



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE QUÍMICA

FABIANA BARCELOS FURTADO

**ESTUDO QUÍMICO, ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE *Inga laurina* (Sw.) Willd.**

UBERLÂNDIA

2014

FABIANA BARCELOS FURTADO

**ESTUDO QUÍMICO, ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL E ATIVIDADES
BIOLÓGICAS DE *Inga laurina* (Sw.) Willd.**

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

Orientação: Prof. Dr. Francisco José Tôrres de Aquino

Coorientação: Prof. Dr. Alberto de Oliveira

UBERLÂNDIA

2014



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



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 187/PPQUI.

DATA: 28/02/2014

DISCENTE: Fabiana Barcelos Furtado

MATRÍCULA: 11212QMI007

TÍTULO DO TRABALHO: Estudo químico, análise do óleo essencial e atividades biológicas de *Inga laurina* (Sw.) Willd.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Química de Produtos Naturais

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Análise química e avaliação da atividade antioxidante e antimicrobiana sobre microorganismos da cavidade bucal da espécie *Inga laurina* (SW) Willd.

Às quatorze horas do dia vinte e oito de fevereiro do ano dois mil e quatorze, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, Bloco 5I, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Leonardo dos Reis Silveira, da Universidade de São Paulo, Marcos Pivatto e Francisco José Tôrres de Aquino, do Instituto de Química da UFU, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(a) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e Aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será ESTUDO QUÍMICO, ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE *Inga laurina* (Sw.) Willd.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 40 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 17 horas e 10 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Prof. Dr. Leonardo dos Reis Silveira

USP

Prof. Dr. Marcos Pivatto

IQUFU

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

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos bons espíritos que me guiaram na execução deste trabalho de mestrado;

A minha família pelo incentivo e apoio de sempre;

Ao meu orientador, professor Dr. Francisco José Torres de Aquino, por ter me recebido no grupo de pesquisa e pela orientação;

Ao professor Dr. Alberto de Oliveira por sua coorientação;

Ao professor Dr. Evandro Afonso do Nascimento pelas importantes contribuições no desenvolvimento deste trabalho;

Aos professores Dr. Sérgio Antônio Lemos de Moraes e Dr. Roberto Chang pelos conhecimentos teóricos e técnicos ensinados;

Aos colegas de laboratório, em especial a professora Me. Carla de Moura Martins pelo trabalho em conjunto;

Aos alunos de iniciação científica pelo auxílio nas análises;

Ao professor Dr. Glein Monteiro de Araújo, do Instituto de Biologia da UFU, pela identificação do material vegetal;

Ao professor Dr. Carlos Henrique Gomes Martins do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca - LaPeMA, e a seus alunos, Luis Fernando Leandro, Maria Anita e Thaís da Silva Moraes pela realização das análises de atividade antimicrobiana;

Ao professor Dr. Luís Carlos Scalon Cunha pelas análises antimicrobianas, pelos ensinamentos e ajuda;

Ao Professor Dr. Cláudio Vieira da Silva, do Instituto de Ciências Biomédicas da UFU, pelo suporte nas análises de citotoxicidade;

Ao professor Me. Mário Machado Martins e aos alunos Fabrício Castro Machado e Paulla Vieira Rodrigues pela realização das análises de atividade citotóxica;

A Fapemig pelo apoio financeiro (APQ-01178-11).

SUMÁRIO

1 Introdução	15
1.1 O Gênero <i>Inga</i> Mill.....	16
1.1.1 Metabólitos presentes no gênero <i>Inga</i>	17
1.1.2 Atividades biológicas associadas ao gênero <i>Inga</i>	20
1.2 <i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd.....	21
1.2.1 Metabólitos presentes em <i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd.....	23
1.2.2 Atividades biológicas associadas à <i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd.....	24
1.3 Óleos Essenciais.....	24
1.4 Atividade antimicrobiana e microrganismos bucais.....	27
1.5 Atividade citotóxica.....	28
1.6 Capacidade sequestrante do radical DPPH, teor de fenóis totais e proantocianidinas.....	28
1.7 Constituintes químicos da madeira e das cascas.....	30
1.7.1 <i>Holocelulose</i>	30
1.7.2 <i>Lignina</i>	32
1.7.3 <i>Extrativos</i>	33
1.7.4 <i>Teor de cinzas</i>	34
2 Objetivos	35
3 Metodologia	36
3.1 Coleta e preparo do material vegetal.....	36
3.2 Determinação dos constituintes químicos da madeira e cascas de <i>Inga laurina</i>	36
3.2.1 <i>Determinação do teor de cinzas</i>	36
3.2.2 <i>Preparação da amostra livre de extrativos</i>	37
3.2.3 <i>Determinação de lignina insolúvel em ácido (Lignina de Klason)</i>	38
3.2.4 <i>Determinação de lignina solúvel</i>	38
3.2.5 <i>Determinação de holocelulose</i>	39
3.2.6 <i>Determinação de hemiceluloses e α-celulose</i>	39
3.3 Identificação dos compostos voláteis de <i>Inga laurina</i>	40
3.3.1 <i>Extração dos óleos essenciais por hidrodestilação</i>	40

3.3.2 Análise dos óleos essenciais por CG-EM.....	40
3.3.3 Identificação e quantificação dos componentes dos óleos essenciais.....	41
3.4 Preparação dos extratos.....	41
3.5 Prospecção fitoquímica dos constituintes presentes nos extratos.....	42
3.6 Determinação do teor de fenóis totais.....	44
3.7 Determinação do teor de taninos condensados (proantocianidinas).....	44
3.8 Capacidade sequestrante do radical DPPH.....	45
3.8.1 Cálculo do CE_{50}	45
3.9 Atividade antimicrobiana.....	46
3.9.1 Microrganismos utilizados nos ensaios.....	46
3.9.2 Preparo das amostras para o método de microdiluição.....	47
3.9.3 Preparo do inóculo.....	48
3.9.4 Preparação do fármaco padrão.....	48
3.9.5 Controles.....	48
3.9.6 Método da microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima.....	49
3.10 Atividade citotóxica dos óleos essenciais.....	50
3.10.1 Preparo das amostras.....	50
3.10.2 Teste de viabilidade celular.....	50
3.11 Análises estatísticas.....	51
4 Resultados e Discussões.....	52
4.1 Determinação da umidade.....	52
4.2 Determinação dos constituintes químicos da madeira e cascas de <i>Inga laurina</i>	52
4.3 Identificação dos compostos voláteis de <i>Inga laurina</i>	55
4.4 Prospecção fitoquímica.....	66
4.5 Capacidade sequestrante do radical DPPH, teor de fenóis totais e proantocianidinas.....	66
4.6 Atividades antimicrobiana e citotóxica.....	71
4.6.1 Atividade antimicrobiana dos extratos das cascas e folhas de <i>Inga laurina</i>	71
4.6.2 Atividades antimicrobiana e citotóxica dos óleos essenciais das cascas e folhas de <i>Inga laurina</i>	73
5 Conclusões.....	78

REFERÊNCIAS.....	79
APÊNDICE A - Identificação dos componentes dos óleos essenciais.....	94
APÊNDICE B - Meios de cultura e soluções utilizadas na determinação da atividade antimicrobiana.....	97
APÊNDICE C - Meio de cultura utilizado na determinação da atividade citotóxica.....	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Microrganismos, morfotipos e meios de culturas utilizados na avaliação da atividade antimicrobiana.....	47
Tabela 2 - Teor de umidade das partes de <i>I. laurina</i>	52
Tabela 3 - Composição química da casca e madeira de <i>I. laurina</i>	53
Tabela 4 - Comparação da composição química dos constituintes de casca e madeira de folhosas.....	55
Tabela 5 - Rendimento dos óleos essenciais de <i>I. laurina</i> em diferentes períodos.....	55
Tabela 6 - Composição química do óleo essencial das cascas e folhas de <i>I. laurina</i> em período de seca.....	56
Tabela 7 - Classificação, por grupos funcionais, dos componentes dos óleos essenciais das cascas e folhas de <i>I. laurina</i> no período de seca.....	57
Tabela 8 - Composição química do óleo essencial das cascas e folhas de <i>I. laurina</i> em período chuvoso.....	59
Tabela 9 - Classificação, por grupos funcionais, dos componentes do óleo essencial das cascas e folhas de <i>I. laurina</i> no período chuvoso.....	60
Tabela 10 - Prospecção fitoquímica do extrato bruto das folhas e cascas de <i>I. laurina</i>	66
Tabela 11 - Valores de CE ₅₀ , fenóis totais, proantocianidinas e rendimentos obtidos para o extrato etanólico das folhas e cascas de <i>I. laurina</i>	68
Tabela 12 - Concentrações inibitórias mínimas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos extratos etanólicos das cascas e folhas de <i>I. laurina</i>	71
Tabela 13 - Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e concentração citotóxica ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de óleos essenciais das cascas e folhas de <i>I. laurina</i> em diferentes períodos, seca e chuva.....	74

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estruturas químicas de alguns princípios ativos isolados de plantas.....	16
Figura 2 - Ilustração de partes aéreas de espécies do gênero <i>Inga</i> Mill. comuns no Brasil.....	17
Figura 3 - Estruturas químicas de flavonoides isolados das folhas de <i>I. edulis</i>	18
Figura 4 – Estruturas dos principais flavonoides monoméricos e diméricos encontrados nas folhas de <i>I. umbellifera</i>	19
Figura 5 - Estruturas químicas de compostos encontrados em folhas jovens de espécies de <i>Inga</i>	20
Figura 6 - Distribuição geográfica da espécie <i>Inga laurina</i> (Sw.) Willd.....	21
Figura 7 – Fotografia de um exemplar de <i>Inga laurina</i> cultivada para arborização.....	22
Figura 8 - Imagens de detalhes das folhas (1), frutos (2), flores (3) e sementes (4) de <i>Inga laurina</i>	22
Figura 9 – Estruturas de metabólitos presentes em <i>Inga laurina</i>	23
Figura 10 - Exemplos de estruturas químicas de terpenóides.....	25
Figura 11 - Componentes de óleos essenciais associados à atividade antimicrobiana.....	26
Figura 12 – Esquema de formação da cadeia de celulose pela união de unidades β -D-glucose.....	31
Figura 13 - Exemplo de lignina: estrutura proposta para lignina da madeira de <i>Eucalyptus grandis</i>	32
Figura 14 - Gráfico de comparação dos grupos funcionais encontrados nos óleos das cascas em período chuvoso e de seca.....	62
Figura 15 - Gráfico de comparação dos grupos funcionais encontrados nos óleos das folhas em período chuvoso e de seca.....	63
Figura 16 - Estruturas de compostos identificados nos óleos essenciais de <i>I. laurina</i>	65
Figura 17 - Curva de calibração para a determinação espectrofotométrica de fenóis totais (método Folin-Ciocalteu).....	67
Figura 18 - Curva de calibração para a determinação espectrofotométrica de proantocianidinas (método da vanilina).....	68

LISTA DE ABREVIações E SIGLAS

ANOVA - Analysis of variance

ATCC - American type culture collection

BHT - Butilidróxitolueno

CC₅₀ - Concentração citotóxica: 50% de viabilidade celular

CE₅₀ - Concentração eficiente. Quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50%.

CG/EM - Cromatografia gasosa/espectroscopia de massas

CIM - Concentração inibitória mínima

CLSI - Clinical and laboratory standards institute

DC - Digluconato de clorexidina

DMEM - Dulbecco's modified eagle's medium

DMSO - Dimetilsulfóxido

DP - Desvio padrão

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

EAG - Equivalentes de ácido gálico

EBEC - Extrato bruto etanólico das cascas

EBEF - Extrato bruto etanólico das folhas

ECAT - Equivalentes de catequina

FT - Fenóis totais

HEPES - 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid

HUFU - Herbarium Uberlandense

IA - Índice aritmético

IS - Índice de seletividade

LaPeMA - Laboratório de pesquisa em microbiologia aplicada

MIC - Minimum inhibitory concentration

NBT - Nitroblue tetrazolium

N.I. - Não identificado

NP/PEG - Natural products / polyethylene glycol

P - Proantocianidinas

PBS - Phosphate buffered saline

SFB - Soro fetal bovino

TIC - Total ions chromatogram

TR - Tempo de retenção

TRIS - Tris(hidroximetil)aminometano

TSB - Tryptone soya broth

UFC - Unidades formadoras de colônias

UV - Ultravioleta

RESUMO

Inga laurina (Sw.) Willd., conhecida popularmente como Angá ou Ingá Branco, pertence a família Leguminosae e ao gênero *Inga*. Algumas espécies deste gênero tem importância farmacológica e agrônômica. O objetivo deste trabalho foi fornecer informações sobre *I. laurina* com relação a constituição química da madeira, das cascas e dos óleos essenciais, bem como avaliar atividades biológicas dos extratos brutos e dos compostos voláteis. As análises da constituição macromolecular indicaram maior quantidade de hemicelulose e α -celulose na madeira quando comparada a casca. A quantidade de lignina solúvel e insolúvel em ácido e o teor de cinzas não apresentaram grandes variações quantitativas entre casca e madeira. A variação da composição química dos óleos essenciais obtidos em período chuvoso e de seca foi determinada por CG/EM. No óleo essencial das cascas, extraído durante a estação seca, destacou-se a presença de terpenoides (30,05%), sendo o fitol o composto majoritário (9,76%). Já para o óleo das cascas do período chuvoso, além dos terpenoides (26,63%), foram observados ácidos graxos em grande quantidade (46,84%), sendo o ácido palmítico o composto majoritário (25,40%). Com relação ao óleo essencial das folhas obtido durante a estação seca, os ésteres foram os principais componentes (42,35%). O principal éster presente foi o benzoato de (Z)-hex-3-enila (10,15%) e o composto majoritário deste óleo foi o (Z)-hex-3-en-1-ol (14,23%). Terpenoides (33,84%), alcanos de cadeia longa (27,04%) e ácidos graxos (21,72%) foram as principais classes de compostos do óleo essencial das folhas no período chuvoso. Fitol (33,21%), nonacosano (21,95%) e ácido palmítico (15,20%) foram os componentes majoritários identificados neste óleo. A atividade antimicrobiana contra patógenos orais aeróbicos e anaeróbicos foi avaliada pelo método de microdiluição em caldo e a atividade citotóxica realizada com células Vero. Em geral, todos os óleos essenciais exibiram atividade antimicrobiana contra os microrganismos aeróbicos e anaeróbicos avaliados. Os melhores resultados da ação bacteriostática foram observados contra *P. gingivalis*, *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. salivarius* e *S. sobrinus* quando avaliados os óleos do período chuvoso, que apresentaram valores de CIM variando entre 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Em contrapartida, extratos brutos etanólicos das cascas e folhas de *I. laurina* não

apresentaram atividade antimicrobiana relevante (CIM < 100 µg mL⁻¹) para as mesmas bactérias avaliadas. Pelo cálculo do índice de seletividade constatou-se maior seletividade pelas bactérias do que toxicidade para as células Vero. A partir da prospecção fitoquímica e dos resultados obtidos nas análises de fenóis totais e proantocianidinas, para os extratos etanólicos de cascas e folhas de *I. laurina*, foi possível propor que os compostos fenólicos presentes nas amostras avaliadas são os principais responsáveis pela eficiente capacidade sequestradora de radicais DPPH observada, com valores de CE₅₀ equivalentes aos do BHT. Desta forma, os resultados promissores com relação aos ensaios biológicos de óleos e extratos de *I. laurina* incentivam investigações mais aprofundadas desta espécie.

Palavras-chave: *Inga laurina*. Óleo essencial. Atividade antimicrobiana. DPPH. Atividade citotóxica. Constituição macromolecular. Fitoquímica.

ABSTRACT

Inga laurina (Sw.) Willd., popularly known as Angá or Ingá Branco, belongs to Leguminosae family, *Inga* genus, and some species of this genus are recognized due to their pharmacological and agronomic importance. The objective of this study was to provide information about *I. laurina* regarding to the chemical composition of the wood and stem bark and leaves' essential oils. Additionally, biological activities of the extracts and oils were evaluated. Macromolecular analysis of the wood indicated higher amount of α -cellulose and hemicelluloses in the wood compared to bark. The amount of soluble and insoluble lignin in acid and the content of ash did not show quantitative variations. The seasonal chemical composition of essential oils from *Inga laurina* was determined by GC/MS. In the essential oil extracted from the bark during the dry season, the presence of terpenoids (30.05%) stood out, and phytol (9.76%) was the major compound identified. For the bark oil obtained during the rainy season, in addition to terpenoids (26.63%), were identified a large amount of fatty acids (46.84%), in particular palmitic acid (25.40%). Regarding the leaves' essential oil obtained in the dry season, esters (42.35%) were the main components. The main ester present was (Z)-hex-3-enyl benzoate (10.15%) and the major compound of this oil was (Z)-hex-3-en-1-ol (14.23%). Terpenoids (33.84%), long-chain alkanes (27.04%) and fatty acids (21.72%) were the main components of the essential oil from leaves in the rainy season. Phytol (33.21%), nonacosane (21.95%) and palmitic acid (15.20%) were the major compounds identified. The antimicrobial activity against aerobic and anaerobic oral bacteria was evaluated by the microdilution method and cytotoxic activity was carried out with Vero cells. In general, all essential oils exhibited antimicrobial activity against the aerobic and anaerobic microorganisms evaluated. The better bacteriostatic effect was observed against *P. gingivalis*, *S. mutans*, *S. sanguinis*, *S. salivarius* and *S. sobrinus* when evaluated oils of the rainy season, with MIC values ranging from 25 to 50 mg mL⁻¹. In contrast, ethanol crude extracts of the bark and leaves of *I. laurina* showed no significant antimicrobial activity (MIC < 100 μ g mL⁻¹) against the same bacteria evaluated. Analysis of selectivity index showed a higher selectivity by bacteria evaluated than toxicity to Vero cells. From the

phytochemical screening and by the results obtained in the analysis of total phenols and proanthocyanidins for the ethanol extracts of bark and leaves from *I. laurina*, it is possible to purpose that phenolic compounds present in the samples tested are primarily responsible for efficient DPPH radical scavenging ability observed with EC₅₀ values similar to the BHT. Thus, the promising results with respect to biological assays of oils and extracts from *I. laurina* encourage to additional investigations of this species.

Keywords: *Inga laurina*. Essential oil. Antimicrobial activity. Cytotoxic activity. DPPH. Macromolecular constitution. Phytochemical.

1 Introdução

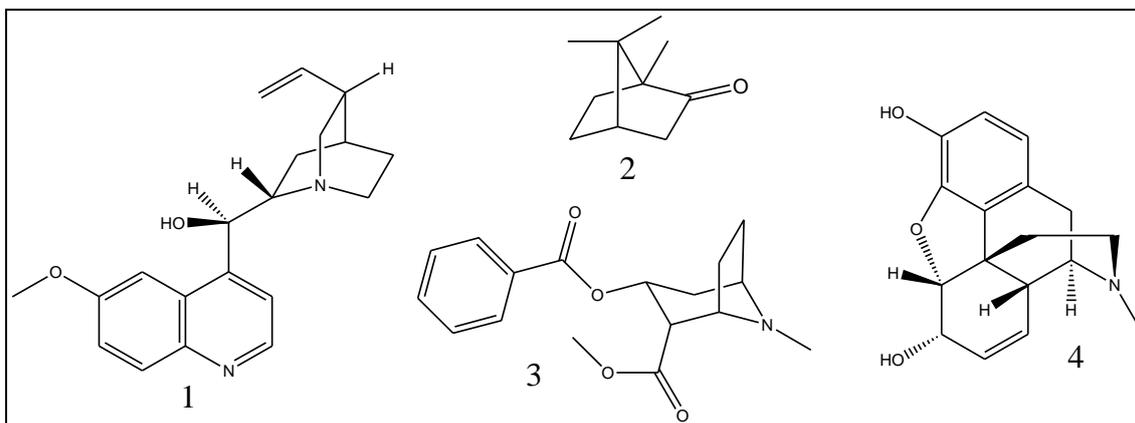
O reino vegetal é um dos principais fornecedores de substâncias úteis ao tratamento de doenças que acometem os seres humanos (PHILLIPSON; ANDERSON, 1989). Em 2010, de 1.369 publicações relacionadas a produtos naturais, aproximadamente 61% eram sobre a descoberta de novos compostos a partir de fontes vegetais (KINGHORN, *et al.*, 2011). Este interesse no reino vegetal está relacionado à grande variedade e complexidade de metabólitos biossintetizados pelas plantas, os chamados metabólitos secundários, que são produzidos, na maioria das vezes, como mecanismo de defesa em resposta às condições de adaptação (REINBOTHE *et al.*, 1990). Os metabólitos secundários são substâncias geralmente produzidas em pequenas quantidades, e, diferente dos produtos do metabolismo primário, nem sempre estão envolvidos em funções vitais do vegetal ou mesmo presentes em todos eles. Geralmente apresentam baixo peso molecular e possuem características químicas variadas e às vezes complexas (ALVES, 2001). Sendo assim, estas moléculas apresentam grande potencial de atividades biológicas sendo úteis como modelos para o desenvolvimento de novos fármacos.

A partir do século XIX, foram registrados os primeiros estudos sobre vegetais com base científica. Isso resultou no isolamento de alguns princípios ativos de plantas, já conhecidas como medicinais. Destes estudos, foram obtidas algumas substâncias que se consagraram como eficazes e que atualmente ainda são empregadas no tratamento de certas doenças, como por exemplo: quinina (**1**), cânfora (**2**), cocaína(**3**) e morfina (**4**) (Figura 1) (WHEELWRIGH, 1974; VANHAELEN, 1989).

Segundo Newman e Cragg (2012), aproximadamente 50% dos fármacos lançados em 2010 tiveram origem ou foram baseados em moléculas obtidas de produtos naturais. Nestes 50% estão incluídos compostos isolados de produtos naturais, compostos isolados de produtos naturais de origem especificamente botânica e compostos derivados de produtos naturais, mas com modificações semi-sintéticas. Nesse sentido, cientistas persistem na pesquisa de plantas cujas propriedades medicinais são pouco conhecidas, mas que podem resultar no

isolamento de substâncias importantes para o tratamento de doenças (SAAD *et al.*, 2005).

Figura 1 - Estruturas químicas de alguns princípios ativos isolados de plantas. Quinina (1); cânfora (2); cocaína (3); morfina (4).



Fonte: adaptado de Montanari e Bolzani (2001)

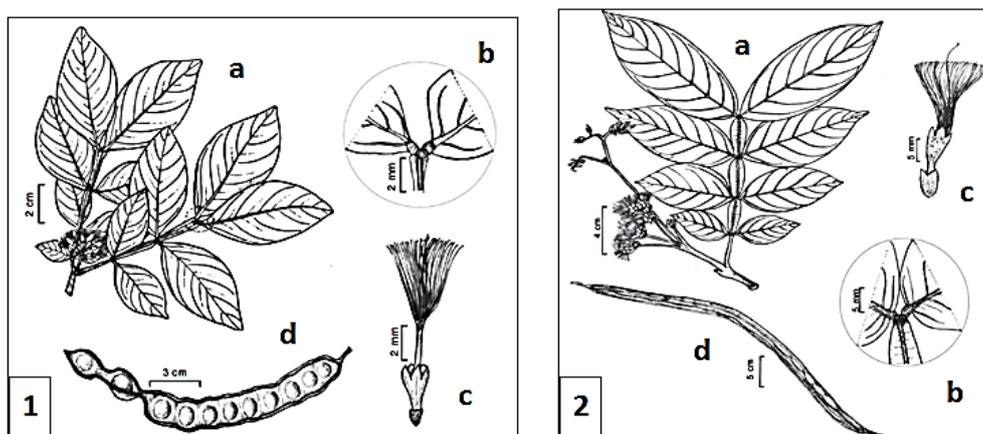
1.1 O Gênero *Inga* Mill.

O gênero *Inga* Mill. pertence à família Leguminosae-Mimosoideae, tribo Ingeae e compreende cerca de 300 espécies (SOUSA, 2009). O grupo tem seu nome derivado do indígena (tupi) angá ou ingá, que significa “tem semente envolvida” (RODRIGUES, 1905). Trata-se de um gênero exclusivamente neotropical, com sete principais áreas de distribuição. O litoral e o interior do Brasil, o sudeste da América Central e o oeste da América do Sul, constituem os principais centros de diversidade do gênero (PENNINGTON, 1997; MATA; FELIX, 2007). De acordo com León (1966), fósseis atribuídos ao *Inga* são encontrados em outras regiões do globo nos respectivos períodos: Cretáceo (Europa e América do Norte), Oligoceno (Panamá), Mioceno (Costa Rica) e Plioceno (Bolívia), o que demonstra a ampla distribuição e importância da espécie.

A planta do gênero *Inga* é caracterizada basicamente por apresentar folhas paripenadas, com nectário na raque foliar, localizado entre cada par de folíolo e legume, com sementes envolvidas por polpa carnosa e adocicada (BENTHAM, 1876)

(Figura 2). Apresenta potencial econômico no reflorestamento, fitoterapia, produção de energia e alimentação (PRITCHARD *et al.*, 1995; BILIA, 2003; CARAMORI *et al.*, 2008).

Figura 2 - Ilustração de partes aéreas de espécies do gênero *Inga* Mill. comuns no Brasil: *Inga alba* (Sw.) Willd. (1); *Inga edulis* Mart. (2). a. ramo florido; b. nectário; c. flor; d. fruto.



Fonte: adaptado de Souza (2011).

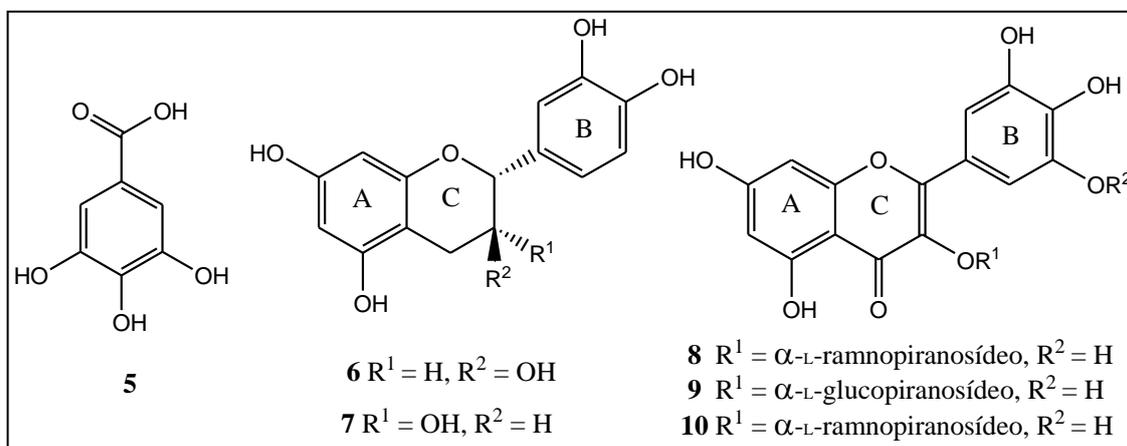
Muitas das espécies deste gênero são usadas por tribos da Amazônia para o tratamento de diferentes tipos de doenças (SCHULTES; RAFFAUF, 1990). Por exemplo, sementes de *I. brachystachya* são usadas para reduzir flatulência; folhas e raízes de *I. strigillosa* para o tratamento de áreas descoloridas da pele; flores de *I. cecropietorum* para dor de ouvido; flores de *I. rubiginosa* são usadas como descongestionante nasal; as polpas dos frutos de *I. macrophylla* para limpeza de dentes e flores de *I. myriocephala* para o fortalecimento de cabelos (VIVOT *et al.*, 2001). Segundo Silva *et al.* (2007) as cascas de *I. edulis* são utilizadas na medicina popular como anti-inflamatório e antidiarreico.

