



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS NATURAIS  
E SINTÉTICOS BIOATIVOS**



**CARLOS ARTHUR GOUVEIA VELOSO**

**Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana das folhas de *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill (Boraginaceae) e de seu óleo essencial**

**João Pessoa – PB**

**2018**

**CARLOS ARTHUR GOUVEIA VELOSO**

**Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana das folhas de *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill (Boraginaceae) e de seu óleo essencial**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de **MESTRE EM PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS**. Área de Concentração: **FARMACOQUÍMICA**

**ORIENTADOR:** Prof. Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa  
**COORIENTADORA:** Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ivana Maria Fechine

**João Pessoa – PB**

**2018**

**Catálogo na publicação**  
**Seção de Catalogação e Classificação**

V443e Veloso, Carlos Arthur Gouveia.

Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana das folhas de *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill (Boraginaceae) e de seu óleo essencial / Carlos Arthur Gouveia Veloso. - João Pessoa, 2018.  
102 f. : il.

Orientação: Vicente Carlos de Oliveira Costa.  
Coorientação: Ivana Maria Fachine.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCS.

1. *Varronia dardani*. 2. Óleo essencial. 3. Fitoquímica.  
4. Atividade antimicrobiana. I. Costa, Vicente Carlos de Oliveira. II. Fachine, Ivana Maria. III. Título.

UFPB/BC

**CARLOS ARTHUR GOUVEIA VELOSO**

**Estudo fitoquímico e avaliação da atividade antimicrobiana das folhas de *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill (Boraginaceae) e de seu óleo essencial**

Dissertação aprovada em 22/02/2018.

**BANCA EXAMINADORA**



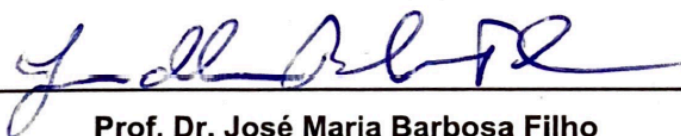
---

**Prof. Dr. Vicente Carlos de Oliveira Costa**  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Orientador



---

**Profa. Dra. Ivana Maria Fachine**  
(Universidade Estadual da Paraíba)  
Co-orientadora



---

**Prof. Dr. José Maria Barbosa Filho**  
(Universidade Federal da Paraíba)  
Examinador interno



---

**Prof. Dr. Emídio Vasconcelos Leitão da Cunha**  
(Universidade Estadual da Paraíba)  
Examinador externo

*Dedico este trabalho àquelas que sempre confiaram em mim  
e me ampararam quando eu mais precisei. Obrigado,  
“Mainha” e tia Nelma.*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus que permitiu que eu chegasse até aqui, e que abençoou toda a minha caminhada.

Agradeço imensamente ao meu pai e também à minha mãe, uma guerreira, que mesmo diante de algumas dificuldades, conseguiu me criar e me educar, buscando sempre me proporcionar o melhor, espero um dia poder proporcioná-la o mesmo.

À minha tia Nelma Gouveia, que é como uma segunda mãe para mim e sempre me apoiou e incentivou durante toda a minha vida acadêmica.

Meus agradecimentos aos amigos César Dantas e Fernanda Nóbrega, companheiros desde a minha graduação e que vão continuar presentes em minha vida com certeza.

Agradeço imensamente ao meu professor e orientador Dr. Vicente Carlos, meu pai científico, que consegue cativar qualquer pessoa com a sua humildade e sabedoria. Sempre será um exemplo para mim.

Aos professores Dr. Marcelo Sobral e Dr. Josean Fechine, grandes mestres, os quais me ajudaram muito no desenvolvimento deste trabalho.

À minha coorientadora Dr<sup>a</sup> Ivana Maria Fechine, que me apresentou à Fitoquímica, área que pretendo continuar a minha jornada.

À professora Dr<sup>a</sup> Bagnólia Costa pelos seus ensinamentos e por me ajudar na escrita e correção da minha dissertação.

À professora Dr<sup>a</sup> Fabiana Cavalcante por me incentivar a buscar novos conhecimentos e aplicá-los aos meus futuros trabalhos.

Aos meus amigos da organização do Curso de Verão de Farmacologia, inclusive àqueles que fazem parte do Laboratório de Farmacologia Funcional Prof. George Thomas.

Ao botânico Dr. José Iranildo Miranda de Melo pela identificação da espécie estudada.

Aos técnicos Raimundo Nonato, Alexsandro Marinho, Sócrates Golzio e Evandro Ferreira pelo auxílio durante os meus experimentos.

Aos meus amigos que o mestrado me deu, Juliana de Medeiros, Sarah Dantas, Luiz Agra e Danilo Duarte.

Aos meus companheiros de laboratório, Ana Rita, Lucas, Fiama, Yuri, Roseane, Sabrina, Anderson, Ramon, Laiane, Joanda, Diego, André, Hidna, Jociano, Pedro, Jordana, Ranna e todos os outros da equipe SFCB.

Ao Programa de Pós-graduação e Sintéticos Bioativos.

À Universidade Federal da Paraíba.

À professora Dr<sup>a</sup> Ana Cláudia Dantas de Medeiros e toda a equipe do Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM), em especial aos alunos Fernanda e Pedro Henrique, pela grande contribuição em meu trabalho.

À Universidade Estadual da Paraíba.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq.

Estudo fitoquímico e avaliação atividade antimicrobiana das folhas de *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill (Boraginaceae) e de seu óleo essencial.  
Veloso, C. A. G.

Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,  
Dissertação de Mestrado, CCS/UFPB (2018).

## RESUMO

O gênero *Varronia* pertence à família Boraginaceae, anteriormente classificada como *Cordia*, compreende cerca de 100 espécies. Algumas espécies são descritas na literatura com atividades anti-inflamatória, analgésica e cicatrizante. A espécie *Varronia dardani* não possui relatos na medicina popular. O material vegetal foi coletado em Serra Branca – PB, uma exsicata encontra-se depositada no herbário Prof. Lauro Pires Xavier sob registro JPB 29509. As folhas de *V. dardani* foram secas em estufa 40 °C, trituradas e extraídas com etanol a 95%, concentrado em rotaevaporador obtendo-se o Extrato Etanólico Bruto (EEB), o qual foi desengordurado com hexano e em seguida submetido a partição líquido/líquido (7:3 v/v) obtendo-se as fases hexânica, diclorometano, acetato de etila e n-butanol. As estruturas químicas foram identificadas através de espectroscopia de massa, Ressonância Magnética Nuclear (RMN) e em comparações com a literatura. A fase diclorometano (Vd-FD) foi submetida a cromatografia líquida de média pressão de onde foram isoladas seis substâncias, sendo duas chalconas (pinostrobrina chalcona e gimnogrameno) e quatro flavanonas (pinocembrina, isosakuranetina, pinostrobrina e sakuranetina-4'-metil éter). O óleo essencial das folhas *V. dardani* (Vd-OE) foi extraído por hidrodestilação em aparelho de Clevenger e caracterizado por cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas (CG-EM). A constituição química do óleo essencial de *V. dardani* foi de 97,2% de monoterpenos e sesquiterpenos. Sendo os  $\delta$ -Cadineno (8,71%), timol (7,43%), carvacrol (5,92%),  $\gamma$ -cadineno (5,66%), p-cimeno (5,25%) e  $\delta$ -cadinol (5,20%) os constituintes majoritários. Foi investigada a atividade antimicrobiana, através da Concentração Inibitória Mínima (CIM) e da Inibição da Formação de Biofilme (IFB), realizadas por microdiluição e utilizando o EEB, sua fase diclorometano, o Vd-OE e de algumas flavanonas e chalconas isoladas e/ou em misturas frente às espécies de microrganismos de interesse na odontologia. O óleo essencial inibiu o crescimento de *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus salivarius* com a CIM de 2 mg/mL, Vd-EEB inibiu o crescimento de *S. salivarius*, Vd-FD exibiu uma CIM frente às cepas de *E. faecalis* e *S. salivarius*, a pinostrobrina chalcona inibiu o crescimento de *S. salivarius*, e em mistura com o gimnogrameno, apresentou CIM para as cepas *E. faecalis* e *S. salivarius*. A pinocembrina inibiu o crescimento de *E. faecalis* e *S. salivarius*. A pinocembrina, a pinostrobrina chalcona e sua mistura com o gimnogrameno apresentaram inibição da formação do biofilme de *S. salivarius* na maior concentração testada. A pinostrobrina chalcona inibiu a formação do biofilme de *E. faecalis* na sua menor concentração. Os resultados *in vitro* indicaram que a espécie contém em sua composição química, substâncias com potencial antimicrobiano, necessitando assim, de estudos complementares visando buscar uma nova terapia para infecções dentais utilizando a referida espécie.

**Palavras-chave:** *Varronia dardani*, óleo essencial, fitoquímica, atividade antimicrobiana.

**Phytochemical study and evaluation of antimicrobial activity from leaves of *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill (Boraginaceae) and its essential oil.**  
Veloso, C. A. G.

**Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos,  
Dissertação de Mestrado, CCS/UFPB (2018).**

**ABSTRACT**

The genus *Varronia* belongs to the family Boraginaceae, previously classified as *Cordia*, comprises about 100 species. Some species are described in the literature with activities anti-inflammatory, analgesic and cicatrizant. The species *Varronia dardani* has no reports in folk medicine. The vegetal material was collected in Serra Branca - PB, a voucher specimen is deposited in the Prof. Lauro Pires Xavier herbarium under registration JPB 29509. The leaves from *V. dardani* were dried in an oven at 40 °C, crushed and extracted with 95% ethanol, concentrated in a rotavaporator, obtaining the Ethanolic Crude Extract (ECE), which was degreased with hexane and then partitioned liquid/liquid (7: 3 v / v) to give the hexane, dichloromethane, ethyl acetate and n-butanol phases. The chemical structures were identified by mass spectroscopy, Nuclear Magnetic Resonance (NMR) and in comparisons from the literature. The dichloromethane phase (Vd-DP) was subjected to medium pressure liquid chromatography from which six substances were isolated, two chalcones (pinostrobin chalcone and gymnogrammene) and four flavanones (pinocembrin, isosakuranetin, pinostrobin and sakuranetin-4'-methyl ether). The essential oil from leaves of *V. dardani* (Vd-EO) was extracted by hydrodistillation by using a Clevenger apparatus and characterized by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS). The chemical composition of *V. dardani* oil was 97.2% monoterpenes and sesquiterpenes. The  $\delta$ -Cadinene (8.71%), thymol (7.43%), carvacrol (5.92%),  $\gamma$ -cadinene (5.66%), p-cymene (5.25%) and  $\delta$ -cadinol (5.20%) was the major constituents. Antimicrobial activity was investigated by the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and the Inhibition of Biofilm Formation (IBF), performed by microdilution and using the ECE, its dichloromethane phase, the Vd-EO and some flavanones and chalcones isolated and/or in mixtures with species of microorganisms of interest in dentistry. The essential oil inhibited the growth of *Enterococcus faecalis* and *Streptococcus salivarius* with MIC of 2 mg/mL, Vd-ECE inhibited the growth of *S. salivarius*, Vd-DP exhibited a MIC against strains of *E. faecalis* and *S. salivarius*, pinostrobin chalcone inhibited the growth of *S. salivarius*, and in combination with gymnogrammene, showed a MIC for strains *E. faecalis* and *S. salivarius*. Pinocembrin inhibited the growth of *E. faecalis* and *S. salivarius*. Pinocembrin, pinostrobin chalcone and its mixture with gymnogrammene showed inhibition of the formation of *S. salivarius* biofilm in the highest concentration tested. Pinostrobin chalcone inhibited the formation of the *E. faecalis* biofilm at its lowest concentration. The *in vitro* results indicated that the species contains in its chemical composition substances with antimicrobial potential, thus requiring complementary studies aiming to seek a new therapy for dental infections using the species cited.

**Keywords:** *Varronia dardani*, essential oil, phytochemistry, antimicrobial activity.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> – Distribuição geográfica mundial da família Boraginaceae. ....	24
<b>Figura 2</b> – Estrutura básica das flavanonas. ....	29
<b>Figura 3</b> – A chalcona como intermediária no metabolismo dos flavonoides...31	
<b>Figura 4</b> – Estrutura básica das chalconas. ....	32
<b>Figura 5</b> – Folhas de <i>Varronia dardani</i> (Taroda) J.S. Mill.....	33
<b>Figura 6</b> – Inflorescência de <i>Varronia dardani</i> (Taroda) J.S. Mill. ....	33
<b>Figura 7</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de Vd-1. ....	50
<b>Figura 8</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de Vd-1 na região de 119 – 150 ppm.....	50
<b>Figura 9</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de Vd-1.....	51
<b>Figura 10</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de Vd-1 na região de 6,90 – 8,50 ppm.....	51
<b>Figura 11</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da mistura Vd-1 e Vd-2. ....	54
<b>Figura 12</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da mistura Vd-1 e Vd-2 na região de 5,90 – 8,30 ppm.....	54
<b>Figura 13</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de Vd-2 na região de 3,30 – 4,00 ppm.....	55
<b>Figura 14</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da mistura Vd-1 e Vd-2. ....	55
<b>Figura 15</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da mistura Vd-1 e Vd-2 na região de 192,6 – 196,4 ppm.....	56
<b>Figura 16</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C (100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da mistura Vd-1 e Vd-2 na região de 53,80 – 60 ppm.....	56
<b>Figura 17</b> – Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da mistura Vd-1 e Vd-2 na região de 3,90 – 3,74 e 174 - 157 ppm. ....	57
<b>Figura 18</b> – Espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de Vd-3.....	60
<b>Figura 19</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de Vd-3 na região de 2,70 – 3,16 ppm.....	60
<b>Figura 20</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de Vd-3 na região de 5,40 – 6,00 ppm.....	61

<b>Figura 21</b> – Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-3 na região de 7,24 – 7,60 ppm.....	61
<b>Figura 22</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-3. ....	62
<b>Figura 23</b> – Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-3 na região de 135 – 210 ppm.....	62
<b>Figura 24</b> – Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-3 na região de 94 – 130 ppm.....	63
<b>Figura 25</b> – Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-3 na região de 42 – 84 ppm.....	63
<b>Figura 26</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-4.....	66
<b>Figura 27</b> – Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-4 na região de 6,75 – 7,65 ppm.....	66
<b>Figura 28</b> – Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-4 na região de 5,30 – 6,05 ppm.....	67
<b>Figura 29</b> – Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-4 na região de 2,50 – 4,00 ppm.....	67
<b>Figura 30</b> – Espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-4. ....	68
<b>Figura 31</b> – Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-4 na região de 144 – 204 ppm.....	68
<b>Figura 32</b> – Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-4 na região de 70 – 140 ppm.....	69
<b>Figura 33</b> – Expansão do espectro de RMN $^{13}\text{C}$ (125 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-4 na região de 38 – 61 ppm.....	69
<b>Figura 34</b> – Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-4 na região de 3,10 – 4,60 e 178 - 142 ppm.....	70
<b>Figura 35</b> – Espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b.....	74
<b>Figura 36</b> – Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 11,72 – 12,32 ppm.....	74
<b>Figura 37</b> – Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 6,75 – 7,60 ppm.....	75
<b>Figura 38</b> – Expansão do espectro de RMN $^1\text{H}$ (500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 5,10 – 6,20 ppm.....	75

<b>Figura 39</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 5,00 – 6,62 ppm.....	76
<b>Figura 40</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 3,52 – 3,98 ppm.....	76
<b>Figura 41</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup> H (500 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 2,55 – 3,25 ppm.....	77
<b>Figura 42</b> – Espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b.....	77
<b>Figura 43</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 190 – 201 ppm.....	78
<b>Figura 44</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 159 – 168,5 ppm.....	78
<b>Figura 45</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 123 – 141 ppm.....	79
<b>Figura 46</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 93 – 115 ppm.....	79
<b>Figura 47</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 73 – 83 ppm.....	80
<b>Figura 48</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 53,9 – 56,9 ppm.....	80
<b>Figura 49</b> – Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup> C (125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 38,5 – 47 ppm.....	81
<b>Figura 50</b> – Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 3,62 – 3,93 e 175 - 156 ppm.....	81
<b>Figura 51</b> – Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG-EM) do óleo essencial de <i>Varronia dardani</i> .....	82

## LISTA DE ESQUEMA

<b>Esquema 1</b> – Obtenção e fracionamento do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das folhas de <i>Varronia dardani</i> .....	42
--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> – Exemplos de compostos (flavonoides, terpenoides, alcaloides e ácidos fenólicos) isolados e identificados de partes (folhas, brotos e óleo essencial) de espécies da família Boraginaceae. ....	25
<b>Quadro 2</b> – Exemplos de compostos polifenólicos isolados de folhas e raízes de espécies do gênero <i>Varronia</i> .....	28
<b>Quadro 3</b> – Escore proposto por Peixoto e colaboradores (2017), para a classificação do percentual de inibição do biofilme. ....	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Método utilizado na cromatografia sob média pressão da fase diclorometano de <i>Varronia dardani</i> .....	43
<b>Tabela 2</b> – Dados de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C (500 e 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de Vd-1, 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (pinostrobina chalcona) em comparação aos dados obtidos por WEI e colaboradores (2013), nas mesmas condições. ....	49
<b>Tabela 3</b> – Dados de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C (400 e 100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de Vd-1 (pinostrobina chalcona) e Vd-2 (gimnogrameno), em comparação aos dados obtidos na literatura (WEI et al., 2013; MILES & MAIN, 1985). ....	53
<b>Tabela 4</b> – Dados de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C (500 e 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de Vd-3, 5,7-dihidroxi-flavanona (pinocembrina) em comparação aos dados de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C (400 e 100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) por Ching e colaboradores (2007). ....	59
<b>Tabela 5</b> – Dados de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C (400 e 100 MHz, CD <sub>3</sub> OD) de Vd-4, 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavanona (isosakuranetina) em comparação aos dados de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C (500 e 125 MHz, CD <sub>3</sub> OD) por Kim e colaboradores (1999). ....	65
<b>Tabela 6</b> – Dados de <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C (500 e 125 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) de Vd-5a (pinostrobina) e Vd-5b (sakuranetina 4'-metil éter), em comparação aos dados obtidos na literatura (ROMAN JÚNIOR et al., 2017; OYAMA & KONDO, 2004). ....	73
<b>Tabela 7</b> – Composição química do óleo essencial das partes aéreas de <i>Varronia dardani</i> .....	83
<b>Tabela 8</b> – Concentração Inibitória Mínima das amostras derivadas de <i>Varronia dardani</i> , frente às cepas <i>E. faecalis</i> , <i>S. salivarius</i> e <i>S. oralis</i> .....	86
<b>Tabela 9</b> – Índice de Inibição da Formação de Biofilme (IFB) das amostras derivadas de <i>Varronia dardani</i> , frente à cepa de <i>E. faecalis</i> . Os valores são expressos em porcentagem de inibição (I%). ....	88
<b>Tabela 10</b> – Índice de Inibição da Formação de Biofilme (IFB) das amostras derivadas de <i>Varronia dardani</i> , frente à cepa de <i>S. salivarius</i> . Os valores são expressos em porcentagem de inibição (I%). ....	88

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E FÓRMULAS MOLECULARES

APT	Teste de próton anexado
BHI	<i>Brain Heart Infusion</i>
CCDA	Cromatografia em Camada Delgada Analítica
CDCl <sub>3</sub>	Clorofórmio deuterado
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massas
CHCl <sub>3</sub>	Clorofórmio
CIM	Concentração inibitória mínima
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
COSY	Espectroscopia de correlação total
d	Dupleto
DCM	Diclorometano
dd	Duplo dupleto
EEB	Extrato etanólico bruto
ESI	Ionização por <i>electrospray</i>
ESI-MS	Espectroscopia de massa acoplada à ionização por <i>electrospray</i>
EtOH	Etanol
HMBC	Correlação heteronuclear a múltiplas ligações
HMQC	Correlação heteronuclear de <i>quantum</i> múltiplo
I%	Porcentagem de inibição
IFB	Inibição da formação de biofilme
<i>J</i>	Constante de acoplamento
m	Multiplete
CD <sub>3</sub> OD	Metanol deuterado
MHz	<i>Megahertz</i>
PPgPNSB	Programa de Pós-graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos
ppm	Partes por milhão
q	Quadruplete
P.F.	Ponto de fusão
PNMF	Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos
PNPIC	Política nacional de práticas integrativas e complementares
R <sub>f</sub>	Fator de retenção

RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN <sup>13</sup> C	Ressonância magnética nuclear de carbono treze
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância magnética nuclear de hidrogênio
s	Simpleto
sl	Simpleto largo
SUS	Sistema único de saúde
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
δ	Deslocamento químico

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>19</b>
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>22</b>
2.1. Geral .....	22
2.2. Específicos .....	22
<b>3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA .....</b>	<b>24</b>
3.1. Sobre a família Boraginaceae.....	24
3.2. Dados botânicos da família Boraginaceae.....	26
3.3. Sobre o gênero <i>Varronia</i> .....	26
3.3.1. Principais classes de metabólitos encontrados no gênero <i>Varronia</i> .....	27
3.3.2. Considerações sobre a espécie estudada .....	32
3.3.3. Óleos essenciais .....	34
3.4. Biofilme dental.....	36
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>39</b>
4.1. Material e equipamentos utilizados .....	39
4.2. Material Vegetal .....	40
4.2.1. Coleta e identificação do material vegetal.....	40
4.2.2. Processamento do material vegetal de <i>Varronia dardani</i> .....	40
4.3. Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) das folhas de <i>V. dardani</i> .....	40
4.4. Fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB) das folhas de <i>V. dardani</i> .....	41
4.5. Processamento cromatográfico da fase diclorometano por Cromatografia Líquida sob Média Pressão (CLMP).....	42
4.6. Processamento cromatográfico das frações por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) .....	43
4.7. Métodos espectrométricos .....	43
4.8. Obtenção do óleo essencial e caracterização química.....	43
4.9. Atividade antimicrobiana.....	44
4.9.1. Cepas testadas .....	44
4.9.2. Meios de cultura .....	44

4.9.3.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	45
4.9.4.	Inibição da Formação de Biofilme (IFB) .....	45
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>48</b>
5.1.	Identificação estrutural de Vd-1 .....	48
5.2.	Identificação estrutural de Vd-2 .....	52
5.3.	Identificação estrutural de Vd-3 .....	58
5.4.	Identificação estrutural de Vd-4 .....	64
5.5.	Identificação estrutural de Vd-5a e Vd-5b .....	71
5.6.	Identificação dos constituintes voláteis de <i>Varronia dardani</i> . .....	82
5.7.	Ensaio microbiológicos .....	85
5.7.1.	Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM).....	85
5.7.2.	Inibição da Formação de Biofilme (IFB) .....	87
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>90</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>92</b>

# *Introdução*

## 1. INTRODUÇÃO

As plantas são fontes significativas de compostos bioativos para a sociedade, o uso destas com propriedades medicamentosas é tão antigo quanto a civilização humana. Por séculos, produtos derivados de minerais, vegetais e animais constituíram os únicos recursos para o alívio de enfermidades (ADAMS et al., 2009; PROENÇA DA CUNHA et al., 2010; RATES, 2001).

Nos primórdios, o homem buscou na natureza vários recursos para aliviar os distintos males que o afligia, sendo físicos ou espirituais. Aos feiticeiros, considerados intercessores entre os homens e os deuses cabia o dever de curar os doentes, unindo-se, desse modo, a religião e a magia ao conhecimento empírico das práticas de saúde, como por exemplo, o uso de plantas medicinais. Na antiguidade, outra abordagem foi realizada a partir da relação entre o modo de vida e o ambiente o qual as pessoas viviam, assim, levando em conta o ditado hipocrático, onde os métodos de cura deixaram de ser associados somente à abordagem espiritual e mística (TITONELLI ALVIM et al., 2006).

Embora a medicina alopática tenha se desenvolvido a partir do século XX, a população carente ainda encontra barreiras para a sua utilização. Isso, combinado com a facilidade de aquisição e a vasta tradição do uso de plantas medicinais, tornam-se importantes fatores que levam à utilização dessas plantas pelas populações dos países em desenvolvimento (VEIGA-JUNIOR et al., 2005).

A flora do Brasil é uma fonte renovável para o estudo de novos fármacos, devido à relativa facilidade de coleta, ambiente favorável para seu crescimento e a vasta biodiversidade estrutural de compostos orgânicos, contribuindo assim, para o isolamento e elucidação de ativos, além de diversos outros itens que podem ser aproveitados para fins sociais (BRAZ-FILHO, 2010).

A caatinga ocorre em uma área no Brasil de 845.000 km<sup>2</sup>, ocupando 9,9% da área territorial brasileira, de acordo com o Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – IBGE (BRASIL, 2017), sendo o único bioma exclusivamente brasileiro, ou seja, grande parte do patrimônio biológico dessa região não é encontrada em outro lugar do mundo além do Nordeste do Brasil (MMA, 2002). Embora possua uma alta taxa de diversidade e endemismo, o bioma da caatinga é pouco estudado e o menos resguardado pelos órgãos responsáveis de

conservação e proteção, havendo enorme falta na informação acerca da vegetação (MARANGON et al., 2016).

O Brasil possui elementos legais envolvendo a utilização de plantas medicinais, bem como programas de incentivo à pesquisa destas. Foram publicadas no ano de 2006, algumas políticas voltadas para o setor: a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (PNPMF) e a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS) (CARVALHO, 2011).

A ampla variedade de compostos orgânicos isolados de plantas da flora brasileira, o potencial destes para o desenvolvimento social e econômico e a sua contribuição para o avanço científico e tecnológico nos levam a compreender o valor da pesquisa dos produtos naturais (BRAZ-FILHO, 1994).

A pesquisa de antimicrobianos oriundos de fontes naturais vem sendo estimulada devido ao aumento da resistência dos microrganismos nocivos à saúde frente à maioria dos antimicrobianos já conhecidos. Linhas de pesquisas têm sido desenvolvidas por vários pesquisadores, fundamentadas nas propriedades anti-infecciosas de muitas plantas utilizadas na medicina popular (DUARTE, 2006).

O estudo fitoquímico é de grande importância para a ampliação do conhecimento do gênero *Varronia* e da família Boraginaceae, especificamente da espécie *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill, através da identificação de compostos orgânicos isolados na espécie, e também com a caracterização química e a análise da atividade antimicrobiana do seu óleo essencial, visto que a literatura apresenta poucos estudos descritos em relação a investigação fitoquímica e biológica desta espécie.

*Objetivos*

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Geral

Contribuir para o conhecimento químico do gênero *Varronia* e da família Boraginaceae enfatizando os aspectos fitoquímico e biológico das folhas de *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill, através da extração, isolamento e identificação de seus compostos.

### 2.2. Específicos

- Estudar fitoquimicamente a espécie *Varronia dardani*, por meio do isolamento e identificação estrutural dos constituintes químicos, a fim de obter modelos moleculares bioativos, bem como, traçar um perfil químico da planta;
- Extrair o óleo essencial das partes aéreas do vegetal e determinar a sua composição química;
- Investigar uma possível atividade antimicrobiana do extrato etanólico bruto de *V. dardani* (Vd-EEB), da sua fase diclorometano (Vd-FD), do óleo essencial (Vd-OE) e de flavanonas e chalconas isoladas e/ou em misturas frente a espécies de microrganismos que infectam o biofilme dental.

*Fundamentação Teórica*

### 3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1. Sobre a família Boraginaceae

A família Boraginaceae reúne mais de 2.000 espécies em cerca de 120 gêneros (DRESLER et al., 2017b; TEKE & BINZET, 2017; LUEBERT et al., 2016) com suas representantes distribuídas nas regiões tropicais, subtropicais e temperadas, poucas delas nas zonas temperadas do hemisfério Norte (Figura 1) (BRITANNICA ACADEMIC, 2014; LSPV-FC-IECA, 2018).

**Figura 1** – Distribuição geográfica mundial da família Boraginaceae.



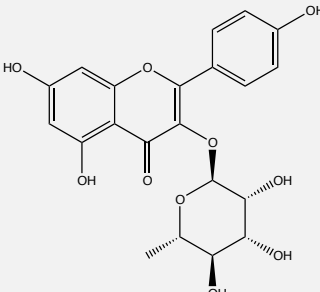
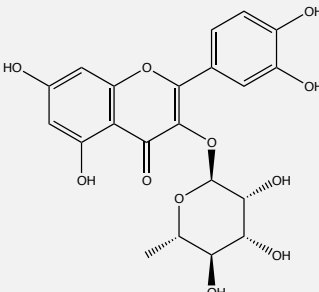
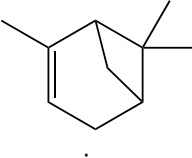
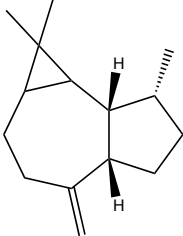
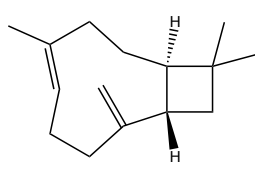
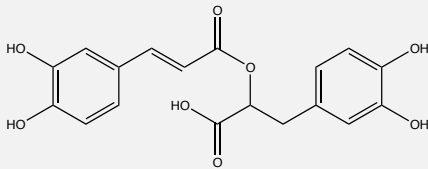
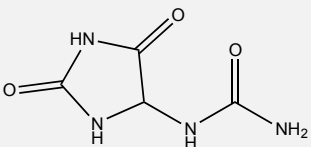
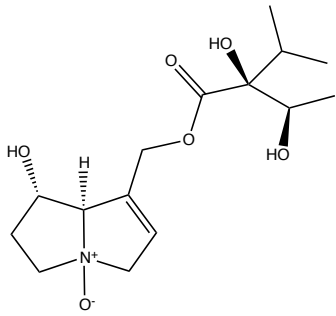
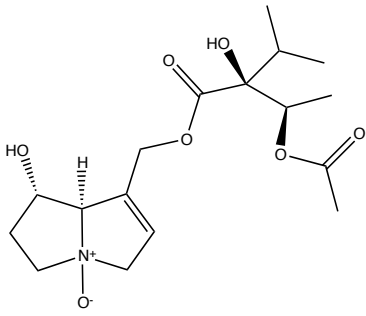
Fonte: Laboratório de Sistemática de Plantas Vasculares da Faculdade de Ciências do Instituto de Ecologia e Ciências Ambientais (LSPV-FC-IECA)

Disponível em:

<[www.thecompositaehut.com/www\\_tch/webcurso\\_spv/familias\\_pv/boraginaceae.html](http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/boraginaceae.html)> Acesso em jan. 2018.

Esta família compreende um grupo de plantas que são importantes para a farmacologia e cosmetologia. Muitos compostos biologicamente ativos foram isolados e determinados em plantas dessa família, incluindo terpenoides, naftoquinonas, alcaloides, flavonoides e fenóis (Quadro 1, p. 25). Os constituintes isolados destas plantas exibem atividades antimicrobiana, antitumoral, antiviral, anti-inflamatória, cardiotônicas, antiplaquetária e contraceptiva (SHARMA et al. 2009; PAPP et al. 2011; TARAVATI et al. 2014; DRESLER et al., 2017b).

**Quadro 1** – Exemplos de compostos (flavonoides, terpenoides, alcaloides e ácidos fenólicos) isolados e identificados de partes (folhas, brotos e óleo essencial) de espécies da família Boraginaceae.

Espécie	Substâncias	Referências
<p><i>Cordia collococa</i> (Folhas)</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Afzelina</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Quercitrina</p> </div> </div>	<p>FOUSEKI et al. (2016)</p>
<p><i>Varronia curassavica</i> (Óleo essencial)</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p><math>\alpha</math>-pineno</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Aloaromadendreno</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Trans-cariofileno</p> </div> </div>	<p>DE CARVALHO JR. et al. (2004)</p>
<p><i>Echium vulgare</i> (Brotos)</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Ácido rosmarínico</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Alantoína</p> </div> </div>	<p>DRESLER et al. (2017a)</p>
<p><i>Cynoglossum columnae</i> (Folhas)</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>N-óxido de rinderina</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>N-óxido de 3'-O-acetilrinderina</p> </div> </div>	<p>DAMIANAKOS et al. (2016)</p>

A família inclui um grande número de plantas, como *Cordia verbenacea* (erva-baleeira), *Heliotropium* (heliotrópio), *Mertensia virginica* (*bluebell* da Virgínia), *Phacelia* (erva daninha escorpião), *Pulmonaria* (pulmonária) e *Myosotis* (não-me-esqueças). Algumas das mais típicas boragináceas mostram alterações de cor da corola (pétalas) durante o envelhecimento, de amarelo ou cor de rosa para azul ou amarelo a branco. Essa transformação é causada por alterações de pH dos líquidos celulares. Muitas espécies são venenosas, mas algumas espécies têm sido utilizadas medicinalmente, como *Symphytum officinale* (confrei) e *Borago officinalis* (borragem) (BRITANNICA ACADEMIC, 2014; ABRANTES et al, 2004).

### 3.2. Dados botânicos da família Boraginaceae

Esta família é caracterizada por apresentar porte variado com folhas simples e geralmente alternadas. Suas flores são hermafroditas e também de sexos separados e possuem um cálice gamossépalo, tubuloso, com lobos curtos ou profundos, corola tubulosa, infundibuliformes, campanulada, hipocrateriforme ou rotácea. O androceu tem cinco estames livres, excertos ou não, com filetes curtos ou longos, antera bilocular, rimosa, com lóculos globosos, ovóides, oblongos. O gineceu é composto de dois a quatro carpelos, constituindo ovário súpero, com dois a quatro lóculos, uniovulados, raro, uniloculares, com quatro óvulos anátropos, estilete inteiro ou bipartido no ápice. O fruto é indeiscente, carnoso, sendo raramente seco, constituindo uma drupa com dois a quatro lóculos ou pirenado por aborto ou um esquizocarpo dissolvido em quatro núculas livres ou concrecidas duas a duas, com estrutura drupácea (LEITE, 2006).

### 3.3. Sobre o gênero *Varronia*

O Gênero *Varronia* compreende cerca de 100 espécies neotropicais de arbustos multi-ramificados com inflorescências condensadas e folhas uniformemente serrilhadas. Há cerca de 30 espécies de *Varronia* no Brasil, que ocorrem em uma variedade de habitats de florestas, o "cerrado" e vegetação "caatinga" (STAPF, 2010).

*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 et al., 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.; *Varronia globosa* Jacq.; *Varronia leucocephala* (Moric.) J.S. Mill e *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill, todas distribuídas no Nordeste do Brasil (MELO, 2012).

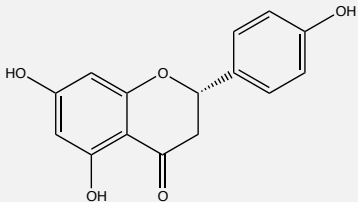
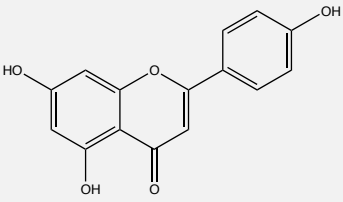
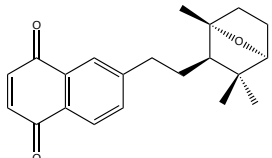
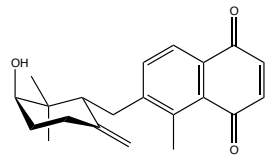
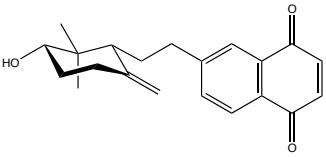
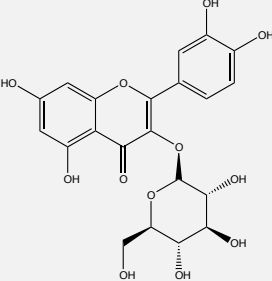
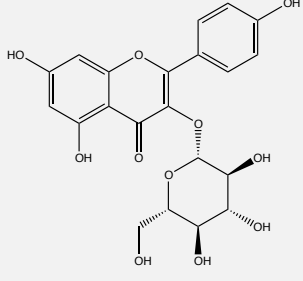
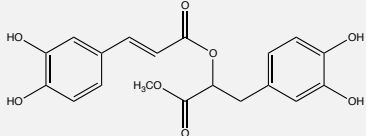
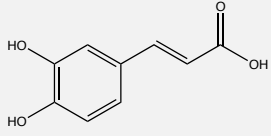
Algumas plantas do gênero possuem numerosos usos medicinais, como anti-inflamatório, analgésico e cicatrizante (LORENZI, 2008). Estas propriedades farmacológicas vêm sendo comprovadas durante as duas últimas décadas (SERTIÉ et al., 1991; CARVALHO JÚNIOR et al., 2004; MING et al., 2012) e a indústria farmacêutica manifestou um interesse crescente na obtenção de espécies deste gênero utilizadas como matéria-prima para a obtenção de fitoterápicos (MONTANARI, 2011; HOELTGEBAUM, 2017).

