



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
REGIONAL CATALÃO  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ELIÂNGELA CRISTINA CÂNDIDA COSTA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DA RAIZ  
DE *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc (Calophyllaceae)**

**CATALÃO - GO**

**2017**

---

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR VERSÕES ELETRÔNICAS DE TESES E DISSERTAÇÕES NA BIBLIOTECA DIGITAL DA UFG**

Na qualidade de titular dos direitos de autor, autorizo a Universidade Federal de Goiás (UFG) a disponibilizar, gratuitamente, por meio da Biblioteca Digital de Teses e Dissertações (BDTD/UFG), regulamentada pela Resolução CEPEC nº 832/2007, sem ressarcimento dos direitos autorais, de acordo com a Lei nº 9610/98, o documento conforme permissões assinaladas abaixo, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira, a partir desta data.

**1. Identificação do material bibliográfico:**       **Dissertação**       **Tese**

**2. Identificação da Tese ou Dissertação:**

Nome completo do autor: Eliângela Cristina Cândida Costa

Título do trabalho: ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DA RAIZ DE *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc (Calophyllaceae)

**3. Informações de acesso ao documento:**

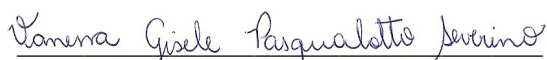
Concorda com a liberação total do documento  SIM       NÃO<sup>1</sup>

Havendo concordância com a disponibilização eletrônica, torna-se imprescindível o envio do(s) arquivo(s) em formato digital PDF da tese ou dissertação.



Assinatura do(a) autor(a)<sup>2</sup>

Ciente e de acordo:



Assinatura do(a) orientador(a)<sup>2</sup>

Data: 20/05/2018

---

<sup>1</sup> Neste caso o documento será embargado por até um ano a partir da data de defesa. A extensão deste prazo suscita justificativa junto à coordenação do curso. Os dados do documento não serão disponibilizados durante o período de embargo.

Casos de embargo:

- Solicitação de registro de patente
- Submissão de artigo em revista científica
- Publicação como capítulo de livro
- Publicação da dissertação/tese em livro

<sup>2</sup>A assinatura deve ser escaneada.

ELIÂNGELA CRISTINA CÂNDIDA COSTA

**ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DA RAIZ  
DE *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc (Calophyllaceae)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Goiás - Regional Catalão, para obtenção do título de Mestre em Química.

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino.

**CATALÃO - GO  
2017**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UFG.

Cândida Costa, Eliângela Cristina  
ESTUDO QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL BIOLÓGICO DA  
RAIZ DE *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc (Calophyllaceae)  
[manuscrito] / Eliângela Cristina Cândida Costa. - 2017.  
xx, 126 f.: il.

Orientador: Prof. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Unidade  
Acadêmica Especial de Física e Química, Catalão, Programa de Pós  
Graduação em Química, Catalão, 2017.

Anexos.

Inclui fotografias, abreviaturas, símbolos, tabelas, lista de figuras,  
lista de tabelas.

1. *Kielmeyera coriacea*. 2. xantona. 3. potencial biológico. I.  
Pasqualotto Severino, Vanessa Gisele, orient. II. Título.

Relatório de Defesa de Dissertação  
 Candidata: **Eliângela Cristina Cândida Costa**

Aos 14/08/2017 às 12:00 horas, realizou-se na Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão nas formas e termos do Regimento Interno do Programa de Pós-Graduação em Química a Defesa de Dissertação de Mestrado sob o título: **“Estudo Químico e Avaliação do Potencial Biológico da Raiz de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc (*Calophyllaceae*)”**. apresentada pela candidata: **Eliângela Cristina Cândida Costa**. Ao final dos trabalhos a banca examinadora reuniu-se em sessão reservada para o julgamento tendo os membros chegado ao seguinte resultado:


Participantes da Banca:	Função	Instituição
Profa. Dra. Vanessa Gisele P. Severino	Presidente	UFG – Catalão
Profa. Dra. Lucília Kato	Titular	UFG – Catalão
Profa. Dra. Lorena Ramos Freitas de Sousa	Titular	UFG – Catalão

Resultado Final: Aprovada.

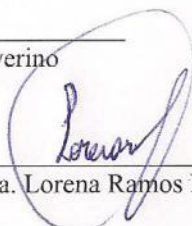
**Parecer da Comissão Julgadora:**

*A aluna está aprovada, mediante a realização das correções sugeridas pela banca examinadora.*

Encerrada a sessão reservada, a presidente informou ao público presente o resultado. Nada mais havendo a tratar, a sessão foi encerrada e, para constar eu Milana Jacob da Silva representante do Programa de Pós Graduação em Química lavrei o presente relatório que será assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

  
 \_\_\_\_\_  
 Profa. Dra. Vanessa Gisele P. Severino

  
 \_\_\_\_\_  
 Profa. Dra. Lucília Kato

  
 \_\_\_\_\_  
 Profa. Dra. Lorena Ramos Freitas de Sousa

  
 \_\_\_\_\_  
 Representante do PPG Milana Jacob da Silva

(  ) Não houve alteração no título.

(    ) Houve. O novo título passa a ser:

\_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_



Serviço Público Federal  
Ministério da Educação  
Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão  
Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Química

*Assinatura dos membros da comissão examinadora que avaliou e aprovou a defesa de Dissertação de Mestrado da candidata Eliângela Cristina Cândida Costa realizada em 14 de Agosto de 2017.*

Profa. Dra. Vanessa Gisele P. Severino

Profa. Dra. Lucília Kato

Profa. Dra. Lorena Ramos Freitas de Sousa

*Dedico este trabalho...*

*À minha mãe Lucilene,  
minha irmã Lara Gabriela e ao  
Felipe pelas manifestações de amor  
e dedicação em todas as horas.  
Obrigada por tudo!*

## AGRADECIMENTOS

À Deus que sempre esteve me dando forças, sustento e coragem para superar os desafios e acreditar em um mundo de possibilidades.

À minha mãe Lucilene e minha irmã Lara Gabriela pelo imenso amor e compreensão. Obrigada pela força e motivação para continuar essa caminhada!

À minha orientadora, professora Dra. Vanessa Pasqualotto, pela amizade, ensinamentos e por acreditar em minha capacidade. Uma pessoa que admiro pelo exemplo de caráter e competência a ser seguido.

Às professoras Dra. Lucília Kato e Dra. Lorena Ramos por aceitarem participar da banca. Obrigada pelas considerações e contribuições!

Aos professores do Departamento de Química da UFG – Regional Catalão pelos ensinamentos e contribuição em minha formação acadêmica.

Ao Felipe por partilhar comigo todos os momentos com amor, compreensão e incentivo. Obrigada por fazer parte da minha vida!

À minha família, em especial meu avô Itamar, minha madrinha Silvia, meu padrasto Carlos Henrique e ao meu pai, Elias, pelo apoio, afeto e orações.

À minha querida avó Maria pelo imenso amor e cuidado.

À minha amiga Evelise pela amizade, confiança e força nos momentos difíceis compartilhados.

Às minhas amigas Maria Mayrenne e Dayane pela amizade e companheirismo.

À professora Dra. Lucília Kato por ter me acolhido no Laboratório de Produtos Naturais da UFG – Regional Goiânia.

Às alunas de Iniciação Científica, Jéssica e Bryna, pela amizade e contribuição neste trabalho.

Ao Me. Afif Felix Monteiro pela contribuição na realização dos experimentos de CLAE-EM.

À professora Dra. Rosy Iara Maciel de Azambuja Ribeiro e aos alunos do Laboratório de Patologia Experimental da Universidade Federal de São João del-Rei, *Campus* Centro-Oeste Dona Lindu, pela contribuição na realização dos ensaios antitumorais.

Ao professor Dr. Carlos Henrique e aos alunos do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca pela contribuição na realização dos ensaios antimicrobianos.

**Ao** professor Luciano Lião e sua equipe do laboratório de RMN, em especial ao Dr. Gerlon de Almeida Ribeiro Oliveira, pela realização de alguns experimentos e pelos ensinamentos.

À Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão pela oportunidade em realizar este trabalho.

À Universidade Federal de Goiás – Regional Goiânia pela oportunidade em continuar meus experimentos.

À Dra. Ana Paula pelas contribuições e conhecimentos transmitidos.

À Tainara Rosa e à Izabella Mariana de Souza Zuffo pela contribuição na realização dos ensaios antioxidantes.

À Me. Núbia Mariano pela colaboração com dados do estudo etnobotânico.

**Aos** meus amigos de laboratório de produtos naturais da UFG – Regional Catalão, em especial ao Felipe, José Henrique, Daniela, Renan e Camila, pela amizade e por compartilharem momentos de alegria e descontração.

**Aos** meus amigos do Laboratório de Produtos Naturais da UFG – Regional Goiânia, aos quais não citarei nomes por serem muitos, pela amizade, excelente convivência e ensinamentos.

**Aos** meus amigos Ramon, Miriã e Helloíza, pelos laços de amizade.

**Aos** órgãos de fomento, CNPq, CAPES e FAPEG, pelo suporte financeiro concedido.

À CAPES pela bolsa concedida.

**A** todos que de alguma forma contribuíram para este trabalho.

*“O sucesso nasce do querer, da determinação  
e persistência em se chegar a um objetivo.  
Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence  
obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis.”*

*José de Alencar*

## RESUMO

O Cerrado é uma região cuja riqueza biológica é singular, sendo formado por cerca de 10 mil plantas. No estudo da flora, a etnobotânica se destaca por compreender a interação da sociedade com as plantas. Nesse contexto, o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Vanessa Pasqualotto vem realizando estudos etnobotânicos em colaboração com a comunidade Coqueiros, visando o resgate e a valorização dos saberes populares sobre plantas medicinais, dentre as quais se destaca a espécie *Kielmeyera coriacea*, foco deste estudo. Neste estudo foram entrevistados 37 membros, em que 76% indicam *K. coriacea* para o tratamento de infecções, reumatismo, leucemia, dor no dente, dentre outras. Assim, foi realizado o estudo químico do extrato etanólico da raiz (EER) desta espécie, objetivando caracterizar seus metabólitos secundários, uma vez que não há relatos químicos na literatura para esta parte da planta. Ademais, foi avaliado os potenciais antioxidante, antimicrobiano e antitumoral de *K. coriacea*. A partir da extração líquido-líquido de EER foram obtidas as frações hexano (FH), acetato de etila (FAE) e hidroalcoólica (FHA); pelo fracionamento da FAE foi isolada a substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona. O estudo do perfil químico foi realizado por CLAE-EM, identificando-se compostos majoritários como  $\delta$ -tocotrienol, acilforoglucinol prenilado, 2-hidroxi-1-metoxixantona e quercitrina. EER, FH, FAE, FHA e suas subfrações, bem como a substância isolada foram submetidos aos ensaios biológicos. FHA apresentou ação antioxidante com  $EC_{50}$  de  $201,53 \mu\text{g mL}^{-1}$ . EER e a subfração FH-10, proveniente do fracionamento de FH, inibiram o crescimento bacteriano de *Streptococcus pyogenes* e *S. pneumoniae* (Concentração Inibitória Mínima de 6,25 e  $1,56 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente); EER também inibiu o fungo *Candida glabrata* na  $7,81 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Por fim, FH, FAE e FH-10 apresentaram efeito antitumoral frente à célula HeLa, a qual está relacionada ao câncer do cólon do útero ( $IC_{50}$  de 2,5, 2,5 e  $0,89 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente). Ao correlacionar os dados químicos com biológicos, tem-se que as subfrações FAE-4.7.3, proveniente do fracionamento de FAE, e FH-10 são constituídas por substâncias como 4-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona, 3-hidroxi-1,2-dimetoxixantona, lupeol, acilforoglucinol prenilado e a quercitrina, as quais poderiam estar associadas ao potencial biológico encontrado. Portanto, o conhecimento adquirido neste estudo contribuiu para a ampliação dos saberes químico-biológicos de *K. coriacea*.

**Palavras-chave:** *Kielmeyera coriacea*, xantona, potencial biológico.

## ABSTRACT

Cerrado is a region whose biological richness is unique, being formed by about 10 thousand plants. The flora study, ethnobotanic stands out for understanding of the interaction of society with plants. In this view, teacher Dr. Vanessa Pasqualotto research group's has been carrying out ethnobotanic survey in collaboration with the Coqueiros community, with the objective of recovering and valuing the popular knowledge about medicinal plants, among which the *Kielmeyera coriacea* species, the focus of this study, stands out. In this group, 37 members were interviewed, of which 76% indicate *K. coriacea* for the treatment of infections, rheumatism, leukemia, tooth pain, among others. Thus, the chemical study of ethanolic extract of roots (EER) of this species, aiming at to characterize its secondary metabolites, since there are no chemical reports in the literature for this part of the plant. In addition antioxidant, antimicrobial and antitumor potential of *K. coriacea* were evaluated. From the liquid-liquid extraction of EER the hexane (FH), ethyl acetate (FAE) and hydroalcoholic (FHA) fractions were obtained; by the fractionation of FAE, the substance 3-hydroxy-2,4-dimethoxyxanthone was isolated. Additionally, a fingerprint study was performed by LC-MS technique, identifying major compounds such as  $\delta$ -tocotrienol, prenylated acylphoroglucinol, 2-hydroxy-1-methoxyxanthone, quercitrin. EER, FH, FAE, FHA, its subfractions and the isolated substance were submitted to biological tests. FHA presented antioxidant action with  $EC_{50}$  de 201,53  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . EER and FH-10 subfraction from FH fractionation, inhibited the bacterial growth of *Streptococcus pyogenes* and *S. pneumoniae* (Minimum Inhibitory Concentration of 6.25 and 1.56  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively); EER also inhibited the fungus *Candida glabrata* in 7.81  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Finally, FH, FAE and FH-10 presented an antitumor effect against the HeLa cells, which are related to cervical cancer ( $IC_{50}$  of 2.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 2.5  $\mu\text{g mL}^{-1}$  and 0.89  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively). When correlating the chemical and biological data, it is possible that the FAE-4.7.3 subfractions, from the fractionation of FAE, and FH-10 are constituted by substances such as 4-hydroxy-2,3-methylenedioxy xanthone, 3-hydroxy-1,2-dimethoxy xanthone, lupeol, prenylated acylphoroglucinol and quercitrin, which could be associated with the biological potential found. Therefore, the knowledge acquired in this study contributed to the expansion of the chemical-biological knowledge of *K. coriacea*.

**Keywords:** *Kielmeyera coriacea*, xanthone, biologic potential.

## LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1.1: Cerrado brasileiro.....	1
FIGURA 1.2: Representação da extensão do Cerrado brasileiro.....	2
FIGURA 1.3: folha (A); flor (B) e fruto (C) de <i>K. Coriacea</i> .....	5
FIGURA 1.4: Estrutura química geral dos flavonoides.....	17
FIGURA 1.5: Estrutura das principais classes de flavonoides.....	18
FIGURA 1.6: Estrutura geral de uma xantona.....	20
FIGURA 1.7: Classificação das xantonas.....	21
FIGURA 3.1: CCD das subfrações provenientes do refração da subfração 4...41	41
FIGURA 3.2: Redução do radical livre DPPH pelo antioxidante quercetina.....	47
FIGURA 3.3: Mecanismo de reação da resazurina.....	50
FIGURA 3.4: Redução do MTT por enzimas mitocondriais.....	52
FIGURA 4.1: Estrutura básica da xantona e seus deslocamentos químicos de $^{13}\text{C}$ .....	60
FIGURA 4.2: Duas propostas de estruturas, (A) e (B), de xantonas previamente isoladas do gênero <i>Kielmeyera</i> .....	60
FIGURA 4.3: Proposta estrutural para a substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona com os deslocamentos químicos de carbono para proposta (A).....	61
FIGURA 4.4: Proposta estrutural para a substância 4-hidroxi-2,3-dimetoxixantona com os deslocamentos químicos de carbono para proposta (B).....	61
FIGURA 4.5: Estrutura da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona.....	62
FIGURA 4.6: Espectro de RMN de $^1\text{H}$ da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 500 MHz).....	67
FIGURA 4.7: Espectro de RMN de $^{13}\text{C}$ da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 125 MHz).....	68
FIGURA 4.8: Mapa de contorno de <i>g</i> -HSQC da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 125 MHz).....	69
FIGURA 4.9: Ampliação do mapa de contorno de <i>g</i> -HSQC da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 125 MHz).....	70
FIGURA 4.10: Espectro de <i>g</i> -COSY da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 500 MHz).....	71
FIGURA 4.11: Ampliação do espectro de <i>g</i> -COSY da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 500 MHz).....	72
FIGURA 4.12: Mapa de contorno de <i>g</i> -HMBC da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 125 MHz).....	73

FIGURA 4.13: Correlações dos sinais observadas no mapa de contornos <i>g</i> -HMBC utilizadas para a elucidação estrutural.....	63
FIGURA 4.14: Ampliação do mapa de contorno de <i>g</i> -HMBC da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona (C <sub>3</sub> D <sub>6</sub> O, 125 MHz).....	74
FIGURA 4.15: Espectro de massas da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona, obtido em modo positivo (ESI).....	64
FIGURA 4.16: Espectro de massas sequencial (EM/EM) do íon [M+H] <sup>+</sup> de <i>m/z</i> 273,0270.....	64
FIGURA 4.17: Propostas de fragmentação para a estrutura da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona.....	65
FIGURA 4.18: Substâncias identificadas por CLAE-EM no modo positivo (ESI) a partir das sufrações provenientes da fração acetato de etila do EER de <i>K. coriacea</i> .....	77
FIGURA 4.19: Substâncias identificadas por CLAE-EM no modo positivo (ESI) a partir da sufração proveniente da fração hexano do EER de <i>K. coriacea</i> .....	78
FIGURA 4.20: Substâncias identificadas por CLAE-EM no modo positivo (ESI) a partir da sufração proveniente da fração hidroalcoólica do EER de <i>K. coriacea</i> .....	78
FIGURA 4.21: Avaliação da viabilidade celular da linhagem tumoral HeLa frente aos tratamentos com o EER e as frações FH e FAE nas concentrações 0,005; 0,010; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1 mg mL <sup>-1</sup> .....	89
FIGURA 4.22: Avaliação da viabilidade celular da linhagem tumoral HeLa frente ao tratamento com a fração FHA nas concentrações 0,005; 0,010; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1 mg mL <sup>-1</sup> .....	90
FIGURA 4.23: Avaliação da viabilidade celular da linhagem tumoral HeLa frente aos tratamentos com o EER e as frações FH e FAE nas concentrações 0,315; 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0 µg mL <sup>-1</sup> .....	91
FIGURA 4.24: Avaliação da viabilidade celular da linhagem tumoral HeLa frente aos tratamentos com as subfrações da FAE.....	95
FIGURA 4.25: Avaliação da viabilidade celular da linhagem tumoral HeLa frente ao tratamento com a subfração 4.7.3 da FAE.....	96
FIGURA 4.26: Avaliação da viabilidade celular da linhagem tumoral HeLa frente aos tratamentos com as subfrações 9 e 10 da FH.....	97
FIGURA 4.27: Avaliação da viabilidade celular da linhagem tumoral HeLa frente aos tratamentos com as subfrações 4 e 7 da FHA.....	98

**LISTA DE QUADROS**

QUADRO 1.1: Levantamento etnobotânico de <i>K. coriacea</i> realizado na Comunidade Coqueiros (GO)(continuação).....	8
QUADRO 1.2: Características de dois tipos de revisões bibliográficas.....	11
QUADRO 1.3: Terpenoides isolados e/ou identificados do gênero <i>Kielmeyera</i> .(continuação).....	15
QUADRO 1.4: Classe de compostos fenólicos em plantas.....	17
QUADRO 1.5: Flavonoides isolados e/ou identificados do gênero <i>Kielmeyera</i> (continuação).....	19
QUADRO 1.6: Xantonas isoladas e/ou identificadas do gênero <i>Kielmeyera</i> (continuação).....	22
QUADRO 1.7: Esteroides isolados e/ou identificados do gênero <i>Kielmeyera</i> .....	29
QUADRO 1.8: Cumarinas isoladas e/ou identificadas do gênero <i>Kielmeyera</i> .....	30
QUADRO 1.9: Ácidos orgânicos isolados e/ou identificados do gênero <i>Kielmeyera</i> (continuação).....	31
QUADRO 1.10: Derivado policíclico isolado e identificado do gênero <i>Kielmeyera</i> .....	33
QUADRO 4.1: Relação da quantidade de artigos publicados por ano.....	53
QUADRO 4.2: Rede de co-citação de artigos com o tema <i>Kielmeyera</i> .....	54
QUADRO 4.3: Rede de correlação entre periódicos.....	55
QUADRO 4.4: Correlação de palavras chave em toda busca bibliográfica.....	56
QUADRO 4.5: Correlação de universidades que estudam o gênero <i>Kielmeyera</i> .....	57

**LISTA DE TABELAS**

TABELA 3.1. Programação das condições do gradiente.....	45
TABELA 4.1: Rendimento obtido no procedimento de extração do EER e das frações.....	58
TABELA 4.2: Dados de RMN de <sup>1</sup> H da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona e comparação com a literatura.....	66
TABELA 4.3: Substâncias identificadas por CLAE-EM no modo positivo (ESI) das subfrações do EER de <i>K. coriacea</i> .....	76
TABELA 4.4: Valores de potencial antioxidante do EER e suas frações de <i>K. coriacea</i> frente ao DPPH.....	79
TABELA 4.5: Valores de potencial antioxidante das subfrações da FH, FAE e FHA de <i>K. coriacea</i> frente ao DPPH.....	80
TABELA 4.6: Resultados da Concentração Inibitória Mínima em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do EER de <i>K. coriacea</i> e das frações oriundas do mesmo frente às bactérias avaliadas.....	82
TABELA 4.7: Resultados da Concentração Inibitória Mínima em $\mu\text{g mL}^{-1}$ do EER e frações de <i>K. coriacea</i> frente aos fungos avaliados.....	84
TABELA 4.8: Resultados da Concentração Inibitória Mínima em $\mu\text{g mL}^{-1}$ das subfrações da FAE.....	85
TABELA 4.9: Resultados da Concentração Inibitória Mínima (em $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) das subfrações oriundas da fração hexano (FH) e hidroalcoólica (FHA) do EER de <i>K. coriacea</i> frente às bactérias.....	87
TABELA 4.10: Resultados da Concentração Inibitória Mínima em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de subfrações da fração acetato de etila (FAE) do EER de <i>K. coriacea</i> .....	88
TABELA 4.11: Resultados da Concentração Inibitória Mínima em $\mu\text{g mL}^{-1}$ de subfrações da fração hexano (FH) e hidroalcoólica (FHA) do EER de <i>K. coriacea</i> .....	88
TABELA 4.12: Valores de IC <sub>50</sub> do EER e suas frações (concentrações de 0,315-5,0 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) frente à células tumorais HeLa.....	92
TABELA 4.13: Valores de IC <sub>50</sub> das subfrações da FAE (concentrações de 1-100 $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em células tumorais HeLa.....	95

**LISTA DE FLUXOGRAMAS**

FLUXOGRAMA 1.1: Caracterização do estudo bibliométrico.....	11
FLUXOGRAMA 3.1: Exemplificação do estudo bibliométrico.....	35
FLUXOGRAMA 3.2: Extração líquido-líquido do EER.....	38
FLUXOGRAMA 3.3: Refracionamento da subfração 2.....	40
FLUXOGRAMA 3.4: Fracionamento da fração FAE.....	42
FLUXOGRAMA 3.5: Fracionamento da fração FH.....	43
FLUXOGRAMA 3.6: Fracionamento da fração FHA.....	44

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

$\delta$	deslocamento químico em partes por milhão (ppm)
$\delta_C$	deslocamento químico de carbono
$\delta_H$	deslocamento químico de hidrogênio
$\varphi$	diâmetro da coluna cromatográfica
AcOEt	acetato de etila
APG	<i>angiosperm phylogeny group</i>
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
CA	cromatografia por adsorção
CC	cromatografia em coluna
CCD	cromatografia em camada delgada
$CDCl_3$	clorofórmio deuterado
$C_3D_6O$	acetona deuterada
CE	cromatografia por exclusão
Dicl	Diclorometano
CIM	concentração inibitória mínima
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
CLAE-DAD	cromatografia líquida de alta eficiência com detector de arranjo de diodo
CLAE-EM	cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas
<i>d</i>	dubleto
DAD	detector de arranjo de diodos
<i>dd</i>	duplo dubleto
<i>ddd</i>	duplo duplo dubleto
<i>dl</i>	dubleto largo
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO- $d_6$	dimetilsulfóxido deuterado
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazil
<i>dt</i>	duplo tripleto
EM	espectrometria de massas
ESI	<i>electrospray ionization</i>
FE	fase estacionária
FM	fase móvel
eV	elétron-volt
EC <sub>50</sub>	concentração mínima da amostra necessária para reduzir em 50% a atividade inicial do DPPH
Hex	hexano
h	altura da fase estacionária
Hz	hertz
IC <sub>50</sub>	concentração de amostra necessária para inibir 50% do crescimento celular

IE	impacto eletrônico
<i>J</i>	constante de acoplamento
kV	medida de tensão elétrica em quilovolt
<i>m/z</i>	razão massa/carga
MeOH	metanol
MHz	mega-hertz
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
PB	pico base
PIM	pico do íon molecular
ppm	parte por milhão
RMN	ressonância magnética nuclear
RMN de <sup>1</sup> H	ressonância magnética nuclear de hidrogênio
RMN de <sup>13</sup> C	ressonância magnética nuclear de carbono
<i>s</i>	simpleto
<i>sl</i>	singleto largo
<i>t</i>	triplete
<i>t<sub>r</sub></i>	tempo de retenção
UV	ultravioleta
UV-Vís	região do ultravioleta e visível
v/v	volume por volume

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 Cerrado.....	1
1.1.1 Família Calophyllaceae.....	4
1.1.1.1 <i>Kielmeyera coriacea</i> .....	5
1.2 Etnobotânica.....	6
1.3 Bibliometria.....	9
1.3.1 Conceitos.....	9
1.4 Metabólitos secundários do gênero <i>Kielmeyera</i> .....	14
1.4.1 Terpenoides.....	14
1.4.1.1. Terpenoides isolados e/ou identificados do gênero <i>Kielmeyera</i> .....	14
1.4.2 Compostos fenólicos.....	16
1.4.2.1 Flavonoides.....	17
1.4.2.1.1 Flavonoides isolados e/ou identificados do gênero <i>Kielmeyera</i> .....	18
1.4.2.2 Xantonas.....	20
1.4.2.2.1 Xantonas isoladas e/ou identificadas do gênero <i>Kielmeyera</i> .....	22
1.4.3 Esteroides isolados e/ou identificados do gênero <i>Kielmeyera</i> .....	28
1.4.4 Cumarinas isoladas e/ou identificadas do gênero <i>Kielmeyera</i> .....	30
1.4.5 Ácidos orgânicos isolados e/ou identificados do gênero <i>Kielmeyera</i> .....	31
1.4.6 Derivado policíclico isolado e identificado do gênero <i>Kielmeyera</i> .....	32
1.5 Potencial biológico de <i>K. coriacea</i> .....	33
2. OBJETIVOS.....	34
3. METODOLOGIA.....	35
3.1 ESTUDO BIBLIOMÉTRICO.....	35
3.1.1 Revisão sistemática da literatura.....	35
3.1.2 Estatística descritiva da amostra.....	35
3.1.3 Análise de redes de relacionamento.....	36
3.2 ESTUDO QUÍMICO.....	36
3.2.1 Equipamentos.....	36
3.2.1.1 Evaporador rotativo.....	36
3.2.1.2 Espectrômetro de RMN.....	36
3.2.2 Materiais.....	36
3.2.2.1 Cromatografia.....	36

3.2.2.2 Solventes.....	37
3.2.2.3 Reveladores.....	37
3.2.3 Coleta e identificação do material vegetal.....	37
3.2.4 Obtenção do extrato vegetal.....	38
3.2.5 Extração líquido-líquido do EER.....	38
3.2.6 Análise das frações FH, FAE e FHA.....	38
3.2.7 Fracionamento da fração FAE.....	39
3.2.7.1 Refracionamento da subfração 2.....	39
3.2.7.2 Refracionamento da subfração 4.....	40
3.2.7.3 Refracionamento da subfração 4.5.....	41
3.2.7.4 Refracionamento da subfração 4.7.....	41
3.2.7.5 Refracionamento da subfração 4.8.....	42
3.2.8 Fracionamento da fração FH.....	42
3.2.9 Fracionamento da fração FHA.....	43
3.2.10 Perfil químico de subfrações das frações FH, FAE e FHA.....	44
3.2.10.1 Condições cromatográficas.....	44
3.2.10.2 Condições espectrométricas.....	45
3.3 ESTUDO BIOLÓGICO.....	45
3.3.1 Avaliação da atividade antioxidante.....	45
3.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana.....	47
3.3.2.1 Preparo das amostras.....	48
3.3.2.2 Preparo do inoculo/fungos.....	50
3.3.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima.....	50
3.3.2.4 Bactérias.....	51
3.3.3 Avaliação da atividade antitumoral.....	51
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	53
4.1 ESTUDO BIBLIOMÉTICO .....	53
4.1.1 Revisão sistemática da literatura.....	53
4.1.2 Estatística descritiva da amostra.....	53
4.1.3 Análise de redes de relacionamento.....	54
4.2 ESTUDO QUÍMICO.....	57
4.2.1 Preparo dos extratos e frações.....	57
4.2.2 Estudo químico do extrato etanólico das raízes de <i>K. coriacea</i> .....	58

4.2.2.1 Identificação estrutural da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona.....	59
4.2.3 Caracterização do perfil metabólico das frações de <i>K. coriacea</i> por espectrometria de massas.....	75
4.3 ESTUDO BIOLÓGICO.....	79
4.3.1 Atividade antioxidante.....	79
4.3.2 Atividade antimicrobiana.....	81
4.3.3 Atividade antitumoral.....	88
4.3.4 Estudo biológico para a 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona.....	96
5. CONCLUSÃO.....	98
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	101
ANEXOS.....	110

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 Cerrado

Domínio é um conjunto de ecossistemas que funcionam de forma estável, sendo caracterizado de acordo com o clima, fitofisionomia, biodiversidade, umidade, vegetação, solo e altitude. Devido à extensão territorial do Brasil e a presença de climas e vegetação variados, o mesmo é composto por seis domínios: Amazônia, Cerrado, Mata Atlântica, Caatinga, Pampa e Pantanal (MARINHO et al., 2014; RIBEIRO; FONSECA; SILVA, 2001).

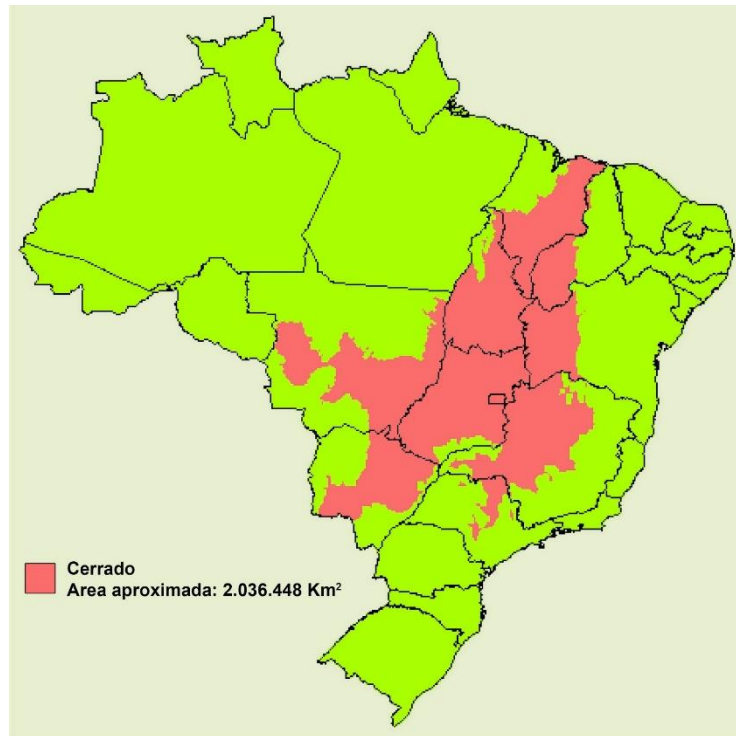
O Planalto Central do Brasil é coberto principalmente por Cerrado (FIGURA 1.1, pg.1), um gradiente fisionômico que abrange pastagem, savanas, florestas tropicais e cerradão (MIATO; WRIGHT; BATALHA, 2016). O Cerrado é o segundo maior domínio da América do Sul, ocupando uma área inicial de 2.036.448 km<sup>2</sup> (FIGURA 1.2, pg.2), aproximadamente 22% do território brasileiro. Ele fornece 160.000 espécies de plantas, animais e fungos, sendo reconhecido como a savana mais rica do mundo, em que cerca de 12 mil espécies de plantas são catalogadas com o uso medicinal (DE AQUINO et al., 2013; MARINHO et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014).

FIGURA 1.1: Cerrado brasileiro



Fonte: <http://portalsuaescola.com.br/tipos-de-vegetacao-no-brasil/>

FIGURA 1.2: Representação da extensão do Cerrado brasileiro



Fonte: <http://geoconceicao.blogspot.com.br/2012/05/cerrado-brasileiro.html>

Cerrado é uma palavra de origem espanhola que significa fechado, sendo que o termo se refere à característica geral da vegetação arbustivo-arbórea que ocorre na formação savânica. O termo é utilizado tanto para designar tipos de vegetação (tipos fitofisionômicos) quanto para definir suas formas (formação fitofisionômica) (CARVALHO, 2006). É uma região onde o clima é predominantemente tropical, apresentando uma vasta riqueza biológica, possuindo mais de 12.000 espécies de plantas, em que pelo menos 30% são endêmicas dessa área (KLINK, MACHADO, 2005; SANO; DE ALMEIDA; RIBEIRO, 2008).

Esse domínio abrange os estados de Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Tocantins, Maranhão, Pará, Piauí, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Distrito Federal. É caracterizado pela presença de inverno seco e verão chuvoso, um clima classificado como tropical chuvoso (NOVAES et al., 2013; WALTER, 2006).

O Cerrado é um dos ambientes mais ameaçados do mundo, apesar do seu tamanho e importância. Segundo o Ministério do Meio Ambiente, dentre os 2.036.448 km<sup>2</sup> de vegetação nativa restam apenas cerca 22%. A expansão da atividade agropecuária pressiona cada vez mais as áreas remanescentes. Essa situação faz com que a região seja considerada um “hotspot” de biodiversidade e desperte especial

atenção para a conservação dos seus recursos naturais, ou seja, uma região marcada por sua elevada biodiversidade endêmica, mas que se encontra ameaçada de extinção (RODRIGUES et al., 2014; ROSOLEN et al., 2015).

Entre outros prejuízos ao ecossistema, sabe-se que a perda de biodiversidade colabora sobremaneira na redução da capacidade de reconstituição do mesmo. Vale ressaltar o papel biológico importante da microfauna e microflora presentes nos ambientes agroecológicos (ROSOLEN et al., 2015).

A flora do Cerrado ainda é pouco explorada com estudos químicos e biológicos voltados à identificação de plantas úteis, principalmente quando comparada à diversidade e à área ocupada. As informações escassas sobre a mesma acarretam em perda de conhecimento sobre a utilização de plantas para uso medicinal (GUARIMNETO; MORAIS, 2003), pois sabe-se que as plantas possuem propriedades diversas o que confere a elas a possibilidade de seu uso, por exemplo, no tratamento de doenças.

O uso de plantas no tratamento de doenças infecciosas é comum desde os tempos antigos, evidenciando seu grande potencial na pesquisa. Este potencial pode ser explicado pela grande variedade e complexidade de metabólitos secundários sintetizados pelas plantas como resultado de mecanismos adaptativos e de defesa contra insetos, animais e microrganismos. Dessa forma, as plantas são consideradas como um grande laboratório de síntese orgânica (OJIMA, 2008).

As atividades biológicas das espécies vegetais do Cerrado ainda são pouco exploradas, apesar da grande diversidade de metabólitos secundários. A ampla variedade de plantas, pouco avaliadas biologicamente, proporciona inúmeras possibilidades de estudos na busca de moléculas com atividade biológica (MOURA, 2012).

Uma das plantas nativas da região supracitada é a *K. coriacea*, a qual apresenta substâncias como xantonas, flavonoides, cumarinas, esteroides e triterpenoides, que podem atuar como substâncias bioativas (CORTEZ; MARSTON; HOSTETTMANN, 1999; DE AQUINO et al., 2013).

Assim, o gerenciamento e a promoção do desenvolvimento sustentável do Cerrado constituem em uma tarefa árdua e de extrema responsabilidade. A biodiversidade brasileira representa para população, em específico para os pesquisadores brasileiros, uma região de importância científica, social, econômica, cultural e ambiental relevante, a qual se busca como um objetivo único o desenvolvimento sustentável e a preservação de um ecossistema tão diversificado e rico.

Essa diversificação por si justifica a variedade de famílias de plantas existentes no país, as quais ainda precisam ser exploradas (DE MESQUITA et al., 2009).

### 1.1.1 Família Calophyllaceae

A família Calophyllaceae é encontrada em sua maior parte no Cerrado, sendo composta por 14 gêneros e 460 espécies em toda sua distribuição (STEVENS, 2012); apresenta um elevado potencial medicinal, ornamental, ecológico e econômico.

As famílias Hypericaceae, Clusiaceae e Calophyllaceae eram organizadas, inicialmente, em uma única família, a Guttiferae. Os gêneros e as espécies que atualmente são da família Calophyllaceae eram incluídos na família Clusiaceae. Contudo, a partir de estudos filogenéticos, notou-se que havia gêneros distintos em uma única família a Clusiaceae. Assim, houve uma separação, e gêneros que estavam incluídos na família Clusiaceae tiveram uma nova organização e classificação, passando assim para família Calophyllaceae e outras classificações próprias (RUHFEL, 2011).

Com os primeiros trabalhos publicados pelo *Angiosperm Phylogeny Group* (APG, 1998), a proposta da primeira árvore filogenética foi baseada na organização das angiospermas, uma vez que a família Clusiaceae incluía a Hypericaceae e a Calophyllaceae e ambas estavam contidas na ordem Malpighiales. No APG II (2003), Hypericaceae e Clusiaceae tornam-se independentes. Já no APG III (2009), a subfamília Kielmeyeroideae foi separada da família Clusiaceae e elevada à Calophyllaceae (ALKIMIM, 2014; RUHFEL; STEVENS; DAVIS, 2013). Concluiu-se que na Clusiaceae somente poderiam ser incluídos os gêneros reconhecidos em Calophyllaceae, se também fossem incluídos os gêneros das famílias Bonnetiaceae, Hypericaceae e Podostemaceae (SOUZA, LORENZI, 2012).

A família foi denominada de Clusiaceae por não constituir um grupo monofilético. Dentre as clusioides (Malpighiales), a organização ficou da seguinte forma: a ordem Malpighiales dividida em dois clados, sendo um formado por Clusiaceae e Bonnetiaceae, e o outro por Calophyllaceae, Hypericaceae e Podostemaceae (ALKIMIM, 2014; RUHFEL; STEVENS; DAVIS, 2013; SANTOS; SANTO; RAPINI, 2015).

A família Calophyllaceae conta com os seguintes gêneros: *Calophyllum*, *Caraipa*, *Clusiella*, *Endodesmia*, *Haploclathra*, *Kayea*, *Kielmeyera*, *Lebrunia*, *Mahurea*, *Mammea*, *Marila*, *Mesua*, *Neotatea* e *Poeciloneuron*, com distribuição

panropical. No Brasil, são encontrados oito gêneros e aproximadamente 80 espécies, sendo elas endêmicas com uma proporção de 73%, onde 13 são apontadas como raras (ALKIMIM, 2014; BARBOSA, 2015; SANTOS; SANTO; RAPINI, 2015).

### 1.1.1.1 *Kielmeyera coriacea*

O gênero *Kielmeyera* Mart. & Zucc. (Calophyllaceae) é endêmico da América do Sul, incluindo 48 espécies, maciçamente distribuídas no Cerrado e na Mata Atlântica, sendo de grande importância ecológica. No Brasil, este gênero apresenta alguns táxons de difícil identificação, dentre eles estão as espécies pertencentes ao complexo *K. coriacea* (ALKIMIM, 2014; SANTOS; SANTO; RAPINI, 2015; TRAD et al., 2013).

Em um levantamento da flora lenhosa de 376 áreas em todo o Cerrado, apenas 38 espécies estiveram presentes em mais de 50% dessa área, sendo *K. coriacea* uma delas (ALKIMIM, 2014). Essa planta é arbórea, caducifólia e conhecida popularmente como pau-santo. Quando adulta atinge uma altura média de 3-6 m, com ramos glabros, tricomas simples, látex amarelo e tronco bastante suberoso. Possui folhas simples e coriáceas, as quais ficam concentradas no ápice dos ramos. As flores são constituídas por pétalas alvas a levemente rosadas e estames amarelos em grande número; geralmente são vistosas, perfumadas e coloridas, podendo ser atrativas às abelhas, besouros e demais insetos (FIGURA 1.3, pg. 5). Além disso, produz anualmente grande quantidade de sementes viáveis que são disseminadas principalmente pelo vento e também é conhecida por ser produtora de cortiça (ALKIMIM, 2014; BIESDORFA; CORTEZ; AUDI, 2012; RIOS; MORI; BARBOSA, 2011).

FIGURA 1.3: folha (A); flor (B) e fruto (C) de *K. coriacea*



Fonte: <https://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/5114606233>

Para a espécie *K. coriacea* há trabalhos que reportam sua caracterização química e ação biológica (CALEARE et al., 2013; CORTEZ; MARSTON; HOSTETTMANN, 1999; MOURA, 2012; SELA et al., 2010). Contudo, existe uma escassez no que tange ao estudo etnobotânico, o qual é baseado no uso de plantas medicinais utilizadas por um determinado grupo de pessoas ou comunidades rurais, incluindo suas crenças e práticas culturais (LIMA et al., 2012).

## 1.2 Etnobotânica

Etnobotânica é uma ciência multidisciplinar que estuda a inter-relação entre povos tradicionais com as plantas e o modo como eles utilizam esses recursos vegetais. (MONGALO et al., 2016). Com o conhecimento etnobotânico, é possível identificar potenciais para novas aplicações de plantas com propriedades farmacológicas que podem ser investigadas cientificamente e conseqüentemente ser decisivas para o tratamento e/ou controle de doenças (LIMA et al., 2012; MISHRA et al., 2016).

Devido ao uso generalizado de plantas medicinais tradicionais e a ampla aceitação de medicamentos à base de plantas, grandes estudos em farmácia e áreas afins são recomendados para fornecer informações às indústrias farmacêuticas na fabricação de novos medicamentos (ROUHI-BOROUJENI; ASADI-SAMANI; MORADI, 2016).

Um desses estudos é a bioprospecção, que busca a descoberta de compostos bioativos com origem botânica. Por exemplo, a aspirina (*Filipendula ulmaria* L. Maxim), a colchicina (*Colchicum autumnale* L.), a digoxina e a digitoxina (*Digitalis purpurea* L.), e o tetrahydrocannabinol e canabidiol (*Cannabis sativa* L.) são drogas bem conhecidas que foram desenvolvidas a partir de informações etnobotânicas. Além disso, registros etnobotânicos também levaram ao isolamento da artemisinina (*Artemisia annua* L.), um medicamento antimalárico importante, cuja relevância foi reconhecida com a premiação do Nobel 2015 de Fisiologia e Medicina (GARNATJE; PEÑUELAS; VALLÈS, 2017; PARRA; QUAVE et al., 2017).

Na etnobotânica dados de como as pessoas de uma cultura, etnia ou uma região usam as plantas nativas de suas regiões são obtidos. Tradicionalmente, essa riqueza de conhecimento foi transmitida oralmente de geração em geração, sem qualquer documento. No entanto, devido à falta de interesse entre as gerações, bem como a sua tendência para migrar para cidades, a possibilidade de perda dos saberes é latente. Dessa forma, os estudos etnobotânicos destacam-se por manter a conservação e a

disseminação desse conhecimento (KALADEVI; PREETHA, 2015; ROUHI-BOROUJENI; ASADI-SAMANI; MORADI, 2016).

Nesse contexto, este trabalho buscou informações importantes fundamentadas nos conhecimentos populares sobre *K. coriacea*, afim de correlacionar com os ensaios biológicos e coletar informações essenciais para a continuidade da pesquisa. Sendo assim, foi realizada uma análise de dados de um estudo etnobotânico feito pela doutoranda Núbia Alves Mariano Teixeira Pires Gomides do Programa de Pós-Graduação em Biodiversidade e Biotecnologia da Rede Pro-Centro-Oeste e participante do grupo de pesquisa em Produtos Naturais da UFG/Regional Goiânia.

A análise deste estudo revelou uma variedade de plantas medicinais utilizadas pela Comunidade Coqueiros na prevenção e cura de inúmeras doenças. A Comunidade Coqueiros situa-se a 15 km de Catalão-GO, e a faixa etária dos moradores é de 40 a 70 anos, sendo que os mesmos fazem uso das plantas medicinais na cura de suas enfermidades.

Para a coleta de dados foram utilizados dois métodos: a entrevista etnobotânica e a observação/participação, sem o preenchimento de questionários (RODRIGUES, 2007). Foram extraídas deste estudo apenas as informações sobre o uso popular de *K. coriacea*. Dos 37 entrevistados, 76% deles afirmaram que conhecem *K. coriacea*, identificada por eles como pau-santo, por ser utilizada para o tratamento de alguma enfermidade. É importante ressaltar, que a planta em estudo foi a mais citada por esses entrevistados, fato que contribuiu para a continuidade da pesquisa com a mesma. Os dados mais importantes dos usos medicinais obtidos pelos entrevistados foram cedidos pela doutoranda Núbia Alves Mariano Teixeira Pires Gomides e são expressos no (QUADRO 1.1, pg.8).