1.1.1 Metabólitos presentes no gênero *Inga*

Nas folhas de *I. edulis* foram isolados alguns compostos fenólicos como ácido gálico (5), catequina (6), epicatequina (7), miricetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (8),

quercetina-3-O- α -L-glucopiranosídeo (**9**) e quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (**10**) (Figura 3) (SOUZA *et al.*, 2007). Dias *et al.* (2010) isolaram também nas folhas de *I. edulis* procianidinas B1 e B2, miricetina e quercetina. Já nas raízes desta espécie foram isolados glicosídeos esteroidais e alguns flavonoides como 5,7,3',4'-tetra-hidroxi-3-metoxiflavona, 6,3',4'-tri-hidroxi-aurona e 5,7,4'-tri-hidroxi-6,8-dimetilflavonona (CORREA *et al.*, 1995).

Figura 3 - Estruturas químicas de flavonoides isolados das folhas de *I. edulis*: Ácido gálico (**5**); catequina (**6**); epicatequina (**7**); miricetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (**8**); quercetina-3-O- α -L-glucopiranosídeo (**9**); quercetina-3-O- α -L-ramnopiranosídeo (**10**).

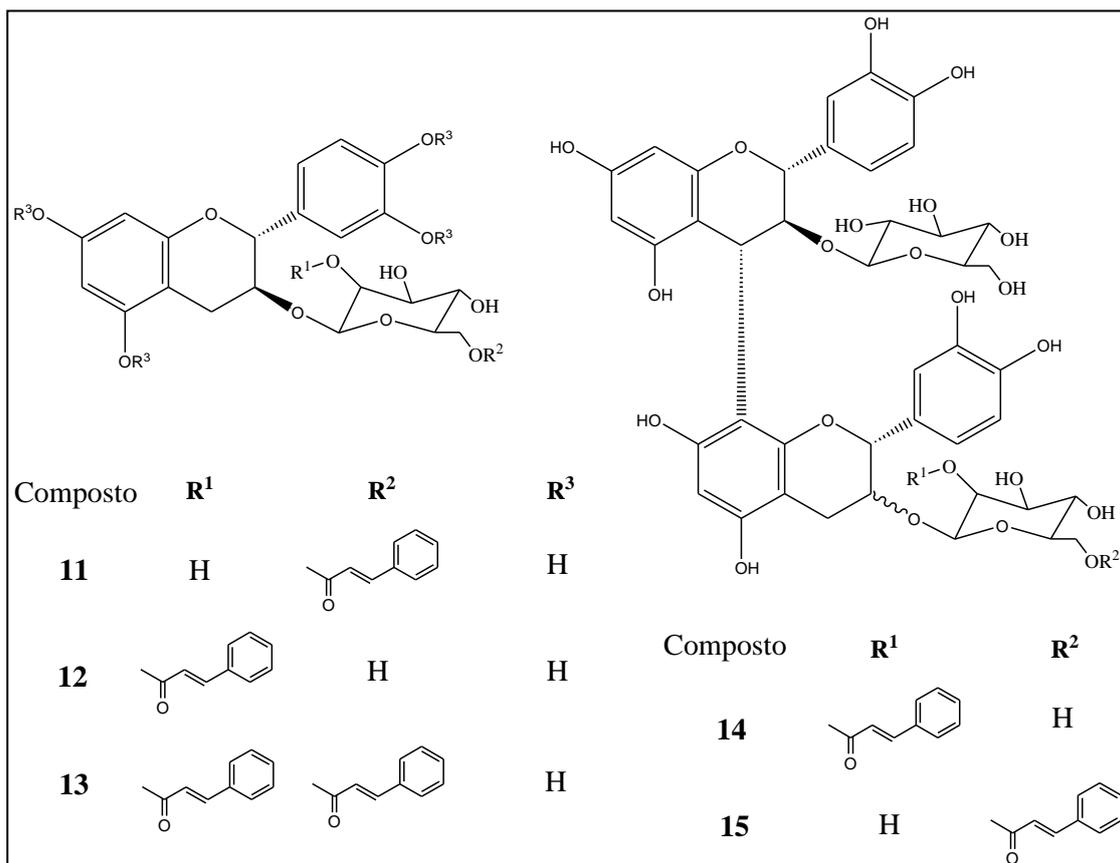


Fonte: adaptado de Souza (2007).

Vivot *et al.* (2001) isolaram ácidos elágico e gálico (**5**) das folhas de *I. verna*.

Foi relatado por Coley *et al.* (2005) a presença de L-tirosina e 2 metabólitos secundários nitrogenados, o *trans*-4-hidroxi-N-metil-L-prolina e o ácido 5-amino-4-hidroxi-pentanóico, em folhas jovens de *I. umbellifera*. Em estudos anteriores deste mesmo grupo de pesquisa (LOKVAM *et al.*, 2004) foram isolados das folhas desta espécie três cinamoil-glicosídeos de catequina: catequina-3-O- β -D-glucopiranosídeo(2-cinamoil)-piranosídeo (**11**), catequina-3-O- β -D-glucopiranosídeo(6-cinamoil)-piranosídeo (**12**) e a catequina-3-O- β -D-glucopiranosídeo(2,6-biscinamoil)-piranosídeo (**13**), além de duas procianidinas diméricas: catequina-3-O- β -D-glucopiranosídeo(4 α →8)-catequina-3-O- β -D-glucopiranosídeo(2-cinamoil) piranosídeo (**14**) e a catequina-3-O- β -D-glucopiranosídeo(4 α →8)-epicatequina-3-O- β -D-glucopiranosídeo(6-cinamoil) piranosídeo (**15**) (Figura 4).

Figura 4 – Estruturas dos principais flavonoides monoméricos e diméricos encontrados nas folhas de *I. umbellifera*: Catequina-3-*O*- β -D-gluco (2-cinamoil) piranosídeo (**11**); catequina-3-*O*- β -D-gluco (6-cinamoil) piranosídeo (**12**); catequina-3-*O*- β -D-gluco (2,6-biscinamoil) piranosídeo (**13**); catequina-3-*O*- β -D-glucopirano-(4 α →8)-catequina-3-*O*- β -D-gluco(2-cinamoil) piranosídeo (**14**); catequina-3-*O*- β -D-glucopirano-(4 α →8)-epicatequina-3-*O*- β -D-gluco(6-cinamoil) piranosídeo (**15**).



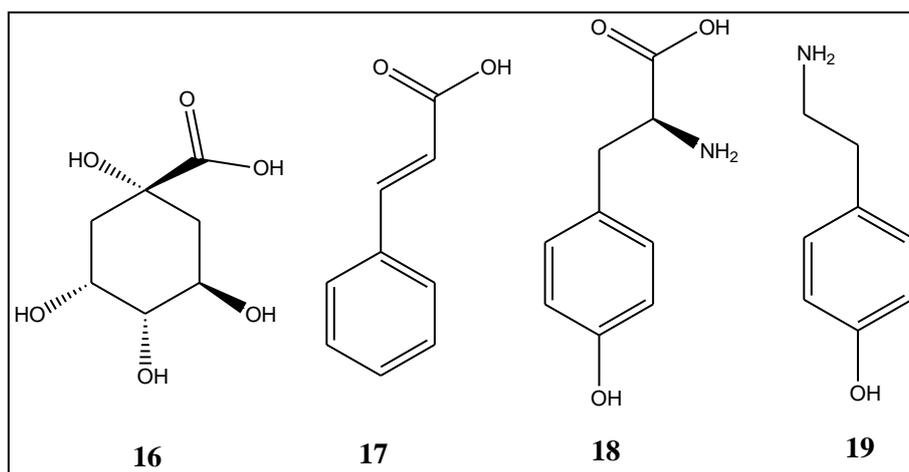
Fonte: adaptado de Lokvam (2004).

Nas cascas de *I. marginata*, Álvarez *et al.* (1998) identificaram saponinas, taninos, fitoesteróis e triterpenoides.

Em estudo relacionando a defesa contra herbívoros e a constituição química de 37 espécies do gênero *Inga*, Kursar *et al.* (2009) isolaram de folhas jovens compostos como ácidos quínico (**16**), gálico (**5**), cinâmico (**17**) e seus derivados e ainda, tirosina (**18**) e tiramina (**19**) nas suas formas puras ou conjugadas (Figura 5). O composto fenólico mais comum encontrado na maioria das espécies foi o flavan-3-ol que na sua forma polimérica é chamado de tanino condensado. Das espécies analisadas neste

estudo, 32 apresentaram um ou mais tipos de compostos fenólicos e 12 espécies apresentaram saponinas.

Figura 5 - Estruturas químicas de compostos encontrados em folhas jovens de espécies de *Inga*. Ácido quínico (**16**); ácido cinâmico (**17**); tirosina (**18**); tiramina (**19**).



Diferentes ácidos piperídicos hidroxilados foram identificados em *I. brenesii*, *I. longispica*, *I. oerstediana* e *I. paterno* (MORTON *et al.*, 1991; MORTON, 1998). A presença destes ácidos é restrita a poucos gêneros, sendo, portanto, importantes para classificações quimiotaxonômicas (MORTON; ROMEO, 1990). Também açúcares, como a D-frutose e D-sucrose, foram isolados de *I. spectabilis* (HUSSAIN *et al.*, 1990).

1.1.2 Atividades biológicas associadas ao gênero *Inga*

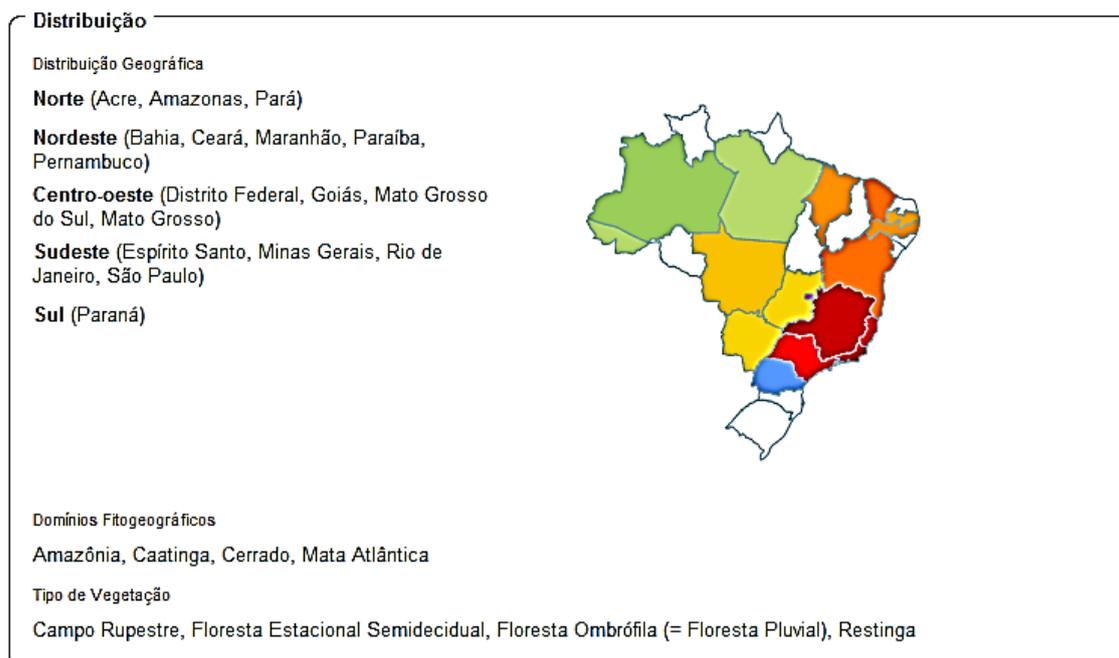
Análises químicas mostram que o gênero *Inga* é fonte importante na busca de novos princípios ativos de interesse farmacêutico e agrônomico. Alguns estudos relataram atividade antioxidante apresentada por extratos de *I. edulis* (SOUZA *et al.*, 2007; DIAS *et al.*, 2010), *I. verna* (VIVOT *et al.*, 2001) e derivados sintéticos preparados a partir de metabólitos secundários isolados de *I. laurina* (RAO *et al.*, 2011), atividade inibitória de proteinases, associadas a defesa contra herbivoria, por *I. umbratica* (CALDERON *et al.*, 2001), *I. laurina* (MACEDO *et al.*, 2007; OLIVA *et al.*, 2010) e várias espécies do gênero (KURSAR *et al.*, 2009; MACEDO *et al.*, 2011), atividade

antiparasitária apresentada por *I. laurina* (ANTOUN *et al.*, 2001), antimicrobiana por *I. fendleriana* (PISTELLI *et al.*, 2009) e *I. vera* (LOZANO *et al.*, 2013), aleloquímica por *I. umbellifera* (LOKVAM *et al.*, 2006) e antitumoral e antifúngica por *I. marginata* (ALVAREZ *et al.*, 1998).

1.2 *Inga laurina* (Sw.) Willd.

A espécie *I. laurina*, sinóníma *I. fagifolia*, apresenta distribuição ampla, ocorrendo em quase toda a América Central, América do Sul até o Paraguai e Norte da Argentina, incluindo as regiões montanhosas da Costa Rica e Panamá, em altitudes de até 1500 m. No Brasil, estende-se desde a região amazônica até o estado do Paraná (Figura 6) (SOUSA, 1993; GARCIA, 1998; LORENZI, 2002), sendo relativamente tolerante às regiões de cerrado e campos secos (PENNINGTON, 1997).

Figura 6 - Distribuição geográfica da espécie *Inga laurina* (Sw.) Willd.



Fonte: Refflora (2010).

Apresenta-se como árvores de 5 a 8 m de altura (Figura 7), com folhas pecioladas, nectários foliares sésseis ou elevados, inflorescências em espigas e

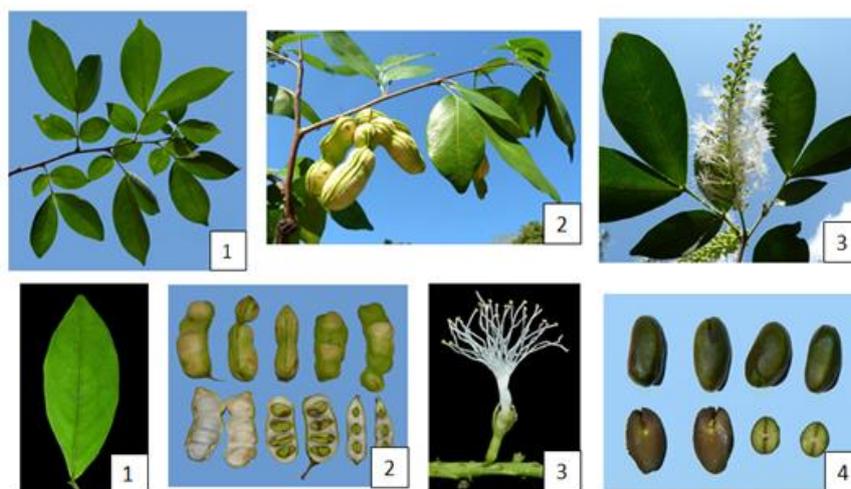
cilíndricas. Apresenta flores com pétalas glabras de cor branca, e frutos sésseis, coriáceos e glabros, amarelos quando maduros, com sementes elípticas, verdes, e polpa bem desenvolvida, adocicada e comestível (Figura 8). Floresce principalmente entre os meses de setembro e novembro e frutifica entre os meses de dezembro e janeiro (POSSETTE; RODRIGUES 2010).

Figura 7 – Fotografia de um exemplar de *Inga laurina* cultivada para arborização.



Fonte: Rabelo (2012).

Figura 8 - Imagens de detalhes das folhas **(1)**, frutos **(2)**, flores **(3)** e sementes **(4)** de *Inga laurina*.



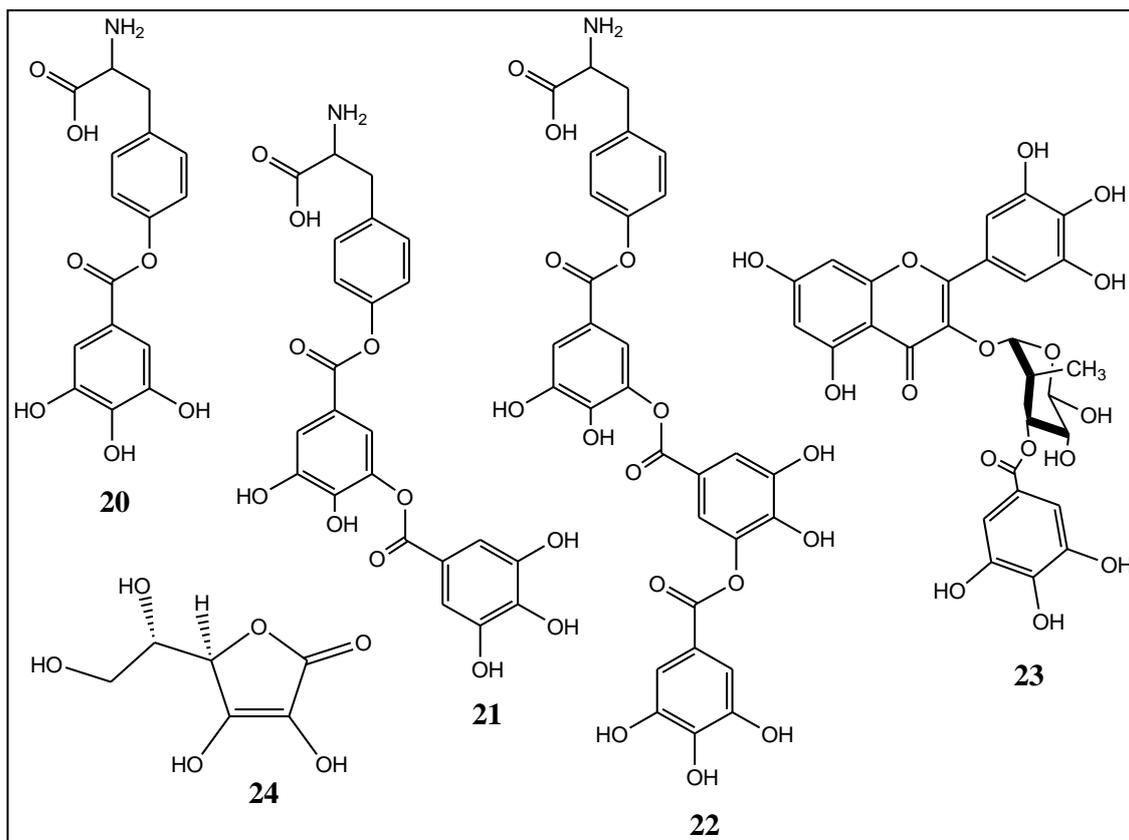
Fonte: Rabelo (2012).

1.2.1 Metabólitos presentes em *Inga laurina* (Sw.) Willd.

Embora esta espécie seja parte importante da flora brasileira, pouco é conhecido sobre sua constituição química (MACEDO *et al.*, 2007). Lokvam *et al.* (2007) isolaram galoil depsídeos de tirosina (**20-22**) (Figura 9) a partir do extrato preparado com folhas jovens de *I. laurina*. Outro composto fenólico observado em considerável concentração foi o flavonoide miricetina 3-*O*- α -(2''-*O*-galoil) ramnosídeo (**23**) (Figura 9).

Milton & Jenness (1987) identificaram ácido ascórbico (**24**) (Figura 9) em folhas de *I. laurina*.

Figura 9 – Estruturas de metabólitos presentes em *Inga laurina*. Galoíl tirosina (**20**); *m*-digaloíl tirosina (**21**); *m*-trigaloíl tirosina (**22**); miricetina 3-*O*- α -(2''-*O*-galoíl) ramnosídeo (**23**); ácido ascórbico (**24**).



Fonte: adaptado de Lokvam (2007).

1.2.2 Atividades biológicas associadas à *Inga laurina* (Sw.) Willd.

Estudos de atividade biológica de *I. laurina* relataram capacidade inibitória da enzima tripsina, por inibidores purificados das sementes (MACEDO *et al.*, 2007; OLIVA *et al.*, 2010). Inibidores de tripsina são importantes no controle de pragas, sendo o inibidor presente nas sementes de *I. laurina* eficiente contra *Homalinotus coriaceus*, *Diatraea saccharalis* e *Heliothis virescens* (MACEDO *et al.*, 2011; RAMOS *et al.*, 2012).

Antoun *et al.* (2001), verificaram atividade antiplasmodial do extrato da folha de *I. laurina*, sendo parcialmente ativo contra *Plasmodium falciparum*, parasita causador da malária. Estudos realizados por Santana *et al.* (2005) analisando taxas de decomposição de folhas por fungos, mostraram que esta espécie apresenta nas folhas jovens alta concentração de lignina (30,7% em massa), o que dificulta a decomposição por fungos que não apresentam enzimas lignolíticas.

Rao *et al.* (2011) analisaram a possibilidade de galactol depsídeos de folhas jovens de *I. laurina* apresentarem atividade antioxidante que foi comprovada por dois métodos, DPPH e NBT. Os compostos 3-(4-(3,4,5-trihidroxibenzoiloxi)fenil)-2-ácido aminopropanóico, 3-(4-(4-hidroxi,3-metóxi benzoiloxi)fenil)-2-ácido aminopropanóico e 3-(4-(3,4-dihidroxibenzoiloxi)fenil)-2-ácido aminopropanóico exibiram excelente atividade tanto pelo método DPPH quanto pelo método NBT quando comparados com padrões de vitamina C (**24**) e ácido gálico (**5**) respectivamente. Já os compostos 3-(4-(4-hidroxi,3,5-dimetóxi benzoiloxi)fenil)-2-ácido aminopropanóico e 3-(4-(4-hidroxibenzoiloxi)fenil)-2-ácido aminopropanóico só apresentaram boa atividade pelo método DPPH e o composto 3-(4-(4-metóxi benzoiloxi)fenil)-2-ácido aminopropanóico só exibiu boa atividade pelo método NBT.

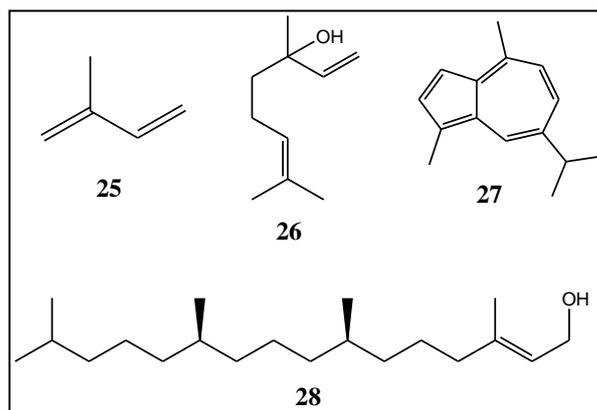
1.3 Óleos Essenciais

Os óleos essenciais são metabólitos secundários voláteis muito conhecidos pelo cheiro que caracteriza algumas plantas. Esse aroma provém da combinação de suas diversas frações e podem estar em um só órgão vegetal ou em toda planta. As plantas

produzem essas substâncias voláteis a partir de vias metabólicas secundárias, ou seja, não prioritárias para a sobrevivência do vegetal (MARTINS *et al.*, 2000).

Os óleos essenciais constituem uma mistura complexa de metabólitos que apresentam composição variada (MATOS, 1989), predominando terpenos (cerca de 90%) e derivados de fenilpropano (WAGNER *et al.*, 1984). O termo terpenóides é empregado para designar todas as substâncias compostas por unidades de isopreno (25). Os compostos terpênicos encontrados com frequência nos óleos essenciais são classificados como monoterpenos, sesquiterpenos e diterpenos (Figura 10), que são constituídos por duas, três e quatro unidades isoprênicas, respectivamente (SIMÕES *et al.*, 1999).

Figura 10 - Exemplos de estruturas químicas de terpenóides. Isopreno (25); monoterpenóide linalol (26); sesquiterpenóide guaiazuleno (27); diterpenóide fitol (28).



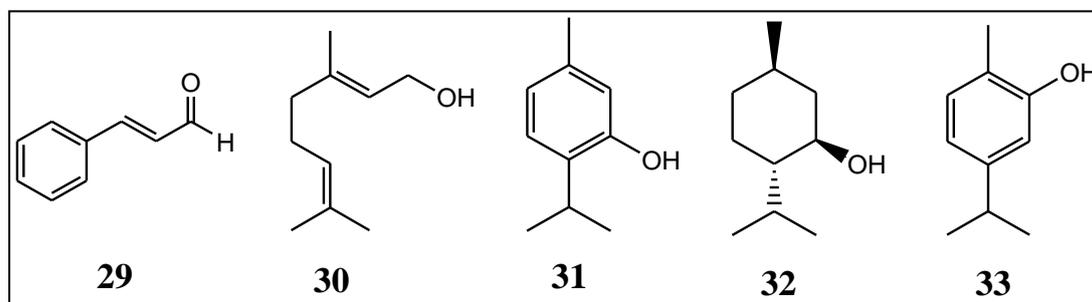
A partir dos hidrocarbonetos a planta produz os compostos oxigenados, os quais constituem a segunda maior categoria. Os álcoois são usualmente baseados nos monoterpenos. Os aldeídos são considerados álcoois primários parcialmente oxidados. As cetonas são produzidas pela oxidação de álcoois secundários. Os ésteres são produzidos pelo álcool terpênico correspondente e um ácido orgânico sendo que seus altos níveis são alcançados na maturidade do fruto/planta ou na floração. Os ácidos são raros nos óleos essenciais, porém alguns podem ser encontrados como: ácido

benzoico, ácido fenilacético e ácido hidrociânico. Compostos como éteres também são raros (SANTOS, 1997).

Os monoterpenóides e sesquiterpenóides produzidos por diversos grupos vegetais são metabólitos sujeitos a fatores internos (genéticos) e externos como luminosidade, temperatura, tipo de solo, disponibilidade de água e outros (CARDOSO *et al.*, 2001). Segundo Guenther (1997), outros fatores podem influenciar a produção de terpenos como idade da folha, eventos fenológicos, acúmulo de nitrogênio foliar, herbivoria, injúria física e outras formas de estresse.

Óleos essenciais possuem um amplo espectro de aplicações, incluindo atividades antiinflamatória, antiespasmódica, antinociceptiva e antioxidante. Além disso, eles exercem efeitos imunomoduladores, psicotrópicos, acaricida e expectorante (PISSERI *et al.*, 2008). Atividades antidiabética, antiviral e supressora de câncer também foram observadas (EDRIS, 2007). Adicionalmente a estes efeitos, os óleos essenciais mostram significantes propriedades antimicrobianas contra um amplo espectro de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (EDRIS, 2007). Dentre os componentes dos óleos essenciais mais avaliados para evitar o crescimento bacteriano, estão o cinamaldeído (**29**) (componente majoritário do óleo de canela), o geraniol (**30**), timol (**31**), mentol (**32**) e carvacrol (**33**) (Figura 11) (PÉREZ-VÁSQUEZ *et al.*, 2011; AL-BAYATI, 2009; ZOMORODIAN *et al.*, 2011).

