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.5.2 Determinação estrutural do constituinte VGC (I)

O espectro de RMN de ^1H obtido para VGC (I) (FIGURA 60) apresenta a maioria dos sinais com deslocamentos químicos entre δH 0,91 e δH 2,07, característicos de substância de natureza triterpênica. Os sinais largos em δH 5,03 e 5,52 foram atribuídos aos átomos de hidrogênio H13 do ácido oleanólico e ursólico respectivamente. O sinal em δH 3,32-3,47 foi atribuído ao átomo de hidrogênio H3. O sinal em δH 2,65-2,66 foi atribuído ao H18 do ácido oleanólico e em δH 2,07-2,14 ao H18 do ácido ursólico.

No espectro de RMN de ^{13}C (FIGURA 62) obtido para VGC (I) foi possível identificar o sinal em δC 180,4 e 180,6, referente à carboxila dos triterpenos. A partir do espectro DEPT-135 (FIGURA 63, pág. 81) foi possível identificar dois carbonos olefínicos com deslocamentos químicos em δC 139,7 (C-13), δC 126,1 (C-12). Os valores de deslocamentos químicos são semelhantes àqueles dos carbonos olefínicos dos ácidos ursólico e oleanólico, respectivamente.

Os dados espectrais de RMN de ^1H e ^{13}C obtidos para VGC (I) (FIGURA), que permitiram sua identificação, e os valores relatados na literatura (VALADARES, 2009) para a mistura de ácido ursólico (1) e oleanólico (2) estão listados na (TABELA 12). Os quais estão sendo reportados pela primeira vez nesta espécie.

Figura 60 – Estruturas de Ácido Ursólico (1) e Ácido Oleanólico (2).

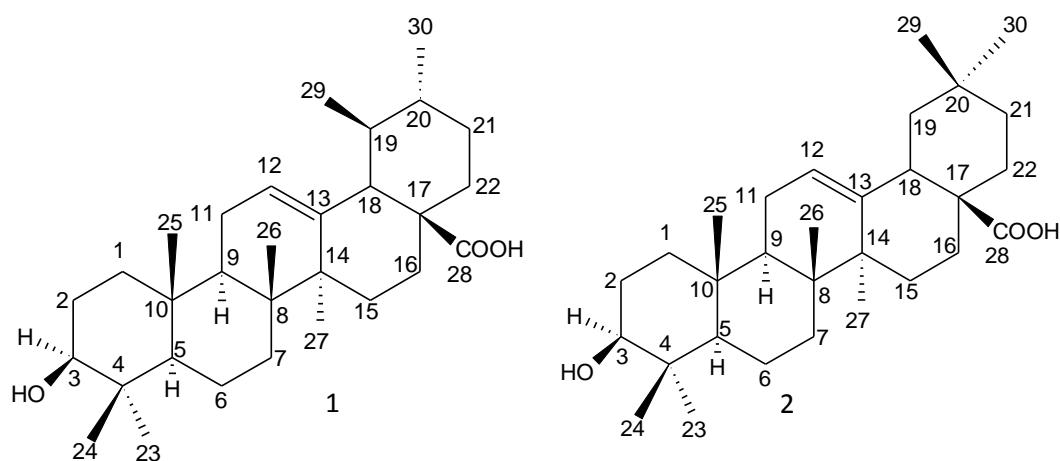


Tabela 12 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de VGC (I) dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC.

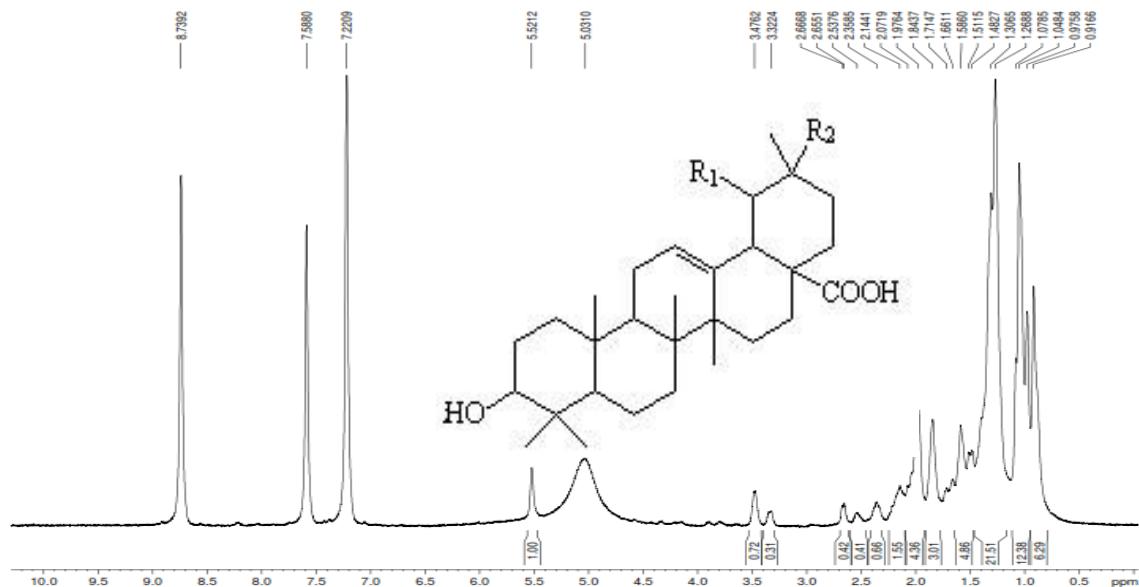
	Ácido ursólico (1)		Ácido oleanólico (2)		MAHATO; KUNDU, 1994	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}	1	2
C						
4	39,4	-	39,5	-	39,3	38,9
8	39,8	-	39,9	-	39,7	39,8
10	37,8	-	37,7	-	38,8	37,8
13	139,7	-	145,3	-	143,7	143,4
14	40,5	-	40,2	-	41,3	41,6
17	47,1	-	46,9	-	46,7	46,6
20	30,5	-	30,0	-	30,9	30,6
28	180,6	-	180,3	-	184,0	181,0
CH						
3	78,6	3,32	78,5	3,32	79,2	78,7
5	56,3	0,91	54,0	0,91	55,5	55,2
9	47,1	1,59	46,9	1,59	47,9	47,6
12	126,1	5,52	123,0	5,52	122,8	122,1
18	54,0	2,14	40,4	2,14	41,3	41,3
CH₂						
1	37,9	1,3;1,0	37,9	1,3;1,0	38,8	38,5
2	26,6	1,66	26,6	1,66	27,4	27,4
6	17,9	1,51	18,00	1,51	18,5	18,3
7	32,6	1,58;1,30	32,6	1,58;1,30	32,7	32,6
11	21,9	1,97	23,4	1,97	23,2	23,1
15	30,0	1,84;1,07	28,6	1,84;1,07	27,8	27,7
16	23,4		23,4		23,6	23,4
19	45,8		45,8		45,8	45,8

21	29,2	1,51;1,30	33,7	1,51;1,30	33,9	33,8
22	36,5		32,5		32,1	32,3
CH₃						
23	28,6	1,07	28,8	1,07	28,3	28,1
24	17,0	1,04	17,0	1,04	15,6	15,6
25	16,0	0,91	16,1	0,91	15,5	15,3
26	17,9	0,91	17,0	0,91	17,2	16,8
27	24,1	1,07	26,1	1,07	26,1	26,0
29	17,6	0,97	33,6	0,97	33,2	33,1
30	21,8	0,91	23,4	0,91	23,6	23,6

Fonte: Elaborada pelo autor

5.5.2.1 Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN ¹H) e de Carbono -13 (RMN ¹³C) uni e bidimensionais de VGC (I)

Figura 61 - Espectro de RMN¹ H (CDCl₃, 500 MHz) de VGC (I)



- (1) R₁=CH₃; R₂= H
(2) R₂= H ; R₁=CH₃

Figura 62 - Espectro de RMN¹³C (CDCl₃, 125 MHz) de VGC (I)

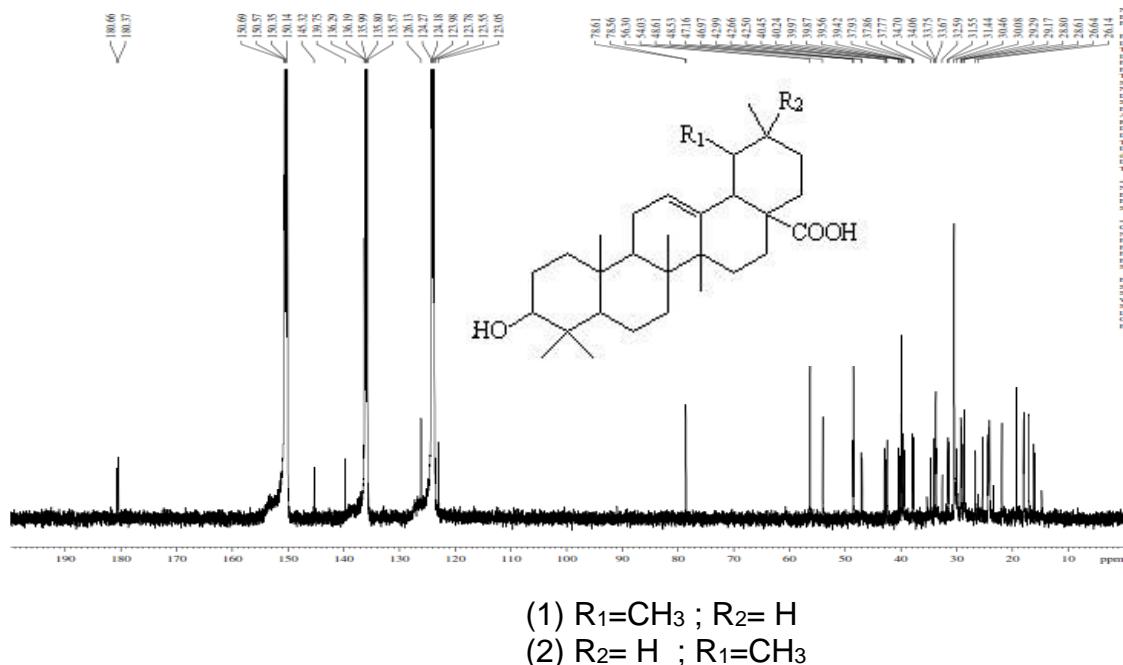


Figura 63 - Espectro de RMN ¹³C-DEPT 135° (CDCl₃, 125 MHz) de VGC (I)

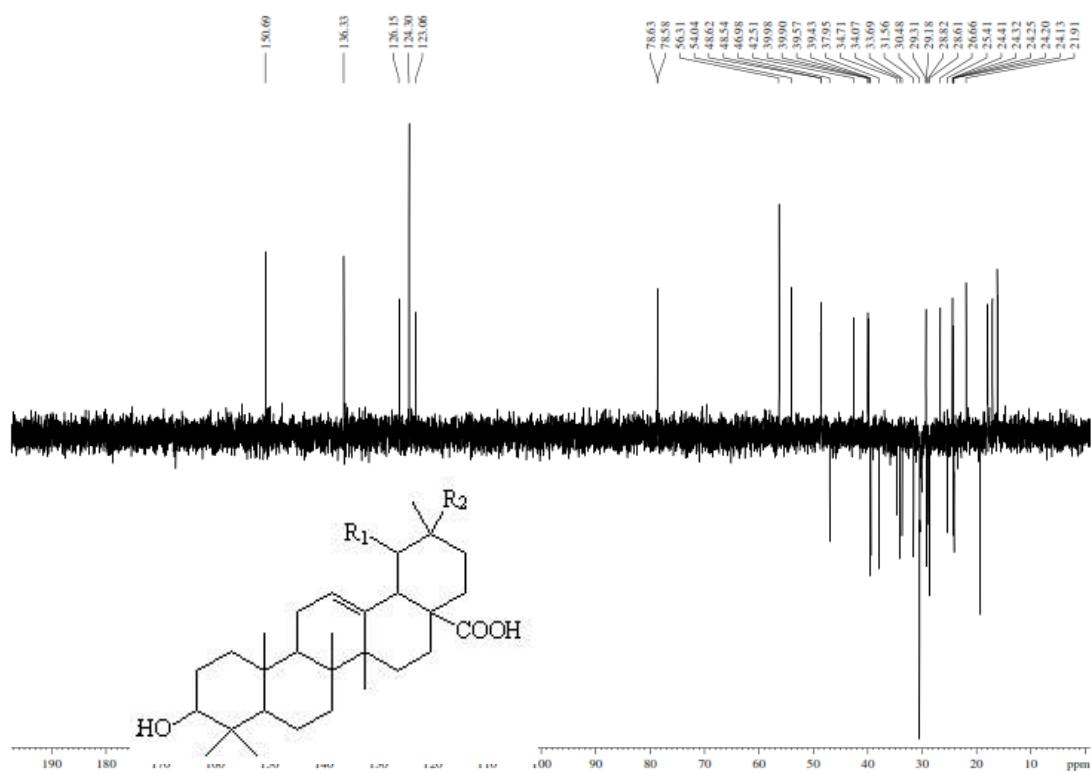


Figura 64 - Mapa de correlação homonuclear - COSY (CDCl_3 , 500 MHz) de VGC (I)

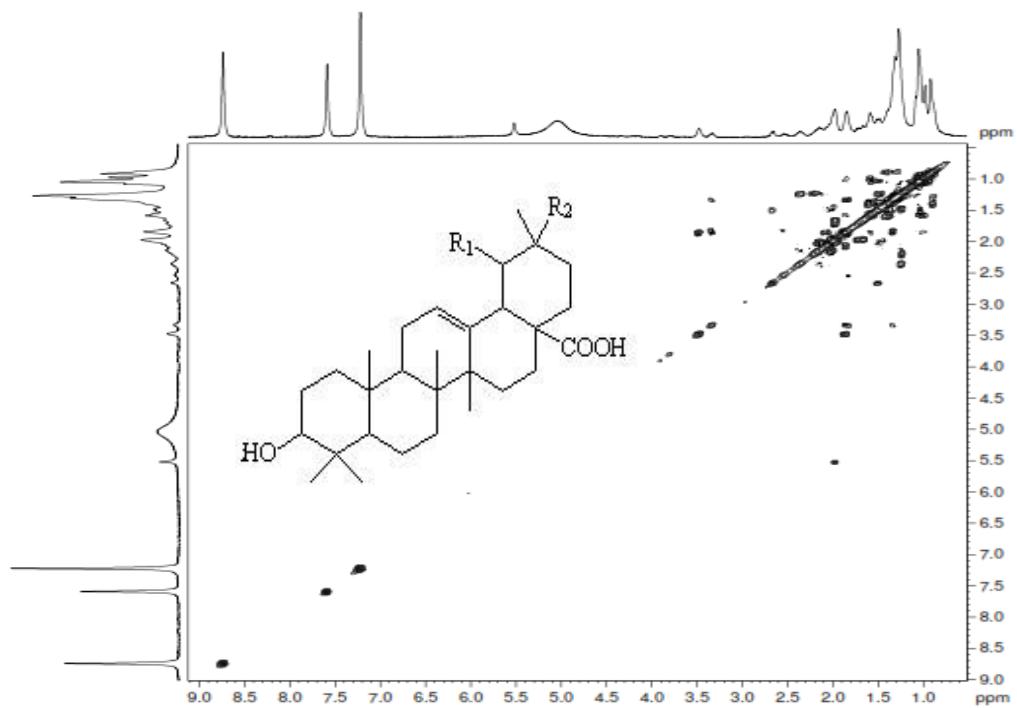


Figura 65 - Mapa de correlação heteronuclear-HMBC (CDCl_3 , 125 MHz) de VGC (I)

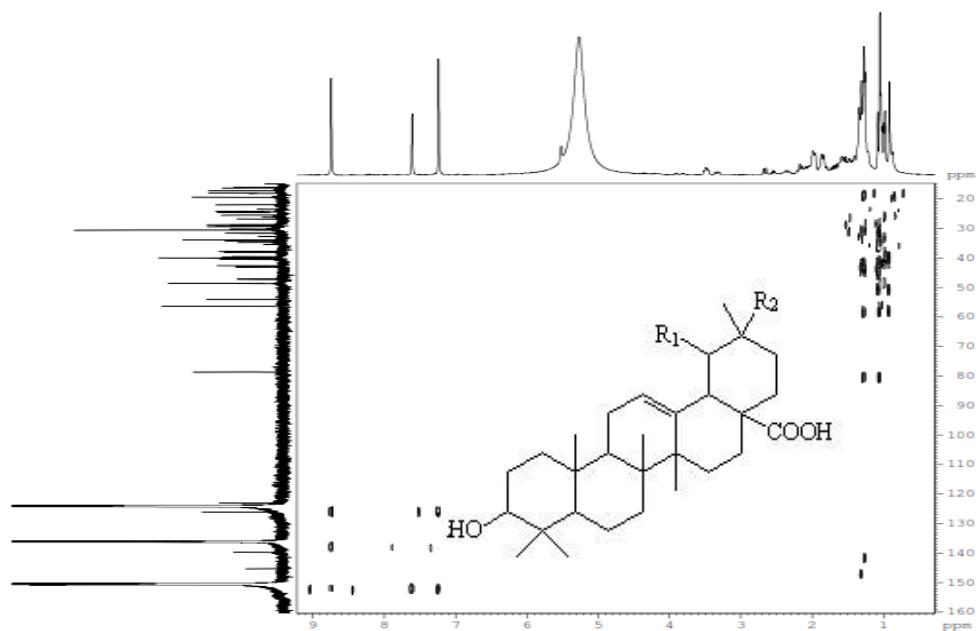
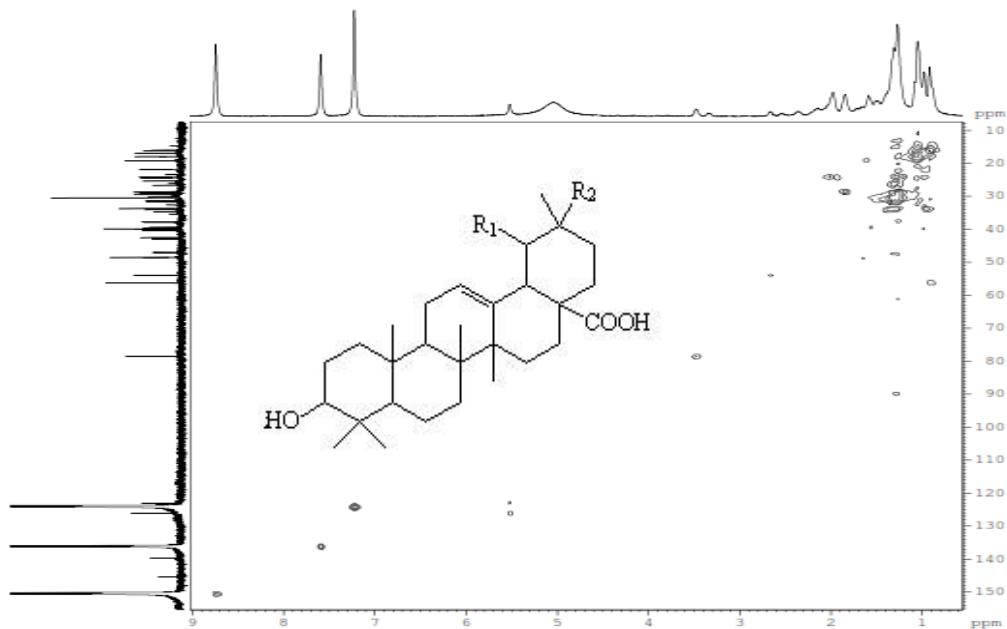


Figura 66 - Mapa de correlação heteronuclear-HMQC (CDCl_3 , 125 MHz) de VGC (I)



5.6 Estudo da composição fixa do lenho de *V. gardneriana*

5.6.1 Obtenção dos constituintes

Parte do lenho (2.284 g) foi seco à temperatura ambiente e em seguida triturado, o material foi submetido à extração exaustiva com etanol a temperatura ambiente. Após este período, o solvente foi evaporado em evaporador rotativo à pressão reduzida, obtendo-se (73,5g) de extrato. O extrato etanólico do lenho de *V. gardneriana* (EELVG) (73,5g), foi submetido a um pré-fracionamento em coluna cromatográfica, utilizando sílica gel. O extrato foi adsorvido em 50g de sílica, foram utilizados os seguintes solventes puros em ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio, acetato de etila, metanol, álcool n-butílico e água, obtendo-se os extratos (TABELA 13).

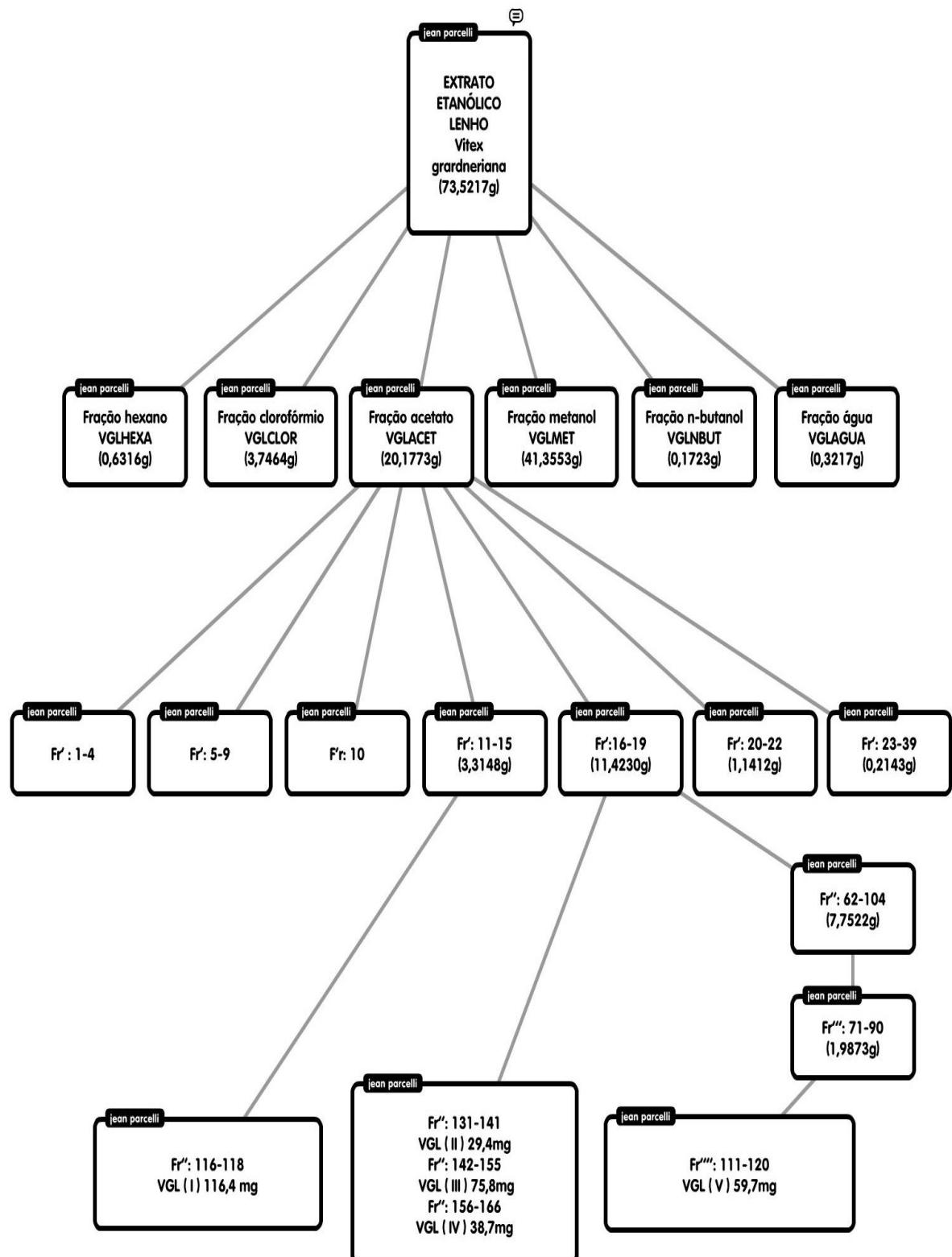
Tabela 13 - Solventes e respectivas massas obtidas no pré-racionamento do extrato etanólico do lenho de *Vitex gardneriana*

SOLVENTE	MASSA(g)
Hexano	0,63
Clorofórmio	3,74
Acetato de Etila	20,17
Metanol	41,35
N-butanol	0,07
Água	0,32
Massa Total	66,03

Fonte: Elaborada pelo autor.

