



UNIVERSIDADE DO ESTADO DO RIO GRANDE DO NORTE – UERN
FACULDADE DE CIÊNCIAS EXATAS E NATURAIS- FANAT
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS NATURAIS - PPGCN
MESTRADO EM CIÊNCIAS NATURAIS – MCN



FRANCISCO ADRIANO GÓIS DE OLIVEIRA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE
***Varronia dardani* – (Taroda) J.S.Mill. (BORAGINACEAE)**

MOSSORÓ-RN

2016

FRANCISCO ADRIANO GÓIS DE OLIVEIRA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE

***Varronia dardani* – (Taroda) J.S.Mill. (BORAGINACEAE)**

Dissertação submetida à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais - PPGCN da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte - UERN, como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre** em Ciências Naturais com Área de Concentração em Produtos Naturais.

Orientador: Profº Drº. Francisco Arnaldo Viana.

MOSSORÓ-RN

2016

Ficha catalográfica gerada pelo Sistema Integrado de Bibliotecas
e Diretoria de Informatização (DINF) - UERN,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

O48c Oliveira, Francisco Adriano Góis de.
Contribuição ao estudo fitoquímico da espécie *Varronia dardani* –
(Taroda) J.S.Mill. (Boraginaceae) / Francisco Adriano Góis de Oliveira -
2016.
104 p.

Orientador: Francisco Arnaldo Viana.

Coorientadora: .

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Estado do Rio Grande do
Norte, Faculdade de Ciências Exatas e Naturais, Programa de Pós
Graduação em Ciências Naturais, Mestrado em Ciências Naturais,
Mossoró, 2016.

1. *Varronia dardani*. 2. Quinonas. 3. Flavonóides. 4. Atividade biológica.
I. Viana, Francisco Arnaldo , orient. II. Título.

FRANCISCO ADRIANO GÓIS DE OLIVEIRA

CONTRIBUIÇÃO AO ESTUDO FITOQUÍMICO DA ESPÉCIE *Varronia dardani* –
(Taroda) J.S.Mill. (BORAGINACEAE)

Dissertação apresentada à Universidade do Estado do Rio Grande do Norte – UERN como parte dos requisitos necessários à obtenção do Grau de Mestre em Ciências Naturais, área de concentração Produtos Naturais, no ano de 2016.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM: 22/04/2016

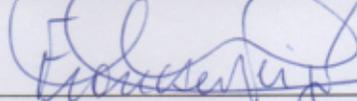
EXAMINADORES



Prof. Dr.º Francisco Arnaldo Viana
Universidade do Estado do Rio Grande do Norte - UERN



Dr.ª Aline Maria Sales Solano
Universidade Federal do Rio Grande do Norte - UFRN



Prof. Dr.º Francisco Marlon Carneiro Feijó
Universidade Federal Rural do Semi-Árido - UFERSA

A Deus, por todas as conquistas vividas.

Aos meus pais, Lourdes e Genivaldo, e as minhas irmãs Saúde e Karla, pelo amor, dedicação, compreensão e incentivo.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, que nunca me deixou desamparado, principalmente nos últimos dois anos diante da ausência de meus pais e familiares.

Aos meus pais, **Maria de Lourdes** e **Genivaldo Leite** pelo amor, carinho, e dedicação em minha educação.

As minhas irmãs, **Maria da Saúde** e **Adriana Karla**, pela força, incentivo e otimismo.

Ao professor Francisco Arnaldo Viana, pela orientação bem como pelas oportunidades concedidas para o meu aperfeiçoamento acadêmico, as quais permitiu acesso para novos campos de estudos.

Ao professor Jaécio Carlos Diniz, pela amizade, contribuição com a coleta da planta, e me repassar parte do seu conhecimento sobre uma importante técnica analítica (HPLC). Muitíssimo obrigado!

Ao técnico Fábio Mesquita, pela amizade, contribuição com a coleta da planta e por todo auxílio e orientação na atividade antifúngica do óleo.

Ao professor José Iranildo Miranda de Melo, pela identificação da planta.

Ao professor Francisco Marlon Carneiro Feijó e ao técnico Caio Sérgio Santos, pela disponibilidade do Laboratório de Microbiologia Veterinária – UFERSA.

A Central de Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, e do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), da Universidade Federal do Ceará e aos operadores do RMN, Chagas, Ceíça e Thiciana.

As minhas amigas **Crislânia** e **Simone**, pela amizade, carinho, apoio e compreensão nos momentos mais difíceis.

A **CAPES**, pela bolsa de pesquisa concedida, proporcionando maior tempo de dedicação à pesquisa.

Especialmente a **Claudina Sonaly Melo Rodrigues**, “minha menina encantada, sem você do meu lado tudo é nada, o tempo passa, mas minha vida pára, sinto-me assim longe de você, minha noiva e mulher amada”.

“Você nunca saberá que resultados virão da sua ação, mas se você não fizer nada, não existirão resultados”.

Caio Moura

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	IV
LISTA DE TABELAS	VI
LISTA DE FLUXOGRAMAS	VII
LISTA DE SIGLAS	VIII
RESUMO	IX
ABSTRACT	X
INTRODUÇÃO	199
OBJETIVOS	2121
1 - Geral	221
2 - Específicos	221
CAPÍTULO 1 - CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS	23
1.1 - Considerações sobre a família <i>Boraginaceae</i>	233
1.2 - Considerações sobre o gênero <i>Varronia</i> p. Browne.....	244
1.3 - Considerações sobre a espécie <i>Varronia dardani</i> (Taroda) J.S.Mill	266
1.4 - ESTUDO DO ÓLEO ESSENCIAL DA <i>VARRONIA DARDANI</i>	288
1.4.1 - Aspectos gerais dos óleos essenciais.....	288
CAPÍTULO 2 - PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL	31
2.1 - Métodos Cromatográficos	31
2.1.1 - Cromatografia de Adsorção	31
2.1.2 - Cromatografia em Coluna (CC)	31
2.1.3 – Cromatografia em camada delgada (CCD)	332
2.1.4 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)	32
2.2 - Métodos Físicos	32
2.2.1 - Ponto de Fusão	33
2.2.1.1 - Termogravimetria (TG/DSC).....	33
2.2.2 – Espectrometria de Massa	33
2.2.3 – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....	33
2.2.4 - Rotação óptica	344
2.2.5 - Índice de refração	34

2.3 - Estudos dos Constituintes Químicos Voláteis das Folhas da <i>Varronia dardani</i>	34
2.3.1 - Obtenção do óleo essencial das folhas da <i>V. dardani</i>	344
2.3.2 - Identificação e quantificação dos constituintes químicos do óleo essencial da <i>V.dardani</i>	366
2.3.3 - Atividade antifúngica sobre fungos filamentosos	377
2.3.4 - Atividades antifúngica e antibacteriana quanto a leveduras e bactérias de interesse médico veterinário	388
2.3.5 - Leveduras utilizadas e preparo do inóculo	388
2.3.6 - Bactérias utilizadas e preparo do inóculo.....	388
2.3.7 - Confeção do antibiograma.....	399
2.3.8 - Leitura e interpretação dos halos.....	399
2.4 - Material vegetal.....	40
2.4.1 - Obtenção do extrato diclorometano das raízes da <i>V. dardani</i> (EDRVD-DCM).....	40
2.4.2 - Fracionamento cromatográfico do extrato <i>EDRVD</i>	40
2.4.3 - Fracionamento cromatográfico da fração EDRVD-DCM e isolamento de <i>CPR-1</i> e <i>CPR-2</i>	42
2.4.4 - Obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas da <i>V. dardani</i>	433
2.4.5 - Tratamento Cromatográfico do extrato hidroalcoólico das folhas de <i>V. dardani</i> <i>EHiFVD</i>	43
2.4.6 - Fracionamento cromatográfico da fração <i>EHiFVD-DCM</i> e isolamento de <i>CPF-1</i> e <i>CPF-2</i>	45
2.4.7 - Fracionamento cromatográfico da fração <i>I-EHiFVD-DCM</i> e isolamento de <i>CPF-1</i> e <i>CPF-2</i>	45
CAPÍTULO 3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO	48
3.1 - Análise cromatográfica do óleo essencial da <i>V. dardani</i>	488
3.2 - Avaliações do potencial biológico do óleo essencial da <i>V. dardani</i>	50
3.2.1 - Avaliação do potencial antimicrobiano do óleo essencial da <i>V. dardani</i>	50
3.2.2 - Atividade antifúngica sobre fungos filamentosos	50
3.2.3 - Resultados e Discussão	50
3.3 - Atividades antifúngica e antibacteriana quanto a leveduras e bactérias de interesse médico veterinário	54
3.3.1 - Resultados e Discussão	54
3.4 - Determinação estrutural das naftoquinonas isoladas das raízes de <i>V. dardani</i>	56
3.4.1 – Determinação estrutural de <i>CPR-1</i>	56

3.4.2 – Determinação estrutural de <i>CPR-2</i>	67
3.5 - Determinação estrutural dos flavonóides isolados das folhas da <i>V. dardani</i>	78
3.5.1 - Determinação estrutural de <i>CPF-1</i>	78
3.5.2 – Determinação estrutural de <i>CPF-2</i>	87
CAPÍTULO 4 - CONCLUSÕES	96
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	98

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 - Fotografia ilustrando folhas (A), inflorescência (B) e fruto (C) da <i>V. dardani</i>	26
Figura 02 - Inibição do crescimento micelial (ICM, %) dos fungos pós colheita <i>L. theobromae</i> e <i>C. gloeosporioides</i> , em função de diferentes concentrações do óleo essencial de <i>Varronia dardani</i> . Médias seguidas de mesma letra, minúscula para concentração de óleo essencial e maiúscula para fungo, não diferem estatisticamente entre si pelo <i>post hoc</i> de Tukey (ANOVA <i>two-way</i> ; $p \leq 0,01$, $n = 4$). As barras representam o desvio-padrão da média.....	50
Figura 03 - Crescimento micelial do <i>Lasiodiplodia theobramae</i> em função das diferentes concentrações do óleo da <i>V.dardani</i>	52
Figura 04 - Crescimento micelial do <i>Lasiodiplodia theobramae</i> em função das diferentes concentrações do óleo da <i>V.dardani</i>	52
Figura 05 - Crescimento micelial do <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em função das diferentes concentrações do óleo da <i>V.dardani</i>	53
Figura 06 - Crescimento micelial do <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> em função das diferentes concentrações do óleo da <i>V.dardani</i>	53
Figura 07 - Estrutura da Cordiaquinona A.....	57
Figura 08 - Espectro de RMN ¹ H [500 MHz, CDCl ₃] de <i>CPR-1</i>	60
Figura 09 - Espectro de RMN ¹ H [500 MHz, CDCl ₃] de <i>CPR-1</i>	60
Figura 10 - Espectros de RMN ¹³ C-CPD [125 MHz, CDCl ₃] de <i>CPR-1</i>	61
Figura 11 - Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° [125 MHz, CDCl ₃] de <i>CPR-1</i>	61
Figura 12 - Espectro de RMN ¹ H, ¹³ C – HSQC [500 MHz, CDCl ₃] de <i>CPR-1</i>	62
Figura 13 - Expansão 1 do espectro de RMN ¹ H, ¹³ C – HSQC de <i>CPR-1</i>	62
Figura 14 - Expansão 2 do espectro de RMN ¹ H, ¹³ C – HSQC de <i>CPR-1</i>	63
Figura 15 - Espectro de RMN ¹ H, ¹³ C - HMBC [500 MHz, CDCl ₃] de <i>CPR-1</i>	63
Figura 16 - Expansão 1 do espectro de RMN ¹ H, ¹³ C – HMBC de <i>CPR-1</i>	64
Figura 17 - Expansão 2 do espectro de RMN ¹ H, ¹³ C – HMBC de <i>CPR-1</i>	64
Figura 18 – Expansão 3 do espectro de RMN ¹ H, ¹³ C – HMBC de <i>CPR-1</i>	65
Figura 19 - Espectro de RMN ¹ H, ¹ H – COSY [500 MHz, CDCl ₃] de <i>CPR-1</i>	65
Figura 20 - Expansão 1 do espectro de RMN ¹ H, ¹ H – COSY [500 MHz, CDCl ₃] de <i>CPR-1</i>	66
Figura 21 - Expansão2 do espectro de RMN ¹ H, ¹ H – COSY de <i>CPR-1</i>	66
Figura 22 - Estrutura da Cordiquinona B.....	68

Figura 23 - Espectro de RMN ¹ H [500 MHz, CDCl ₃] de CPR-2	71
Figura 24 - Expansão 1 do espectro de RMN ¹ H [500 MHz, CDCl ₃] de CPR-2	71
Figura 25 - Espectros de RMN ¹³ C-CPD [125 MHz, CDCl ₃] de CPR-2	72
Figura 26 - Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° [125 MHz, CDCl ₃] de CPR-2	72
Figura 27 - Espectro de RMN ¹ H, ¹³ C – HSQC [500 MHz, CDCl ₃] de CPR-2	73
Figura 28 - Expansão 1 do espectro de RMN ¹ H, ¹³ C – HSQC [500 MHz, CDCl ₃] de CPR-2	73
Figura 29 - Expansão 2 do espectro de RMN ¹ H, ¹³ C – HSQC [500 MHz, CDCl ₃] de CPR-2	74
Figura 30 - Espectro de RMN ¹ H, ¹³ C - HMBC [500 MHz, CDCl ₃] de CPR-2	74
Figura 31 - Expansão 1 do espectro de RMN ¹ H, ¹³ C - HMBC [500 MHz, CDCl ₃] de CPR-2	74
Figura 32 - Expansão 2 do espectro de RMN ¹ H, ¹³ C - HMBC [500 MHz, CDCl ₃] de CPR-2	75
Figura 33 - Expansão 3 do espectro de RMN ¹ H, ¹³ C - HMBC [500 MHz, CDCl ₃] de CPR-2	76
Figura 34 - Espectro de RMN ¹ H, ¹ H – COSY [500 MHz, CDCl ₃] de CPR-2	76
Figura 35 - Expansão 1 do espectro de RMN ¹ H, ¹ H – COSY [500 MHz, CDCl ₃] de CPR-2	77
Figura 36 - Expansão 2 do espectro de RMN ¹ H, ¹ H – COSY [500 MHz, CDCl ₃] de CPR-2	77
Figura 37 - Análise de TG/DSC (ponto de fusão) determinado para CPF-1	78
Figura 38 - Estrutura de CPF-1 (5-hidroxi-7-Metoxiflavanona).....	79
Figura 39 - Cromatograma de CPF-1 puro.....	80
Figura 40 - Espectro de massa de CPF-1	80
Figura 41 - Espectro de RMN ¹ H [500 MHz, CDCl ₃] de CPF-1	82
Figura 42 - Expansão do espectro de RMN ¹ H [500 MHz, CDCl ₃] de CPF-1	82
Figura 43 - Espectros de RMN ¹³ C-CPD [125 MHz, CDCl ₃] de CPF-1	83
Figura 44 - Espectro de RMN ¹³ C-DEPT 135° [125 MHz, CDCl ₃] de CPF-1	83
Figura 45 - Espectro de RMN ¹ H, ¹³ C – HSQC [500 MHz, CDCl ₃] de CPF-1	84
Figura 46 - Espectro de RMN ¹ H, ¹³ C - HMBC [500 MHz, CDCl ₃] de CPF-1	84
Figura 47 - Expansão 1 do espectro de RMN ¹ H, ¹³ C - HMBC [500 MHz, CDCl ₃] de CPF-1	85

Figura 48 - Expansão 2 do espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC [500 MHz, CDCl_3] de CPF-1	85
Figura 49 - Expansão 3 do espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC [500 MHz, CDCl_3] de CPF-1	86
Figura 50 - Análise de TG/DSC (ponto de fusão) determinado para CPF-2	87
Figura 51 - Estrutura de CPF-2 (5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona).....	88
Figura 52 - Cromatograma de CPF-2 puro.....	89
Figura 53 - Espectro de massa de CPF-2	89
Figura 54 - Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de CPF-2	91
Figura 55 - Expansão do espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de CPF-2	91
Figura 56 - Espectros de RMN ^{13}C -CPD [125 MHz, CDCl_3] de CPF-2	92
Figura 57 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de CPF-2	92
Figura 58 - Espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HSQC [500 MHz, CDCl_3] de CPF-2	93
Figura 59 - Espectro do espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC [500 MHz, CDCl_3] de CPF-2	93
Figura 60 - Espectro de RMN ^1H , ^1H - COSY [500 MHz, CDCl_3] de CPF-2	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Massa e rendimentos dos óleos extraídos de <i>V. dardani</i>	34
Tabela 02 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico de <i>EDRVD-DCM</i> (2680 mg)	40
Tabela 03 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico de <i>EDRVD-DCM</i> (0,9305g).....	41
Tabela 04 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico de <i>EHiFVD</i> (24,6 g).....	43
Tabela 05 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico de <i>EHiFVD</i> (2,5 g).....	43
Tabela 06 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico de <i>EHiFVD-DCM</i> (0,2896g).....	45
Tabela 07 - Constituintes químicos do óleo essencial da <i>Varronia dardani</i>	48
Tabela 08 - Diâmetro de halos de inibição quanto ao óleo essencial <i>V. dardani</i> e controles positivo e negativo em cepas de bactérias e leveduras de interesse médico veterinário em milímetros.....	53
Tabela 09 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C e ^1H (CDCl_3) de <i>CPR-1</i>	57
Tabela 10 - Correlações a longa distância ^1H , ^{13}C – HMBC de <i>CPR-1</i>	58
Tabela 11 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C e ^1H (CDCl_3) de <i>CPR-2</i>	68
Tabela 12 - Correlações a longa distância ^1H , ^{13}C – HMBC de <i>CPH-2</i>	69
Tabela 13 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C e ^1H (CDCl_3) de <i>CPF-1</i>	80
Tabela 14 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C e ^1H (CDCl_3) de <i>CPF-2</i>	89

LISTA DE FLUXOGRAMAS

Fluxograma 01 - Método de extração do óleo essencial da <i>V. dardani</i>	35
Fluxograma 02 - Rota esquemática para obtenção do extrato diclorometano da raiz da <i>V. dardani</i>	40
Fluxograma 03 - Isolamento dos constituintes químicos CPR-1 e CPR-2 obtidos a partir do extrato diclorometano das raízes de <i>V.dardani</i>	42
Fluxograma 04 - Rota esquemática para obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas da <i>V. dardani</i>	43

LISTA DE SIGLAS

$[\alpha]_D^{20}$	Rotação ótica específica
D^{25}	Densidade
η^{25}	Índices de refração
J	Constante de acoplamento
δ	Deslocamento químico
APT	Attached Band decoupling
BB	Broad Band decoupling
CC	Cromatografia em Coluna
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CLAE	Cromatografia Líquido de Alta Eficiência
CG/DIC	Cromatografia Gasosa com Detector de Ionização de Chama
CG/MS	Cromatografia Gasosa acoplada a Espectrometria de Massa
COSY	Correlation Spectroscopy
DEPT	Distortionless Enhancement by Polarization Transfer
EM-IES	Espectrometria de Massa com ionização por electrospray
EM	Espectrometria de Massa
HMBC	Heteronuclear Multiple Bond Correlation
HMQC	Heteronuclear Multiple Quantum Coherence
Hz	Hertz
IK	Índice de Kovalts
NOESY	Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy
ppm	Partes por milhão
p.f	Ponto de fusão
p/v	Porcentagem peso / volume

RMN ¹³C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono-13
RMN ¹H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
Rf	Fator de retenção
TR	Tempo de retenção

RESUMO

Este trabalho descreve a investigação fitoquímica da *Varronia dardani* (Boraginaceae), visando o isolamento e caracterização estrutural de novos constituintes químicos, bem como a investigação da composição química do óleo essencial e a avaliação de seu potencial biológico (antimicrobiano). O estudo do óleo essencial das folhas da *V. dardani* resultou na identificação de 25 constituintes, correspondendo a mais de 83% da composição do óleo, constituídos por monoterpenoides e sesquiterpenoides. O óleo essencial mostrou significativa atividade antimicrobiana frente aos fungos filamentosos *Colletotrichum gloeosporioides* e *Lasiodiplodia theobromae*, e atividades antifúngica e antibacteriana quanto a leveduras e bactérias de interesse médico veterinário, frente a bactérias *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* e a leveduras *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. A investigação química realizada com o extrato diclorometano da raiz e com o extrato hidroalcoólicos das folhas resultou no isolamento e caracterização de quatro substâncias. Do extrato diclorometano da raiz foram isoladas duas naftoquinonas; Cordiquinona A e Cordiaquinona B, (6-[10-(11, 12, 16-trimetil-13-oxociclohexil)etil]-1,4-naftalenodiona) respectivamente. Do extrato hidroalcoólico das folhas, foram isolados dois flavanoides, 5-hidroxi-7-metoxi-flavanona e 5-hidroxi-7,4'-dimetoxi-flavanona respectivamente. A determinação estrutural das substâncias foi realizada através do uso de técnicas espectrométricas como: espectrometria de massa (EM e EM-IES) e ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e carbono-13 (RMN ¹³C), incluindo técnicas bidimensionais (COSY, HSQC, HMBC, NOESY) e comparação com os dados descritos na literatura, enquanto a composição química do óleo essencial estudado foi determinado por CG-EM e CG-DIC.

Palavras-chave: *Varronia dardani*, naftoquinonas, flavonóide, óleo essencial e atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

This work describes the phytochemical research *Varronia Dardani* (Boraginaceae), to the isolation and structural characterization of new chemical constituents, and the investigation of the chemical composition of essential oil and evaluation of their biological potential (antimicrobial). The study of the essential oil of *V. Dardani* sheets resulted in the identification of 25 constituents, corresponding to more than 83% of the oil composition, consisting of monoterpenoids and sesquiterpenoids. The essential oil showed significant antimicrobial activity to filamentous fungi *Colletotrichum gloeosporioides* and *Lasiodiplodia theobromae*, and antifungal and antibacterial activities as yeast and bacteria veterinary medical interest, against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* and the yeast *Candida albicans* and *Cryptococcus neoformans*. The chemical research carried out with dichloromethane root extract and the hydroalcoholic extract of leaves resulted in the isolation and characterization of four substances. Dichloromethane root extract were isolated two naphthoquinones; Cordiquinona cordiaquinone A and B (6- [10- (11, 12, 16-trimethyl-13-oxocyclohexyl) ethyl] -1,4-naftalenodiona) respectively. The hydroalcoholic extract of leaves, two flavonoids were isolated, 5-hydroxy-7-methoxy-flavanone and 5-hydroxy-7,4'-dimethoxy-flavanone respectively. The structural determination of substances was performed by use of spectrometric techniques such as mass spectrometry (MS and ESI-MS) and nuclear magnetic resonance of hydrogen (^1H NMR) and carbon-13 (^{13}C NMR), including two dimensional techniques (COSY, HSQC, HMBC, NOESY) and comparison with the data described in the literature as essential oil studied chemical composition was determined by GC-MS and GC-FID.

Keywords: *Varronia Dardani*, naphthoquinones, flavonoids, essential oil and antimicrobial activity.

INTRODUÇÃO

Segundo Di Stasi (1996) e Barreiro (2009), o Brasil, sendo o país de maior diversidade vegetal do mundo, com valor estimado em torno de 55 mil espécies, correspondendo a 22% das espécies descritas mundialmente, e com um índice de endemismo altíssimo, apresenta um número reduzido de espécies estudadas constituindo-se assim, um importante tema de pesquisa acadêmica multidisciplinar nas áreas de Etnobotânica, Etnofarmacologia e Fitoquímica, requeridas pelo crescente interesse mundial na descoberta de substâncias com propriedades terapêuticas. Sob este aspecto, dentre os biomas brasileiros destaca-se a Caatinga, uma região com uma formação vegetal característica do semiárido do Nordeste Brasileiro, constituída de ampla variedade vegetal, com inúmeras espécies endêmicas (Andrade-Lima, 1981 e 1989). A exemplo de plantas valiosas da flora desse bioma, podem ser citados estudos fitoquímicos e farmacológicos relevantes de muitas espécies vegetais (Albuquerque, 2004), como *Amburana cearenses* (Allemão) A.C.Sm (cumaru), *Myracrodruon urundeuva* Allemão (aroeira do sertão) como plantas medicinais úteis na cura de diversas enfermidades, sendo utilizadas em programas comunitários denominado de Farmácias Vivas (Matos, 2001).

Desde a antiguidade as plantas são usadas tradicionalmente por populações de todos os continentes, no controle de diversas doenças e pragas. Esta tradição tornou-se um recurso alternativo de grande aceitação, tanto nas pequenas comunidades rurais como nos centros urbanos. Este fato vem chamando a atenção da comunidade científica para comprovar a eficácia e promover o uso seguro desses recursos naturais (Fennel *et al.*, 2004).

As plantas destacam-se também por serem fontes naturais elaboradoras de uma infinidade de substâncias químicas que são biossintetizadas para desempenhar funções vitais, tais como defesa contra predadores e microorganismos. Essas substâncias podem ser importantes para os seres humanos, uma vez que ao apresentarem atividades farmacológicas, podem ser aplicadas na área terapêutica, atuando como medicamento, ou protótipos para síntese de novos fármacos (Palmeira, 2005).

Inúmeras plantas pertencentes à família Boraginaceae são utilizadas na medicina popular, outras são produtoras de madeira de boa qualidade, inclusive resistentes ao ataque de fungos, insetos e microrganismos (Santos *et al.*, 2006). Em virtude disso, plantas desta família tem sido alvo de estudos como fonte de substâncias bioativas de interesse das indústrias farmacêuticas, e de cosméticos. Entretanto, poucas espécies desta família foram estudadas detalhadamente sob o ponto de vista químico ou farmacológico (Barroso *et al.*, 2002).

O gênero *Varronia* P. Browne é um dos maiores e mais importantes da família Boraginaceae, devido aos seus aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e importância econômica. As espécies pertencentes a este gênero têm sido usadas na medicina popular por apresentarem diversas propriedades farmacológicas ou biológicas como: antifúngica (Guzzo *et al.*, 2010; Hernandez *et al.*, 2006), larvicida (Santos *et al.*, 2006; Freitas, 2010), antimicrobiana (Carvalho *et al.*, 2004). Além do uso de plantas do gênero *Varronia* na medicina popular, estudos disponíveis na literatura têm relatado que extratos e substâncias puras obtidas a partir de diferentes espécies do gênero apresentam propriedades biológicas.

O presente trabalho descreve o isolamento e elucidação estrutural dos metabólitos secundários do extrato diclorometano da raiz e extrato hidroalcoólico das folhas de *V. dardani*, assim como o potencial antimicrobiano do óleo essencial extraídos de suas folhas.

A determinação estrutural das substâncias foi realizada através do uso de técnicas espectrométricas como: Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio (RMN ^1H) e de Carbono-13 (RMN ^{13}C), incluindo técnicas bidimensionais como COSY, HSQC e HMBC.

OBJETIVOS

1 - Geral

Contribuir com a ampliação do conhecimento químico e biológico da espécie *Varronia dardani*, através do isolamento de metabólitos e da avaliação do potencial antimicrobiano, do óleo essencial extraídas de suas folhas.

2 - Específicos

- Coletar no campo amostras da espécie *Varronia dardani* para fins de estudo e de incorporação de *voucher* ao Herbário Dárdano de Andrade Lima (UFERSA);
- Preparar os extratos diclorometano das raízes, hidroalcoólico das folhas da *Varronia dardani*;
- Isolar, purificar os metabólitos secundários presentes no extrato diclorometano das raízes e hidroalcoólico das folhas através de processos cromatográficos;
- Elucidar as estruturas das substâncias isoladas por métodos espectroscópicos de RMN – ^1H e RMN- ^{13}C , uni e bidimensionais (COSY, NOESY, HMQC e HMBC);
- Realizar testes antimicrobianos do óleo essencial da *V. dardani*.

CAPÍTULO 1

REFERENCIAL TEÓRICO

CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

1 - CONSIDERAÇÕES BOTÂNICAS

1.1 - Considerações sobre a família Boraginaceae

A família Boraginaceae, estabelecida por Jussieu em 1789, a qual pertence os gêneros *Cordia* L. e *Varronia* P. Browne, conta com cerca de 130 gêneros e aproximadamente 2.500 espécies distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais, temperadas e árticas. Seus principais centros de dispersão localizam-se na região mediterrânea e nos Estados Unidos da América (Melo e Lira Lemos, 2008). No Brasil, a família está representada por 9 gêneros e 129 espécies (Melo *et al.*, 2014).

Na Região Nordeste, na vegetação da caatinga, a família se destaca por concentrar 6 gêneros e 39 espécies, o que corresponde a 2,7% do número de espécies deste bioma (Giulietti *et al.*, 2006; Melo *et al.*, 2010).

As plantas que compõem a família Boraginaceae possuem as seguintes características:

Herbáceas ou lenhosas, arbustivas ou arbóreas, com folhas alternas, raramente opostas, inteiras. Flores pequenas ou grandes, hermafroditas ou menos frequentemente unissexuais, diclamídeas, actinomorfas ou zigomorfas, em geral reunidas em inflorescências estas paniculiformes, tirsóides, capitadas, glomérulo-globosas, escorpióides ou helicoides com ramos secundifloros. A corola é gamopétala, às vezes discretamente bilabiada. O androceu é formado por 5 estames livres ou coerentes pelo ápice das anteras, inclusos ou exsertos. O gineceu é composto de dois a quatro carpelos, apresentando ovário súpero, com dois a quatro lóculos uniovulados, e estilete (*Euploca* Nutt., *Heliotropium* L) é inteiro ou 2-bifurcado no ápice (*Cordia* L., *Varronia* P. Browne). O fruto é do tipo esquizocarpo (p. ex., *Heliotropium*), com duas a quatro núculas, ou do tipo Ydrupa (p. ex., *Cordia*). As sementes apresentam-se com ou sem endosperma, com embrião reto ou curvo, constituídos por cotilédones planos ou Plicados (Leite, 2006; Melo, com. Pess.).

Inúmeras plantas pertencentes à família Boraginaceae são utilizadas na medicina popular, outras são produtoras de madeira de boa qualidade, inclusive resistente ao ataque de

fungos, insetos e microrganismos (Santos *et al.*, 2006). Em virtude disso, plantas desta família tem sido alvo de estudos como fonte de substâncias bioativas de interesse das indústrias farmacêuticas, e de cosméticos. Entretanto, poucas espécies desta família foram estudadas detalhadamente sob o ponto de vista químico ou farmacológico (Barroso *et al.*, 2002).

A família Boraginaceae, sob o ponto de vista químico é pouco estudada, embora muitas de suas espécies apresentem interesse como fonte prolífica de substâncias químicas para a indústria farmacêutica, para a indústria de cosméticos entre outras. (Barroso *et al.*, 2002; Menezes, 2001). As principais classes de substâncias encontradas na família são os alcalóides, quinonas, naftoquinonas e flavonóides. Dentre representantes desta família registradas na flora potiguar, destaca-se o gênero *Cordia*, um dos maiores da família, constituído por árvores e arbustos, tendo a espécie *Cordia curassavica* (Jacq.). Roem. e Schult. (erva baleeira), a ter na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o registro do primeiro medicamento fitoterápico nacional com atividade anti-inflamatória e cicatrizante produzido a partir de extratos vegetais (Basile *et al.*, 1989).

1.2 - Considerações sobre o gênero *Varronia* p. Browne

O gênero *Varronia* P. Browne é um dos maiores e mais importantes da família Boraginaceae, devido aos seus aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e importância econômica. Apresenta distribuição exclusivamente neotropical e engloba aproximadamente 100 espécies (Melo, com. Pess.), muitas das quais são usadas na medicina popular, por apresentarem diversas propriedades farmacológicas ou biológicas como: antiúlcera, antimicrobiana, antifúngica, larvicida, antiinflamatória e analgésica. Ainda podem ser empregados no tratamento de diversas patologias como, pneumonia, tosse, reumatismo e dispepsia (Diniz *et al.*, 2009).

Varronia tem sido descrito como um subgênero de *Cordia* (Taroda, 1984), no entanto, houve a segregação de *Varronia* dos outros membros de *Cordia*, sendo classificado assim devido a sua significância morfológica e evidências moleculares, corroborando para que *Varronia* seja um grupo monofilético distinto, sendo tratada como irmã de *Cordia* e reconhecida a nível genérico (Miller e Gottschling, 2007).

A nomenclatura de algumas espécies que antes estavam posicionadas dentro do gênero *Cordia* foi atualizada para *Varronia* devido à mudança na filogenia, incluindo espécies como: *Varronia curassavica* Jacq (Melo, 2012a); *Varronia globosa* Jacq (Melo, 2012b);

Varronia leucocephala (Moric.) J.S.Mill (Melo, 2012c); e *Varronia dardani* (Melo, 2012d), todas distribuídas no Nordeste do Brasil.

Além do uso de plantas dos gêneros *Cordia* e *Varronia* na medicina popular, estudos disponíveis na literatura têm relatado que extratos e substâncias puras obtidas a partir de diferentes espécies do gênero apresentam propriedades biológicas. Segundo Ioset *et al.*, (1998 e 2000) o extrato diclorometano e os compostos isolados das raízes de *Cordia linnaei* Stearn e *Cordia curassavica* Jacq. (= *Varronia curassavica* Jacq.), apresentaram atividade antifúngica contra fungos patogênicos de plantas como o *Cladosporium cucumerinum* e contra o fungo *Candida albicans*, bem como atividade larvicida frente a larvas do mosquito *Aedes aegypti*, causador da febre amarela e dengue. De acordo com Mori *et al.*, (2008) o extrato metanólico da madeira e os compostos obtidos de *Cordia fragrantissima* Kurz exibiram forte atividade antileishmania quando testado *in vitro*.

Embora pantropical, este táxon tem seu maior centro de diversidade no Novo Mundo, sendo particularmente bem representado no Brasil, onde podem ser encontradas cerca de 65 espécies, descritas como:

“Árvores, arbustos ou ervas variavelmente pubescentes, providos de tricomas geralmente simples, ocasionalmente estrelados. As folhas são alternadas usualmente homomórficas, às vezes dimórficas, pecioladas ou sésseis, as flores são terminais ou internodais. O cálice é tubuloso e não aumenta na frutificação, nem sofre modificações. A corola apresenta-se variando de pequena (4 mm) a grande (7 mm) em forma de funil, de bandeja ou tubular cilindra. O ovário é 2-caperlar com 4 lóbulos e 4 óvulos, sendo que geralmente apenas um se desenvolve. Os frutos são assencialmente drupáceos, comumente ovóides e às vezes elipsóides. As sementes são em números de 1-2 por fruto, providas de embrião com cotilédones plicados (Leite, 2006)”.

Segundo Gibbs (1974), em estudo sobre membros da família Boraginaceae, o gênero *Cordia* é caracterizado pelas seguintes classes de substâncias: quinonas, hidroquinonas, terpenóides, álcoois terpênicos, compostos fenólicos, flavonóides, saponinas, taninos, esteróides e compostos nitrogenados. Inúmeras espécies do gênero *Cordia* tem apresentado estudos com destacada atividade biológica, com ação anti-inflamatória (Al-Awadi *et al.*,

2001), antimicrobiana, antioxidante (Okusa *et al.*, 2007), antitumoral (Parisotto *et al.*, 2011) analgésica, antiúlcera (Roldão *et al.*, 2008) entre outras.

1.3 - Considerações sobre a espécie *Varronia dardani* (Taroda) J.S.Mill

Esta espécie tem como basionimo *Cordia dardani* Taroda, endêmica da caatinga do Brasil, sendo distribuída em Estados do Nordeste do país como: Ceará, Pernambuco, Bahia, Paraíba, Alagoas e Sergipe (Melo & Sales 2005a) e no Rio Grande do Norte (Melo *et al.*, 2012).

Varronia dardani (Taroda) J.S. Mill foi descrita por apresentar:

Ramos subcilíndrico; Folhas alternas; pecíolo sulcado, viloso. Inflorescência espiciforme, congesta, terminal e axilar; pedúnculo densamente viloso, rufescente. Flores sésseis; cálice obcônico, tomentoso, lacínios diminutos, ovados; corola tubularsalverforme, alva a creme, pubescente externamente, internamente vilosa na região do tubo, lobos diminutos, truncados; estames subsésseis, anteras oblongas, divaricatas; ovário piriforme; ramos estigmáticos, estigmas foliáceos, vilosos (Melo, 2012).

É uma espécie próxima de *Varronia curassavica*, com a qual pode ser facilmente confundida por compartilharem, principalmente, hábito e inflorescência espiciformes. No entanto, *Varronia dardani* distingue-se de *V. curassavica* basicamente pelo formato da lâmina foliar, que é deltoide, oval-deltóide a oval-oblonga com base truncada enquanto que em *V. curassavica* é lanceolada, oblongo-ovada a oblongo-lanceolada de base atenuada.

Foto: Autoria própria



Foto: Autoria própria



Foto: Autoria própria

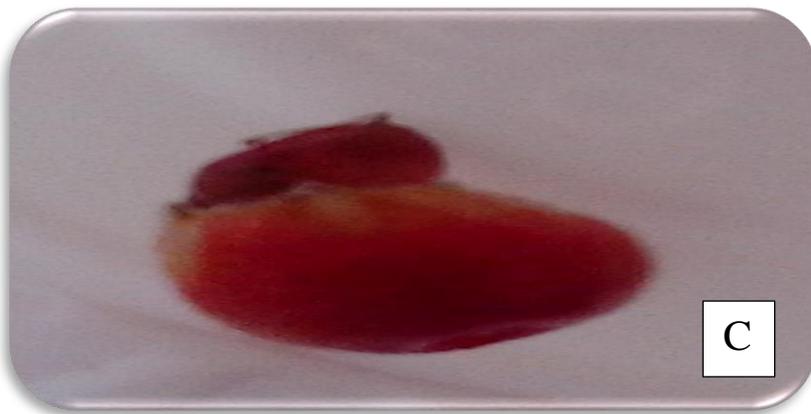


Figura 01 - Fotografia ilustrando folhas (A), inflorescência (B) e fruto (C) da *V. dardani*.

1.4 - ESTUDO DO ÓLEO ESSENCIAL DA *VARRONIA DARDANI*

1.4.1 - Aspectos gerais dos óleos essenciais

O termo “óleo essencial” foi utilizado pela primeira vez no século XVI por Paracelsus, quem nomeou o componente efetivo de uma droga, “quinta essência”. Por volta do século 20, os mesmos eram utilizados em perfumes, cosméticos e aromas alimentares, enquanto sua utilidade em preparações farmacêuticas tinha declinado (Edris, 2007).

