



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

**LUCIANA DE SOUZA BARBOSA**

**ESTUDO ETNOBOTÂNICO, QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO  
BIOLÓGICO DE *Kielmeyera coriacea* (CALOPHYLLACEAE)**

**CATALÃO - GO  
2015**

Ficha catalográfica elaborada automaticamente  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a), sob orientação do Sibi/UFG.

de Souza Barbosa, Luciana  
ESTUDO ETNOBOTÂNICO, QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO  
POTENCIAL EFEITO BIOLÓGICO DE *Kielmeyera coriacea*  
(CALOPHYLLACEAE) [manuscrito] / Luciana de Souza Barbosa. -  
2015.  
xv, 118 f.: il.

Orientador: Profa. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino .  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Goiás, Regional  
Catalão , Programa de Pós-Graduação em Química, Catalão, 2015.  
Bibliografia. Anexos.

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

1. *Kielmeyera coriacea*. 2. estudo etnobotânico,. 3. estudo químico. 4.  
ensaios biológicos.. I. , Vanessa Gisele Pasqualotto Severino, orient. II.  
Título.]

**LUCIANA DE SOUZA BARBOSA**

**ESTUDO ETNOBOTÂNICO, QUÍMICO E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL EFEITO  
BIOLÓGICO DE *Kielmeyera coriacea* (CALOPHYLLACEAE)**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *stricto sensu* em Química da Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão, como requisito para o Exame de Defesa Final.

Área de concentração: Química

Linha de Pesquisa: Produtos Naturais e Meio Ambiente

Orientadora: Profa. Dra. Vanessa G. Pasqualotto Severino

**CATALÃO - GO**

**2015**

**TERMO DE CIÊNCIA E DE AUTORIZAÇÃO PARA DISPONIBILIZAR AS TESES E DISSERTAÇÕES ELETRÔNICAS 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: Luciana de Souza Barbosa

Título do trabalho: Estudo etnobotânico, químico e avaliação do potencial efeito biológico de *Kielmeyera coriacea* (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)

Data: 29 / 10 / 2015

---

<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.



Relatório de Defesa de Dissertação  
Candidata: **LUCIANA DE SOUZA BARBOSA**

Aos 27/03/2015 às 14:00 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 efeito biológico de *Kielmeyera coriacea* (Calophyllaceae)**” apresentada pela candidata **Luciana de Souza Barbosa**. 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:**

Profa. Dra. Vanessa Gisele P. Severino  
Prof. Dr. Carlos Henrique G. Martins  
Dra. Ana Paula Terezan

**Função**

Presidente  
Titular  
Titular

**Instituição**

UFG – Catalão  
UNIFRAN  
UFG - Catalão

**Resultado Final:** aprovada.

**Parecer da Comissão Julgadora:**

*A banca examinadora após a leitura da dissertação, apresentação oral e arguição do trabalho, considerou a candidata aprovada.*

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 Cássia Cristina da Silveira representante do Programa de Pós Graduação em Química lavrei o presente relatório que será assinado por mim e pelos membros da banca examinadora.

*Vanessa G. P. Severino*  
Profa. Dra. Vanessa Gisele P. Severino

*Carlos Henrique G. Martins*  
Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins

*Ana Paula Terezan*  
Dra. Ana Paula Terezan

*Cássia Cristina da Silveira*  
Representante do PPG Cássia Cristina da Silveira

( ) Não houve alteração no título.

( X ) Houve. O novo título passa a ser:

*Estudo etnobotânico, químico e avaliação do potencial efeito biológico de *Kielmeyera coriacea* (Calophyllaceae)*

DEDICO

*Aos meus pais e à minha irmã, que sempre estiveram ao meu lado, me incentivando e dando forças para seguir com meus estudos, com muita dedicação, amor e carinho.*

*Obrigada por tudo!*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado forças e sabedoria para chegar até aqui, e concluir meus objetivos.

Aos meus pais, por não medirem esforços para me apoiar em meus estudos e me ver feliz, sempre me dando forças para superar todas as dificuldades que aparecessem em meu caminho. Sou imensamente grata por ter vocês em minha vida.

À minha irmã Jéssica pelo carinho e amizade que sempre teve por mim.

Ao meu namorado Renato, que sempre esteve ao meu lado quando eu precisava.

À minha querida orientadora Vanessa Gisele Pasqualotto Severino, que sempre esteve ao meu lado me orientando e me passando conhecimentos que foram muito importantes para mim. Agradeço também pela amizade e pela preocupação que sempre teve comigo. Se cheguei até aqui, foi pelos seus ensinamentos. Obrigada por tudo!

À Profa. Dra. Richele Priscila Severino pelos ensinamentos recebidos e por ter me indicado para fazer parte da pesquisa de Produtos Naturais.

À Profa. Dra. Elaine Rosechrer Carbonero pela amizade e dedicação para sanar as minhas dúvidas sempre que eu precisasse.

À Dra. Ana Paula Terezan, pela boa vontade de realizar todos os experimentos para que eu conseguisse fechar meus resultados e por todas as contribuições dadas para meu aprendizado.

Ao Prof. Dr. Paulo Cezar Vieira do Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de São Carlos, pela realização dos ensaios enzimáticos e por toda a ajuda dada para a elucidação de produtos naturais.

Aos professores Dr. Antônio Gilberto Ferreira do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de São Carlos e Dr. Luciano Moraes Lião do Laboratório de Ressonância Magnética Nuclear da Universidade Federal de Goiás, pela realização dos experimentos de RMN uni e bidimensionais.

Aos professores Dr. Anderson Luiz Ferreira do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão e Dr. Carlos Henrique Gomes Martins do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA) da Universidade de Franca – UNIFRAN, pelos ensaios biológicos realizados.

Aos professores do Departamento de Química por todos os ensinamentos recebidos durante o período de graduação e mestrado, contribuindo assim para a minha formação acadêmica.

À Me. Núbia Alves Mariano Teixeira Pires Gomides, pela amizade, pela pesquisa etnobotânica realizada e por toda a colaboração prestada para concluir o meu trabalho.

Aos meus colegas do laboratório de Produtos Naturais, Antônia, Felipe, Juliana, Michelle Nauara, Leonardo, Estefânia, Bruna, Renan pela amizade, e em especial, ao Afif que sempre me ajudou em tudo que eu precisei.

Aos companheiros do mestrado, Michelle Machado, João Gabriel e Evandro, por todos os momentos de alegria e dificuldades que passamos juntos e pela amizade demonstrada a mim durante todo esse período de aprendizado.

Ao Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Goiás, Regional – Catalão por dar oportunidade à realização do trabalho.

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

À CAPES pela bolsa concedida.

Enfim, a todos que contribuíram de alguma forma para que eu chegasse até aqui.

*"Começar não é apenas um tipo de ação. É também um estado de espírito, um tipo de trabalho, uma atitude, uma consciência."*

*Edward Said*

## RESUMO

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, e as plantas são fontes importantes de moléculas ativas, possuindo ampla diversidade estrutural. Dentre os domínios encontrados no Brasil, o Cerrado apresenta uma grande fonte de plantas medicinais com atividades biológicas, sendo promissor para a identificação de moléculas bioativas. Neste contexto, estudos sobre espécies pertencentes ao Cerrado podem contribuir significativamente para a valorização e conservação deste domínio. A espécie *Kielmeyera coriacea* (Calophyllaceae) é conhecida popularmente como pau-santo, sendo nativa da região do planalto central brasileiro. É uma espécie muito utilizada na medicina popular, majoritariamente para gastrite, anemia e leucemia, conforme relatado nas entrevistas etnobotânicas realizadas neste estudo. Com a realização do estudo químico das folhas de *K. coriacea*, identificou-se as substâncias lupeol, lupenona,  $\beta$ -amirina, os ácidos *cis* e *trans-p*-cumárico e o flavonoide quercetina, o qual foi avaliado frente à catepsina V (CatV) e por apresentar um potencial inibitório elevado, teve seu IC<sub>50</sub> avaliado, apresentando um valor de 2,2  $\mu$ M. O extrato etanólico das folhas (EF) e frações oriundas da partição líquido-líquido de *K. coriacea* também foram avaliados frente às catepsinas, e o resultado mais expressivo para EF foi frente à CatV, inibindo a atividade da mesma em 98%; EF também foi testado frente à ação ulcerogênica, apresentando, nas concentrações de 200 e 300 mg.kg<sup>-1</sup>, uma inibição significativa das lesões ulcerativas. Em relação à avaliação antimicrobiana, EF apresentou atividade antimicrobiana frente aos fungos *Candida albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* (CIM de 31,25  $\mu$ g/mL, 62,5  $\mu$ g/mL e 7,81  $\mu$ g/mL). Portanto, a realização deste trabalho tornou possível a correlação de dados etnobotânicos com científicos, além de contribuir com informações relevantes de caráter químico-biológico sobre *K. coriacea*.

Palavras-chave: *Kielmeyera coriacea*, estudo etnobotânico, estudo químico, ensaios biológicos.

## ABSTRACT

Brazil has the greatest biodiversity in the world, and the plants are major sources of active molecules, having wide structural diversity. Among the domains found in Brazil, the Cerrado is a great source of medicinal plants with biological activities, and promising for the identification of bioactive molecules. In this context, studies on species of the Cerrado, can significantly contribute to the development and preservation of this biome. The species *Kielmeyera coriacea* (Calophyllaceae) is popularly known as pau-santo, being native to the Brazilian central plateau region. It is used in popular medicine, mainly for gastritis, anemia and leukemia, as reported in ethnobotanical interviews conducted in this study. The chemical study of *K. coriacea* leaves afforded the substances lupeol, lupenone,  $\beta$ -amyrin, *cis* and *trans-p*-coumaric acid and flavonoid quercetin, which was evaluated against the cathepsin V (CatV) and has a high inhibitory potential, had its IC<sub>50</sub> assessed, with a value of 2.2  $\mu$ M. The leaves extract (LE) and fractions originating from the liquid-liquid partition *K. coriacea* were also tested against cathepsins, and the LE showed the most satisfactory results against CatV, inhibiting the activity by 98%; LE was also tested against the ulcerogenic action, with concentrations of 200 and 300 mg.kg<sup>-1</sup>, and showed significant inhibition of ulcerative lesions. For antimicrobial evaluation, LE showed antimicrobial activity against the fungi *Candida albicans*, *C. tropicalis* and *C. glabrata* (MIC of 31,25  $\mu$ g/mL, 62,5  $\mu$ g/mL e 7,81  $\mu$ g/mL). Therefore, this research made possible the correlation ethnobotanical and scientific data, and contributed with relevant information of chemical-biological character of *K. coriacea*.

Keywords: *Kielmeyera coriacea*, ethnobotanical study, study chemical, biological assays.

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 1.1</b>	Representação do Cerrado brasileiro.....	2
<b>FIGURA 1.2</b>	Representação da extensão do domínio do Cerrado brasileiro.....	2
<b>FIGURA 1.3</b>	Distribuição mundial de Calophyllaceae.....	5
<b>FIGURA 1.4</b>	Estrutura química de exemplos de: a) 4-fenil-cumarina, b) 4-alkil-cumarina.....	6
<b>FIGURA 1.5</b>	Partes vegetais de <i>K. coriacea</i> .....	27
<b>FIGURA 1.6</b>	Distribuição geográfica da espécie <i>K. coriacea</i> no Brasil.....	27
<b>FIGURA 1.7</b>	Estruturas químicas do a) $\delta$ -tocotrienol; b) tocotrienolperoxidímero.....	29
<b>FIGURA 3.1</b>	Mapa do município de Goiandira (GO).....	50
<b>FIGURA 3.2</b>	Demonstração do esquema geral dos ensaios enzimáticos.....	58
<b>FIGURA 3.3</b>	Estrutura do inibidor irreversível de cisteíno peptidases E-64 .....	59
<b>FIGURA 4.1</b>	Cromatograma da mistura das substâncias 1, 2 e 3 .....	63
<b>FIGURA 4.2</b>	Estruturas químicas das substâncias 1, 2 e 3 .....	63
<b>FIGURA 4.3</b>	Espectros de massas da substância 1 $t_R=29,57$ (IE, 70 eV).....	64
<b>FIGURA 4.4</b>	Proposta de fragmentação para a substância 1 .....	65
<b>FIGURA 4.5</b>	Espectros de massas da substância 2 $t_R=28,46$ (IE, 70 eV).....	66
<b>FIGURA 4.6</b>	Proposta de fragmentação para a substância 2 .....	67
<b>FIGURA 4.7</b>	Espectros de massas da substância 3 $t_R=27,87$ (IE, 70 eV).....	68
<b>FIGURA 4.8</b>	Proposta de fragmentação para a substância 3 .....	69
<b>FIGURA 4.9</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) das substâncias 4 e 5 .....	72
<b>FIGURA 4.10</b>	Espectro de RMN de $^1\text{H}$ (400 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da substância 6.....	75
<b>FIGURA 4.11</b>	Efeito do extrato etanólico das folhas de <i>K. coriacea</i> no modelo de indução de úlcera gástrica por etano absoluto em ratos .....	90
<b>FIGURA 4.12</b>	Imagens dos estômagos tratados com carbenoxolona, solução salina e extrato de <i>K. coriacea</i> (200 e 300 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ).....	91
<b>FIGURA 4.13</b>	Imagens dos estômagos tratados solução salina e extrato de <i>K. coriacea</i> (50 e 100 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ) .....	92
<b>FIGURA 4.14</b>	Estrutura química da quercetina (substância 6).....	95
<b>FIGURA 4.15</b>	Estruturas químicas das substâncias quercetina e luteolina .....	95

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 1.1</b> Distribuição da família Calophyllaceae na tribo Calophylleae Choisy e suas ocorrências.....	5
<b>TABELA 1.2</b> Compostos isolados de espécies de <i>Kielmeyera</i> do Cerrado.....	7
<b>TABELA 1.3</b> Substâncias isoladas de espécies do gênero <i>Kielmeyera</i> na Caatinga ....	20
<b>TABELA 3.1</b> Massa dos extratos etanólicos e frações obtidas da partição líquido-líquido de <i>K. coriacea</i> .....	41
<b>TABELA 3.2</b> Condições cromatográficas do fracionamento da fração hexano das folhas .....	42
<b>TABELA 3.3</b> Condições cromatográficas do fracionamento da fração acetato de etila das folhas.....	46
<b>TABELA 3.4</b> Medidas de uso e conhecimento calculados para <i>Kielmeyera coriacea</i> , propostas por Feitosa (2012) .....	52
<b>TABELA 4.1</b> Sinais de fragmentação mais característicos da mistura de 1, 2 e 3 .....	64
<b>TABELA 4.2</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância 4, em comparação com os dados da literatura .....	71
<b>TABELA 4.3</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CDCl <sub>3</sub> ) da substância 5, em comparação com os dados da literatura.....	71
<b>TABELA 4.4</b> Dados de RMN de <sup>1</sup> H (400 MHz, CD <sub>3</sub> OD) da substância 6, em comparação com os dados da literatura.....	74
<b>TABELA 4.5</b> Levantamento etnobotânico de <i>K. coriacea</i> realizado em Goiandira (GO) .....	76
<b>TABELA 4.6</b> Cálculo do valor da diversidade do informante (VDI).....	79
<b>TABELA 4.7</b> Cálculo do valor de diversidade do uso (VDU) .....	80
<b>TABELA 4.8</b> Valor de consenso dos informantes para os tipos de usos (VCTU) de <i>K. coriacea</i> .....	81
<b>TABELA 4.9</b> Valor de consenso dos informantes para as formas de usos (VCFU) de <i>K. coriacea</i> .....	82
<b>TABELA 4.10</b> Valor de consenso para a parte da planta (VCP) de <i>K. coriacea</i> .....	82
<b>TABELA 4.11</b> Valores de CIM (em µg/mL) do extrato aquoso e frações da entrecasca de <i>K. coriacea</i> frente à bactérias e fungos.....	85
<b>TABELA 4.12</b> Valores de CIM (em µg/mL) do extrato etanólico do caule e frações de <i>K. coriacea</i> frente à bactérias e fungos .....	86
<b>TABELA 4.13</b> Valores de CIM (em µg/mL) do extrato etanólico e frações das folhas de <i>K. coriacea</i> frente à bactérias e fungos .....	87

<b>TABELA 4.14</b> Valores de CIM (em $\mu\text{g/ml}$ ) das substâncias isoladas do extrato etanólico das folhas <i>K. coriacea</i> frente à bactérias e fungos .....	88
<b>TABELA 4.15</b> Percentuais de inibição enzimática das frações oriundas do EF (concentração em $\mu\text{g/ml}$ ) .....	94

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E FÓRMULAS

$\phi$	diâmetro
$\delta$	deslocamento químico em partes por milhão (ppm)
$\lambda_{em}$	comprimento de onda de emissão
$\lambda_{ex}$	comprimento de onda de excitação
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
Cat	catepsina
CCD	cromatografia em camada delgada
CA	cromatografia por adsorção
$CDCl_3$	clorofórmio deuterado
$CD_3OD$	metanol deuterado
$C_3D_6O$	acetona deuterada
CE	cromatografia por exclusão
CIM	concentração inibitória mínima
CG-EM	cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
$d$	dubleto
DAD	detector de arranjo de fotodiodos
DMSO	dimetilsulfóxido
DMSO- $d_6$	dimetilsulfóxido deuterado
DNA	ácido desoxirribonucleico
DTE	ditioeritritol
E	enzima
E-64	L-3-carboxi- <i>trans</i> -2,3-epoxipropionil-leucilamido(4-guanino)butano
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
EI	complexo enzima-inibidor
eV	elétron-Volt
Hz	hertz
IBAMA	Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IC <sub>50</sub>	potência inibitória
IE	impacto eletrônico
$J$	constante de acoplamento
M	molar
m	múltiplo

<i>m/z</i>	relação massa/carga
MCA	7-amino-4-metilcumarina
MHz	mega hertz
MTT	3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
PB	Pico base
PIM	Pico do íon molecular
p.o.	por via oral
RMN	Ressonância Magnética Nuclear
RMN <sup>1</sup> H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	singleto
<i>t</i>	triplete
tr	tempo de retenção
UV-Vis	região ultravioleta e visível
VCFU	Valor de consenso para a forma de uso
VCPP	Valor de consenso para a parte da planta
VCTU	Valor de consenso para os tipos de usos
VDI	Valor da diversidade do informante
VDU	Valor da diversidade de uso
Z-FR-MCA	carbобенzoxi-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina

# SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>1</b>
1.1 Os produtos naturais e o Cerrado brasileiro .....	1
1.2 Família Calophyllaceae J. Agardh.....	4
1.2.1 O gênero <i>Kielmeyera</i> Mart. & Zucc.....	5
1.2.2 A espécie <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc. e seu potencial biológico .....	27
1.3 ESTUDO BIOLÓGICO .....	30
1.3.1 Atividade antimicrobiana .....	30
1.3.2 Atividade anti-ulcerogênica .....	31
1.3.3 As enzimas catepsinas .....	32
1.3.3.1 As catepsinas .....	33
<b>2. OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
2.1 Objetivo Geral.....	35
2.2 Objetivos específicos.....	35
<b>3. PARTE EXPERIMENTAL.....</b>	<b>36</b>
3.1 Materiais utilizados no estudo químico de <i>K. coriacea</i> .....	36
3.2 Materiais utilizados no estudo biológico de <i>K. coriacea</i> .....	37
3.3 ESTUDO QUÍMICO de <i>K. coriacea</i> .....	39
3.3.1 Coleta e identificação do material vegetal.....	39
3.3.2 Preparo dos extratos etanólicos .....	39
3.3.3 Particionamento dos extratos.....	40
3.3.4 Fracionamento da fração hexano das folhas.....	41
3.3.5 Fracionamento da fração acetato de etila das folhas .....	45
3.4. ESTUDO BIOLÓGICO de <i>K. coriacea</i> .....	50
3.4.1 Levantamento Etnobotânico de <i>K. coriacea</i> .....	50
3.4.2 Ensaio antimicrobianos.....	53
3.4.3 Ensaio antiulcerogênicos .....	56
3.4.4 Ensaio enzimáticos .....	57
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>61</b>
4.1 ESTUDO QUÍMICO.....	61
4.1.1 Sustâncias isoladas .....	61
4.1.2 Elucidação Estrutural .....	62
4.1.2.1 Prováveis estruturas das substâncias 1, 2 e 3 .....	62
4.1.2.2 Elucidação estrutural das substâncias 4 e 5.....	70
4.1.2.3 Elucidação estrutural da substância 6.....	73

4.2	Estudo etnobotânico .....	76
4.3	ESTUDOS BIOLÓGICOS .....	83
4.4.1	Ensaio antimicrobiano .....	83
4.4.2	Ensaio antiulcerogênico.....	90
4.4.3	Ensaio enzimáticos .....	93
<b>5.</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>96</b>
<b>6.</b>	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>98</b>
<b>7.</b>	<b>ANEXOS .....</b>	<b>111</b>

# 1 - INTRODUÇÃO

## 1.1 - OS PRODUTOS NATURAIS E O CERRADO BRASILEIRO

Os produtos naturais (PNs), também conhecidos como metabólitos secundários, têm sido uma fonte rica de compostos para a descoberta de medicamentos (HARVEY, EDRADA-EBEL, & QUINN, 2015). Historicamente, os PNs oriundos de plantas e animais foram a fonte de praticamente todas as preparações medicinais e continuam a fazer parte de ensaios clínicos, como agentes anticancerígenos e antimicrobianos (HARVEY, 2008; DIAS et al., 2012).

As plantas em particular, têm sido a base da medicina tradicional, cujo os primeiros registros datam cerca de 2.600 a.C, tendo documentado o uso de 1.000 substâncias derivadas das mesmas, na Mesopotâmia. Sistemas à base de espécies vegetais continuam a desempenhar um papel essencial na área da saúde, e a sua utilização por diferentes culturas, tem sido extensivamente documentada (CRAGG & NEWMAN, 2013).

A natureza apresenta uma grande complexidade química em relação à organismos que produzem metabólitos secundários, pois estes vivem em ambientes biologicamente e geograficamente diferentes. Tais metabólitos representam uma fonte contínua de inspiração para novos medicamentos potentes e seletivos; estima-se que cerca de 50% deles, recentemente aprovados, derivem direta ou indiretamente de PNs (CRAGG & NEWMAN, 2013). Referindo-se à algumas aplicações, têm sido empregados em antibióticos, agentes anti-virais e anti-câncer, imunossupressores e anti-hipertensivo.

Atualmente, numerosos metabólitos secundários de várias fontes naturais, tais como bactérias, fungos e plantas, têm sido isolados e caracterizados. Muitos deles são importantes, pois geralmente exibem um amplo espectro de atividades biológicas. Suas propriedades são notáveis e podem ser atribuídas à sua complexidade e diversidade estrutural, em que as enzimas são responsáveis pela formação e diversificação desses compostos (WATANABE, 2014).

Neste contexto, o Brasil, devido à sua extensão, destaca-se como a flora mais rica do mundo, com quase 19% da flora mundial (GIULIETTI et al., 2005).

Apresenta 6 domínios vegetais, sendo que o da Amazônia ocupa cerca de 50%, seguido pelo Cerrado (24%), Mata Atlântica (13%), Caatinga (10%), Pampa (2%) e Pantanal (1%) (IBGE, 2011).

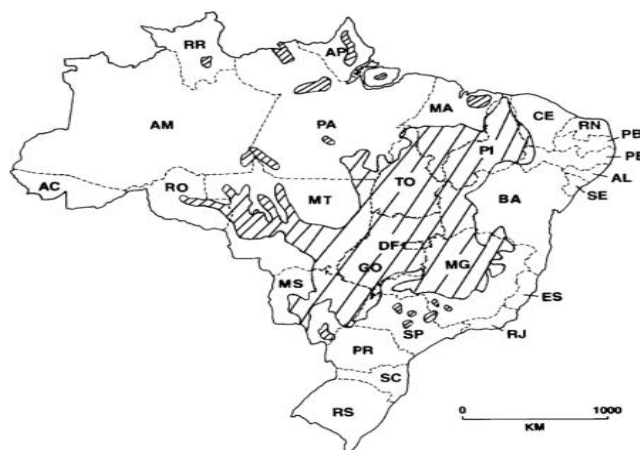
O Cerrado (FIGURA 1.1, p. 2) está localizado basicamente no planalto central, sendo reconhecido como a savana tropical mais rica do planeta, possuindo mais de 12.000 espécies de plantas, em que pelo menos 30% são endêmicas dessa área (KLINK & MACHADO, 2005; FORZZA et al., 2010). Sua área geográfica corresponde a 24% de todo o território brasileiro (RODRIGUÊS, 2014); se estende sobre os estados da Bahia, Maranhão, Minas Gerais, Goiás, Paraná, Piauí, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, São Paulo e Tocantins (NOVAES et al., 2013) (FIGURA 1.2, p. 2).

FIGURA 1.1. Representação do Cerrado brasileiro



Fonte: <http://revistasagarana.com.br/vastos-gerais-brasileiros>. Acesso em 27/11/2014

FIGURA 1.2. Representação da extensão do domínio do Cerrado brasileiro



Fonte: NOVAES et al., 2013.

O Cerrado possui um clima sazonal, apresentando invernos secos. A temperatura média anual é em torno de 23°C e a precipitação anual é em torno de 1.000 e 1.800 milímetros (INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA, 2013). É um ambiente rico em diversas espécies de árvores, as quais são utilizadas para diversos fins, tais como serraria e produção de carvão (NOVAES et al., 2013).

Apesar de apresentar uma grande biodiversidade, o Cerrado é um ambiente muito ameaçado de extinção. De uma área total de 2 milhões de Km<sup>2</sup> de vegetação nativa, já sofreu uma redução de 48,4%. Isso porque a taxa de desmatamento anual é de 0,69%, maior até que da Amazônia e dos demais domínios brasileiros. Diante disso, se o ritmo de desmatamento continuar acelerado, estima-se que em um prazo de 40 a 50 anos ocorra o desaparecimento de todos os seus recursos florestais (IBAMA, 2014), perdendo-se com isso informações relevantes sobre a química dos mesmos. Tais informações poderiam servir como base para o desenvolvimento de bioprodutos, fomentando assim a economia do Brasil.

KAPLAN, FIGUEIREDO & GOTTLIEB (1994) afirma que o Cerrado deveria ser considerado área prioritária de pesquisas com plantas medicinais e conservação de recursos naturais, pois ao se comparar as espécies vegetais do Cerrado com a Mata Atlântica, observa-se que o Cerrado detém um grande número de compostos químicos, em quantidades pequenas, que só podem ser identificados por análise espectral, em contraste com a Mata Atlântica, em que as espécies vegetais apresentam pequeno número de compostos em grandes quantidades.