A fração clorofórmio (3,74 g), foi cromatografada em coluna, utilizando sílica gel, sendo adsorvido em 20g de sílica, usando os eluatos em ordem crescente de polaridade a um gradiente de 10 % em volume: hexano (100%), hexano/clorofórmio (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), clorofórmio (100%), clorofórmio/AcoEt (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), AcoEt (100%), AcoEt/metanol (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9) e metanol (100%), obteve-se 131 frações. Todas as frações foram analisadas por cromatografia em camada delgada (CCD). As frações (F'116-118) eluidas em clorofórmio/acetato de etila (9:1), foram reunidas por similaridade, obtendo-se assim um pó branco que foi purificado por recristalização em clorofórmio, obtendo-se (116,4 mg) de um composto puro denominado VGL (I), como mostra o (FLUXOGRAMA 2).

Fluxograma 2 – Isolamento de VGL (I), VGL (II), VGL (III), VGL (IV) e VGL (V) respectivamente, do lenho de *V. gardneriana*



Fonte: Elaborado pelo autor.

A fração acetato de etila (20,17g) também foi recromatografada usando os eluatos em ordem crescente de polaridade a um gradiente de 10 % em volume: clorofórmio (100%), clorofórmio/AcoEt (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), AcoEt (100%), AcoEt/metanol (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9) e metanol (100%), fornecendo 315. Observou-se a formação de precipitados eluidos em acetato/ metanol, as quais foram reunidas (3:7) F”131-141 (29,4 mg), denominada de VGL (II). (3:7; 2:8) F”142-155 (75,8 mg) VGL (III) e o VGL (IV) e as frações (2:8; 1:9 F”156-166), (38,7mg), denominado VGL (IV). As frações 62 a 104, foram também reunidas obtendo-se (7,75g), as quais foram recromatografadas em coluna, utilizando sílica. Usando os eluatos em ordem crescente de polaridade a um gradiente de 10 % em volume: clorofórmio/AcoEt (1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), AcoEt (100%), AcoEt/metanol (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9) e metanol (100%), fornecendo 110 frações (15 ml), obtendo-se um precipitado branco a partir da fração (F”70 a 90), (1,9873g), o qual foi recromatografado. Usando os solventes clorofórmio/AcoEt: (1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), AcoEt (100%), AcoEt/metanol (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), fornecendo 308 frações. A frações AcoEt/metanol (8:2 F”111-120) mostraram-se puras após análise em CCD, as mesmas foram reunidas e denominadas VGL (V) (59,7mg), (FLUXOGRAMA 2).

5.6.2 Determinação estrutural do constituinte de VGL (I)

O espectro de RMN ¹H de VGL (I) (500 MHz, CD3OD, (FIGURA. 68) mostra um conjunto de sinais para dois hidrogêniosl múltiplo em δ_H 7,54-7,56ppm e um dupletos em δ_H 6,84 ppm (1H, J = 8,7 Hz, H-3), na região de aromáticos. Observou-se também um singlet para três hidrogênios em δ_H 3,89 ppm atribuídos a uma metoxila.

No espectro de RMN ¹³C e (125 MHz, CD3OD, (FIGURA. 69) mostram sinais referentes a 8 carbonos. O sinal em (δ_C 170,2,) sugere a presença de uma carbonila, atribuída a ácido e dois sinais em (δ_C 152,8 C-4 e 148,8 de carbonos aromáticos oxigenados. Dados do DEPT 135º revelaram a presença de quatro sinais, três referentes a carbonos aromáticos em 125,4: 116,0 e 114,0 ppm e um associado à presença de metoxila em 56,5 ppm, (TABELA 14).

A análise dos dados em comparação com a literatura (POUCHERT, 1993; CANUTO; SILVEIRA, 2010; GALLETT, 1996), chegou-se à conclusão de que VGL (I) é um composto fenólico conhecido como Ácido vanílico (FIGURA, 67). O qual está sendo reportado pela primeira vez nesta espécie.

Figura 67 – Estrutura do Ácido Vanílico

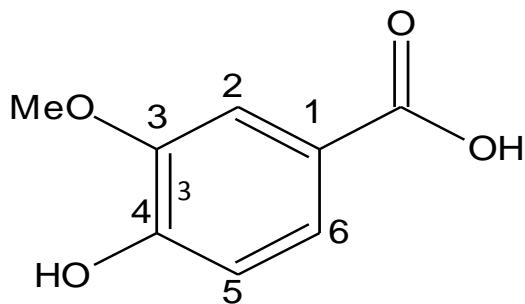


Tabela 14 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de VGL (I) dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC.

VGL (I)				
	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
C				
1	123.22			H-5
3	148.83		H-2	H-5
4	152.84		H-5	H-2
7	170.16			H-2; H-6
CH				
2	114.01	7.55 (d)		
5	116.00	6,84 (8.7)		
6	125.43	7.57 (dd)		
CH₃				
MeO-3	56.58	3.89 (s)		

Fonte: Elaborada pelo autor

5.6.2.1 Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN ^1H) e de Carbono -13 (RMN ^{13}C) uni e bidimensionais de VGL (I)

Figura 68 - Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de VGL (I)

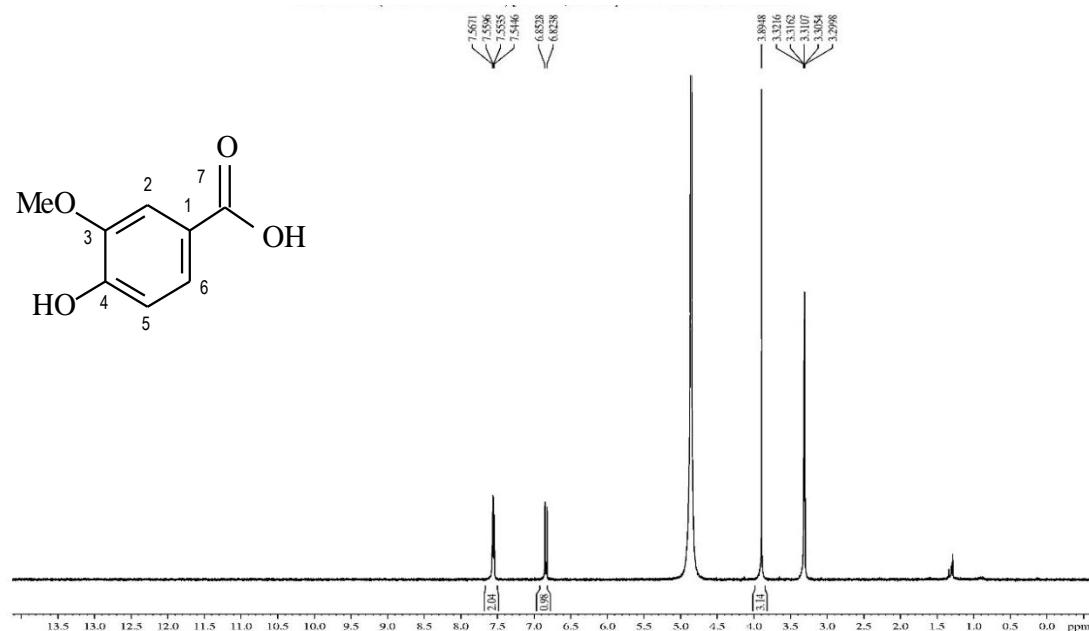


Figura 69 - Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) de VGL (I)

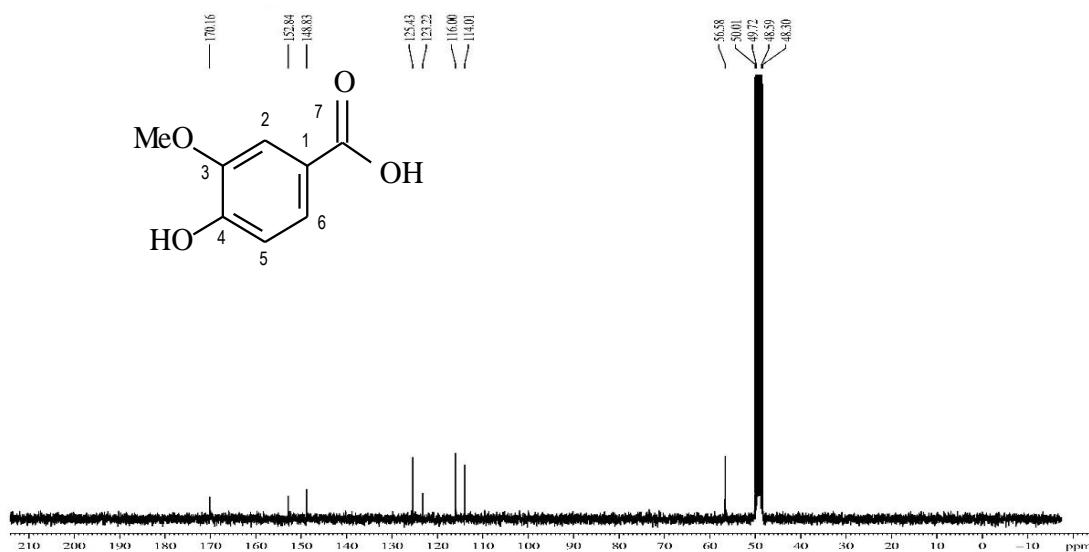


Figura 70 - Mapa de correlação homonuclear - COSY (CD₃OD, 500 MHz) de VGL (I)

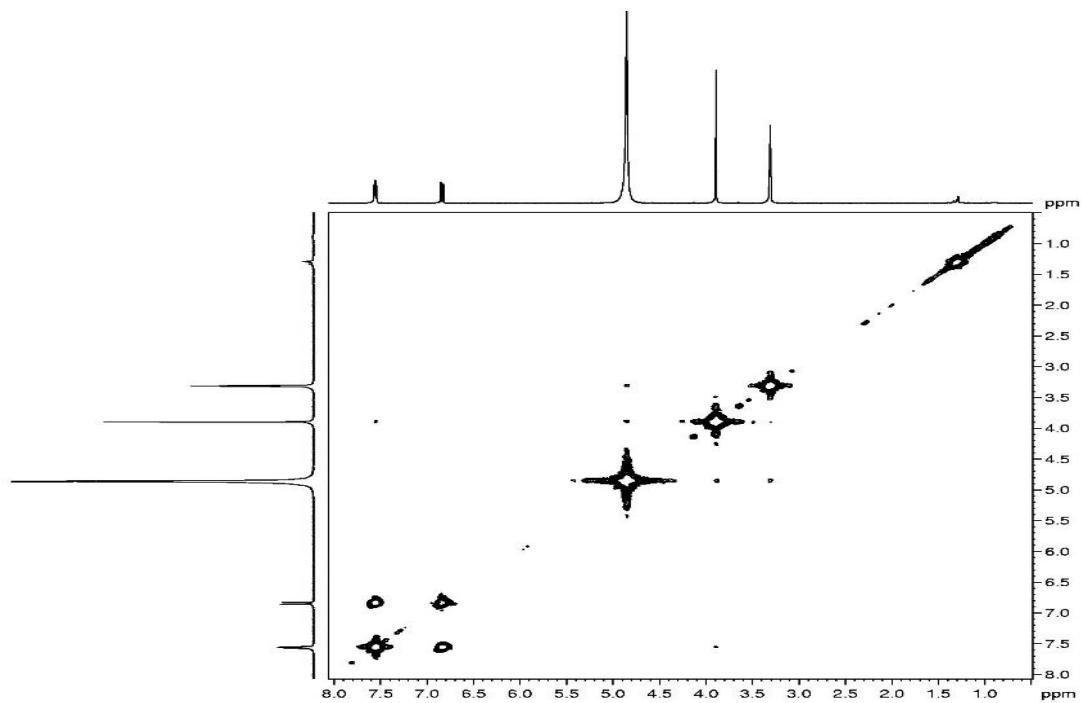


Figura 71 - Mapa de correlação heteronuclear – HMBC (CD₃OD, 125 MHz) de VGL (I)

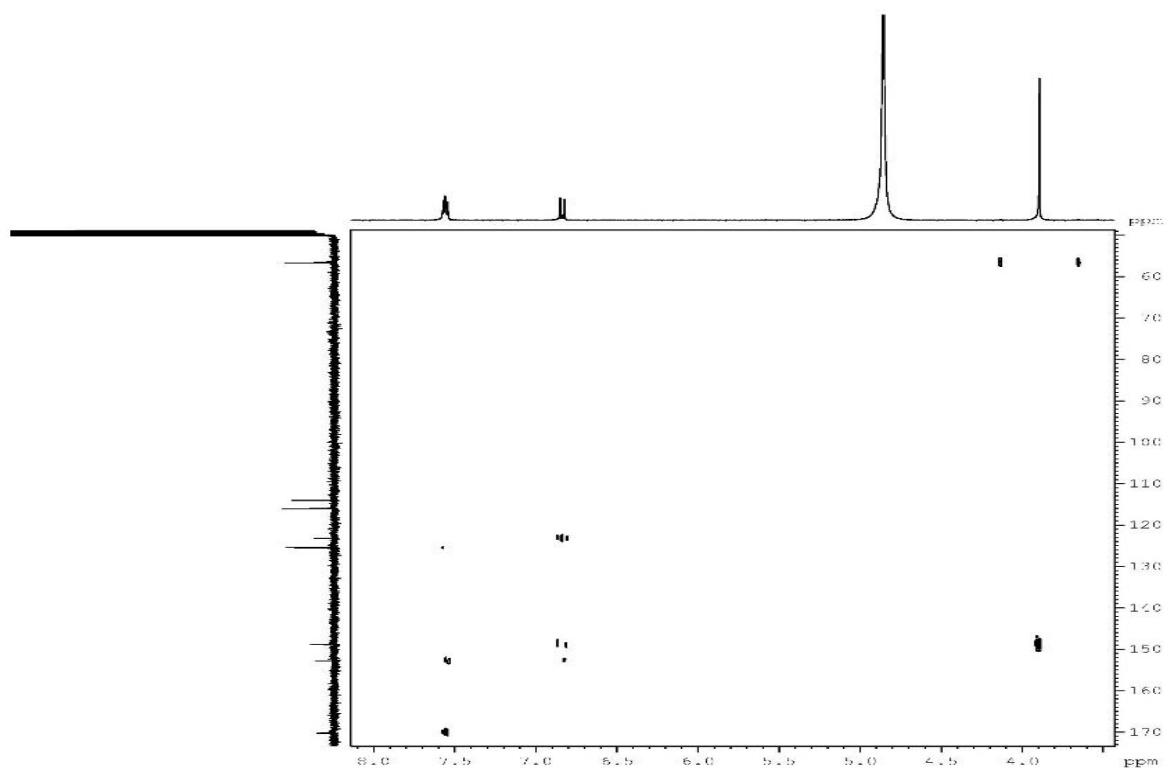


Figura 72 - Mapa de correlação heteronuclear – HMQC (CD_3OD , 125 MHz) de VGL (I)

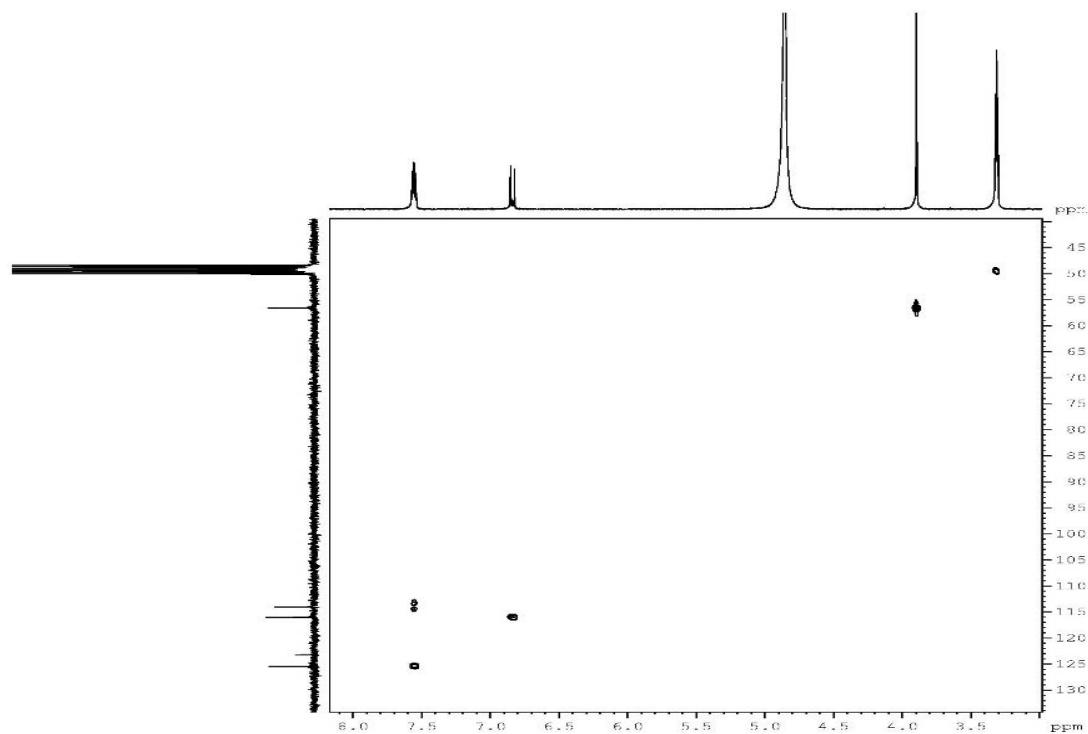
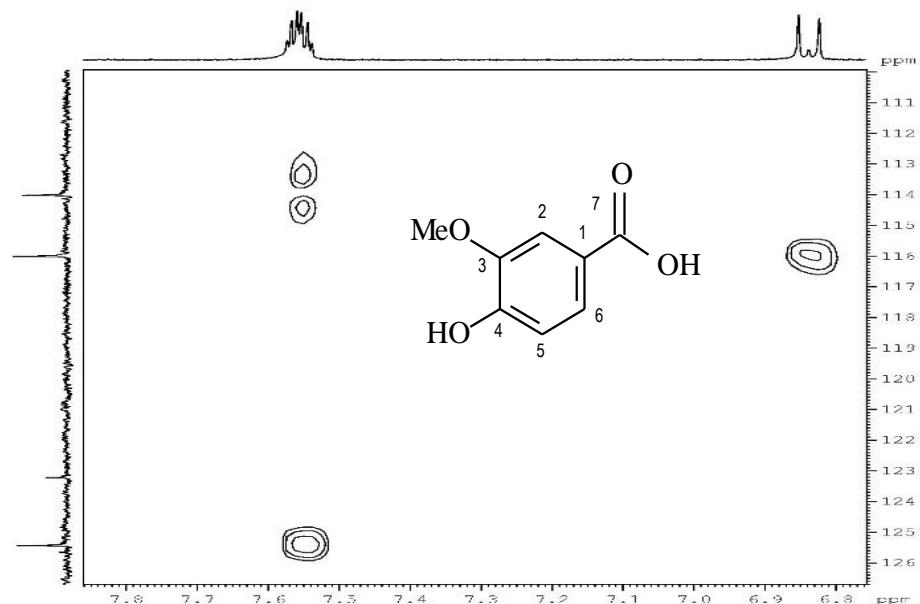


Figura 73 - Mapa de correlação heteronuclear – HMQC expandido (CD_3OD , 125 MHz) de VGL (I)



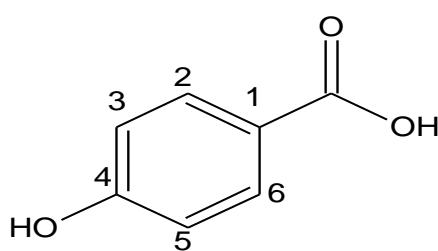
5.6.3 Determinação estrutural do constituinte VGL (II)

Análise do espectro de RMN ^1H de VGL (II) 500 MHz, CD3OD, (FIGURA 75), revelaram dois dupletos em δ_{H} 7,88 e 6,82 ppm (2H, d, $J = 9,6$ Hz, H-2,6 e H-3,5), característicos de um sistema aromático para-dissubstituído.

O espectro de RMN ^{13}C de VGL (II) 125 MHz, CD3OD, (FIGURA 76) apresentaram cinco linhas espectrais, das quais uma foi compatível com carbonila de ácido (δ_{C} 170,2 ppm) e as outras quatro foram associadas a carbonos aromáticos: δ_{C} 163,4 (C-4); 133,1(C-2,6); 122,8 (C-1) e 116,2 (C-3,5). As absorções em δ_{C} 133,1 e 116,2 ppm foram atribuídas a carbonos hidrogenados. Os sinais em δ_{C} 163,4 (C-4) e 122,8 ppm (C-1) (FIGURA 76) foram reconhecidos como pertencentes a carbonos não-hidrogenados (TABELA 15). Os dados de RMN foram concordantes com os dados registrados na literatura. O VGL (II) foi identificado como sendo o ácido *p*-hidroxi-benzóico (4), cujos dados de RMN foram concordantes com os registrados na literatura (POUCHERT, 1993), O qual está sendo reportado pela primeira vez nesta espécie, (FIGURA 74).