Os óleos essenciais também conhecidos como óleos voláteis, óleos etéreos ou simplesmente essências, são extraídos de plantas através das técnicas de arraste de vapor, na maioria das vezes, e também pela prensagem do pericarpo de frutos cítricos, que no Brasil dominam o mercado de exportação (Bizzo, 2009). A ISO (International Organization for Standardization) os define como: “um produto obtido por destilação em água ou vapor, por destilação seca de materiais naturais ou por processos mecânicos de extração de pericarpos de frutos cítricos. Após a destilação, o óleo essencial é fisicamente separado da fase aquosa” (ISO 9235:1997).

Os óleos essenciais são misturas complexas de substâncias voláteis contidas em órgãos de plantas, e assim são denominados devido à composição lipofílica que se apresentam quimicamente diferente da composição glicerídica dos verdadeiros óleos e gorduras. Esta diferença está relacionada a algumas características físico-químicas dos mesmos, como, por exemplo, geralmente serem líquidos de aparência oleosa a temperatura ambiente, serem voláteis e apresentarem aroma agradável. De coloração, odor e viscosidade variados, os óleos voláteis apresentam solubilidade limitada em água e geralmente apresentam densidade menor. Os óleos estão associados a várias funções necessárias a sobrevivência do vegetal, exercendo papel fundamental na defesa contra microrganismos e predadores, como também atraindo insetos e outros agentes fecundadores.

Os terpenóides são os constituintes predominantes dos óleos essenciais de plantas, mas muitos destes óleos também são compostos por outros produtos químicos como fenilpropanóides, podendo ser acrescidos de outras classes de compostos, como álcoois, ésteres, aldeídos e cetonas de cadeia curtas. Quase todos os óleos essenciais são extremamente complexos na composição, no que diz respeito à presença de uma grande variedade de entidades químicas altamente funcionalizadas, que pertencem a diferentes classes químicas (monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides) metabolitos que conferem suas características organolépticas (Bizzo, Hovell & Rezende, 2009), mas dependendo do método

de extração e da composição da planta, terpenos menos voláteis podem aparecer na composição do óleo, assim como os mais voláteis podem se dispersar (Sangwan *et al.*, 2001). A composição química dos óleos voláteis produzidos por espécies distintas pode apresentar constituintes em comum, assim como, a composição química de um óleo obtido a partir da mesma espécie pode variar, quando se levar em consideração o ambiente o qual o vegetal se desenvolve, o tipo de cultivo e as influências climáticas (Sangwan *et al.*, 2001).

A evolução de conhecimentos técnicos sobre os óleos essenciais deu-se em meados do século XVIII, quando se iniciaram os estudos para suas caracterizações químicas. Atualmente é bastante grande o numero de plantas conhecidas para a produção de óleos essenciais em bases econômicas. Tal ocorrência vai desde plantas rasteiras, como é o caso da hortelã, até plantas de porte arbóreo, como é o caso do eucalipto (Vitti e Brito, 2003).

Os óleos essenciais são comumente utilizados na medicina tradicional e encontram sua maior aplicação biológica como agentes antimicrobianos. Possuem aplicações nas áreas de perfumaria, cosméticos, alimentos e como coadjuvantes em medicamentos, mas são empregados principalmente como aromas e fragrâncias (Bizzo, 2009).

Neste trabalho foi realizado o estudo dos constituintes químicos voláteis do óleo essencial das folhas da *V. dardani*, assim como a verificação da atividade antimicrobiana (fungos e bactérias) do mesmo, frente a fungos filamentosos, leveduras e bactérias de interesse médico veterinário.

CAPÍTULO 2

Procedimento Experimental

2-PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

2.1 - Métodos Cromatográficos

2.1.1 - Cromatografia de Adsorção

As cromatografias de adsorção em coluna foram executadas utilizando gel de sílica 60, com granulometria de 70-230 mesh, da marca Vetec (cromatografia gravitacional) e 230-400 mesh da Merck para cromatografia sob média pressão (cromatografia flash). O comprimento e diâmetro das colunas variaram de acordo com as alíquotas das amostras a serem cromatografadas e com a quantidade de sílica empregada. As colunas utilizadas na cromatografia de adsorção sob média pressão (cromatografia flash) foram de vidro resistente à pressão e continham bulbos no ápice, para armazenamento do solvente. Foi empregada nesta técnica, bomba de ar comprimido modelo Inalar Compact N° 682403 de Ind. de aparelhos médicos Ltda. Para a cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se cromatoplasmas de gel de sílica 60, 5-40 µm, com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm sobre cromatoplasmas de poliéster ou alumínio da Merck.

As revelações das substâncias nas cromatoplasmas analíticas foram realizadas através da exposição destas a radiação ultravioleta (UV) em dois comprimentos de onda (254 e 365 nm) emitidos por lâmpada modelo UVSL-25 da Mineral Light, pela pulverização com solução de vanilina e ácido fosfórico em água ou com solução de *p*-anisaldeído, ácido sulfúrico em ácido acético, seguindo de aquecimento em estufa em 105 °C por 5 minutos.

Os solventes utilizados nos procedimentos cromatográficos foram: Hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, isopropanol, etanol e metanol, puros ou em misturas binária em proporções crescentes de polaridade. Os solventes eram de qualidade P.A., destilado ou grau CLAE.

A destilação dos solventes dos extratos e das frações resultantes das cromatografias foi realizada em evaporador rotatório Fisatom 802.

2.1.2 - Cromatografia em Coluna (CC)

Nas separações por cromatografia em coluna foram utilizados como fase fixa os adsorventes, gel de sílica com granulometria de 70-230, da marca Vetec e Sephadex LH-20, marca Pharmacia. Os comprimentos e diâmetro das colunas variaram de acordo com as

quantidades de amostras a serem cromatografadas e adsorventes utilizados. Como eluentes foram usados hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona, metanol e água. Estes solventes foram usados puros ou em misturas binárias programadas em ordem de polaridade crescente. Todos os solventes foram de qualidade P.A. das marcas Vetec e MERCK, ou grau CLAE.

2.1.3 – Cromatografia em camada delgada (CCD)

Para cromatografia em camada delgada (CCD) utilizou-se placas de poliéster e alumínio nas dimensões 6 x 3,5 cm, com camada de sílica 60, 5-40 µm, com indicador de fluorescência na faixa de 254 nm (F₂₅₄), MERCK. As revelações das substâncias, nas placas, foram realizadas por exposição em lâmpada de irradiação modelo UVSL-25 da Mineral Light com dois comprimentos de onda (254 e 366 nm), pela pulverização com uma solução de vanilina e ácido fosfórico em água em ou solução de *p*-anisaldeído, ácido sulfúrico em ácido acético glacial, seguida por aquecimento em chapa aquecedora ou estufa a 105 °C ou por vapores de iodo presentes em câmara saturada. Como eluentes foram usados hexano, diclorometano, acetato de etila, acetona e metanol, puros ou em misturas binária ou ternária.

2.1.4 - Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE)

A cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE) foi realizada em aparelho da marca SHIMAZDU, constituído de três bombas de alta pressão, modelo LC-10Atpv, detector com arranjo de dióxido e um forno termostático para acomodação da coluna. Para as corridas utilizou-se uma coluna semi-preparativa em fase reversa Supercosil LC-18 (LC, 250 x 10 nm, 5 µm) e como fase móvel os solventes diclorometano e metanol com grau HPLC, que foram filtrados em membrana de nylon com poros de PTFE de 0,45 µm e desgaseificados com gás Hélio por 10 min. As amostras foram dissolvidas com os solventes usados na fase móvel e filtradas num sistema manual de membrana de teflon 0,45 µm da Whatman.

2.2 - Métodos Físicos

Os espectros apresentados neste trabalho foram obtidos em equipamentos da Central de Analítica do Departamento de Química Orgânica e Inorgânica, e do Centro Nordestino de Aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear (CENAUREMN), da Universidade

Federal do Ceará, e o ponto de fusão das substâncias isoladas foi obtido em equipamento no Laboratório de Catálise, Ambiente e Materiais (LACAM), da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte.

2.2.1 - Ponto de Fusão

2.2.1.1 - Termogravimetria (TG/DSC)

A análise termogravimétrica (TG/DSC) foi realizada com o intuito principal de acompanhar a temperatura de fusão e degradação dos materiais isolados. Para isso aproximadamente 1 mg das amostras foi submetida a um aquecimento de 25 a 300 °C, a uma razão de aquecimento de 10°/min, sob atmosfera de nitrogênio com fluxo de 70 mL.min⁻¹. O equipamento utilizado foi o modelo STA 449 Jupiter da Netzsch

2.2.2 – Espectrometria de Massa

A análise qualitativa do óleo essencial e dos constituintes não voláteis foram obtidos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) num GC composto por: Auto-Injetor AOC-5000; Cromatógrafo a Gás GC-2010 Plus; Espectrômetro de Massa QP2010 Ultra; OCI/PTV-2010; FID-2010; Detector Splitting; Software NIST 11 MASS e Software GCMS solution - Marca Shimadzu, equipado com coluna Rtx-5ms (polissiloxano 5%-difenil-95%-dimetil) de 30 m x 0,25 mm x 0,25 µm. Os experimentos foram realizados nas seguintes condições: ionização por impacto de elétrons a 70 eV; hélio como gás de arraste com fluxo de 1,22 mL.min⁻¹; gradiente crescente de temperatura de 6 °C/min, de 30 a 300 °C. As temperaturas do injetor e detector foram de 250 e 310 °C respectivamente. Os dados de MS e FID foram simultaneamente adquiridos e empregados num sistema de divisão de detector; numa razão de separação de escoamento de 1:1 (MS/FID).

2.2.3 – Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)

Os espectros de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN ¹H) e carbono ¹³ (RMN ¹³C) uni e bidimensionais, foram obtidos em espectrômetro Bruker, modelos DRX-500 e DPX-300, operando na frequência de 500 e 300 MHz para hidrogênio e 125 e 75 MHz

para carbono-13, ambos pertencente ao centro Nordeste de aplicação e Uso da Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal do Ceará (CERAUREMN-UFC).

Os solventes deuterados utilizados na dissolução das amostras e obtenção dos espectros foram: clorofórmio (CDCl_3), metanol (CD_3OD) e piridina ($\text{C}_5\text{D}_5\text{N}$). Os deslocamentos químicos (δ) foram expressos em parte por milhão (ppm) e referenciados nos espectros de RMN ^1H pelo pico de hidrogênio pertencente à fração não deuterada dos solventes: clorofórmio (δ_{H} , 7,27), metanol (δ_{H} , 4,87; 3,31) e piridina (δ_{H} , 8,74; 7,58; 7,22) e para os espectros de RMN ^{13}C pelos picos de carbono-13 dos solventes: clorofórmio δ (77,23), metanol δ (49,15) e piridina δ (123,87; 135,91 e 150,35)

As multiplicidades das absorções foram indicadas segundo a convenção: s (singlete), sl (singlete largo) d (dubleto), dd (duplo dubleto), dl (dubleto largo), dt (dubleto triplo), td (triplete duplo), t (triplete) e m (multiplete).

O padrão de hidrogênio dos carbonos foi determinado através da utilização da técnica DEPT 135° e segundo convenção: C (carbono não hidrogenado), CH (carbono metínico), CH_2 (carbono metilênico) e CH_3 (carbono metílico).

2.2.4 - Rotação óptica

As rotações ópticas foram obtidas em polarímetro digital da Perkin-Elmer 341 a temperatura de 25 °C e concentração de $1\text{mg}\cdot 2\text{mL}^{-1}$ de solvente.

2.2.5 - Índice de refração

O índice de refração do óleo foi obtido utilizando um Abbe Refractometer da QUIMIX, modelo WyA-15.

2.3 - Estudos dos Constituintes Químicos Voláteis das Folhas da *Varronia dardani*

2.3.1 - Extração do óleo essencial das folhas da *V. dardani*

As folhas de *Varronia dardani* foram coletadas no município de Mossoró-RN e levadas ao laboratório de Cromatografia (UERN), onde foram pesadas (222,72 g) e adicionadas em um balão de 5,0 L, juntamente com 2 L de água destilada. Ao balão foi acoplado um doseador do tipo Clevenger e um condensador, e o sistema foi então submetido

ao processo de hidrodestilação por 2 hs. Após este período, a fase orgânica foi separada do hidrolato, seca com sulfato de sódio anidro (Na₂SO₄), e filtrada (Fluxograma 01), resultando em óleo de aspecto amarelado, fluido e aromático, armazenados em frascos de vidro fechados cobertos com papel alumínio e mantidos sob-refrigeração a 5°C antes da análise cromatográfica e testes antimicrobianos. Vale ressaltar que foram feitas cinco extrações consecutivas da mesma planta, cujos rendimentos dos óleos encontram-se descritos na Tabela 01, calculados a partir da equação 1.

Equação 01:

$$TO = \frac{M \text{ óleo}}{M \text{ folha}} \times 100$$

Onde:

TO = teor de óleo;

M óleo = massa do óleo obtida;

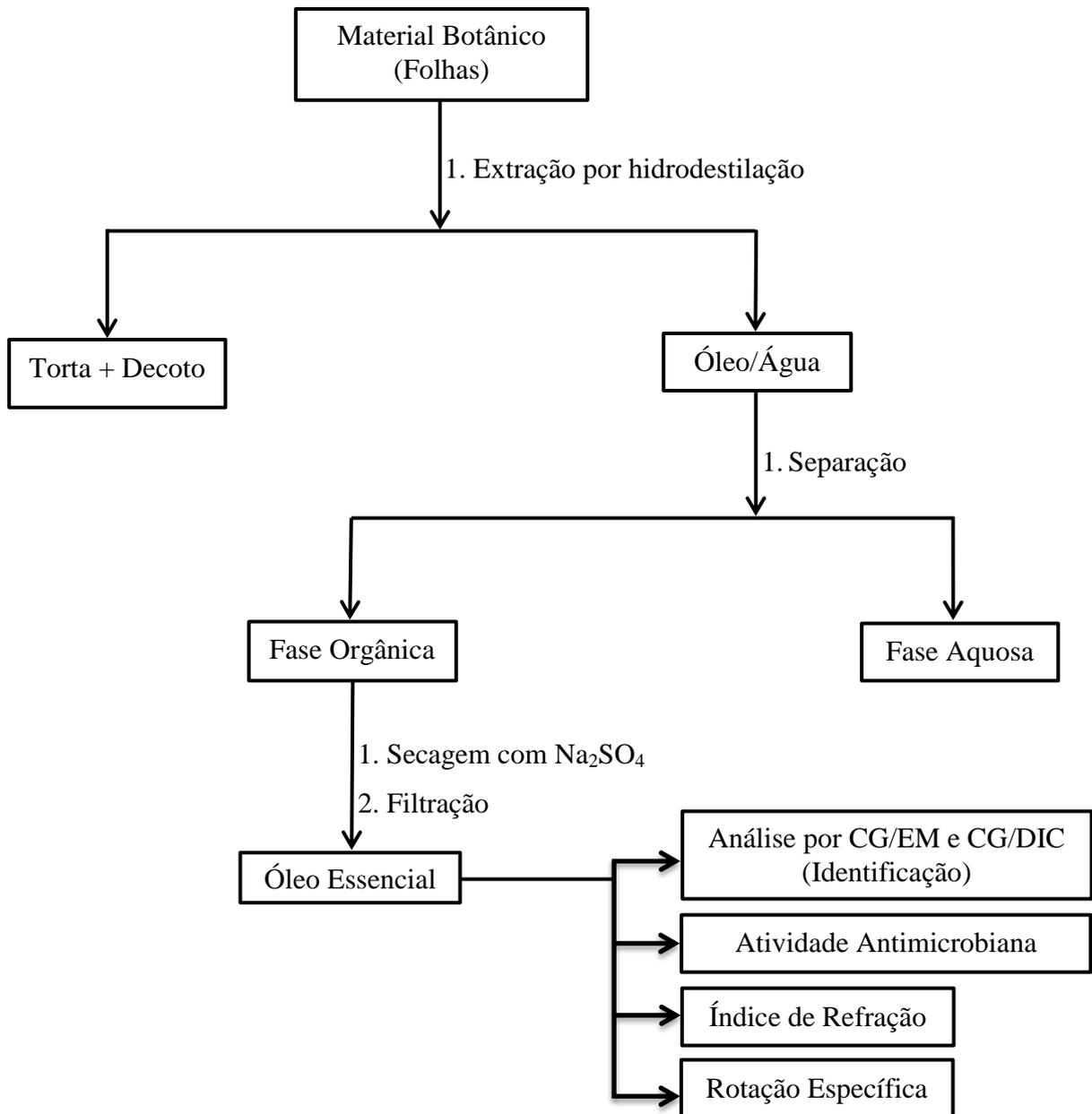
M folha = massa das folhas utilizada na extração.

Na tabela a seguir encontram-se os dados do óleo essencial obtido da *V. dardani*.

Tabela 01 - Massa e rendimentos dos óleos extraídos de *V. dardani*

Espécie (<i>V. dardani</i>)		
Extração	Massa (mg)	Rendimento (%)
I	887,3	0,29
II	709	0,13
III	798	0,16
IV	976	0,18
V	800	0,17

Fluxograma 01 - Método de extração do óleo essencial da *V. dardani*.



2.3.2 - Identificação e quantificação dos constituintes químicos do óleo essencial da *V. dardani*

O teor de cada componente foi determinado com base na área de cada pico relacionada com a área total dos picos do cromatograma. Cada componente do óleo foi identificado com base no índice de retenção (considerando-se uma série homóloga de n-alcenos C7-C30), corrigido por regressão linear, também por comparação do padrão de

fragmentação próprio de cada componente, com espectros de massa de banco de dados virtual (Biblioteca Nist/Epa/Nih, 2011) e, ainda, por comparação visual com espectros de massa registrados na literatura (Adams, 2012).

2.3.3 - Atividade antifúngica sobre fungos filamentosos

O teste da atividade antifúngica do óleo essencial de *V.dardani* foi realizado no do Laboratório de Cultura e Tecido Vegetal – LCTV da UERN, de onde foram obtidos o *Colletotrichum gloeosporioides* (5522) e o *Lasiodiplodia theobromae* (435), fungos utilizado no experimento.

Os fungos foram cultivados em meio BDA (Batata-Dextrose-Ágar) e mantidos em estufa (BOD) a 25 ± 2 °C, sob alternância luminosa (12 h claro / 12 h escuro) para obtenção do inóculo. O OE, extraído anteriormente, foi diluídos no meio BDA nas concentrações 1; 2; 3 e 4 $\mu\text{L}\cdot\text{mL}^{-1}$, sendo adicionados ao meio ainda liquefeito (55 °C) após autoclavação por 20 minutos.

Posteriormente, os meios foram levados à câmara de fluxo laminar onde foram vertidos em placas de petri. Discos de micélio do fungo com aproximadamente 3 mm de diâmetro foram retirados de culturas com 15 dias de crescimento e inoculados no centro da placas contendo o meio BDA, identificando assim os seguintes tratamentos: T1 (meio de cultura apenas com o meio, sem óleo), controle negativo; T2 (meio com fungicida comercial tiofanato metílico), controle positivo; T3 (1 μL do OE de *V.dardani*); T4 (2 μL do OE de *V.dardani*); T5 (3 μL do OE de *V.dardani*); T6 (4 μL do OE de *V.dardani*). Para o preparo do controle positivo, foi diluído no meio 3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ do fungicida.

As avaliações tiveram início 24h posteriores à montagem do experimento, sendo estas realizadas diariamente com o auxílio de um paquímetro, através de medição do diâmetro do micélio (média de duas medidas perpendiculares). As avaliações foram concluídas com o total crescimento do fungo na placa correspondente ao tratamento controle negativo (T1).

O delineamento experimental utilizado foi do tipo inteiramente casualizado, sendo 6 tratamentos e 5 repetições, totalizando 30 placas. A percentagem de inibição foi determinada através dos dados do crescimento micelial individual de cada fungo, sendo estes aplicados na fórmula adaptada de Edington *et al.*, (1971):

Equação 2:

$$I = \frac{(CFC - CFT)}{CFC} \times 100$$

Onde:

I = porcentagem de inibição;

CFC = crescimento do fungo no controle;

CFT = crescimento do fungo no tratamento.

Os dados foram avaliados estatisticamente pela análise da variância e as médias comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade.

2.3.4 - Atividades antifúngica e antibacteriana quanto a leveduras e bactérias de interesse médico veterinário

O teste para avaliação da atividade antifúngica e antibacteriana do óleo essencial de *V.dardani* foi realizado no Laboratório de Microbiologia Veterinária da UFERSA, a partir da confecção de antibiogramas de acordo com o método de difusão em ágar – técnica do poço descrito por Silveira *et al.*, (2009).

2.3.5 - Leveduras utilizadas e preparo do inóculo

Para o teste antifúngico foram utilizadas duas espécies de leveduras: *Candida albicans* (ATCC 10231) e *Cryptococcus neoformans* (LV 002), cepa padrão e isolado de ovino, respectivamente. Os discos liofilizados da *C. albicans* foram reidratados em caldo Brain Heart Infusion (BHI), incubados por 24h a 35°C e posteriormente repicadas em ágar Sabouraud dextrose (SD). A cepa de *C. neoformans* estava estocada em temperatura de 5 °C em ágar SD e foi repicada em caldo BHI, incubadas por 48h a 35°C, sendo feito uma semeadura em ágar SD. Ambos os inóculos foram preparados a partir da escolha de cinco colônias, medindo aproximadamente 1mm de diâmetro, da cultura de 24h para a *C. albicans* e de 48h para *C. neoformans* em ágar SD, as quais foram suspensas em 5 mL de solução salina estéril 0,85%, e foram utilizadas quando observou-se uma solução-padrão da escala de McFarland 0,5. (NCCLS., 2002)

2.3.6 - Bactérias utilizadas e preparo do inóculo

No teste antibacteriano utilizou-se de três espécies bacterianas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853) e *Escherichia coli* (LM

003), duas cepas da coleção ATCC e a terceira, de amostra procedente de individuo com infecção urinária. As cepas padrão foram reidratadas em caldo BHI, incubadas em estufa bacteriológica por 24h a 35°C antes dos procedimentos. A cepa de *E. coli* estava estocada a 5°C em caldo BHI coberto com glicerina, sendo posteriormente semeadas em caldo BHI e incubada nas mesmas condições das cepas anteriores. Os inóculos foram transferidos para tubos de ensaio com solução salina 0,85% estéril, até obter a turvação de 0,5 da escala de MacFarland (NCCLS., 2003)

2.3.7 - Confeção do antibiograma

Para confecção dos antibiogramas, utilizaram-se placas de Petri contendo apenas ágar Mueller Hinton para o teste em bactérias e ágar Mueller Hinton com 2% de dextrose e 0,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ de azul de metileno para o teste em leveduras, de acordo com o protocolo do CLSI M44-A2. Foram perfurados poços de 6mm de diâmetro com auxílio de ponteiros estéreis, sendo o fundo dos poços vedados com o mesmo meio de cultura ainda liquefeito, no intuito de não deixar extravasar as alíquotas do óleo. Os inóculos, tanto as bactérias quanto as leveduras, foram semeadas sobre a superfície de seus respectivos meios com auxílio de *swab* estéril. Dispensou-se, utilizando-se pipeta automática, em cada poço devidamente identificado, 50 μL dos seguintes tratamentos: T1 OE de *V. dardani*; T2, T3, T4 e T5 correspondente às diluições do OE de *V. dardani* em DMSO, obtendo-se as concentrações de 1, 2, 3 e 4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$, respectivamente; e T6 controle negativo (DMSO puro). O T7 controle positivo utilizou-se de discos de gentamicina (10 μg) que foram dispostos, após semeadura dos inóculos, sobre o meio de cultura sem perfuração de poços. As placas foram incubadas em estufa a $35\pm 1^\circ\text{C}$ por 24 horas.

2.3.8 - Leitura e interpretação dos halos

Após o período de incubação, foram medidos os halos de inibição do crescimento (mm), utilizando régua milimetrada, descartando-se o diâmetro de leitura do poço. Cada tratamento foi testado em tréplica, sendo considerada a média da medição dos halos. Foram considerados com halo de inibição, aqueles que apresentavam diâmetro superior a 10 mm e comparados ao controle positivos gentamicina para bactérias e cetoconazol e itraconazol para leveduras.

2.4 - Material vegetal

As raízes e as folhas da *Varronia dardani* (Taroda). J.S.Mill foram coletadas durante seu estágio de floração, em março de 2014, na serra do Lima, município de Patú no Estado do Rio Grande Do Norte, Brasil, pelo Professor Jaécio Carlos Diniz, do Departamento de Química da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte e pelo técnico em biologia, Francisco Fábio Mesquita, do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte. Além das raízes e folhas foram coletadas também, outras partes da planta, tais como: galhos e flores para exsicata. A identificação da planta foi realizada pelo Prof. Dr. José Iranildo Miranda de Melo pertencente ao Departamento de Biologia da Universidade Federal de Campina Grande. Uma exsicata correspondente à coleta da planta (MOSS 13755) encontra-se arquivada no Herbário Dárdano de Andrade Lima da Universidade Federal Rural do Semiárido - UFERSA.

Todas as etapas referentes ao tratamento do vegetal, preparação dos extratos, extração e isolamento dos metabólitos secundários foram executadas no laboratório de cromatografia da Universidade do Estado do Rio Grande do Norte (UERN). Neste trabalho realizou-se o estudo químico das raízes e folhas, assim como a atividade biológica do óleo essencial extraído das folhas.

2.4.1 - Obtenção do extrato diclorometano das raízes da *V. dardani* (*EDRVD-DCM*)

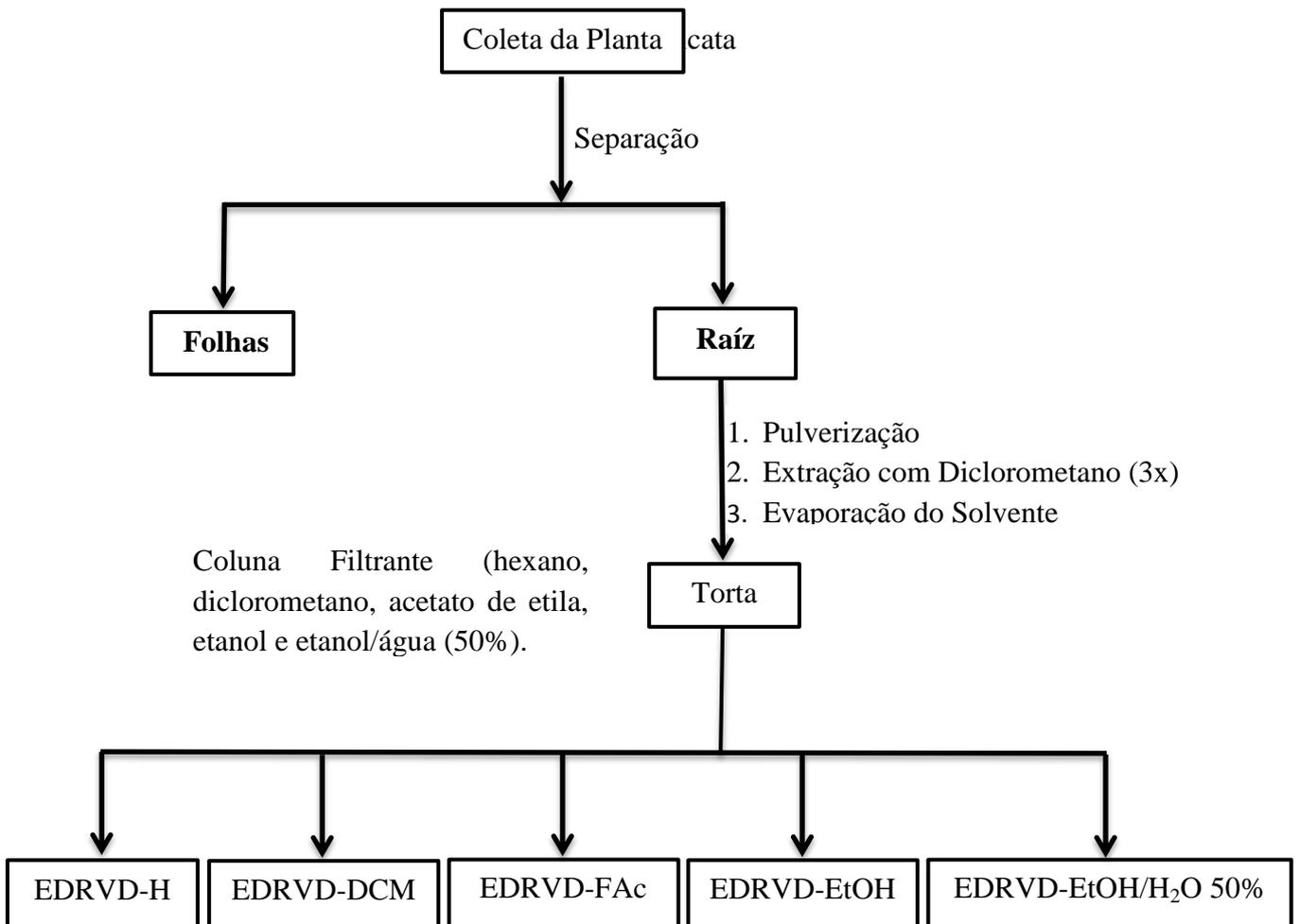
As raízes (70,30 g) secas à temperatura ambiente e trituradas mecanicamente, foram submetidas à extração exaustiva com diclorometano a frio. A solução resultante foi filtrada e em seguida destilada a pressão reduzida, fornecendo 2,68 g de material, denominado *EDRVD*.

2.4.2 - Fracionamento cromatográfico do extrato *EDRVD*

2,68 g do extrato *EDRV-D* foram misturada a 13,18 g de gel de sílica, pulverizados em gral de porcelana e acondicionados sobre 20,60 g de gel de sílica em coluna de 500 mL. seguido de fracionamento cromatográfico por eluições sucessivas com hexano, diclorometano, acetato de etila, etanol e etanol/água (1:1) (Fluxograma 2), resultou nas frações constantes na tabela 02 a seguir.

Tabela 02 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico de *EDRVD*

Eluente	Fração	Massa (mg)
Hexano	<i>EDRVD-H</i>	84,7
Diclorometano	<i>EDRVD-DCM</i>	930,5
Acetato de Etila	<i>EDRDV-ACeOEt</i>	1029
Etanol	<i>EDRDV-EtOH</i>	163,4
Etanol/Água (50%)	<i>EDRVD-EtOH/H₂O</i>	45,5
TOTAL		2253,1

Fluxograma 2 - Rota de obtenção do extrato diclorometano da raiz da *V. dardani*.

2.4.3 - Fracionamento cromatográfico da fração *EDRVD-DCM* e isolamento de *CPR-1* e *CPR-2*

930,5 mg da fração *EDRVD-DCM* foi misturada em 17,5 g de gel de sílica, pulverizados e grau de porcelana e cromatografados sobre 47,7 g de sílica em coluna de 300 mL. A eluição foi realizada com um sistema isocrático de hexano/acetona (30%), coletando 32 frações de 10 mL cada. Estas frações, após comparação por CCD e reveladas com vapores de iodo e *p*-anizaldeído, foram reunidas conforme descrito na Tabela 03 e Fluxograma 3. Na fração 3-4 observou-se formação de um precipitado amarelo (solúvel em acetona), o qual foi separado por filtração da água-mãe (3-4 AM) e lavado com acetona. Após análise por CCD, este material (95,5 mg) revelou-se puro e foi denominado como *CPR-1*. Na fração 6 foi observado um outro precipitado, o qual foi filtrado e lavado com acetona. Após análise por CCD, o material (60,6 mg) revelou-se puro, apresentando um fator de retenção R_fs diferente da amostra *CPR-1*, sendo esse novo material denominado de *CPR-2*.

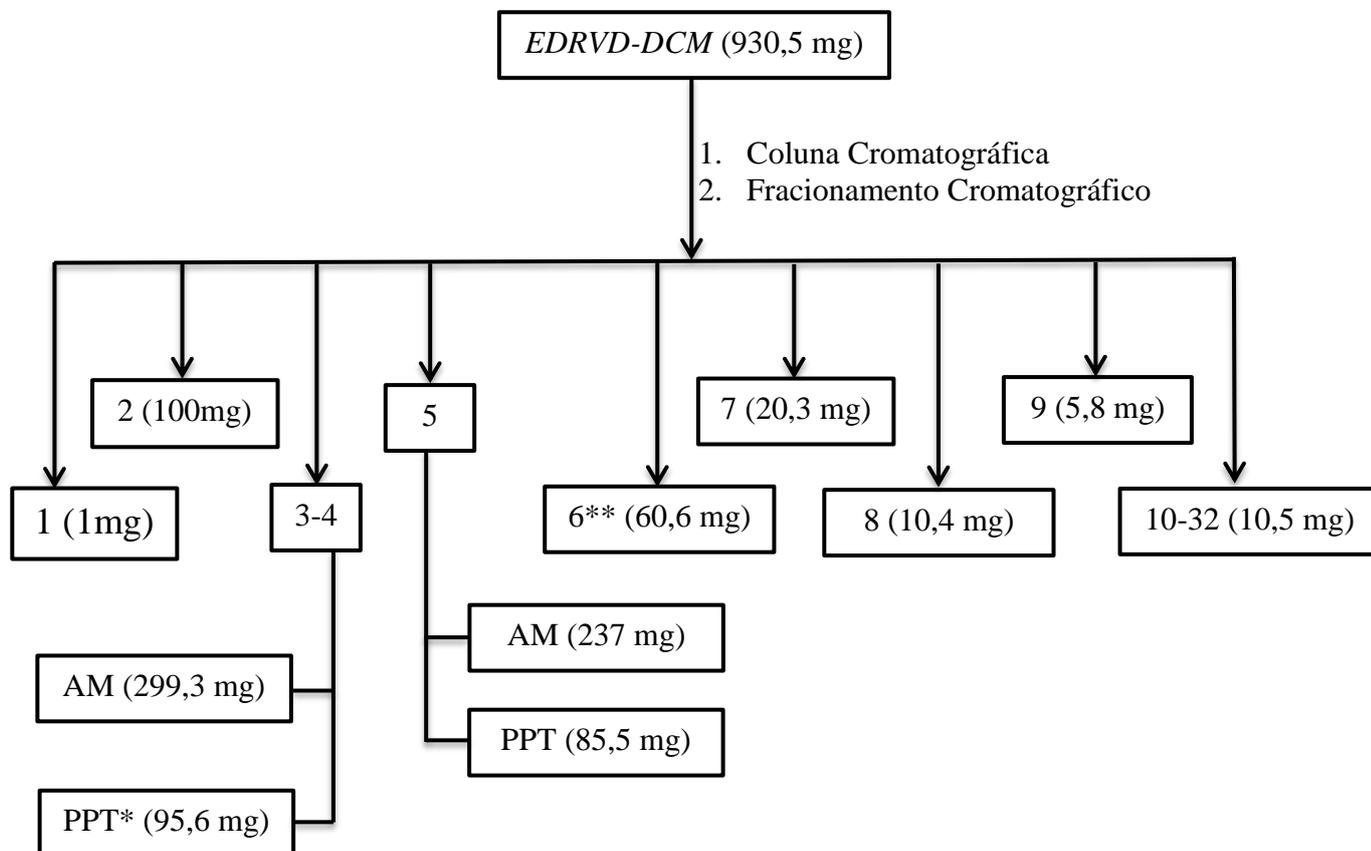
Tabela 03 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico de *EDRVD-DCM*

Eluente	Fração	Massa (mg)
Hexano/Acetona (30%)	1	1
Hexano/Acetona (30%)	2	100
Hexano/Acetona (30%)	3-4 AM	299,3
Hexano/Acetona (30%)	3-4 PPT*	95,6
Hexano/Acetona (30%)	5 AM	237
Hexano/Acetona (30%)	5 PPT	85,5
Hexano/Acetona (30%)	6**	60,6
Hexano/Acetona (30%)	7	20,3
Hexano/Acetona (30%)	8	10,4
Hexano/Acetona (30%)	9	5,8
Hexano/Acetona (30%)	10-32	10,5
TOTAL		926

*Frações contendo um sólido amarelo denominado CPR-1

**Fração contendo um sólido amarelo denominado CPR-2

Fluxograma 03 - Isolamento dos constituintes químicos *CPR-1* e *CPR-2* obtidos a partir do extrato diclorometano das raízes de *V.dardani*.



2.4.4 - Obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas da *V. dardani*

As folhas (45,4 g), secas à temperatura ambiente e trituradas mecanicamente, foram submetidas à extração exaustiva com uma solução etanol/água (30%) a frio. A solução resultante foi filtrada e em seguida rotaevaporada a pressão reduzida seguida de secagem em banho Maria até completa retirada de água, fornecendo 24,6 g de material, denominado *EHiFVD*.

2.4.5 - Tratamento Cromatográfico do extrato hidroalcoólico das folhas de *V. dardani* *EHiFVD*.