QUADRO 1.1: Levantamento etnobotânico de *K. coriacea* realizado na Comunidade Coqueiros (GO) (continuação)

<b>Idade (anos)</b>	<b>Sexo</b>	<b>Indicação de uso medicinal</b>	<b>Parte da planta utilizada</b>	<b>Forma de uso</b>	
64	masculino	leucemia e anemia	entrecasca	apurar com leite e utilizar pequenas porções diariamente	
74		gastrite e dor de estômago	galho fino	amassar e colocar de molho na água por 24 horas	
		anemia e leucemia	entrecasca e folhas	chá das partes em conjunto	
72	feminino	dor na gengiva, dor de dente e cárie	entrecasca fresca	mastigação	
60	masculino	Artrite, artrose, anemia, leucemia e infecções intestinais	entrecasca ou folhas	amassar e deixar de molho, posteriormente tomar	
		cicatrização	entrecasca	fazer o emplasto	
		gastrite		apurar com leite e utilizar pequenas porções diariamente	
55		gastrite, anemia e leucemia		amassar e fazer a infusão com água	
66		cicatrização	entrecasca	fazer um melado e utilizar como emplasto	
		dor de dente		mastigação	
50		gastrite	galho fino	moer e fazer um melado	
70		dor nos rins	entrecasca	infusão	
53		todos os tipos de infecções		chá	
59		reumatismo e gastrite	entrecasca ou folhas	infusão	
66		infecções de útero, infecções de intestino, dor nos rins e reumatismo	entrecasca		
53		cicatrização	entrecasca ou folhas	fazer um melado e utilizar como emplasto	
52		vermífugo		chá	
80		feminino	antibiótico	entrecasca	mastigação
			infecções intestinais		apurar com leite e utilizar pequenas porções diariamente

QUADRO 1.1: Levantamento etnobotânico de *K. coriacea* realizado na Comunidade Coqueiros (GO) (conclusão)

Idade (anos)	Sexo	Indicação de uso medicinal	Parte da planta utilizada	Forma de uso
80	feminino	dor de dente	entrecasca	mastigação
53	masculino	vermífugo	entrecasca ou folhas	chá
52		antibiótico		mastigação
80	feminino	infecções intestinais	entrecasca	apurar com leite e utilizar pequenas porções diariamente
		dor de dente		mastigação
67	masculino	antibiótico		amassar e fazer a garrafada com pinga
		dor de dente		mastigação
63		cicatrização		fazer um melado e utilizar como emplasto
		dor nos rins e todos os tipos de infecções		infusão

Como já reportado, a *K. coriacea* é bastante utilizada pela Comunidade Coqueiros, nas mais diversas enfermidades, sendo a entrecasca e as folhas as partes mais utilizadas. No entanto, tais partes já têm sido investigadas pelo grupo de pesquisa do qual a mestrandia fez parte, apresentando propriedades antiulcerogênica, antimicrobiana e enzimática.

Assim, instigou-se a realização do estudo químico-biológico do extrato etanólico da raiz de *K. coriacea*, visando averiguar as propriedades biológicas promissoras associadas à química da mesma.

Paralelamente, foi realizado um estudo bibliométrico do gênero *Kielmeyera*, visando conhecer os metabólitos secundários já isolados e/ou identificados do mesmo.

### 1.3 Bibliometria

#### 1.3.1 Conceitos

A bibliometria é um estudo que associa um conjunto de técnicas aplicadas aos métodos estatísticos e matemáticos para analisar dados associados a um determinado conhecimento. O estudo segue uma lógica da amostragem para assim obter informações

a partir de um levantamento bibliográfico, bem como conclusões acerca de uma busca (ZHANG et al., 2017).

Os métodos bibliométricos possuem diversas aplicações, sendo elas: a avaliação de uma instituição de pesquisa; uma revisão sistemática da literatura; identificar as tendências e o crescimento do conhecimento em uma área, bem como o surgimento de novos temas; identificar as revistas em destaque; prever as tendências de publicação; analisar a produtividade de autores, organizações, países e suas correlações; analisar os processos de citação e co-citação e comparar o estudo comum entre universidades. Por fim, na bibliometria, a análise de citações permite a identificação e descrição de uma série de padrões na produção do conhecimento científico e seus impactos, procedência institucional dos autores mais influentes em um determinado campo de pesquisa e o tipo de documento mais utilizado (ARAÚJO, 2006; VANTI, 2002).

O uso de técnicas bibliométricas contribui de forma decisiva em situações que os recursos estão escassos, como por exemplo, quando um bibliotecário precisa resolver que títulos ou publicações periódicas podem ou não ser suprimidas em uma biblioteca. Ele poderá utilizar dessas técnicas para predefinir uma lista de publicações periódicas prioritárias, autores relevantes, revistas importantes e prever a demanda futura. É fundamental ter esse controle e organização, pois assim minimiza o tempo de busca, além de relacionar temas de suma importância, facilitando a escrita e análise de dados. Os índices bibliométricos também servem de base para avaliar a produtividade e a qualidade da pesquisa dos cientistas (VANTI, 2002).

A avaliação de uma instituição de pesquisa e uma revisão sistemática da literatura se destaca, pois, ambas visam o mapeamento da produtividade científica de periódicos, autores e a representação da informação obtida (DU; TANG, 2014).

A revisão sistemática é constituída por uma análise crítica de um determinado tema, a partir de dados da literatura, seguindo um método científico capaz de avaliar o grau de replicabilidade e validade dos resultados. É importante destacar que a revisão sistemática não é um conjunto de comentários sobre o que se pesquisa, nem mesmo a obtenção do resumo de cada artigo (MORIOKA, 2014). Nesse contexto, destaca-se a diferença entre a revisão sistemática e a não sistemática (QUADRO 1.2, pg.11).

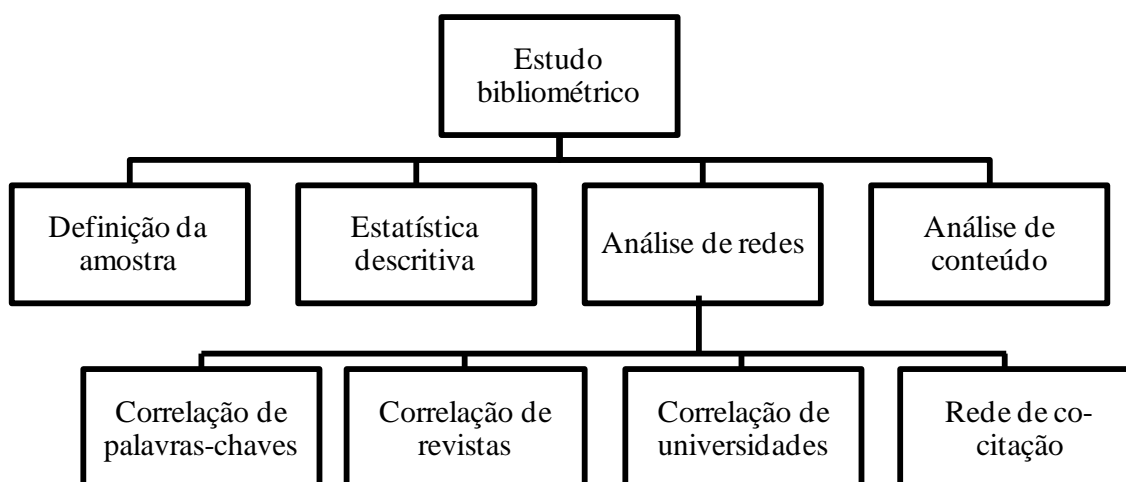
QUADRO 1.2: Características de dois tipos de revisões bibliográficas

Revisão sistemática	Revisão não-sistemática
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Análise da literatura utilizando método científico;</li> <li>• Busca restrita por referências com análise quantitativa e qualitativa;</li> <li>• Conhecimento adequado, mesmo com baixo conhecimento inicial sobre os assuntos tratados na literatura;</li> <li>• Utilização de <i>softwares</i> para análise dos dados, mas valorizando a análise do pesquisador.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• É um tipo de revisão amplamente aceito;</li> <li>• Utilizada para vários tipos de pesquisas;</li> <li>• O levantamento bibliográfico requer artigos e referências encontradas ou indicadas por terceiros;</li> <li>• Utilização de artigos de forma aleatória e sem coerência.</li> </ul>

\*Adaptado: MORIOKA, 2014.

O estudo bibliométrico utiliza análises estatísticas para descrever as características importantes de artigos dentro de um determinado tópico ou campo. Ele se resume em quatro etapas: definição da amostra, estatística descritiva, análise de redes e análise de conteúdo (FLUXOGRAMA 1.1, pg.11).

FLUXOGRAMA 1.1: Caracterização do estudo bibliométrico



A definição da amostra consiste em listar palavras-chave relacionadas ao estudo realizado. Nela se inicia o levantamento bibliográfico realizado em base de dados específica para o tema e delimita artigos a serem referenciados. A princípio, essa busca deve ser realizada de forma rigorosa e coerente com o estudo, pois ela será o ponto de partida para as demais etapas. Posteriormente, são avaliados o título, as palavras-chave e o resumo, atentando-se aos sinônimos e combinações de palavra-chave. Caso a busca contenha um número extensivo de publicações, é possível fazer um corte temporal, como por exemplo, restringir para artigos mais recentes (MORIOKA, 2014).

Na estatística descritiva são citadas as principais características da amostra, como uma observação minuciosa se a mesma atende o tema desejado. Nessa etapa é necessário um senso crítico do leitor, selecionando o que é relevante e excluindo artigos que não se relacionam com a pesquisa. Podem ser utilizados como apoio, programas como o Excel ou similares, mas vale ressaltar que a seleção é realizada manualmente, com a leitura dos resumos e até mesmo dos artigos na íntegra. As bases de dados como o *Scifinder*, *Scopus*, *PubMed* e o *Web of Science* oferecem ferramentas de apoio para a busca científica. Outro exemplo é a construção de gráficos e tabelas no Excel para distribuição adequada e comparação desses dados (ARAÚJO, 2006; MORIOKA, 2014).

Um ponto positivo das bases de dados *Scopus* e *Web of Science* são que as mesmas fornecem o número de citações a cada ano para os artigos. Com esse dado, é possível acompanhar a evolução da relevância (em termos de citação) de um determinado tema do artigo. Podem também, ser criados gráficos de colunas, de barras, de dispersão; ou aquele que mais se adequar com o tipo de análise em estudo (DU; TANG, 2014).

Para a análise de redes, os artigos já estarão selecionados, sendo possível realizar relações entre eles, ter noção do conteúdo e analisar as principais referências da amostra. Essas relações são feitas por meio de mapas conceituais e redes de correlação, com o auxílio de *softwares* como: o SITKIS + UCINET + NetDraw; o VOSviewer e o *Cite Space*. Na elaboração das redes de correlação, os programas aceitam saída do ISI *Web of Science*, do *Scopus* e do *PubMed* (MORIOKA, 2014).

Para a realização da rede de co-citação é importante que os dados estejam no formato desses bancos de dados. Nela, é possível aumentar e diminuir o número de nós na rede de co-citação; e no *software* consta o número de referências que são consideradas num determinado parâmetro (MORIOKA, 2014).

Dessa forma, a rede de co-citação será criada, e a partir dela, as referências serão utilizadas para construir o conhecimento da amostra em análise. No programa também, há a opção de visualizar a rede por “temperatura”, em “*Density visualization*” (MORIOKA, 2014). Por exemplo, em uma rede de revistas e periódicos, as revistas mais citadas serão identificadas em cores mais vibrantes como o vermelho, enquanto revistas menos citadas para aquele assunto, recebem coloração de amarelo à verde; já as revistas que se correlacionarem possuirão a mesma cor, sendo com maior ou menor impacto.

Pela rede de co-citação é possível observar as referências mais relevantes, por serem mais citadas; quais autores se aproximam em seus estudos; sua contribuição para análise do tema como um todo e os principais precursores do estudo. Várias outras redes também podem ser realizadas, como a de revistas mais frequentes para aquela amostragem, quais palavras-chave são mais comuns para os artigos, em que país se estuda mais sobre o tema, quais universidades realizam o estudo e quais se relacionam entre si. Enfim, há uma variedade de redes que podem ser feitas dependendo do tema e da finalidade da pesquisa.

Sendo assim, resume-se que a análise de rede traz conhecimentos dos artigos a serem estudados e possíveis pesquisadores que se assemelham em seus trabalhos. São inúmeras informações, mas cabe ao pesquisador selecionar e refinar os dados que fazem parte do raciocínio lógico do seu estudo, assim como é realizado na análise de dados da definição da amostra (MORIOKA, 2014).

Por fim, a análise do conteúdo realiza o estudo geral, como o método da pesquisa, os principais termos utilizados, seus resultados e as conclusões para futuras pesquisas. Nela, há uma classificação quantitativa de informações que necessitam de reportar dados estatísticos, mas pesquisas mais simples já se concluem em apenas a análise de redes. Dessa forma, é perceptível a vasta aplicabilidade da bibliometria, e que os dados analisados podem ser alterados de acordo com a amostra utilizada (ARAÚJO, 2006; MORIOKA, 2014).

Desde 2015, estudos bibliométricos têm sido utilizados para identificar e analisar trabalhos com maior reconhecimento, isto é, a maioria dos artigos citados (MORIOKA, 2014). Dessa forma, nota-se a importância da utilização de técnicas simples, como a bibliometria para a sistematização de dados e organização das informações obtidas em uma pesquisa.

Em relação ao estudo realizado nesse trabalho, não há esse tipo de análise para *K. coriacea*, o que permite uma inovação nos estudos, podendo correlacionar dados vinculados ao levantamento bibliográfico. Sendo assim, a partir da análise de redes de correlação, foram selecionados os autores principais, e as palavras-chave essenciais para a busca de novos artigos. Enfim, esse estudo auxiliou de forma significativa na coleta de informações a cerca do estudo químico, que são os metabólitos isolados e/ou identificados do gênero *Kielmeyera*, além de fornecer dados adicionais e relevantes sobre o trabalho.

#### **1.4 Metabólitos secundários do gênero *Kielmeyera***

Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos: terpenoides, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (NUNES, 2014). Diante a diversidade desses metabólitos em extratos de plantas, foi realizado um levantamento bibliográfico sobre os metabólitos isolados e/ou identificados do gênero *Kielmeyera*. Esse levantamento consistiu em uma busca sistemática de acordo com a bibliometria, nas seguintes bases de dados: *Scifinder*, *Scopus*, *Web of Science* e *Science Direct*, selecionando artigos até fevereiro de 2017.

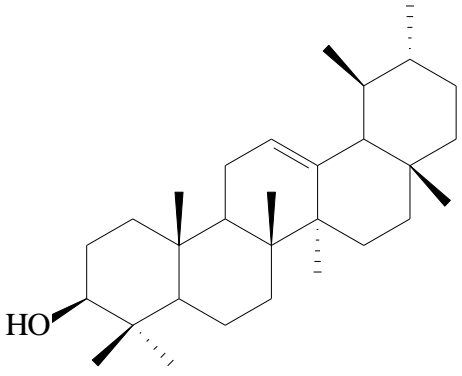
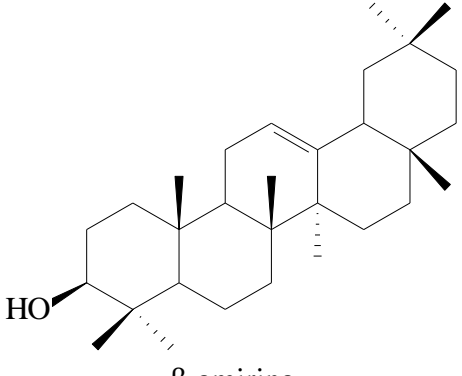
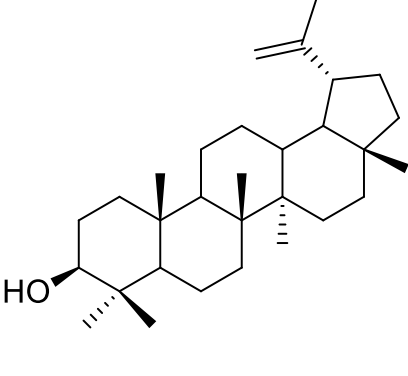
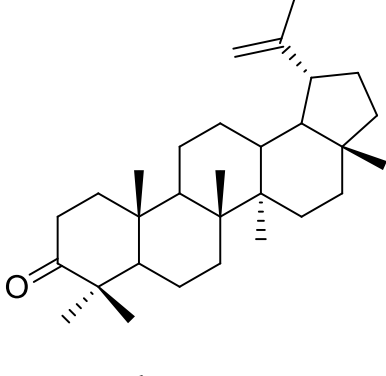
##### **1.4.1 Terpenoides**

Os terpenoides constituem o maior grupo de metabólitos secundários. Eles são derivados do isopreno (C<sub>5</sub>) e são classificados em: monoterpenoides (C<sub>10</sub>), sesquiterpenoides (C<sub>15</sub>), diterpenoides (C<sub>20</sub>), triterpenoides (C<sub>30</sub>) e tetraterpenoides (C<sub>40</sub> ou mais) (KAWASE, 2013).

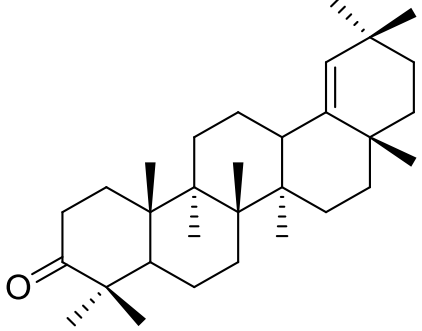
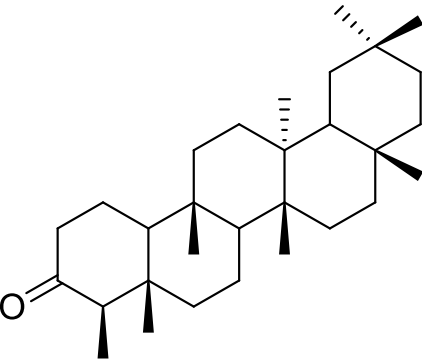
##### **1.4.1.1. Terpenoides isolados e/ou identificados do gênero *Kielmeyera***

No QUADRO 1.3 (pg. 15) são apresentados os terpenoides isolados e/ou identificados do gênero *Kielmeyera* e relatados na literatura.

QUADRO 1.3: Terpenoides isolados e/ou identificados do gênero *Kielmeyera* (continuação)

Autores	Espécie/ Parte da espécie	Substância
<p>- NAGEM; SILVA, 1988 - SOBRAL et al., 2009</p>	<p>- <i>K. pumila</i> (fruto) - <i>K. cuspidata</i> Saddi (caule)</p>	 <p><math>\alpha</math>-amirina</p>
<p>- SOBRAL et al., 2009 - BARBOSA, 2015</p>	<p>- <i>K. cuspidata</i> Saddi (caule) - <i>K. coriacea</i> (folha)</p>	 <p><math>\beta</math>-amirina</p>
<p>BARBOSA, 2015</p>	<p><i>K. coriacea</i> (folha)</p>	 <p>lupeol</p>
<p>- BARBOSA, 2015 - COQUEIRO, 2010</p>	<p>- <i>K. coriacea</i> (folha) - <i>K. variabilis</i> (caule)</p>	 <p>lupenona</p>

QUADRO 1.3: Terpenoides isolados e/ou identificados do gênero *Kielmeyera* (conclusão)

<p>COQUEIRO, 2010</p>	<p><i>K. variabilis</i> (caule)</p>	 <p>germaniconona</p>
<p>SILVA; GOTTLIEB; MAGALHÃES, 1968</p>	<p><i>K. rosea</i>*</p>	 <p>friedelina</p>

\* Parte não identificada na literatura

#### 1.4.2 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos apresentam variedade em sua fórmula estrutural, a qual se deve à grande diversidade de combinações que acontece na natureza, sendo algumas dessas denominadas de polifenóis. Estas combinações fenólicas podem ser divididas em classes (QUADRO 1.4, pg.17), dentre as quais se destacam os flavonoides, os ácidos fenólicos, os taninos e os tocoferóis como os mais comuns antioxidantes fenólicos de fonte natural (ANGELO; JORGE, 2007).

QUADRO 1.4: Classe de compostos fenólicos em plantas

Classe do metabólito secundário	Fórmula geral da estrutura química
Fenólicos simples e benzoquinonas	C <sub>6</sub>
Ácidos hidroxibenzoicos	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub>
Acetofenol, ácidos fenilacéticos	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub>
Ácidos hidroxicinâmicos e fenilpropanoides	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub>
Naftoquinonas	C <sub>6</sub> -C <sub>4</sub>
Xantonas	C <sub>6</sub> -C <sub>1</sub> -C <sub>6</sub>
Estilbenos, antraquinonas	C <sub>6</sub> -C <sub>2</sub> -C <sub>6</sub>
Flavonoides, isoflavonoides	C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub>
Lignanas, neolignanas	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>
Biflavonoides	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>2</sub>
Ligninas	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> ) <sub>n</sub>
Taninos condensados	(C <sub>6</sub> -C <sub>3</sub> -C <sub>6</sub> ) <sub>n</sub>

C = carbono;

C<sub>x</sub>, em que x = quantidade de carbonos;

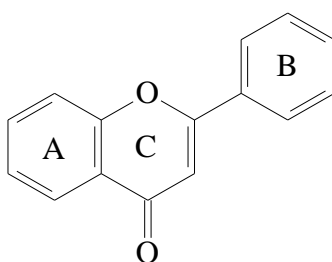
C<sub>6</sub> = benzeno

\*Adaptado: ANGELO; JORGE, 2007.

#### 1.4.2.1 Flavonoides

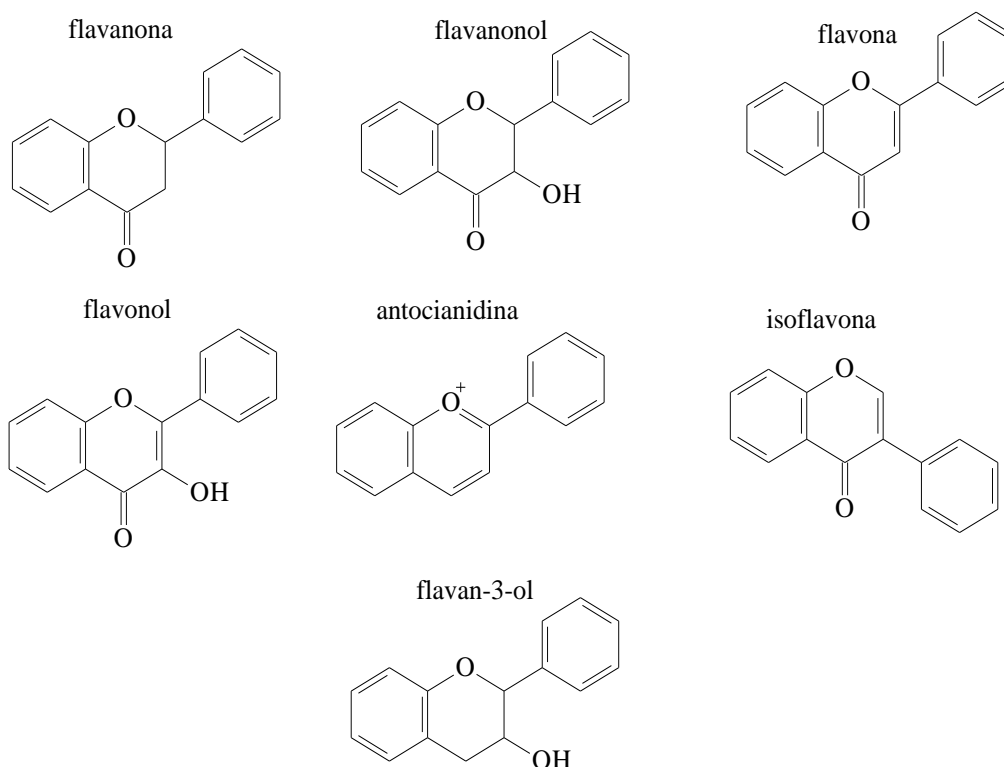
Os flavonoides são compostos encontrados em frutas, folhas, sementes e em outras partes da planta na forma de glucosídios ou agluconas. São compostos de baixo peso molecular, consistindo em 15 átomos de carbono. Sua estrutura química possui dois anéis aromáticos, denominados anel A e B, unidos por três carbonos que formam um anel heterocíclico, denominado anel C (FIGURA 1.4, pg.17). O anel aromático A é derivado do ciclo acetato/malonato, enquanto o anel B é derivado da fenilalanina, pela rota chiquimato (MARTINS, 2012).

FIGURA 1.4: Estrutura química geral dos flavonoides



As variações em substituição do anel C padrão resultam em importantes classes de flavonoides, como flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis (ou catequinas), isoflavonas e antocianidinas (FIGURA 1.5, pg.18). Os flavonoides se destacam devido seu elevado potencial antioxidante (MACHADO et al., 2008).

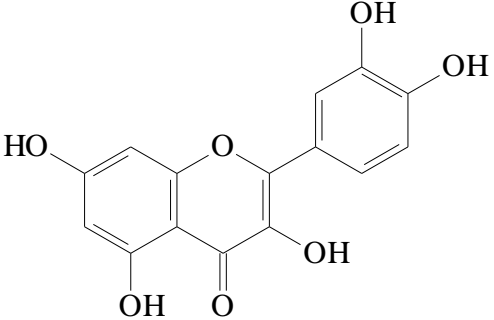
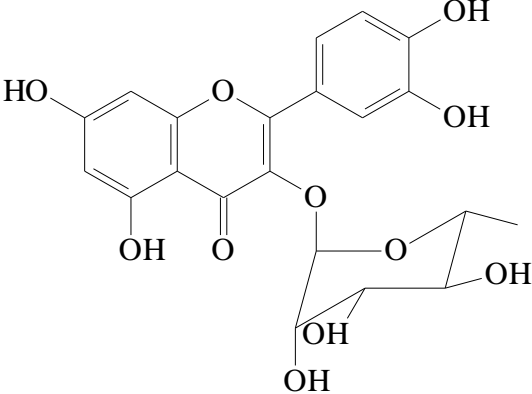
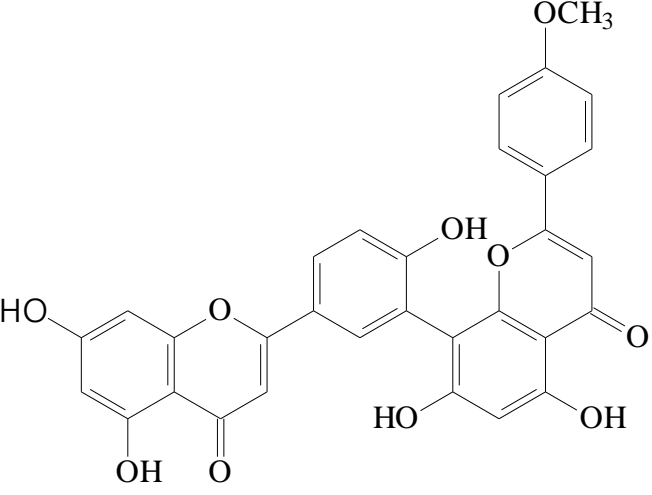
FIGURA 1.5: Estrutura das principais classes de flavonoides



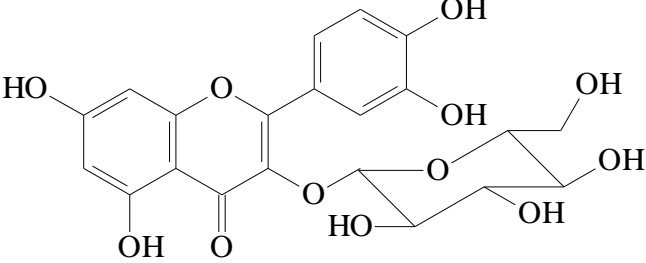
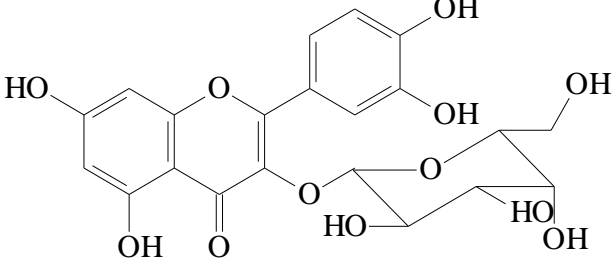
#### 1.4.2.1.1 Flavonoides isolados e/ou identificados do gênero *Kielmeyera*

No QUADRO 1.5 (pg. 19) são apresentados os flavonoides isolados e/ou identificados do gênero *Kielmeyera* e relatados na literatura.

QUADRO 1.5: Flavonoides isolados e/ou identificados do gênero *Kielmeyera* (continuação)

Autores	Espécie/ Parte da espécie	Substância
BARBOSA, 2015	<i>K. coriacea</i> (folha)	 <p>quercetina</p>
COQUEIRO, 2010	<i>K. variabilis</i> (caule)	 <p>quercitrina</p>
		 <p>podocarpusflavona A</p>

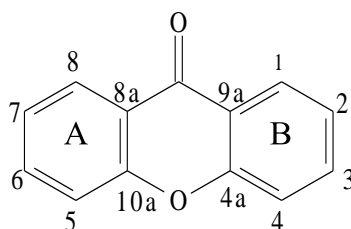
QUADRO 1.5: Flavonoides isolados e/ou identificados do gênero *Kielmeyera* (conclusão)

Autores	Espécie/ Parte da espécie	Substância
COQUEIRO, 2010	<i>K. variabilis</i> (caule)	 <p>quercetina-3-<i>O</i>-glucosídeo</p>
		 <p>quercetina-3-<i>O</i>-galactosídeo</p>

#### 1.4.2.2 Xantonas

As xantonas são substâncias heterocíclicas oxigenadas com esqueleto dibenzo  $\gamma$ -pirona central, o que confere a estas moléculas um arranjo simétrico. O nome xantona vem do grego, que significa amarelo, sendo esta a cor da maioria destes compostos. Sua estrutura (FIGURA 1.6, pg. 20) apresenta posições numeradas 1-4 e de 5-8 referentes aos átomos de carbonos que podem ser substituídos, resultando em uma variedade de compostos que podem ser isolados de fonte natural ou sintetizados (SOBRAL, 2006).

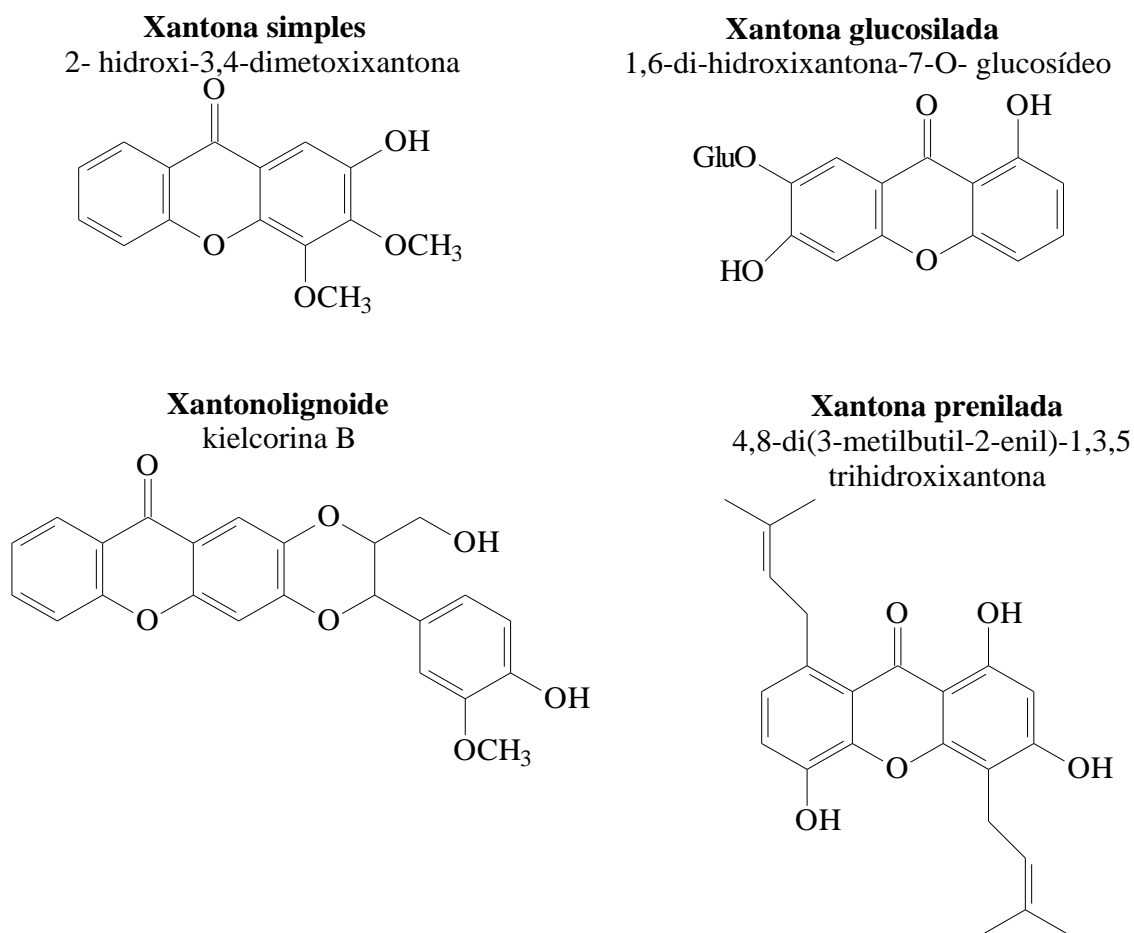
FIGURA 1.6: Estrutura geral de uma xantona



As xantonas possuem diversas atividades biológicas, tais como anti-hipertensiva, antitumoral e antioxidante, todas baseadas em suas diversas estruturas (MOURA, 2012). Os heterocíclicos oxigenados desempenham um papel importante na concepção e na descoberta de novos compostos farmacologicamente ativos (WOO et al., 2007).

A classificação das xantonas é dividida em quatro grupos principais: oxigenadas, simples, glucosiladas, preniladas e xantonolignoides (FIGURA 1.7, pg.21). As classes de xantonas oxigenadas simples são subdivididas em seis grupos, de acordo com o grau de oxigenação, podendo ser do tipo: mono, di, tri, tetra, penta ou hexa oxigenadas. A maior parte das xantonas isoladas do gênero *Kielmeyera* pertence à classe das oxigenadas e simples (SOBRAL, 2006).

FIGURA 1.7: Classificação das xantonas

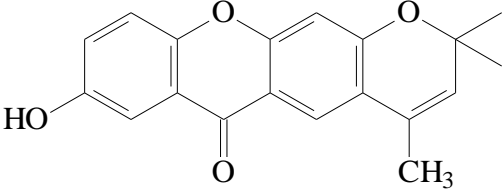
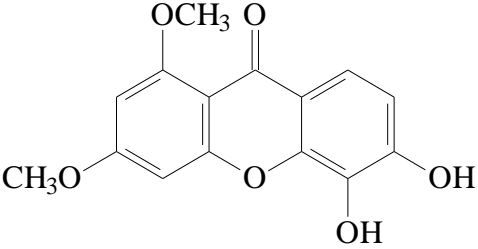
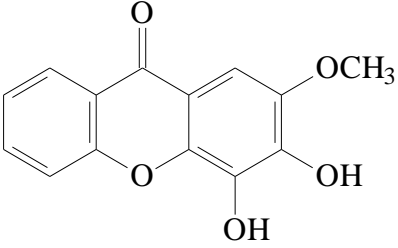
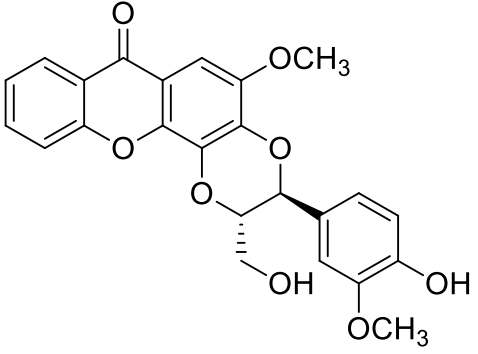


Fonte: SOBRAL, 2006

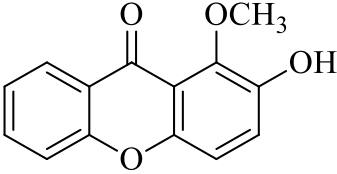
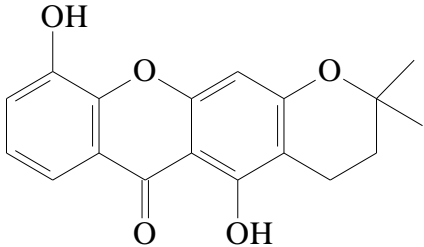
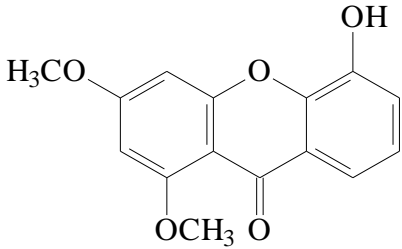
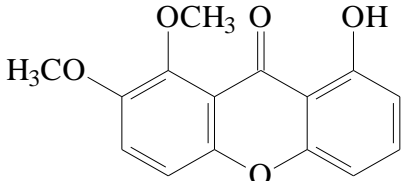
### 1.4.2.2.1 Xantonas isoladas e/ou identificadas do gênero *Kielmeyera*

No QUADRO 1.6 (pg. 22) são apresentadas as xantonas isoladas e/ou identificadas do gênero *Kielmeyera* e relatadas na literatura.

QUADRO 1.6: Xantonas isoladas e/ou identificadas do gênero *Kielmeyera* (continuação)

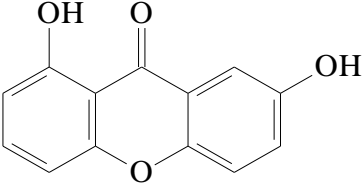
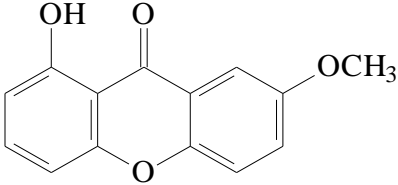
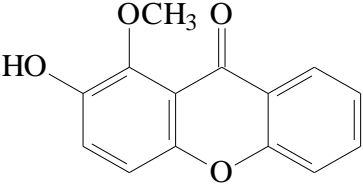
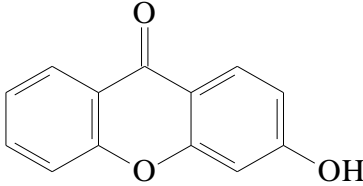
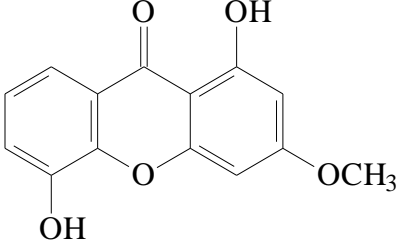
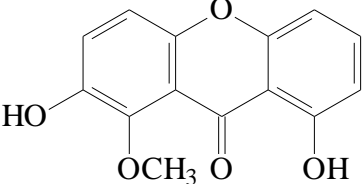
Autores	Espécie/ Parte da espécie	Substância
- NAGEM; SILVA, 1988 - COQUEIRO et al., 2016	- <i>K. pumila</i> (caule) - <i>K. variabilis</i> (caule)	 <p style="text-align: center;">osajaxantona</p>
COQUEIRO et al., 2016	<i>K. variabilis</i> (caule)	 <p style="text-align: center;">3,4-dihidroxi-6,8-dimetoxixantona</p>
		 <p style="text-align: center;">3,4-dihidroxi-2-metoxixantona</p>
-COQUEIRO et al., 2016 -CORTEZ; MARSTON; HOSTETTMANN, 1999	- <i>K. variabilis</i> (caule) - <i>K. coriacea</i> (casca do caule)	 <p style="text-align: center;">kielcorina</p>

QUADRO 1.6: Xantonas isoladas e/ou identificadas do gênero *Kielmeyera*  
(continuação)

Autores	Espécie/ Parte da espécie	Substância
<p>-COQUEIRO et al., 2016 -CORTEZ; MARSTON; HOSTETTMANN, 1999</p>	<p>-<i>K. variabilis</i> (caule) -<i>K. coriacea</i> (casca do caule)</p>	 <p>2-hidroxi-1-metoxixantona</p>
<p>-GOTTLIEB et al., 1969</p>	<p>- <i>K. ferruginea</i> (casca e madeira)</p>	 <p>6-dehidroxijacareubina</p>
<p>-GOTTLIEB et al., 1969 -PIMENTA et al., 1964 -PINTO; MESQUITA; GOTTLIEB, 1987 -LOPES et al., 1977 -CORTEZ et al., 1998 -DUARTE et al., 1968 -COQUEIRO et al., 2016</p>	<p>- <i>K. ferruginea</i> (casca e madeira) - <i>K. coriacea</i> (folha) - <i>K. rupestres</i>* - <i>K. variabilis</i> (caule)</p>	 <p>5-hidroxi-1,3-dimetoxixantona</p>
<p>-GOTTLIEB et al., 1970 -ANTONACCIO et al., 1965</p>	<p><i>K. excelsa</i> (madeira)</p>	 <p>1-hidroxi-7,8-dimetoxixantona</p>

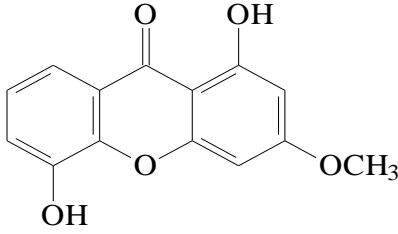
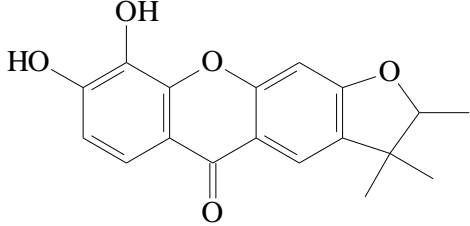
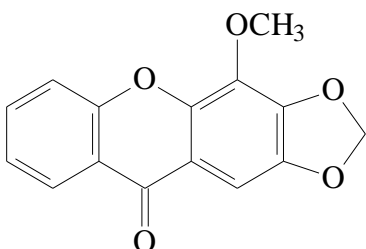
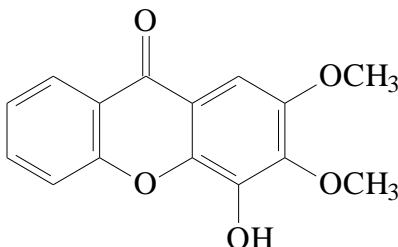
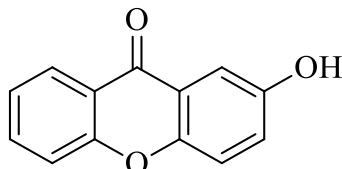
\*parte vegetal não indicada na literatura

QUADRO 1.6: Xantonas isoladas e/ou identificadas do gênero *Kielmeyera*  
(continuação)

Autores	Espécie/ Parte da espécie	Substância
-GOTTLIEB et al., 1970 -ANTONACCIO et al., 1965	<i>K. excelsa</i> (madeira)	 <p>1,7-dihidroxi-xantona</p>
		 <p>1-hidroxi-7-metoxixantona</p>
		 <p>2-hidroxi-1-metoxixantona</p>
		 <p>3-hidroxi-xantona</p>
- PIMENTA et al., 1964 -LOPES et al., 1977 -DUARTE et al., 1968	- <i>K. coriacea</i> (folha) - <i>K. rupestres</i> *	 <p>mesuaxantona A</p>
-GOTTLIEB et al., 1969. -GOTTLIEB et al., 1970; -ANTONACCIO et al., 1965.	- <i>K. ferruginea</i> (casca e madeira) - <i>K. excelsa</i> (madeira)	 <p>2,8-dihidroxi-1-metoxixantona</p>

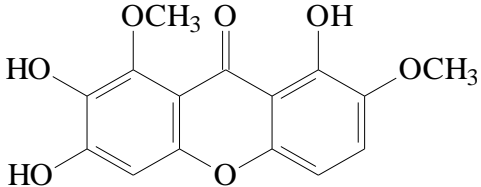
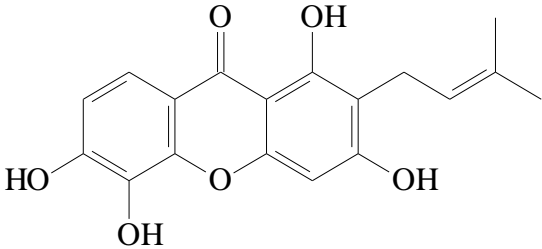
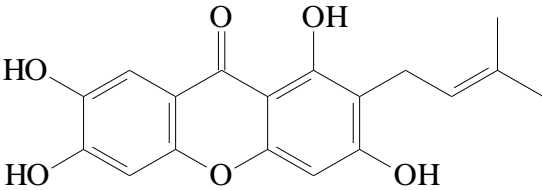
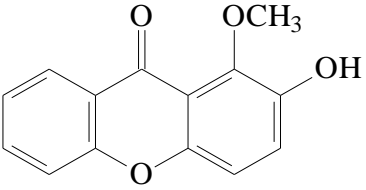
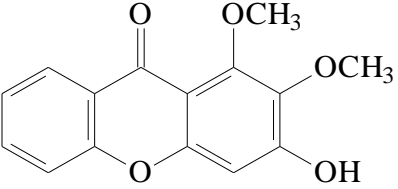
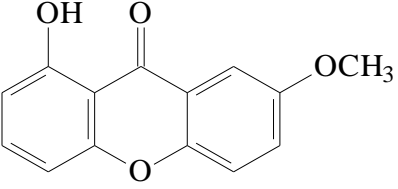
\*parte vegetal não indicada na literatura

QUADRO 1.6: Xantonas isoladas e/ou identificadas do gênero *Kielmeyera*  
(continuação)

Autores	Espécie/ Parte da espécie	Substância
-PIMENTA et al., 1964 -PINTO; MESQUITA; GOTTLIEB, 1987 -LOPES et al., 1977 -CORTEZ et al., 1998	<i>K. coriacea</i> (folha)	 <p>2-metoxixantona</p>
		 <p>toxiloxantona C</p>
-PIMENTA et al., 1964 -PINTO; MESQUITA; GOTTLIEB, 1987 -LOPES et al., 1977 -CORTEZ et al., 1998 -GOTTLIEB; MESQUITA; NAGEM, 1971 -DUARTE et al., 1968	- <i>K. coriacea</i> (folha) - <i>K. rubiflora</i> (casca e madeira) - <i>K. rupestres</i> *	 <p>4-metoxi-2,3-metilenodioxixantona</p>
-GOTTLIEB; MESQUITA; NAGEM, 1971 -DUARTE et al., 1968 -CORTEZ; MARSTON; HOSTETTMANN, 1999	- <i>K. rubriflora</i> (casca e madeira) - <i>K. rupestres</i> * - <i>K. variabilis</i> (caule) - <i>K. coriacea</i> (casca do caule)	 <p>4-hidroxi-2,3-dimetoxixantona</p>
GOTTLIEB; MESQUITA; NAGEM, 1971	<i>K. rubriflora</i> (casca e madeira)	 <p>2-hidroxi-xantona</p>

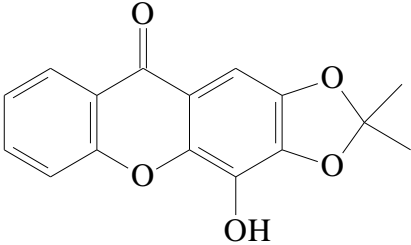
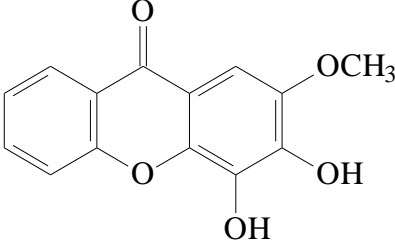
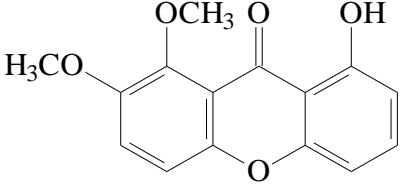
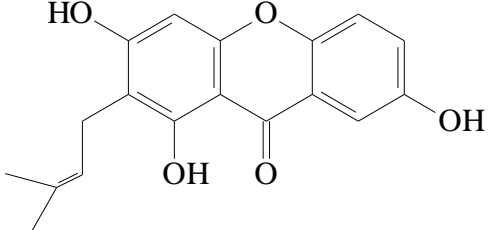
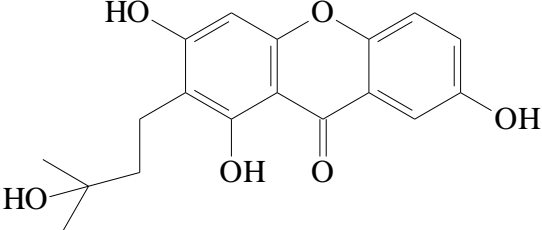
\*parte vegetal não indicada na literatura

QUADRO 1.6: Xantonas isoladas e/ou identificadas do gênero *Kielmeyera* (continuação)

Autores	Espécie/ Parte da espécie	Substância
GOTTLIEB; MESQUITA; NAGEM, 1971	<i>K. rubriflora</i> (casca e madeira)	 <p>1,7-dimetoxi-2,3,8-trihidroxixantona</p>
PINHEIRO et al., 2003	<i>K. variabilis</i> (caule)	 <p>1,3,5,6-tetrahidroxi-2-prenilxantona</p>
		 <p>assiguxantona B</p>
DUARTE et al., 1968	<i>K. rupestres</i> *	 <p>1-metoxi-2-hidroxixantona</p>
		 <p>3-hidroxi-1,2-dimetoxixantona</p>
CORREA; GOTTLIEB; MAGALHAES, 1966	<i>K. corymbosa</i> *	 <p>1-hidroxi-7-metoxixantona</p>

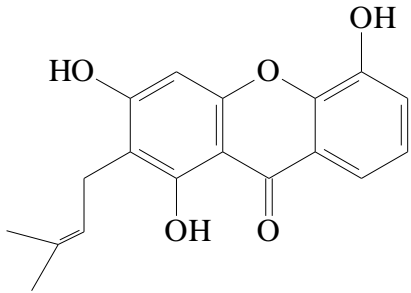
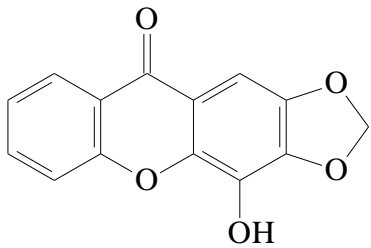
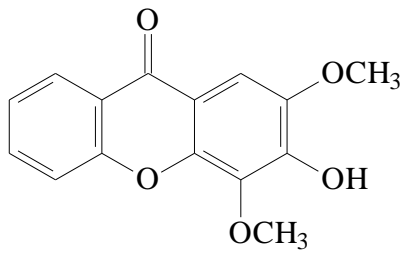
\*parte vegetal não indicada na literatura

QUADRO 1.6: Xantonas isoladas e/ou identificadas do gênero *Kielmeyera*  
(continuação)

Autores	Espécie/ Parte da espécie	Substância
CORREA; GOTTLIEB; MAGALHAES, 1966	<i>K. corymbosa</i> *	 <p>4-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona</p>
		 <p>3,4-dihidroxi-2-metoxixantona</p>
-GOTTLIEB et al., 1966 -GOTTLIEB et al., 1965	<i>K. petiolaris</i> *	 <p>1-hidroxi-7,8-dimetoxixantona</p>
CORTEZ; MARSTON; HOSTETTMANN, 1999	<i>K. coriacea</i> (casca do caule)	 <p>1,3,7-triidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona</p>
		 <p>1,3,7-triidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-xantona</p>

\*parte vegetal não indicada na literatura

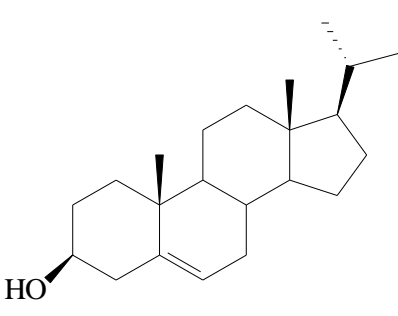
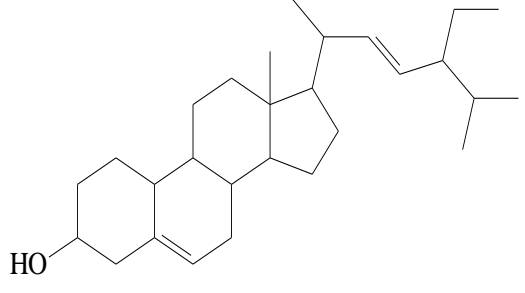
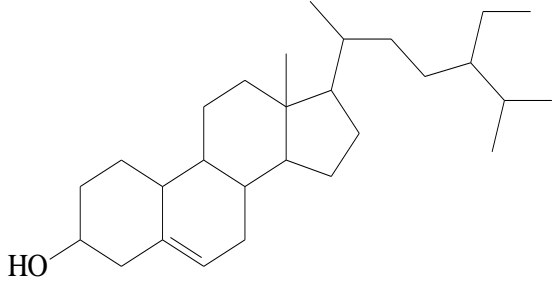
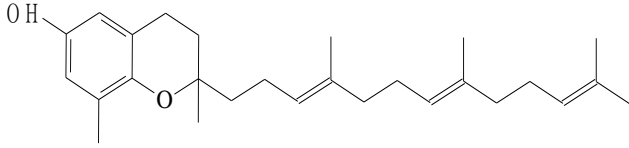
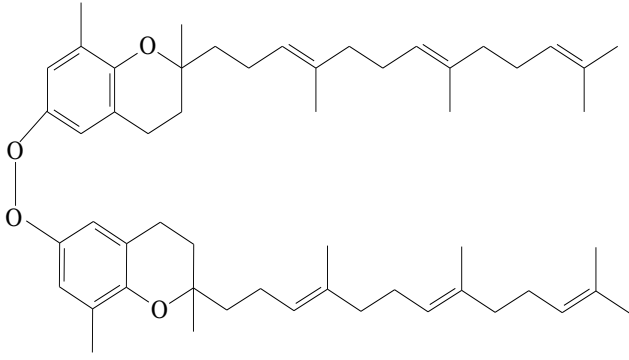
QUADRO 1.6: Xantonas isoladas e/ou identificadas do gênero *Kielmeyera* (conclusão)

Autores	Espécie/ Parte da espécie	Substância
<p>-CORTEZ; MARSTON; HOSTETTMANN, 1999 -CALEARE et al., 2013</p>	<p><i>K. coriacea</i> (casca do caule e caule)</p>	 <p>1,3,5-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona</p>
<p>SOBRAL et al., 2009</p>	<p>- <i>K. cuspidata</i> Saddi (caule)</p>	 <p>4-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona</p>
		 <p>3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona</p>

### 1.4.3 Esteroides isolados e/ou identificados do gênero *Kielmeyera*

No QUADRO 1.7 (pg. 29) são apresentados os esteroides isolados e/ou identificados do gênero *Kielmeyera* e relatados na literatura.