Figura 74 – Estrutura do Ácido *p*-hidroxi-benzóico

Tabela 15 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de VGL (II) dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC.



C	VGL (II)	
	δ_{C}	δ_{H}
1	122,8	
2,6	133,1	7,88 (1H, d, 9,6 Hz)
3,5	116,1	6,82 (1H, d, 9,6 Hz)
4	163,4	
7	170,2	

Fonte: Elaborada pelo autor

5.6.3.1 Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN ^1H) e de Carbono -13 (RMN ^{13}C) uni e bidimensionais de VGL (II)

Figura 75 - Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de VGL (II)

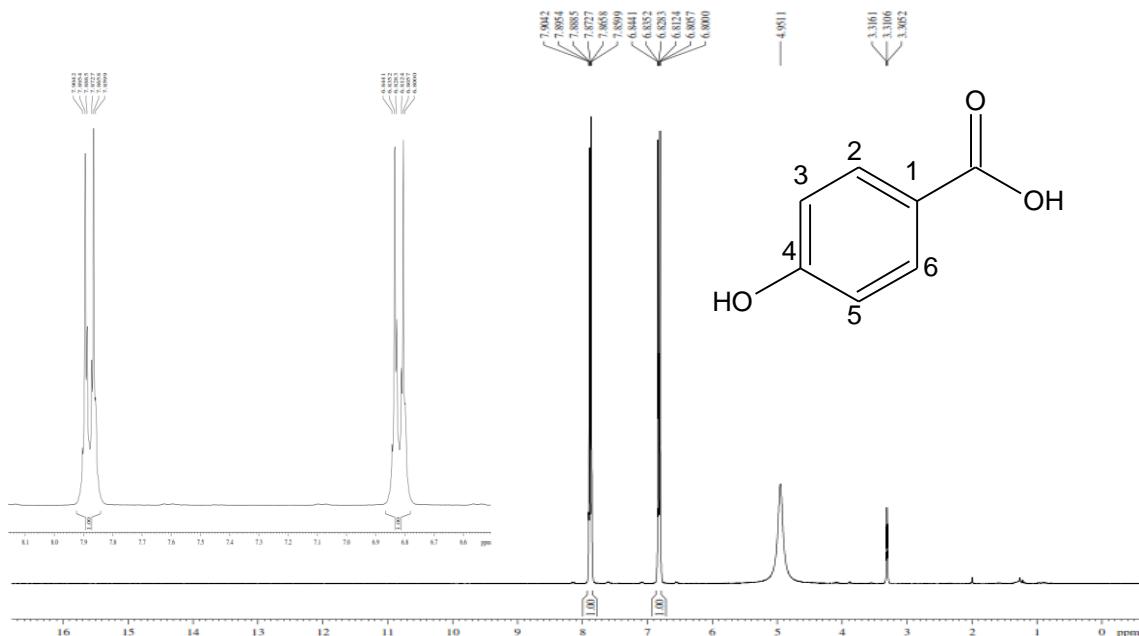


Figura 76 - Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) de VGL (II)

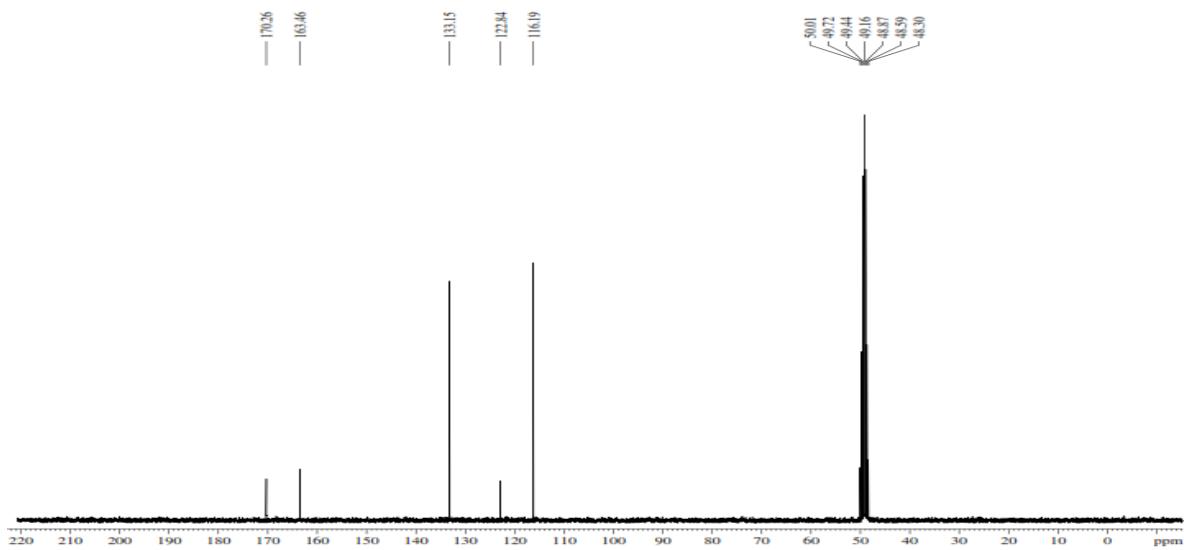


Figura 77 - Mapa de correlação heteronuclear–HMBC (CD_3OD , 125 MHz) de VGL (II)

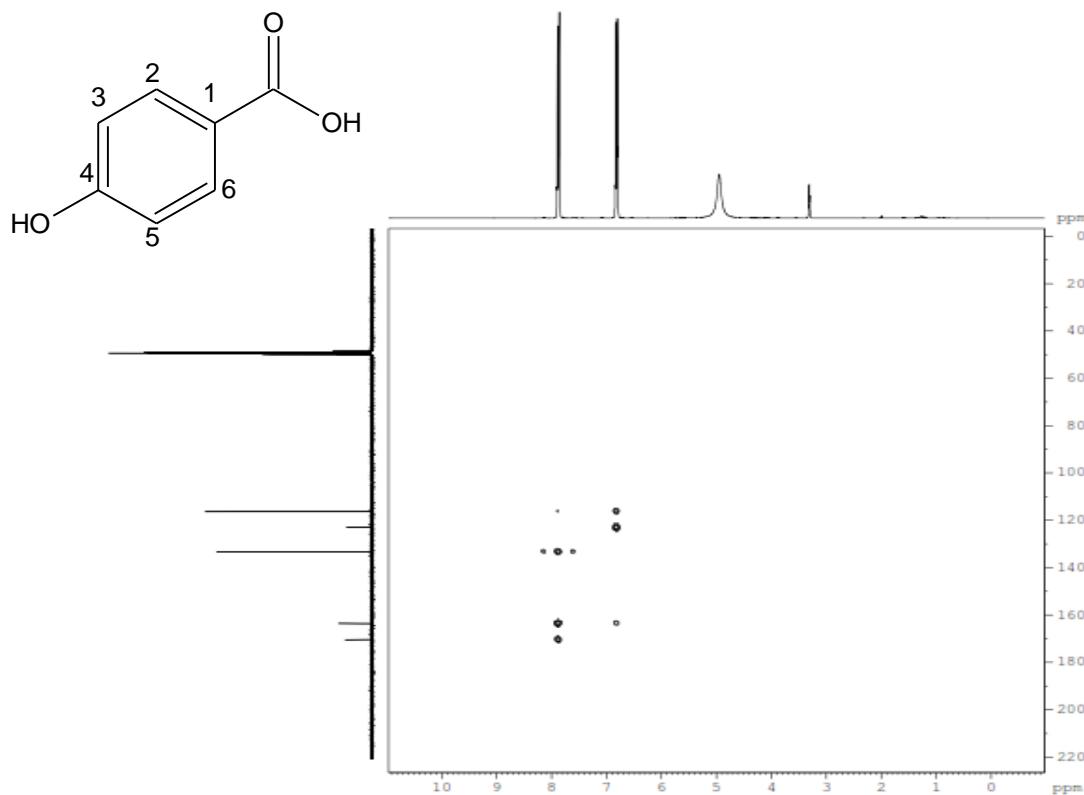


Figura 78 - Mapa de correlação heteronuclear–HMBC expandido (CD_3OD , 125 MHz) de VGL(II)

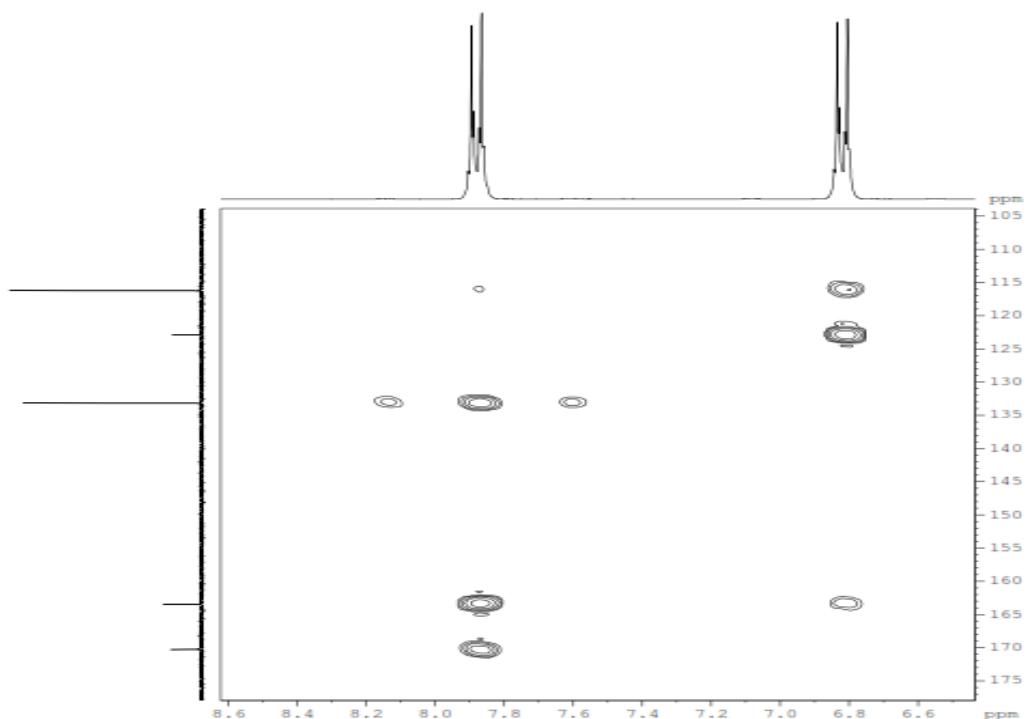
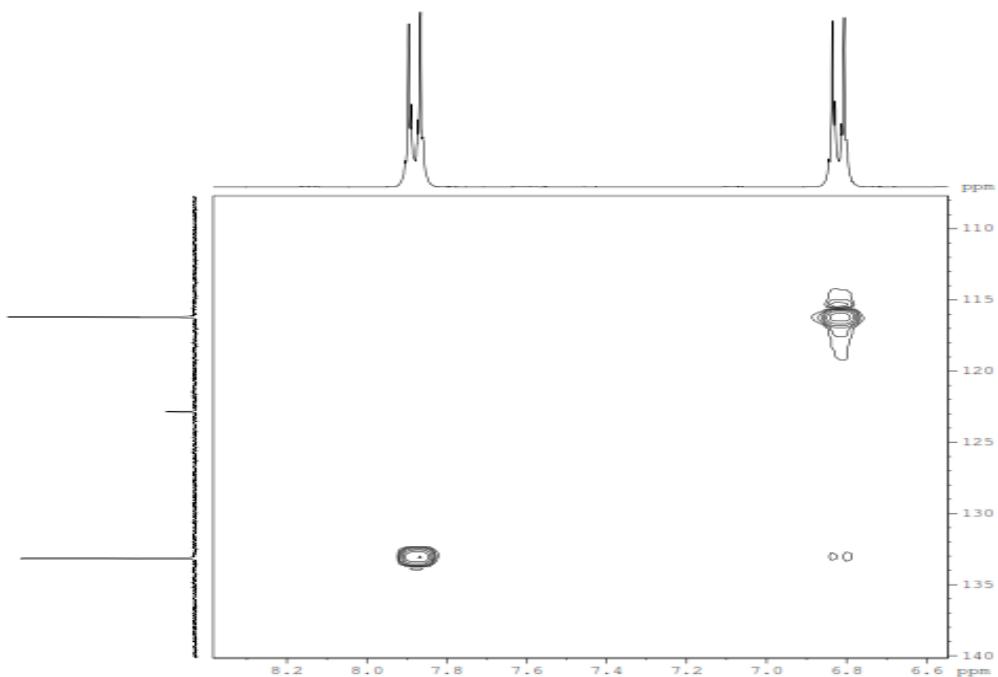


Figura 79 - Mapa de correlação heteronuclear – HMQC (CD_3OD , 125 MHz) de VGL (II)



Figura 80 - Mapa de correlação heteronuclear – HMQC expandido (CD_3OD , 125 MHz) de VGL (II)



5.6.4 Determinação estrutural do constituinte VGL (III)

Através da análise do espectro de RMN ^1H de VGL (III) 500 MHz, CD₃OD, (FIGURA 82) foram observados os sinais de hidrogênio aromáticos fortemente desprotegidos em δ_{H} 7,55 ppm (H-2) com sinal característico de acoplamento meta e com sinal de H-5 em δ_{H} 6,83 ppm com dubbleto $J = 8,7$ Hz. E o sinal de H-6 em δ_{H} 7,57 ppm com o dubbleto ($J = 9$ e $J = 7,57$ Hz)

A cadeia lateral foi identificada através dos sinais com desacoplamentos característicos de hidrogênios aromáticos, com dubbletos em δ_{H} 7,87 e 6,82 ppm (2H, d, $j=8,8$ Hz, H-2', H-6' e H-3' e H-5', característicos de sistema aromático *p*-substituído. Observou-se ainda um singlet em δ_{H} 3,88 ppm (3H, s, 3-OCH₃).

No espectro de RMN ^{13}C -CPD 125 MHz, CD₃OD, (FIGURA 83) foram registradas treze linhas espectrais, sendo duas atribuídas a uma carbonila de éster (δ 178,2, C-7) e a uma carbonila de ácido (δ 170,2, C-7'), três relacionadas a carbonos aromáticos oxigenados (δ 152,8 C-4; 148,8, C-3 e δ 163,4 C-4'). Os carbonos hidrogenados foram identificados através de análise do espectro de RMN $^{13}\text{CDEPT135}$ no qual foram visualizados seis sinais: cinco referentes a carbonos aromáticos hidrogenados (δ 125,4, C-6; 115,9, C-5; 113,9, C-2; 133,14 C-3'/5'; 116,2 C-2'/6') e um associado à presença de metoxila (δ 56,5, 3-OMe). As absorções em δ 123,2 (C-1) e δ 122,8 (C-1') ausentes no espectro DEPT135, foram atribuídas a carbonos aromáticos não-hidrogenado, (TABELA 16). Desta forma, VGL (III) foi identificado como sendo o éster do ácido vanílico e *p*-hidróxi-benzóico, que está sendo reportado pela primeira vez na literatura, sendo considerado, portanto, uma substância inédita (FIGURA 81).

Figura 81 – Estrutura do Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoato de *p*-hidroxibenzóico

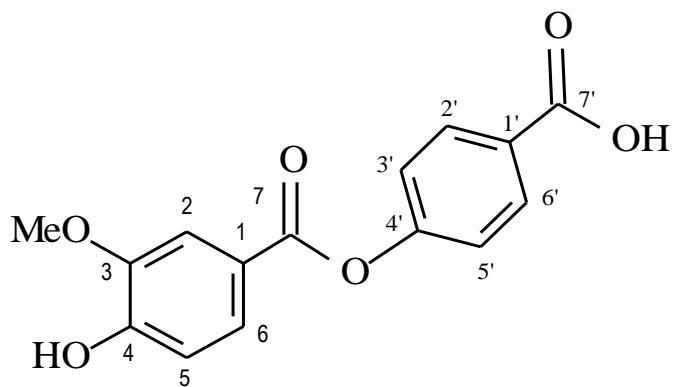


Tabela 16 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de VGL (III) dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC.

	HSQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
C				
1	123.21	-		H-5
3	148.79	-	H-2	H-5; MeO-3
4	152.79	-	H-5	H-2
7	170.18	-		H-2; H-6
1'	122.86	-		H-3'/H-5'
4'	163.47	-	H-3'/H-5'	H-2'/H-6'
7'	170.22	-		H-2'/H-6'
CH				
2	113.99	7.55 (d)		H-6
5	115.98	6.83 (d J=8.7 Hz)		
6	125.43	7.57 (dd)		H-2
2'/6'	116.18	7.87 (d, J=8.8Hz)		
3'/5'	133.14	6.82 (d, J=8.8Hz)		
CH₃				
MeO-3	56.55	3.88 (s)		

Fonte: Elaborada pelo autor

5.6.4.1 Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN ^1H) e de Carbono -13 (RMN ^{13}C) uni e bidimensionais de VGL (III)

Figura 82 - Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de VGL (III)

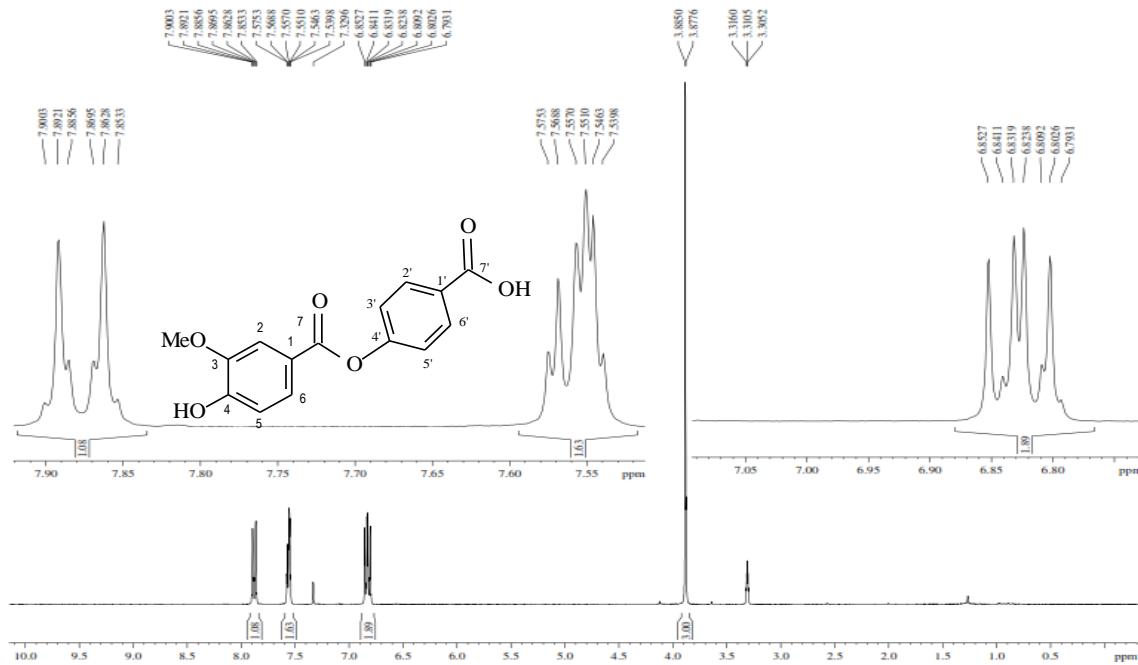


Figura 83 - Espectro de RMN¹³C (CD₃OD, 125 MHz) de VGL (III)

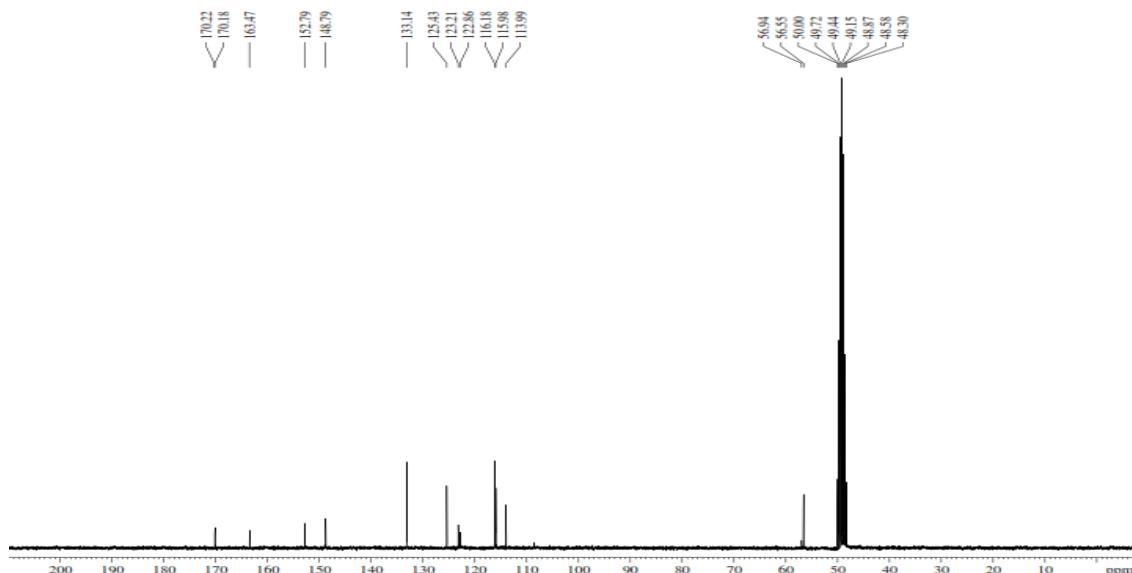


Figura 84 - Espectro de RMN¹³C-DEPT 135° (CD₃OD, 125 MHz) de VGL (III)