Figura 11 - Componentes de óleos essenciais associados à atividade antimicrobiana. Cinamaldeído (**29**); geraniol (**30**); timol (**31**); mentol (**32**); carvacrol (**33**).



Fonte: adaptado de Bakkali *et al.* (2008).

1.4 Atividade antimicrobiana e microrganismos bucais

A abrangência da utilização de fitoterápicos e de plantas medicinais é vasta e engloba fins variados, também em relação à saúde bucal. Considerando as doenças periodontais, pode-se defini-las como, um processo infeccioso que resulta em uma resposta inflamatória (MONTEIRO *et al.*, 2002). Alguns microrganismos, tidos como patógenos periodontais possuem a capacidade de implantar-se no sulco gengival, produzindo substâncias tóxicas que degeneram o tecido periodontal (RUBIRA, 1993). O depósito de bactérias e a composição da placa bacteriana são relatados como etiologia da cárie dental e de várias formas da doença periodontal (LI *et al.*, 2004).

O biofilme dental é uma comunidade microbiana organizada, dentro de uma matriz complexa composta de produtos extracelulares microbianos e compostos salivares crescendo nas superfícies do esmalte (MARSH, 2005). O controle do biofilme bacteriano dentro das diversas especialidades odontológicas é de grande importância, pois aponta tanto para a prevenção, como para o tratamento, da cárie e de doenças periodontais (OLIVEIRA *et al.*, 1998).

Atualmente, existem vários métodos para avaliar a atividade antibacteriana de extratos vegetais e óleos essenciais. Os mais conhecidos são os métodos de difusão em ágar, macro e microdiluição (PINTO *et al.*, 2003). O método de microdiluição em caldo é considerado a melhor opção, comparado a diferentes técnicas mais comumente utilizadas nos laboratórios para avaliação de atividade antimicrobiana (ALVES *et al.*, 2008). Neste método, a atividade antimicrobiana de extratos e óleos essenciais é avaliada determinando-se a menor quantidade de extrato ou óleo necessária para inibir o crescimento do microrganismo-teste. Esse valor é conhecido como concentração inibitória mínima (CIM) (PINTO *et al.*, 2003).

Dados sobre a atividade antibacteriana de produtos vegetais, avaliados frente a microrganismos sensíveis e resistentes a antibióticos, bem como o possível efeito sinérgico da associação entre antibióticos e produtos de origem vegetal, foram observados e sugerem a necessidade de estudos detalhados sobre o uso terapêutico

das plantas (NASCIMENTO *et al.*, 2000; LANG; BUCHBAUER, 2012; BASSOLÉ; JULIANI, 2012).

1.5 Atividade citotóxica

A determinação da citotoxicidade é um procedimento importante na busca de substâncias que sejam menos tóxicas e mais seletivas com relação a uma atividade biológica.

As metodologias que utilizam células vivas são as mais empregadas. As células utilizadas podem ser de vários tecidos, tanto de origem humana quanto animal, sendo que a sobrevivência e/ou proliferação celular podem ser avaliadas por contagem do número de células ou pelo uso de corantes. A incorporação de radioisótopos, formação de colônias, aderência celular, produtos de metabolismo entre outros são parâmetros que também podem ser utilizados (RIDDELL *et al.*, 1986; DE ANGELIS *et al.*, 1986; SAOTOME *et al.*, 1989; NOSER, 1991; SASAKI *et al.*, 1991; HUSOY *et al.*, 1993).

A partir de ensaios *in vitro* é possível calcular a concentração que determina 50% de viabilidade celular (CC_{50}), e a relacionar com valores de CIM para o cálculo do índice de seletividade (IS). O IS é calculado pelo logaritmo da razão entre a CC_{50} e o valor de CIM ($IS = \log [CC_{50}] / [CIM]$). Um valor positivo representa maior seletividade contra microrganismos do que toxicidade celular, e um valor negativo, menor seletividade pelos microrganismos e maior citotoxicidade (CASE *et al.*, 2006).

1.6 Capacidade sequestrante do radical DPPH, teor de fenóis totais e proantocianidinas

As espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio têm um papel importante nas reações bioquímicas/fisiológicas do corpo humano. No entanto, se houver produção excessiva destas durante os processos fisiológicos e não existirem antioxidantes disponíveis *in vivo*, podem ocorrer processos que desencadeiam danos que podem levar a doenças (HUANG *et al.*, 2005; MOLYNEUX, 2004).

Antioxidantes são substâncias que retardam a velocidade da oxidação, através de mecanismos, como a complexação com metais (PIETTA, 2000). É crescente o interesse em substâncias que possuam propriedades antioxidantes e que possam ser fornecidas ao organismo humano como alimentos ou como suplementos preventivos.

Em plantas que possuem propriedades antioxidantes, são relatadas a presença de polifenóis, especialmente ácidos fenólicos e flavonóides (IGNAT, 2011). Neste contexto, as proantocianidinas são bioflavonóides encontrados em inúmeras plantas, conhecidas pela forte capacidade antioxidante e consideradas mais potentes que a vitamina C e E. As proantocianidinas têm um importante papel contra problemas circulatórios e também em patologias do sistema nervoso (NANDAKUMAR *et al.*, 2008; SERRANO *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2011). Compostos fenólicos estão diretamente relacionados à capacidade antioxidante, pois são formados por um ou mais anéis aromáticos substituídos com grupos hidroxilas, sendo capazes de quelar metais e sequestrar radicais livres (SANTOS, 2006).

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante *in vitro*, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas complexas potencialmente interessantes na prevenção de doenças crônico-degenerativas. Dentre estes métodos destaca-se o de sequestro de radicais livres, utilizando o radical DPPH, que é baseado na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006). Por este método há um descoramento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH de cor violeta quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio radicalar (HUANG *et al.*, 2005; BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995).

O método de Folin-Ciocalteou é empregado com o objetivo de detectar todas as classes de compostos polihidroxifenólicos. Como o reagente de Folin-Ciocalteou reage com compostos não fenólicos que também apresentam potencial antioxidante, muitos autores sugerem que este método seja empregado para determinar a capacidade antioxidante total (EVERETTE *et al.*, 2010).

O método utilizando a vanilina é empregado com o objetivo de detectar compostos fenólicos que apresentam ligação simples entre C2 e C3 e grupos hidroxila em posições alternadas no anel A de flavonoides, embora possa detectar tanto flavonoides monoméricos quanto poliméricos (Figura 3). Neste método, tanto as leucoantocianidinas (catequinas) quanto as proantocianidinas (taninos condensados) reagem com a vanilina na presença de HCl para produzir um produto de condensação vermelho, que pode ser detectado por espectrofotômetro (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2003).

1.7 Constituintes químicos da madeira e das cascas

A madeira é um biopolímero, formado por celulose, hemicelulose, lignina e uma menor quantidade de metabólitos secundários e materiais inorgânicos. (ROWELL *et al.*, 2005).

A composição química da casca é complexa e varia de acordo com a espécie. Análises químicas da casca para diferentes espécies indicam que seus compostos químicos podem ser classificados da seguinte maneira: polissacarídeos (celulose, hemicelulose e materiais pécticos); lignina e polifenóis; hidroxiácidos complexos (suberina); e os extrativos (graxas, óleos, fitoesteróis, resinas ácidas, ceras, taninos, terpenos, flobafenos e flavonóides) (ROWELL *et al.*, 2005).

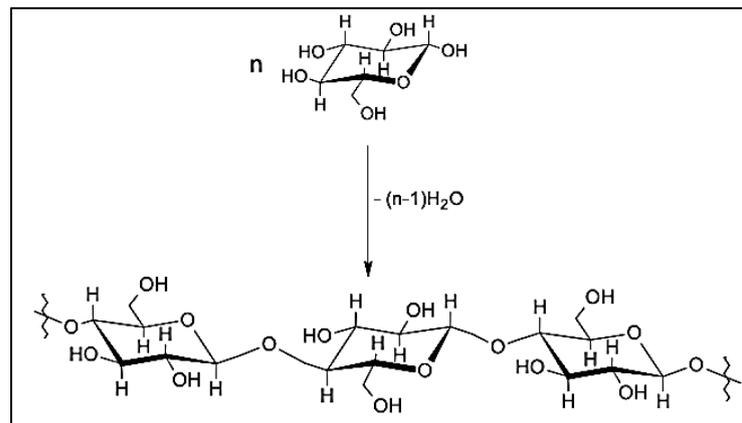
1.7.1 Holocelulose

A maior parte dos carboidratos da madeira e da casca são compostos por polímeros de celulose e hemicelulose, com menor quantidade de outros sacarídeos. A combinação de celulose e hemicelulose é chamada holocelulose (ROWELL *et al.*, 2005).

A celulose é o polímero natural mais abundante do planeta (ROWELL *et al.*, 2005). Sua cadeia é formada por unidades de β -glucose (Figura 12), resultando num polímero de alto peso molecular (300.000 a 500.000 Da). É o principal componente da

parede celular da fibra, com estrutura linear e constituída por um único tipo de sacarídeo (PENEDO, 1980).

Figura 12 – Esquema de formação da cadeia de celulose pela união de unidades β -D-glucose.



Fonte: Morais *et al.* (2005).

Hemiceluloses também são polissacarídeos, mas diferem da celulose por serem constituídas por vários tipos de unidades glucosídicas, além de serem ramificadas e presentes na madeira em menor grau de polimerização (peso molecular entre 25.000 e 35.000 Da) envolvendo as fibras da celulose (ROWELL *et al.*, 2005).

As hemiceluloses estão intimamente relacionadas à celulose e contribuem com os componentes estruturais da árvore (ROWELL *et al.*, 2005).

O termo hemicelulose não designa um composto químico definido, mas sim uma classe de componentes poliméricos presentes em vegetais fibrosos, possuindo, cada componente, propriedades peculiares. Como no caso da celulose e da lignina, o teor e a proporção dos constituintes das hemiceluloses podem variar entre espécies e também dentro da própria espécie (PHILIPP, 1988).

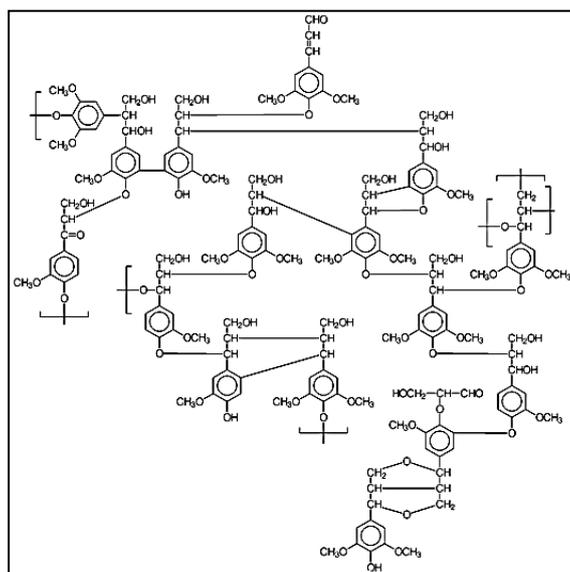
As hemiceluloses presentes na casca, na maioria dos casos, são similares às encontradas na madeira, com algumas variações na composição (ROWELL *et al.*, 2005).

1.7.2 Lignina

A lignina é o segundo polímero mais abundante do reino vegetal, sendo responsável pela resistência mecânica, transporte de nutrientes, água e metabólitos, além de oferecer proteção contra microrganismos (ROWELL *et al.*, 2005).

As ligninas são estruturas amorfas, complexas, formadas principalmente por unidades aromáticas de fenilpropano (Figura 13) (ROWELL *et al.*, 2005), sendo um constituinte da madeira que pode variar de 15 a 30%, dependendo da espécie vegetal. As ligninas são obtidas em larga escala como subproduto da indústria de polpação, cujo principal aproveitamento ainda é como fonte de energia, pela queima, em caldeiras de recuperação (ROWELL *et al.*, 2005).

Figura 13 - Exemplo de lignina: estrutura proposta para lignina da madeira de *Eucalyptus grandis*.



Fonte: Morais *et al.* (1993).

Alguns esquemas estruturais foram propostos para ligninas de diferentes tipos de madeira, gimnospermas e angiospermas. Foi verificado a partir destes estudos que, diferentemente da celulose e de outros polímeros naturais, as ligninas apresentam uma estrutura macromolecular cujas unidades monoméricas não se repetem de modo

regular. Além do mais, os monômeros encontram-se entrelaçados por diferentes tipos de ligações químicas (ROWELL *et al.*, 2005).

A estrutura das ligninas pode ser diferente, dependendo de sua localização no vegetal, havendo a contribuição de fatores topoquímicos, que influenciam em sua formação. Esses fatores podem afetar a quantidade relativa da ocorrência e a estrutura das ligninas (ROWELL *et al.*, 2005).

Sua estrutura tridimensional explica a rigidez e a resistência às forças de compressão, gerando uma estrutura resistente ao impacto, compressão e quebra ao conferir rigidez à parede da célula e, ao agir como um agente permanente de ligação entre as células. Pelo decréscimo que causa na permeação de água através das paredes das células dos tecidos condutores do xilema, a lignina tem uma atuação importante no intrincado transporte interno de água, nutrientes e metabólitos. Tecidos lignificados resistem ao ataque por microorganismos pelo impedimento à penetração de enzimas destruidoras da parede celular (PHILIPP, 1988).

O termo lignina refere-se a uma mistura de substâncias que têm composições químicas semelhantes, mas de estruturas diferentes. As ligninas presentes nas paredes celulares das plantas estão sempre associadas com as hemiceluloses, não só através da interação física como também pelas ligações covalentes (PHILIPP, 1988).

1.7.3 Extrativos

Os extrativos são compostos químicos da parede celular, geralmente formados a partir de graxas, ácidos graxos, álcoois graxos, fenóis, terpenos, esteróides, resinas, ceras, e alguns outros tipos de compostos orgânicos. Estes compostos existem na forma de monômeros, dímeros e polímeros. A maioria dos extrativos é responsável pela cor, odor e durabilidade da madeira. Geralmente, a ocorrência de extrativos é maior na casca e menor na madeira (ROWELL *et al.*, 2005).

1.7.4 Teor de cinzas

Cinzas é o resíduo inorgânico que permanece após a queima da matéria orgânica entre 600 e 850 °C. Os principais componentes das cinzas da madeira e da casca são: potássio, cálcio, magnésio, manganês, zinco, ferro, alumínio, cromo, níquel, sódio, fósforo, entre outros. Os metais são encontrados como carbonatos, silicatos, oxalatos e fosfatos. A casca contém maior porcentagem de conteúdo mineral do que a madeira (SJÖSTRÖM, 1993).

2 Objetivos

Como há poucos relatos científicos sobre a constituição química e atividades biológicas relacionadas à *Inga laurina* (Sw.) Willd., este trabalho teve como objetivo fornecer informações adicionais sobre esta espécie no que diz respeito à constituição química da madeira, cascas e dos óleos essenciais e ainda avaliar as atividades biológicas dos extratos brutos e compostos voláteis.

Neste contexto, foram delineados os seguintes objetivos específicos:

- a) quantificar os constituintes macromoleculares e teor de cinzas da madeira e das cascas;
- b) identificar os constituintes voláteis dos óleos essenciais das folhas e das cascas em diferentes períodos sazonais;
- c) avaliar a capacidade de sequestro do radical livre DPPH, o teor de fenóis totais e proantocianidinas dos extratos brutos etanólicos de folhas e cascas;
- d) avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos brutos etanólicos e dos óleos essenciais nos ensaios com microrganismos bucais aeróbicos e anaeróbicos (*Porphyromonas gingivalis*; *Prevotella nigrescens*; *Fusobacterium nucleatum*; *Actinomyces naeslundii*; *Bacteroides fragilis*; *Streptococcus mutans*; *S. sanguinis*; *S. salivarius*; *S. sobrinus*; *S. mitis*);
- e) avaliar a citotoxicidade dos óleos essenciais no ensaio *in vitro* com células Vero.

3 Metodologia

3.1 Coleta e preparo do material vegetal

Folhas, cascas e madeira de *I. laurina* foram coletadas próximo à rodovia BR-050 (18°59'13.96''S; 48°12'42.16''O), no município de Uberlândia-MG. A coleta foi feita de modo aleatório e de indivíduos diferentes, próximos uns dos outros. As exsicatas foram identificadas pelo professor Glein Monteiro de Araújo do Instituto de Biologia (UFU) e depositadas no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia (HUFU), com o seguinte número de registro: 64050.

As partes coletadas foram destinadas a análises macromoleculares (cascas e madeira) e a preparação dos extratos (cascas e folhas), sendo a madeira picada e triturada em moinho de bolas de porcelana e as cascas e folhas foram secas em estufa a 35 °C e posteriormente trituradas em moinho de facas. O material fresco (folhas e cascas) foi coletado sempre no período da manhã, entre 8 e 10 h, para a extração dos óleos essenciais. A coleta do material vegetal destinado à obtenção dos óleos essenciais foi feita em duas situações diferentes, nos meses de junho e julho, período considerado de estiagem na região de Uberlândia e nos meses de novembro e dezembro, período chuvoso. A coleta foi realizada em situações climáticas diferentes com o intuito de comparar as diferenças na constituição química dos óleos essenciais e seu desempenho contra os microrganismos bucais.

Foi feita a determinação da umidade utilizando uma balança de luz infravermelha da marca Kett, modelo FD-600, sendo que aproximadamente 1 g de amostra foi deixada a uma temperatura de 105 ± 5 °C por quinze minutos até que o teor de umidade permanecesse constante.

3.2 Determinação dos constituintes químicos da madeira e cascas de *Inga laurina*

3.2.1 Determinação do teor de cinzas

Para a determinação do teor de cinzas, aproximadamente 2 g de cascas e 2 g de madeira foram transferidas para cadinhos de porcelana previamente calcinados, esfriados e pesados. Em seguida foi feita a distribuição uniforme das amostras nos cadinhos e as mesmas foram incineradas na temperatura de aproximadamente 600 °C por 6 h. Após esta etapa foram calculadas as porcentagens de cinzas em relação ao pó que foi submetido ao processo de incineração (BROWNING, 1967). Este procedimento foi realizado por três vezes para cada amostra.

3.2.2 Preparação da amostra livre de extrativos

Amostras de 50 g de madeira e cascas foram colocadas em um cartucho de papel filtro e adaptado ao extrator Soxhlet. Foram realizadas três extrações com 300 mL dos solventes: cicloexano, cicloexano:etanol (2:1 v v⁻¹) e água, sucessivamente. A extração foi feita até a observação do aspecto incolor do solvente. Em seguida, o material vegetal livre de extrativos foi retirado do aparelho Soxhlet e deixado em dessecador até a evaporação completa do solvente que passava sobre o material vegetal. Este procedimento foi realizado em triplicata e as amostras livres de extrativos foram utilizadas na determinação de lignina insolúvel e lignina solúvel em ácido e determinação de holocelulose, hemiceluloses e α -celulose.

Para a determinação de lignina insolúvel, lignina solúvel em ácido e da holocelulose, hemiceluloses e α -celulose nas cascas é necessária a realização de um pré-tratamento da casca em meio básico para solubilizar as substâncias que são insolúveis em ácidos minerais e que seriam contabilizadas no rendimento final. Nesse pré-tratamento, 2 g (40/60 meshes) das cascas foram tratadas com uma solução de hidróxido de sódio 1% (m v⁻¹) a 90 °C, durante 1 hora. O resíduo obtido foi filtrado em funil de vidro sinterizado, lavado sucessivamente com 100 mL de água destilada quente, 50 mL de ácido acético 10% (v v⁻¹) e novamente com 200 mL de água quente, seco a 105 ± 3 °C e pesado (BROWNING, 1967). Em seguida, o rendimento foi calculado.

3.2.3 Determinação de lignina insolúvel em ácido (Lignina de Klason)

A lignina de Klason foi determinada de acordo com o método descrito por Browning (1967). Aproximadamente 1 g da amostra de cascas livre de extrativos e pré-tratada (40/60 meshes) ou 1 g de amostra de madeira foi colocada em um béquer e foram adicionados 15 mL de uma solução de ácido sulfúrico 72% ($v v^{-1}$), de forma lenta e sob agitação constante. A mistura foi agitada a cada 10 min por 2 h. Em seguida a mistura foi diluída num balão de destilação de 1 L com 560 mL de água, e refluxada por 4 h. Depois disso a solução foi resfriada, filtrada e o resíduo lavado com água destilada até pH neutro. O resíduo foi seco em estufa a 105 °C até massa constante. O teor de lignina insolúvel foi determinado pela diferença entre a massa pré-tratada e a massa do resíduo obtido.

3.2.4 Determinação de lignina solúvel

O filtrado do procedimento descrito no item 3.2.3 foi transferido para um balão de 1 L e completado com água destilada. A partir dessa solução, foi retirada uma alíquota de 10 mL e a ela foram adicionados 5 mL de água destilada. A partir dessa nova solução foi possível determinar quantitativamente a lignina solúvel por espectroscopia na região do ultravioleta (UV), a partir da análise das bandas de absorção nas regiões de 215 e 280 nm do espectro. Foi realizado um experimento utilizando o mesmo procedimento para determinação de lignina insolúvel, entretanto, sem a presença de cascas livres de extrativos (branco). A concentração de lignina solúvel foi calculada segundo a equação 1 (GOLDSCHIMID, 1971 apud MORAIS, 2005):

Equação 1:

$$C_{L.S.} = \frac{4,53 A_{215} - A_{280}}{300}$$

em que:

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

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

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

3.2.5 Determinação de holocelulose

O teor de holocelulose foi determinado pelo método descrito por Browning (1967). Inicialmente foi realizado o pré-tratamento das cascas livres de extrativos com solução de hidróxido de sódio 1% ($m v^{-1}$) como descrito no item 3.2.2. Em seguida, 5 g de cascas pré-tratadas ou 5 g de madeira (40/60 meshes) foram colocadas em um erlenmeyer de 1 L e foram adicionados 110 mL de água destilada, 3 mL de ácido acético glacial, 22 mL de solução de acetato de sódio a 20% ($m v^{-1}$) e 9 mL de solução de clorito de sódio 40% ($m v^{-1}$), respectivamente. A mistura foi homogeneizada com agitação magnética, vedada com um erlenmeyer de 100 mL invertido para evitar a saída de gases e colocada em banho aquecido a 75 °C, por 60 min., sob agitação frequente. A adição dos reagentes foi repetida por mais três vezes a cada intervalo de 60 min. Em seguida, a solução foi filtrada em funil de vidro sinterizado sob vácuo. O filtrado foi lavado com 1 L de água destilada, dois volumes de acetona (10 mL cada) e filtrado até a holocelulose ficar relativamente seca. O produto foi mantido em estufa a 70 °C, por 24 h. Em seguida, o rendimento foi calculado.

3.2.6 Determinação de hemiceluloses e α -celulose

As massas obtidas de holocelulose no processo descrito no item 3.2.5 foram pesadas e transferidas para um erlenmeyer de 250 mL. Sob atmosfera de nitrogênio, foram adicionados 100 mL de uma solução de hidróxido de potássio a 24% ($m v^{-1}$), a 25 °C. A solução foi homogeneizada, o frasco foi vedado e colocado em banho aquecido a 25 °C por 120 min., agitando-se a cada 10 min.. A mistura foi filtrada em funil de vidro sinterizado de porosidade média previamente tarado e o filtrado foi recolhido em um kitassato de 500 mL. Em seguida, o resíduo fibroso (α -celulose) foi lavado com 25 mL de solução de hidróxido de potássio (KOH) 24% ($m v^{-1}$), 50 mL de água destilada, 25 mL de solução ácido acético 10% ($v v^{-1}$) e água destilada até pH neutro. A seguir, o resíduo foi lavado com 50 mL de acetona e secado na estufa a 105 ± 5 °C até a massa permanecer constante. O resíduo obtido foi a α -celulose, sendo então

o seu rendimento calculado. O teor de hemiceluloses foi obtido por diferença entre o teor de holocelulose e de celulose (BROWNING, 1967).

3.3 Identificação dos compostos voláteis de *Inga laurina*

3.3.1 Extração dos óleos essenciais por hidrodestilação

Folhas ou cascas frescas foram cortadas e colocadas em um aparelho de Clevenger e o óleo essencial foi extraído com arraste de vapor por 4 h. A mistura água e óleo foi transferida para um funil de separação onde o óleo essencial foi extraído com cerca de 5 mL de diclorometano (MORAIS *et al.*, 2009). Em seguida, o óleo essencial foi seco com sulfato de sódio anidro, filtrado, deixado à temperatura ambiente para evaporação do diclorometano, acondicionado em frasco de vidro âmbar e armazenado à temperatura de -18 ± 5 °C até o momento da análise. A massa do óleo foi pesada em uma balança analítica para o cálculo do rendimento em relação à massa seca da amostra inicial.

3.3.2 Análise dos óleos essenciais por CG-EM

As amostras dos óleos essenciais foram analisadas em um cromatógrafo a gás acoplado à espectrômetro de massas (CG-EM) da marca Shimadzu, modelo GC17A/QP5010, equipado com coluna capilar da marca Supelco SPC-5 de 30 m de comprimento, 25 mm de diâmetro interno e 0,25 µm de espessura de filme. O gás carreador usado foi o hélio a fluxo constante de 1 mL min^{-1} , as temperaturas do injetor (modo split 1:20) e detector foram 220 e 246 °C, respectivamente e o volume de injeção foi 1 µL de óleo diluído em diclorometano na concentração de aproximadamente 10 mg/mL. A rampa de aquecimento foi de 60 a 246 °C (3 °C min^{-1}). O detector de massas operou com energia de impacto de 70 eV e foram registrados os fragmentos de 40 a 650 Da (ADAMS, 2007).

3.3.3 Identificação e quantificação dos componentes dos óleos essenciais

A identificação dos constituintes do óleo essencial foi baseada na comparação do espectro de massas obtido com os espectros das bibliotecas Wiley229, Nist08s, Wiley7 e Shim2205 e na comparação dos índices aritméticos (IA) calculados e tabelados na literatura. A equação utilizada no cálculo do IA (Equação 2) foi proposta por Van den Dool e Kratz em 1963 e adotada recentemente por Adams (ADAMS, 2007) por ser mais precisa que aquela utilizada no cálculo do índice de Kovats:

$$\text{Equação 2:} \quad \text{IA (x)} = 100 (\text{n}^\circ \text{ de carbonos do Pz}) + 100 \frac{t(x) - t(\text{Pz})}{t(\text{Pz}+1) - t(\text{Pz})}$$

Onde:

x = composto no momento t;	t (x)= tempo de retenção do composto em análise;
Pz = alcano antes de x;	t (Pz)= tempo de retenção do alcano antes de x;
Pz + 1 = alcano depois de x;	t (Pz+1)= tempo de retenção do alcano depois de x.