Assim, o Cerrado tornou-se uma das regiões mais importantes para a conservação de toda a sua biodiversidade, sendo classificado como um *hotspot* de biodiversidade, conceito definido inicialmente por MEYERS (1988), como áreas com concentrações excepcionais de espécies endêmicas e perda excepcional de *habitat*. Essa definição surgiu da necessidade de identificar áreas prioritárias, uma vez que o número de espécies ameaçadas supera os recursos de conservação. Desta forma, ao concentrar esforços nas áreas onde a necessidade é maior e o retorno também poderia ser, e a conservação seria mais efetiva. De acordo com GORENFLO et al. (2012), existem trinta e cinco *hotspots* de biodiversidade na Terra, os quais abrangem 2,3% da superfície e

contêm mais de metade das espécies de plantas do mundo e 43% das espécies de vertebrados terrestres da Terra.

Por essas características, o Cerrado deveria ser considerado área prioritária de pesquisas com plantas medicinais e conservação de recursos naturais, além de contribuir para a formação de recursos humanos, imprescindíveis para o desenvolvimento das comunidades locais. E neste contexto, o estudo de espécies de famílias vegetais oriundas do Cerrado representa uma ação importante para a aquisição de informações químico-biológicas.

## 1.2 - FAMÍLIA CALOPHYLLACEAE J. AGARDH

A família Calophyllaceae J. Agardh engloba espécies que apresentam potencial medicinal, ornamental, ecológico e econômico. Possui cerca de 13 gêneros e 460 espécies com distribuição pantropical (STEVENS, 2012).

O reconhecimento de Calophyllaceae como uma família distinta da Clusiaceae só foi possível devido à estudos filogenéticos (RUHFEL et al., 2011) que evidenciaram que na Clusiaceae somente poderiam ser incluídos os gêneros reconhecidos em Calophyllaceae, se também fossem incluídos os gêneros das famílias Bonnetiaceae, Hypericaceae e Podostermaceae (SOUZA, & LORENZI, 2012).

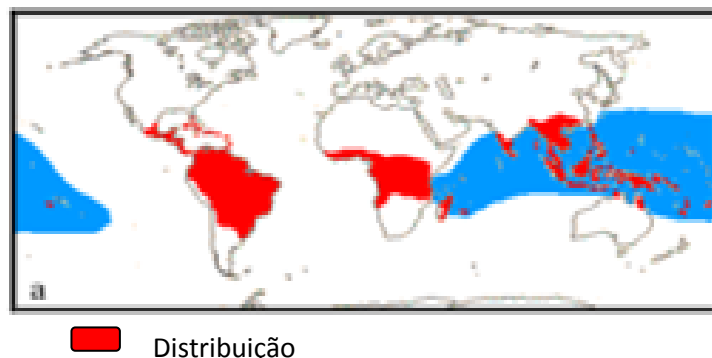
Na família Calophyllaceae sete gêneros são encontrados no Brasil, sendo divididos em 81 espécies (BITTRICH, 2012). Para o estado de Goiás, são citados três gêneros e dezessete espécies, que ocorrem em formações campestres, savânicas e florestais (ALKIMIM, 2014).

A família Calophyllaceae possui espécies importantes do ponto de vista etnobotânico e econômico (ALKIMIN, 2014). O guanandi (*Calophyllum brasiliense* Cambess) oferece madeira de boa qualidade, sendo considerada a primeira madeira-de-lei do Brasil (SOUZA & LORENZI, 2012). O camaçari (*Caraipa densifolia*) possui propriedades anti-inflamatórias, antioxidantes e antitumorais, sendo utilizado para tratamentos de doenças de pele (SILVEIRA, 2010).

Na FIGURA 1.3 (p. 5) está representada a distribuição mundial da família Calophyllaceae e na TABELA 1.1 (p. 5) a distribuição dessa família, em

tribos e gêneros, bem como a ocorrência de alguns gêneros em Goiás (GO), Tocantins (TO) e Distrito Federal (DF).

FIGURA 1.3. Distribuição mundial de Calophyllaceae



Fonte: STEVENS, 2011

TABELA 1.1. Distribuição da família Calophyllaceae na tribo Calophylleae Choisy e suas ocorrências

<b>Tribo Calophylleae Choisy</b>	
<b>Gênero</b>	<b>Distribuição</b>
<i>Calophyllum</i> L.	GO, TO e DF
<i>Caraipa</i> Aubl.	TO
<i>Kielmeyera</i> Mart. & Zucc.	GO, TO e DF

Fonte: ALKIMIM, 2011; BITTRICH, 2012; FLORESCER, 2013.

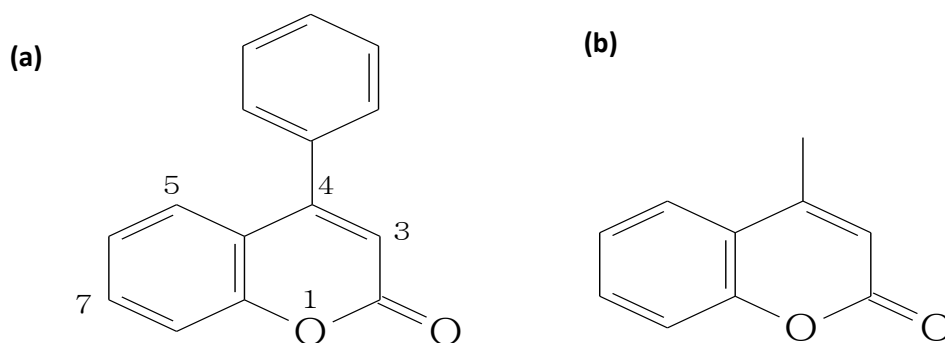
### 1.2.1 - O GÊNERO *Kielmeyera* MART & ZUCC

O gênero *Kielmeyera* Mart & Zucc já pertenceu à família Clusiaceae e atualmente está inserido em Calophyllaceae. Este gênero compreende 47 espécies, distribuídas principalmente no Brasil, em regiões de baixa altitude (SADDI, 1982; STEVENS, 2011), as quais são endêmicas na América do Sul e compostas de arbustos, localizados em *habitat* de campo cerrado, campo rupestre ou restinga (JOLY, 1983). Algumas das espécies apresentam apelo estético e uso medicinal, e são conhecidas popularmente como pau-santo, rosa-do-campo e malva-do-campo (SADDI, 1982; ALMEIDA et al., 1998).

A importância das atividades farmacológicas e biológicas apresentadas pelo gênero *Kielmeyera* foram evidenciadas em trabalhos científicos,

mostrando que esse gênero é caracterizado pela presença de xantonas e 4-fenil, 4-alkuil-cumarinas (FIGURA 1.4, p. 6), indicando estes metabólitos secundários como marcadores taxonômicos do gênero (CRUZ et al., 2001).

FIGURA 1.4. Estrutura química de exemplos de: a) 4-fenil cumarina, b) 4-alkuil-cumarina



Dez espécies do gênero *Kielmeyera* (*K. cuspidata* Saddi, *K. ferruginea*, *K. coriacea* Mart. e Zucc., *K. rubriflora*, *K. rosea*, *K. pumila*, *K. corymbosa*, *K. rupestres*, *K. excelsa*, *K. variabilis* Mart. e *K. petiolaris*) são encontradas no Cerrado e em regiões vizinhas, e já foram estudadas sob o ponto de vista químico, apresentando as xantonas como os principais constituintes químicos (CORTEZ et al., 1998).

Uma revisão bibliográfica sobre os constituintes químicos presentes no gênero *Kielmeyera* foi realizada em janeiro de 2015. A TABELA 1.2 (ps. 7 à 19) descreve as principais espécies oriundas deste gênero, com ocorrência no Cerrado brasileiro.

TABELA1.2. Compostos isolados de espécies de *Kielmeyera* do Cerrado

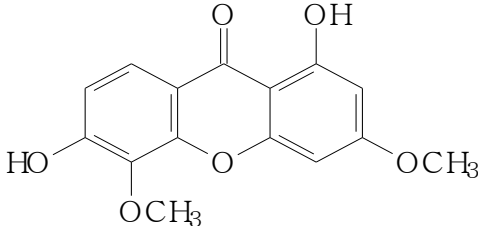
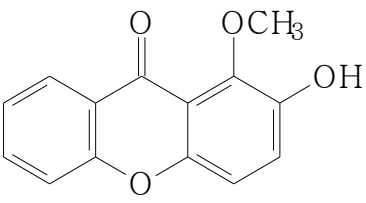
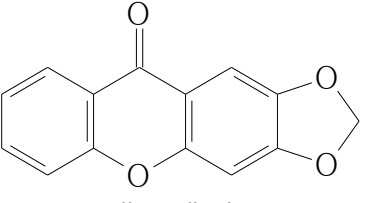
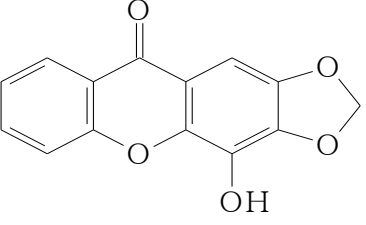
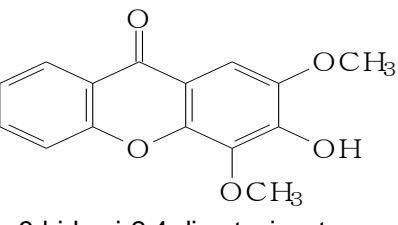
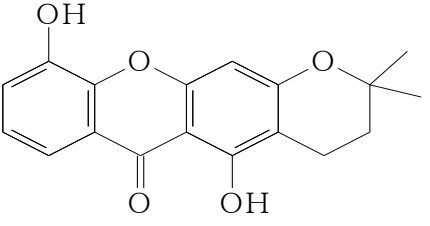
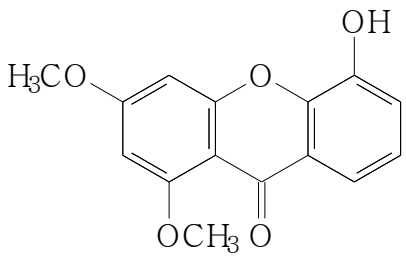
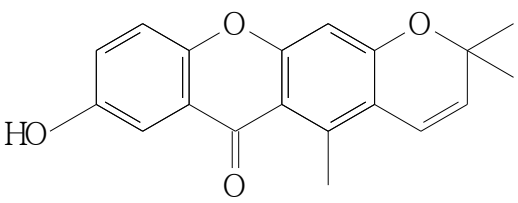
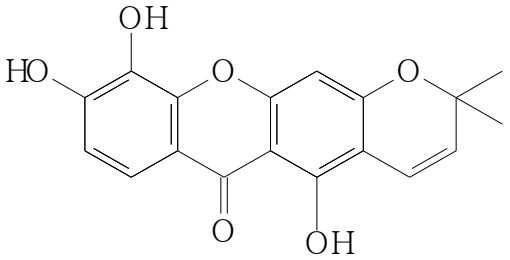
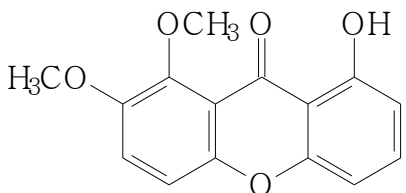
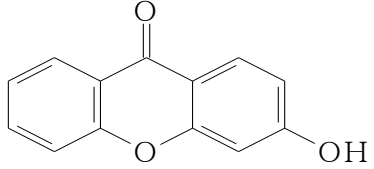
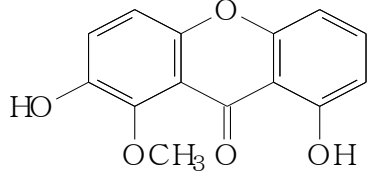
Xantonas		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p>1,6-diidroxi- 3,5-dimetoxixantona</p>	<i>K. cuspidata</i> (caule)	SOBRAL et al., 2008.
 <p>2-hidroxi-1-metoxixantona</p>		
 <p>2,3-metilenodioxixantona</p>		
 <p>4-hidroxi-2,3- metilenodioxixantona</p>	1) <i>K. cuspidata</i> (caule) 2) <i>K. ferruginea</i> (casca e madeira) 3) <i>K. coriacea</i> (folha) 4) <i>K. rubriflora</i> (folha e caule)	1) SOBRAL et al., 2008. 2) GOTTLIEB et al., 1969. 3) PIMENTA et al., 1964; PINTO et al., 1987; LOPES et al., 1977; CORTEZ et al., 1998. 4) GOTTLIEB et al., 1971.
 <p>3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona</p>	1) <i>K. cuspidata</i> (caule) 2) <i>K. coriacea</i> (folha) 3) <i>K. rubiflora</i> (folha e caule)	1) SOBRAL et al. 2008. 2) PIMENTA et al., 1964; PINTO et al., 1987; LOPES et al., 1977; CORTEZ et al., 1998. 3) GOTTLIEB et al., 1971.
 <p>6-dehidroxijacareubina</p>	<i>K. ferruginea</i> (casca e madeira)	GOTTLIEB et al., 1969.

TABELA 1.2. Compostos isolados de espécies de *Kielmeyera* do Cerrado (continuação)

Xantonas		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p>5-hidroxi-1,3-dimetoxixantona</p>	1) <i>K. ferruginea</i> (casca e madeira) 2) <i>K. coriacea</i> (folha) 3) <i>K. rupestres</i> *	1) GOTTLIEB et al., 1969. 2) PIMENTA et al., 1964; PINTO et al., 1987; LOPES et al., 1977; CORTEZ et al., 1998. 3) DUARTE et al., 1968.
 <p>osajaxantona</p>	1) <i>K. ferruginea</i> (casca e madeira) 2) <i>K. coriacea</i> (folha) 3) <i>K. corymbosa</i> *	1) GOTTLIEB et al., 1969. 2) PIMENTA et al., 1964. PINTO et al., 1987. LOPES et al., 1977. CORTEZ et al., 1998. 3) CORREA et al., 1966.
 <p>jacareubina</p>	<i>K. ferruginea</i> (casca e madeira)	GOTTLIEB et al., 1969.
 <p>1-hidroxi-7,8-dimetoxixantona</p>	<i>K. excelsa</i> (madeira)	GOTTLIEB et al., 1970; ANTONACCIO et al., 1965.
 <p>3-hidroxi-xantona</p>	<i>K. excelsa</i> (madeira)	GOTTLIEB et al., 1970; ANTONACCIO et al., 1965.
 <p>2,8-dihidroxi-1-metoxixantona</p>	1) <i>K. ferruginea</i> (casca e madeira) 2) <i>K. excelsa</i> (madeira)	1) GOTTLIEB et al., 1969. 2) GOTTLIEB et al., 1970; ANTONACCIO et al., 1965.

\*parte vegetal do isolamento não indicada na literatura

TABELA 1.2. Compostos isolados de espécies de *Kielmeyera* do Cerrado (continuação)

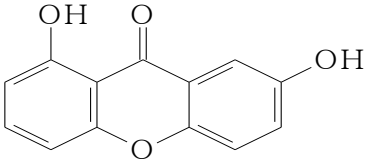
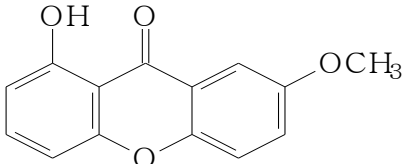
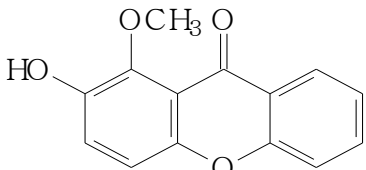
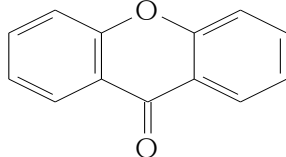
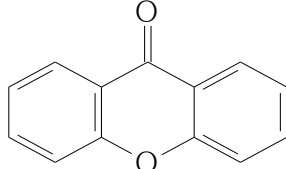
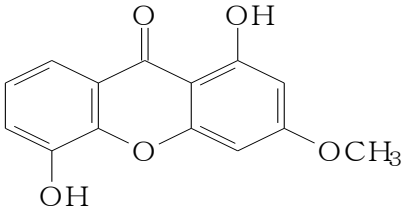
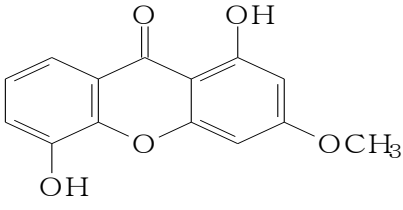
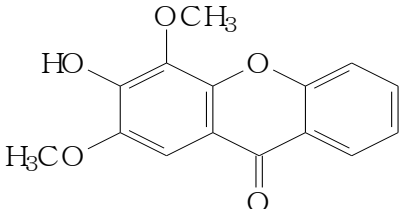
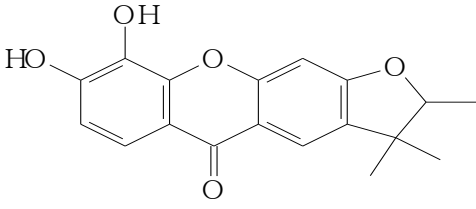
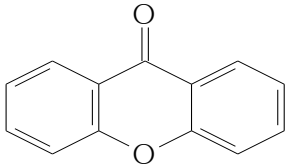
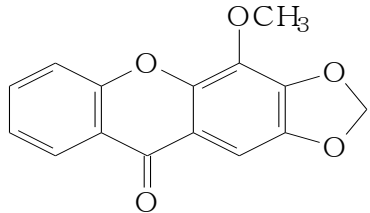
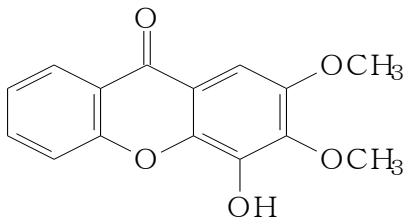
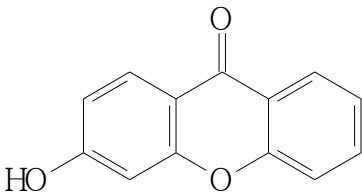
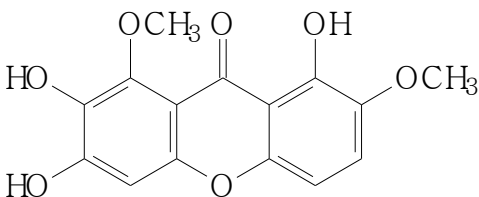
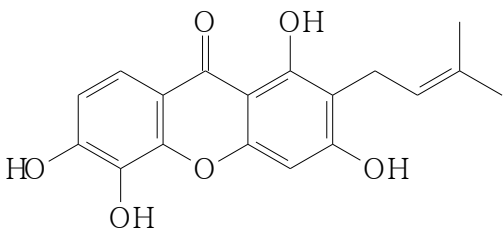
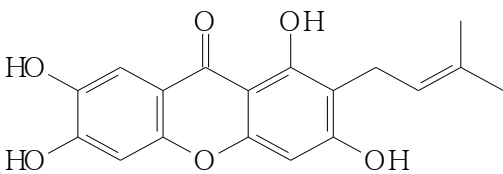
Xantonas		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p>1,7-dihidroxi-xantona</p>	<i>K. excelsa</i> (madeira)	GOTTLIEB et al.,1970. ANTONACCIO et al.,1965.
 <p>1-hidroxi-7-metoxixantona</p>		
 <p>2-hidroxi-1-metoxixantona</p>		
 <p>xantona</p>	1) <i>K. coriacea</i> (folha) 2) <i>K. variabilis</i> (caule)	1) PIMENTA et al., 1964; PINTO et al., 1987; LOPES et al., 1977; CORTEZ et al., 1998. 2) PINHEIRO et al., 2003.
 <p>carbotrona</p>		

TABELA 1.2 Compostos isolados de espécies de *Kielmeyera* do Cerrado (continuação)

<b>Xantonas</b>		
<b>Substância</b>	<b>Ocorrência e isolamento</b>	<b>Referência</b>
 <p>2-metoxixantona</p>	<i>K. coriacea</i> (folha)	PIMENTA et al., 1964; PINTO et al., 1987; LOPES et al., 1977; CORTEZ et al., 1998.
 <p>mesuaxantona A</p>	1) <i>K. coriacea</i> (folha) 2) <i>K. rupestres</i> *	1) PIMENTA et al., 1964; PINTO et al., 1987; LOPES et al., 1977; CORTEZ et al., 1998. 2) DUARTE et al., 1968.
 <p>xantonolignoide</p>		PIMENTA et al., 1964. PINTO et al., 1987. LOPES et al., 1977. CORTEZ et al., 1998.
 <p>toxiloxantona C</p>	<i>K. coriacea</i> (folha)	
 <p>carbotrona</p>		

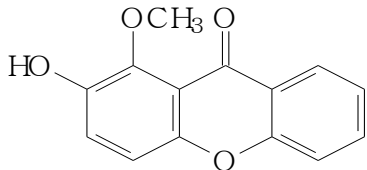
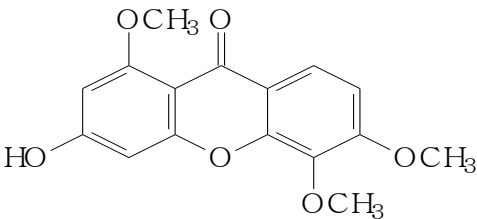
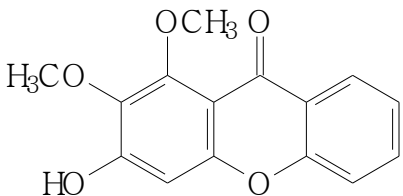
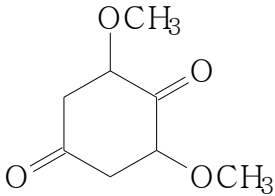
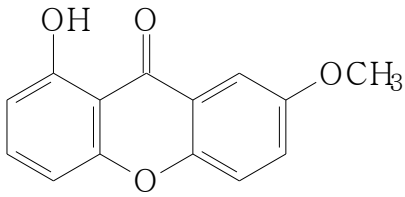
\*parte vegetal do isolamento não indicada na literatura

TABELA 1.2. Compostos isolados de espécies de *Kielmeyera* do Cerrado (continuação)

Xantonas		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p>4-metoxi-2,3-metilenodioxixantona</p>	1) <i>K. coriacea</i> (folha) 2) <i>K. rubiflora</i> (casca e madeira) 3) <i>K. rupestres</i> *	1) PIMENTA et al., 1964. PINTO et al., 1987. LOPES et al., 1977. CORTEZ et al., 1998. 2) GOTTLIEB et al., 1971. 3) DUARTE et al., 1968.
 <p>4-hidroxi-2,3-dimetoxixantona</p>	1) <i>K. rubriflora</i> (casca e madeira) 2) <i>K. rupestres</i> *	1) GOTTLIEB et al., 1971. 2) DUARTE et al., 1968.
 <p>2-hidroxi-xantona</p>	<i>K. rubriflora</i> (casca e madeira)	GOTTLIEB et al., 1971.
 <p>1,7-dimetoxi-2,3,8-trihidroxi-xantona</p>		
 <p>1,3,5,6-tetrahidroxi-2-prenilxantona</p>	<i>K. variabilis</i> (caule)	PINHEIRO et al., 2003.
 <p>assiguxantona B</p>		

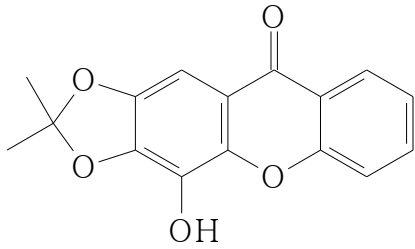
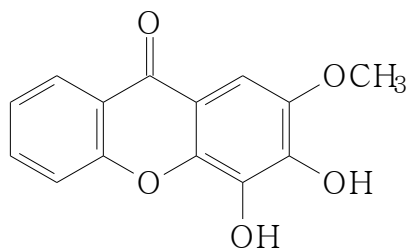
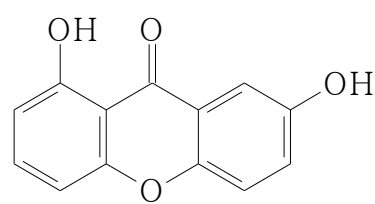
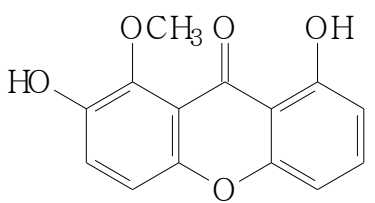
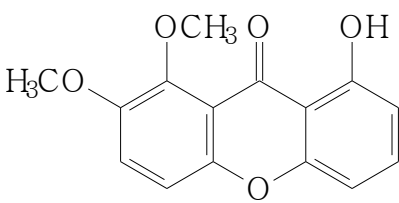
\*parte vegetal do isolamento não indicada na literatura

TABELA 1.2. Compostos isolados de espécies de *Kielmeyera* do Cerrado (continuação)

Xantonas		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p>1-metoxi-2-hidroxixantona</p>		
 <p>5-hidroxi-1,5,6-trimetoxixantona</p>	<i>K. rupestris</i> *	DUARTE et al., 1968.
 <p>3-hidroxi-1,2-dimetoxixantona</p>		
 <p>2,6-dimetoxiquinona</p>		
 <p>1-hidroxi-7-metoxixantona</p>	<i>K. corymbosa</i> *	CORREA et al., 1966.

\*parte vegetal do isolamento não indicada na literatura

TABELA 1.2. Compostos isolados de espécies de *Kielmeyera* do Cerrado (continuação).