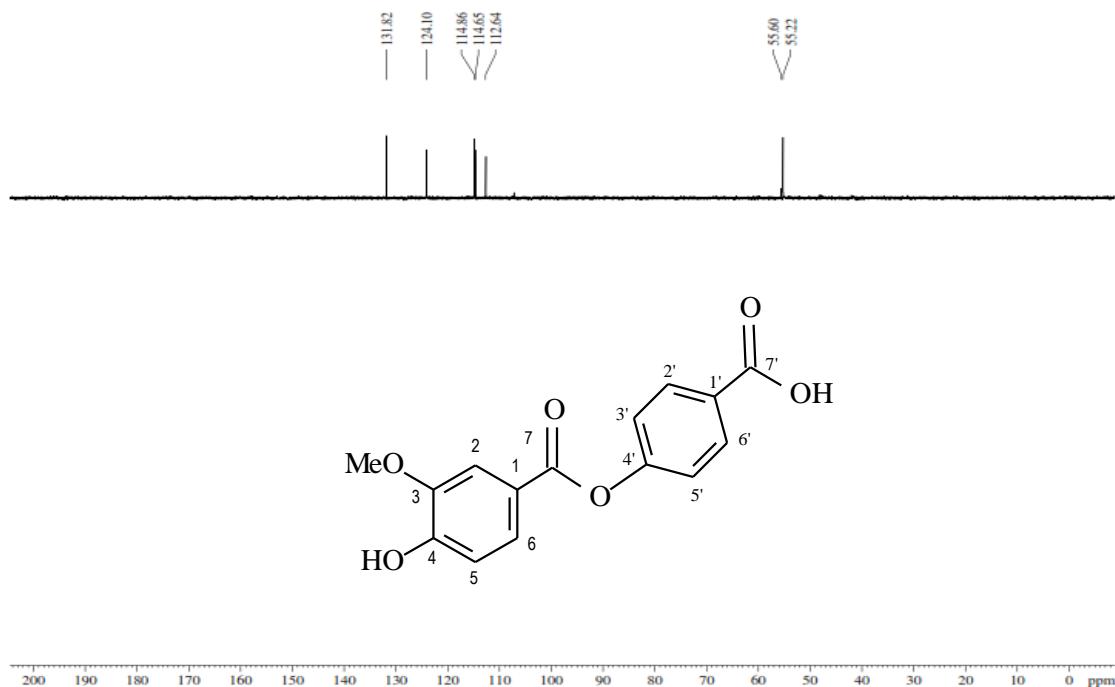


Figura 85 - Mapa de correlação homonuclear - COSY (CD_3OD , 500 MHz) de VGL (III)

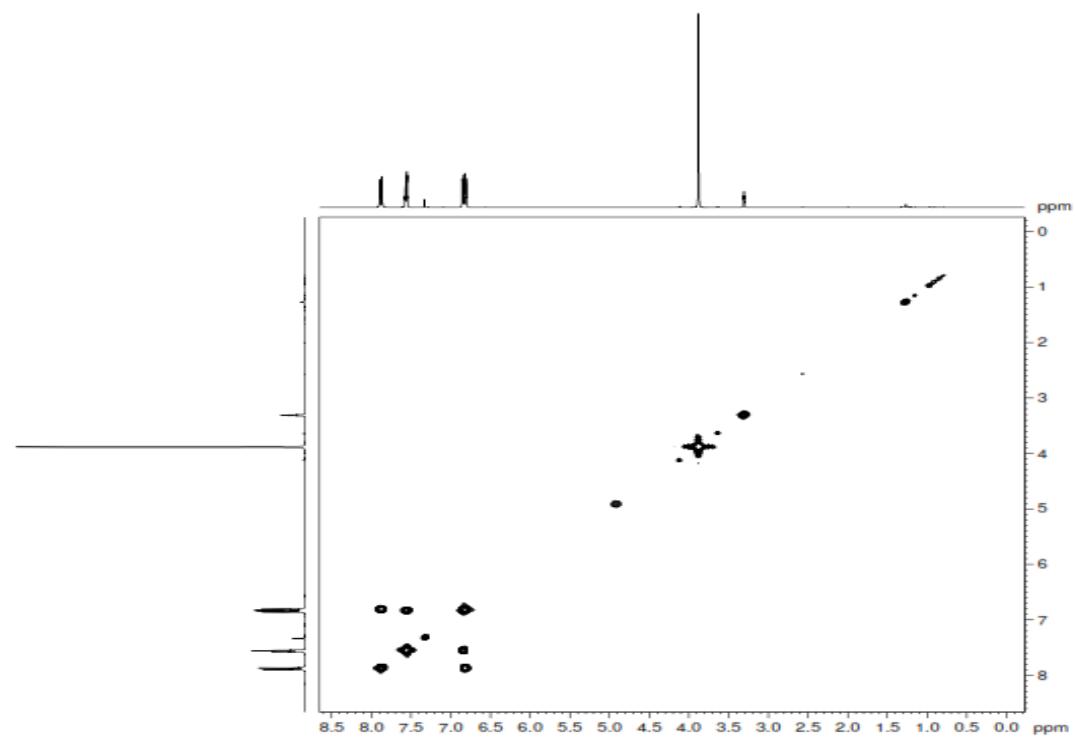


Figura 86 - Mapa de correlação heteronuclear– HMBC (CD₃OD, 125 MHz) de VGL (III)

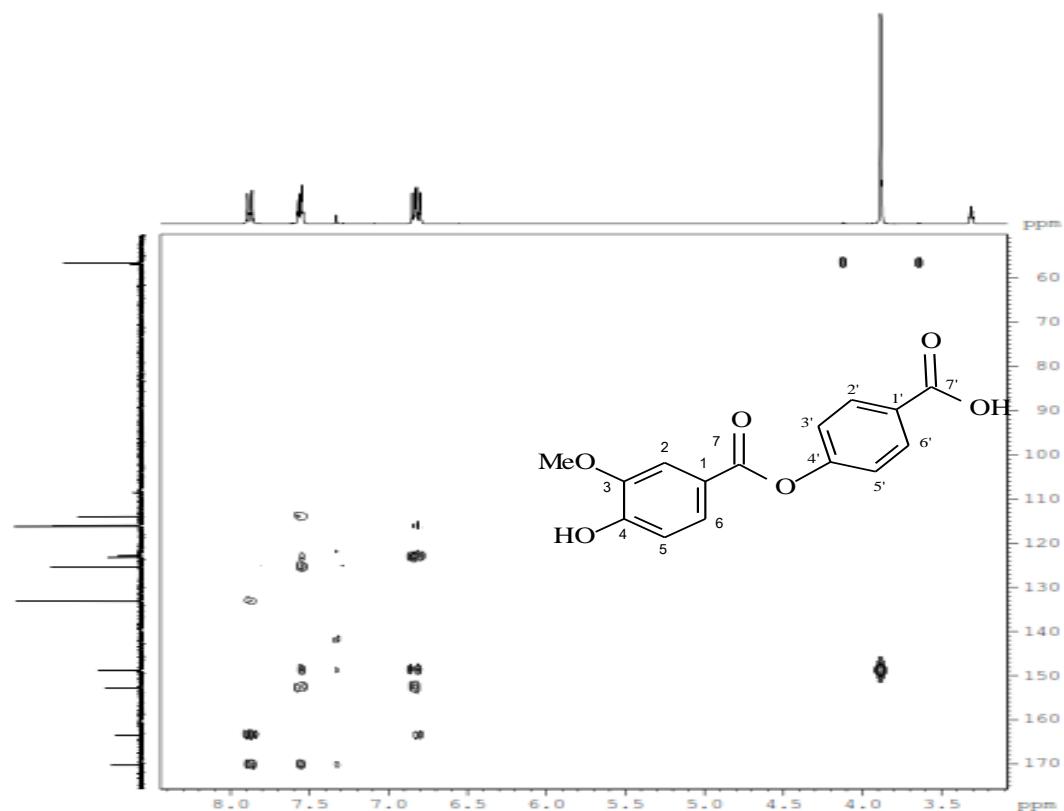
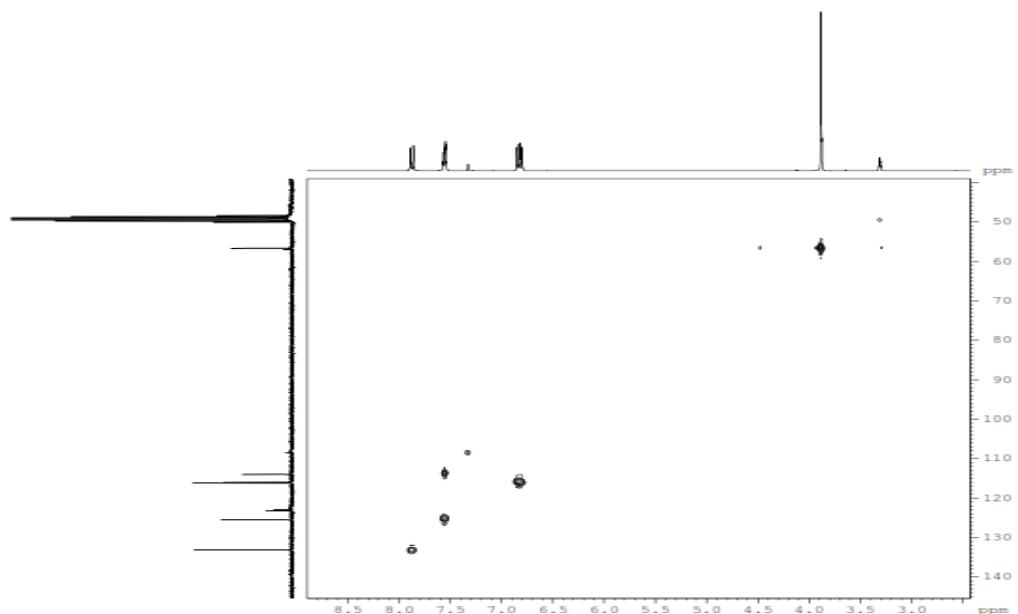


Figura 87 - Mapa de correlação heteronuclear – HMQC (CD₃OD, 125 MHz) de VGL (III)



5.6.5 Determinação estrutural do constituinte VGL (IV)

O espectro de RMN ^1H de VGL (IV), (FIGURA 89) apresentou um conjunto de sinais em δ_{H} 0,76 a 2,50 ppm de grupos metila e metilenos característico de triterpenos. O sinal em δ_{H} 2,50 (1 H, S, H-18) característico para o H-18 de um triterpeno tipo ursano com um substituinte 19 α -hidroxil, que em decorrência dos sinais δ_{H} 129,5 (CH, C-12) e 140,2 (C, C-13) no espectro de ^{13}C RMN (FIGURA 90), sugerem a presença de uma unidade 19 α -hidroxiursan-12-en. Foram observados também sinais referentes a seis metilas, sendo uma com um dubbleto em δ_{H} 0,99 ppm (3H-30), além do sinal em δ_{H} 5,25 ppm, de próton oleofínico. Os sinais verificados em δ_{H} 3,83 (m, H-2 β) e 3,30 (H-3 β) sugerem uma configuração α para os dois grupos hidroxila no anel A.

O espectro de RMN ^{13}C -CPD (FIGURA 90) foram registradas trinta linhas espectrais consistente com uma estrutura triterpenóide, foram ainda observados sinais referentes a sete grupos metila em δ 29,4 (C-23); 22,6 (C-24); 17,04 (C-25); 17,7 (C-26); 27,2 (C-27); 25,31 (C-29) e 16,7 (C-30), além de sinais referentes aos carbonos olefinicos em δ 129,5 (CH, C-12) e 140,2 (C, C-13), os quais sugerem um esqueleto tripertenóide tipo ursano. Foi verificado a presença de sinais relativos a dois carbonos metinicos oxigenados em δ 67,3 (C-2); 80,3 (C-3) e um sinal indicativo de carbono quaternário oxigenado em δ 73,7; além da presença de um sinal relativo a um grupo carboxila em δ 182,4 (C-28). Desta forma, por meio dos dados de ^1H e ^{13}C e dados da literatura (MAHATO; KUNDU, 1994) VGL (IV) foi identificado como sendo o ácido 2 α ,3 α ,19 α -trihidroxiursan-12-en-28-óico (FIGURA 88), o qual está sendo relatado pela primeira vez na literatura (TABELA 17).

Figura 88 – Estrutura do ácido 2 α ,3 α ,19 α -trihidroxiursan-12-en-28-óico

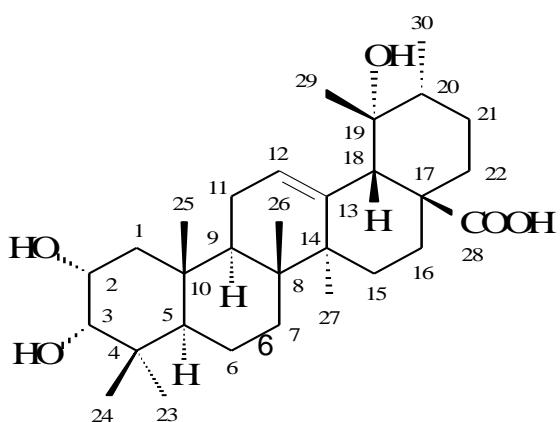


Tabela 17 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de VGL (IV) (CD_3OD)

VGL (IV)				
	HMQC		HMBC	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2\text{J}_{\text{CH}}$	$^3\text{J}_{\text{CH}}$
C				
4	39.54	-	3H-23; 3H-24	
8	41.43	-	3H-26	3H-27
10	39.62	-	3H-25	
13	140.23	-		3H-27
14	42.91	-	3H-27	3H-26
17	47,8	-		
19	73.76	-	3H-29	3H-30
28	182.43	-		
CH				
2	67.34	3.93 (m)		
3	80.28	3.30		3H-23; 3H-24
5	49.49	1.20		3H-23; 3H-24; 3H-25
9	48.38	1.70		3H-25; 3H-26
12	129.53	5.25 (br, s)		
18	55.25	2.50 (s)		3H-29
19	-		-	-
20	43.25	1.35	3H-30	3H-29
CH₂				
1	42.66	1.58, 1.30		
2	-	-	-	-
6	19.44			
7	34.23	1.50, 1.30		3H-26
11	24.87	1.98		
15	29.74			3H-27
16	26.77			

19	-			
21	27.46			3H-30
22	39.17			
CH₃				
23	29.39	0.99 (s)		3H-24
24	22.61	0.87 (s)		3H-23
25	17.04	0.99 (s)		
26	17.70	0.76 (s)		
27	27.23	1.20 (s)		
29	25.31	1.35 (s)		
30	16.76	0.93 (J, 6.7 Hz)		

Fonte: Elaborada pelo autor

5.6.5.1 Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN ¹H) e de Carbono -13 (RMN ¹³C) uni e bidimensionais de VGL (IV)

Figura 89 - Espectro de RMN ¹H (CDCl₃, 500 MHz) de VGL (IV)

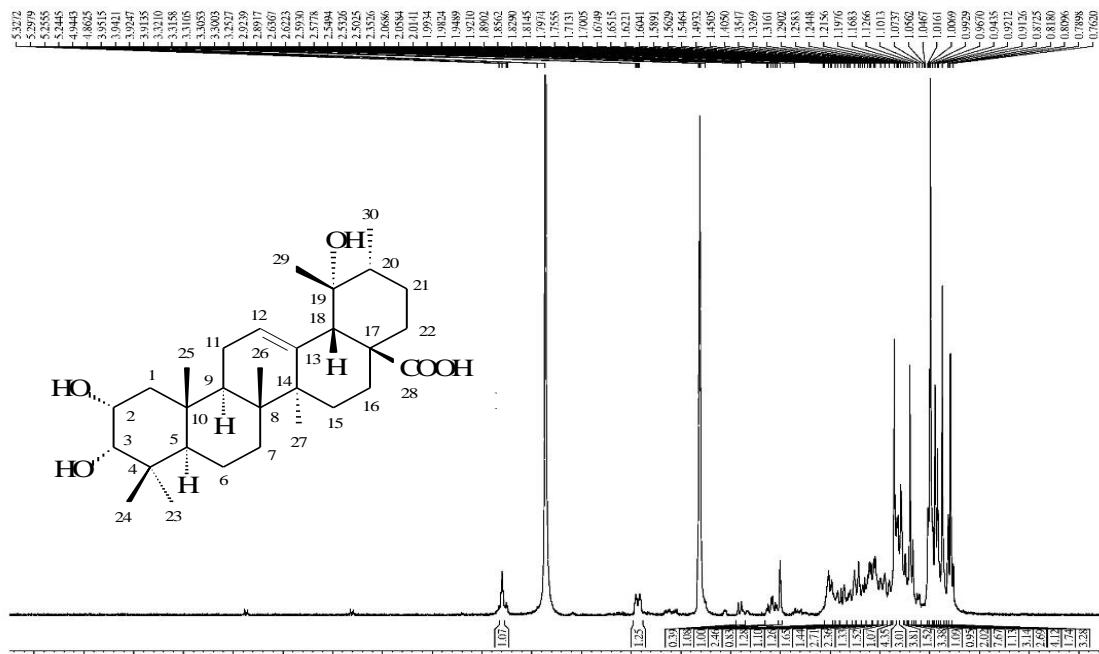


Figura 90 - Espectro de RMN¹³C (CDCl₃, 125 MHz) de VGL (IV)

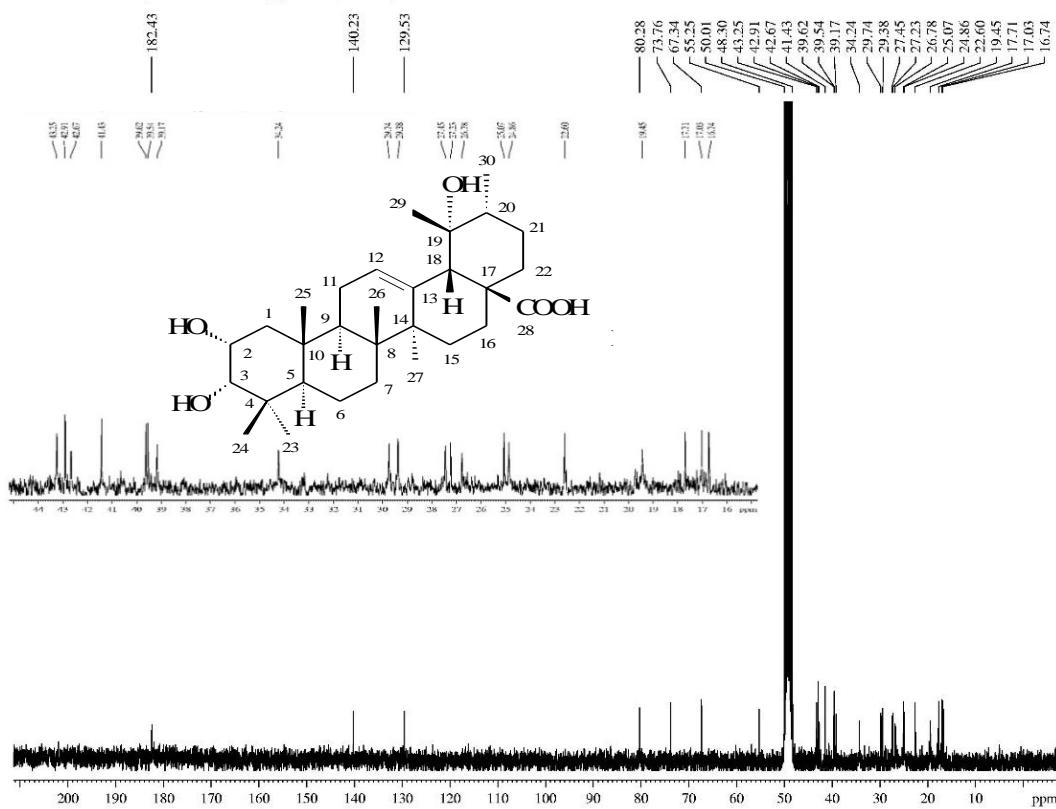


Figura 91 - Espectro de RMN¹³C-DEPT 135° (CDCl₃ , 125 MHz) de VGL (IV)

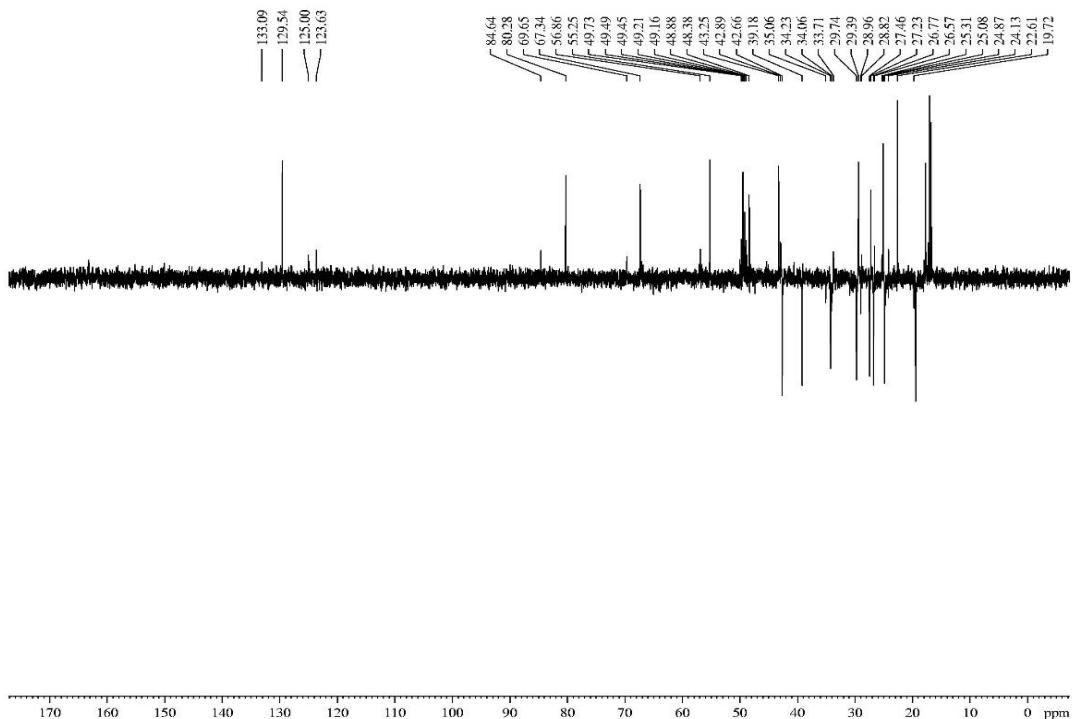


Figura 92 - Mapa de correlação homonuclear -COSY (CDCl_3 , 500 MHz) de VGL (IV)