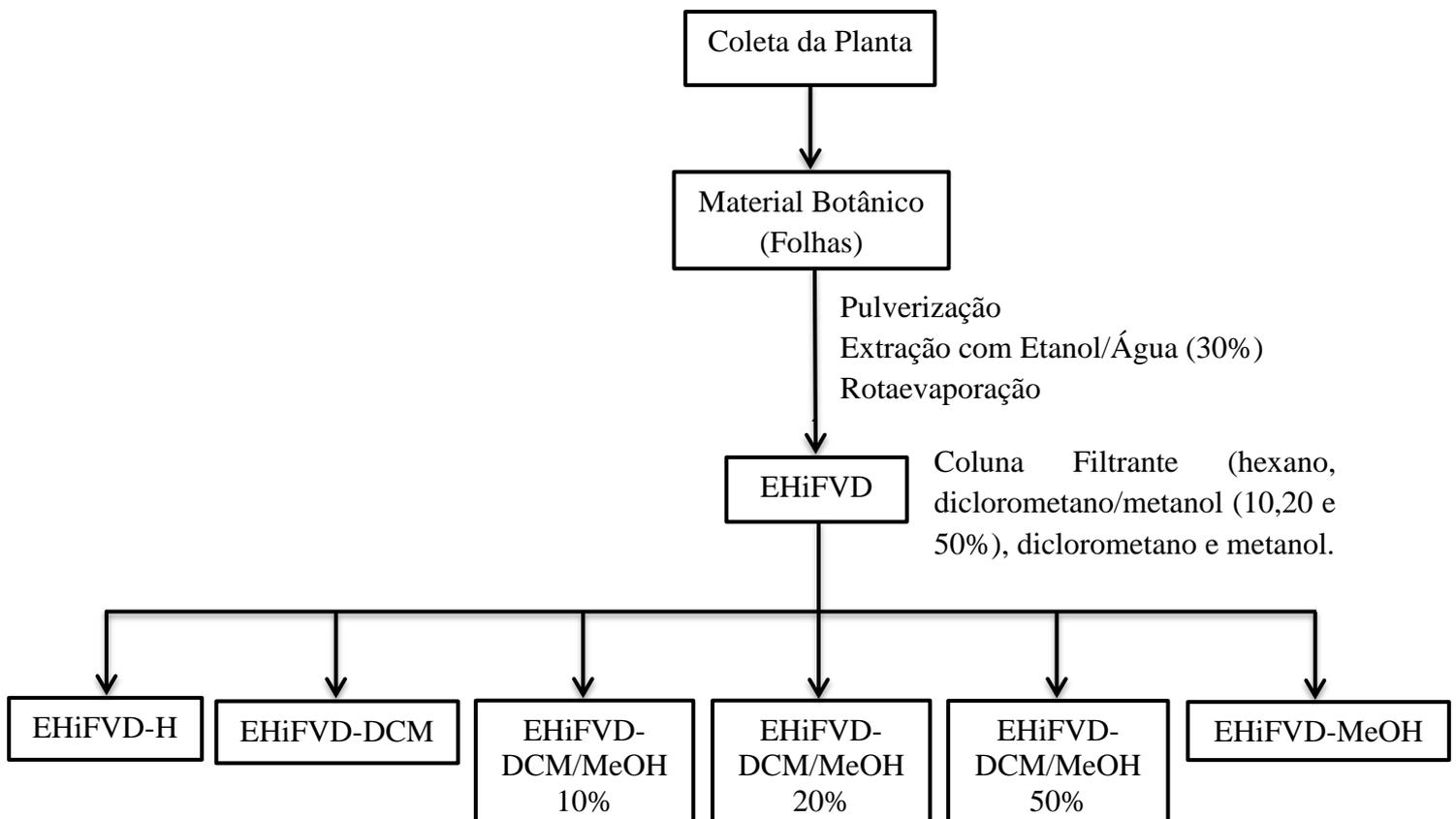
24,6 g do extrato *EHiFVD* foi misturado a 17,8 g de gel de sílica, pulverizado em gral de porcelana e acondicionado sobre 30,9 g de gel de sílica em coluna de 500 mL. O

material foi cromatografado utilizando eluições sucessivas com hexano, diclorometano, diclorometano/metanol (10, 20 e 50% respectivamente), e metanol resultando após secagem nas frações constantes na Tabela 04.

Tabela 04 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico de *EHiFVD*

Eluente	Fração	Massa (mg)
Hexano	<i>EHiFVD – H</i>	28
Diclorometano	<i>EHiFVD – DCM</i>	2500
Diclorometano/metanol (10%)	<i>EHiFVD - DCM/MeOH 10%</i>	2300
Diclorometano/metanol (20%)	<i>EHiFVD - DCM/MeOH 20%</i>	2500
Diclorometano/metanol (50%)	<i>EHiFVD - DCM/MeOH 50%</i>	3100
Metanol	<i>EHiFVD – MeOH</i>	6400
TOTAL		16828

Fluxograma 4 - Rota para obtenção do extrato hidroalcoólico das folhas da *V. dardani*.



2.4.6 - Fracionamento cromatográfico da *EHiFVD-DCM* e isolamento de *CPF-1* e *CPF-2*.

A fração *EHiFVD-DCM* (2,5g) foi submetida a lavagens sucessivas com hexano grau HPLC, obtendo-se duas frações, uma solúvel, denominada (*S-EHiFVD-DCM*) e a outra insolúvel (*I-EHiFVD-DCM*).

Tabela 05 - Dados resultantes do fracionamento cromatográfico de *EHiFVD-DCM*

Eluente	Fração	Massa (g)
Hexano HPLC	<i>S-EHiFVD-DCM</i>	1,2
Hexano HPLC	<i>I-EHiFVD-DCM</i>	1,3
TOTAL		2,5

2.4.7 - Fracionamento cromatográfico da fração *I-EHiFVD-DCM* e isolamento de *CPF-1* e *CPF-2*

Uma alíquota de 0,2896 g da fração *I-EHiFVD-DCM* foi misturada a 7,5 g de gel de sílica, pulverizados em grau de porcelana e cromatografados sobre 25,8 g de sílica em coluna de 300 mL. A eluição foi realizada com um sistema isocrático de hexano/acetato de etila (14%), obtendo-se após coleta 31 frações de 10 mL. Estas frações foram comparadas por cromatografia em camada delgada, após revelação com vapor de iodo e *p*-anizaldeído. As frações que apresentaram o mesmo perfil cromatográfico foram reunidas conforme descrito na Tabela 06. A frações 5 (11,5 mg) cristalizou após evaporação do solvente, e após análise de CCD revelou apenas um spot apresentando característica de material puro sendo denominado de *CPF-1*. Na fração 12 observou-se após evaporação a formação cristais, e após a análise por CCD, este material (26,9 mg) revelou-se puro, sendo comparado com o *CPF-1*, o qual apresentou diferentes Rfs, estes material foi denominado *CPF-2*.

Tabela 06- Dados resultantes do fracionamento cromatográfico de *I-EHiFVD-DCM*

Eluente	Fração	Massa (mg)
Hexano/AcOEt (14%)	1-4	5,4
Hexano/AcOEt (14%)	5*	11,5
Hexano/AcOEt (14%)	6-7	123,9
Hexano/AcOEt (14%)	8	13,1
Hexano/AcOEt (14%)	9	12
Hexano/AcOEt (14%)	10	14,3
Hexano/AcOEt (14%)	11	27,7
Hexano/AcOEt (14%)	12**	26,9
Hexano/AcOEt (14%)	13-16	26,2
Hexano/AcOEt (14%)	17-20	1,4
Hexano/AcOEt (14%)	21-31	15,9
TOTAL		278,3

*Fração contendo cristais, denominados *CPF-1*

**Fração contendo um material branco, denominados *CPF-2*

CAPÍTULO 3

Resultados e Discussão

3 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 - Análise cromatográfica do óleo essencial da *V. dardani*

A extração do óleo essencial das folhas de *V. dardani* forneceu um óleo fluido e amarelado exibindo as seguintes propriedades físicas: $[\alpha]_D^{20} + 22^\circ$ ($c = 0.008$, CHCl_3), $n^{25} = 0,08$ e $d^{25} = 0,8873 \text{ g.mL}^{-1}$. O rendimento obtido do óleo foi de 0,18 % calculado pela média do percentual das extrações calculado utilizando a equação 1.

A determinação dos constituintes químicos presente no óleo foi realizada por cromatógrafo gasoso acoplado a um espectrômetro de massas, enquanto o teor de cada componente foi determinado por cromatografia gasosa equipado com detector de ionização de chama. Na tabela 7 encontram-se os dados do óleo essencial (*OE*).

A análise por cromatografia gasosa do óleo apresentou 30 substâncias, onde foram identificados e quantificados 25 constituintes químicos, totalizando um percentual de 83,33% da composição química do óleo. Dentre os 25 constituintes identificados, 13 pertencem à classe dos monoterpenoides, onde são representados por 7 hidrocarbonetos monoterpenos (53,84%), 3 monoterpenoides oxigenados (23,08%) e 3 monoterpenoides acetilados (23,08%). Identificou-se ainda 11 substâncias classificadas como sesquiterpenoides, dos quais 4 são hidrocarbonetos sesquiterpenos (36,36%), 6 são sesquiterpenoides oxigenados (54,54%) e 1 sesquiterpenoides acetilado (9,10%). Além disso, o óleo apresentou traços de um derivado fenólico, representada por um único constituinte químico o benzoato de benzila (0,47%). Na Tabela 7, estão sumarizados os constituintes químicos identificados, seus teores e respectivos índices retenção.

Dos hidrocarbonetos monoterpenos destaca-se o *D*-limoneno (20,02%) como sendo o composto majoritário do óleo, seguido pelos monoterpenos oxigenados o 1,8 cineol (13,25%), linalol (12,27%), α -terpineol (6,48%) e o terpinen-4-ol (6,35%). Outros majoritários são os derivados sesquiterpenos o *2E.6E* acetato de farnesol (8,84%) e o *2E.6E*-farnesol (8,68%). Os demais constituintes apresentaram teores abaixo de 6%. Cinco substâncias denominada NI-1, NI-2, NI-3, NI-4 e NI-2 não foram identificadas, totalizando um percentual de 2,43% em massa.

Tabela 7 - Composição do óleo essencial (*OE*) da *Varronia dardani*

	Constituintes^a	Tempo de Retenção	IK^b	IK^c	OEVD^d (%)
1	α -turgeno	10.883	924	928	2.412
2	α -pineno	11.117	932	935	1.433
3	o-cimeno	13.747	1022	1018	3.915
4	<i>D</i> -limoneno	13.895	1024	1023	20.025
5	1,8 cineol	13.998	1026	1027	13.250
6	β -ocimeno(<i>Z</i>)	14.325	1032	1038	0.7748
7	(γ)-terpineno	14.720	1054	1051	2.885
8	NI-1	15.575	NI-1	1081	0.404
9	Linalol	15.814	1095	1089	12.275
10	NI-2	17.806	NI-2	1163	0.826
11	terpinen-4-ol	18.116	1174	1174	6.350
12	α -terpineol	18.453	1186	1187	6.489
13	acetato de bornila	20.920	1284	1287	0.688
14	acetato de carveol	22.068	1365	1335	0.720
15	acetato de geraniol	23.055	1379	1378	1.288
16	α -copaeno	23.240	1374	1387	0.469
17	NI-3	25.951	NI-3	1511	0.372
18	α -muuroleno	26.087	1500	1518	0.554
19	(γ)-muuroleno	26.451	1478	1535	1.316
20	δ -cadineno	26.588	1522	1542	1.749
21	Nerolidol (<i>E</i>)	27.211	1561	1572	0.263
22	Spathulenol	27.944	1577	1609	0.398
23	Ledol	28.540	1602	1639	0.399
24	NI-4	28.929	NI-4	1659	0.693
25	epi- α -cadinol	29.184	1638	1672	1.034
26	α -cadinol	29.482	1652	1687	0.877
27	<i>2E.6E</i> -farnesol	30.512	1742	1741	8.685
28	benzoato de benzila	31.643	1759	1802	0.478
29	<i>2E.6E</i> -acetato de farnesol	32.712	1845	1861	8.842
30	NI-5	39.145	NI-5	2244	0.136
Teor de monoterpeneo					43,33
Teor de sesquiterpeneo					36,66
Teor total identificado					83,33

^aConstituintes químicos listados de acordo com ordem de eluição em coluna Rtx-5ms.

^cIK = Índices de Kovats corrigido para os constituintes do óleo essencial.

OEVD (%)^d = percentual obtido por CG-DIC.

NI = Não Identificado

3.2 - Avaliações do potencial biológico do óleo essencial da *V. dardani*

Em busca por substâncias de origem natural com potencial biológico, foram selecionados dois métodos, o de atividade antifúngica sobre fungos filamentosos e antibacterianos quanto a leveduras e bactérias de interesse médico veterinário.

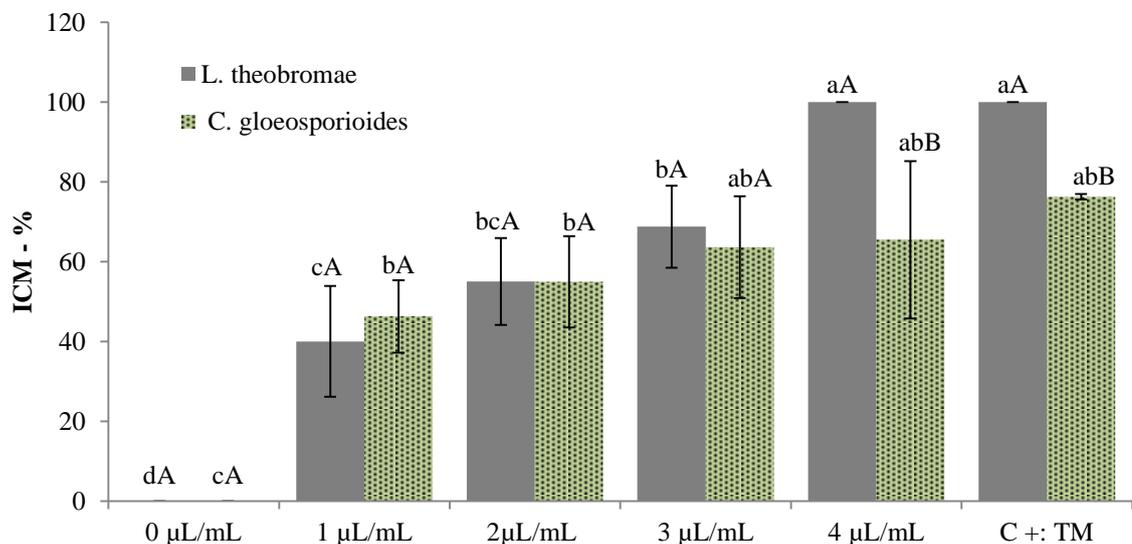
3.2.1 - Avaliação do potencial antimicrobiano do óleo essencial da *V. dardani*

3.2.2 - Atividade antifúngica sobre fungos filamentosos

3.2.3 - Resultados e Discussão

No presente estudo, a atividade antifúngica do óleo essencial de *Varronia dardani* foi avaliada e comparada com tiofanato metílico, um antifúngico comercial, utilizado nas operações de combate aos fungos pós-colheita *L. theobromae* (435) e *C. gloeosporioides* (5522). O OE demonstrou claramente atividade antifúngica, sendo que a análise de variância mostrou que o crescimento radial micelial foi significativamente influenciado pela concentração do OE ($p \leq 0,0001$; $F=83,7819$), da espécie ($p \leq 0,002$; $F=11,0391$), assim como da interação significativa entre os dois fatores ($p \leq 0,0011$; $F = 5,1724$) (Figura 02).

Figura 02 - Inibição do crescimento micelial (ICM, %) dos fungos pós colheita *L. theobromae* (435) e *C. gloeosporioides* (5522), em função de diferentes concentrações do óleo essencial de *Varronia dardani*. Médias seguidas de mesma letra, minúscula para concentração de óleo essencial e maiúscula para fungo, não diferem estatisticamente entre si pelo *post hoc* de Tukey (ANOVA *two-way*; $p \leq 0,01$, $n = 4$). As barras representam o desvio-padrão da média.



O óleo essencial da *V. dardani*, quando testada contra o *L. theobromae* (435), mostrou uma atividade dose-dependente, cuja maior concentração ($4 \mu\text{L.mL}^{-1}$) mostrou uma eficácia estatisticamente similar ao controle positivo, tiofanato metílico (Figuras 03 e 04). Da mesma forma, o **OE** mostrou uma atividade fungitóxica sobre o *C. gloeosporioides* (5522), cuja inibição mostrou-se similar à induzida pelo fungicida controle (Figuras 05 e 06). Analisando a eficácia do óleo essencial sobre os fungos, os resultados mostram que, até a concentração de $3 \mu\text{L.mL}^{-1}$, o percentual de inibição é estatisticamente similar entre os dois fungos, embora um aumento na concentração do óleo essencial não resulte em inibição do crescimento do *C. gloeosporioides* (5522) (Figuras 05 e 06).

A maioria dos óleos essenciais possui algum grau de atividade antimicrobiana. Essa atividade é atribuída à ação das substâncias presentes em sua composição como os compostos fenólicos, monoterpenos e terpenóides (Gilles *et al.*, 2010). O mecanismo de ação dos monoterpenos envolve, principalmente, efeitos tóxicos à estrutura e à função da membrana celular (Oliveira *et al.*, 2011; Seixas *et al.*, 2011). Esses compostos, avaliados em sua forma pura, mostram ação antimicrobiana em diferentes estudos (Dan *et al.*, 2010; Hussain *et al.*, 2010; Pereira *et al.*, 2011; Combrinck *et al.*, 2011).

Essa atividade biológica dos óleos essenciais e de seus constituintes pode atuar como agentes fungistáticos e/ou fungicida, chamada de atividade antifúngica, dependendo das concentrações utilizadas. O mesmo óleo pode ser ativo contra um amplo espectro de espécies de microrganismos, porém as concentrações mínimas inibitórias (CMI) podem variar (Antunes & Cavacob, 2010). Alguns autores discutem que a atividade antifúngica dos óleos essenciais testados advém, provavelmente, do resultado da penetração de quitina na parede das hifas, prejudicando a lipoproteína da membrana citoplasmática, levando a este extravasamento do citoplasma, bem como ao esvaziamento e murchamento das hifas, e presença de filamentos (Zambonelli *et al.*, 1996; Caccioni & Guizzardi, 1994; Dos Santos *et al.*, 2013). As propriedades antimicrobianas dos óleos essenciais deve-se a sua característica lipofítica (Bakkali *et al.*, 2008). A hidrofobicidade do óleo essencial permite uma interação entre o óleo e os lipídeos da membrana celular, interferindo na sua permeabilidade e causando alterações em sua estrutura (Costa *et al.*, 2011).

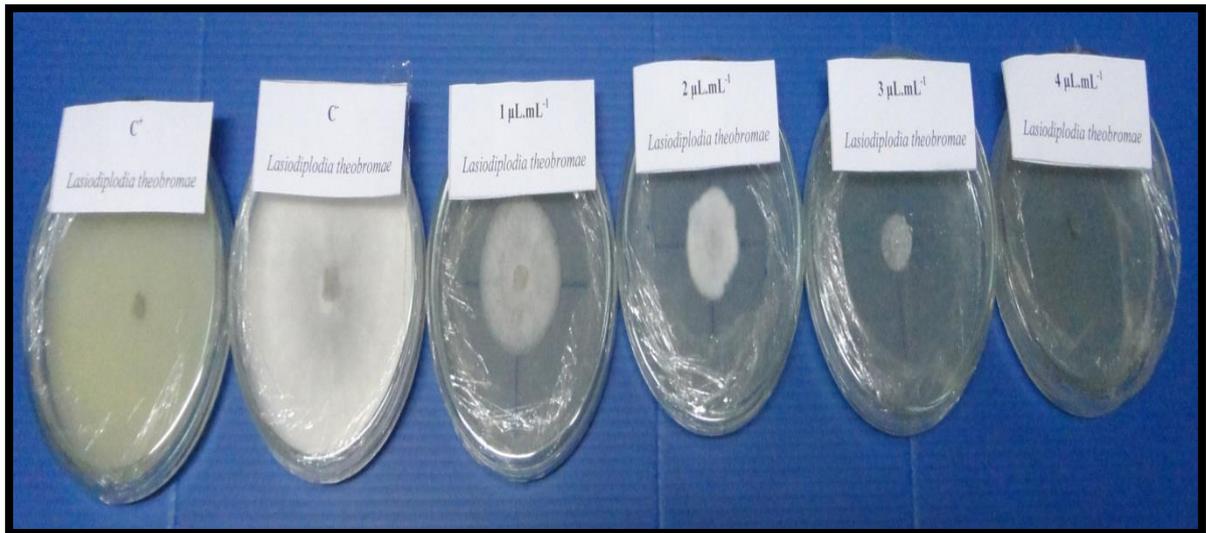


Figura 03 - Crescimento micelial do *Lasiodiplodia theobromae* (435) em função das diferentes concentrações do óleo da *V.dardani*.

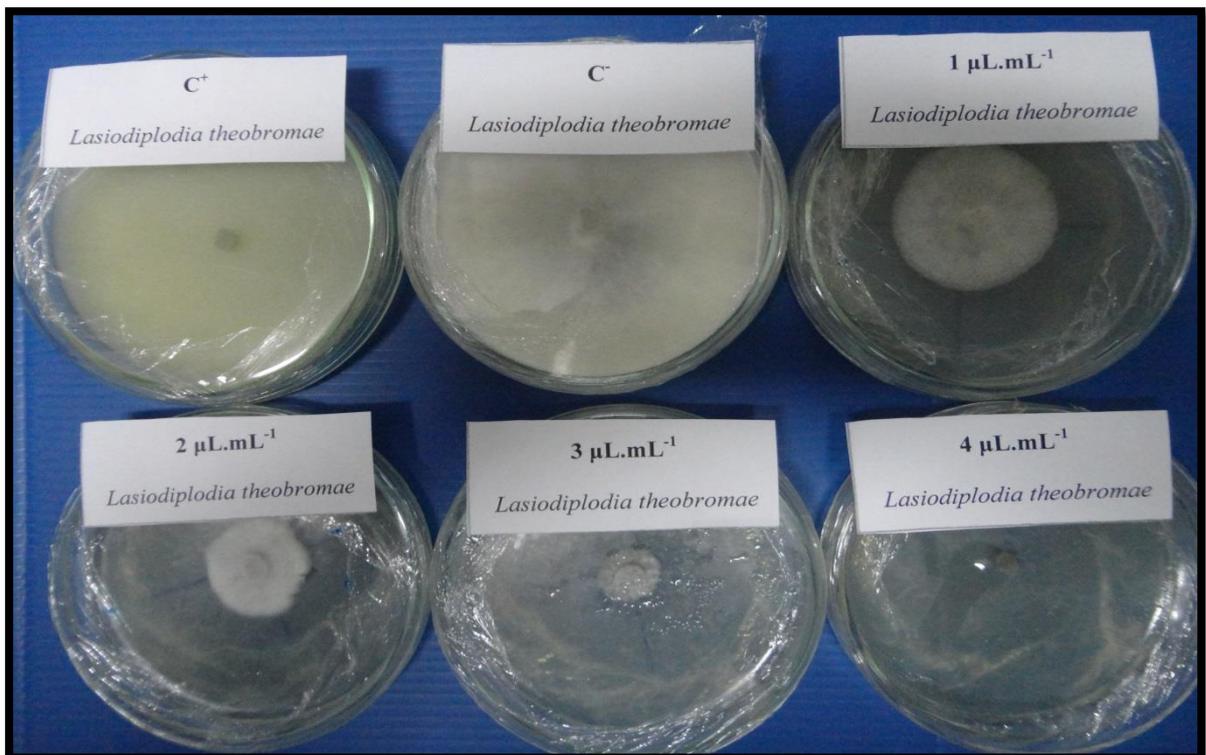


Figura 04 - Crescimento micelial do *Lasiodiplodia theobromae* (435) em função das diferentes concentrações do óleo da *V.dardani*.

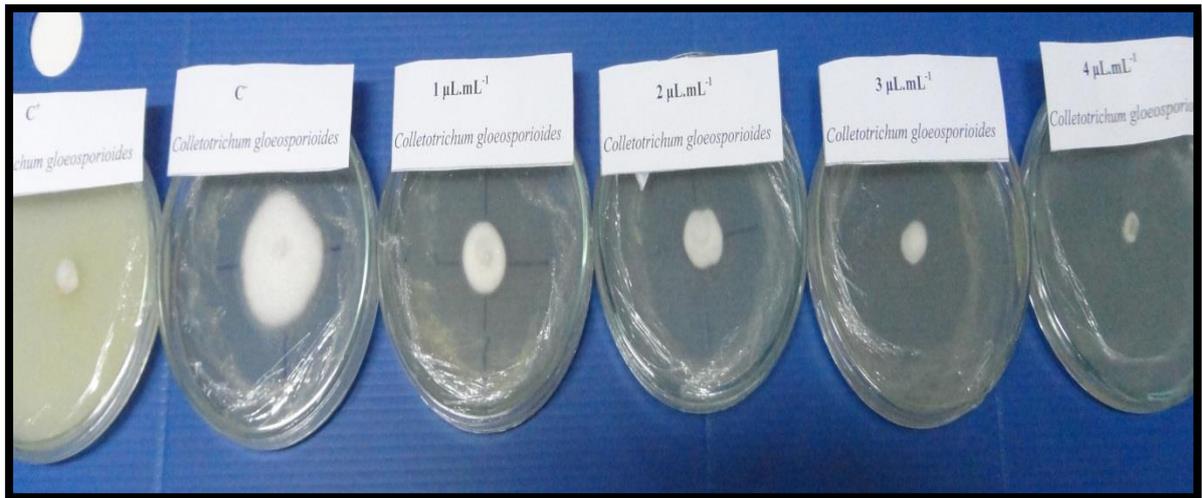


Figura 05 - Crescimento micelial do *Colletotrichum gloeosporioides* (5522) em função das diferentes concentrações do óleo da *V.dardani*.

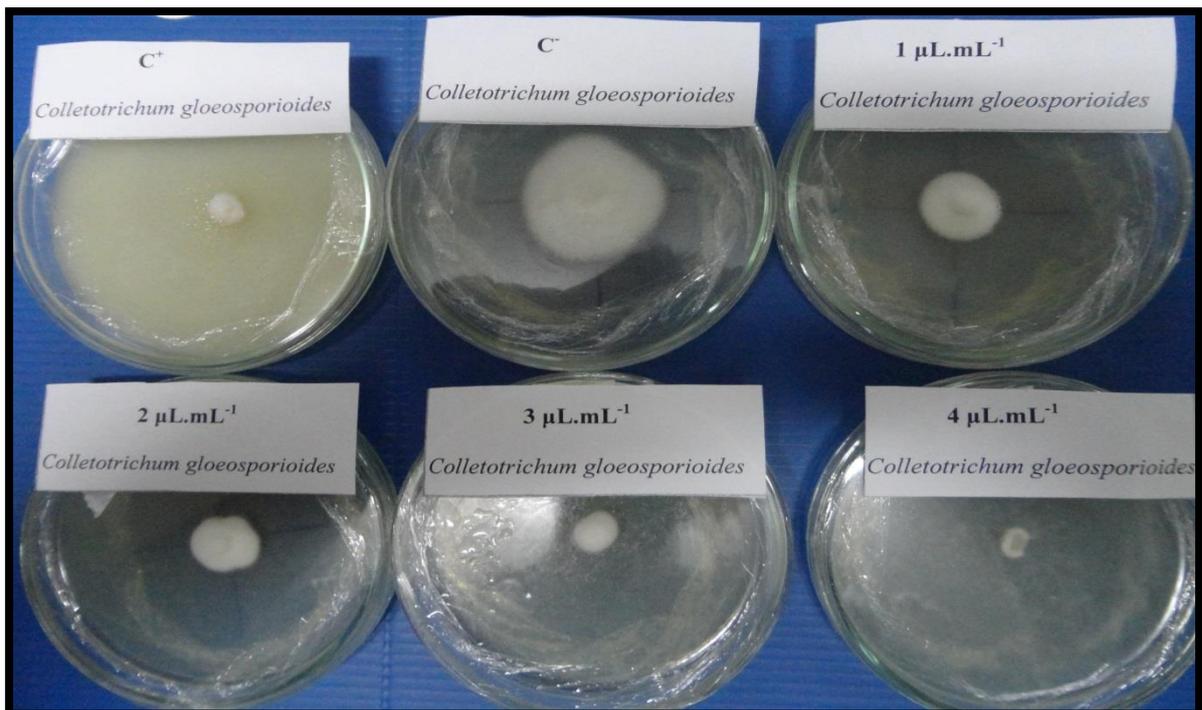


Figura 06 - Crescimento micelial do *Colletotrichum gloeosporioides* (5522) em função das diferentes concentrações do óleo da *V.dardani*.

3.3 - Atividades antifúngica e antibacteriana quanto a leveduras e bactérias de interesse médico veterinário

3.3.1 - Resultados e Discussão

A Tabela 08 apresenta os resultados da atividade antimicrobiana de diferentes micro-organismos, leveduras e bactérias na presença do óleo essencial de *V. dardani* e dos controles positivo utilizando como antimicrobiano bactericida, a gentamicina e fungicida, itraconazol, cetoconazol e negativo DMSO.

Tabela 08 - Diâmetro de halos de inibição quanto ao óleo essencial *V. dardani* e controles positivo e negativo em cepas de bactérias e leveduras de interesse médico veterinário em milímetros.

Tratamentos	Halos de inibição (mm)				
	ATCC 25923	ATCC 27853	LM 003	ATCC 10231	LM 002
Óleo bruto	29,3	0,0	10,0	17,5	21,0
1 μLml^{-1}	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
2 μLml^{-1}	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
3 μLml^{-1}	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
4 μLml^{-1}	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Gentamicina*	20,3	22,3	12,0	0,0	0,0
Cetoconazol*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Itraconazol*	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
DMSO**	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0

*Controle positivo gentamicina ($10 \mu\text{g.mL}^{-1}$) utilizada para *S.aureus*, *P. aeruginosa* e *E. coli* e cetoconazol ($16 \mu\text{g.mL}^{-1}$) e itraconazol ($16 \mu\text{g.mL}^{-1}$) utilizados contra *C. albicans* e *C. neoformans*.

**Controle negativo dimetilsulfóxido

O OE bruto da *V. dardani* promoveu inibição frente às cepas bacterianas de *S. aureus* (ATCC 25923) e *E. coli* (LM 003), com exceção da *P. aeruginosa* (ATCC 27853), e para as leveduras *C. albicans* (ATCC 10231) e *C. neoformans* (LM 002). Entretanto, as concentrações 1, 2, 3, 4 $\mu\text{L.mL}^{-1}$ do óleo testado não inibiram os micro-organismos em estudo. O halo formado pela fração bruta do óleo essencial para *S. aureus* foi superior se comparado ao controle positivo testado, bem como os halos formados para as leveduras,

sendo que as cepas de leveduras foram resistentes aos antifúngicos utilizados como controle positivo.

O mecanismo de ação dos óleos essenciais tem sido bastante discutido (Bona *et al.*, 2012) devido à quantidade e variedade dos compostos químicos presentes, o que dificulta a atribuição de um mecanismo de ação específico para a atividade antimicrobiana (Carson, Mee & Riley, 2002). Dorman & Deans (2000) relataram que a maioria dos óleos essenciais provavelmente exerce efeito antimicrobiano, afetando a estrutura da parede celular bacteriana, desnaturando e coagulando proteínas. Podem também alterar a permeabilidade da membrana plasmática, causando a interrupção de processos vitais da célula, como transporte de elétrons, translocação de proteínas, fosforilação e outras reações, resultando em perda do controle químico osmótico, levando a morte celular.

De acordo com Moreira *et al.*, (2010) e Steurer (2008), a atividade antimicrobiana dos óleos essenciais é clara, mas o mecanismo de ação antimicrobiana ainda não está completamente elucidado. Há consenso de que os compostos aromáticos e fenólicos são os principais responsáveis pela atividade antimicrobiana, onde exercem seus efeitos diretamente na membrana citoplasmática, provocando alterações na sua estrutura e funções. Os mesmos autores afirmam que componentes presentes em menor quantidade também desempenham um papel importante, envolvendo-se em interações sinérgicas com os compostos fenólicos. Ainda de acordo com Steurer (2008), esses mecanismos não funcionam como alvos separados e podem ocorrer em consequência dos outros.

A ação antimicrobiana do óleo de *V. dardani* observada foi maior nas cepas de *S. aureus* do que nas *E. coli*, pois segundo Kalemba & Kunicka (2003), por serem gram-positivas, tendem a apresentar maior susceptibilidade à ação dos óleos essenciais do que bactérias gram-negativas. A *P. aeruginosa* possui um mecanismo de defesa complexo, apresentando baixa sensibilidade à maioria dos antimicrobianos. Palleroni (2010) & Dorman & Deans (2000) relatam que a resistência de algumas bactérias gram-negativas aos óleos essenciais pode estar relacionada à presença de moléculas hidrofílicas nos óleos, que impede a sua ação sobre a membrana externa lipofílica destes micro-organismos, que pode justificar o resultado obtido quanto à ausência de inibição desta bactéria. Embora tenha sido observado boa inibição do bacilo gram-negativo da *E. coli*, que pode estar relacionado à ação de partículas hidrofóbicas presentes nos óleos, apresentando a capacidade de difusão na membrana externa formada por lipídeos da parede celular desses agentes. (Tortora, Funke, Case, 2010). As bactérias gram-negativas, apesar de possuírem uma estrutura de parede celular menos rígida do que as gram-positivas têm uma parede celular quimicamente mais

complexa, sendo que um dos constituintes dessa parede, o lipopolissacarídeo, determina a antigenicidade, toxicidade e patogenicidade desses microrganismos. Além disso, esse grupo de bactérias possui um teor lipídico maior do que as gram-positivas. Tais características podem estar envolvidas com o menor diâmetro apresentado no antibiograma pelo óleo testado (Vargas *et al.*, 2004).

Os resultados quanto às leveduras *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans* apresentaram diâmetros nos antibiogramas superiores à bactéria gram-negativas, provavelmente devido às estruturas da parede celular desses micro-organismos, pois de acordo com Adams (2004) a composição química da parede celular é bastante complexa, constituída principalmente por polissacarídeos, ligados ou não a proteínas ou lipídeos, polifosfatos e íons inorgânicos, formando a matriz de cimentação. Quitina, glucanas, galactomananas e proteínas são os compostos mais frequentes, embora sua quantidade varie entre as diferentes espécies de fungos. Ainda de acordo com Aguilar-Uscanga & François (2003) a parede celular de leveduras apresenta como componentes polímeros de manose (constituindo manoproteínas), glicanas (principalmente betaglucanas, galactanas) e polímeros de N-acetilglucosamina. Esse último constituinte apresenta-se com um percentual de 90% de parede celular de bactéria gram positiva, justificando a ação do óleo da *V. dardani* que deve apresentar compostos capazes de degradação dos polissacarídeos presentes na parede celular de leveduras e bactérias gram positivas descritas.

A ação de *V. dardani* tem potencial para minimizar os índices das enfermidades de cryptococose (Moreira *et al.*, 2006), candidíase (Playford, 2008), dermatites (Gasparetto *et al.*, 2013) e gastroenterites (Sthetty *et al.*, 2012).

3.4 - Determinação estrutural das naftoquinonas isoladas das raízes de *V. dardani*

3.4.1 – Determinação estrutural de *CPR-1*

O composto denominado *CPR-1* isolado a partir do extrato diclorometano *EDRVD-DCM* das raízes de *V. dardani* foi obtido como uma resina amarela solúvel em acetona.

O espectro de RMN ^1H 300 MHz, CDCl_3 (Figuras 08 e 09) apresentou na região de aromáticos sinais em δ 7,99 (d, $J = 7,8$ Hz); 7,90 (d, $J = 1,6$ Hz) e 7,57 (dd, $J = 7,8$ e 1,6 Hz) correspondentes a um sistema do tipo AMX. Apresentou também um singlete intenso com integração para dois hidrogênios em δ 6,95, correspondente a hidrogênios magneticamente equivalentes, além de uma série de sinais correspondentes a hidrogênios de grupamentos

metilênicos e metínicos. Adicionalmente foram observados sinais para três grupos metilas, dois ligados a carbono não hidrogenado em δ 1,75 (s, CH₃-19) e 1,71 (s, CH₃-18) e um ligado a carbono metínico δ 1,02 (d, $J = 6,9$ Hz, CH₃-16).

O espectro de RMN ¹³C 75 MHz, CDCl₃ (Figura 10) apresentou vinte e uma linhas espectrais, que quando comparado com o espectro DEPT 135° (Figura 11), demonstrou a existência de seis carbonos metínicos, cinco carbonos metilênicos e três carbonos metílicos. Por subtração dos sinais dos respectivos espectros foram observados sete carbonos não hidrogenados, entre eles, dois correspondentes a grupos carbonílicos em δ 185,6 (C-4), 185,1 (C-1). Na região de aromáticos foram verificadas oito linhas espectrais na faixa de δ 150,3 a 126,9 que aliadas aos sinais dos carbonos carbonílicos em δ 185,6 e 185,1 caracterizaram um sistema naftoquinônico. Os espectro bidimensional heteronuclear HSQC (Figuras 12 a 14) permitiu associar os sinais das ligações de cada hidrogênio ao seu respectivo carbono.

Os espectros de HMBC (Figuras 15 a 18) mostrou correlações entre o sinal em δ 6,95, (H-2 e H-3) com as carbonilas em δ 185,6 e 185,1 bem como um sinal de hidrogênio em δ 2,77 (2H 9) com o sinal de carbono aromático em δ 151,4 (C-6) configurando uma cadeia lateral ligada ao anel quinônico. Verificaram-se também correlações dos hidrogênios em δ 7,99 (d, $J = 7,8$ Hz, H-8) e 7,90 (d, $J = 1,6$ Hz) em com o carbono carbonílico em δ 185,6 (C-4) e 185,1 (C-1). Observaram-se correlações dos hidrogênios das metilas em δ 1,71 (3H-18), 1,75 (3H-19) com o sinal do carbono 126,9 (C-17), e da metila δ 1,02 (d, $J = 6,9$ Hz 3H-16) com os sinais dos carbonos em δ 35,9 (C-12), 31,4 (C-13). Os principais deslocamentos químicos estão listados na Tabela 09 e as correlações observadas estão descritas na Tabela 10.

A combinação das informações obtidas dos espectros de RMN ¹H e ¹³C, uni e bidimensionais, nos espectros COSY (Figuras 19 a 21) e comparação com dados da literatura levaram a concluir que **CPR-I** tratava-se da cordiaquinona A (Figura 07), anteriormente isolada das raízes de *C. corymbosa* (Bieber, *et al.*, 1990 & Bieber *et al.*, 1994), *C. curassavica* (Ioset *et al.*, 1998). Cordiaquinona A possui propriedade antifúngica contra *Cladosporium cucumerinum* e *Candida albicans*, assim como efeito larvicida contra o mosquito da dengue, *Aedes aegypti* (Ioset, *et al.*, 1998).