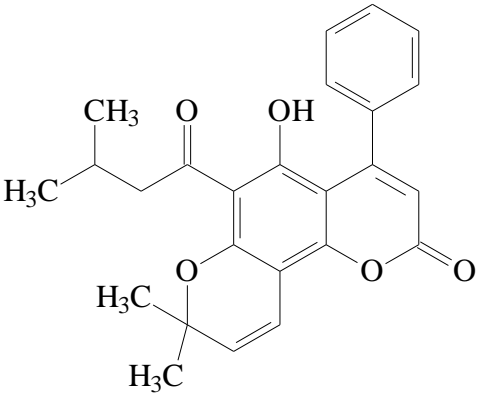
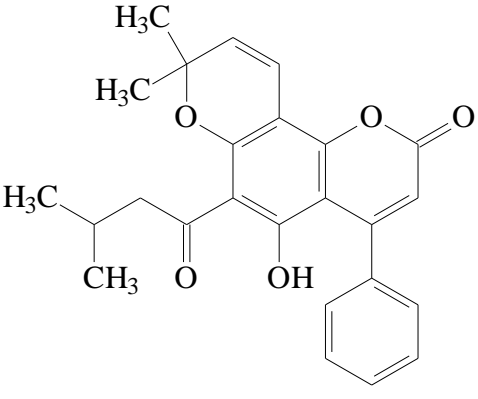
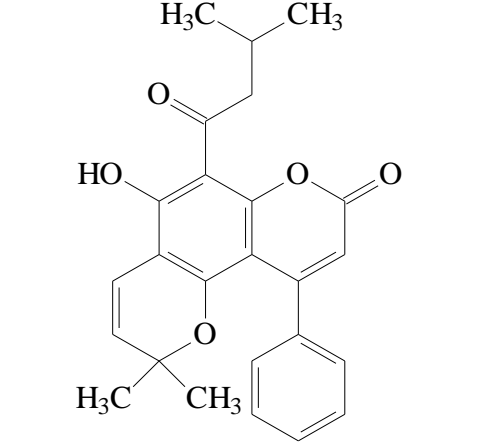
QUADRO 1.7: Esteroides isolados e/ou identificados do gênero *Kielmeyera*

Autores	Espécie/ Parte da espécie	Substância
<p>- NAGEM; SILVA, 1988 -COQUEIRO et al., 2016</p>	<p>- <i>K. pumila</i> (caule) - <i>K. variabilis</i> (caule)</p>	 <p><math>\beta</math>-sitosterol</p>
<p>COQUEIRO et al., 2016</p>	<p><i>K. variabilis</i> (caule)</p>	 <p>stigmasterol</p>
		 <p>ergost-5-en-3-ol</p>
<p>DE MESQUITA et al., 2011</p>	<p><i>K. coriacea</i> (casca da raiz)</p>	 <p><math>\delta</math>-tocotrienol</p>
		 <p><math>\delta</math>-tocotrienol peróxido dímero</p>

### 1.4.4 Cumarinas isoladas e/ou identificadas do gênero *Kielmeyera*

No QUADRO 1.8 (pg. 30) são apresentadas as cumarinas isoladas e/ou identificadas do gênero *Kielmeyera* e relatadas na literatura.

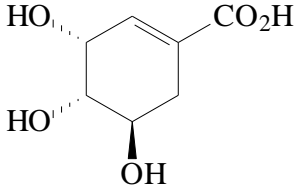
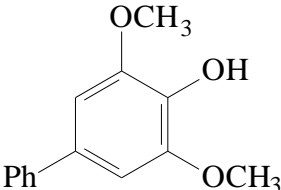
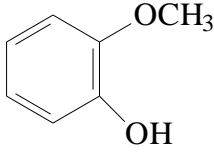
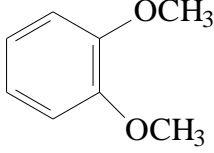
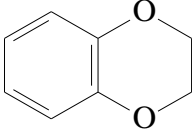
QUADRO 1.8: Cumarinas isoladas e/ou identificadas do gênero *Kielmeyera*

Autores	Espécie/ Parte da espécie	Substância
NAGEM; SILVA, 1988	<i>K. pumila</i> (caule)	 <p>1,2-diidro-5-hidroxi-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-4-(3-metilbutiril)-6-fenilfuro[2,3]benzopiran-8-ona</p>
NAGEM; SILVA, 1988	<i>K. pumila</i> (caule e fruto)	 <p>mammeigina</p>
NAGEM; SILVA, 1988	<i>K. pumila</i> (fruto)	 <p>isomammeigina</p>

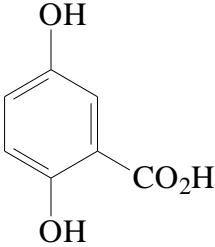
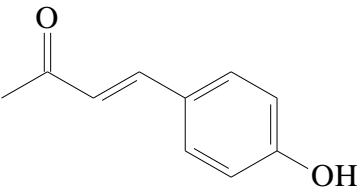
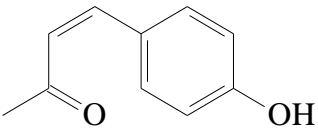
### 1.4.5 Ácidos orgânicos isolados e/ou identificados do gênero *Kielmeyera*

No QUADRO 1.9 (pg. 31) são apresentados os ácidos orgânicos isolados e/ou identificados do gênero *Kielmeyera* e relatados na literatura.

QUADRO 1.9: Ácidos orgânicos isolados e/ou identificados do gênero *Kielmeyera* (continuação)

Autores	Espécie/ Parte da espécie	Substância
SOBRAL et al., 2009	<i>K. cuspidata</i> Saddi (caule)	 <p>ácido chiquímico</p>
-PIMENTA et al., 1964 -PINTO; MESQUITA; GOTTLIEB, 1987 -LOPES et al., 1977 -CORTEZ et al., 1998	<i>K. coriacea</i> (caule, casca e madeira)	 <p>aucuparina</p>
		 <p><i>o</i>-metoxifenol</p>
		 <p><i>o</i>-metoxianisol</p>
		 <p>etileno-fenileno dióxido</p>

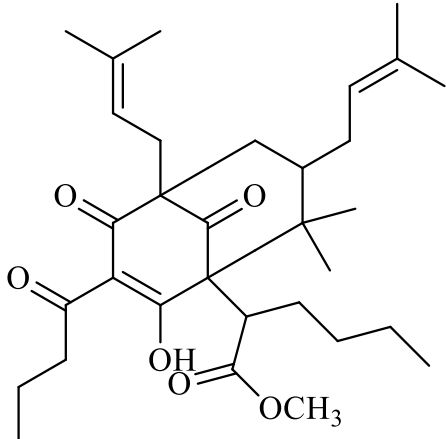
QUADRO 1.8: Ácidos orgânicos isolados e/ou identificados do gênero *Kielmeyera* (conclusão)

Autores	Espécie/ Parte da espécie	Substância
PINHEIRO et al., 2003	<i>K. variabilis</i> (caule)	 <p>2,5-dihidroxi-benzoico</p>
CORTEZ; MARSTON; HOSTETTMANN, 1999	<i>K. coriacea</i> (folha)	 <p>ácido-<i>trans-p</i>-cumárico</p>
		 <p>ácido-<i>cis-p</i>-cumárico</p>

#### 1.4.6 Derivado policíclico isolado e identificado do gênero *Kielmeyera*

No QUADRO 1.10 (pg. 33) é apresentado o derivado policíclico isolado e identificado do gênero *Kielmeyera* e relatado na literatura.

QUADRO 1.10: Derivado policíclico isolado e identificado do gênero *Kielmeyera*

Autores	Espécie/ Parte da espécie	Substância
COQUEIRO et al., 2016	<i>K. variabilis</i> (caule)	 <p>acilforoglucinol poliprenilado</p>

### 1.5 Potencial biológico de *K. coriacea*

Segundo CORTEZ; MARSTON; HOSTETTMANN (1999), oito metabólitos secundários da classe das xantonas foram isolados do extrato diclorometano da casca do caule e das folhas e avaliados quanto às suas propriedades farmacológicas, apresentando atividade antitumoral, antifúngica, antibacteriana, tuberculostática e anti-inflamatória. Sugere-se também que a classe de xantonas presentes em *K. coriacea*, possuem um potencial antidepressivo (SELA et al., 2010). Dentre os compostos isolados, quatro xantonas e uma bifênica apresentaram atividade antifúngica contra *Cladosporium cucumerinum* e duas xantonas preniladas inibiram o crescimento de *Candida albicans* (MOURA, 2012).

As propriedades biológicas de *K. coriacea* podem ser comprovadas pelo estudo do extrato aquoso do caule, a qual possui potencial contra a malária, esquistossomose, leishmaniose, fungos e bactérias (ZAGOTO et al., 2006), além de ser usado em rituais realizados pelos índios Krahô (RODRIGUES, CARLINI, 2005).

No estudo de CALEARE e colaboradores foi isolada a 1,3,7-triidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona, a partir do extrato etanólico do caule de *K. coriacea*. O extrato apresentou atividade inibitória sobre as três formas de *Trypanosoma cruzi* e não foi tóxico em células dos mamíferos. Os resultados mostraram que a xantona apresentou uma atividade em amastigota, com um IC<sub>50</sub> de 3,5 ± 1,6 µM (CALEARE et al., 2013).

Portanto, o estudo químico-biológico da raiz de *K. coriacea* se faz necessário para a investigação da atividade biológica, dados etnofarmacológicos e caracterização química, uma vez que ela tem apresentado resultados expressivos em células cancerígenas, salientando também o fato de não haver estudos de extratos com a raiz da planta, tornando assim um estudo inédito (DE MESQUITA et al., 2011). Análogo ao conhecimento científico, como já relatado, a entrecasca de *K. coriacea* é utilizada pela medicina popular no tratamento de infecções no útero, leucemia, cárie, cicatrização, infecções no geral, entre outras.

## 2. OBJETIVOS

O objetivo geral deste trabalho consistiu em realizar o estudo bibliométrico, químico e biológico das raízes de *K. coriacea*.

Como objetivos específicos, teve-se:

- Coletar o material vegetal;
- Preparar o extrato etanólico a partir do material vegetal coletado;
- Realizar o estudo bibliométrico, com o objetivo de relacionar o máximo de informações e dados.
- Realizar um levantamento bibliográfico dos metabólitos secundários já isolados pelo gênero com o auxílio da bibliometria.
- Fracionar o extrato etanólico da raiz de *K. coriacea*, por meio de técnicas cromatográficas como: Cromatografia por adsorção, Cromatografia por exclusão, Cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), entre outras.
- Empregar técnicas de Ressonância Magnética Nuclear de  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  (1D e 2D) e Espectrometria de Massas na identificação/determinação estrutural da substância isolada.
- Empregar a técnica de CLAE-EM, na finalidade de obter o perfil químico das subfrações de *K. coriacea*.
- Avaliar o potencial antioxidante, antimicrobiano e antitumoral do extrato vegetal, das frações, subfrações e substância isolada, relacionando sua estrutura-atividade.

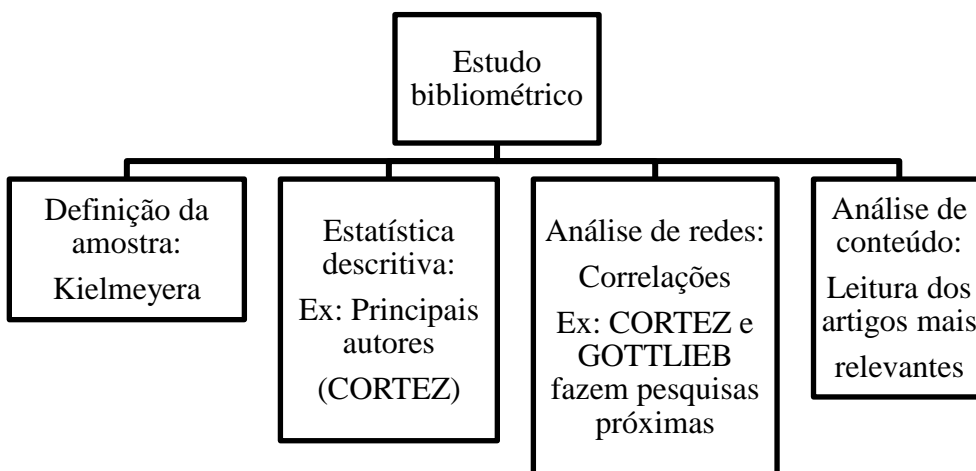
### 3. METODOLOGIA

#### 3.1 ESTUDO BIBLIOMÉTRICO

##### 3.1.1 Revisão sistemática da literatura

Um estudo sistemático foi realizado para o levantamento bibliográfico de artigos com informações da planta *K. coriacea* ou similares. As bases de dados utilizadas foram *Scopus*, *Scifinder*, *Web of Science* e *Science Direct*. Foram selecionados artigos com relatos de fitoquímica de plantas do gênero *Kielmeyera*, bem como de atividades antioxidante, antimicrobiana e antitumoral. As palavras-chave utilizadas foram *Kielmeyera coriacea* e *Kielmeyera*, com a finalidade de buscar informações não só da espécie, mas do gênero; e xantona, que é a classe quimiotaxonômica do gênero. A partir dessa busca, foram realizadas a estatística descritiva, a análise de dados e assim a análise de conteúdo (FLUXOGRAMA 3.1, pg.35).

FLUXOGRAMA 3.1: Exemplificação do estudo bibliométrico



##### 3.1.2 Estatística descritiva da amostra

Na análise descritiva, primeiramente foi feita uma relação do percentual de artigos publicados com o tema *Kielmeyera coriacea* por ano (1995-2016), demonstrando a evolução do estudo com o passar do tempo. Com isso, foi realizado um gráfico de linhas no Excel para expressar esses dados.

### 3.1.3 Análise de redes de relacionamento

Para as redes de relacionamento foi utilizada a base de dados *Scopus*, passando a amostra por cada etapa da análise descritiva. Foi utilizado o *software* VOSview para criar redes de correlação para determinados temas que possuem o foco principal, plantas do gênero *Kielmeyera*. Sendo assim, foi construído redes de relacionamento de citação, correlação de periódicos, correlação de palavras-chave e correlação de universidades que realizam estudos com base no tema pesquisado.

## 3.2 ESTUDO QUÍMICO

### 3.2.1 Equipamentos

#### 3.2.1.1 Evaporador rotativo

- IKA, modelo RV 05 Basic, com banho de aquecimento IKA HB 05.06 CN e bomba de hidrovácuo da marca Quimis.

#### 3.2.1.2 Espectrômetro de RMN

- Bruker (500 MHz para  $^1\text{H}$ ) modelo DRX 500 (11,7 Tesla), instalado no Instituto de Química da Universidade Federal de Goiás, sob supervisão do prof. Dr. Luciano Morais Lião.

### 3.2.2 Materiais

#### 3.2.2.1 Cromatografia

- Cromatografia de adsorção em coluna aberta (CC). Fases estacionárias: sílica gel 60 70-230 *mesh* e 230-400 *mesh*.
- Cromatografia de exclusão em coluna aberta (CE). Fase estacionária: *Sephadex* LH-20, Amershan Pharmacia Biotech®.
- Cromatografia em camada delgada (CCD). Fase estacionária: sílica gel 60 com F<sub>254</sub> ( $\varphi = 0,2$  mm), em folhas de alumínio (FLUKA).

- Cromatografia Líquida de Alta Eficiência:
  - Analítico: Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipado com duas bombas LC-6AD, um auto-injetor SIL-10AF, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-20A e um módulo de comunicação CBM-20A.
- Espectrômetro de massas:
  - Espectrômetro de massas (EM) AmaZon *Íon Trap* (IT) (BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha), equipado com uma interface de Ionização por *Electrospray* (ESI).

### 3.2.2.2 Solventes

- Destilados da MERCK, SINTH, VETEC e LABSYNTH para separações cromatográficas.
- Deuterados da MERCK e ALDRICH para obtenção de espectros de RMN.
- Solventes grau HPLC: metanol e acetonitrila, das marcas PANREAC e J. T. BAKER.

### 3.2.2.3 Reveladores

- Vanilina em ácido sulfúrico, anisaldeído e solução de Dragendorff.

### 3.2.3 Coleta e identificação do material vegetal

A raiz de *K. coriacea*, subespécie *coriacea*, foi coletada na região do Distrito Federal (DF 480, lote 01, SMA - Gama/DF, latitude 15°59'34.79"S; longitude 48° 3'12.21"O), em 01 de outubro de 2013, sob licença de acesso e remessa de amostra de componente do patrimônio genético, número 010698/2013-2. A planta foi identificada pelo Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro da Unidade Acadêmica Especial de Biotecnologia da Universidade Federal de Goiás-Regional Catalão. Os espécimes testemunhos foram depositados no Herbário da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (CEN), sob o número BW 6046.

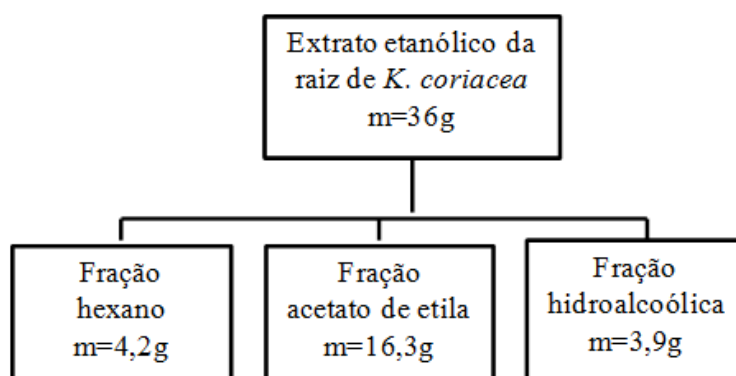
### 3.2.4 Obtenção do extrato vegetal

A raiz (645 g) foi seca em estufa a 45 °C, moída e submetida à extração com etanol, em repouso e à temperatura ambiente, para extração dos metabólitos secundários. O período de extração foi de nove dias, realizando-se a troca do solvente a cada três dias. Após a filtração, foi realizada a evaporação do solvente em evaporador rotativo, obtendo-se assim o extrato etanólico da raiz (EER), o qual foi armazenado refrigerado até o estudo do mesmo.

### 3.2.5 Extração líquido-líquido do EER

Uma alíquota de 1,0 g do EER foi dissolvida em 100 mL de uma mistura MeOH/H<sub>2</sub>O (3:7, v/v) e em seguida, foram realizadas três extrações com 30 mL de cada solvente (hexano e acetato de etila). Essa extração foi realizada várias vezes, utilizando uma massa total de 36 g do extrato bruto e o restante (44 g) foi armazenado. Esse processo resultou na obtenção das frações hexano (FH), acetato de etila (FAE) e hidroalcoólica (FHA). O excesso da água da fração FHA foi removido com o auxílio do liofilizador (FLUXOGRAMA 3.2, pg. 38).

FLUXOGRAMA 3.2: Extração líquido-líquido do EER



### 3.2.6 Análise das frações FH, FAE e FHA

A partir da extração líquido-líquido, as frações FAE e FHA foram submetidas às análises de RMN de <sup>1</sup>H (ANEXO 1), sendo observados sinais característicos de compostos fenólicos, e por cromatografia líquida de alta eficiência com detector por arranjo de diodo (CLAE-DAD) (ANEXO 2) nos comprimentos de onda de 217, 220,

254 e 365 nm. A fração FAE apresentou maior quantidade de picos em seu cromatograma, despertando interesse para o início do estudo fitoquímico com a mesma. Não menos importantes, as frações FH e FHA foram fracionadas posteriormente.

### **3.2.7 Fracionamento da fração FAE**

Uma alíquota de 2,0 g da FAE foi submetida à Cromatografia por Adsorção (CA). Utilizou-se o sistema de eluição em ordem crescente de polaridade, com os sistemas: hexano/acetato de etila/metanol, visando à separação dos componentes em grupos de acordo com suas similaridades. Foram utilizadas as seguintes proporções: hexano/acetato de etila (8:2 v/v); hexano/acetato de etila (1:1 v/v); 100% acetato de etila; acetato de etila/metanol (8:2 v/v); acetato de etila/metanol (1:1 v/v) e 100% metanol.

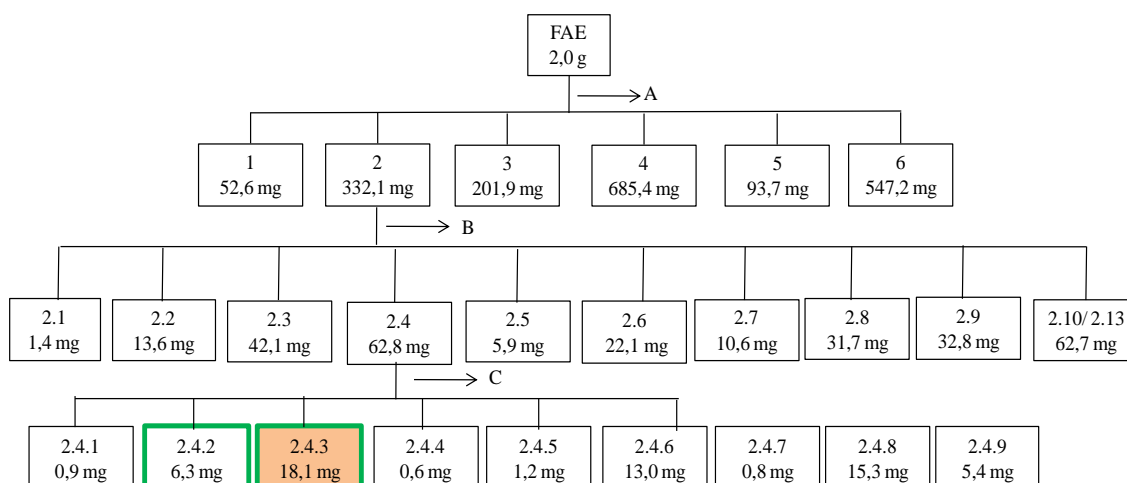
Dezoito subfrações foram coletadas, as quais foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), e considerando-se a similaridade química, as mesmas foram agrupadas em seis (FLUXOGRAMA 3.4, pg. 42). Com base nas manchas analisadas via CCD, as subfrações 2 e 4 foram selecionadas para o refractionamento.

#### **3.2.7.1 Refractionamento da subfração 2**

A subfração 2 foi submetida ao fracionamento por CA, com eluição gradiente (hexano/acetato de etila/metanol), nas mesmas proporções apresentadas anteriormente. Deste fracionamento, trinta e duas subfrações foram obtidas, as quais foram agrupadas devido similaridades por CCD em treze junções (FLUXOGRAMA 3.3, pg. 40).

A subfração 2.4 foi selecionada para fracionamento por cromatografia por exclusão (CE), com eluição isocrática com os solventes CH<sub>2</sub>Cl<sub>2</sub>/MeOH (3:7 v/v). Esse refractionamento gerou nove subfrações, sendo a 2.4.2 e 2.4.3 as mais promissoras, com base na análise das manchas cromatográficas em CCD e pela análise de RMN de <sup>1</sup>H (ANEXO 4). A subfração 2.4.3 foi submetida à análise de CLAE-EM e as demais subfrações foram reservadas.

### FLUXOGRAMA 3.3: Refracionamento da subfração 2



Legenda:

A = Cromatografia por adsorção; Sílica comum (70-230)  $\phi=6$  cm,  $h=24$  cm; Hex/AcOEt/MeOH

B = Cromatografia por adsorção; Sílica flash (230-400)  $\phi=2,4$  cm,  $h=20$  cm; Hex/AcOEt/MeOH

C = Cromatografia por exclusão; Sephadex (LH-20)  $\phi=2,6$  cm,  $h=35$  cm;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$

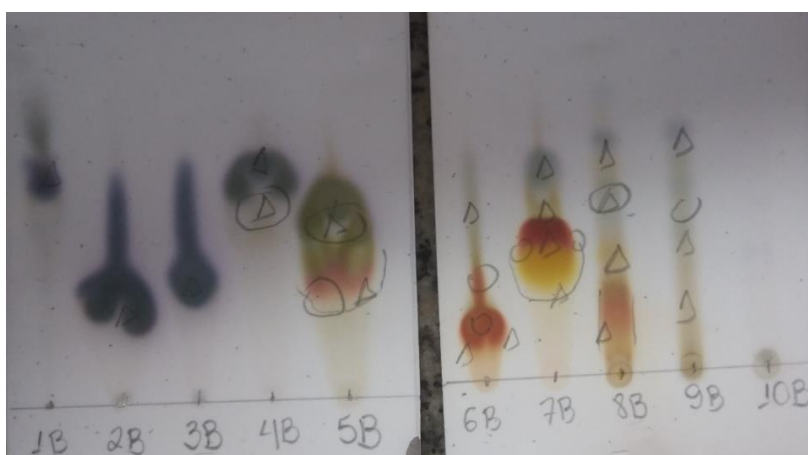
Alaranjado = Subfrações analisadas por CLAE-EM

Contorno verde = Subfrações submetidas aos ensaios biológicos

#### 3.2.7.2 Refracionamento da subfração 4

A subfração 4 (685,4 mg) foi submetida ao fracionamento por CA, com eluição gradiente (hexano/acetato de etila/metanol), nas mesmas proporções apresentadas anteriormente. O fracionamento rendeu vinte e nove subfrações, as quais foram agrupadas em dez junções, de acordo com suas similaridades químicas constatadas por CCD (FLUXOGRAMA 3.4, pg. 42). Com base nas diversas manchas cromatográficas que seus componentes apresentaram quando analisados via CCD, as subfrações 4.5 (5B na CCD); subfração 4.7 (7B na CCD) e subfração 4.8 (8B na CCD) foram selecionadas para refração. A subfração 4.4 foi analisada por CLAE-EM e RMN de  $^1\text{H}$  (ANEXO 5). As demais subfrações foram reservadas.

FIGURA 3.1: CCD das subfrações provenientes do refração da subfração 4



Sistema de eluição:  
Hex/AcOEt  
(1:1 em 5mL, v/v) + 1mL de MeOH  
Revelador: Vanilina  
Δ - Absorção em 254 nm  
○ - Absorção em 365 nm

### 3.2.7.3 Refracionamento da subfração 4.5

A subfração 4.5 (53,8 mg) foi submetida ao fracionamento por CE, empregando Sephadex LH-20, no modo de eluição isocrática ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  3:7 v/v) como fase móvel, utilizando um volume total de 275 mL. O fracionamento rendeu oito frações, as quais foram agrupadas em quatro junções (FLUXOGRAMA 3.4, pg. 42). Analisando a CCD e a análise de RMN de  $^1\text{H}$  (ANEXO 6), a subfração 4.5.4 foi a mais promissora por apresentar sinais na região de aromáticos em aproximadamente 7 ppm, sendo ela analisada por CLAE-EM.

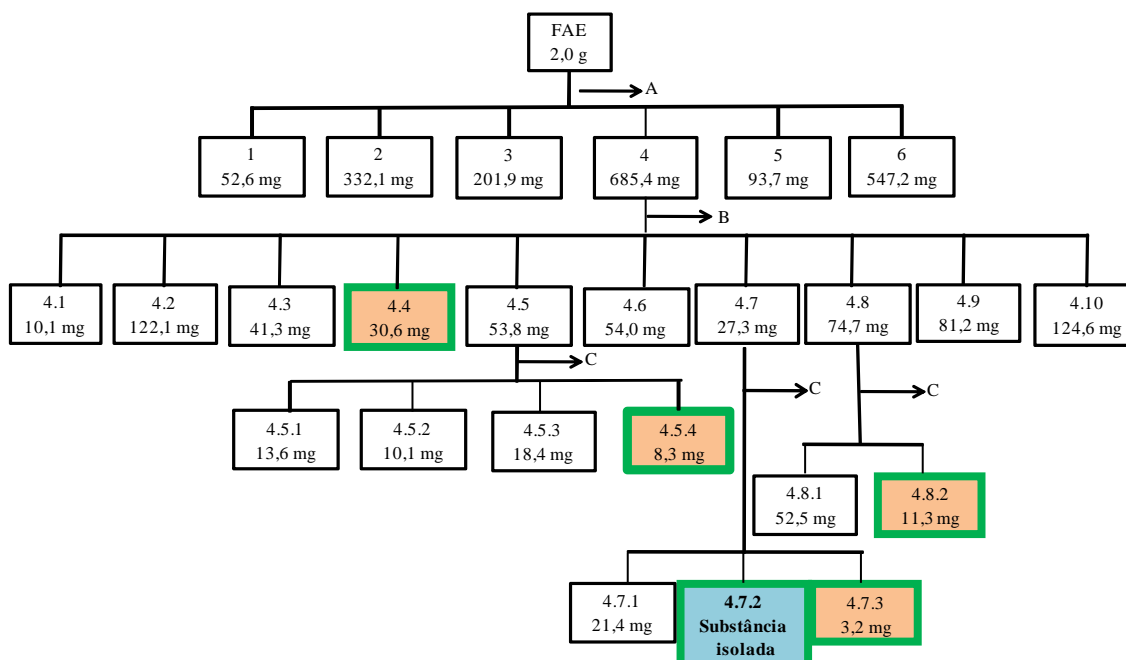
### 3.2.7.4 Refracionamento da subfração 4.7

A subfração 4.7 (27,3 mg) foi submetida ao fracionamento via CE, com eluição isocrática ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  3:7 v/v), para fase móvel. O fracionamento rendeu oito subfrações, as quais foram agrupadas em três junções de acordo com suas similaridades químicas constatadas por CCD. As subfrações 4.7.2 e 4.7.3 foram submetidas à análise de RMN de  $^1\text{H}$ , e se mostraram interessantes, pois apresentaram sinais na região de 6,0-8,0 ppm, que são característicos de hidrogênios de aromáticos. De acordo com essas análises e comparações com dados da literatura, identificou-se na subfração 4.7.2, a estrutura de uma xantona, a qual a mesma foi submetida a análise de RMN de  $^{13}\text{C}$ , bidimensionais e espectrometria de massas (EM), para elucidação estrutural. Já a subfração 4.7.3, foi analisada por CLAE-EM e RMN de  $^1\text{H}$  (ANEXO 7).

### 3.2.7.5 Refracionamento da subfração 4.8

A subfração 4.8 (74,7 mg) foi submetida ao fracionamento via CE com eluição isocrática ( $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$  3:7 v/v), como fase móvel. O fracionamento rendeu treze frações, as quais foram agrupadas em duas frações de acordo com suas similaridades químicas constatadas por CCD (FLUXOGRAMA 3.4, pg. 45). A subfração 4.8.2 apresentou manchas interessantes via CCD, por se de coloração e absorver no UV. Sendo assim, ela foi submetida à análise de RMN de  $^1\text{H}$  (ANEXO 8), e também de CLAE-EM.

FLUXOGRAMA 3.4: Fracionamento da fração FAE



Legenda:

A = Cromatografia por adsorção; Sílica comum (70-230)  $\phi=6$  cm,  $h=24$  cm; Hex/AcOEt/MeOH

B = Cromatografia por adsorção; Sílica flash (230- 400)  $\phi=2,6$  cm,  $h=17$  cm; Hex/AcOEt/MeOH

C = Cromatografia por exclusão; Sephadex (LH-20)  $\phi=3,0$  cm,  $h=39$  cm;  $\text{CH}_2\text{Cl}_2/\text{MeOH}$

Alaranjado = Subfrações analisadas por CLAE-EM

Azul = Substância isolada

Contorno verde = Subfrações submetidas aos ensaios biológicos

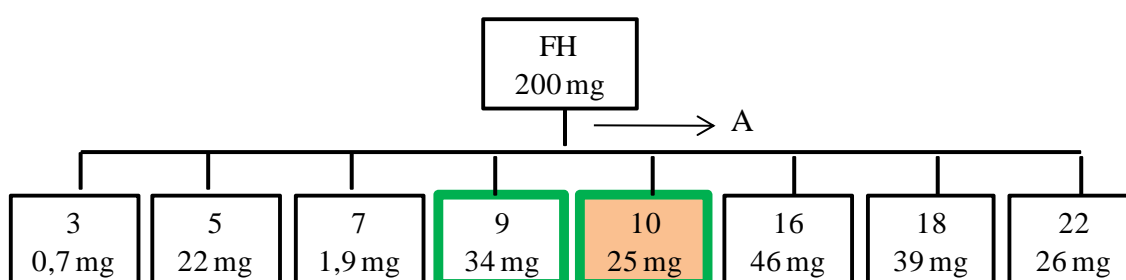
### 3.2.8 Fracionamento da fração FH

Uma alíquota de 2,0 g da FH foi submetida à Cromatografia por Adsorção (CA). Utilizou-se o sistema de eluição em ordem crescente de polaridade, com os seguintes

sistemas: hexano/clorofórmio, visando à separação dos componentes em grupos de acordo com suas similaridades. Foram utilizadas as seguintes proporções: hexano/clorofórmio (8:2 v/v); hexano/ clorofórmio (1:1 v/v); 100% clorofórmio.

Vinte e duas subfrações foram coletadas, as quais foram analisadas por CCD, considerando as suas similaridades químicas, e agrupadas em oito subfrações (FLUXOGRAMA 3.5). Com base na análise de RMN de  $^1\text{H}$  (ANEXO 9), a subfração 10 (FH-10), foi selecionada para análise de CLAE-EM.

FLUXOGRAMA 3.5: Fracionamento da fração FH



Legenda:

A = Cromatografia por exclusão; Sephadex (LH-20)  $\phi= 3,4$  cm,  $h= 23$  cm; Hex/ $\text{CHCl}_3$

Alaranjado = Subfração analisada por CLAE-EM

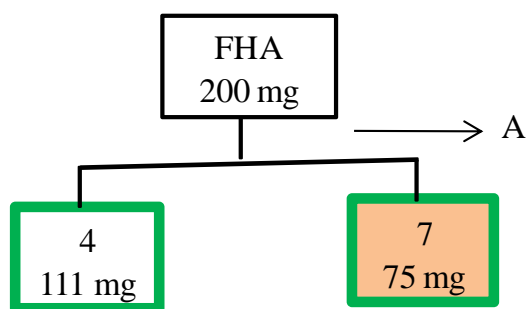
Contorno verde = Subfrações submetidas aos ensaios biológicos

### 3.2.9 Fracionamento da fração FHA

Uma alíquota de 200 mg da FHA foi submetida à CE. Utilizou-se o sistema de eluição em modo isocrático, com 100% de MeOH.

Dezenove subfrações foram coletadas, as quais foram analisadas por CCD, considerando-se as suas similaridades químicas, e agrupadas em duas subfrações (FLUXOGRAMA 3.6, pg. 44). Com base na análise de RMN de  $^1\text{H}$  (ANEXO 10), a subfração 7 (FHA-7), foi selecionada para análise de CLAE-EM.

FLUXOGRAMA 3.6: Fracionamento da fração FHA



Legenda:

A = Cromatografia por exclusão; Sephadex (LH-20)  $\phi= 3,4$  cm,  $h=23$  cm; 100% MeOH

Alaranjado = Subfração analisada por CLAE-EM

Contorno verde = Subfrações submetidas aos ensaios biológicos

### 3.2.10 Perfil químico de subfrações das frações FH, FAE e FHA

As análises de CLAE-EM foram realizadas pelo Me. Afif Felix Monteiro, no Instituto de Química da Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, em Araraquara-SP.

Por meio da análise de RMN de  $^1\text{H}$ , cinco subfrações da FAE (2.4.3; 4.4; 4.5.4; 4.7.3 e 4.8.2) uma subfração da FH (10) e uma subfração da FHA (7) foram selecionadas para análise por CLAE-EM.

#### 3.2.10.1 Condições cromatográficas

As análises cromatográficas foram realizadas empregando-se uma coluna analítica Phenomenex Kinetex<sup>®</sup>, 5  $\mu\text{m}$ , C18, 100 Å, (150 x 4,6 mm), e modo de eluição gradiente, sendo a fase móvel composta por  $\text{H}_2\text{O}$  (0,1% ác. fórmico)-acetonitrila (0,1% ác. fórmico) 95:5 (v/v) até 0:100 (v/v), numa vazão constante de 1,0 mL/min, em 42 min (programação do gradiente - TABELA 3.1, pg. 45). O volume de injeção das amostras (subfrações) foi de 1,0  $\mu\text{L}$  de uma solução de concentração de 1,0  $\text{mg mL}^{-1}$  e o comprimento de onda de referência monitorado foi de 254 nm.

TABELA 3.1. Programação das condições do gradiente do sistema eluente

Método analítico			
Tempo (min)	A%	B %	Vazão (mL min <sup>-1</sup> )
0.01	95	5	
30.00	0	100	
35.00	0	100	1.0
38.00	95	5	
42.00	95	5	
42.01	-	-	

Legenda: A - água (0,1% ác. fórmico)

B - acetonitrila (0,1% ác. fórmico)

### 3.2.10.2 Condições espectrométricas

As análises de CLAE-EM e CLAE-EM/EM foram adquiridas em um sistema de CLAE-IT-EM/EM. O cromatógrafo líquido utilizado foi um instrumento Prominence (Shimadzu, Kyoto, Japan), equipado com duas bombas LC-6AD, um auto-injetor SIL-10AF, detector de arranjo de diodos (DAD) SPD-20A e um módulo de comunicação CBM-20A. O sistema de CL foi acoplado à um Espectrômetro de massas (EM) *AmaZon Ion Trap* (IT) (BrukerDaltonics, Bremen, Alemanha), equipado com uma interface de Ionização por *Electrospray* (ESI). Nitrogênio e hélio foram usados como gases de arraste e colisão, respectivamente. Os parâmetros de ionização por ESI foram os seguintes: *capillary voltage* = 4.500 V, e *plate voltage* = 550 V, *drying gas flow* = 5.5 L min<sup>-1</sup>, *drying temperature* = 250 °C, e *nebulizer pressure* = 17 psi. As análises foram realizadas em 25 °C. Os parâmetros do analisador IT foram: a largura de isolamento foi definida em *m/z* 1.0 e a amplitude de fragmentação foi definida como 120%. As análises foram executadas no modo de ionização positivo (scan 100-1000 *m/z*). Os dados foram coletados e processados com o software Data Analysis (versão 4.2).

## 3.3 ESTUDO BIOLÓGICO

### 3.3.1 Avaliação da atividade antioxidante

O ensaio antioxidante do EER e das frações FH, FAE e FHA foi realizado na UFG-Regional Catalão, pela aluna de iniciação científica Tainara da Fonseca Rosa, sob

supervisão da Dra. Ana Paula Terezan. Já o ensaio com as subfrações foi realizado pela aluna Izabella Zuffo, no Instituto de Química da UFG-Goiânia.