Xantonas		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p>4-hidroxi-2,3-metilenodioxixantona</p>	<i>K. corymbosa</i> *	CORREA et al., 1966.
 <p>3,4-dihidroxi-2-metoxixantona</p>		
 <p>1,7-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona</p>	<i>K. petiolaris</i> *	GOTTLIEB et al., 1966. GOTTLIEB et al., 1965.
 <p>1,7-dihidroxi-2,3-metilenodioxixantona</p>		
 <p>1-hidroxi-7,8-dimetoxixantona</p>		

\*parte vegetal do isolamento não indicada na literatura

TABELA 1.2. Compostos isolados de espécies de *Kielmeyera* do Cerrado (continuação)

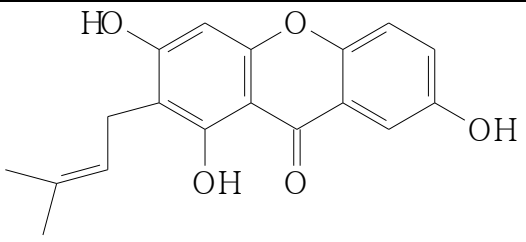
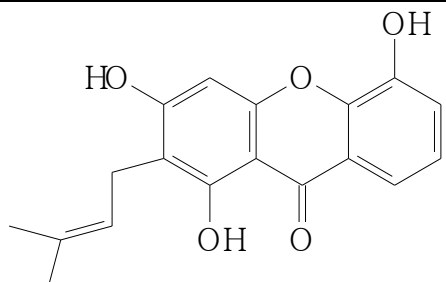
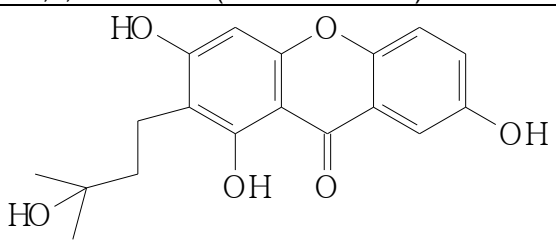
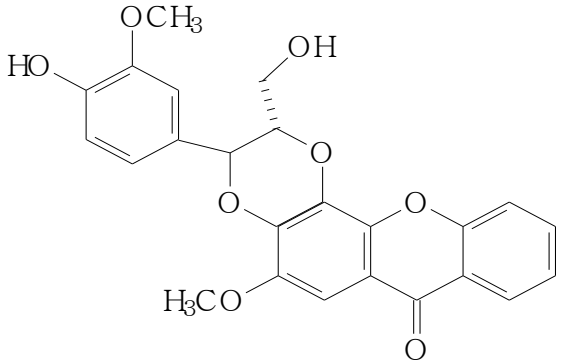
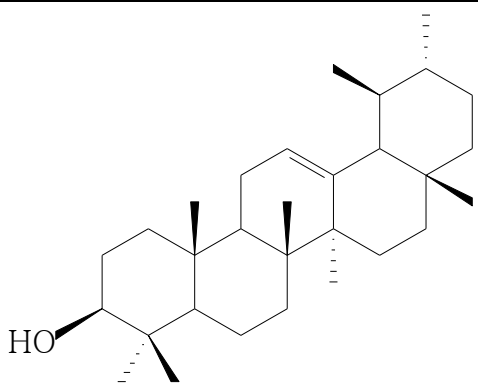
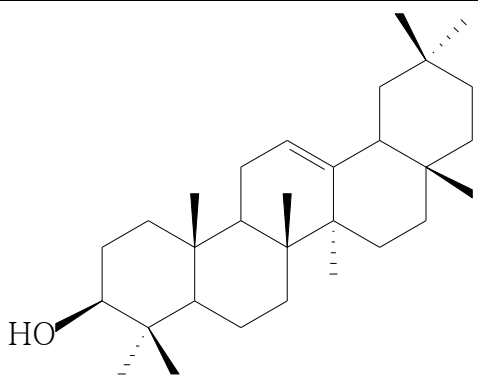
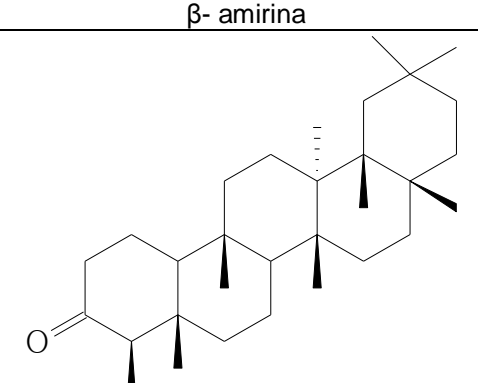
Xantonas		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p>1,3,7-triidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona</p>	<p><i>K. coriacea</i> (casca do caule)</p>	<p>CORTEZ et al., 1999.</p>
 <p>1,3,5-triidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona</p>		
 <p>1,3,7-triidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-xantona</p>		
 <p>kielcorina</p>		

TABELA 1.2. Compostos isolados de espécies de *Kielmeyera* do Cerrado (continuação)

Terpenoides		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p><math>\alpha</math>- amirina</p>	<p>1) <i>K. cuspidata</i> (caule) 2) <i>K. rosea</i>* 3) <i>K. pumila</i> (caule)</p>	<p>1) SOBRAL et al., 2008. 2) SILVA et al., 1968. 3) NAGEM et al., 1988.</p>
 <p><math>\beta</math>- amirina</p>	<p><i>K. cuspidata</i> (caule)</p>	<p>SOBRAL et al., 2008.</p>
 <p>friedelina</p>	<p><i>K. rosea</i>*</p>	<p>SILVA et al., 1968.</p>

\*parte vegetal do isolamento não indicada na literatura

TABELA 1.2. Compostos isolados de espécies de *Kielmeyera* do Cerrado (continuação)

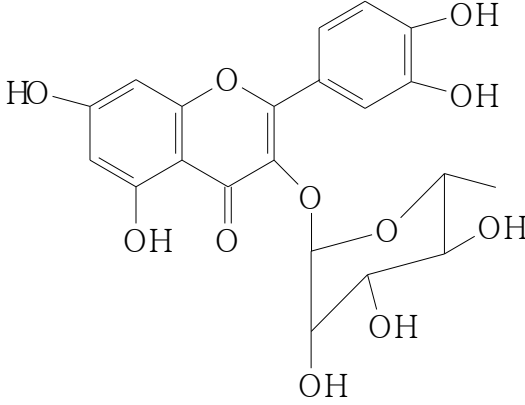
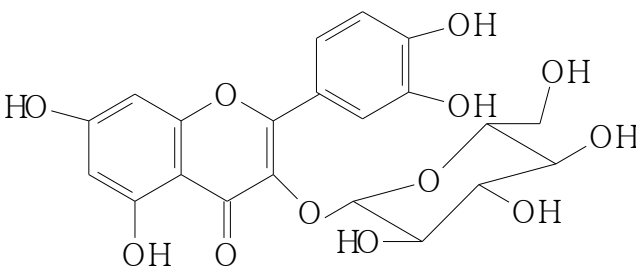
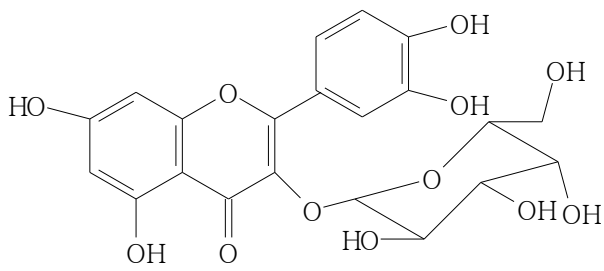
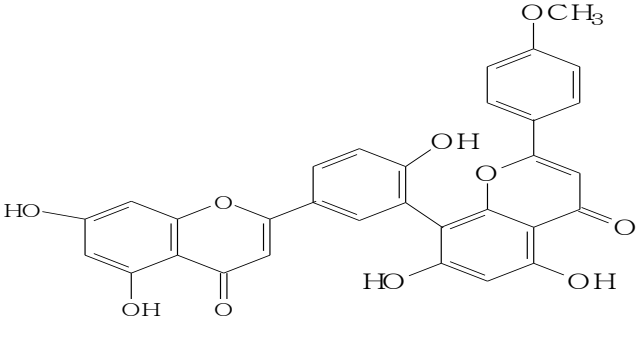
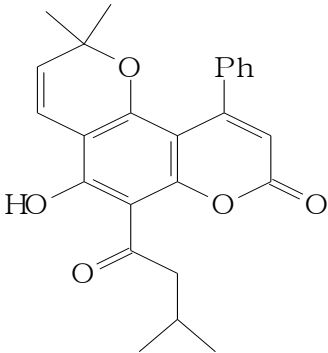
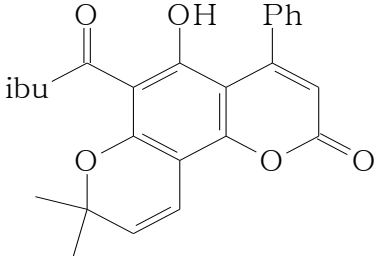
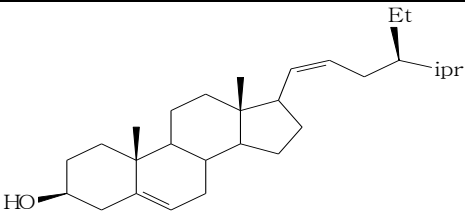
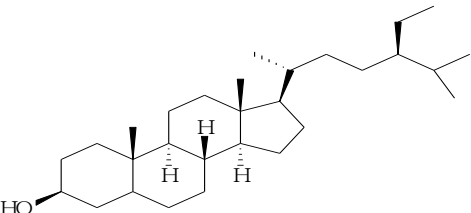
Flavonoides		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p>quercitrina</p>		
 <p>quercetina-3-O-glicosídeo</p>	<i>K. variabilis</i> (folhas)	COQUEIRO, 2010.
 <p>quercetina-3-O-galactosídeo</p>		
 <p>podocarpusflavona A</p>		

TABELA 1.2. Compostos isolados de espécies de *Kielmeyera* do Cerrado (continuação)

Cumarinas		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p>isomammeigina</p>	<i>K. pumila</i> (caule)	NAGEM et al., 1988.
 <p>mammeigina</p>		
Esteroides		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p>estigmasterol</p>	<i>K. corymbosa</i> *	CORREA et al., 1966.
 <p>sitosterol</p>	<i>K. rosea</i> *	SILVA et al., 1968.

\*parte vegetal do isolamento não indicada na literatura

TABELA 1.2. Compostos isolados de espécies de *Kielmeyera* do Cerrado (continuação)

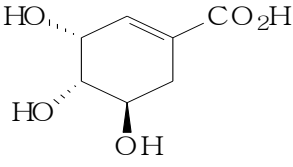
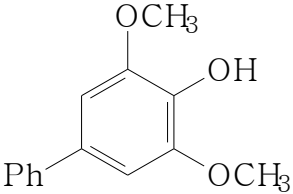
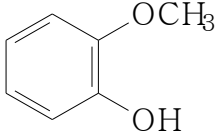
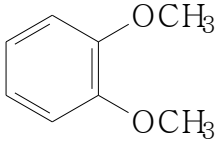
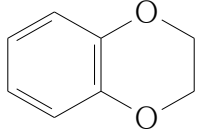
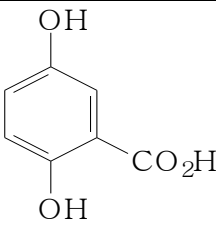
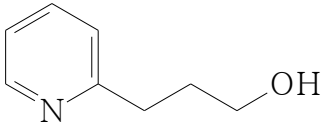
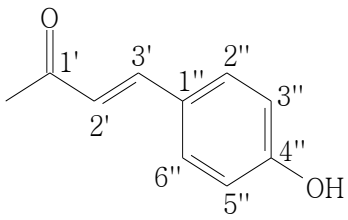
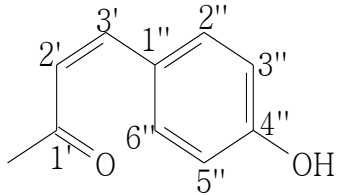
Derivados do ácido chiquímico		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p>ácido chiquímico</p>	<i>K. pumila</i> (caule)	NAGEM et al., 1988.
 <p>aucuparina</p>	<i>K. coriacea</i> (caule, casca e madeira)	PIMENTA et al., 1964. PINTO et al., 1987. LOPES et al., 1977. CORTEZ et al., 1998.
 <p>o-metoxifenol</p>		
 <p>o-metoxianisol</p>		
 <p>etilenoo-fenileno dióxido</p>		
 <p>2,5-dihidroxi-benzoico</p>		

TABELA 1.2. Compostos isolados de espécies de *Kielmeyera* do Cerrado (continuação)

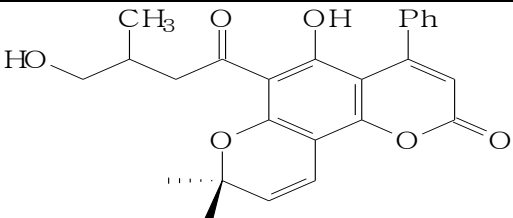
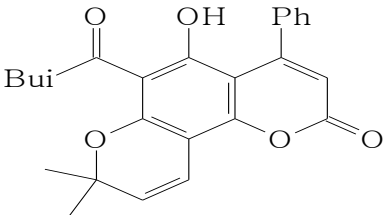
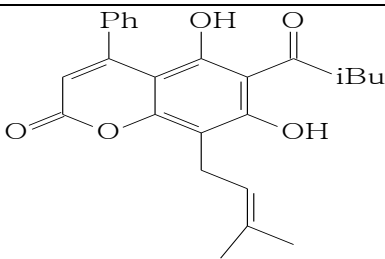
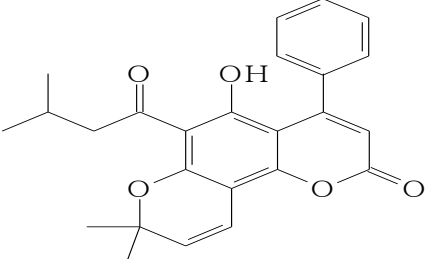
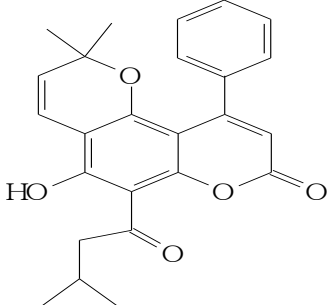
Alcaloides		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p><i>n</i>-triacontanol</p>	<i>K. rosea</i> *	SILVA et al., 1968.
Derivados do ácido cinâmico		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p>ácido <i>trans p</i>-cumárico</p>	<i>K. coriacea</i> (folhas)	CORTEZ et al., 1999.
 <p>ácido <i>cis p</i>-cumárico</p>		

\*parte vegetal do isolamento não indicada na literatura

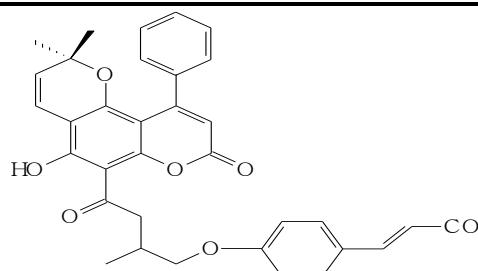
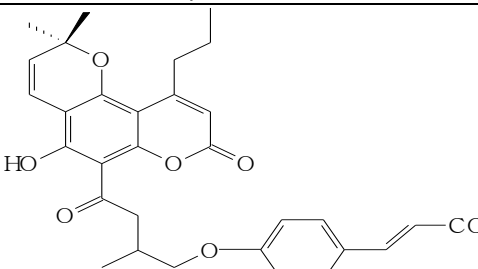
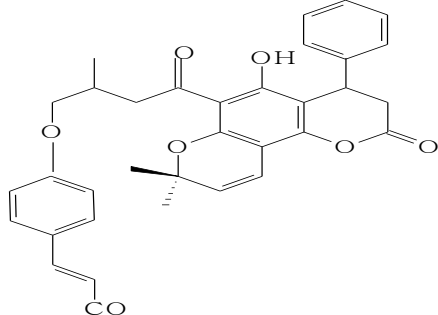
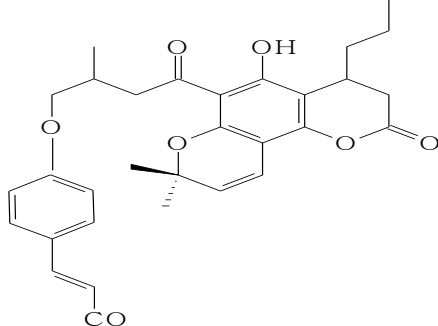
Das espécies citadas na tabela anterior, a *K. rosea* é a única para a qual não foi relatada xantona (SILVA et al., 1968).

Os trabalhos mais recentes sobre o gênero *Kielmeyera* vêm sendo desenvolvidos com espécies de ocorrência na Caatinga, as quais revelam as cumarinas como os seus principais constituintes químicos (TABELA 1.3, ps. 20 à 26) (ANDRADE, 2007).

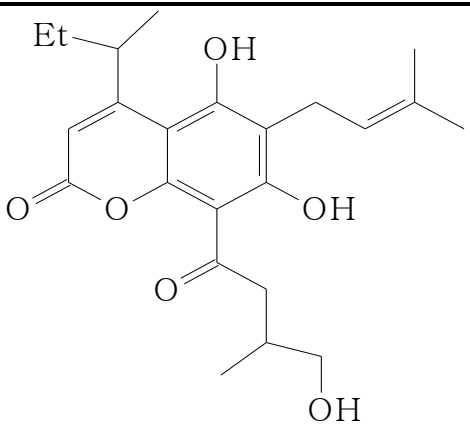
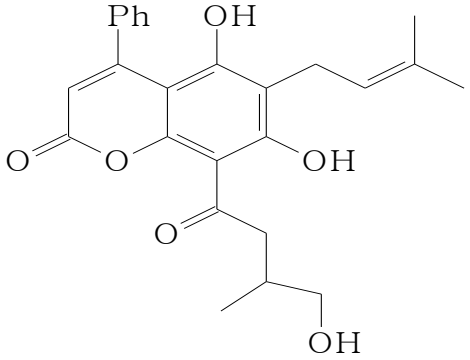
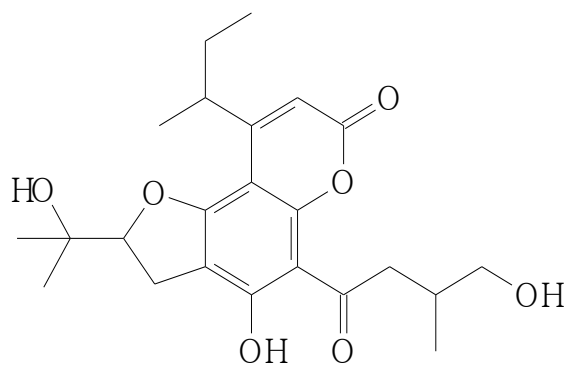
TABELA 1.3. Substâncias isoladas de espécies do gênero *Kielmeyera* na Caatinga

Cumarinas		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p>hidroximameigina</p>	<i>K. elata</i> (caule)	GRAMACHO et al., 1999.
 <p>mammea A/A</p>		
 <p>mammea AA/A</p>		
 <p>1,2-diidro-5-hidroxi-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-4-(3-metilbutiril)-6-fenilfuro[2,3]benzopiran-8-ona</p>		
 <p>isomameigina</p>		

TABELAS 1.3. Substâncias isoladas de espécies do gênero *Kielmeyera* na Caatinga (continuação)

Cumarinas		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p>7-hidroxi-8-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-fenil-2',2'-dimetil-2H,6H-benzo [1,2-b:3,4-b']-dipiran-2-ona</p>		
 <p>7-hidroxi-S-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-n-propil-2',2'-dimetil-2H,6H-benzo [1,2-b:3,4-b']-dipiran-2-ona</p>		
 <p>5-hidroxi-6-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-fenil-2',2'-dimetil-2H,6H-benzo [1,2-b:3,4-b']-dipiran-2-ona</p>	<p><i>K. argentea</i> (caule)</p>	<p>CRUZ et al., 1998</p>
 <p>5-hidroxi-6-(4-cinamoil-3-metil-1-oxobutil)-4-n-propil-2',2'-dimetil-2H,6H-benzo [1,2-b:3,4-b']-dipiran-2-ona.</p>		

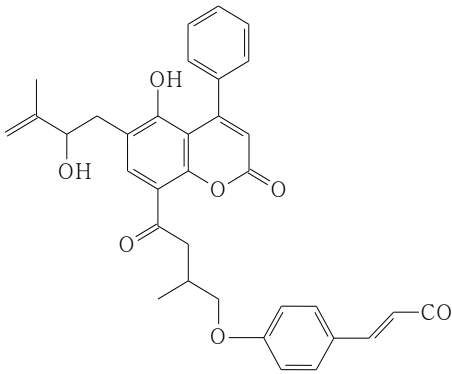
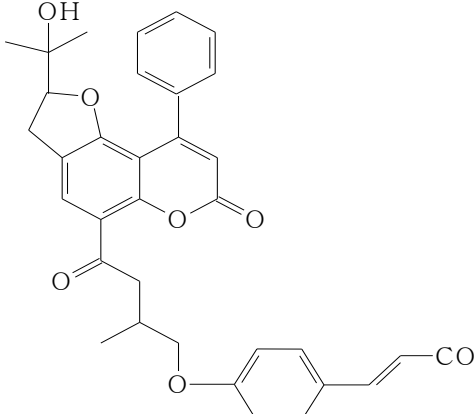
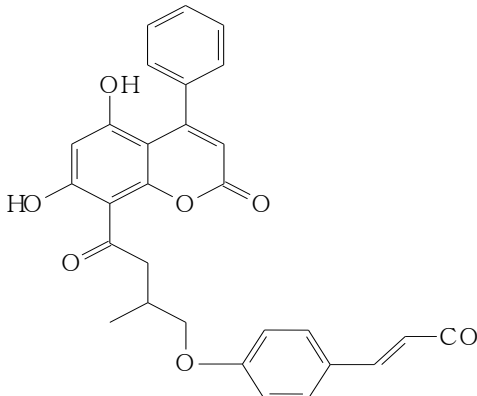
TABELAS 1.3. Substâncias isoladas de espécies do gênero *Kielmeyera* na Caatinga (continuação)

Cumarinas		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p>4-(1-metilpropil)-5,7-dihidroxi-8-(4-hidroxi-3-metilbutiril)-6-(3-metilbut-2-enil)-cromen-2-ona</p>		
 <p>5,7-dihidroxi-8-(4-hidroxi-3-metilbutiril)-6-(3-metilbut-2-enil)-4-fenilcromen-2-ona</p>		
 <p>9-(1-metilpropil)-4-hidroxi-5-(4-hidroxi-3-metilbutiril)-2-(1-hidroxi-1-metiletil)-2,3-dihidrofuro[2,3]cromen-7-ona</p>		

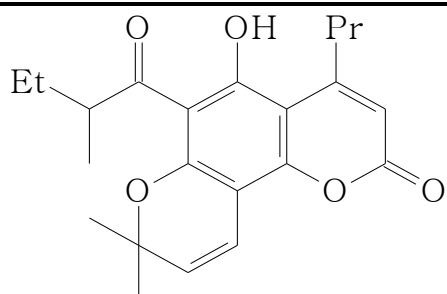
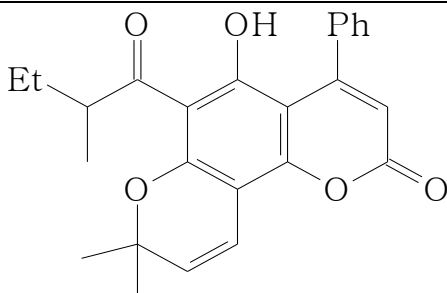
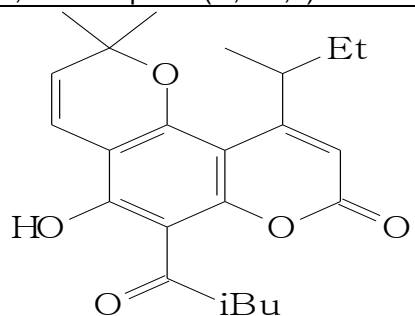
*K. albopunctata*  
(caule)

SCIO et al.,2003.

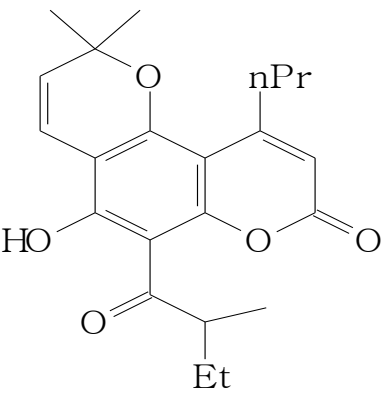
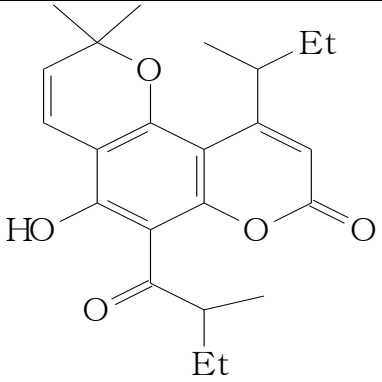
TABELAS 1.3. Substâncias isoladas de espécies do gênero *Kielmeyera* na Caatinga (continuação)

Cumarinas		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p>5,7-dihidroxi-6-(2'-hidroxi-3'-metil-3'-butenil)-8-(4''-cinamoil-3''-metil-1''-oxobutil)-4-fenilcumarina</p>		
 <p>7-hidroxi-8-(4''-cinamoil-3''-metil-1-oxobutil)-2'-(2-hidroxiisopropil)dihidrofurano-(5',4':5,6)-4-fenilcumarina</p>	<i>K. reticulata</i> (caule)	CRUZ et al., 2002.
 <p>5,7-dihidroxi-8-(4''-cinamoil-3''-metil-1-oxobutil)-4-fenilcumarina</p>		

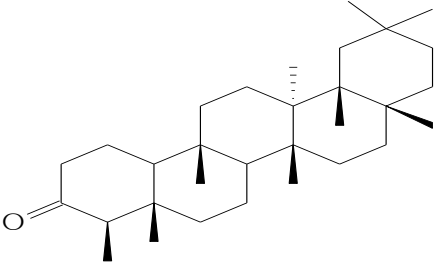
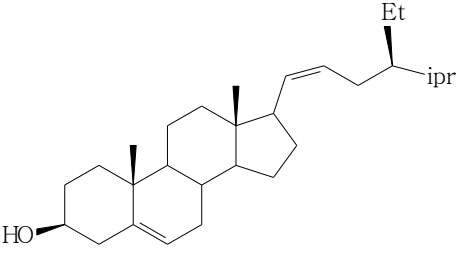
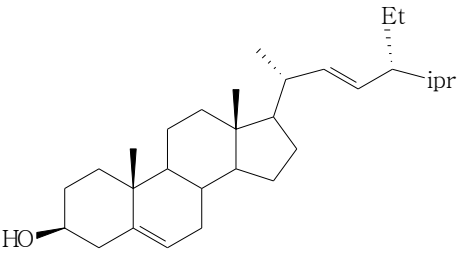
TABELAS 1.3. Substâncias isoladas de espécies do gênero *Kielmeyera* na Caatinga (continuação)

Cumarinas		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p>5-hidroxi-6-(2-metil-1-oxobutil)-4-<i>n</i>-propil-6',6'-dimetilpirano(2',3':7,8)-cumarina</p>		
 <p>5-hidroxi-6-(3-metil-1-oxobutil)-4-fenil-6',6'-dimetilpirano(2',3':7,8)-cumarina</p>	<i>K. lathrophyton</i> (caule)	CRUZ et al., 2001.
 <p>7-hidroxi-8-(2-metil-1-oxobutil)-4-s-butil-6',6'-dimetilpirano(2',3':5,6)-cumarina</p>		

TABELAS 1.3. Substâncias isoladas de espécies do gênero *Kielmeyera* na Caatinga (continuação)

Cumarinas		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p>7-hidroxi-8-(2-metil-1-oxobutil)-4-<i>n</i>-propil-6',6'-dimetilpirano(2',3':5,6)-cumarina</p>	<p><i>K. lathrophyton</i> (caule)</p>	<p>CRUZ et al., 2001.</p>
 <p>7-hidroxi-8-(3-metil-1-oxobutil)-4-s-butil-6',6' dimetilpirano(2',3':5,6)-cumarina</p>		

TABELAS 1.3. Substâncias isoladas de espécies do gênero *Kielmeyera* na Caatinga (continuação)

Triterpenoide		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p>friedelina</p>	1) <i>K. elata</i> (caule) 2) <i>K. lathrophyton</i> (caule)	1) GRAMACHO et al., 1999. 2) CRUZ et al., 2001
Esteroides		
Substância	Ocorrência e isolamento	Referência
 <p>estigmasterol</p>	<i>K. lathrophyton</i> (caule)	CRUZ et al., 2001.
 <p>estrumasterol</p>		

Nesse contexto, pode-se mencionar que as cumarinas vêm sendo caracterizadas no gênero *Kielmeyera* pela presença de um esqueleto 5,7-di-oxigenado, o qual possui um substituinte fenila ou alquila ligado ao carbono C-4 e substituintes acila ou prenila ligados aos carbonos C-6 ou C-8 (NOLDIN et al., 2006).