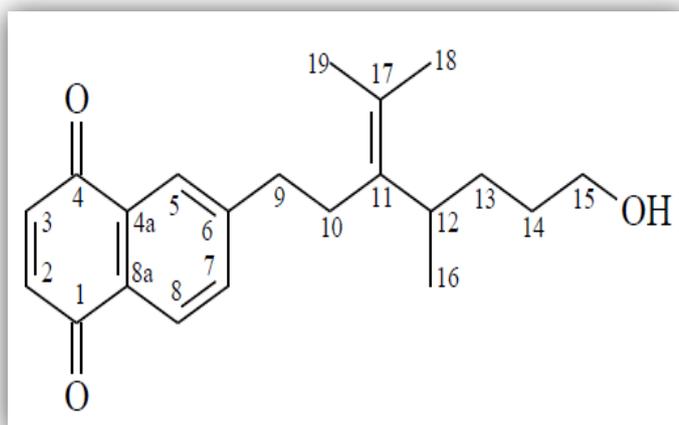
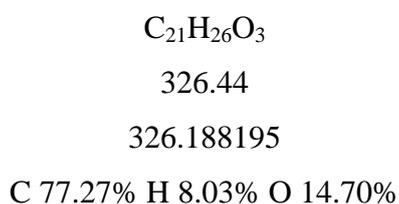


Figura 07: Estrutura da Cordiaquinona A

Tabela 09 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C e ^1H (CDCl_3) de *CPR-1*

	HSQC		HSQC *Lit	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C				
4	185,6	-	185,36	
1	185,1	-	184,85	
6	150,3	-	149,97	
11	134,8	-	134,46	
4a	132,3	-	131,97	
8a	130,2	-	129,94	
17	126,9	-	126,76	
CH				
2	139,0	6,95 (s)	138,73	6,95 (s)
3	138,8	6,95 (s)	138,49	6,95 (s)
7	134,0	7,57 (dd; 7,8; 1,6)	133,79	7,58 (dd; 8,0; 1,8)
8	127,0	7,99 (d; 7,8)	126,76	8,01 (d; 8,0)
5	126,1	7,90 (d; 1,6)	125,83	7,90 (d; 1,8)
12	35,9	2,75 (m)	35,63	
CH₂				
15	63,4	3,62 (t; 6,2)	63,19	3,62 (t; 6,5)
9	37,0	2,77 (m)	36,78	2,77 (m)
10	31,9	1,40 (m)	31,71	2,21 (m); 2,30 (m)
13	31,4	1,52 (m)	31,14	1,41 (m)
14	29,8	2,21 (m)	29,63	1,50 (m)
CH₃				
19	21,3	1,75 (s)	21,13	1,71 (s)
18	20,4	1,71 (s)	20,16	1,75 (s)
16	19,9	1,02 (d; 6,9)	19,69	1,04 (d; 7,0)

Deslocamentos químicos (δ_{C} e δ_{H}) em ppm e constante de acoplamento (J) em (Hz)

*Dados de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3), (Bieber *et al.*, 1990).

Tabela 10 - Correlações a longa distância ^1H , ^{13}C – HMBC de *CPR-1*

	HMBC		
	δ_{C}	$^2J_{\text{CH}}$	$^2J_{\text{CH}}$
C			
4	185,6	H-3	H-3
1	185,1	H-2	H-2
6	150,3	2H-9	2H-9
11	134,8	H-12	H-12
4a	132,3	-	-
8a	130,2	-	-
17	126,9	3H-18; 3H-19	3H-18; 3H-19
CH			
2	139,0	-	-
3	138,8	-	-
7	134,0	-	-
8	127,0	-	-
5	126,1	-	-
12	35,9	-	-
CH₂			
15	63,4	-	-
9	37,0	-	-
10	31,9	2H-9	2H-9
13	31,4	H-12	H-12
14	29,8	-	-
CH₃			
19	21,3	-	-
18	20,4	-	-
16	19,9	H-12	H-12

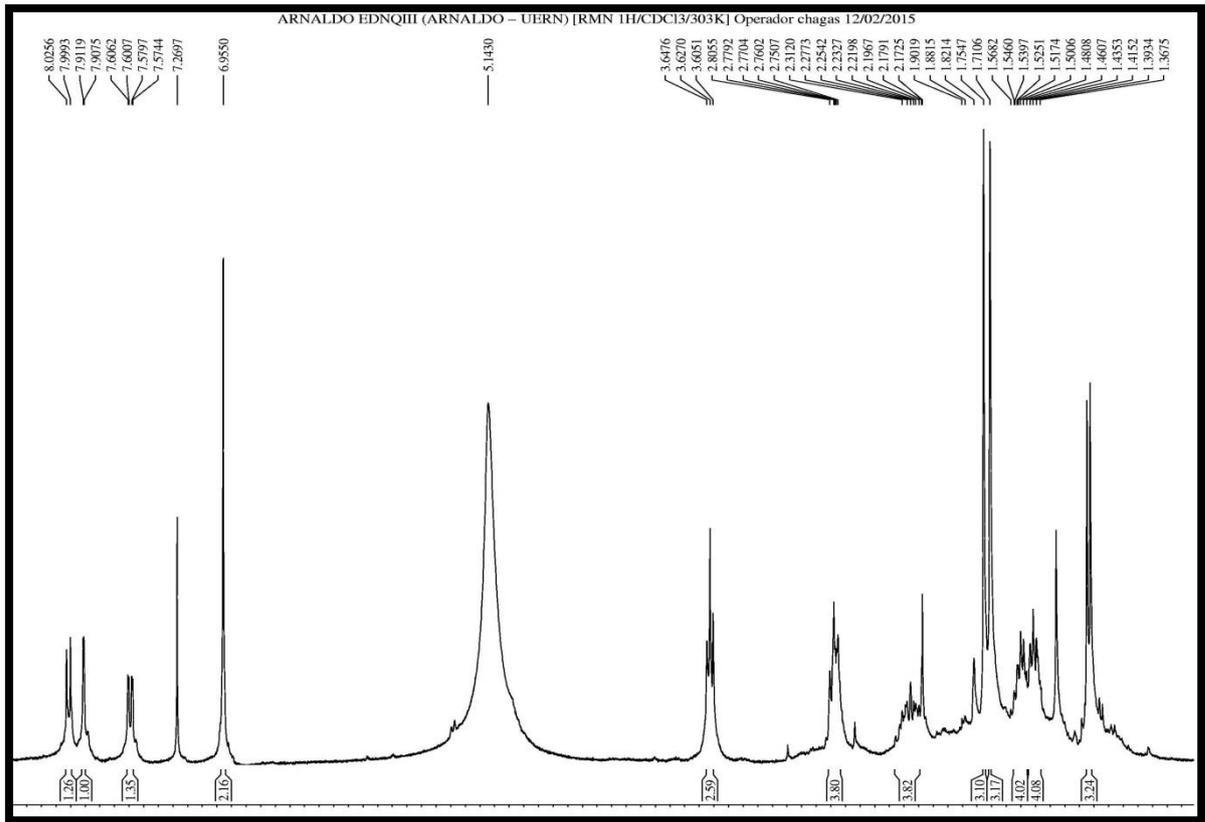


Figura 08 - Espectro de RMN¹H [500 MHz, CDC13] de *CPR-1*

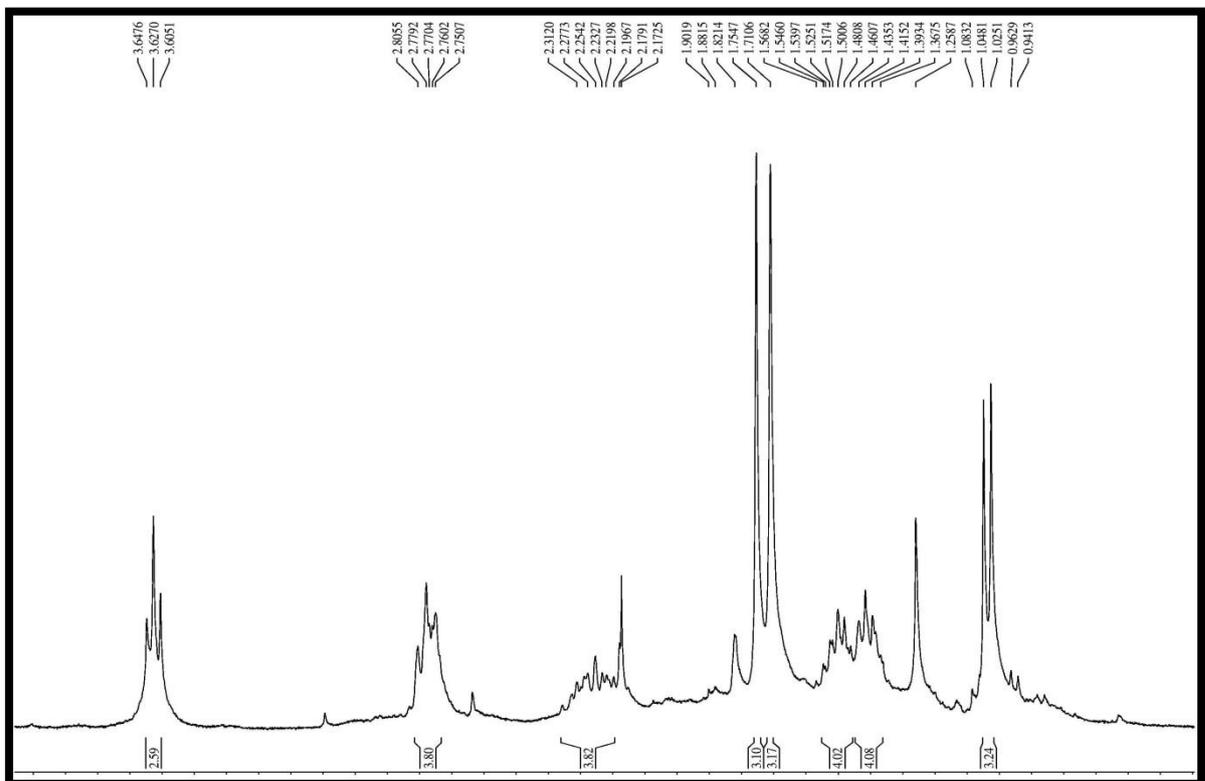


Figura 09 - Espectro de RMN¹H [500 MHz, CDC13] de *CPR-1*

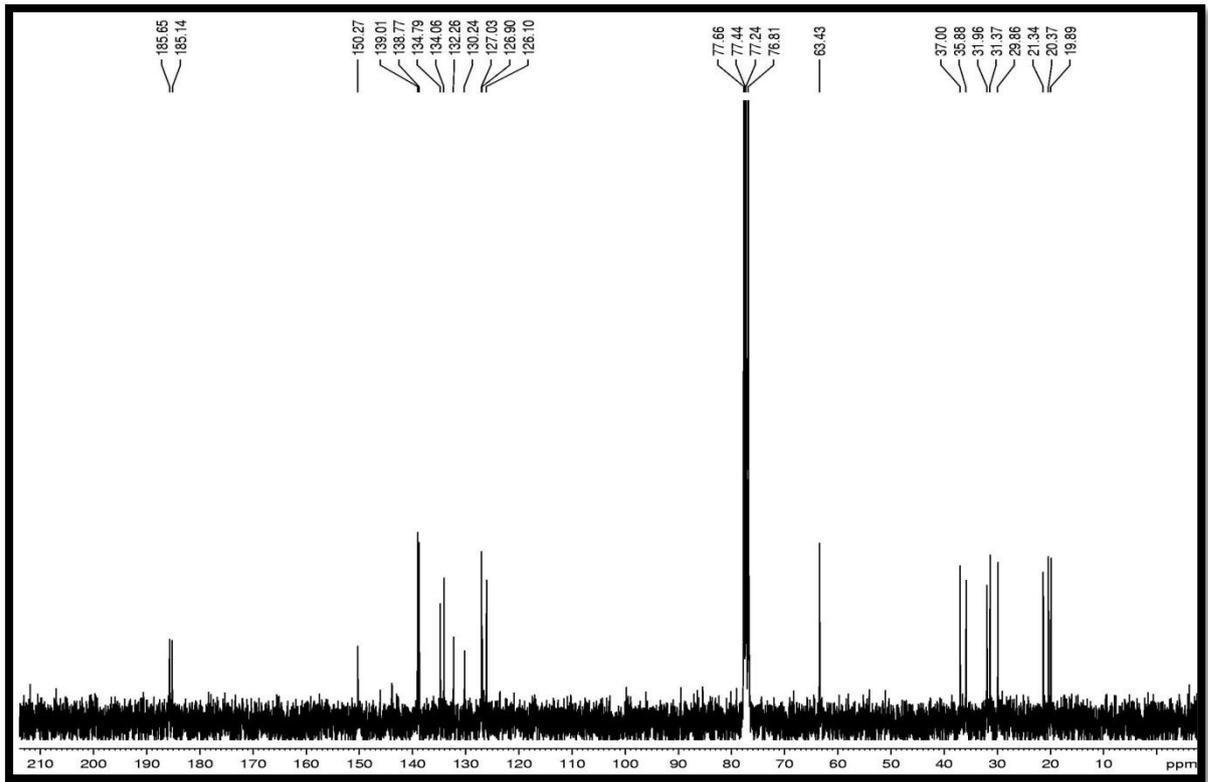


Figura 10 - Espectros de RMN ^{13}C -CPD [125 MHz, CDCl_3] de *CPR-I*

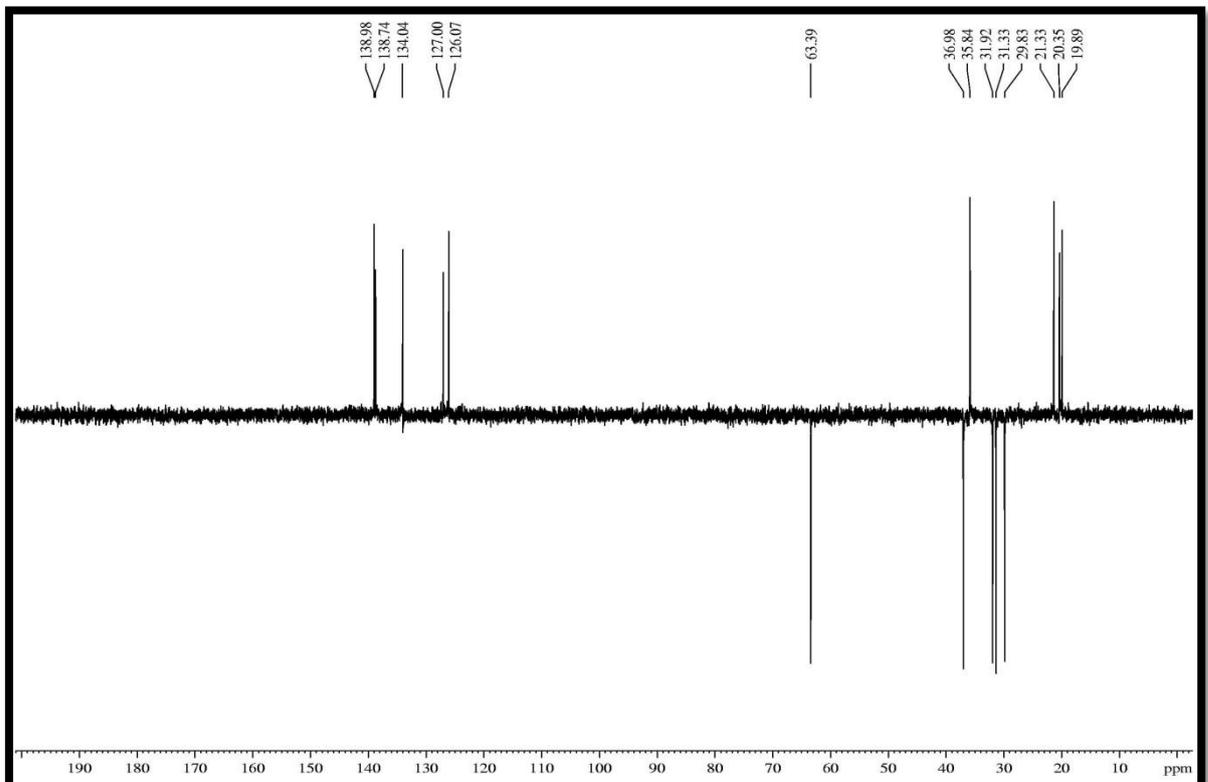


Figura 11 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de *CPR-I*

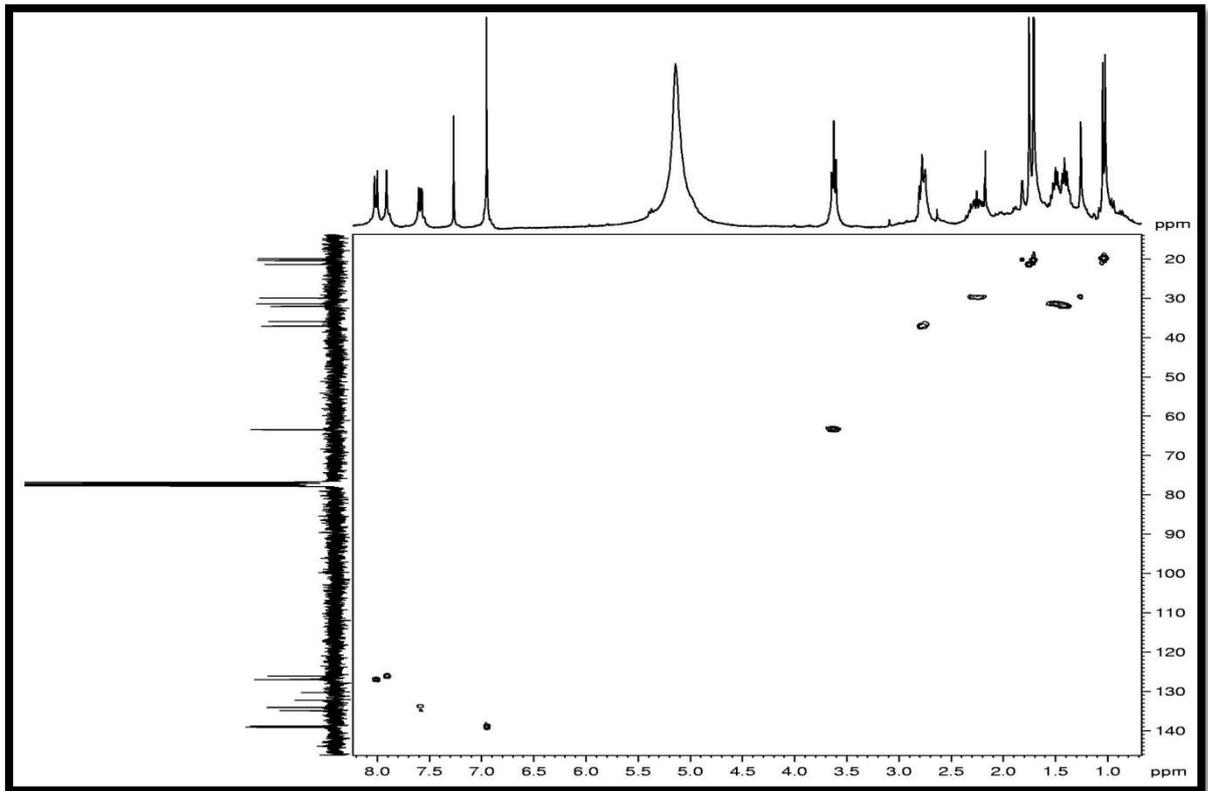


Figura 12 - Espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HSQC [500 MHz, CDCl_3] de *CPR-1*

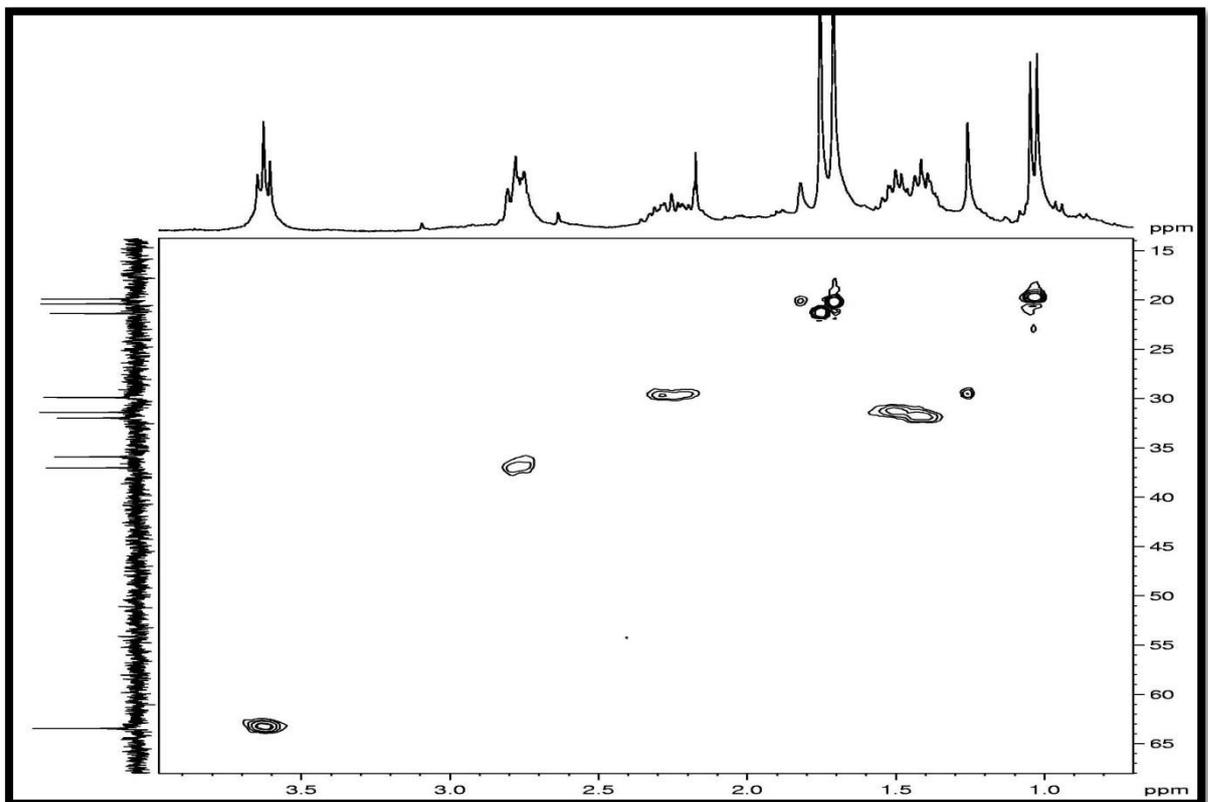


Figura 13 – Expansão 1 do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HSQC de *CPR-1*

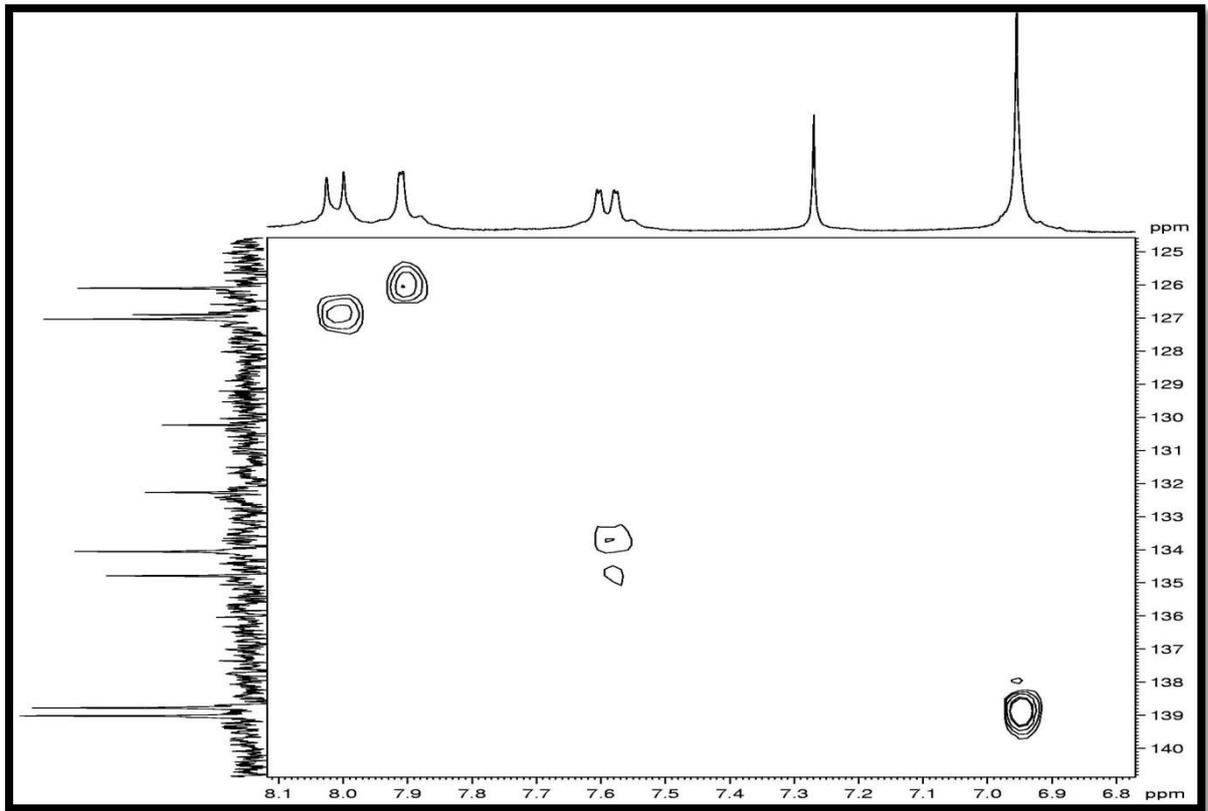


Figura 14 – Expansão 2 do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HSQC de CPR-1

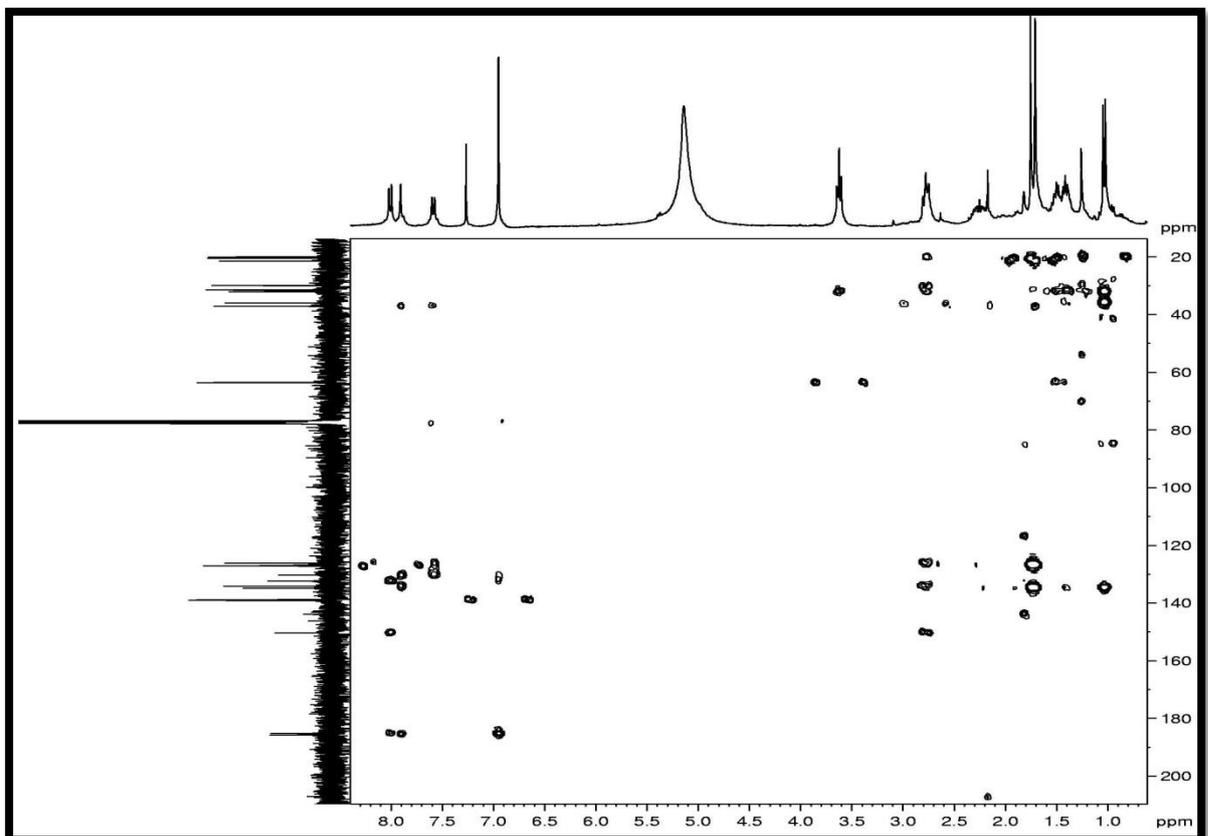


Figura 15 – Espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC [500 MHz, CDCl_3] de CPR-1

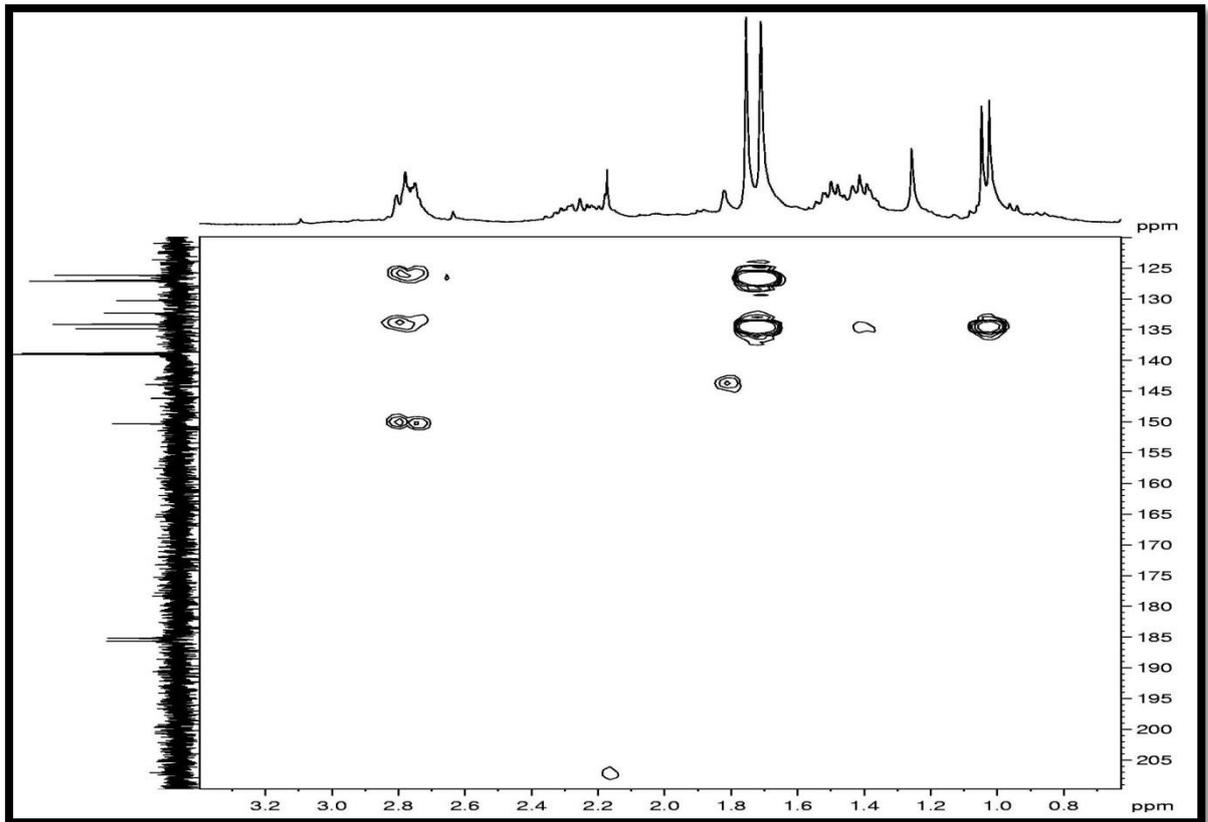


Figura 16 - Expansão 1 do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC de *CPR-1*

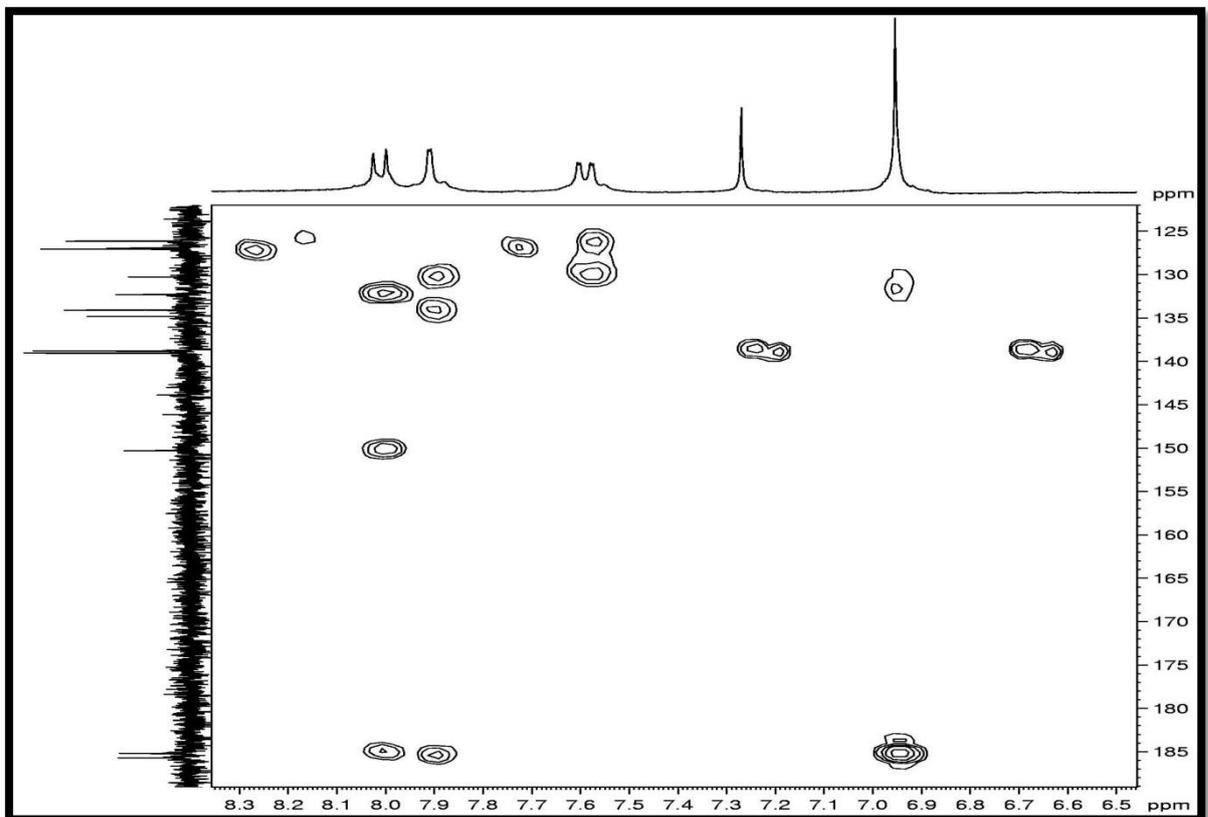


Figura 17 - Expansão 2 do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC de *CPR-1*

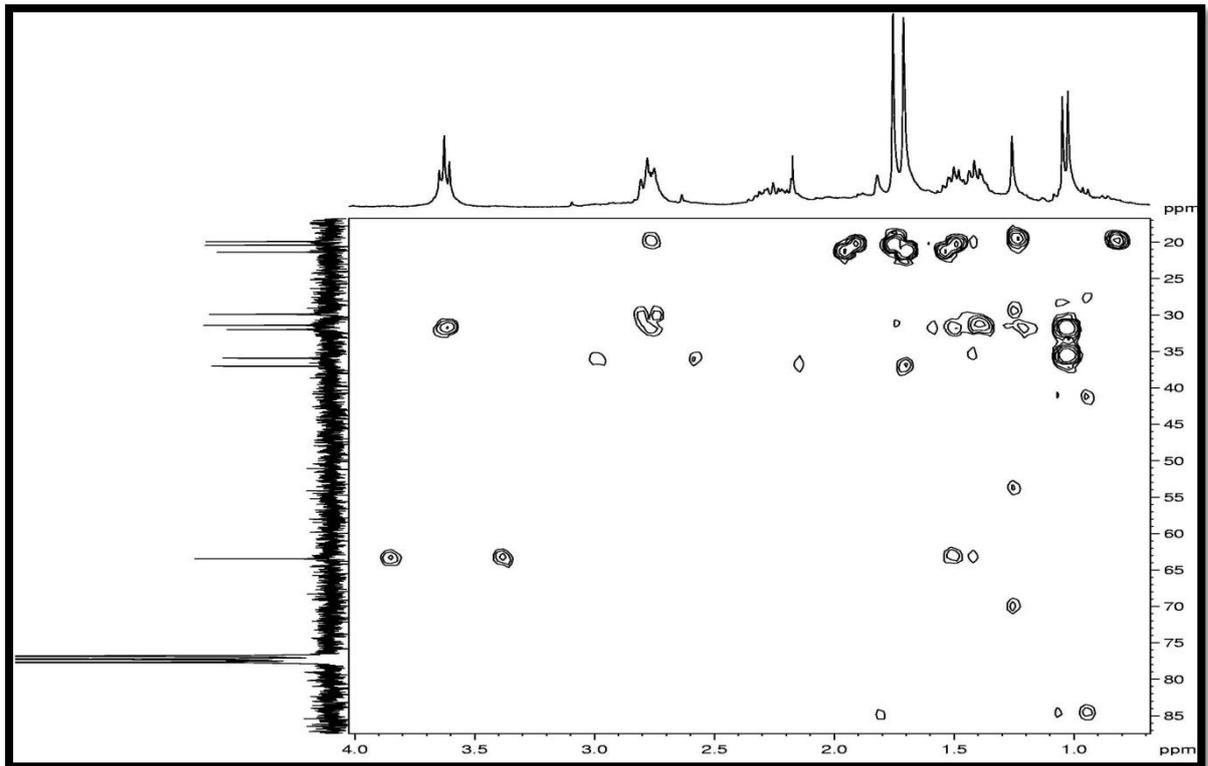


Figura 18 – Expansão 3 do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HMBC de *CPR-1*