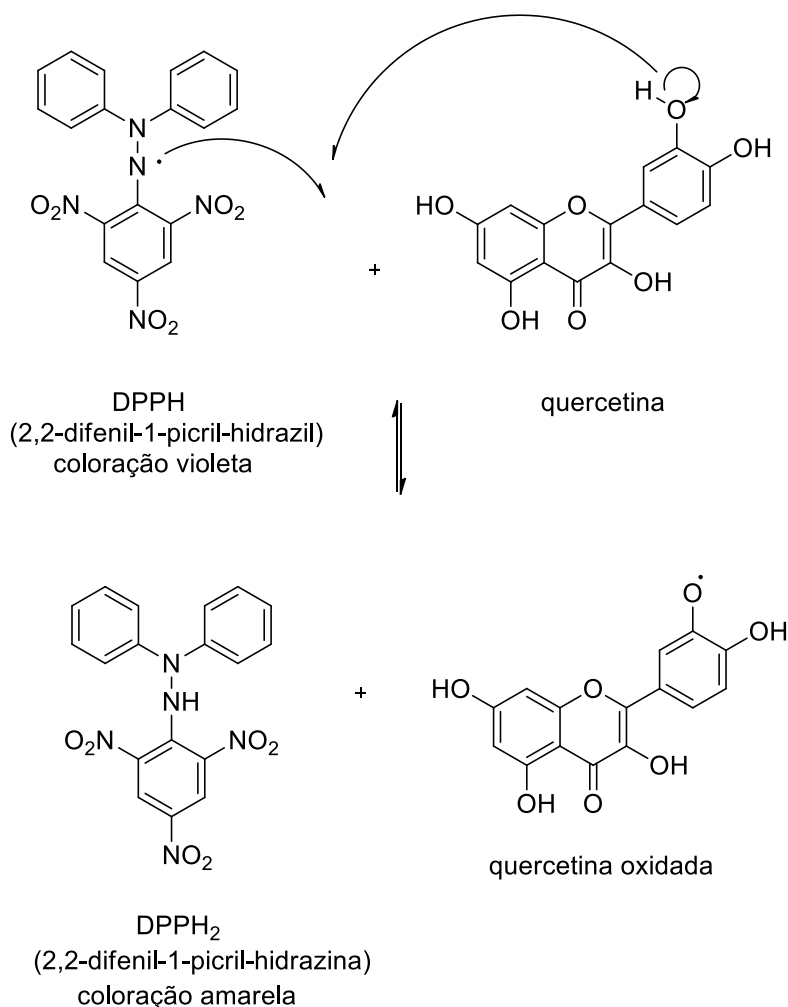
A avaliação da atividade antioxidante foi realizada pelo método de DPPH. O DPPH age como um capturador de outros radicais livres ou de substâncias neutras capazes de estabilizá-lo. As substâncias com propriedades antioxidantes possuem essa capacidade. A atividade sequestrante do radical DPPH foi determinada por meio da solubilização do EER e de FH, FAE e FHA em metanol (grau HPLC/Panreac) na concentração de 1 mg mL<sup>-1</sup> e a partir dessa solução foram realizadas diluições seriadas nas seguintes concentrações: 500, 250, 125, 62,5, 31,25, 15,63 e 7,81 µg mL<sup>-1</sup>. O ensaio foi realizado em tubos de ensaios em triplicata. Adicionou-se 150 µL da solução da amostra de cada uma das concentrações e 2850 µL da solução metanólica de DPPH. Após a adição da solução de DPPH, as amostras foram agitadas e incubadas no escuro em temperatura ambiente por trinta minutos. Após este tempo, foram realizadas leituras em espectrofotômetro de UV-Vís (marca Varian, modelo Cary 50 CONC) e a absorvância foi determinada a 517 nm. A porcentagem de inibição do DPPH foi expressa de acordo com a equação:

$$\% \text{ Inibição do DPPH}^{\bullet} = [(Abs_{amostra} - Abs_{branco}) / Abs_{DPPH}] \times 100$$

A atividade sequestrante do radical DPPH<sup>•</sup> foi expressa em termos de EC<sub>50</sub> (concentração mínima necessária para o antioxidante testado reduzir em 50% a atividade inicial do DPPH), sendo esta determinada por meio do cálculo a partir das curvas de calibração. As amostras foram comparadas ao padrão ácido gálico, submetido ao mesmo tratamento. E por meio das curvas de calibração do padrão ácido gálico, esses valores foram comparados (RUFINO et al., 2007).

No teste de captura com DPPH ocorre uma reação de oxi-redução, em que o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil), de coloração violeta, é reduzido, ou seja, o elétron desemparelhado do nitrogênio se emparelha com o elétron cedido por um radical hidrogênio de um antioxidante, como por exemplo, a quercetina, tornando a solução amarela e ocorrendo a formação do DPPH-H (2,2-difenil-1-picril-hidrazina), reduzido e mais estável. É essa característica de mudança de coloração que permite o acompanhamento visual da reação (FIGURA 3.2, pg. 47) (TEIXEIRA et al., 2010).

FIGURA 3.2: Redução do radical livre DPPH pelo antioxidante quercetina



Fonte: RUFINO et al., 2007

### 3.3.2 Avaliação da atividade antimicrobiana

As análises foram realizadas em colaboração com o grupo de pesquisa do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada – LaPeMA, da Universidade de Franca (UNIFRAN), Franca/SP, pelas alunas Maria Anita Lemos Vasconcelos Ambrosio e Tuany Rodarte P. de Oliveira.

A técnica empregada foi a de microdiluição em caldo. A Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi definida como a menor concentração de amostra, em que o microrganismo não demonstrou crescimento visível. E assim, foi avaliado o potencial antimicrobiano do EER e das frações FH, FAE e FHA.

De acordo com o estudo etnobotânico, as folhas e a entrecasca de *K. coriacea* são indicadas pela Comunidade Coqueiros para diversas infecções, cicatrização, reumatismo e infecções bucais. Dessa forma, os microrganismos foram selecionados de acordo com essas indicações populares para determinada patologia. No total foram treze linhagens bacterianas patogênicas humanas, sendo:

- *Escherichia coli* (ATCC 14948), *Salmonella choleraesui* (ATCC 10708), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 9610): patógenos relacionados com à diarreia humana.
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *S. pneumoniae* (ATCC IAL 1741), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. aureus* (ATCC 29213): patógenos relacionados à infecções humanas.
- *Burkholderia cepacia* (ATCC 17759), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 12345), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14502): patógenos relacionados ao reumatismo.
- *S. mutans* (ATCC 25175), *Lactobacillus casei* (ATCC 11578), *S. sobrinus* (ATCC 33478): patógenos relacionados à cárie dentária humana.

Também foram avaliadas três linhagens fúngicas patogênicas, relacionadas à candidíase:

- *Candida albicans*;
- *C. tropicalis*;
- *C. glabrata*.

Como controles positivos (teste de viabilidade celular e confiabilidade da técnica) foram empregados os antibióticos comerciais clorexidina, penicilina e estreptomicina, todos da marca SIGMA.

### **3.3.2.1 Preparo das amostras**

Uma solução estoque de cada amostra foi preparada, solubilizando-se 1,0 mg da mesma em 125 µL de DMSO. Posteriormente, cada solução foi diluída em 1875 µL de meio líquido (caldo BHI), originando a solução padrão, da qual foram obtidas as

concentrações nas microplacas no intervalo de 0,195 a 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , empregando, portanto, a técnica de microdiluição em caldo. O intervalo de concentração dos controles positivos foi de 0,115 a 59,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Na metodologia do ensaio biológico, o intervalo de concentração das amostras e do controle positivo seguiram o protocolo do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI), aplicado pelo LaPeMA (UNIFRAN).

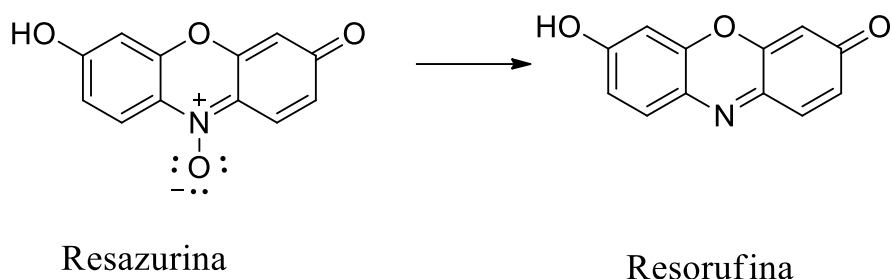
A escolha do solvente DMSO para os ensaios biológicos se deu pela sua baixa volatilidade, adequação à solubilização e por não interferir no crescimento bacteriano. O volume de solvente empregado na solubilização das amostras foi igualmente adicionado isoladamente em um orifício de cada microplaca como controle negativo, para confirmar se o mesmo não estava inibindo o crescimento do microrganismo (ARANTES, 2005).

Para verificar a viabilidade de cada microrganismo e do meio de cultura em cada experimento, em orifícios de cada microplaca foram adicionados os seguintes componentes: 1) culturas de cada microrganismo e 2) meio de cultura líquido. As microplacas foram incubadas a 37 °C por 24 horas.

Após o período de incubação, as placas foram reveladas com 30  $\mu\text{L}$  de resazurina (Sigma®) 0,02% em solução aquosa esterilizada (SARKER, NAHAR e KUMARASAMY, 2007) e após alguns minutos a leitura foi realizada. A resazurina (7-hidroxi-3H-fenoxazina-3-ona-10-óxido) com uma pequena fluorescência de cor azul facilita a verificação da presença ou ausência de crescimento microbiano devido à coloração obtida nas microplacas, pois a coloração azul indica ausência de crescimento microbiano, enquanto a coloração rosa indica a presença de células viáveis em crescimento. Desta forma, foi possível determinar a CIM das amostras avaliadas.

A resazurina pode ser reduzida na presença de células viáveis e convertida à resorufina (7-hidróxi-3H-fenoxazina-3-ona) (FIGURA 3.3, pg. 50), situação que verifica a coloração rosa. Esse método consegue facilitar a verificação do crescimento microbiano, pois nele é utilizado o poder redutor das células vivas, onde essa redução ocorre de forma constante e proporcional ao número de células, com a forma reduzida excretada para fora da célula.

FIGURA 3.3: Mecanismo de reação da resazurina



### 3.3.2.2 Preparo do inóculo/fungos

Os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud por 24 horas a 37 °C. Com o auxílio de alça de platina esterilizada, transferiu-se algumas colônias das leveduras para tubos contendo 2 mL de solução salina 0,85%, os quais foram comparados à escala de Mc Farland 0,5 para se obter o valor de  $6 \times 10^6$  UFC mL<sup>-1</sup>. Em seguida, foram realizadas as diluições recomendadas pela NCCLS M27-A em caldo RPMI-1640 (meio de cultura com glutamina e vermelho fenol, sem bicarbonato), até que o inóculo atingisse  $1,2 \times 10^3$  UFC mL<sup>-1</sup> (Unidade formadora de colônia por mL).

### 3.3.2.3 Determinação da Concentração Inibitória Mínima

A técnica para determinação da CIM foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços, em que foram feitas diluições seriadas em concentrações de 1,46 a 2000 µg mL<sup>-1</sup>. O meio de cultura utilizado foi o caldo RPMI-1640, tamponado com ácido morfolino polissulfônico (MOPS) e pH final de 7,2. Nas linhas, em todos os poços, foram adicionados 100 µL do caldo; posteriormente no primeiro poço foram adicionados mais 100 µL da solução de trabalho e realizada a homogeneização. Em seguida, foram retirados 100 µL do primeiro poço e adicionado ao segundo poço, e homogeneizado, e assim sucessivamente até o décimo segundo poço, realizando-se assim a diluição seriada.

Para o controle positivo, realizou-se o mesmo processo, no entanto, como já citado no trabalho, a concentração atingida foi de 0,031 a 8 µg mL<sup>-1</sup>; para controle negativo o volume utilizado foi de 1%. Após esse procedimento, foi adicionado 100 µL do inóculo, previamente preparado, em todos os poços. Após a montagem das

microplacas, estas foram incubadas por 48 horas a 37 °C. Decorrido este período, foi determinada a CIM por meio do uso do revelador resazurina (FIGURA 3.3, pg.50).

#### **3.3.2.4 Bactérias**

Para o controle positivo utilizou-se anfotericina B (SIGMA), sendo a mesma diluída para obter a concentração de 0,031 a 16,0 µg mL<sup>-1</sup>, na microplaca de 96 poços. Para a validação dos ensaios, quanto ao controle positivo, foram utilizadas cepas de referência, para se obter uma faixa de CIM de 0,25 a 2,0 µg mL<sup>-1</sup>. Também foram realizados outros controles como: de esterilidade do meio de cultura (caldo RPMI-1640), do inóculo (que deve apresentar crescimento devido à ausência de agentes antimicrobianos), de esterilidades dos antifúngicos, dos extratos e do solvente DMSO (controle negativo).

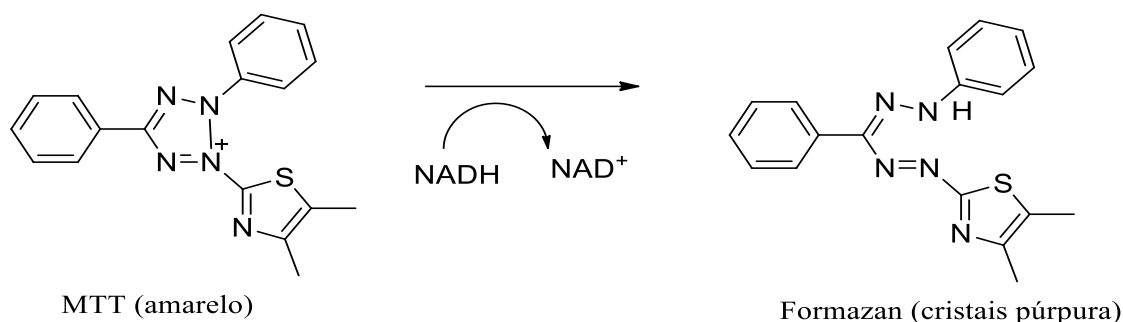
#### **3.3.3 Avaliação da atividade antitumoral**

Este ensaio foi realizado em colaboração com o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Rosy Iara Maciel de Azambuja Ribeiro, da Universidade Federal de São João del-Rei, em Divinópolis-MG, pela aluna Kamilla Monteiro dos Santos.

De acordo com o estudo etnobotânico, a entrecasca e as folhas de *K. coriacea* são utilizadas para infecções do útero. Essa informação foi determinante para a realização dos ensaios com amostras de EER e de frações de *K. coriacea* frente às células HeLa, no intuito de verificar se as mesmas possuem atividade antitumoral frente ao câncer do cólon de útero.

Um dos ensaios colorimétricos para a avaliação de proliferação celular ou citotoxicidade (IC<sub>50</sub>) mais comumente utilizado é o ensaio de MTT [(brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazolium ou *thiazolyl blue*)]. O princípio do método é a redução de um substrato amarelo, o sal de tetrazolium MTT, por enzimas mitocondriais resultando em um produto azul/roxo. A reação ocorre somente em células vivas e que esteja com suas mitocôndrias ativas, o que configura um ensaio versátil e quantitativo (MOSMANN, 1983) (FIGURA 3.4, pg.52).

FIGURA 3.4: Redução do MTT por enzimas mitocondriais



Fonte: GOMES, 2008.

As células HeLa foram cultivadas em microplacas em uma concentração de  $2 \times 10^4$  células por poço, sendo incubadas por 24 horas de tratamento. Após esse período essa solução foi adicionada em cada poço, com 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura RPMI com 10% de soro fetal bovino (SFB). Após 24 horas o sobrenadante foi retirado e adicionado 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura com os tratamentos, sem SFB. Após 24 horas em contato com as amostras, o meio de cultura foi retirado, e os poços foram lavados com tampão fosfato-salino (PBS) e em seguida adicionados 100  $\mu\text{L}$  de MTT ( $2,5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ ). O meio reagiu com o MTT por 3 horas.

Em seguida, o MTT foi retirado e foram adicionados, em cada poço, 100  $\mu\text{L}$  de DMSO, para realizar a lise das células. Foi realizada leitura em 570 nm em espectrofotômetro de UV-Vís. Para a análise dos resultados foi realizado o cálculo de porcentagem de viabilidade, considerando as células não tratadas como 100% viáveis. Assim, a viabilidade das demais células, tratadas com as amostras de *K. coriacea* foram comparadas a partir do controle.

Os valores de  $\text{IC}_{50}$  foram calculados em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e  $\text{mg mL}^{-1}$ , verificando a concentração do extrato/fração que inibiu 50% da viabilidade celular de células cancerígenas.

Foram usadas as seguintes concentrações do EER e das frações FH, FAE e FHA das raízes de *K. coriacea*:  $5 \times 10^{-3}$ ;  $1,0 \times 10^{-2}$ ;  $2,5 \times 10^{-2}$ ;  $5,0 \times 10^{-2}$ ;  $7,5 \times 10^{-2}$  e  $1,0 \times 10^{-1} \text{ mg mL}^{-1}$ . Em seguida, foram realizados novos testes com as frações e o extrato em concentrações mais baixas em relação às já realizadas, sendo elas: 0,315; 0,625, 1,25, 2,5 e  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Como controle positivo foi utilizado no ensaio o quimioterápico cisplatina frente a células HeLa, apresentando um  $\text{IC}_{50}$  de  $13,6 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Posteriormente, foi realizado o ensaio antitumoral para as subfrações frente às células HeLa.

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 ESTUDO BIBLIOMÉTICO

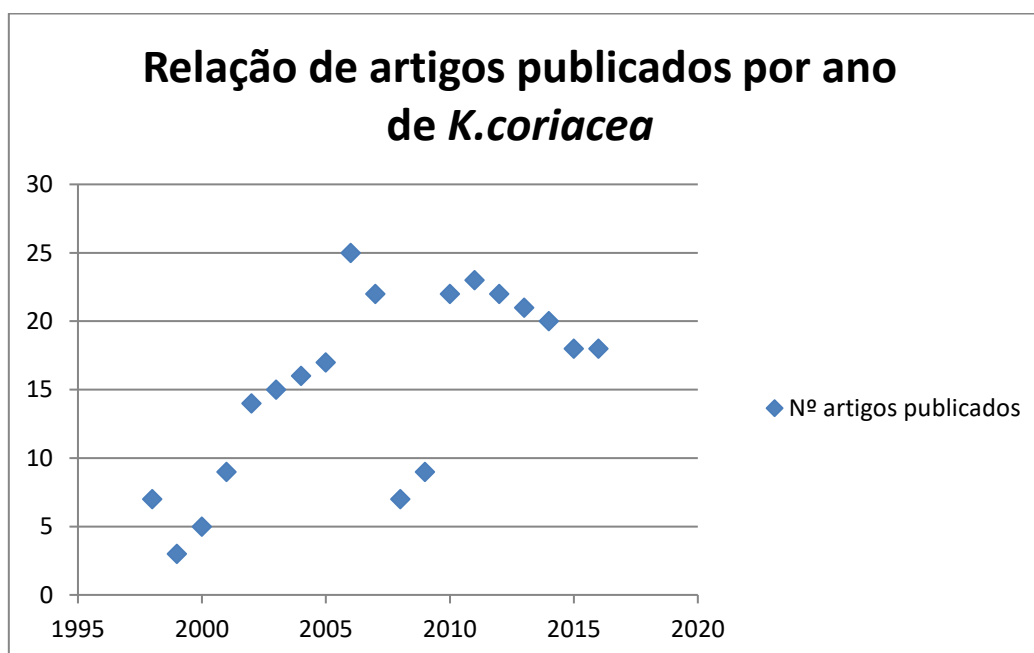
#### 4.1.1 Revisão sistemática da literatura

Com a revisão sistemática da literatura foi possível elaborar um levantamento bibliográfico de todos os metabólitos secundários identificados e/ou isolados do gênero *Kielmeyera*. A partir dele também foram selecionados os artigos mais relevantes, visando extrair o máximo de informações e correlações, de modo mais organizado e objetivo.

#### 4.1.2 Estatística descritiva da amostra

Por meio da estatística descritiva foi possível verificar o início dos estudos, sendo o mesmo realizado em 1998 por CORTEZ e colaboradores. Desde então, o número de citações e trabalhos aumentou até 2002, onde houve um número de trabalhos elevado, seguido por uma queda de forma desigual com o passar dos anos (QUADRO 4.1, pg. 53).

QUADRO 4.1: Relação da quantidade de artigos publicados por ano

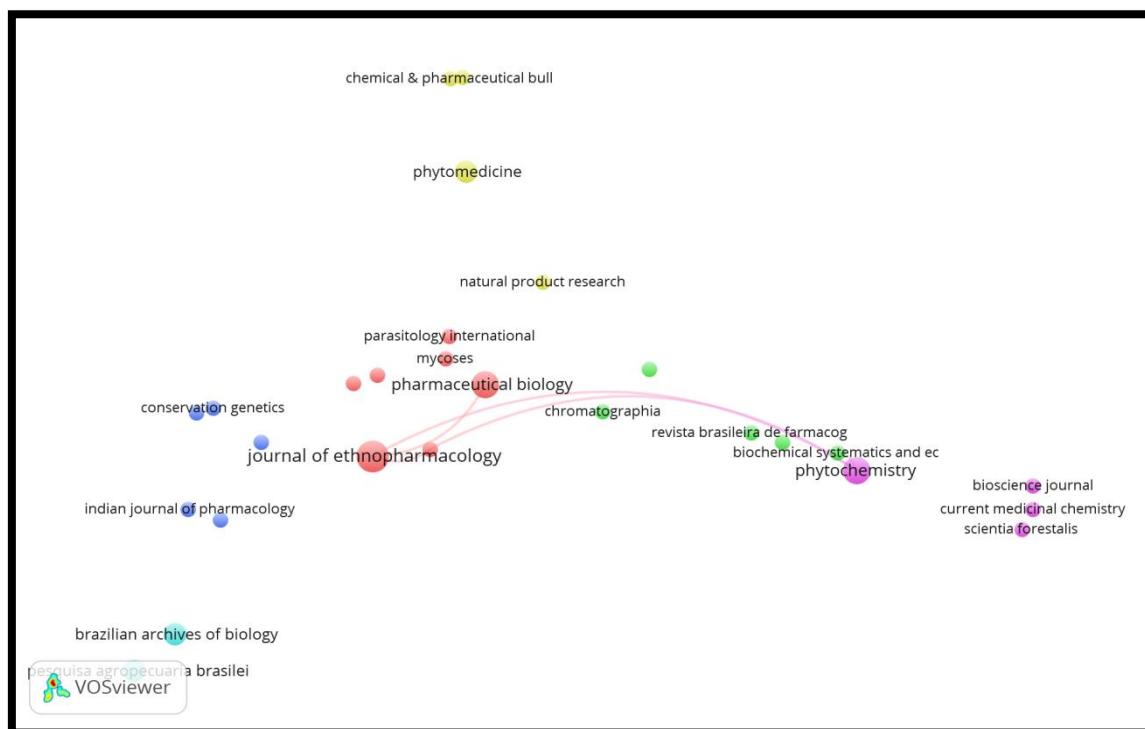




*Ethnopharmacology* apresenta o maior número de publicações referentes às plantas do gênero *Kielmeyera*. Ademais, este periódico apresenta correlação com periódicos com círculo de cor vermelha, como por exemplo, *Pharmaceutical Biology* e com os do grupo em azul, sendo um deles o *Indian Journal Pharmacology*. Destaca-se nesta análise o periódico *Phytochemistry* que contém um dos artigos precursores dos estudos de *Kielmeyera*, como exemplo a “*Xanthones from Kielmeyera excelsa*” de GOTTLIEB e colaboradores (1969), os quais publicaram muitos artigos nesse periódico para plantas do mesmo gênero, como a *Kielmeyera rubriflora*, em 1970. Esse mesmo periódico possui correlação com o *Journal of Ethnopharmacology* que tem artigos publicados, como o “*Preliminary toxicity study of dichloromethane extract of Kielmeyera coriacea stems in mice and rats*”, de OBICI e colaboradores em 2008.

O periódico *Pharmaceutical Biology* também possui correlação com o *Phytochemistry*, destacando-se o artigo “*Antibacterial activity of a biphenyl and xanthones from Kielmeyera coriacea*”, de CORTEZ e colaboradores (2002), autores também bastante citados nos temas em estudo. Esses dados tornam-se bastante relevantes para publicações futuras, uma vez que os mesmos poderão direcionar a escolha do periódico, além da facilidade de novas buscas para futuros estudos.

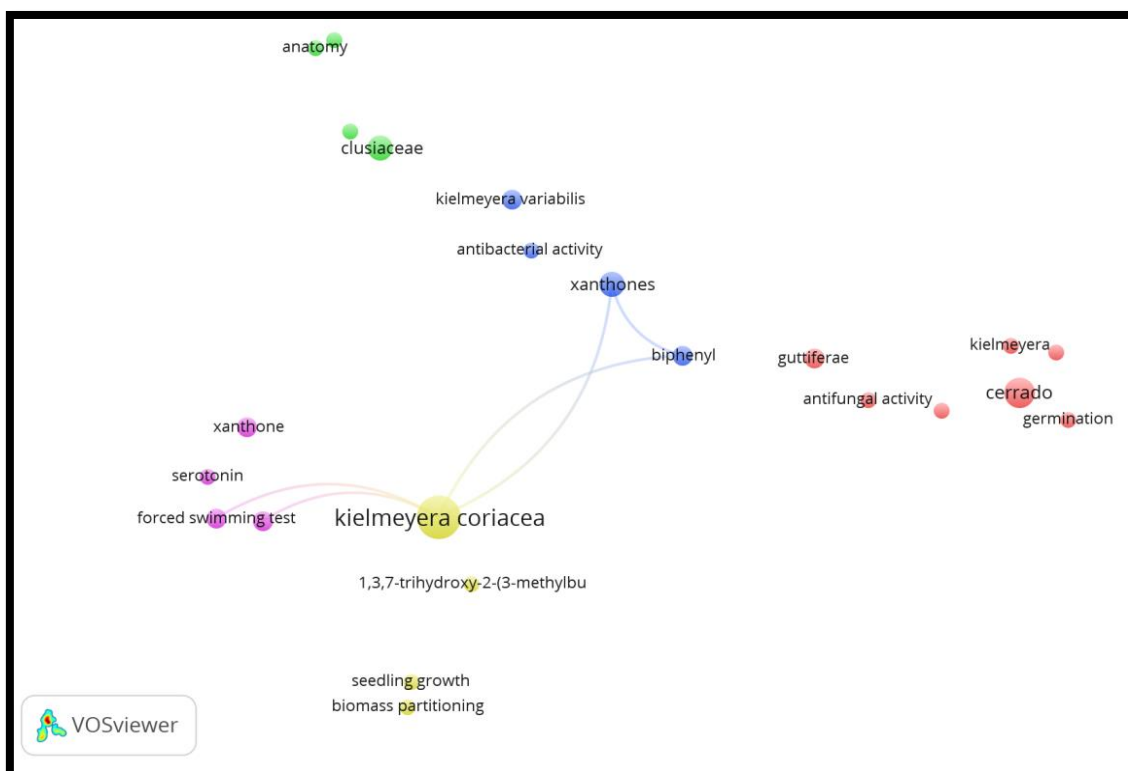
QUADRO 4.3: Rede de correlação entre periódicos



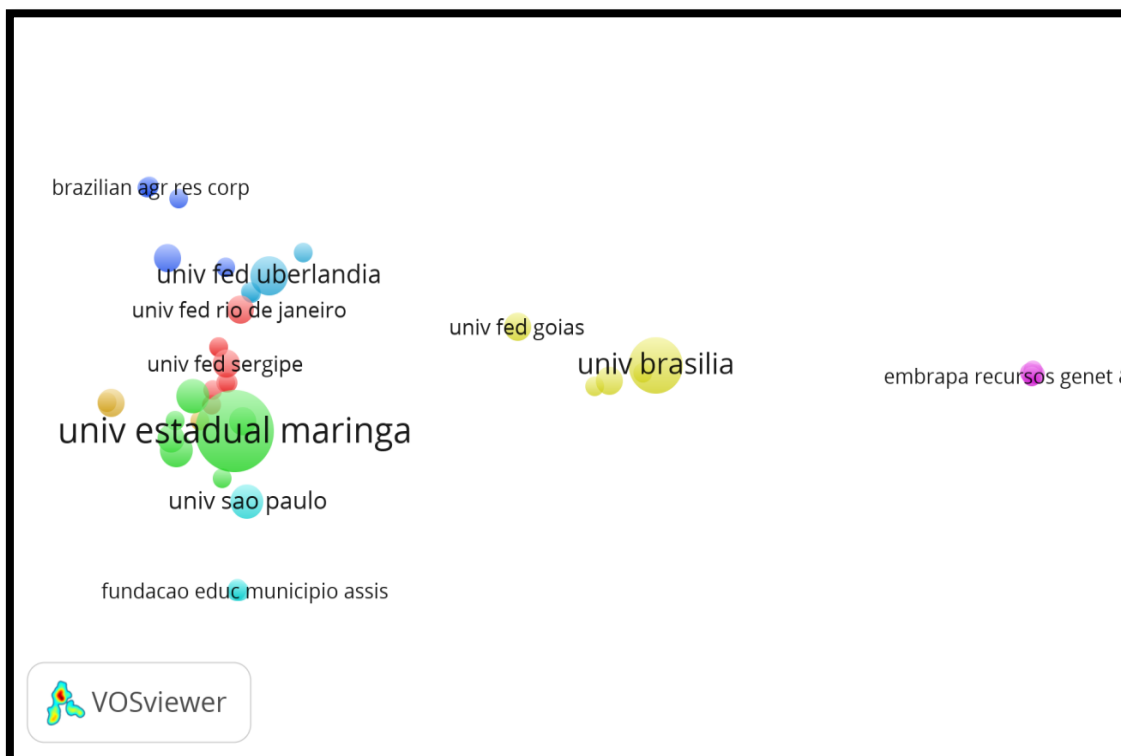
Nos QUADROS 4.4 e 4.5 são representadas as correlações entre palavras-chave e universidades que mais estudam o gênero *Kielmeyera*, respectivamente.

No QUADRO 4.4 (pg.56) observa-se uma relação forte entre metabólitos já isolados da planta com a palavra *Kielmeyera coriacea*, em específico a palavra xantona, que é uma classe marcadora do gênero. A partir da análise do QUADRO 4.5 é possível observar dados relacionados a quais universidades realizam o estudo deste gênero. Esse dado é interessante, pois divulga quais tipos de estudos as universidades estão realizando; por exemplo, a Universidade Estadual de Maringá se destaca por possuir um maior número de citações (círculo verde maior) e também a maior rede de correlação, se aproximando com os estudos da Universidade de Brasília e da Universidade Federal de São Carlos, as quais apresentam círculos com coloração semelhantes.

QUADRO 4.4: Correlação de palavras chave em toda busca bibliográfica



QUADRO 4.5: Correlação de universidades que estudam o gênero *Kielmeyera*



Portanto, é evidente a importância de um estudo sistemático da literatura, bem como uma análise crítica dos artigos, para assim obter informações importantes que não seriam consideradas com apenas uma leitura simples dos artigos individualmente. Isso destaca a importância e a colaboração da bibliometria no levantamento bibliográfico e na análise dos dados referentes aos artigos.

## 4.1 ESTUDO QUÍMICO

### 4.2.1 Preparo dos extratos e frações

O material botânico coletado foi seco, triturado, extraído por maceração com etanol por nove dias, com troca de solvente a cada três dias, um total de 600 mL, e o extrato foi concentrado em evaporador rotativo, obtendo-se o extrato etanólico das raízes (EER) de *K. coriacea*, e pela extração líquido-líquido obteve-se as frações hexano (FH), acetato de etila (FAE) e hidroalcoólica (FHA). O rendimento de cada amostra está apresentado na TABELA 4.1 (pg. 58).

TABELA 4.1: Rendimento obtido no procedimento de extração do EER e das frações

Massa Inicial (g)	Extrato ou fração	Código	Massa obtida (g)	Rendimento (%)
45,0 <sup>a</sup>	etanólico	EER	80,0	12,4 <sup>c</sup>
	hexano	FH	4,2	11,7 <sup>d</sup>
36,0 <sup>b</sup>	acetato de etila	FAE	16,3	45,3 <sup>d</sup>
	hidroalcoólica	FHA	3,9	10,8 <sup>d</sup>

<sup>a</sup>Massa do material vegetal seco.

<sup>b</sup>Massa de extrato etanólico das raízes (EER).

<sup>c</sup>Rendimento calculado a partir da massa do material vegetal seco.

<sup>d</sup>Rendimento calculado a partir da massa inicial do EER.

#### 4.2.2 Estudo químico do extrato etanólico das raízes de *K. coriacea*

O estudo químico do extrato etanólico das raízes de *K. coriacea* proporcionou o isolamento de uma substância que por meio da comparação dos seus dados espectroscópicos e espectrométricos com estruturas já isoladas do gênero, identificou-se a substância como 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona, a qual pertence à classe das xantonas, as marcadoras quimiotaxonômicas do gênero *Kielmeyera*.

As xantonas são formadas por 13 átomos de carbono, seguindo o seguinte arranjo: C<sub>6</sub>-C<sub>1</sub>-C<sub>6</sub>, denominado de esqueleto xantônico. Além dos compostos oxigenados presentes na estrutura principal, nesse esqueleto podem ser encontrados substituintes oxigenados na forma de grupos hidroxílicos, metoxílicos, metilenodioxílicos e unidades alquílicas. São esses substituintes que influenciam nos deslocamentos químicos, gerando blindagem ou desblindagem na análise de RMN (SOBRAL et al., 2009).

Ademais, na perspectiva de obter informações adicionais sobre a composição química presente nas raízes de *K. coriacea* foi realizado o perfil metabólico, denominado de desrepliação, das frações oriundas do EER, por meio da análise via CLAE-EM.

Os picos majoritários foram analisados por espectrometria de massas no modo positivo. A caracterização dos metabólitos foi realizada por comparação do tempo de retenção e da massa exata com o banco de dados METLIN (SMITH et al., 2005) e com dados da literatura.

#### 4.2.2.1 Identificação estrutural da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona

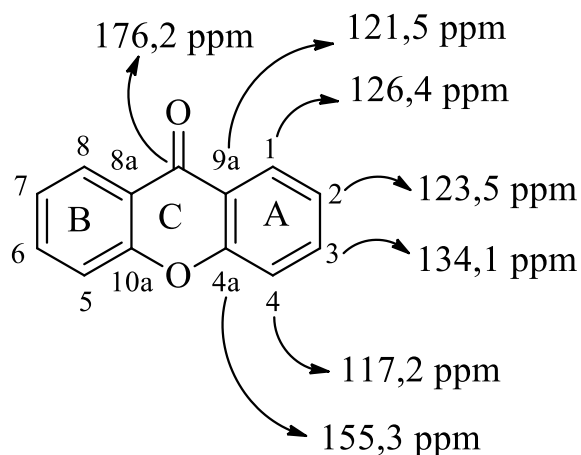
No espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.6, pg. 67) foram observados sinais característicos de hidrogênios aromáticos, integrando para um hidrogênio cada, em  $\delta$  7,64 (*dd*,  $J= 8,5$  Hz e 0,8 Hz) atribuído ao H-5,  $\delta$  7,81 (*ddd*,  $J= 8,5$  Hz, 6,8 Hz e 1,6 Hz) atribuído ao H-6,  $\delta$  7,45 (*ddd*,  $J= 7,9$  Hz; 6,8 Hz e 0,8 Hz) atribuído ao H-7 e  $\delta$  8,24 (*dd*,  $J= 7,9$  Hz e 1,6 Hz) atribuído ao H-8. A análise das suas multiplicidades evidenciou sinais característicos de um anel aromático com quatro átomos de hidrogênios vicinais, uma vez que um *ddd* confirma o acoplamento de um hidrogênico com mais outros três hidrogênios.

Um sinal de simpleto em  $\delta$  7,44 também foi observado, o qual integrou para um hidrogênio, referente ao H-1, comprovando a existência de um anel aromático pentassubstituído. Verificou-se também sinais referentes a dois simpletos em  $\delta$  3,97 e  $\delta$  4,04, ambos com integração para três hidrogênios, relativos a dois grupos metoxilas (TABELA 4.2, pg. 66).

Por meio da análise de RMN de  $^{13}\text{C}$  (FIGURA 4.7, pg. 68) observou-se 15 sinais, sendo alguns menos intensos, com absorção na região de carbono aromático. Os deslocamentos químicos em  $\delta$  147,2 e  $\delta$  136,9 comprovam a existência de grupos oxigenados pertencentes à metoxilas, devido ao fato de serem sinais localizados em campo baixo. Essas metoxilas doam densidade eletrônica, contribuindo para a obtenção de sinais de carbonos mais desblindados. Destaca-se também o sinal em  $\delta$  176,1, característico de carbonila conjugada, colaborando para a caracterização do esqueleto xantônico básico (CASTELÃO et al., 1977) (TABELA 4.2, pg. 66).

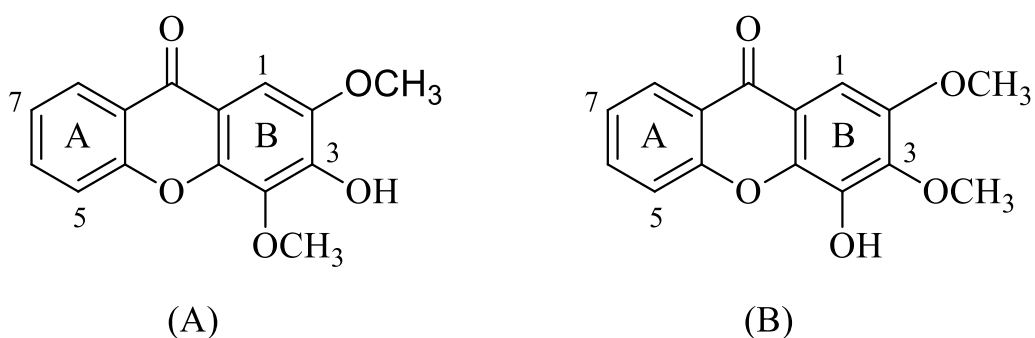
As atribuições dos deslocamentos químicos do RMN de  $^{13}\text{C}$  do núcleo xantônico (FIGURA 4.1, pg. 60) serviram como referência para interpretação e identificação da xantona em estudo.

FIGURA 4.1: Estrutura básica da xantona e seus deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$



Por meio da análise dos sinais em  $\delta$  119,0,  $\delta$  124,9,  $\delta$  126,8 e  $\delta$  135,2 confirmou-se a presença de um anel aromático sem substituintes, pois são valores equivalentes à de uma xantona sem substituinte, aproximando-se dos valores da literatura. A partir disso, foram consideradas duas propostas de estruturas, (A) e (B) (FIGURA 4.2, pg. 60), de xantonas previamente isoladas do gênero *Kielmeyera*.

FIGURA 4.2: Duas propostas de estruturas, (A) e (B), de xantonas previamente isoladas do gênero *Kielmeyera*



(A) 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona

(B) 4-hidroxi-2,3-dimetoxixantona

Ao comparar as propostas (A) e (B), notou-se que os deslocamentos químicos de  $^{13}\text{C}$  do anel A de ambas são semelhantes devido ao fato de ser um anel sem substituinte.

Contudo, os sinais do anel B das duas propostas se diferem, pois apresentam substituintes como a hidroxila e a metoxila em posições distintas. Dessa forma, a mudança na posição desses substituintes altera os deslocamentos químicos dos carbonos ligados aos mesmos para uma região mais desblindada (FIGURAS 4.3 e 4.4, pg. 61) (CASTELÃO et al., 1977; DE ALMEIDA, 2013; KATO et al., 2005; KIJJOA et al., 2000; MINAMI et al., 1994; SOBRAL et al., 2009).

FIGURA 4.3: Proposta estrutural para a substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona com os deslocamentos químicos de carbono para proposta (A)

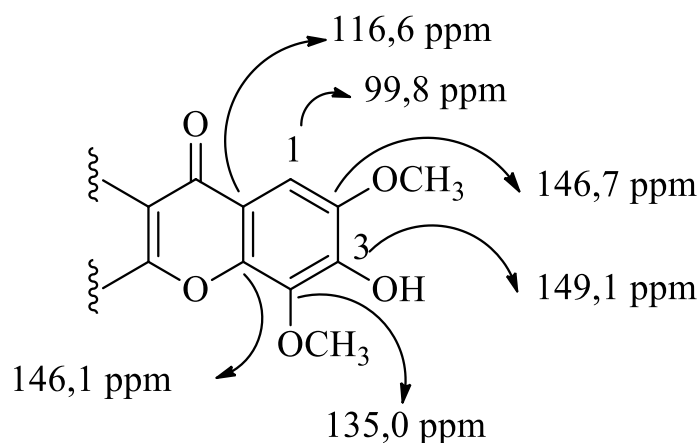
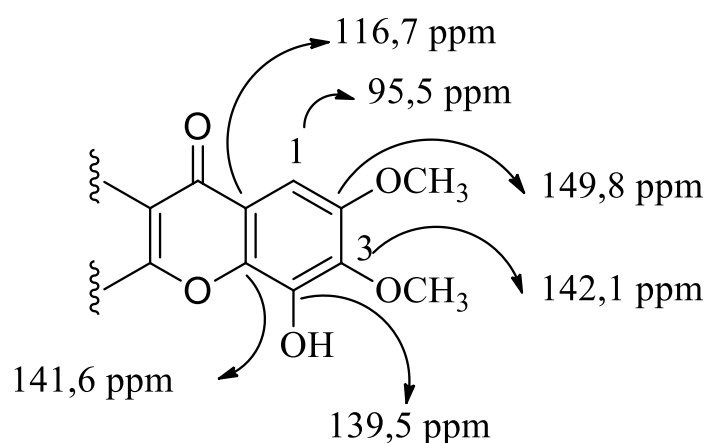
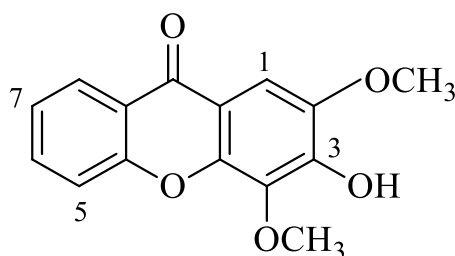


FIGURA 4.4: Proposta estrutural para a substância 4-hidroxi-2,3-dimetoxixantona com os deslocamentos químicos de carbono para proposta (B)



Sendo assim, os deslocamentos químicos das propostas (A) e (B) auxiliaram na determinação da posição dos substituintes do esqueleto xantônico, concluindo que a substância em estudo é a proposta (A). Além das propostas, sua estrutura (FIGURA 4.5, pg. 62) foi identificada com base nos espectros de RMN de  $^1\text{H}$ , RMN de  $^{13}\text{C}$ , HSQC, COSY e HMBC e comparados com dados relatados na literatura (COQUEIRO et al, 2016; SOBRAL, 2009). A substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona foi obtida na forma de um sólido amarelo (1,2 mg) a partir do fracionamento da fração acetato de etila (subfração 4.7.2) do EER de *K. coriacea*.

FIGURA 4.5: Estrutura da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona



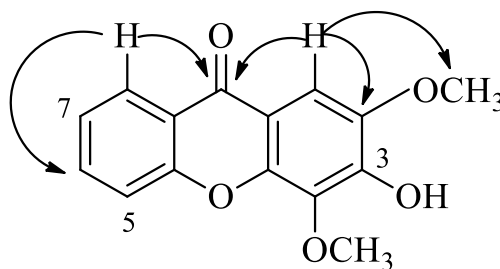
Pelo experimento de HSQC observou-se as seguintes correlações: H-5 em  $\delta$  7,64 com C-5 em  $\delta$  119,0; H-6 em  $\delta$  7,81 com C-6 em  $\delta$  135,2; H-7 em  $\delta$  7,45 com C-7 em  $\delta$  124,9; H-8 em  $\delta$  8,24 com C-8 em  $\delta$  126,8. Os sinais de  $^1\text{H}$  das duas metoxilas, nas posições 2 e 4, em  $\delta$  3,97 e  $\delta$  4,04, mostraram correlação a  $J^1$  com os sinais dos carbonos em  $\delta$  56,7 e  $\delta$  61,7, respectivamente (FIGURA 4.8, pg. 69) e (FIGURA 4.9, pg. 70) (CASTELÃO et al., 1977; GOTTLIEB; NAGEM, 1977).

A xantona isolada já foi reportada para o gênero *Kielmeyera* nas folhas e na casca do caule da espécie, contudo não há relatos na literatura para o isolamento da mesma para raiz.

Por meio da análise de correlação homonuclear do espectro de COSY confirmou-se o acoplamento dos sinais de hidrogênios vicinais do anel aromático, observados no RMN de  $^1\text{H}$ ; o sinal em  $\delta$  8,24 (H-8) acoplou com o sinal em  $\delta$  7,45 atribuído ao H-7, o qual acoplou com o sinal em  $\delta$  7,81 referente ao H-6 (FIGURA 4.10, pg.71); o sinal de H-6 acoplou com o sinal em  $\delta$  7,64 referente ao hidrogênio H-5 (FIGURA 4.11, pg.72).

Pelos dados do mapa de contorno HMBC observou-se que o sinal em  $\delta$  8,24 (H-8) correlacionou-se com o sinal de carbono da carbonila em  $\delta$  176,1 (C-9) (FIGURA 4.13, pg.63) e com o sinal em  $\delta$  135,2 (C-6). O sinal em  $\delta$  7,44 (s, 1H), correspondente ao H-1, se correlacionou com os sinais em  $\delta$  56,7, característico de carbono de metoxila, indicando a substituição de uma das posições da xantona por uma metoxila. O H-1 também apresentou correlações com o sinal de C-2 em  $\delta$  147,2, com o sinal de C-4a ( $\delta$  147,5) e com o sinal do carbono da carbonila (C-9) em  $\delta$  176,1 (FIGURA 4.12, pg.73). Outras correlações observadas foram: o sinal em  $\delta$  7,81 (H-6) com o sinal em  $\delta$  126,8 (C-8); o sinal em  $\delta$  7,64 (H-5) com o sinal em  $\delta$  124,9 (C-7); e o sinal em  $\delta$  7,45 (H-7) com o sinal em  $\delta$  119,0 (C-5).

FIGURA 4.13: Correlações dos sinais observadas no mapa de contornos g-HMBC utilizadas para a elucidação estrutural

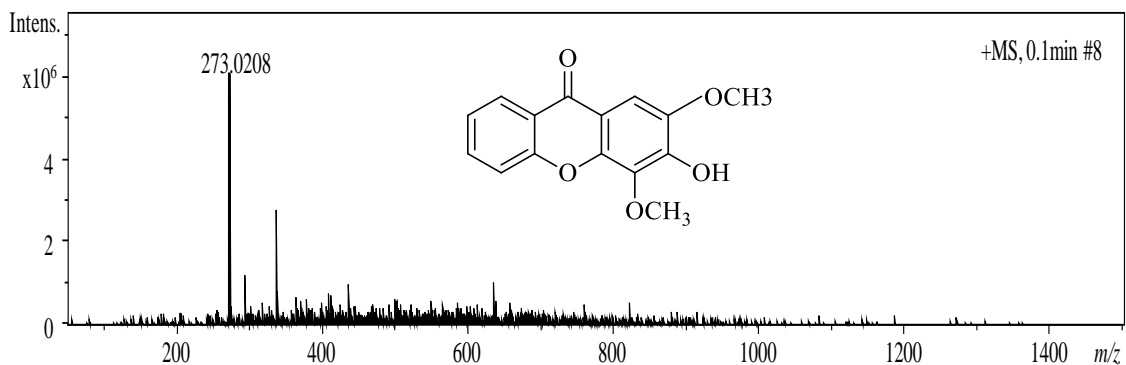


Os sinais de hidrogênios das metoxilas em  $\delta$  3,97 e  $\delta$  4,04 se correlacionaram a  $J^3$  com os sinais dos carbonos em  $\delta$  147,2 (C-2) e  $\delta$  136,9 (C-4), respectivamente (FIGURA 4.14, pg.74).

Os sinais com  $\delta$  0,70 a 1,70, característicos de hidrogênios alifáticos, são impurezas da amostra, possivelmente de terpenoides e/ou esteroides (PAVIA, 2013).