### **3.3.1. Principais classes de metabólitos encontrados no gênero**

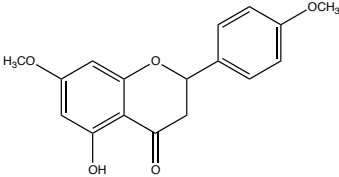
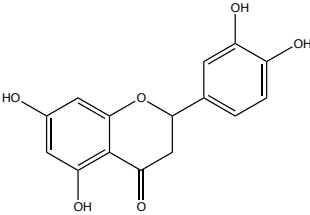
#### ***Varronia***

Várias pesquisas resultaram no isolamento e identificação de diferentes classes de metabólitos secundários em diferentes partes de plantas do gênero *Varronia*, como mostra o Quadro 2 (p. 28).

**Quadro 2** – Exemplos de compostos polifenólicos isolados de folhas e raízes de espécies do gênero *Varronia*.

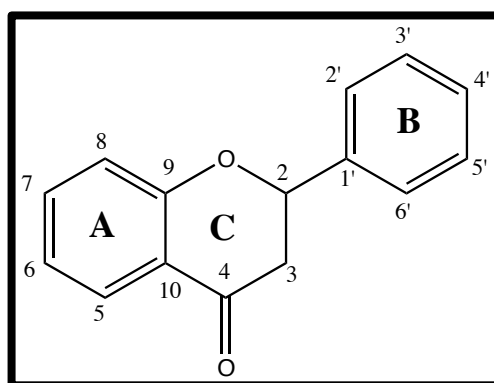
Espécie	Substâncias	Referências
<p><i>V. curassavica</i> (Folhas)</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Naringenina</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Apigenina</p> </div> </div>	<p>AMEIRA et al. (2009)</p>
<p><i>V. leucocephala</i> (Raízes)</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Cordiaquinona J</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Cordiaquinona L</p> </div> </div> <div style="text-align: center; margin-top: 20px;">  <p>Cordiaquinona M</p> </div>	<p>DINIZ et al. (2009)</p> <p>OLIVEIRA et al. (2012)</p> <p>RODRIGUES et al. (2012)</p>
<p><i>V. sinensis</i> (Folhas)</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>Quercetina-3-O-β-D-glicopiranosídeo</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Kaempferol-3-O-β-D-glicopiranosídeo</p> </div> </div> <div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center; margin-top: 20px;"> <div style="text-align: center;">  <p>Rosmarinato de metila</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Ácido cafeico</p> </div> </div>	<p>AL-MUSAYEIB et al. (2011)</p> <p>DE SOUZA et al. (2011)</p> <p>QU et al. (2011)</p>

**Quadro 2 – (Continuação).**

<p><i>V. globosa</i> (Folhas)</p>	<div style="display: flex; justify-content: space-around; align-items: center;"> <div style="text-align: center;">  <p>5-Hidroxi-4',7-dimetoxiflavanona</p> </div> <div style="text-align: center;">  <p>Eriodictiol</p> </div> </div>	<p>SILVA et al. (2010)</p>
---------------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----------------------------

Na constituição química de espécies desse gênero destaca-se a presença de flavonoides, principalmente os que possuem estrutura do tipo flavanonas (Figura 2). Estes metabólitos são caracterizados pela presença de uma cadeia de três carbonos saturados e um átomo de oxigênio no C4 (D'ARCHIVIO et al, 2007). Há algumas décadas, estes eram considerados apenas como grupos menores de flavonoides (BOHM, 1994), como chalconas, di-hidrochalconas e auronas. No entanto, durante os últimos anos, o número total de flavanonas conhecidas aumentou ao ponto de que elas são agora consideradas uma das principais classes de flavonoides, assim como as flavonas, isoflavonas, flavonóis e antocianidinas (VEITCH & GRAYER, 2006; KHAN & DANGLES, 2014).

**Figura 2 –** Estrutura básica das flavanonas.



Fonte: Simões et al. (2017)

Como as flavanonas fazem parte do grupo dos flavonoides, elas apresentam além do efeito antioxidante, diversos efeitos biológicos, como atividade antiviral, antimicrobiana e antiinflamatória, inibem a agregação de plaquetas, são antiulcerogênicas e antialérgicas (GATTUSO et al., 2007).

Os flavonoides em geral fazem parte de um grande grupo de metabólitos naturais bem difundidos em plantas superiores. Eles são responsáveis pela cor das flores em angiospermas, mas flavonoides incolores foram relatados. Nos primórdios das pesquisas com flavonoides, os mesmos foram considerados subprodutos inúteis do metabolismo vegetal, no entanto, várias funções biológicas na planta são exercidas por vários membros da série, por exemplo, proteção UV, modulação enzimática e proteção contra agentes infecciosos (BUCKINGHAM; MUNASINGHE, 2015)

Estes metabólitos secundários são polifenólicos, derivados da via dos fenilpropanoides e do acetato, baseados em uma estrutura com quinze carbonos ( $C_6C_3C_6$ ) (DORNAS et al., 2007). Possuem dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um anel cromano (anel C) acoplado ao anel A. O anel C é heterocíclico com seis membros, pode ser encontrado com cinco membros (ex. auronas) ou na sua forma acíclica (chalconas) (DI CARLO et al., 1999; SISA et al., 2010). Os anéis (A, B e C) recebem a numeração com números ordinários para os núcleos A e C e os mesmos números seguidos por uma linha (') para o núcleo B (SIMÕES et al., 2017).

Diversos estudos mostraram que estes metabólitos promovem várias atividades terapêuticas. Eles evitam a formação de radicais livres, exercem atividade anti-inflamatória por inibir enzimas da via do ácido araquidônico (COX-1, COX-2, 5-LOX) e outros mediadores da inflamação (elastase, histamina, etc.). Além disso, outras atividades foram comprovadas, como anti-hemorragica, espasmolítica, diurética e antitumoral (MIDDLETON et al., 2000; NIJVELDT et al., 2001; REVANKAR et al., 2017). Sugeriu-se também que alguns flavonoides diminuem o risco de doença coronariana (MOJZISOVA et al., 2001; ISHIZAWA et al., 2011), e dietas ricas de flavonoides têm efeitos benéficos contra a resistência à insulina (CHUDNOVSKIY et al., 2014; BLUNDER et al., 2017).

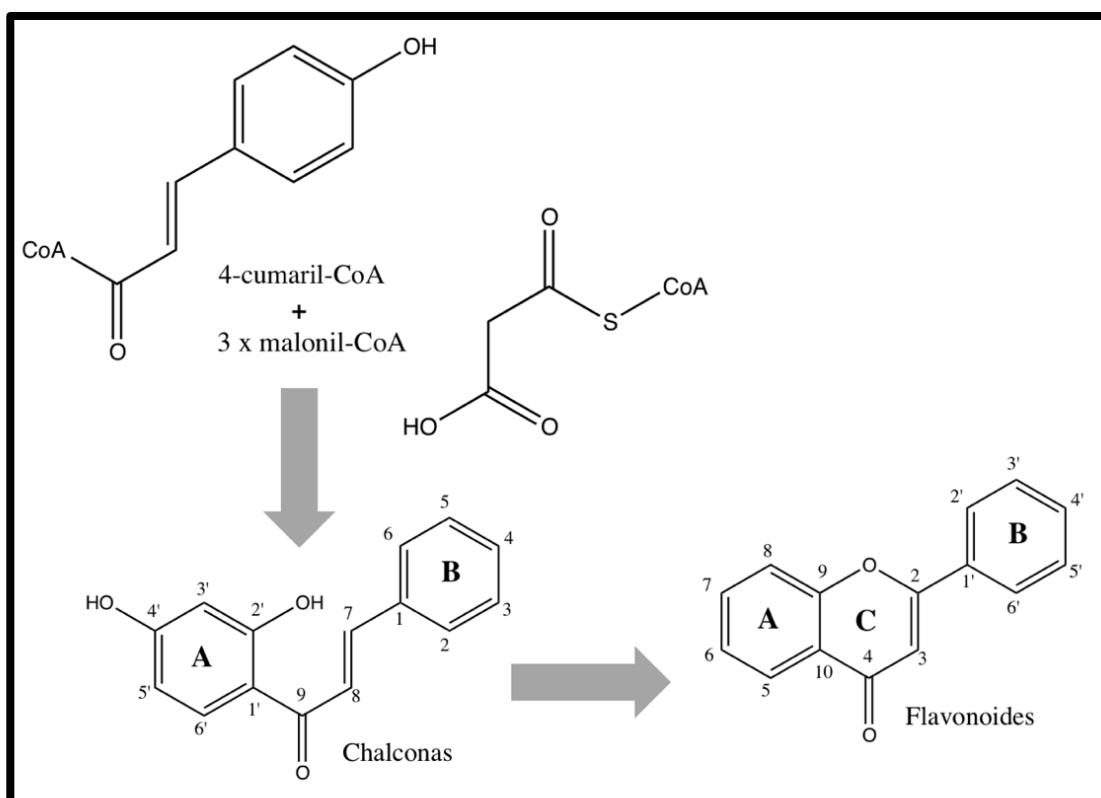
### **3.3.1.1. Classificação dos flavonoides**

Alguns tipos de flavonoides podem ser tanto intermediários na biossíntese, quanto produtos finais, os quais se acumulam no tecido vegetal. Nestes, se incluem as chalconas (a primeira estrutura com 15 carbonos derivada

do malonil-coenzima A e do 4-cumaril-coenzima A) (Figura 3), flavanonas, flavanon-3-óis e flavan-3,4-dióis (BUCKINGHAM; MUNASINGHE, 2015).

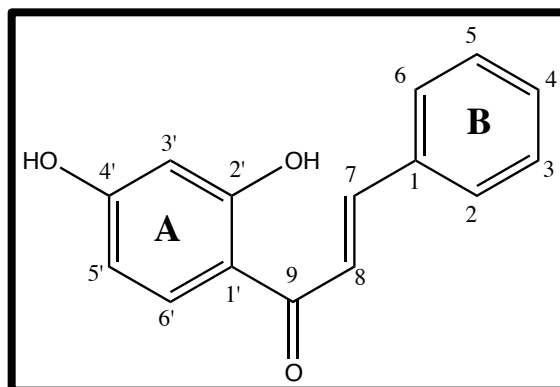
A ampla diversidade estrutural exibida na classe nos flavonoides advém de transformações químicas que ocorrem na estrutura básica destes compostos, as quais podem ser por meio de hidroxilação, metilação, acilação, glicosilação, hidrogenação, malonilação e sulfatação (DI CARLO et al., 1999; MACHADO et al., 2010).

**Figura 3** – A chalcona como intermediária no metabolismo dos flavonoides.



Fonte: Adaptado de Simões et al. (2017)

Um dos principais intermediários da biossíntese dos flavonoides são as chalconas, que apresentam uma cadeia aberta possuindo uma estrutura básica (Figura 4) formada por dois anéis aromáticos ligados por três carbonos que formam um sistema  $\alpha,\beta$ -carbonila insaturada (ÁVILA, 2008).

**Figura 4** – Estrutura básica das chalconas.

Fonte: Simões et al. (2017)

As chalconas têm uma gama de atividades biológicas comprovadas cientificamente, como por exemplo, efeito antimicrobiano, anticâncer, anti-inflamatório, antioxidante entre outros (LE BAIL et al., 2001). Estes efeitos foram atribuídos à porção cetona  $\alpha,\beta$ -insaturada das moléculas (MING et al., 2017; YADAV et al., 2011), a remoção desta característica, mostrou ser capaz de também anular as atividades. Isômeros das flavanonas, elas se apresentam na configuração *cis*- e *trans*-, e podem ser facilmente ciclizada para flavanonas (SINGH et al., 2014). A ciclização geralmente consiste na reação das chalconas com 1-2% de ácido e catalisadores básicos, seguida do fechamento do anel (AKSÖZ et al., 2011).

### 3.3.2. Considerações sobre a espécie estudada

*Varronia dardani* é endêmica da caatinga do Brasil, distribuída em Estados do Nordeste do país como: Ceará, Pernambuco, Bahia, Alagoas, Paraíba e Rio Grande do Norte. A espécie foi descrita por apresentar ramo subcilíndricos, folhas alternas (Figura 5), pecíolo sulcado e viloso com inflorescência espiciforme (Figura 6), congesta, terminal e axilar; pedúnculo densamente viloso (MELO, 2012).

**Figura 5** – Folhas de *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill.



Fonte: DUARTE, 2015, p.19.

**Figura 6** – Inflorescência de *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill.



Fonte: The Field Museum, Tropical Plants Guide  
Disponível em: <[www.fm2.fieldmuseum.org/plantguides/view.asp?checkbox=20798](http://www.fm2.fieldmuseum.org/plantguides/view.asp?checkbox=20798)> Acesso em  
jan. 2018.

São poucos os estudos relacionados à *Varronia dardani*. A triagem fitoquímica realizada por Duarte, no ano de 2015, identificou a presença de taninos flabobênicos, flavononóis, catequinas, flavanonas e quinonas em sua

composição. A análise cromatográfica do óleo essencial da *V. dardani* possibilitou a identificação de compostos como o limoneno, 1,8-cineol e o linalol, cujos estudos relatam uma contribuição relevante nas áreas: biológica, farmacêutica e cosmética. O óleo essencial desta espécie também mostrou eficácia no teste antifúngico e larvicida (DUARTE, 2015).

O estudo realizado por De Oliveira em 2016, investigou a composição química do óleo essencial de *V. dardani* e a avaliação de seu potencial antimicrobiano frente às cepas de importância principalmente na medicina veterinária. Através da caracterização do óleo essencial, destacaram-se como compostos majoritários o d-limoneno, 1,8 cineol, linalol,  $\alpha$ -terpineol, terpinen-4-ol, 2E,6E acetato de farnesol e o 2E,6E-farnesol. Este óleo apresentou uma atividade antimicrobiana frente aos microrganismos *Colletotrichum gloeosporioides*, *Lasiodiplodia theobromae*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Cryptococcus neoformans*. Ainda no mesmo estudo, foram relatados os isolamentos de duas naftoquinonas (cordiaquinona A e cordiaquinona B) do extrato diclorometano das raízes e de dois flavonoides do extrato hidroalcoólico das folhas (pinocembrina e sakuranetina 4'-metil éter).

### 3.3.3. Óleos essenciais

Há muito tempo, os óleos essenciais são utilizados como bactericidas, fungicidas, larvicidas, inseticidas, em aplicações cosméticas e farmacêuticas, na agricultura e indústria alimentícia (BAKKALI et al, 2008; DOSSOUKPEVI et al., 2016). Esses óleos, também chamados de óleos voláteis, etéreos ou essências, são misturas complexas voláteis, lipofílicas, com baixo peso molecular, comumente líquidas e odoríferas (MORAIS, 2009), podem ser extraídos dos vegetais mediante destilação por arraste a vapor e são comumente encontrados nos tricomas glandulares que se projetam da epiderme e agem como “advertência” sobre a toxicidade do vegetal, repelindo potenciais herbívoros, mesmo antes que ataquem as plantas (TAIZ et al. 2017; BIZZO et al, 2009).

O número de componentes de um óleo volátil costuma variar de 20 a 200, a maioria apresenta estrutura terpenoídica ou fenilpropanoídica, as primeiras possuem, geralmente, em seu esqueleto carbônico múltiplos de cinco átomos de

carbono: 10 átomos de carbono (monoterpenos), 15 átomos de carbono (sesquiterpenos) e 20 átomos de carbono (diterpenos). A volatilidade dos terpenos está associada ao tamanho da cadeia carbônica, sendo assim os monoterpenos são muito voláteis, os sesquiterpenos apresentam média volatilidade e os diterpenos são, praticamente, não voláteis. Já os fenilpropanoides possuem como característica molecular um anel fenila ligado a uma cadeia lateral com três átomos de carbono (ALMEIDA, 2015; HEINZMANN et al, 2017).

As composições de óleos essenciais obtidos a partir de diferentes espécies de vegetais refletem a resposta do metabolismo às condições ambientais específicas, como solo, clima, altitude e luminosidade (CARVALHO et al., 2006). Os vegetais produzem metabólitos primários, responsáveis por processos imprescindíveis à vida, logo, moléculas comuns no reino vegetal, como os açúcares simples, os aminoácidos, as proteínas e os ácidos nucleicos. Além disso, produzem metabólitos secundários, derivados de componentes do metabolismo basal, cuja função individual não é considerada fundamental à sobrevivência das células, e podem apresentar potencial relevância terapêutica (WOLFFENBÜTTEL, 2007; KREIS et al., 2017).

A análise da composição de um óleo essencial, pode ser realizada através da cromatografia gasosa, na qual a operação básica consiste na volatilização da amostra após a injeção no equipamento (SPARKMAN, 2011). O acoplamento com o espectrômetro de massas associa os benefícios da cromatografia (elevada seletividade) com os da espectrometria de massas (auxílio na obtenção de dado estrutural) (VÉKEY, 2001).

Na família Boraginaceae, diversas espécies foram estudadas quanto a composição química dos seus óleos essenciais, incluindo-se nestas a *Cordia verbenacea* DC. (erva-baleeira), a qual originou os fitoterápicos Acheflan<sup>®</sup>, formulado pela Aché Pharmaceutical Laboratories no Brasil, e contém cerca de 2,3 – 2,9% de  $\alpha$ -humuleno e é indicado para o tratamento de tendinite crônica e dores miofasciais (DE OLIVEIRA et al., 2017; DUTRA et al., 2016; QUISPESCONDORI et al., 2008); e o Rowachol<sup>®</sup>, formulado pela Rowa Pharmaceuticals na Irlanda, é uma mistura de terpenos ( $\alpha$ -pineno,  $\beta$ -pineno, mentol, mentona, canfeno, borneol e cineol) que aumenta a solubilidade do colesterol, carbonato

de cálcio e fosfato de cálcio, o que o torna um agente potente colerético (HAN et al., 2016; LEE et al., 2011).

### 3.4. Biofilme dental

O biofilme dental pode ser definido como sendo uma comunidade microbiológica, caracterizada por desenvolver-se sobre a superfície dentária, sendo envolvida por uma matriz extracelular formada de polímeros, a qual pode ser de origem microbiana (exopolissacarídeos – EPS) e/ou do próprio hospedeiro (HOJO et al., 2009; MARSH, 2004; DONLAN & COSTERTON, 2002). Esses microrganismos exibem um comportamento de grupo coordenado, essencial no desenvolvimento das doenças periodontais e das cáries dentárias (BASAVARAJU et al., 2016; MOORE & MOORE, 1994).

Alguns dos microrganismos causadores de doenças na cavidade oral e com capacidade para formar biofilmes são *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus salivarius* e *Streptococcus oralis* (KAWADA-MATSUO & KOMATSUZAWA, 2017; TINOCO et al., 2016). Estas espécies são as principais causadoras de endocardite e são frequentemente associadas com a falha do tratamento endodôntico (FAN et al., 2018; RICUCCI & SIQUEIRA, 2010; DOUGLAS et al., 1993).

A resistência aos antibióticos pelas células bacterianas presentes em um biofilme foi estabelecida como sendo 1.000 a 1.500 vezes maior do que a resistências das bactérias “livres”, chamadas de células plactônicas (HUANG et al., 2011; LEVY, 1998). A presença de matriz extracelular, em conjunto com o impedimento das barreiras locais e o microambiente oral alterado, reduz o acesso ao fármaco utilizado no tratamento, desencadeando a resistência bacteriana aos antimicrobianos, aumentando assim, a estabilidade mecânica dos biofilmes, tornando-os difíceis de tratar ou remover (GAO et al, 2016; DE OLIVEIRA et al., 2018).

Baseado nestas informações, torna-se extremamente importante a pesquisa de novos tratamentos envolvendo tanto a inibição do crescimento

microbiano, quanto a desestabilização dessa matriz (EPS), a fim de aumentar a eficácia do tratamento da doença dentária (FERNANDES et al., 2018; HALL-STOODLEY et al., 2004).

# *Material e Métodos*

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. Material e equipamentos utilizados

Para as análises das amostras em Cromatografia em Camada Delgada (CCDA) foram utilizadas placas de sílica gel 60 PF254 7749 (Merck).

As visualizações das placas foram realizadas através da exposição à lâmpada de irradiação ultravioleta com dois comprimentos de onda (254 e 366 nm) por meio de aparelho MINERALIGHT, modelo UVGL-58. Além disso foi utilizado como revelador uma câmara saturada com vapores de iodo. As frações foram reunidas de acordo com os seus perfis cromatográficos observados por esta técnica.

Os pontos de fusão das amostras foram determinados em aparelho digital da marca Microquímica, modelo MQAPF-302, com bloco de platina em microscópio óptico tipo *Kopfle*, marca REICHERT, modelo R3279, com temperatura que variava de 0 a 350° C.

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  (RMN de  $^1\text{H}$ ) e de  $^{13}\text{C}$  (RMN de  $^{13}\text{C}$ ) e HMBC foram obtidos em espectrômetros das marcas Varian-System e Bruker, operando a 500 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 125 ( $^{13}\text{C}$ ) e (400 MHz ( $^1\text{H}$ ) e 100 ( $^{13}\text{C}$ ) respectivamente. As amostras para análise foram preparadas solubilizando-as em solvente deuterado da *Cambridge Isotope Laboratories* ( $\text{CDCl}_3$  e  $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Os deslocamentos químicos ( $\delta$ ) foram expressos em partes por milhão (ppm) e foram referenciados para RMN de  $^1\text{H}$  pelos picos característicos dos hidrogênios pertencentes às frações não deuteradas destes solventes: clorofórmio ( $\delta_{\text{H}}$  7,24) e metanol ( $\delta_{\text{H}}$  3,30). Para os espectros de RMN de  $^{13}\text{C}$ , estes mesmos parâmetros foram utilizados: clorofórmio ( $\delta_{\text{C}}$  77,00), metanol ( $\delta_{\text{C}}$  49,00). As multiplicidades no espectro de RMN  $^1\text{H}$  foram indicadas segundo as convenções: s (simpleto), sl (simpleto largo), d (duplete), dd (duplo duplete), m (multiplete).

Um aparelho de Média Pressão (BÜCHI Sepacore® Easy Purification Systems) foi utilizado para cromatografar a fase diclorometano do extrato etanólico bruto de *Varronia dardani*.

Para obtenção dos espectros de massas foi utilizado um espectrômetro da Bruker Ion-Trap AmazonX.

Foi utilizado para a caracterização química do óleo essencial da espécie em estudo, um cromatógrafo CG-EM (Cromatografia gasosa acoplada à espectroscopia de massa) QP2010 Ultra - Shimadzu, equipado com coluna apolar de sílica Rtx-5ms (30 m x 0,25 mm x 0,25 µm). Realizou-se a consulta à biblioteca NIST *Mass Spectral Library* (*National Institute of Standards and Technology*) e a literatura para a identificação dos compostos.

## **4.2. Material Vegetal**

### **4.2.1. Coleta e identificação do material vegetal**

O material vegetal (partes aéreas) de *Varronia dardani* foi coletado no município de Serra Branca, estado da Paraíba, em 25 de janeiro de 2016 e a exsiccata desta espécie encontra-se catalogada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier (JPB) do Centro de Ciências Exatas e da Natureza – UFPB, sob registro JPB 29509 sendo identificado pelo botânico Prof. Dr. José Iranildo de Melo do Departamento de Ciências Biológicas – UEPB.

### **4.2.2. Processamento do material vegetal de *Varronia dardani***

O material vegetal (folhas), foi desidratado em estufa com ar circulante à temperatura de 40 °C durante 72 horas. Após secagem, foi submetido a um processo de pulverização em moinho mecânico, obtendo-se 1,3 kg do pó planta.

### **4.3. Obtenção do extrato etanólico bruto (EEB) das folhas de *V. dardani***

O material vegetal seco e pulverizado foi submetido à maceração com etanol (EtOH) a 95 %. Foram feitos três processos de extração em um intervalo de 72 horas cada. A solução etanólica obtida foi filtrada, realizando-se, em

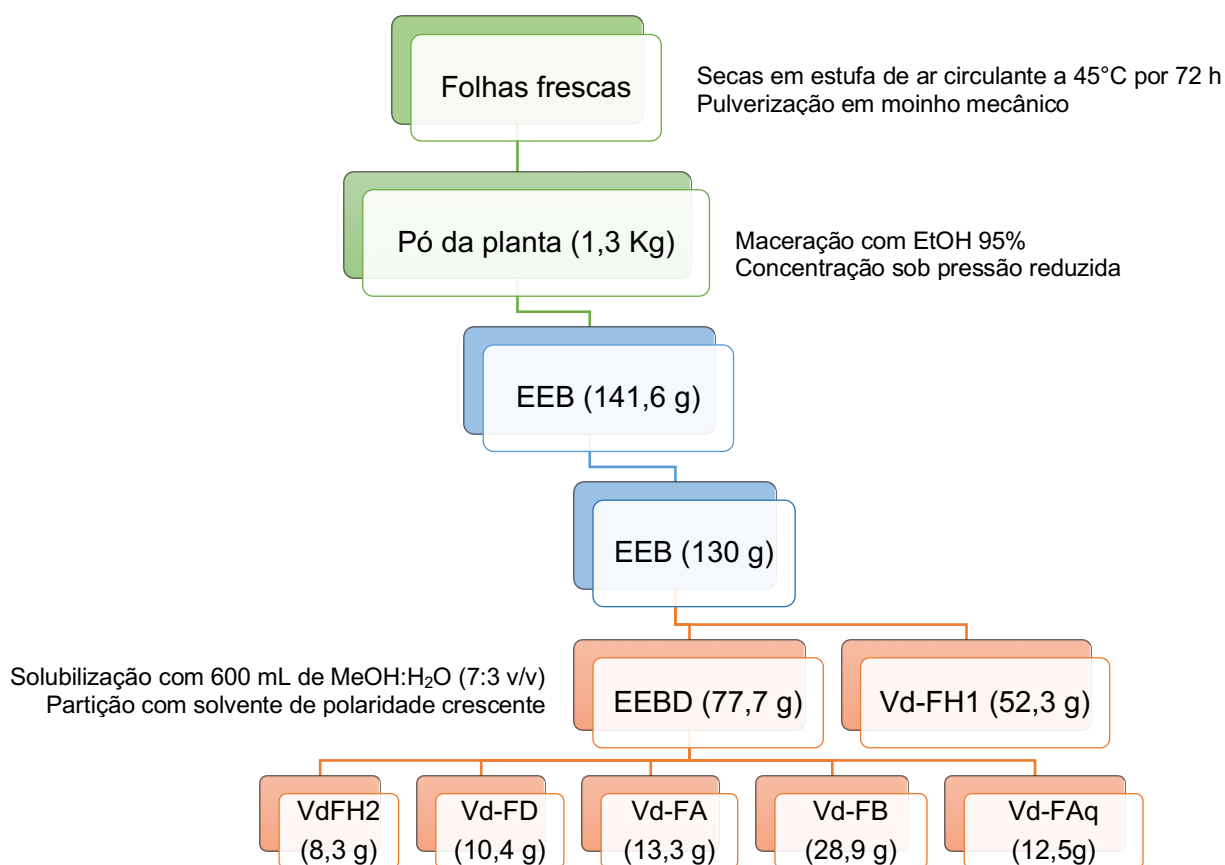
seguida, a evaporação do solvente com o auxílio de um rotaevaporador sob pressão reduzida a uma temperatura média de 40 °C. Após esse processo de evaporação do solvente, obteve-se o extrato etanólico bruto (EEB) (Esquema 1).

#### **4.4. Fracionamento do extrato etanólico bruto (EEB) das folhas de *V. dardani***

Uma parte do extrato etanólico bruto (130 g) foi submetida a um desengorduramento com hexano, a parte solúvel foi concentrada sob pressão reduzida resultando na Primeira Fase Hexânica de *V. dardani* (VDFH1) (52,3 g). Já a parte insolúvel retida em papel filtro, chamada de Extrato Etanólico Bruto Desengordurado (EEBD) (77,7 g), foi diluída em uma solução de metanol/água (600 mL, 7:3 v/v) e homogeneizada sob agitação mecânica durante aproximadamente 60 minutos. Essa solução hidrometanólica foi submetida à uma partição líquido/líquido, em uma ampola de separação, sob agitação manual utilizando consecutivamente solventes de polaridades crescentes, obtendo-se as fases: hexânica (segunda fase), diclorometano, acetato de etila e butanólica.

As soluções obtidas no processo de partição foram tratadas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro, para que fosse retirado o excesso de água, e submetidas à filtração sob pressão reduzida. Após esse processo, os solventes foram evaporados em evaporador rotativo sob pressão reduzida à uma temperatura média de 40 °C, obtendo-se: 8,3 g da segunda fase hexânica; 10,4 g da fase diclorometano; 13,3 g da fase acetática; 28,9 g da fase butanólica e 12,5 g da fase aquosa (Esquema 1).

**Esquema 1** – Obtenção e fracionamento do Extrato Etanólico Bruto (EEB) das folhas de *Varronia dardani*.



**Legenda:** EEBD – Extrato etanólico bruto desengordurado; Vd-FH1 – Primeira fase hexânica de *V. dardani*; Vd-FH2 – Segunda fase hexânica de *V. dardani*; Vd-FD – Fase diclorometano de *V. dardani*; Vd-FA – Fase acetática de *V. dardani*; Vd-FB – Fase butanólica de *V. dardani*; Fase aquosa de *V. dardani*.

#### 4.5. Processamento cromatográfico da fase diclorometano por Cromatografia Líquida sob Média Pressão (CLMP)

Uma alíquota da fase diclorometano (2 g) foi submetida à cromatografia em coluna sob média pressão, utilizando como fase estacionária, 51 g de sílica gel 60 (7734 Merck - 0,063 – 0,200 mm) e uma coluna de vidro cilíndrica adequada. Como fase móvel, foram utilizados hexano, diclorometano (DCM) e metanol (MeOH), em sistema gradiente e isocrático, distribuídos em nove ciclos, todos com o fluxo a 15 mL/min (Tabela 1). Foram coletadas 13 frações com 100 mL cada, as quais foram concentradas em evaporador rotativo a vácuo à temperatura média de 40 °C.

**Tabela 1** – Método utilizado na cromatografia sob média pressão da fase diclorometano de *Varronia dardani*.

Ciclo	Método	Frações coletadas
1º	Isocrático - 100% Hexano	Vd-FD-FR1
2º	Gradiente - Hexano e DCM (1:0 – 4:1)	Vd-FD-FR2 – Vd-FD-FR3
3º	Gradiente - Hexano e DCM (4:1 – 1:1)	Vd-FD-FR4 – Vd-FD-FR5
4º	Gradiente - Hexano e DCM (1:1 – 1:4)	Vd-FD-FR6
5º	Gradiente - Hexano e DCM (1:4 – 0:1)	Vd-FD-FR9
6º	Gradiente - MeOH e DCM (0,1:9,9 – 1:19)	Vd-FD-FR8 – Vd-FD-FR9
7º	Gradiente - MeOH e DCM (1:19 – 1:9)	Vd-FD-FR10
8º	Gradiente - MeOH e DCM (1:9 – 3:7)	Vd-FD-FR11 – VDFR-12
9º	Gradiente - MeOH e DCM (3:7 – 1:1)	Vd-FD-FR13

**Legenda:** DCM – Diclorometano; MeOH – Metanol.

#### 4.6. Processamento cromatográfico das frações por Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA)

Ao solubilizarem-se as 13 frações em metanol para a realização da CCDA, algumas apresentaram precipitados de cor alaranjada, os quais foram separados, obtendo-se assim 16 frações ao todo.

Após a análise por CCDA, foram reunidas algumas frações de acordo com os seus respectivos fatores de retenção (Rfs).

#### 4.7. Métodos espectrométricos

#### 4.8. Obtenção do óleo essencial e caracterização química

O óleo essencial foi obtido utilizando equipamento tipo Clevenger (Marconi, modelo M480) através da metodologia padrão de arraste por vapor d'água.

A caracterização química do óleo foi realizada em Espectrofotômetro de Massas acoplado a Cromatógrafo Gasoso (CG-EM), GCMS/QP2010 Ultra - Shimadzu, equipado com coluna RTX-5MS (5% Diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane) (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 e fluxo de 1,7 mL/min; injetor no modo split (1:100); gradiente crescente de temperatura de 4 °C/min, de 40 a 180 °C e 20 °C/min de 180 a 280 °C. As temperaturas do injetor e detector foram de 250 e 290 °C, respectivamente. Os espectros foram obtidos numa faixa  $m/z$  10 – 460 Da.

A identificação dos compostos presentes no óleo essencial foi realizada através da análise dos espectros de massa, consulta à biblioteca NIST *Mass Spectral Library* (*National Institute of Standards and Technology*) e com base na literatura.

#### **4.9. Atividade antimicrobiana**

A avaliação da atividade antimicrobiana foi realizada no Laboratório de Desenvolvimento e Ensaio de Medicamentos (LABDEM) situado no Departamento de Farmácia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), sob orientação da Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Ana Cláudia Dantas de Medeiros.

##### **4.9.1. Cepas testadas**

Os microrganismos utilizados foram *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073) e *Streptococcus oralis* (ATCC 10557). Padronizou-se o inóculo microbiano utilizando a espectrofotometria, no comprimento de onda de 625 nm de modo a obter a transmitância de 85%, conforme determina a CLSI - *Clinical and Laboratory Standards Institute* (2012).

##### **4.9.2. Meios de cultura**

Foram empregados meios de cultura desidratados, disponíveis no comércio, os quais foram reconstituídos com água destilada, conforme as especificações do fabricante. Para realização dos testes antimicrobianos foram utilizados os meios ágar e caldo Mueller Hinton (HIMEDIA®), caldo BHI (HIMEDIA®).

#### 4.9.3. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) do extrato etanólico bruto de *Varronia dardani* (Vd-EEB), da sua fase diclorometano (Vd-FD), do óleo essencial (Vd-OE), das flavanonas e chalconas isoladas e/ou em misturas foi realizada através da técnica da microdiluição em caldo, proposta pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2012), com algumas modificações.

O inóculo foi padronizado em tubos contendo 5 mL de solução salina (NaCl 0,9%) estéril. A suspensão microbiana foi ajustada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 625 nm, a qual equivalente a  $10^6$  UFC/mL. Para essa etapa, as amostras foram solubilizadas em DMSO 10%. Cem microlitros de cada amostra foram diluídos em série com caldo *Brain Heart Infusion* (BHI), em uma placa de 96 poços, assim como o controle positivo (Clorexidina a 0,20% - *Sigma-Aldrich*). Dez microlitros do inóculo com o microrganismo foi adicionado nos poços. As placas foram incubadas a  $37 \pm 0,5$  °C, por 24 horas. O crescimento bacteriano foi indicado pela adição de 20 µL da solução aquosa de resazurina (*Sigma-Aldrich*) a 0,01% com posterior incubação a  $37 \pm 0,5$  °C, por duas horas. Bactérias viáveis reduziram o corante, mudando sua coloração para rosa e a CIM foi definida como a menor concentração da substância que inibiu a mudança de coloração da Resazurina®.