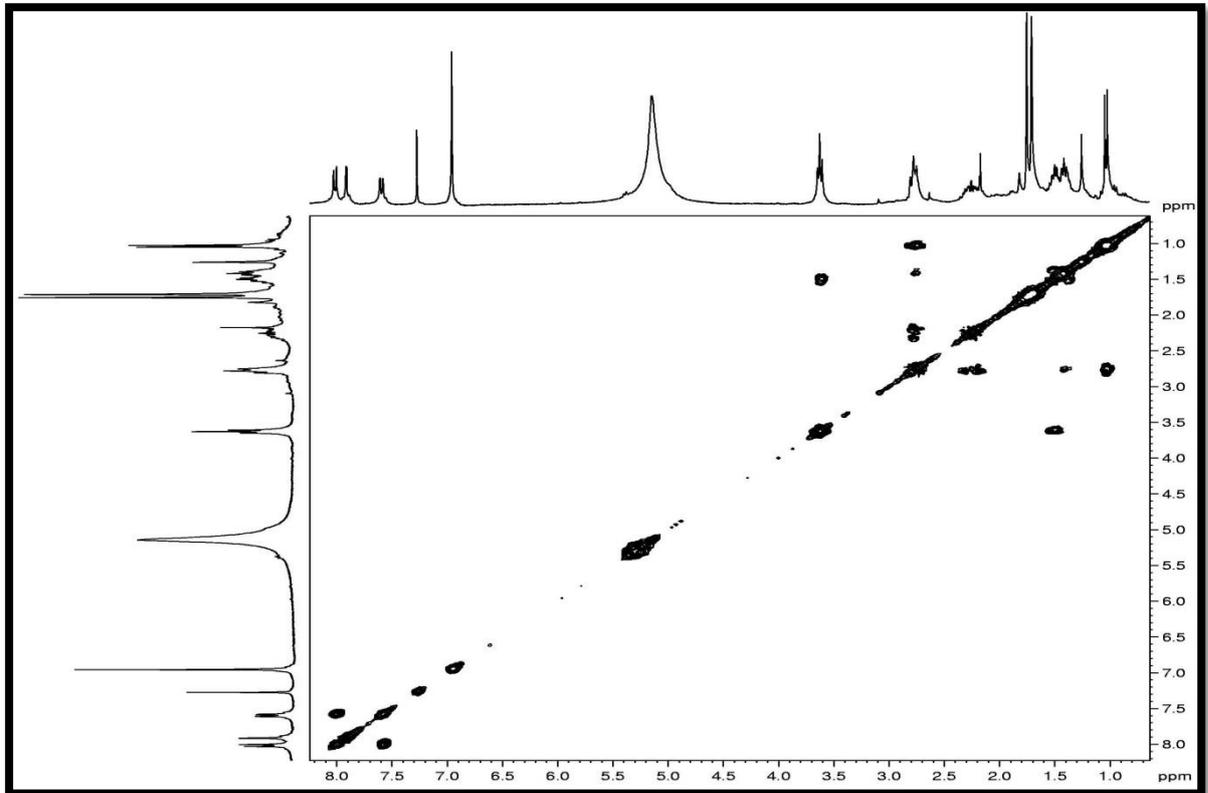


Figura 19 - Espectro de RMN ^1H , ^1H – COSY [500 MHz, CDCl_3] de *CPR-1*

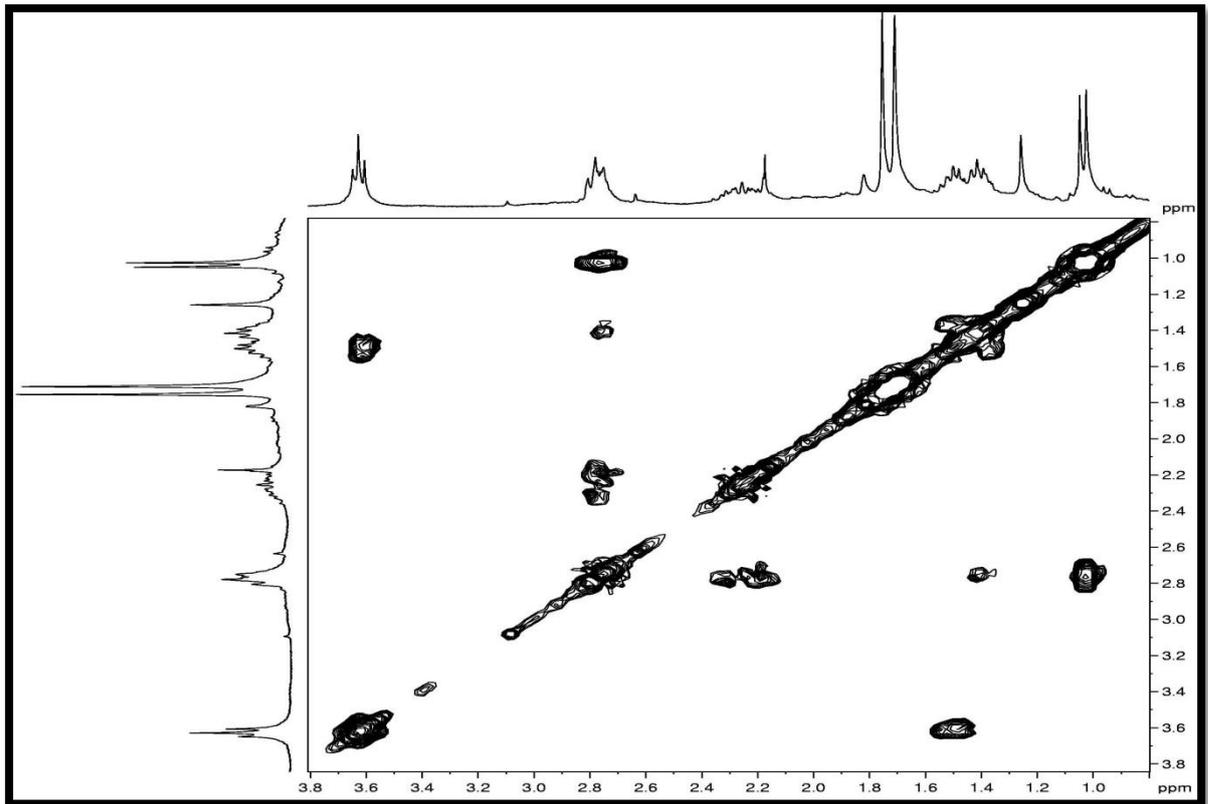


Figura 20 – Expansão 1 do espectro de RMN ^1H , ^1H – COSY [500 MHz, CDCl_3] de *CPR-1*

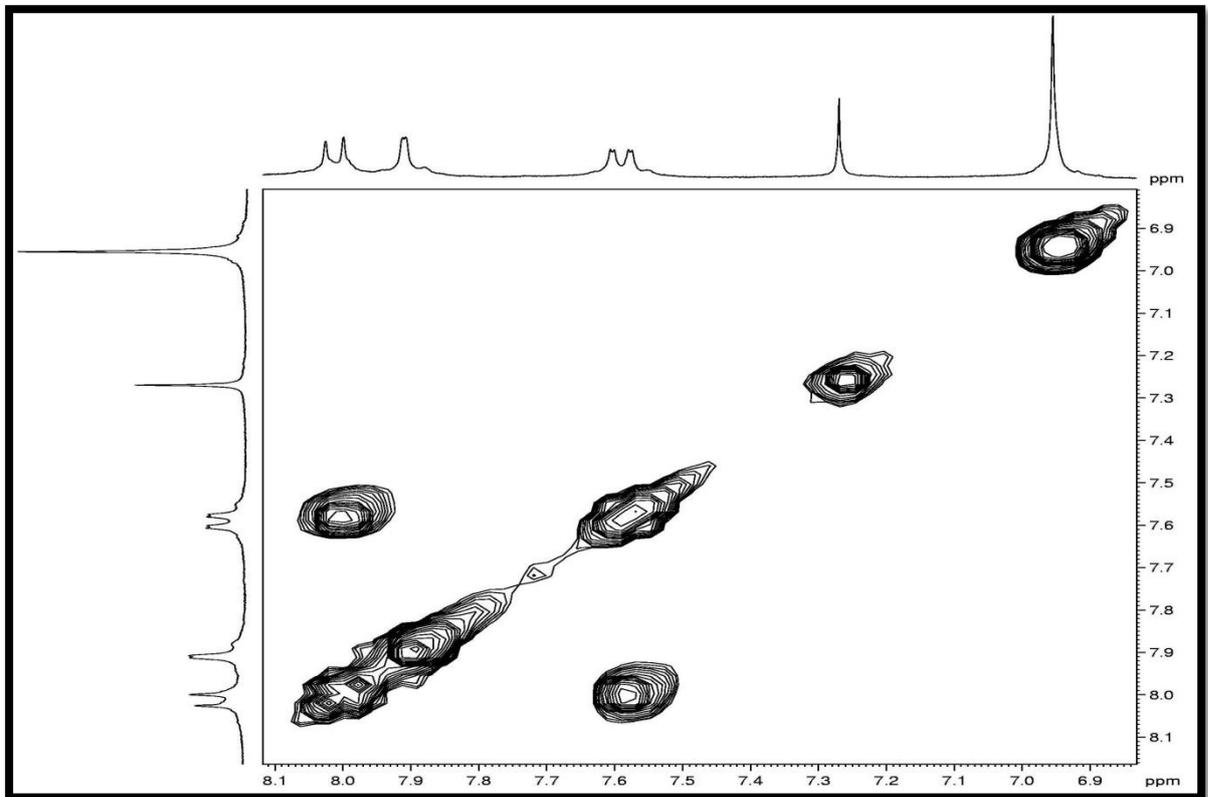


Figura 21 – Expansão 2 do espectro de RMN ^1H , ^1H – COSY de *CPR-1*

3.4.2 – Determinação estrutural de CPR-2

Após fracionamento cromatográficos do extrato diclorometano da raiz da *V. dardani*, incluindo colunas cromatográficas sobre gel de sílica foi isolado 60,6 mg de um sólido amarelo, solúvel em acetona, denominado de **CPR-2**.

O espectro de RMN ^1H [300 MHz, CDCl_3] (Figuras 23 e 24) apresentou um sinal em δ_{H} 6,96 (s, H-2 e H-3) com integração para dois hidrogênios, compatível com anel quinônico, três sinais típicos de um sistema AMX em δ 7,88 (d, $J = 1,5$ Hz, H-5), 8,0 (d, $J = 7,9$ Hz, H-8) e 7,55 (dd, $J = 7,9$ e 1,5 Hz, H-7). Mostrou ainda três sinais na região de hidrogênios metílicos, sendo um singleto em δ 0,62 (s, 3H-18) indicando a presença de um grupo metila ligado a carbono não-hidrogenado e dois dupletos em δ 0,98 (d, $J = 7,8$ Hz, 3H-17) e 1,00 (d, $J = 6,3$ Hz, 3H-19) correspondentes a grupos metilas ligados a carbono terciário. Sinais referentes a hidrogênios metilênicos e metínicos em δ_{H} 2,80 (td $J = 5,4$ Hz, H-15), 2,64 (td $J = 5,1$ Hz, H-15), 1,66 (m, 2H-10), 2,38 (m, 2H-14), 1,91 (m, H-9), 1,68 (m, H-9), 2,60 (q, $J = 6,5$ Hz, H-12), e 2,14 (m, H-16) foram ainda observados.

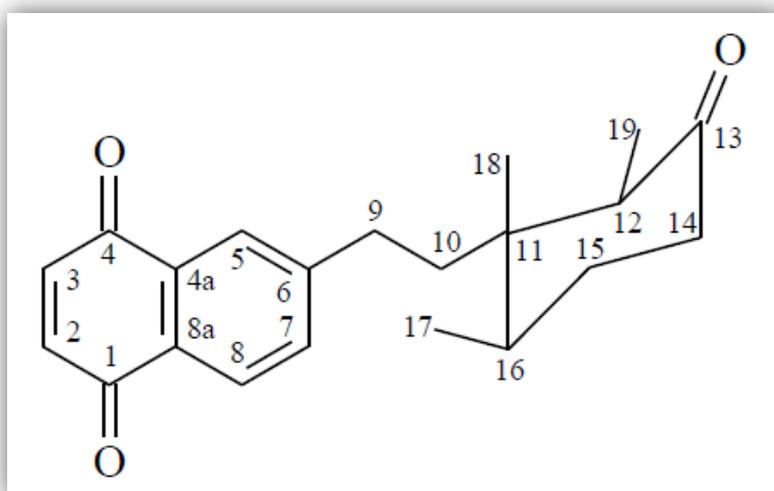
O espectro de RMN ^{13}C -CPD [75 MHz, CDCl_3] (Figura 25) apresentou vinte e uma linhas espectrais, onze das quais na região de carbonos sp^2 , incluindo três carbonilas (δ_{C} 213,1; 185,4 e 184,9). Após a comparação com o espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° (Figura 26) verificou-se a presença de sete carbonos metínicos, cinco dos quais são carbonos de dupla; quatro carbonos metilênicos; três carbonos metílicos e sete carbonos não-hidrogenados, conforme dispostos na Tabela 11.

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear HSQC (Figuras 27 a 29) permitiu associar seguramente as correlações, a uma ligação, dos sinais de cada hidrogênio ao seu respectivo carbono (Tabela 11). Através deste experimento foi possível atribuir de forma inequívoca os deslocamentos químicos dos sinais de hidrogênios ligados aos carbonos metilênicos C-9, C-10, C-14 e C-15 e carbonos metínicos C-12 e C-16.

O espectro ^1H , ^1H – COSY (Figuras 34 a 36), mostrou acoplamento *orto* entre os sinais de hidrogênios aromáticos em δ 7,55 (dd, $J = 7,9$ e 1,5 Hz, H-7) e 8,0 (d, $J = 7,9$ Hz, H-8), assim como acoplamentos geminal e vicinal envolvendo hidrogênios metínicos e metilênicos com deslocamentos químicos em δ 2,80 (td, $J = 5,4$ Hz) e 2,64 (td 5,1 Hz, H-9a / H-9b); em δ 2,60 (q, $J = 6,5$ Hz, H-12) com δ 1,00 (d, $J = 6,3$ Hz, H-19) em δ 2,14 (m, H-16) com δ 0,98 (d, $J = 7,8$, H-17). Através deste experimento também foi possível verificar os acoplamentos de hidrogênios homotópicos axial e equatorial em δ 1,66 (m, H-10a e H-10b) com δ_{H} 1,91 e 1,68 (m, 2H-9).

O espectro bidimensional de correlação heteronuclear a duas ($^2J_{CH}$) e a três ligações ($^3J_{CH}$), HMBC (Figuras 30 a 33) foi importante para confirmar e verificar possíveis atribuições dos deslocamentos químicos de carbono. Através deste experimento, observaram-se correlações entre o hidrogênio em δ 8,00 (H-5) com o carbono em δ 185,4 (C-1); assim como do hidrogênio em δ 7,88 (H-8) com o carbono em δ 184,9 (C-4) e do hidrogênio em δ 7,55 (H-7) com o carbono δ 126,1 (C-8) justificando assim a posição dos hidrogênios metínicos e das carbonilas característicos do anel quinônico. As posições dos três grupos metílicos foram confirmadas através das correlações do sinal de hidrogênio em δ 0,62 (H-18) com os carbonos em δ 36,5 (C-16) e 43,9 (C-11); do sinal de hidrogênio em δ 1,00 (H-19) com os carbonos em δ 43,9 (C-11) e 50,6 (C-12) e do sinal de hidrogênio em δ 0,98 (H-17) com o carbono em δ 29,7 (C-15), e 36,5 (C-16). Outras correlações justificadas foram as dos hidrogênios metilênicos em δ 2,60 (2H-9) com o carbono em δ 149,7 (C-6), demonstrando a ligação do grupo metilênico ao anel quinônico. Além das correlações descritas, o espectro apresentou outras correlações como apresentadas na (Tabela 12).

Com base nos resultados discutidos acima e comparação com dados da literatura chegou-se a estrutura de **CPR-2** tratava-se de uma naftoquinona de natureza terpênica, conhecida por cordiaquinona B (Figura 22), uma substância previamente isolada das espécies *Cordia linnae* e *Cordia curassavica* (Ioset *et al.*, 1998 e 2000). Através do espectro HSQC foi possível determinar com segurança os deslocamentos químicos referentes aos carbonos C-5 e C-8, os quais, conforme a literatura pode ser permutada (Ioset *et al.*, 1998). Conforme as referências citadas, o composto apresenta atividade antifúngica contra *Cladosporium cucumerinum* e *Candida albicans* e atividade larvívica contra o inseto *Aedes aegypti*.



$C_{22}H_{28}O_3$
 340.46
 340.203845
 C 77.61% H 8.29% O 14.10%

Figura 22: Estrutura da Cordiaquinona B

Tabela 11 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C e ^1H (CDCl_3) de **CPR-2**

	HSQC		HSQC * Lit	
	δ_{C}	δ_{H}	δ_{C}	δ_{H}
C				
13	213,1	-	213,1	-
1	185,4	-	185,2	-
4	184,9	-	184,7	-
6	149,7	-	149,5	-
4a	132,3	-	132,0	-
8a	130,3	-	130,0	-
11	43,9	-	43,6	-
CH				
2	138,9	6,96 (s)	138,7	6,97
3	138,7	6,96 (s)	138,5	6,97
7	134,0	7,55 (dd; 7,9; 1,5)	133,9	7,57 dd (7,8; 1,7)
5	127,1	7,88 (d; 1,5)	126,8	7,89 d (1,9)
8	126,1	8,00 (d; 7,9)	125,9	8,02 d (7,8)
12	50,6	2,60 (q; 6,5)	50,3	2,60 q (6,8)
16	36,5	2,14 (m)	36,2	2,14 m
CH₂				
14	41,7	2,38 (m)	41,5	2,41 m
10	39,0	1,66 (m)	38,8	1,66 m
9	31,0	2,80 (td; 5,4); 2,64 (td; 5,1)	29,4	2,80 td (13,1; 4,9)
15	29,7	1,91 (m); 1,68 (m)	30,8	1,93 m
CH₃				
19	7,9	1,00 (d; 6,3)	7,7	1,03 d (6,8)
17	15,4	0,98 (d; 7,8)	15,1	1,01 d (6,4)
18	15,4	0,62 (s)	15,2	0,63 s

Deslocamentos químicos (δ_{C} e δ_{H}) em ppm e constante de acoplamento (J) em (HZ)
 *Dados de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3), (Ioset *et al.*, 1998).

Tabela 12 - Correlações a longa distância ^1H , ^{13}C – HMBC de *CPR-2*

	HMBC			
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$
C				
13	213,1	-	-	-
1	185,4	-	H-2	H-3, H-8
4	184,9	-	H-3	H-2, H-5
6	149,7	-	2H-9	H-8, 2H-10
4a	132,3	-	-	H-3, H-8
8a	130,3	-	-	H-2, H-5, H-7
CH				
2	138,9	6,96 (S)	H-3	-
3	138,7	6,96 (S)	H-2	-
7	134,0	7,55 (dd; 7,9; 1,5)	-	H-5; 2H-9
5	127,1	8,00 (d; 7,9)	-	H-7, 2H-9
8	126,1	7,88 (d; 1,5)	H-7	-
12	50,6	2,60 (q; 6,5)	3H-19	-
16	36,5	2,14 (m)	H-15, 3H-17	2H-10, 2H-14, 3H-18
CH₂				
14	41,7	2,38 (m)	-	-
10	39,0	1,66 (m)	-	3H-18
9	31,0	1,91 (m); 1,68 (m)	2H-10	H-5, H-7, 3H-18
15	29,7	2,80 (td; 5,4); 2,64 (td; 5,1)	2H-14	3H-17
CH₃				
19	7,9	1,00 (d; 6,3)	H-12	-
17	15,4	0,98 (d; 7,8)	-	2H-15
18	15,4	0,62 (s)	-	2H-10, H-12, H-16

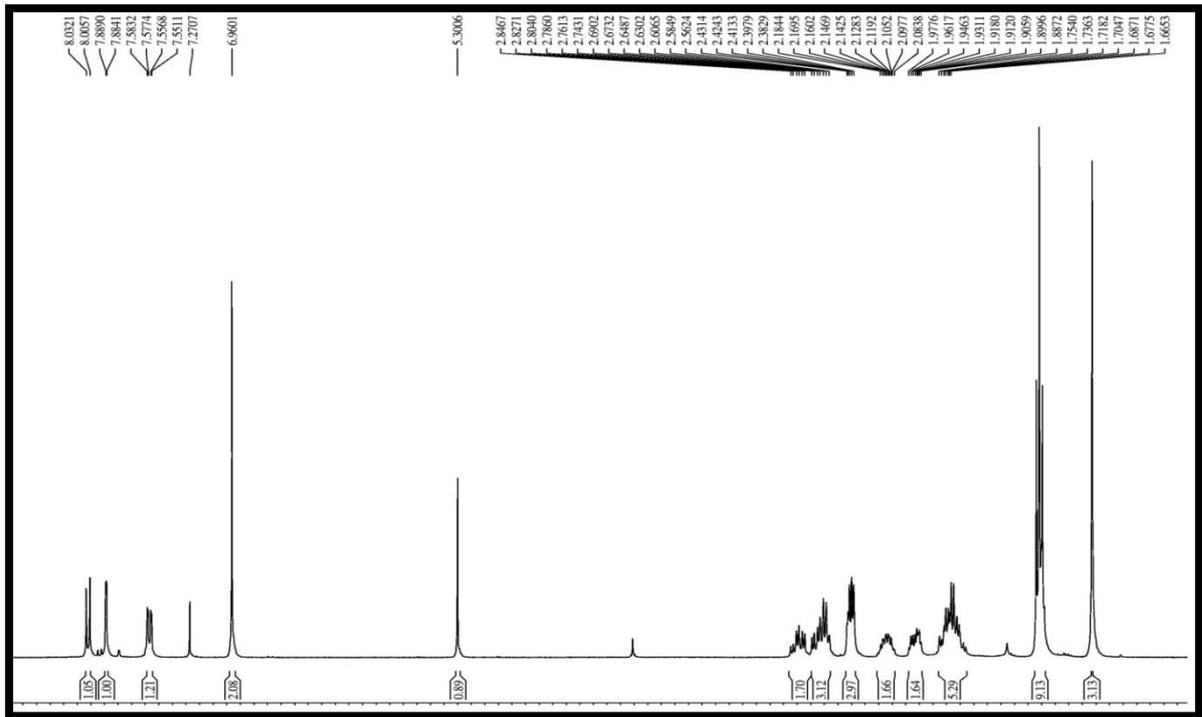


Figura 23 - Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de *CPR-2*

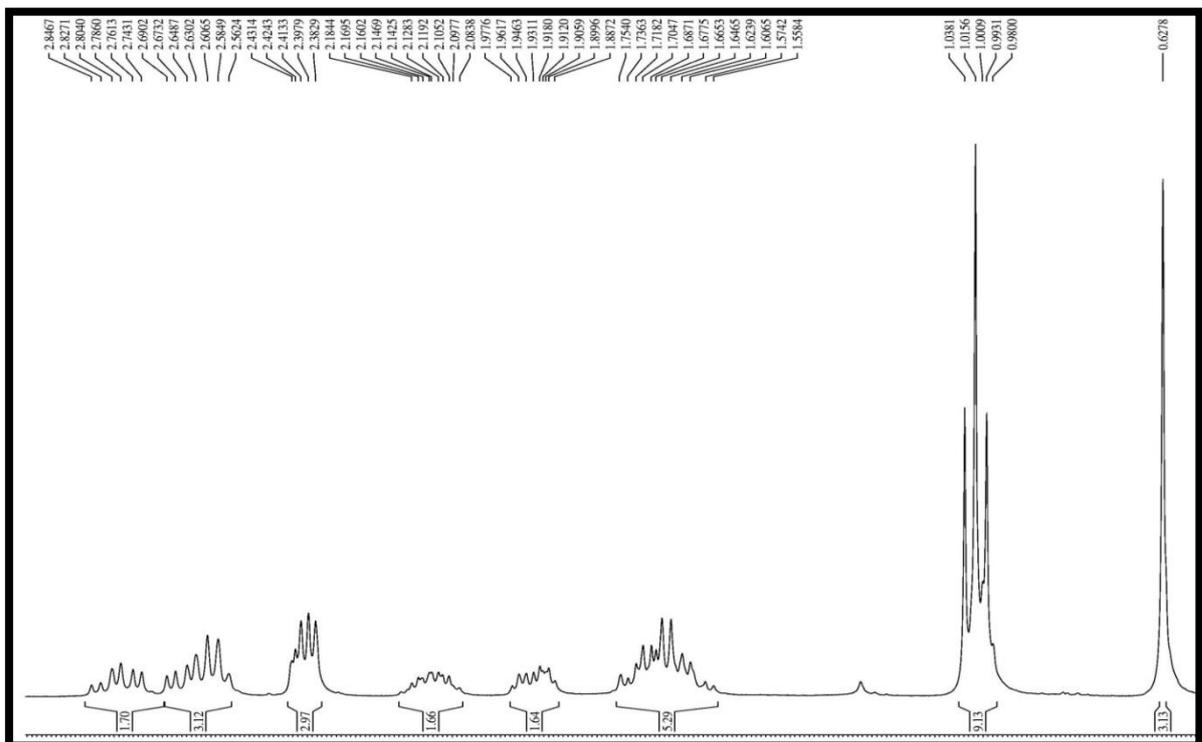


Figura 24 – Expansão 1 do espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de *CPR-2*

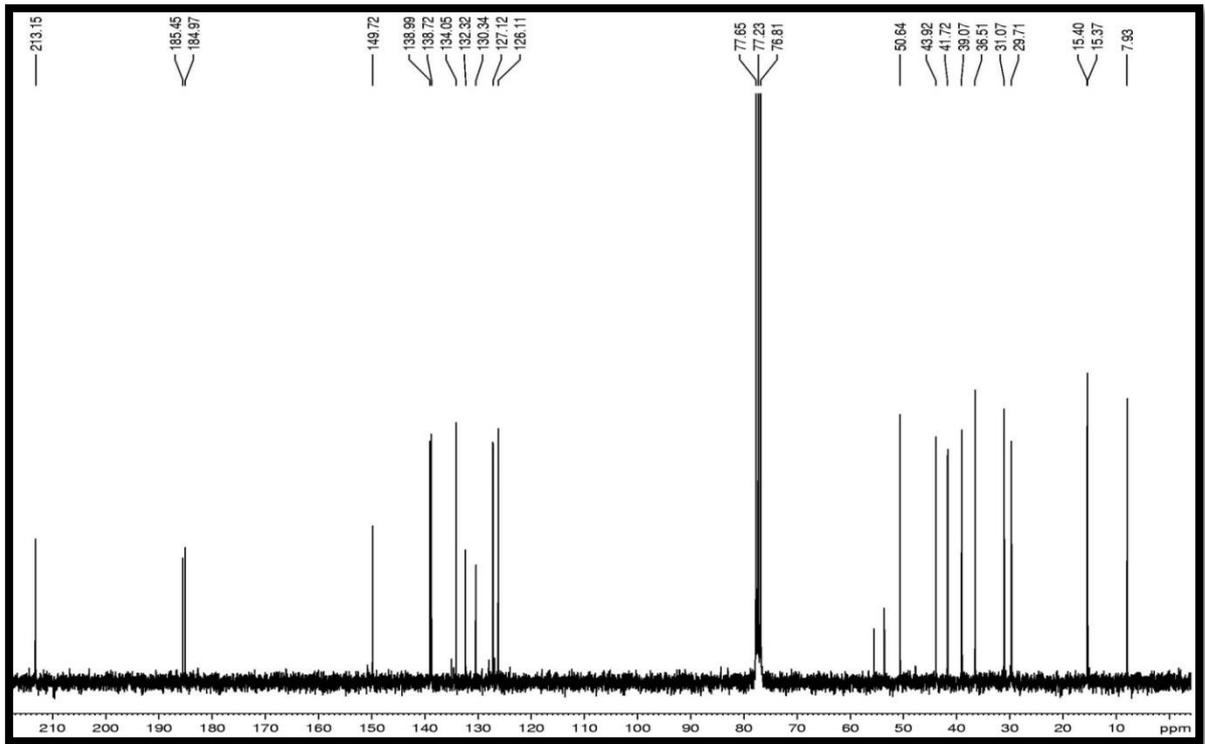


Figura 25 - Espectros de RMN ^{13}C -CPD [125 MHz, CDCl_3] de *CPR-2*

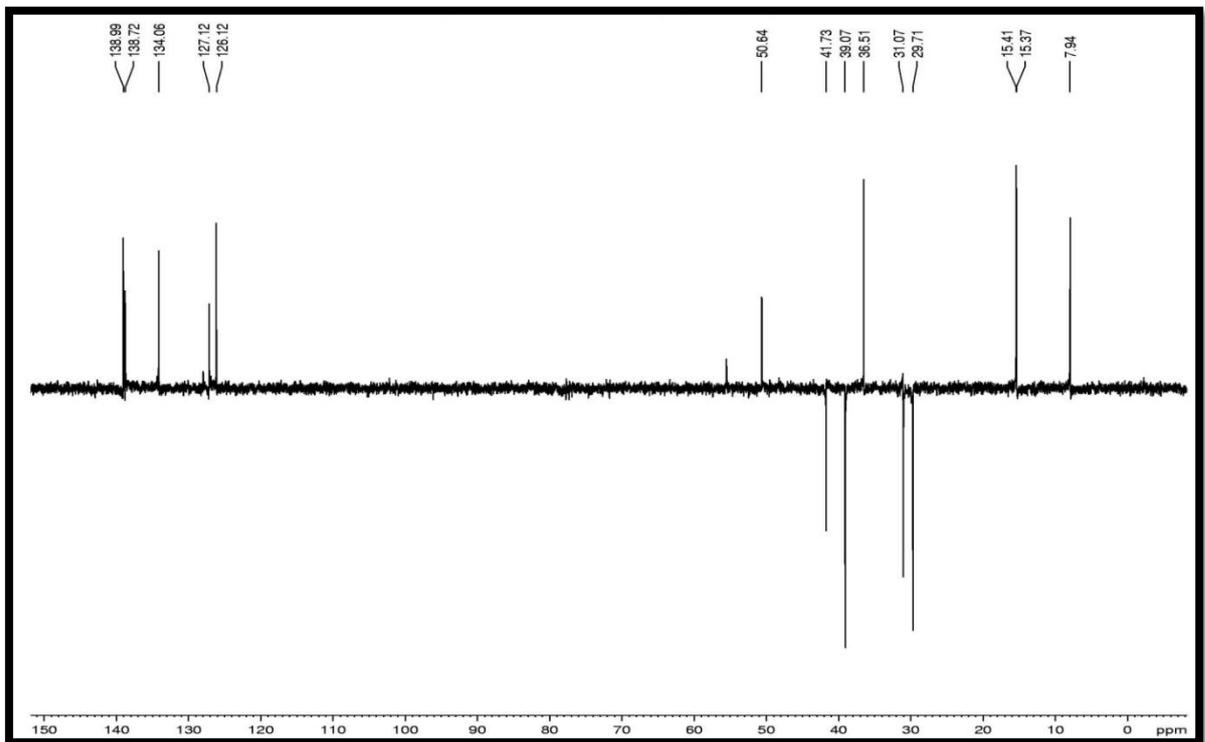


Figura 26 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de *CPR-2*

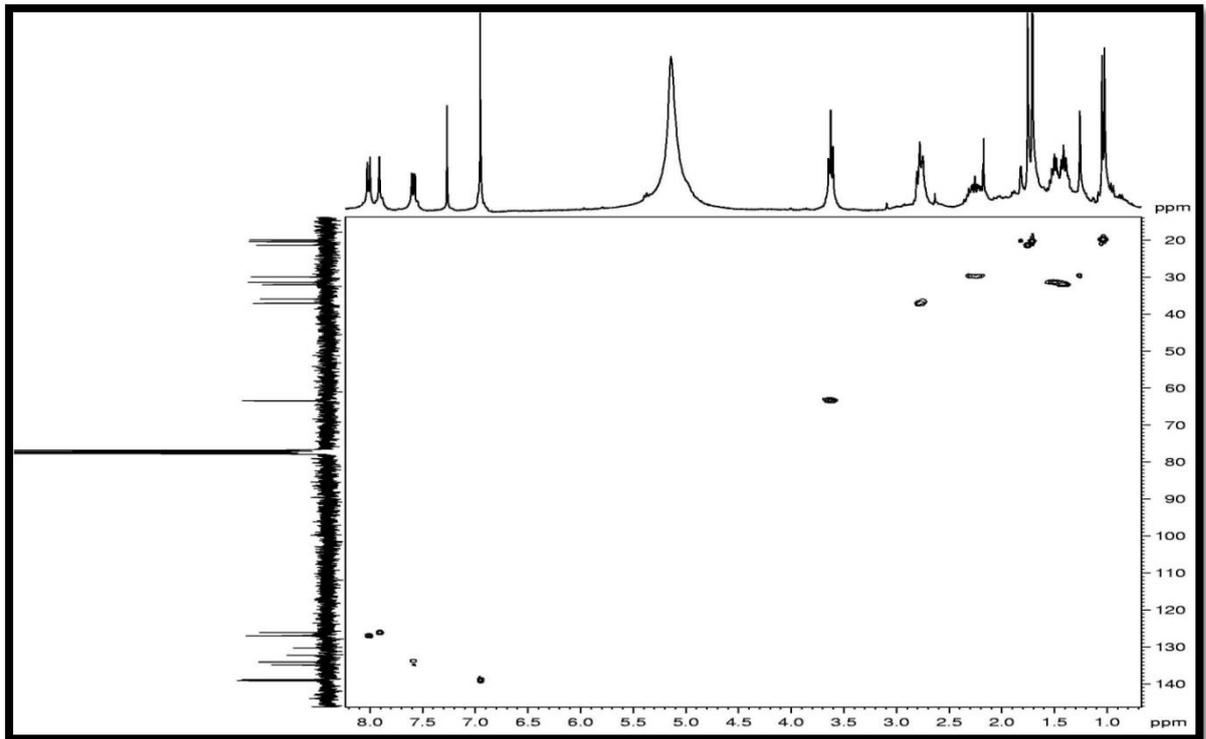


Figura 27 - Espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HSQC [500 MHz, CDCl_3] de *CPR-2*

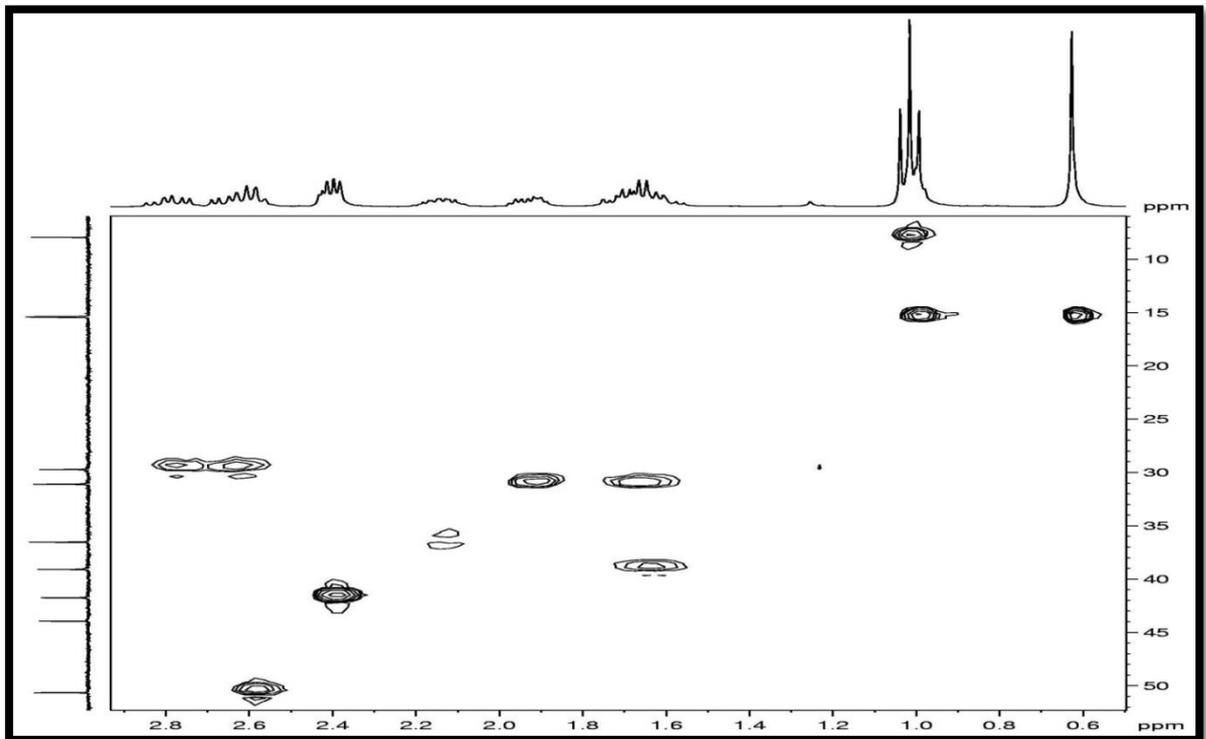


Figura 28 - Expansão 1 do espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HSQC [500 MHz, CDCl_3] de *CPR-2*

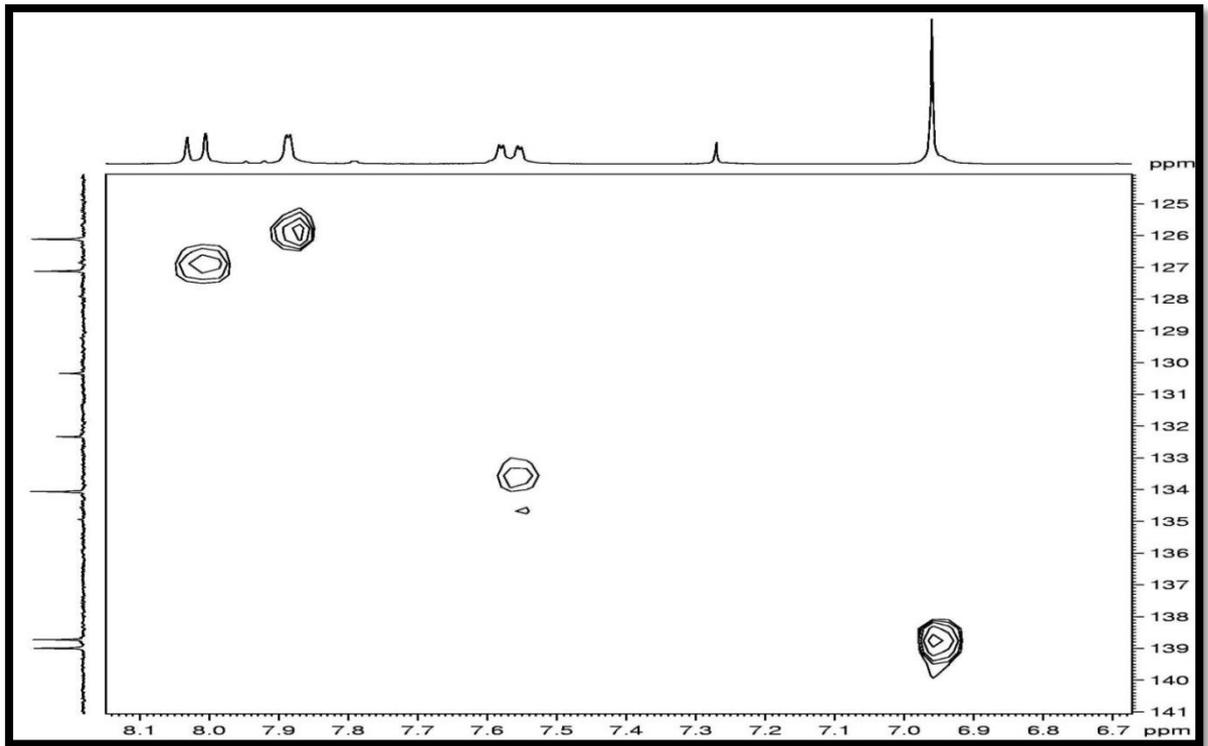


Figura 29 - Expansão 2 do espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HSQC [500 MHz, CDCl_3] de *CPR-2*