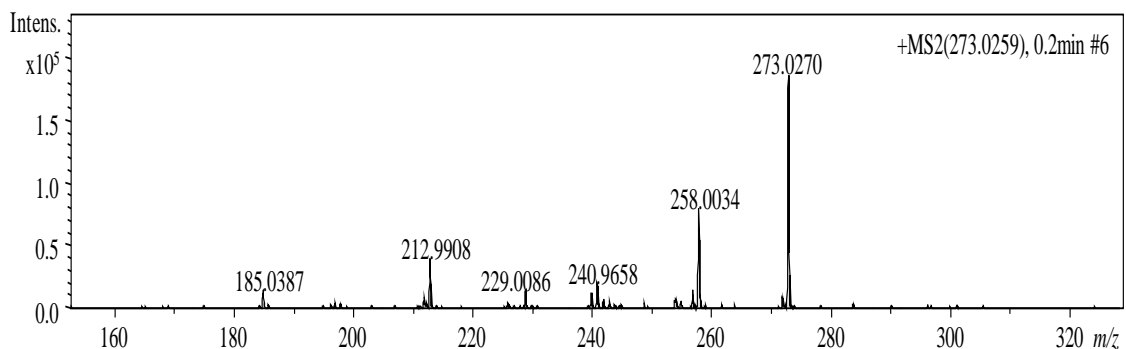
Além dos dados de RMN, uma alíquota da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona foi submetida à EM por infusão direta. Por meio da análise do espectro de massas no modo positivo (ESI), observou-se o íon  $[M+H]^+$   $m/z$  273,0208 (FIGURA 4.15, pg. 64), possibilitando atribuir a esta substância a fórmula molecular  $C_{15}H_{12}O_5$ .

FIGURA 4.15: Espectro de massas da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona, obtido em modo positivo (ESI)



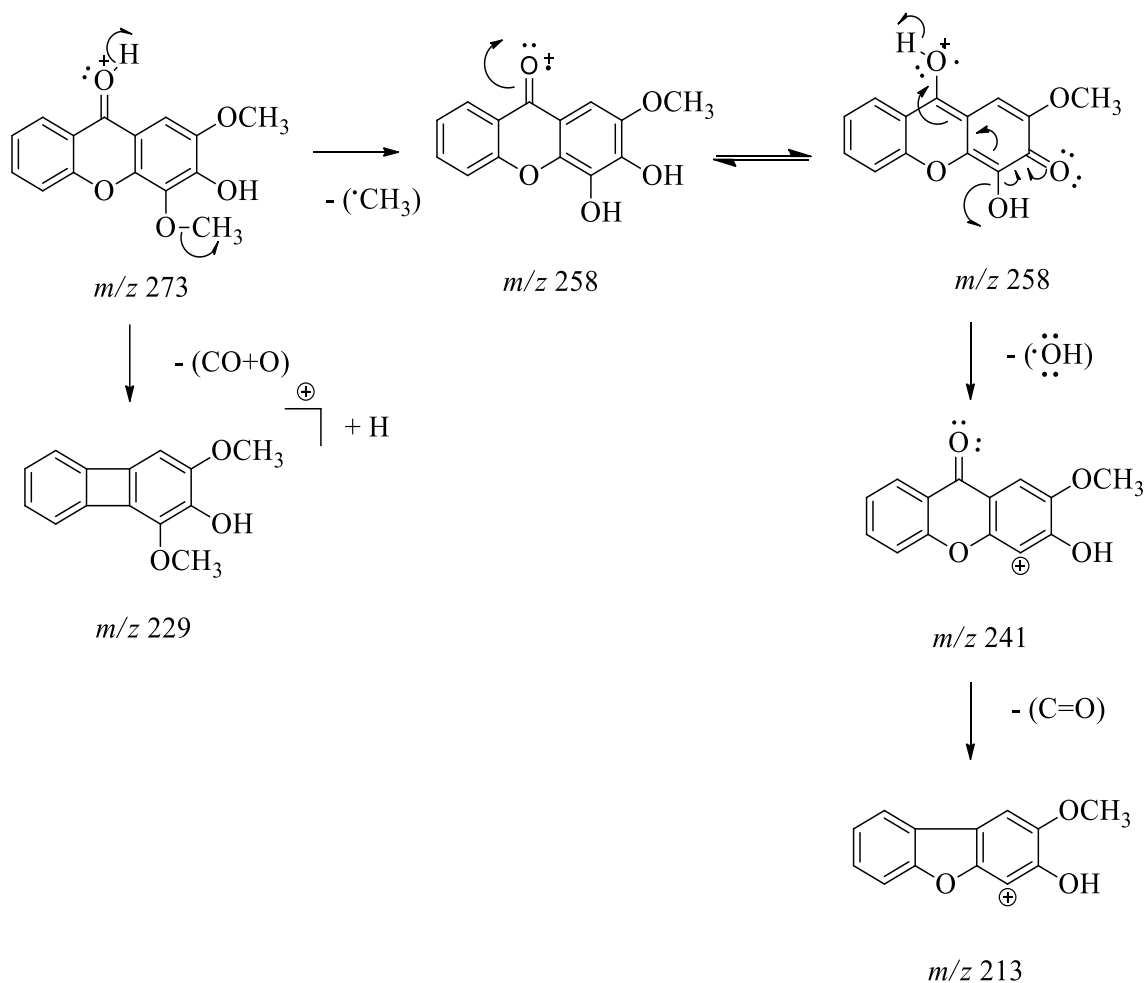
O íon  $m/z$  273,0208 foi selecionado (isolado) e fragmentado sequencialmente ( $EM^2$ ), usando energia de 25 a 40 eV. O espectro de massas é apresentado na FIGURA 4.16 (pg. 64). O perfil de fragmentação obtido experimentalmente foi comparado com dados da literatura para fragmentações características de xantonas. Desta forma, foram realizadas propostas de fragmentações para a xantona em estudo (FIGURA 4.17, pg.65).

FIGURA 4.16: Espectro de massas sequencial (EM/EM) do íon  $[M+H]^+$  de  $m/z$  273,0270



Ao analisar o espectro de EM/EM da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona, observou-se que o fragmento mais estável ( $m/z$  258) foi gerado pela eliminação de um radical metila ( $\cdot CH_3$ ), proveniente da metoxila na posição 4, do anel B da xantona. Em seguida, o fragmento  $m/z$  241 foi formado pela perda de um radical hidroxila ( $\cdot OH$ ) da posição 4; este mesmo fragmento sofreu a perda de um grupamento  $C=O$  e formou a estrutura com  $m/z$  213. O íon  $m/z$  229 pode ser formado a partir do íon  $m/z$  273 com a perda de um grupo ( $CO_2$ ) (FIGURA 4.17, pg. 65) (DU et al., 2012; FENG et al., 2012; SILVA et al., 2016; WITTENAUER et al., 2012).

FIGURA 4.17: Propostas de fragmentação para a estrutura da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona



Dessa forma, a partir dos dados espectroscópicos foi confirmada a proposição da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona. Esta substância está descrita na literatura, sendo isolada de espécies como *K. cuspidata* (caule); *K. coriacea* (folhas); *K. lathrophyton* (caule) e de *K. rubiflora* (folhas e caule) (CORTEZ et al., 1998; DE ALMEIDA, 2013; GOTTLIEB et al., 1969; GOTTLIEB; MESQUITA; NAGEM, 1971; LOPES et al., 1977; PIMENTA et al., 1964; PINTO; MESQUITA; GOTTLIEB, 1987; SOBRAL et al., 2009).

TABELA 4.2: Dados de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona e comparação com a literatura

Substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona (500 e 125 MHz, acetona- $d_6$ )				SOBRAL et al., 2009 (300 e 75 MHz, $\text{CDCl}_3$ + DMSO- $d_6$ )	
$^1\text{H}/^{13}\text{C}$	$\delta$ (ppm); multiplicidade; $J$ (Hz); integral	$^{13}\text{C}$ (ppm)	$g$ -HMBC	$\delta$ (ppm); multiplicidade; $J$ (Hz); integral	$^{13}\text{C}$ (ppm)
1	7,44; <i>s</i> ; 1H	101,3	-	7,47; <i>s</i> ; 1H	100,4
2	-	147,2	H-1; 2-OMe	-	145,5
3-OH	*	145,3	-	6,03; <i>s</i> ; 1H	145,9
4	-	136,9	4-OMe	-	134,8
4a	-	147,5	-	-	146,2
10a	-	157,2	-	-	155,6
5	7,64; <i>dd</i> ; 8,5 e 0,8; 1H	119,0	H-7	7,53; <i>dd</i> ; 8,8 e 1,2; 1H	117,7
6	7,81; <i>ddd</i> ; 8,5; 6,8 e 1,6; 1H	135,2	H-8	7,67 <i>dt</i> ; 8,8; 6,5 e 1,6; 1H	133,7
7	7,45; <i>ddd</i> 7,9; 6,8 e 0,8; 1H	124,9	H-5	7,34; <i>tl</i> ; 8,8; 1H	123,5
8	8,24; <i>dd</i> ; 7,9 e 1,6; 1H	126,8	H-6	8,29; <i>dd</i> ; 8,8 e 1,6; 1H	126,1
8a	-	122,3	-	-	121,0
9a	-	112,5	-	-	113,6
9	-	176,1	H-1; H-8	-	175,7
2-OMe	3,97; <i>s</i> ; 3H	56,7	-	3,97; <i>s</i> ; 3H	56,1
4-OMe	4,04; <i>s</i> ; 3H	61,7	-	4,05; <i>s</i> ; 3H	61,2

\* Valor não encontrado no espectro de RMN de  $^1\text{H}$ .

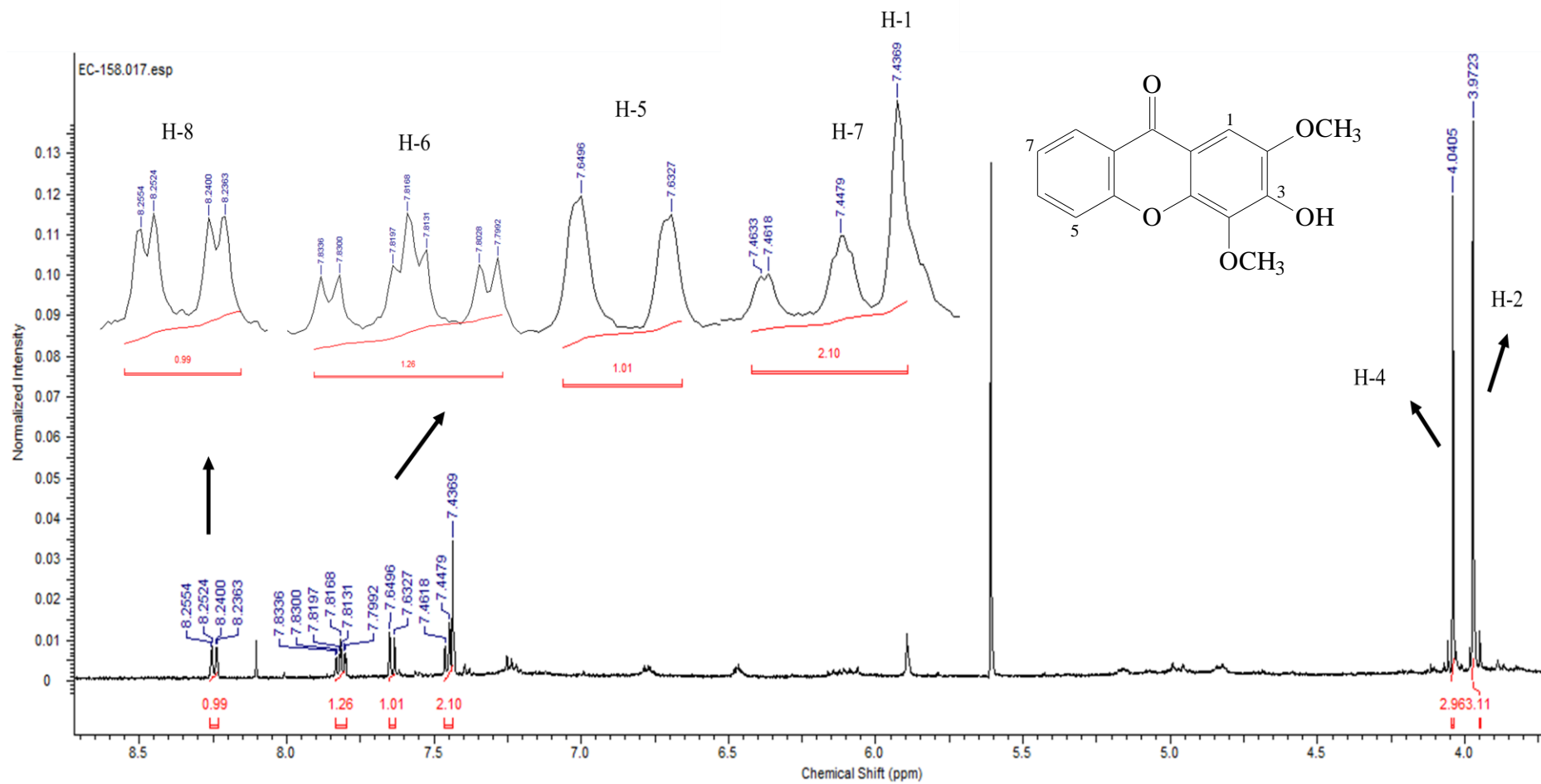


FIGURA 4.6: Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 500 MHz)

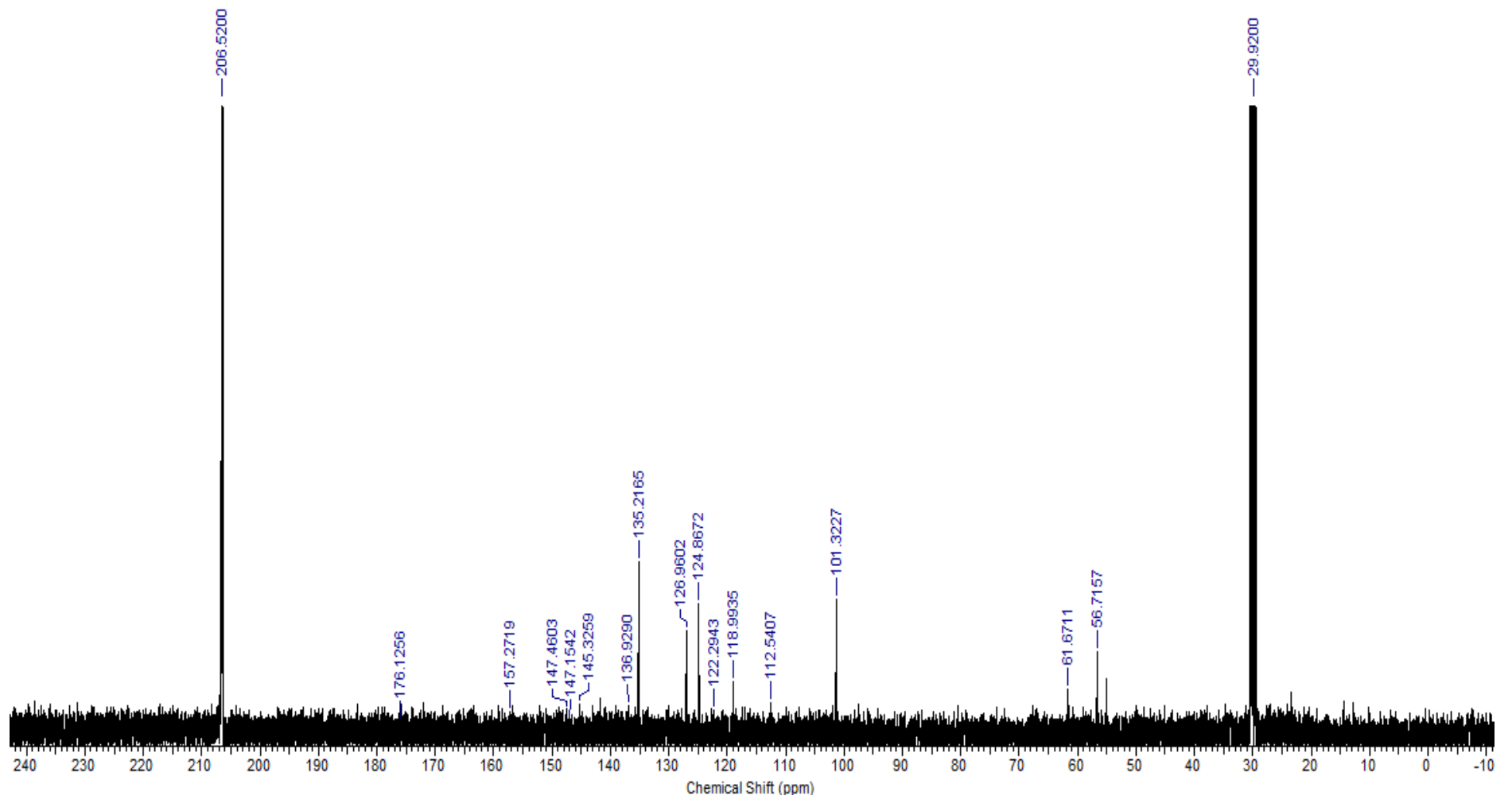


FIGURA 4.7: Espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 125 MHz)

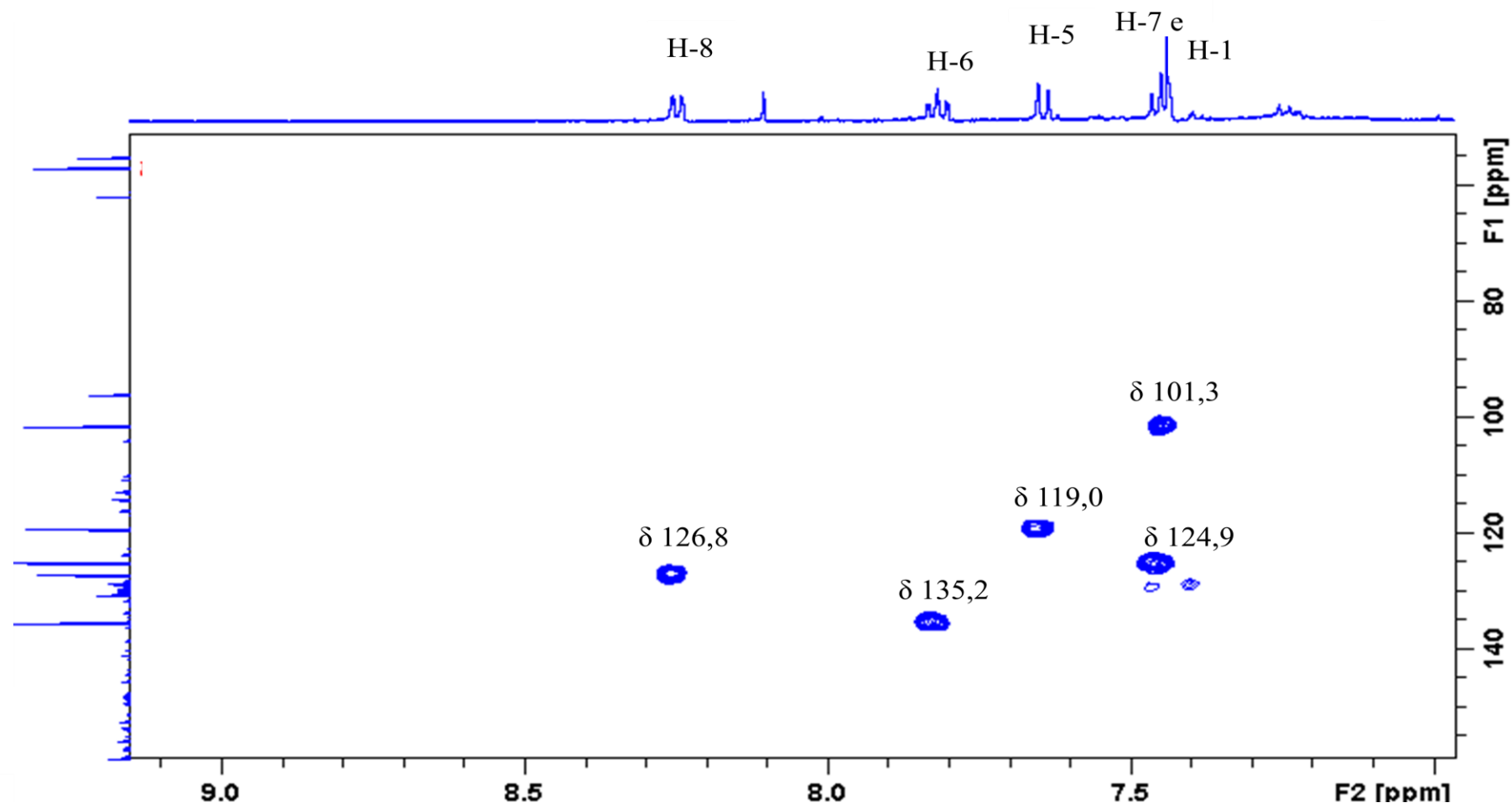


FIGURA 4.8: Mapa de contorno de *g*-HSQC da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 125 MHz)

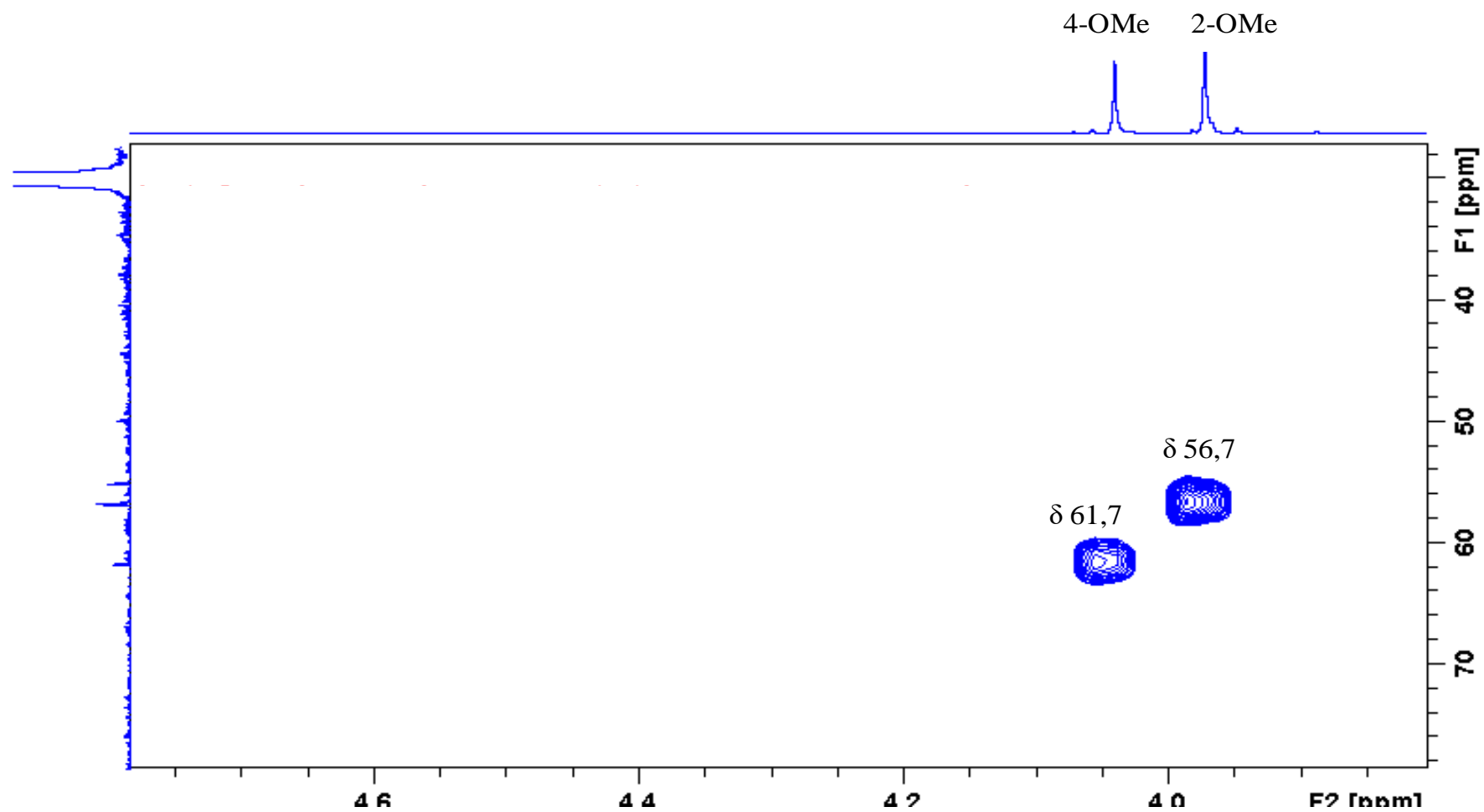


FIGURA 4.9: Ampliação do mapa de contorno de g-HSQC da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona ( $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$ , 125 MHz)

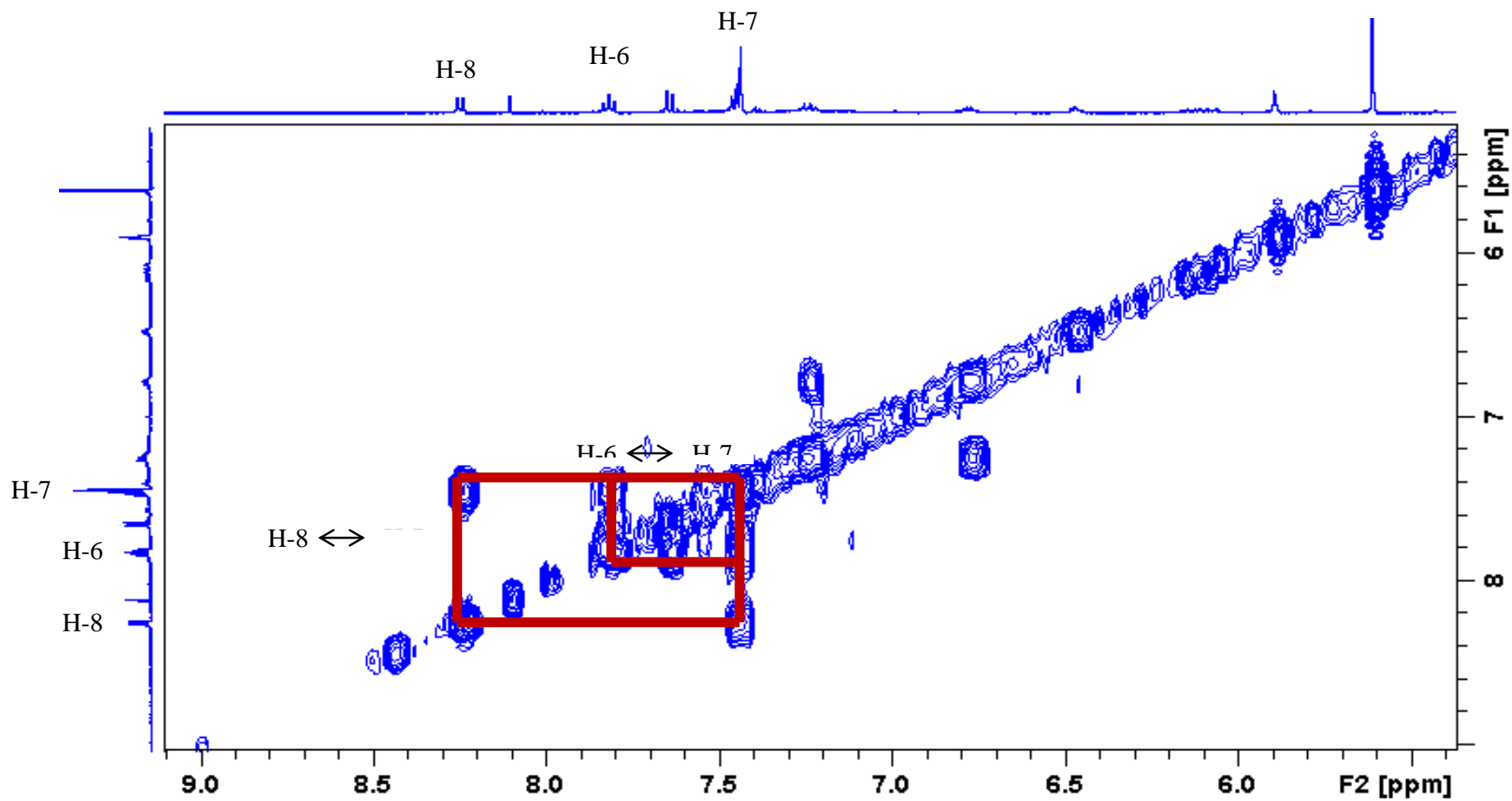


FIGURA 4.10: Espectro de g-COSY da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona ( $C_3D_6O$ , 500 MHz)

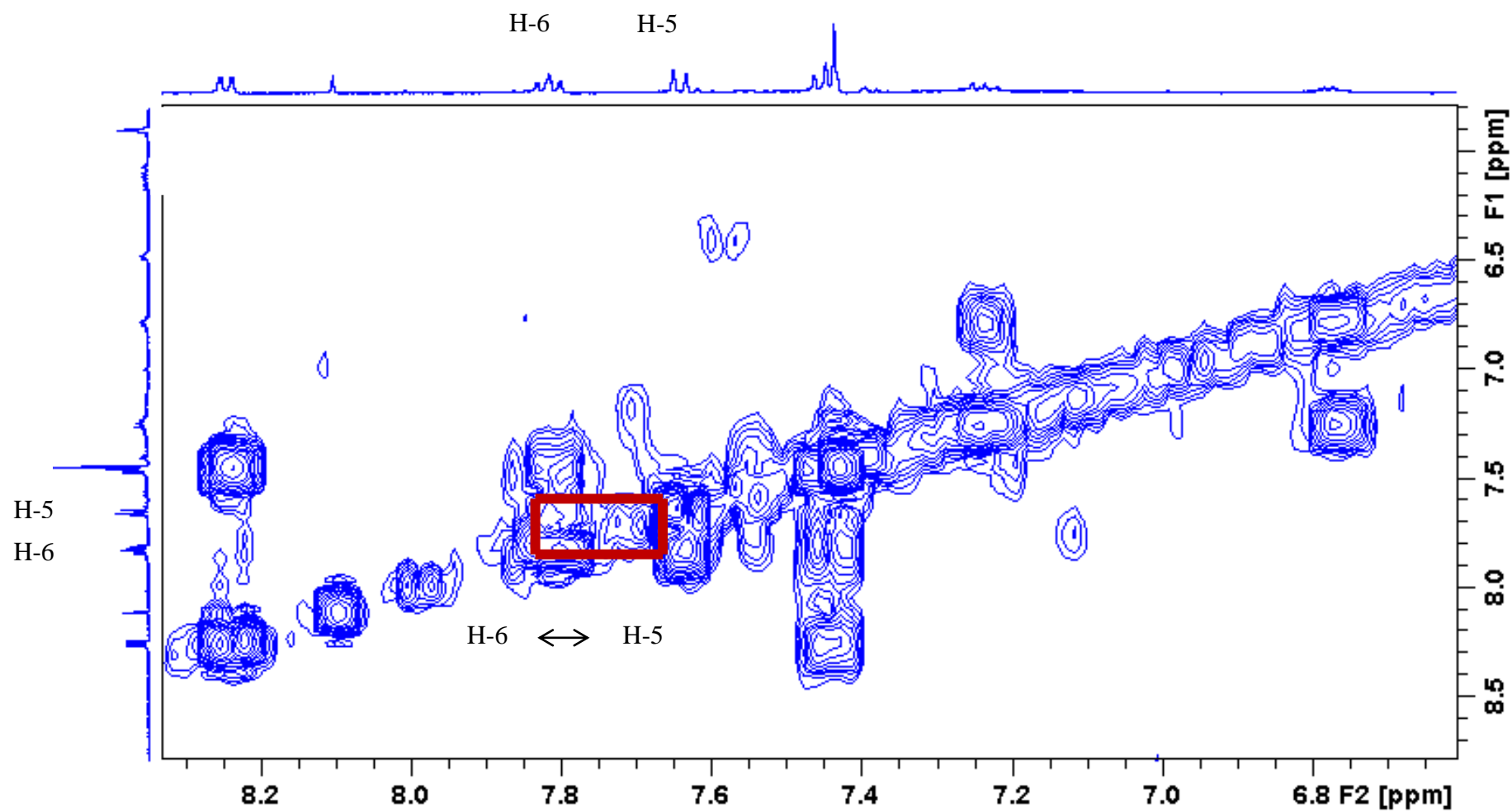


FIGURA 4.11: Ampliação do espectro de g-COSY da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona ( $C_3D_6O$ , 500 MHz)

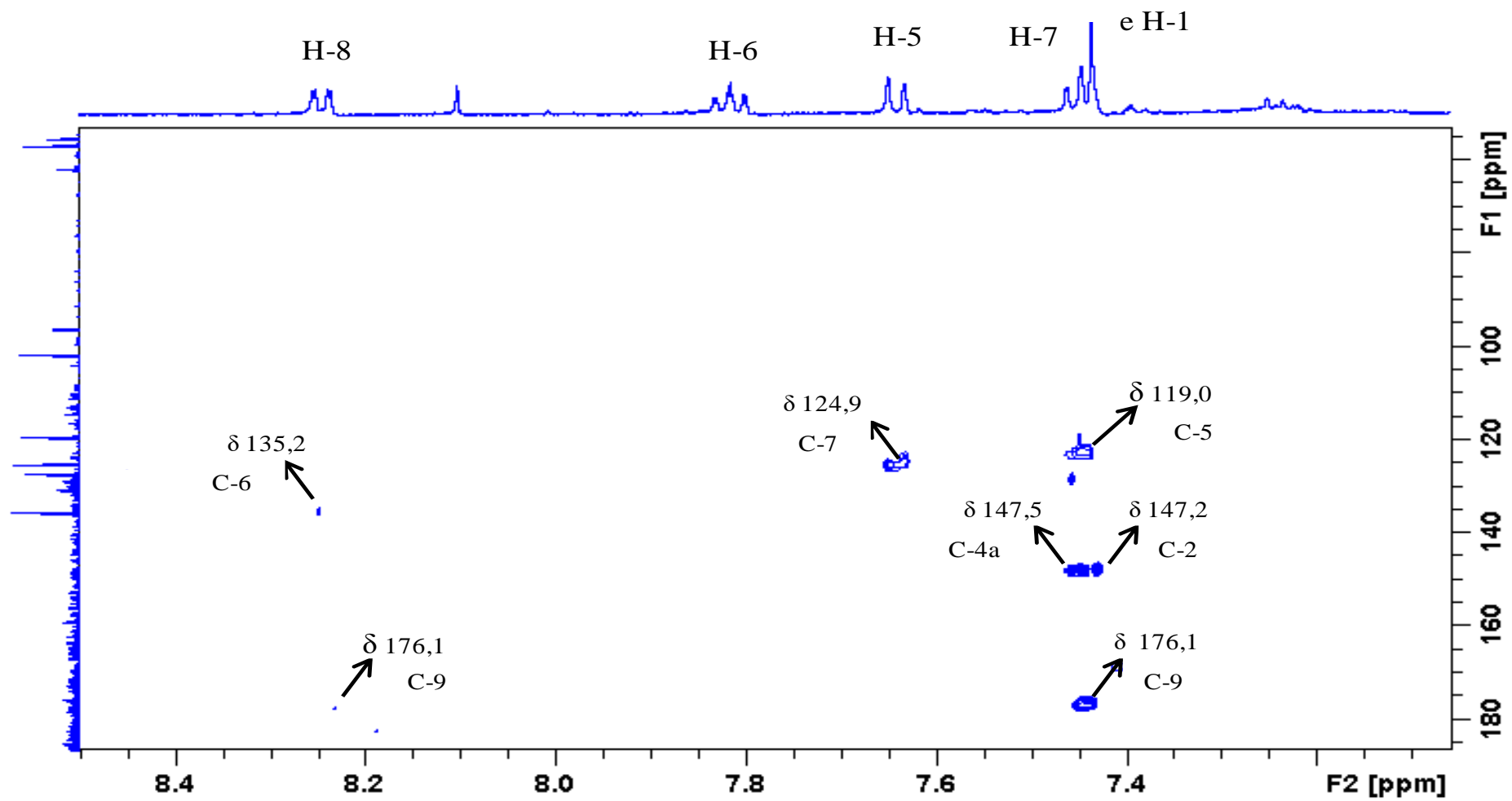


FIGURA 4.12: Mapa de contorno de g-HMBC da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona (C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O, 125 MHz)

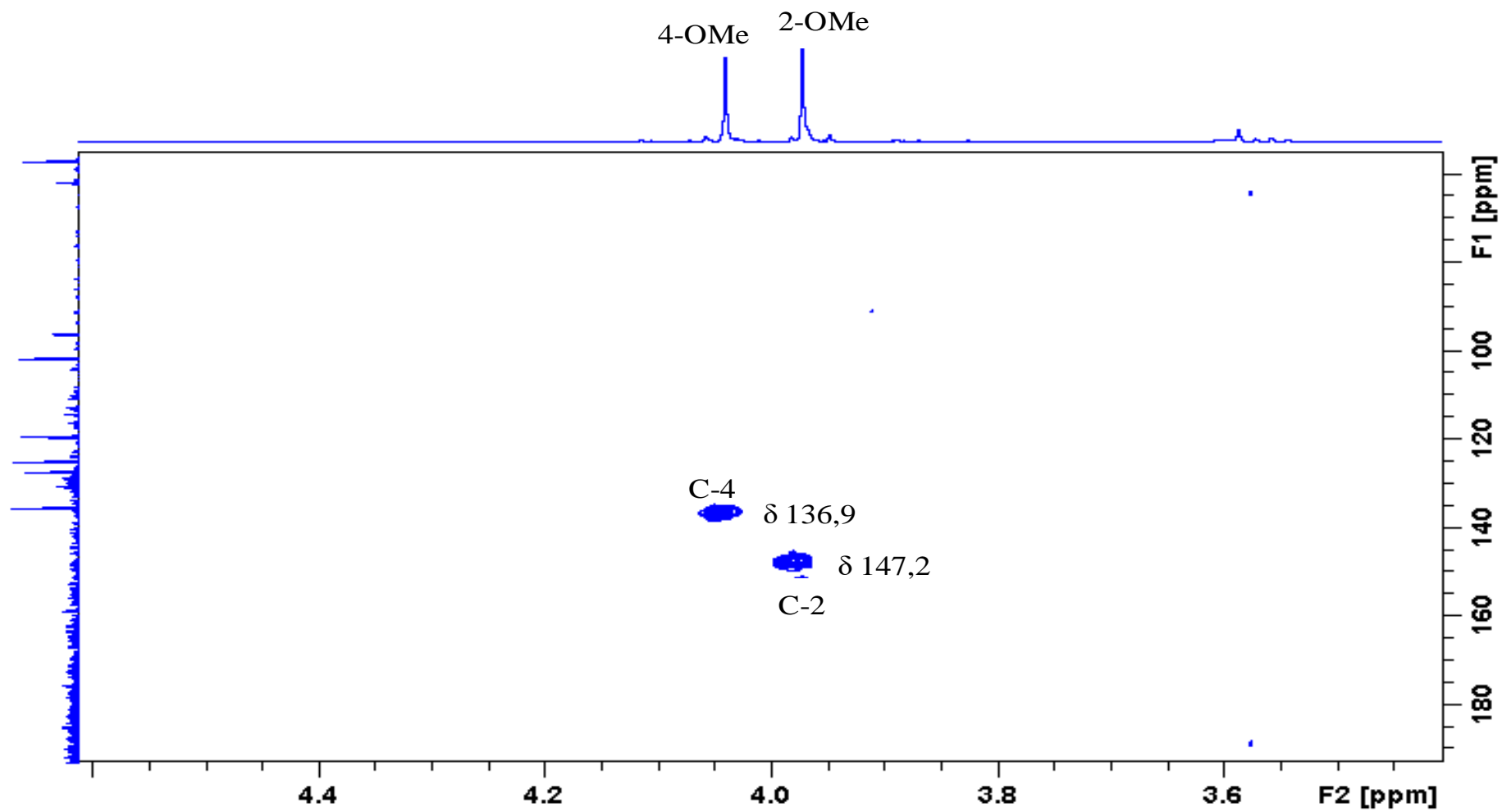


FIGURA 4.14: Ampliação do mapa de contorno de g-HMBC da substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona ( $C_3D_6O$ , 125 MHz)

### 4.2.3 Caracterização do perfil metabólico das frações de *K. coriacea* por espectrometria de massas

Com o objetivo de obter informações sobre o perfil químico das subfrações oriundas das frações hexano (FH), acetato de etila (FAE) e hidroalcoólica (FHA), obtidas a partir da extração líquido-líquido do EER de *K. coriacea*, foi realizada a análise das mesmas via Cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massas sequencial com fonte de ionização Ion Trap. Esse estudo consistiu na desreplcação assistida de informações prévias contidas na base de dados dos metabólitos secundários já isolados do gênero *Kielmeyera* (CASS; CASSIANO, 2015).

As amostras em estudo foram provenientes de fracionamentos por cromatografia em coluna (FLUXOGRAMAS 3.3 a 3.6, pgs 40 a 44), e foram analisadas por RMN de  $^1\text{H}$ , sendo consideradas mais relevantes para o estudo de desreplcação e ensaios biológicos aquelas com sinais na região dos aromáticos. Assim, foram analisadas cinco subfrações da FAE (2.4.3; 4.4; 4.5.4; 4.7.3 e 4.8.2), uma subfração da FH (10) e uma subfração da FHA (7).

Todas as amostras foram injetadas no cromatógrafo líquido acoplado ao espectrômetro de massas e a partir do experimento foi gerado um cromatograma de íons totais (CIT), em que foi possível realizar a busca pelos íons  $[\text{M}+\text{H}]^+$  de  $m/z$  específico. Em seguida, obteve-se os cromatogramas de íons extraídos (CIE) correspondentes aos compostos presentes na amostra, que estavam associados ao espectro de massas (SILVA et al., 2016). Os valores de  $m/z$  experimentais foram comparados com aqueles calculados para os compostos relatados previamente na literatura e a partir dessas informações foram identificadas quinze substâncias, cujos dados se encontram na TABELA 4.3 (pg. 76) e suas estruturas nas FIGURAS 4.18 a 4.20 (pgs. 77 a 78). Dentre os metabólitos identificados, constatou-se a predominância majoritária da classe de xantonas. Porém, notou-se também a presença de outras classes de compostos, como flavonoides e esteroides, na composição das subfrações do EER de *K. coriacea*. Após a análise, o perfil obtido por CLAE-EM de cada amostra foi analisado separadamente, sendo os valores de  $m/z$  dos picos de maior intensidade comparados com a literatura, identificando as substâncias presentes em cada subfração. Verificou-se que os espectros de absorção correspondentes a estes picos são de bandas de absorção no UV características de xantonas (CORTEZ et al., 1998; SILVA et al., 2016).

TABELA 4.3: Substâncias identificadas por CLAE-EM no modo positivo (ESI) das subfrações do EER de *K. coriacea*

Nº	Subfração	Substância	t <sub>r</sub> <sup>*</sup> (min)	m/z observada [M + H] <sup>+</sup>	m/z teórica	Fórmula molecular	Referência
1	FAE-2.4.3	quercetina-3- <i>O</i> -glucosídeo/ quercetina-3- <i>O</i> -galactosídeo	29,6	465,2894	465,2899	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>12</sub>	COQUEIRO, 2010
2		δ-tocotrienol	29,6	396,2937	396,3028	C <sub>27</sub> H <sub>39</sub> O <sub>2</sub>	DE MESQUITA et al., 2011
3	FAE-4.4	acilforoglucinol	28,5	529,3353	529,3529	C <sub>32</sub> H <sub>48</sub> O <sub>6</sub>	COQUEIRO et al., 2016
4	FAE-4.5.4	3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona	13,2	273,0210	273,0718	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	SOBRAL et al., 2009
5		2-hidroxi-1-metoxixantona	13,3	243,0006	243,0010	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	GOTTLIEB et al., 1970
6	FAE-4.7.3	4-hidroxi-2,3- metilenodioxixantona	12,2	257,0060	257,0056	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>5</sub>	SOBRAL et al., 2009
7		3-hidroxi-1,2-dimetoxixantona	13,0	273,0147	273,0718	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	DUARTE et al., 1968
8	FAE-4.8.2	kielcorina	14,3	437,0947	437,1192	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	COQUEIRO et al., 2016
9		4-hidroxi-2,3-dimetoxixantona	11,6	273,0213	273,0718	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	CORTEZ; MARSTON; HOSTETTMANN, 1999
10		lupeol	27,8	427,3269	427,3895	C <sub>30</sub> H <sub>50</sub> O	BARBOSA, 2015
11	FH-10	acilforoglucinol	28,6	529,3533	529,3529	C <sub>32</sub> H <sub>48</sub> O <sub>6</sub>	COQUEIRO et al., 2016
12		quercitrina	29,6	449,2519	449,1039	C <sub>21</sub> H <sub>20</sub> O <sub>11</sub>	COQUEIRO, 2010
13	FHA-7	2,8-dihidroxi-1-metoxixantona	10,4	259,0075	259,0562	C <sub>14</sub> H <sub>10</sub> O <sub>5</sub>	COQUEIRO et al., 2016
14		5-hidroxi-1,3-dimetoxixantona	11,5	273,0270	273,0718	C <sub>15</sub> H <sub>12</sub> O <sub>5</sub>	ANTONACCIO et al., 1965
15		kielcorina	14,3	437,1103	437,1192	C <sub>24</sub> H <sub>20</sub> O <sub>8</sub>	COQUEIRO et al., 2016

\* t<sub>r</sub>-Tempo de retenção

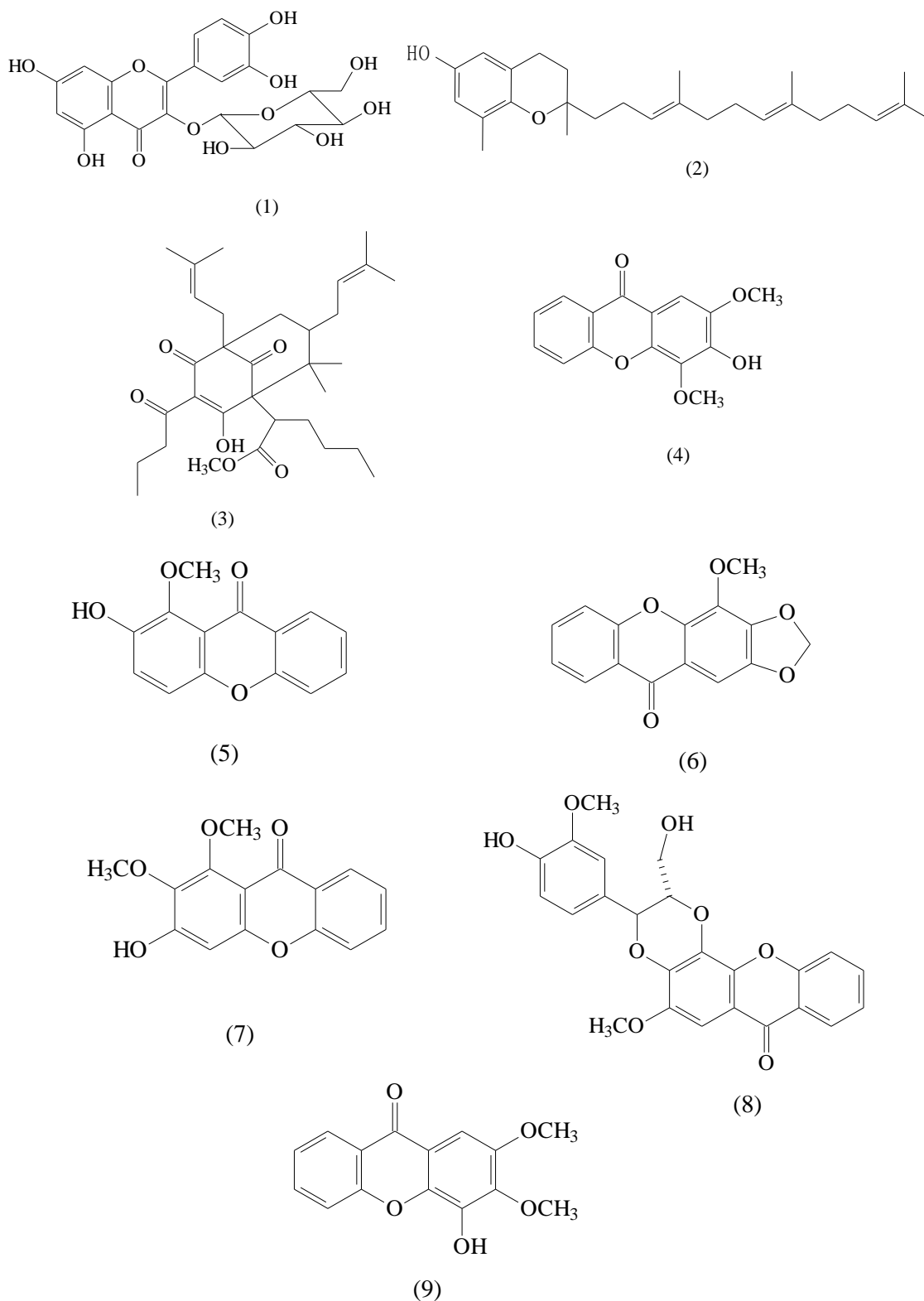
Legenda:

FAE-2.4.3/ FAE-4.4/ FAE-4.5.4/ FAE-4.7.3/ FAE-4.8.2 - subfrações provenientes da fração acetato de etila

FH-10 - subfração proveniente da fração hexano

FHA-7 - subfração proveniente da fração hidroalcoólica.