#### 4.9.4. Inibição da Formação de Biofilme (IFB)

As mesmas cepas citadas anteriormente foram utilizadas para avaliação da inibição da formação de biofilme (IFB) das amostras. Para tanto, o inóculo foi padronizado em tubos contendo 5 mL de solução salina a 0,9% estéril. A suspensão microbiana foi ajustada em espectrofotômetro, no comprimento de onda de 625 nm, a qual equivalente a  $10^6$  UFC/mL. Para essa etapa, as amostras foram solubilizadas em DMSO 10%. Cem microlitros de cada amostra em uma concentração de 4,0 mg/mL foram diluídas em série em caldo Mueller-Hinton enriquecido com 15% de sacarose em uma placa de 96 poços, bem como o controle positivo (clorexidina a 0,20%). Cem microlitros do inóculo foi colocado

nos poços. A placa foi então encubada a  $37,0 \pm 0,5$  °C por 48 horas. Após esse período, a placa foi lavada duas vezes com solução salina a 0,9% e secas na estufa a  $37,0 \pm 0,5$  °C por 45 minutos. Ao término do tempo, adicionou-se 100 µL de cristal violeta a 0,4% em cada poço, esperou-se mais 45 minutos para lavar a placa quatro vezes com água destilada, secar a temperatura ambiente e adicionar 200 µL de etanol 95° em cada poço. Decorridos 45 minutos, 100 µL de cada poço foi retirado e colocado em uma nova placa de 96 poços para a leitura em um espectrofotômetro (EZ Read 2000 – Biochrom) em um comprimento de onda de 590 nm.

O percentual de inibição da formação de biofilme foi calculado conforme equação abaixo e classificado segundo o escore (Quadro 3) proposto por Peixoto e colaboradores (2017).

$$I\% = [(A_{AM} - A_{CN}) / (A_{CP} - A_{CN})] \times 100$$

**Quadro 3** – Escore proposto por Peixoto e colaboradores (2017), para a classificação do percentual de inibição do biofilme.

<i>Escore</i>	Valor de Referência	Categoria
0	$\leq 25\%$	Sem inibição
1	$25 < x \leq 50$	Fraca inibição
0	$50 < x \leq 75$	Inibição moderada
3	$75 < x \leq 100$	Forte inibição

# *Resultados e Discussão*

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Identificação estrutural de Vd-1

A substância codificada como Vd-1 foi isolada na forma de cristais alaranjados e solúveis em MeOH com P.F.= 162 – 164 °C. O espectro de massas obtido por ESI-MS mostrou o pico do íon molecular em m/z 269.41 [M-H]<sup>-</sup> compatível com a fórmula molecular C<sub>16</sub>H<sub>14</sub>O<sub>4</sub>.

No espectro de RMN de <sup>13</sup>C APT (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) (Figuras 7 e 8, p. 50) foi possível observar a presença de 12 sinais correspondentes a 16 átomos de carbono. Os sinais foram atribuídos a seis carbonos não hidrogenados, nove carbonos metínicos, um carbono metílico e nenhum sinal foi atribuído a carbonos metilênicos. Os sinais com deslocamentos químicos em δ<sub>C</sub> 194,32; 128,78 e 143,15 quando comparados com a literatura (WEI et al., 2013), sugeriram tratar-se de um esqueleto de flavonoide do tipo chalcona, e foram atribuídos aos carbonos C-9 (carbonílico), C-8 (α-carbonila), e C-7 (β-carbonila), respectivamente. A presença dos sinais em δ<sub>C</sub> 167,81 e 165,83 inferiu uma oxigenação nos carbonos C-4', C-2' e C-6', respectivamente. Observou-se ainda um sinal de carbono metílico em δ<sub>C</sub> 55,86 que de acordo com a literatura foi atribuído ao carbono de uma metoxila (OCH<sub>3</sub>). Os demais dados de carbonos estão compilados na Tabela 2 (p. 49).

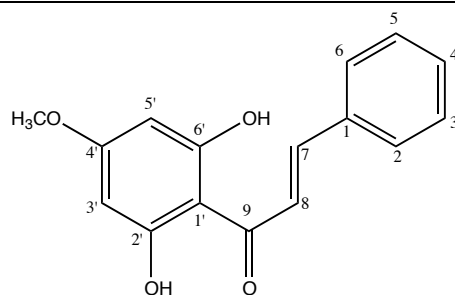
O espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) (Figuras 9 – 10, p. 51) mostrou um simpleto largo em δ<sub>H</sub> 3,76 integrando para três hidrogênios, característico de metoxila ligada a anel aromático. Os hidrogênios e carbonos das posições 3' e 5', foram atribuídos aos mesmos deslocamentos químicos, sugerindo assim, uma simetria molecular do anel A da chalcona. Sendo assim, com base nestes dados, foi possível inferir que a metoxila estaria então na posição *para*, enquanto haviam duas hidroxilas, cada uma substituindo uma posição *meta* entre si do anel A. Na região desprotegida do espectro encontraram-se sinais de hidrogênios aromáticos δ<sub>H</sub> 7,38 – 7,36 (m, 3H) e 7,59 (dd, 2H; J = 8 Hz e J = 2 Hz) que sugeriram a presença de um anel aromático monossustituído (anel B). Em δ<sub>H</sub> 8,18 (d; 1H; J = 15,5 Hz) e δ<sub>H</sub> 7,71 (d; 1H; J = 15,5 Hz), foram observados os sinais referentes aos carbonos alfa (Cα) e beta (Cβ) que caracterizam a

ligação dupla das chalconas com uma geometria *trans* ( $J = 15,5$ ). Os demais sinais estão compilados na Tabela 2.

Assim, após comparação dos dados de RMN de Vd-1 com os descritos na literatura, foi possível concluir que o composto se trata da pinostroquina chalcona (2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona), a qual é derivada do flavonoide pinostroquina. Esse composto está sendo relatado pela primeira vez na família em estudo. O composto pinostroquina chalcona já foi isolado em espécies das famílias Piperaceae (MARQUES et al., 2015; MARQUES et al., 2013), Zingiberaceae (CHAURASIYA et al., 2017; MALEK et al., 2011), Juglandaceae (CAO et al., 2011), entre outras.

**Tabela 2** – Dados de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-1, 2',6'-dihidroxi-4'-metoxichalcona (pinostroquina chalcona) em comparação aos dados obtidos por WEI e colaboradores (2013), nas mesmas condições.

Posição	Vd-1		Referência	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
1	-	136,95		136,96
2	7,59 (dd; 2H; $J = 8$ e 2 Hz)	129,92	7,59 (dd; 2H; $J = 8$ Hz e 1,5 Hz)	129,97
3	7,38 – 7,36 (m; 3H)	129,32	7,37 – 7,36 (m; 3H)	129,36
4	7,38 – 7,36 (m; 3H)	131,09	7,37 – 7,36 (m; 3H)	131,15
5	7,38 – 7,36 (m; 3H)	129,32	7,37 – 7,36 (m; 3H)	129,36
6	7,59 (dd; 2H; $J = 8$ e 2 Hz)	129,92	7,59 (dd; 2H; $J = 8$ e 1,5 Hz)	129,97
7	7,71 (d; 1H; $J = 15,5$ Hz)	143,15	7,71 (d; 1H; $J = 15,5$ Hz)	143,20
8	8,18 (d; 1H; $J = 15,5$ Hz)	128,78	8,19 (d; 1H; $J = 15,5$ Hz)	128,75
9	-	194,32	-	194,30
1'	-	106,63	-	106,60
2'	-	165,83	-	165,89
3'	5,94 (sl; 2H)	94,60	5,93 (s; 2H)	94,56
4'	-	167,81	-	167,84
5'	5,94 (sl; 2H)	94,60	5,93 (s; 2H)	94,56
6'	-	165,83	-	165,89
4'-OCH <sub>3</sub>	3,76 (sl; 3H)	55,86	3,76 (sl; 3H)	55,88



Pinostroquina chalcona

Figura 7 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de Vd-1.

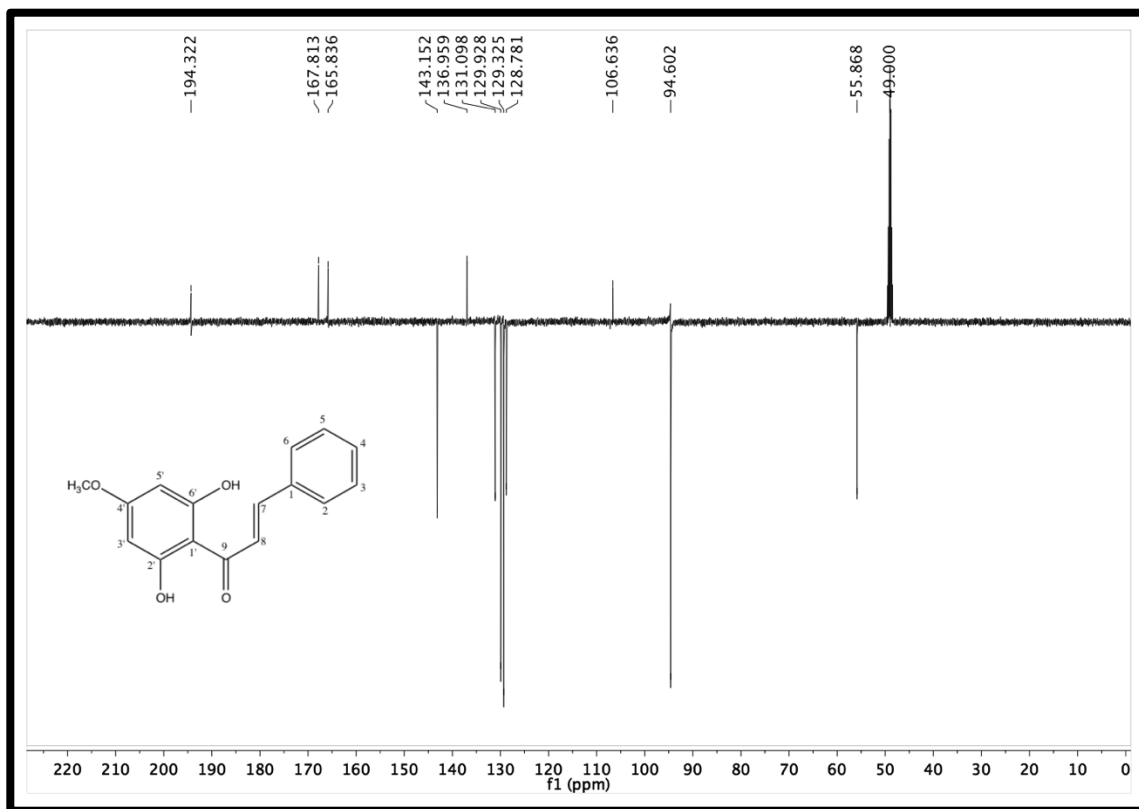


Figura 8 – Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de Vd-1 na região de 119 – 150 ppm.

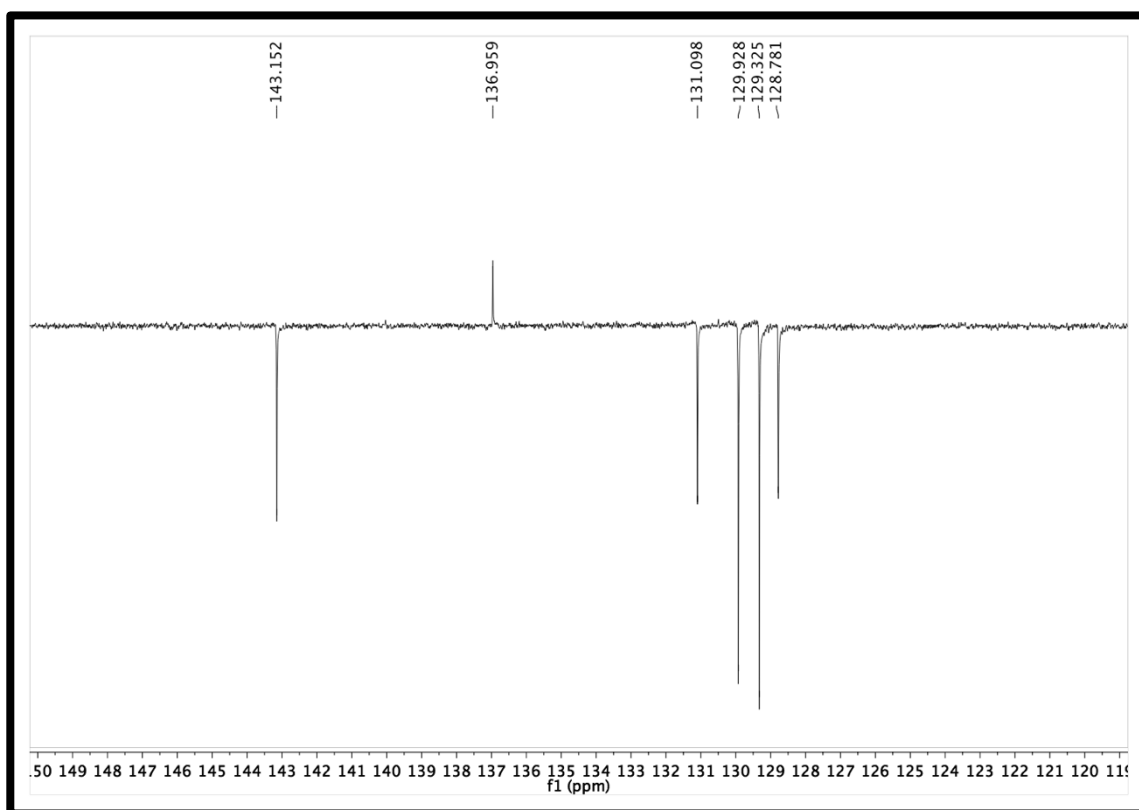


Figura 9 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de Vd-1.

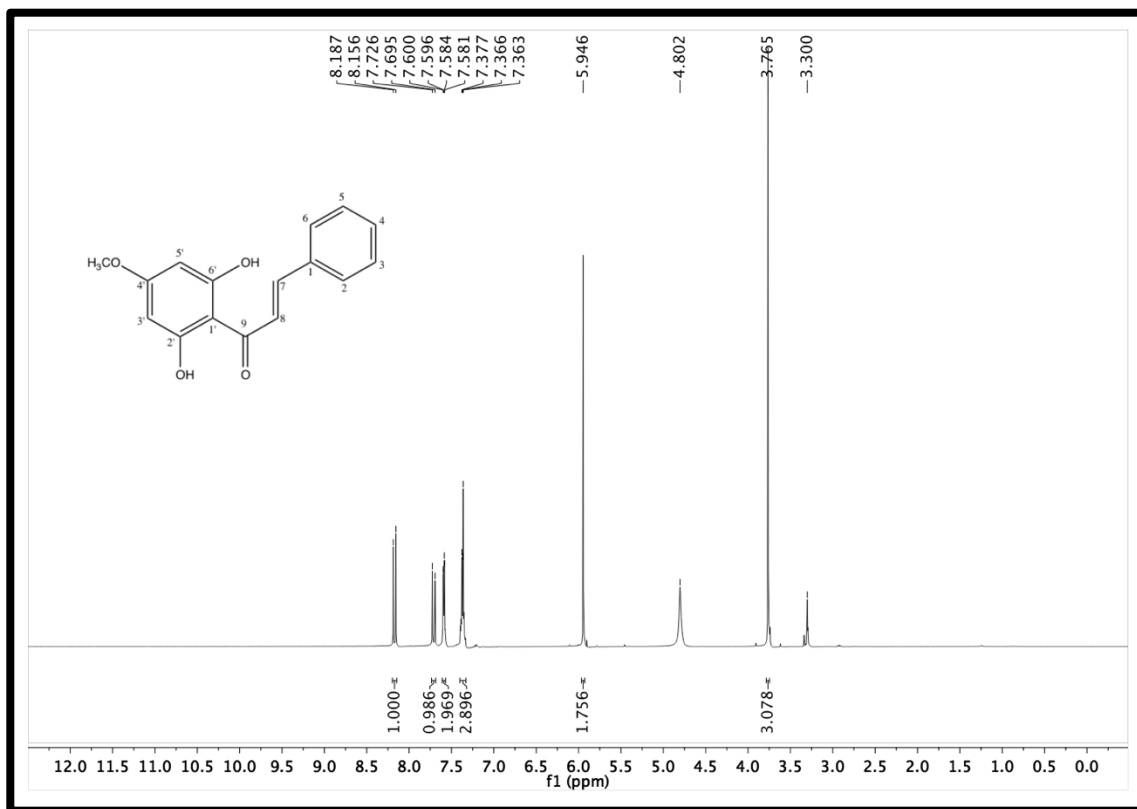
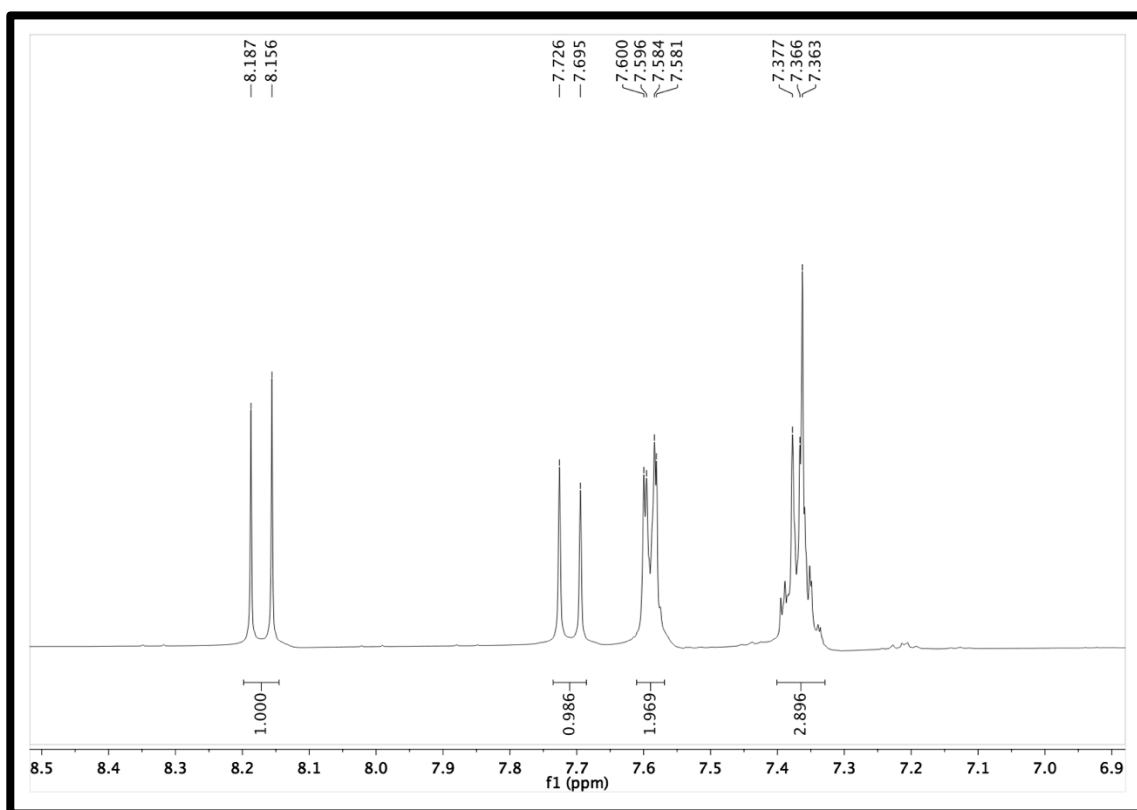


Figura 10 – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de Vd-1 na região de 6,90 – 8,50 ppm.



## 5.2. Identificação estrutural de Vd-2

O composto codificado como Vd-2 apresentou-se em forma de cristais alaranjados com P.F.= 153 – 171 °C. O espectro de massas obtido por ESI-MS mostrou dois picos, um em  $m/z$  269.44  $[M-H]^-$  compatível com a fórmula molecular  $C_{16}H_{14}O_4$  e outro em  $m/z$  299.63  $[M-H]^-$  compatível com a fórmula molecular  $C_{17}H_{16}O_5$ , condizente com parâmetros de uma mistura.

Observando o espectro de RMN  $^{13}C$  APT (100 MHz,  $CD_3OD$ ) (Figura 14, p. 55), foram identificados 22 sinais referentes a 33 carbonos, sugerindo tratar-se de uma mistura de dois compostos com esqueleto flavonoídico.

O espectro de RMN  $^1H$  de Vd-2 (400 MHz,  $CD_3OD$ ) (Figura 11, p. 54), quando comparado com Vd-1 mostrou uma semelhança de sinais, porém foram observados dois simpletos integrando para dois hidrogênios cada, ausentes em Vd-1, característicos de metoxila ligada a anel aromático. O espectro exibiu ainda dois dupletos em  $\delta_H$  7,60 e  $\delta_H$  6,98, integrando para dois hidrogênios cada, o que permitiu sugerir um sistema AA'BB'. Esses dados corroboraram com a hipótese de que Vd-2 estaria em mistura com Vd-1. Os demais deslocamentos químicos exibidos nos experimentos de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  estão compilados na Tabela 3 (p. 53).

As posições das metoxilas no composto Vd-2, foram evidenciadas através da análise do espectro bidimensional de correlação heteronuclear HMBC (Figura 17, p. 57), onde foi observada uma correlação entre os dois simpletos em  $\delta_H$  3,85 e 3,81, correspondentes aos hidrogênios das metoxilas e o sinal para carbono não hydrogenado e oxigenado em  $\delta_C$  163,03 e  $\delta_C$  167,85, respectivamente.

Diante disso, através dos dados espectrais de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$ , HMBC e ESI-EM, bem como, com comparações utilizando dados encontrados na literatura, foi possível identificar o composto Vd-2 como sendo 2',6'-dihidroxi-4,4'-dimetoxichalcona, ou gimnogrameno, relatado pela primeira vez na espécie *Varronia dardani*.

**Tabela 3** – Dados de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (400 e 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-1 (pinostrobrina chalcona) e Vd-2 (gimnogrameno), em comparação aos dados obtidos na literatura (WEI et al., 2013; MILES & MAIN, 1985).

Posição	Vd-1 $\delta_{\text{H}}$	Vd-2 $\delta_{\text{H}}$	Vd-1 e Vd-2 $\delta_{\text{C}}$	Referência <sup>1</sup> $\delta_{\text{C}}$	Referência <sup>2</sup> $\delta_{\text{C}}$
1	-	-	136,98; 129,58	136,96	129,10
2	7,64 (dd; 2H; $J = 9,6$ e $2,4$ Hz)	7,60 (d; 2H; $J = 7$ Hz)	129,96; 126,26	129,97	131,00
3	7,45 – 7,40 (m; 3H)	6,98 (d; 2H; $J = 7$ Hz)	129,33; 115,43	129,36	115,30
4	7,45 – 7,40 (m; 3H)	-	131,13; 163,03	131,15	163,60
5	7,45 – 7,40 (m; 3H)	6,98 (d; 2H; $J = 7$ Hz)	129,33; 115,43	129,36	115,30
6	7,64 (dd; 2H; $J = 9,6$ e $2,4$ Hz)	7,60 (d; 2H; $J = 7$ Hz)	129,96; 126,26	129,97	131,00
7	7,77 (d; 1H; $J = 15,6$ Hz)	7,73 (d; 1H; $J = 15,6$ Hz)	143,19; 143,47	143,20	143,20
8	8,22 (d; 1H; $J = 15,6$ Hz)	8,11 (d; 1H; $J = 15,6$ Hz)	128,78	128,75	125,90
9	-	-	194,34; 194,36	194,30	193,50
1'	-	-	106,63; 106,63	106,60	106,30
2'	-	-	165,84; 165,82	165,89	165,30
3'	5,99 (s; 2H)	5,98 (s; 2H)	94,60; 94,62	94,56	94,60
4'	-	-	167,82; 167,85	167,84	167,10
5'	5,99 (s; 2H)	5,98 (s; 2H)	94,60; 94,62	94,56	94,60
6'	-	-	165,84; 165,82	165,89	165,30
4'-OCH <sub>3</sub>	3,81 (sl; 3H)	3,81 (s; 3H)	55,90; 55,90	55,88	55,80
4-OCH <sub>3</sub>	-	3,85 (s; 3H)	55,86	-	55,80

Referência<sup>1</sup> – Pinostrobrina chalcona – RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (400 e 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) – (WEI et al., 2013)

Referência<sup>2</sup> – Gimnogrameno – RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (90 e 22,5 MHz,  $(\text{CD}_3)_2\text{CO}$ ) – (MILES & MAIN, 1985)

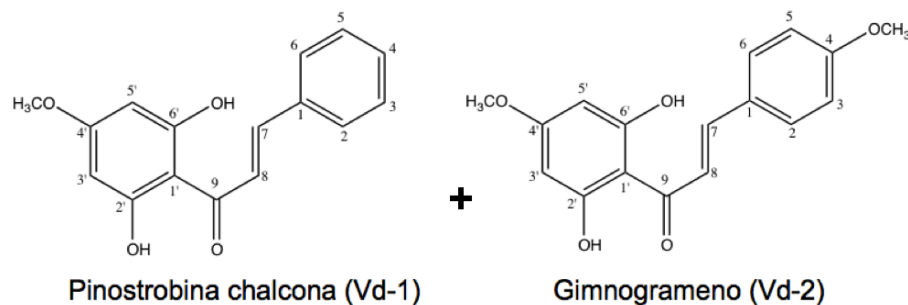


Figura 11 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da mistura Vd-1 e Vd-2.

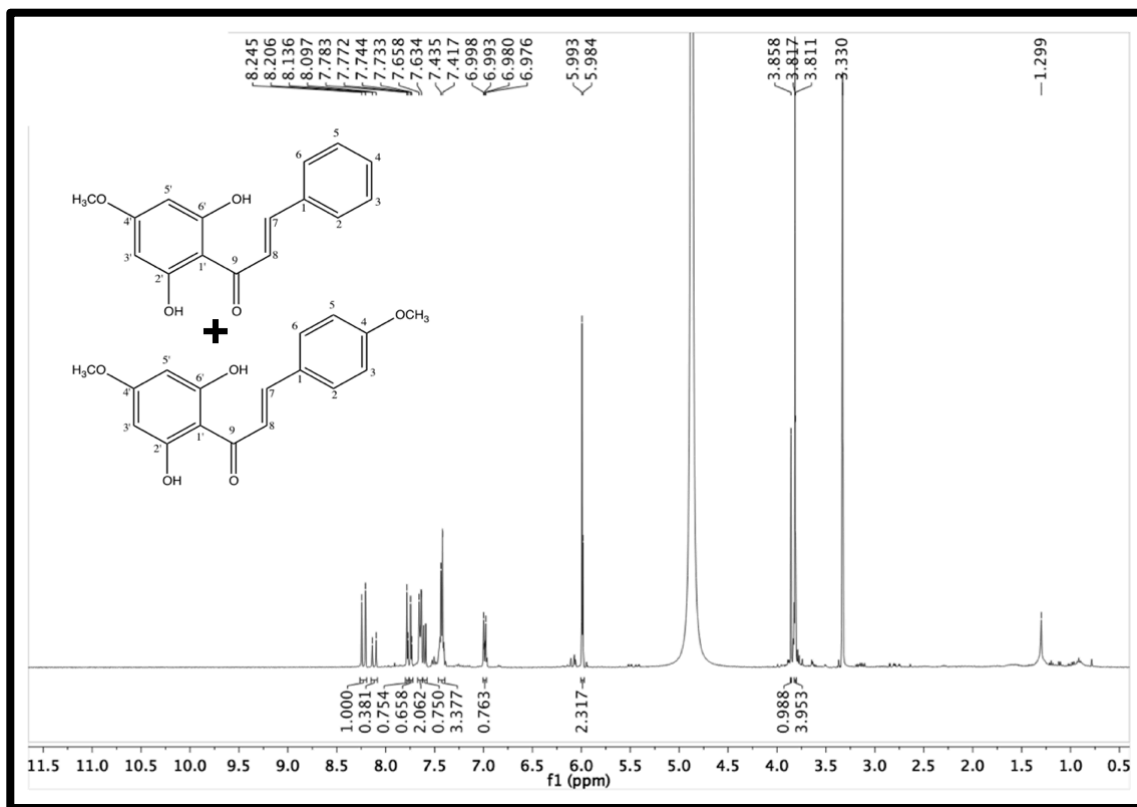
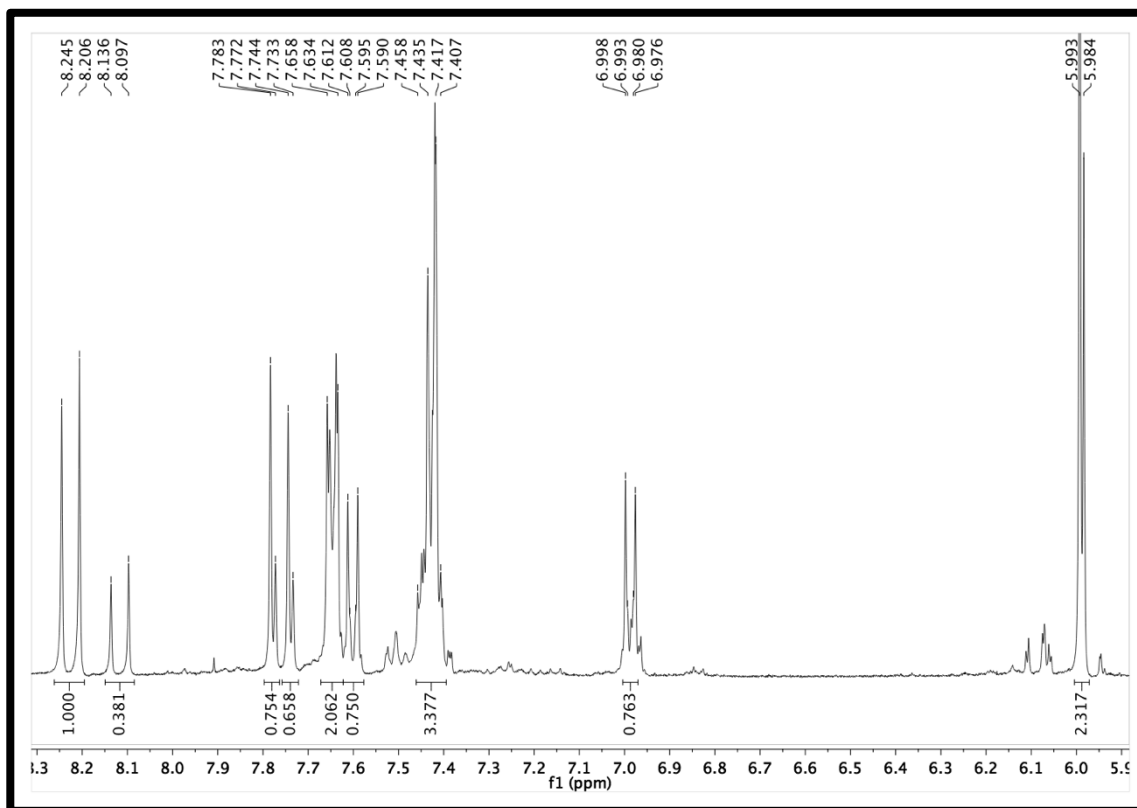
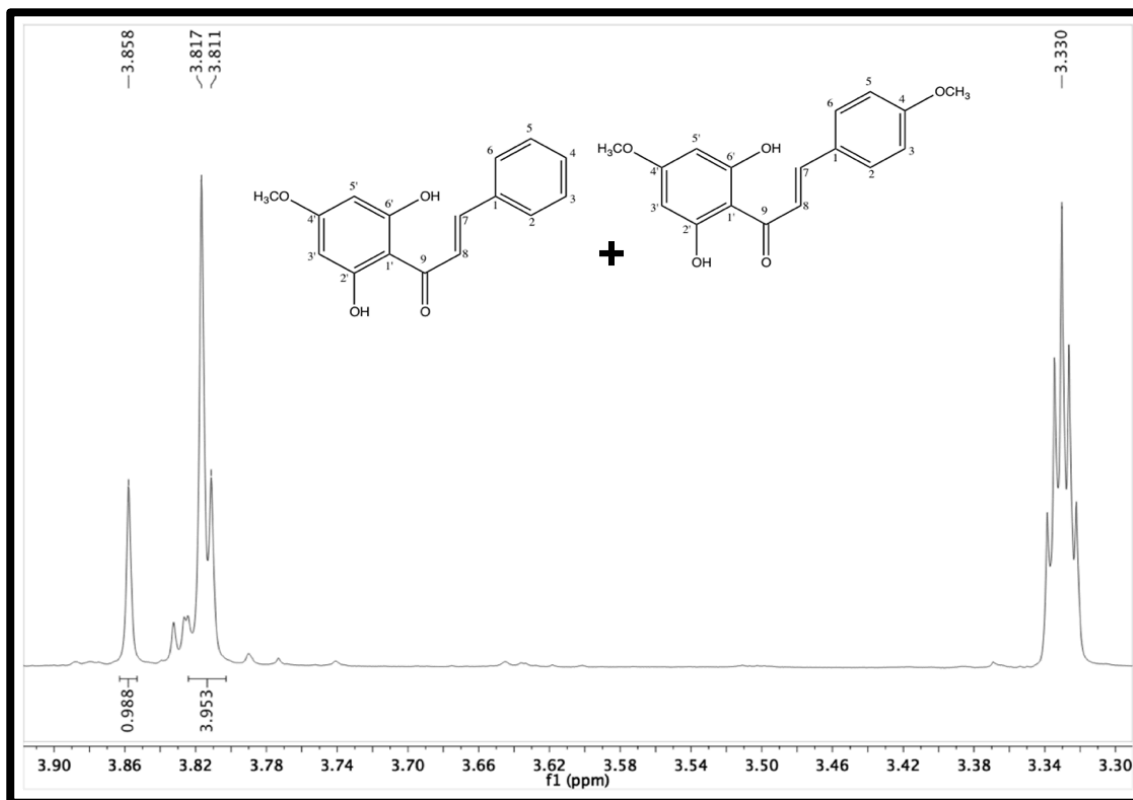


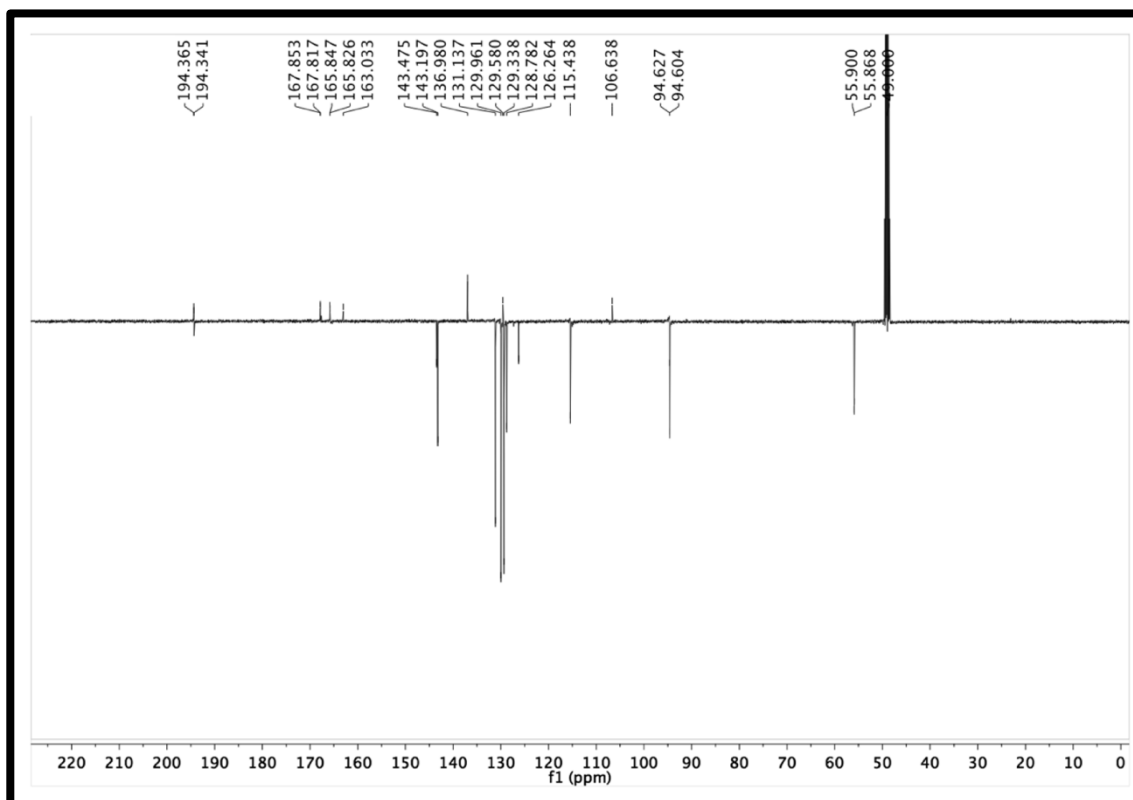
Figura 12 – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da mistura Vd-1 e Vd-2 na região de 5,90 – 8,30 ppm.