Diante da diversidade de classes de metabólitos secundários supracitada, a continuidade dos estudos químicos de espécies do gênero *Kielmeyera*, visando o conhecimento de novas estruturas moleculares, torna-se relevante. Portanto, neste estudo é proposta a investigação de *K. coriacea*.

### 1.2.2. A ESPÉCIE *Kielmeyera coriacea* MART. & ZUCC. E SEU POTENCIAL BIOLÓGICO

A espécie *K. coriacea* (FIGURA 1.5, p. 27) foi descrita por Martius & Zuccarini e é conhecida popularmente como pau-santo. Sua distribuição geográfica no Brasil se dá nas regiões Norte (Pará, Amazonas e Rondônia), Nordeste (Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal e Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais e São Paulo) e Sul (Paraná) (FIGURA 1.6, p. 27) (BITTRICH, 2010).

FIGURA 1.5. Partes vegetais de *K. coriacea*



Fonte: <http://timblindim.wordpress.com/arvores/pau-santo>. Acesso em 16/12/2014.

FIGURA 1.6. Distribuição geográfica da espécie *K. coriacea* no Brasil



Fonte: BITTRICH, 2010

Essa espécie apresenta diversas características morfológicas, podendo ser encontrada como arbusto ou árvore, com ramos tortuosos sem pêlos, com cicatrizes, casca espessa de cortiça que se despreza facilmente e cor clara. Possui látex de cor creme e abundante. As folhas são alternas, coriáceas, reunidas no ápice dos ramos, tendo até 22 cm de comprimento; os frutos são secos (tipo cápsula). (REDE DE SEMENTES DO CERRADO, 1995).

A espécie *K. coriacea* apresenta interesse econômico para a produção de madeira, carvão, celulose e tanino para a indústria de couro (PINTO et al., 1994). CORTEZ et al. (1998) ressalta o uso das flores e frutos por floricultores para confecção de arranjos ornamentais, denominados popularmente de flores do planalto.

Essa espécie é muito rica em xantonas (ZAGOTO et al., 2006; AUDI et al., 2002), triterpenoides e bifenilas (AUDI et al., 2002), que inibem o metabolismo energético mitocondrial (CORTEZ, 1998).

Segundo CORTEZ et al. (1999), uma bifenila e oito xantonas foram isoladas do extrato diclorometano da casca do caule de *K. coriacea*; as xantonas foram avaliadas quanto às suas propriedades farmacológicas, apresentando atividade antitumoral, antifúngica, antibacteriana, tuberculostática e anti-inflamatória. Nesse mesmo estudo, quatro xantonas e a bifenila apresentaram atividade frente ao fungo patogênico *Cladosporium cucumerinum* e duas xantonas prenilhadas inibiram o crescimento de *Candida albicans*

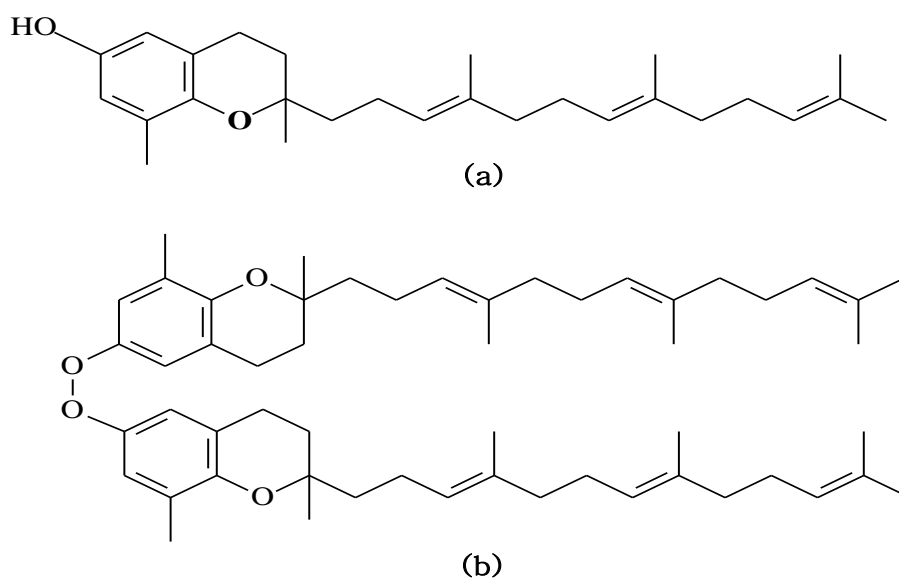
A substância aucuparina (TABELA 1.2, p. 18), isolada no trabalho de CORTEZ et al. (1999), foi testada biologicamente e apresentou atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* com valor de Concentração Inibitória Mínima (CIM) de  $3,12 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ; já a substância 1,3,7-triidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona foi ativa contra *Staphylococcus aureus* (CIM de  $12,5 \mu\text{g.mL}^{-1}$ ) (CORTEZ et al., 2002).

O extrato diclorometano das folhas de *K. coriacea* foi avaliado frente às larvas de *Aedes aegypti*. Os resultados foram promissores, indicando a viabilidade do estudo biomonitorado das frações oriundas do mesmo, em busca de substâncias que também poderão ser ativas frente a este mosquito (COELHO et al., 2009).

O extrato hidroalcoólico das folhas de *K. coriacea* foi avaliado no sistema nervoso central em ratos, mostrando-se efetivo como ansiolítico, mas não como antidepressivo (AUDI et al., 2002). No entanto, o extrato hidroalcoólico do caule apresentou um perfil de composto com atividade ansiolítica e antidepressiva (MARTINS et al., 2004). Para esse mesmo extrato, foi avaliada a ação antiúlcera, utilizando modelos de estresse agudo, indometacina e etanol-ácido para induzir úlcera gástrica experimental. Os resultados mostraram proteção antiúlcera significativa nos modelos de úlcera induzida por indometacina e etanol-ácido, mas não foram significativos frente ao modelo de estresse agudo. Portanto, os resultados obtidos nesse trabalho sugerem que esse extrato aumenta a resistência à agentes necrosantes e promove um efeito protetor na mucosa gástrica (GOULART et al., 2005).

Um estudo realizado com o extrato hexano da casca da raiz de *K. coriacea* resultou no isolamento de uma mistura de  $\delta$ -tocotrienol e o seu dímero (FIGURA 1.7, p. 29). A citotoxicidade dessa mistura foi avaliada frente à quatro células cancerígenas humanas (melanona, cólon, leucemia e glioblastoma); os resultados sugerem que a mistura consegue suprimir o crescimento da leucemia e reduzir a sobrevivência da célula, dependendo da concentração utilizada em cada ensaio (MESQUITA et al., 2011).

FIGURA 1.7. Estruturas químicas do a)  $\delta$ -tocotrienol; b)  $\delta$ -tocotrienolperoxidímero.



Fonte: MESQUITA, 2011

Em relação ao extrato da entrecasca de *K. coriacea*, este apresenta atividade antioxidante e antimicrobiana; em concentrações menor que 10 µg/mL, o extrato e as frações em hexano inibiram o crescimento de *Streptococcus mutans*, principal agente causador da cárie dentária. Valores de CIM para substâncias puras abaixo de 10 µg/mL são considerados potenciais agentes antimicrobianos (AQUINO et al., 2013).

A espécie *K. coriacea*, conhecida popularmente como pau-santo, apresenta indicações para o tratamento de esquistossomose, leishmaniose, malária, infecção por bactérias e fungos (ALVES, 2000), dentre outras.

Em relação à medicina popular, os índios Kraho, do Brasil, utilizam *K. coriacea* em preparações que possuem ação no sistema nervoso central (RODRIGUES & CARLINI, 2005). Da casca é extraída uma resina amarela tônica e emoliente, utilizada no tratamento de dores de dentes (CORREA, 1969).

Com base nesses estudos, nota-se a importância de realizar o estudo químico-biológico dessa espécie na busca de substâncias com potencial bioativo, bem como de correlações com a etnobotânica e etnofarmacologia.

### 1.3 - ESTUDO BIOLÓGICO

#### 1.3.1 – ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Nos últimos anos, a busca por PNs pelo mercado consumidor vem se intensificando, e com isso o número de pesquisas voltadas ao isolamento e identificação de substâncias químicas de origem natural tem crescido de maneira significativa. Uma alternativa apropriada para a redução da toxicidade nas formulações de muitos medicamentos é o emprego de agentes antimicrobianos de origem animal e vegetal (KAMISZ, 2005).

Atualmente um grande número de recursos naturais provenientes de agentes antimicrobianos peptídicos, bem como vários análogos sintéticos, foram testados em relação à sua possível aplicação como agentes quimioterapêuticos, e devido à sua baixa toxicidade, há a possibilidade dos mesmos serem usados como fármacos para o tratamento de doenças infecciosas (ZASLOFF, 2002).

As plantas medicinais possuem potencial antimicrobiano, o qual está relacionado às composições químicas de cada espécie. Devido à quantidade de plantas para análise e suas diversidades químicas, se torna relevante a busca por métodos efetivos para avaliar a eficiência das mesmas. No entanto, faz-se necessária uma análise prévia para avaliação biológica dos seus extratos (*screening*), a fim de garantir a melhor eficiência e segurança, permitindo assim a identificação de princípios ativos (DAS, TIWARI, & SHRIVASTAVA, 2010).

Na perspectiva de encontrar novas substâncias com atividade antimicrobiana frente ao crescimento de micro-organismos cada vez mais resistentes aos antimicrobianos comerciais, vários extratos derivados de plantas medicinais já foram testados. Nesse contexto, dado o uso de *K. coriacea* na medicina tradicional para diversas enfermidades, torna-se relevante a avaliação da mesma frente à micro-organismos relacionados com as mesmas, a fim de verificar o potencial efeito biológico desta espécie.

### 1.3.2 - ATIVIDADE ANTIULCEROGÊNICA

A úlcera gástrica é um tipo de doença crônica que causa lesões superficiais no tecido cutâneo e mucoso. Geralmente é causada por um processo inflamatório e é conhecida popularmente como ferida. Ao atingir o estômago ou o duodeno, é chamada de úlcera péptica (d' ACAMPORA et al., 2008). Afeta cerca de 10% da população dos países industrializados, acometendo de 11 a 20% dos homens e de 8 a 11% das mulheres. Isso faz com que haja grandes gastos com a saúde (FERREIRA, 2005).

A úlcera pode ser causada por diversos fatores, tais como, o aumento na secreção gástrica, a diminuição do fluxo sanguíneo, a inibição do crescimento e proliferação da mucosa, além de hábitos de vida, como estresse, tabagismo, uso contínuo de drogas anti-inflamatórias e consumo excessivo de álcool (WALLACE & MA 2001; BRUNTON, 1996).

Para o tratamento dessa lesão, geralmente são utilizados antiácidos visando a sua redução. Um agravante na utilização desses fármacos são as reações adversas como trombocitopenia, reações anafiláticas e impotência (DONATINI et al., 2009).

Devido aos fatores agravantes supracitados, bem como o valor do tratamento não ser acessível à toda a população (HIRUMA-LIMA et al., 2006), nota-se a necessidade de desenvolver pesquisas com plantas medicinais, verificando a sua possível atividade antiulcerogênica, e com isso produzir novos agentes terapêuticos que sejam menos tóxicos, mais eficazes e com maior acessibilidade à população carente (DANTAS, 2012).

Neste contexto, considerando que o extrato hidroalcoólico das folhas de *K. coriacea* já foi avaliado frente à ação antiúlcera e apresentou atividade significativa nos modelos de úlcera induzida por indometacina e etanol-ácido (GOULART et al., 2005), faz-se necessária a continuação dos estudos, avaliando tanto o extrato das folhas (extraído com outros solventes) como extratos de outras partes da planta, além das frações e substâncias isoladas dos mesmos.

### 1.3.3 - AS ENZIMAS CATEPSINAS

As enzimas são alvos biológicos muito importantes para o desenvolvimento de novos fármacos. Possuem um poder catalítico extraordinário, grau elevado de especificidade para os seus respectivos substratos e aceleram as reações químicas. Estão no centro de cada um dos processos bioquímicos, e possuem um papel essencial em inúmeras vias bioquímicas associadas à desordens e doenças em humanos (LEHNINGER, 2011).

As catepsinas, conhecidas como cisteíno proteases, representam uma classe de enzimas que têm por função primária a degradação aleatória de proteínas nos lisossomos, podendo ser encontradas em muitos tipos de células (TURK & GUNCAR, 2003), porém também estão envolvidas em diferentes patologias, tais como aterosclerose, artrite reumatoide, osteoporose e diferentes tipos de cânceres. Estão distribuídas entre as famílias das aspartil peptidases (D e E), serino peptidases (A e G) e cisteíno peptidases (B, C, F, H, K, L, O, S, V, W e X) (BROMME & KALETA, 2002). As cisteíno peptidases constituem os membros da família da papaína (BROCKLEHURST & PHILPOTT, 2013). Possuem 570 genes em humanos e são classificadas em seis categorias principais de acordo com o seu mecanismo catalítico: serina,

ácido (aspartato e glutamato), cisteína, metalo e proteases treonina (RAWLINGS, BARRET e BATEMAN, 2012).

Conforme supracitado, apresentam como principal função a reciclagem e degradação de proteínas em lisossomos. No entanto, esta definição tem mudado consideravelmente durante as últimas décadas, com a demonstração do seu envolvimento em vários processos fisiopatológicos.

As catepsinas desempenham funções específicas, como no pulmão a homeostase, e eventos fisiopatológicos, tais como a asma, fibrose pulmonar, doença pulmonar obstrutiva crônica (incluindo enfisema e bronquite crônica), silicose, displasia broncopulmonar ou invasão tumoral (LALMANACH, 2015).

### 1.3.3.1 - AS CATEPSINAS

Muitas das cisteíno catepsinas, como a CatS, CatK, CatL e a CatV, são elastases e colagenases potentes (YASUDA et al. 2004) implicadas na remodelação da parede arterial humana, e são expressas altamente em lesões arteriais humanas, aterosclerose e aneurismas abdominais aórticos (AAAs) (HELSKE, 2006).

Estas enzimas estão envolvidas na degradação de proteínas intracelulares e algumas delas têm uma larga distribuição tecidual (CatL e CatB), enquanto outras possuem uma distribuição muito mais seletiva (CatK, CatS e CatW) (ROBICHAUD et al., 2003).

A CatK é essencial para a reabsorção óssea e é mediada pelos osteoclastos; também é detectada em células de câncer de mama e em metástase de ossos (DUONG et al., 2014). É responsável pela degradação de proteínas da matriz óssea, incluindo colágeno do tipo I (DUONG, 2012). Portanto, a busca de inibidores específicos e seletivos para CatK se torna um caminho terapêutico potente para o tratamento de doenças relacionadas com a perda óssea (GAUTHIER et al., 2008).

A CatL está associada a processos patológicos tais como reabsorção óssea, metástase, artrite e reumatoide (SEVERINO, 2008). Um aumento dos níveis de CatL foi encontrada em diferentes tipos de câncer, como tumores gastrointestinais, câncer de mama, câncer do endométrio, câncer de ovário, e carcinoma de células escamosas (MIYAMOTO, 2011).

Além disso, provou-se que o nível de expressão de catepsina correlaciona-se positivamente com metástases e com o mau prognóstico para pacientes com câncer, para o qual a CatL tem sido sugerida como um dos biomarcadores potenciais desse prognóstico (ZHANG, 2014). Além disso, a Cat L também foi identificada em pacientes que sofrem de artrite (IKEDA et al., 2000).

Por outro lado, sugere-se que um aumento da expressão e atividade da CatL está implicada no desenvolvimento de várias condições patológicas. Cerca de 30 anos atrás, as catepsinas foram encontradas e associadas ao câncer. No entanto, o seu papel significativo em termos de progressão tumoral e invasão tem sido estabelecido por muitos estudos clínicos recentes (LEGOWSKA, 2014).

A CatV é uma elastase altamente eficaz e tem sido associada à degradação da matriz extracelular fisiológica e patológica. No entanto, seu mecanismo de ação permanece indefinido. Considerando que a CatV humana exibe uma potente atividade elastolítica, é uma catepsina estruturalmente homóloga à CatL, pois compartilham cerca de 78% da sequência de aminoácidos (LIU, 2004). Essa catepsina quando está em conjunto com as catepsinas lisossomais L, K e S, tem sido implicada na aterosclerose (YASUDA, et al., 2004); também é expressa em câncer de colorretal e carcinomas de mama, mas não no cólon normal ou tecido mamário. Acredita-se que a CatV desempenha um papel na progressão do câncer, tornando-se assim um alvo importante para a oncologia (LIU, 2004).

Diante desse contexto, e considerando que a espécie *K. coriacea* é utilizada na medicina popular para o tratamento de artrite e artrose, torna-se importante a investigação desta planta quanto à sua possível atividade inibitória frente às catepsinas supracitadas.

## 2 - OBJETIVOS

### 2.1 - OBJETIVO GERAL

Os objetivos gerais deste trabalho consistiram no levantamento etnobotânico da espécie *K. coriacea*, bem como o estudo químico-biológico da mesma, na perspectiva de isolar e identificar metabólitos secundários, com a finalidade de investigar seu potencial inibitório frente às catepsinas (CatK, CatL e CatV) e em ensaios antimicrobiano e antiulcerogênico.

### 2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Os objetivos específicos foram:

1. Realizar o levantamento etnobotânico da espécie *K. coriacea*;
2. Fracionar o extrato etanólico das folhas de *K. coriacea* através de técnicas cromatográficas convencionais;
3. Elucidar estruturalmente as substâncias isoladas;
4. Investigar a atividade inibitória dos extratos, frações obtidas por partição líquido-líquido e compostos isolados de *K. coriacea* frente às catepsinas (CatK, CatL e CatV);
5. Investigar o potencial inibitório dos extratos, frações obtidas por partição líquido-líquido e compostos isolados de *K. coriacea* em ensaios antimicrobiano e antiulcerogênico.

### 3 – PARTE EXPERIMENTAL

#### 3.1 - MATERIAIS UTILIZADOS NO ESTUDO QUÍMICO DE *K. coriacea*

##### 3.1.1 – SOLVENTES

##### 3.1.2 - ELUENTES PARA CROMATOGRAFIA

- Solventes P.A.: hexano, diclorometano, acetona, acetato de etila e metanol, das marcas Química Araguaia, Panreac e Synth<sup>®</sup>;
- Solventes grau HPLC: água deionizada, ácido acético, metanol e acetonitrila, das marcas Panreac e J. T. Baker;
- Solventes deuterados para RMN: CDCl<sub>3</sub>, CD<sub>3</sub>OD, DMSO-d<sub>6</sub>, C<sub>3</sub>D<sub>6</sub>O, da marca Sigma Aldrich.

##### 3.1.3 – FASES ESTACIONÁRIAS PARA CROMATOGRAFIA

- Sílica gel 60 (70-230 mesh), marca Merk;
- Sílica flash (230 - 400 mesh), marca Merk;
- Sephadex LH-20, Amersham Pharmacia Biotech AB;
- C18 Luna (100 Å e 10 µm; 25 cm x 0,7 cm), preparada no Laboratório de Síntese Orgânica e CLAE da UFSCar;
- Cromatoplasmas de sílica gel em alumínio 60 F<sub>254</sub>, φ = 0,2 mm, marca (Sigma Aldrich).

##### 3.1.4 - REVELADORES

- Solução ácida de vanilina, preparada a partir da dissolução de 3,0 g de vanilina em 135 mL de água destilada, 135 mL de metanol e 30 mL de ácido sulfúrico concentrado;

##### 3.1.5 – EQUIPAMENTOS

- Evaporador rotativo IKA, modelo RV 05 Basic, com banho de aquecimento IKA HB 05.06 CN e bomba de hidrovácuo, marca Quimis.
- Cromatógrafos Líquidos de Alta Eficiência
  - ✓ Analítico: equipamento da marca Agilent, com sistema de quatro bombas, detector DAD e *software Izichrom*.
  - ✓ Preparativo: equipamento da marca Agilent, com sistema de duas bombas, detector MWD e *software Chemstation*.

- Cromatógrafo gasoso acoplado à espectrômetro de massas, marca Agilent, modelo 5975 Series MSD, equipado com coluna capilar HP-5 e ionização por impacto eletrônico.
- ✓ coluna capilar HP-5 MS (5% fenil-95% metilpolissiloxano, 30 m de comprimento por 0,25 mm de diâmetro e espessura de 0,25 µm).
- Espectrofluorímetro com leitor de placa de ELISA Molecular Devices, modelo Spectra Max M3, instalado no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos.
- Espectrômetro de Ressonância Magnética Nuclear:
  - ✓ Bruker (400 MHz para  $^1\text{H}$ ) modelo DRX 400 (9,4 Tesla), instalado no Departamento de Química da Universidade Federal de São Carlos, sob supervisão do prof. Dr. Antonio Gilberto Ferreira.
  - ✓ 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.
- Aparelho de Clevenger;
- Câmara de luz ultravioleta com irradiação de luz nos comprimentos de onda de 254 e 365 nm.

### 3.2 - MATERIAIS UTILIZADOS NO ESTUDO BIOLÓGICO DE *K. coriacea*

#### 3.2.1 – EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

- Agitador de tubos (Marconi, SP, Brasil)
- Autoclave (Phoenix, Araraquara, Brasil)
- Balança analítica digital (Satorius AG, Goettingem, RF, Alemanha)
- Câmara de anaerobiose (Don Whitley Scientific, Bradford, U.K)
- Capela de Fluxo Laminar (Veco VL FS-09-M, Campinas, SP, Brasil)
- Escala de McFarland (Probac, São Paulo, SP, Brasil)
- Espectrofotômetro (Femto, São Paulo, SP, Brasil)
- Estufa bacteriológica (Marconi, Piracicaba, SP, Brasil)
- Jarra de microaerofilia (Permutation, Curitiba, PR, Brasil)
- Leitora de Microplacas Asys UVM 340 (Biochrom Ltd., Cambridge, Reino Unido)

- Membrana Filtrante de 0,22 µm (Millipore, Massachusetts, USA)
- Micropipetas automáticas (Gilson, Middleton, WI, USA)
- Microplacas com 96 poços (Costar, Massachusetts, USA)
- Placa de Petri (Pleion, Barueri, SP, Brasil)
- Ponteiras (Gilson, Middleton, WI, USA)
- Sistema de purificação de água MilliQ (Millipore, Billerica, MA, USA)
- Ultrassom (Unique, Indaiatuba, SP, Brasil)

### 3.2.2 - REAGENTES, SOLVENTES E SUBSTÂNCIAS UTILIZADAS

- Acetato de etila (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Água MilliQ (Millipore, Billerica, MA, USA)
- Cristal violeta (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Dicloridrato de clorexidina (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Dimetilsulfóxido-DMSO (Merck, Darmstadt, Hessen, Alemanha)
- Etanol (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Éter etílico (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Hexano (Synth, St. Louis, MO, USA)
- Hemina (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Menadione (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Metanol (Synth, Diadema, SP, Brasil)
- Resazurina (Sigma, St. Louis, MO, USA)
- Solução salina 0,85% e 10mL/Kg
- Carbenoxolona 100mg/Kg
- Água *ad libitum*
- CO<sub>2</sub>
- Inibidor irreversível específico de cisteíno peptidase E-64 [L-3-carboxi-*trans*-2,3-epoxipropionil-leucilamido (4-guanino) butano] e DTE (ditioeritritol), adquiridos da Sigma-Aldrich.
- Substrato fluorogênico Z-FR-MCA (Cbz-Phe-Arg-MCA, carbobenzoil-fenilalanina-arginina-7-amino-4-metilcumarina, ou benziloxycarbonil-fenilalanina-arginina-4-metil-7-coumarilamida), adquiridos da empresa BachemInc e Sigma-Aldrich.

Enzimas estudadas (recombinantes humanas): as CatK e CatV foram cedidas pelo Prof. Dr. Dieter Brömme, da *University of British Columbia*, Vancouver, Canadá; a CatL foi cedida pelo Dr. Marcio Fernando Madureira Alves, da Universidade Federal de São Paulo, São Paulo – SP.