FIGURA 4.18: Substâncias identificadas por CLAE-EM no modo positivo (ESI) a partir das sufrações provenientes da fração acetato de etila do EER de *K. coriacea*



Assim, foi possível traçar o perfil químico das amostras analisadas por CLAE-EM. Os cromatogramas, bem como os espectros de massas, são apresentados no tópico ANEXOS 2 e 3.

FIGURA 4.19: Substâncias identificadas por CLAE-EM no modo positivo (ESI) a partir da sufração proveniente da fração hexano do EER de *K. coriacea*

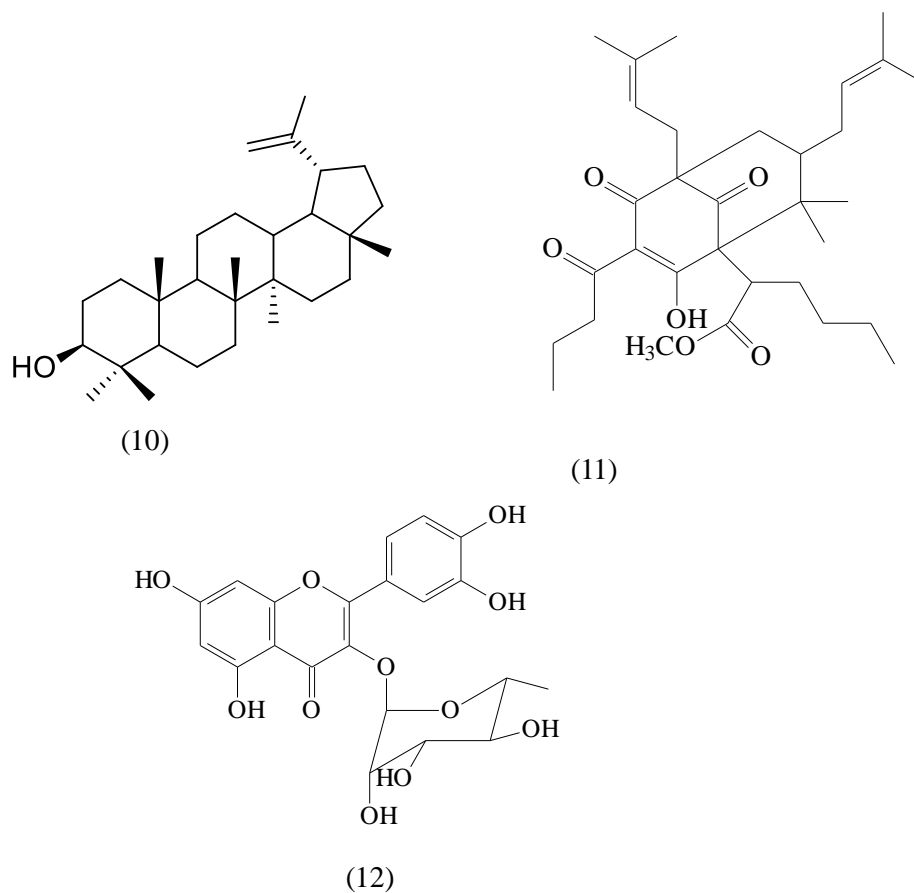
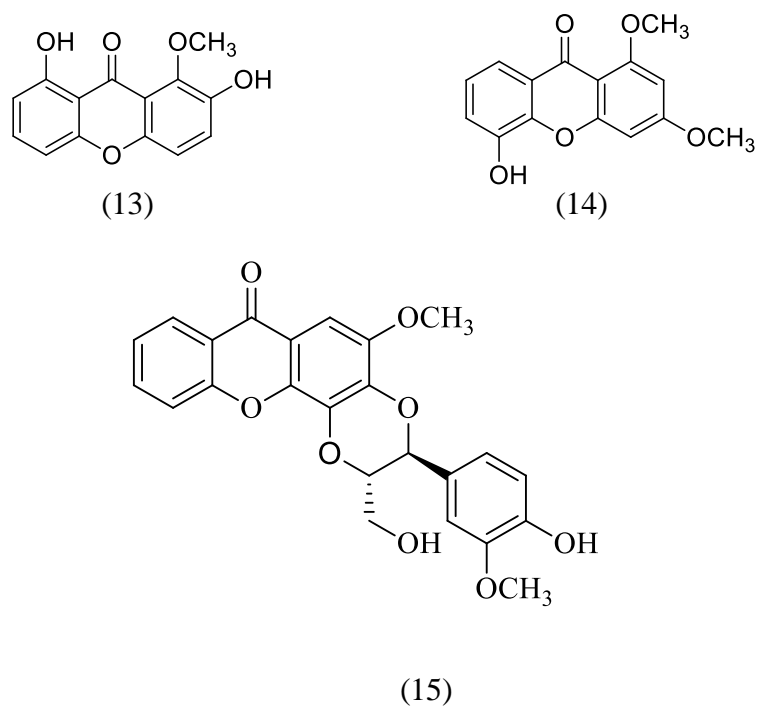


FIGURA 4.20: Substâncias identificadas por CLAE-EM no modo positivo (ESI) a partir da sufração proveniente da fração hidroalcoólica do EER de *K. coriacea*



### 4.3 ESTUDO BIOLÓGICO

O estudo biológico da espécie *K. coriacea* consistiu na avaliação do seu potencial antioxidante pelo método de inibição de radicais DPPH, antimicrobiano frente a bactérias e fungos, bem como antitumoral frente a células HeLa.

Os ensaios foram realizados inicialmente com o EER e as frações FH, FAE e FHA oriundas do mesmo. A partir de análises de RMN de <sup>1</sup>H, foram selecionadas para testes as subfrações provenientes da cromatografia em coluna dessas frações, consideradas promissoras em termos dos constituintes químicos presentes, além da substância isolada. Os microrganismos utilizados, bem como a linhagem de célula tumoral, foram selecionados em função dos estudos etnobotânicos apresentados previamente nesta dissertação (pgs. 8 e 9), considerando o uso de *K. coriacea* para as principais patologias citadas pelos membros da Comunidade Coqueiros.

#### 4.3.1 Atividade antioxidante

A avaliação da atividade antioxidante correlacionada com a atividade biológica do EER e suas frações FH, FAE e FHA foi realizada pelo método de sequestro de radicais com o DPPH. Os resultados de EC<sub>50</sub> são apresentados na TABELA 4.4 (pg. 79). O DPPH<sup>\*</sup> (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) é um radical livre com um elétron desemparelhado que previne sua dimerização, fenômeno observado também em outros radicais livres (CELLI; PEREIRA-NETTO; BETA, 2011; OLIVEIRA, 2015).

TABELA 4.4: Valores de potencial antioxidante do EER e suas frações de *K. coriacea* frente ao radical DPPH

Amostras	EC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )
EER	<b>458,87</b>
FH	651,03
FAE	<b>470,72</b>
FHA	<b>201,53</b>
ácido gálico	90,64

Legenda:

EER- Extrato etanólico da raiz de *Kielmeyera coriacea*

FH- Fração hexano

FAE- Fração acetato de etila

FHA- Fração hidroalcoólica.

Os resultados apontam FHA como a fração mais ativa ( $EC_{50}$  de  $201,53 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). De acordo com COQUEIRO e colaboradores (2013) que também avaliaram o potencial antioxidante de plantas do mesmo gênero, frente ao DPPH, encontrando resultados mais expressivos para as frações mais polares dos extratos das folhas e do caule de *K. variabilis* (frações acetato de etila e n-butanol com  $EC_{50}$  de  $3,5 \pm 0,3$  e  $4,4 \pm 0,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente).

As subfrações oriundas de FH, FAE e FHA de *K. coriacea* também foram ensaiadas frente ao DPPH (TABELA 4.5, pg. 80).

TABELA 4.5: Valores de  $EC_{50}$  das subfrações da FH, FAE e FHA de *K. coriacea* frente ao DPPH

Amostras	$EC_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
FAE-2.4.3	<b>104,62</b>
FAE-4.7.3	1761,68
FAE-4.8.2	2756,84
FH-9	370,29
FH-10	623,61
FHA-4	797,79
FHA-7	349,33
ácido gálico	2,65

Legenda:

FAE-2.4.3/ FAE-4.7.3/ FAE-4.8.2 - subfrações provenientes da fração acetato de etila

FH-9/ FH-10 - subfrações provenientes da fração hexano

FHA-4/ FHA-7 - subfrações provenientes da fração hidroalcoólica.

Os resultados revelaram valores de  $EC_{50}$  elevados, expressando a baixa atividade antioxidante das subfrações. A única subfração considerada promissora foi a FAE-2.4.3, com um valor de  $EC_{50}$  de  $104,62 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Essa fração foi submetida ao estudo do seu perfil químico pela técnica de CLAE-EM, resultando na identificação do flavonoide quercetina-3-*O*-glucosídeo e do esteroide  $\delta$ -tocotrienol. Um estudo realizado por ROSA e colaboradores (2010), para os mesmos ensaios supracitados, comprovaram a ação antioxidante do flavonoide quercetina-3-*O*-glucosídeo. valores de  $EC_{50}$  promissores estão relacionados à presença de metabólitos secundários de caráter polar, como os flavonoides, classe que possui polifenóis com ligações duplas e hidroxilas, conjugados com o anel aromático, capazes de doar elétrons por ressonância e estabilizar os radicais

livres. Sendo assim, as propriedades relacionadas com a estrutura de compostos fenólicos protegem contra o estresse oxidativo, reduzindo o risco de doenças cardíacas, prevenindo o câncer e retardando o processo de envelhecimento das células (DE OLIVEIRA, 2015).

Os potenciais benefícios dos flavonoides, assim como de outros compostos fenólicos, são determinados por evidências epidemiológicas da atividade antioxidante, cardioprotetora, anticarcinogênica, dentre outras. Muitos desses flavonoides são encontrados na natureza na forma glucosilada, com oxigênio (O-) ou com carbono (C-). A glucosilação se destaca por permitir a redução da reatividade e aumentar a hidrossolubilidade dos flavonoides (CELLI; PEREIRA-NETTO; BETO, 2011).

A vitamina E (tocotrienol) age como um redutor da oxidação da quercetina-3-*O*-glucosídeo, permitindo uma permanência maior do flavonoide para cumprir suas ações antioxidativas. Em contrapartida, a quercetina-3-*O*-glucosídeo protege a vitamina E da oxidação, com a qual também apresenta efeitos sinérgicos (ROSA, 2010).

#### **4.3.2 Atividade antimicrobiana**

Neste trabalho foi avaliada a atividade antimicrobiana do EER e das frações oriundas do mesmo (FH, FAE e FHA) frente a treze bactérias e três fungos, pelo método de microdiluição em caldo, determinando-se a CIM. Como controle negativo foi empregado o dimetilsulfóxido (DMSO), mesmo solvente utilizado para solubilizar as amostras, o qual não influenciou na atividade antimicrobiana. No intuito de avaliar a viabilidade celular dos microrganismos testados, utilizou-se o controle positivo para as bactérias foram utilizados antibióticos comerciais (estreptomicina, penicilina e clorexidina e tetraciclina); a anfotericina foi empregada frente aos fungos *Candida krusei* e *C. parapsilosis*. Os resultados apresentados nas TABELAS 4.6 e 4.7 (pgs. 82 e 84)8 5 apontaram valores de viabilidade semelhantes com os ensaios já realizados pelo laboratório, uma vez que os microrganismos foram inibidos em concentrações baixas, condizentes com a faixa de inibição contida no protocolo estabelecido pelo LAPeMA.

TABELA 4.6: Resultados da Concentração Inibitória Mínima em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do EER de *K. coriacea* e das frações oriundas do mesmo frente às bactérias avaliadas

Patologia	Bactérias	Amostras				Controles Positivos		
		EER	FH	FAE	FHA	estreptomicina	penicilina	clorexidina
	<i>Escherichia coli</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	2,95		
Diarreia	<i>Salmonella choleraesui</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	5,9		
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	2,95		
	<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>12,5</b>	> 400	<b>200</b>	> 400		0,09	
Infecções	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	<b>12,5</b>	> 400	<b>200</b>	> 400		0,18	
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	<b>25</b>	> 400	<b>200</b>	> 400		5,9	
Reumatismo	<i>Staphylococcus aureus</i>	<b>12,5</b>	> 400	<b>200</b>	> 400		0,74	
(febre reumática)	<i>Burkholderia cepacia</i>	> 400	> 400	> 400	> 400	5,9		
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	<b>6,25</b>	<b>200</b>	<b>25</b>	> 400		0,37	
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	<b>6,25</b>	> 400	> 400	> 400	5,9		
Infecções bucais	<i>Streptococcus mutans</i>	<b>50</b>	> 400	> 400	> 400			0,92
	<i>Lactobacillus casei</i>	<b>25</b>	> 400	> 400	> 400			3,69
	<i>Streptococcus sobrinus</i>	<b>100</b>	> 400	> 400	> 400			0,92

Legenda:

EER- Extrato etanólico da raiz de *Kielmeyera coriacea*

FH- Fração hexano

FAE- Fração acetato de etila

FHA- Fração hidroalcoólica.

Por meio da análise dos resultados da avaliação antimicrobiana observou-se que o EER e as frações FH e FAE apresentam diferentes níveis de atividade frente a cada microrganismo. Contudo, a fração FHA não apresentou atividade significativa frente aos microrganismos ( $CIM > 400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os resultados mais expressivos foram para o EER, o qual inibiu o crescimento de nove das treze bactérias em estudo, destacando-se a suscetibilidade de *S. pyogenes* e *P. aeruginosa* ( $CIM$  de  $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) (TABELA 4.6, pg. 82). De acordo com a literatura (RÍOS; RECIO, 2005; GIBBONS, 2008), um extrato vegetal ou fração são considerados promissores em um ensaio antimicrobiano quando apresentam valor de  $CIM$  igual ou inferior a  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  e para substâncias puras, um valor de  $CIM$  igual ou inferior a  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Portanto, o EER é considerado promissor, uma vez que o valor de  $CIM$  do mesmo foi menor que  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Bactéria *S. pyogenes*, as amostras EER, FH e FAE foram ativas ( $CIM$  de  $6,25 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $25 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente), demonstrando, o potencial antimicrobiano no combate à febre reumática e comprovando a importância de se considerar as informações de uso popular para estudos científicos, dado que os membros da Comunidade Coqueiros relataram o uso do chá da entrecasca e das folhas de *K. coriacea* para tal enfermidade.

Outra indicação de uso popular de *K. coriacea* pela Comunidade Coqueiros foi o consumo da entrecasca e galhos, por meio da mastigação, para evitar cáries. Neste contexto, ao avaliar o EER observou-se o potencial desta amostra com valores de  $CIM$  de  $25$ ,  $50$  e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  frente aos microrganismos *L. casei*, *S. mutans* e *S. sobrinus*, respectivamente, os quais estão relacionados à infecções bucais e cáries. Resultados semelhantes foram encontrados por DE AQUINO e colaboradores (2013), cujo extrato etanólico da entrecasca de *K. coriacea* inibiu o crescimento de *S. mutans* em concentração menor que  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Tais resultados tornam-se relevantes, uma vez que a partir dos mesmos surge o incentivo para a continuidade das pesquisas, vinculando-as ao desenvolvimento de produtos destinados a higiene bucal, por exemplo.

Com relação aos ensaios antifúngicos, os resultados mais expressivos foram para o EER e as frações FH e FAE frente à *C. glabrata* ( $CIM$  de  $7,81 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $500 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente). Destaca-se o EER, o qual foi ativo para os três fungos em estudo, apresentando um valor de  $CIM$  bem menor que as demais frações (TABELA 4.7, pg. 84). Tais resultados inferem que esta amostra, bem como as frações oriundas da mesma, com exceção da fração FHA, são capazes de inibir o crescimento destes microrganismos, causadores da candidíase (GEIGER; FOXMAN; SOBEL, 1995).

Valores de inibição semelhantes foram apresentados por BARBOSA (2015) para o extrato aquoso da entrecasca de *K. coriacea* e a fração acetato de etila, frente ao fungo *C. glabrata* (CIM de 15,62  $\mu\text{g mL}^{-1}$  para ambas as amostras).

TABELA 4.7: Resultados da Concentração Inibitória Mínima em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  do EER e frações de *K. coriacea* frente aos fungos avaliados

Patologia	Fungos	Frações			
		EER	FH	FAE	FHA
Candidíase	<i>Candida albicans</i>	<b>31,25</b>	> 2000	<b>500</b>	> 3000
	<i>Candida tropicalis</i>	<b>62,5</b>	2000	> 2000	> 3000
	<i>Candida glabrata</i>	<b>7,81</b>	<b>1000</b>	<b>500</b>	> 3000

Legenda:

EER- Extrato etanólico da raiz de *Kielmeyera coriacea*

FH- Fração hexano

FAE- Fração acetato de etila

FHA- Fração hidroalcoólica.

A partir da análise dos dados da avaliação antimicrobiana, foram selecionadas apenas as bactérias mais suscetíveis ao EER e suas frações para a realização de novos ensaios com as subfrações provenientes do fracionamento das frações. Conforme relatado previamente, as subfrações foram selecionadas de acordo com seus dados preliminares da fitoquímica e a análise de RMN de  $^1\text{H}$ . Os valores de CIM para essas subfrações se encontram nas TABELAS 4.8 e 4.9 (pgs. 85 e 87. As frações FAE-4.5.4, FAE-4.7.3 e FAE-4.8.2 apresentaram atividade moderada (CIM de 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 200  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente) apenas frente o *L. casei*, que é um dos causadores de cárie e infecções bucais. A fração que apresentou atividade para um maior número de bactérias foi a FAE-4.4, sendo ativa para quatro bactérias das sete em estudo.

TABELA 4.8: Resultados da Concentração Inibitória Mínima em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  das subfrações da FAE

Patologia	Bactérias	Subfrações					
		FAE 2.4.2	FAE 2.4.3	FAE 4.4	FAE 4.5.4	FAE 4.7.3	FAE 4.8.2
Infecções	<i>Staphylococcus aureus</i>	>400	>400	400	>400	400	>400
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	>400	>400	<b>100</b>	400	200	>400
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	>400	>400	<b>200</b>	>400	400	>400
Reumatismo	<i>Staphylococcus aureus</i>	>400	>400	<b>400</b>	400	400	>400
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	>400	>400	<b>100</b>	400	400	>400
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	>400	>400	400	>400	400	>400
Infecção bucal	<i>Lactobacillus casei</i>	>400	400	400	<b>200</b>	<b>200</b>	<b>100</b>

Legenda:

FAE-2.4.2/ FAE-2.4.3/ FAE-4.4/ FAE-4.5.4/ FAE-4.7.3/ FAE-4.8.2 - subfrações provenientes da fração acetato de etila.

O estudo do perfil químico da subfração FAE-4.4 por CLAE-EM indicou a presença de um derivado policíclico denominado de acilforoglucinol poliprenilado. COQUEIRO e colaboradores (2016) isolaram a partir do extrato etanólico dos galhos de *K. variabilis*, e avaliaram seu potencial antimicrobiano frente à *S. aureus*, obtendo valor de CIM de  $0,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ . A presença do acilforoglucinol poliprenilado na subfração em estudo pode estar relacionada à sua atividade promissora frente aos microrganismos *S. pneumoniae*, *S. epidermidis*, *S. aureus* e *S. pyogenes*.

As subfrações FAE-4.5.4, FAE-4.7.3 e FAE-4.8.2 apresentaram valores de CIM de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Além de serem submetidas à análise de CLAE-EM, sendo identificadas xantonas, uma classe que se destaca por possuir um elevado potencial antimicrobiano, o que pode justificar a ação antimicrobiana frente à bactéria *L. casei*. CORTEZ e colaboradores (2002) testaram o potencial antibacteriano da 1,3,7-triidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona, a qual apresentou atividade contra *S. aureus* com valor de CIM de  $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Nota-se que o valor de CIM para a xantona descrita é bem menor que para as subfrações em estudo (CIM de  $100\text{-}200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Esses valores distintos podem ser justificados devido a xantona descrita na literatura ser uma xantona prenilada, enquanto que nas analisadas e identificadas por CLAE-EM experimentalmente, são xantonas simples.

Das subfrações provenientes da fração hidroacoólica, apenas a FHA-7 apresentou atividade antimicrobiana moderada (CIM de  $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) frente ao microrganismo *L. casei*. Pela análise do perfil químico desta fração foram identificadas xantonas, destacando a kielcorina, pertencente a classe dos xantonolignoides que apresenta um lignoide (grupo fenilpropânico) ligado ao núcleo xantônico (PINHERO et al., 2003), as quais podem estar envolvidas no processo de inibição bacteriana.

Os resultados de CIM obtidos para as subfrações FH-9 e FH-10, provenientes da fração hexano, estão apresentados na TABELA 4.9 (pg. 87).

TABELA 4.9: Resultados da Concentração Inibitória Mínima (em  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) das subfrações oriundas da fração hexano (FH) e hidroalcoólica (FHA) do EER de *K. coriacea* frente a bactérias

Patologia	Bactérias	Subfrações			
		FH-9	FH-10	FHA-4	FHA-7
Infecções	<i>Staphylococcus aureus</i>	12,5	6,25	>400	>400
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	3,12	1,56	>400	>400
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	6,25	3,12	>400	>400
Reumatismo	<i>Staphylococcus aureus</i>	12,5	6,25	>400	>400
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	6,25	6,25	>400	>400
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	50	>400	>400
Infecção bucal	<i>Lactobacillus casei</i>	12,5	1,56	>400	200

Legenda:

FH-9/ FH-10 - subfrações provenientes da fração hexano

FHA-4/ FHA-7 - subfrações provenientes da fração hidroalcoólica.

A subfração FH-10 apresentou-se como potencial frente à *S. pneumoniae* (CIM de  $1,56 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), sendo aproximadamente, dez vezes mais ativa que o valor estabelecido pela literatura para uma substância pura (CIM de  $10 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Pelo estudo do perfil químico desta subfração, o acilforoglucinol poliprenilado e a quercitrina. É importante destacar que a substância acilforoglucinol poliprenilado é reportada como sendo um agente antimicrobiano (COQUEIRO et al., 2016).

Por meio do estudo realizado por MOCAN e colaboradores (2015) confirmou-se a ação antimicrobiana de um extrato que continha a quercitrina em sua composição química. Portanto, tais constituintes podem estar envolvidos na inibição dos microrganismos neste estudo.

Por fim, os valores de CIM das subfrações avaliadas frente a os fungos *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* são apresentados nas TABELAS 4.10 e 4.11 (pg. 88).

TABELA 4.10: Resultados da Concentração Inibitória Mínima em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de subfrações da fração acetato de etila (FAE) do EER de *K. coriacea*

Patologia	Fungos	Subfrações				
		FAE 2.4.3	FAE 4.4	FAE 4.5.4	FAE 4.7.3	FAE 4.8.2
Candidíase	<i>Candida albicans</i>	>400	>400	>400	>400	>400
	<i>Candida tropicalis</i>	>400	>400	>400	>400	>400
	<i>Candida glabrata</i>	>400	>400	>400	>400	>400

Legenda:

FAE-2.4.3/ FAE-4.4/ FAE-4.5.4/ FAE-4.7.3/ FAE-4.8.2 - subfrações provenientes da fração acetato de etila.

TABELA 4.11: Resultados da Concentração Inibitória Mínima em  $\mu\text{g mL}^{-1}$  de subfrações da fração hexano (FH) e hidroalcoólica (FHA) do EER de *K. coriacea*

Patologia	Fungos	Subfrações			
		FH 9	FH 10	FHA 4	FHA 7
Candidíase	<i>Candida albicans</i>	>400	>400	>400	>400
	<i>Candida tropicalis</i>	>400	>400	>400	>400
	<i>Candida glabrata</i>	>400	>400	>400	>400

Legenda:

FH-9/ FH-10 - subfrações provenientes da fração hexano

FHA-4/ FHA-7 - subfrações provenientes da fração hidroalcoólica.

Diante dos resultados apresentados acima, não foi observada nenhuma atividade antifúngica ( $\text{CIM} > 400 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). O controle positivo (anfotericina) foram frente aos fungos *C. krusei* e *C. parapsilosis*, obtendo CIM de 1,0 e 0,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente.

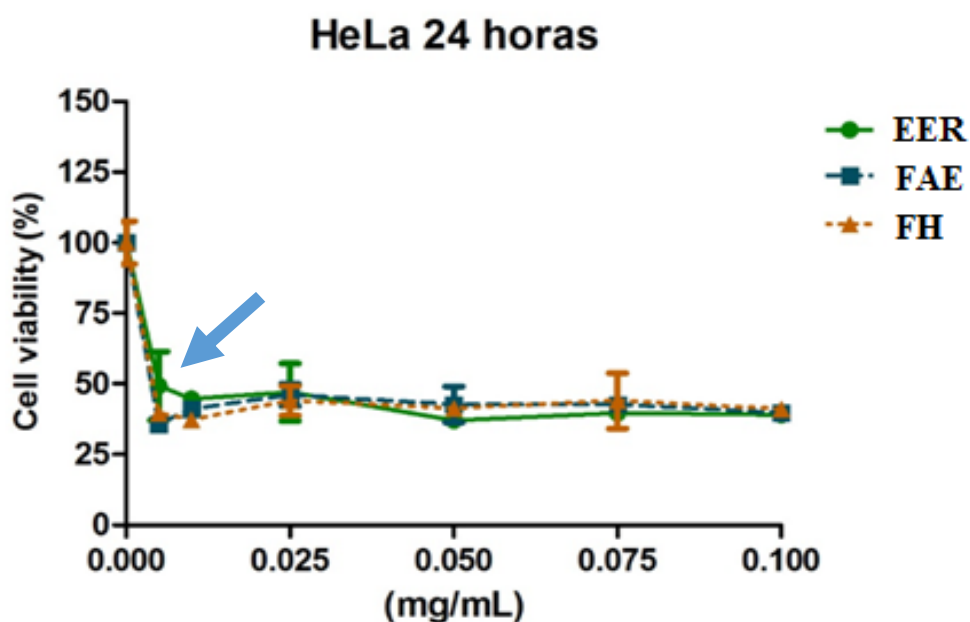
### 4.3.3 Atividade antitumoral

A partir do estudo etnobotânico realizado, os membros da Comunidade Coqueiros indicaram a entrecasca de *K. coriacea* para infecções no útero. Assim, EER e suas frações foram testados frente a células HeLa, as quais estão relacionadas ao câncer do cólon do útero.

Os valores de IC<sub>50</sub> foram determinados a partir do gráfico de percentual de inibição da viabilidade celular *versus* a concentração (mg mL<sup>-1</sup> e µg mL<sup>-1</sup>) de cada amostra.

Os resultados mais expressivos obtidos foram para as amostras EER, FH e FAE, com valores de IC<sub>50</sub> menores que 0,025 mg mL<sup>-1</sup> (FIGURA 4.21, pg. 89), revelando a citotoxicidade das amostras frente às células HeLa.

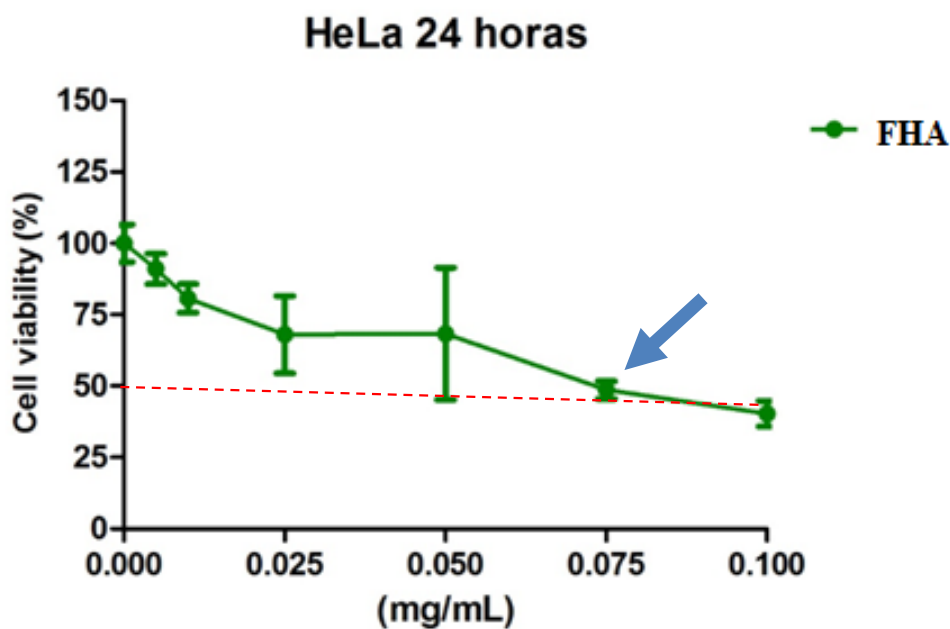
FIGURA 4.21: Avaliação da viabilidade celular da linhagem tumoral HeLa frente aos tratamentos com o EER e as frações FH e FAE nas concentrações 0,005; 0,010; 0,025; 0,05; 0,075 e 0,1 mg mL<sup>-1</sup>



Legenda:  
EER- Extrato etanólico da raiz de *Kielmeyera coriacea*  
FAE- Fração acetato de etila.  
FH- Fração hexano

A fração FHA foi menos ativa, apresentando um IC<sub>50</sub> de 0,076 mg mL<sup>-1</sup>. O gráfico do percentual de inibição da viabilidade celular *versus* a concentração da amostra está representado na FIGURA 4.22 (pg. 90)

FIGURA 4.22: Avaliação da viabilidade celular da linhagem tumoral HeLa frente ao tratamento com a fração FHA nas concentrações 0,005; 0,010; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1 mg mL<sup>-1</sup>

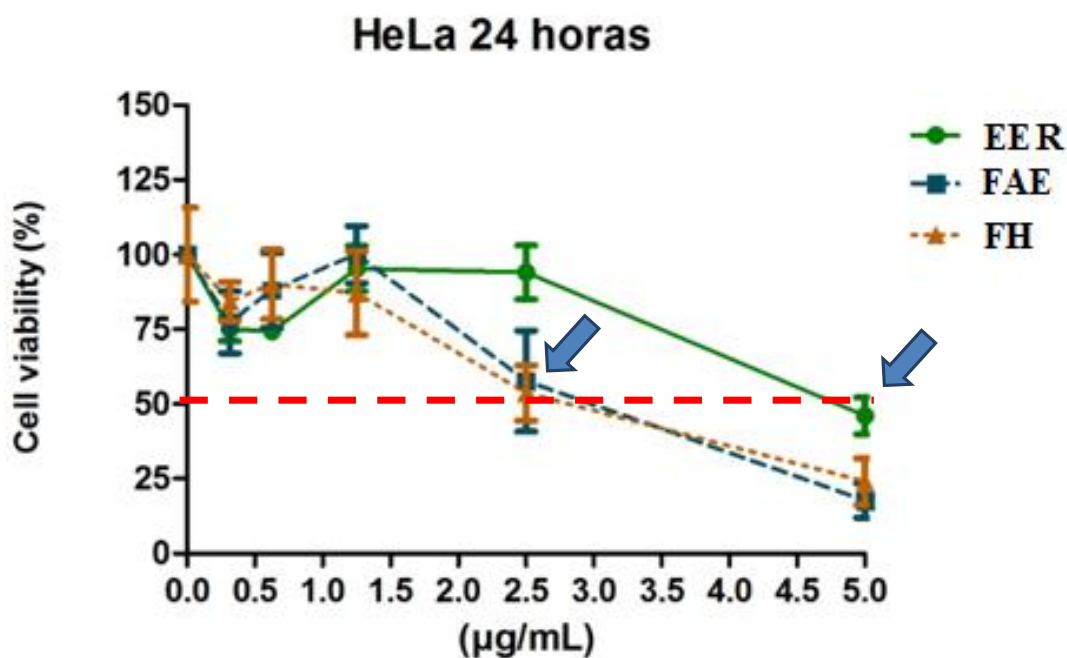


Legenda:  
FHA- Fração hidroalcoólica

Frente aos resultados, notou-se que nas concentrações empregadas para as amostras, estas se mostraram muito citotóxicas.

Assim, foi realizado um outro ensaio com o EER e as frações FH e FAE, em concentrações mais baixas (0,315; 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) (FIGURA 4.23, pg. 91). Para a FHA, as concentrações usadas foram suficientes para alcançar o IC<sub>50</sub>, em que a partir de 0,05 mg mL<sup>-1</sup> a amostra apresentou-se como citotóxica, não realizando assim ensaio adicional.

FIGURA 4.23: Avaliação da viabilidade celular da linhagem tumoral HeLa frente aos tratamentos com o EER e as frações FH e FAE nas concentrações 0,315; 0,625; 1,25; 2,5 e 5,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$



Legenda:  
 EER- Extrato etanólico da raiz de *Kielmeyera coriacea*  
 FAE- Fração acetato de etila.  
 FH- Fração hexano

Segundo a literatura, um extrato bruto é considerado promissor quando o mesmo apresenta um valor de  $\text{IC}_{50}$  menor que  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  (KHALIGHI-SIGAROODI et al., 2012; PIEME et al., 2014). A partir dos resultados obtidos, pôde-se observar que o EER foi citotóxico, pois inibiu a viabilidade das células de câncer do cólon do útero, com um  $\text{IC}_{50}$  de  $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , aproximadamente quatro vezes menor que o valor considerado promissor pela literatura.

As frações FH e FAE apresentaram valores de  $\text{IC}_{50}$  de  $2,87$  e  $2,76 \mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo  $1,7$  e  $1,8$  vezes mais potentes, respectivamente, que EER. Esses dados comprovam o aumento significativo da atividade citotóxica com o fracionamento do extrato, destacando a elevada atividade antitumoral. Os potenciais citotóxicos do extrato e frações testadas, expressos como viabilidade celular, frente à linhagem de células HeLa, são apresentados na TABELA 4.12 (pg. 92).

TABELA 4.12: Valores de IC<sub>50</sub> do EER e suas frações (concentrações de 0,315 - 5,0 µg mL<sup>-1</sup>) frente a células tumorais HeLa

Amostras	IC <sub>50</sub> (µg mL <sup>-1</sup> )
EER	5,0
FH	2,76
FAE	2,87
FHA	76,23

Legenda:

EER- Extrato etanólico da raiz de *Kielmeyera coriacea*

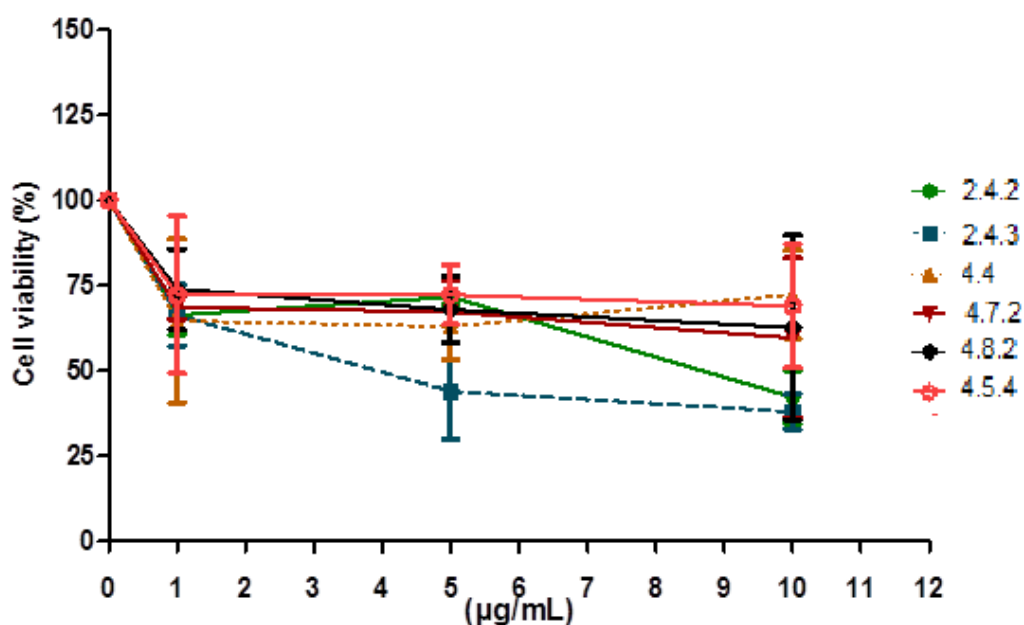
FH- Fração hexano

FAE- Fração acetato de etila

FHA- Fração hidroalcoólica.

As subfrações 2.4.2, 2.4.3, 4.4, 4.5.4, 4.7.3 e 4.8.2, provenientes da fração FAE, também foram submetidas ao ensaio em questão. Os valores de IC<sub>50</sub> foram calculados em µg mL<sup>-1</sup>, a fim de verificar em qual concentração as subfrações inibiriam 50% da viabilidade das células cancerígenas, em um período de 24 horas de incubação. As concentrações utilizadas para avaliação das subfrações foram de 1,0; 5,0 e 10,0 µg mL<sup>-1</sup>, determinadas com base no IC<sub>50</sub> encontradas para o ensaio realizado com a FAE (FIGURAS 4.24 e 4.25 pgs. 92 e 93, respectivamente).

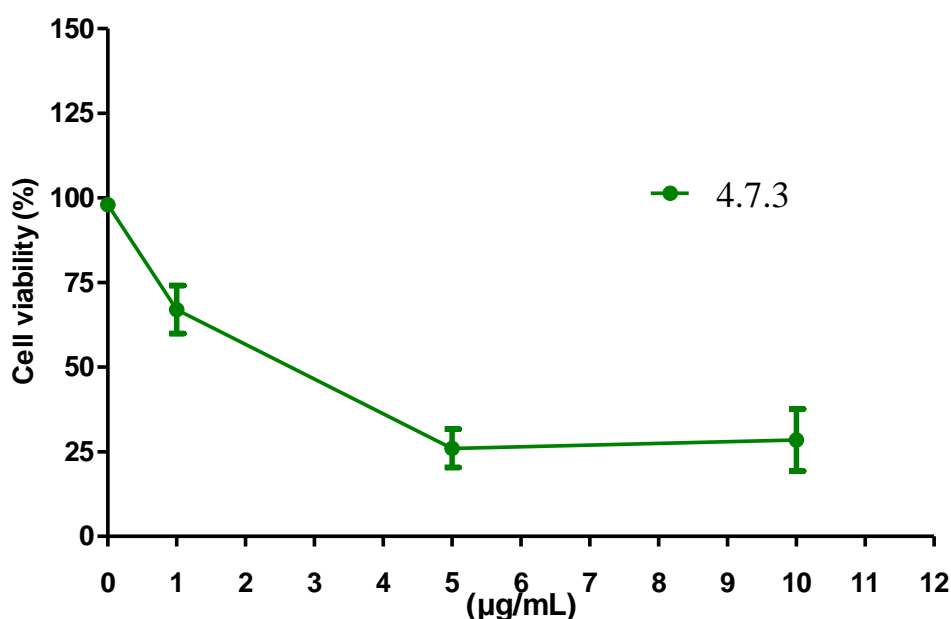
FIGURA 4.24: Avaliação da viabilidade celular da linhagem tumoral HeLa frente aos tratamentos com as subfrações da FAE



Legenda:

FAE-2.4.2/ FAE-2.4.3/ FAE-4.4/ FAE-4.5.4/ FAE-4.7.2/ FAE-4.8.2 - subfrações provenientes da fração acetato de etila

FIGURA 4.25: Avaliação da viabilidade celular da linhagem tumoral HeLa frente ao tratamento com a subfração 4.7.3 da FAE



Legenda:  
FAE-4.7.3 – subfração proveniente da fração acetato de etila

As subfrações que apresentaram resultados significativos foram FAE-2.4.3, FAE-4.4 e FAE-4.7.3, com valores de  $IC_{50}$  de  $3,54 \mu\text{g mL}^{-1}$ ,  $3,33 \mu\text{g mL}^{-1}$  e  $2,71 \mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Ao comparar os dados obtidos com aqueles reportados pela literatura (concentração de  $30 \mu\text{g mL}^{-1}$  para ser considerada ativa), as subfrações foram muito citotóxicas frente as células HeLa, com valores aproximadamente dez vezes menores.

Por meio do estudo do perfil químico da subfração FAE-2.4.3 constatou-se a presença do acilforoglucinol prenilado e do esteroide  $\delta$ -tocotrienol, possíveis substâncias responsáveis pela atividade biológica expressiva.

Segundo a literatura, o extrato hexano da casca da raiz de *K. coriacea* mostrou-se ativa em linhagens de células de tumores humanos nas seguintes culturas: MDA-MB-435 (melanoma), HCT-8 (cólon), HL-60 (leucemia) e SF-295 (glioblastoma). Deste extrato foi isolada uma mistura de constituintes contendo o derivado da vitamina E, os esteroides  $\delta$ -tocotrienol e seu peróxido-dímero. Essa mistura demonstrou possuir efeito citotóxico e antiproliferativo sobre tais células, causando alterações no ciclo celular como inibição na síntese de DNA e indução de morte por apoptose e necrose, o que

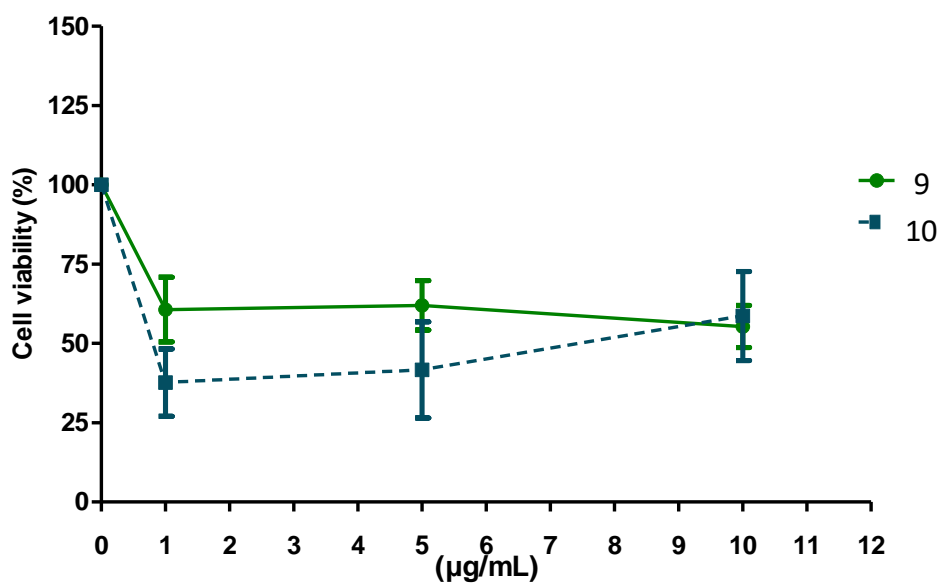
reafirma que os tocotrienóis possuem efeito antiproliferativo em células cancerígenas (DE MESQUITA et al., 2011; AGGARWAL et al., 2010).

Na subfração FAE-4.7.3 foram identificadas, via CLAE-EM duas xantonas: a 4-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona e a 3-hidroxi-1,2-dimetoxixantona. De acordo com a literatura, as xantonas também possuem potencial citotóxico devido seu esqueleto básico, e pode também pode variar de acordo com o tipo e a posição dos seus substituintes (CORRÊA, 2009).

Com relação às subfrações FH-9 e FH-10, apenas a última foi promissora ( $IC_{50}$  de  $0,89 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Já foi reportado que o aciloforoglucinol policíclico possui efeito citotóxico em linhagens de meduloblastoma e em células de câncer de mama, o que justifica a atividade promissora da subfração FH-10, já que o aciloforoglucinol foi identificado por CLAE-EM na mesma (SHEN et al., 2016) (FIGURA 4.26, pg. 94).

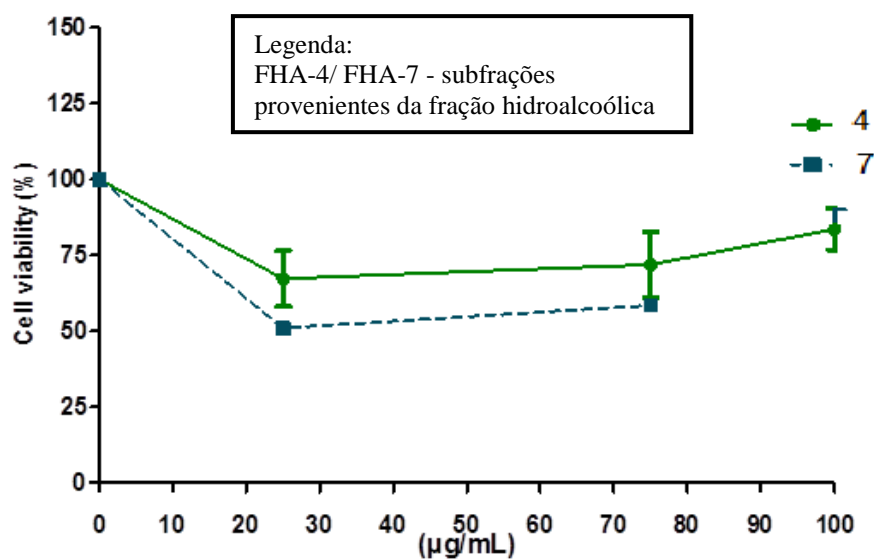
Para as subfrações FHA-4 e FHA-7 não foram obtidos resultados significativos, ou seja, não foi possível determinar  $IC_{50}$  para as mesmas concentrações ensaiadas. A fração FHA não apresentou resultado significativo, e mesmo realizando o estudo bioguiado com suas subfrações, os resultados não foram relevantes, conforme apresentado na FIGURA 4.27 (pg. 98).