O tempo de retenção dos alcanos lineares, para a aplicação da equação em questão, foi obtido através da análise de padrões (C₈-C₃₀, pares e ímpares) injetados nas mesmas condições da amostra.

Primeiramente, foram selecionados os espectros de massas das diversas bibliotecas com índice de similaridade igual ou superior a 94%; em seguida, buscou-se na literatura o composto com índice aritmético igual ou próximo ao calculado (ADAMS, 2007; NIST, 2010; PHEROBASE,2003). Detalhes da identificação estão descritos no apêndice A.

A quantificação de cada componente foi obtida através da normalização das áreas dos picos no cromatograma de íons totais (TIC, total ions chromatogram). Os resultados representaram a média dos valores de três análises.

3.4 Preparação dos extratos

O material vegetal foi previamente seco e triturado e 900 g de folhas e 250 g de cascas foram usadas para preparação dos extratos. A preparação foi feita utilizando o

método de maceração e o solvente utilizado foi o etanol 95% na concentração final de 1:10 (pó da casca ou folha/solvente). Foram feitas 3 macerações repetidas por um período de 48 h cada. Ao final do processo de maceração, foi feita uma filtração simples utilizando papel filtro e em seguida o solvente foi evaporado em rotaevaporador sob pressão reduzida. Depois de secos os extratos foram liofilizados e o rendimento foi calculado.

3.5 Prospecção fitoquímica dos constituintes presentes nos extratos

Foram preparadas soluções metanólicas nas concentrações de 1 mg mL^{-1} de amostras de extratos brutos das cascas e folhas de *I. laurina*. As soluções foram aplicadas em placas de cromatografia de camada delgada, sendo a sílica a fase estacionária, e para detecção de determinadas classes de substâncias foram utilizados os seguintes reveladores preparados de acordo com a metodologia de Wagner e Blatt (1996):

a) anisaldeído-ácido sulfúrico (detecção de saponinas)

0,5 mL de anisaldeído foram misturados com 10 mL de ácido acético glacial. A esta mistura foi adicionado posteriormente 85 mL de metanol e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado, nesta ordem.

A placa foi borrifada com o revelador, aquecida a $100 \text{ }^\circ\text{C}$ por 5 a 10 min. e então analisada.

b) dragendorff (detecção de alcaloides)

Para revelação, foram preparadas duas soluções:

Solução A: Foram dissolvidos 0,85 g de nitrato de bismuto em 10 mL de ácido acético glacial e adicionados 40 mL de água destilada sob aquecimento.

Solução B: Foram dissolvidos 8 g de iodeto de potássio em 30 mL de água.

Solução estoque: Mistura de A e B (1:1).

Solução para pulverização: 1 mL da solução estoque foi misturada com 2 mL de ácido acético glacial e 10 mL de água.

c) ninidrina (detecção de aminoácidos)

Foram dissolvidos 30 mg de ninidrina em 10 mL de *n*-butanol seguido pela adição de 0,3 mL de ácido acético 98% ($v v^{-1}$).

A placa foi pulverizada com 10 mL do revelador, aquecida por 5 a 10 min. e então avaliada.

d) ácido fosfomolibdico (detecção de terpenóides)

Foi preparada uma solução de ácido fosfomolibdico em etanol a 20% ($m v^{-1}$).

A placa foi pulverizada com 10 mL da solução e então foi aquecida a 100 °C por 5 min. e depois observada.

e) liebermann-Burchard (detecção de triterpenos e esteroides)

5 mL de anidrido acético e 5 mL de ácido sulfúrico concentrado foram adicionados cuidadosamente a 50 mL de etanol absoluto, sob banho de gelo.

A placa foi pulverizada com 10 mL da solução, aquecida a 100 °C por 5 a 10 min. e então analisada em luz UV (365 nm).

f) NP/PEG (detecção de flavonoides)

Para revelação, foram preparadas duas soluções:

Solução A: Solução metanólica de difenilboriloxietilamina a 1% ($m v^{-1}$).

Solução B: Solução etanólica de polietileno glicol-4000 a 5% ($m v^{-1}$).

Solução para pulverização: Foram misturados 10 mL da solução A e 8 mL da solução B. Após a borrifação na placa, a análise foi feita sob luz UV (365 nm).

g) cloreto férrico (detecção de taninos e compostos fenólicos)

Foi preparada uma solução aquosa de cloreto férrico a 10% ($m v^{-1}$).

A placa foi borrifada com 10 mL da solução e então analisada.

3.6 Determinação do teor de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais presentes nos extratos etanólicos das cascas e folhas foi realizada por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965; SOUSA *et al.*, 2007) que contém uma mistura de ácidos fosfomolibídico e fosfotungstíco, com formação de um complexo de coloração azul com absorção máxima em 760 nm na presença de um agente redutor. Uma alíquota contendo 25 mg de amostra foi dissolvida em metanol, transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume final completado com o solvente. Para a reação colorimétrica, uma alíquota de 0,5 mL da solução metanólica do extrato foi misturada com 2,5 mL de solução aquosa do reativo Folin-Ciocalteu 10% (v v⁻¹) e 2 mL de solução de carbonato de sódio 7,5% (m v⁻¹). A mistura foi incubada por 5 min em banho-maria, a 50 °C e posteriormente a absorvância foi medida a 760 nm. Foi preparada uma solução contendo metanol e todos os reagentes com exceção da amostra (branco). O teor de fenóis totais foi determinado empregando-se a equação da reta obtida pela curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 µg mL⁻¹) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por grama de extrato.

3.7 Determinação do teor de taninos condensados (proantocianidinas)

Para a determinação dos taninos condensados foi utilizado o método da vanilina (GODEFROOT *et al.*, 1981 apud MORAIS *et al.*, 2009). Uma alíquota contendo 25 mg de amostra foi dissolvida em metanol, transferida para um balão volumétrico de 50 mL e o volume final completado com solvente. Desta solução foi retirada uma alíquota de 2 mL, transferida para um tubo de ensaio e adicionados a 3 mL de uma solução recém-preparada de vanilina em ácido sulfúrico 70% (v v⁻¹), na concentração de 5 mg mL⁻¹. A mistura foi mantida em banho-maria a uma temperatura de 50 °C (15 min.). A amostra foi esfriada e a absorvância medida a 500 nm. Foi preparada uma solução contendo metanol e todos os reagentes com exceção da amostra (branco). O

teor de taninos condensados foi determinado empregando-se a equação da reta obtida pela curva de calibração construída com padrões de catequina (1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A curva padrão foi construída nas mesmas condições da reação em que a amostra foi substituída pela catequina. Os resultados foram expressos como mg de ECAT (equivalentes de catequina) por grama de extrato.

3.8 Capacidade sequestrante do radical DPPH

A capacidade dos extratos etanólicos das cascas e folhas em sequestrar o radical livre DPPH foi analisada seguindo metodologia descrita na literatura, com modificações, monitorando-se o consumo deste radical pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorvância de soluções de diferentes concentrações. Estas medidas foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda 517 nm (BRAND-WILLIAMS *et al.*, 1995; SOUSA *et al.*, 2007).

3.8.1 Cálculo do CE_{50}

Soluções dos extratos preparadas em metanol nas concentrações de 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para folha e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para casca foram diluídas nas concentrações de 83, 66, 49, 32, e 15% a partir da amostra original (100%). As medidas das absorvâncias foram feitas das reações entre 0,3 mL das diluições das amostras e 2,7 mL da solução estoque de DPPH ($C = 40 \mu\text{g mL}^{-1}$), realizadas à 517 nm, a cada 5 min. até completar 1 h. A mistura de metanol (2,7 mL) e solução em metanol do extrato (0,3 mL) foi utilizada como branco. A partir dos valores de absorvância obtidos no tempo de 60 min. para cada concentração testada, foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes (% DPPH_{REM}), conforme a equação 3 (YILDIRIM *et al.*, 2001):

Equação 3:
$$\% \text{ DPPH}_{\text{REM}} = \frac{[\text{DPPH}]_{\text{T}=0} - ([\text{DPPH}]_{\text{T}=60} - \text{BRANCO})}{[\text{DPPH}]_{\text{T}=0}} \times 100$$

Onde:

$[DPPH]_{T=60}$: Absorvância do DPPH após a reação com o extrato;

$[DPPH]_{T=0}$: Absorvância do DPPH sem o extrato ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$);

BRANCO: Absorvância do extrato em metanol.

A concentração eficiente, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE_{50}), foi determinada a partir de uma curva linear de primeira ordem, obtida plotando-se no eixo das ordenadas as concentrações da amostra ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e no eixo das abscissas a porcentagem de DPPH remanescente (% $DPPH_{REM}$).

3.9 Atividade antimicrobiana

A metodologia utilizada na determinação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos e óleos essenciais consistiu em avaliar a menor quantidade de amostra necessária para inibir o crescimento dos microrganismos-teste. Esse valor é expresso como concentração inibitória mínima (CIM) (OSTROSKY, 2008).

A atividade antimicrobiana foi determinada utilizando o método da microdiluição em caldo, segundo o CLSI para os microrganismos aeróbios (CLSI, 2006) e CLSI para os microrganismos anaeróbios (CLSI, 2007). As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca (LaPeMA), com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins. Procedimentos de preparação dos meios de cultura e soluções estão descritos no Apêndice B.

3.9.1 Microrganismos utilizados nos ensaios

Para a determinação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos e óleos essenciais foram utilizadas as seguintes cepas padrão provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC): *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *S. mitis* (ATCC 49456), *S. mutans* (ATCC 25175), *S. sobrinus* (ATCC 33478), *S. salivarius* (ATCC 25975),

Actinomyces naeslundii, (ATCC 19039), *Fusobacterium nucleatum* (ATCC 25586), *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285), *Prevotella nigrescens* (ATCC 33533) e *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277) (Tabela 1).

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

Microrganismo/Cepas Padrão ATCC	Morfotipo	Meio de cultura do inóculo	Meio de cultura do teste
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	Coco Gram positivo	TSB Ágar	TSB
<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456	Coco Gram positivo	TSB Ágar	TSB
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Coco Gram positivo	TSB Ágar	TSB
<i>Streptococcus sobrinus</i> ATCC 33478	Coco Gram positivo	TSB Ágar	TSB
<i>Streptococcus salivarius</i> ATCC 25975	Coco Gram positivo	TSB Ágar	TSB
<i>Actinomyces naeslundii</i> ATCC 19039	Bacilo Gram positivo	Schaedler Ágar	Schaedler
<i>Fusobacterium nucleatum</i> ATCC 25586	Bacilo Gram negativo	Schaedler Ágar	Schaedler
<i>Bacteroides fragilis</i> ATCC 25285	Bacilo Gram negativo	Schaedler Ágar	Schaedler
<i>Prevotella nigrescens</i> ATCC 33563	Bacilo Gram negativo	Schaedler Ágar	Schaedler
<i>Porphyromonas gingivalis</i> ATCC 33277	Bacilo Gram negativo	Schaedler Ágar	Schaedler

3.9.2 Preparo das amostras para o método de microdiluição

Para a realização da técnica de microdiluição em microplaca, todas as amostras foram inicialmente preparadas com concentrações de 8000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (solução de partida). Para se obter esta concentração, foram dissolvidas 2 mg de cada amostra em 250 μL de dimetilsulfóxido (DMSO). Foram retirados 125 μL da solução de partida e

acrescentados a 1875 μL de caldo TSB, obtendo-se uma solução mãe para microrganismos aeróbicos de concentração $500 \mu\text{g mL}^{-1}$. Para a obtenção da solução mãe para microrganismos anaeróbicos, foram retirados 162,5 μL da solução de partida que foram acrescentados a 2437,5 μL de caldo Schaedler suplementado, sendo obtida também uma solução de concentração $500 \mu\text{g mL}^{-1}$.

3.9.3 Preparo do inóculo

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

3.9.4 Preparação do fármaco padrão

O fármaco padrão utilizado para validação da técnica foi o digluconato de clorexidina. Inicialmente foi pesado 1 mg do fármaco e diluído em 10 mL de água destilada esterilizada, tendo uma concentração final de $0,1 \text{ mg mL}^{-1}$. Em seguida, 1 mL dessa solução foi transferida para um tubo contendo 4 mL de caldo Schaedler suplementado; essa diluição apresentava concentração de $0,02 \text{ mg mL}^{-1}$ e foi considerada como solução estoque para realização da técnica. Foi levada em consideração a potência de 100% do fármaco.

3.9.5 Controles

Para a determinação de atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição, foi utilizado como controle positivo o digluconato de clorexidina. Para o

método de microdiluição em caldo, as concentrações de digluconato de clorexidina variaram de $0,0115 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $5,9 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Ainda foram realizados os seguintes controles: esterilidade dos caldos TSB e Schaedler; controle da cultura (inóculo); esterilidade da clorexidina; esterilidade dos extratos brutos e óleos essenciais e controle do DMSO (5 a 1%).

3.9.6 Método da microdiluição para determinação da concentração inibitória mínima

Todos os procedimentos foram realizados em capela de fluxo laminar, de acordo com as normas vigentes. As vidrarias, ponteiras e os meios de cultura foram esterilizados. Foram utilizadas microplacas estéreis com 96 poços. Cada poço recebeu inóculo, caldo triptona soja ou caldo Schaedler e amostra das soluções preparadas. O volume final em cada poço foi de $100 \mu\text{L}$ para os microrganismos aeróbicos e $200 \mu\text{L}$ para os anaeróbicos.

Foram avaliadas as amostras das soluções nas concentrações de 400 a $0,195 \mu\text{g mL}^{-1}$ e determinada a concentração mínima de cada amostra capaz de inibir o crescimento dos microrganismos.

As placas que continham bactérias aeróbicas foram seladas com parafilme e incubadas a $36 \text{ }^\circ\text{C}$ por 24 h em microaerofilia pelo sistema de chama/vela. Após o período de incubação, foram adicionados em cada poço $30 \mu\text{L}$ de resazurina (Sigma) preparada em solução aquosa (0,01%). Este sistema revelador permite a observação imediata da atividade antimicrobiana da amostra testada, sendo que a cor azul representa ausência de crescimento bacteriano e a cor vermelha, a presença de crescimento bacteriano. Os microrganismos anaeróbicos foram incubados por 48 a 72 h em câmara de anaerobiose, a $36 \text{ }^\circ\text{C}$. Em seguida, foi utilizado o mesmo revelador (resazurina) para a determinação das CIMs para os microrganismos anaeróbicos.

Todos os extratos brutos e óleos essenciais foram avaliados em triplicata. Dependendo do dia em que as análises foram feitas, pode não ter sido testado alguma microrganismo, neste caso, foi feita uma substituição por outra bactéria. Isso ocorreu

pelo fato de que uma bactéria pode não ter apresentado crescimento para a realização dos testes naquele dia.

3.10 Atividade citotóxica dos óleos essenciais

As análises foram realizadas no Laboratório de Biologia Celular de Tripanosomatídeos da UFU, com a colaboração do Prof. Dr. Claudio Vieira da Silva. O teste de viabilidade celular foi realizado com a célula Vero ATCC CCL 81 (fibroblastos de rim de macaco verde da África). Para avaliação da citotoxicidade dos óleos essenciais utilizou-se o método de diluição em microplaca. Procedimentos de preparação do meio de cultura utilizado estão descritos no Apêndice C.

3.10.1 Preparo das amostras

As amostras de óleos essenciais de *I. laurina* foram dissolvidas em metanol e diluídas no meio de cultura DMEM suplementado, sendo assim obtida uma solução mãe na concentração de $640 \mu\text{g mL}^{-1}$. A concentração final de metanol da solução mãe não excedeu 3%.

3.10.2 Teste de viabilidade celular

Foi preparada uma solução contendo 1×10^6 células em 10 mL de meio DMEM suplementado. Em seguida, foram pipetados 100 μL desta solução e transferidos para cada poço da análise. A placa foi incubada por 6 h a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO_2 , ocorrendo assim a adesão das células ao fundo do poço. Após a adesão, o meio de cultura foi retirado de cada poço e em seguida foram adicionadas as amostras nas concentrações a serem testadas: 512, 256, 128, 64, 32, 16, 8 e 4 $\mu\text{g mL}^{-1}$. O volume final de cada poço foi de 100 μL e a concentração de células presentes em cada poço foi de 1×10^4 células. A concentração final de metanol em cada poço não excedeu 3%.

Após ser preparada, a placa foi incubada por 48 h a 37 °C com atmosfera úmida e 5% de CO₂. Em seguida, foram adicionados 10 µL de solução reveladora de resazurina a 3 mM, em PBS, em cada poço da placa (GÓMEZ-BARRIO *et al.*, 2006), e novamente as placas foram incubadas por 24 h nas mesmas condições. A leitura da absorvância foi realizada a 594 nm em um espectrofotômetro de microplaca. O ensaio foi realizado em triplicata e a partir das absorvâncias de cada concentração testada, a viabilidade celular foi calculada de acordo com o controle de crescimento (controle positivo). A concentração citotóxica (CC₅₀) (concentração que apresenta 50% de viabilidade celular) foi calculada por meio de um gráfico dose-resposta com regressão não linear (CHIBALE *et al.*, 2007).

Para esta análise, foram realizados os controles de crescimento, do solvente, das amostras, controle negativo (100% de células lisadas) e controle do meio.

A partir de valores conhecidos de CC₅₀ e de CIM foi calculado o índice de seletividade (IS) (CASE *et al.*, 2006) através da seguinte equação:

Equação 4 :
$$IS = \log \frac{CC_{50}}{CIM}$$

3.11 Análises estatísticas

Os dados foram expressos como média ± DP para análises realizadas em triplicata. O teste t foi realizado para comparação do rendimento dos óleos essenciais. A comparação entre as médias foi realizada por Análise de Variância (ANOVA), seguida por teste de Holm Sidak para análises de CE₅₀, fenóis totais e proantocianidinas e teste Tukey para análises de CC₅₀ através do programa SigmaPlot 11.0. Valores de p ≤ 0,05 foram considerados para denotar diferença estatística significativa.

4 Resultados e Discussões

4.1 Determinação da umidade

Os resultados da perda de umidade por dessecação das matérias-primas vegetais estão descritos na tabela 2. Os teores encontrados estão próximos ou dentro dos valores de porcentagem de umidade ideais para fármacos vegetais (entre 8 e 14%) (FARMACOPÉIA BRASILEIRA IV, 1988).

Tabela 2 - Teor de umidade das partes de *I. laurina*.

Amostras	Umidade (%)
Folha	9,0 ± 0,9
Casca	12,8 ± 0,5
Madeira	7,4 ± 0,7

As porcentagens de umidade foram descontadas nos cálculos referentes à composição química da madeira e casca.

4.2 Determinação dos constituintes químicos da madeira e cascas de *Inga laurina*

O conhecimento dos teores lignocelulósicos de um determinado vegetal é importante, pois há inúmeras aplicabilidades em escala industrial. A partir destes materiais, é possível obter compostos aromáticos leves e combustíveis sólidos sem enxofre (a partir da lignina); gomas vegetais para a produção de espessantes, adesivos, emulsificantes, estabilizantes e outros produtos químicos, como precursores de polímeros (a partir da hemicelulose); glicose, com todos os seus derivados (etanol, ácidos orgânicos e solventes orgânicos; a partir da celulose) (KAMM; KAMM, 2004).

Para a análise da composição macromolecular é necessária a realização de uma extração para a obtenção do material vegetal livre de extrativos (KLOCK *et. al.*, 2005). Os extrativos são compostos químicos que não fazem parte da estrutura da parede celular, são solúveis em água ou em solventes orgânicos neutros e estão presentes

principalmente na casca (MORAIS *et al.*, 2005). A tabela 3 mostra a porcentagem de extrativos e a composição macromolecular encontrada para casca e madeira de *I. laurina*.

Tabela 3 - Composição química da casca e madeira de *I. laurina*.

		Casca	Madeira
Extrativos (%)	Cicloexano	1,09 ± 0,00	0,024 ± 0,003
	Cicloexano: etanol (2:1)	1,79 ± 0,07	1,19 ± 0,05
	Água	18,74 ± 0,27	10,57 ± 0,33
	Solução de NaOH 1%	28,08 ± 0,14	---
	Total de extrativos (TE)	49,70 ± 0,48	11,78 ± 0,38
	TE descontada a umidade (a)	42,05 ± 0,48	10,90 ± 0,38
Cinzas e Composição macromolecular (%)	Lignina insolúvel em ácido (b)	26,98 ± 2,74	26,36 ± 0,99
	Lignina solúvel em ácido (c)	0,42 ± 0,01	0,45 ± 0,06
	Holocelulose (d)	34,47 ± 1,47	61,67 ± 0,52
	α-celulose	23,30 ± 2,62	36,44 ± 4,82
	Hemiceluloses	11,17 ± 2,62	25,23 ± 4,82
	Cinzas (e)	3,47 ± 0,04	2,42 ± 0,02
	Total (a+b+c+d+e)	107,39*	101,80*

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão para análises realizadas em triplicata;

*Resultados acima de 100% são esperados para estas análises (BROWNING, 1967).

Os resultados obtidos mostram que as cascas apresentaram maior teor de extrativos que a madeira, com valores de 42,05% e 10,90% respectivamente. Segundo Rowell *et al.* (2005), as cascas geralmente apresentam maior teor de extrativos. Estudo recente de Cunha (2013) relacionado à *Cassia bakeriana*, uma espécie também pertencente à família Leguminosae, encontrou teor de extrativos de 53,88% para casca e 13,04% para madeira. Pinto *et al.* (2005) analisando outra espécie da mesma família (*Acacia mangium*) encontrou teor de extrativos de 9,83% para a madeira. Os

resultados do teor de extrativos de casca e madeira de *I. laurina* obtidos estão de acordo com aqueles relatados na literatura para outras espécies pertencentes à mesma família, já que resultados para plantas do mesmo gênero não foram encontrados na literatura para comparação.

A análise utilizada para a determinação dos componentes macromoleculares da madeira e casca de *I. laurina* foi somativa. Esta análise tem como objetivo separar e quantificar os componentes macromoleculares individualmente. Uma análise satisfatória é a soma de aproximadamente 100% para todos os componentes determinados. Este objetivo é difícil de ser alcançado, especialmente se o número de análises individuais aumenta. Pode ocorrer sobreposição de resultados combinados a erros individuais (BROWNING, 1967; KLOCK *et al.*, 2005). Na literatura são encontrados trabalhos que indicam valores de rendimento de análises somativas entre 98% e 107% (LAMOUNIER *et al.*, 2012; MARTINS, 2012; MORAIS *et al.*, 2005; FENGEL; WEGENER, 1989; CUNHA, 2013). Os valores totais dos constituintes da casca e madeira encontrados para a espécie *I. laurina* foram 107,39% e 101,80%, respectivamente.

A tabela 4 mostra a comparação dos constituintes macromoleculares estruturais (α -celulose, hemicelulose e lignina) e cinzas, presentes na madeira e casca de algumas árvores folhosas a partir de dados disponíveis na literatura.

Poucos trabalhos são encontrados com relação à composição macromolecular de cascas de árvores quando comparado a análises de madeira. Desta forma, somente o trabalho de Cunha (2013) relacionado à *C. bakeriana* e Vieira *et al.* (2009) relacionado à *T. pentaphyla* foram encontrados para fazer a comparação com dados obtidos no presente estudo. Para cascas de folhosas, os valores de lignina insolúvel (26,98%) e holocelulose (34,47%) obtidos estão de acordo com as porcentagens descritas pelos pesquisadores (Tabela 4). É importante ressaltar que as porcentagens de lignina solúvel, cinzas, α -celulose e hemicelulose para *I. laurina* se aproximam daquelas obtidas por Cunha (2013).

Tabela 4 - Comparação da composição química dos constituintes de casca e madeira de folhosas.

	Composição %	
	Casca de folhosas	Madeira de folhosas
Lignina insolúvel	15,0 - 42,0 ^{f, h}	21,0 - 40,0 ^{a-h}
Lignina solúvel	0,6 ^h	0,5 - 0,8 ^{e, h}
Holocelulose	27,4 - 42,0 ^{f, h}	41,0 - 71,9 ^{a-g, h}
α-celulose	20,3 ^h	34,8 - 59,2 ^{a-e, h}
Hemiceluloses	7,1 ^h	12,7 - 32,0 ^{a-d, h}
Cinzas	4,9 ^h	0,2 - 2,1 ^{c, e, g, h}

a. *Astronium urundeuva* (MORAIS *et al.*, 1999); b. *Cedrela fissilis* (MORAIS *et al.*, 2003); c. *Cecropia adenopus* (LONDE, 2004); d. *Moquinia polimorfa* (MORAIS *et al.*, 2005); e. *Acacia mangium* (PINTO *et al.*, 2005); f. *Tabebuia pentaphyla* (VIEIRA *et al.*, 2009); g. *Kielmeyera coriacea* (MARTINS, 2012); h. *Cassia bakeriana* (CUNHA, 2013).

Já na madeira, a porcentagem de lignina solúvel (0,45%) foi abaixo e a porcentagem de cinzas (2,42%) acima dos valores relatados por outros pesquisadores no estudo de folhosas (LONDE, 2004; PINTO *et al.*, 2005; MARTINS, 2012; CUNHA, 2013). Foram obtidos resultados semelhantes aos relatados na literatura para análise dos demais constituintes lignocelulósicos da madeira (MORAIS *et al.*, 1999; MORAIS *et al.*, 2003; LONDE, 2004; MORAIS *et al.*, 2005; PINTO *et al.*, 2005; VIEIRA *et al.*, 2009; MARTINS, 2012; CUNHA, 2013).

4.3 Identificação dos compostos voláteis de *Inga laurina*

O rendimento dos óleos essenciais de cascas e folhas de *I. laurina* em diferentes períodos está expresso na tabela 5.

Tabela 5 - Rendimento dos óleos essenciais de *I. laurina* em diferentes períodos.

Óleo	Rendimento (%)	
	Período de seca	Período chuvoso
Casca	0,00034 ± 0,00004 [*]	0,00049 ± 0,00017 [*]
Folha	0,00371 ± 0,00098	0,00307 ± 0,00110

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão para medidas realizadas em triplicata.

^{*}p ≤ 0,05 para comparações entre casca e folha.

A partir dos resultados obtidos, é possível observar que não houve diferença significativa no rendimento dos óleos extraídos das cascas e das folhas com relação ao período de coleta. Porém a quantidade de óleo presente nas folhas foi maior que nas cascas, tanto na seca, quanto no período chuvoso. Em ambos os casos, o rendimento foi considerado baixo quando comparado ao de espécies que têm o óleo essencial comercializado. Por exemplo, óleos cítricos, apresentam rendimento aproximadamente de 0,4% (SILVA-SANTOS *et al.*, 2006). Folhas de *Eucalyptus citriodora* têm rendimento do óleo variando entre 1,0 e 1,6% (VITTI; BRITO, 2003) e os óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum*) apresentam rendimento de 0,2 e 2,0%, respectivamente (KOKETSU *et al.*, 1997).

Assim como a espécie *I. laurina*, o Pau-Brasil (*Caesalpinia echinata*), também da família Leguminosae, apresentou baixo rendimento para o óleo essencial de folhas (0,006%) segundo estudos (REZENDE *et al.*, 2004).