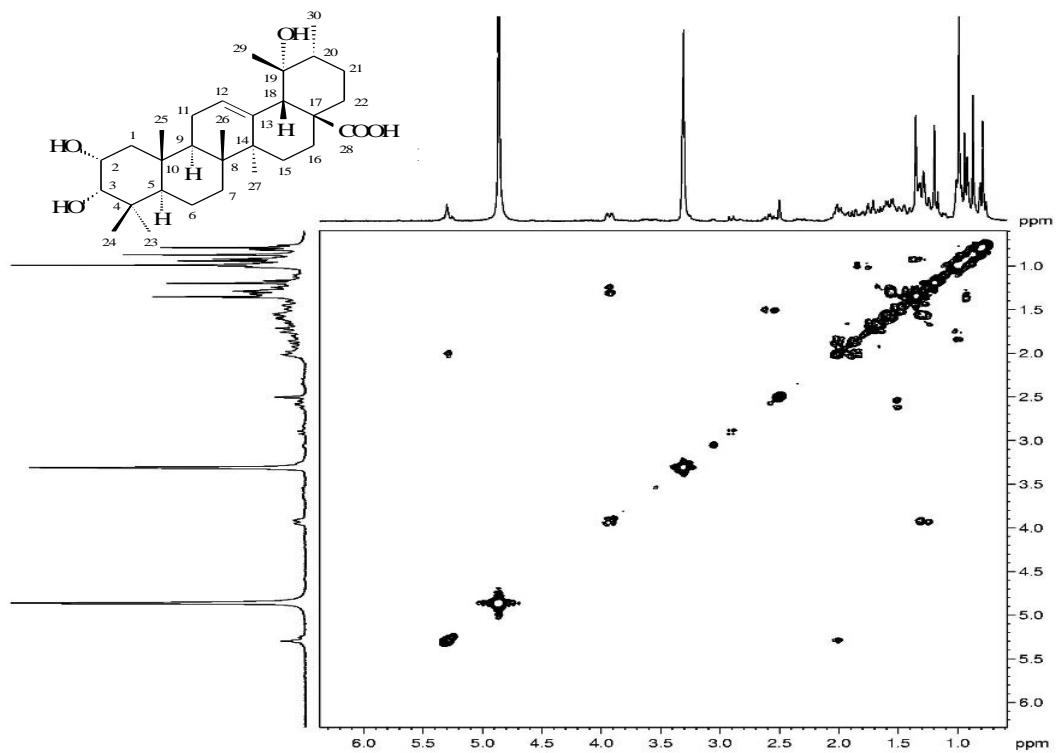


Figura 93 - Mapa de correlação homonuclear - COSY-expandido (CDCl_3 , 500 MHz) de VGL (IV)

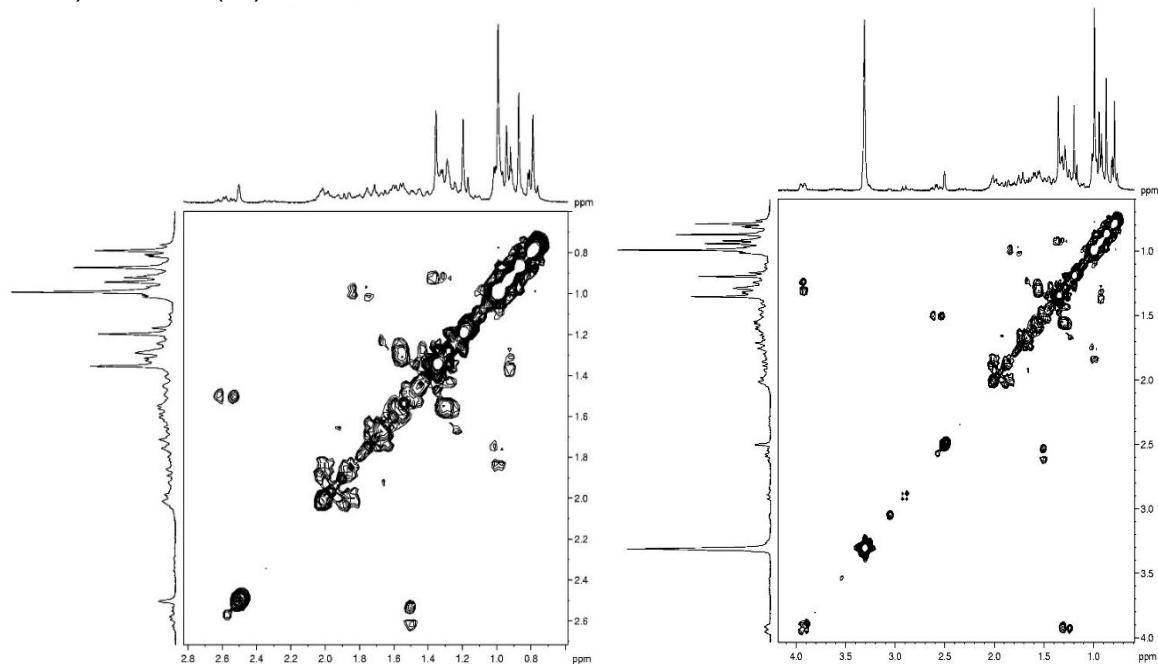


Figura 94 - Mapa de correlação heteronuclear–HMBC (CDCl_3 , 125MHz) de VGL (IV)

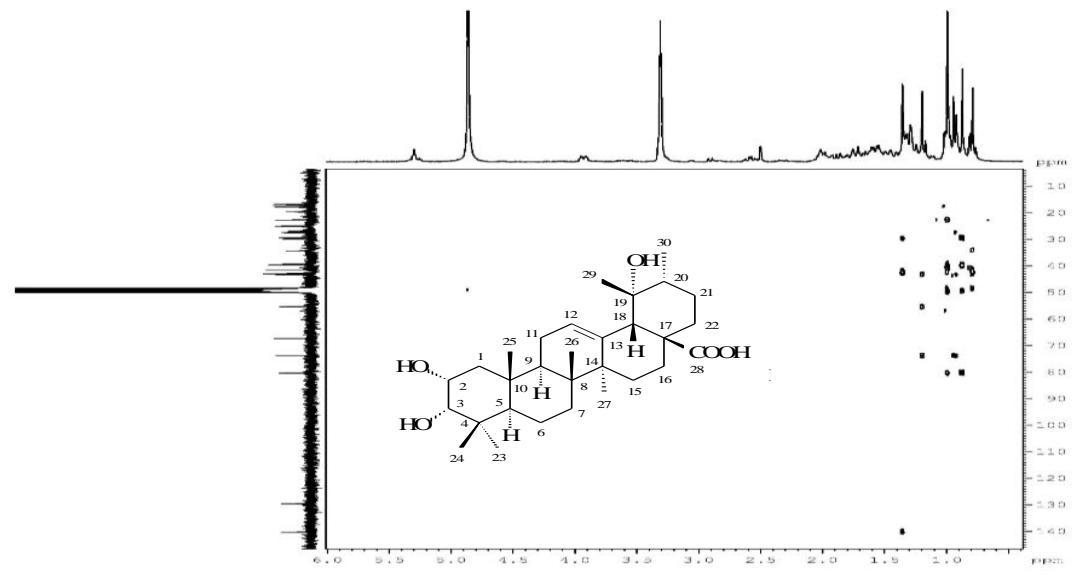


Figura 95 - Mapa de correlação heteronuclear – HMBC expandido (CDCl_3 , 125MHz) de VGL (IV)

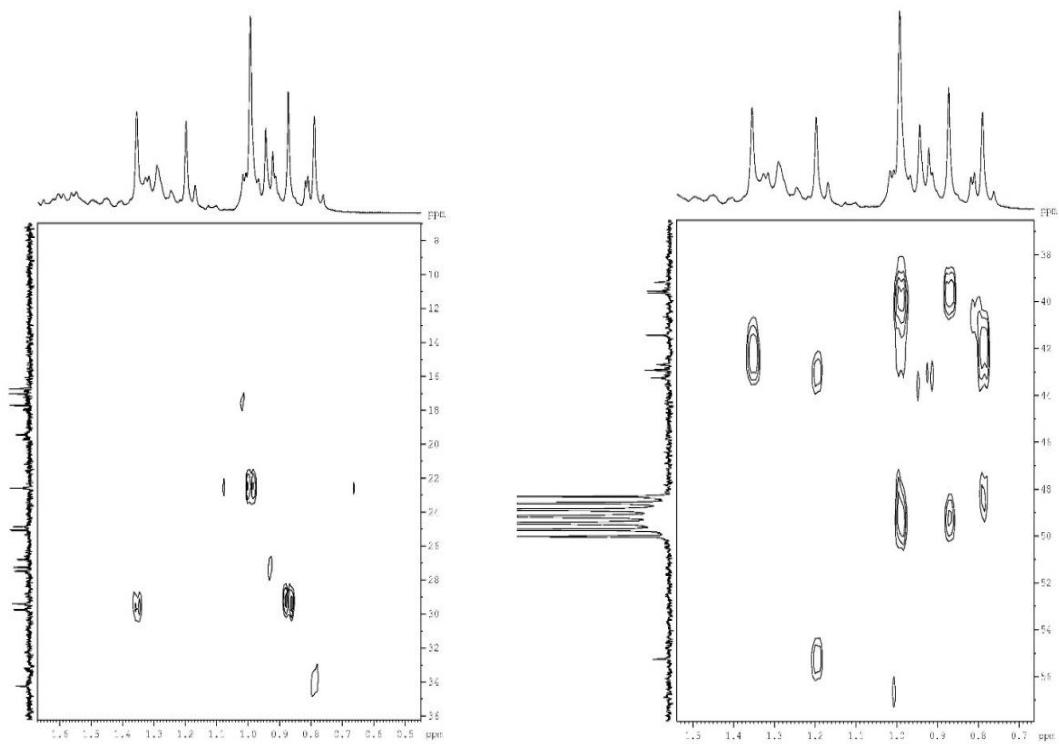


Figura 96 - Mapa de correlação heteronuclear – HMQC (CDCl_3 , 125 MHz) de VGL (IV)

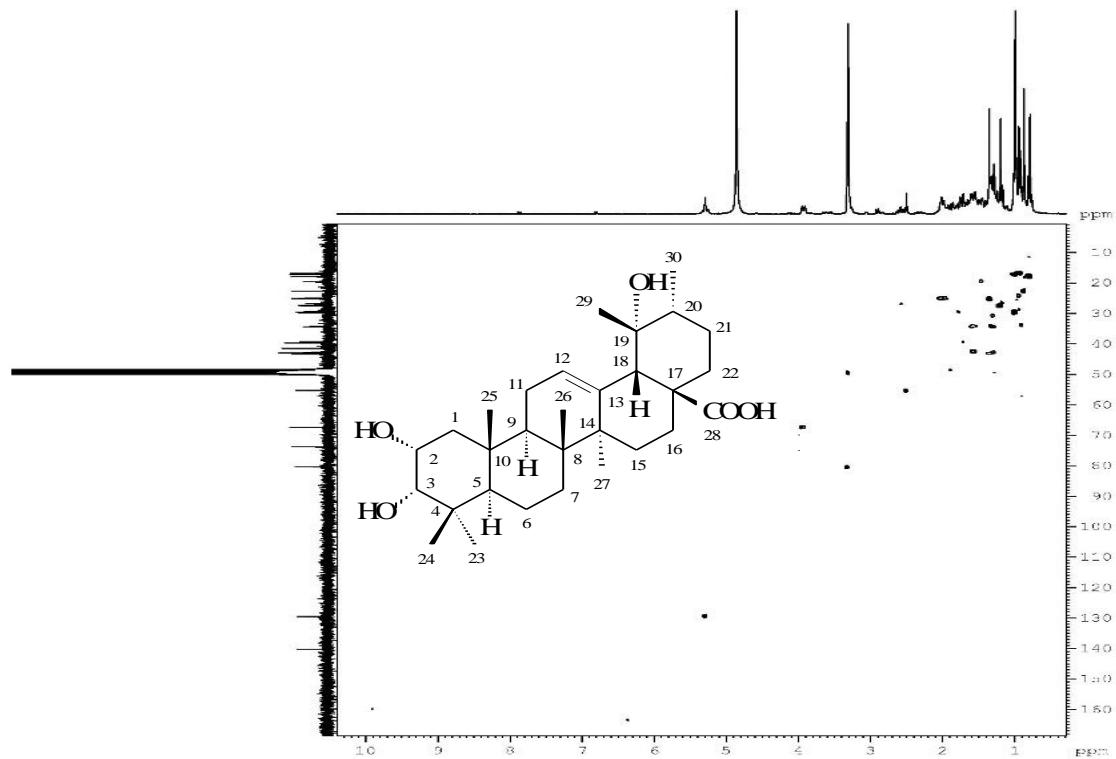
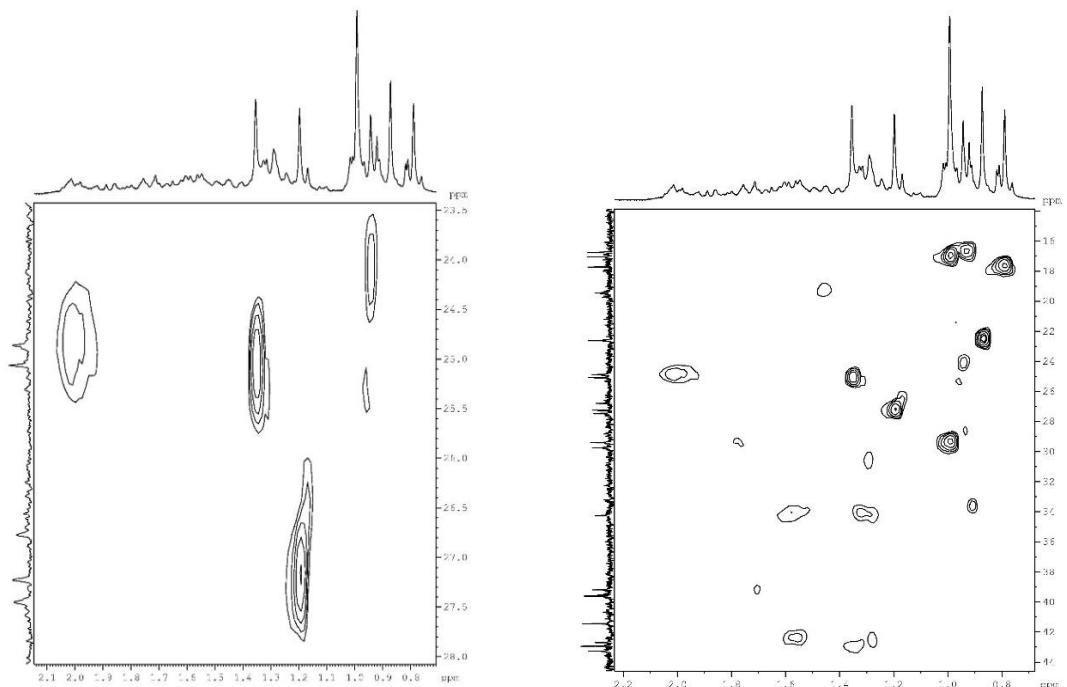


Figura 97 - Mapa de correlação heteronuclear – HMQC expandido (CDCl_3 , 125 MHz) de VGL (IV)



5.6.6 Determinação estrutural do constituinte VGL (V)

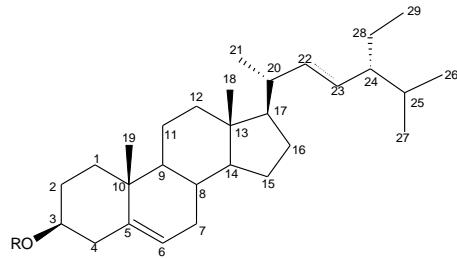
A substância VGL (V) (FIGURA 98), foi comparada com uma amostra padrão em CCD e mostrou-se similar ao 3-O- β -D-glicopiranosilsitosterol. A qual está sendo relatada pela primeira vez na espécie. A confirmação estrutural foi feita por comparação dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono observados no espectro RMN¹³C (FIGURA 100) com valores descritos na literatura (TABELA 18).

Tabela 18 - Dados de RMN¹³C de VGL (V) em piridina-d₅ comparados com valores descritos na literatura

Fonte: Elaborada pelo autor

C	VGR (V)	SILVA, et al., 2006
1	37,30	37,40
2	30,60	30,20
3	78,70	78,40
4	39,70	39,30
5	141,30	140,80
6	122,30	121,90
7	32,40	32,10
8	32,50	32,00
9	50,70	50,30
10	37,30	36,80
11	21,10	21,10
12	40,30	39,90
13	42,80	42,40
14	57,20	56,80
15	24,90	24,50
16	28,90	28,50
17	56,60	56,20
18	12,50	12,10
19	19,60	19,10
20	36,70	36,30
21	19,40	19,00
22	34,50	34,10
23	26,70	26,30
24	46,40	46,00
25	29,80	29,40
26	20,30	19,90
27	19,70	19,40
28	23,70	23,30
1'	103,10	102,50
2'	78,20	78,00
3'	79,00	78,50
4'	71,80	71,60
5'	75,50	75,50
6'	65,40	62,70

Figura 98 – Estrutura do 3-O- β -D-glicopiranossilsitosterol



5.6.6.1 Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN ^1H) e de Carbono -13 (RMN ^{13}C) uni e bidimensionais de VGL (V)

Figura 99 - Espectro de RMN ^1H (piridina-d₅, 500 MHz) de VGL (V)

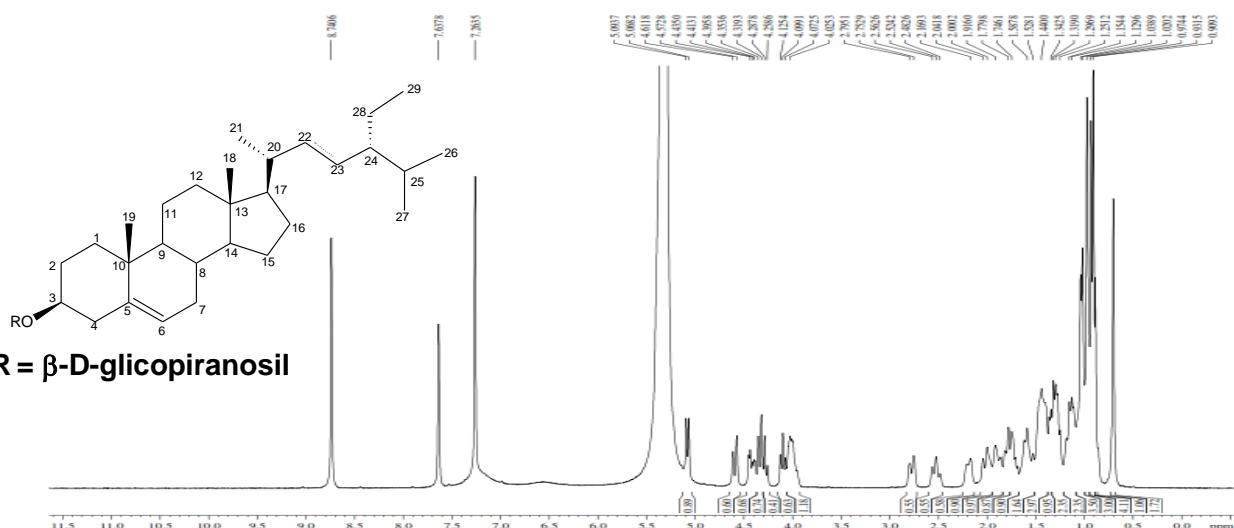
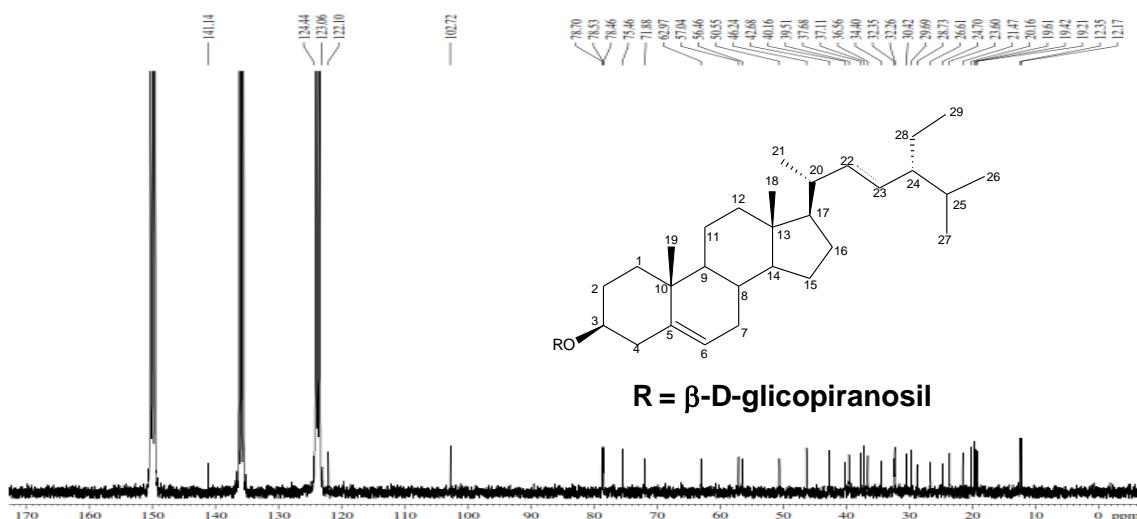


Figura 100 - Espectro de RMN ^{13}C (piridina-d₅, 125 MHz) de VGL (V)



5.7 Estudo da composição fixa das raízes de *V. gardneriana*

5.7.1 Obtenção dos constituintes

Raízes de *V. gardneriana*, (1.273g) foram secas à temperatura ambiente, por aproximadamente 72 h e trituradas. O material foi submetido à extração com etanol a temperatura ambiente. Após este período, o solvente foi evaporado sob pressão, obtendo-se (56,43g) de extrato.

O extrato etanólico das raízes de *V. gardneriana* (56,43g) foi submetido a coluna cromatográfica, utilizando sílica gel. O extrato foi adsorvido em 50g de sílica. Foram utilizados os seguintes solventes puros em ordem crescente de polaridade: hexano, clorofórmio, acetato de etila e metanol, obtendo-se as frações de acordo com a (TABELA 18) a seguir.