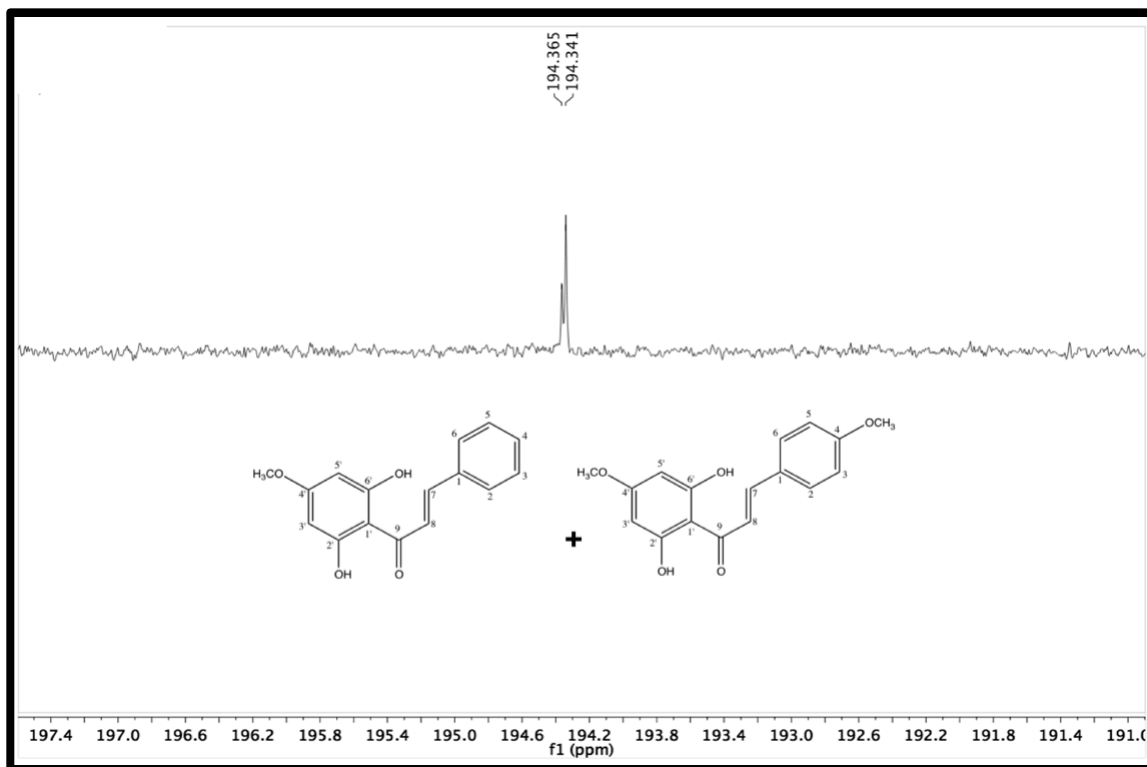
**Figura 13** – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de Vd-2 na região de 3,30 – 4,00 ppm.



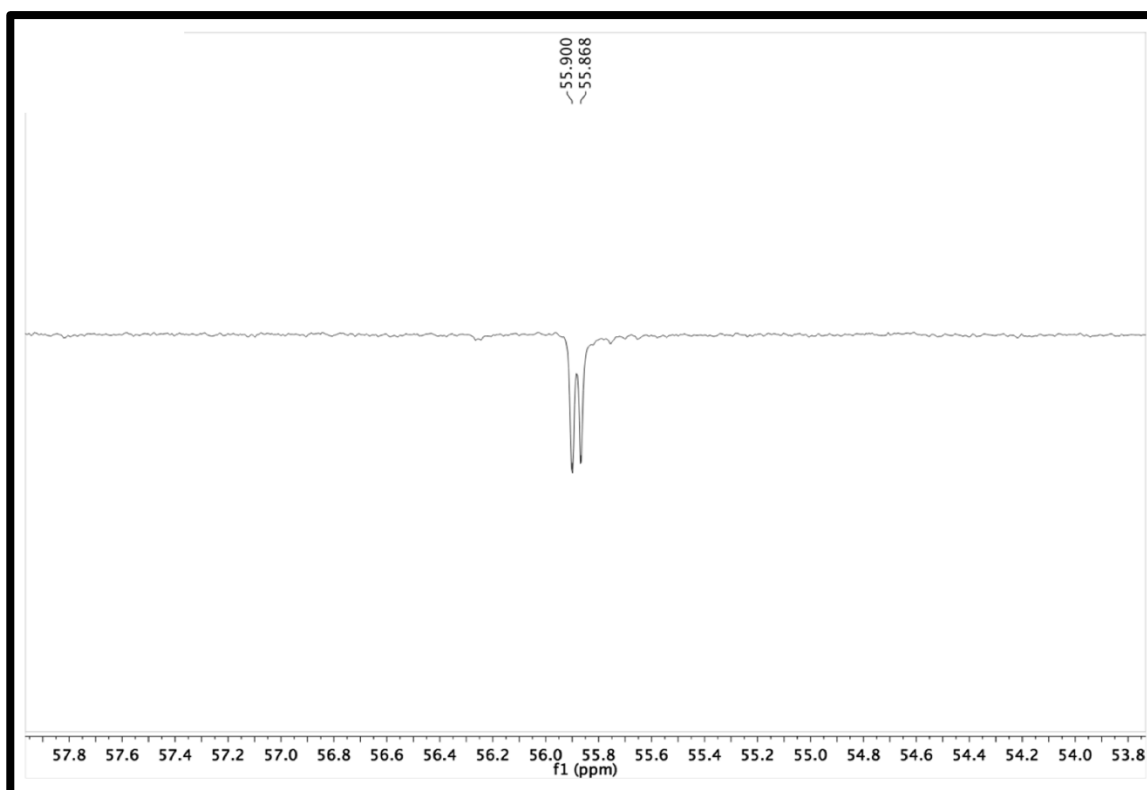
**Figura 14** – Espectro de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da mistura Vd-1 e Vd-2.



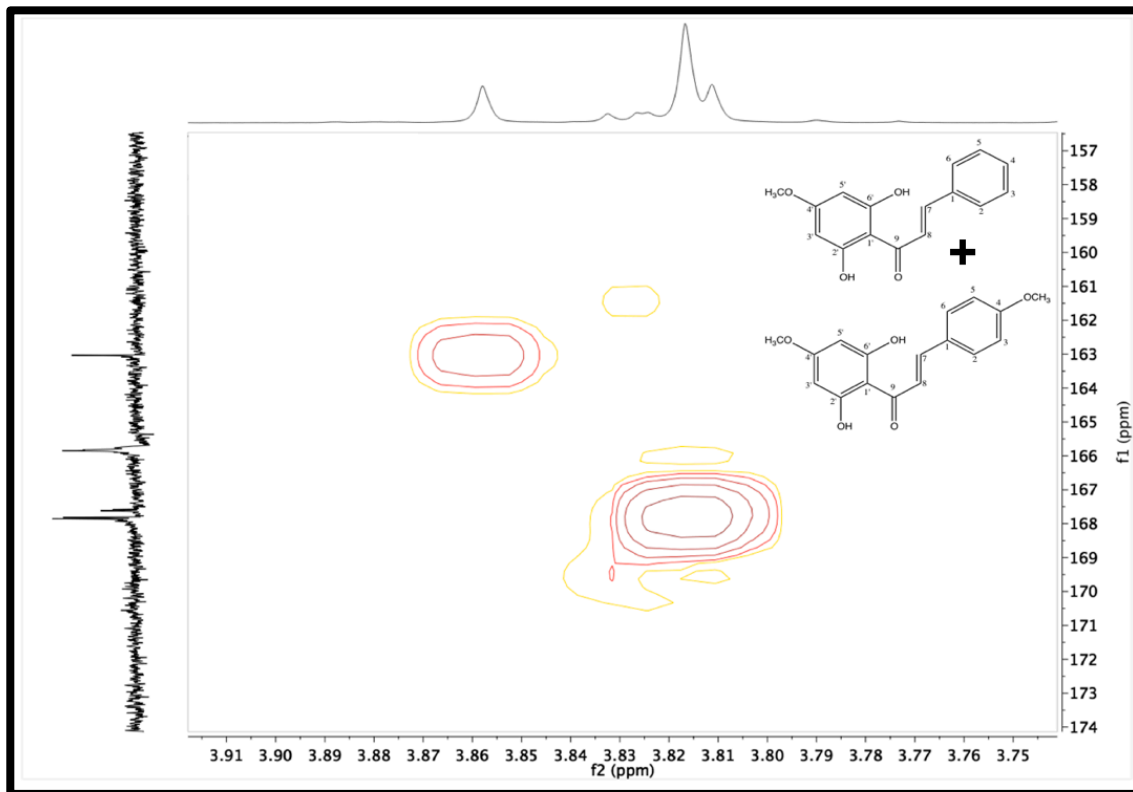
**Figura 15** – Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da mistura Vd-1 e Vd-2 na região de 192,6 – 196,4 ppm.



**Figura 16** – Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da mistura Vd-1 e Vd-2 na região de 53,80 – 60 ppm.



**Figura 17** – Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) da mistura Vd-1 e Vd-2 na região de 3,90 – 3,74 e 174 - 157 ppm.



### 5.3. Identificação estrutural de Vd-3

O composto Vd-3 foi isolado na forma de um pó amorfo amarelo com P.F.= 198 – 200 °C. O espectro de massas obtido por ESI-MS mostrou o pico do íon molecular em  $m/z$  255.29  $[M-H]^-$  compatível com a fórmula molecular  $C_{15}H_{12}O_4$ .

Foram observados no espectro de RMN  $^1H$  (500 MHz,  $CD_3OD$ ) (Figura 18, p. 60) três deslocamentos em  $\delta_H$  5,44 (dd; 1H;  $J = 12,5$  Hz e  $J = 3$  Hz), 3,07 (dd; 1H;  $J = 12,5$  Hz e  $J = 17$  Hz) e em 2,76 ppm (1H; dd;  $J = 17$  Hz e  $J = 3$  Hz), característicos dos hidrogênios alifáticos H-2, H-3ax e H-3eq de uma flavanona. O valor da constante de acoplamento  $J = 17$  Hz corresponde ao acoplamento geminal (H-3ax / H-3eq),  $J = 12,5$  Hz ao acoplamento axial-axial (H-2 / H-3ax) e  $J = 3,0$  Hz ao acoplamento axial-equatorial (H-2 / H-3eq) (IGNOATO et al., 2012; SILVA, 2007).

Este mesmo espectro mostrou ainda deslocamento característico de um anel B monosubstituído, um multipeto em cerca de 7,40 ppm.

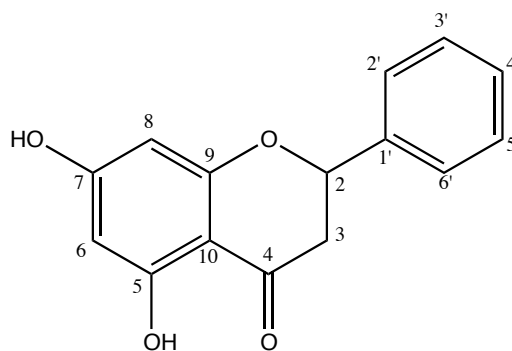
No espectro de RMN  $^{13}C$  APT (125 MHz,  $CD_3OD$ ) (Figura 22, p. 62) foram observados deslocamentos em  $\delta_C$  80,42; 44,16 e em 197,33, que foram atribuídos aos carbonos C-2; C-3 e C-4, respectivamente, sendo estes deslocamentos, típicos do anel C de uma flavanona. O sinal em  $\delta_C$  197,33, atribuído ao carbono carbonílico (C-4), é típico da presença de uma hidroxila quelada (C-5), já que na ausência da mesma, o deslocamento químico passa a ser entre 190,0 e 192,0 ppm (AGRAWAL et al., 1989).

Neste mesmo espectro, foi possível observar a existência de dois deslocamentos em  $\delta_C$  96,23 e  $\delta_C$  97,17, atribuídos a C-6 e C-8, respectivamente. Os sinais em  $\delta_C$  165,47 e  $\delta$  168,40 foram atribuídos aos carbonos oxigenados C-5 e C-7 (REIDEL, 2014; NAPAL et al, 2009). Os demais sinais de RMN de  $^1H$  e  $^{13}C$  estão reunidos na Tabela 4 (p. 59).

Após a análise dos dados espectrais de RMN  $^1H$  e  $^{13}C$  e ESI-EM, bem como, comparações com as informações apresentadas na literatura foi possível identificar Vd-3 como sendo 5,7-dihidroxi-flavanona, ou pinocembrina. O isolamento da pinocembrina na espécie *Varronia dardani* já foi relatado na literatura anteriormente (DE OLIVEIRA, 2016).

**Tabela 4** – Dados de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-3, 5,7-dihidroxi flavanona (pinocembrina) em comparação aos dados de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (400 e 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) por Ching e colaboradores (2007).

Posição	Vd-3		Referência	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	5,44 (1H, dd, $J = 12,5$ e 3 Hz)	80,42	5,33 (1H, dd, $J = 12,8$ e 3,6 Hz)	80,40
3	3,07 (dd; 1H; $J = 17$ e 12,5 Hz) 2,76 (dd; 1H; $J = 17$ e 3 Hz)	44,16	2,98 (1H, dd, $J = 17,4$ e 12,8 Hz) 2,67 (1H, dd, $J = 16,9$ e 3,6 Hz)	44,10
4	-	197,33	-	197,30
5	-	165,47	-	165,40
6	5,93 (d; 1H; $J = 2$ Hz)	96,23	5,87 (2H, d, $J = 1,8$ Hz)	96,20
7	-	168,40	-	168,30
8	5,89 (d; 1H; $J = 2$ Hz)	97,17	5,87 (2H, d, $J = 1,8$ Hz)	97,20
9	-	164,65	-	164,60
10	-	103,39	-	103,30
1'	-	140,39	-	140,30
2'	7,40 (5H, m)	127,31	7,34 (5H, m)	127,30
3'	7,40 (5H, m)	129,60	7,34 (5H, m)	129,60
4'	7,40 (5H, m)	129,68	7,34 (5H, m)	129,70
5'	7,40 (5H, m)	129,60	7,34 (5H, m)	129,60
6'	7,40 (5H, m)	127,31	7,34 (5H, m)	127,30



Pinocembrina

Figura 18 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de Vd-3.

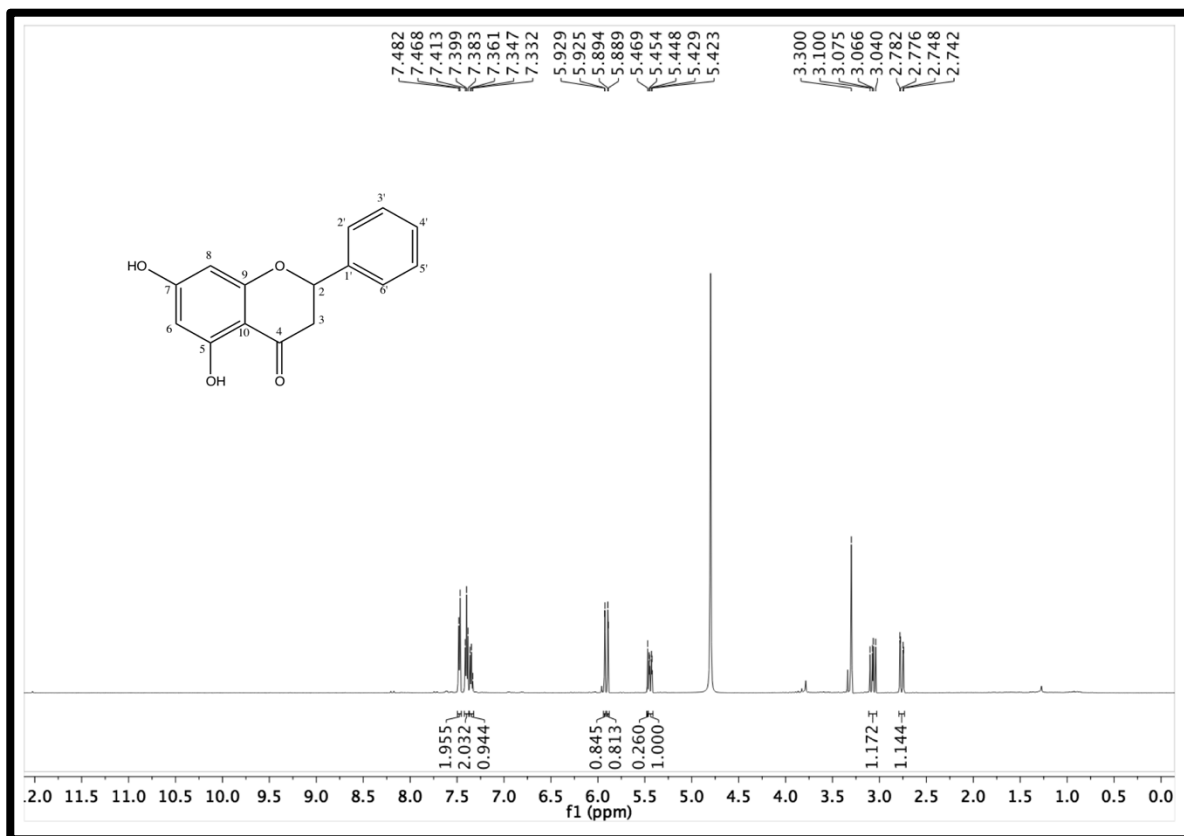
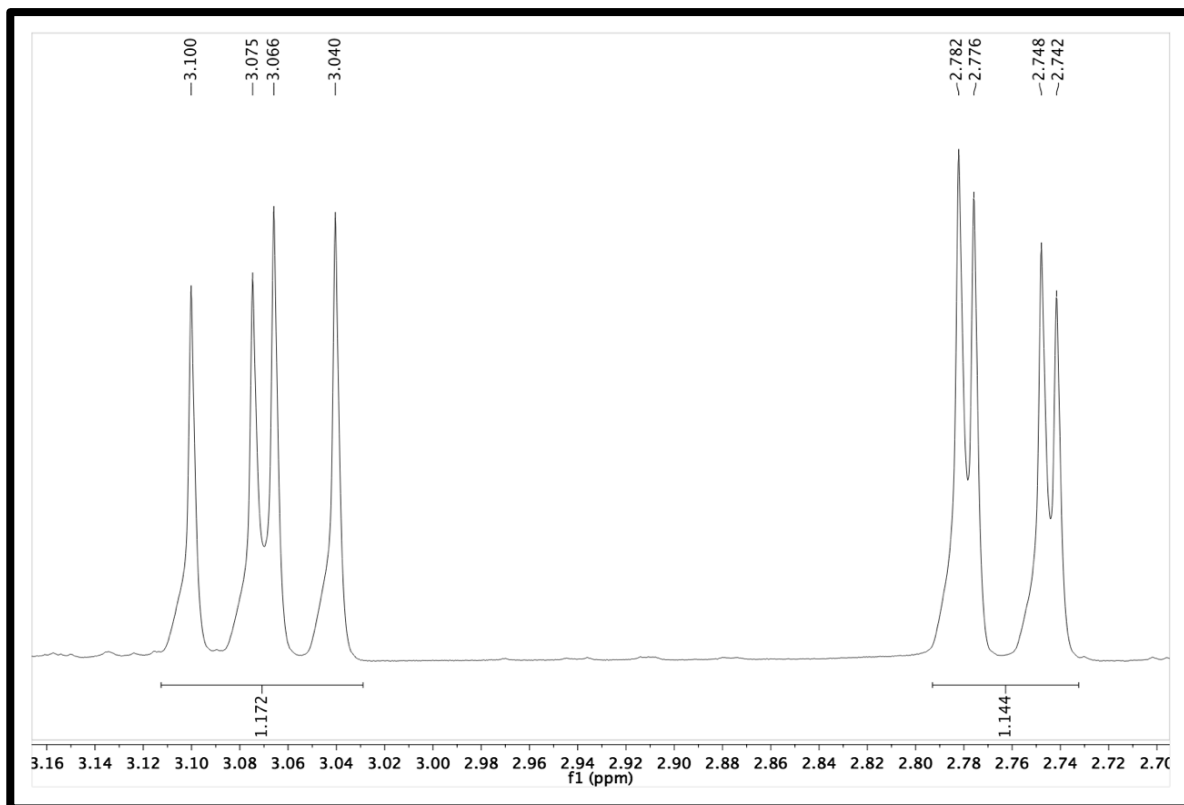
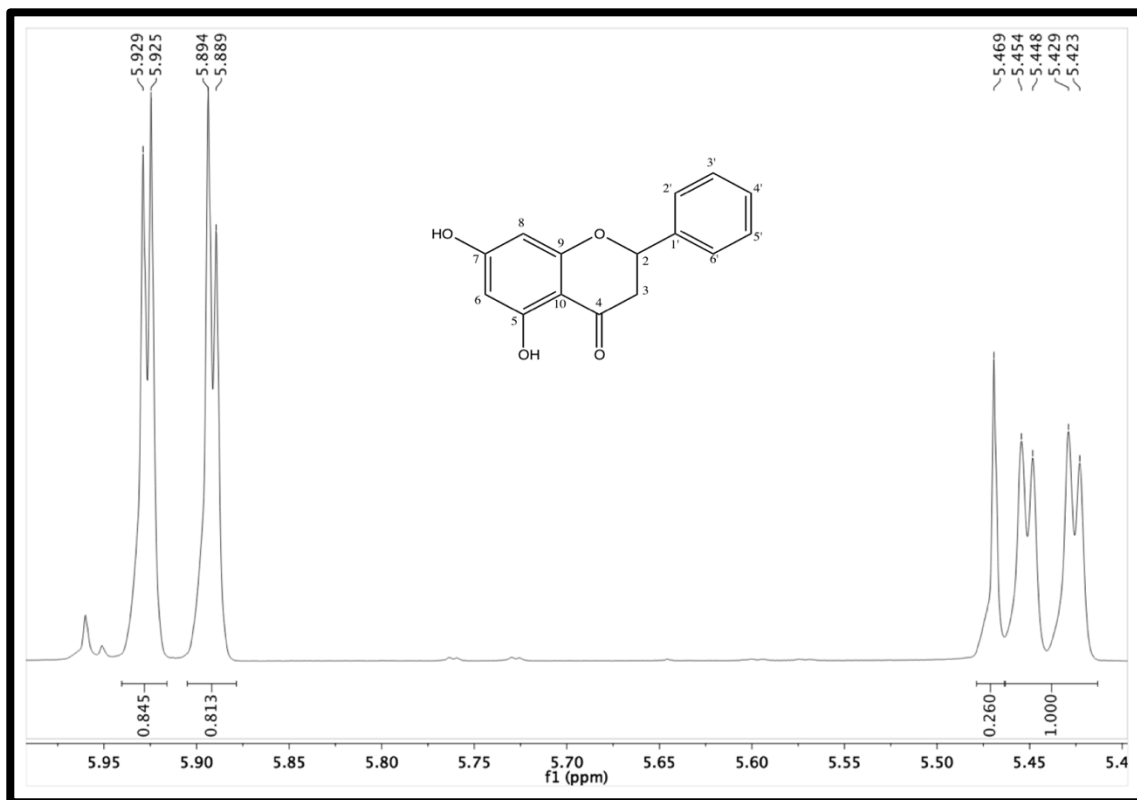


Figura 19 – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de Vd-3 na região de 2,70 – 3,16 ppm.



**Figura 20** – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de Vd-3 na região de 5,40 – 6,00 ppm.



**Figura 21** – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de Vd-3 na região de 7,24 – 7,60 ppm.

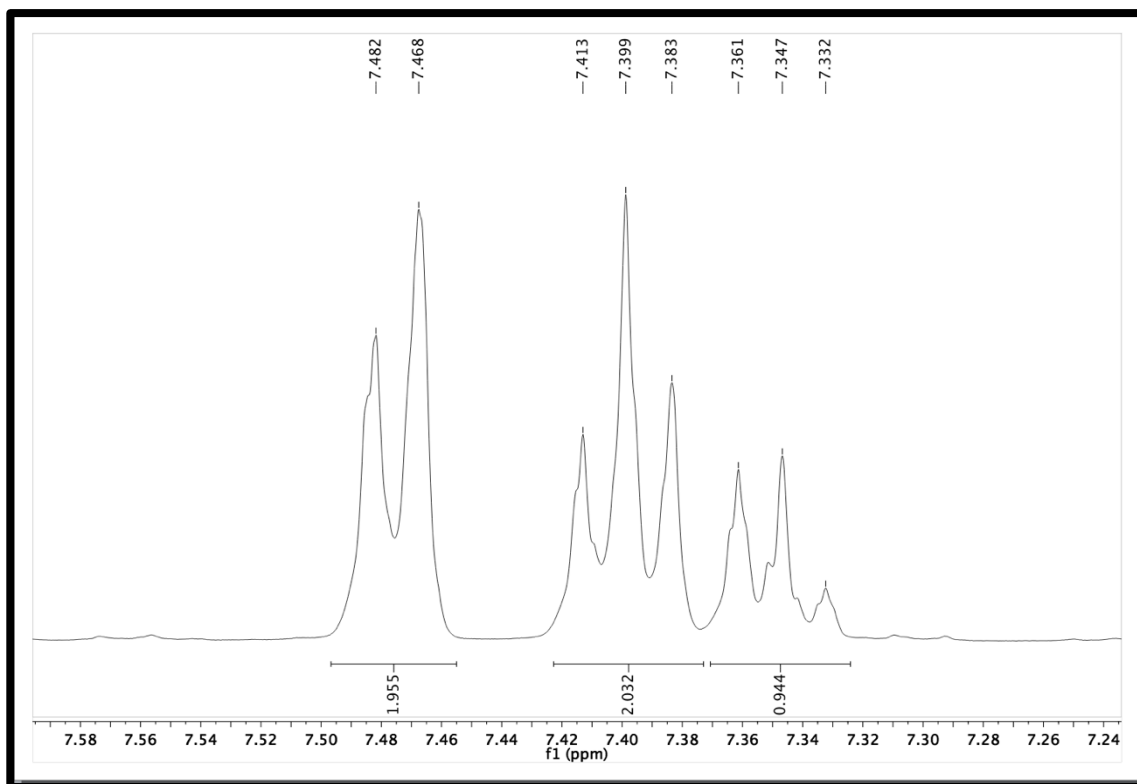


Figura 22 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de Vd-3.

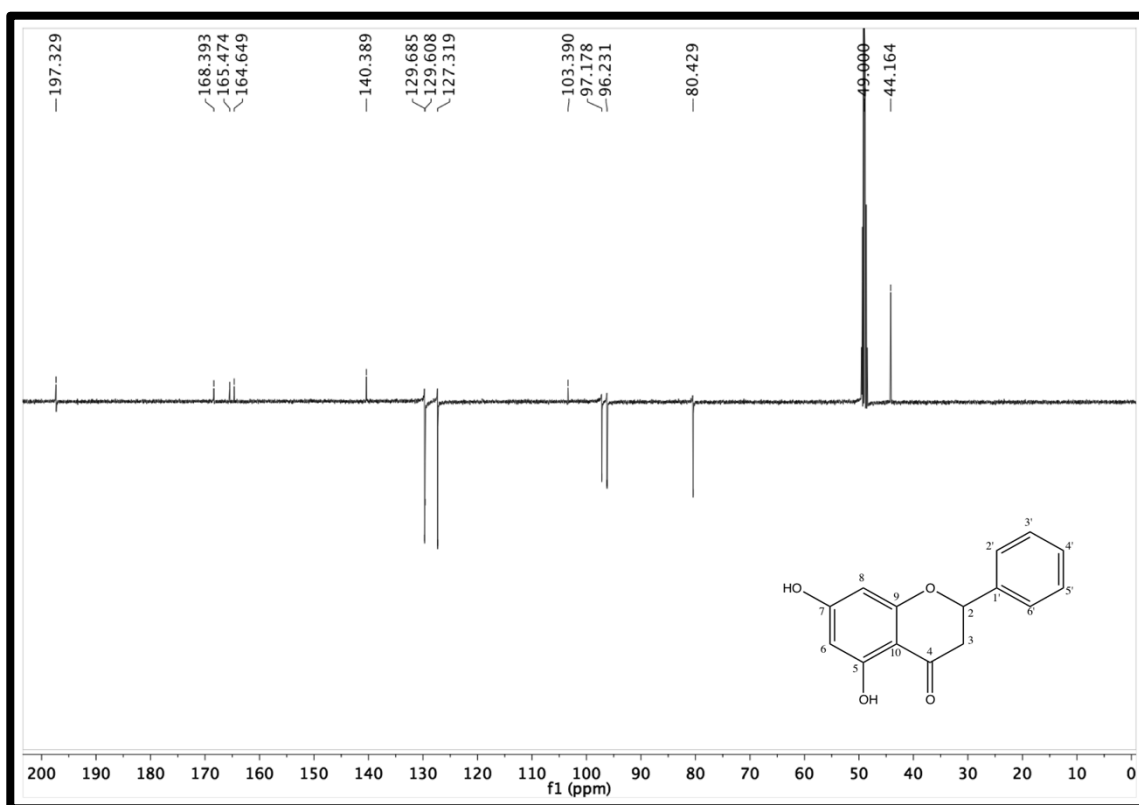
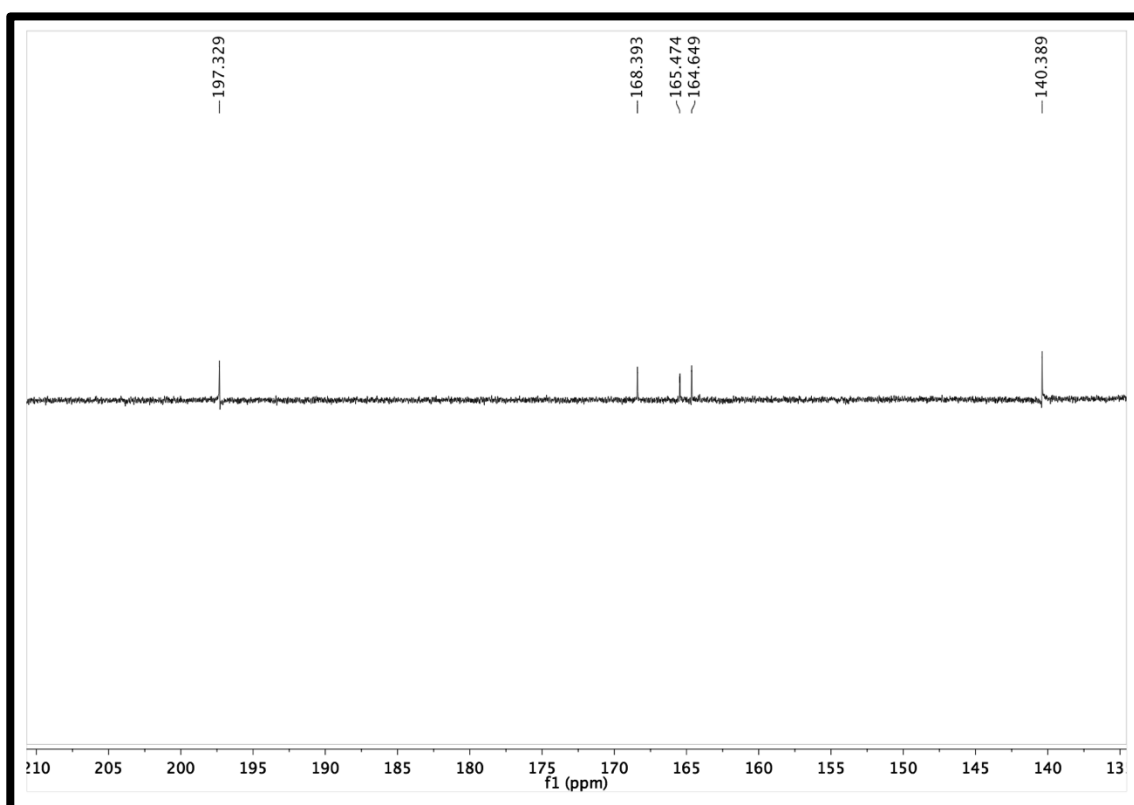
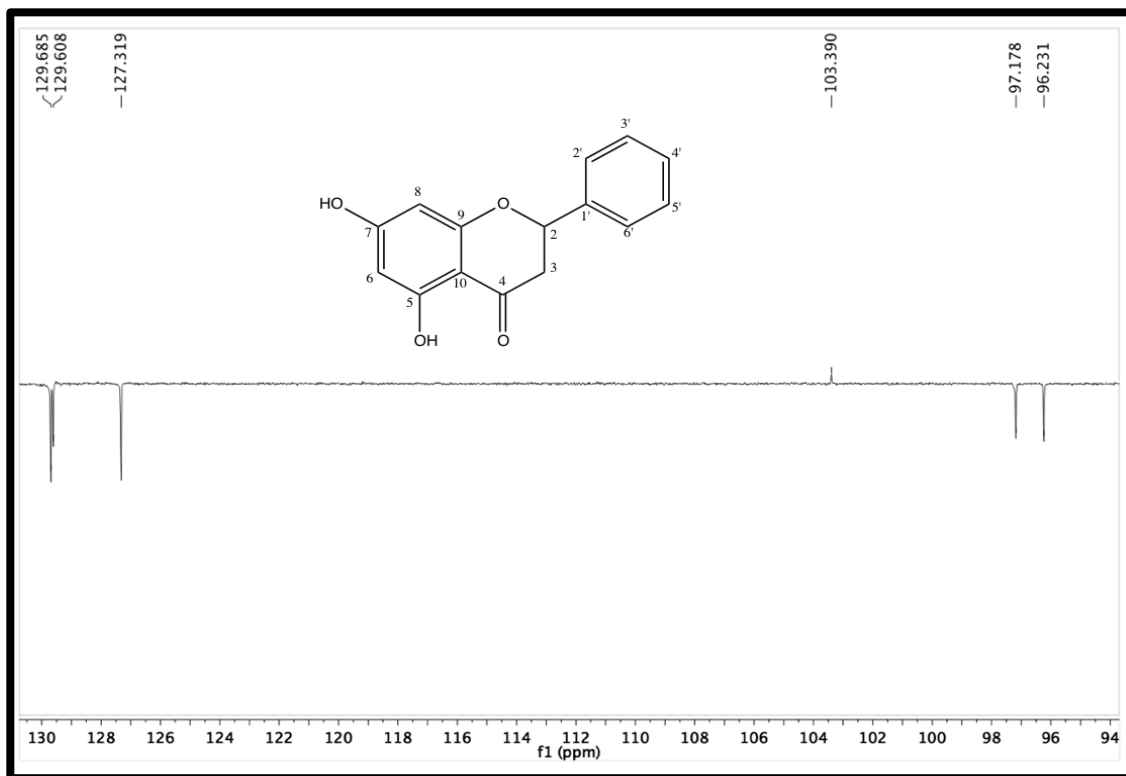


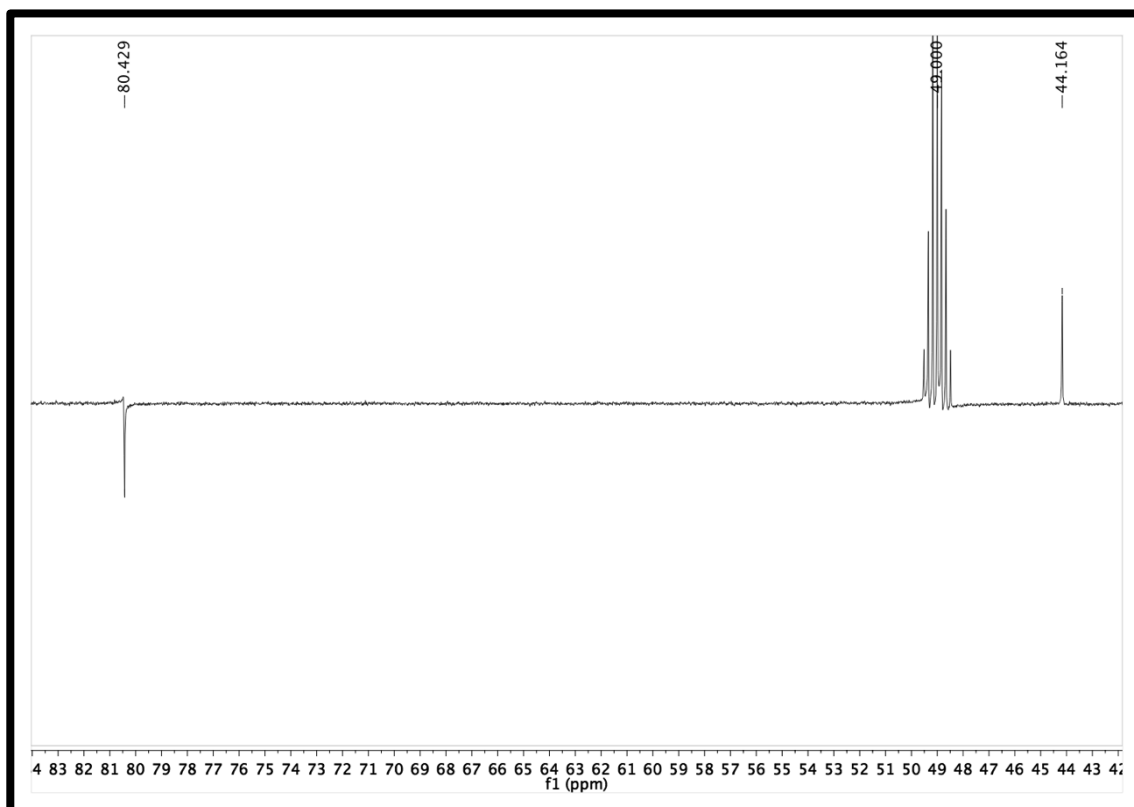
Figura 23 – Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de Vd-3 na região de 135 – 210 ppm.