A tabela 6 mostra a composição de óleos essenciais das cascas e folhas de *I. laurina* no período da seca. A tabela 7 apresenta a classificação dos compostos da tabela 6 por grupos funcionais.

Tabela 6 - Composição química do óleo essencial das cascas e folhas de *I. laurina* em período de seca.

Composto	TR	IA Referência	IA Calculado	Composição % TIC	
				Casca	Folha
butanoato de etila	3,41	802 ^b	807	3,03	-
(E)-hex-3-en-1-ol	4,28	852 ^a	853	-	1,09
(Z)-hex-3-en-1-ol	4,33	853 ^a	856	-	14,23
hexanol	4,56	863 ^b	868	-	5,69
álcool benzílico	9,48	1034 ^a	1041	-	1,46
linalol	11,90	1100 ^a	1105	5,17	-
hotrienol	12,02	1104 ^a	1108	-	1,74
(3E)(6Z)-nona-3,6-dien-1-ol	14,35	1160 ^a	1163	-	1,43
butanoato de (Z)-hex-3-enila	15,02	1184 ^b	1188	-	7,60
butanoato de hexila	15,64	1188 ^a	1194	-	1,95
α-terpineol	15,85	1195 ^a	1199	4,18	-
salicilato de metila	15,89	1196 ^a	1200	-	4,16
2-metilbutanoato de (Z)-hex-3-enila	17,42	1229 ^b	1235	-	2,06
geraniol	18,67	1254 ^a	1263	3,71	-
hexanoato de (Z)-hex-3-enila	23,22	1378 ^b	1383	-	8,29
hexanoato de hexila	24,10	1382 ^b	1388	-	3,47

hexanoato de (<i>E</i>)-hex-2-enila	24,25	1391 ^a	1391	-	0,91
N.I.	26,14	-	1436	-	2,19
N.I.	26,44	-	1443	3,94	-
N.I.	31,54	-	1568	-	1,70
benzoato de (<i>Z</i>)-hex-3-enila	31,85	1572 ^a	1576	-	10,15
benzoato de hexila	32,10	1579 ^b	1582	-	2,03
benzoato de (<i>E</i>)-hex-2-enila	32,41	1587 ^b	1590	-	1,73
hexadecano	32,80	1600 ^b	1600	4,57	-
sesquiterpeno oxigenado	33,13	-	1608	3,75	-
γ -eudesmol	34,36	1630 ^b	1640	3,48	-
heptadec-8-eno	34,47	1677 ^a	1675	7,66	-
heptadecano	35,24	1700 ^b	1700	2,79	-
N.I.	35,49	-	1703	-	1,32
N.I.	35,50	-	1704	4,33	-
N.I.	36,91	-	1708	4,88	-
pentadecanal	37,18	1717 ^a	1715	-	3,69
N.I.	39,28	-	1773	1,85	-
salicilato de 2-etilexila	40,63	1807 ^b	1810	3,25	-
hexahidrofarnesil-acetona (fitona)	41,20	1843 ^a	1846	3,90	1,24
hexadecanol	41,53	1874 ^b	1883	8,34	-
heptadecadienal	43,34	-	1889	-	1,78
salicilato de 3,3,5-trimetilcicloexila(homosalato)	43,42	-	1891	4,60	-
N.I.	43,55	-	1895	-	4,29
fitol	48,80	2114 ^a	2116	9,76	2,58
N.I.	51,85	-	2154	3,43	-
N.I.	53,32	-	2203	3,01	-
N.I.	55,11	-	2265	3,41	-
N.I.	56,35	-	2308	3,22	-
pentacosano	59,10	2500 ^b	2500	3,16	-
heptacosano	64,87	2700 ^b	2700	-	2,66
nonacosano	71,81	2900 ^b	2900	-	9,77
			Total (%):	99,42	99,21

N.I. = não identificado; TIC = total ions chromatogram; IA = índice aritmético; TR = tempo de retenção em min.

^a NIST Livro de Química na Web: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

^b Adams, 2007

Tabela 7 - Classificação, por grupos funcionais, dos componentes dos óleos essenciais das cascas e folhas de *I. laurina* no período de seca.

Grupos funcionais	Casca (%)	Folha (%)
álcool	8,34 (1)	23,90 (5)
éster	10,88 (3)	42,35 (10)
aldeído	-	5,47 (2)
cetona	3,90 (1)	1,24 (1)
monoterpeno oxigenado	13,06 (3)	1,74 (1)
sesquiterpeno oxigenado	7,23 (2)	-
diterpeno oxigenado	9,76 (1)	2,58 (1)
alceno de cadeia longa	10,52 (3)	12,43 (2)
alceno de cadeia longa	7,66 (1)	-
N.I.	28,07 (8)	9,50 (4)

N.I. = não identificado; números entre parêntesis se referem ao número de compostos de cada função.

Para o óleo da casca no período da seca, os terpenóides representaram 30,05% (Tabela 7) dos compostos analisados, sendo o fitol (**28**) (9,76%) o mais abundante (Figura 16). Além do composto **28**, outros terpenóides encontrados foram o linalol (**26**) (5,17%), α -terpineol (**34**) (4,18%), geraniol (**30**) (3,71%) e γ -eudesmol (**35**) (3,48%) (Figura 16). Estudos de Phutdhawong *et al.* (2004) mostraram que o óleo essencial de folhas frescas da espécie *Streblus asper* é constituído por 45,1% do composto **28** e apresentou atividade anticâncer quando testado em ratos com leucemia linfocítica. Já o composto **26**, tem grande importância na indústria de sabões e detergentes (WICHTEL, 2002), sendo largamente utilizado pela indústria de perfumaria e cosmética (CLARK, 1988) e também apresenta propriedades anticâncer (WATTENBERG, 1991), assim como o composto **30**, que evita a proliferação de células tumorais, especialmente no fígado e na pele (YU *et al.*, 1995). O composto **26** apresenta ainda atividade antinociceptiva (PEANA *et al.*, 2006) e óleos ricos neste composto apresentam atividade anti-inflamatória (GANAPATY *et al.*, 2004), antioxidante (SALLES-TREVISAN *et al.*, 2006; BASTOS *et al.*, 2006), anticonvulsante (ELISABETSKY *et al.*, 1995) e hipnótica (ROBBERS *et al.*, 1996), apresentando também propriedades ansiolíticas (SHAW *et al.*, 2007). O composto **34** é usado na indústria de perfumes, cosméticos sabões e agentes antissépticos (MADYASTHA; SRIVATSAN, 1988; WICHTEL, 2002). O composto **30**, além de ter propriedades antitumorais é usado na indústria de perfumes e aromatizantes (CHADHA; MADYASTHA, 1984) e em sinergismo com outros terpenóides, apresentou propriedades anti-inflamatórias segundo Ganapaty *et al.* (2004). O composto **35**, juntamente com outros terpenóides do óleo da folha da espécie *Litsea kostermansii*, apresentou atividade antimicrobiana (HO *et al.*, 2009). Contudo, os principais terpenóides encontrados no óleo da casca da espécie *I. laurina* no período da seca são amplamente usados em escala industrial e apresentam atividades biológicas importantes já relatadas na literatura. Outros componentes também considerados majoritários neste mesmo óleo foram o hexadecanol (**36**) (8,34%), usado na indústria de cosméticos (SMOLINSKE, 1992) e o heptadec-8-eno (**37**) (7,66%) (Figura 16), não sendo encontrado na literatura estudos sobre seu potencial farmacológico e industrial. É importante destacar também a presença do éster

homosalato (**38**) (4,60%) (Figura 16), usado em formulações de protetores solares (SARVEYA *et al.*, 2004).

Já na folha, para o mesmo período, a maioria dos compostos analisados foram ésteres, representando 42,35%. Os principais ésteres presentes foram o hexanoato de (Z)-hex-3-enila (**39**) (8,29%) e benzoato de (Z)-hex-3-enila (**40**) (10,15%) (Figura 16). Segundo Santos (1997), os ésteres apresentam potencial antifúngico, sedativo e podem ser poderosos agentes espasmolíticos. Além dos ésteres, o (Z)-hex-3-en-1-ol (**41**) (14,23%) e o nonacosano (**42**) (9,77%) (Figura 16) também estão presentes majoritariamente. A hexahidrofarnesil-acetona (fitona) (**43**) (Figura 16) foi encontrada tanto na folha quanto nas cascas no período da seca, representando respectivamente 1,24 e 3,90% da composição dos óleos. Óleos que apresentam este composto como majoritário geralmente apresentam boa atividade antimicrobiana (RADULOVIC *et al.*, 2006; LIOLIOS *et al.*, 2007) e alelopática (RAZAVIA; NEJAD-EBRAHIMIB, 2010).

A tabela 8 mostra a composição dos óleos essenciais das cascas e folhas de *I. laurina* no período chuvoso. A tabela 9 apresenta a classificação dos compostos da tabela 8 por grupos funcionais.

Tabela 8 - Composição química do óleo essencial das cascas e folhas de *I. laurina* em período chuvoso.

Composto	TR	IA Referência	IA Calculado	Composição % TIC	
				Casca	Folha
4-metilhexan-3-ona	3,99	-	840	1,19	-
(Z)-hex-3-en-1-ol	4,33	853 ^a	856	-	9,59
hexanol	4,56	863 ^b	868	-	0,70
N.I.	7,18	-	979	1,21	-
N.I.	7,79	-	1001	1,18	-
linalol	11,90	1100 ^a	1105	2,69	-
monoterpeno oxigenado	12,99	-	1140	7,80	-
butanoato de (Z)-hex-3-enila	15,02	1184 ^b	1188	-	0,59
hexanoato de (Z)-hex-3-enila	23,22	1378 ^b	1383	-	0,37
eremofileno	27,43	1464 ^a	1467	1,51	-
(E)-9-epi-cariofileno	27,67	1468 ^a	1473	1,36	-
sesquiterpeno	28,43	-	1491	1,40	-
(E)-nerolidol	30,48	1564 ^a	1568	-	0,28
ácido dodecanóico (ácido láurico)	30,73	1568 ^b	1575	5,80	0,43
tetradecanal	32,13	1611 ^b	1611	0,94	-
sesquiterpeno oxigenado	33,07	-	1637	1,27	-
N.I.	33,30	-	1644	1,29	-

N.I.	34,18	-	1668	1,83	-
heptadec-8-eno	34,47	1677 ^a	1678	3,48	-
heptadecano	35,24	1700 ^b	1700	1,68	-
sesquiterpeno oxigenado	35,57	-	1706	1,59	-
sesquiterpeno oxigenado	35,82	-	1713	2,01	-
N.I.	35,85	-	1714	-	0,43
sesquiterpeno oxigenado	36,99	-	1746	5,61	-
ácido Tetradecanóico (ácido mirístico)	37,85	1775 ^a	1771	4,06	0,32
hexahidrofarnesil-acetona (fitona)	41,20	1843 ^a	1846	1,99	0,61
hexadecanol	41,53	1874 ^b	1883	2,15	0,37
N.I.	42,77	-	1919	-	0,99
salicilato de 3,3,5-trimetilcicloexila(homosalato)	43,42	-	1939	3,87	-
N.I.	43,48	-	1941	1,16	-
isofitol	43,66	1946 ^b	1947	-	0,35
ácido hexadec-9-enóico (ácido palmitoleico)	43,69	1957 ^c	1948	1,58	-
N.I.	44,13	-	1962	1,04	-
ácido hexadecanoico (ácido palmítico)	44,50	1970 ^a	1972	25,40	15,20
N.I.	47,84	-	2082	-	0,87
N.I.	48,36	-	2099	-	0,80
fitol	48,80	2114 ^a	2116	1,39	33,21
ácido (9Z,12Z)-octadeca-9,12-dienóico(ácido linoleico)	49,59	2132 ^b	2140	3,58	1,19
ácido (Z)-octadec-9-enóico (ácido oleico)	49,65	2141 ^b	2144	5,52	2,33
N.I.	49,79	-	2149	-	2,78
ácido octadecanóico (ácido esteárico)	50,37	2170 ^a	2169	0,90	2,25
tricosano	53,88	2300 ^b	2300	-	0,43
pentacosano	59,10	2500 ^b	2500	0,89	-
heptacosano	64,87	2700 ^b	2700	0,69	3,33
octacosano	68,85	2800 ^b	2800	-	1,33
nonacosano	71,81	2900 ^b	2900	-	21,95
triacontano	73,96	3000 ^b	3000	0,95	-
Total (%)				99,01	100,7

N.I. = não identificado; TIC = total ions chromatogram; IA = índice aritmético; TR = tempo de retenção em min.

^a NIST Livro de Química na Web: <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

^b Adams, 2007

^c The Pherobase: Database of insect pheromones and semiochemicals: <http://www.pherobase.com/>

Tabela 9 - Classificação, por grupos funcionais, dos componentes do óleo essencial das cascas e folhas de *I. laurina* no período chuvoso.

Grupos funcionais	Casca (%)	Folha (%)
álcool	2,15 (1)	10,66 (3)
éster	3,87 (1)	0,96 (2)
aldeído	0,94 (1)	-
cetona	3,18 (2)	0,61 (1)
monoterpeno oxigenado	10,49 (2)	-
sesquiterpeno	4,27 (3)	-
sesquiterpeno oxigenado	10,48 (4)	0,28 (1)
diterpeno oxigenado	1,39 (1)	33,56 (2)
alceno de cadeia longa	4,21 (4)	27,04 (4)
alceno	3,48 (1)	-
ácido graxo	46,84 (7)	21,72 (6)
N.I.	7,71 (6)	5,87 (5)

N.I. = não identificado; números entre parêntesis se referem ao número de compostos de cada função.

Para o óleo da casca no período chuvoso houve abundância de terpenóides (26,63%), assim como no período de seca (Tabela 9). Os terpenóides mais abundantes identificados foram o **26** (2,69%), eremofileno (**44**) (1,51%), (*E*)-9-epi-cariofileno (**45**) (1,36%) e o **28** (1,39%) (Figura 16). No período chuvoso houve a presença majoritária de ácidos graxos (46,84%) (Tabela 9), o que não foi constatado no período de seca onde nenhum ácido graxo foi identificado (Figura 14). O ácido graxo de maior abundância foi o ácido hexadecanoico (ácido palmítico) (**46**) (Figura 16), representando 25,40% do total de compostos analisados, sendo o composto majoritário no óleo das cascas em período chuvoso.

Com relação ao óleo das folhas em período chuvoso, os terpenóides, que na seca estavam presentes de forma pouco significativa, passaram a ser os compostos mais abundantes (33,84%) (Tabela 9), sendo o **28** (33,21%) (Figura 16) o composto majoritário. A presença dos compostos **46** (15,20%) e **42** (21,95%) (Figura 16) também foi significativa.

Observa-se que nas cascas (Figura 14) e nas folhas (Figura 15), as proporções de ácidos graxos e ésteres são inversamente proporcionais na seca e na chuva. É possível que, baixas quantidades de ácidos graxos sejam decorrentes da utilização destes compostos, em adição aos álcoois, em reações de esterificação, aumentando assim a proporção de ésteres no óleo essencial. Altas proporções de ácidos graxos pode ser um indicativo de que, naquele momento, estes compostos não estão envolvidos em reações de esterificação, resultando em baixas concentrações de ésteres no óleo no período chuvoso.

A espécie *I. laurina* floresce entre os meses de setembro e novembro e frutifica entre os meses de dezembro e janeiro (POSSETTE; RODRIGUES 2010), período chuvoso. Segundo Santos (1997), altos níveis de ésteres são alcançados na maturidade do fruto/planta ou na floração. Porém, na espécie *I. laurina*, as quantidades de ésteres foram maiores tanto nas folhas quanto nas cascas em períodos vegetativos (seca) (Figuras 14 e 15), sendo que os ésteres foram encontrados nas folhas em maior quantidade (Figura 15). Estudos de Van Poecke *et al.* (2001) e Chen *et al.* (2003) mostraram que o salicilato de metila (**47**) (Figura 16) é um éster comumente emitido

de tecidos vegetativos sob o ataque de insetos e parasitas. Este composto também foi encontrado no óleo das folhas de *I. laurina* (4,16%) no período de seca. Segundo Matsunaga *et al.* (2008) o éster **38**, presente na casca de *I. laurina* na proporção de 4,60%, tem a função de proteger o DNA da radiação ultravioleta. Estes estudos nos levaram a acreditar que uma classe de compostos não desempenha uma função fixa na adaptação de um organismo vegetal. Ésteres, que usualmente se destacam pelo seu poder aromatizante, estão intimamente ligados ao processo reprodutivo da planta atraindo polinizadores e facilitando a dispersão de sementes, porém nada impede que estes compostos façam parte de um mecanismo de defesa. Dessa forma, outros ésteres, além de **38** e **47**, também podem atuar protegendo a planta. A presença de ésteres em maior quantidade no óleo essencial do período vegetativo de *I. laurina*, sobretudo nas folhas que são tecidos vegetais mais sensíveis estruturalmente, sugere que nesta espécie estes compostos atuem no mecanismo de defesa.

Figura 14 - Gráfico de comparação dos grupos funcionais encontrados nos óleos das cascas em período chuvoso e de seca.

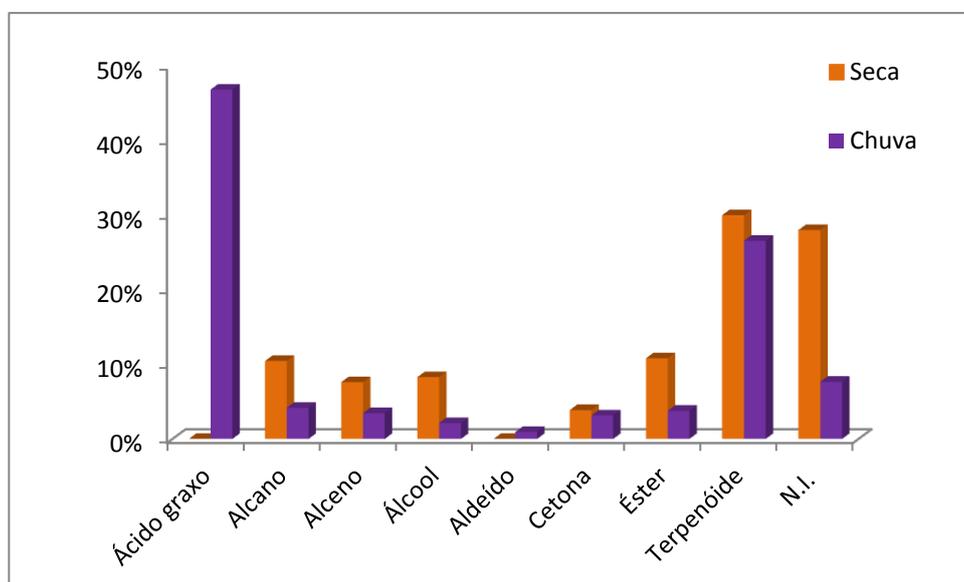
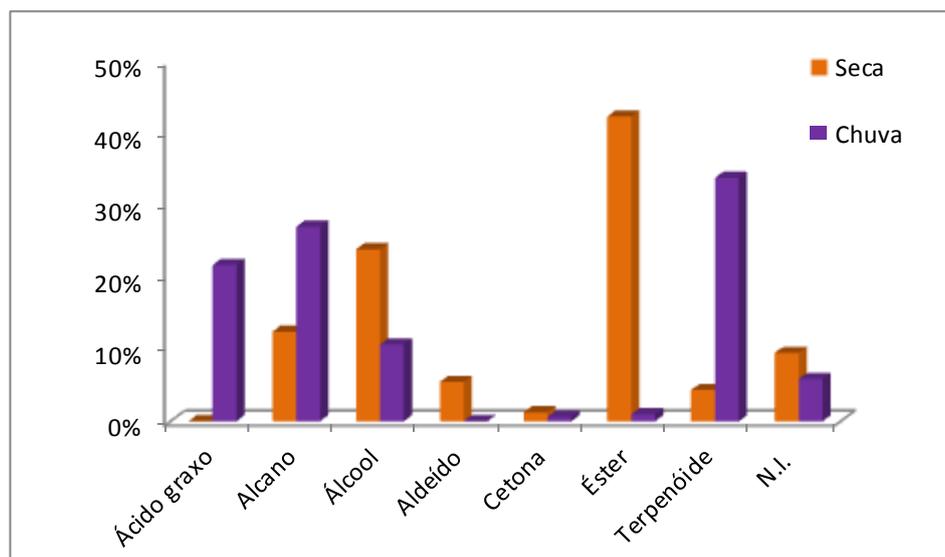


Figura 15 - Gráfico de comparação dos grupos funcionais encontrados nos óleos das folhas em período chuvoso e de seca.



Os principais constituintes químicos das ceras epicuticulares são *n*-alcanos, ésteres, álcoois e ácidos graxos (CHACHALIS *et al.*, 2001). Segundo Heredia *et al.* (1998), devido à sua composição química, as ceras se destacam como a principal barreira protetora contra perda de água por transpiração excessiva, ação de patógenos, radiações solares e entradas de produtos químicos e contaminantes. É possível que nos óleos essenciais, assim como nas ceras, o papel destes compostos sejam equivalentes, sendo por isso observada significativa proporção de alcanos, álcoois e ésteres nas folhas (Figura 15), pois é um tecido mais sujeito a perdas de água e a injúrias externas quando comparado à casca.

Os monoterpenóides e sesquiterpenóides produzidos por diversos grupos vegetais são metabólitos frequentemente sujeitos a fatores internos (genéticos) e externos como luminosidade, temperatura, tipo de solo, disponibilidade de água e outros (CARDOSO *et al.*, 2001).

A região de Uberlândia tem classificação climática Aw segundo Köppen, ou seja, o período de seca é característico do inverno e o chuvoso é característico do verão (TAVARES, 2008). No hemisfério sul, o solstício de Verão (22 de dezembro) e o solstício de Inverno (21 de junho) implicam em dias longos e curtos respectivamente. Um período maior ou menor de intensidade luminosa pode explicar a variação qualitativa

de terpenóides (Tabelas 6 e 8) quando os óleos das cascas ou folhas de *I. laurina* são comparados em diferentes períodos de coleta. Estudos mostram que a intensidade de luz é um fator que influencia a concentração e/ou composição de terpenóides (SPRING; BIENERT, 1987; KAROUSOU *et al.*, 1998; JOHNSON *et al.*, 1999; YAMAURA *et al.*, 1989).

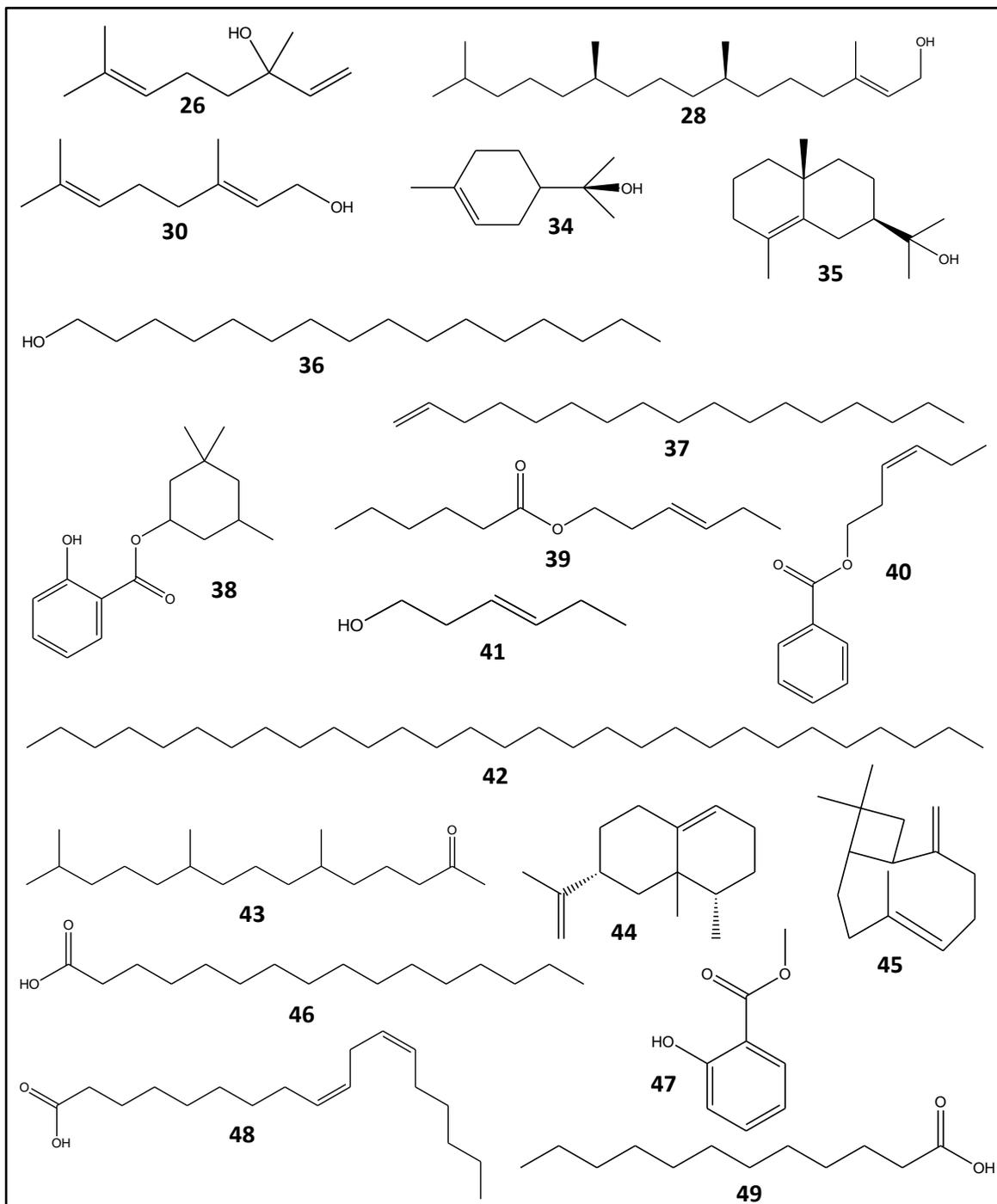
Com relação à concentração, o óleo das cascas não mostrou grandes variações de terpenóides nos diferentes períodos analisados (Figura 14). Já o óleo das folhas teve uma maior concentração de terpenóides no período chuvoso (luminosidade maior) (Figura 15). A síntese de alguns terpenóides ocorre especificamente em tricomas glandulares (MCCASKILL; CROTEAU, 1998) e a densidade destas estruturas na epiderme foliar pode ser um indicativo da capacidade de produção de óleos essenciais em determinadas espécies (TURNER *et al.*, 2000). Yamaura *et al.* (1989) e Ioannidis *et al.* (2002) demonstraram que no manjeriço (*Ocimum basilicum*) e no tomilho (*Thymus vulgaris*) o completo desenvolvimento de tricomas glandulares é luz-dependente. Dessa maneira é possível que na folha a produção de terpenóides tenha sido menor em um período de baixa intensidade luminosa devido ao desenvolvimento incompleto dos tricomas glandulares. Já na casca a produção de terpenóides provavelmente não é tão dependente de tricomas, sendo estes compostos produzidos e armazenados em outras estruturas, e, provavelmente por isso, suas concentrações foram aproximadamente constantes nos dois períodos analisados.