### 3.3 - ESTUDO QUÍMICO DE *K. coriacea*

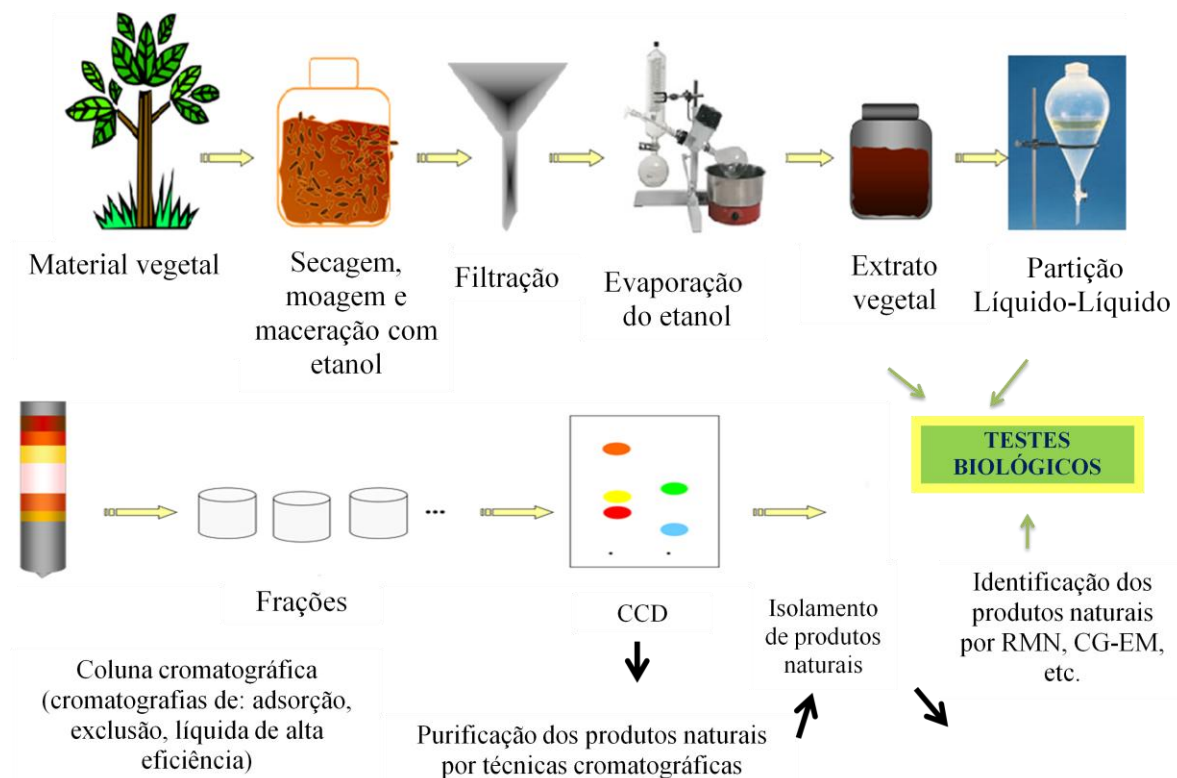
#### 3.3.1 - COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL VEGETAL

As partes vegetais (folhas, caule e raízes) de *K. coriacea* foram coletadas no Cerrado do Centro-Oeste brasileiro, na região do Distrito Federal (DF 480, lote 01, SMA - Gama/DF), em 01 de outubro de 2013, com a autorização de acesso e de remessa de amostra de componente do patrimônio genético, sob o número 010698/2013-2. Os dados e as coordenadas da coleta (GPS) foram armazenados para coletas futuras. Esta parte do trabalho foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Helder Nagai Consolaro (Unidade Acadêmica Especial de Biotecnologia, Universidade Federal de Goiás/Regional catalão - UFG/RC), o qual realizou a identificação do material vegetal e a catalogação do mesmo. Os espécimes testemunhos foram depositados no Herbário da EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnologia (CEN), sob o número BW 6046.

#### 3.3.2- PREPARO DOS EXTRATOS ETANÓLICOS

As folhas, caules e raízes de *K. coriacea* foram secas separadamente em estufa a 45°C, moídas e submetidas à maceração com etanol, em repouso e à temperatura ambiente, para extração de 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 rotatório, obtendo-se assim os extratos vegetais das folhas (R16F), caule (R16C) e raízes (R16R), os quais foram armazenados em refrigerador. Esse procedimento está representado no (FLUXOGRAMA 1, p.40).

## FLUXOGRAMA 1. Metodologia para obtenção dos extratos etanólicos.



### 3.3.3 - PARTICIONAMENTO DOS EXTRATOS

Uma alíquota de 10 g de cada extrato foi dissolvida em 1000 mL de um sistema de solvente composto por MeOH/H<sub>2</sub>O (3:7, v/v). Em seguida, foram realizadas três extrações com 300 mL de cada solvente (hexano e acetato de etila). Esse processo resultou na obtenção das frações hexano, acetato de etila e hidroalcoólica.

O procedimento foi repetido várias vezes para obtenção da quantidade de massa necessária aos estudos propostos. As massas dos extratos etanólicos, bem como das frações obtidas da partição líquido-líquido são apresentadas na TABELA 3.1, (p. 41).

TABELA 3.1. Massa dos extratos etanólicos e frações obtidas da partição líquido-líquido de *K.coriacea*

<b>Amostra</b>	<b>Massa(g)</b>
<b>❖ Extrato etanólico das folhas</b>	35,3214
Fração hexano	5,1912
Fração acetato de etila	13,4940
Fração hidroalcoólica	7,5843
<b>❖ Extrato etanólico do caule</b>	30,2765
Fração hexano	6,4908
Fração acetato de etila	11,2575
Fração hidroalcoólica	9,4365
<b>❖ Extrato etanólico da raiz</b>	39,8432
Fração hexano	2,2310
Fração acetato de etila	14,1354
Fração hidroalcoólica	8,4321

### 3.3.4 - FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO HEXANO DAS FOLHAS

Uma alíquota de 5,1912 g da fração hexano, oriunda da partição líquido-líquido do extrato etanólico das folhas, foi submetida à Cromatografia por Adsorção (CA) ( $\Phi = 5$  cm;  $h = 11$  cm) utilizando sílica gel (70-230 mesh) como fase estacionária e eluição em ordem crescente de polaridade, com os seguintes sistemas: hexano/acetato de etila/metanol, visando à separação dos componentes em grupos de acordo com suas similaridades. Foram coletadas cinco frações, as quais foram analisadas por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), considerando as suas similaridades químicas (FLUXOGRAMA 2, p.42). As condições cromatográficas do fracionamento estão representadas na TABELA 3.2 (p. 42).

## FLUXOGRAMA 2. Fracionamento da fração hexano das folhas

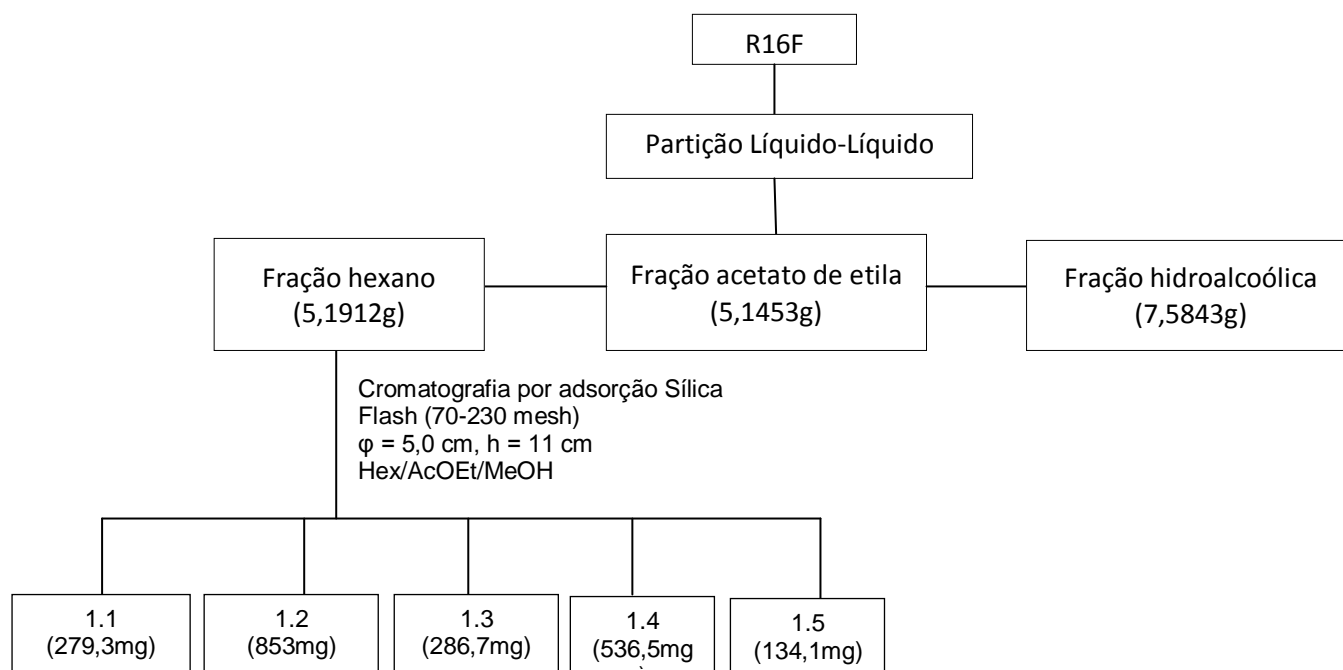


TABELA 3.2. Condições cromatográficas do fracionamento da fração hexano das folhas

Frações	Eluentes	Volume (mL)
1	hexano 100%	600
2	hexano/acetato de etila 1:1 (v/v)	1.300
3	acetato de etila 100%	650
4	acetato de etila/metanol 1:1 (v/v)	1.400
5	metanol 100%	500

### 3.3.4.1 - FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO 1.2

A fração 1.2 foi submetida ao fracionamento por CA ( $\Phi = 5,0$  cm e  $h = 12,5$  cm) com sílica gel (230-400 mesh) como fase estacionária e eluição gradiente (hexano/acetato de etila/metanol). O fracionamento rendeu oito frações, as quais foram agrupadas em cinco junções de acordo com suas

similaridades químicas constatadas por CCD. Com base nas diversas manchas cromatográficas que seus componentes apresentaram quando analisados via CCD, a fração 1.2.2 foi selecionada para refração.

#### 3.3.4.2 - REFRACIONAMENTO DA FRAÇÃO 1.2.2

A fração 1.2.2 foi submetida ao fracionamento por CA ( $\Phi = 4,0$  cm e  $h = 18$  cm) com sílica gel (230-400 mesh) como fase estacionária e eluição gradiente (hexano/acetato de etila/metanol). O fracionamento rendeu dezenove frações, as quais foram agrupadas em três junções de acordo com suas similaridades químicas constatadas por CCD. Com base nos perfis de eluição de seus componentes quando analisados via CCD, a fração 1.2.2.1 foi selecionada para refração.

#### 3.3.4.3 - REFRACIONAMENTO DA FRAÇÃO 1.2.2.1

A fração 1.2.2.1 foi submetida ao fracionamento por CA ( $\Phi = 4.0$  cm e  $h = 20$  cm) com sílica gel (230-400 mesh) como fase estacionária e eluição gradiente (hexano/acetato de etila/metanol). O fracionamento rendeu vinte e seis frações, as quais foram agrupadas em quatro junções de acordo com suas similaridades químicas constatadas por CCD. Com base nos perfis de eluição de seus componentes quando analisados via CCD, a fração 1.2.2.1.1 foi selecionada para refração.

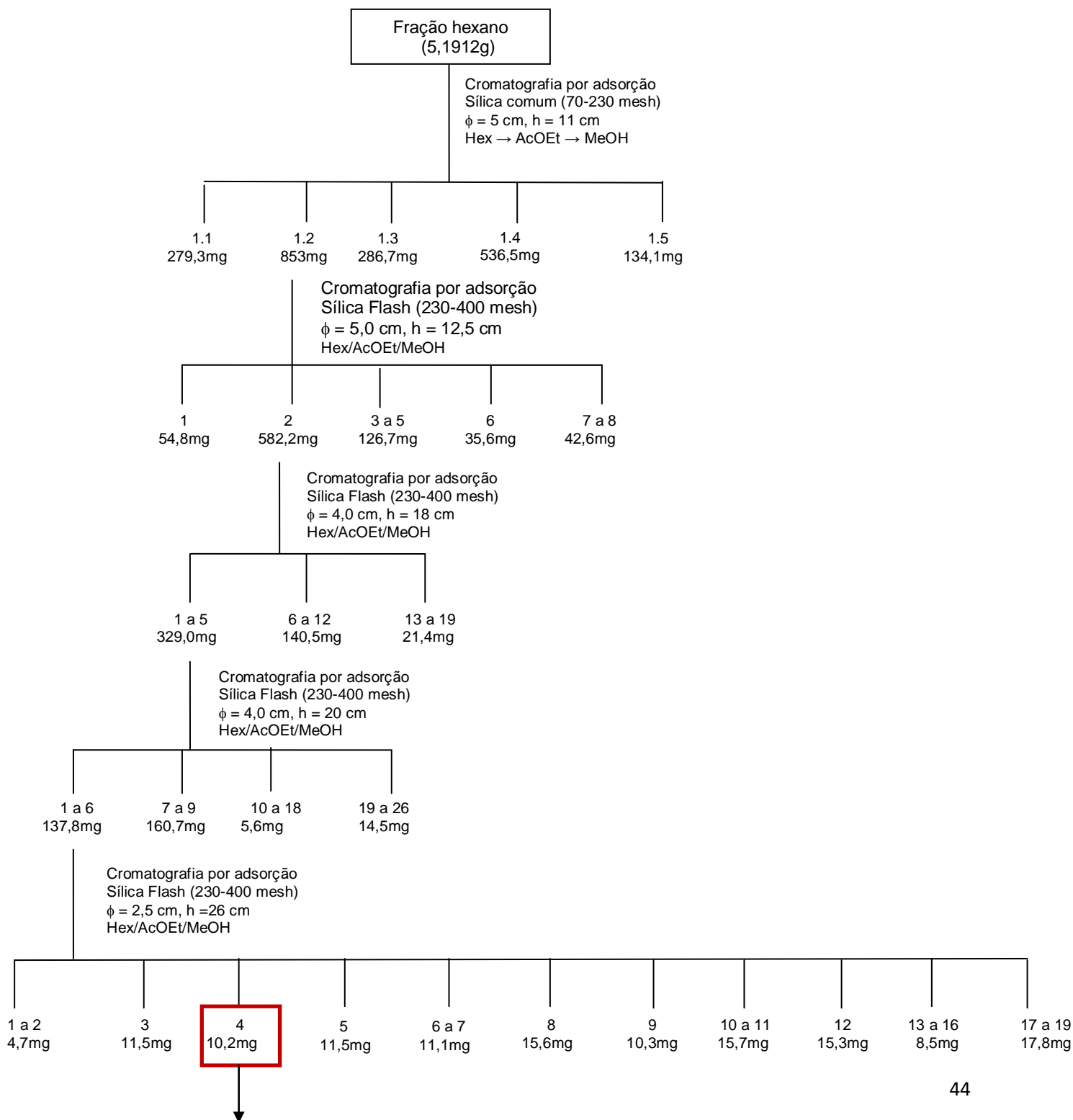
#### 3.3.4.4 - REFRACIONAMENTO DA FRAÇÃO 1.2.2.1.1

A fração 1.2.2.1.1 foi submetida ao fracionamento por CA ( $\Phi = 2,5$  cm e  $h = 26$  cm) com sílica gel (230-400 mesh) como fase estacionária e eluição gradiente (hexano/acetato de etila/metanol). O fracionamento rendeu dezenove frações, as quais foram agrupadas em 11 junções de acordo com suas similaridades químicas constatadas por CCD. A fração 1.2.2.1.1.4, por apresentar manchas roxas características de terpenoides, foi analisada por CG-EM e identificada como uma mistura das substâncias lupeol (SUBSTÂNCIA 1), lupenona (SUBSTÂNCIA 2) e  $\beta$ -amirina (SUBSTÂNCIA 3) (FLUXOGRAMA 3, p. 44).

### 3.3.4.5 - ANÁLISE DA FRAÇÃO 1.2.2.1.1.4 POR CG-EM.

A análise cromatográfica via CG-EM foi realizada utilizando-se gás hélio como gás de arraste, nas seguintes condições: temperatura inicial de 100°C, programa em 8°C por min até 295°C, mantida por 8 min, com tempo total de 38 min; temperatura do injetor: 250°C; *split mode*: 1:20; vazão: 1,3 mL.min<sup>-1</sup>; pressão: fluxo de modo constante.

FLUXOGRAMA 3. Identificação das SUBSTÂNCIAS 1, 2 e 3.



### 3.3.5 - FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS

Uma alíquota de 5,1453 g da fração acetato de etila das folhas foi submetida à CA ( $\Phi = 5$  cm;  $h = 10$  cm), utilizando sílica gel (70-230 mesh) como fase estacionária e eluição em ordem crescente de polaridade, com o seguinte sistema: hexano/acetato de etila/metanol, visando à separação dos componentes em grupos de acordo com suas polaridades. Foram coletadas cinco frações, consideradas distintas de acordo com a análise por CCD, as quais foram denominadas de frações 1, 2, 3, 4 e 5 de acordo com a sequência de eluição (FLUXOGRAMA 4, p. 45). As condições cromatográficas desse fracionamento estão representadas na TABELA 3.3 (p. 46)

FLUXOGRAMA 4. Fracionamento da fração acetato de etila das folhas

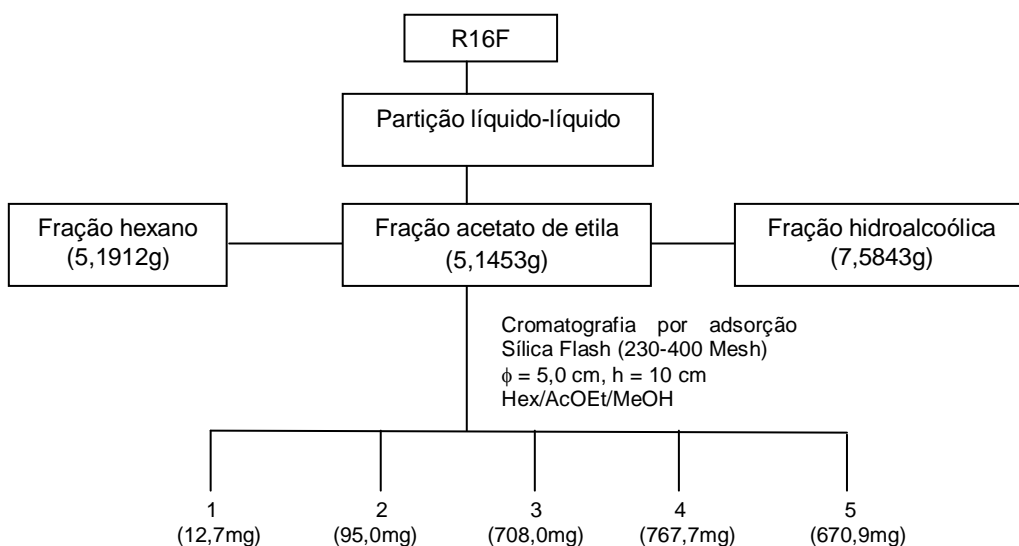


TABELA 3.3. Condições cromatográficas do fracionamento da fração acetato de etila das folhas

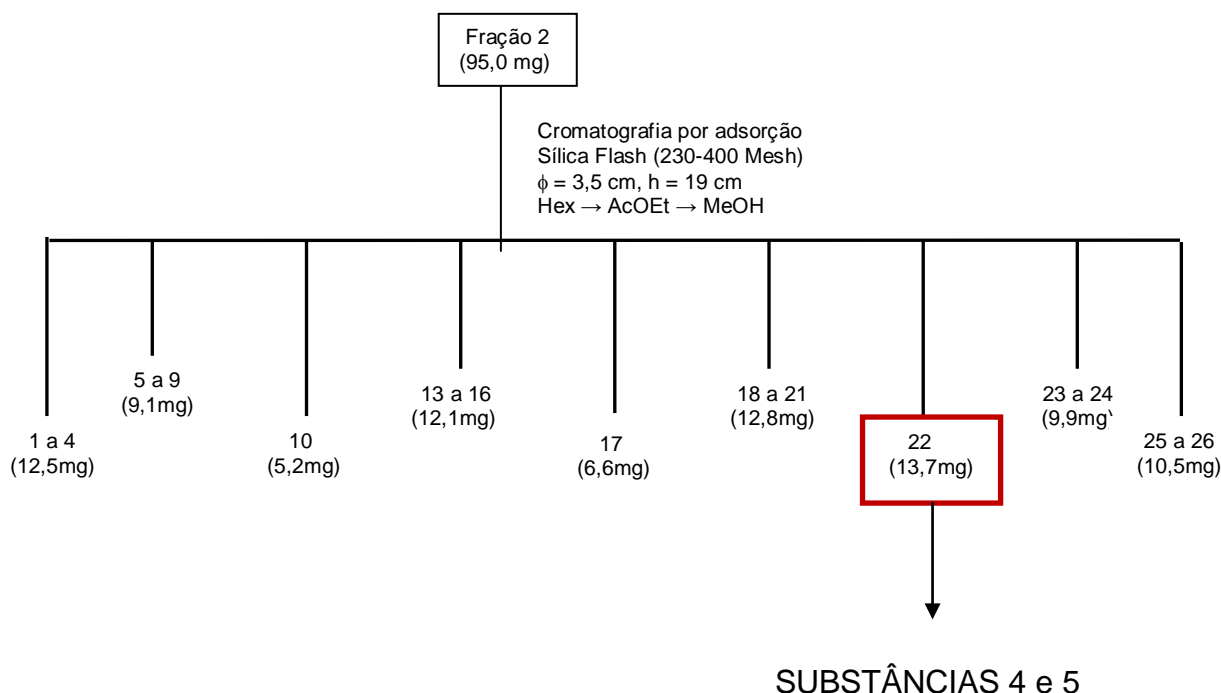
Frações	Eluentes	Volume (mL)
1	hexano 100%	500
2	hexano/acetato de etila 1:1 (v/v)	1.100
3	acetato de etila 100%	400
4	acetato de etila/metanol 1:1 (v/v)	1.000
5	metanol 100%	500

#### 3.3.5.1- FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO 2

A fração 2 foi submetida ao fracionamento por CA ( $\Phi = 3,5$  cm e  $h = 19$  cm) com sílica gel (230-400 mesh) como fase estacionária e eluição gradiente (hexano/acetato de etila/metanol). O fracionamento rendeu 26 frações, as quais foram agrupadas em nove junções de acordo com suas similaridades químicas constatadas por CCD.

A fração 2.22, por apresentar característica de substância de interesse, foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$  e identificada como a mistura dos ácidos *cis* e *trans-p*-cumárico (SUBSTÂNCIAS 4 e 5). O procedimento de isolamento está representado no (FLUXOGRAMA 5, p. 47).

## FLUXOGRAMA 5. Isolamento das SUBSTÂNCIAS 4 e 5.



### 3.3.6 - FRACIONAMENTO DA FRAÇÃO 3

A fração 3 foi submetida ao fracionamento por CA ( $\Phi = 3,5$  cm e  $h = 19$ cm) com sílica gel (230-400 mesh) como fase estacionária e eluição gradiente (hexano/acetato de etila/metanol). O fracionamento rendeu 15 frações, as quais foram agrupadas em 11 junções de acordo com suas similaridades químicas constatadas por CCD. Com base nos perfis de eluição de seus componentes, quando analisados via CCD, a fração 3.5 foi selecionada para refracionamento.

#### 3.3.6.1 - REFRACIONAMENTO DA FRAÇÃO 3.5

A fração 3.5 foi submetida ao fracionamento por CA ( $\Phi = 2,0$  cm e  $h = 30$  cm) com sílica gel (230-400 mesh) como fase estacionária e eluição gradiente (hexano/acetato de etila/metanol). O fracionamento rendeu 14 frações, as quais foram analisadas por CCD e agrupadas em sete junções de acordo com suas similaridades químicas. Com base nos perfis de eluição de seus componentes quando analisados via CCD, a fração 3.5.3 foi selecionada para refracionamento.

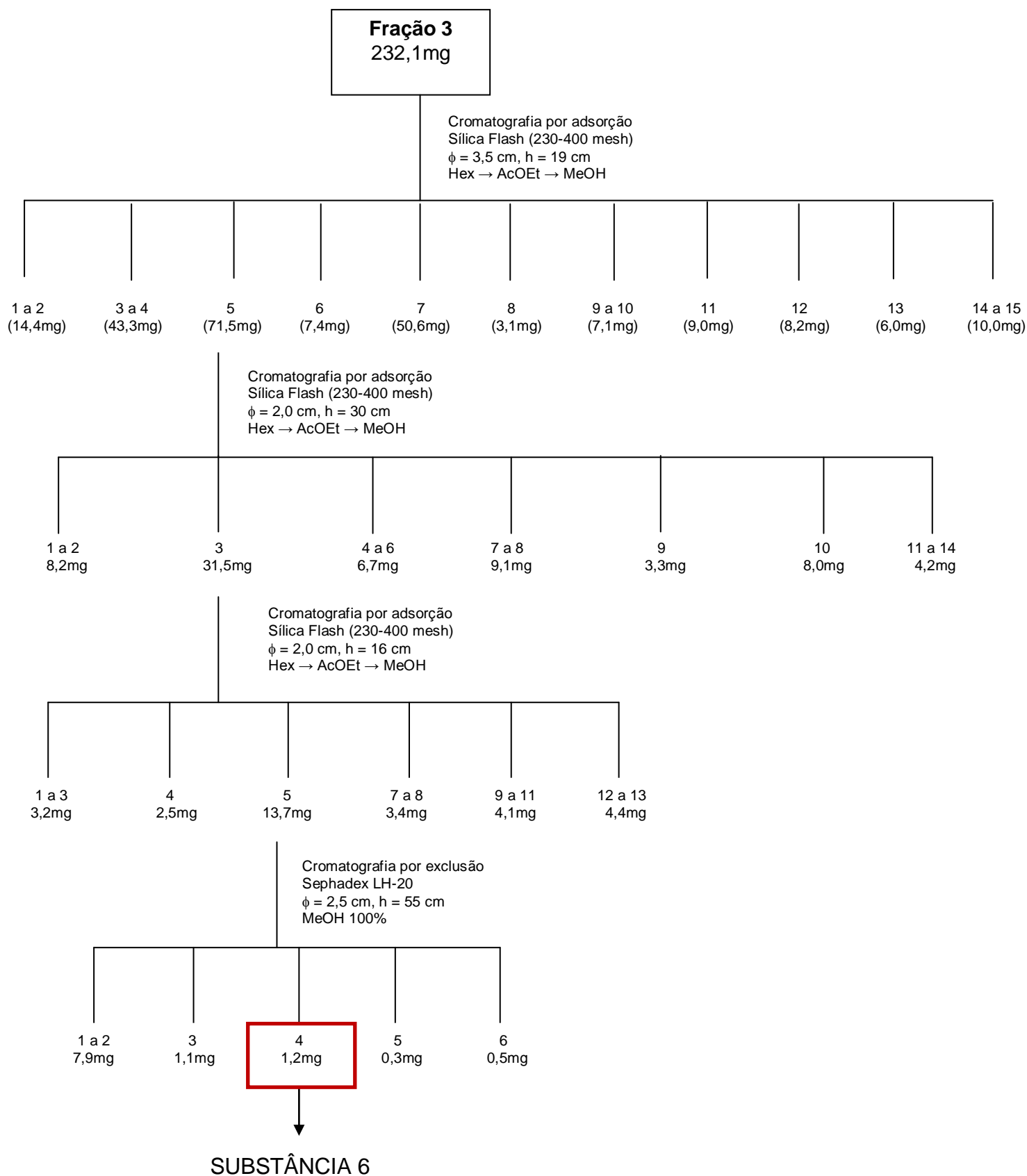
### 3.3.6.2 - REFRACIONAMENTO DA FRAÇÃO 3.5.3

A fração 3.5.3 foi submetida ao fracionamento por CA ( $\Phi = 2,0$  cm e  $h = 16$  cm) com sílica gel (230-400 mesh) como fase estacionária e eluição gradiente (hexano/acetato de etila/metanol). O fracionamento rendeu 13 frações, as quais foram agrupadas em seis junções de acordo com suas similaridades químicas constatadas por CCD. Com base nos perfis de eluição de seus componentes quando analisados via CCD, a fração 3.5.3.5 foi selecionada para refracionamento.