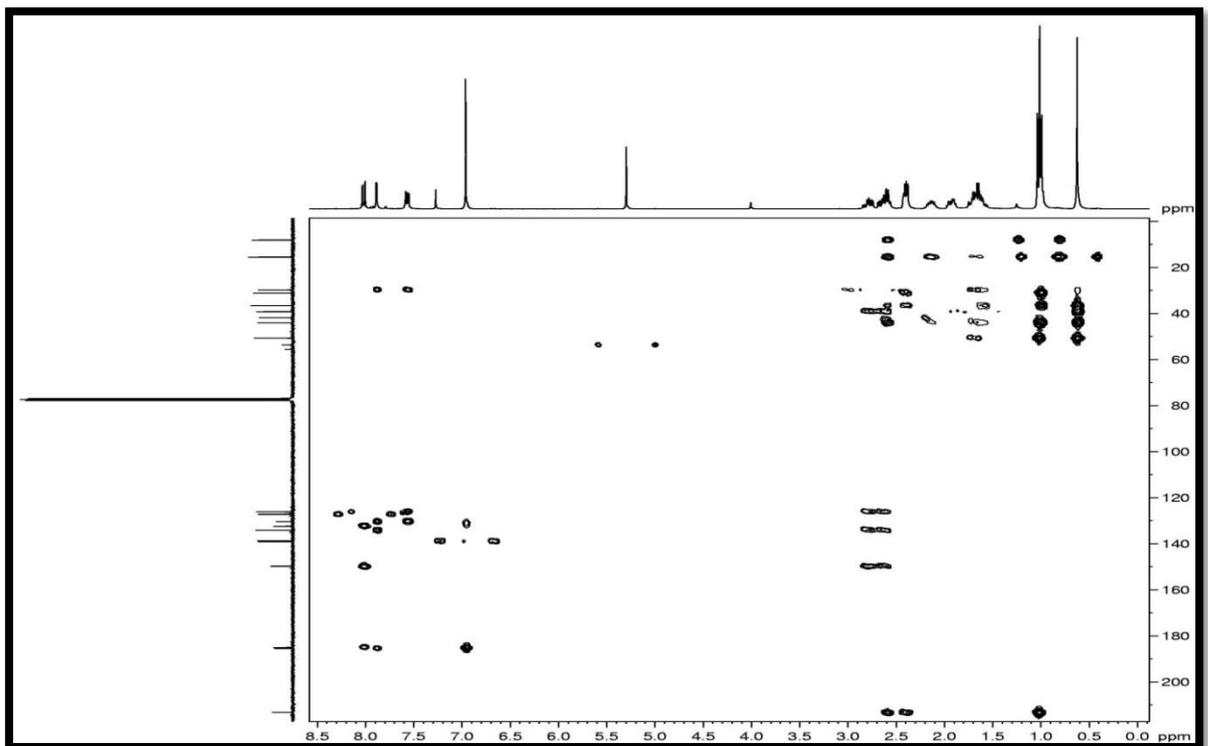


Figura 30 - Espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC [500 MHz, CDCl_3] de *CPR-2*

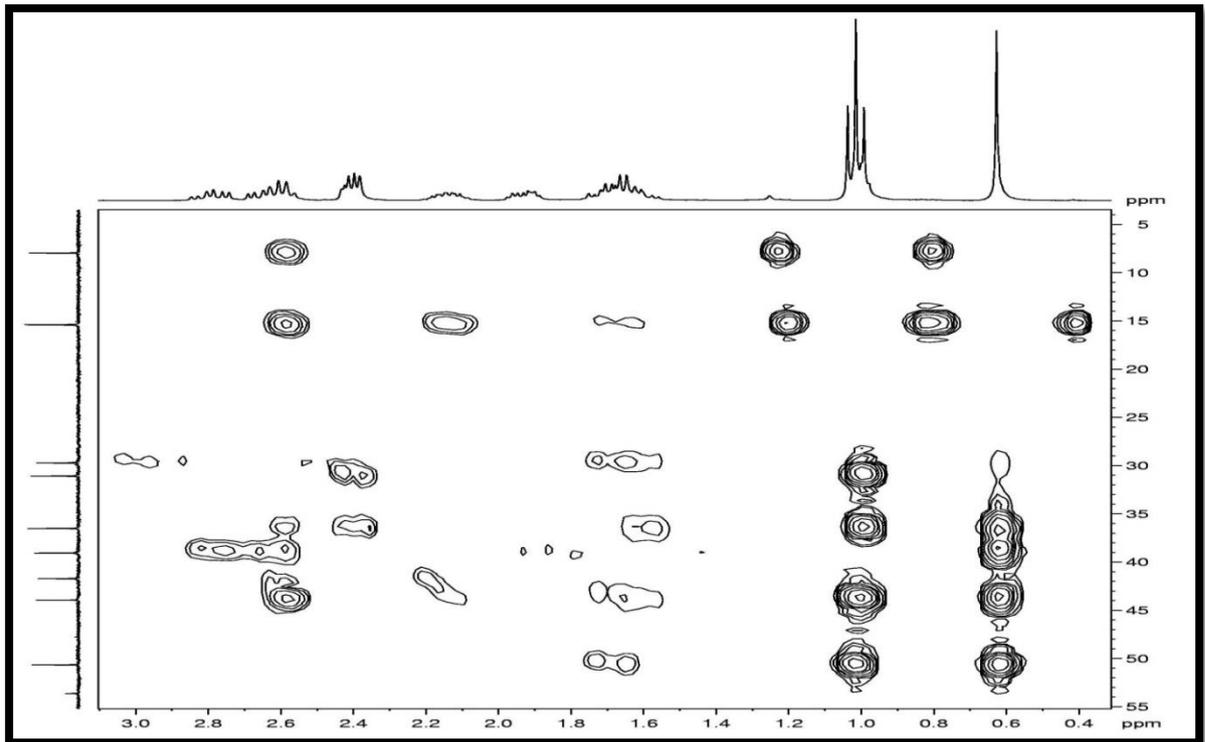


Figura 31 – Expansão 1 do espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC [500 MHz, CDCl_3] de *CPR-2*

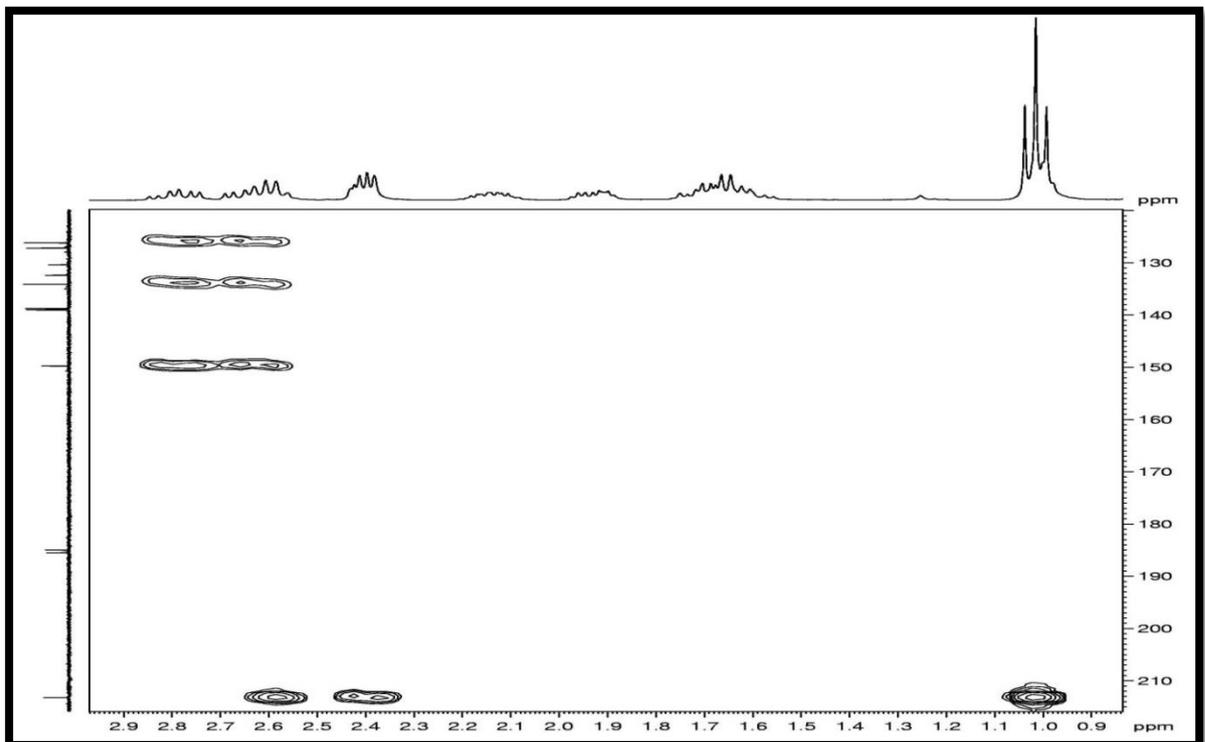


Figura 32 - Expansão 2 do espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC [500 MHz, CDCl_3] de *CPR-2*

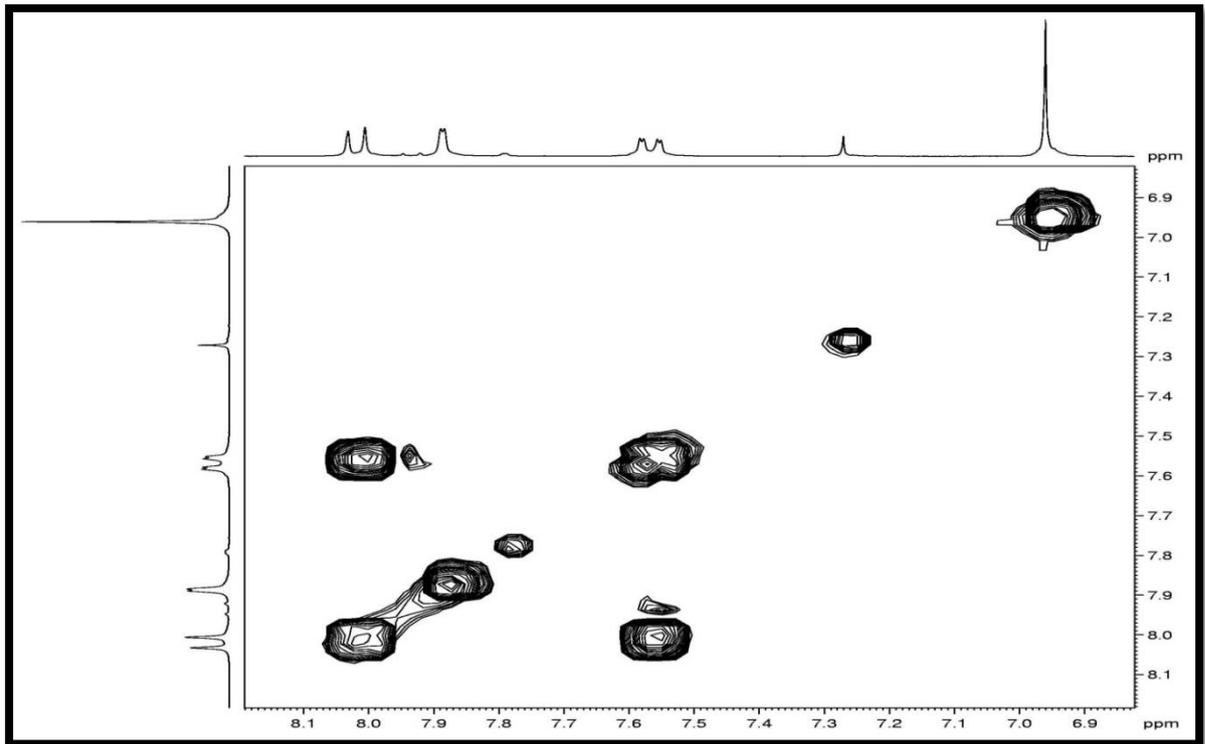


Figura 35 – Expansão 1 do espectro de RMN ^1H – COSY [500 MHz, CDCl_3] de *CPR-2*

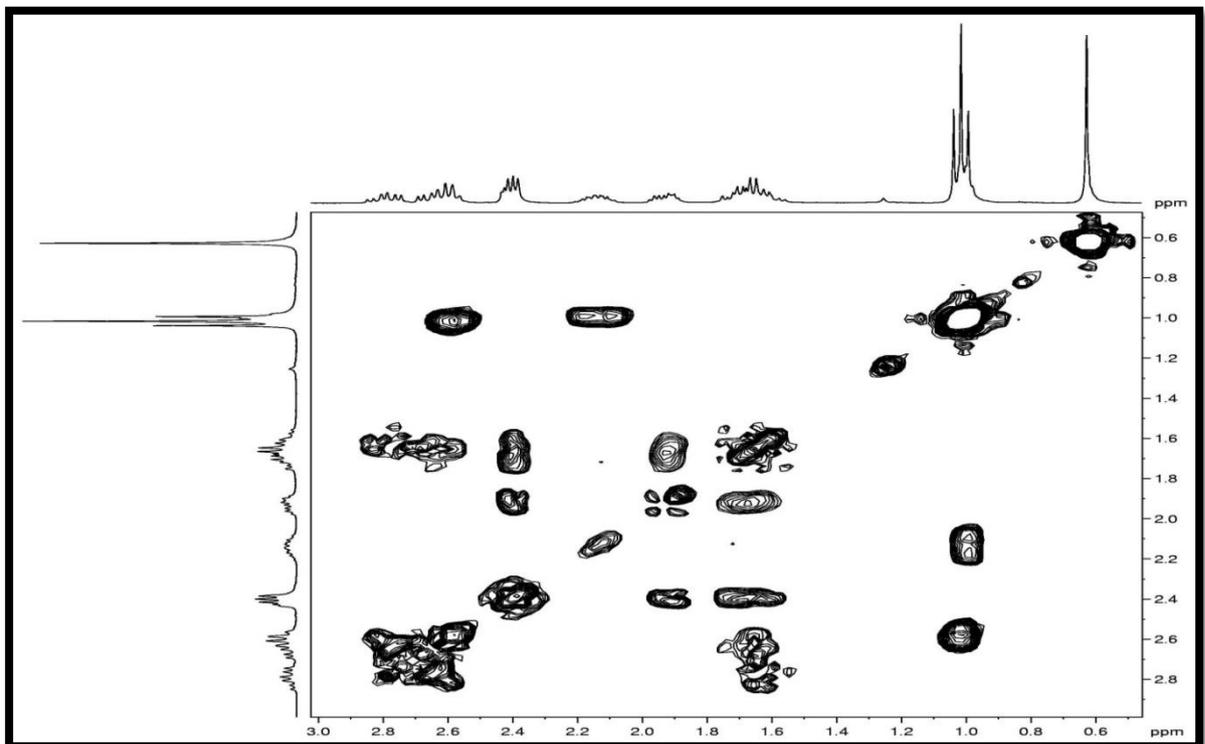


Figura 36 – Expansão 2 do espectro de RMN ^1H – COSY [500 MHz, CDCl_3] de *CPR-2*

3.5 - Determinação estrutural dos flavonóides isolados das folhas da *V. dardani*

3.5.1 - Determinação estrutural de CPF-1

O composto *CPF-1* (11,56 mg) foi isolado da fração diclometano, resultado da coluna filtrante do extrato hidroalcoólico das folhas da *Varronia dardani*, sob forma de um sólido branco, com ponto de fusão de 99 °C (Figura 37).

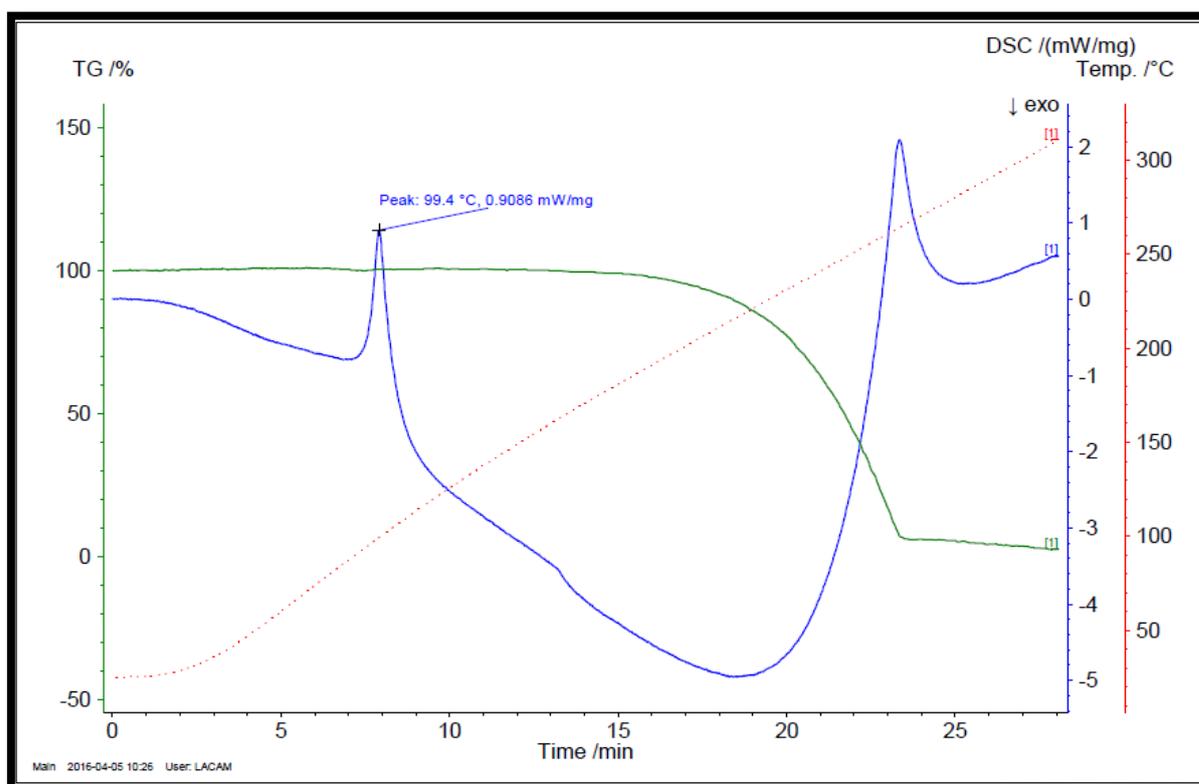


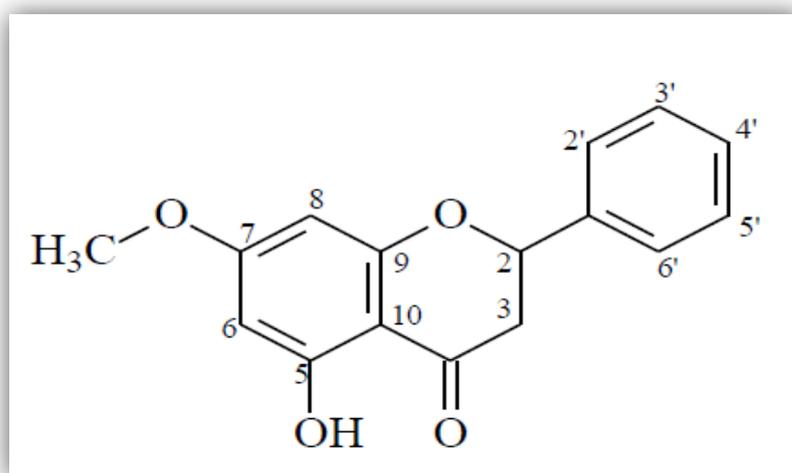
Figura 37 – Análise de TG/DSC (ponto de fusão) determinado para *CPF-1*

O espectro de RMN ^1H (Figuras 41 e 42) apresentou sinais de um nonoanel fenila δ 7,43 (s largo, H-3', H-4' e H-5') e 7,45 (s largo, H-2' e H-6'). O Espectro de RMN ^1H mostrou também sinais de prótons compatíveis com acoplamento de hidrogênios *meta* posicionados a aromático em δ 6,09 (s largo, H-6) e 6,08 (s largo, H-8), próton oxialquilo em δ 5,43 (d, $J = 11,30$ Hz, H-2), e prótons alifáticos em δ 3,10 (dd, $J = 2,5, 17,0$ Hz, H-3) e 2,84 (d, $J = 17,1$ Hz, H-3). Além disso, o espectro de RMN ^1H apresentou sinais para o grupo metoxilo a δ 3,82 (s, 3H), e um próton de hidroxila em δ 12,03 (s, OH). A ligação entre prótons e os carbonos correspondentes foi estabelecido pelo HSQC (Figura 45).

O espectro de RMN ^{13}C -CPD [500 MHz, CDCl_3] (Figura 43) apresentou treze linhas espectrais, das quais 10 correspondem a átomos de carbonos com hibridação sp^2 e três a átomos de carbono com hibridação sp^3 . A análise comparativa entre os espectros de RMN ^{13}C -CPD e DEPT 135° (Figura 44) revelou a presença de um carbono metínico δ 79,45 (C-2), um carbono metilênico δ 43,60 (C-3) e um carbono metílico ligado a átomo de oxigênio, característicos de grupos metoxila em δ 55,92 (O- CH_3). Por subtração dos espectros, constatou-se a presença de cinco carbonos não hydrogenados, dos quais o sinal em δ 196,0 (C=O C-4) foi compatível com uma carbonila de cetona conjugada, enquanto os sinais em δ 168,21 (C-7), 163,01 (C-9) foram inferidos a carbonos não hydrogenados ligados a átomos de oxigênio, como descrito na (Tabela 13). O espectro de RMN ^{13}C mostrou um sinal de carbono ligado à hidroxila em δ 164,36 (C-5), e mais seis de carbono aromático δ 95,36 (C-6), 94,49 (C-8), 103,36 (C-10), 138,58 (C-1'), 126,36 (C-2', C-4' e C-6'), 129,10 (C-3 e C-5).

Um apoio adicional para a estrutura foi obtido a partir de análise dos espectros de HMBC (Figuras 46 a 49), onde a posição da metoxila presentes na estrutura foi verificada e confirmada, sugerindo que o composto tratava-se de uma flavanona substituída com um grupo metoxila e hidroxilo. Mas as evidências para a estrutura atribuída ao composto veio da comparação dos seus dados espectrais com os relatados na literatura.

Através da comparação entre os dados espectroscópicos discutidos anteriormente e os dados registrados na literatura (Atun *et al.*, 2013) chegou-se à conclusão que **CPF-I** tratava-se do composto 5-Hidroxi-7-metoxiflavanona (Figura 38), com fórmula molecular de $\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$, cuja pureza e a massa molecular foram confirmadas por CG/EM (Figuras 39 e 40).



$\text{C}_{16}\text{H}_{14}\text{O}_4$
 270.28
 270.089209
 C 71.10% H 5.22% O 23.68%

Figura 38: Estrutura de **CPF-I** (5-hidroxi-7-Metoxiflavanona)

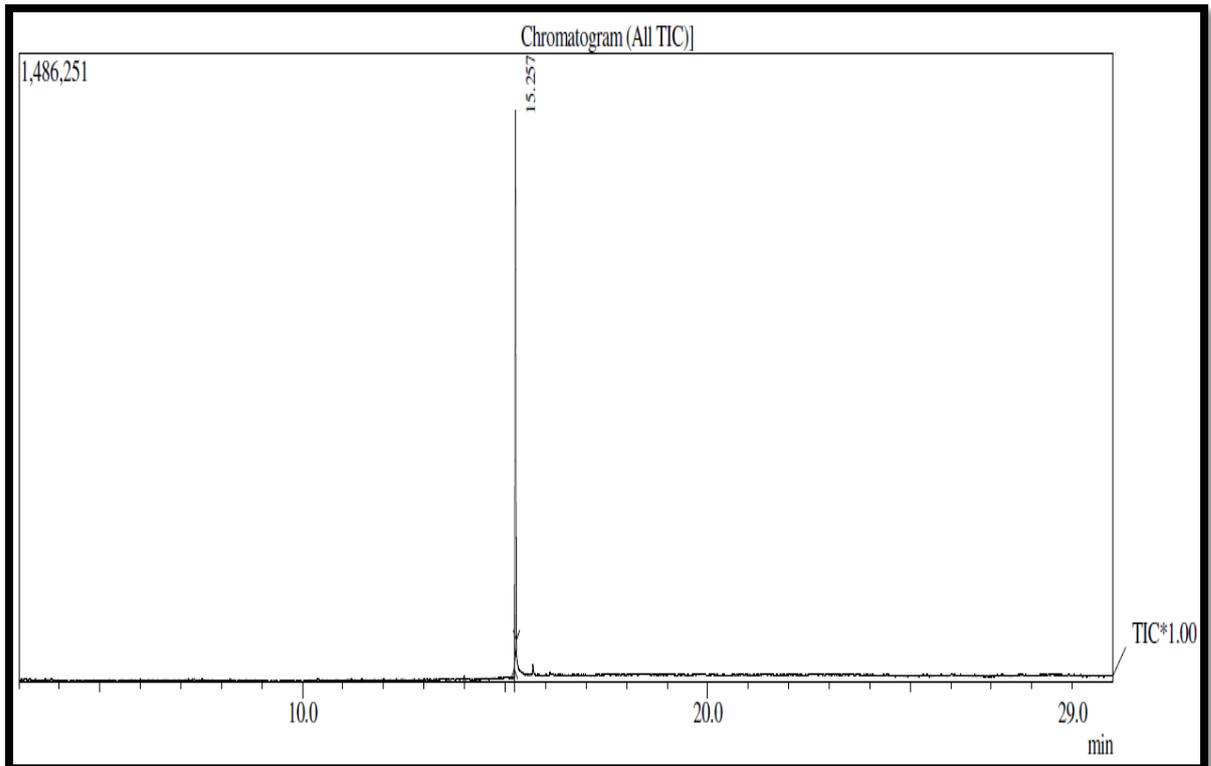


Figura 39: Cromatograma de *CPF-1* puro

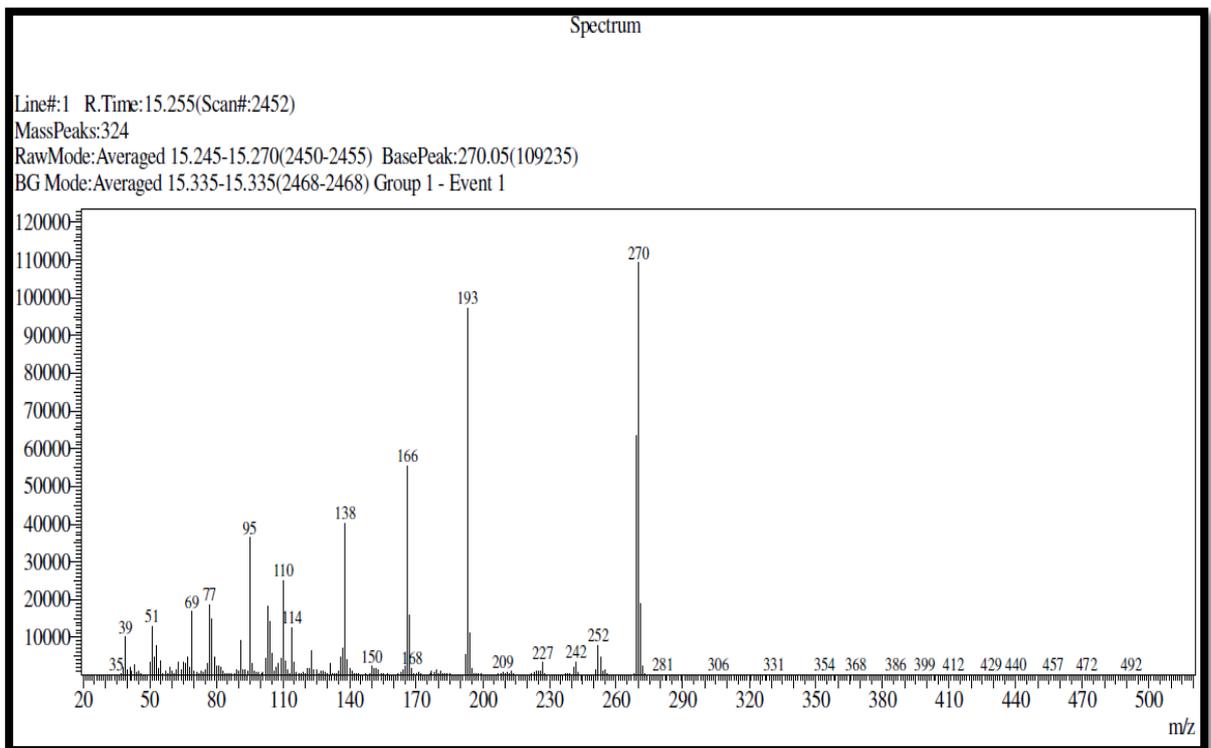


Figura 40: Espectro de massa de *CPF-1*

Tabela 13 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C e ^1H (CDCl_3) de *CPF-1*

	HSQC		HMBC		HSQC *Lit	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
C						
4	196,00	-	2H-3	H-4	195,93	-
7	168,21	-	H-6; H-8	H-3	168,30	-
9	164,36	-	H-3	H-2; H-5	164,30	-
5	163,01	-	Há-9; Hb-9	H-8	163,14	-
1'	138,58	-	H-4; H-2'; H-6'	H-3; H-3'; H-5'	138,54	-
10	103,36	-	-	H-5; H-7	103,30	-
CH						
3'	129,10	7,43	-	-	129,00	7,42 (s)
4'	126,36	7,43	-	-	126,36	7,43 (s)
5'	129,10	7,43	-	-	129,00	7,42 (s)
2'	126,36	7,45	H-3'	H-4; H-4'	126,30	7,43 (s)
6'	126,36	7,45	H-3'	H-4; H-4'	126,30	7,43 (s)
6	95,36	6,09	-	2H-10	95,30	6,04 (s)
8	94,49	6,08	-	2H-10; 2H-14; H-12	94,43	6,04 (s)
2	79,45	5,43	H-3	-	77,45	5,43 (d); 12,0
CH₂						
3	43,60	2,83 (d, $J = 17,1$ Hz); 3,10 (dd, $J = 17, 2,5$ Hz)			43,50	3,08 (d); 12,0
CH₃						
	55,92	3,82			55,85	3,81 s (3H)

Deslocamentos químicos (δ_{C} e δ_{H}) em ppm e constante de acoplamento (J) em (Hz)*Dados de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3), (Atun *et al.*, 2013).

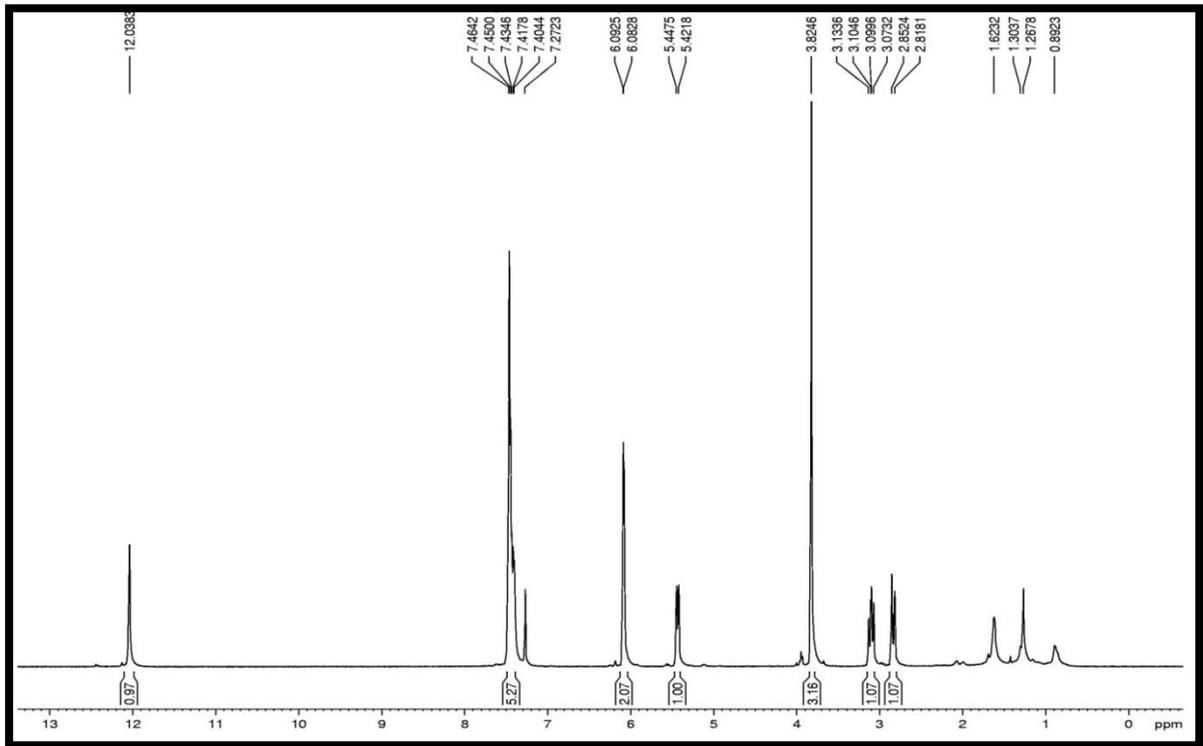


Figura 41 - Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de *CPF-1*

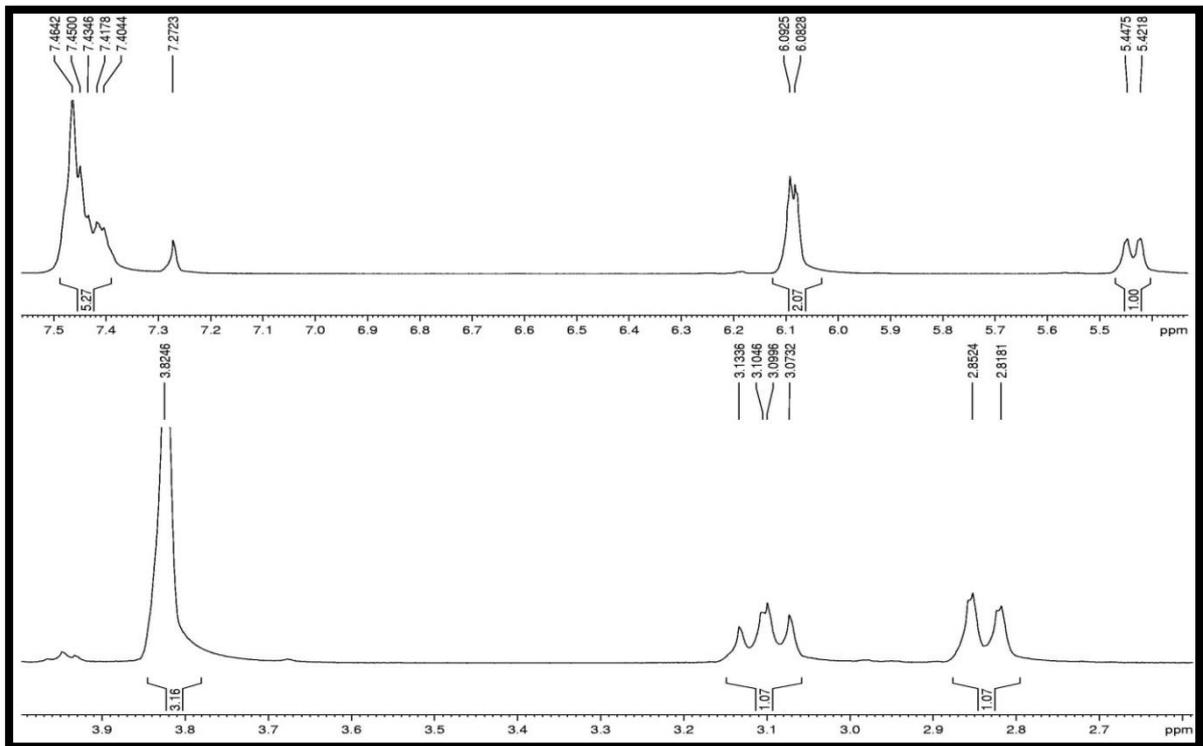


Figura 42 - Expansão do espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de *CPF-1*