Conforme visto, o metabolismo secundário de plantas pode variar consideravelmente dependendo de vários fatores, sendo que a constância de concentrações de metabólitos secundários é praticamente uma exceção (SAKAMOTO *et al.*, 2005).

Não há nenhum relato na literatura de estudos feitos sobre o óleo essencial da espécie *I. laurina*. As espécies do gênero *Inga* são praticamente inexploradas quanto à caracterização de seus óleos essenciais e suas atividades biológicas, existindo, no seu conhecimento, somente um estudo disponível relatando a composição química do óleo das flores da espécie *Inga edulis* Mart., que apresentou como componentes

majoritários o **26** (20%), tricosano (11,4%) e o **46** (7,6%) (ZOGHBI *et al.*, 2001), sendo estes compostos também encontrados nos óleos de casca ou folha de *I. laurina*.

Figura 16 - Estruturas de compostos identificados nos óleos essenciais de *I. laurina*.



26. linalol; **28.** fitol; **30.** geraniol; **34.** α -terpineol; **35.** γ -eudesmol; **36.** hexadecanol; **37.** heptadec-8-eno; **38.** homosalato; **39.** hexanoato de (Z)-hex-3-enila; **40.** benzoato de (Z)-hex-3-enila; **41.** (Z)-hex-3-en-1-ol; **42.** nonacosano; **43.** fitona; **44.** eremofileno; **45.** (E)-9-epi-cariofileno; **46.** ácido palmítico; **47.** salicilato de metila; **48.** ácido linoleico; **49.** ácido láurico;

4.4 Prospecção fitoquímica

A tabela 10 mostra os resultados da prospecção fitoquímica dos constituintes nos extratos brutos etanólicos das folhas e cascas de *I. laurina*.

Tabela 10 - Prospecção fitoquímica do extrato bruto das folhas e cascas de *I. laurina*.

Classes de substâncias	EBEF	EBEC
alcaloides	-	-
aminoácidos	-	+
compostos fenólicos e taninos	+	+
flavonoides	+	+
saponinas	+	+
terpenóides	+	+
triterpenos e esteroides	+	+

+ : presença; - : ausência; **EBEF**: extrato bruto etanólico da folha;
EBEC: extrato bruto etanólico da casca.

No extrato etanólico da folha não foi constatada a presença de alcaloides e aminoácidos, já no extrato das cascas somente alcaloides estavam ausentes.

Os compostos fenólicos de plantas se enquadram em diversas categorias, tais como: fenóis simples, ácidos fenólicos (derivados de ácidos benzóico e cinâmico), cumarinas, flavonoides, estilbenos, taninos condensados e hidrolisáveis, lignanas e ligninas (SOUSA *et al.*, 2007). Observa-se que, pela prospecção fitoquímica, os extratos das cascas e folhas indicaram a presença de compostos fenólicos (Tabela 10). Estes compostos apresentam grupos hidroxila e carbonila na sua estrutura e por esse motivo solventes mais polares como o etanol são capazes de extrair estes compostos do material vegetal.

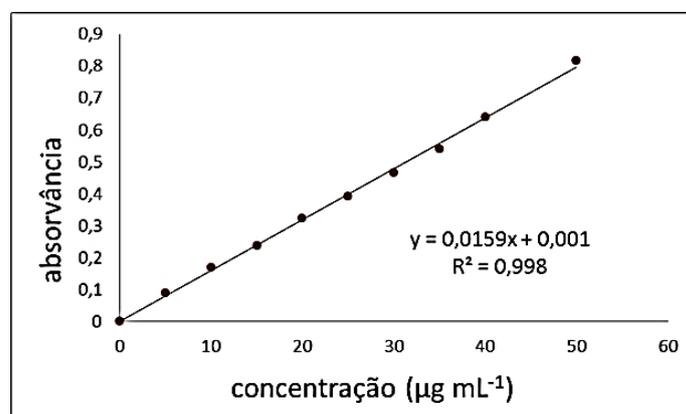
4.5 Capacidade sequestrante do radical DPPH, teor de fenóis totais e proantocianidinas

Os resultados da capacidade de sequestro do radical livre DPPH para os extratos brutos analisados foram expressos através das médias das concentrações efetivas (CE₅₀) que representa a concentração de amostra necessária para sequestrar

50% do radical livre DPPH. Assim, o valor do CE_{50} foi calculado a partir da equação 3 e os valores obtidos estão na tabela 11 para os extratos etanólicos das folhas e cascas.

O método Folin-Ciocalteu foi empregado com o objetivo de detectar todas as classes de compostos polidroxifenólicos. A partir da determinação das absorvâncias obtidas para diferentes concentrações de ácido gálico, foi traçada uma curva de calibração para a determinação do teor de fenóis totais nas amostras (Figura 17).

Figura 17 - Curva de calibração para a determinação espectrofotométrica de fenóis totais (método Folin-Ciocalteu).



A partir dos valores de absorvância medidos das amostras em 760 nm e empregando a equação da reta obtida pela curva de calibração do ácido gálico, foram obtidos os teores de fenóis totais, expressos em miligrama equivalente de ácido gálico por grama de amostra, mostrados na tabela 11.

Já o método da vanilina foi empregado com o objetivo de detectar uma classe mais limitada de compostos fenólicos denominada proantocianidinas (taninos condensados). A partir da determinação das absorvâncias de diferentes concentrações de catequina, foi construída uma curva de calibração (Figura 18).

A partir dos valores de absorvância medidos das amostras em 500 nm, e empregando-se a equação da reta obtida pela curva de calibração da catequina, os teores de proantocianidinas (taninos condensados) foram obtidos e expressos em miligrama equivalente de catequina por grama de amostra (Tabela 11).

Figura 18 - Curva de calibração para a determinação espectrofotométrica de proantocianidinas (método da vanilina).

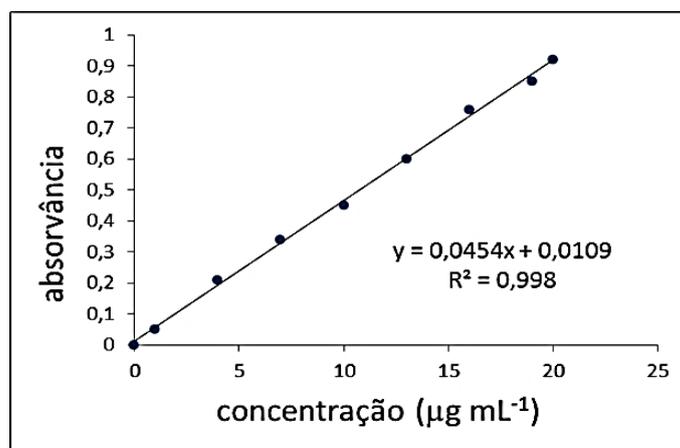


Tabela 11 - Valores de CE₅₀, fenóis totais, proantocianidinas e rendimentos obtidos para o extrato etanólico das folhas e cascas de *I. laurina*.

	CE ₅₀ ± DP (µg mL ⁻¹)	FT ± DP (mg de EAG/g _{extrato})	P ± DP (mg de ECAT/g _{extrato})	Rendimento da extração (%)
EBEF	10,43 ± 0,85 ^c	255,38 ± 0,29 ^a	37,91 ± 0,63 ^a	5,99
EBEC	3,48 ± 0,14 ^a	795,13 ± 2,05 ^b	207,35 ± 0,43 ^b	29,01
BHT	7,17 ± 0,34 ^b	---	---	---

Os dados são apresentados como média ± desvio padrão para testes realizados em triplicata. Diferenças significativas ($p \leq 0,05$) são indicadas com diferentes letras em cada coluna. **CE₅₀**: concentração eficiente; **FT**: fenóis totais; **P**: proantocianidinas; **EBEF**: extrato bruto etanólico das folhas; **EBEC**: extrato bruto etanólico das cascas; **BHT**: butilidroxitolueno, antioxidante sintético (controle positivo).

Analisando a tabela 11, é possível observar que extratos etanólicos das cascas e folhas mostraram valores de CE₅₀ estatisticamente diferentes entre si e ainda estatisticamente diferentes quando comparados ao BHT (controle positivo). O extrato bruto das cascas apresentou melhor capacidade sequestradora de DPPH quando comparado ao extrato das folhas e ao BHT. Extratos etanólicos de 16 espécies pertencentes a 5 famílias diferentes foram testados com relação a capacidade sequestradora de DPPH e os valores de CE₅₀ variaram de 11,56 até 184,92 µg mL⁻¹. Os melhores resultados obtidos foram para extrato das folhas de *Pseudopiptadenia*

contorta e para extrato das folhas de *Anadenanthera peregrina* com valores de CE_{50} de 13,84 e 11,56 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente (MENSOR *et al.*, 2001). Outro estudo, analisando 5 espécies, mostrou que para os extratos etanólicos o CE_{50} apresentou valores entre 27,59 e 111,14 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo o melhor resultado obtido para o extrato das cascas de *Terminalia brasiliensis* (SOUSA *et al.*, 2007). Extrato etanólico de caule e folhas de *Campomanesia pubescens* (Myrtaceae) apresentaram CE_{50} de 7,4 e 6,6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ respectivamente (CHANG *et al.*, 2011). A partir dos exemplos citados podemos observar que os extratos etanólicos de muitas espécies apresentam boa capacidade de sequestro do radical DPPH assim como *I. laurina* que apresentou resultados tão bons ou até melhores quanto aos valores de CE_{50} , quando comparados com o controle BHT.

Os conteúdos de fenóis totais e proantocianidinas foram diferentes estatisticamente entre o extrato etanólico das folhas e das cascas. Foi observado que, quanto maior o conteúdo fenólico, maior a capacidade de sequestro do radical DPPH (Tabela 11). *I. laurina* apresentou altos teores de conteúdo fenólico quando comparado aos extratos etanólicos de outras espécies. Por exemplo, *C. bakeriana* apresentou conteúdo fenólico de 696,5 e 184,82 mg de EAG/ g_{extrato} para cascas e folhas respectivamente (CUNHA, 2013). Extratos das cascas de *Eucalyptus globulus* e *Castanea sativa* indicaram teor de fenóis totais de 119 e 266 mg de EAG/ g_{extrato} , respectivamente (VÁZQUEZ *et al.*, 2008). Foi encontrado teor de fenóis totais de 115 mg de EAG/ g_{extrato} para extrato de folhas de *C. pubescens* (CHANG *et al.*, 2011). Porém, o estudo de Sousa (2007) mostrou que para extratos etanólicos das folhas de *Terminalia brasiliensis*, *Terminalia fagifolia*, *Cenostigma macrophyllum* e *Qualea grandiflora* o conteúdo fenólico variou de 394,90 até 667,90 mg de EAG/ g_{extrato} , sendo estas concentrações de compostos fenólicos maiores do que as encontradas para folhas de *I. laurina*.

O teor de proantocianidinas encontrado nos extratos de *I. laurina* foi maior quando comparado aos valores encontrados nos extratos etanólicos do caule e folhas de *C. pubescens*, com valores de 7,6 e 17,3 mg de ECAT/ g_{extrato} respectivamente (CHANG *et al.*, 2011). Já para *C. bakeriana* foram encontradas concentrações de 197,76 e 150,93 mg de ECAT/ g_{extrato} (CUNHA, 2013) para extratos etanólicos obtidos de cascas

e folhas respectivamente, sendo a concentração encontrada para as folhas maior quando comparada a concentração obtida para *I. laurina*.

Foi obtido um rendimento maior com relação à extração das cascas (29,01%) quando comparado à extração das folhas (5,99%) (Tabela 11).

Segundo Silva *et al.* (2007) e Vivot *et al.* (2001) extratos hidroetanólicos de folhas de *I. laurina* tem mostrado capacidade antioxidante e alta concentração de compostos fenólicos. Compostos fenólicos já foram identificados em diferentes espécies do gênero *Inga*, tais como ácido gálico e ácido elágico, isolados das folhas de *I. verna* (VIVOT *et al.*, 2001). Souza *et al.* (2007) e Dias *et al.* (2010) isolaram alguns compostos fenólicos nas folhas de *I. edulis*. Estes pesquisadores confirmaram por análises em HPLC a presença de proantocianidinas além de outros flavonóides glicosilados. Segundo Lokvam *et al.* (2007) tirosina e seus galoil depsídeos compreendem a grande maioria dos compostos fenólicos presentes em folhas jovens da espécie *I. laurina*. Estes pesquisadores isolaram galoil depsídeos de tirosina a partir de folhas jovens de *I. laurina*. Posteriormente, Rao *et al.* (2011) fizeram a síntese destes metabólitos e testaram sua capacidade antioxidante pelos métodos DPPH e NBT, obtendo bons resultados. É importante destacar que para *I. laurina* não foram encontrados relatos na literatura sobre análises das cascas. Em relação às folhas, a atividade antioxidante já avaliada se limitou especificamente à galoil depsídeos de tirosina, sendo necessário investigar a capacidade antioxidante de outros compostos fenólicos presentes nas folhas desta espécie.

A partir dos anos 80, deu-se início à pesquisas com antioxidantes naturais visando à substituição dos antioxidantes sintéticos (SILVA *et al.*, 2007), por estes apresentarem efeitos danosos ao organismo quando utilizados em doses elevadas (BROINIZI *et al.*, 2007). É importante que se faça uma investigação mais aprofundada da capacidade antioxidante da espécie *I. laurina*, visto que, ensaios realizados por este trabalho mostraram-se positivos. A partir de outros ensaios *in vitro* e *in vivo*, a espécie em estudo pode ser considerada uma potencial fonte de agentes antioxidantes naturais que pode ser empregada em substituição aos antioxidantes sintéticos.

4.6 Atividades antimicrobiana e citotóxica

4.6.1 Atividade antimicrobiana dos extratos das cascas e folhas de *Inga laurina*

Os resultados das concentrações inibitórias mínimas (CIM) dos extratos etanólicos das cascas e folhas de *I. laurina* nos ensaios com bactérias bucais aeróbicas e anaeróbicas estão apresentados na tabela 12.

Tabela 12 - Concentrações inibitórias mínimas ($\mu\text{g mL}^{-1}$) dos extratos etanólicos das cascas e folhas de *I. laurina*.

	Microrganismos	EBEC	EBEF	DC
Anaeróbicas	<i>P. gingivalis</i> ^a ATCC 33277	400	400	3,688
	<i>P. nigrescens</i> ^a ATCC 33563	400	400	1,844
	<i>F. nucleatum</i> ^a ATCC 25586	400	400	3,688
	<i>A. naeslundii</i> ^b ATCC 19039	>400	>400	1,844
	<i>B. fragilis</i> ^a ATCC 25285	>400	>400	1,844
Aeróbicas	<i>S. mutans</i> ^b ATCC 25175	>400	>400	0,922
	<i>S. sanguinis</i> ^b ATCC 10556	400	>400	3,688
	<i>S. salivarius</i> ^b ATCC 25975	200	200	0,922
	<i>S. sobrinus</i> ^b ATCC 33478	400	>400	1,844
	<i>S. mitis</i> ^b ATCC49456	>400	>400	3,688

Concentrações das amostras testadas = $0,195 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $400 \mu\text{g mL}^{-1}$; Concentrações do controle positivo = $0,0115 \mu\text{g mL}^{-1}$ a $5,9 \mu\text{g mL}^{-1}$. **EBEC**: Extrato bruto etanólico casca; **EBEF**: Extrato bruto etanólico folha; **DC**: Digluconato de clorexidina (controle positivo).

^a Gram-negativa; ^b Gram-positiva.

As concentrações inibitórias mínimas obtidas para os extratos etanólicos variaram de 200 até mais de $400 \mu\text{g mL}^{-1}$. O menor valor de CIM, $200 \mu\text{g mL}^{-1}$, foi

encontrado para *S. salivarius*, quando testados os extratos etanólicos das folhas e cascas. Para as bactérias testadas, as concentrações inibitórias para a maioria das amostras avaliadas foi igual ou maior que $400 \mu\text{g mL}^{-1}$.

Houve atividade de todos os extratos nos ensaios com os microrganismos bucais pelo método de microdiluição, porém, segundo Rios e Recio (2005), para extratos brutos de produtos naturais, somente atividades antimicrobianas com CIM abaixo de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ são consideradas ativas. Dessa forma, ainda que os resultados obtidos para extratos não estejam dentro da faixa de concentração estabelecida pelos autores, é possível sugerir a presença de princípios ativos importantes nas amostras analisadas, já que valores de CIM de 200 e $400 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram constatados, o que justifica a necessidade de estudos adicionais para o isolamento e avaliação da atividade antimicrobiana dos compostos puros.

Na literatura existem poucos estudos relacionados à atividade antimicrobiana de espécies do gênero *Inga*. Um destes estudos mostra que extratos acetato de etila e *n*-butanol de partes aéreas da espécie *I. fendleriana* inibiram bactérias Gram-positivas (*Staphylococcus epidermidis* e *S. aureus*) com valores de CIM variando entre 125 a $850 \mu\text{g mL}^{-1}$. Quando flavonoides desta mesma espécie foram isolados e testados contra as mesmas bactérias, os valores de CIM passaram a ter uma variação de 31 a $250 \mu\text{g mL}^{-1}$ (PISTELLI *et al.*, 2009).

O extrato etanólico das folhas de *I. laurina* já foi testado contra *Mycobacterium tuberculosis*, porém não foi considerado ativo (ANTOUN *et al.*, 2001). Álvarez *et al.* (1998) analisaram o extrato das cascas de *I. marginata* e mostraram que este não tem atividade contra *S. aureus*, *Escherichia coli*, *S. gallinarum*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella typhimurium*. O extrato etanólico de *I. vera* apresentou atividade inibitória pelo método de difusão em disco contra *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* (LOZANO *et al.*, 2013). A partir destes estudos, podemos observar que diferentes espécies de *Inga* apresentam atividade antimicrobiana diferente para o mesmo tipo de bactéria. É possível que os metabólitos secundários atuantes contra bactérias não sejam aqueles comuns a todo o gênero, mas sim metabólitos específicos de cada espécie. Contudo, este fato incentiva uma

investigação mais aprofundada de *I. laurina*, contribuindo para o conhecimento químico e farmacológico da espécie.

Em estudo realizado com uma espécie da mesma família de *I. laurina*, realizado por Cunha (2013), foram observados resultados promissores para a partição diclorometano, obtida das cascas de *Cassia bakeriana*, quando submetido aos ensaios de atividade antimicrobiana utilizando *S. sanguinis*, *S. sobrinus*, *B. Fragilis*, *A. naeslundii*, *F. Nucleatum* e *P. gingivalis* apresentando valores de CIM entre 12,5 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Porém, com o posterior fracionamento e isolamento, as moléculas puras apresentaram perda da atividade antimicrobiana. Contudo, *C. bakeriana* apresentou melhor atividade antimicrobiana quando comparada a extratos brutos de *I. laurina* nos ensaios com as mesmas bactérias bucais testadas.

4.6.2 Atividades antimicrobiana e citotóxica dos óleos essenciais das cascas e folhas de *Inga laurina*

Os resultados das concentrações inibitórias mínimas (CIM) nos ensaios com bactérias bucais aeróbicas e anaeróbicas e da atividade citotóxica dos óleos essenciais das cascas e folhas de *I. laurina* em diferentes períodos (seca e chuva) estão apresentados na tabela 13.

Os óleos das cascas e folhas do período chuvoso indicaram potencial atividade antibacteriana contra todas as bactérias aeróbicas (Gram-positivas) testadas, com CIM entre 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Extratos ou óleos de espécies vegetais, com valores de CIM inferiores a 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados promissores como potenciais agentes antimicrobianos (RIOS; RECIO, 2005).

Alguns compostos encontrados nos óleos essenciais do período chuvoso de *I. laurina*, já têm suas propriedades antimicrobianas relatadas na literatura, tais como o **41** e **26** (DORMAN; DEANS, 2000), os ácidos palmitoleico, **48** e **49** (OUTTARA *et al.*, 1997), (*E*)-nerolidol (SKAL TSA *et al.*, 2000), **46** (PAVITHRA *et al.*, 2009) e **28** (INOUE *et al.*, 2005). Geralmente as propriedades biológicas dos óleos essenciais são determinadas pelas características dos compostos majoritários (BAKKALI *et al.*, 2008).

Dos compostos citados, foi observado de forma majoritária, o **41** (9,59%) na folha, o **49** (5,80%) na casca e o **46** em ambos, cascas (25,40%) e folhas (15,20%). No óleo essencial das folhas, além do composto **28** (33,21%), destacou-se a presença do **42** (21,95%) e, embora nenhuma propriedade antimicrobiana tenha sido relatada na literatura, é possível que este composto possa estar atuando como antimicrobiano.

Tabela 13. Concentração inibitória mínima ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e concentração citotóxica ($\mu\text{g mL}^{-1}$) de óleos essenciais das cascas e folhas de *I. laurina* em diferentes períodos, seca e chuva.

Microrganismos	Seca		Chuva		DC*	
	Cascas	Folhas	Cascas	Folhas		
Anaeróbicos	<i>P. gingivalis</i> ^a ATCC 33277	100	100	100	50	3,688
	<i>P. nigrescens</i> ^a ATCC 33563	200	100	400	100	1,844
	<i>F. nucleatum</i> ^a ATCC 25586	-	-	400	200	3,688
	<i>A. naeslundii</i> ^b ATCC 19039	>400	>400	>400	400	1,844
	<i>B. fragilis</i> ^a ATCC 25285	>400	>400	-	-	1,475
Aeróbicos	<i>S. mutans</i> ^b ATCC 25175	200	200	25	50	0,922
	<i>S. sanguinis</i> ^b ATCC 10556	200	100	50	50	3,688
	<i>S. salivarius</i> ^b ATCC 25975	-	-	25	25	0,922
	<i>S. sobrinus</i> ^b ATCC 33478	200	200	25	25	1,844
	<i>S. mitis</i> ^b ATCC 49456	100	100	-	-	3,688
Atividade citotóxica	Células Vero ATCC CCL 81	456 ± 9	227 ± 16	>512	>512	-----

Concentrações das amostras testadas = 0,195 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$; Concentrações do controle positivo = 0,0115 $\mu\text{g mL}^{-1}$ a 5,9 $\mu\text{g mL}^{-1}$. DC: Digluconato de clorexidina (controle positivo).

^a Gram-negativa; ^b Gram-positiva.

Resultados importantes também foram obtidos quando testados os óleos das cascas e das folhas nos diferentes períodos contra uma das bactérias anaeróbicas, *P. gingivalis*, que apresentou CIM variando entre 50 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, sendo o melhor

resultado ($50 \mu\text{g mL}^{-1}$) obtido para o óleo das cascas coletadas no período chuvoso. Valores de CIM de $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ foram encontrados contra as bactérias *P. nigrescens*, *S. sanguinis* e *S. mitis* quando testado o óleo das folhas coletadas no período da seca, e contra as bactérias *P. nigrescens* e *S. mitis*, quando testado o óleo das cascas em diferentes períodos. A obtenção de bons resultados de inibição frente a algumas bactérias (CIM = $100 \mu\text{g mL}^{-1}$) também para óleos obtidos no período da seca, pode ser devido a presença de **41** nas folhas numa proporção de 14,23% e **26** nas cascas, 5,17%. Tais compostos, como já mencionado, apresentam atividade antimicrobiana comprovada (DORMAN; DEANS, 2000). Além disso, nestes óleos foi constatada a presença de **47**, **30** e **35** que apresentam propriedades antimicrobianas quando presentes em óleos essenciais de acordo com estudos de Yoon *et al.* (2009), Rath *et al.* (2008) e Ulusoy *et al.* (2009).

Álcoois possuem atividade bactericida atuando potencialmente como agentes desnaturantes de proteínas (PELCZAR *et al.*, 1988). É possível que este seja o meio pelo qual o **41** tenha atuado como antimicrobiano, sendo que este composto está presente em altas concentrações nos óleos das folhas em ambos os períodos (seca e chuva).

É notável que, no período chuvoso, os óleos essenciais de *I. laurina* mostraram uma atividade antimicrobiana melhor quando comparado ao período de seca. Isto se deve ao fato de que, em períodos sazonais diferentes, a planta sintetiza compostos diferentes, devido as suas necessidades de adaptação às condições climáticas e ambientais. Uma diferença marcante, tanto para as folhas quanto para as cascas, foi a presença de ácidos graxos na chuva e ausência total destes compostos na seca (Figuras 14 e 15). Estudos têm mostrado que ácidos graxos possuem atividade antibacteriana contra muitos microrganismos (KABARA, 1981; SHELEF *et al.*, 1980; RUSSEL, 1991). Para ácidos graxos saturados, grupos hidrofóbicos têm mostrado grande influência na atividade antimicrobiana (BRANEN *et al.*, 1980), mas o aumento da hidrofobicidade com o aumento da cadeia pode reduzir sua solubilidade no sistema aquoso. O ideal é que se tenha um composto onde há um equilíbrio entre grupos hidrofóbicos, para que ocorra a interação com proteínas hidrofóbicas e lipídeos da superfície bacteriana (WANG; JOHNSON, 1992), e grupos hidrofílicos, para permitir a solubilidade nos

sistemas aquosos, onde ocorre o crescimento dos microrganismos. Segundo Branen *et al.* (1980) e Kabara *et al.* (1977), o **49**, encontrado no óleo essencial da casca de *I. laurina* no período chuvoso, apresenta o balanço ideal de grupos hidrofílicos e hidrofóbicos, atuando assim como um bom agente antimicrobiano. Os ácidos graxos presentes nos óleos essenciais de cascas e folhas de *I. laurina* coletadas no período chuvoso, podem ser os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana destes óleos.

Alguns terpenóides, sobretudo os oxigenados, apresentam propriedades antimicrobianas (NAIGRE *et al.*, 1996). Estudos sugerem que a capacidade antimicrobiana deste grupo de compostos se deve à suas propriedades lipofílicas (KNOBLOCH *et al.*, 1986) e sua solubilidade em meio aquoso (KNOBLOCH *et al.*, 1988). Nota-se que, por serem compostos presentes nos óleos de *I. laurina*, não podemos descartar a influência que podem exercer sobre o efeito inibitório encontrado. É ainda importante destacar que, no óleo das folhas coletadas no período chuvoso, o componente majoritário é o **28** (33,21%), um diterpeno oxigenado. Tal composto pode ser o responsável pela atividade antimicrobiana.

A atividade antimicrobiana pode estar relacionada a um metabólito específico presente na composição do óleo ou ainda em sinergismo com outros compostos presentes na mistura (DAVIDSON; PARISH, 1989; GILL *et al.*, 2002; MOUREY; CANILLAC, 2002). Os compostos não identificados nos óleos também podem estar contribuindo para o efeito antimicrobiano.