Tabela 19 – Solventes e respectivas e massas obtidas no pré-fracionamento do extrato etanólico da raiz de *Vitex gardneriana*

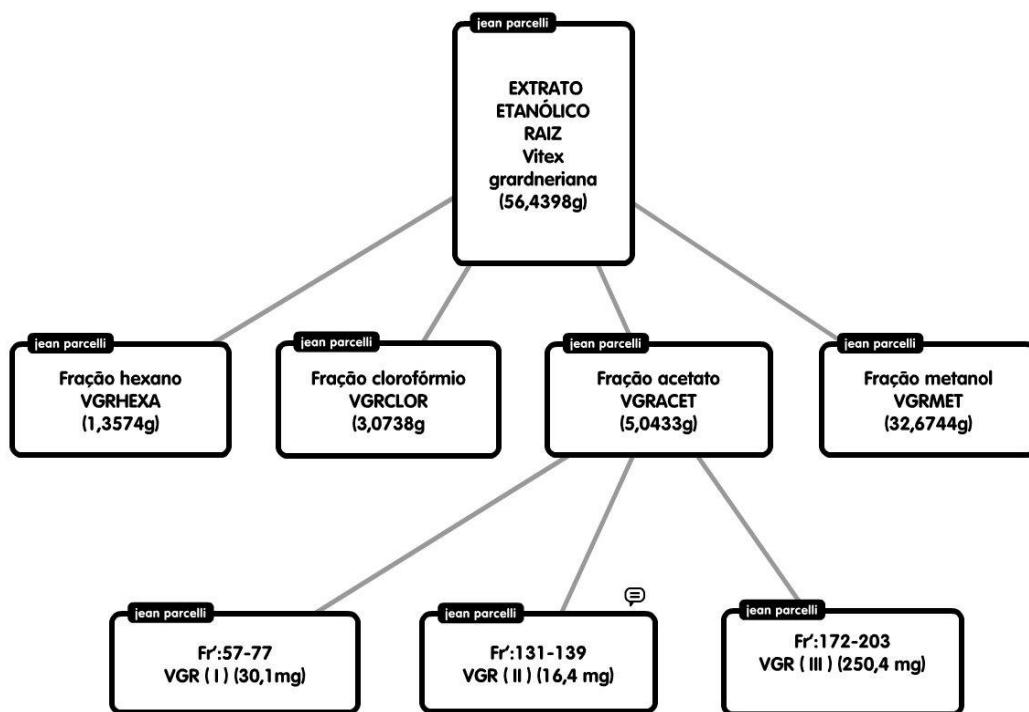
SOLVENTE	MASSA(g)
Hexano	1,35
Clorofórmio	3,07
Clorofórmio	5,04
Metanol	32,67
Massa Total	42,14

Fonte: Elaborada pelo autor.

A fração acetato (5,04g) do extrato etanólico da raiz de *V. gardneriana* (EERVG), foi submetido a fracionamento em coluna cromatográfica. O extrato foi adsorvido em 23,74g de sílica, usando os eluatos em ordem crescente de polaridade a um gradiente de 10 % em volume: hexano (100%), hexano/clorofórmio (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), clorofórmio (100%), clorofórmio/AcoEt (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9), AcoEt (100%), AcoEt/metanol (9:1, 8:2, 7:3, 6:4, 1:1, 4:6, 3:7, 2:8, 1:9) e metanol (100%), obtendo-se 305 frações de acordo com

(FLUXOGRAMA 3) a seguir. As frações (F'57-77), provenientes do eluato clorofórmio/acetato 7:3, obteve-se um precipitado sólido branco denominado VGR (I), (30,1 mg), que após análise dos dados de RMN e comparação com a literatura foi identificado como sendo o Ácido protocatecuico.

Fluxograma 3 – Isolamento de VGR (I), VGR (II) e VGR (III), respectivamente, da raiz de *V. gardneriana*.



Fonte: Elaborado pelo autor.

As frações (F'131-149), proveniente do eluato clorofórmio/acetato 4:6, foram reunidas por similaridade, obtendo-se uma substância denominada VGR (II), (16,7mg), a qual após análise dos dados de RMN e comparação com a literatura foi identificado como sendo o Ácido 3,4-dihidróxido benzoico. As frações 172-203 obtida em clorofórmio/acetato 2:8, forneceu a substância denominada VGR (III), a qual após análise dos dados de RMN e comparação com a literatura foi identificado como sendo o Glicosídeo do β -Sitosterol (250,4mg), (FLUXOGRAMA 3).

5.7.2 Determinação estrutural de VGR (I)

No espectro de RMN ^{13}C -CPD de VGR (I) (FIGURA 103), foram registradas sete linhas espectrais, sendo uma atribuída a carbonila de éster ou de ácido (δ 170,3, C-7) e duas relacionadas a carbonos aromáticos oxigenados (δ 151,6 C-4 e 146,1, C-3). Os carbonos hidrogenados foram identificados através da análise do espectro de RMN ^{13}C -DEPT135 (125 MHz, CD_3OD , (FIGURA 103), no qual foram visualizados apenas três sinais, todos referentes a carbonos aromáticos hidrogenados (δ 124,0 C-2; 117,8 C-6; 115,9 C-5). A absorção em δ 123,2 (C-1), ausente no espectro DEPT135, foi atribuída a carbono aromático não-hidrogenado.

O espectro de RMN ^1H de VGR (I) (FIGURA 102) apresentou um sinal múltiplo em δ_{H} 7,46-7,43, correspondentes a dois hidrogênios, os quais, juntamente com um duplet em δ 6,81 (1H, $J = 8,7$ Hz, H-5), foram associados a um anel benzênico trissubstituído. A fórmula molecular $\text{C}_7\text{H}_6\text{O}_4$, deduzida a partir da análise dos espectros de RMN, sugeriram a estrutura de um derivado do ácido benzóico trissubstituído, o qual foi identificado como sendo o ácido protocatecuico (FIGURA 101) após comparação com dados RMN ^{13}C disponíveis na literatura (POUCHERT, 1993) (TABELA 20), sendo reportado pela primeira vez nesta espécie.

Figura 101 – Estrutura do Ácido Protocatecuico

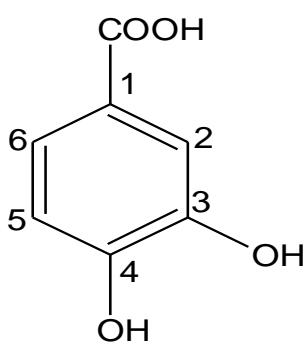


Tabela 20 – Dados de RMN ^1H e ^{13}C de VGR (I) dispostos segundo as correlações obtidas através de espectros HSQC.

	VGR (I)		ácido protocatecuico
	C	δ_{C}	δ_{C}
1		123,2	123,0
2		124,0	123,9
3		146,1	146,0
4		151,6	151,5
5		115,9	115,7
6		117,8	117,7
7		170,3	170,3

Fonte: Elaborada pelo autor

5.7.2.1 Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 e de Carbono -13, uni e bidimensionais de VGR (I)

Figura 102 - Espectro de RMN ^1H (CD_3OD , 500 MHz) de VGR (I)

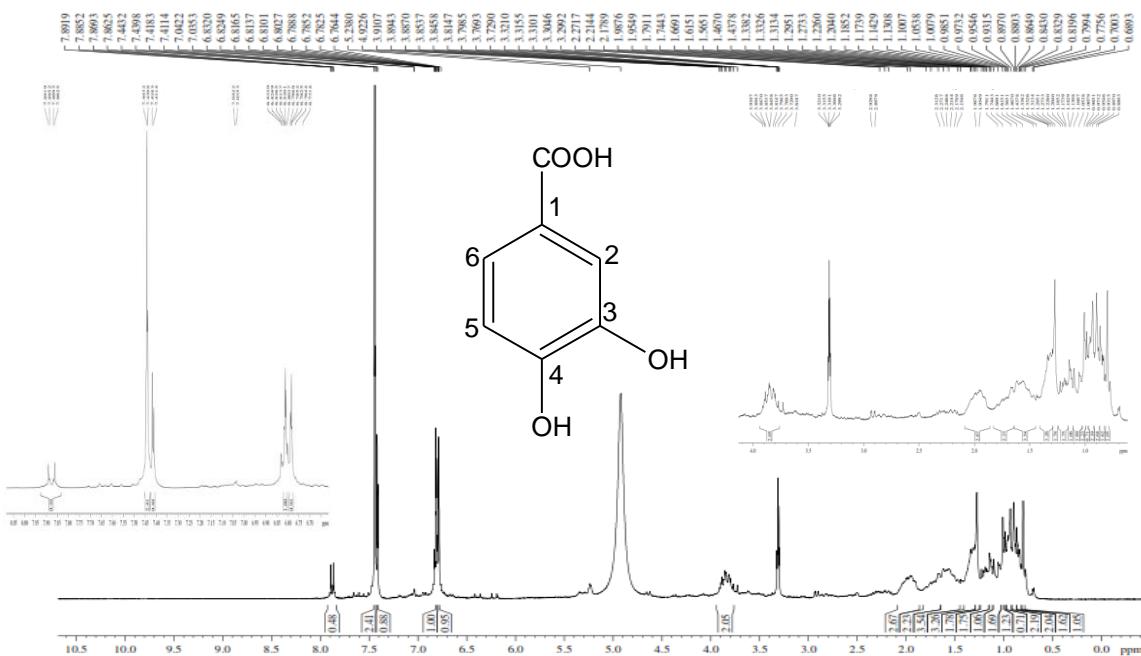
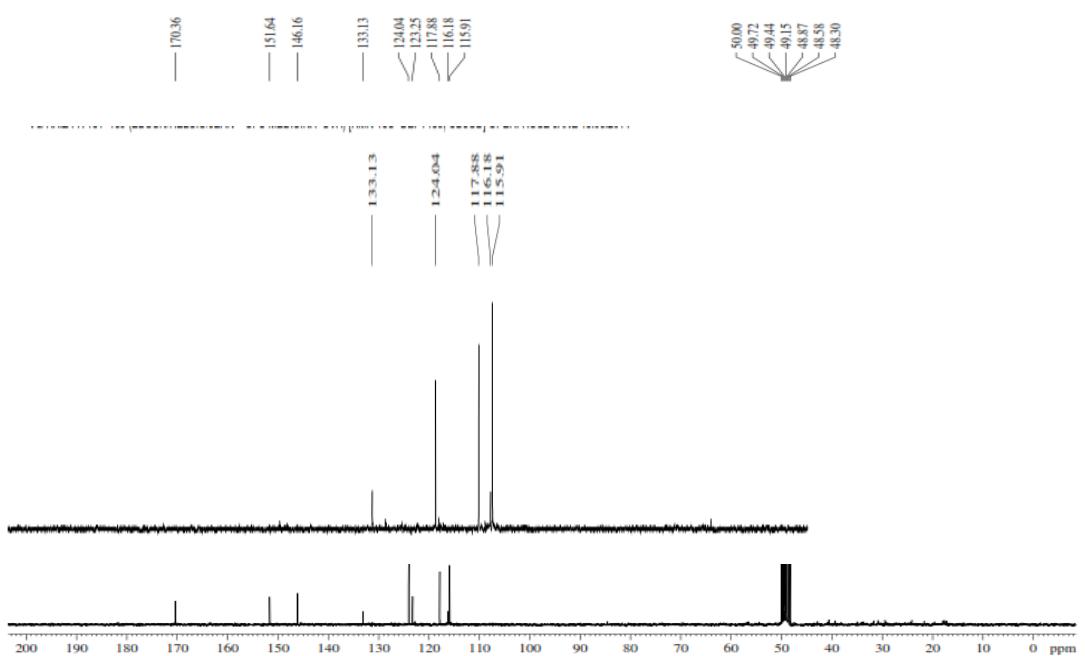


Figura 103 - Espectro de RMN ^{13}C (CD_3OD , 125 MHz) de VGR (I)



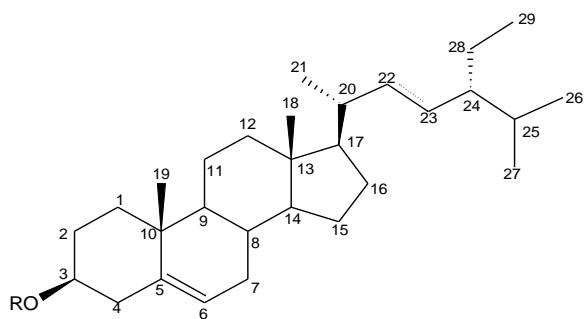
5.7.3 Determinação estrutural de VGR (II) e (III), respectivamente

A análise do espectro de RMN ^1H (FIGURA 107), revelou sinais referentes a hidrogênios carbinólicos em δ_{H} 3,5,3, hidrogênios de uma dupla trissubstituída em δ_{H} 5,28 (m) e dissubstituída em δ_{H} 5,10 (m), além de vários sinais para hidrogênios metílicos em δ_{H} 0,68 (s); 0,70 (s) e 0,79-0,93 (sl).

A análise do espectro de RMN ^{13}C (FIGURA 106) de VGR (II), revelou a presença de sinais cujos valores de deslocamento químico sugerem a presença de um carbono oximetínico em δ_{C} 72,02, uma ligação dupla trisubstituída δ_{C} 121,92 e δ_{C} 140,97 e dissubstituída em δ_{C} 129,50 e 138,52.

A substância VGR (III), foi comparada com uma amostra padrão em CCD e mostrou-se similar ao 3-O- β -D-glicopiranosilsitosterol. A confirmação estrutural foi feita por comparação dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono observados no espectro RMN ^{13}C (FIGURA 108) com valores descritos na literatura (TABELA 18).

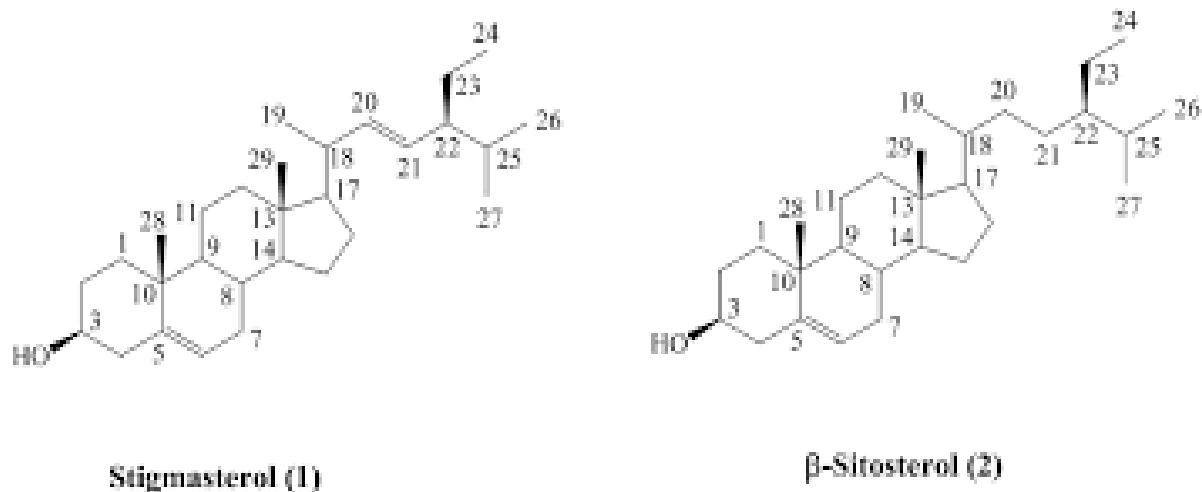
Figura 104 – Estrutura do 3-O- β -D-glicopiranosilsitosterol



$\text{R} = \beta$ -D-glicopiranossil

Estas informações juntamente com a comparação com dados descritos na literatura (TABELA 21) permitiram identificar VGR (III) como sendo a mistura dos esteroides: estigmasterol (1) e β -sitosterol (2), (FIGURA 105). Substâncias largamente distribuídas no reino vegetal,

Figura 105 – Estrutura dos esteroides β -sitosterol e estigmasterol



5.7.3.1 Espectros de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN 1H) e de Carbono -13 (RMN ^{13}C) uni e bidimensionais de VGR (II) e (III)

Figura 106 - Espectro de RMN ^{13}C ($CDCl_3$, 125 MHz) de VGR (II)

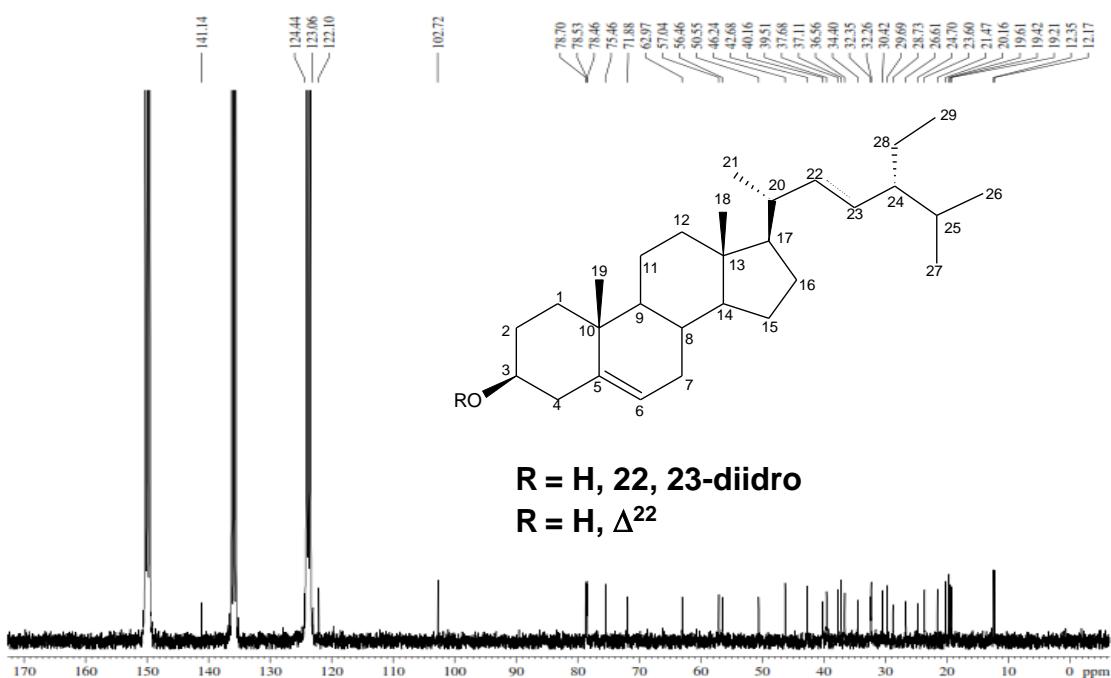


Figura 107 - Espectro de RMN ^1H (CDCl_3 , 500 MHz) de VGR (II)

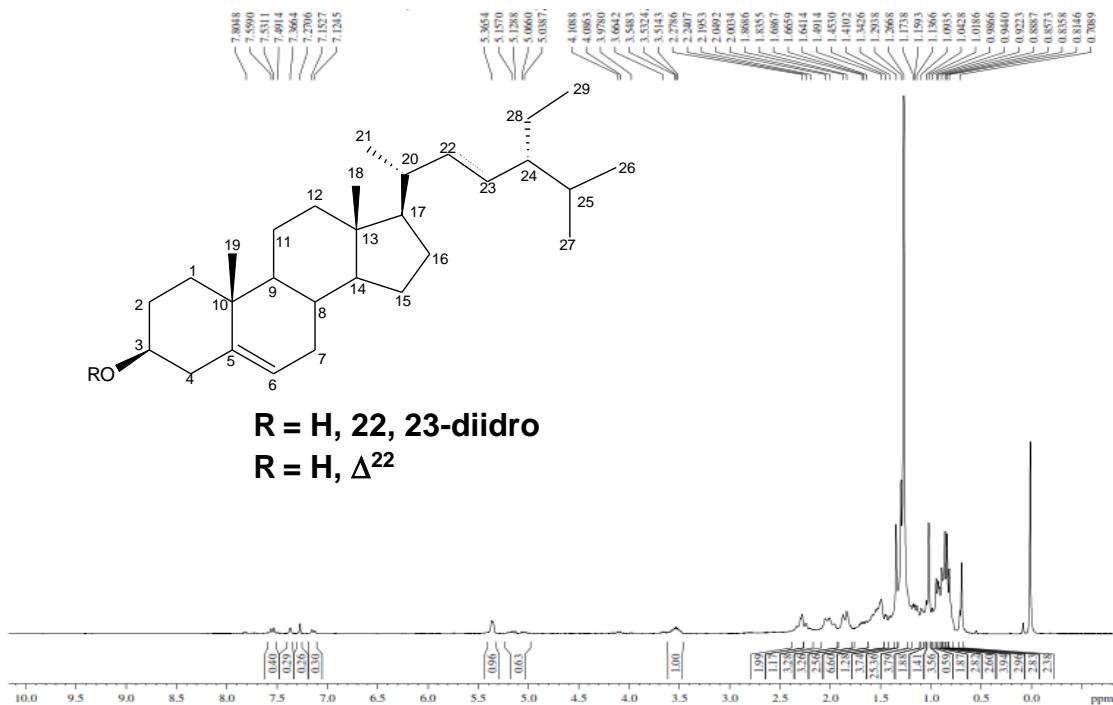


Figura 108 - Espectro de RMN ^{13}C (CDCl_3 , 125 MHz) de VGR (III)

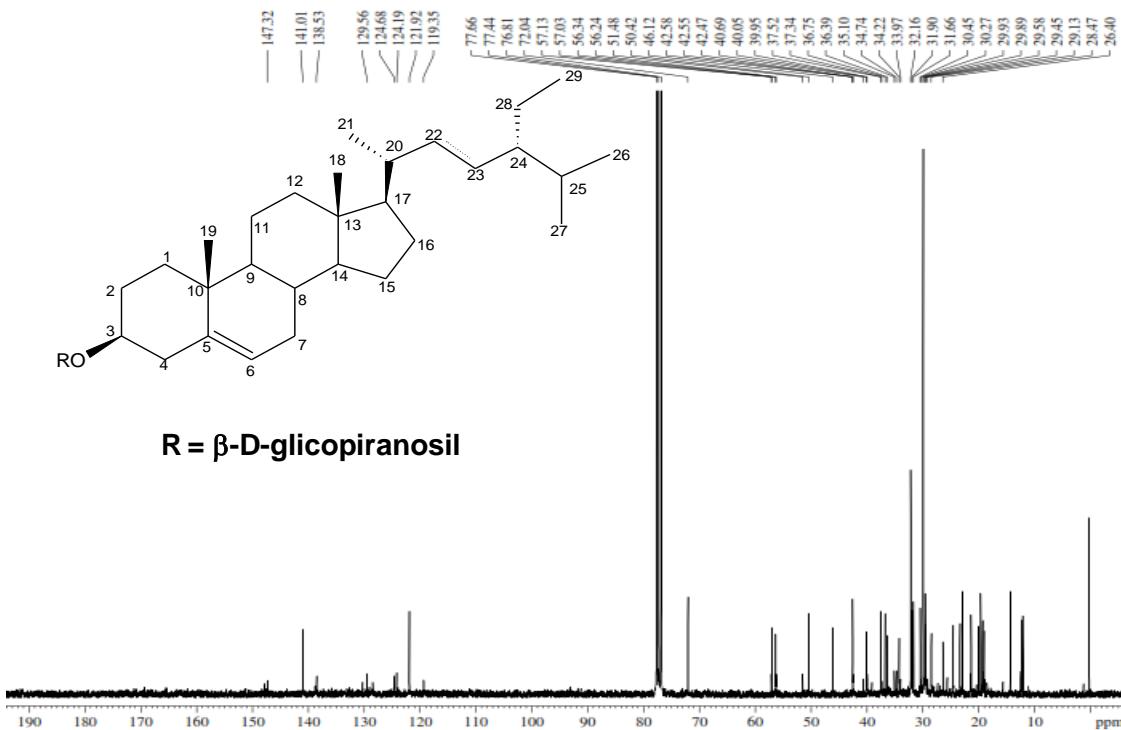


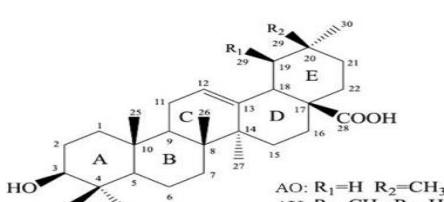
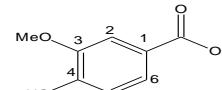
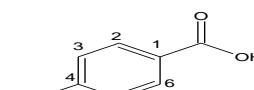
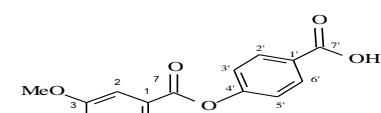
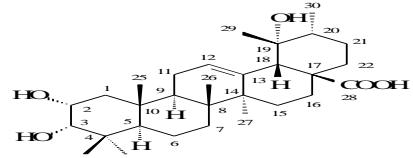
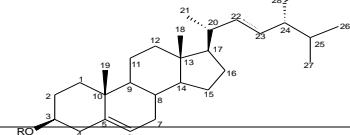
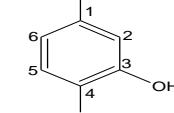
Tabela 21 - Dados de RMN ^{13}C de VGR (I) em piridina-d₅ e VGR (II) em CDCl_3 comparados com valores da literatura.