**Figura 24** – Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-3 na região de 94 – 130 ppm.



**Figura 25** – Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-3 na região de 42 – 84 ppm.



#### 5.4. Identificação estrutural de Vd-4

O composto Vd-4 foi obtido em forma de cristais amarelo-claro com P.F. = 189 - 191 °C.

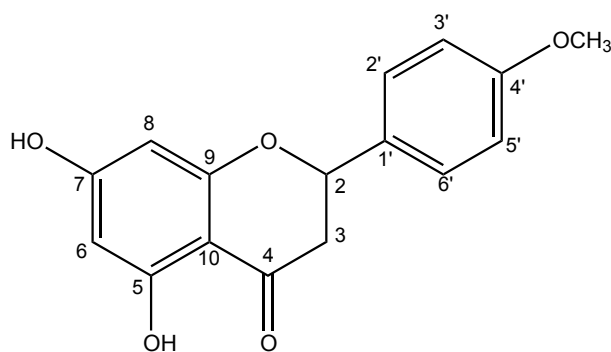
No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ), foi possível observar dois dupletos, um em  $\delta_{\text{H}}$  7,41 (H-2' e H-6') e outro em  $\delta_{\text{H}}$  6,96 (H-3' e H-5'), característico de sistema AA'BB' do anel B de um flavonoide. Este mesmo espectro mostrou ainda um simpleto integrando para três hidrogênios em  $\delta_{\text{H}}$  3,82 (4'-OCH<sub>3</sub>), característico de prótons de metoxila, a qual pode ser confirmada pelo deslocamento químico em  $\delta_{\text{C}}$  55,74 (4'-OCH<sub>3</sub>) no espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  APT (100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ). Outros dados dos experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  estão compilados na Tabela 5 (p. 65).

No espectro de HMBC (Figura, 34, p. 70), foi possível observar a correlação entre os sinais dos hidrogênios  $\delta_{\text{H}}$  3,82 (4'-OCH<sub>3</sub>) com o carbono  $\delta_{\text{C}}$  161,39 (C-4'), sendo possível confirmar então, que uma metoxila estaria inserida no carbono da posição 4', do anel B.

Após análises dos dados espectrais, paralelamente com a análise da literatura, foi possível concluir Vd-4 como sendo 5,7-dihidroxi-4' metoxiflavanona, ou isosakuranetina (KIM et al., 1999), identificada pela primeira vez no gênero *Varronia*, porém, já identificada na família Boraginaceae, como consta no estudo de Nogueira e colaboradores (2013), envolvendo a espécie *Cordia exaltata*.

**Tabela 5** – Dados de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (400 e 100 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-4, 5,7-dihidroxi-4'-metoxiflavanona (isosakuranetina) em comparação aos dados de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) por Kim e colaboradores (1999).

Posição	Vd-4		Isosakuranetina	
	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$	$\delta_{\text{H}}$	$\delta_{\text{C}}$
2	5,37 (1H, dd, $J = 12,8$ e 2,8 Hz)	80,24	5,34 (1H, dd, $J = 9,1$ e 2,2 Hz)	80,24
3	3,11 (dd; 1H; $J = 17,2$ e 12,8 Hz) 2,76 (dd; 1H; $J = 17,2$ e 3,2 Hz)	43,99	2,80 (1H, dd, $J = 17,1$ e 9,1 Hz) 2,69 (1H, dd, $J = 17,1$ e 2,2 Hz)	44,00
4	-	197,60	-	197,59
5	-	165,43	-	165,46
6	5,90 (d; 1H; $J = 2$ Hz)	97,09	5,89 (d; 1H; $J = 2$ Hz)	97,12
7	-	168,34	-	168,36
8	5,92 (d; 1H; $J = 2$ Hz)	96,18	5,90 (d; 1H; $J = 2$ Hz)	96,21
9	-	164,76	-	164,78
10	-	103,34	-	103,38
1'	-	132,28	-	132,32
2'	7,41 (2H, d, $J = 8,4$ Hz)	127,32	7,39 (2H, d, $J = 8,7$ Hz)	128,91
3'	6,96 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)	114,98	6,94 (2H, d, $J = 8,7$ Hz)	115,02
4'	-	161,39	-	161,43
5'	6,96 (2H, d, $J = 8,8$ Hz)	114,98	6,94 (2H, d, $J = 8,7$ Hz)	115,02
6'	7,41 (2H, d, $J = 8,4$ Hz)	127,32	7,39 (2H, d, $J = 8,7$ Hz)	128,91
4'- $\text{OCH}_3$	3,82 (3H, sl)	55,74	3,80 (3H, sl)	57,50



Isosakuranetina

(Vd-4)

Figura 26 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de Vd-4.

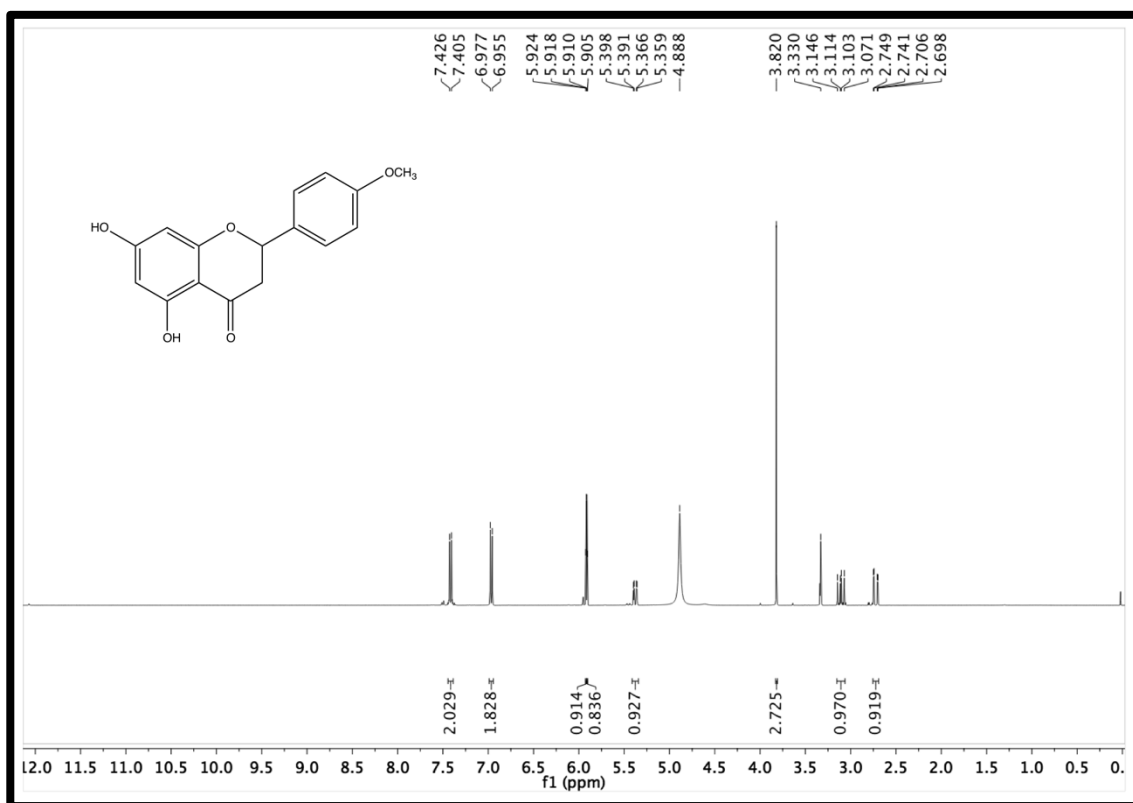
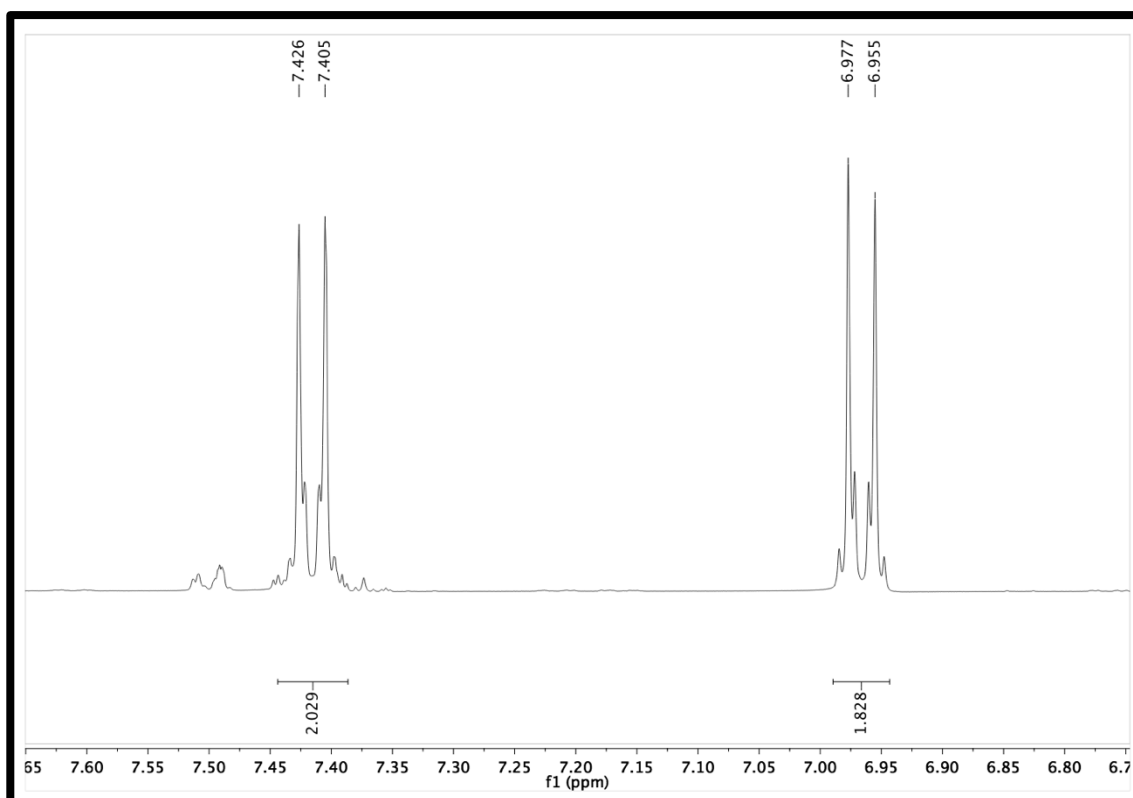
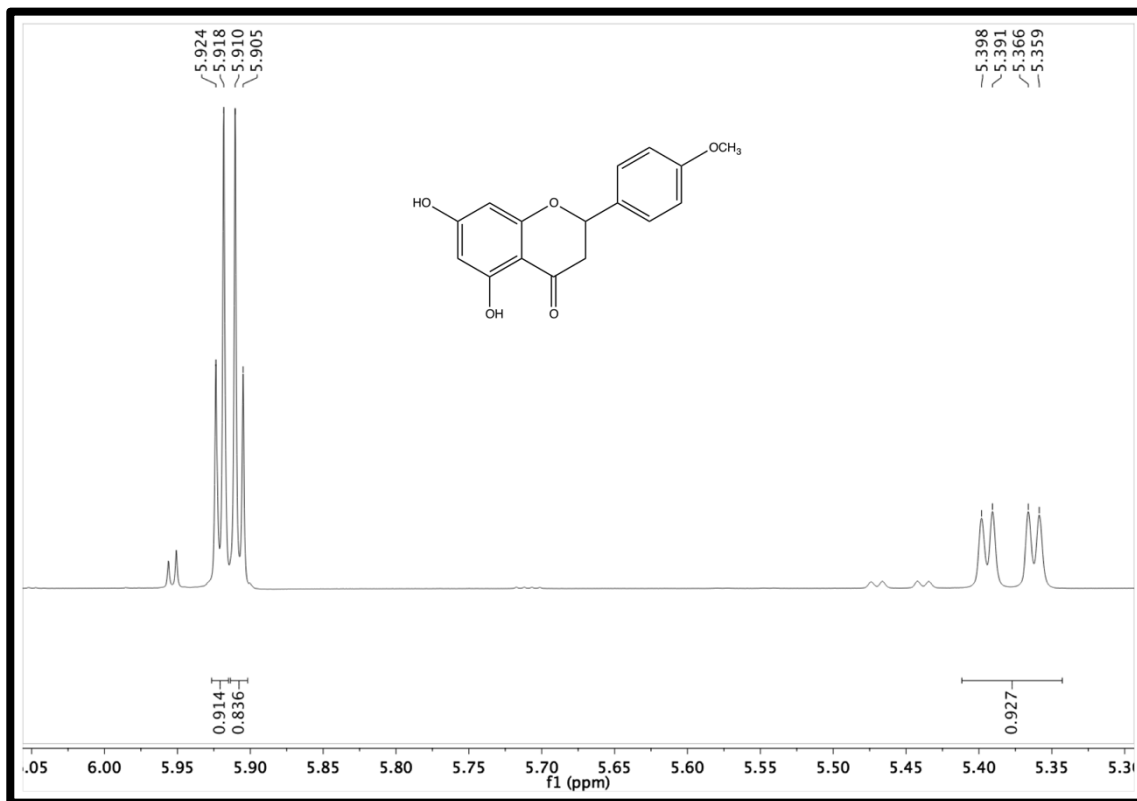


Figura 27 – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de Vd-4 na região de 6,75 – 7,65 ppm.



**Figura 28** – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de Vd-4 na região de 5,30 – 6,05 ppm.



**Figura 29** – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (400 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de Vd-4 na região de 2,50 – 4,00 ppm.

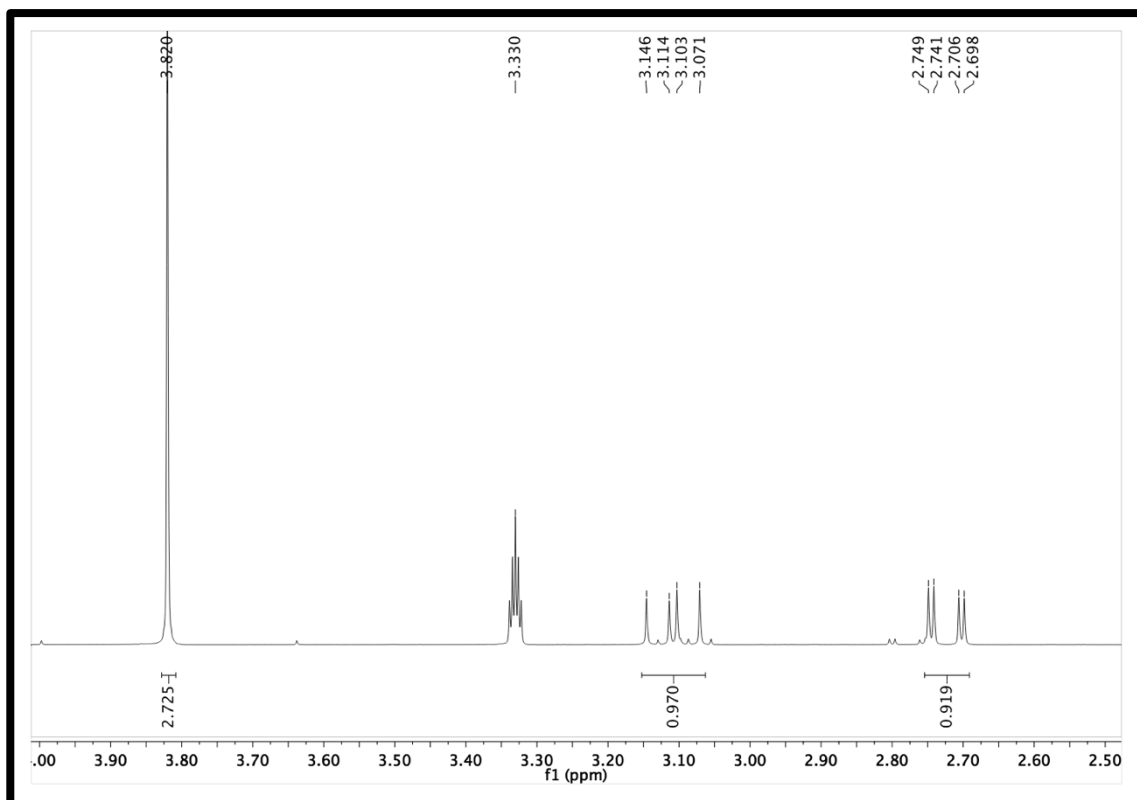


Figura 30 – Espectro de RMN <sup>13</sup>C (100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de Vd-4.

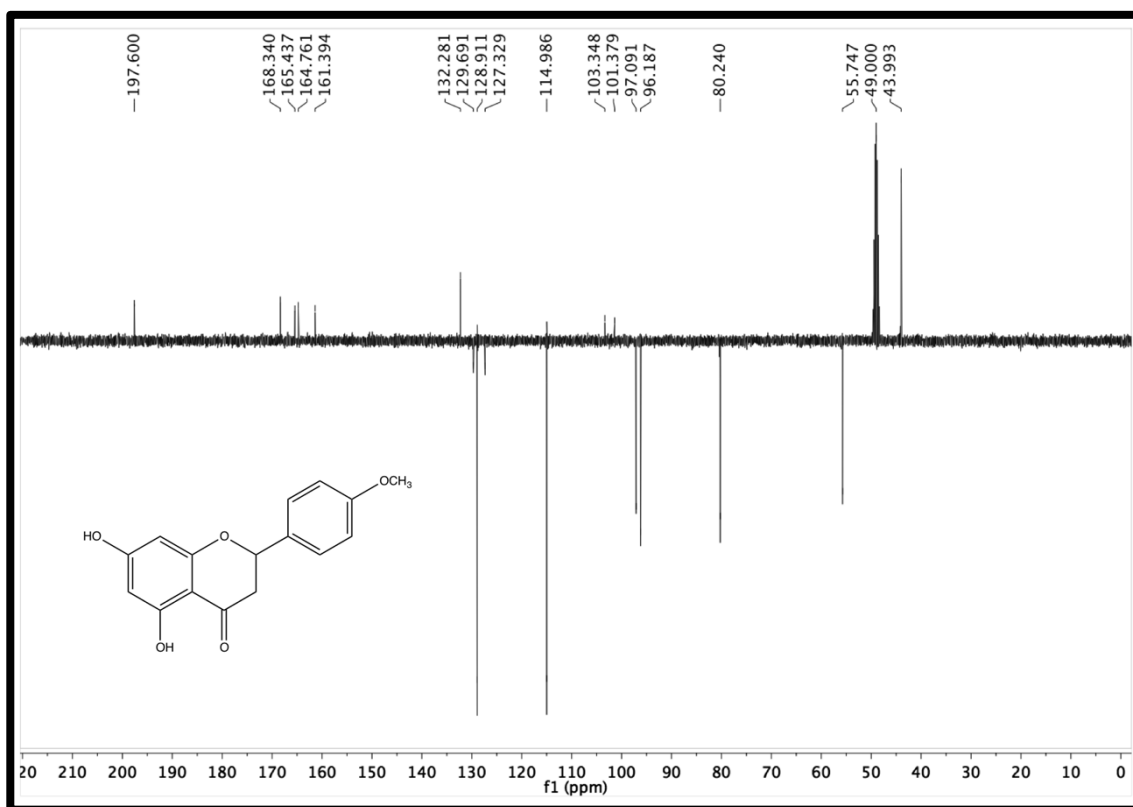
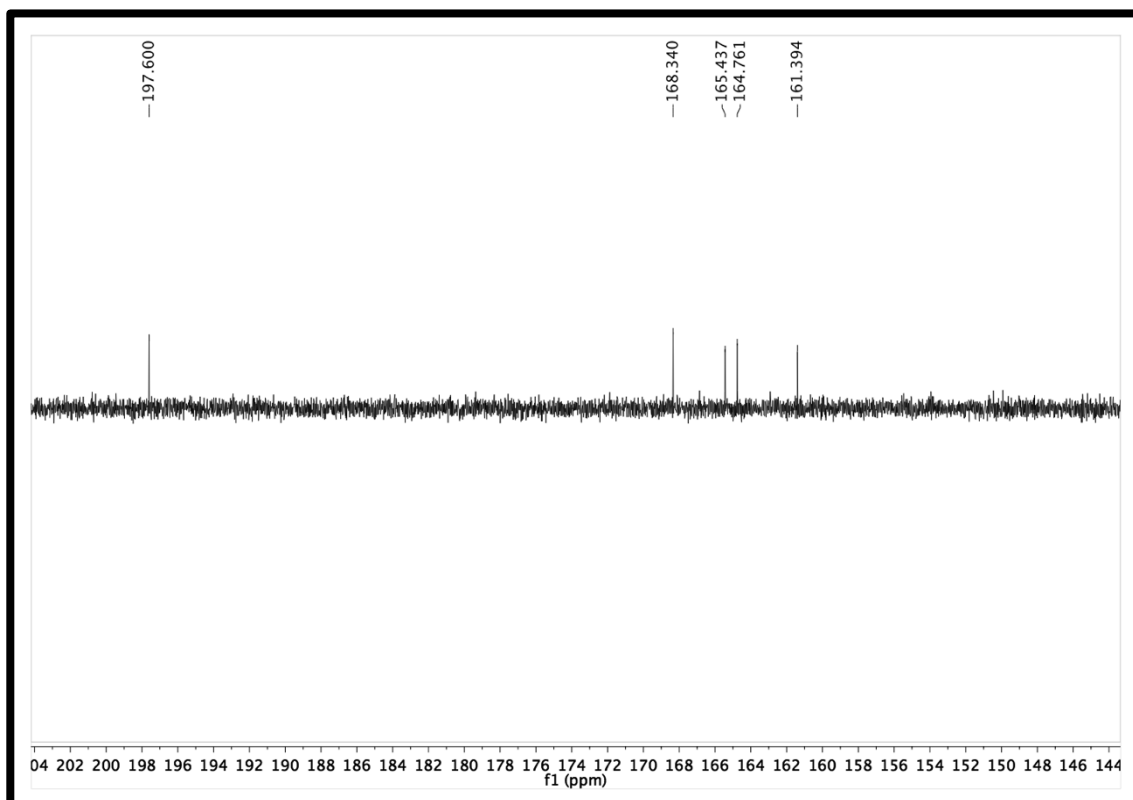
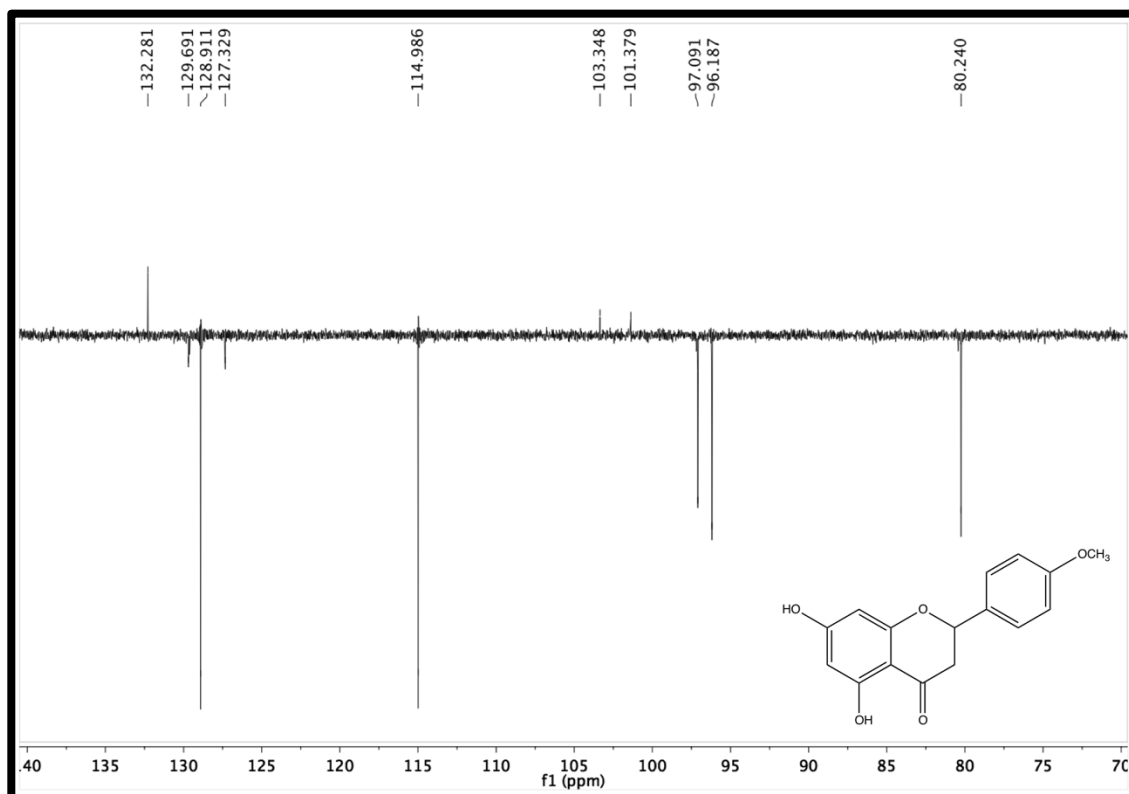


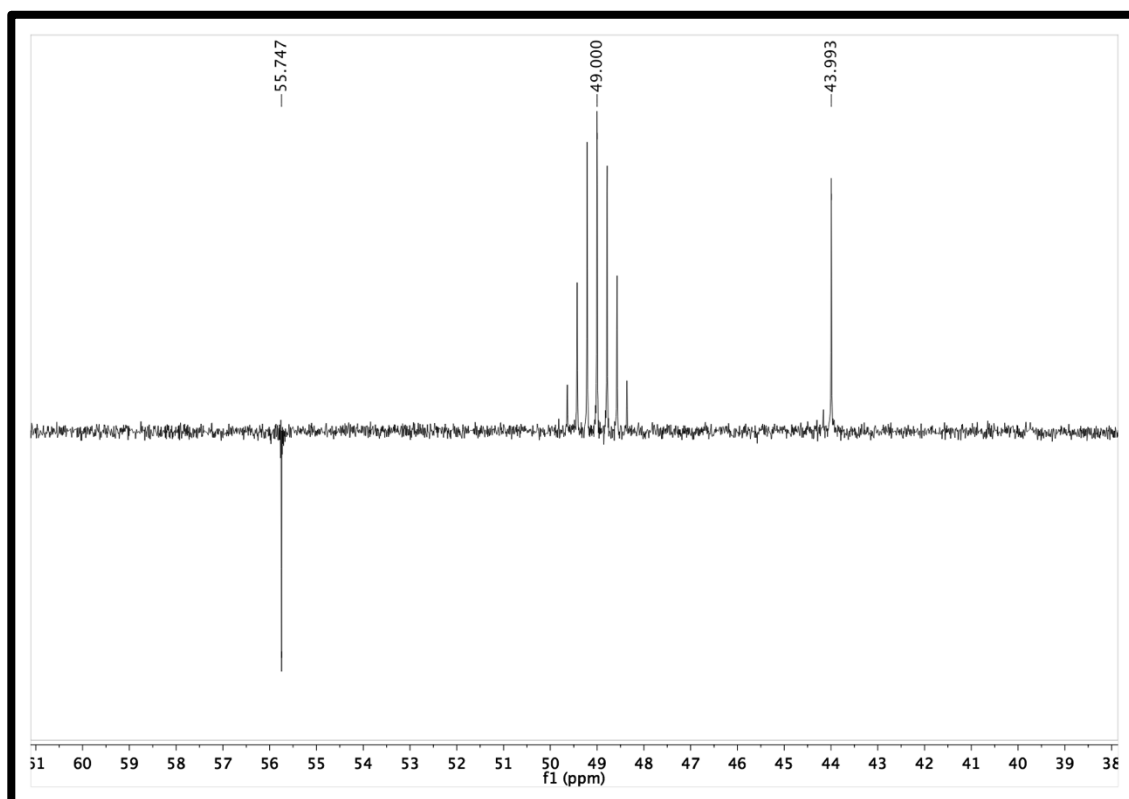
Figura 31 – Expansão do espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de Vd-4 na região de 144 – 204 ppm.



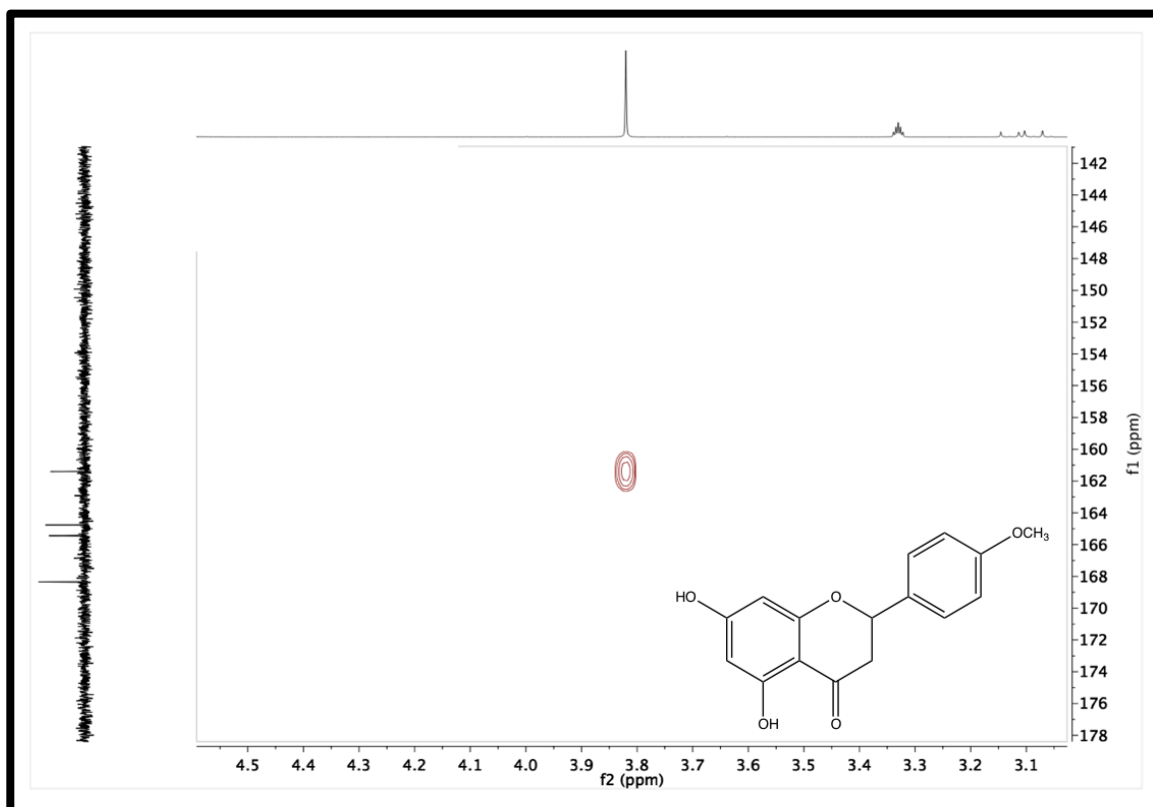
**Figura 32** – Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-4 na região de 70 – 140 ppm.



**Figura 33** – Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) de Vd-4 na região de 38 – 61 ppm.



**Figura 34** – Expansão do espectro de HMBC (400 e 100 MHz, CD<sub>3</sub>OD) de Vd-4 na região de 3,10 – 4,60 e 178 - 142 ppm.



### 5.5. Identificação estrutural de Vd-5a e Vd-5b

Os compostos Vd-5a e Vd-5b foram obtidos como cristais amarelo-claro e com P.F.= 179 - 186 °C.

No espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  APT (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) (Figura 42, p. 77) foram observados 29 sinais referentes a 33 carbonos que permitem sugerir a presença de dois compostos com o esqueleto flavonoídico. Através de alguns deslocamentos norteadores,  $\delta_{\text{C}}$  79,03 (C-2-Vd-5a),  $\delta_{\text{C}}$  42,97 (C-3-Vd-5a) e 195,57 (C-4-Vd-5a);  $\delta_{\text{C}}$  78,81 (C-2-Vd-5b),  $\delta_{\text{C}}$  43,16 (C-3-Vd-5b) e 195,84 (C-4-Vd-5b) (ROMAN JÚNIOR et al., 2017; NYOKAT et al., 2017; OYAMA & KONDO, 2004; BANDONI et al., 1978), caracterizando a ausência da insaturação entre os carbonos C-2 e C-3 em ambos os compostos, foi possível sugerir que esses flavonoides seriam então do tipo flavanona. Observaram-se também, a presença de três sinais característicos de carbonos metoxílicos (Figura 48, p. 80) em  $\delta_{\text{C}}$  55,49 (7-OCH<sub>3</sub>-Vd-5a), 55,47 (7-OCH<sub>3</sub>-Vd-5b) e 55,17 (4'-OCH<sub>3</sub>-Vd-5b).

No espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) e suas expansões (Figura 35 a 41, p. 74) foram observados deslocamentos químicos, corroborando com o espectro de RMN  $^{13}\text{C}$ , sendo um dos compostos (Vd-5a) com um anel B livre, assinalado pelo multipeto em  $\delta_{\text{H}}$  7,36 – 7,43 integrando para cinco hidrogênios, e o outro composto (Vd-5b) com um anel B em um sistema AA'BB', evidenciado pela presença de dois dupletos em  $\delta_{\text{H}}$  7,34 (2H, d,  $J = 7$  Hz, H-2' e H-6') e  $\delta_{\text{H}}$  6,92 (2H, d,  $J = 7$  Hz, H-3' e H-5'). Neste último caso, foi levado em consideração as constantes de acoplamento ( $J$ ) entre os prótons do anel B, provando assim, o acoplamento em *orto* entre H-2' e H-3', e H-5' e H-6' (YARIPOUR et al., 2017; GOSSAN et al., 2015).

O espectro de HMBC (Figura 50, p. 81), indicou uma correlação entre os prótons metoxílicos em  $\delta_{\text{H}}$  3,76 (7-OCH<sub>3</sub> de Vd-5a),  $\delta_{\text{H}}$  3,75 (7-OCH<sub>3</sub> de Vd-5b) e  $\delta_{\text{H}}$  3,79 (4'-OCH<sub>3</sub> de Vd-5b) com os carbonos oxigenados dos flavonoides em  $\delta_{\text{C}}$  167,80 (C-7-Vd-5a),  $\delta_{\text{C}}$  167,76 (C-7 de Vd-5b) e  $\delta_{\text{C}}$  159,88 (C-4' de Vd-5b), respectivamente, confirmando a inserção de uma metoxila na posição C-7 no composto Vd-5a e de duas metoxilas no composto Vd-5b, uma na posição C-7 e outra em C-4'.

Com essas análises e suas comparações com os dados obtidos na literatura, foi possível identificar o composto Vd-5a como sendo a 5-hidroxi-7-

metoxiflavanona, ou pinostrobina (ROMAN JÚNIOR et al., 2017) e Vd-5b, sendo a 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavanona, ou sakuranetina 4'-metil éter (OYAMA & KONDO, 2004). A pinostrobina está sendo relatada pela primeira vez na espécie, porém o composto sakuranetina 4'-metil éter já havia sido isolado em *V. dardani*, como consta no estudo de De Oliveira, em 2016.

**Tabela 6** – Dados de  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) de Vd-5a (pinostrobin) e Vd-5b (sakuranetina 4'-metil éter), em comparação aos dados obtidos na literatura (ROMAN JÚNIOR et al., 2017; OYAMA & KONDO, 2004).

Posição	Vd-5a $\delta_{\text{H}}$	Vd-5b $\delta_{\text{H}}$	Vd-5a e Vd-5b $\delta_{\text{C}}$	Referência <sup>1</sup> $\delta_{\text{C}}$	Referência <sup>2</sup> $\delta_{\text{C}}$
2	5,36 (1H, dd, $J = 13$ e 3 Hz)	5,30 (1H, dd, $J = 13$ e 3 Hz)	79,03; 78,81	80,20	79,00
3	3,05 (dd; 1H; $J = 17,5$ e 13 Hz) 2,71 (dd; 1H; $J = 17,5$ e 3 Hz)	3,02 (dd; 1H; $J = 17$ e 13 Hz) 2,77 (dd; 1H; $J = 17$ e 3 Hz)	42,97; 43,16	46,52	43,20
4	-	-	195,57; 195,84	191,88	196,00
5	6,02 (d; 1H; $J = 2,5$ Hz)	6,00 (d; 1H; $J = 2,5$ Hz)	163,99; 163,97	166,67	164,10
6	-	-	94,98; 94,91	97,28	95,10
7	6,04 (d; 1H; $J = 2,5$ Hz)	6,03 (d; 1H; $J = 2,5$ Hz)	167,80; 167,76	164,48	167,90
8	-	-	94,10; 94,05	94,41	94,20
9	-	-	162,62; 162,74	167,28	162,90
10	-	-	104,84; 102,97	106,20	103,10
1'	-	-	138,30; 130,29	141,13	130,40
2'	7,36 – 7,43 (5H, m)	7,34 (2H, d, $J = 7$ Hz)	125,99; 127,57	129,79	127,70
3'	7,36 – 7,43 (5H, m)	6,92 (2H, d, $J = 7$ Hz)	129,69; 114,06	129,51	114,20
4'	7,36 – 7,43 (5H, m)	-	128,68; 159,88	129,78	160,00
5'	7,36 – 7,43 (5H, m)	6,92 (2H, d, $J = 7$ Hz)	129,69; 114,06	127,33	114,20
6'	7,36 – 7,43 (5H, m)	7,34 (2H, d, $J = 7$ Hz)	125,99; 127,57	127,39	127,70
7-OCH <sub>3</sub>	3,76 (3H, s)	3,75 (3H, s)	55,49	56,31	55,30
4'-OCH <sub>3</sub>	-	3,79 (s; 3H)	55,47	-	55,60
5-OH		12,02 (1H, s)			-

Referência <sup>1</sup> – Pinostrobin – RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (400 e 100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – (ROMAN JÚNIOR et al., 2017)

Referência <sup>2</sup> – Sakuranetina 4'-metil éter – RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$  (500 e 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) – (OYAMA & KONDO, 2004)

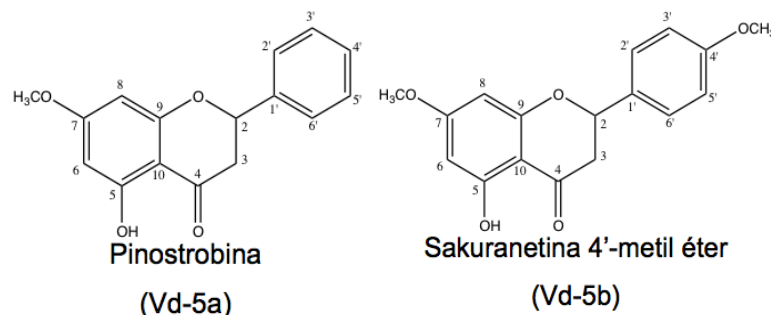


Figura 35 – Espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da mistura de Vd-5a e Vd-5b.

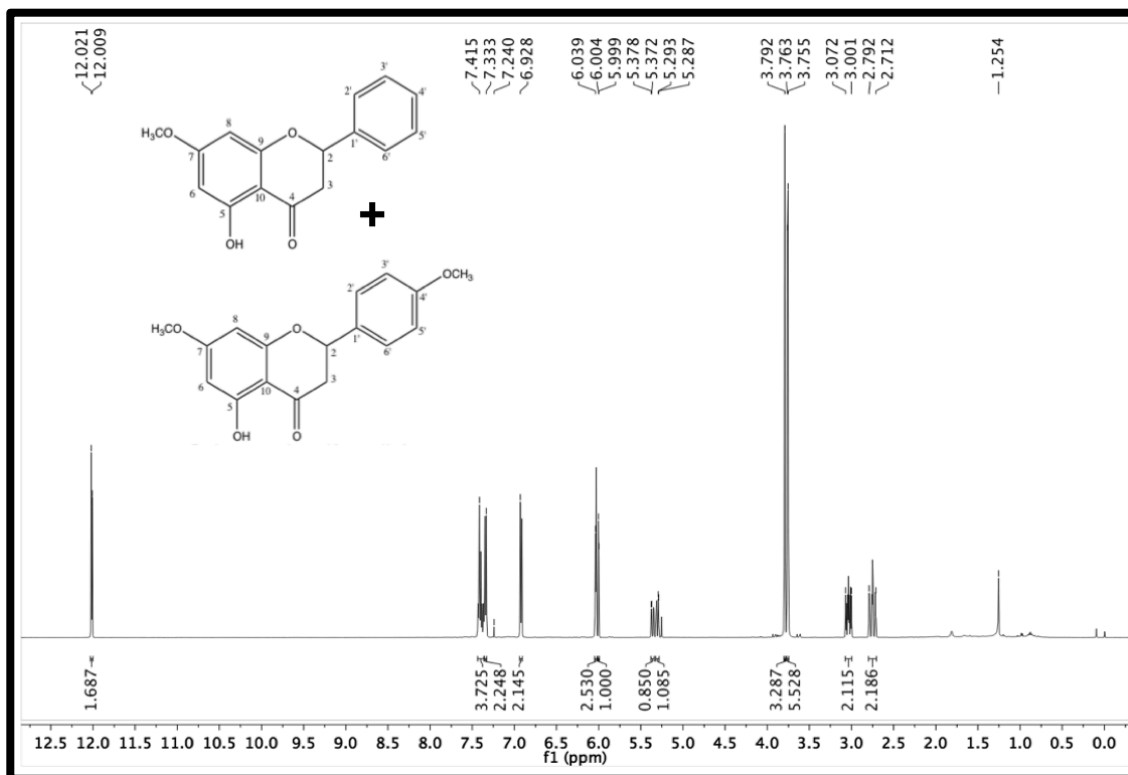
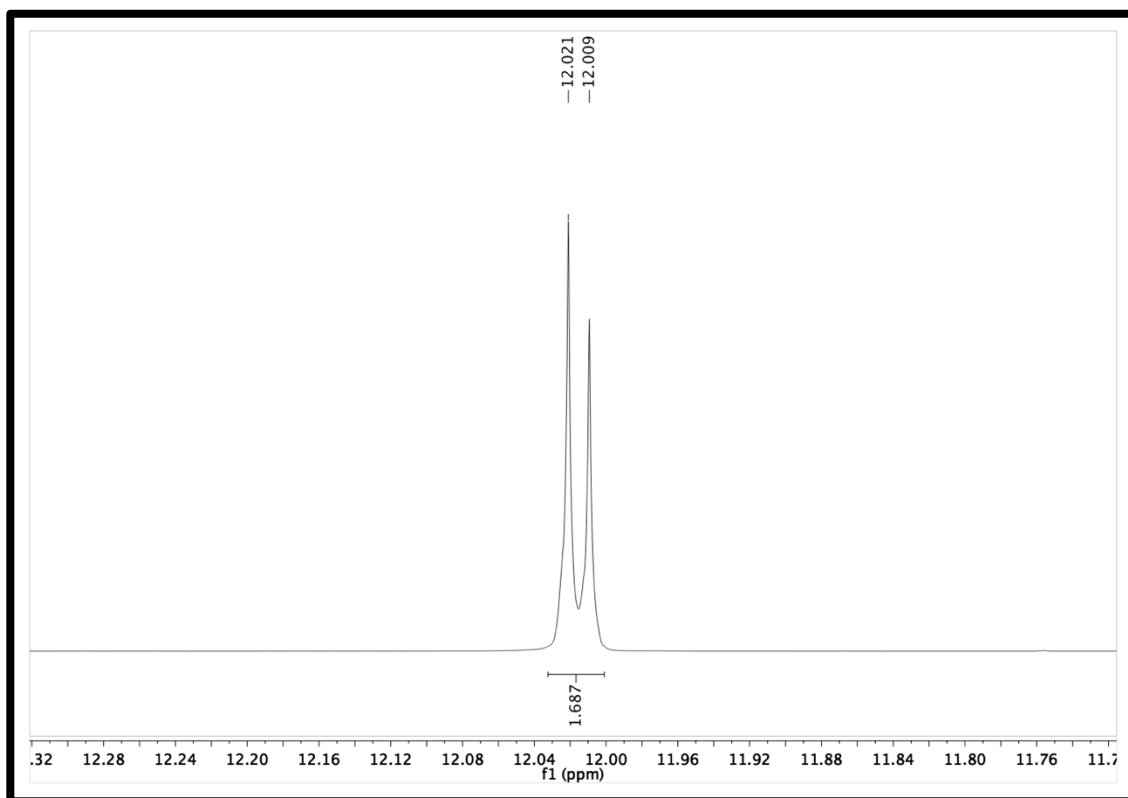
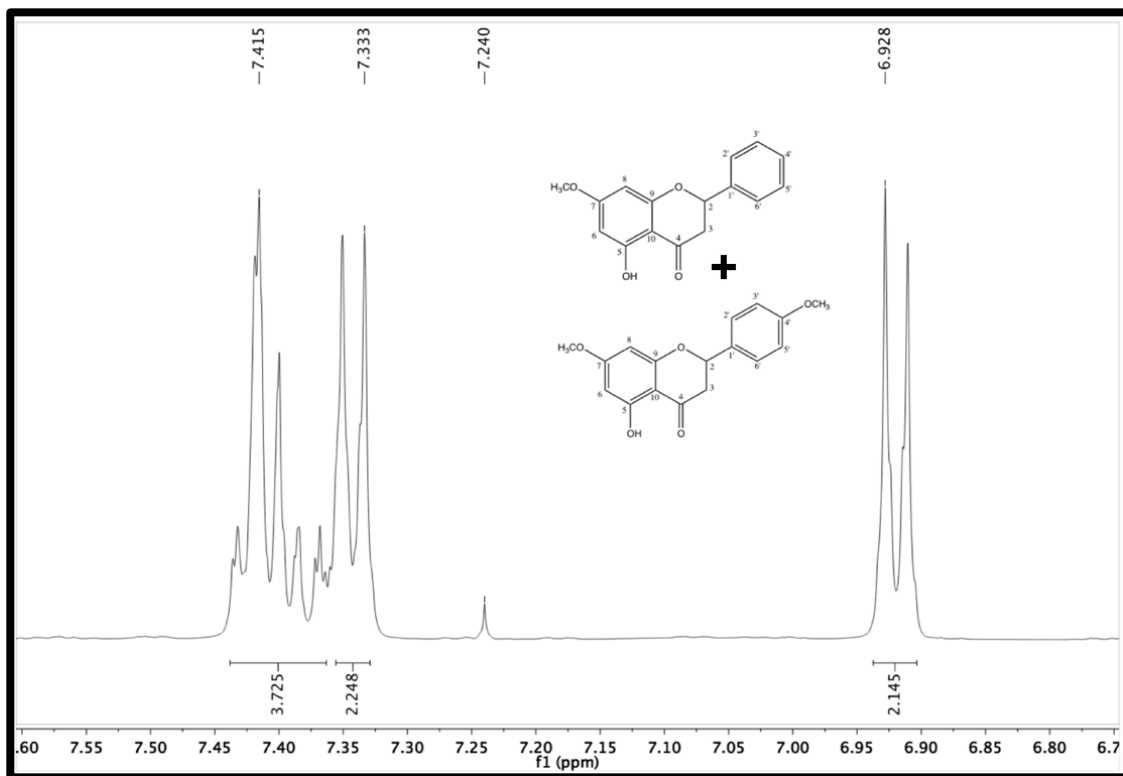


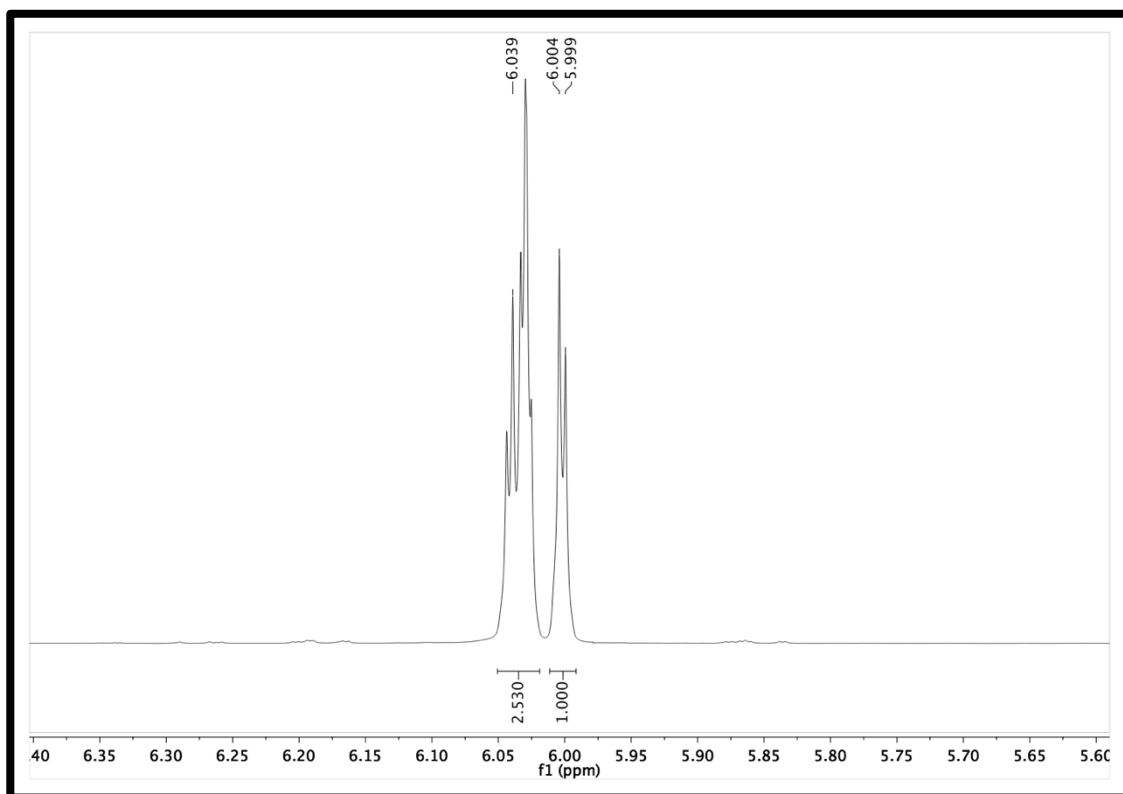
Figura 36 – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 11,72 – 12,32 ppm.



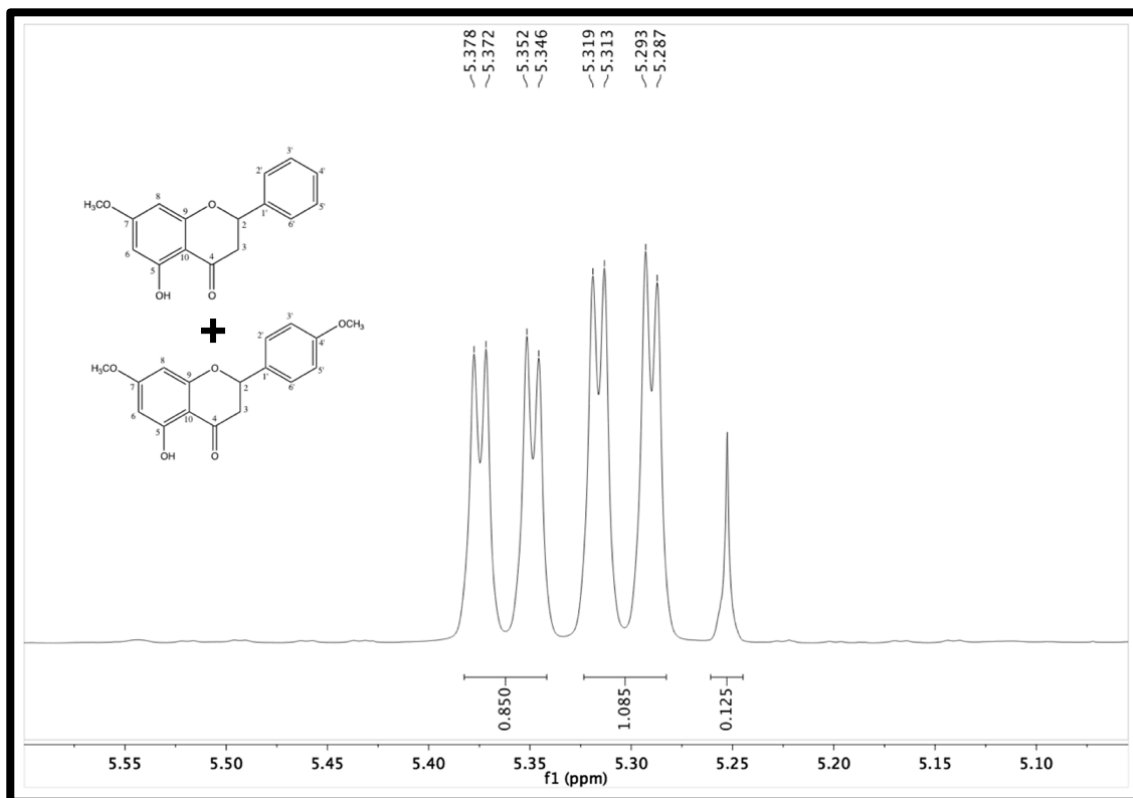
**Figura 37** – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 6,75 – 7,60 ppm.



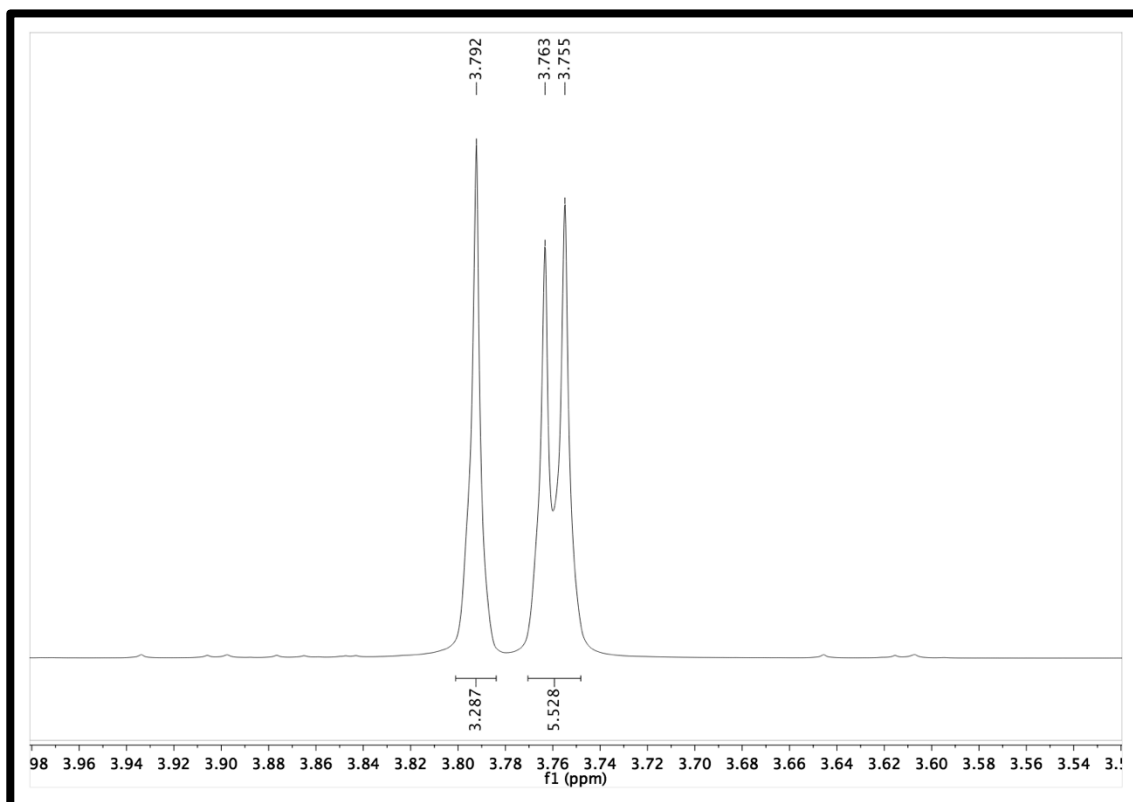
**Figura 38** – Expansão do espectro de RMN  $^1\text{H}$  (500 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 5,60 – 6,40 ppm.



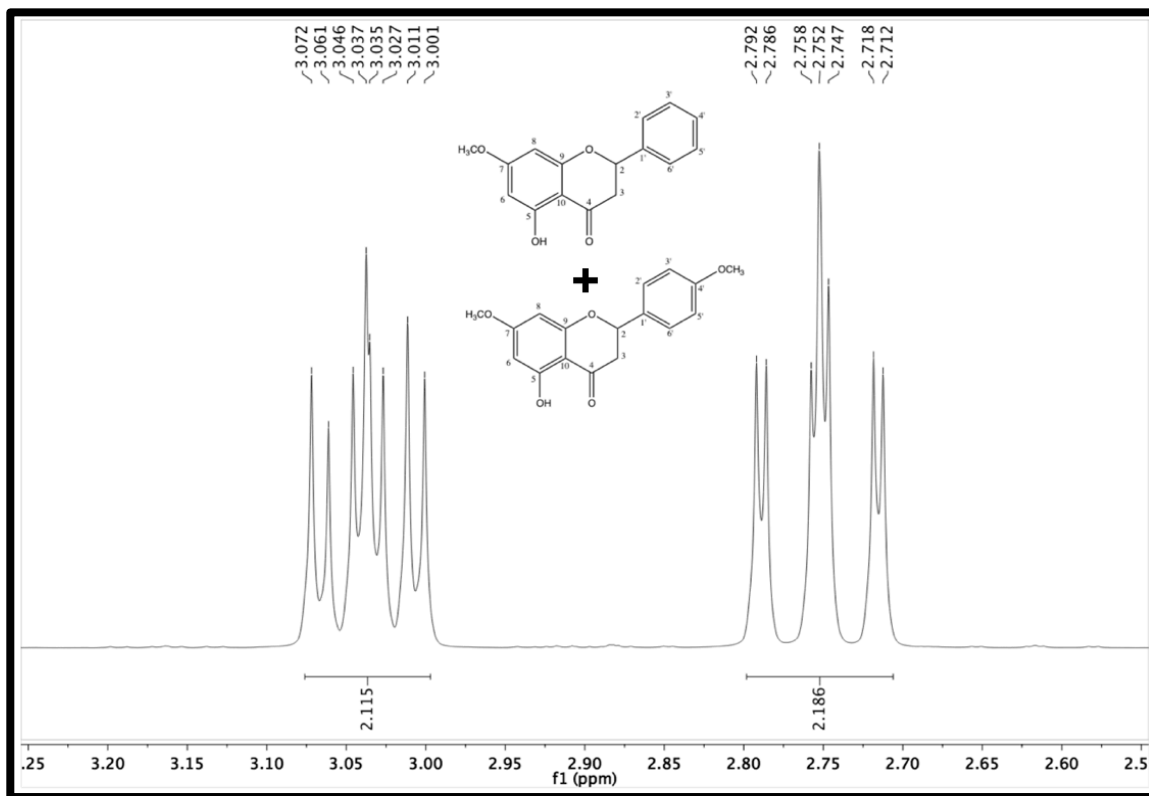
**Figura 39** – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 5,05 – 5,60 ppm.



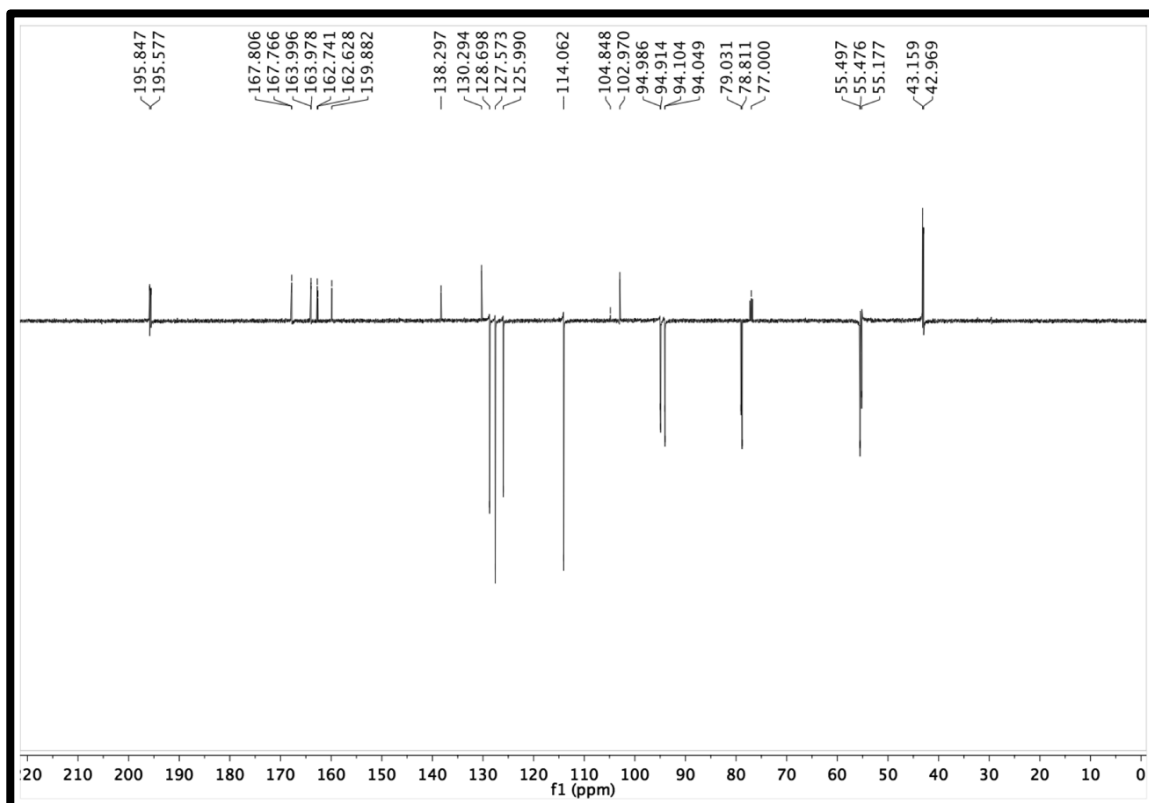
**Figura 40** – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 3,52 – 3,98 ppm.



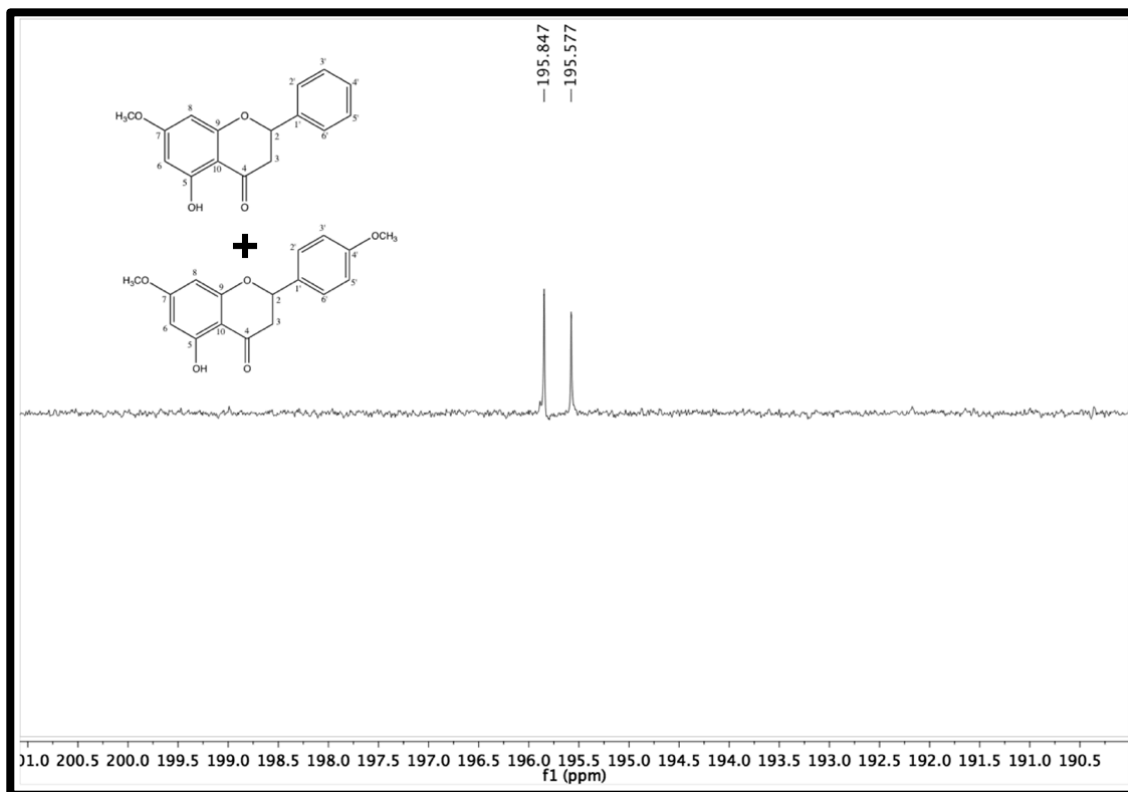
**Figura 41** – Expansão do espectro de RMN <sup>1</sup>H (500 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 2,55 – 3,25 ppm.



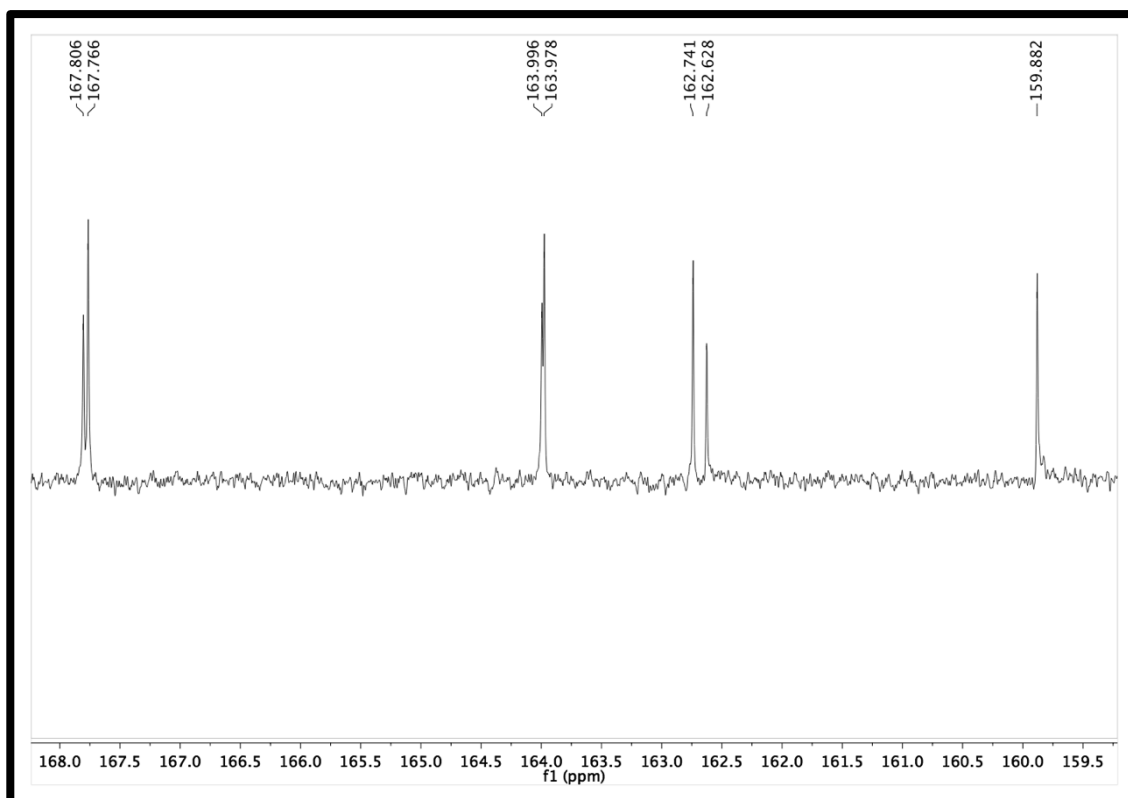
**Figura 42** – Espectro de RMN <sup>13</sup>C (125 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da mistura de Vd-5a e Vd-5b.