Foi estabelecida uma relação entre a citotoxicidade e atividade antimicrobiana através do índice de seletividade (IS). Para os óleos essenciais considerados ativos com relação à atividade antimicrobiana (CIM igual ou inferior a $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), foram obtidos os seguintes valores de IS: 0,66 (CIM = $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), para óleos essenciais das cascas coletadas no período de seca; 0,36 (CIM = $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), para óleos essenciais das folhas coletadas no período de seca; 0,70 (CIM = $100 \mu\text{g mL}^{-1}$), 1,01 (CIM = $50 \mu\text{g mL}^{-1}$) e 1,31 (CIM = $25 \mu\text{g mL}^{-1}$) para os óleos essenciais de folhas e cascas coletadas no período chuvoso. Todos os valores de IS foram positivos, indicando que os óleos

essenciais mostraram maior seletividade pelos microrganismos que toxicidade para as células Vero.

5 Conclusões

As porcentagens dos constituintes químicos da madeira e das cascas encontradas para *I. laurina* (Sw.) Willd. são próximas daquelas obtidas para outras espécies de folhosas.

É possível inferir que os compostos fenólicos presentes nos extratos de cascas e folhas de *I. laurina* sejam os principais responsáveis pelo sequestro dos radicais DPPH. No entanto, são necessárias investigações adicionais sobre a capacidade antioxidante dos metabólitos presentes nos extratos, visto que apresentaram valores de CE_{50} equivalentes ao do BHT.

Os óleos essenciais de *I. laurina* apresentam baixo rendimento e os dados obtidos mostram que o conteúdo de metabólitos secundários varia com relação a mudanças sazonais. Esta variação qualitativa e quantitativa de metabólitos se refletiu na eficácia destes óleos com relação à inibição do crescimento de microrganismos bucais. A melhor ação bacteriostática apresentada pelos óleos essenciais do período chuvoso pode ser explicada pela maior quantidade de ácidos graxos presentes nos óleos obtidos neste período. Os óleos essenciais indicaram alta seletividade contra patógenos orais e baixa toxicidade para células Vero. Assim, óleos essenciais de *I. laurina* podem ser empregados no controle do biofilme bacteriano, auxiliando na prevenção da cárie e de doenças periodontais. Em contrapartida, os extratos brutos etanólicos das cascas e folhas não apresentam interessante atividade antimicrobiana com relação a bactérias avaliadas neste estudo.

Dessa forma, foram observados resultados promissores nos ensaios realizados com *I. laurina*, o que incentiva investigações mais aprofundadas desta espécie.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry**. 4. ed. Illinois USA: Allured Publishing Corporation, Carol Stream, 2007.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; LIMA, A.; LIMA, M. V. Determinação de taninos em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 5, p. 763-765, 2003.
- AL-BAYATI, F. A. Isolation and identification of antimicrobial compound from *Mentha longifolia* L. leaves grown wild in Iraq. **Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials**, London, v. 8, n. 20, 2009.
- ALVAREZ, J. C.; SERRANO, R. P.; OSPINA, L. F.; TORRES, L. A. A. Biological activity of saponins from the bark of *Inga marginata* Willd. **Revista Colombiana de Ciências Químico-Farmacêuticas**, Bogotá, v. 27, p. 17-19, 1998.
- ALVES, H. M. A diversidade química das plantas como fonte de fitofármacos. **Cadernos Temáticos de Química Nova na Escola**, São Paulo, v. 3, p. 10-15, 2001.
- ALVES, E. A.; VINHÓLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substância puras de *Miconia*. **Química Nova**, São Paulo, v. 31, p. 1224-1229, 2008.
- ANTOUN, M.D.; RAMOS, Z.; VASQUEZ, J.; OQUENDO, I.; PROCTOR, G. R.; GERENA, L.; FRANZBLAU, S.G. Evaluation of the flora of Puerto Rico for *in vitro* antiplasmodial and antimycobacterial activities. **Phytotherapy Research**, Malden, v. 15, p. 638-642, 2001.
- BAKKALI, F.; AVERBECK, S.; AVERBECK, D.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils : a review. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, n. 2, p. 446-475, 2008.
- BASSOLÉ, I. H. N.; JULIANI, H. R. Essential oils in combination and their antimicrobial properties, **Molecules**, Basel, v. 17, p. 3989-4006, 2012.
- BASTOS, D. H. M.; ISHIMOTOA, E. Y.; MARQUESB, M. O. M.; FERRIB, A. F.; TORRES, E. A. F. S. Essential oil and antioxidant activity of green mate and mate tea (*Ilex paraguariensis*) infusions. **Journal of Food Composition and Analysis**, San Diego, v. 19, p. 538-543, 2006.
- BENTHAM, G. Mimosaceae. In: MARTIUS, C. F. P. V.; ENDLICHER, A. W.; URBAN, I. **Flora brasiliensis**. Munich: F. Fleisher, 1876, v. 15, p. 258-527.
- BILIA, D. A. C.; BARBEDO, C. J.; CÍCERO, S. M.; MARCOS-FILHO, J. Ingá: uma espécie importante para recomposição vegetal em florestas primárias, com sementes interessantes para a ciência. **Informativo Abrates**, Brasília, v. 1, n. 13, p. 26-30, 2003.

- BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food science and technology**, London, v. 28, p. 25-30, 1995.
- BRANEN, A. L.; DAVIDSON, P. M.; KATZ, B. Antibacterial properties of phenolic antioxidants and lipids. **Food Technology**, Chicago, v. 34, p. 51–53, 63, 1980.
- BROINIZI, P. R. B.; WARTHA, E. R. S. A.; SILVA, A. M. O. E.; NOVOA A. V.; TORRES, R. P.; AZEREDO, H. M. C.; ALVES, R. E.; MANCINI-FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 902-908, 2007.
- BROWNING, B. L. **Methods of wood chemistry**. New York: Interscience Publishers, v. 2, 1967.
- CALDERON, L. A.; TELES, R. C. L.; LEITE, J. R. S. A.; BLOCH, C.; ASTOLFI-FILHO, S.; FREITAS, S. M. Serine protease inhibitors from Amazon Leguminosae seeds: purification and preliminary characterization of two chymotrypsin inhibitors from *Inga umbratica*. **Protein and Peptide Letters**, Hilversum, v. 8, p. 485-493, 2001.
- CARAMORI, S. S.; SOUZA, A. A.; FERNANDES, K. F. Caracterização bioquímica de frutos de *Inga alba* (Sw.) Willd. e *Inga cylindrica* Mart. (Fabaceae). **Revista Saúde e Ambiente**, Cuiabá, v. 9, p. 16-23, 2008.
- CARDOSO, M. G.; SHAN, A. Y. K. V.; PINTO, J. E. B. P.; DELU FILHO, N.; BERTOLUCCI, S. K. V. **Metabólitos secundários vegetais: visão geral, química e medicinal**. Texto acadêmico. Lavras-MG: Editora UFLA-Lavras, v. 1, 2001.
- CASE, R. J.; FRANZBLAU, S. G.; WANG, Y.; CHO, S. H.; SOEJARTO, D. D.; PAULI, G. F. Ethnopharmacological evaluation of the informant consensus model on anti-tuberculosis claims among the Manus. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 106, n. 1, p. 82–89, 2006.
- CHACHALIS, D.; REDDY, K. N.; ELMORE, C. D. Characterization of leaf surface, wax composition, and control of redvine and trumpet creeper with glyphosate. **Weed Science**, Champaign, v. 49, p. 156-163, 2001.
- CHADHA, A.; MADYASTHA, K. M. Metabolism of geraniol and linalool in the rat and effects on liver and lung microsomal enzymes. **Xenobiotica**, London, v. 14, n. 5, p. 365-374, 1984.
- CHANG, R.; MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; CUNHA, L. C. S.; ROCHA, E. O.; AQUINO, F. J. T.; SOUZA, M. G. M.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Essential oil composition and antioxidant and antimicrobial properties of *Campomanesia pubescens* O. Berg, Native of Brazilian Cerrado. **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 30, n. 9, p. 1843–1848, 2011.

CHEN, F.; D'AURIA, J. C.; THOLL, D.; ROSS, J. R.; GERSHENZON, J.; NOEL, J. P.; PICHERSKY, E. An *Arabidopsis thaliana* gene for methyl salicylate biosynthesis, identified by a biochemical genomics approach, has a role in defense. **Plant Journal**, Oxford, v. 36, p. 577–588, 2003.

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

CLARK, G. S. A profile: an aroma chemical linalol. **Perfumer and flavorist**, Wheaton, v. 13, p. 49-54, 1988.

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

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

COLEY, P. D.; LOKVAM, J.; RUDOLPH, K.; BROMBERG, K.; SACKETT, T. E.; WRIGHT, L.; BRENES-ARGUEDAS, T.; DVORETT, D.; RING, S.; CLARK, A.; BAPTISTE, C.; PENNINGTON, R. T.; KURSAR, T. A. Divergent defensive strategies of young leaves in two species of *Inga*. **Ecology**, Tempe, v. 86, n. 10, p. 2633-2643, 2005.

CORREA, S. M. V. C.; CONSERVA, L. M.; MAIA, J. G. S. Constituents of roots of *Inga edulis* var. *Parviflora*. **Fitoterapia**, Milano, v. 66, p. 379, 1995.

CUNHA, L. C. S. **Estudo fitoquímico, atividades antioxidante, antimicrobiana e citotóxica da espécie *Cassia bakeriana* Craib**. 2013. Tese de doutorado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013.

DAVIDSON, P. M.; PARISH, M. E. Methods for testing the efficacy of food antimicrobials. **Food Technology**, Chicago, v. 43, p. 148–155, 1989.

DE ANGELIS, I.; GIUBILEI, L.; STAMMATI, A.; ZAMPAGLIONI, F.; ZUCCO, F.; BARTOLINI, G.; SALVATORE, G. *In vitro* toxicity of some cosmetic ingredients. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 477-479, 1986.

DIAS, A. L. S.; SOUZA, J. N. S.; ROGEZ, H. Enriquecimento de compostos fenólicos de folhas de *Inga edulis* por extração em fase sólida: quantificação de seus compostos majoritários e avaliação da capacidade antioxidante. **Química Nova**, São Paulo, v. 33, n. 1, p. 38-42, 2010.

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

DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.

EDRIS, A.E. Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. **Phytotherapy Research**, London, v. 21, n. 4, p. 308-323, 2007.

ELISABETSKY, E.; BRUM, L.; SOUZA, D. Anticonvulsant properties of linalool in glutamate-related seizure models. **Phytomedicine**, Jena, v. 6, p. 107–113, 1995.

EVERETTE, J. D.; BRYANT, Q. M.; GREEN, A. M.; ABBEY, Y. A.; WANGILA, G. W.; WALKER, R. B. Thorough study of reactivity of various compound classes toward the Folin-Ciocalteou reagent. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 58, p. 8139-8144, 2010.

FARMACOPÉIA brasileira. 4. ed., São Paulo: Atheneu, 1988.

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

GANAPATY, S.; BEKNAL, A. K. Chemical composition and anti-inflammatory activity of *Pelagonium graveolens* oil (geranium). **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 20, n. 4, p. 18-20, 2004.

GARCIA, F. C. P. **Relações sistemáticas e fitogeográficas de *Inga* Mill. (Leguminosae-Mimosoideae) nas florestas da costa sul e sudeste do Brasil**. 1998. Tese de Doutorado. Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 1998.

GILL, A. O.; DELAQUIS, P.; RUSSO, P.; HOLLEY, R. A. Evaluation of antilisterial action of cilantro oil on vacuum packed ham. **International Journal of Food Microbiology**, Amsterdam, v. 3, p. 83–92, 2002.

GÓMEZ-BARRIO, A.; VEJA, C.; ESCARIO, J. A.; ROLÓN, M. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, Berlin, v. 99, n. 2, p. 103–107, 2006.

GUENTHER, A. Seasonal and spatial variations in natural volatile organic compound emissions. **Ecological Applications**, Tempe, v. 7, n. 1, p. 34-45, 1997.

HEREDIA, A.; DOMÍNGUEZ, E.; SERRANO, J. M.; LAGUNA, L.; REINA, J. J.; CASADO, C. G. La cutícula vegetal: estructura y funciones. **Ecología**, Madrid, v. 12, p. 293-305, 1998.

HO, C. L.; WANG, E. I.; HSU, K. P.; LEE, P. Y.; SU, Y. C. Composition and antimicrobial activity of the leaf essential oil of *Litsea kostermansii* from Taiwan. **Natural Product Communications**, Westerville, v. 4, n. 8, p. 1123-1126, 2009.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

HUSOY, T.; SYVERSEN, T.; JENSSEN, J. Comparisons of four *in vitro* cytotoxicity tests: the MTT assay, NR assay, uridine incorporation and protein measurements. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 7, n. 2, p. 149-154, 1993.

HUSSAIN, R. A.; YUH-MEEI, L.; POVEDA, L. J.; BORDAS, E.; SUPCHUNG, B.; PEZZUTO, J. M.; SOEJARTO, D. D.; KINGHORN, A. D. Plant-derived sweetening agents: saccharide and polyol constituents of some sweet-tasting plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 28, p. 103-115, 1990.

IGNAT, I.; IRINA, V.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, London, v. 126, n. 4, p. 1821- 1835, 2011.

INOUE, Y.; HADA, T.; SHIRAISHI, A.; HIROSE, K.; HAMASHIMA, H.; KOBAYASHI, S. Biphasic Effects of geranylgeraniol, teprenone, and phytol on the growth of *Staphylococcus aureus*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, Bethesda, v. 49, p. 1770-1774, 2005.

IOANNIDIS, D.; BONNER, L.; JOHNSON, C. B. UV-B is required for normal development of oil glands in *Ocimum basilicum* L. (Sweet Basil). **Annals of Botany**, London, v. 90, p. 453-460, 2002.

JOHNSON, C. B.; KIRBY, J.; NAXAKIS, G.; PEARSON, S. Substantial UV-B-mediated induction of essential oils in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). **Phytochemistry**, New York, v. 51, p. 507-510, 1999.

KABARA, J. J.; VRABLE, R.; LIE KEN JIE, M. Antimicrobial lipids: natural and synthetic fatty acids and monoglycerides. **Lipids**, Champaign, v. 12, p. 753–759, 1977.

KABARA, J. J. Food-grade chemicals for use in designing food preservative systems. **Journal of Food Protection**, Des Moines, v. 44, p. 633–647, 1981.

KAMM, B.; KAMM, M. Principles of biorefineries. **Applied Microbiological Biotechnology**, Heidelberg, v. 64, n. 2, p.137-145, 2004.

KAROUSOU, R.; GRAMMATIKOPOULOS, G.; LANARAS, T.; MANETAS, Y.; KOKKINI, S. Effects of enhanced UV-B radiation on *Mentha spicata* essential oils. **Phytochemistry**, New York, v. 49, p. 2273-2277, 1998.

KINGHORN, A. D.; PAN, L.; FLETCHER, J. N.; CHAI, H. The relevance of higher plants in lead compound discovery programs. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 74, n. 6, p. 1539–1555, 2011.

KLOCK, U.; MUÑIZ, G. I. B.; HERNANDEZ, J. A.; ANDRADE A. S. **Química da madeira**. 3. ed. Curitiba: Universidade Federal do Paraná, 2005.

KNOBLOCH, K.; WEIGAND, N.; WEIS, H. M., VIGENSCHOW, H. **Progress in essential oil research**. Berlin: Brunke, 1986.

KNOBLOCH, K.; PAULI, A.; IBERL, N.; WEIS, H. M.; WEIGAND, N. **Modes of action of essential oil components on whole cells of bacteria and fungi in plate tests**. Berlin: Walter de Gruyther, 1988.

KOKETSU, M.; GONÇALVES, S. L.; GODOY, R. L. O.; LOPES, D.; MORSBACH, N. Óleos essenciais de cascas e folhas de canela (*Cinnamomum verum* Presl) cultivada no Paraná. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 17. n. 3, p. 281-285, 1997.

KURSAR, T. A.; DEXTER, K. G.; LOKVAM, J.; PENNINGTON, R. T.; RICHARDSON, J. E.; WEBER, M. G.; MURAKAMI, E. T.; DRAKE, C.; MCGREGOR, R.; COLEY, P. D. The evolution of antiherbivore defenses and their contribution to species coexistence in the tropical tree genus *Inga*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, p. 18073-18078, 2009.

LAMOUNIER, K. C.; CUNHA, L. C. S.; MORAES, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; NASCIMENTO, E. A.; SOUZA, M. G. M.; MARTINS, C. H. G.; CUNHA, W. R. Chemical analysis and study of phenolics, antioxidant activity and antibacterial effect of the wood and bark of *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2012, p. 1-7, 2012.

LANG, G.; BUCHBAUER, G. A review on recent research results (2008–2010) on essential oils as antimicrobials and antifungals: a review. **Flavor and Fragrance Journal**, Geneva, v. 27, p. 13–39, 2012.

LEÓN, J. Central american and west indian species of *Inga* (Leguminosae). **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 53, n. 3, p. 265- 359, 1966.

LI, J.; HELMERHORST, E. J.; LEONE, C. W.; TROXLER, R. F.; YASKELL, T.; HAFFAJEE, A. D.; SOCRANSKY, S. S.; OPPENHEIM, F. G. Identification of early microbial colonizers in human dental biofilm. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 97, n. 6, p. 1311-1318 , 2004.

LIOIOS, C.; LAOUE, H.; BOULAACHEB, N.; GORTZI, O.; CHINO, I. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Algerian phlomis bovei* De Noé subsp. Bovei. **Molecules**, Basel, v. 12, p. 772-781, 2007.

LOKVAM, J.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Cinnamoyl glucosides of catechin and dimeric procyanidins from young leaves of *Inga umbellifera* (Fabaceae). **Phytochemistry**, New York, v. 65, n. 3, p. 351-358, 2004.

LOKVAM, J.; BRENES-ARGUEDAS, T.; LEE, J. S.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Allelochemic function for a primary metabolite: the case of l-tyrosine hyper-production in *Inga umbellifera* (Fabaceae). **American Journal of Botany**, Columbus, v. 93, n. 8, p. 1109-1115, 2006.

LOKVAM, J.; CLAUSEN, T. P.; GRAPOV, D.; COLEY, P. D.; KURSAR, T. A. Galloyl depsides of tyrosine from young leaves of *Inga laurina*. **Journal of natural products**, Cincinnati, v. 70, p. 134-136, 2007.

LONDE, G. B. **Análise química da *Cecropi adenopus* (embaúba)**. 2004. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2004.

LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. São Paulo: Plantarum, 2002.

LOZANO, C. M.; VASQUEZ-TINEO, M. A.; RAMIREZ, M.; JIMENEZ, F. *In vitro* antimicrobial activity screening of tropical medicinal plants used in Santo Domingo, Dominican Republic. Part I. **Pharmacognosy Communications**, Queensland, v. 3, n. 2, p. 64-69, 2013.

MACEDO, M. L. R.; GARCIA, V. A.; FREIRE, M. D. G. M.; RICHARDSON, M. Characterization of a Kunitz trypsin inhibitor with a single disulfide bridge from seeds of *Inga laurina* (SW.) Willd. **Phytochemistry**, New York, v. 68, p. 1104-1111, 2007.

MACEDO, M. L. R.; FREIRE, M. G. M.; FRANCO, O. L.; MIGLIOLO, L.; OLIVEIRA, C. F. R. Practical and theoretical characterization of *Inga laurina* Kunitz inhibitor on the control of *Homalinotus coriaceus*. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part B, Oxford, v. 158, p. 164–172, 2011.

MADYASTHA, K. M.; SRIVATSAN, V. Biotransformations of alpha-terpineol in the rat: its effects on the liver microsomal cytochrome P-450 system. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, New York, v. 41, n. 1, p. 17-25, 1988.

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

MARTINS, E. R., CASTRO, D. M., CASTELLANI, D. C., DIAS, J. E. **Plantas medicinais**. Viçosa: Editora UFV, 2000.

MARTINS, C. M. **Estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc (Pau-santo) do cerrado**. 2012. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2012.

MATA, M. F.; FELIX, L. P. Flora da Paraíba, Brasil: *Inga* Mill. (Leguminosae – Mimosoideae). **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, p. 135-137, 2007.

MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais: guia de seleção e aproveitamento de plantas usadas em fitoterapia no nordeste do Brasil**. Fortaleza: IOCE, 1989.

MATSUNAGA, S. N.; GUENTHER, A. B.; POTOSNAK, M. J.; APEL, E. C. Emission of sunscreen salicylic esters from desert vegetation and their contribution to aerosol formation. **Atmospheric Chemistry and Physics**, Munich, v. 8, p. 7367-7371, 2008.

MCCASKILL, D.; CROTEAU, R. Strategies for bioengineering the development and metabolism of glandular tissues in plants. **Nature Biotechnology**, New York, v. 17, p. 31-37, 1998.

MENSOR, L. L.; MENEZES, F. S.; LEITÃO, G. G.; REIS, A. S.; SANTOS, T. C.; COUBE, C. S.; LEITÃO, S. G. Screening of Brazilian plant extracts for antioxidant activity by the use of DPPH free radical method. **Phytotherapy Research**, London, v. 15, p. 127-130, 2001.

MILTON, K.; JENNESS, R. Ascorbic acid content of neotropical plant parts available to wild monkeys and bats. **Experientia**, Basel, v. 43, p. 339-342, 1987.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**, Hat Yai, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

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

MONTEIRO, A. M. D.; ARAÚJO, R. P. C.; GOMES FILHO, I. S. Diabetes mellitus tipo 2 e doença periodontal. **Revista Gaúcha de Odontologia**, Porto Alegre, v. 50, n. 1, p. 50-54, 2002.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; PILÓ-VELOSO, D. Isolamento e análise estrutural de ligninas. **Química Nova**, São Paulo, v. 16, n. 5, p. 435-448, 1993.

MORAIS, S. A. L.; NASCIMENTO, E. A.; QUEIROZ, R. A. A.; PILÓ-VELOSO, D.; DRUMOND, M. G. Studies on polyphenols and lignin of *Astronium urundeuva* wood. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, Campinas, v. 10, n. 6, p. 447-452, 1999.

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

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

MORTON, T. C.; ROMEO, J. T. Preliminary chemical investigations of Costa Rican *Inga* species based on nonprotein amino acids. **Bulletin IGSM**, Dalwallinu, v. 18, p. 112-123, 1990.

MORTON, T. C.; ZEKTZER, A. S.; RIFE, J. P.; ROMEO, J. T. *Trans*- 4-methoxypipelic acid, an amino acid from *Inga paterno*. **Phytochemistry**, New York, v. 30, p. 2397-2399, 1991.

MORTON, T. C. Chemotaxonomic significance of hydroxylated pipelic acids in Central American *Inga* (Fabaceae: Mimosoideae: Ingeae). **Biochemical Systematics and Ecology**, Oxford, v. 26, p. 379-401, 1998.

MOUREY, A.; CANILLAC, N. Anti-*Listeria monocytogenes* activity of essential oils components of conifers. **Food Control**, Guildford, v. 13, p. 289-292, 2002.

NAIGRE, R.; KALCK, P.; ROQUES, C.; ROUX, I.; MICHEL, G. Comparison of antimicrobial properties of monoterpenes and their carbonylated products. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 62, p. 275-277, 1996.

NANDAKUMAR, V.; SINGH, T.; KATIYAR, S. K. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 269, n. 2, p. 378-387, 2008.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C. D. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 31, n. 4, p. 247-256, 2000.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 30 years from 1981 to 2010. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 75, n. 3, p. 311-335, 2012.

NATIONAL INSTITUTE OF STANDARD AND TECHNOLOGY. **Chemistry webBook**, 2014. Disponível em: < <http://webbook.nist.gov/chemistry/>>. Acesso em: 15 jan. 2014.

NOSER, F. Cultura de células a serviço da cosmetologia. **Cosmetics and Toiletries**, Carol Stream, v. 3, p. 46-47, 1991.

OLIVA, M. L. V. A novel subclassification for Kunitz protease inhibitors from leguminous seeds, **Biochimie**, Paris, v. 92, p. 1667-1673, 2010.

OLIVEIRA, D. C.; ROSELL, F. L.; SAMPAIO, J. E. C.; RODRIGUES JÚNIOR, A. L. Redução do índice de placa com Listerine: avaliação do índice de placa em relação ao uso de Listerine e/ou escovação. **Revista Gaúcha de Odontologia**, Porto Alegre, v. 46, n. 2, p. 101-104, 1998.

OSTROSKY, E. A.; MIZUMOTO, M. K.; LIMA, M. E. L.; KANEKO, T. M.; NISHIKAWA, S. O.; FREITAS, B. R. Métodos para avaliação da atividade antimicrobiana e determinação da concentração mínima inibitória (CIM) de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 18, p. 301-307, 2008.

OUATTARA, B.; SIMARD, R. E.; HOLLEY, R. A.; PIETTE, G. J. P.; BÉGIN, A. Antibacterial activity of selected fatty acids and essential oils against six meat spoilage organisms. **International Journal of food microbiology**, Amsterdam, v. 37, n. 2, p.155–162, 1997.

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

PEANA, A. T.; MARZOCCO, S.; POPOLO, A.; PINTO, A. (-)-Linalool inhibits *in vitro* NO formation: probable involvement in the antinociceptive activity of this monoterpene compound. **Life Science**, New York, v. 78, n. 7, p. 719-723, 2006.

PELCZAR, M. J.; CHAN, E. C. S.; KRIEG, N. R. Control of microorganisms by physical agents. **Microbiology**, New York, p. 469–509, 1988.

PENEDO, W. R. **Uso da madeira para fins energéticos**. Belo Horizonte: Fundação CETEC, 1980.

PENNINGTON, T. D. **The genus *Inga*: botany**. Richmond: Royal Botanic Gardens, Kew, 1997.

PÉREZ-VÁSQUEZ, A.; CAPELLA, S.; LINARES, E.; BYE, R.; ANGELES-LÓPEZ, G.; MATA R. Antimicrobial activity and chemical composition of the essential oil of *Hofmeisteria schaffneri*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v. 63, p. 579-586, 2011.

PHILIPP, P.; D'ALMEIDA, M. L. O. **Tecnologia de fabricação da pasta celulósica**. 2. ed. São Paulo: IPT, v. 1, 1988.

PHILLPSON, J. D.; ANDERSON, L. A. Ethnopharmacology and western medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 25, p. 61-72, 1989.

PHUTDHAWONG, W.; DONCHAI, A.; KORTH, J.; PYNE, S. G.; PICHA, P.; NGAMKHAM, J.; BUDDHASUKH, D. The components and anticancer activity of the volatile oil from *Streblus asper*. **Flavour and fragrance journal**, Chichester, v. 19, p. 445-447, 2004.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

PINTO T. J. A.; KANEKO T. M.; OHARA M. T. **Controle biológico de qualidade de produtos farmacêuticos, correlatos e cosméticos**. 2. ed. São Paulo: Atheneu Editora, 2003.

PISSERI, F.; BERTOLI, A.; PISTELLI, L. Essential oils in medicine: principles of therapy. **Parassitologia**, Roma, v. 50, n. 1, p. 89-91, 2008.

PISTELLI, L.; BERTOLI, A.; NOCCIOLI, C.; MENDEZ, J.; MUSMANNO, R. A.; DI MAGGIO, T.; CORATZA, G. Antimicrobial activity of *Inga fendleriana* extracts and isolated flavonoids. **Natural Products Communications**, Westerville, v. 4, p. 1679-1683, 2009

POSSETTE, R. F. S.; RODRIGUES W. A. O gênero *Inga* Mill. (Leguminosae – Mimosoideae) no estado do Paraná, **Acta Botanica Brasilica**, Porto Alegre, v. 24, n. 2, p. 354-368, 2010.