### 3.3.6.3 - REFRACIONAMENTO DA FRAÇÃO 3.5.3.5

A fração 3.5.3.5 foi submetida ao fracionamento por Cromatografia de Exclusão (CE) ( $\Phi = 2,5$  cm e  $h = 55$ cm) com fase estacionária Sephadex LH-20 e eluição em modo isocrático, empregando-se metanol 100%. O fracionamento rendeu seis frações, as quais foram agrupadas em cinco junções de acordo com suas similaridades químicas constatadas por CCD. Dentre elas, a fração 3.5.3.5.4 foi analisada por RMN de  $^1\text{H}$  e identificada como o flavonoide quercetina (SUBSTÂNCIA 6). O procedimento de isolamento dessa substância está representado no (FLUXOGRAMA 6, p. 49).

## FLUXOGRAMA 6. Isolamento da SUBSTÂNCIA 6



### 3.4 - ESTUDO BIOLÓGICO DE *K. coriacea*

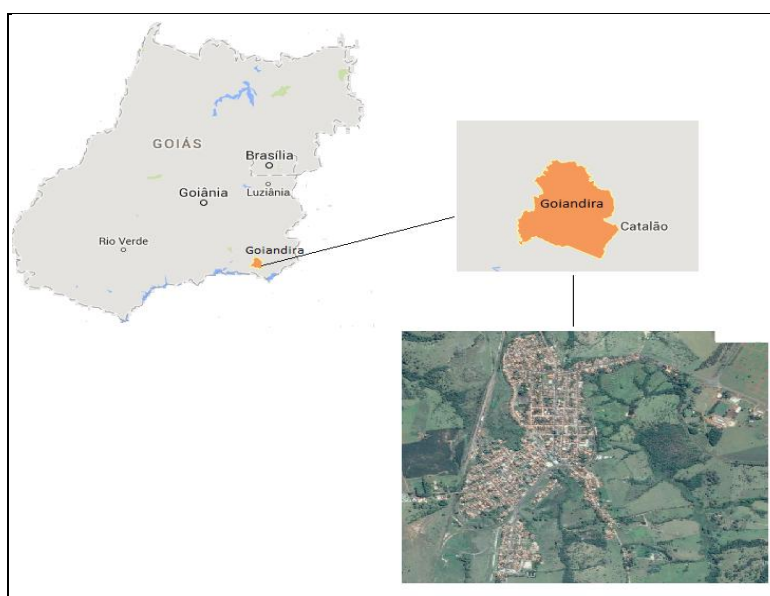
#### 3.4.1 - LEVANTAMENTO ETNOBOTÂNICO DE *K. coriacea*

Para a pesquisa etnobotânica, foi abordada a metodologia que é em parte baseada em métodos das Ciências Sociais e Antropológicas, tendo como objetivo maximizar a recolha de saber-fazer tradicional. A amostragem não deve ser ao acaso nem aleatória, mas sim dirigida aos elementos da população que à partida poderão saber mais acerca da temática que se pretende abordar (CAMEJO RODRIGUES, 2007). Para localizar pessoas com essas características tem-se então de recorrer à técnica bola de neve (*snowball*), que consiste no primeiro entrevistado indicar o próximo e assim por diante (THIOLLENT, 1994, BECKER, 1993).

As entrevistas foram realizadas pela botânica Me. Núbia Alves Mariano Teixeira Pires Gomides no município de Goiandira (GO), o qual localiza-se ao Centro-Sul do Estado de Goiás, latitude 18°07'54''S, longitude 48°05'06''W, a uma altitude de 848 m, distando cerca de 15 km de Catalão e 280 km da capital, Goiânia.

Este município possui uma área de 564,6 km<sup>2</sup> e uma população de 5.520 habitantes, com densidade de 9,32 habitantes/km<sup>2</sup>, sendo a área urbanizada de 0,368 km<sup>2</sup>, e a área rural de 562,13 km<sup>2</sup> (IBGE, 2014) (Figura 3.1, p. 50).

Figura 3.1. Mapa do município de Goiandira (GO)



Fonte: Adaptado de IBGE(2014)

De acordo com o IBGE (2014), Goiandira possui a agricultura desenvolvida nos seguintes produtos: arroz, banana, café, cana-de-açúcar, feijão, mandioca, milho, palmito e soja. Por possuir a maior parte de suas terras voltadas à agropecuária, a cidade tem o perfil agropecuário.

Quanto aos métodos de recolha de dados, há dois muito citados e usados na etnobotânica, sendo a entrevista etnobotânica e a observação participação. Neste estudo foi desenvolvida a técnica de entrevista estruturada, a qual é definida como "*um questionário, mas utilizado de modo mental pelo entrevistador (e não preenchido pelo entrevistado)*" (CAMEJO RODRIGUES, 2007 p. 170).

Para a realização das entrevistas, o projeto foi submetido ao comitê de ética da Universidade Federal de Goiás, sendo aprovado em 02/04/2012, sob número de protocolo 033/12 (ANEXO 1); como requisito básico para realização das entrevistas, foi solicitado ao informante a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 2).

Foram entrevistados 25 informantes individualmente, priorizando atores sociais como raizeiros, benzedeiros, antigas parteiras, pessoas idosas e antigos moradores. As visitas em domicílios ocorreram no mês de abril de 2013, em quatro finais de semana, nos períodos matutino e vespertino.

Dentre as muitas espécies medicinais do Cerrado, algumas recebem destaque relativo ao seu uso medicinal, como é o caso da *K. coriacea*, representada pelo seu expressivo uso local, em diversas enfermidades. Desta forma, as entrevistas foram direcionadas para obter dos informantes a socialização de seus conhecimentos sobre esta planta.

A coleta de dados na entrevista compreendeu: a) nome do entrevistado; b) idade do entrevistado; c) conhecimento da espécie; d) usos medicinais da espécie; e) parte da planta utilizada no preparo medicinal; f) formas de preparo medicinal.

O conhecimento local foi analisado através de medidas quantitativas, as quais têm como objetivo refletir a concordância entre os informantes sobre o conhecimento da espécie (FEITOSA, 2012) (Tabela 3.4, p.52). Os dados foram tabulados no *Microsoft Office Excel 2007*.

TABELA 3.4. Medidas de uso e conhecimento calculados para *Kielmeyera coriacea*, propostas por FEITOSA (2012)

<b>Índices</b>	<b>Cálculo</b>	<b>Descrição</b>
Valor da diversidade do informante (VDI)	VDI= número de usos citados por determinado informante dividido pelo número de usos totais.	Mede como muitos informantes usam a espécie e como esse uso encontra-se distribuído.
Valor de consenso para os tipos de usos (VCTU)	VCTU = número de vezes em que determinado uso foi reportado dividido pelo número total de usos. O valor encontrado é dividido pela quantidade de categorias de uso.	Mede o grau de concordância entre os informantes referente ao uso das espécies.
Valor de diversidade de uso (VDU)	VDU= número de indicações registradas por categorias de uso dividido pelo número total de indicações de uso.	Mede a importância e como as categorias de uso contribuem para o valor total de usos.
Valor de consenso para a forma de uso (VCFU)	VCFU = número de citações para determinada forma de uso dividido pelo total de citações para as todas as formas.	Mede o grau de concordância entre os informantes referente a forma de uso da planta.
Valor de consenso para a parte da planta (VCP)	VCP= número de vezes em que determinada parte da planta foi citada dividido pelo número total de citações de todas as partes.	Mede o grau de concordância entre os informantes referente a parte da planta usada.

Para a realização dos ensaios antimicrobianos, além dos extratos etanólicos do caule e das folhas, também foi preparado o extrato aquoso da entrecasca de *K. coriacea*, o qual é indicado pelas pesquisas etnobotânicas realizadas, para o tratamento de diversas doenças, entre elas, a cárie dentária.

Para o preparo do extrato aquoso, a entrecasca foi pesada e dividida em frascos de Erlenmeyer, os quais foram preenchidos com água e acondicionados na geladeira por nove dias, fazendo a troca do solvente a cada três dias. Após o período, a solução foi filtrada, concentrada em rota-e liofilizada.

### 3.4.2 - ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

#### 3.4.2.1 - ATIVIDADE ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS, FRAÇÕES E SUBSTÂNCIAS ISOLADAS DE *K. coriacea* FRENTE ÀS BACTÉRIAS E LEVEDURAS

Os ensaios de avaliação do potencial efeito antibacteriano e antifúngico dos extratos vegetais, frações oriundas da partição líquido-líquido e substâncias isoladas da espécie *K. coriacea* foram realizados no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA) da Universidade de Franca – UNIFRAN, situada na cidade de Franca-SP, sob a colaboração do professor Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, Thaís da Silva Moraes, Maria Anita Lemos Vasconcelos e Luis Fernando Leandro.

Os seguintes micro-organismos foram utilizados:

- *Escherichia coli* (ATCC 14948), *Salmonella choleraesui* (ATCC 10708), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 9610) - patógenos relacionados com a diarreia humana;
- *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC IAL 1741), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) - patógenos relacionados a infecções humanas;
- *Burkholderia cepacia* (ATCC 17759), *Streptococcus pyogenes* (ATCC 12345), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14502) - patógenos relacionados ao reumatismo;
- *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), *Lactobacillus casei* (ATCC 11578), *Streptococcus sobrinus* (ATCC 33478) - patógenos relacionados à cárie dentária humana;
- *Candida albicans* (ATCC 28366), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) e *Candida glabrata* (ATCC 15126) - patógenos relacionados à candidíase.

Todos os ensaios biológicos foram realizados em triplicata e a Concentração Inibitória Mínima (CIM) foi determinada como a menor concentração capaz de inibir o crescimento visível do micro-organismo ensaiado, após o período de incubação.

### 3.4.2.2 - PREPARO DAS AMOSTRAS ENSAIADAS FRENTE À BACTÉRIAS E LEVEDURAS E AVALIAÇÃO DA CIM

Foram ensaiadas as seguintes substâncias: lupeol (substância **1**, p. 61), lupenona (substância **2**, p. 61), quercetina (substância **3**, p. 62). Como as substâncias lupeol e lupenona foram identificadas em mistura no estudo químico de *K. coriacea*, estas foram cedidas para ensaios pela Me. Michelle Aparecida Machado, a qual realizou o mestrado no Laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de Goiás - Regional Catalão.

Os extratos da entrecasca, caule e folhas, bem como as frações oriundas da partição líquido-líquido, também foram ensaiadas.

Como controles positivos foram empregados os antibióticos comerciais clorexidina, penicilina e estreptomicina, todos da marca SIGMA. Inicialmente, foi preparada uma solução estoque de cada amostra, solubilizando 1,0 mg da mesma em 125 µL de DMSO. Posteriormente, cada solução foi diluída em 1875 µL de meio líquido (caldo BHI), originando assim a solução mãe, da qual pôde-se obter concentrações nas microplacas no intervalo de 0,195 a 400 µg/mL, empregando, portanto a técnica de microdiluição em caldo. O intervalo de concentração dos controles positivos foi de 0,115 a 59,0 µg/mL. A 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 no LaPeMA (UNIFRAN).

É importante ressaltar que foi utilizado o solvente DMSO nos ensaios biológicos, por ser considerado pouco volátil, adequado para a solubilização e por não interferir no crescimento bacteriano. O volume deste 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 micro-organismo. O volume final de DMSO nos experimentos não excedeu a 5% (ARANTES, 2005).

Para verificar a viabilidade de cada micro-organismo e do meio de cultura em cada experimento, em orifícios de cada microplaca foram adicionados os seguintes componentes: 1) culturas de cada micro-organismo e 2) meio de cultura líquido.

As microplacas foram incubadas a 37°C por 24 horas, respeitando a exigência de atmosfera da bactéria avaliada. Terminado o período de incubação, as placas foram reveladas com 30 µL de resazurina (Sigma®) 0,02% em solução aquosa esterilizada (SARKER, NAHAR e KUMARASAMY, 2007) e após alguns minutos a leitura foi realizada. A resazurina facilita a verificação da presença 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.

### 3.4.2.3 - ATIVIDADE ANTIFÚNGICA DOS EXTRATOS E FRAÇÕES FRENTE À LEVEDURAS

#### 3.4.2.3.1 - PREPARO DO INÓCULO

O inóculo foi preparado baseado nas normas preconizadas pela NCCLS M-27 A2. Primeiramente, os fungos foram cultivados em placas de Petri contendo Ágar Sabouraud por 24 horas a 37°C.

Após esse período, com o auxílio de alça de platina esterilizada, transferiu-se algumas colônias das leveduras para tubos contendo 2mL de solução salina 0,85 %, os quais foram comparados a escala de Mc Farland 0,5 para se obter o valor de  $6 \times 10^6$  UFC/mL. Em seguida foram realizadas as diluições recomendadas pela NCCLS M27-A em caldo RPMI até que o inóculo atingisse  $1,2 \times 10^3$  UFC/mL.

#### 3.4.2.3.2 - PREPARO DOS CONTROLES

Para o controle positivo utilizou-se anfotericina B da marca SIGMA, sendo a mesma diluída para obter a concentração de 0,031 a 16,0 µg/mL, na microplaca de 96 poços. Para a validação dos ensaios, quanto ao controle da anfotericina B, foram utilizadas cepas de referência, para se obter uma faixa de CIM de 0,25 a 2,0 µg/mL.

Também foram realizados outros controle como: de esterilidade do meio de cultura (caldo RPMI), controle do inóculo (que deve apresentar crescimento devido a ausência de agentes antimicrobianos), controle de esterilidade dos

antifúngicos, controle de esterilidade dos extratos e controle do solvente DMSO (controle negativo). O controle do solvente deve ser realizado para que não haja dúvidas a respeito da inibição do crescimento do micro-organismo, pois em algumas concentrações o solvente pode levar a inibição do crescimento microbiano.

#### 3.4.2.3.3 - MÉTODO DA MICRODILUIÇÃO EM CALDO E DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A técnica da determinação da CIM foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços, onde foram feitas diluições seriadas em concentrações de 1,46 a 2000 µg/mL. O meio de cultura utilizado foi o caldo RPMI, tamponado com 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, foi retirado 100 µL do primeiro poço e adicionados 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 , para controle negativo a concentração utilizada foi de 1%. Após esse procedimento, foi adicionado 100µL 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 através do uso do revelador resazurina.

### 3.4.3 - ENSAIOS ANTIULCEROGÊNICOS

#### 3.4.3.1 – METODOLOGIA

O ensaio antiulcerogênico foi realizado com a colaboração do professor Dr. Anderson Luíz Ferreira da Universidade Federal de Goiás – Regional Catalão e suas alunas: Maria Viviane Gomes Oliveira e Keise Rodrigues Silva.

## ➤ ANIMAIS

Para esse experimento foram utilizados 35 animais e estes animais utilizados no ensaio são provenientes do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (UFU). Foram utilizados ratos machos Wistar (150 a 250 g) para os experimentos de lesões gástricas. Os animais foram aclimatados às condições do laboratório por pelo menos sete dias antes da manipulação experimental, com temperatura de  $23 \pm 2^\circ\text{C}$ , e ciclos claro-escuro de 12 horas controlados, alimentados com ração *Presence* (Purina) e água *ad libitum*.

Os animais foram distribuídos ao acaso nos diferentes grupos experimentais e submetidos ao jejum (com água *ad libitum*) por 24 horas. Todos os protocolos experimentais foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Goiás (CEUA/UFG), (ANEXO 3).

## ➤ ÚLCERA GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL

Após 24 horas de jejum, grupos de ratos foram tratados por via oral com extrato etanólico das folhas de *K. coriacea*, em doses variáveis de 50, 100, 200 e 300,0 mg/kg. Para o controle positivo (carbenoxolona - 100 mg/kg) e para o controle negativo (solução salina - 10 mL/kg), foram utilizados 8 ratos para ambos os controles. A lesão gástrica foi induzida pela administração, também por via oral, de 1mL de etanol absoluto.

Os animais foram eutanasiados por *overdose* de  $\text{CO}_2$  uma hora após a administração do agente lesivo. Após a eutanásia, os estômagos foram abertos na região da maior curvatura, prensados em placas de vidro e fotografados. A área de lesão foi calculada com auxílio do programa *AVSoftBioView 4* (BARBASTEFANO et al., 2007).

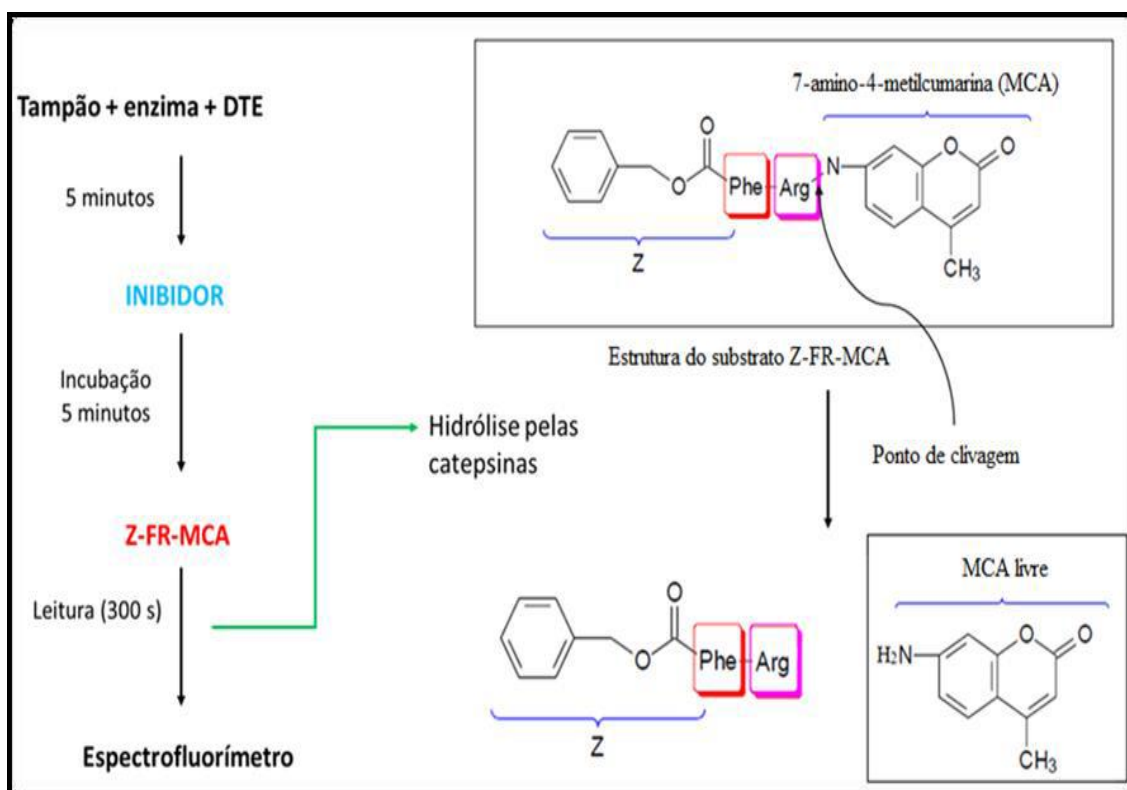
### 3.4.4 - ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Os ensaios enzimáticos foram realizados com a colaboração do professor Dr. Paulo Cezar Viera da Universidade Federal de São Carlos e sua aluna Flávia Monique.

### 3.4.4.1. METODOLOGIA

A determinação da atividade enzimática foi realizada com base no monitoramento da hidrólise do substrato fluorogênico Z-FR-MCA, através do acompanhamento da fluorescência em função do tempo de reação. A metodologia geral do ensaio é ilustrado na (FIGURA 3.2, p. 58).

FIGURA 3.2. Demonstração do esquema geral dos ensaios enzimáticos



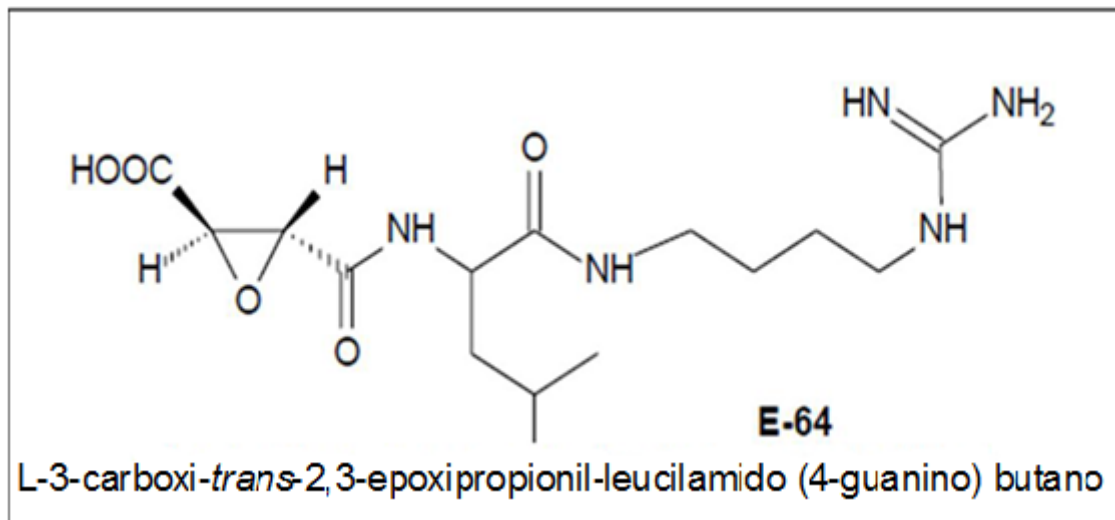
Os experimentos foram realizados empregando-se placas de 96 poços, com coloração preta e fundo plano, mantidas em compartimento termostatizado à 27 °C. A fluorescência foi detectada em um espectrofluorímetro com fenda de excitação e emissão ajustada para  $\lambda_{ex} = 380$  nm e  $\lambda = 460$  nm, respectivamente.

Foi usado tampão acetato de sódio 100 mM, com 5mM de EDTA, pH = 5,5. As enzimas foram pré-ativadas com DTE durante 5 min e posteriormente, pré-incubadas com as amostras a serem testadas por mais 5 min. A reação foi iniciada pela adição de Z-FR-MCA e as medidas foram realizadas.

Os controles foram executados sem inibidor (controle negativo) e na presença do inibidor irreversível E-64 (controle positivo) (FIGURA 3.3, p. 59).

Posteriormente, realizou-se o monitoramento direto e contínuo da hidrólise do substrato durante 300 segundos.

FIGURA 3.3. Estrutura do inibidor irreversível de cisteíno peptidases E-64



A concentração da enzima foi usada de modo que a hidrólise do substrato não fosse superior a 5% nos 300 s do experimento. Os valores de fluorescência foram convertidos para  $\mu\text{M}/\text{min}$ , usando uma curva de calibração determinada através da hidrólise total do peptídeo.

A triagem de substâncias foi realizada em triplicata, em concentração única de  $25 \mu\text{M}$ . O percentual de inibição foi determinado a partir da atividade enzimática em situações de ausência e presença de inibidores, conforme a equação:

$$\% \text{ Inibição} = (1 - V_i/V_0) \times 100$$

onde:

$V_i$ : é a velocidade obtida na presença de inibidor

$V_0$ : é a velocidade obtida na ausência do mesmo.

As substâncias que apresentaram inibição significativa, igual ou superior a 50% frente às catepsinas foram selecionadas para a determinação dos valores de  $\text{IC}_{50}$ , um parâmetro útil para determinação da potência do inibidor.

A potência de um inibidor ( $\text{IC}_{50}$ ) é definida como a concentração que provoca diminuição de 50% da atividade da enzima. Este valor é uma convenção usada com finalidade de comparar valores de potência entre inibidores.

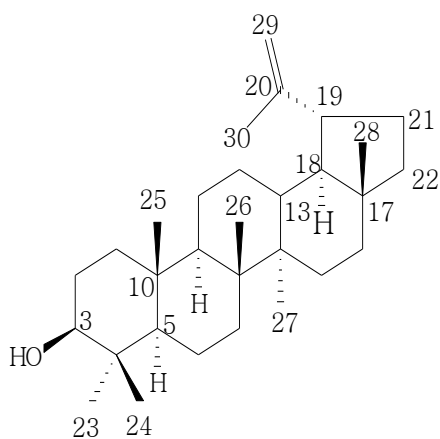
A determinação dos valores de potência inibitória foi realizada de forma direta, empregando-se o ensaio cinético com substrato fluorogênico. Os percentuais de inibição foram obtidos em diferentes concentrações de inibidor (triplicata), explorando-se uma faixa de inibição de 15% a 90%, obtendo-se uma curva de concentração *versus* resposta. Os dados cinéticos foram obtidos e tratados para a determinação dos valores de IC<sub>50</sub>, pelo método de regressão linear de melhor ajuste, utilizando-se o programa *Sigmaplot* 9.0

## 4 - RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 - ESTUDO QUÍMICO

Através do estudo químico de *K. coriacea* foram identificados seis metabólitos secundários, sendo a mistura de três triterpenoides (substâncias 1, 2 e 3), a mistura dos ácidos *cis* e *trans-p*-cumárico (substâncias 4 e 5) e um flavonoide (substâncias 6). As estruturas químicas são mostradas abaixo.