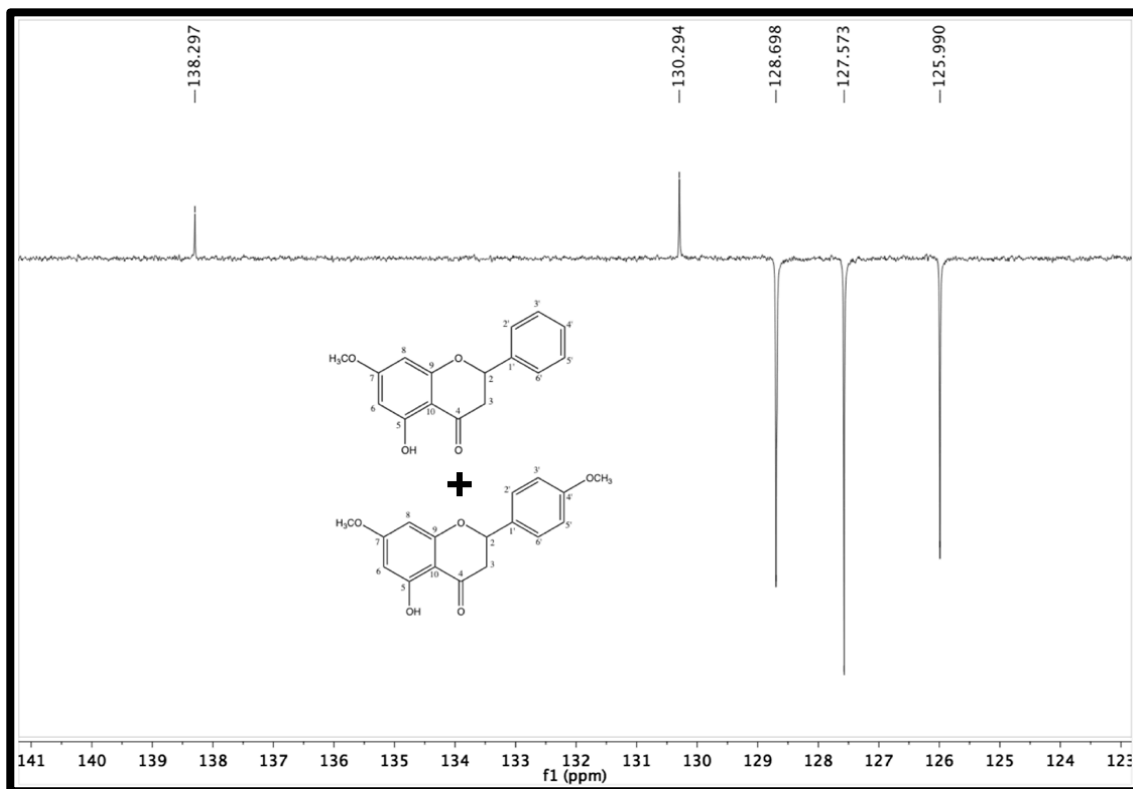
**Figura 43** – Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 190 – 201 ppm.



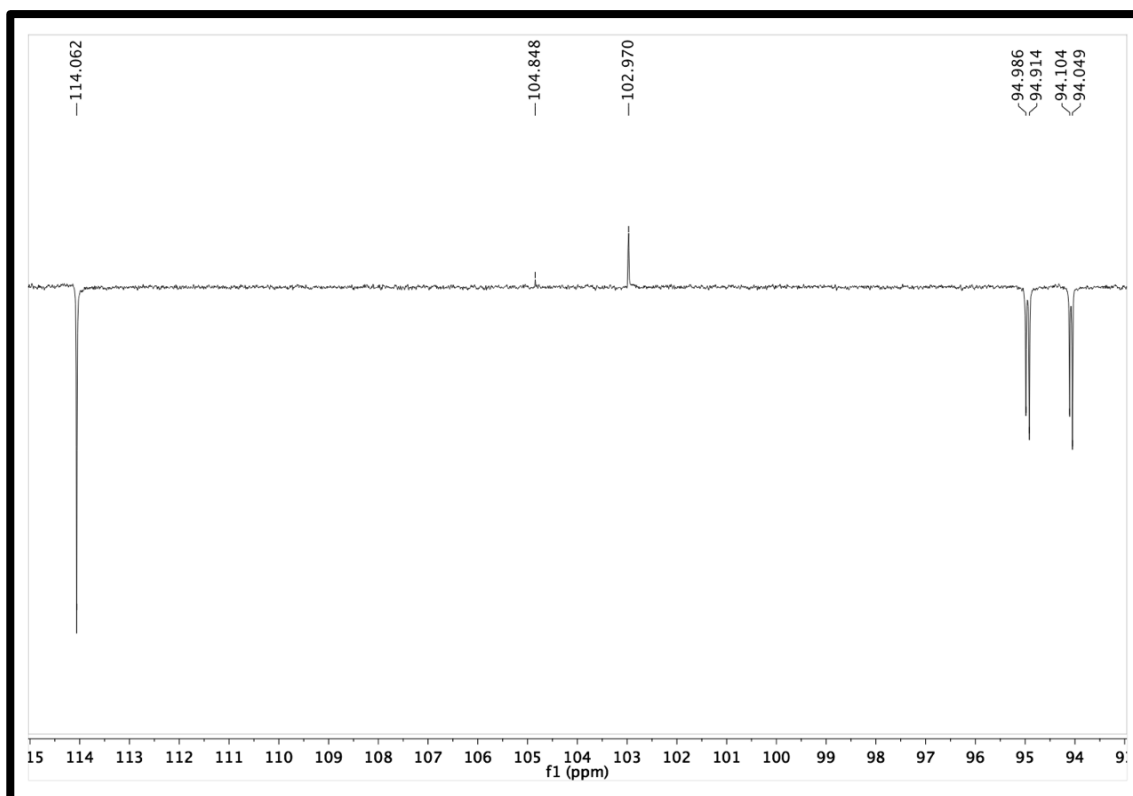
**Figura 44** – Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 159 – 168,5 ppm.



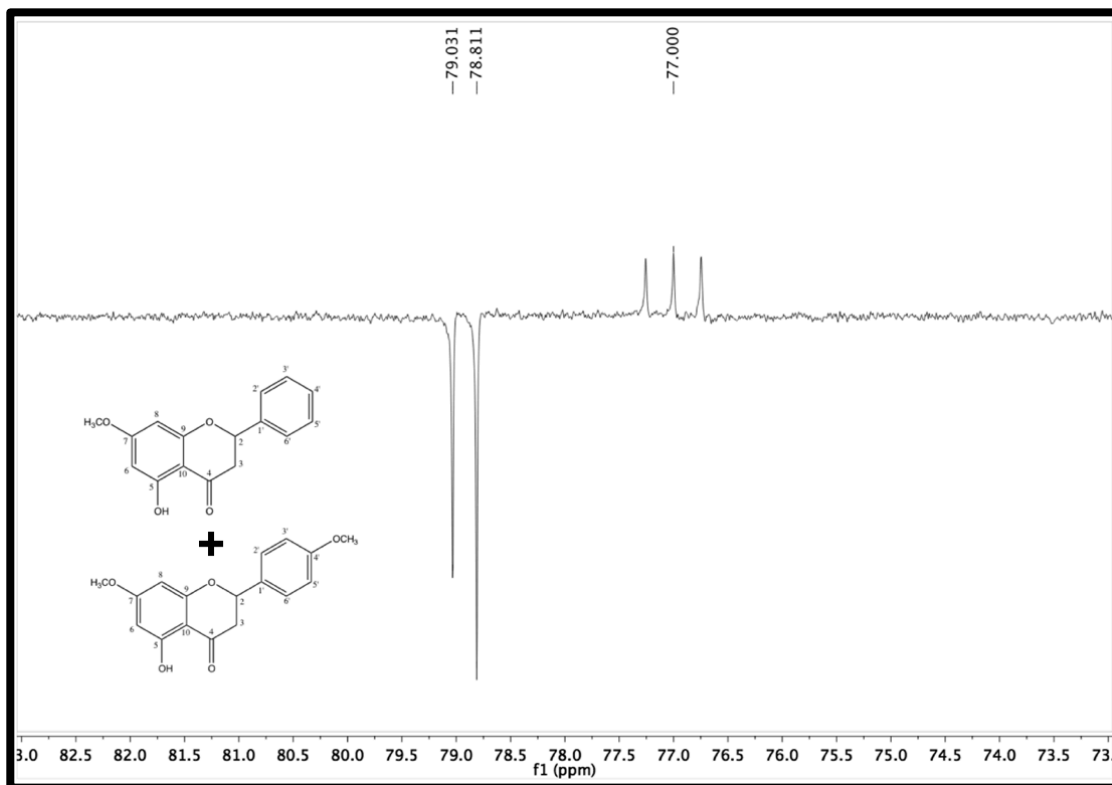
**Figura 45** – Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 123 – 141 ppm.



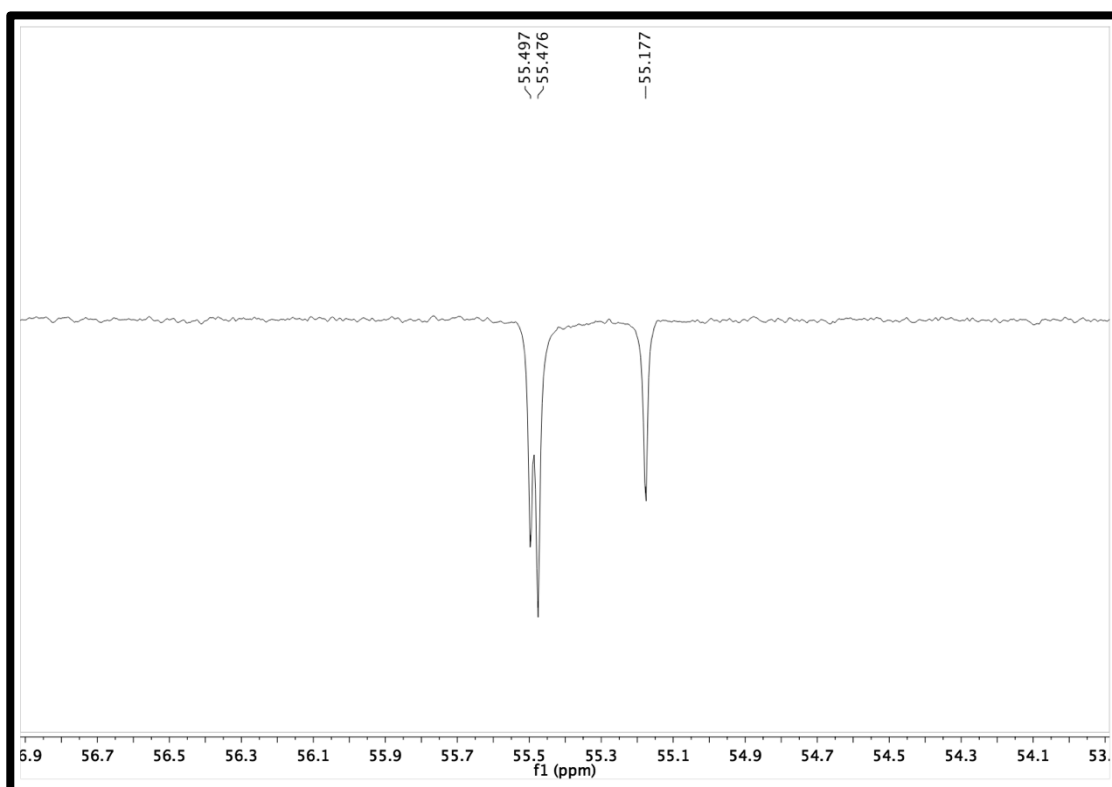
**Figura 46** – Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 93 – 115 ppm.



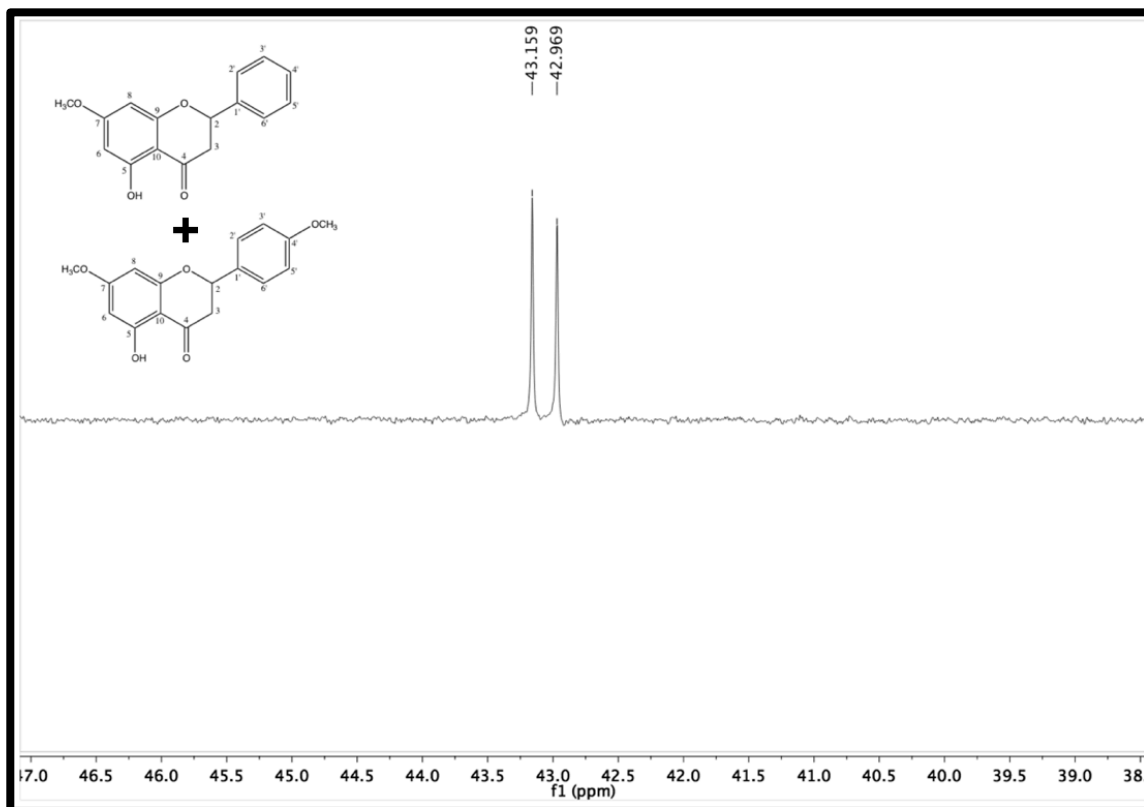
**Figura 47** – Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 73 – 83 ppm.



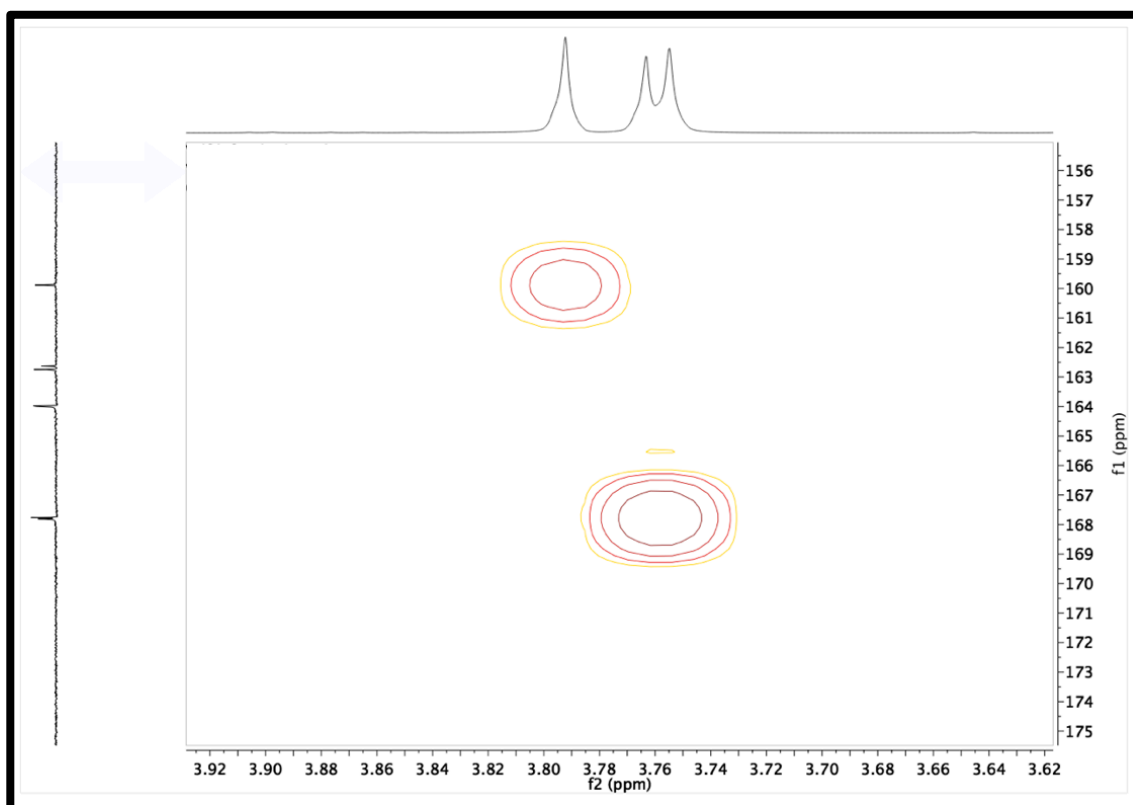
**Figura 48** – Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 53,9 – 56,9 ppm.



**Figura 49** – Expansão do espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 38,5 – 47 ppm.



**Figura 50** – Expansão do espectro de HMBC (500 e 125 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da mistura de Vd-5a e Vd-5b na região de 3,62 – 3,93 e 175 - 156 ppm.



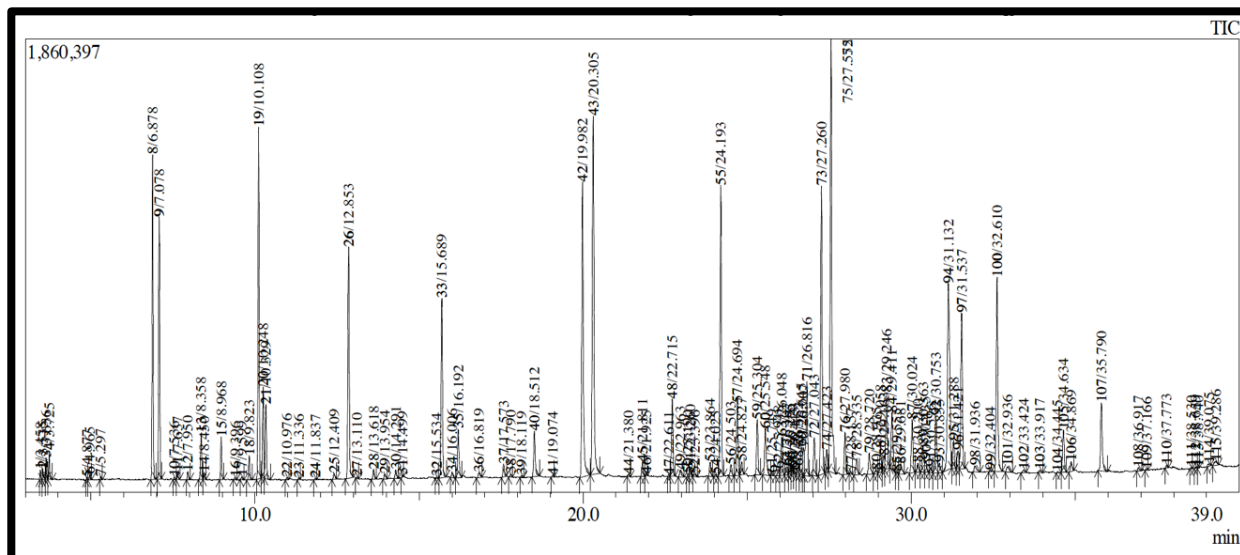
### 5.6. Identificação dos constituintes voláteis de *Varronia dardani*.

O óleo essencial das partes aéreas de *V. dardani* foi obtido por hidrodestilação com rendimento de 0,18% em relação ao peso do material fresco utilizado. Pela análise em CG-EM foi possível identificar 82 constituintes (Figura 52) correspondendo a 97,2% do total do óleo em uma mistura complexa. Sendo que o  $\delta$ -Cadineno (8,71%), timol (7,43%), carvacrol (5,92%),  $\gamma$ -cadineno (5,66%), p-cimeno (5,25%) e  $\delta$ -cadinol (5,20%) foram os constituintes majoritários (Tabela 7).

Duarte, em 2015, identificou no óleo essencial de *V. dardani*, coletada no município de Patu – RN, como sendo o composto majoritário, o d-limoneno (27,49%) seguido pelo 1,8 cineol (13,23%), linalol (10,54%),  $\alpha$ -terpineol (6,27%), (*E,E*) farnesol (6,34%) e o (*E,E*) acetil de farnesol (6,67%). No estudo de De Oliveira (2016), a espécie *V. dardani* foi coletada no município de Mossoró – RN, e a caracterização química do seu óleo essencial, apresentou como compostos majoritários o d-limoneno (20,02%), 1,8 cineol (13,25%), linalol (12,27%),  $\alpha$ -terpineol (6,48%), terpinen-4-ol (6,35%), 2E,6E acetato de farnesol (8,84%) e o 2E,6E-farnesol (8,68%). A maior parte destes compostos foram identificados no presente estudo, porém não foram considerados como majoritários.

As condições genéticas e geográficas podem alterar profundamente a composição química e a produção de um óleo essencial (MORSHEDLOO et al., 2018; SAEIDI et al., 2018), levando à uma notável diversidade de compostos na mesma espécie (URBIZU-GONZÁLEZ et al., 2017). Isto explica a diferença na composição química, principalmente dos compostos majoritários identificados nas espécies coletadas na região do Rio Grande do Norte e Paraíba.

**Figura 51** – Cromatograma obtido por cromatografia gasosa (CG-EM) do óleo essencial de *Varronia dardani*.



**Tabela 7** – Composição química do óleo essencial das partes aéreas de *Varronia dardani*.

	CONSTITUINTES	IK	OEVD (%)
1	2-Hexanol	803	0,29
2	(E)-2-Hexenal	852	0,03
3	(Z)-3-Hexenol	856	0,06
4	1-Hexanol	870	0,04
5	α-Turgeno	939	4,33
6	α-Pineno	934	3,62
7	Canfeno	949	0,04
8	Sabineno	974	0,68
9	β-Pineno	977	0,09
10	Mirceno	994	0,61
11	α-Felandreno	1006	0,04
12	3-Careno	1012	0,04
13	α-Terpineno	1018	0,38
14	p-Cimeno	1026	5,25
15	d-limoneno	1030	1,40
16	1,8 cineol	1033	1,16
17	Trans-o-cimeno	1051	0,04
18	γ-Terpineno	1061	0,02
19	Óxido de cis-linalool	1075	0,03
20	α-Terpinoleno	1091	0,12
21	Linalol	1103	3,96
22	4-(1-Metiletil)-1-metil-2-ciclohexenol	1124	0,34

23	Isopulegol	1148	0,03
24	Umbelulona	1177	0,02
25	Terpinen-4-ol	1181	3,24
26	p-Cimen-8-ol	1190	0,11
27	$\alpha$ -Terpineol	1195	0,91
28	Piperitol	1212	0,12
29	$\beta$ -Citronelol	1233	0,33
30	Éter metil timol	1239	0,05
31	Carvona	1249	0,03
32	Geraniol	1259	0,90
33	Geranial	1275	0,04
34	Carvacrol	1300	5,92
35	Timol	1310	7,43
36	$\delta$ -elemeno	1342	0,03
37	$\alpha$ -Cubebeno	1354	0,25
38	Acetato de citronelila	1358	0,03
39	$\alpha$ -Copaeno	1381	1,41
40	Acetil-geraniol	1388	0,15
41	$\beta$ -Elemeno	1397	0,15
42	$\alpha$ -Gurjuneno	1416	0,27
43	$\alpha$ -cis-Bergamoteno	1421	0,04
44	Isocariofileno	1426	5,41
45	$\beta$ -Gurjuneno	1436	0,23
46	$\alpha$ -trans-Bergamoteno	1442	1,32
47	$\alpha$ -Cariofileno	1461	1,07
48	Aromadendreno	1468	1,07
49	Cadina-1(6),4-dieno	1481	0,13
50	$\delta$ -Muuroleno	1484	0,76
51	Germacreno-D	1488	0,16
52	Germacreno-A	1492	0,12
53	$\beta$ -Selineno	1494	0,07
54	Epibiclicosquifelandreno	1500	0,17
55	Cubebol	1503	0,63
56	$\alpha$ -Muuroleno	1508	2,13
57	$\beta$ -Bisaboleno	1516	0,71
58	$\gamma$ -Cadineno	1523	5,66
59	Isogeraniol	1528	0,37
60	$\delta$ -Cadineno	1532	8,71
61	$\alpha$ -Cadineno	1546	0,78
62	$\alpha$ -Calacoreno	1552	0,03

63	$\alpha$ -Elemol	1557	0,33
64	<i>trans</i> -Nerolidol	1570	0,50
65	Palustrol	1577	0,51
66	Espatuleno	1587	1,76
67	Óxido de cariofileno	1592	1,23
68	Viridiflorol	1605	1,30
69	Epóxido de Humuleno II	1608	0,18
70	1,10-di-epi-Cubenol	1610	0,53
71	$\beta$ -Eudesmol	1611	0,23
72	Rosifoliol	1613	0,10
73	Epicubenol	1615	1,21
74	$\gamma$ -Eudesmol	1617	0,22
75	$\delta$ -Cadinol	1620	5,20
76	$\beta$ -Cadin-4-en-10-ol	1623	0,51
77	Cadin-4-en-10-ol	1626	3,18
78	6-isopropenil-4,8a-dimetildecáhidro-1-naftalenol	1641	4,01
79	Oplopanona	1659	0,05
80	Benzoato de benzila	1668	0,86
81	Ledol	1684	1,39
82	Fitol	1930	0,07

IK = índice de Kovats; Componentes identificados em CG-EM com base no Índice de Retenção (IR) em comparação com a biblioteca NIST *Mass Spectral Library* (*National Institute of Standards and Technology*) e a literatura. Os compostos foram listados de acordo com a ordem de eluição na coluna RTX-5MS (5% Diphenyl / 95% dimethyl polysiloxane) com 30 metros de comprimento.

## 5.7. Ensaio microbiológicos

### 5.7.1. Determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A concentração inibitória mínima foi determinada para as cepas *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Streptococcus salivarius* (ATCC 7073) e *Streptococcus oralis* (ATCC 10557) pelo método de microdiluição em caldo com o uso de Resazurina<sup>®</sup> (Tabela 8). Foram testados o óleo essencial de *Varronia dardani*, o extrato etanólico bruto de *V. dardani* (Vd-EEB), a sua fase diclorometano (Vd-FD), as substâncias pinostrobin, chalcona isolada (Vd-1) e em mistura com a chalcona gimnogrameno (Vd-2), e a flavanona pinocembrina isolada (Vd-3).

**Tabela 8** – Concentração Inibitória Mínima das amostras derivadas de *Varronia dardani*, frente às cepas *E. faecalis*, *S. salivarius* e *S. oralis*.

Amostras	CIM (mg/mL)		
	Espécies de microrganismos testadas		
	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Streptococcus salivarius</i>	<i>Streptococcus oralis</i>
Vd-OE	2	2	-
Vd-EEB	-	2	-
Vd-FD	1	1	-
Vd-1	-	0,25	-
Vd-1 e Vd-2	0,5	0,5	-
Vd-3	0,25	0,25	-

O crescimento da cepa de *S. oralis* não foi impedido por nenhuma das amostras. O óleo essencial de *V. dardani* (Vd-OE) inibiu o crescimento de *E. faecalis* e *S. salivarius* na concentração máxima testada (2 mg/mL), já o extrato etanólico bruto de *V. dardani* (Vd-EEB) não inibiu o crescimento de *E. faecalis*, porém foi capaz de inibir o crescimento da cepa de *S. salivarius* na concentração máxima (2 mg/mL). A fase diclorometano, exibiu uma CIM de 1 mg/mL frente às cepas de *E. faecalis* e *S. salivarius*. O diclorometano pode extrair mais compostos apolares, os quais penetram mais facilmente a parede celular da bactéria, favorecendo assim a sua atividade antimicrobiana (MOREIRA et al., 2013).

A pinostroquina chalcona isolada (Vd-1) teve somente a CIM estabelecida frente à cepa de *S. salivarius* (0,25 mg/mL), enquanto que em mistura com o gimnogrameno (Vd-1 e Vd-2), apresentou CIM para as cepas *E. faecalis* e *S. salivarius* (0,5 mg/mL). Esse aumento de inibição pode ter ocorrido por diversos fatores, como sinergismo ou até mesmo à maior lipofilicidade do gimnogrameno, devido à inserção de outra metoxila à molécula. Pelo fato da parede celular das bactérias conter uma alta quantidade de lipídios, tais como o ácido micólico, substâncias lipofílicas são susceptíveis de penetrar com facilidade na célula (PALOMINO et al., 2002).

Com relação à flavanona pinocembrina (Vd-3), a mesma inibiu o crescimento das cepas de *E. faecalis* e *S. salivarius* (0,25 mg/mL).

### 5.7.2. Inibição da Formação de Biofilme (IFB)

Este experimento avaliou a capacidade das amostras derivadas de *V. dardani* de inibir a formação de biofilme com as cepas de *E. faecalis* e *S. salivarius*, visto que estas foram as únicas que apresentaram crescimento afetado no teste de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM), a qual serviu de base para a determinação da concentração inicial de cada amostra testada.

Observando os resultados deste teste para *E. faecalis*, expressos em porcentagem de inibição (I%) na Tabela 9, e seguindo o *escore* (Quadro 3, p. 46) proposto por Peixoto e colaboradores (2017), foi possível determinar uma forte inibição (*escore* 3) nas concentrações de 4 mg/mL para o extrato etanólico bruto (Vd-EEB), 2 mg/mL para a fase diclorometano (Vd-FD) e o óleo essencial (Vd-OE), enquanto que para a pinostrobina chalcona isolada (Vd-1) e sua mistura com o gimnogrameno (Vd-1 e Vd-2), a menor concentração que apresentou uma forte inibição foi a maior concentração testada (1 mg/mL). Para a flavanona pinocembrina isolada (Vd-3), a menor concentração que exibiu uma forte inibição do biofilme da cepa de *E. faecalis* foi 1 mg/mL.

Ao analisar os dados do teste para *S. salivarius*, os quais estão expressos em porcentagem de inibição (I%) na Tabela 10, foi possível determinar uma forte inibição (*escore* 3) nas concentrações de 4 mg/mL para o extrato etanólico bruto (Vd-EEB), para a fase diclorometano (Vd-FD) e para o óleo essencial (Vd-OE). Para a pinostrobina chalcona isolada (Vd-1), a menor concentração com forte inibição da formação do biofilme foi de 0,25 mg/mL, enquanto que sua mistura com o gimnogrameno (Vd-1 e Vd-2), a menor concentração foi 1 mg/mL. Com relação à flavanona pinocembrina isolada (Vd-3), a menor concentração que exibiu uma forte inibição do biofilme da cepa de *S. salivarius* foi 0,5 mg/mL. No biofilme formado com a cepa de *S. salivarius*, observou-se uma maior inibição da sua formação quando se utilizou isoladamente a pinostrobina chalcona e a flavanona.

Essa forte inibição apresentada por algumas das amostras testadas, mostra que as mesmas conseguem inibir a formação de biofilme, tornando a bactéria mais vulnerável para a ação de um determinado antimicrobiano.

**Tabela 9** – Índice de Inibição da Formação de Biofilme (IFB) das amostras derivadas de *Varronia dardani*, frente à cepa de *E. faecalis*. Os valores são expressos em porcentagem de inibição (I%).

Concentração (mg/mL)	Vd-EEB (%)	Vd-FD (%)	Vd-OE (%)	Vd-1 (%)	Vd-1 e Vd-2 (%)	Vd-3 (%)
4,00000	75 < I% ≤ 100	75 < I% ≤ 100	75 < I% ≤ 100	-	-	-
2,00000	25 < I% ≤ 50	75 < I% ≤ 100	75 < I% ≤ 100	-	-	-
1,00000	25 < I% ≤ 50	50 < I% ≤ 75	25 < I% ≤ 50	75 < I% ≤ 100	75 < I% ≤ 100	75 < I% ≤ 100
0,50000	I% ≤ 25%	50 < I% ≤ 75	I% ≤ 25%	25 < I% ≤ 50	50 < I% ≤ 75	50 < I% ≤ 75
0,25000	I% ≤ 25%	I% ≤ 25%	I% ≤ 25%	I% ≤ 25%	50 < I% ≤ 75	25 < I% ≤ 50
0,12500	I% ≤ 25%	I% ≤ 25%	I% ≤ 25%	I% ≤ 25%	25 < I% ≤ 50	I% ≤ 25%
0,06250	-	-	-	I% ≤ 25%	I% ≤ 25%	I% ≤ 25%
0,03125	-	-	-	I% ≤ 25%	I% ≤ 25%	I% ≤ 25%

**Tabela 10** – Índice de Inibição da Formação de Biofilme (IFB) das amostras derivadas de *Varronia dardani*, frente à cepa de *S. salivarius*. Os valores são expressos em porcentagem de inibição (I%).

Concentração (mg/mL)	Vd-EEB (%)	Vd-FD (%)	Vd-OE (%)	Vd-1 (%)	Vd-1 e Vd-2 (%)	Vd-3 (%)
4,00000	75 < I% ≤ 100	75 < I% ≤ 100	75 < I% ≤ 100	-	-	-
2,00000	50 < I% ≤ 75	25 < I% ≤ 50	25 < I% ≤ 50	-	-	-
1,00000	25 < I% ≤ 50	I% ≤ 25%	I% ≤ 25%	75 < I% ≤ 100	75 < I% ≤ 100	75 < I% ≤ 100
0,50000	I% ≤ 25%	I% ≤ 25%	I% ≤ 25%	75 < I% ≤ 100	50 < I% ≤ 75	75 < I% ≤ 100
0,25000	I% ≤ 25%	I% ≤ 25%	I% ≤ 25%	75 < I% ≤ 100	25 < I% ≤ 50	50 < I% ≤ 75
0,12500	I% ≤ 25%	I% ≤ 25%	I% ≤ 25%	50 < I% ≤ 75	25 < I% ≤ 50	25 < I% ≤ 50
0,06250	-	-	-	50 < I% ≤ 75	I% ≤ 25%	25 < I% ≤ 50
0,03125	-	-	-	I% ≤ 25%	I% ≤ 25%	I% ≤ 25%

*Conclusões*

## 6. CONCLUSÕES

O estudo fitoquímico de *Varronia dardani* levou ao isolamento de três compostos e duas misturas, que foram identificados por Espectrometria de Massas e Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  e bidimensional.

Foram identificadas duas chalconas - pinostrobrina chalcona e gimnogrameno; e quatro flavanonas - pinocembrina, isosakuranetina, pinostrobrina e sakuranetina-4'-metil éter, sendo os dois últimos compostos já descritos na literatura. Com exceção destes, todos os outros estão sendo relatados pela primeira vez na espécie em estudo.