FIGURA 4.26: Avaliação da viabilidade celular da linhagem tumoral HeLa frente aos tratamentos com as subfrações 9 e 10 de FH



Legenda:  
FH-9/ FH-10 - subfrações provenientes da fração hexano

FIGURA 4.27: Avaliação da viabilidade celular da linhagem tumoral HeLa frente aos tratamentos com as subfrações 4 e 7 da FHA



Na tabela (TABELA 4.13, pg. 95) constam todos os valores de  $IC_{50}$  obtidos frente às células HeLa. De forma, pode-se inferir que o EER de *K. coriacea* possui em potencial anticancerígeno. A toxicidade do EER e das frações oriundas do mesmo não foi avaliada em ensaios com células normais, portanto é necessária a verificação das amostras. A análise dos resultados possibilitou a observação que as subfrações FAE-2.4.3, FAE-4.4 e FH-10 inibiram significativamente o crescimento celular.

TABELA 4.13: Valores de  $IC_{50}$  das subfrações da FAE (concentrações de 1-100  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) em células tumorais HeLa

Amostras	$IC_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
FAE-2.4.2	*
FAE-2.4.3	3,54
FAE-4.4	3,33
FAE-4.5.4	*
FAE-4.7.3	2,71
FAE-4.8.2	*
FH-9	*
FH-10	0,89
FHA-4	*
FHA-7	*

\*Não atingiu o valor de  $IC_{50}$

Legenda:

FAE-2.4.2/ FAE-2.4.3/ FAE-4.4/ FAE-4.5.4/ FAE-4.7.3/ FAE-4.8.2 - subfrações provenientes da fração acetato de etila

FH-9/ FH-10 - subfrações provenientes da fração hexano

FHA-4/ FHA-7 - subfrações provenientes da fração hidroalcoólica.

#### 4.3.4 Estudo biológico para a 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona

A substância isolada no referente trabalho, a 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona com código FAE-4.7.2, foi submetida aos três ensaios biológicos supracitados. No ensaio antioxidante, ela apresentou uma baixa atividade em relação ao ácido gálico, com um  $EC_{50}$  de 1860,09  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Essa substância é pertencente à classe das xantonas simples, e como o próprio nome diz, são substâncias mais simples estruturalmente, apresentando funcionalidades com baixo peso molecular. Essa classificação é caracterizada pela presença do núcleo xantônico com algum substituinte, como uma hidroxila, metoxila, metila, dentre outras.

Geralmente a atividade biológica está relacionada com a estrutura química. A elevada atividade antioxidante de derivados fenólicos é atribuída aos substituintes OH (hidroxila) que atuam como doadores de próton. Esse fato torna-se possível devido à deslocalização de elétrons ao longo da molécula que estabiliza os radicais. Outro fator contribuinte para atividade é a planaridade dessas moléculas, pois esta permite a conjugação dos elétrons  $\pi$ , aumentando a estabilidade dos radicais livres (CORRÊA, 2009).

Nesse contexto, destaca-se a importância das hidroxilas na estrutura da molécula para o aumento da atividade antioxidante, uma vez que elas podem atuar na captura dos radicais livres (CORRÊA, 2009). Como a 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona possui apenas uma hidroxila em sua estrutura (FIGURA 4.5 pg. 62), esse fato pode ter justificado seu baixo potencial antioxidante.

A 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona isolada da subfração FAE-4.7.2 não apresentou atividade citotóxica frente às células HeLa, pois não atingiu o valor de  $IC_{50}$  nas concentrações testadas. De acordo com a literatura, esse fato pode estar relacionado à sua estrutura possuir apenas uma hidroxila, possuir dois substituintes (hidroxila e metoxila), além dela ser uma xantona di-oxigenada com metoxilas.

No que tange à atividade antitumoral, além do substituinte, a posição da substituição, a densidade eletrônica e a geometria molecular também pode influenciar na atividade biológica de um composto. Ou seja, compostos com densidade de carga eletrônica positiva aumentam a inibição do crescimento de células tumorais; efeito observado em compostos que apresentam anéis fundidos, como o cromeno, encontrados em xantonas. Essa forma estrutural é de extrema importância para a associação entre droga e biorreceptor (OLIVEIRA et al., 2007).

Em um estudo realizado por PEDRO e colaboradores (2002), foi avaliado o potencial de vinte e sete xantonas oxigenadas para inibição do crescimento de três linhagens de células cancerígenas, sendo elas a MCF-7 (células do câncer de mama), TK-10 (células cancerígenas reanis) e UACC-62 (células relacionadas ao melanoma). Os resultados demonstraram que as xantonas mono-oxigenadas com substituintes em posições diferentes apresentaram mudanças significativas na atividade inibitória. As xantonas com hidroxila na posição 2 foram quase inativas, enquanto que na posição 4, a substância passou a ter uma atividade considerável. Outra comparação foi a mudança do substituinte, trocando OH por OCH<sub>3</sub> (metoxila). Os resultados inferem que uma metoxila na posição 2 faz com que o composto apresente atividade inibitória nas células cancerígenas e mudando o substituinte para a posição 4 deixa o composto praticamente inativo.

Para as xantonas di-oxigenadas, se os substituintes forem apenas hidroxilas, há atividade biológica; o contrário ocorre quando os ligantes são metoxiladas. Já para compostos com hidroxila e metoxila, notou-se que sua atividade inibitória foi diminuída. No geral, as xantonas di-hidroxiladas, independente da posição, são mais ativas que as demais (mono-oxigenada e bi-oxigenada com metoxila), destacando assim a importância da presença da hidroxila na inibição do crescimento de células cancerígenas (CORRÊA, 2009).

Por fim, em ensaio antimicrobiano as xantonas têm se destacado pela sua atividade antibacteriana. Estudos realizados com xantonas preniladas e oxigenadas frente ao microrganismo *S. aureus* revelaram maior atividade antibacteriana das primeiras. Uma justificativa seria o fato dos grupos prenilados conferirem à molécula caráter mais hidrofóbico (apolar), ocasionando um aumento na sua interação com a membrana celular. Sendo assim, as xantonas cujos substituintes são mais hidrofóbicos tendem a apresentar maior potencial antibacteriano, enquanto que as xantonas hidroxiladas apresentam uma menor atividade antibacteriana (CORRÊA, 2009).

Neste contexto, a xantona isolada neste estudo não apresentou atividade biológica antimicrobiana expressiva, pois o valor de CIM foi acima de 400 µg mL<sup>-1</sup> frente a todos os microrganismos testados.

## 5. CONCLUSÃO

A partir do trabalho realizado foi possível investigar o potencial de *K. coriacea*, a partir de dados etnobotânicos, valorizando assim o saber popular, e ampliando o conhecimento acerca dos compostos possivelmente responsáveis pelos efeitos biológicos.

A partir do estudo bibliométrico realizado, obteve-se informações que possibilitaram relacionar temas de suma importância, como autores, universidades, palavras-chave, revistas e suas principais publicações sobre a espécie em estudo. Além disso, a bibliometria contribuiu para a organização do levantamento bibliográfico, etapa tão importante deste estudo, facilitando a disposição e análise das informações.

Por meio do estudo químico do extrato etanólico da raiz de *K. coriacea* foi isolado e identificada a substância 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona, pertencente à classe das xantonas, sendo esta já reportada no gênero *Kielmeyera*.

Pela análise por CLAE-EM das frações hexano, acetato de etila e hidroalcoólica, foi possível identificar: dois flavonoides (quercetina-3-*O*-glucosídeo/quercetina-3-*O*-galactosídeo e quercitrina), um esteroide ( $\delta$ -tocotrienol), um derivado policíclico (acilforoglucinol), um triterpenoide (lupeol) e sete xantonas (3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona, 2-hidroxi-1-metoxixantona, 4-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona, 3-hidroxi-1,2-dimetoxixantona, kielcorina, 2,8-dihidroxi-1-metoxixantona e a 5-hidroxi-1,3-dimetoxixantona).

Dos ensaios frente ao radical DPPH observou-se que a espécie *K. coriacea* é promissora em produzir substâncias antioxidantes, destacando-se o EER, a FHA e a FAE-2.4.3, os quais apresentaram valores de EC<sub>50</sub> de 458,87  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 201,53  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 104,62  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), respectivamente. Por CLAE-EM foi identificado na subfração FAE-2.4.3 o composto  $\delta$ -tocotrienol e a mistura dos flavonoides, podendo ter contribuído por sua atividade biológica expressiva.

Os ensaios biológicos frente às bactérias e fungos possibilitou a determinação da CIM das amostras em estudo, sendo que a fração FAE, sua subfração FAE-4.4, bem como a subfração FH-10 apresentaram valores de CIM promissores (25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 100  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 6,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), respectivamente, todas frente ao microrganismo *Streptococcus pyogenes*. A análise química por CLAE-EM de FAE-4.4 e FH-10 permitiu a identificação do acilforoglucinol para ambas as subfrações, uma substância já

relatada na literatura como antimicrobiana. Ademais, o EER se destacou por inibir o crescimento de *Candida glabrata* (CIM de 7,81  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Com relação aos ensaios de citotoxicidade, os resultados expressivos foram para FH, sua subfração FH-10 e FAE frente às linhagens de células HeLa, com  $\text{IC}_{50}$  de 2,76  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , 0,89  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e 2,87  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente. Pelo estudo do perfil químico de FH-10 foi identificado um triterpenoide o lupeol, um flavonoide a quercitrina e o acilforoglucinol, os quais podem ser considerados como os responsáveis pela citotoxicidade da subfração. Portanto, o estudo em questão revela o potencial de *K. coriacea* como sendo uma fonte promissora de substâncias citotóxicas. No entanto, enfatiza-se a necessidade da realização dos ensaios citotóxicos com células humanas saudáveis.

A substância isolada, 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona, também foi submetida aos três ensaios biológicos supracitados. Contudo, ela não apresentou atividade biológica relevante. De acordo com a literatura, esse fato pode estar relacionado à sua estrutura química, por ser uma xantona simples.

Conclusivamente, os dados confirmaram que o extrato da raiz de *K. coriacea*, possui um forte potencial biológico, correlacionado aos metabólitos pertencentes nesta espécie. Há relatos químicos sobre a *K. coriacea*, no entanto não há estudos químicos e biológicos para a raiz, enaltecendo a relevância deste estudo. Portanto, os resultados obtidos se tornam importantes e contribuem para a ampliação do conhecimento químico-biológico desta espécie.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGGARWAL, B. B.; SUNDARAM, C.; PRASAD, S.; KANNAPPAN, R. Tocotrienols, the vitamin E of the 21st century: Its potential against cancer and other chronic diseases. *Biochemical Pharmacology*, 80: 1613-1631, 2010.

ALKIMIM, W. O. **Calophyllaceae J. Agardh em Goiás e Tocantins & Hypericaceae Juss. no Distrito Federal, Brasil**. Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília. Brasília, 2014.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos- Uma breve revisão. *Rev Inst Adolfo Lutz*, 66(1): 1-9, 2007.

ANTONACCIO, L. D.; SILVA, L. G. F. E; CORREA, D. DE B.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHAES, M. T. Chemistry of Brazilian Guttiferae. III. xanthones from *Kielmeyera excelsa*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 37(2): 229-230, 1965.

ARANTES, V. P. **Studying of Antimycobactericide Activity of Vegetal Extracts from Brazilian's Cerrado**. Dissertação apresentada à Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" - UNESP. Araraquara, 2005.

ARAÚJO, C. A. Bibliometria: Evolução histórica e questões atuais. *Em Questão*, Porto Alegre, 12(1): 11-32, 2006.

BARBOSA, L. DE S. **Estudo químico e avaliação do potencial biológico de *Kielmeyera coriacea* (Calophyllaceae)**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Goiás. Catalão, 2015.

BIESDORFA, C.; CORTEZ, D. A. G.; AUDI, E. A. Caracterização morfológica da cortiça de *Kielmeyera coriacea* mart. do Cerrado brasileiro. *Phytomedicine*, 19: 374-377, 2012.

CALEARE, A. O.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; SILVA, S. DE. O.; NAKAMURA, C. V. Trypanocidal activity of 1,3,7-trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-xanthone isolated from *Kielmeyera coriacea*. *Parasitology International*, 62: 405-411, 2013.

CARVALHO, P. E. R. **Espécies Arbóreas Brasileiras**. V. 2, Colombo: Embrapa Florestas, 2006.

CASS, Q. B.; CASSIANO, N. **Cromatografia Líquida: Novas tendências e aplicações**. 1ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.

CASTELÃO, J. F. JR.; GOTTLIEB, O. R.; DE LIMA, R. A.; MESQUITA, A. A. L. Xanthonolignoids from *Kielmeyera* and *Caraipa* species <sup>13</sup> C NMR spectroscopy of xanthones. *Phytochemistry*, 16: 735-740, 1977.

CELLI, G. B.; PEREIRA-NETTO, A. B.; BETA, T. Comparative analysis of total phenolic content, antioxidant activity, and flavonoids profile of fruits from two varieties

of Brazilian cherry (*Eugenia uniflora* L.) throughout the fruit developmental stages. *Food Research International*, 44: 8, 2442-2451, 2011.

COQUEIRO, A.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R.; GUPTA, K. B. S. S.; DE MIERI, M.; HAMBURGER, M.; YOUNG, M. C. M.; STAPLETON, P.; GIBBONS, S.; BOLZANI, V. DA S. Antistaphylococcal Prenylated Acylphoroglucinol and Xanthenes from *Kielmeyera variabilis*. *Journal of Natural Products*, 79: 470-476, 2016.

COQUEIRO, A. **Fracionamento bioguiado para seleção de substâncias antioxidante, antimalárica e antibiótica potenciais nas espécies *Kielmeyera variabilis* (Clusiaceae) e *Brosimum glaziovii* (Moraceae)**. Tese apresentada ao Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista. São Paulo, 2010.

COQUEIRO, A.; REGASINI, L. O.; SKRZED, S. C. G.; QUEIROZ, M. M. F.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. DA S. Free Radical Scavenging Activity of *Kielmeyera variabilis* (Clusiaceae). *Molecules*, 18: 2376-2385, 2013.

CORREA, D. DE B.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHAES, M. T. Constituents of *Kielmeyera corymbosa*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 38(2): 269-271, 1966.

CORRÊA, R. DE S. **Xantonas oxigenadas bioativas: cristalização, estrutura e suas interações intra e intermoleculares**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Física, Universidade de São Paulo. São Carlos, 2009.

CORTEZ, D. A. G.; FILHO, B. A. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Antibacterial activity of a biphenyl and xanthenes from *Kielmeyera coriacea*. *Pharmaceutical Biology*, 40(7): 485-489, 2002.

CORTEZ, D. A. G., MARSTON, A., HOSTETTMANN, K. Separation of xanthenes and a biphenyl from *Kielmeyera coriacea* by centrifugal partition chromatography. *Chromatographia*, 50: 7-10, 1999.

CORTEZ, D. A. G.; YOUNG, M. C. M.; MARSTON, A.; WOLFENDER, J. L.; HOSTETTMANN, K. Xanthenes, triterpenes and a biphenyl from *Kielmeyera coriacea*. *Phytochemistry*, 47: 1367-1374, 1998.

DE ALMEIDA, M. F. **Derivados poliprenilados do floroglucinol de *Kielmeyera lathrophyton* e *K. Cuspidata*-Calophyllaceae**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2013.

DE AQUINO, F. J. T.; MARTINS, C. M.; MORAIS, S. A. L.; CUNHA, L. C. S.; ALOISE, G. R. G.; CHANG, R.; OLIVEIRA, A.; MORAES, T. S.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Antioxidant and antimicrobial activity of *Kielmeyera coriacea* Mart. and Zucc. *Academic Journal*, 7: 2722-2728, 2013.

DE MESQUITA, M. L.; ARAÚJO, R. M.; BEZERRA, D. P.; FILHO, R. B.; PAULA, J. E. DE.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. DE. LOTUFO, L. V. C.; ESPINDOLA, L.S. Cytotoxicity of  $\delta$ -tocotrienols from *Kielmeyera coriacea* against cancer cell lines. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 19: 623-630, 2011.

DE MESQUITA, M. L.; PAULA, J. E. DE.; PESSOA, C.; MORAES, M. O. DE.; COSTA-LOTUFO, L. V.; GROUGNET, R.; MICHEL, S.; TILLEQUIN, F.; ESPINDOLA, L. S. Cytotoxic activity of Brazilian Cerrado plants used in traditional medicine against cancer cell lines. *Journal of Ethnopharmacology*, 123: 439-445, 2009.

DE OLIVEIRA, G. G.; NETO, F. C.; DEMARQUE, D. P.; PEREIRA-JUNIOR, J. A. DE S.; FILHO, C. S. P.; DE MELO, S. J.; ALMEIDA, J. R. G. DA S.; LOPES, J. L. C.; LOPES, N. P. Dereplication of Flavonoid Glycoconjugates from *Adenocalymma imperatoris-maximilianii* by Untargeted Tandem Mass Spectrometry-Based Molecular Networking. *Planta med*, 2016.

DUARTE, A. P., CORRÊA, D. DE B., SILVA, L. G. F., GONÇALVES, S. J., GOTTLIEB, O. R. Constituintes de *Kielmeyera rupestris*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 40: 307-311, 1968.

DU, J.; TANG, X. L. Natural products against cancer: A comprehensive bibliometric study of the research projects, publications, patents and drugs. *Journal of Cancer Research and Therapeutics*, 10(5): 27-37, 2014.

DU, X.; WANG, W.; ZHANG, Q.; CHENG, J.; AVULA, B.; KHAN, I. A.; GUO, D. Identification of xanthenes from *Swertia punicea* using highperformance liquid chromatography coupled with *electrospray ionization* tandem mass spectrometry. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 26: 2913-2923, 2012.

FENG, R.; ZHANG, Y.; CHEN, X.; WANG, Y.; SHI, J.; CHE, C.; YEUNG, J. H. K.; MA, J.; TAN, X.; YANG, C.; DENG, Y.; ZHANG, Y. In vitro study on metabolite profiles of bioactive xanthenes isolated from *Halenia elliptica* D. Don by high performance liquid chromatography coupled to ion trap time-of-flight mass spectrometry. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 62: 228-234, 2012.

GARNATJE, T.; PEÑUELAS, J.; VALLÈS, J. Ethnobotany, Phylogeny, and ‘Omics’ for Human Health and Food Security. *Trends in Plant Science*, 22(3): 187-191, 2017.

GEIGER, A. M.; FOXMAN, B.; SOBEL, J. D. Chronic vulvovaginal candidiasis: characteristics of women with *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and *Candida Genitourin*. *Planta med*, 71: 304-307, 1995.

GIBBONS, S. Phytochemicals for Bacterial Resistance-Strengths, Weaknesses and Opportunities. *Planta med*, 2008.

GOMES, J. P. M. **Pesquisa de atividade antitumoral e mutagênica in vitro de produtos naturais**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências farmacêuticas, UNESP. Araraquara, 2008.

GOTTLIEB, O. R.; ANTONACCIO, L. D.; STEFANI, G.M.; MAGALHAES, M. T. 1,7,8- Trihydroxyxanthenes from *Kielmeyera petiolaris* and *K. excels*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 37(2): 229-30, 1965.

- GOTTLIEB, O. R.; MESQUITA, A. A. L.; NAGEM, T. J. H. Xanthones from *Kielmeyera rubriflora*. *Phytochemistry*, 10(9): 2253-2255, 1971.
- GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T.; STEFANI, G. M. 1,2,8-trioxygenated xanthones from *Kielmeyera petiolaris*. *Tetrahedron*, 22(6): 1785-1788, 1966.
- GOTTLIEB, O. R.; MESQUITA, A. A. L.; DA SILVA, E. M.; MELO, DE T. Xanthones of *Kielmeyera ferruginea*. *Phytochemistry*, 8: 665-666, 1969.
- GOTTLIEB, O. R.; MESQUITA, A. A. L.; DE OLIVEIRA, G. G.; DE MELO, M. T. Xanthones from *Kielmeyera speciosa*. *Phytochemistry*, 9: 2537-2544, 1970.
- GOTTLIEB, O. R.; NAGEM, T. J. 2-Hydroxy-3,4-Dimethoxyxanthone from *Kielmeyera* species. *Revista Latinoamericana Química*, 8(12): 137-138, 1977.
- GUARIM-NETO, G., MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do Cerrado de Mato Grosso: Um estudo bibliográfico. *Acta Botânica Brasileira*, 17: 561-584, 2003.
- KALADEVI, V.; PREETHA, S. S. Ethnoveterinary important plants in kulathupuzha reserve forest area, kerala. *International Journal of Advanced Biological Research*, 5(1): 50-53, 2015.
- KATO, L.; OLIVEIRA, C. M. A.; BITTRICH, V.; AMARAL, M. C. E. Xanthones from *Weddellina squamulosa* Tul. (Podostemaceae). *Biochemical Systematics Ecology*, 3: 331-334, 2005.
- KAWASE, K. Y. F. **Obtenção, caracterização e aplicação do óleo essencial de orégano (*Origanum vulgare* L.)**. Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Processos Químicos e Bioquímicos, Universidade Federal do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2013.
- KHALIGHI-SIGAROODI, F.; AHVAZI, M.; HADJIAKHOONDI, A.; TAGHIZADEH, M.; YAZDANI, D.; KHALIGHI-SIGAROODI, S.; BIDEI, S. Cytotoxicity and Antioxidant Activity of 23 Plant Species of Leguminosae Family. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 11(1): 295-302, 2012.
- KIJJOA, A.; GONZALEZ, M. J.; PINTO, M. M. M.; SILVA, A. M. S.; ANANTACHOKE, C.; HERZ, W. Xanthones from *Calophyllum teysmanni* Var. *inophylloid*. *Phytochemistry*, 55: 833-836, 2000.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, 1: 147-155, 2005.
- LIMA, I. L. P.; SCARIOT, A.; DE MEDEIROS, M. B.; SERVILHA, A. C. Diversidade e uso de plantas do Cerrado em comunidade de Geraizeiros no norte do estado de Minas Gerais, Brasil. *Acta Botânica Brasileira*, 26(3): 675-684, 2012.
- LOPES, J. L. C.; LOPES, J. N. C.; GILBERT, B.; BONINI, S. E. Osajaxanthone from *Kielmeyera coriacea*. *Phytochemistry*, 16(7): 1101, 1977.

MACHADO, H.; NAGEM, T. J.; PETERS, V. M.; FONSECA, C. S.; OLIVEIRA, T. T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. *Boletim do Centro de Biologia da Reprodução*, Juiz de Fora, 27:(1/2), 33-39, 2008.

MARINHO, E. B.; OLIVEIRA, A. L.; ZANDONADI, D. B.; BENEDITO, L. E. C.; SOUZA, R. B.; FIGUEIREDO, C. C.; BUSATO, J. G. Organic matter pools and nutrient cycling in different coffee production systems in the Brazilian Cerrado. *Afroforest Syst.* 88: 767-778, 2014.

MARTINS, C. M. **Estudo Químico: Atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc (Pau-Santo) do Cerrado.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2012.

MIATTO, R. C., WRIGHT, I. J. W., BATALHA, M. A. Relationships between soil nutrient status and nutrient-related leaf traits in Brazilian Cerrado and seasonal forest communities. *Plant soil*, DOI 10.1007/s11104-016-2796-2, 2016.

MINAMI, H.; KINOSHITA, M.; FUKIYAMA, Y.; KODAMA, M.; YOSHIZAWA, T.; SUGIURA, M.; NAKAGOWA, K.; TAGO, H. Antioxidant xanthenes from *Garcinia subelliptica*. *Phytochemistry*, 36(2): 501-506, 1994.

MISHRA, G.; KHOSA, R. L.; SINGH, P.; TAHSEEN, M. A. Ethnobotany and phytopharmacology of *Leea indica*: An overview. *Journal of Coastal Life Medicine*, 4(1): 69-72, 2016.

MOCAN, A.; VLASE, L.; VODNAR, D. C.; GHELDIU, A.; OPREAN, R.; CRISAN, G. Antioxidant, Antimicrobial Effects and Phenolic Profile of *Lycium barbarum* L. Flowers. *Molecules*, 20: 15060-15071, 2015.

MONGALO, N. I.; MCGAW, L. J.; SEGAPELO, T. V.; FINNIE, J. F.; VAN STADEN, J. Ethnobotany, phytochemistry, toxicology and pharmacological properties of *Terminalia sericea* Burch. ex DC. (Combretaceae) - A review. *Journal of Ethnopharmacology*, 789-802, 2016.

MORIOKA, S. N. **O desafio da integração da sustentabilidade no sistema de mensuração de desempenho corporativo: Contribuições de um estudo bibliométrico e estudos de casos.** Dissertação apresentada à Escola Politécnica, Universidade de São Paulo. São Paulo, 2014.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *Journal of Immunological Methods*, 65: 55-63, 1983.

MOURA, C. M. **Estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc (pau-santo) do Cerrado.** Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2012.

NAGEM, T. J.; SILVA, M. DE A. Xanthonas and phenylcoumarins from *Kielmeyera pumila*. *Phytochemistry*, 27(9): 2961-2962, 1988.

NOVAES, P.; MOLINILLO, J. M. G.; VARELA, R. M.; MACÍAS, F. A. Ecological phytochemistry of Cerrado (Brazilian Savanna) plants. *Phytochemistry Reviews*, 12: 839-855, 2013.

NUNES, J. DE M. **Xanthonas, benzopiranos e floroglucinois diméricos em culturas de tecidos de espécies de *Hypericum* nativas do sul do Brasil**. Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre, 2014.

OBICI, S.; OTOBONE, F. J.; SELA, V. R. DA S.; ISHIDA, K.; DA SILVA, J. C.; NAKAMURA, C. V.; CORTEZ, D. A. G.; AUDI, E. A. Preliminary toxicity study of dichloromethane extract of *Kielmeyera coriacea* stems in mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 115: 131-139, 2008.

OJIMA, I. Modern natural products chemistry and drug discovery. *Journal of Medicinal Chemistry*, 51: 2587-2588, 2008.

OLIVEIRA, A. M. A. G.; OLIVEIRA-CAMPOS, A. M. F.; RODRIGUES, L. M.; RAPOSO, M. M. M.; MACHADO, A. E. H.; NASCIMENTO, M. S. J.; NAZARETH, N.; PINTO, M. Synthesis and Antitumor Evaluation of Benzopsoresalen Analogues. *Chemistry & Biodiversity*, 4: 2007.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do DPPH. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 17: 1, 36-44, 2015.

PARRA, J. DE LA.; QUAVE, C. L. Ethnophytotechnology: Harnessing the Power of Ethnobotany with Biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 35 (9): 802-806, 2017.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S.; VYVYAN, J. R. **Introdução à espectroscopia**. 4ª ed. São Paulo: Cengage Learning, 2013.

PEDRO, M.; CERQUEIRA F.; SOUSA, M. E.; NASCIMENTO, M. S. J.; PINTO, M. Xanthonas as Inhibitors of Growth of Human Cancer Cell Lines and Their Effects on the Proliferation of Human Lymphocytes In Vitro. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 10: 3725-3730, 2002.

PIEME, C. A.; KUMAR, S. G.; DONGMO, M. S.; MOUKETTE, B. M.; BOYOUUM, F. F.; NGOGANG, J. Y.; SAXENA, A. K. Antiproliferative activity and induction of apoptosis by *Annona muricata* (Annonaceae) extract on human cancer cells. *Complementary and Alternative Medicine*, 14: 516, 2014.

PIMENTA, A.; MESQUITA, A. A. L.; CAMEY, M.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHAES, M. T. Chemistry of Brazilian Guttiferae: Xanthonic constituents of *Kielmeyera coriacea*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 36(1): 39-41, 1964.

PINHEIRO, L.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D.; FERREIRA, A. G.; YOUNG, M. C. M.; CORTEZ, D. A. G. Antibacterial Xanthones from *Kielmeyera variabilis* Mart. (Clusiaceae). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 98(4): 549-552, 2003.

PINTO, M. M. DE M.; MESQUITA, A. A. L.; GOTTLIEB, O. R. Xanthonolignoids from *Kielmeyera coriacea*. *Phytochemistry*, 26 (7): 2045-2048, 1987.

RIBEIRO, J. F.; DA FONSECA, C. E. L.; SILVA, J. C. S. **Cerrado: Caracterização e recuperação de Matas de Galeria**. Planatilna: Embrapa Cerrados, 2001.

RÍOS, J. L.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, 100: 80-84, 2005.

RIOS, P. D.; MORI, F. A.; BARBOSA, A. C. M. C. Morphological characterization of *Kielmeyera coriacea* Mart. Cork from Brazilian Cerrado. *SciELO*, 17(3): 387-392, 2011.

RODRIGUES, E.; CARLINI, E. A. Ritual use of plants with possible action on the central nervous system by the Kraho Indians, Brazil. *Phytotherapy Research*, 19: 129-135, 2005.

RODRIGUES, J. S. C. Estudo etnobotânico das plantas aromáticas e medicinais. Curso teórico-prático. *Ameal*. 8(57): 168-174, 2007.

RODRIGUES, T.; CATÃO, E.; BUSTAMANTE, M. M. C.; QUIRINO, B. F.; KRUGER, R. H.; KYAW, C. M. Seasonal effects in a lake sediment archaeal community of the Brazilian Savanna. *Archaea (Vancouver, B.C.)*, 957145, 2014.

ROSA, E. A. DA.; SILVA, B. C. E.; DA SILVA, F. M.; TANAKA, C. M. A.; PERALTA, R. M.; DE OLIVEIRA, C. M. A.; KATO, L.; FERREIRA, H. D.; DA SILVA, C. C. Flavonoides e atividade antioxidante em *Palicourea rigida* Kunth, Rubiaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 20(4): 484-488, 2010.

ROSOLEN, V.; DE CAMPOS, A. B.; GOVONE, J. S.; ROCHA, C. Contamination of wetland soils and floodplain sediments from agricultural activities in the Cerrado Biome (State of Minas Gerais, Brazil). *Catena*, 128: 203-210, 2015.

ROUHI-BOROJENI, H.; ASADI-SAMANI, M.; MORADI, M. T. A review of the medicinal plants effective on headache based on the ethnobotanical documents of Iran. *Scholars Research Library*, 8(3): 37-42, 2016.

RUFINO, M. DO S. M.; ALVES, R. E.; DE BRITO, E. S.; DE MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. DE G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre DPPH. *Comunicado técnico online*, ISSN 1679-6535, 2007.

RUHFEL, B. R. **Systematics and biogeography of the clusioid clade (Malpighiales)**. Dissertation presented to The Department of Organismic and Evolutionary Biology, Harvard University Cambridge. Massachusetts, 2011.

RUHFEL, B. R.; STEVENS, P. F.; DAVIS, C. C. Combined morphological and molecular phylogeny of the Clusioid clade (Malpighiales) and the Placement of the ancient rosid macrofossil *Paleoclusia*. *International Journal of Plant Sciences*, 174(6): 910-936, 2013.

SANO, S. M.; DE ALMEIDA, S. P.; RIBEIRO, J. F. **Cerrado: Ecologia e Flora**. V.1. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2008.

SANTOS, A. P. B.; SANTO, F. DA S. DO E.; RAPINI, A. Flora da Bahia: Calophyllaceae. *Sitientibus série Ciências Biológicas*, ISSN 2238-4103, 2015.

SARKER, S. D.; NAHAR, L.; KUMARASAMY, Y. Microtitre plate-based antibacterial assay incorporating resazurin as an indicator of cell growth, and its application in the in vitro antibacterial screening of phytochemicals. *Methods*, 42: 321-324, 2007.

SELA, V. R.; HATTANDA, I.; ALBRECHT, C. M.; DE ALMEIDA, C. B.; OBICI, S.; CORTEZ, D. A.; AUDI, E. A. Effect of xanthone from *Kielmeyera coriacea* stems on serotonergic neurons of the median raphe nucleus. *Phytomedicine*, 17: 274–278, 2010.

SHEN, K.; LU, F.; XIE, J.; WU, M.; CAI, B.; LIU, Y.; ZHANG, H.; TAN, H.; PAN, Y.; XU, H. Cambogin exerts anti-proliferative and pro-apoptotic effects on breast adenocarcinoma through the induction of NADPH oxidase 1 and the alteration of mitochondrial morphology and dynamics. *Oncotarget*, 7(31): 50596-50611, 2016.

SILVA, E. M. P.; BARROS, C. M. R. F.; SANTOS, C. M. M.; BARROS, A. S.; DOMINGUES, M. R. M.; SILVA, A. M. S. Characterization of 2,3-diaryl-xanthenes by *electrospray* mass spectrometry: gas-phase chemistry versus known antioxidant activity properties. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 30: 2228-2236, 2016.

SILVA, L. G. F.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Constituintes da *Kielmeyera rosea*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 40(2): 155-156, 1968.

SMITH, C. A.; O'MAILLE, G.; WANT, E. J.; QIN, C.; TRAUGER, S. A.; BRANDON, T. R.; THEODORE, R.; CUSTODIO, D. E.; ABAGYAN, R.; SIUZDAK, G. METLIN: A metabolite mass spectral database. *Therapeutic drug monitoring*, 27(6): 747-751, 2005.

SOBRAL, I. S. **Estudo químico e atividade antimicrobiana do caule da *Kielmeyera cuspidata* (Clusiaceae)**. Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal da Bahia. Salvador, 2006.

SOBRAL, I. S.; SOUZA-NETA, L. C.; COSTA, G. A. N.; GUEDES, M. L. S.; MARTINS, D.; CRUZ, F. G. Xantonas, triterpenos e atividade antibacteriana do extrato em diclorometano de *Kielmeyera cuspidata* Saddi, Clusiaceae. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, 19(3): 686-689, 2009.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Calophyllaceae e Hypericaceae, botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil**, baseado em APG III. 3ª ed. São Paulo: Instituto Plantarum, 2012.

STEVENS, P. F., 2012. Calophyllaceae. Angiosperm Phylogeny Website. Versão 12, julho 2012. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em: 10 mai. 2016.

TEIXEIRA, E. W.; MESSAGE, D.; NEGRI, G.; SALATINO, A.; STRINGHETA, P. C. Seasonal Variation, Chemical Composition and Antioxidant activity of Brazilian Propolis Samples. *eCAM*, 7(3): 307-315, 2010.

TRAD, R. J.; CORTEZ, M. B. DE. S.; BITTRICH, V.; AMARAL, M. DO. C. E. Estudo da anatomia foliar no complexo *Kielmeyera coriacea* (Calophyllaceae). 64º Congresso Nacional de Botânica. Belo Horizonte, 2013.

VANTI, N. A. P. Da bibliometria à webometria: Uma exploração conceitual dos mecanismos utilizados para medir o registro da informação e a difusão do conhecimento. *Revista Ciência da Informação*, Brasília, 31(2): 152-162, 2002.

WALTER, B. M. T. **Fitofisionomias do bioma Cerrado: Síntese terminológica e relações florísticas**. Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biológicas, Universidade de Brasília (UnB). Brasília, 2006.

WITTENAUER, J.; FALK, S.; SCHWEIGGERT-WEISZ, U.; CARLE, R. Characterisation and quantification of xanthenes from the aril and pericarp of mangosteens (*Garcinia mangostana* L.) and a mangosteen containing functional beverage by HPLC-DAD-MS<sup>n</sup>. *Food Chemistry*, 134: 445-452, 2012.

WOO, H.; JEONG, B. R.; KOO, K. B.; CHOI, J. W.; HIRSCH, A. M.; HAWES, M. C. Modifying expression of closely related UDP-glycosyltransferases from pea and *Arabidopsis* results in altered root development and function. *Physiologia Plantarum*, 130: 250-260, 2007.

ZAGOTO, J. N., BRACHT, A., PAGADIGORRIA, C. L. S., ISHII-IWAMOTO, E. L., CORTEZ, D. A. G., YAMAMOTO, N. S. Effects of the *Kielmeyera coriacea* extract on energy metabolism in the rat liver. *Journal of Ethnopharmacology*, 105: 47-54, 2006.

ZHANG, Y.; ZHANG, Y.; SHI, K.; YAO, X. Research development, current hotspots, and future directions of water research based on MODIS images: a critical review with a bibliometric analysis. *Environmental Science and Pollution Research*, DOI 10.1007/s11356-017-9107-1, 2017.

# ANEXOS

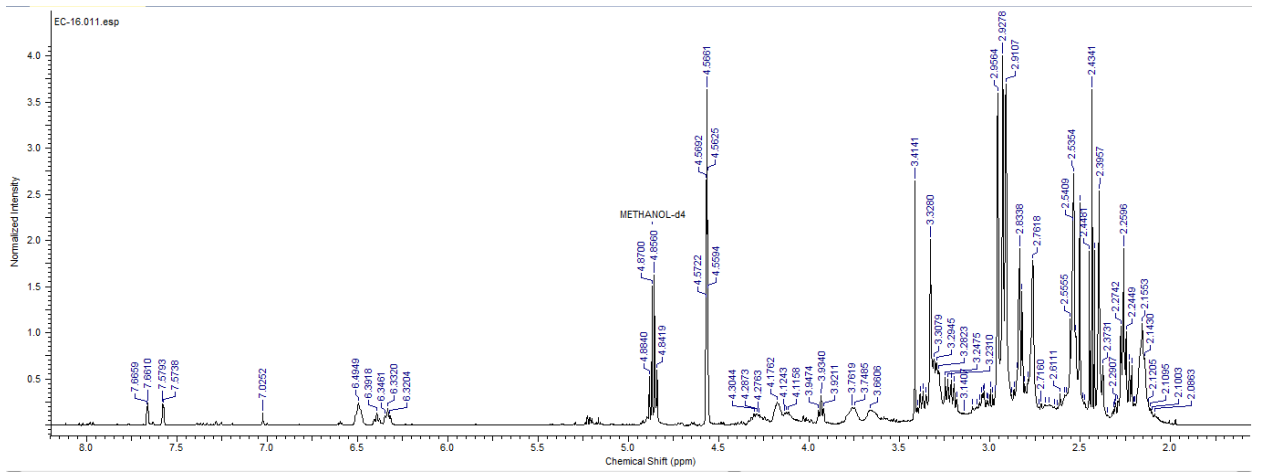
0.1 RMN de  $^1\text{H}$  do extrato e das  
frações:

Extrato etanólico da raiz (EER);

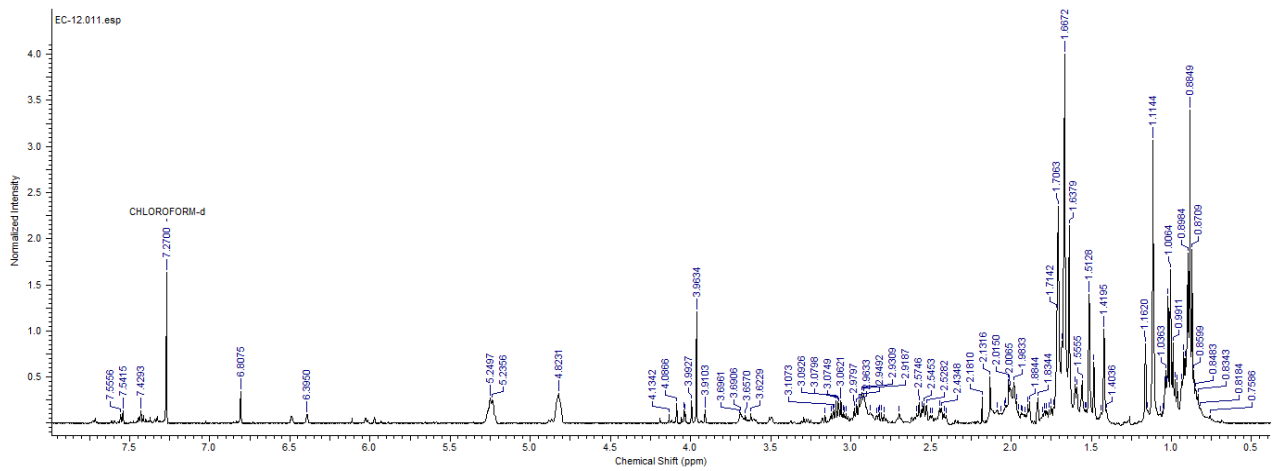
Hexano (FH);

Acetato de etila (FAE);

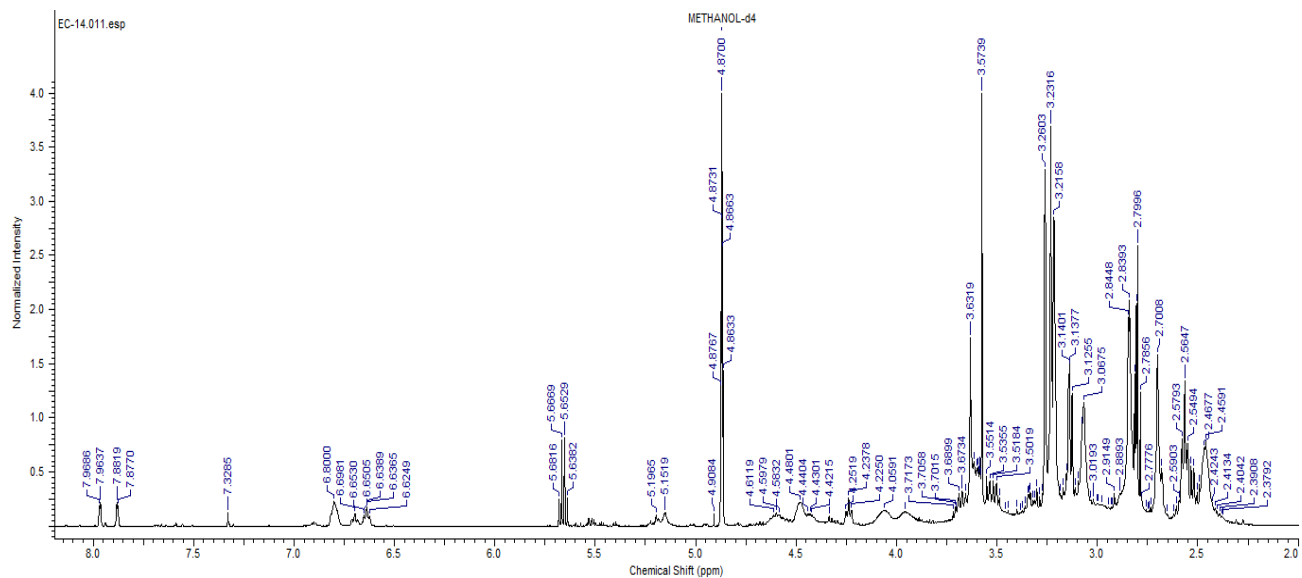
Hidroalcoólica (FHA).



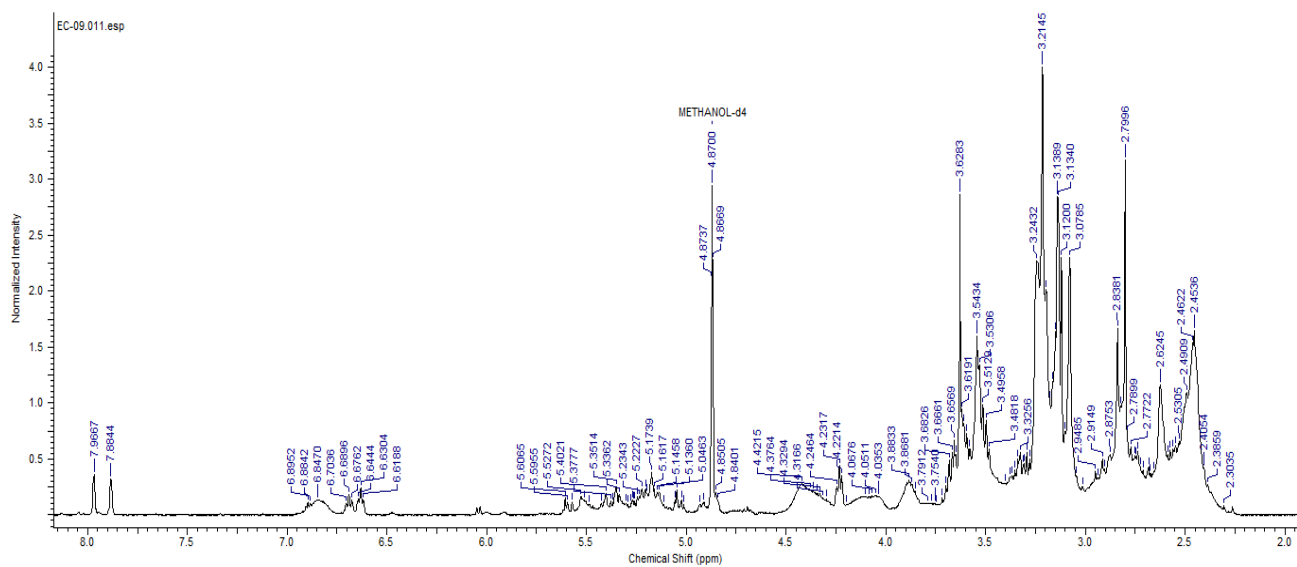
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  do extrato etanólico da raiz ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)



Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração hexano ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



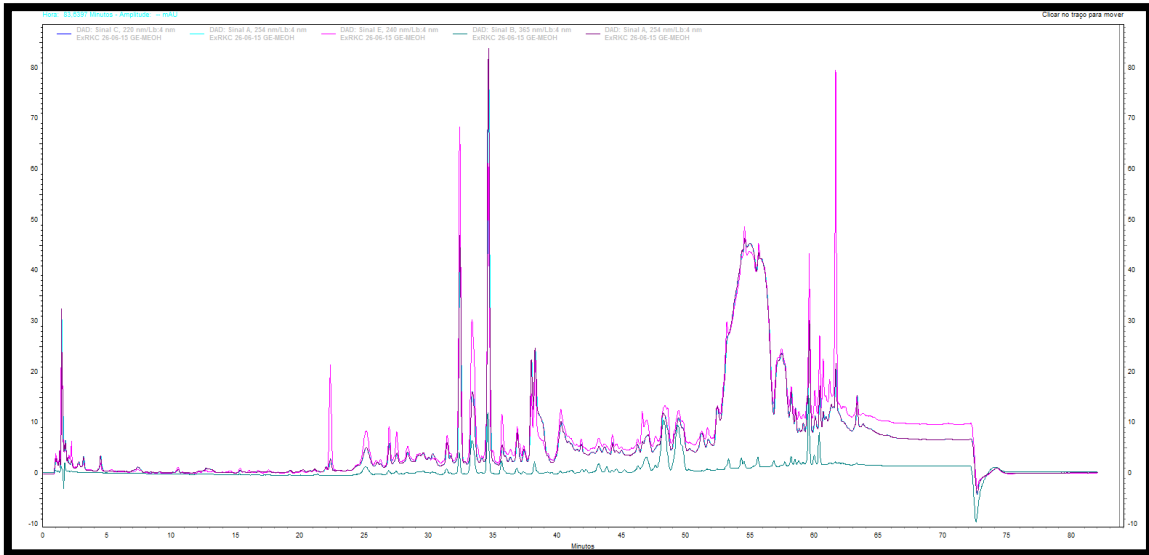
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração acetato de etila ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)



Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da fração hidroalcoólica ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)

0.2 Cromatogramas obtidos, via CLAE-DAD, do extrato e das frações:

Extrato etanólico da raiz (EER);  
Acetato de etila (FAE);  
Hidroalcoólica (FHA).