#### 4.1.1 – SUBSTÂNCIAS ISOLADAS

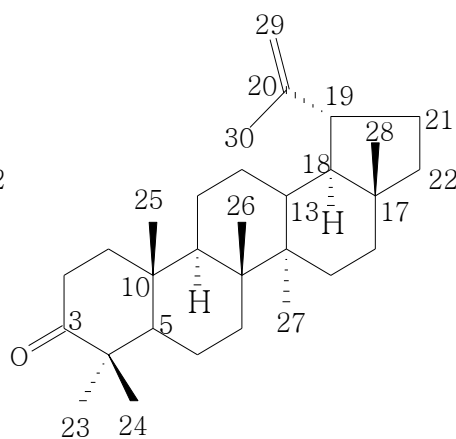


lupeol (1)

**Origem:** fração hexano das folhas

**Isolamento:** p. 44

**Identificação estrutural:** p. 65

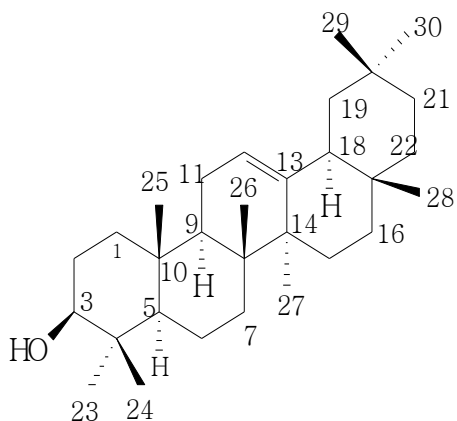


lupenona (2)

**Origem:** fração hexano das folhas

**Isolamento:** p. 44

**Identificação estrutural:** p.67

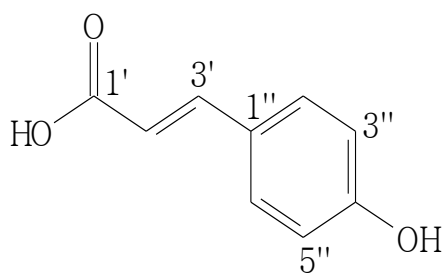


$\beta$ -amirina (3)

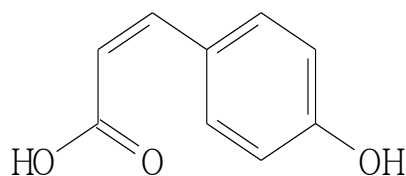
**Origem:** fração hexano das folhas

**Isolamento:** p. 44

**Identificação estrutural:** p.69



ácido *trans-p*-cumárico (4)

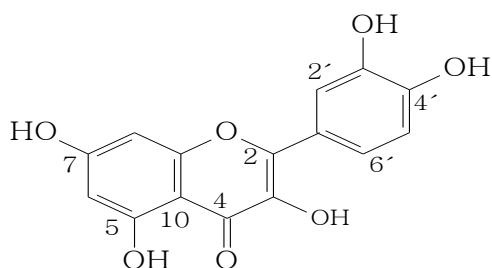


ácido *cis-p*-cumárico (5)

**Origem:** fração AcOEt das folhas

**Isolamento:** p. 47

**Identificação estrutural:** p. 73



quercetina (6)

**Origem:** fração AcOEt das folhas

**Isolamento:** p.49

**Identificação estrutural:** p. 76

#### 4.1.2 – ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL

##### 4.1.2.1 – ESTRUTURAS DAS SUBSTÂNCIAS 1, 2 E 3.

As substâncias 1, 2 e 3 foram identificadas, via CG-EM, como uma mistura de triterpenoides, da fração 1.2.2.1.1.4, oriunda da fração hexano das folhas, a qual se apresentou como um sólido de coloração branca.

Os dados obtidos por CG-EM (FIGURA 4.1, p. 63) foram comparados com o banco de dados da biblioteca (NIST) do equipamento sugerindo a presença de três triterpenoides: lupeol (1), lupenona (2) e  $\beta$ -amirina (3) (FIGURA 4.2, p. 63).

A TABELA 4.1 (p.64) apresenta os sinais obtidos a partir da fragmentação de cada estrutura.

FIGURA 4.1: Cromatograma da mistura das substâncias 1, 2 e 3.

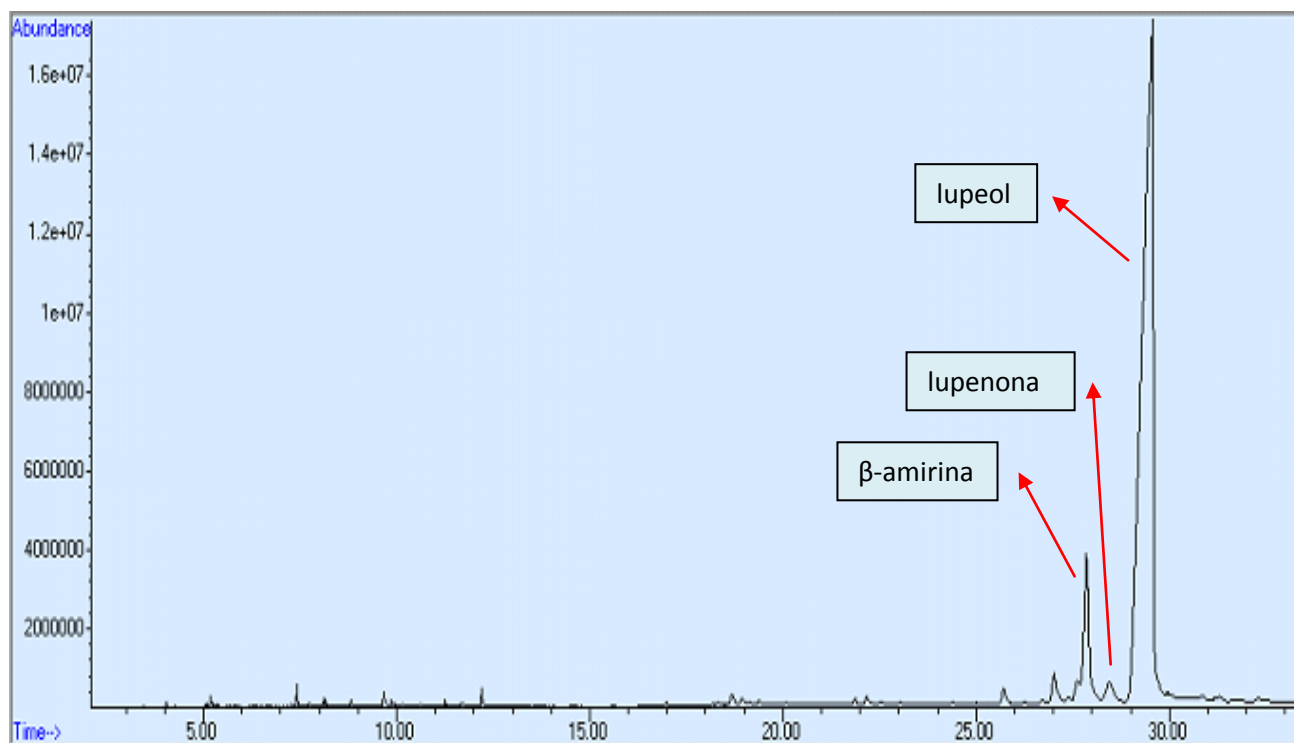


FIGURA 4.2: Estruturas químicas das substâncias 1, 2 e 3.

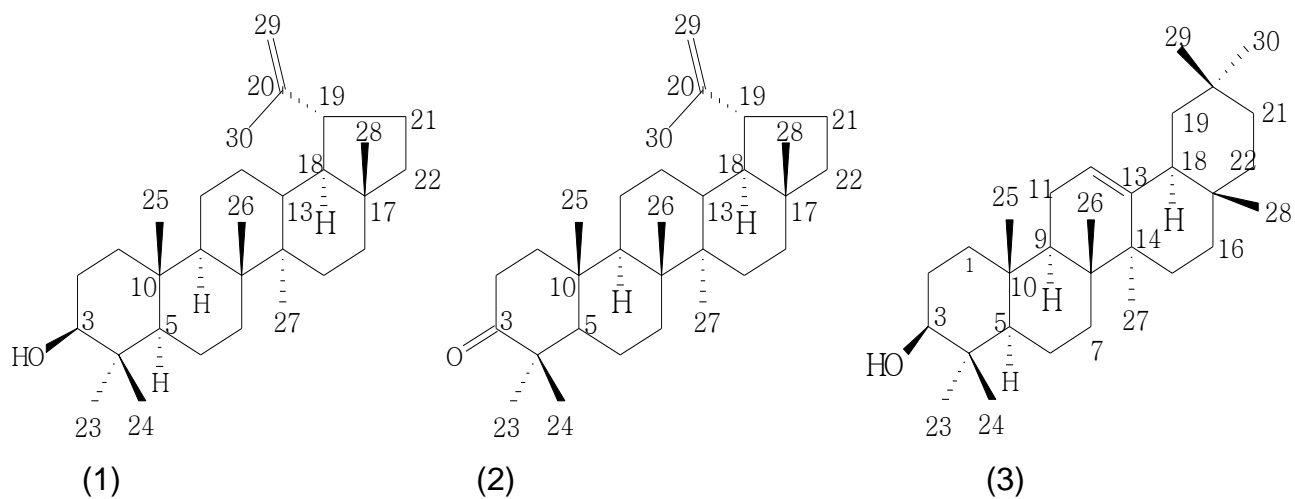


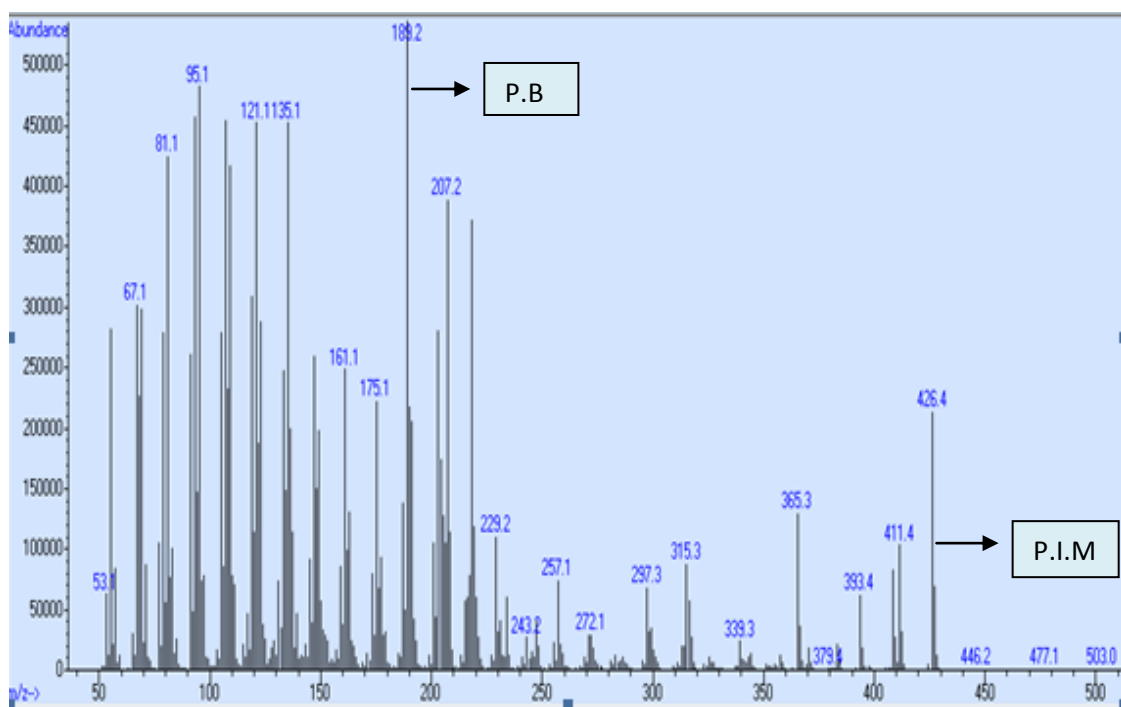
TABELA 4.1. Sinais de fragmentação mais característicos da mistura de 1, 2 e 3

Triterpenoide	Fragmentação ( <i>m/z</i> )
(1) lupeol	426 ( $M^+$ ), 411, 234, 220, 207, 189 (100%)
(2) lupenona	424 ( $M^+$ ), 409, 218, 205 (100%), 189
(3) $\beta$ -amirina	426 ( $M^+$ ), 218 (100%), 205, 189

Fonte: VILEGAS et al., 1997; BASAR, 2005.

O espectro de massas de **1** (FIGURA 4.3, p. 64) apresentou um pico em *m/z* 426, característico do pico do íon molecular, referente à fórmula estrutural  $C_{30}H_{50}O$ . Observou-se também um pico em *m/z* 189, relativo ao pico mais estável do cromatograma (pico base).

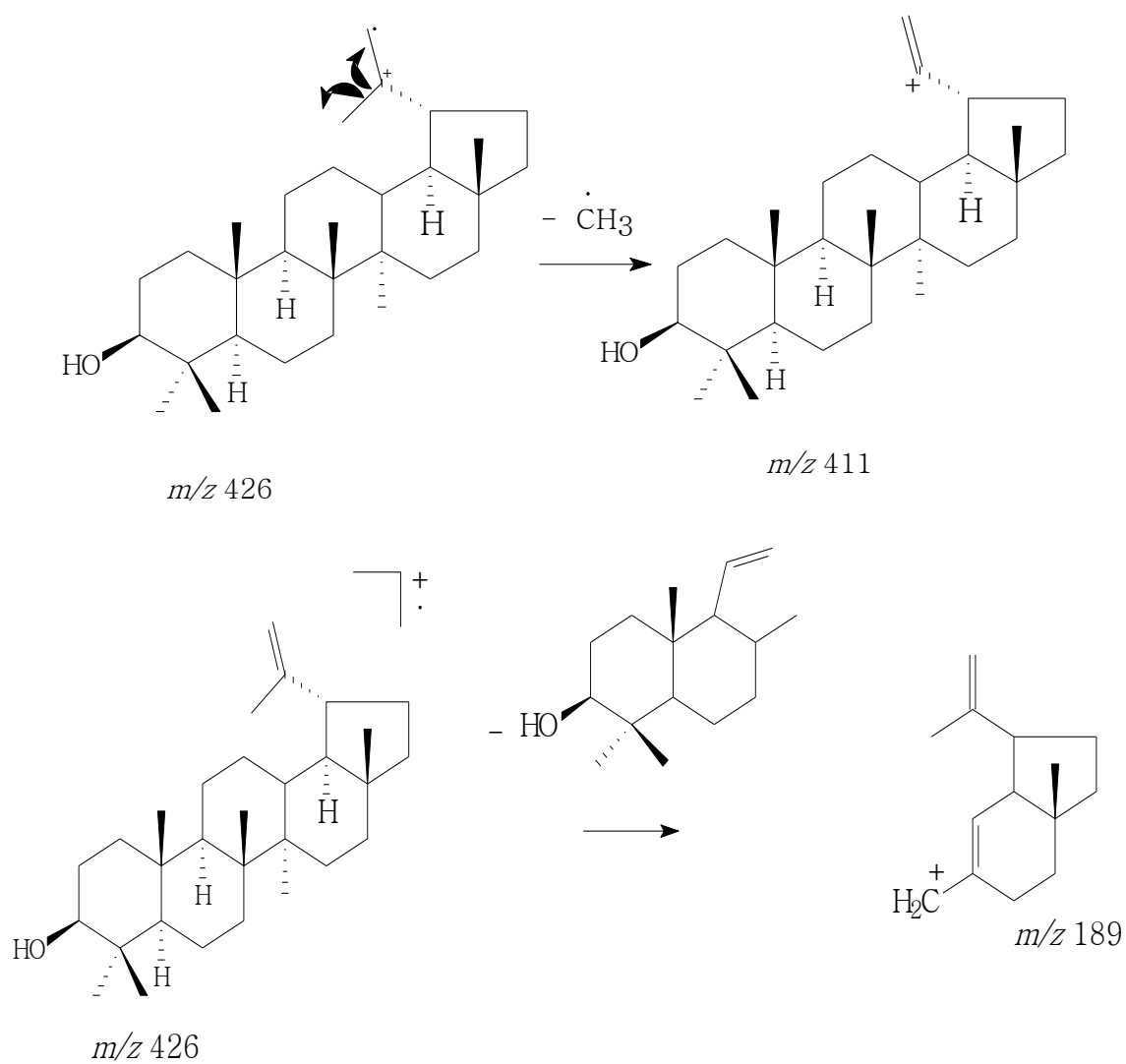
FIGURA 4.3. Espectro de massas da substância **1**  $t_R= 29,57$  (IE, 70 eV).

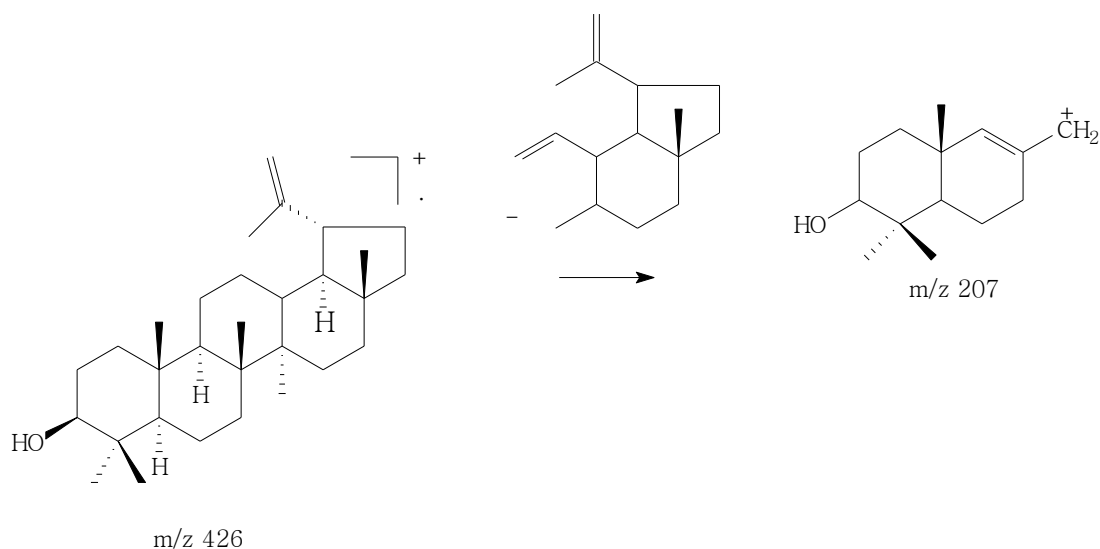


O lupeol pertence à família dos lupanos e está amplamente distribuído em todo o reino vegetal, sendo isolado de diversas espécies de plantas. Este composto apresenta potencial biológico, sendo relatadas as atividades antitumoral, antioxidante (RAJIC, 2000), anti-inflamatória e antimalárica (FERNÁNDEZ et al., 2001; LOPES, 2007) para o mesmo, além de se mostrar eficaz contra diabetes e problemas do coração (ANDRIKOPOULOS et al., 2003).

Uma proposta de fragmentação para **1**, baseada em dados da literatura (SANTANA, 2011), é apresentada na (FIGURA 4.4 p. 65 ).

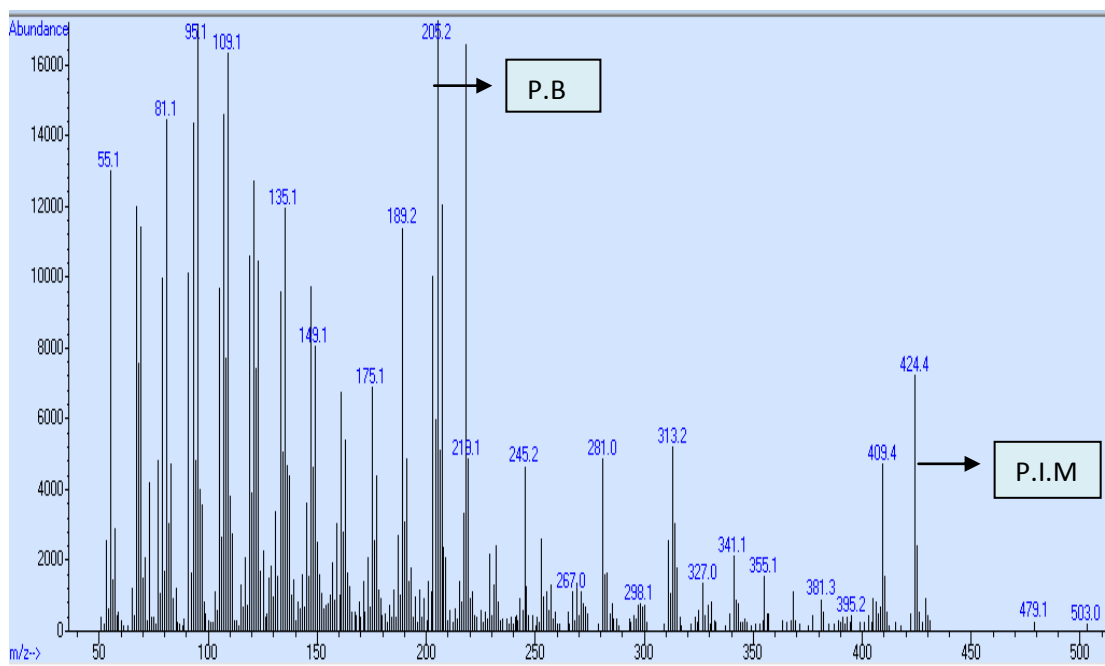
FIGURA 4.4 Proposta de fragmentação para a substância **1**.





O espectro de massas de **2** (lupenona) (FIGURA 4.5, p. 66) apresentou um pico em  $m/z$  424, relativo ao pico do íon molecular, cuja fórmula estrutural é  $C_{30}H_{48}O$ . Além disso, observou-se em  $m/z$  205 a presença do pico base.

FIGURA 4.5. Espectro de massas da substância **2**  $t_R = 28.46$  (IE, 70 eV).

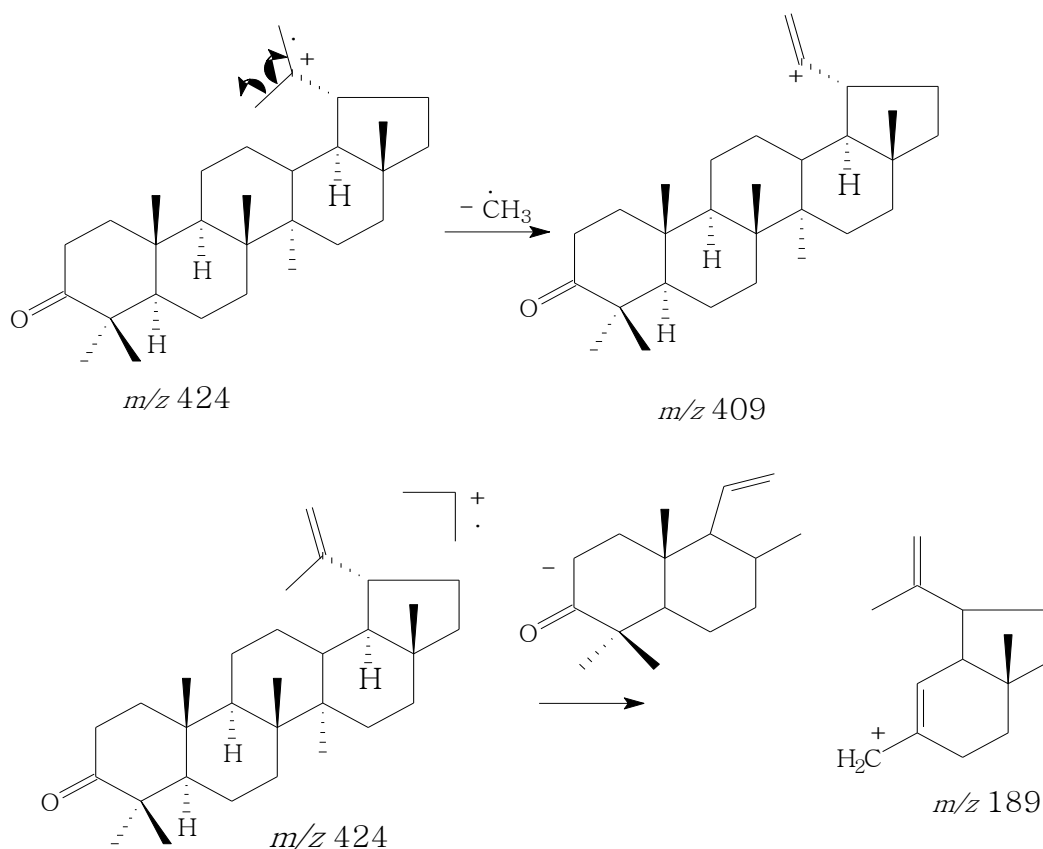


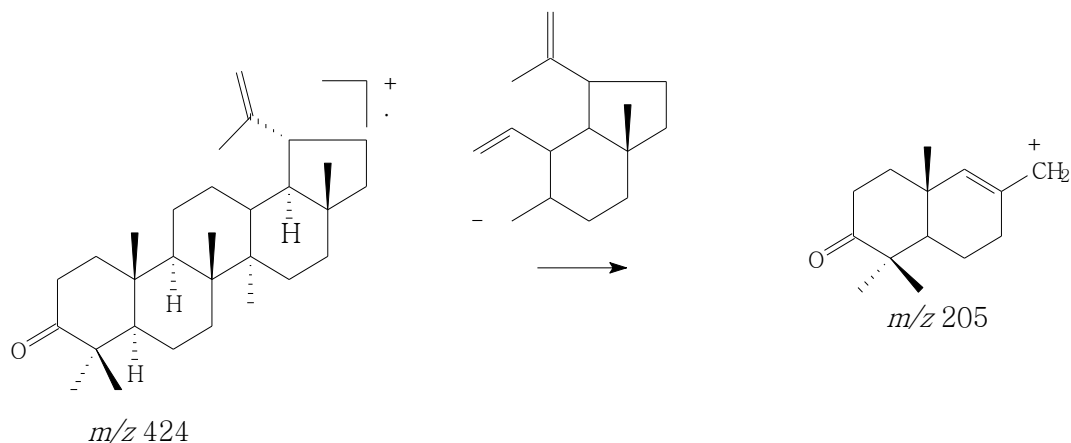
No que tange ao potencial biológico, a lupenona foi testada quanto à sua atividade alelopática frente à substâncias químicas produzidas por *Acacia Mangium*, separadamente, e em mistura com o lupeol. A avaliação em mistura

apresentou uma redução na sua atividade, em relação ao seu efeito isolado. Um estudo do efeito do pH na atividade alelopática, a lupenona apresentou atividade mais expressiva em pH menor que 3, enquanto o lupeol apresentou maior atividade em condições básicas (pH de 9). Quando analisados em mistura, em pH ácido, a atividade da lupenona superou à do lupeol, enquanto em pH básico, o lupeol apresentou atividade alelopática superior à lupenona (LUZ et al., 2010).

Uma proposta de fragmentação para **2**, baseada em dados da literatura (SANTANA, 2011), é apresentada na (FIGURA 4.6 p.67).