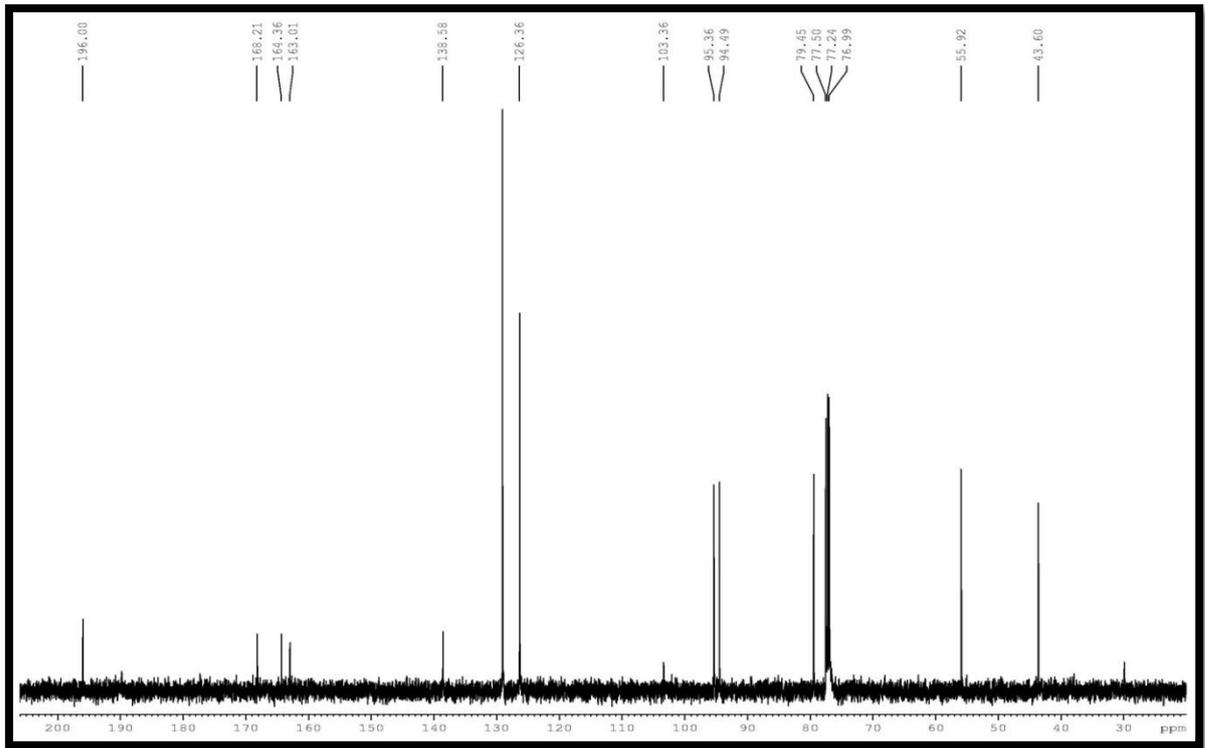


Figura 43 - Espectros de RMN ^{13}C -CPD [125 MHz, CDCl_3] de *CPF-1*

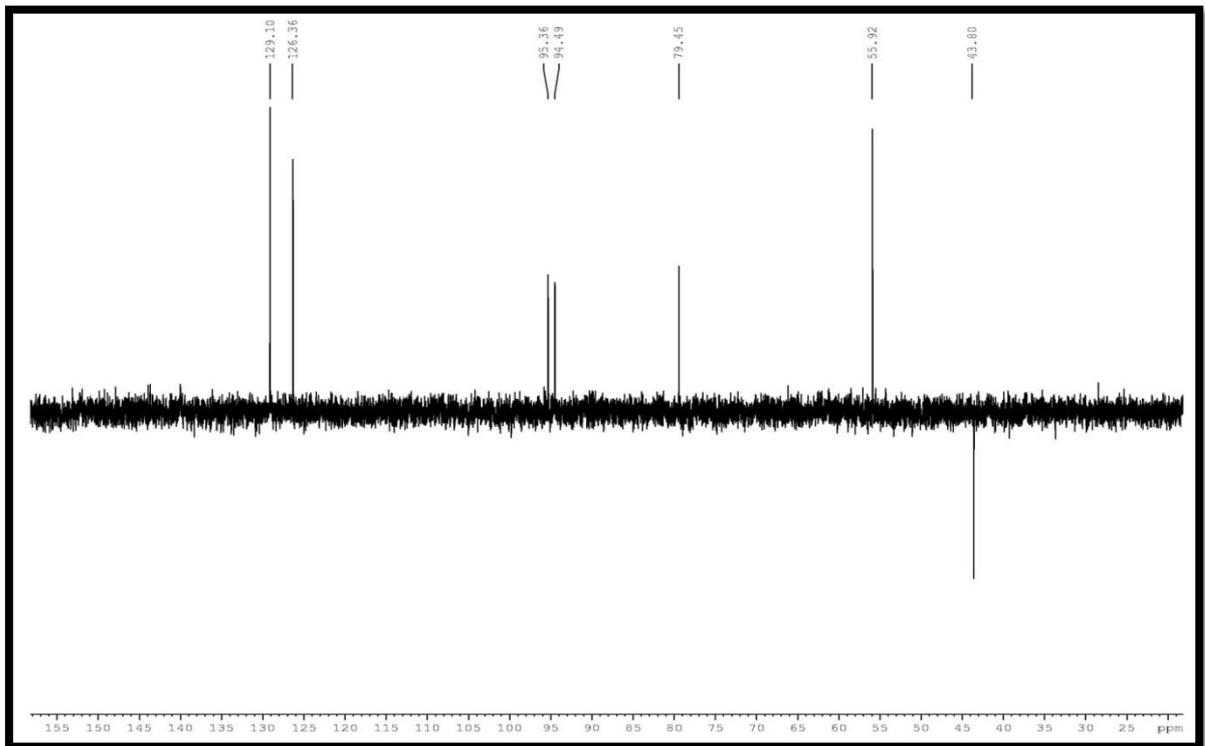


Figura 44 - Espectro de RMN ^{13}C -DEPT 135° [125 MHz, CDCl_3] de *CPF-1*

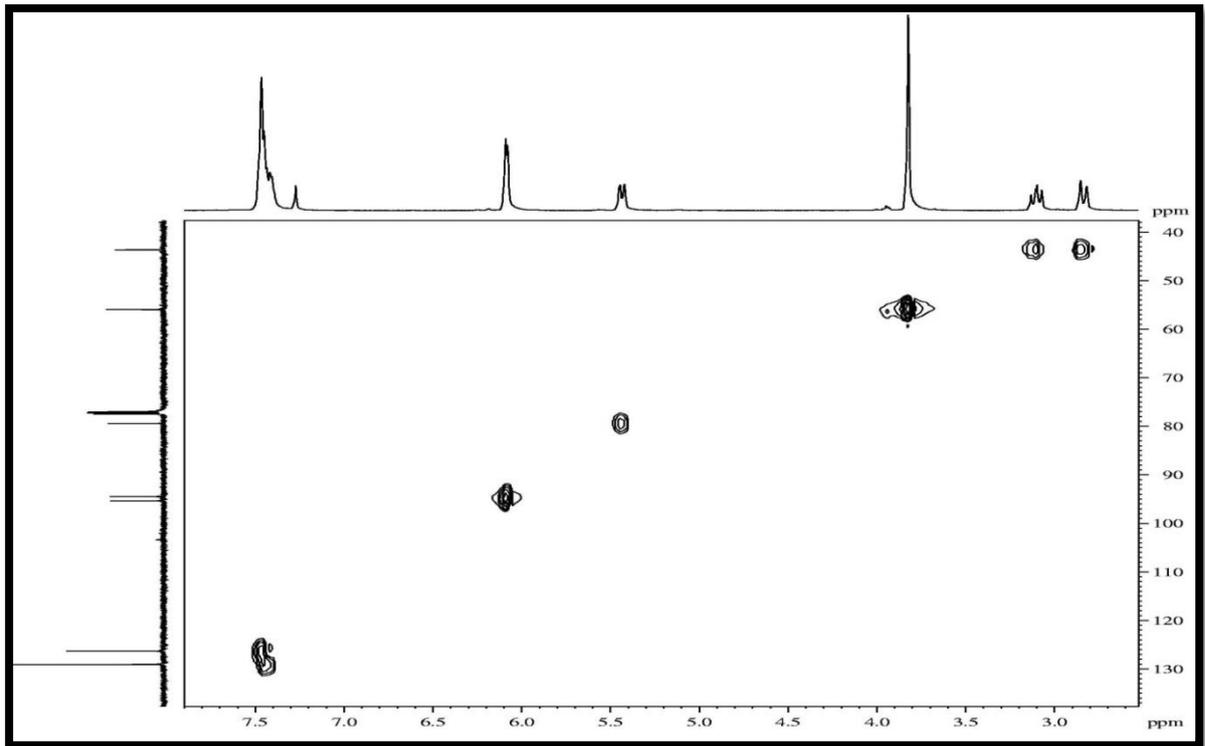


Figura 45 - Espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HSQC [500 MHz, CDCl_3] de *CPF-1*

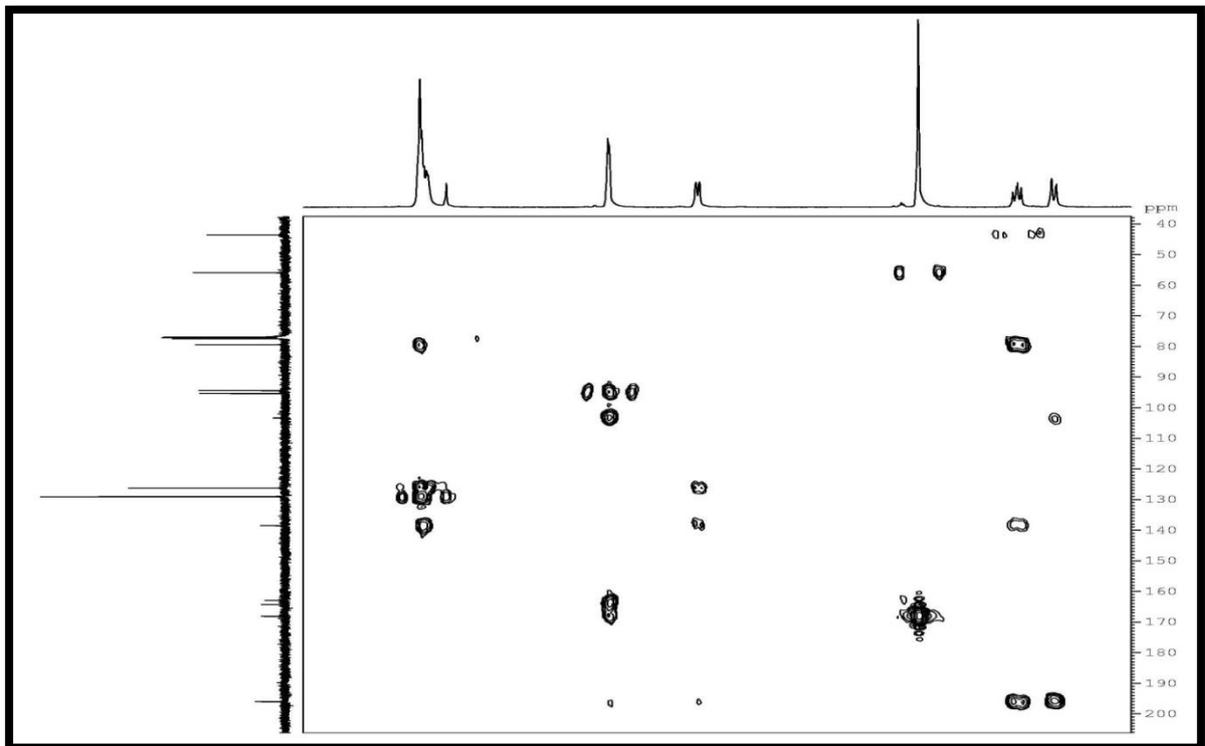


Figura 46 - Espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC [500 MHz, CDCl_3] de *CPF-1*

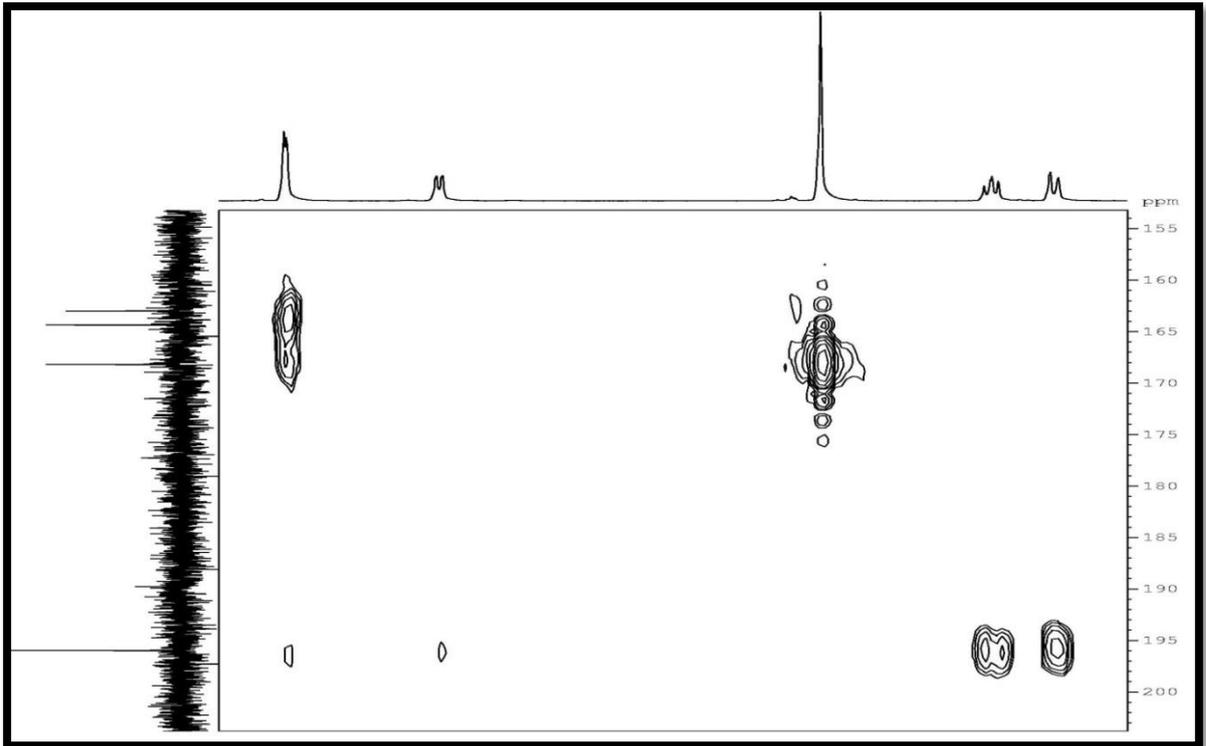


Figura 47 – Expansão 1 do espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC [500 MHz, CDCl_3] de *CPF-1*

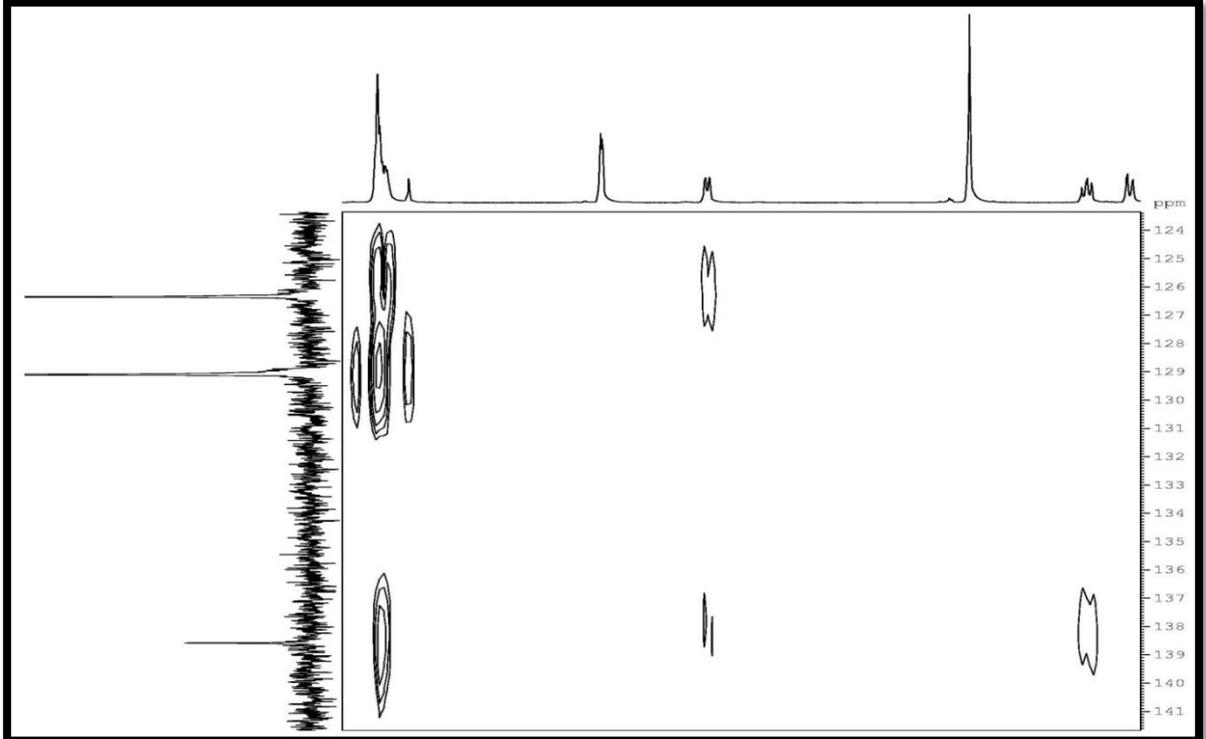


Figura 48 – Expansão 2 do espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC [500 MHz, CDCl_3] de *CPF-1*

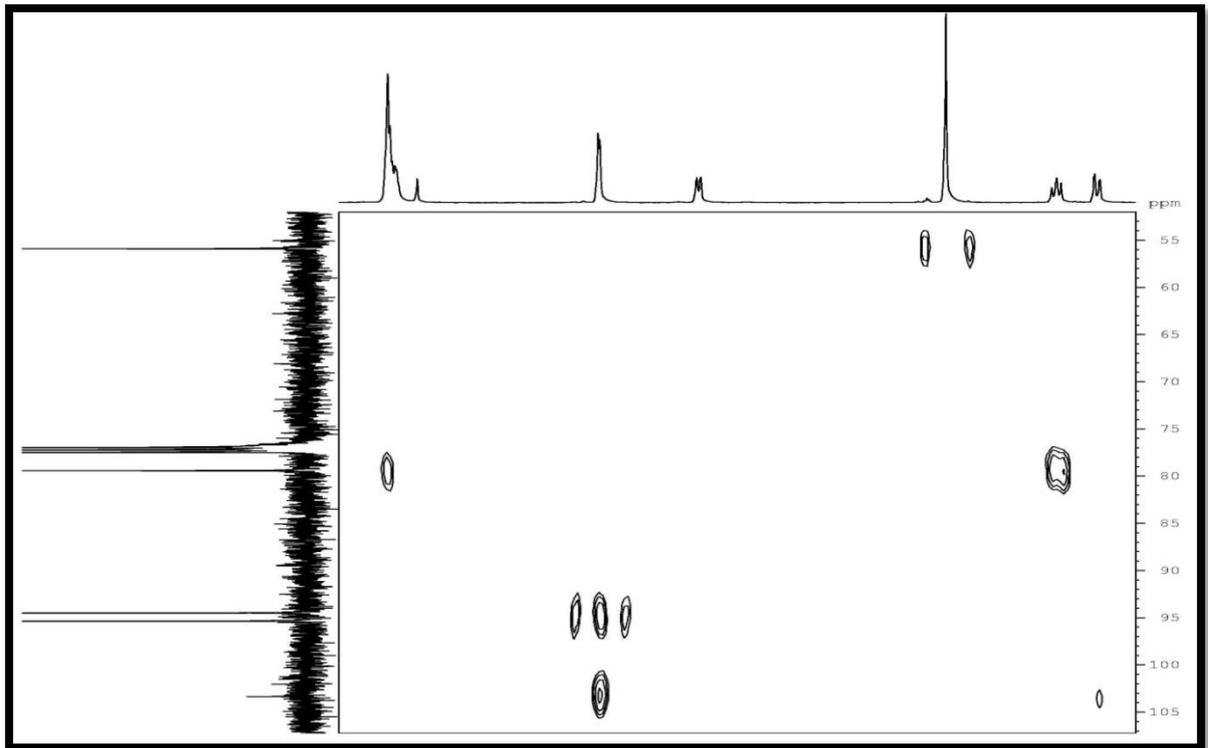


Figura 49 – Expansão 3 do espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC [500 MHz, CDCl_3] de **CPF-1**

3.5.2 – Determinação estrutural de *CPF-2*

A substância identificada como *CPF-2* (26,9 mg) também foi isolada da fração diclorometano, resultado da filtração cromatográfica do extrato hidroalcoólico das folhas *V. dardani*, sob forma de um sólido branco cristalino, com ponto de fusão de 119 °C (Figura 50).

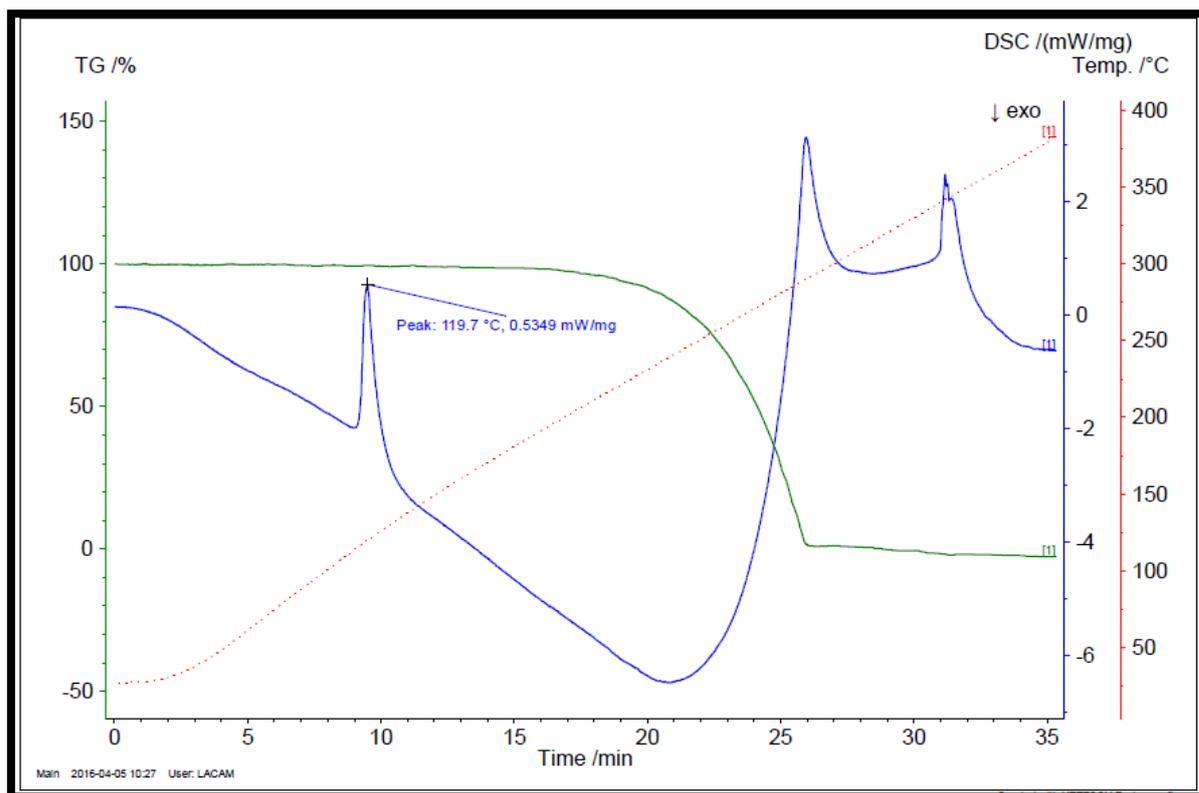


Figura 50 – Análise de TG/DSC (ponto de fusão) determinado para *CPF-2*

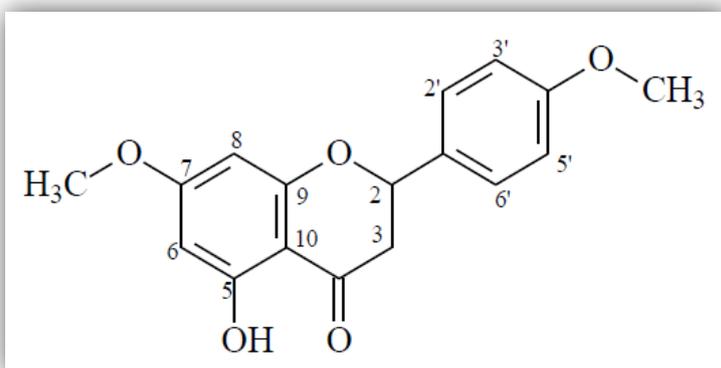
Os espectros de RMN ^{13}C -CPD e ^1H (Figuras 54 e 55) apresentaram deslocamentos químicos próximos aos encontrados para o composto *CPF-1*, previamente discutido, mostrando semelhanças entre as estruturas. A presença de um sinal a mais correspondente a um grupo metoxila observado nos espectros de RMN ^1H e ^{13}C , constituiu a principal diferença entre os compostos designados por *CPF-2* e *CPF-1*.

O espectro de RMN ^{13}C 300 MHz, CDCl_3 (Figura 56) mostrou sinais de quinze linhas espectrais, e semelhantes aos deslocamentos observados para o composto *CPF-1*, onze também estão associadas a átomos de carbono com hibridação sp^2 revelando, portanto a natureza flavonoídica do composto, e dois encontram-se na região de grupos metoxilas. Após análise comparativa entre os espectros RMN ^{13}C -CPD e DEPT 135° (Figura 57) verificou-se a presença de um carbono metínico e sete carbonos não-hidrogenados todos com hibridação sp^2 .

Destes, o sinal em δ 196,19 (C=O, C-4) foi compatível com uma carbonila de cetona conjugada, enquanto os sinais em δ 168,13 (C-7); 164,32 (C-5); 163,08 (C-9); 160,23 (C-4'); foram associados a carbonos sp^2 ligados a átomo de oxigênio, conforme os dados apresentados na (Tabela 14).

A análise dos sinais do espectro de RMN ^{13}C (Figura 56) de **CPF-2** levou a uma proposta estrutural para esta flavanona. Os sinais de δ 79,18 e 43,36 foram atribuídos aos carbonos (C-2 e C-3, respectivamente) do anel heterocíclico. O espectro RMN 1D-DEPT confirmou a multiplicidade do carbono C-3 como sendo um grupo metilênico. Os dois sinais em δ 55,84 e δ 55,54 foram caracterizadas como duas metoxilas. A análise do conjunto de sinais nos espectros de HSQC e HMBC (Figuras 58 e 59) confirmou na molécula a presença de dois anéis aromáticos e um anel central que corresponde a uma estrutura C6-C3-C6', Característico de um flavanona. As atribuições dos átomos δ 94,4 (C-6), 95,26 (C-8), 163,08 (C-9) e 103,32 (C-10) foram efetuadas com base nos espectros de HMBC. A localização dos grupos metoxilos na molécula foi determinada mediante HMBC (Figura 59), destacando as correlações próton-carbono metoxílico δ 3,83 e δ 7,43 (H-3', H-5'), com um carbono quaternário δ 160,23 (C-4'), prótons δ 6,96 (H-2', H-6') com o carbono δ 130,59 (C-1'); e observado também outra correlação entre o próton δ 3,80 com carbono δ 168,13 (C-7).

Com base nos dados apresentados e comparação com os dados registrados (Erika *et al.*, 2008), chegou-se à conclusão que **CPF-2** tratava-se do composto 5-Hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona (Figura 51), com fórmula molecular $C_{17}H_{16}O_5$, cuja pureza e a massa molecular foram confirmadas também por CG/EM (Figuras 52 e 53). As substâncias **CPF-1** e **CPF-2** são metabólitos secundários comuns encontrados e isolados nos gêneros da família Boraginaceae, mas foram isolados e caracterizados pela primeira vez no gênero *Varronia dardani*.



$C_{17}H_{16}O_5$
 300.31
 300.099774
 C 67.99% H 5.37% O 26.64%

Figura 51: Estrutura de **CPF-2** (5-hidroxi-7,4'-dimetoxiflavanona)

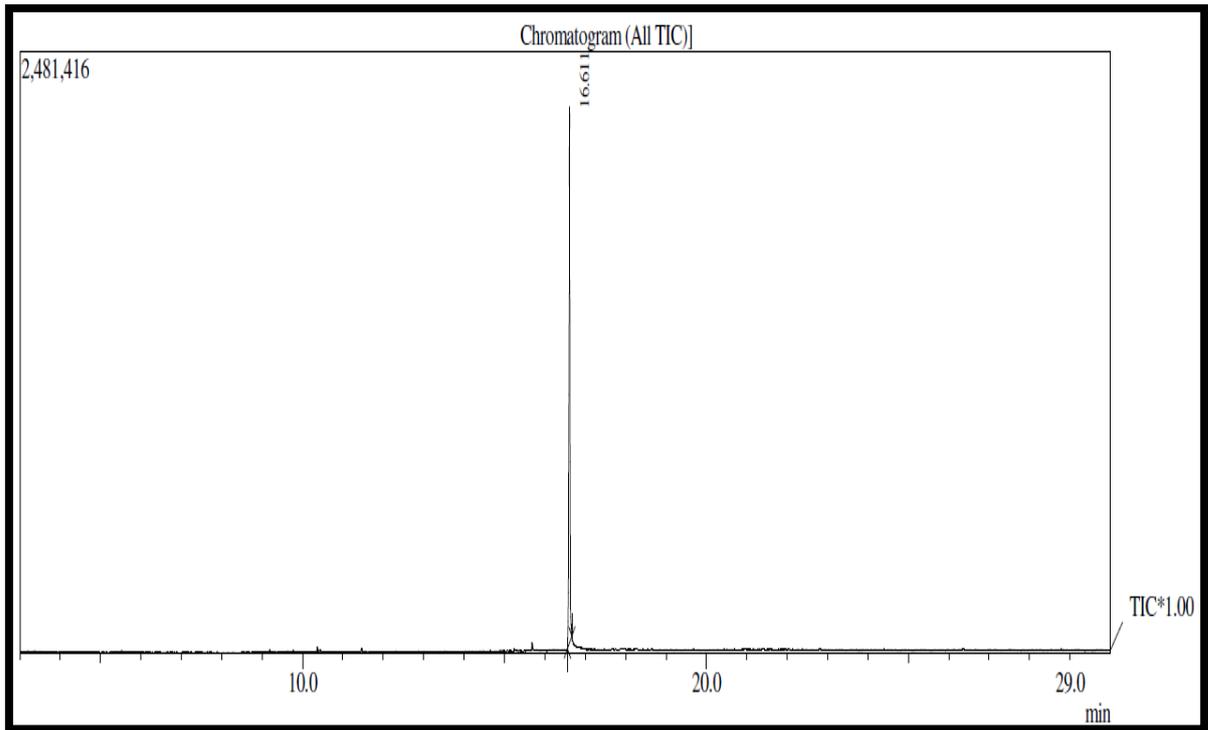


Figura 52: Cromatograma de *CPF-2* puro

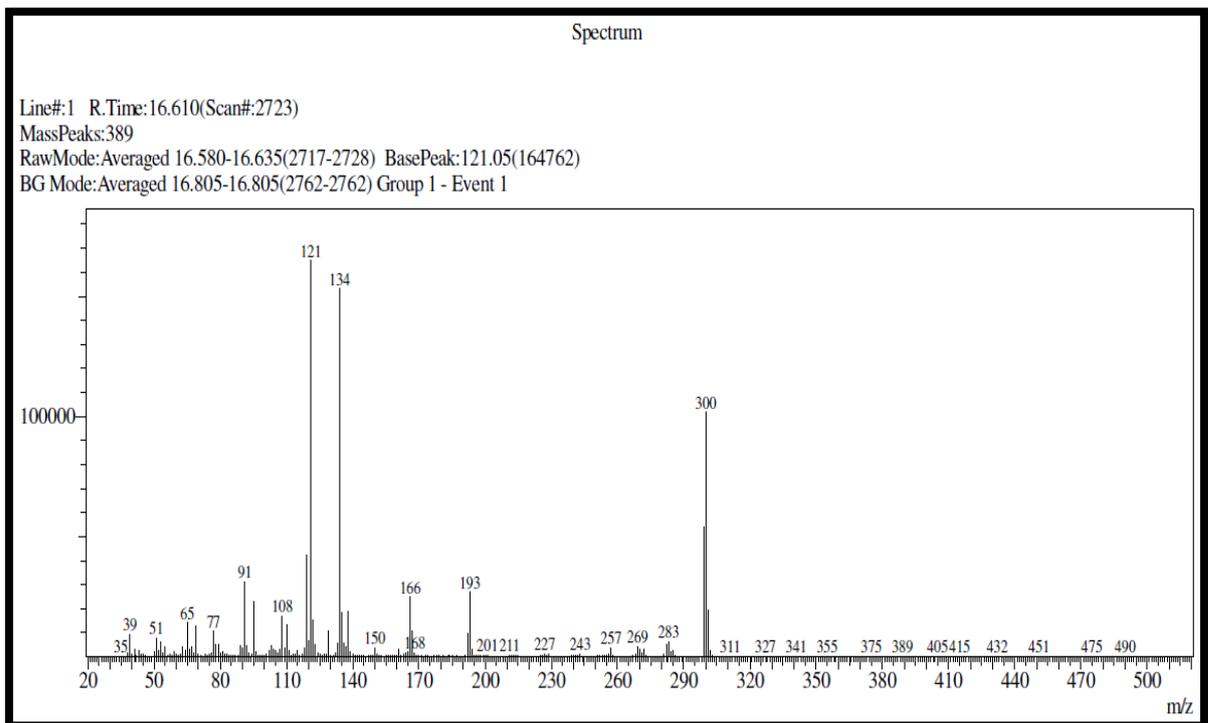


Figura 53: Espectro de massa de *CPF-2*

Tabela 14 - Deslocamentos químicos (δ) de RMN ^{13}C e ^1H (CDCl_3) de *CPF-2*

	HSQC		HMBC		HSQC * Lit	
	δ_{C}	δ_{H}	$^2J_{\text{CH}}$	$^3J_{\text{CH}}$	δ_{C}	δ_{H}
C						
4	196,19	-	2H-3	H-4	196,21	-
7	168,13	-	H-6; H-8	3H-	168,10	-
5	164,32	-	H-3	H-2; H-5	164,28	-
9	163,08	-	Há-9; Hb-9	H-8	163,05	-
4'	160,23	-	H-4; H-2'; H-6'	H-3; H-3'; H-5'	160,19	-
1'	130,59	-	-	H-5; H-7	130,52	-
10	103,32	-	-	-	103,05	-
CH						
2	79,18	7,45	H-3'	H-4; H-4'	79,16	3,11
2'	114,41	6,96 (d, $J = 8,61$ Hz)	-	-	-	-
3'	127,91	7,43 (d, $J = 8,58$ Hz)	-	-	127,90	7,39
5'	127,91	7,43 (d, $J = 8,58$ Hz)	-	-	-	-
6	94,40	6,08	H-3'	H-4; H-4'	94,37	6,05
6'	114,41	6,96 (d, $J = 8,61$ Hz)	-	-	114,37	6,96
8	95,26	6,08	-	-	95,23	6,08
CH₂						
3	43,36	2,83 (dd); 3,10 (dd)	-	-	46,30	2,79
CH₃						
OCH₃'	55,84	3,83 (s)			55,83	3,81
OCH₃	55,36	3,80 (s)			55,53	3,84

Deslocamentos químicos (δ_{C} e δ_{H}) em ppm e constante de acoplamento (J) em (HZ)*Dados de RMN ^1H e ^{13}C (CDCl_3), (Erika *et al.*, 2008).