O óleo essencial da espécie foi caracterizado por CG-MS, sendo possível a identificação de 82 constituintes, sendo os majoritários o  $\delta$ -Cadineno, timol, carvacrol,  $\gamma$ -cadineno, p-cimeno e o  $\delta$ -cadinol.

O óleo essencial de *V. dardani* inibiu o crescimento de *E. faecalis* e *S. salivarius*, já o extrato etanólico bruto de *V. dardani* não inibiu o crescimento de *E. faecalis*, porém foi capaz de inibir o crescimento da cepa de *S. salivarius*, porém a fase diclorometano, exibiu uma CIM menor frente às cepas de *E. faecalis* e *S. salivarius*. Das substâncias isoladas da fase diclorometano, a pinocembrina, foi capaz de inibir, com a menor concentração, o crescimento tanto da cepa de *E. faecalis* quanto a da *S. salivarius*.

A pinocembrina, a pinostrobrina chalcona e sua mistura com o gimnogrameno apresentaram uma forte inibição da formação do biofilme de *E. faecalis* na maior concentração testada. A pinostrobrina chalcona foi capaz de inibir fortemente a formação do biofilme de *S. salivarius* na menor concentração.

Em resumo, os resultados *in vitro* indicam que a espécie *V. dardani* contém em sua composição química, substâncias com potencial antimicrobiano, sendo a espécie forte candidata a estudos complementares, que visam buscar uma nova terapia para infecções dentais.

# *Referências*

**REFERÊNCIAS**

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

ADAMS, M., BERSET, C., KESSLER, M., HAMBURGER, M. Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders-a survey of European herbals from the 16th and 17th century. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 121, n. 3, p. 343–59, 2009.

AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. New York, Elsevier, 1989.

AKSÖZ, B. E.; ERTAN, R. Chemical and Structural Properties of Chalcones I. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, p. 223-242, 2011.

ALMEIDA, M. P.; ROMERO, R. B.; ROMERO, A. L.; CRESPIAN, E. R. Explorando a química e a atividade antifúngica de óleos essenciais: Uma proposta de projeto para a Educação Básica. **Latin American Journal of Science Education**, v. 1, p. 121-126, 2015.

AL-MUSAYEIB, N.; PERVEEN, S.; FATIMA, I.; NASIR, M.; HUSSAIN, A. Antioxidant, anti-glycation and anti-inflammatory activities of phenolic constituents from *Cordia sinensis*. **Molecules**, v. 16, n. 12, p. 10214-10226, 2011.

ARPINO P.; PRÉVÔT A.; SERPINET J.; TRANCHANT J.; VERGNOL A.; WITIER P. **Manuel Pratique de Chromatographie en Phase Gazeuse**, Masson, Paris, 1995.

ÁVILA, H. P.; SMÂNIA, E. D. F. A.; DELLE MONACHE, F.; SMÂNIA, A. Structure–activity relationship of antibacterial chalcones. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 16, n. 22, p. 9790-9794, 2008.

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.

BANDONI, A. L.; MEDINA, J. E.; RONDINA, R. V. D.; COUSSIO, J. D. Genus *Baccharis* L. I: Phytochemical Analysis of a non-polar Fraction from *B. crispa* Sprengel. **Planta Medica**, v. 34, n. 07, p. 328-331, 1978.

BASAVARAJU, M.; SISNITY, V. S.; PALAPARTHY, R.; ADDANKI, P. K. Quorum quenching: Signal jamming in dental plaque biofilms. **Journal of Dental Sciences**, v. 4, n. 11, p. 349-352, 2016.

BEREKSI REGUIG, Y. L. **Interactions entre l'huile essentielle de *Thymus capitatus*, *Mentha piperita* et *Carthamus caeruleus*, et de leur composants majoritaires: Effet du synergisme ou d'antagonisme sur l'activité antioxydante**. Tese (Doutorado em Química), Université Abou Bekr Belkaid Tlemcen, Departamento de Química, Tlemcen, 2016.

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

BLUNDER, M.; ORTHABER, A.; BAUER, R.; BUCAR, F.; KUNERT, O. Efficient identification of flavones, flavanones and their glycosides in routine analysis via off-line combination of sensitive NMR and HPLC experiments. **Food Chemistry**, v. 218, p. 600-609, 2017.

BOHM, B.A. The minor flavonoids. In: Harborne, J.B. (Ed.), **The Flavonoids: Advances in Research Since 1986**. Chapman & Hall, London, UK, p. 387-440, 1994.

(LSPV-FC-IECA) - Laboratório de Sistemática de Plantas Vasculares da Faculdade de Ciências do Instituto de Ecologia e Ciências Ambientais. **BORAGINACEAE**. Disponível em: [http://www.thecompositaehut.com/www\\_tch/webcurso\\_spv/familias\\_pv/boraginaceae.html](http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/boraginaceae.html). Acesso em maio de 2017.

BRASIL. **Ministério do Meio Ambiente. Serviço florestal Brasileiro**. [2017]. Disponível em: [www.florestal.gov.br/snif/recursos-florestais/os-biomas-e-suas-florestas](http://www.florestal.gov.br/snif/recursos-florestais/os-biomas-e-suas-florestas). Acesso em maio de 2017.

DINIZ, J. C.; VIANA, F. A.; OLIVEIRA, O. F.; MACIEL, M. A. M.; TORRES, M. D. C. D. M.; BRAZ-FILHO, R.; PESSOA, O. D. L. H and  $^{13}\text{C}$  NMR assignments for two new cordiaquinones from roots of *Cordia leucocephala*. **Carbon**, v. 1, p. 2, 2009.

BRAZ-FILHO, R. Phytochemical contribution to development of a emergent country. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 229-239, 2010.

BRAZ-FILHO, R. Química de produtos naturais: importância, interdisciplinaridade, dificuldades e perspectivas. A peregrinação de um pacatubano. **Química Nova**, 1994.

BRITANNICA ACADEMIC, Encyclopedia Britannica, "Boraginaceae.", 8 Dec. 2014. [academic-britannica.ez15.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/Boraginaceae/80696](http://academic-britannica.ez15.periodicos.capes.gov.br/levels/collegiate/article/Boraginaceae/80696). Acesso em agosto de 2017.

BUCKINGHAM, J.; MUNASINGHE, V. **Dictionary of Flavonoids with CD-ROM**. Boca Raton, FL: CRC Press, 2015.

CAO, X. D.; DING, Z. S.; JIANG, F. S.; DING, X. H.; CHEN, J. Z.; CHEN, S. H.; LV, G. Y. Antitumor constituents from the leaves of *Carya cathayensis*. **Natural Product Research**, v. 26, n. 22, p. 2089-2094, 2011.

CARVALHO JUNIOR, P. M.; 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 verbenacea* DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 297-301, 2004.

CARVALHO, A. C. B. Plantas medicinais e fitoterápicos: regulamentação sanitária e proposta de modelo de monografia para espécies oficializadas no Brasil. Brasília, 2011.

CARVALHO, J. L. S.; BLANK, A. F.; ALVES, P. B.; EHLERT, P. A. D.; MELO, A. S.; CAVALCANTI, S. C. H.; ARRIGONI-BLANK, M. F.; SILVAMANN, R. S. Influence of the harvesting time, temperature and drying period on basil (*Ocimum basilicum* L.) essential oil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, n.1, p. 24-30, 2006.

CHAURASIYA, N. D.; LEÓN, F.; DING, Y.; GÓMEZ-BETANCUR, I.; BENJUMEA, D.; WALKER, L. A.; TEKWANI, B. L. Interactions of Desmethoxyyangonin, a Secondary Metabolite from *Renealmia alpinia*, with Human Monoamine Oxidase-A and Oxidase-B. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

CHIARADIA, M. C.; COLLINS, C. H.; JARDIM, Isabel CSF. The state of the art of chromatography associated with the tandem mass spectrometry for toxic compound analyses in food. **Química Nova**, v. 31, n. 3, p. 623-636, 2008.

CHUDNOVSKIY, R.; THOMPSON, A.; THARP, K.; HELLERSTEIN, M.; NAPOLI, J. L.; STAHL, A. Consumption of clarified grapefruit juice ameliorates high-fat diet induced insulin resistance and weight gain in mice. **PloS one**, v. 9, n. 10, p. 405-408, 2014.

D'ARCHIVIO, M.; FILESI, C.; DI BENEDETTO, R.; GARGIULO, R.; GIOVANNINI, C.; MASELLA, R. Polyphenols, dietary sources and bioavailability. **Annali dell'Istituto Superiore di Sanità**, v. 43, n. 4, p. 348-61, 2007.

DAMIANAKOS, H.; JEZIOREK, M.; SYKŁOWSKA-BARANEK, K.; BUCHWALD, W.; PIETROSIUK, A.; CHINO, I. Pyrrolizidine alkaloids from *Cynoglossum columnae* Ten. (Boraginaceae). **Phytochemistry Letters**, v. 15, p. 234-237, 2016.

DE CARVALHO, F. A. G. **Contribuição ao estudo fitoquímico da espécie *Varronia dardani* – (Taroda) J.S. Mill. (Boraginaceae)**. Dissertação (Mestrado em Ciências Naturais) – Programa de Pós-graduação em Ciências Naturais, Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Mossoró, 2016.

DE CARVALHO JR, P. M.; 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 verbenacea* DC. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, n. 2-3, p. 297-301, 2004.

DE OLIVEIRA, F. S.; CRUVINEL, T.; MÉNDEZ, D. A. C.; DIONÍSIO, E. J.; RIOS, D.; MACHADO, M. A. A. M. The in vitro effect of Antimicrobial Photodynamic Therapy on dental microcosm biofilms from partially erupted permanent molars: a pilot study. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, n. 21, p. 163-167, 2018.

DE OLIVEIRA, L. G. S.; RIBEIRO, D. A.; SARAIVA, M. E.; DE MACÊDO, D. G.; MACEDO, J. G. F.; PINHEIRO, P. G.; DE MENEZES, I. R. A. Chemical variability of essential oils of *Copaifera langsdorffii* Desf. in different phenological phases on a savannah in the Northeast, Ceará, Brazil. **Industrial Crops and Products**, v. 97, p. 455-464, 2017.

DE OLIVEIRA, F. A. G. **Contribuição ao estudo fitoquímico da espécie *Varronia dardani* – (Taroda) J.S. Mill. (Boraginaceae)**. Dissertação (Mestrado Ciências

Naturais), Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Mossoró, 2016.

DE SOUZA, M. F.; MANGANOTTI, S. A.; SOUZA, P. N. S.; MEIRA, M. R.; DE MATOS, C. D. C.; MARTINS, E. R. Influência do horário de coleta, orientação geográfica e dossel na produção de óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. **Revista Biotemas**, v. 24, p. 9–14, 2011.

DI CARLO, G.; MASCOLO, N.; IZZO, A. A.; CAPASSO, F. Flavonoids: old and new aspects of a class of natural therapeutic drugs. **Life Sciences**, v. 65, n. 4, p. 337–353, 1999.

DONLAN, R. M.; COSTERTON, J. W. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 5, p. 167–93, 2002.

DORNAS, W. C.; OLIVEIRA, T. T. D.; RODRIGUES-DAS-DORES, R. G.; SANTOS, A. F. D.; NAGEM, T. J. Flavonóides: Potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmaceuticas Basica e Aplicada**, v. 28, n. 31, p. 241–249, 2007.

DOSSOUKPEVI, R.; AHANHANZO, C.; GBAGUIDI, F.; AGBANGLA, C.; AGBIDINOUKOUN, A.; CACAÏ, G. Incidence des plantes régénérées in vitro sur les huiles essentielles de deux espèces de *Ocimum* cultivées au Bénin. **Journal of Applied Biosciences**, v. 99, n. 1, p. 9441-9449, 2016.

DOUGLAS, C. W. I.; HEATH, J.; HAMPTON, K. K.; PRESTON, F. E. Identity of *viridans streptococci* isolated from cases of infective endocarditis. **Journal of Medical Microbiology**, v. 39, n. 3, p. 179-182, 1993.

DRESLER, S.; RUTKOWSKA, E.; BEDNAREK, W.; STANISŁAWSKI, G.; KUBRAK, T.; BOGUCKA-KOCKA, A.; WÓJCIK, M. Selected secondary metabolites in *Echium vulgare* L. populations from nonmetalliferous and metalliferous areas. **Phytochemistry**, v. 133, p. 4-14, 2017a.

DRESLER, S.; SZYMCZAK, G.; WÓJCIK, M. Comparison of some secondary metabolite content in the seventeen species of the Boraginaceae family. **Pharmaceutical Biology**, v. 55, n. 1, p. 691-695, 2017b.

DUARTE, B. A. M. **Estudo químico e biológico da *Varronia dardani* (Taroda) J.S. Mill (Boraginaceae)**. Dissertação (Mestrado Ciências Naturais), Universidade do Estado do Rio Grande do Norte, Programa de Pós-Graduação em Ciências Naturais, Mossoró, 2015.

DUARTE, M. C. T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. **Revista Multiciência**, Campinas, v. 7, n. 1, 2006.

DUTRA, R. C.; CAMPOS, M. M.; SANTOS, A. R.; CALIXTO, J. B. Medicinal plants in Brazil: pharmacological studies, drug discovery, challenges and perspectives. **Pharmacological Research**, v. 112, p. 4-29, 2016.

FAN, W.; HUANG, Z.; FAN, B. Effects of prolonged exposure to moderate static magnetic field and its synergistic effects with alkaline pH on *Enterococcus faecalis*. **Microbial Pathogenesis**, v. 115, p. 117-122, 2018.

FERNANDES, T.; BHAVSAR, C.; SAWARKAR, S.; D'SOUZA, A. Current and novel approaches for control of dental biofilm. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 536, n. 1, p. 199-210, 2018.

FOUSEKI, M. M.; DAMIANAKOS, H.; KARIKAS, G. A.; ROUSSAKIS, C.; GUPTA, M. P.; CHINO, I. Chemical constituents from *Cordia alliodora* and *C. collococa* (Boraginaceae) and their biological activities. **Fitoterapia**, v. 115, p. 9-14, 2016.

GAO, L.; LIU, Y.; KIM, D.; LI, Y.; HWANG, G.; NAHA, P. C.; CORMODE, D. P.; KOO, H. Nanocatalysts promote *Streptococcus mutans* biofilm matrix degradation and enhance bacterial killing to suppress dental caries *in vivo*. **Biomaterials**, v. 101, p. 272-284, 2016.

GATTUSO, G.; BARRECA, D.; GARGIULLI, C.; LEUZZI, U.; CARISTI, C. Flavonoid composition of *citrus* juices. **Molecules**, v. 12, n. 8, p. 1641-1673, 2007.

GOSSAN, D.P.; ALABDUL MAGID, A.; YAO-KOUASSI, P.A.; AHIBO COFFY, A.; VOUTQUENNE-NAZABADIOKO, L.; HARAKAT, D. New acylated flavonol glycosides from the aerial parts of *Gouania longipetala*. **Phytochemistry**, v. 11, p. 306-310, 2015.

GUNTERN, A.; IOSET, J. R.; QUEIROZ, E. F.; FOGGIN, C. M.; HOSTETTMANN, K. Quinones from *Heliotropium ovalifolium*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 4, p. 631-635, 2001.

GUPTA, A.; BIRHMAN, K.; RAHEJA, I.; SHARMA, K. S.; KAR, H. K. Quercetin: A wonder bio avonoid with therapeutic potential in disease management. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease**, v. 6, n. 3, p. 248-252, 2016.

HALL-STOODLEY, L.; COSTERTON, J. W.; STOODLEY, P. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 2, p. 95-108, 2004.

HAN, I. W.; KWON, O. C.; OH, M. G.; CHOI, Y. S.; LEE, S. E. Effects of Rowachol on prevention of postcholecystectomy pain after laparoscopic cholecystectomy: prospective multicenter randomized controlled trial. **HPB: The Official Journal of the International Hepato Pancreato Biliary Association**, v. 18, n. 8, p. 664-670, 2016.

HEINZMANN, B.M.; VOLKER, S. Óleos voláteis. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1ed. Porto Alegre: Artmed, v. 1, p. 167-184, 2017.

HOELTGEBAUM, M. P.; DOS REIS, M. S. Genetic diversity and population structure of *Varronia curassavica*: a medicinal polyploid species in a threatened ecosystem. **The Journal of Heredity**, v. 108, n. 4, p. 415-423, 2017.

HOJO, K.; NAGAOKA, S.; OHSHIMA, T.; MAEDA, N. Bacterial interactions in dental biofilm development. **Journal of Dental Research**, v. 88, p. 982-990, 2009.

HUANG, R.; LI, M.; GREGORY, R. L. Bacterial interactions in dental biofilm. **Virulence**, v. 2, n. 5, p. 435-444, 2011.

ISHIZAWA K.; YOSHIKUMI, M.; KAWAI, Y.; TERAOKA, J.; KIHARA, Y.; IKEDA, Y. Pharmacology in health food: metabolism of quercetin in vivo and its protective effect against arteriosclerosis. **Journal of Pharmacological Sciences**, v. 115, n. 4, p. 466-70, 2011.

IGNOATO, M. C.; FABRÃO, R. M.; SCHUQUEL, I. T. A.; BOTELHO, M. F. P.; SANTIN, S. M. DE O.; ARRUDA, L. L. M. DE; BERSANI-AMADO, C. A.; SOUZA, M. C. DE. Estudo fitoquímico e avaliação da atividade anti-inflamatória de *Aeschynomene fluminensis* vell. (Fabaceae). **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2241-2244, 2012.

KAWADA-MATSUO, M.; KOMATSUZAWA, H. Role of *Streptococcus mutans* two-component systems in antimicrobial peptide resistance in the oral cavity. **Japanese Dental Science Review**, n. 53, v. 3, p. 86-94, 2017.

KHAN, M. K.; DANGLES, O. A comprehensive review on flavanones, the major citrus polyphenols. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 33, n. 1, p. 85-104, 2014.

KIM, DONG-HYUN; BAE, EUN-AH; HAN, M. J. Anti-Helicobacter pylori activity of the metabolites of poncirin from *Poncirus trifoliata* by human intestinal bacteria. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 22, n. 4, p. 422-424, 1999.

KREIS, W; MUNKE, R. T. J; DE PÁDUA, R. M. Biossíntese de metabólitos primários e secundários. In: Simões, C.M.O.; Schenkel, E.P.; Mello, J.C.P.; Mentz, L.A.; Petrovick, P.R. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento**. 1ed. Porto Alegre: Artmed, v. 1, p. 167-184, 2017.

KULKARNI, P. Calcium Chloride catalyzed Intramolecular Oxa Michael addition of 2'-Hydroxychalcone to Flavanone. **Moroccan Journal of Chemistry**, v. 2, n. 4, p. 295-301, 2014.

LABORATÓRIO DE SISTEMÁTICA DE PLANTAS VASCULARES DA FACULDADE DE CIÊNCIAS DO INSTITUTO DE ECOLOGIA E CIÊNCIAS AMBIENTAIS (LSPV-FC-IECA). Disponível em: <[www.thecompositaehut.com/www\\_tch/webcurso\\_spv/familias\\_pv/boraginaceae.html](http://www.thecompositaehut.com/www_tch/webcurso_spv/familias_pv/boraginaceae.html)> Acesso em janeiro de 2018.

LE BAIL, J. C.; POUGET, C.; FAGNERE, C.; BASLY, J. P.; CHULIA, A. J.; HABRIOUX, G. Chalcones are potent inhibitors of aromatase and 17 $\beta$ -hydroxysteroid dehydrogenase activities. **Life Sciences**, v. 68, n. 7, p. 751-761, 2001.

LEE, T. H.; HAN, J. H.; KIM, H. J.; PARK, S. M.; PARK, S. H.; KIM, S. J. Is the addition of choleretic agents in multiple double-pigtail biliary stents effective for difficult common bile duct stones in elderly patients? A prospective, multicenter study. **Gastrointestinal Endoscopy**, v. 74, p. 96-102, 2011.

LEVY, S. B. The challenge of antibiotic resistance. **Scientific American**, v. 278, p. 46-53, 1998.

LORENZI, H., MATOS, F. J. A. **Plantas Medicinais no Brasil**. Nova Odessa: Instituto Plantarum. p. 544, 2008.

LUEBERT, F.; CECCHI, L.; FROHLICH, M. W.; GOTTSCHLING, M.; GUILLIAMS, C. M.; HASENSTAB-LEHMAN, K. E.; HILGER, H. H.; MILLER, J. S.; MITTELBACH, M.; NAZAIRE, M.; NEPI, M.; NOCENTINI, C.; OBER, D.; OLMSTEAD, R. G.; SELVI, F.; SIMPSON, M. G.; SUTORY, K.; VALDÉS, B.; WALDEN, G. K.; WEIGEND, M. Familial classification of the Boraginales. **Taxon**, v. 65, n. 3, p. 502-522, 2016.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; DE OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia da Reprodução**, v. 27, n. 1-2, p. 33-39, 2010.

MALEK, S. N. A.; PHANG, C. W.; IBRAHIM, H.; ABDUL WAHAB, N.; SIM, K. S. Phytochemical and cytotoxic investigations of *Alpinia mutica* rhizomes. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 583-589, 2011.

MARANGON, G. P.; FELKER, R. M.; ZIMMERMANN, A. P. L.; FERREIRA, R. L. C.; DA SILVA, J. A. A. Análise de agrupamento de espécies lenhosas da Caatinga no Estado do Pernambuco. **Pesquisa Florestal Brasileira**, v. 36, n. 88, p. 347-353, 2016.

MARQUES, A. M.; PEREIRA, S. L.; PAIVA, R. A.; CAVALCANTE, C. V.; SUDO, S. Z.; TINOCO, L. W.; SUDO, G. Z. Hypoglycemic Effect of the Methanol flower Extract of *Piper Claussenianum* and the Major Constituent 2',6'-dihydroxy-4'-methoxychalcone in Streptozotocin Diabetic Rats. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 77, n. 2, p. 237-243, 2015.

MARQUES, A. M.; DE PAIVA, R. A.; DA FONSECA, L. M.; CAPELLA, M. A.; GUIMARÃES, E. F.; KAPLAN, M. A. C. Preliminary Anticancer Potency Evaluation and Phytochemical investigation of Methanol Extract of *Piper clausenianum* (Miq.) C. DC. **Journal of Applied Pharmaceutical Science**, v. 3, n. 2, p. 13-18, 2013.

MARSH, P. D. Dental plaque as a microbial biofilm. **Caries Research**, v. 38, n. 3, p. 204-211, 2004.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: Implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological Reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MILES, C. O.; MAIN, L. Kinetics and mechanism of the cyclisation of 2', 6'-dihydroxy-4, 4'-dimethoxy-chalcone; influence of the 6'-hydroxy group on the rate of cyclisation under neutral conditions. **Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 2**, v. 10, p. 1639-1642, 1985.

MING, L. C.; FERREIRA, M. I.; GONÇALVES, G. G. Pesquisas agrônômicas das plantas medicinais da Mata Atlântica regulamentadas pela ANVISA. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 14, p. 131-137, 2012.

MING, L. S.; JAMALIS, J.; AL-MAQTARI, H. M.; ROSLI, M. M.; SANKARANARAYANAN, M.; CHANDER, S.; FUN, H. K. Synthesis, characterization,

antifungal activities and crystal structure of thiophene-based heterocyclic chalcones. **Chemical Data Collections**, v. 9–10, p. 104–113, 2017.

MMA. Avaliação e identificação de áreas e ações prioritárias para a conservação, utilização sustentável e repartição dos benefícios da biodiversidade nos biomas brasileiros. Brasília: MMA/SBF, p. 404, 2002.

MOJZISOVA, G.; KUCHTA, M. Dietary flavonoids and risk of coronary heart disease. **Physiological Research**, v. 50, p. 529–535, 2001.

MONTANARI, I. J. **Variabilidade genética em uma população de *Cordia verbenacea* DC**. Tese (Doutorado em Agronomia – Horticultura). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Faculdade de Ciências Agrônômicas, Botucatu, 2011.

MOORE, W. E.; MOORE, L. V. The bacteria of periodontal diseases. **Periodontology**, v. 5, p. 66–77, p. 1994.

MORAIS, L. A. S. de. Óleos essenciais no controle fitossanitário. In: BETTIOL, W.; MORANDI, M. A. B. (Ed.). **Biocontrole de doenças de plantas: uso e perspectivas**. Jaguariúna: Embrapa Meio Ambiente, p. 139-152, 2009.

MOREIRA, R. R.; MARTINS, G. Z.; PIETRO, R. C.; SATO, D. N.; PAVAN, F. R.; LEITE, S. R.; VILEGAS, W.; LEITE, C. Q. *Paepalanthus* spp: antimycobacterial activity of extracts, methoxylated flavonoids and naphthopyranone fractions. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 2, n. 23, p. 268-272, 2013.

MORSHELOO, M. R.; MAGGI, F.; NEKO, H. T.; AGHDAM, M. S. Sumac (*Rhus coriaria* L.) fruit: Essential oil variability in Iranian populations. **Industrial Crops and Products**, v. 111, p. 1-7, 2018.

NAPAL, G. N. D.; CARPINELLA, M. C.; PALACIOS, S. M. Antifeedant activity of ethanolic extract from *Flourensia oolepis* and isolation of pinocembrin as its active principle compound. **Bioresource Technology**, v. 100, n. 14, p. 3669-3673, 2009.

NOGUEIRA, T. B. S. S.; NOGUEIRA, R. B. S. S.; SILVA, D. A.; TAVARES, J. F.; LIMA, E. O.; PEREIRA, F. O.; FERNANDES, M. M. M. S.; MEDEIROS, F. A.; SARQUIS, R. S. F. R.; BRAZ-FILHO, R.; SOUZA, M. F. V. First Chemical Constituents from *Cordia exaltata* Lam and Antimicrobial Activity of Two Neolignans. **Molecules**, v. 18, p. 11086–11099, 2013.

NIJVELDT, R. J.; VAN NOOD, E.; VAN HOORN, D. E. C.; BOELEN, P. G.; VAN NORREN, K.; VAN LEEUWEN, P. A. M. Flavonoids: A review of probable mechanisms of action and potential applications. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418–425, 2001.

NYOKAT, N.; YEN, K. H.; HAMZAH, A. S.; LIM, I. F.; SAAIDIN, A. S. Isolation and synthesis of pinocembrin and pinostrobin from *Artocarpus odoratissimus*. **Malaysian Journal of Analytical Sciences**, v. 21, n. 5, p. 1156-1161, 2017.

OLIVEIRA, F. M.; SILVA JUNIOR, H. M.; VIANA, F. A.; DINIZ, J. C.; ROCHA, S. A. S. Quantificação por CLAE de naftoquinonas do extrato das raízes de *Cordia leucocephala* Moric. **HOLOS**, v. 1, p. 41-48 2012.

OYAMA, K. I., KONDO, T. Total Synthesis of Flavocommelin, a Component of the Blue Supramolecular Pigment from *Commelina communis*, on the Basis of Direct 6-C-Glycosylation of Flavan. **The Journal of Organic Chemistry**, v. 69, n. 16, p. 5240-5246, 2004.

PAPP, N.; BENCSIK, T. N.; EMETH, K.; GYERGY, A. K. K; SULC, A.; FARKAS, A. Histological study of some *Echium vulgare*, *Pulmonaria officinallis* and *Symphytum officinale* populations. **Natural Product Communications**, v. 10, p. 1475–1478, 2011.

PEIXOTO, L. R.; ROSALEN, P. L.; FERREIRA, G. L. S.; FREIRES, I. A.; DE CARVALHO, F. G.; CASTELLANO, L. R.; DE CASTRO, R. D. Antifungal activity, mode of action and anti-biofilm effects of *Laurus nobilis* Linnaeus essential oil against *Candida* spp. **Archives of Oral Biology**, v. 73, p. 179-185, 2017.

PROENÇA DA CUNHA, A.; CAVALEIRO, C.; SALGUEIRO, L. **Fármacos Aromáticos (Plantas Aromáticas e Óleos essenciais)**. Fundação Calouste Gulbenkian, Farmacognosia e Fitoquímica. Lisboa, p. 670, 2010.

QU, Q. H.; ZHANG, L.; BAO, H.; ZHANG, J. H.; YOU, X. J.; WANG, J. X. Chemical constituents of flavonoids from flowers of *Koelreuteria paniculata*. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, v. 34, p. 1716–1719, 2011.

QUISPE-CONDORI, S.; FOGLIO, M. A.; ROSA, P. T.; MEIRELES, M. A. A. Obtaining  $\beta$ -caryophyllene from *Cordia verbenacea* de Candolle by supercritical fluid extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 46, n. 1, p. 27-32, 2008.

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

REIDEL, R. V. B. **Potencial antifúngico e antibiofilme de diferentes tipos de própolis brasileiras sobre isolados patogênicos de espécies de *Candida não-albicans***. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Porto Alegre, 2014.

REVANKAR, H. M.; BUKHARI, S. N. A.; KUMAR, G. B.; QIN, H. L. Coumarins Scaffolds as COX Inhibitors. **Bioorganic Chemistry**, v. 71, p. 146-159, 2017.

RICUCCI, D.; SIQUEIRA, J. F. Biofilms and apical periodontitis: study of prevalence and association with clinical and histopathologic findings. **Journal of Endodontics**, n. 36, p. 1277–1288, 2010.

RODRIGUES, F. F.; OLIVEIRA, L. G.; RODRIGUES, F. F.; SARAIVA, M. E.; ALMEIDA, S. C.; CABRAL, M. E.; CAMPOS, A. R.; COSTA, J. G. M. Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of essential oil from *Cordia verbenacea* DC leaves. **Pharmacognosy Research**, v. 4, n. 3, p. 161-165, 2012.

ROMAN JUNIOR, W. A.; GOMES, D. B.; ZANCHET, B.; SCHÖNELL, A. P.; DIEL, K. A.; BANZATO, T. P.; SANTOS, C. A. M. Antiproliferative effects of pinostrobin and 5, 6-dehydrokavain isolated from leaves of *Alpinia zerumbet*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 27, n. 5, p. 592-598, 2017.

SAEIDI, K.; MOOSAVI, M.; LORIGOOINI, Z.; MAGGI, F. Chemical characterization of the essential oil compositions and antioxidant activity from Iranian populations of *Achillea wilhelmsii* K. Koch. **Industrial Crops and Products**, v. 112, p. 274-280, 2018.

SERTIÉ, J. A.; BASILE, A. C.; PANIZZA, S.; OSHIRO, T. T.; AZZOLINI, C. P.; PENNA, S. C. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea*. III: oral and topical antiinflammatory activity and gastrotoxicity of a crude leaf extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 31, p. 239–247, 1991.

SHARMA, R. A.; SINGH, B.; SINGH, D.; CHANDRAWAT, P. Ethnomedicinal, pharmacological properties and chemistry of some medicinal plants of Boraginaceae in India. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 1, p. 1153–1175, 2009.

SILVA, S. A. S. D.; AGRA, M. D. F.; TAVARES, J. F.; DA-CUNHA, E. V.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SILVA, M. S. D. Flavanones from aerial parts of *Cordia globosa* (Jacq.) Kunth, Boraginaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 682–685, 2010.

SILVA, P. D. **Estudo fitoquímico e avaliação das atividades antimicrobianas e antiparasitárias dos flavonóides isolados de *Myrciahiemalis* (Myrtaceae)**. Dissertação (Mestrado em Química), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2007.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; DE MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia - do Produto Natural ao Medicamento**. 1. ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.

SINGH, P.; ANAND, A.; KUMAR, V. Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 758-777, 2014.

SISA, M.; BONNET, S. L.; FERREIRA, D.; VAN DER WESTHUIZEN, J. H. Photochemistry of flavonoids. **Molecules**, v. 15, n. 8, p. 5196–5245, 2010.

SPARKMAN, O. D.; PENTON, Z.; KITSON, F. G. Gas chromatography and mass spectrometry: a practical guide. **Academic Press**, 2011.

TAIZ, L.; ZEIGER, E.; MOLLER, I. M.; MURPHY, A. **Fisiologia e Desenvolvimento Vegetal**. 6 ed. Porto Alegre, Artmed, p.373, 2017.

TARAVATI, G.; MASOUDIAN, N.; GHOLAMIAN, A. Evaluation of medical metabolites in Boraginaceae family. **Journal of Chemical Health Risks**, v. 4, p. 53–61, 2014.

TEKE, H. I.; BINZET, R. Anatomical, morphological and palynological studies of some *Onosma* L. (Boraginaceae) taxa endemic to Anatolia. **Pakistan Journal of Botany**, v. 49, n. 2, p. 579-588, 2017.

THE FIELD MUSEUM. **Tropical Plants Guide**. Disponível em: <<http://fm2.fieldmuseum.org/plantguides/view.asp?chkbox=20798>> Acesso em janeiro de 2018.

TINOCO, J. M.; BUTTARO, B.; ZHANG, H.; LISS, N.; SASSONE, L.; STEVENS, R. Effect of a genetically engineered bacteriophage on *Enterococcus faecalis* biofilms. **Archives of Oral Biology**, v. 71, p. 80-86, 2016.

TITONELLI ALVIM, N. A.; FERREIRA, M. D. A.; EVANGELISTA CABRAL, I.; DE ALMEIDA FILHO, A. J. O uso de plantas medicinais como recurso terapêutico: das influências da formação profissional às implicações éticas e legais de sua aplicabilidade como extensão da prática de cuidar realizada pela enfermeira. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, v. 14, n. 3, 2006.

URBIZU-GONZÁLEZ, A. L.; CASTILLO-RUIZ, O.; MARTÍNEZ-ÁVILA, G. C. G.; TORRES-CASTILLO, J. A. Natural variability of essential oil and antioxidants in the medicinal plant *Turnera diffusa*. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 10, n. 2, p. 121-125, 2017.

VEIGA-JUNIOR, VALDIR F.; PINTO, ANGELO C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528., 2005.

VEITCH, N.C.; GRAYER, R.J. Chalcones, dihydrochalcones, and aurones. In: ANDERSEN, O.M.; MARKHAM, K.R. **Flavonoids: Chemistry, Biochemistry and Applications**. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, p. 1003–1100, 2006.

VÉKEY, K. Mass spectrometry and mass-selective detection in chromatography. **Journal of Chromatography A**, v. 921, n. 2, p. 227-236, 2001.

WEI, Z. F.; JIN, S.; LUO, M.; PAN, Y. Z.; LI, T. T.; QI, X. L.; ZU, Y. G. Variation in contents of main active components and antioxidant activity in leaves of different pigeon pea cultivars during growth. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 61, n. 42, p. 10002-10009, 2013.

WOLFFENBÜTTEL, A. N. A química dos óleos essenciais. **Informativo do Conselho Regional de Química da 5ª Região - RS - Brasil**, Artigo, p. 06 - 07, 01 dez. 2007.

XIAO, M.; CAO, N.; FAN, J. J.; SHEN, Y.; XU, Q. Studies on flavonoids from the leaves of *Lindera aggregata*. **Journal of Chinese Medicinal Materials**, v. 34, p. 62–64, 2011.

YADAV, V. R.; PRASAD, S.; SUNG, B.; AGGARWAL, B. B. The role of chalcones in suppression of NF- $\kappa$ B-mediated inflammation and cancer. **International Immunopharmacology**, v. 11, n. 3, p. 295–309, 2011.

YARIPOUR, S.; DELNAVAZI, M. R.; ASGHARIAN, P.; VALIYARI, S.; TAVAKOLI, S.; NAZEMIYEH, H. A Survey on Phytochemical Composition and Biological Activity of *Zygophyllum fabago* from Iran. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 7, n. 1, p. 109 – 114, 2017.