VGR I		VGR II	Referência*
C	δ_{C}	δ_{C}	δ_{C}
1	37,30	37,47	37,40
2	30,60	31,88	30,20
3	78,70	72,02	78,40
4	39,70	42,54	39,30
5	141,30	140,97	140,80
6	122,30	121,92	121,90
7	32,40	31,88	32,10
8	32,50	31,88	32,00
9	50,70	50,36	50,30
10	37,30	36,72	36,80
11	21,10	21,30	21,10
12	40,30	37,47	39,90
13	42,80	42,52	42,40
14	57,20	56,99	56,80
15	24,90	24,58	24,50
16	28,90	28,46	28,50
17	56,60	56,28	56,20
18	12,50	12,07	12,10
19	19,60	19,61	19,10
20	36,70	36,36	36,30
21	19,40	18,99	19,00
22	34,50	34,17	34,10
23	26,70	26,32	26,30
24	46,40	46,06	46,00
25	29,80	29,12	29,40
26	20,30	19,61	19,90
27	19,70	19,20	19,40
28	23,70	23,29	23,30
29	12,30	12,26	11,90
1'	103,10		102,50
2'	78,20		78,00
3'	79,00		78,50
4'	71,80		71,60
5'	75,50		75,50
6'	65,40		62,70

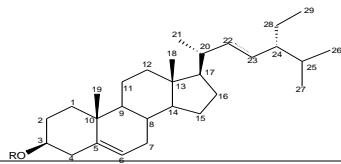
Fonte: Macari, *et al.*, 1990.

Os metabólitos secundários isolados e caracterizados da casca, caule e raiz de *Vitex gardneriana*, com seus nomes e respectivas estruturas químicas, estão relacionados na (TABELA 21).

Tabela 22 – Metabólitos isolados da casca, lenho e raiz de *Vitex gardneriana*

SIGLA	NOME	ESTRUTURA
VGC (I)	Ácido Oleanólico Ácido Ursólico	 <p>Figura 1. Estrutura química de AO e AU</p>
VGL (I)	Ácido Vanílico	
VGL (II)	Ácido p-hidroxi-benzóico	
VGL (III)	Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoato de p-hidroxibenzóico	
VGL (IV)	Ácido 2α,3α,19α-Trihidroxiursan-12-en-28-óico	
(VGL (V))	3-O-β-D-glicopiranosil-sitosterol	
VGR (I)	Ácido Protocatecúico	

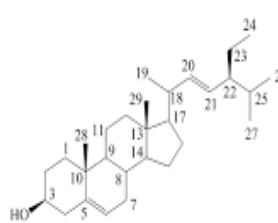
(VGL (V) **3-O- β -D-glicopiranossil-**
sitosterol



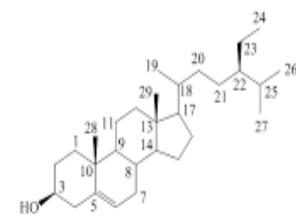
VGR (III)

Mistura

**β -sitosterol e
Stigmasterol**



Stigmasterol (1)



β-Sitosterol (2)

Fonte: O autor

5.8 Atividade antibacteriana de VGL (III), VGL (IV), VGC (I), VGL (I) e VGR (II) respectivamente, compostos fixos isolados de *V. gardneriana*

A atividade antibacteriana de VGL (III), VGL (IV), VGC (I), VGL (I) e VGR (II) respectivamente, isolados de *Vitex gardneriana* foi avaliada utilizando o método da microdiluição (TABELA 16).

Os metabólitos secundários avaliados foram os seguintes:

- Composto 1 – VGL (III) – Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoato de *p*-hidroxibenzóico
- Composto 2 – VGL (IV) - Ácido 2 α ,3 α ,19 α -trihidroxiursan-12-en-28-óico
- Composto 3 – VGC (I) - Mistura do ácido ursólico/oleanólico
- Composto 4 – VGL (I) - Ácido vanílico
- Composto 5 – VGR (II) - 3-O- β -D-glicopiranossilsitosterol

A análise dos resultados dos ensaios da atividade antibacteriana e antibiofilme de 05 (cinco) compostos isolados de *V. gardneriana*, frente às cepas de *S. aureus* ATCC25923 e *P. aeruginosa* ATCC10145 após 24 horas de crescimento na presença de cada um dos metabólitos, mostraram que os mesmos não foram capazes de inibir o crescimento planctônico de ambas espécies de bactérias, o mesmo acontecendo com os biofilmes formados pelas respectivas bactérias.

5.9 Atividade antioxidante de VGL (III), VGL (IV), VGC (I), VGL (I) e VGR (II) respectivamente, compostos fixos isolados de *V. gardneriana*

A atividade antioxidante de VGL (III), VGL (IV), VGC (I), VGL (I) e VGR (II) respectivamente, isolados de *Vitex gardneriana* foi avaliada utilizando os quatro métodos utilizados anteriormente para os óleos essenciais: sequestro do DPPH, FIC, FRAP e BCB.

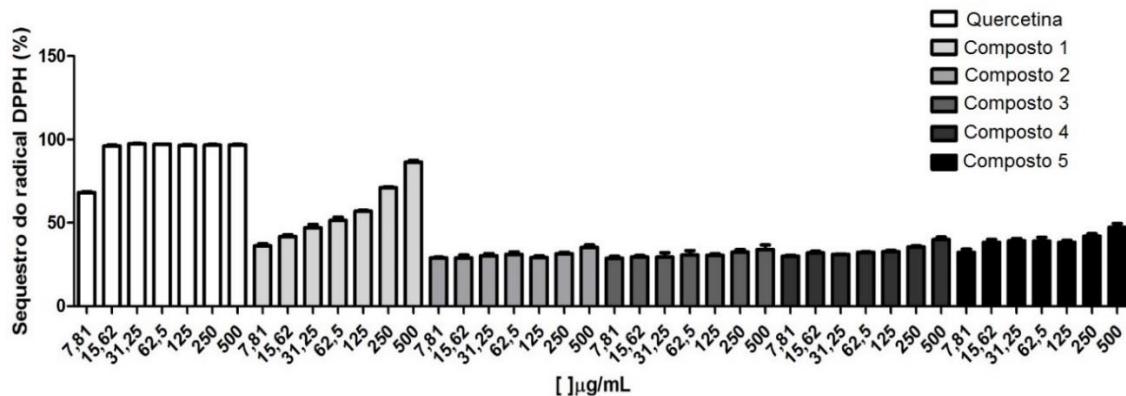
Os metabólitos secundários avaliados foram os seguintes:

- Composto 1 – VGL (III) – Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoato de *p*-hidroxibenzóico
- Composto 2 – VGL (IV) - Ácido 2 α ,3 α ,19 α -trihidroxiursan-12-en-28-óico
- Composto 3 – VGC (I) - Mistura do ácido ursólico/oleanólico
- Composto 4 – VGL (I) - Ácido vanílico
- Composto 5 – VGR (II) - 3-O- β -D-glicopiranosilsitosterol

5.9.1 Ensaio de sequestro do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH)

Os ensaios revelaram que os compostos 2, 3, 4 e 5 possuem capacidades moderadas de capturar o radical 2,2-difenil-picril-hidrazil, em torno de 30 a 50% em relação ao controle positivo (quercetina). Entretanto a mistura de Ácido Vanílico com Ácido Hidroxibenzeno, (composto 1), mostraram uma capacidade sequestrante de 45 a 95%, nas concentrações em $\mu\text{g/mL}$, estudadas de acordo com a (FIGURA 109).

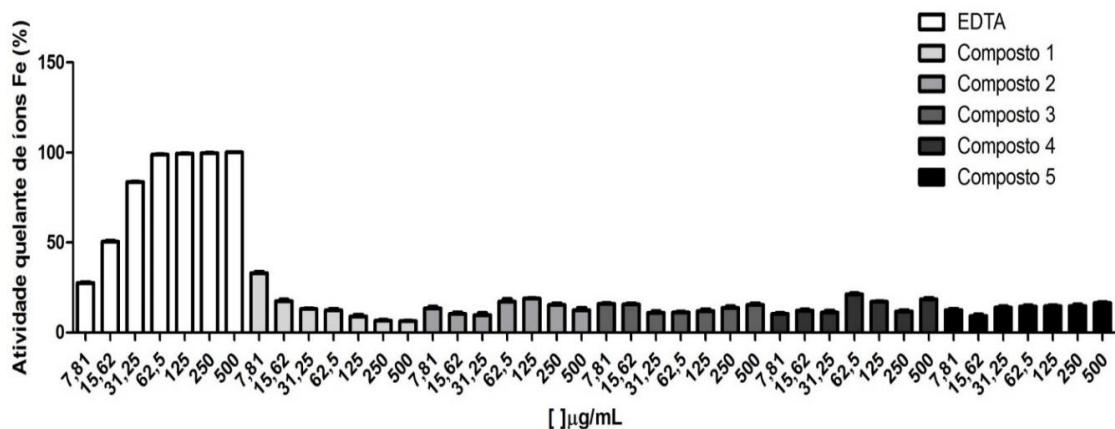
Figura 109 - Atividade antioxidante de VGL (III), VGL (IV), VGC (I), VGL (I) e VGR (II) respectivamente, isolados de *V. Gardneriana* (DPPH)



5.9.2 Ensaio da atividade quelante de íons ferrosos (FIC)

A análise dos resultados de ensaios de atividade antioxidante/quelante de íons ferrosos, mostraram que os 05 compostos isolados de *V. Gardneriana* possuem baixa atividade antioxidante, 5 a 25% em relação ao EDTA (controle positivo). levando em consideração este método nas concentrações de 7.81 a 500 µg/mL (FIGURA 110).

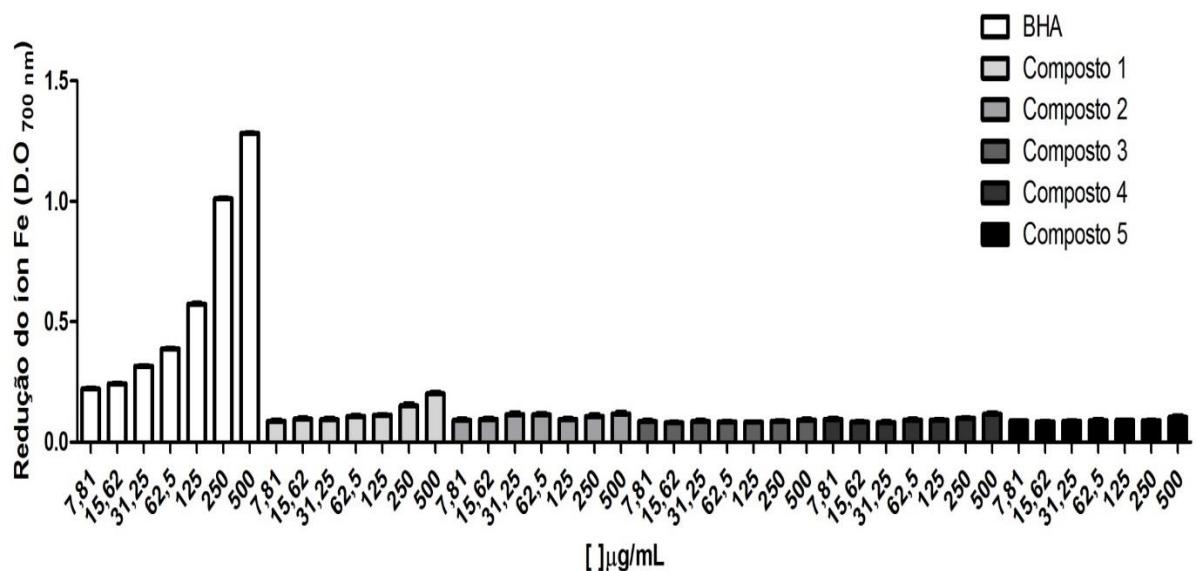
Figura 110 - Atividade antioxidante de VGL (III), VGL (IV), VGC (I), VGL (I) e VGR (II) respectivamente, isolados de *V. gardneriana* (FIC)



5.9.3 Ensaio da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro (FRAP)

Os resultados dos ensaios da atividade antioxidante pelo método de redução do ferro, mostraram baixa atividade antioxidante 10 a 20 % em relação ao controle negativo para todas as concentrações em µg/mL estudadas, como mostra a (FIGURA 111).

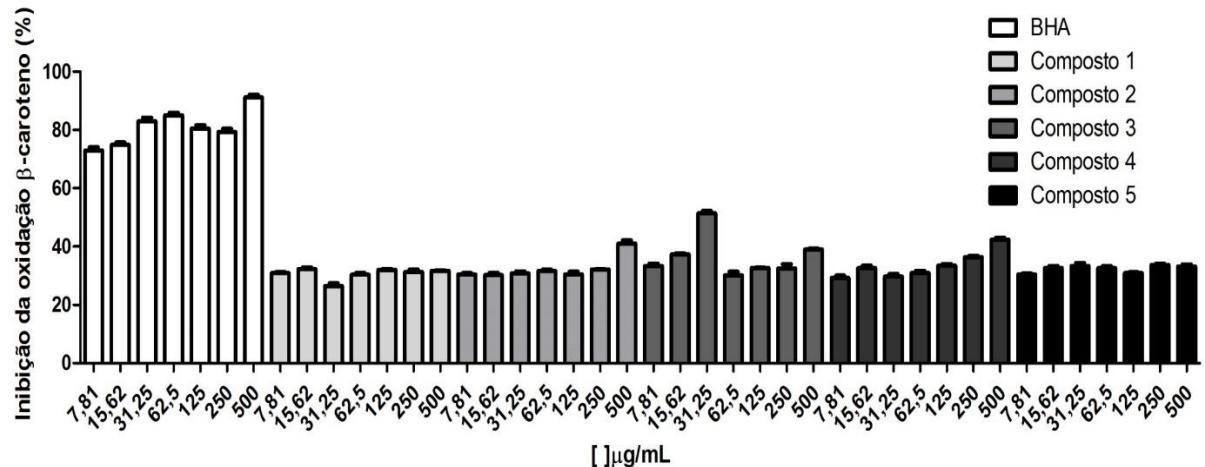
Figura 111 - Atividade antioxidante de VGL (III), VGL (IV), VGC (I), VGL (I) e VGR (II) respectivamente, isolados de *V. gardneriana* (FRAP)



5.9.4 Método de inibição da oxidação do β -caroteno (BCB)

Análise dos resultados dos ensaios da atividade antioxidante por inibição da oxidação do β -caroteno, revelaram que os 5 compostos possuem atividade antioxidante moderada 45 a 50% do controle positivo para as concentrações de 7,81 a 500 $\mu\text{g/mL}$, como mostra a (figura 112).

Figura 112 - Atividade antioxidante de VGL (III), VGL (IV), VGC (I), VGL (I) e VGR (II) respectivamente, isolados de *V. gardneriana* (BCB)



Como mostrados nas figuras 109, 110, 111 e 112 os metabolitos secundários isolados de *V. gardneriana* apresentaram um potencial antioxidante em diferentes ensaios. Com destaque para o composto 1 no teste de sequestro do radical DPPH. Corroborando com esses estudos, recentemente MONTEIRO *et al.* (2015) mostrou que compostos fenólicos presentes nos extratos etanólico e em água de *V. gardneriana* apresentaram uma potencial atividade antioxidante, principalmente no teste de sequestro do DPPH.

De fato, metabólitos secundários de plantas têm mostrado potencial atividade antioxidante, com tal atividade associada a benefícios a saúde do indivíduo e a menor mortalidade causada por doenças crônicas não transmissíveis em seres humanos (HEIM *et al* 2002; BALASUNDRAM *et al* 2006). Entretanto, a atividade antioxidante de tais compostos está intimamente relacionada com sua estrutura química, o que pode explicar o fato do composto 1 ter mostrado uma acentuada atividade antioxidante quando comparado aos demais.

6 CONCLUSÃO

Este estudo resultou na identificação e quantificação de 12 (doze) compostos do óleo essencial de *V. gardneriana*, Cis-Calameneno (28,15%), Isoledeno (13,07%), α-copaeno (9,28%) e E-Cariofileno (6,45%) os constituintes majoritários, com predominância de (66,34 %) de sesquiterpenos. Identificação e quantificação de 21 compostos do óleo essencial de *C. piauiensis*, correspondendo a 87,96%, E-Cariofileno (19,03%), Limoneno (11,74%), Germacreno D (9, 83%), V-Elemeno (8,64%) os constituintes majoritários, com predominância de (42,63%) de sesquiterpenos.

Os ensaios de atividade bactericida e antibiofilme realizados com os óleos essenciais frente às cepas de *S. aureus* ATCC25923 e *P. aeruginosa* ATCC10145, mostraram que o óleo essencial de *C. piauiensis*, possui atividade bacteriostática, bactericida e antibiofilme frente à cepa de *S. aureus* e antibiofilme frente a *P. aeruginosa*. Entretanto, o óleo essencial de *V. gardneriana*, apresentou atividade bacteriostática e antibiofilme frente à cepa de *S. aureus* e antibiofilme frente a *P. aeruginosa*.

Ambos os óleos apresentaram atividade antioxidante significativa quando avaliados pelo Método de Inibição da Oxidação do β-caroteno (BCB), diante dos quatro métodos utilizados.

Foram isolados e quantificados de *V. gardneriana*, nove constituintes fixos de diferentes partes da planta: da casca VGC (I), mistura de Ácido Ursólico e Ácido Oleanólico; do lenho, VGL (I) Ácido vanílico; VGL (II) Ácido *p*-hidróxi-benzóico, VGL (III) Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoato de *p*-hidroxibenzóico, VGL (IV) Ácido 2 α ,3 α ,19 α -trihidroxiursan-12-en-28-óico e o VGL (V) 3-O-β-D-glicopiranosilsitosterol. Da raiz, VGR (I) Ácido protocatecuico; VGR (II) 3-O-β-D-glicopiranosilsitosterol e o VGR (III) uma mistura de β-sitosterol e estigmasterol.

Ressalta-se que todos estes metabólitos secundários são inéditos para esta espécie, e que os compostos VGL (III) Ácido 4-hidroxi-3-metoxibenzoato de *p*-hidroxibenzóico e o VGL (IV) Ácido 2 α ,3 α ,19 α -trihidroxiursan-12-en-28-óico são inéditos na literatura.

Ensaios de atividade bactericida foram realizados com cinco metabólitos isolados frente às cepas de *S. aureus* ATCC25923 e *P. aeruginosa* ATCC10145.

Os mesmos, não apresentaram, atividade bacteriostática, bactericida ou antibiofilme frente às cepas de *S. aureus* e *P. aeruginosa*. Entretanto, apresentaram atividade antioxidante significativa quando avaliados pelo Método de Sequestro do Radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH) e pelo Método de Inibição da Oxidação do β-caroteno (BCB), diante dos quatro métodos utilizados.

Além disso, diante dos resultados apresentados e de acordo com o reportado na literatura, podemos afirmar que os óleos essenciais de *V. gardneriana* e do *Croton piauhiensis*, apresentam-se como uma promissora fonte de compostos contra agentes infecciosos, além de apresentar ação antioxidante passível de ser utilizada contra o estresse oxidativo, possuindo potencial para se tornar no futuro um insumo Biotecnológico.

REFERÊNCIAS

ABEE, T.; KOVÁCS, A. T.; KUIPERS, O. P.; VAN DER VEEN, S. Biofilm formation and dispersal in Gram-positive bacteria. **Curr. Opin. Biotechnol.** v. 22, p. 1-8, 2010.

ADAMS, R. P. **Identification of Essential Oil Components by Gas Chromatography/Mass Spectrometry**. 4. ed. Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 800 p. 2007.

ALIMPÍC, A.; PLJEVLJAKUSÍC, D.; SAVIKIN, K.; KNEZEVÍC, A.; CURCÍC, M.; Velickovíc, D.; STEVÍC, T.; PETROVÍC, G.; MATEVSKIF, V.; VUKOJEVÍCA, J.; MARKOVÍCC, S.; MARINA, P. D.; DULETÍC-LAUVSEVÍC, S. Composition and biological effects of *Salvia ringens* (Lamiaceae) essential oil and extracts. **Industrial Crops and Products**. n. 76, p. 702–709, 2015.