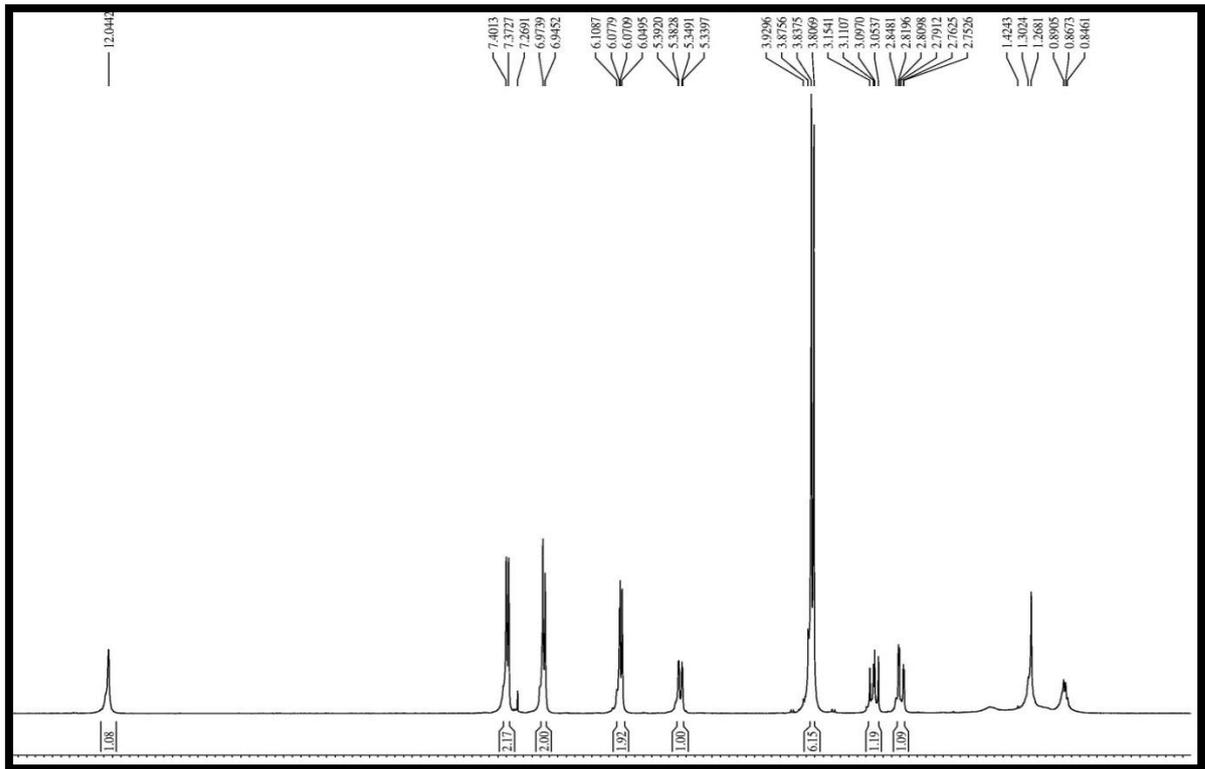


Figura 54 - Espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de *CPF-2*

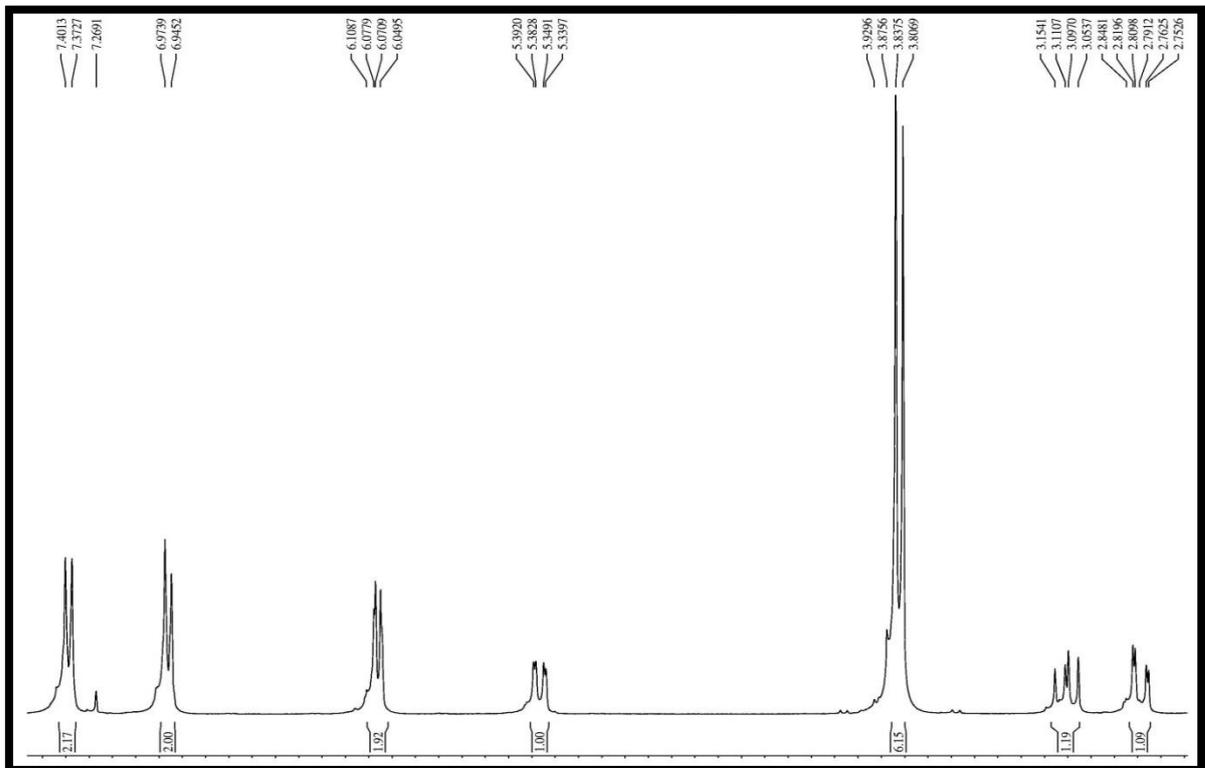


Figura 55 - Expansão do espectro de RMN ^1H [500 MHz, CDCl_3] de *CPF-2*

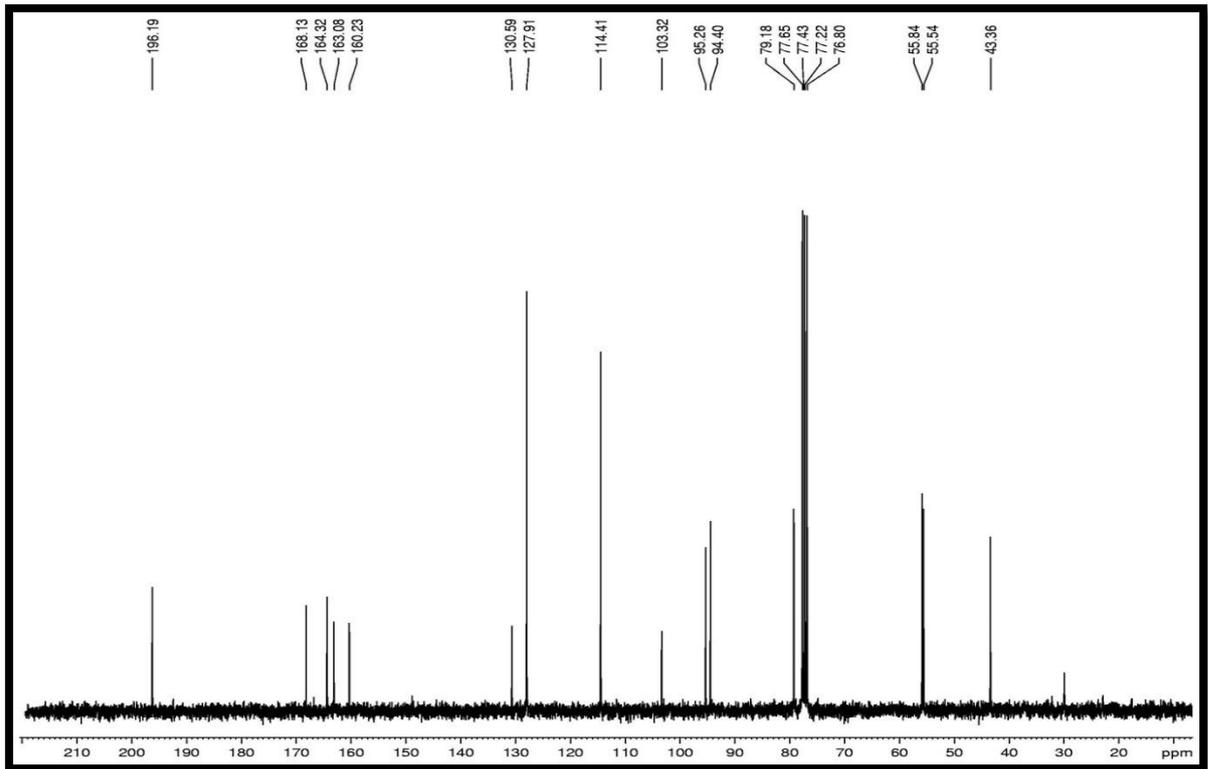


Figura 56 - Espectros de RMN ¹³C-CPD [125 MHz, CDCl₃] de CPF-2

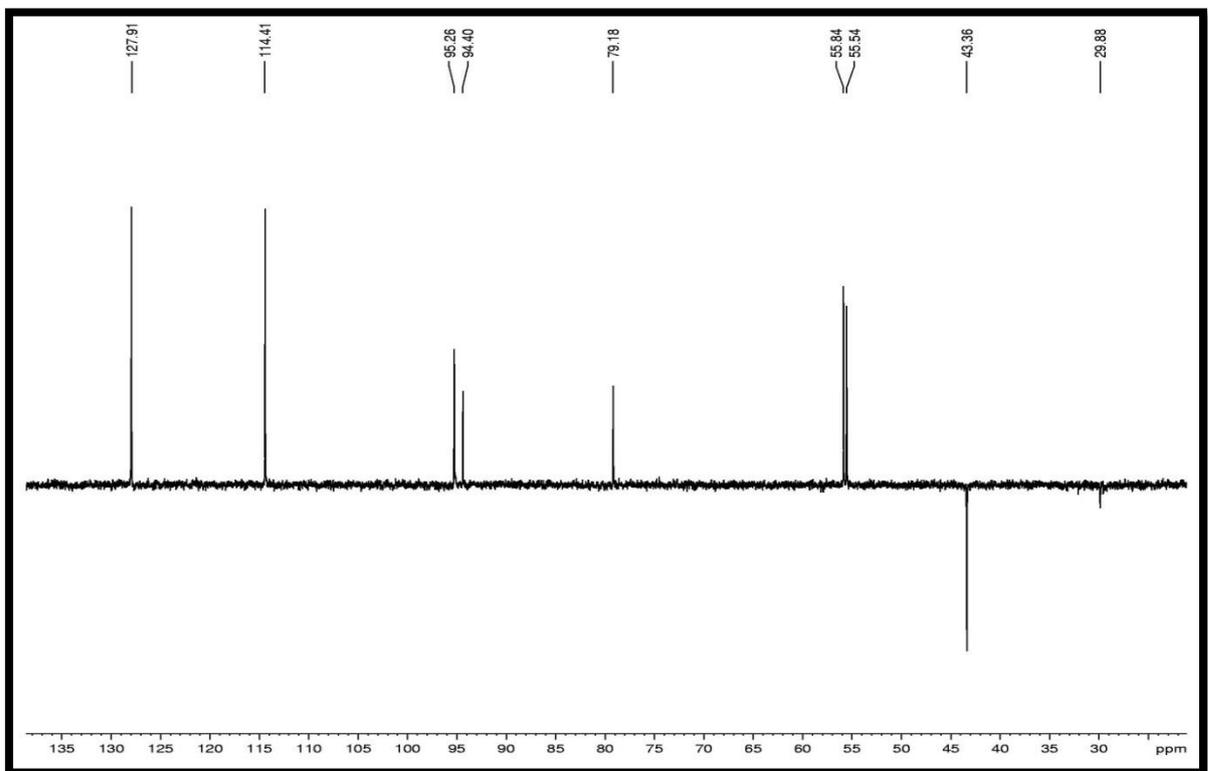


Figura 57 - Espectro de RMN ¹³C-DEPT 135° [125 MHz, CDCl₃] de CPF-2

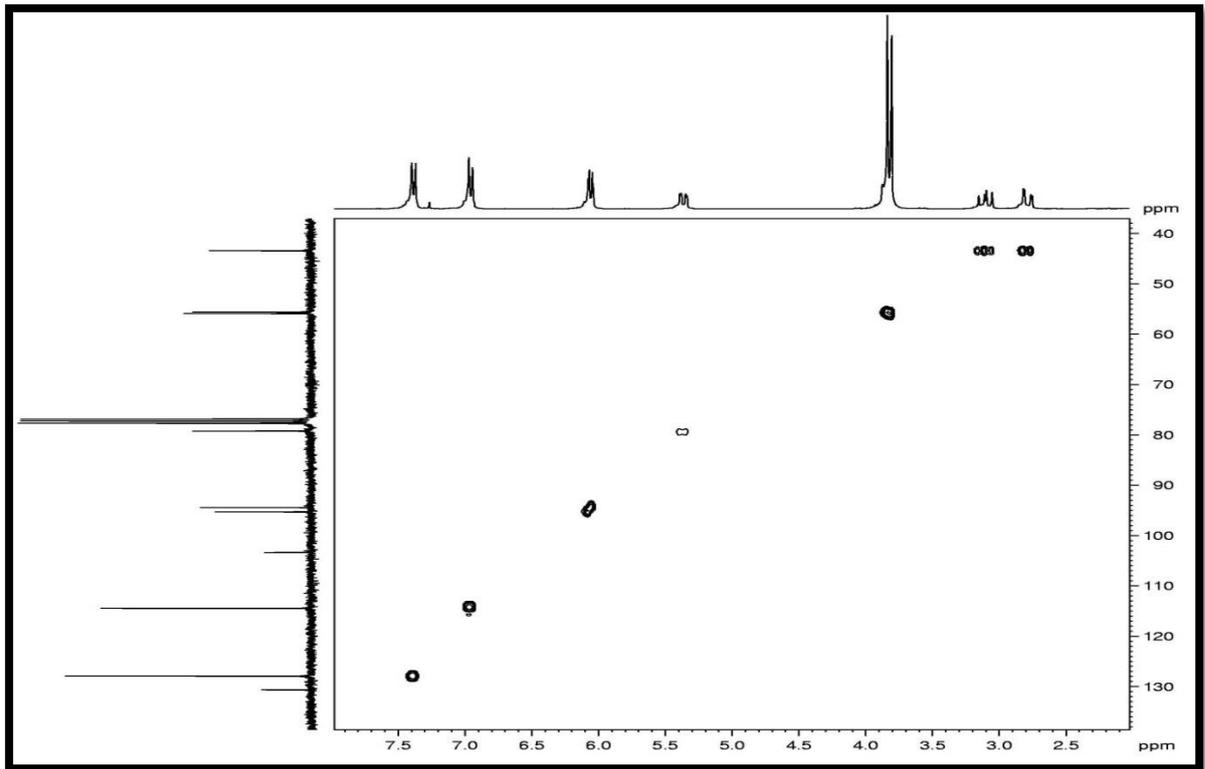


Figura 58 - Espectro de RMN ^1H , ^{13}C – HSQC [500 MHz, CDCl_3] de CPF-2

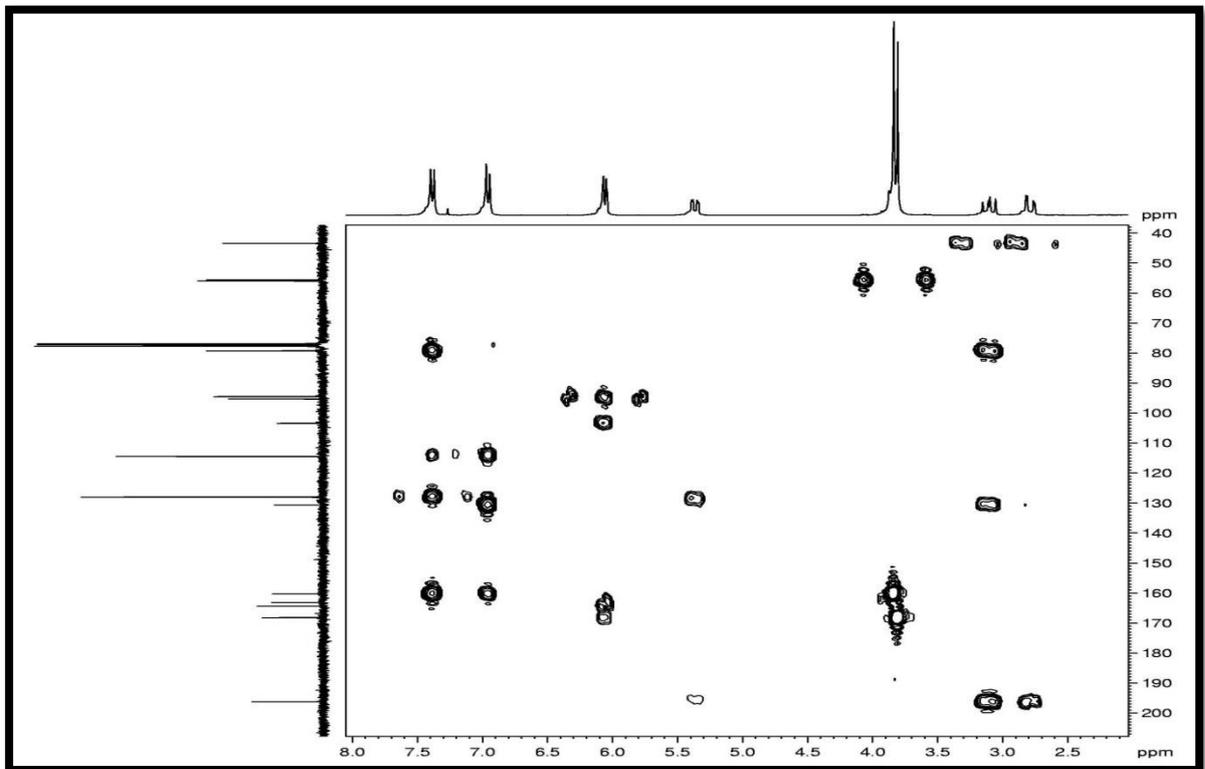


Figura 59 – Espectro do espectro de RMN ^1H , ^{13}C - HMBC [500 MHz, CDCl_3] de CPF-2

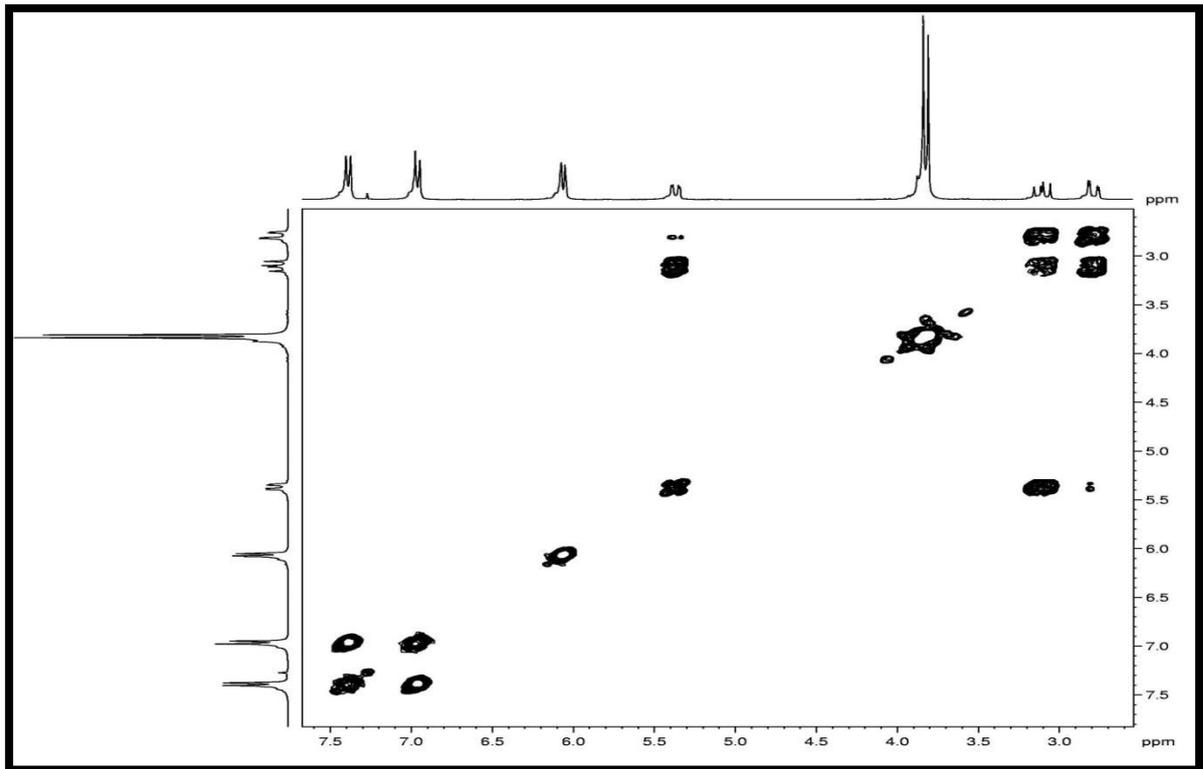


Figura 60 - Espectro de RMN ^1H , ^1H – COSY [500 MHz, CDCl_3] de *CPF-2*

CAPÍTULO 4

Conclusões

CONCLUSÕES

Este trabalho resultou no isolamento, purificação e caracterização de quatro substâncias, presentes no extrato diclorometano da raiz e no extrato hidroalcoólico das folhas da *Varronia dardani*.

Do extrato diclorometano foram isoladas duas naftoquinonas: Cordiaquinona A e Cordiaquinona B.

Do extrato hidroalcoólico das folhas foram isolados dois flavonóides: 5-Hidroxi-7-methoxiflavanona e 5-Hidroxi-7,4'-dimethoxiflavanona

O estudo do óleo essencial resultou em 30 substâncias, onde foram identificados e quantificados 25 constituintes químicos, totalizando um percentual acima de 83% da composição química do óleo.

Ainda referente ao estudo do óleo essencial, o potencial antimicrobiano foi significativo aos dois métodos testados neste trabalho, frente a fungos filamentosos e atividades antifúngica e antibacteriana quanto a leveduras e bactérias de interesse médico veterinário do óleo essencial.

As substâncias isoladas, apesar de serem metabólitos secundários comuns encontrados na literatura, foram isolados pela primeira vez no gênero *Varronia dardani*, bem como o estudo do potencial antifúngico e antibacteriana quanto a leveduras e bactérias de interesse médico veterinário do óleo essencial.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRANTES, H. F. L.; AGRA, M. F. Estudo etnomedicinal das Boraginaceae na caatinga paraibana, Brasil. *Revista Brasileira de Farmácia*, 85 (1), 7-12, 2004.

ADAMS, D. Fungal cell wall chitinases and glucanases. *Microbiology, Reading*, v. 150, n. 7, p. 2029-2035, 2004.

AGUILAR-USCANGA, B.; FRANÇOIS, J. M. A study of the yeast cell wall composition and structure in response to growth conditions and mode cultivation. *Letters in applied microbiology*, v. 37, n. 3, p. 268, 2003.

ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; SILVEIRA, E. R.; UCHÔA, D. E. DE A.; LEMOS, T. L.G.; SOUZA, E. B.; SANTIAGO, G. M. P.; PESSOA, O. D. L. Chemical composition and larvicidal of the essential oils from *Eupatorium betonicaeforma* (D.C.) Baker (Asteraceae). *J. Agric. Food Chem.*, v. 52, p. 6708-6711, 2004.

ANDRADE-LIMA, D. 1981. The caatingas dominium. *Revista Brasileira de Botânica* 4: 149-163.

ANDRADE-LIMA, D. 1989. Plantas das caatingas. Academia Brasileira de Ciências, Rio de Janeiro, RJ. 243p.

ANTUNES, M.D.C.; CAVACOB, A.; The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour Fragrance Journal*. v.25, p.351-366, 2010.

ATUN, S.; ARIANINGRUM, R.; SULISTYOWATI, E.; AZNAM, N. Isolation and antimutagenic activity of some flavanone compounds from *kaempferia rotunda*. *International journal of chemical and analytical science* 4. (2013) 3-8.

BARROSO, I. C. E. ; OLIVEIRA, F.; BRANCO, L. H. Z.; KATO, E. T. M.; DIAS, T. G. O Gênero *Cordia* L.: botânica, química e farmacologia. *Revista Lecta*, v.20, n.1, 15-34, 2002.

BARREIRO, J. E.; BOLZANI, V. S. Biodiversidade: Fonte Potencial para a Descoberta de Fármacos, *Química Nova*, V. 26, n. 3, p. 679-688, 2009.

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

BIEBER, L. W.; MESSANA, I.; LINS, S. C. N.; FILHO, A. A. S.; CHIAPPETA, A. A.; MÉLLO, J. F. Meroterpenoid naphthoquinones from *Cordia corymbosa*. **Phytochemistry**, v. 29, n. 6, p. 1955-1959, 1990.

BIEBER, L. W.; KREBS, H. C.; SCHAFER, W. Further meroterpenoid naphthoquinones from *Cordia corymbosa*. **Phytochemistry**, v. 35, n. 4, p. 1027-1028, 1994.

BONA, T. D. M. M. *et al.* Óleo essencial de orégano, alecrim, canela e extrato de pimenta no controle de Salmonella, Eimeria e Clostridium em frangos de corte. Pesquisa Veterinária Brasileira, Rio de Janeiro, v. 32, n. 5, p. 411-418, 2012.

CACCIONI, D.R.L.; GUIZZARDI, M. Inhibition of germination and growth of fruit and vegetable postharvest pathogenic fungi by essential oil components. Journal of Essential Oil Research. Camberra. v.6, p.173-9, 1994.

CARVALHO JR., P.M. DE; RODRIGUES, R.F.O.; SAWAYA, A.C.H.F.; MARQUES, M.O.M.; SHIMIZU, M.T.; Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenaceae* D.C.; Journal of Ethnopharmacology, 95, p.297- 301, 2004.

CARSON CF, MEE BJ, RILEY TV 2002. Mechanism of action of Melaleuca alternifolia (tea tree) oil on Staphylococcus aureus determined by time-kill, lysis, leakage and salt tolerance assays and electron microscopy. Antimicrob Agents Chemother 46: 1914-1920.

COMBRINCK, S.; REGNIER, T.; KAMATOU, G.P.P. In vitro activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. Industrial Crops and Products. v.33, p.344-349, 2011.

COSTA, A.R.T.; AMARAL, M.F.Z.J.; MARTINS, P.M.; PAULA, J.A.M.; FIUZA, T.S.; RESVENZOL, L.M.F.; PAULA, J.R.; BARA, M.T.F. Ação do óleo essencial de *Syzygium aromaticum* (L.) Merr. & L.M. Perry sobre as hifas de alguns fungos fitopatogênicos. Revista Brasileira de Plantas Mediciniais. v.13, n.2, p. 240- 245, 2011.

COX, G.; WRIGHT, G. D. Intrinsic antibiotic resistance: mechanisms, origins, challenges and solutions. Int J Med Microbiol., v. 303, n. 6-7, p.287-292, Aug. 2013.

DAN, Y.; LIU, H.Y.; GAO, W.W.; CHEN, S.L. Activities of essential oils from *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* against five phytopathogens. Crop Protection. v.29, p.295-299, 2010.

DECOSTERD, L.A.; PARSONS, I.C.; GUSTAFSON, K.R.; CARDELINA II, J.H.; MCMAHON, J.B.; BOYD, M.R. Structure, absolute stereochemistry and synthesis of conocurvone, a potent, novel HIV-inhibitory naphthoquinone trimer from a *Conospermum* sp. *J. Am. Chem. Soc.*, v.115, p. 6673, 1993.

DINIZ, J. C.; VIANA, F. A.; SILVEIRA, E. R.; OLIVEIRA, O. F.; PESSOA, O. D. L. Chemical Composition of the Leaf Essential Oil of *Cordia leucocephala* Moric from Northeast of Brazil, **Journal of Essential Oil Research**, , 20, 495-496, 2008.

DINIZ, J. C.; VIANA, F. A.; OLIVEIRA, O. F.; MACIEL, M. A. M.; TORRES, M. C. M.; BRÁZ-FILHO, R.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O.D.L. ^1H e ^{13}C NMR assignments for two new cordioquinones from roots of *Cordia leucocephala*, **Magn. Reson. Chem**, V. 47, p. 190-193; 2009.

DI STASI, L. C. *Plantas medicinais: arte e ciência – Um guia de estudo interdisciplinar*. São Paulo: Editora da Universidade Estadual Paulista, 1996.

DORMAN H.J.D, DEANS S.G (2000). Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *Journal of Applied Microbiology* 88:308-316

DOS SANTOS, G.R. *et al.* Efeito de óleos essenciais de plantas medicinais sobre a helmintosporiose do capim Tanzânia. *Revista Ciência Agronômica*, v.44, n.3, p.587-593, 2013.

FARMACOGNOSIA: da planta ao medicamento / organizado por Cláudia Maria de Oliveira Simões... (*et al.*). – 5. Ed. Rev. ampl. – Porto Alegre / Florianópolis: Editora da UFRGS/ Editora da UFSC, 2003.

ERIKA, A., PLAZAS, G., LUIS, E., CUCA, S., Wilman, A., DELGADO, A. (2008). Flavonoides aislados de las inflorescencias de *Piper hispidum* Kunth (Piperaceae) y derivados acetilados. *Revista Colombiana de Química*, 37(2), 135-144.

FENNEL CW, Lindsey KL, Mc Gaw LJ, Sparg SG, Stafford GI, Elgorashi EE, Grace OM, Van Staden J 2004. Review: Assessing African medicinal plants for efficacy and safety: Pharmacological screening and toxicology. *J. Ethnopharmacol* 94: 205-217.

FREITAS, H. P. S de. Estudo químico e farmacológico de *Cordia polycephala* (Lam.) I. M. Johnston (Boraginaceae). 2010. 167p. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Química, Departamento de Química Orgânica E Inorgânica, Universidade Federal Do Ceará, Fortaleza, 2010.

GASPARETTO, N. D. *et al.*. Prevalência das doenças de pele não neoplásicas em cães no município de Cuiabá, Mato Grosso. *Pesquisa Veterinária Brasileira*. 33(3):359-362, 2013.

GILLES, M.; ZHAO, J.; AN, M.; AGBOOLA, S. Chemical composition and antimicrobial properties of essential oils of three Australian Eucalyptus species. *Food Chemistry*. v.119, p.731-737, 2010.

GUZZO, R. N.; MACHADO, L.; SANTOS dos, R.B; LACERDA Jr., V.; GRECO, S.J. ; COLE, E.R. Extração e estudo da atividade biológica do óleo essencial de *Cordia verbenacea* (erva-baleeira). In: 33a Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 2010, Águas de Lindóia, 2010.

HERNANDEZ. T.; CANALES. M.; TERAN. B.; AVILA. O.; DURAN. A.; GARCIA. A.M.; HERNANDEZ. H.; ANGELES-LOPEZ. O.; FERNANDEZ-ARAIZA. M.; AVILA. G. Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curassavica* (Boraginaceae). *Journal Ethnopharmacol*. v.111, p.137-41, 2007.

HUSSAIN, A.; ANWAR, F.; NIGAM, P.S.; ASHRAF, M.; GILANI, A.H. Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v.90, p.1827-1836, 2010.

IOSET, J. R.; MARSTON. A.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Antifungal and larvicidal meroterpenoid naphthoquinones and a naphthoxirene from the roots of *Cordia linnaei*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 5, p. 729-734, 1998.

IOSET, J. R.; MARSTON, A.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Antifungal and larvicidal cordiaquinones from the roots of *Cordia curassavica*. **Phytochemistry**, v. 53, p. 613-617, 2000.

ITOIGAWA, M.; ITO, C.; TAN, H.T.; OKUDA, M.; TOKUDA, H.; NISHINO, H.; FURUKAWA, H. Cancer chemopreventive activity of naphoquinones and their analogs from *Avicennia* plants. *Cancer Letters*, v. 174, n.2, p.135-139,2001.

KALEMBA, D. & KUNICKA, A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Currente Medicinal Chemistry* 10, 813-829.

LEITE, K. G. **Abordagem taxonômica da família Boraginacea Juss.** Na Ilha Grande, Angra dos Reis – RJ. p. 1-21. Disponível em: sisweb.castelobranco.br/pesquisa/v.15/PDFs/06.Pdf. Acesso em: 02 fev. 2010.

MARINHO-FILHO, J. D. B.; BEZERRA, D. P.; ARAÚJO, A. J.; MONTENEGRO, R. C.; PESSOA, C.; DINIZ, J. C.; VIANA, F. A.; PESSOA, O. D. L.; SILVEIRA, E. R.; MORAES, M. O.; COSTA-LOTUFO, L. V. Oxidative stress induction by (+)-cordiaquinone J triggers both mitochondria-dependent apoptosis and necrosis in leukemia cells. **Chem. Biol. Interact.**, v. 183, p. 369-379, 2010.

MARTINS, A. F. *et al.* High endemic levels of multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii* among hospitals in Southern Brazil. *Am J Infect Control.*, v. 40, n. 2, p. 108-12, Março 2012.

MATOS, F.J.A. Introdução à fitoquímica experimental. 2. ed. Fortaleza: UFC, 1997. MELO, J. I. M. ; PAULINO, R. C. ; OLIVEIRA, R. C. . Flora do Rio Grande do Norte: Boraginaceae. *Sitentibus serie Ciencias Biologicas (SCB)*, v. 13, p. 01-40, 2013.

MATOS, F.J.A. *Introdução à fitoquímica experimental*. 2 ed. Fortaleza: Imprensa Universitária da UFC, 1997.

MELO, J.I.M. , ANDRADE W.M. Boraginaceae *s.l.* A.Juss. em uma área de Caatinga da ESEC Raso da Catarina, BA, Brasil. **Acta bot. bras.**, v. 21, n. 2, p. 369-378, 2007.

MELO, J. I. M.; LYRA-LEMOS, R. P. Sinopse taxonômica de Boraginaceae *sensu lato* A. Juss no Estado de Alagoas, Brasil. **Acta bot. Bras.**, v. 22(3), p. 701-710, 2008.

MELO, J. I. M.; SILVA, L. C.; STAPF, M. N. S.; RANGA, N. T. Boraginaceae. In: FORZZA, R. C. *et al.* (Org.). **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012a. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB105435>> Acesso em: 16 Jul. 2014.

MELO, J. I. M.; SILVA, L. C.; STAPF, M. N. S.; RANGA, N. T. Boraginaceae. In: FORZZA, R. C. *et al.* (Org.). **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012b. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB105525>> Acesso em: 16 Jul. 2014.

MELO, J. I. M.; SILVA, L. C.; STAPF, M. N. S.; RANGA, N. T. Boraginaceae. In: FORZZA, R. C. *et al.* (Org.). **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2012c. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB105425>> Acesso em: 16 Jul. 2014.

MELO, J. I. M.; SILVA, L. C.; STAPF, M. N. S.; RANGA, N. T. Boraginaceae. In: FORZZA, R. C. *et al.* (Org.). **Lista de espécies da flora do Brasil**. Rio de Janeiro: Jardim

Botânico do Rio de Janeiro. 2012d. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB105417>> Acesso em: 25 Jun. 2014.

MELO, J. I. M. ; PAULINO, R. C. ; OLIVEIRA, R. C. . Flora do Rio Grande do Norte: Boraginaceae. **Sitientibus serie Ciencias Biologicas** (SCB), v. 13, p. 01-40, 2013.

MENEZES, J. E. S. A.; LEMO, T.L.G.; PESSOA, O. D. L. Constituintes químicos de *Cordia trichotoma*: atividade citotóxica e larvicida. **Rev. Bras. Farm.**, 82: 3-4, 2001.

MICROBIOLOGIA [recurso eletrônico] / Gerard J. Tortora, Berdell R. Funke, Christine L. Case ; tradução: Aristóbolo Mendes da Silva ... [et al.] ; revisão técnica: Flávio Guimarães da Fonseca. – 10. ed. – Dados eletrônicos. – Porto Alegre: Artmed, 2012.

MILLER J.S. & GOTTSCHLING M. Generic classification in the Cordiaceae (Boraginales): Resurrection of the genus *Varronia* P.Br. **Taxon** 56: 163 – 169, 2007.

MILLER, J.S.A revised treatment of Boraginaceae for Panama. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, Saint Louis, v. 75, n. 2, 456-521, 1988.

MOREIRA, T.A., FERREIRA, M.S., RIBAS, R.M., BORGES, A.S. Criptococose: estudo clínico-epidemiológico, laboratorial e das variedades do fungo em 96 pacientes. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 39(3):255-258, mai-jun, 2006.

MORI, K.; KAWANO, M.; FUCHINO, H.; OOI, T.; SATAKE, M.; AGATSUMA, Y.; KUSUMI, T.; SEKITA, S. Antileishmanial compounds from *Cordia fragrantissima* collected in Burma (Myanmar). **J. Nat. Prod.**, v. 71, p. 18-21, 2008.

NCCLS. Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para a Determinação da Sensibilidade a Terapia Antifúngica das Leveduras; Norma Aprovada—Segunda Edição. NCCLS document M27-A2 [ISBN 1-56238-469-4]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 Estados Unidos, 2002.

NCCLS. Performance Standards for Antimicrobial Disk Susceptibility Tests; Approved Standard— Eighth Edition. NCCLS document M2-A8 [ISBN 1-56238-485-6]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

OLIVEIRA, M.M.M.; BRUGNERA, D.F.; CARDOSO, M.G.; GUIMARÃES, L.G.L.; PICCOLI, R.H. Rendimento, composição química e atividade antilisterial de óleos essenciais de espécies de *Cymbopogon*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. Botucatu-SP. v.13, n.1, p.8-16, 2011.

OKUSA, P.N.; PENGE, O.; DEVLEESCHOUWER, M.; DUEZ, P. *Journal of Ethnopharmacology*, 112, 476, 2007.

PALLERONI, N. J. The pseudomonas story. *Environmental Microbiology*, Oxford, v. 12, n. 6, p. 1377- 1383, 2010.

PALMEIRA-JUNIOR, S.F. Contribuição ao conhecimento quimiotaxonômico da família Euphorbiaceae: estudo químico de duas espécies do gênero *cróton* (*C. sellowii* Baill. E *C. brasiliensis* Muell. Arg). **Tese de Doutorado (Química e Biotecnologia)**, Departamento de Química, Centros de Ciências, Universidade Federal de Alagoas-UFAL, 2005.

PEREIRA, A. V.; RODRIGUES, O. G.; FEIJÓ, F. M. C.. Atividade antimicrobiana de extratos de plantas no Semi-Árido Paraibano. *Agropecuária Científica no Semi-Árido*, v.2, n.1, p. 37-43, 2006.

PEREIRA, R.B.; LUCAS, G.C.; PERINA, F.J.; RESENDE, M.L.V.; ALVES, E. Potential of essential oils for the control of brown eye spot in coffee plants. *Ciência e Agrotecnologia*. Lavras-MG. v.35, n.1, p.115-123, 2011.

PLAYFORD EG, Marriott D, Nguyen Q, Chen S, Ellis D, Slavin M, Slavin M, Candidemia in non neutropenic critically ill patients: risk factors for non-albicans *Candida* spp. *Critical Care Medicine*. 2008; 36(7):2034-2039.

ROLDÃO, E. F.; WITAICENIS, A.; SEITO, L. N.; HIRUMA-LIMA, C. A.; DI STASI, L. C.; *Journal of Ethnopharmacology*, 119, 94, 2008.

SAITO, M. L.; LUCCHINI, F. **Substâncias obtidas das plantas e a progeira por praguicidas eficientes e seguros ao meio ambiente**. Jaguaruima: EMBRAPA- CNPMA (EMBRAPA-CNPMA. Séries Documentos, 12), p.46, 1998.

SANTOS, R. P.; NUNES, E. P.; NASCIMENTO, R. F.; SANTIAGO, G. M. P.; MENEZES, G. H. A.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. Chemical composition and larvicidal activity of the essential oils of *Cordia leucomalloides* and *Cordia curassavica* from the northeast of Brazil. **J. Braz. Chem. Soc.**, v. 17, n. 5, p. 1027-1030, 2006.

SEIXAS, P.T.L; CASTRO, H.C; SANTOS, G.R; CARDOSO, D.P. Controle fitopatológico do *Fusarium subglutinans* pelo óleo essencial do capim-citronela (*Cymbopogon nardus* L.) e do composto citronelal. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*. v.13, p.513-517, 2011.

SHETTY, V. A.; KUMAR, S. H.; SHETTY, A. K. et al. Prevalence and characterization of diarrheagenic *Escherichia coli* isolated from adults and children in Mangalore, India. *Journal of laboratory physicians*, v. 4, n. 1, p. 24, 2012.

SILVEIRA, L.M.S. *et al.* Metodologia de atividade antimicrobiana aplicada a extratos de plantas: Comparação entre duas técnicas de ágar de fusão. *Revista Brasileira de Farmácia*, 90(2): p. 124-128, Maio 2009.

SOUSA, E.T.; DA SILVA, M.M.; DE ANDRADE, S.J. CARDOSO, M.P.; SILVA, L. A.; DE ANDRADE, J. B. Evaluation of thermal stability of quinones by thermal analysis techniques. *Thermochimica Acta* (Print), v. 529, p. 1-5, 2012

STEURER, F. Especiarias: aplicações e propriedades. 2008. 31 f. Trabalho de Conclusão de Curso. Química de alimentos, Universidade Federal de Pelotas RS, 2008.

TARODA, N. Taxonomic studies on Brazilian species of *Cordia* L. (Boraginaceae). **Philosophy Doctor Thesis**, University of Saint Andrews, Saint Andrews. 1984.

TORTORA, G. J., FUNKE, B. R., CASE, C. L., *Microbiology, An Introduction*. 10th ed., United State: Pearson Benjamin Cummings, Pearson Education Inc. 2010

VARGAS, A. C.; LOGUERCIO, A. P.; WITT, N.M.; COSTA, M.M.; SILVA, M.S.; VIANA, L.R. Atividade antimicrobiana “in vitro” de extrato alcóolico de própolis. *Ciência Rural*, v. 34, n. 1, jan-fev, 2004.

ZAMBONELLI, A.; AULERIO, A.Z.; BIANCHI, A.; ALBASINI, A. Effects of essential oils on phytopathogenic fungi in vitro. *Journal of Phytopathology*. Berlim. v.144, p.491-494, 1996.