Cromatograma do extrato etanólico da raiz ( $\lambda$ : 217, 220, 240, 254 e 365 nm)

Legenda:

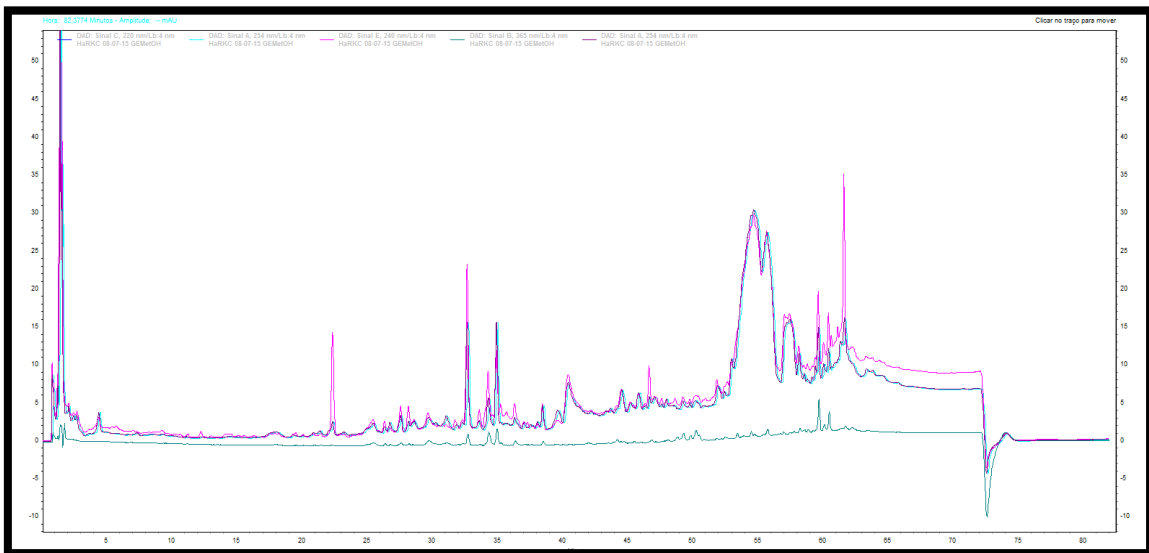
azul:  $\lambda$  217 nm

verde água:  $\lambda$  220 nm

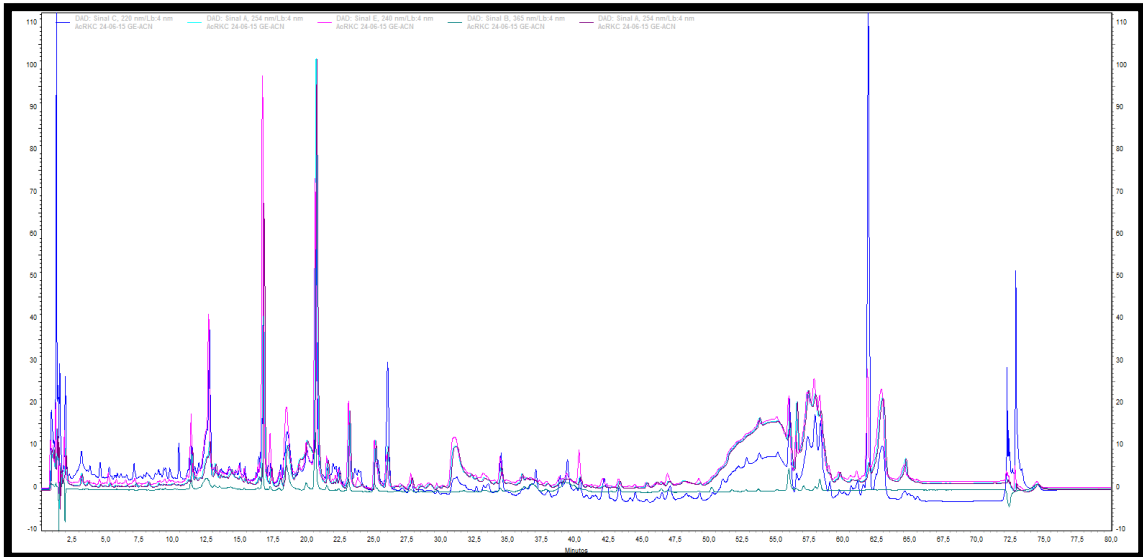
rosa:  $\lambda$  240 nm

verde:  $\lambda$  254 nm

roxo:  $\lambda$  365 nm



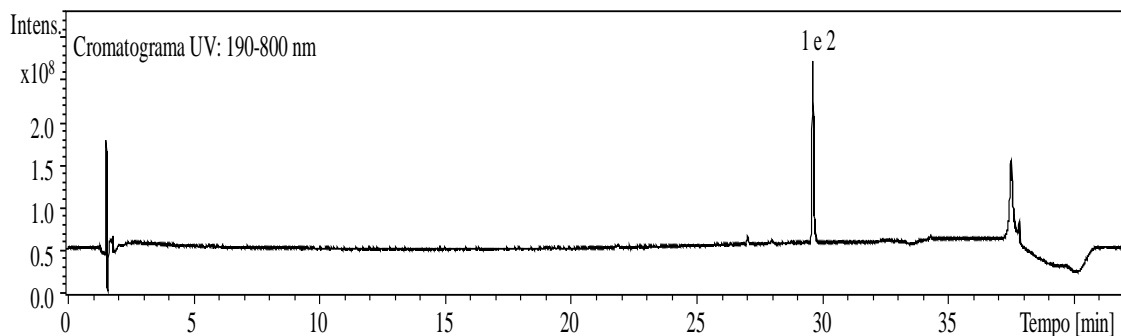
Cromatograma da fração acetato de etila ( $\lambda$ : 217, 220, 240, 254 e 365 nm)



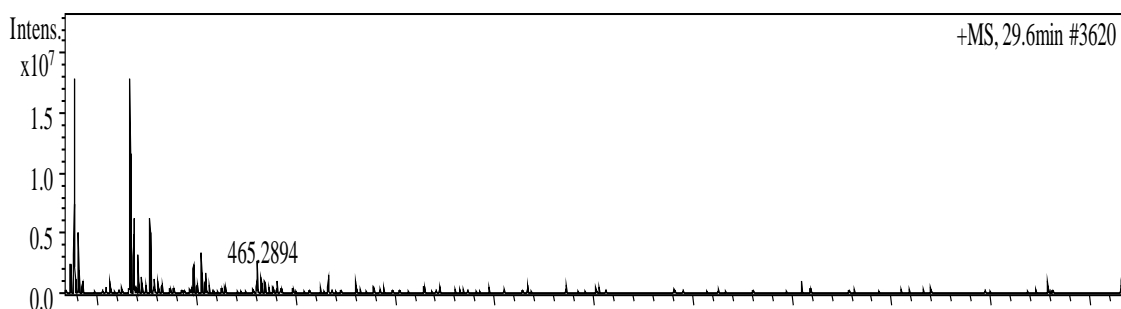
Cromatograma da fração hidroalcolica ( $\lambda$ : 217, 220, 240, 254 e 365 nm)

### 0.3 Cromatogramas e espectros obtidos, via CLAE-EM, das subfrações:

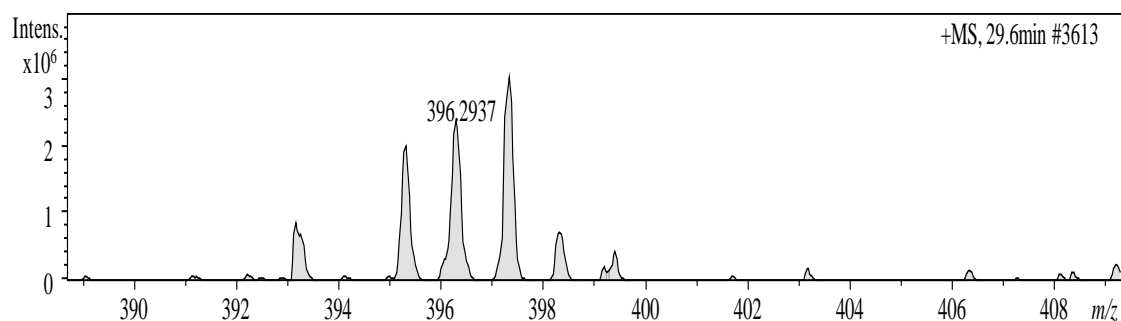
Cromatograma analítico da fração FAE-2.4.3, via CLAE-EM no modo gradiente  
( $\lambda=254\text{nm}$ )



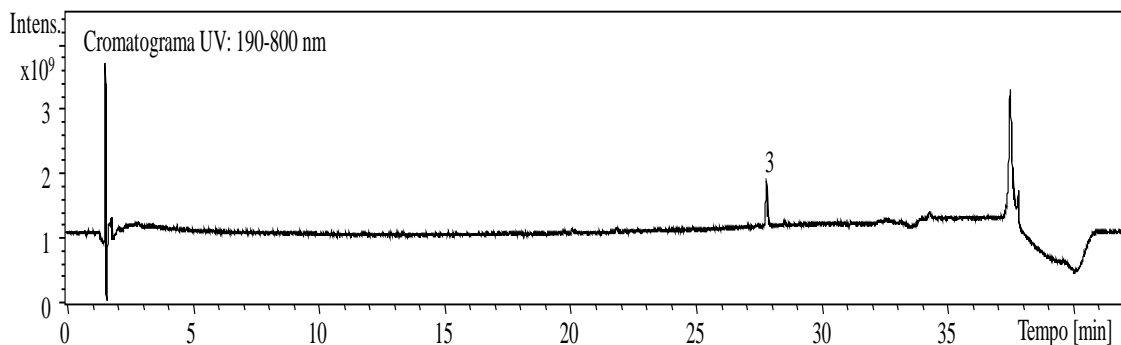
Espectro de massas da fração FAE-2.4.3, obtido em modo positivo (ESI) para o pico 1  
de  $t_r$  29,6 min



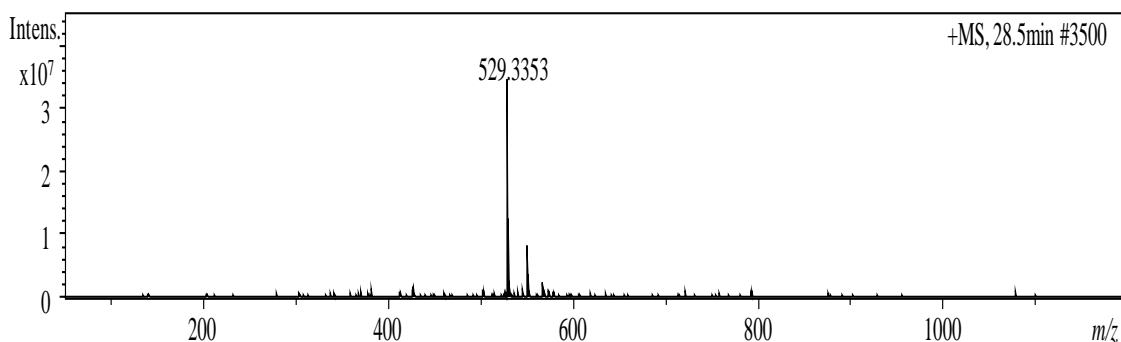
Espectro de massas da fração FAE-2.4.3, obtido em modo positivo (ESI) para o pico 2  
de  $t_r$  29,6 min



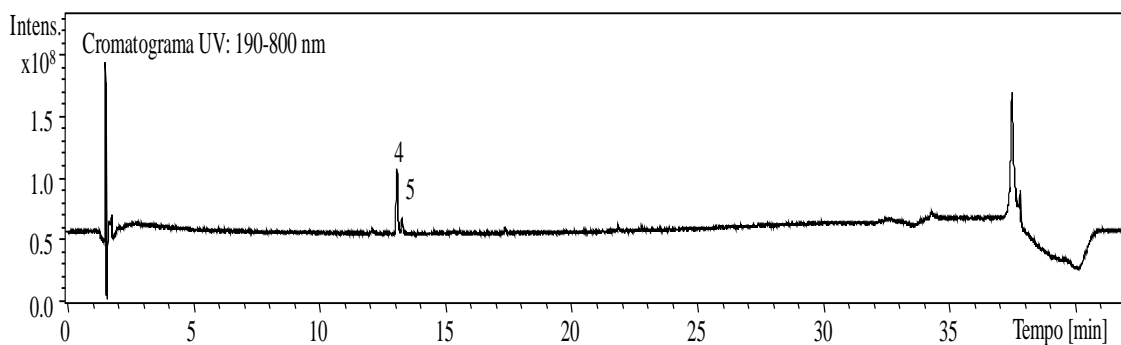
Cromatograma analítico da fração FAE-4.4, via CLAE-EM no modo gradiente  
( $\lambda=254$  nm)



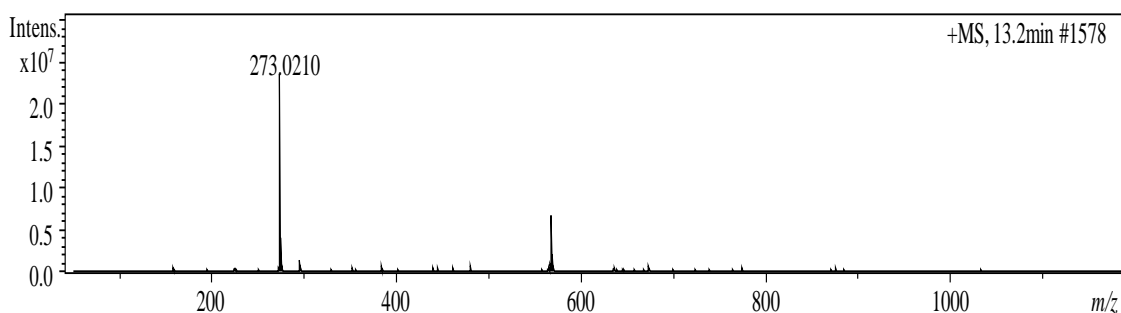
Espectro de massas da fração FAE-4.4, obtido em modo positivo (ESI) para o pico 3  
de  $t_r$  28,5 min



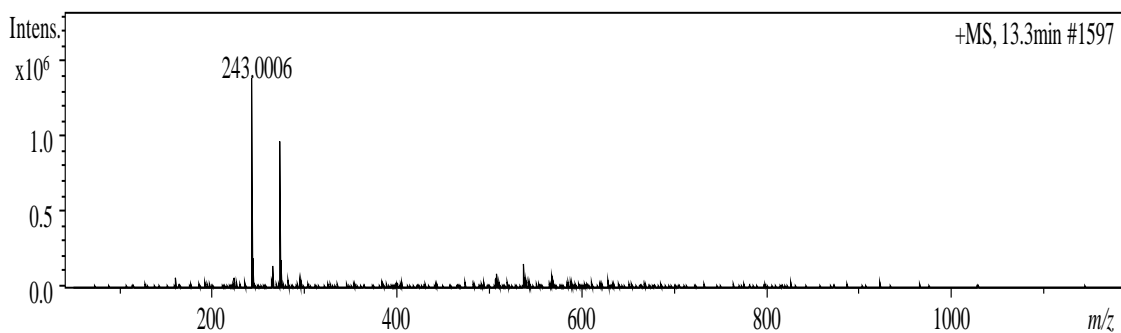
Cromatograma analítico da fração FAE-4.5.4, via CLAE-EM no modo gradiente  
( $\lambda=254$  nm)



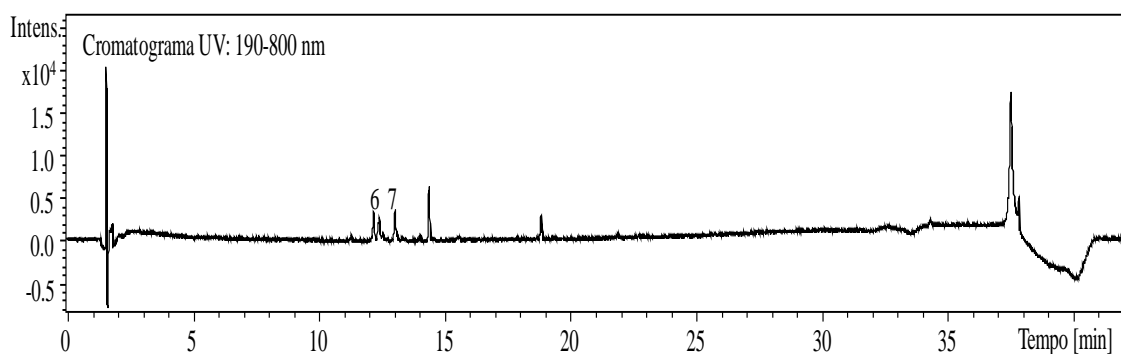
Espectro de massas da fração FAE-4.5.4, obtido em modo positivo (ESI) para o pico 4 de  $t_r$  13,2 min



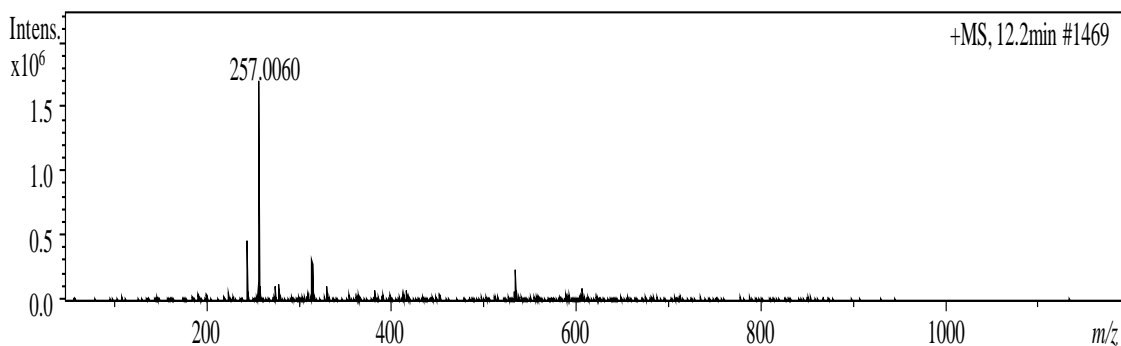
Espectro de massas da fração FAE-4.5.4, obtido em modo positivo (ESI) para o pico 5 de  $t_r$  13,3 min



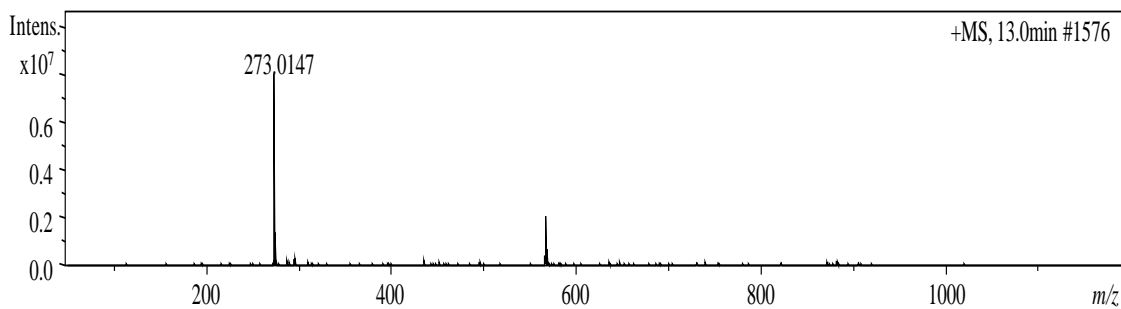
Cromatograma analítico da fração FAE-4.7.3, via CLAE-EM no modo gradiente ( $\lambda=254$  nm)



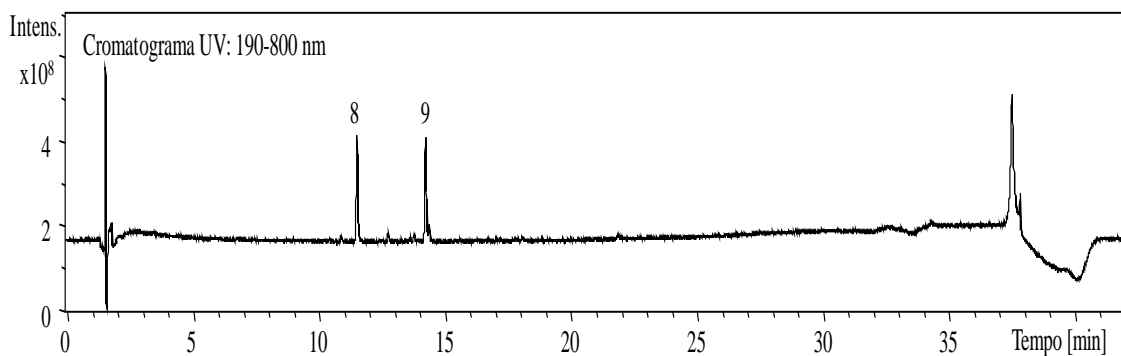
Espectro de massas da fração FAE-4.7.3, obtido em modo positivo (ESI) para o pico 6 de  $t_r$  12,2 min



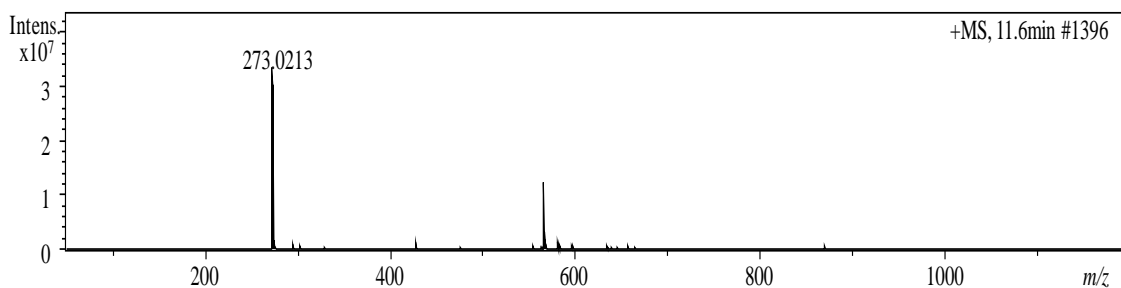
Espectro de massas da fração FAE-4.7.3, obtido em modo positivo (ESI) para o pico 7 de  $t_r$  13,0 min



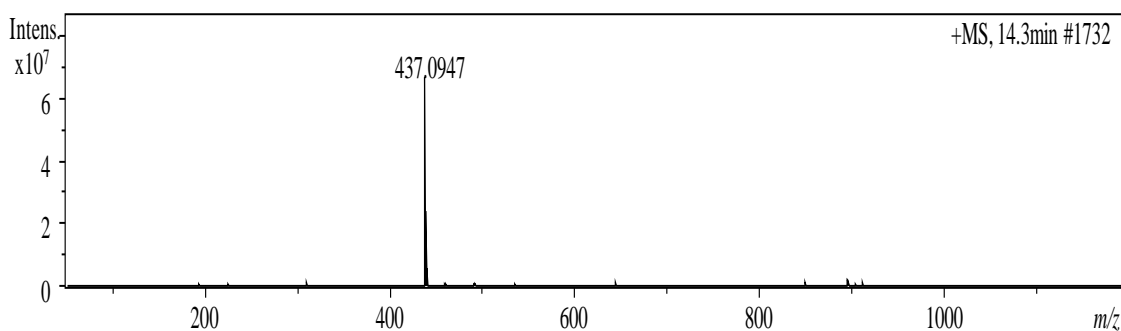
Cromatograma analítico da fração FAE-4.8.2, via CLAE-EM no modo gradiente ( $\lambda=254$  nm)



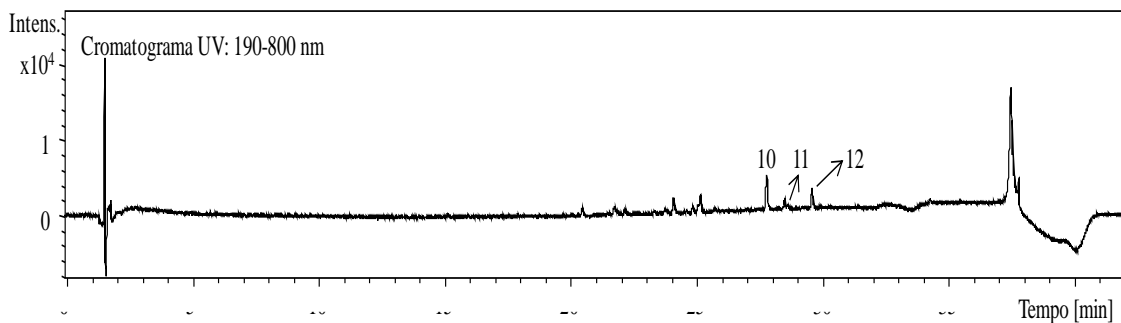
Espectro de massas da fração FAE-4.8.2, obtido em modo positivo (ESI) para o pico 8 de  $t_r$  11,6 min



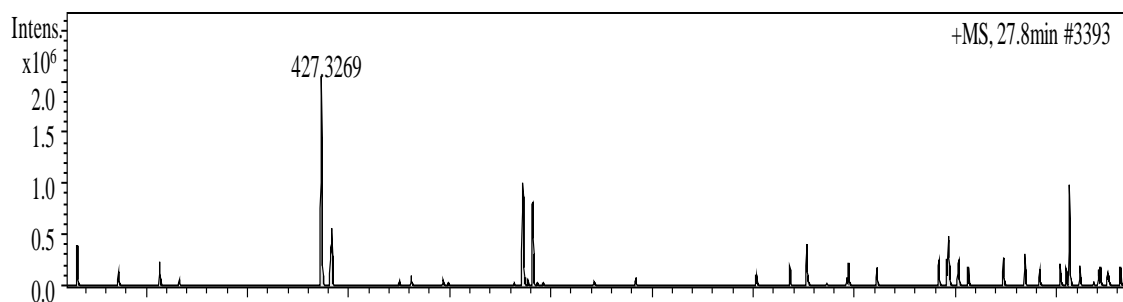
Espectro de massas da fração FAE-4.8.2, obtido em modo positivo (ESI) para o pico 9 de  $t_r$  14,3 min



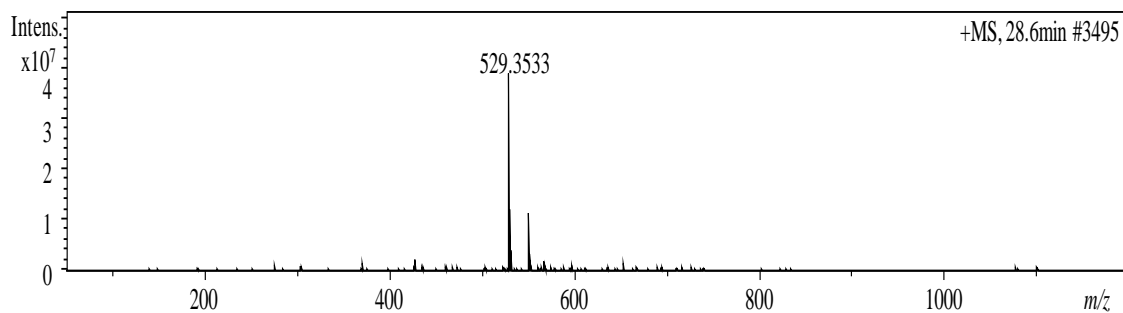
Cromatograma analítico da fração FH-10, via CLAE-EM no modo gradiente ( $\lambda=254$  nm)



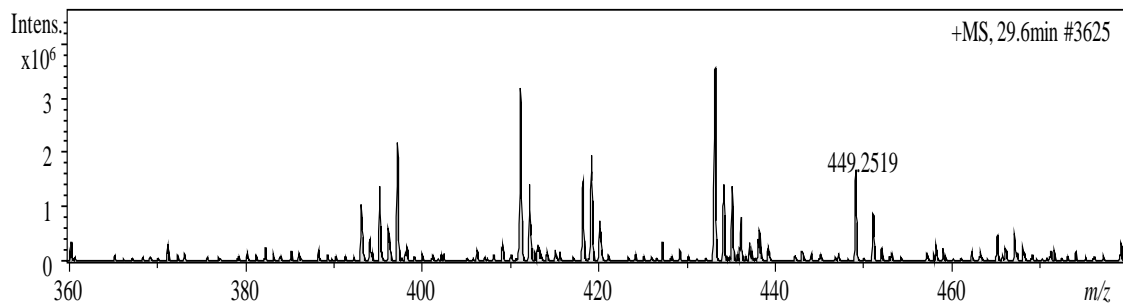
Espectro de massas da fração FH-10, obtido em modo positivo (ESI) para o pico 10  
de  $t_r$  27,8 min



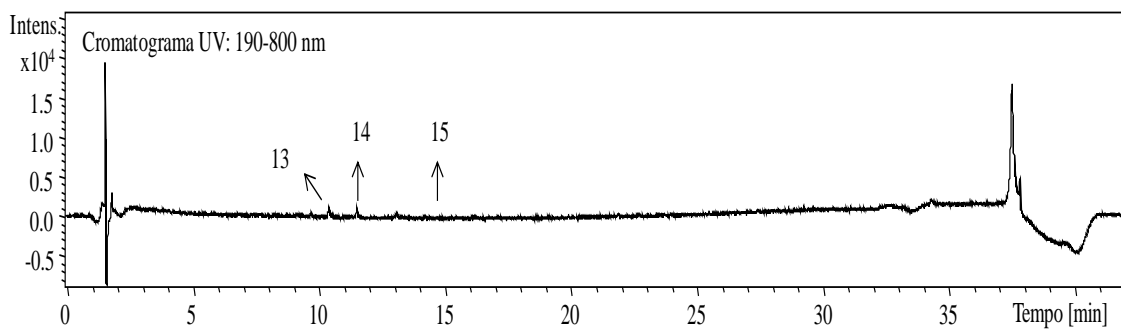
Espectro de massas da fração FH-10, obtido em modo positivo (ESI) para o pico 11  
de  $t_r$  28,6 min



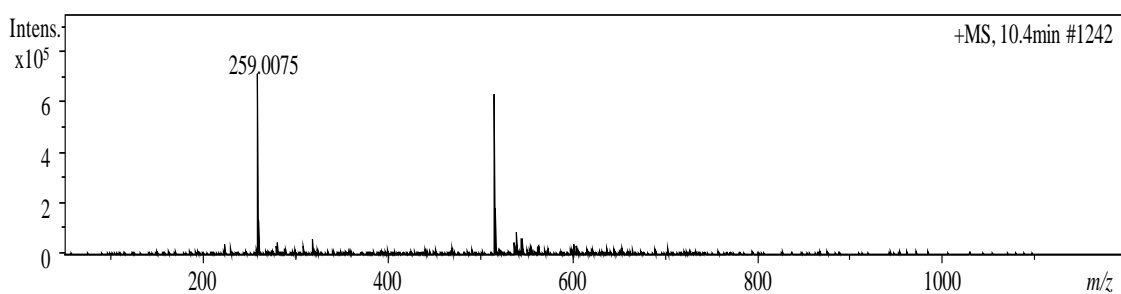
Espectro de massas da fração FH-10, obtido em modo positivo (ESI) para o pico 12  
de  $t_r$  29,6 min



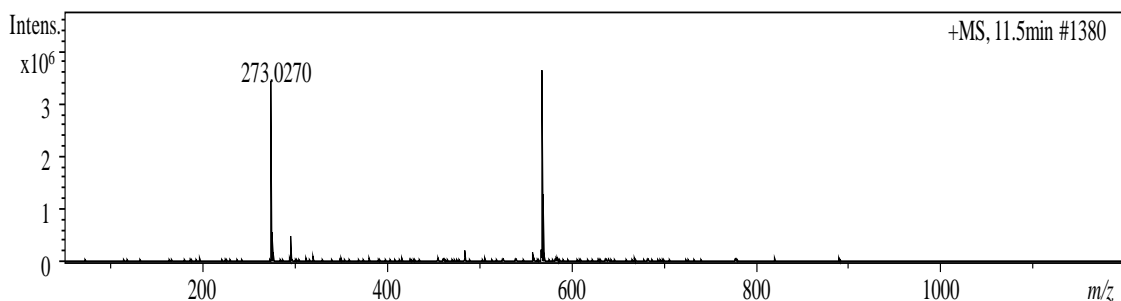
Cromatograma analítico da fração FHA-7, via CLAE-EM no modo gradiente  
( $\lambda=254$  nm)



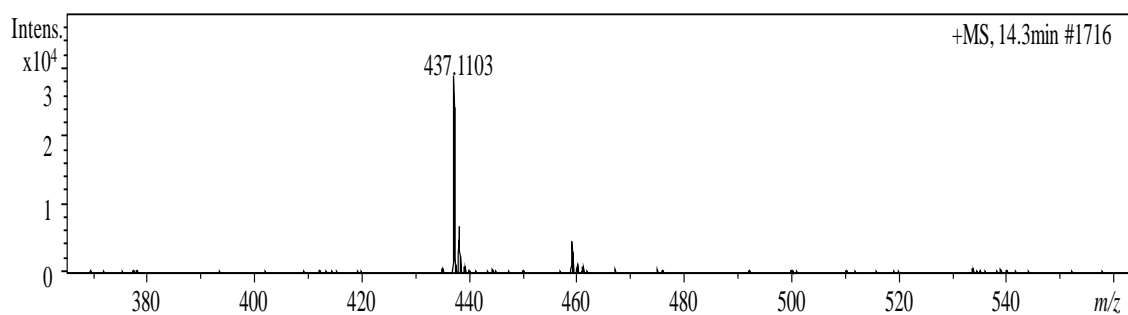
Espectro de massas da fração FHA-7, obtido em modo positivo (ESI) para o pico 13  
 $t_r$  10,4 min



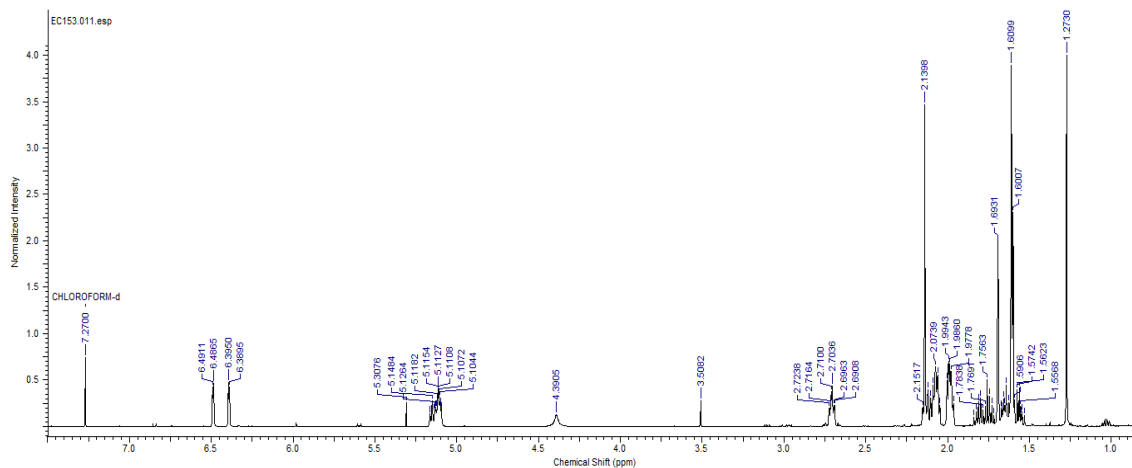
Espectro de massas da fração FHA-7, obtido em modo positivo (ESI) para o pico 14  
de  $t_r$  11,5 min



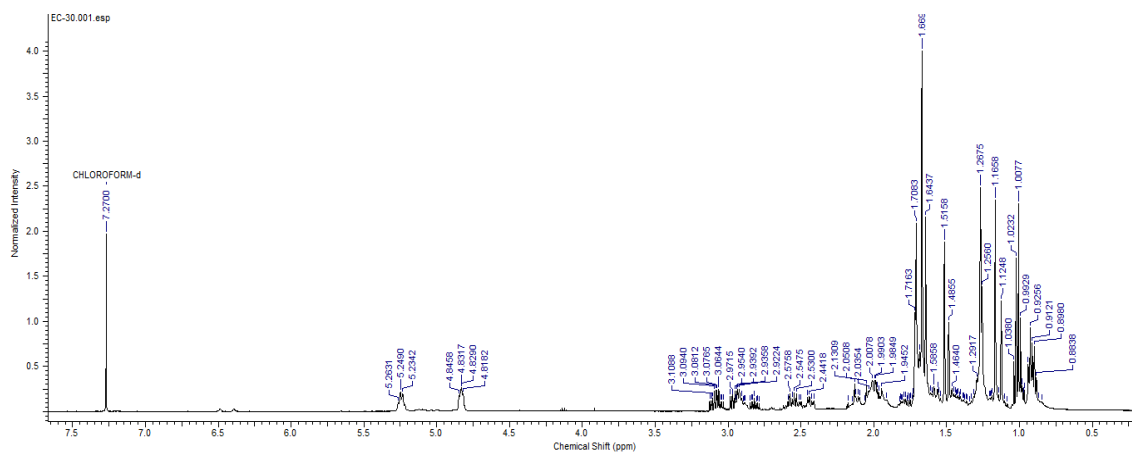
Espectro de massas da fração FHA-7, obtido em modo positivo (ESI) para o pico 15  
de tr 14,3 min



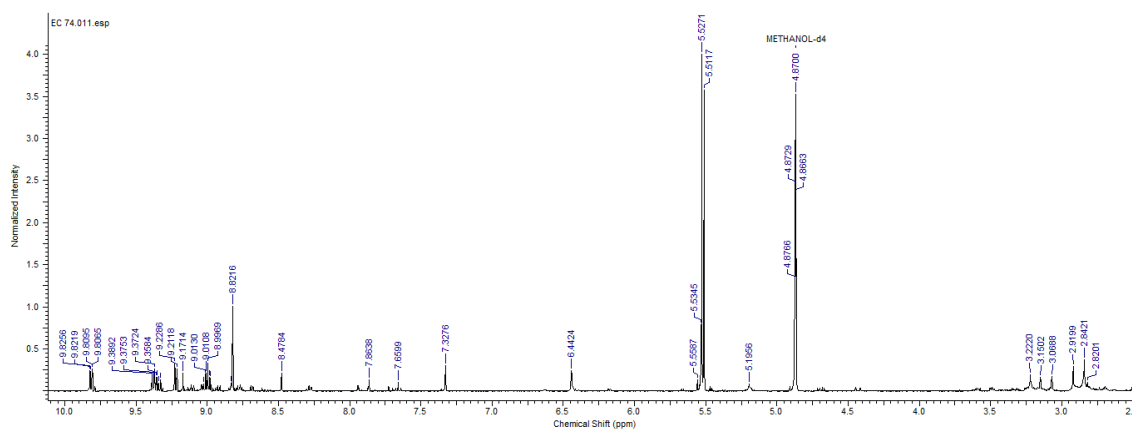
- 0.4 RMN de  $^1\text{H}$  da subfração FAE- 2.4.3
- 0.5 RMN de  $^1\text{H}$  da subfração FAE- 4.4
- 0.6 RMN de  $^1\text{H}$  da subfração FAE- 4.5.4
- 0.7 RMN de  $^1\text{H}$  da subfração FAE- 4.7.3
- 0.8 RMN de  $^1\text{H}$  da subfração FAE 4.8.2
- 0.9 RMN de  $^1\text{H}$  da subfração FH-10
- 0.10 RMN de  $^1\text{H}$  da subfração FHA-7



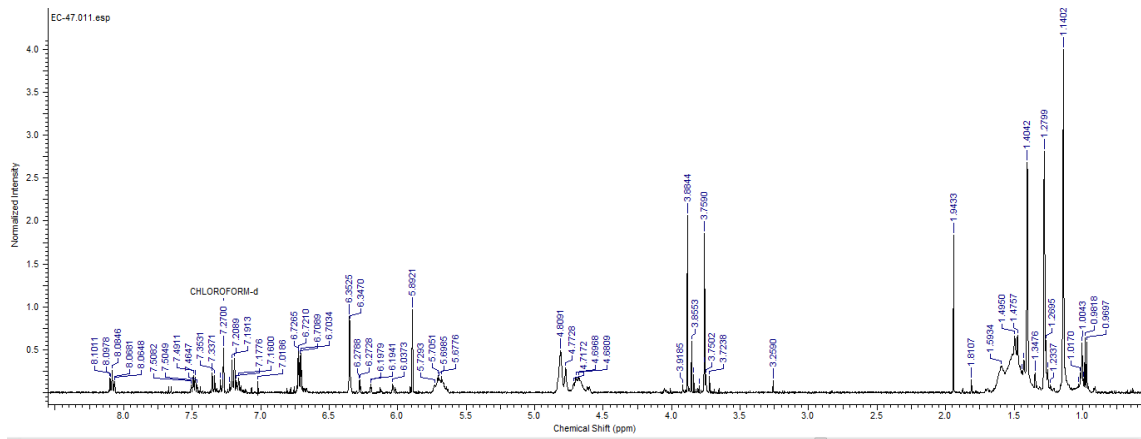
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da subfração FAE-2.4.3 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



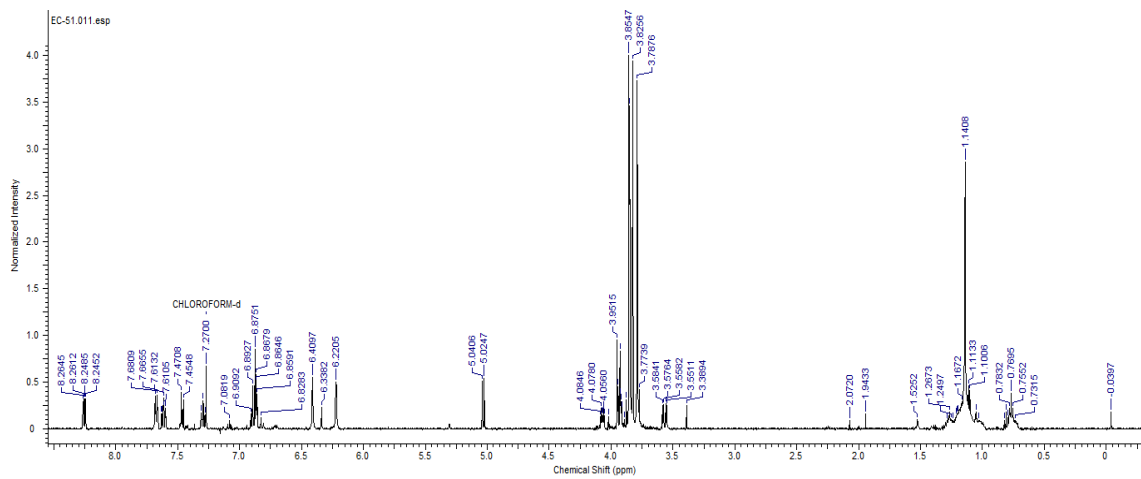
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da subfração FAE-4.4 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



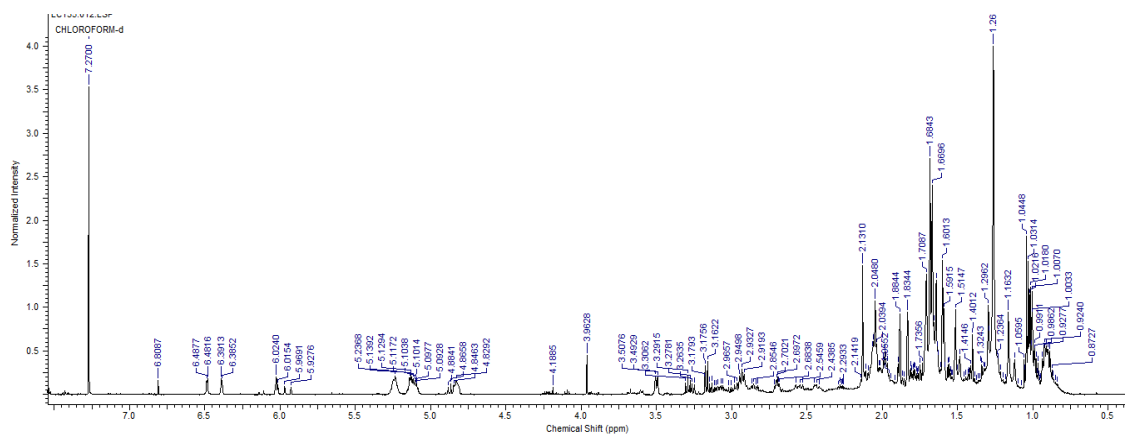
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da subfração FAE-4.5.4 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)



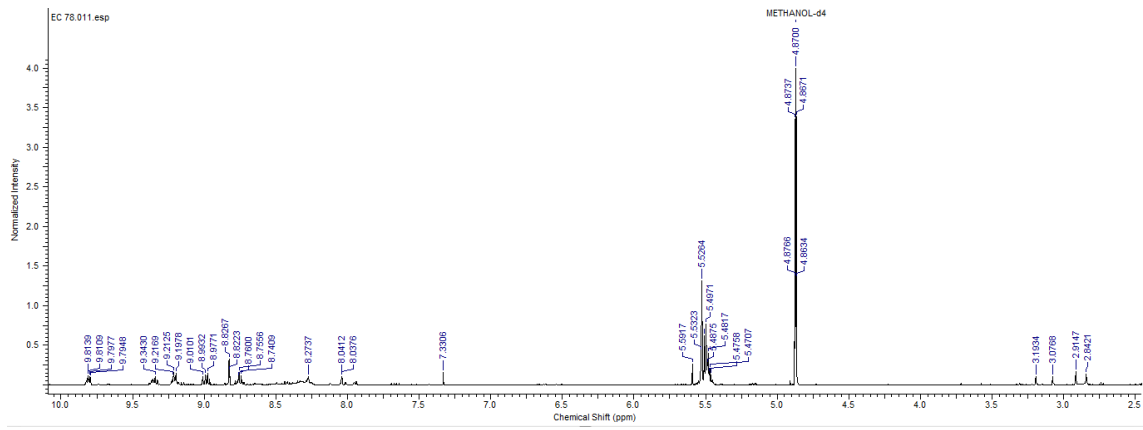
Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da subfração FAE-4.7.3 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da subfração FAE-4.8.2 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da subfração FH-10 ( $\text{CDCl}_3$ , 500 MHz)



Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  da subfração FHA-7 ( $\text{CD}_3\text{OD}$ , 500 MHz)