PRITCHARD, H. W.; HAYE, A. J.; WRIGHT, W. J.; STEADMAN, K. J. A comparative study of seed viability in *Inga* species: desiccation tolerance in relation to the physical characteristics and chemical composition of the embryo. **Seed Science and Technology**, Zurich, v. 23, p. 77-89, 1995.

RABELO A. **Frutas nativas da Amazônia**, 2012. Disponível em: <<http://frutasnativasdaamazonia.blogspot.com.br/2012/02/normal-0-21-microsoftinternetexplorer4.html>>. Acesso em: 03 abr. 2013.

RADULOVIC, N.; STOJANOVIC, G.; PALIC, R. Composition and antimicrobial activity of *Equisetum arvense* L. essential oil. **Phytotherapy Research**, London, v. 20, p. 85–88, 2006.

RAMOS V. S.; CABRERA, O. G.; CAMARGO, E. L.; AMBRÓSIO, A. B.; VIDAL, R. O.; SILVA, D. S.; GUIMARÃES, L. C.; MARANGONI, S.; PARRA, J. R.; PEREIRA, G. A.; MACEDO, M. L. Molecular cloning and insecticidal effect of *Inga laurina* trypsin inhibitor on *Diatraea saccharalis* and *Heliothis virescens*. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, New York, v. 156, n. 3, p. 148-158, 2012.

RAO, B. V.; RAMANJANEYULU, K.; RAMBABU, T.; DEVI, C. H. B. T. S. Synthesis and antioxidant activity of galloyltyrosine, derivatives from young leaves of *Inga laurina*. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**, Guntur, v. 2, n. 4, p. 39-44, 2011.

RATH, C. C.; DEVI, S.; DASH, S. K.; MISHRA, R. Antibacterial potential assessment of Jasmine essential oil against *E. coli*. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, Mumbai, v. 70, n. 2, p. 238–241, 2008.

RAZAVIA, S. M.; NEJAD-EBRAHIMIB, S. Phytochemical analysis and allelopathic activity of essential oils of *Ecballium elaterium* A. Richard growing in Iran. **Natural Product Research**, Abingdon, v. 24, p. 1704-1709, 2010.

LISTA de espécies da flora do Brasil. In: REFLORE, 2010. Disponível em : <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/listaBrasil/FichaPublicaTaxonUC/FichaPublicaTaxonUC.do?id=FB23007>> Acesso em: 03 abr. 2013.

REINBOTHE, C.; DIETRICH, B.; LUCKNER, M. Regeneration of plants from somatic embryos of *digitalis-lanata*. **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 137, p. 224-228, 1990.

REZENDE, C. M.; CORRÊA, V. F. S.; COSTA, A. V. M.; CASTRO, B. C. S. Constituintes químicos voláteis das flores e folhas do pau-Brasil (*Caesalpinia echinata*, Lam.) . **Química Nova**, São Paulo, v. 27, n. 3, p. 414-416, 2004.

RIDDELL, R. J.; CLOTHIER, R. H.; BALLS, M. An evaluation of three *in vitro* cytotoxicity assays. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 469-471, 1986.

RIOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 100, n. 1, p. 80–84, 2005.

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, M. K.; TYLER, V. E. Terpenoids. In: SANTOS, F.A., RAO, V.S. **Pharmacognosy and Pharmacobiotechnology**. New York: Williams & Wilkins, 1996.

RODRIGUES, J. B. **A botânica, nomenclatura indígena e seringueiras: edição comemorativa do sesquicentenário de João Barbosa Rodrigues**. “MBAÉ KAÁ-TAPIYETÁ ENOYNDAVA E AS HEVEAS” pertencentes à biblioteca do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1905. Rio de Janeiro: Fac – similada.

ROWELL, R. M.; PETTERSEN, R.; HAN, J. S.; ROWELL, J. S.; TSHABALALA, M. A. Cell wall chemistry. In: ROWELL, R. M. **Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites**. New York: CRC Press, 2005.

RUBIRA, I. R. F. **Pesquisa de bactérias bucais em amostras de placa subgingival de indivíduos com periodonto normal e de portadores de periodontite através da técnica do “Slot Immunoblot”**. 1993. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo, Bauru, 1993.

RUSSEL, A. D. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food pharmaceutical preservatives. **Journal of Applied Bacteriology**, Oxford, v. 71, p. 191–201, 1991.

SAAD, B.; AZAIZEH, H.; SAID, O. Tradition and perspectives of Arab herbal medicine: a review. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, New York, v. 2, p. 475–479, 2005.

- SAKAMOTO, H. T.; GOBBO-NETO, L.; CAVALHEIRO, A. J.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C. Quantitative HPLC analysis of sesquiterpene lactones and determination of chemotypes in *Eremanthus seidelii* MacLeish & Schumacher (Asteraceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 16, p. 1396-1401, 2005.
- SANTANA, M.; LODGE, D. J.; LEBOW, P. Relationships of host recurrence in fungi to rates of tropical leaf decomposition. **Pedobiologia**, Jena, v. 49, p. 549–564, 2005.
- SANTOS, F. A. **Atividade antimicrobiana, antinociceptiva e anticonvulsivante dos óleos essenciais de *Psidium guyanensis* Pers. e *Psidium pohliatum* Berg.** 1997. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal do Ceará, Ceará, 1997.
- SANTOS, A. B. D. **Atividade antioxidante de extratos vegetais da flora brasileira: estudo com ressonância paramagnética eletrônica (RPE) e teoria do funcional da densidade (TDF).** 2006. Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.
- SAOTOME, K.; MORITA, H.; UMEDA, M. Cytotoxicity test with simplified crystal violet staining method using microtitre plates and its application to injection drugs. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 3, n. 4, p. 317-321, 1989.
- SARVEYA, V.; RISK, S.; BENSON, H. A. E. Liquid chromatographic assay for common sunscreen agents: Application to *in vivo* assessment of skin penetration and systemic absorption in human volunteers. **Journal of Chromatography B**, Amsterdam, v. 803, p. 225–231, 2004.
- SASAKI, K.; TANAKA, N.; WATANABE, M.; YAMADA, M. Comparison of cytotoxic effects of chemicals in four different cell types. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 5, n. 5, p. 403-406, 1991.
- SCHULTES, R. E.; RAFFAULF, R. F. **The Healing Forest: Medicinal and Toxic plants of the Northwest Amazonia.** Portland: Discorides Press, v. 2, 1990.
- SERRANO, J.; PINIA, P. R.; DAUER, A.; AURA, A. M.; CALIXTO, F. S. Tannins: current knowledge of food sources, intakes, bioavailability and biological effects. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 53, n. 2, p. 310-329, 2009.
- SHAW, D.; ANNETT, J. M.; DOHERTY, B.; LESLIE, J. C. Anxiolytic effects of lavender oil inhalation on open-field behaviour in rats. **Phytomedicine**, Jena, v. 14, n. 9, p. 613-620, 2007.
- SHELEF, L. A.; NAGLIK, O. A.; BOGEN, D. W. Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosemary, and allspice. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 45, p. 1042–1044, 1980.
- SILVA-SANTOS, A.; ANTUNES, A. M. S.; BIZZO, H. R.; D'AVILA, L. A. A participação da indústria óleo-citrícola na balança comercial brasileira. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v. 8, n. 4, p. 8-13, 2006.

SILVA, D. C. F.; NASCIMENTO, M. A.; MOREIRA, A. V. B. Verificação da presença de compostos fenólicos com propriedades antioxidantes em amostras de café. **Journal of the Brazilian Society of Food and Nutrition**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 41-58, 2007.

SILVA, E. M.; ROGEZ H.; LARONDELLE Y. Optimization of extraction of phenolics from *Inga edulis* leaves using response surface methodology. **Separation and Purification Technology**, Philadelphia, v. 55, p. 381–387, 2007.

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

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v. 16, n. 3, p. 144-158, 1965.

SJÖSTRÖM, E. **Wood chemistry: fundamentals and applications**. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1993.

SKAL TSA, H. D.; LAZZARI, D. M.; MAVROMATI, A. S.; TILIGADA, E. A.; CONSTANTINIDIS, T. A. Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Scutellaria albida* ssp. *albida* from Greece. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 66, n. 7, p. 672–674, 2000.

SMOLINSKE, S. C. **Handbook of food, drug, and cosmetic excipients**. Boca Raton: CRC Press, 1992.

SOUSA, M. S. El género *Inga* (Leguminosae – Mimosoideae) del sur de México y Centroamerica, estudio previo para la Flora Mesoamericana. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 80, p. 223-269, 1993.

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA JUNIOR, G. M.; AYRES, C. C.; COSTA, L. S.; ARAÚJO, D. S.; CALVACANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 351- 355, 2007.

SOUSA, M. S. Adiciones al género *Inga* (Ingeae, Mimosoideae, Leguminosae) para la flora mesoamericana. **Acta Botanica Mexicana**, Mexico , v. 89, p. 25-41, 2009.

SOUZA, J. N. S.; SILVA, E. M.; SILVA, M. N.; ARRUDA, M. S. R.; LARONDELLE, Y.; ROGEZ, H. Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. **Journal of Brazilian Chemical Society [online]**, Campinas, v. 18, n. 6, p. 1276-1280, 2007.

SPRING, O.; BIENERT, U. Capitata glandular hairs from sunflower leaves: development, distribution and sesquiterpene lactone content . **Journal of Plant Physiology**, Stuttgart, v. 130, p. 441-448, 1987.

TAVARES, J. P. N. Estudo climático da precipitação durante eventos de El-Niño na região de Uberlândia-MG. **Caminhos de Geografia**, Uberlândia, v. 9, n. 27, p. 184 – 187, 2008.

THE PHEROBASE. In: Database of insect pheromones and semiochemicals. 2003. Disponível em: <http://www.pherobase.com/> acesso em: 15 jan. 2014.

TREVISAN, M. T. S.; SILVA, M. G. V.; PFUNDSTEIN, B.; SPIEGELHALDER, B.; OWEN, R. W. Characterization of the volatile pattern and antioxidant capacity of essential oils from different species of the genus *Ocimum*. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 54, n. 12, p. 4378–4382, 2006.

TURNER, G. W.; GERSHENZON, J.; CROTEAU, R. B. Distribution of peltate glandular trichomes on developing leaves of peppermint. **Plant Physiology**, Minneapolis, v. 124, p. 655-663, 2000.

ULUSOY, S.; BOSGELMEZ-TINAZ, G.; SEÇILMIS-CANBAY, H. Tocopherol, carotene, phenolic contents and antibacterial properties of rose essential oil, hydrosol and absolute. **Current Microbiology**, New York, v. 59, p. 554–558, 2009.

VAN POECKE, R. M. P.; POSTHUMUS, M. A.; DICKE, M. Herbivore-induced volatile production by *Arabidopsis thaliana* leads to attraction of the parasitoid *Cotesia rubecula*: chemical, behavioral, and gene-expression analysis. **Journal of Chemical Ecology**, New York, v. 27, p. 1911–1928, 2001.

VANHAELLEN, M. Des metabolites secondaires d origine vegetale a la standardisation des plantes medicinales. **Journal de pharmacie de belgique**, Bruxelles, v. 44, n. 3, p. 242-247, 1989.

VÁZQUEZ, G.; FONTENLA, E.; SANTOS, J.; FREIRE, M. S.; GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, J.; ANTORRENA, G. Antioxidant activity and phenolic content of chestnut (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. **Industrial crops and products**, Philadelphia, v. 28, n. 3, p. 279-285, 2008.

VIEIRA, M. C.; AVELINO, E. F.; DE ALMEIDA, R. R.; LELIS, R. C. C. Caracterização química da casca e da madeira da espécie *Tabebuia pentaphylla* (Linn.) Hemsl. oriunda da arborização urbana do Rio de Janeiro – RJ. **Revista de Ciências da Vida**, Rio de Janeiro, v. 29, n. 1, p. 39-49, 2009.

VITTI, A. M. S.; BRITO, J. O. **ESALQ, Documentos Florestais**. Piracicaba: ESALQ, 2003.

VIVOT, E.; DIOS MUÑOZ, J.; CARMEN CRUAÑES, M.; CRUAÑES, M. J.; TAPIA, A.; HIRSCHMANN, G. S.; MARTÍNEZ, E.; DI SAPIO, O.; GATTUSO, M.; ZACCHINO, S. Inhibitory activity of xanthine-oxidase and superoxide scavenger properties of *Inga verna* subsp. affinis: its morphological and micrographic characteristics. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 76, n. 1, p. 65-71, 2001.

WAGNER, H.; BLADT, S. **Plant drug analysis: A thin layer chromatography atlas**. Berlin: Springer-Verlag, 1996.

WANG, L.; JOHNSON, E. A. Inhibition of *Listeria monocytogenes* by fatty acids and monoglycerides. **Applied and Environmental Microbiology**, Washington, v. 58, p. 624–629, 1992.

WANG, Y.; CHUNG, S. J.; SONG, W. O.; CHUN, O. K. Estimation of daily proanthocyanidin intake and major food sources in the U.S. diet. **Journal of Nutrition**, Paris, v. 141, n. 3, p. 447- 452, 2011.

WATTENBERG, L. W. Inhibition of azoxymethane-induced neoplasia of the large bowel by 3-hydroxy-3,7,11-trimethyl-1,6,10-dodecatriene (nerolidol). **Oxford Journals Life Sciences & Medicine Carcinogenesis**, Oxford, v. 12, p. 151-152, 1991.

WHEELWRIGH, E. G. **Medicinal Plants and their History**. New York : Dover Publications, 1974.

WICHTEL, M., **Teedrogen und Phytopharmaka**. Stuttgart: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft, 2002.

YAMAURA, T.; TANAKA, S.; TABATA, M. Light-dependent formation of glandular trichomes and monoterpenes in thyme seedlings. **Phytochemistry**, New York, v. 28, p. 741-744, 1989.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, Davis, v. 49, n. 8, p. 4083-4089, 2001.

YOON, W. J.; KIM, S. S.; OH, T. H.; LEE, N. H.; HYUN, C. G. *Cryptomeria japonica* essential oil inhibits the growth of drug-resistant skin pathogens and LPS-induced nitric oxide and pro-inflammatory cytokine production. **Polish Journal of Microbiology**, Chełmska, v. 58, p. 61-68, 2009.

YU, S. G., HILDEBRANDT, L. A., ELSON, C. E. Geraniol, an inhibitor of mevalonate biosynthesis, suppresses the growth of hepatomas and melanomas transplanted to rats and mice. **Journal of Nutrition**, Paris, v. 125, n. 11, p. 2763-2767, 1995.

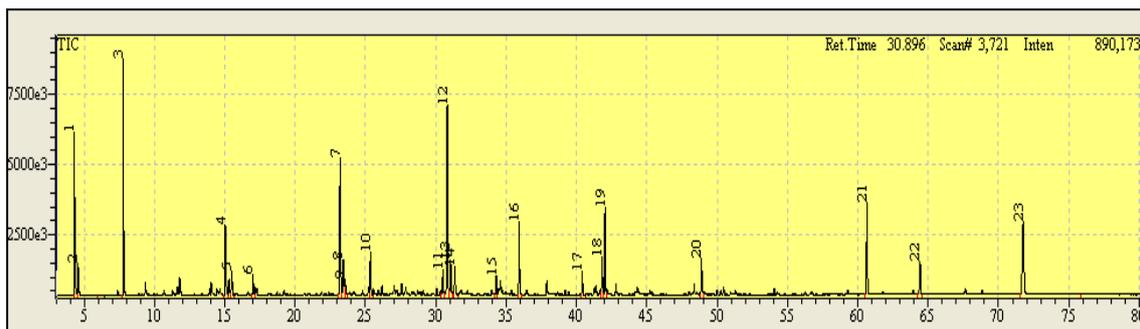
ZOGHBI, M. G. B.; ANDRADE, E. H. A.; MAIA, J. G. S. **Aroma de flores na Amazônia**. Belém: Museu Paraense Emílio Goeldi, 2001.

ZOMORODIAN, K.; SAHARKHIZ, M. J.; RAHIMI, M. J.; BANDEGI, A.; SHEKARKHAR, G.; BANDEGANI, A.; PAKSHIR, K.; BAZARGANI, A. Chemical composition and antimicrobial activities of the essential oils from three ecotypes of *Zataria multiflora*. **Pharmacognosy Magazine**, Mumbai, v. 7, p. 53-59, 2011.

APÊNDICE A – Identificação dos componentes dos óleos essenciais

O aparelho CG-EM forneceu um cromatograma (Figura 1) a partir da injeção do óleo essencial. Foi feita a integração de modo a considerar somente picos com áreas acima de 0,25%. As injeções no aparelho foram feitas em triplicata obtendo-se, assim, três cromatogramas para a análise de cada amostra.

Figura 1 - Exemplo de cromatograma obtido para análise do óleo essencial de *I. laurina*



A partir do software, é possível a comparação dos espectros de massas obtidos para cada componente do óleo essencial injetado com espectros das bibliotecas (Wiley229, Nist08s, Wiley7 e Shim2205) (Figura 2). Índices de similaridade iguais ou superiores a 94% entre espectros de massas da amostra e espectros de massas das bibliotecas foram considerados para a identificação. Para índice de similaridade inferior a 94% o composto foi considerado não identificado (N.I.).

Figura 2 – Exemplo de comparação do espectro de massas obtido (superior) comparado ao espectro de massas da biblioteca, salicilato de metila (inferior): tempo de retenção: 15,89 min.; 94% de similaridade; biblioteca Nist08s.

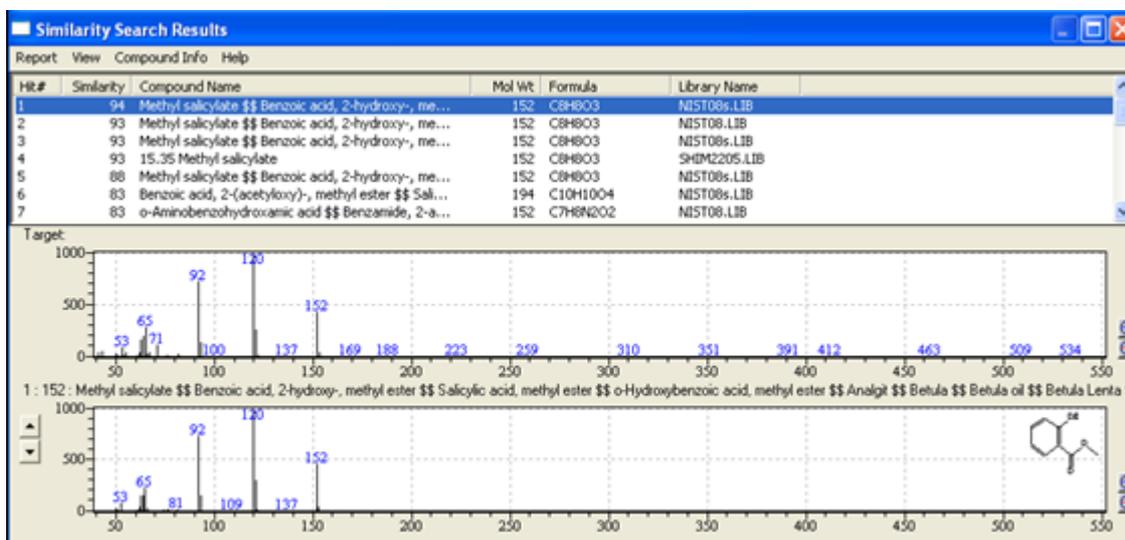
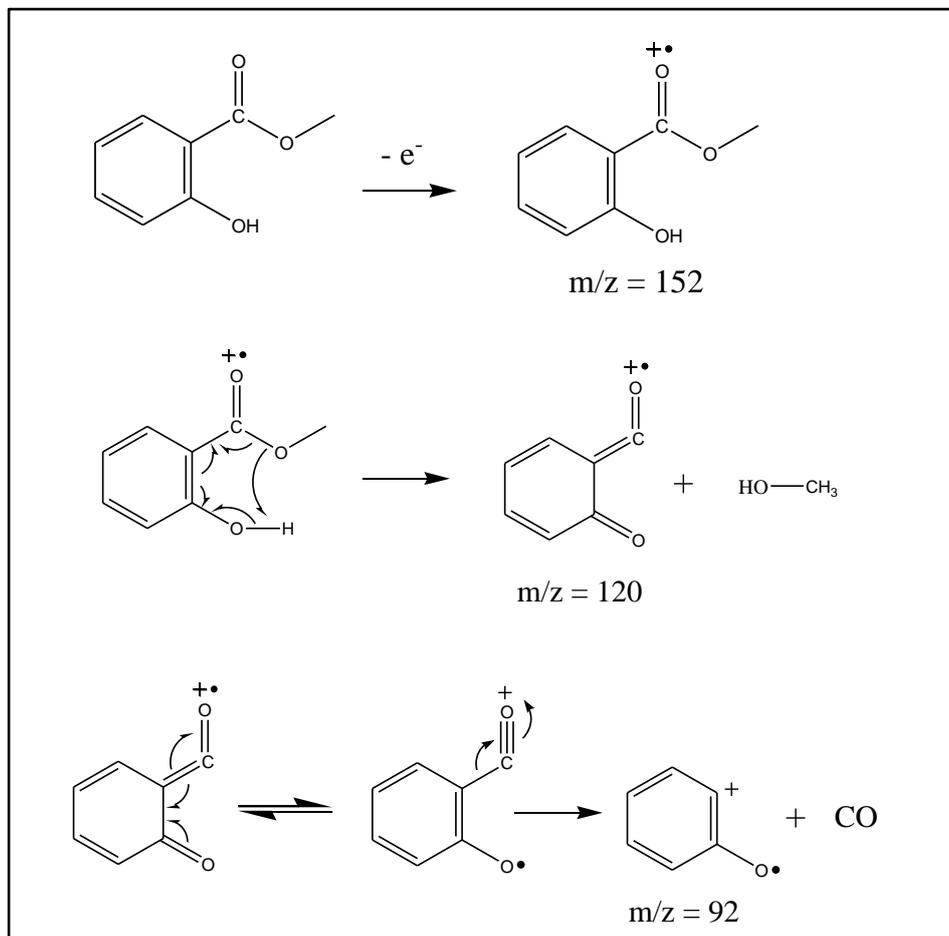


Figura 3 - Padrões de fragmentação da molécula de salicilato de metila: principais fragmentos.



Após a constatação do índice de similaridade igual ou superior a 94%, foi feito o cálculo do índice aritmético (IA) com base nos tempos de retenção obtidos para padrões de alcanos injetados nas mesmas condições da amostra (Tabela 1), a partir da fórmula:

$$IA(x) = 100 (\text{n}^\circ \text{ de carbonos do Pz}) + 100 \frac{t(x) - t(\text{Pz})}{t(\text{Pz} + 1) - t(\text{Pz})}$$

Onde:

x = composto no momento t;
 Pz = alcano antes de x;
 Pz + 1 = alcano depois de x;

t (x)= tempo de retenção do composto em análise;
 t (Pz)= tempo de retenção do alcano antes de x;
 t (Pz+1)= tempo de retenção do alcano depois de x.

Tabela 1 – Tempos de retenção obtidos para padrões de alcanos (C8-C30).

Alcano	Tempo de retenção (min.)
octano (C8)	3,29
nonano (C9)	5,15
decano (C10)	7,95
undecano (C11)	11,66
dodecano (C12)	15,90
tridecano (C13)	20,30
tetradecano (C14)	24,63
pentadecano (C15)	28,83
hexadecano (C16)	32,82
heptadecano (C17)	36,62
octadecano (C18)	40,27
nonadecano (C19)	43,74
eicosano (C20)	47,05
heneicosano (C21)	50,21
docosano (C22)	53,23
tricosano (C23)	56,13
tetracosano (C24)	58,91
pentacosano (C25)	61,59
hexacosano (C26)	64,39
heptacosano (C27)	67,75
octacosano (C28)	69,55
nonacosano (C29)	71,78
triacontano (C30)	74,16

Exemplo do cálculo do índice aritmético:

Tempo de retenção do composto desconhecido: 15,89

$$IA(x) = 100(11) + 100 \frac{15,89 - 11,66}{15,90 - 11,66}$$

$$IA(x) = 1200$$

O valor do IA calculado é então comparado a valores de índice aritmético disponíveis na literatura (ADAMS, 2007; NIST, 2010; PHEROBASE, 2003) para o composto que apresentou alto índice de similaridade com o espectro de massas da amostra desconhecida. Se os valores forem iguais ou próximos, a amostra é considerada identificada. No caso deste exemplo, o valor de IA consultado na literatura para salicilato de metila foi de 1196, que se aproximou do valor obtido no cálculo, 1200, confirmando que o composto de tempo de retenção 15,89 min. é o salicilato de metila.

APÊNDICE B - Meios de cultura e soluções utilizadas na determinação da atividade antimicrobiana

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

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

Caldo Schaedler (BD®)

Composição:

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

Preparação: Dissolveu-se aproximadamente 28,4 g desta composição em 1 L de água destilada, a qual foi homogeneizada e autoclavada por 15 min a 121 ± 1 °C. Após autoclavagem a solução foi suplementada com 1 mL de solução de Hemina a 5 mg mL⁻¹ e 1 mL de solução de menadione a 1 mg mL⁻¹.

Caldo triptona de soja TSB (BD®)

Composição:

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

Preparação: Dissolveram-se 30 g desta composição em 1 L de água destilada, a qual foi homogeneizada e autoclavada por 20 min a 121 ± 1 °C.

Base para ágar sangue (BD®)

Composição:

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

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

Ágar Schaedler (BD®)

Composição:

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

Preparação: Dissolveu-se aproximadamente 41,9 g desta composição em 1 L de água destilada. A solução resultante foi aquecida e homogeneizada até a completa dissolução do pó e autoclavada por 15 min a 121 °C. Logo em seguida, a solução foi suplementada com 1 mL de solução de Hemina (5 mg mL^{-1}), 1 mL de solução de menadione (1 mg mL^{-1}) e com solução 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Em seguida, foram distribuídos 30 mL da solução resultante em placas de petri.

Solução de Hemina

Dissolveu-se 0,5 g de Hemina em 10 mL de solução NaOH a 1 N e adicionou-se 90 mL de água destilada esterilizada. Após obter a solução na concentração final de 5

mg mL⁻¹, esta foi filtrada em membrana filtrante de 0,22 µm de porosidade para um tubo esterilizado.

Solução Menadione

Dissolveu-se em frasco esterilizado 0,1 g de menadione em 100 mL de etanol absoluto, obtendo-se uma solução na concentração de 1 mg mL⁻¹.

APÊNDICE C - Meio de cultura utilizado na determinação da atividade citotóxica

O meio Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) foi preparado de acordo com as instruções do fabricante. O meio foi suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), L-glutamina (2 mM), D-glicose (4.500 mg L⁻¹), bicarbonato de sódio (2.000 mg L⁻¹), HEPES (2.380 mg L⁻¹), piruvato de sódio (1.100 mg L⁻¹), penicilina (60 mg L⁻¹), gentamicina (40 mg L⁻¹) e estreptomicina (10 mg L⁻¹).