ALMEIDA, M. C. S., ALVES, L. A., SOUZA, L. G. S., MACHADO, L. L., MATOS, M. C., OLIVEIRA, M. C. F., LEMOS, T. L. G., BRAZ-FILHO. Flavonoids and other substances from *Lippia sidoides* and their antioxidant activities. **Química Nova**, 33, 1877-1881, 2010

ALVIANO, W. S.; MENDONCA-FILH, O R. R.; ALVIANO, D. S., BIZZO, H. R.; SOUTO-PADRON, T.; RODRIGUES, M. L.; A.M.; BOLOGNESE, C. S.; ALVIANO, SOUZA, M. M. Antimicrobial activity of *croton cajucara* benth linalool-rich essential oil on artificial biofilms and planktonic microorganisms. **Oral Microbiol. Immunol**, n. 20, 101–10. 2005.

AMORATI, R.; FOT, M. C.; VALGIMIGLI, L. **Antioxidant Acitivity of Essential Oils: a critical Review**. **Journal of Agricultural end Chemistry**. N. 61, v. 46, 2013.

ANDRADE, M. A.; CARDOSO, M. G.; BATISTA, L. R.; MALLET, A. C.; MACHADO, S. M. F. Óleos essenciais de *Cymbopogon nardus*, *Cinnamomum zeylanicum* e *Zingiber officinale*: composição, atividades antioxidante e antibacteriana. **Revista Ciência Agronômica**, v. 43, n. 2, p. 399-408, abr-jun., 2012.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plant and agri-industrial byproducts: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chem**, 99, 191-203, 2006.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quím. Nova**, v. 29, n. 1, 113-123, 2006.

BARROS, F. M. C. **Variabilidade sazonal, atividade antimicrobiana, fracionamento bioguiado, isolamento e elucidação estrutural dos principais constituintes do óleo essencial de *Lippia Alba* (MILL.)** N. E. Brown. 2008. 162p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, RS, 2008.

BATONI, G.; MAISETTA, G. A.; BRANCATISANO, F. L.; ESIN, S. ; CAMPA, M. **Use of Antimicrobial Peptides Against Microbial Biofilms: Advantages and Limits.** **Curr Med Chem.** v. 18, p. 256-279, 2011.

BENBELAÏD, F.; KHADIR, A.; ABDOUNE, M. A.; BENDAHOU, M.; MUSELLI, A.; COSTA, J. Antimicrobial activity of some essential oils against oral multidrug-resistant *Enterococcus faecalis* in both planktonic and biofilm state. **Asian. Pac. J. Trop. Biomed.** Jun. v. 4, n. 6, p. 463–472, 2014.

BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Ver. Nutr.**, v. 12, p.123-130, Campinas, 1999.

BJARNSHOLT, T.; JENSEN, P. O.; FIANDACA, M. J.; PEDERSEN, J.; HANSEN, C. R.; ANDERSEN, C. B.; PRESSLER, T.; GIVSKOV, M.; HOIBY, N. *Pseudomonas aeruginosa biofilms in the respiratory tract of cystic fibrosis patients.* **Pediatr. Pulm.**, v. 44, p. 547-558, mar. 2009.

BJARNSHOLT, T.; KIRKETERP-MOLLER, K.; JENSEN, P. O.; MADSEN, K. G.; PHIPPS, R.; KROGFELT, K.; HØIBY, N.; GIVSKOV, M. Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. **Wound Repair Regen.**, v.16, p. 2–10, mai. 2008.

BJARNSHOLT, T.; TOLKER-NIELSEN, T.; GIVSKOV, M.; JANSSEN, M.; CHRSITENSEN, L. H. Detection of bacteria by FISH in culture-negative soft tissue filler lesions. **Dermatol. Surg.**, v. 35, p. 1620–1624, out., 2009.

BUDZYNSKA, A., WIECKOWSKA-SZAKIEL, M., SADOWSKA, B., KALEMBA, D., E RÓZALSKA, B. Antibiofilm activity of selected plant essential oils and their major components. **Polish Journal of Microbiology.** v. 60, p. 35–41, 2011.

BURT, S. **Essential oils: their antimicrobial properties and potential applications in foods:** a review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253, 2004.

CARNEIRO, V.A., SANTOS, H. S., ARRUDA, F. V. S., BANDEIRA, P. N., ALBUQUERQUE, M. R. J. R., PEREIRA, M. O., HENRIQUES, M., CAVADA, B. S., TEIXEIRA, E. H. Casbane Diterpene as a Promising Natural Antimicrobial Agent against Biofilm-Associated Infections. **Molecul.** v. 16, p. 190-201, 2011.

CAVALCANTE, G. M. et al. Atividade antimicrobiana de Artocarpus heterophyllus Lam. (Moraceae) sobre o desenvolvimento de Streptococcus pneumoniae e Escherichia coli. **Scientia Plena.** v. 9, n. 2, 2013.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G. de; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Quím. Nova**, v. 30, p.441-449, 2007.

CHAFTAR, N.; GIRARDOT, M.; QUELLARD, N.; LABANOWVISK, J.; GHRAIRI, T.; HANI, K.; FRÀRE, J.; IMBERT, C. Comparative evaluation of the antimicrobial activity of 19 essential oils. **Chemistry & Biodiversity.** v. 12, 2015.

CHEW, Y. L.; LIM, Y. Y.; OMAR, M.; KHOO, K. S. Antioxidant activity of three edible sea weeds from two areas in South East Asia. **LWT-Food Science and Technology.** v. 41 (6), 1067-1072.2008.

CONN, E.E.; STUMPF, P. K. **Introdução à bioquímica.** Ed. Eddgar Blücher Ltda. 5^a reimpressão, São Paulo, 1990.

COSTA, C.; HENRIQUES, A.; PIRES, C.; NUNES, J.; OHNO, M.; CHIBANA, H; SÁ-CORREIA, I.; TEIXEIRA, M. C. The dual role of candida glabrata drug:H⁺ antiporter CgAqr1 (ORF CAGL0J09944g) in antifungal drug and acetic acid resistance. **Front Microbiol.** v. 4, n. 170, 2013.

CRAGG, G. M; NEWMAN, D. J. Natural products: A continuing source of novel drug leads. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1830, p. 3670-3695, 2013.

CUI, H.; ZHANG, X.; ZHOU, H.; ZHAO, C.; LIN, L. Antimicrobial activity and mechanisms of Salvia sclarea essential oil. **Botanical Studies.** v. 56, n.16, 2015.

DAVEY, M. E., O'TOOLE, G. A. Biofilmes microbianos: Da ecologia à genética molecular. **Microbiology and Molecular Biology Reviews.** v. 64,n. 4, p. 847-867, 2000.

DEY, A.; NATH DE, J. Traditional use of medicinal plants as febrifuge by the tribals of Purulia district, West Bengal, India. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease.** p. 800-803, 2012.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clin. Microbiol. Rev.**, v. 15, p. 167–193, mar., 2002.

DRENKARD, E. Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. **Microbes Infect.** Nov. v. 5, n.3, p.1213-9. 2003.

DUAN, X. J.; ZHANG,W. W.; LI, X. M.; WANG, B.G.; Evaluation of antioxidant property of extract and fractions obtained from red alga, *Polysiphonia urceolata*. **Food Chem.** 95:37-43, 2006.

FRAÇA, F. Lectotypification of Brazilian species of *Vitex* Tour. ex L. (Lamiaceae). Bol. Mus. Para. Emílio Goeldi. **Cienc. Nat.** v. 5, n. 3, p. 357-359, 2010.

FERREIRA, V. F., PINTO, A. C. A fitoterapia no mundo atual. **Quím. Nova.** v. 33, n.9, p. 1829-1829, 2010.

FERNANDA *et al.* Utilização de plantas do bioma caatinga no controle de patógenos de interesse na área de alimentos – uma revisão. **Acta Veterinaria Brasilica.** v.7, p.125-136, 2013.

FONTENELLE, R.O.S.; MORAIS, S.M.; BRITO, E.H.S.; BRILHANTE, R.S.N.; CORDEIRO, R.A.; NASCIMENTO, N.R.F.; KERNTOPF, M.R.; SIDRIM, J.J.C. ROCHA, M.F.G. Antifungal activity of essential oils of Croton species from the Brazilian Caatinga biome. **Journal of Applied Microbiology.** v. 104, p. 1383-1390, 2008.

GALLETTI, G.C.; RUSSO, M.T. Essential oil composition of leaves and berries of Vitex agnuscastus L. from Calabria, Southern Italy. **Mass Spectrometry.** v. 10, p. 1345-1350. 1996.

GANESAN, P.; KUMAR, C. S.; Khaskar, N. Antioxidant properties of metanol extract and its solvent fractions obtained from selected Indian red seaweeds. **Bioresource Technology.** v. 99, n. 8, 2717-2723. 2008.

GRASSMANN, J. Terpenoids as plant antioxidants. **Vitamins and Hormones.** V. 72, p. 505-535. 2005.

HANCOCK,V., WITSØ, I. L. KLEMM, P. Biofilm formation as a function of adhesin, growth medium, substratum and strain type. **International Journal of Medical Microbiology.** v. 301, n.7, p. 570-576, 2011.

HANCOCK, R. E. W. The end of an era. Nat. **Rev. Drug Discov.**, v. 6, p. 489–497, jun. 2007.

HEIM, K. E.; TAGLIAFERRO, A. R.; BOBILYA, D. J. Flavonoid antioxidants: chemistry, metabolism and structure-activity relationships. **J. Nutr Biochem,** v. 13, 527-584, 2002.

HERNÁNDEZ, M.M., HERASO, C., VILLARREAL, M.L., ARISPURO, I.V., ARANDA, E. **Biological activities of crude plant extracts from Vitex trifolia L.** (Verbenaceae). 1999.

HØIBY, N.; CIOFU, O.; BJARNSHOLT, T. *Pseudomonas aeruginosa* biofilms in cystic fibrosis. **Future Microbiol.**, v. 5, p. 1663-1674, Nov. 2010.

HOLANDA, M.L.; MELO, V.M.; SILVA, L.M.; AMORIM, R.C.; PEREIRA, M.G. and BENEVIDES, N.M. Differential activity of a lectin from Solieria filiformis against human pathogenic bacteria. **Braz J Med Biol Res.** v. 38, 1769-73, 2005.

HOMOE, P.; BJARNSHOLT, T.; WESSMAN, M.; SORENSEN, H. C.; JOHANSEN, H. K. Morphological evidence of biofilm formation in Greenlanders with chronic suppurative otitis media. **Eur. Arch. Oto-rhino-l.**, v. 266, p. 1533–1538, mar. 2009.

JAMES, G. A.; SWOGGER, E.; WOLCOTT, R.; PULCINI, E. D.; SECOR, P.; SESTRICH, J.; COSTERTON, J. W.; STEWART, P. S. Biofilms in chronic wounds. **Wound Repair Regen.**, v. 16, p. 37–44, abr. 2008.

KAVANAUGH, N. L.; RIBBECK K. Selected antimicrobial essential oils eradicate *Pseudomonas* spp. and *Staphylococcus aureus* biofilms. **Appl Environ Microbiol.** Jun. v. 78, n.11, p. 4057-61. 2012.

KUMARASAMY, K. K. ; TOLEMAN, M. A.; WALSH, T. R.; BAGARIA, J.; BUTT, F.; BALAKRISHNAN, R.; CHAUDHARY, U.; DOUMITH, M.; GISKE, C. G.; IRFAN, C.; KRISHNAN, P.; KUMAR, A. V.; MAHARJAN, S.; MUSHTAQ, S.; NOORIE, T.; PATERSON, D. L.; PEARSON, A.; PERRY, C.; PIKE, R.; RAO, B.; RAY, U.; SARMA, J. B.; SHARMA, M.; SHERIDAN, E.; THIRUNARAYAN, M. A.; TURTON,

J.; UPADHYAY, S.; WARNER, M.; WELFARE, W.; LIVERMORE, D. M.; WOODFORD, N. Emergence of a new antibiotic resistance mechanism in India, Pakistan, and the UK: a molecular, biological, and epidemiological study. **Lancet Infect Dis.**, v. 10, p. 597-602, 2010.

KUZMA, L.; RÓZALSKI, M; WALENCKA, E.; RÓZALSKA, B.; WYSOKINSKA, H. Antimicrobial activity of diterpenoids from hairy roots of *Salvia sclarea* L.: Salyipisone as potential anti-biofilm agent active against antibiotic resistant *Staphylococci*. **Phytomedicine**. v. 14, p. 31-5, 2007.

LEE, L. Y.; SHIM, J. S.; RUKAYADI, Y.; HWANG, J. K. Antibacterial Activity of Xanthorrhizol Isolated from *Curcuma xanthorrhiza Roxb.* against Foodborne Pathogens. **J. Food Prot.**, v. 71, p. 1926-1930, out., 2008.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: Bases Científicas e Tecnológicas**/João Paulo Viana Leite (editor-- São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

LEWIS, K. Riddle of biofilm resistance. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 45, n. 4, p. 999-1007, abr., 2001.

MACARI, P. T. A.; EMERENCIANO, V. P.; FERREIRA, Z. M. G. S. Identificação dos triterpenos de *Miconia albicans Triana* através de análise por microcomputador. **Quim. Nova**, v. 13, n. 4, p. 260-262, 1990.

MAHATO, S. B.; KUNDU, A. P.; **Phytochemistry**. V. 37, 1517. 1994

MAIA, A. C. C. M. et al. *Vitex agnus castus L.*: Um estudo etnobotânico e etnofarmacológico, Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA. 2001. Disponível em: . Acesso em: 28 dez. 2010.

MECCIA, G. L. B.; ROJAS, C.; ROSQUETE. C.; SAN FELICIANO, A. Essential oil of *Croton ovalifolius Vahl* from Venezuela. **Flavour Fragr. J.** v. 15 p.144–146. 2000.

MILLEZI, F. M.; PEREIRA, M. O.; BATISTA, N. N.; CAMARGOS, N.; AUAD, I.; CARDOSO, M. D. G.; PICCOLI, R. H. Susceptibility of monospecies and dual-species biofilms of *staphylococcus aureus* and *escherichia coli* to essential oils. **Journal of Food Safety.** v. 32, n. 3, p. 351–359, 2013.

MONTEIRO, A. T.; BALDIVIA, D. S.; NASCIMENTO, D. A. S.; SANTOS, E. L. SOUZA, K. P. Atividade antioxidante da polpa de *Acrocomia aculeata*: farinha e polpa in natura. **Anais 17º WORKSHOP DE PLANTAS MEDICINAIS DO MATO GROSSO DO SUL.** Dourados. 10 a 12 de junho 2015. Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Dourados MS. 2015. " Disponível em": wsplantasmedicinais.com.br. Acesso em 12 nov. 2015.

MORAIS, S. M.; JÚNIOR, F. E. A. C.; SILVA, A. R. A.; NETO, J. S. M.; RONDINA, D.; LEAL-CARDOSO, J.H. Antioxidant activity of essential oils from Northeastern Brazilian *Croton* species. **Quim. Nova**, v. 29, p. 907-910, 2006.

NADOSHAN, M. S.; OWLIA, P.; NAJAFABADI, L. M.; RASOOLI, I.; SADERI, H.; SALARI, M. H. Effects of Sub-inhibitory Concentrations of Essential oils of *Mentha spicata and cumminum cyminum* Virulence Factors of *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Medicinal Plants.** v. 9, n. 6, 2009.

NITHYANAND, P.; PANDIAN, S. K.; THENMOZHI, R.; RATHNA, J. Antibiofilm activity of coral-associated bacteria against different clinical M serotypes of *Streptococcus pyogenes*. **FEMS Immunology & Medical Microbiology.**, Vol. 57 p. 284-294. 2009.

NOSTRO, A.; SUDANO, R. A.; BISIGNANO, G.; MARINO, A.; CANNATELLI, M. A.; PIZZIMENTI, F. C. **Effects of oregano, carvacrol and thymol on *Staphylococcus aureus* and *Staphylococcus epidermidis* biofilms.** *J. Med. Microbiol.*, v. 56, p. 519–523. 2007.

POUCHERT. **Phytochemistry**, v. 34, n. 5, p. 1201-1452. 1993.

OLIVEIRA, M.T.A.; TEIXEIRA, A.M.R.; COUTINHO, H.D.M.; MENEZES, I.R.A.; SENA JR, D.M.; SANTOS H.S.; MESQUITA, B.M.; ALBUQUERQUE, M.R.J.R.; BANDEIRA, P.N; BRAZ-FOLHO, R. Identification and Modulatory Activity Assessment of 2-hydroxy-3,4,6-trimethoxyacetophenone isolated from *Croton anisodontus* Mull. Arg (Euphorbiaceae). **Nat. Prod. Commun.**, v. 9, p. 665-668, 2014.

ONURDAĞ F. K., OZKAN, S., OZGEN, S., OLMUŞ, H., ABBASOĞLU, U. *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* adhesion on soft contact lenses. **Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol**, 2010.

PRINS, C. L.; LEMOS, C. S. L.; FREITAS, S. P. Efeito do tempo de extração sobre a composição e o rendimento do óleo essencial de alecrim (*Rosmarinus officinalis*). **PI. Med.**, v. 8, p. 92-95, Botucatu, 2006.

POUCHERT, C. J.; BEHNKE, J.; **The Aldrich Library of ^{13}C , ^1H FT NMR spectra**, 1st ed., Milwaukee: Aldrich Chemical Company, v. 2, 1993.

RANI, A.; SHARMA, A. The genus *Vitex*: A review. **Pharmacogn Rev.**, v. 7, p. 188-198, 2013.

RICKARD, A. H., GILBERT, P., HIGH, N. J., KOLENBRANDER, P. E., HANDLEY, P. S. Bacterial coaggregation: na integral process in the development of multi-species biofilms. **Trends Microbiol.**, v. 11p. 94 – 100, 2003.

RADULOVIC, N.; MANANJARASOA, E.; HARINANTAINA, L.; YOSHINORI, A. Essential oil composition of four Croton species from Madagascar and their chemotaxonomy. **Biochemical Systematics end Ecology**. v. 34, pp. 648-653. 2006.

SÁ BARRETO, L.C.L.; CUNHA-FILHO, M.S.S; SOUZA, I.A.; XAVIER, H.S. Avaliação preliminar da atividade biológica e toxicidade aguda de *Vitex gardneriana Schauer* (Verbenaceae). **Lat. Am. J. Pharm.**, v. 27, p. 909-913, 2008.

SÁ BARRETO, L.C.L.; XAVIER, H.S.; BARBOSA-FILHO, J.M.; BRAZ-FILHO, R. Ecdisteróide e iridóide glicosilado de *Vitex gardneriana Schauer* (Verbenaceae). **Rev. bras. Farmacogn.**, vol.15, p. 51-54, 2005.

SA, N. C. ; CAVALCANTE, T. T. A. ; ARAUJO, A. X. ; SANTOS, H. S. ; ALBUQUERQUE, M. R. J. R. ; BANDEIRA, P. N. ; CUNHA, R. M. S. ; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H. Antimicrobial and antibiofilm action of Casbane Diterpene from *Croton nepetaefolius* against oral bacteria. **Archives of Oral Biology**, v. 57, p. 550-555, 2012.

SANTOS, H. S. dos; CRUZ, W. M. de S. A terapia nutricional com vitaminas antioxidantes e o tratamento quimioterápico oncológico. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, p. 303-308, 2001.

MAHATO, S.; KUNDU, A. P.; ¹³C NMR spectra of penyacyclic triterpenoids – A compilation and some saliente features. **Phytochemistry**, v. 37, N. 6, p. 1517-1575, 1994.

SILVA-ALMEIDA, J. R. G.; SOUZA, A. V. V.; OLIVEIRA, A. P.; SANTOS, U. S.; SOUZA, M. D.; BISPO, L. P.; TURAT, I. C. C. Chemical composition of essential oils from the stem barks of *Croton conduplicatus* (Euphorbiaceae) native to the Caatinga biome. **Afri. J. Pharm. Pharmacol.**, 9, 4. 98-101, 2015.

SILVA, M.J.; ENDO, L.H.; DIAS, A.L.T.; SILVA, G.A.; SANTOS, M.H.; SILVA, M.A. Avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos e frações orgânicas de *Mimosa caesalpiniifolia* Benth. (Mimosaceae). **Rev Ciênc Farm Básica Apl.**, v.33, p. 267-274, 2012.

SILVA, M. G. V. **Óleos essenciais: composição química, biossíntese, técnicas de extração, atividades farmacológicas e importância econômica**, Fortaleza, CE: Ed. UECE, 2007.

SILVA, M. L. C.; COSTA, R. S.; SANTANA, A . S.; KOBLITZ, M. G. B. Compostos fenólicos, carotenóides e atividade antioxidante em produtos vegetais. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 31, n. 3, p. 669-682, jul./set. 2010

SILVA, V. C.; ALVES, A. N. SANTANA, A. Constituintes fenólicos e terpenóides isolados das raízes de *Andira frexinifolia* (Fabaceae). **Química Nova**, v. 29, n. 6, p. 1184-1186. 2006.

SIMÕES, M.; SIMÕES, L.C.; VIEIRA, M.J. A review of current and emergent biofilm control strategies. **LWT - Food Science and Technology**, v. 43, 573–583. 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; PALAZZO, J. C.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**, 1999.

STEPANOVIC, S.; VUKOVIC, D.; DAKIC, I.; SAVIC, B.; SVABIC-VLAHOVIC, M. A modified microtiter-plate test for quantification of *staphylococcal* biofilm formation. **Journal of Microbiological Methods**, v. 40, 175–179. 2000.

VALADARES, Y. M. ***Remijia ferruginea* D. C. *Jacaranda coroba* D.C. e *Solanum paniculatum* L.: Atividades biológicas e síntese de derivados dos ácidos ursólico e oleanólico.** Tese –(Doutorado em Farmácia) Faculdade de Farmácia. Universidade Federal de Minas Gerais, 2009.

VASCONCELOS, M.A.; ARRUDA, F.V.S.; SANTOS, H.S.; RODRIGUES, A.S.; BANDEIRA, P.N.; ALBUQUERQUE, M.R.F.R.; Diterpene isolated from *Croton nepetaefolius* on the prevention and control of biofilms formed by bacteria and Candida species. **Ind Crops Prod.** v. 61, p. 499-509, 2014.

VUONG, C.; KOCIANOVA, S.; VOYICH, J.M.; YAO, Y.; FISCHER, E.R.; DELEO, F.R.; OTTO, M. A crucial role for exopolysaccharide modification in bacterial biofilm formation, immune evasion and virulence. **J. Biol. Chem.**, v. 279, p. 54881-54886, 2004.

WANG, T.; JÓNSDÓTTIR, R.; ÓLAFSDÓTTIR, G. Total phenolic compounds, radical scavenging and metal chelation of extracts from Icelandic seaweeds. **Food Chem.**, v.16, n.1, 240-248, 2009.