FIGURA 4.6. Proposta de fragmentação para a substância **2**

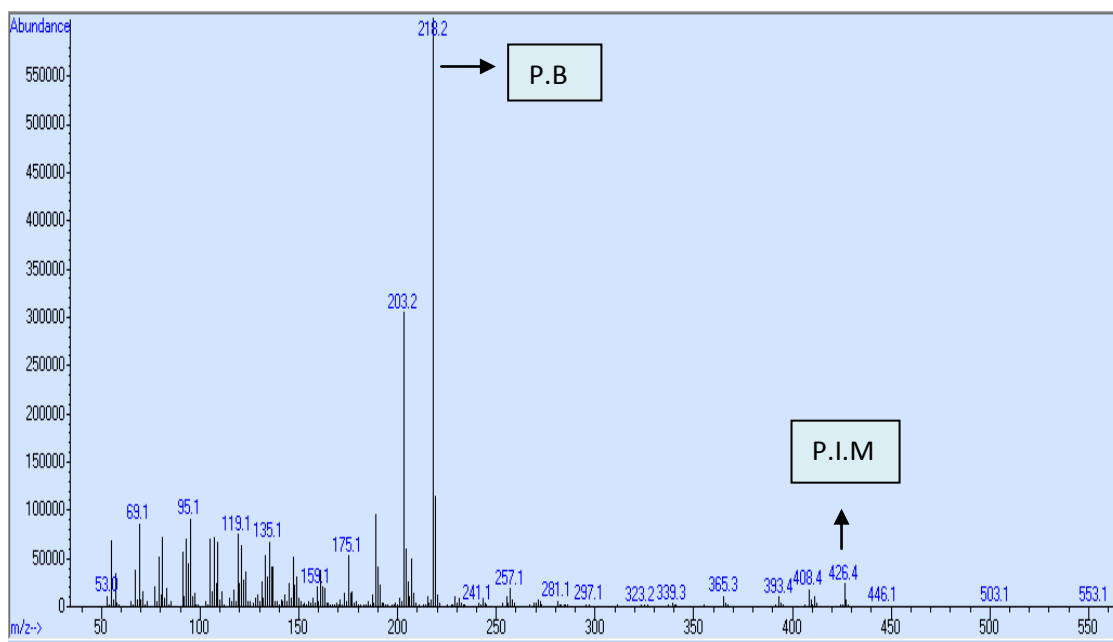




A substância **3**, denominada de  $\beta$ -amirina, apresentou em seu espectro de massas (FIGURA 4.7, p.68) um pico em  $m/z$  426, relativo ao pico do íon molecular, além de um pico em  $m/z$  218 (pico base).

Esta substância pertencente à série dos oleanos, a  $\beta$ -amirina possui um padrão de fragmentação característico, apontando na estrutura a presença de uma ligação dupla em C-12. O tipo de fragmentação mais comum para esse tipo de substância ocorre via reações de Retro-Diels-Alder (GIESE et al., 2005).

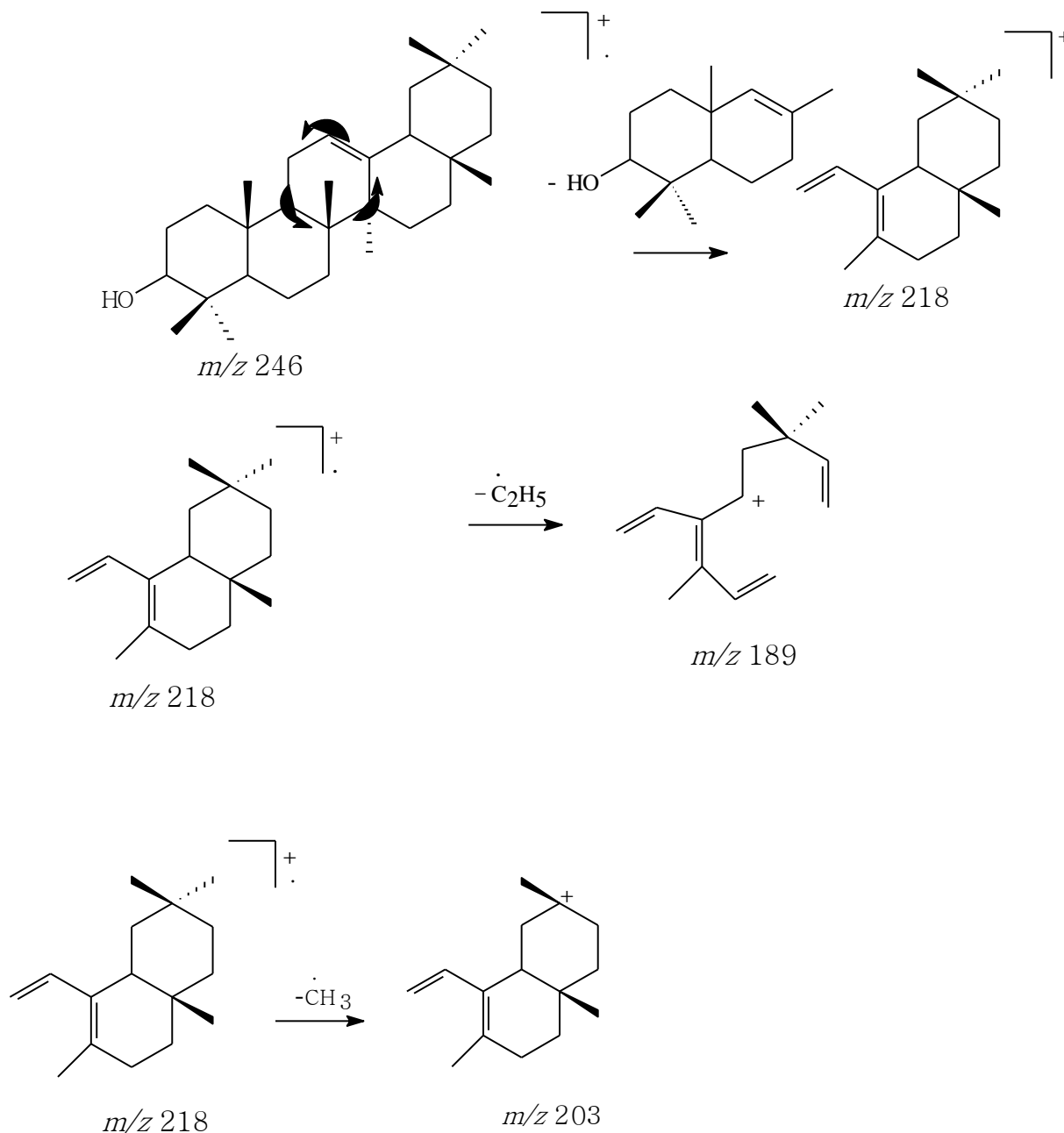
FIGURA 4.7. Espectro de massas da substância **3**  $t_R = 27.87$  (IE, 70 eV)



Para  $\beta$ -amirina algumas atividades biológicas já foram reportadas, tais como: antitumoral (MOREIRA et al., 2003; MENDES-NATERA, 2004), anti-inflamatória (CUNHA et al., 2003) e nematocida (FERRAZ & FREITAS, 2007).

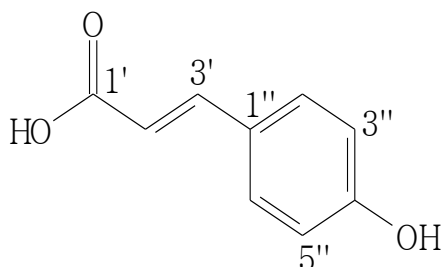
Uma proposta de fragmentação para essa substância, baseada em dados da literatura (SILVA, 2007), é apresentada na (FIGURA 4.8 p. 69).

FIGURA 4.8. Proposta de fragmentação para a substância 3

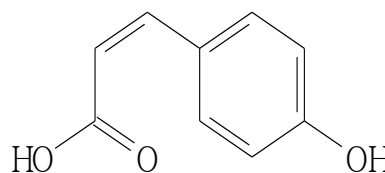


#### 4.1.2.2 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DAS SUBSTÂNCIAS 4 e 5.

Os ácidos *trans* e *cis-p*-cumárico já haviam sido isolados do extrato diclorometano do caule de *K. coriacea* (CORTEZ et al., 1999) e foram isolados novamente no presente trabalho no extrato etanólico das folhas deste espécime.



(4)



(5)

As substâncias 4 e 5 foram isoladas em mistura da fração 2.2, oriunda da fração acetato de etila das folhas de *K. coriacea*.

Pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (FIGURA 4.9, p. 72), observou-se a presença de dois sinais de dupletos, sendo um em  $\delta$  7,43 e outro em  $\delta$  6,81, referentes aos hidrogênios do grupo fenila (3'' e 5'') e (2'' e 6'') respectivamente, os quais são equivalentes, pois estão presentes em um mesmo ambiente químico.

Os sinais de dupletos em  $\delta$  7,59 e  $\delta$  6,28 são característicos dos hidrogênios olefínicos H-3' e H-2', respectivamente, os quais acoplam-se entre si, dando um valor elevado de constante ( $J= 16,1$  Hz), característico de um sistema  $\alpha,\beta$ -insaturado, o que representa uma molécula com anel aromático 1,4-dissubstituído; tais sinais indicam a presença do ácido *trans-p*-cumárico.

Ainda pela análise do espectro de RMN de  $^1\text{H}$ , observou-se três sinais de dupletos em  $\delta$  5,84,  $\delta$  6,86 e  $\delta$  7,67, os quais indicam a presença do ácido *cis-p*-cumárico. Os sinais referentes à H 2' e H 3' indicam a presença dos isômeros, e a diferença nos valores de deslocamento químico em que se encontram, evidenciam a diferença entre eles.

Através da análise dos dados espectroscópicos e comparação com os dados da literatura (CORTEZ et al., 1999), a mistura das substâncias 4 e 5 foi identificada como os ácidos *cis* e *trans-p*-cumárico (TABELAS 4.2 e 4.3, p. 71).

TABELA 4.2. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância 4, em comparação com os dados da literatura

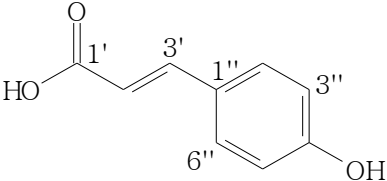
 ácido <i>trans-p</i> -cumárico		
Posição de $^1\text{H}$	Substância 4 (400MHz, $\text{CDCl}_3$ )	(500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) (CORTEZ et al., 1999)
	$\delta$ (ppm), $J$ (Hz)	$\delta$ (ppm), $J$ (Hz)
2'	6,28 (1H, <i>d</i> , $J=16,1$ )	6,29 (1H, <i>d</i> , $J=16,0$ )
2'', 6''	6,81 (1H, <i>d</i> , $J=8,8$ )	6,83 (1H, <i>d</i> , $J=9,0$ )
3'', 5''	7,43 (1H, <i>d</i> , $J=8,8$ )	7,43 (1H, <i>d</i> , $J=9,0$ )
3'	7,59 (1H, <i>d</i> , $J=16,1$ )	7,60 (1H, <i>d</i> , $J=16,0$ )

TABELA 4.3. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da substância 5, em comparação com os dados da literatura.

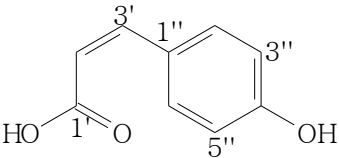
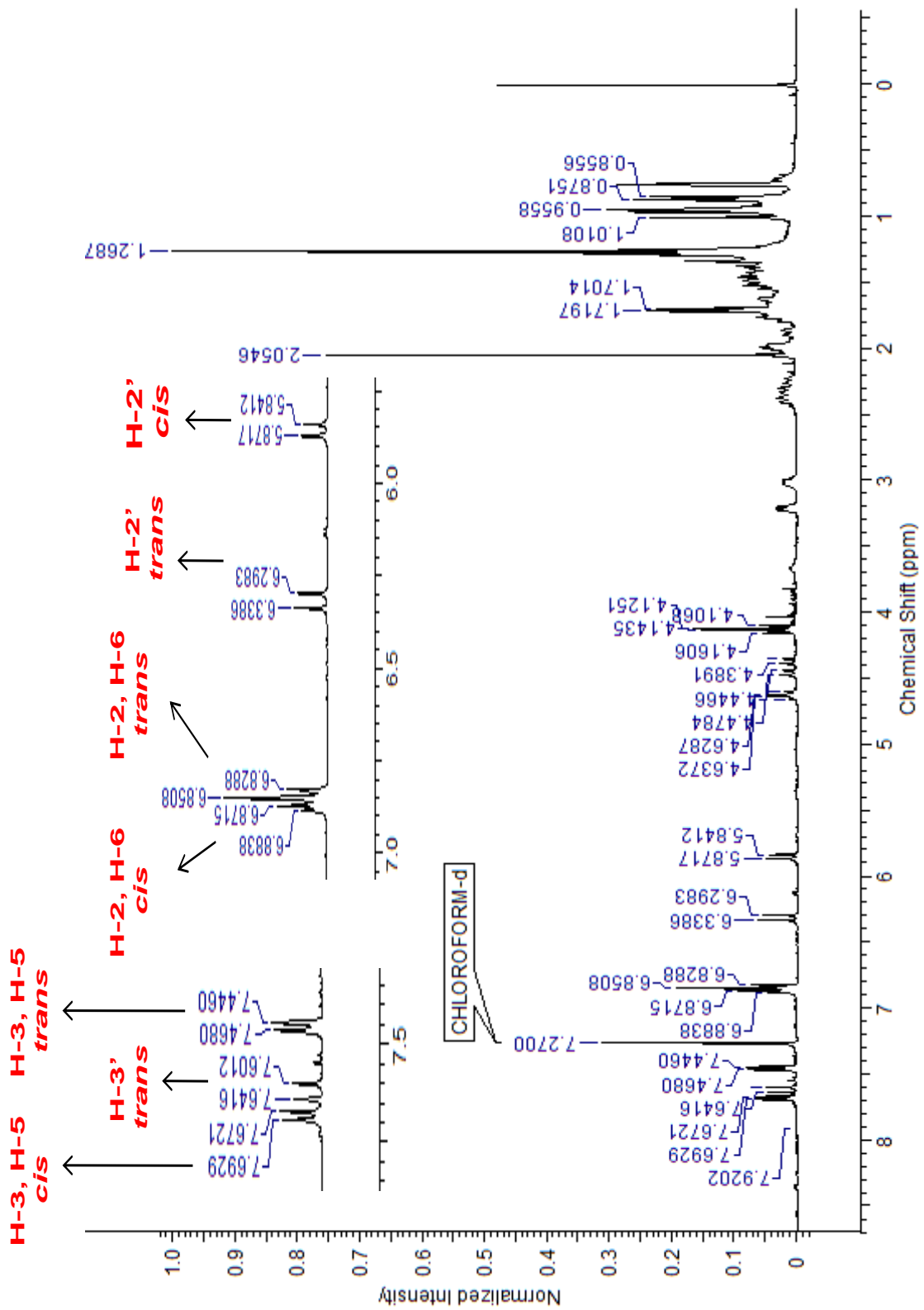
 Ácido <i>cis-p</i> -cumárico		
Posição H	Substância 5 (400MHz, $\text{CDCl}_3$ )	(500 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) (CORTEZ et al., 1999)
	$\delta$ (ppm), $J$ (Hz)	$\delta$ (ppm), $J$ (Hz)
2'	5,84 (1H, <i>d</i> , $J=12,2$ )	5,83 (1H, <i>d</i> , $J=12,5$ )
2'', 6''	6,86 (1H, <i>d</i> , $J=8,5$ )	6,85 (1H, <i>d</i> , $J=8,5$ )
3'', 5''	7,67 (1H, <i>d</i> , $J=8,5$ )	7,66 (1H, <i>d</i> , $J=8,5$ )
3'	-	6,86 (1H, <i>d</i> , $J=12,5$ )

FIGURA 4.9. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) das SUBSTÂNCIAS 4 e 5



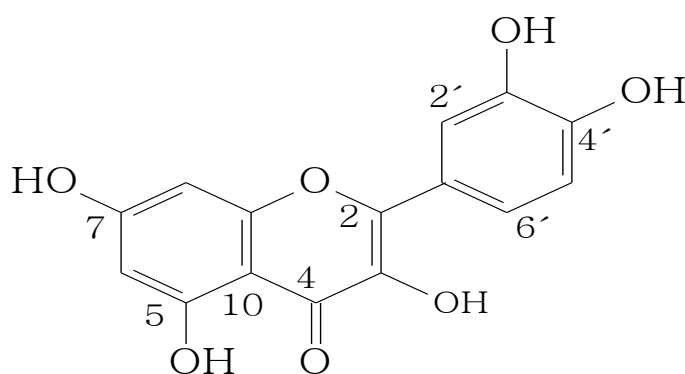
Em relação às substâncias supracitadas, o ácido *trans-p*-cumárico é o mais estável, mas está sujeito à conversão para a forma *cis* quando recebe radiação ultra-violeta (UV) por algumas horas por um processo chamado de foto-isomerização (KORT et al., 1996). Nesse tipo de estrutura, a isomerização *cis* e *trans* ocorre facilmente quando é catalisada com uma luz com incidência em 360 nanômetros. Logo, a radiação UV é capaz de produzir facilmente uma mistura equilibrada desses dois isômeros (DEWICK, 2002).

Para o ácido *p*-cumárico algumas atividades biológicas estão relatadas, tais como: antioxidante (S'WISŁOCKA et al., 2013), alelopática (SOUZA FILHO, PEREIRA & BAYAMA, 2005) e antimicrobiana (ESTEVINHO et al., 2008).

#### 4.1.2.3 - ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DA SUBSTÂNCIA 6.

A quercetina (**6**) é uma substância comumente isolada e pode ser encontrada comercialmente. Já foi isolada do extrato dos galhos de *K. variabilis*, em sua forma glicosilada (quercetina-3-O-glicosídeo e quercetina-3-O-galactosídeo) (COQUEIRO, 2010).

No presente trabalho, a quercetina foi isolada da fração 3.5.3.5, oriunda da fração acetato de etila do extrato etanólico das folhas, e quando analisada via CCD, apresentou uma única mancha amarela, característica de flavonoide.



(6)

Esta substância foi caracterizada através de experimentos de RMN de  $^1\text{H}$  e comparação com os dados da literatura (NAIDU et al., 2012).

O espectro de RMN de  $^1\text{H}$  de **6** (FIGURA 4.10 , p. 75) apresentou na região dos aromáticos, dois sinais de dubletos em  $\delta$  6,18 e  $\delta$  6,39, ambos com  $J= 1,6$  Hz, característico de acoplamento meta entre H-6 e H-8 do anel A de um núcleo flavonoide.

Os sinais em  $\delta$  6,89 ( $d, J= 8,3$  Hz),  $\delta$  7,73 ( $d, J= 2,0$  Hz) e  $\delta$  7,63 ( $dd, J= 8,3$  e  $2,0$  Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H-5', H-2' e H- 6', respectivamente, correspondendo a um sistema de substituição nas posições 3' e 4' do anel B.

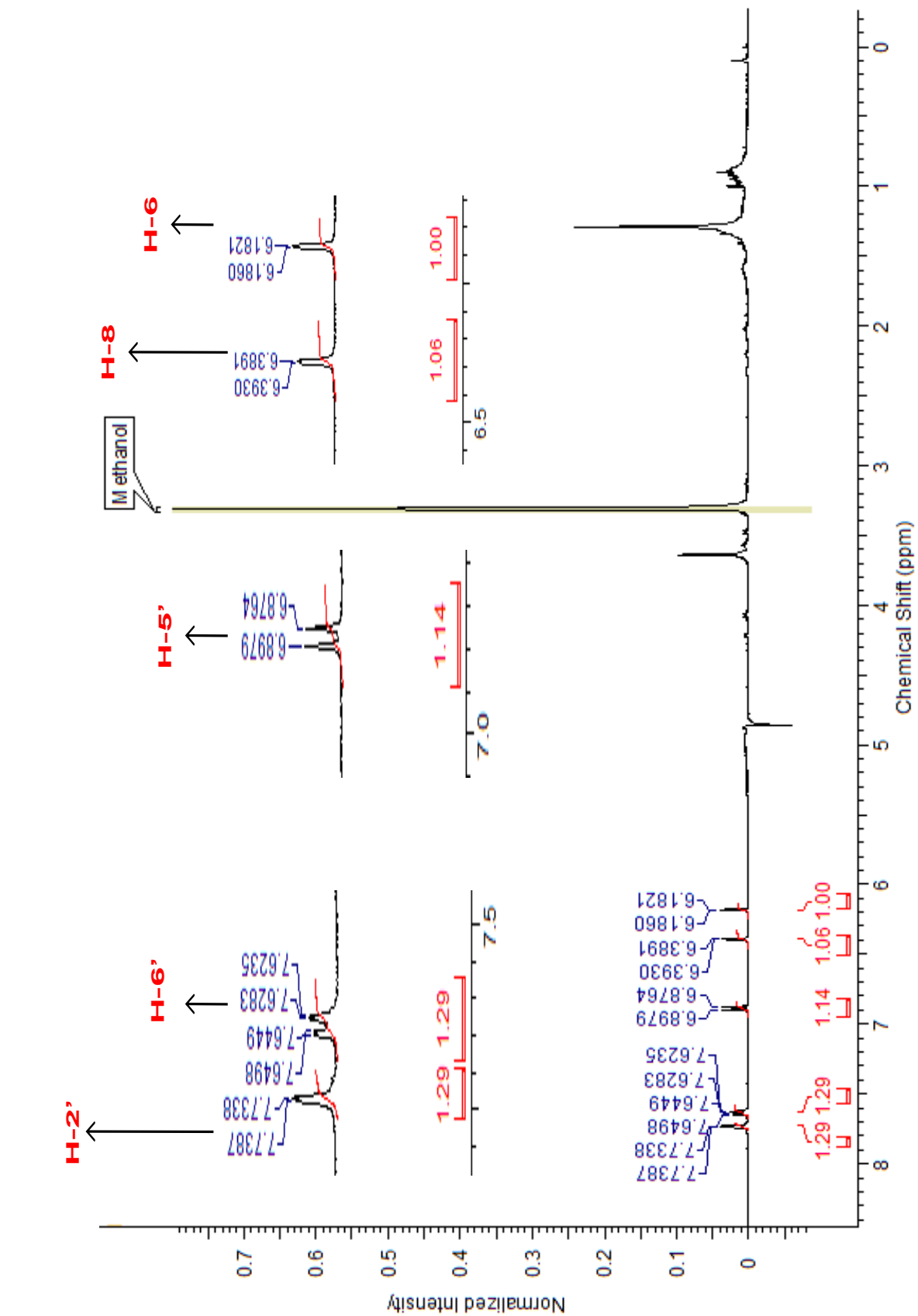
A análise dos dados espectroscópicos (TABELA 4.4, p. 74), em comparação com os dados da literatura, confirmaram a identificação da estrutura como sendo a do flavonoide quercetina.

TABELA 4.4. Dados de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da SUBSTÂNCIA 6 em comparação com os dados da literatura

Posição de $^1\text{H}$	Substância 6 (400MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ )	(200 MHz, $\text{CD}_3\text{OD}$ ) (NAIDU et al., 2012)
	$\delta$ (ppm), $J$ (Hz)	$\delta$ (ppm), $J$ (Hz)
6	6,18 (1H, $d, J= 1,6$ )	6,18 (1H, $d, J=1,7$ )
8	6,39 (1H, $d, J= 1,6$ )	6,40 (1H, $d, J= 1,7$ )
5'	6,89 (1H, $d, J= 8,3$ )	6,89 (1H, $d, J= 8,3$ )
2'	7,73 (1H, $d, J= 2,0$ )	7,68 (1H, $d, J=2,4$ )
6'	7,63 (1H, $dd, J= 8,3$ e $2,0$ )	7,55 (1H, $dd, J= 8,3$ e $2,4$ )

Os flavonoides estão presentes na dieta humana, sendo encontrados no vinho tinto, vegetais como cebola, couve, vagem e brócolis, chá preto, frutas como a maçã, uva e morango, grãos, nozes, sementes e cerveja (NIJVELDT, 2001). Possuem atividade antioxidante importante para a prevenção de doenças, e essa propriedade pode ser associada à sua competência de sequestrar radicais livres (KANDASWAMI & MIDDLETON, 1994).

FIGURA 4.10. Espectro de RMN de  $^1\text{H}$  (400 MHz,  $\text{CD}_3\text{OD}$ ) da SUBSTÂNCIA 6



## 4.2 - ESTUDO ETNOBOTÂNICO

A partir do levantamento etnobotânico de *K. coriacea*, observou-se que dos 25 informantes entrevistados, 76% afirmaram que conheciam e já tinham utilizado esta espécie, pelo menos uma vez para tratar alguma enfermidade. Apenas seis deles conheciam a espécie, porém relataram não saber qual o uso medicinal. Os dados de *K. coriacea* coletados nas entrevistas são expressos na TABELA 4.5 (ps. 76, 77 e 78).

TABELA 4.5. Levantamento etnobotânico de *K. coriacea* realizado em Goiandra(GO)

Idade do entrevistado (anos)	Sexo do entrevistado	Categorias de uso medicinal	Parte da planta utilizada	Forma de uso
64	Masculino	Leucemia	entrecasca	apurar com leite; utilizar pequenas porções diariamente
		Anemia		
74	Masculino	Gastrite	galho fino	amassar e colocar de molho na água por 24 horas
		dor de estômago		
		Anemia	entrecasca e folhas	chá das partes em conjunto
		Leucemia		
72	Feminino	dor na gengiva	entrecasca fresca	Mastigação
		dor de dente		
		Cárie		
60	Masculino	Artrite	entrecasca ou folhas	amassar e deixar de molho; posteriormente tomar.
		Artrose		
		Anemia		
		Leucemia		
		infecções intestinais		
		Cicatrização	entrecasca	fazer o emplasto
		Gastrite		apurar com leite; utilizar pequenas porções diariamente
55	Masculino	Gastrite	entrecasca	amassar e fazer a infusão com água
		Anemia		
		Leucemia		
		Vermífugo		

TABELA 4.5. Levantamento etnobotânico de *K. coriacea* realizado em Goiandira(GO) (continuação)

Idade do entrevistado (anos)	Sexo do entrevistado	Categorias de uso medicinal	Parte da planta utilizada	Forma de uso
66	Masculino	artrite	entrecasca ou folhas	infusão
		artrose		
		leucemia		
		anemia		
		vermífugo		
		cicatrização	entrecasca	fazer um melado e utilizar como emplasto
		dor de dente		mastigação
		gastrite	galho fino	moer e fazer um melado
50	Masculino	dor nos rins	entrecasca	chá
70	Masculino	todos os tipos de infecções	entrecasca	infusão
53	Masculino	reumatismo	entrecasca ou folhas	chá
		gastrite		
71	Masculino	anemia	entrecasca	amassar e deixar de molho; posteriormente tomar
		leucemia		
63	Feminino	leucemia	entrecasca	amassar e deixar de molho; posteriormente tomar
54	Masculino	dor nos rins	entrecasca	infusão
		vermífugo		
63	Masculino	reumatismo	entrecasca ou folhas	chá

TABELA 4.5. Levantamento etnobotânico de *K. coriacea* realizado em Goiandira(GO) (conclusão)

<b>Idade do entrevistado (anos)</b>	<b>Sexo do entrevistado</b>	<b>Categorias de uso medicinal</b>	<b>Parte da planta utilizada</b>	<b>Forma de uso</b>
55	Masculino	dor de dente	entrecasca	mastigação
		Cárie		
57	Masculino	vermífugo	entrecasca	apurar com leite; utilizar pequenas porções diariamente
59	Masculino	infecções de útero	entrecasca	infusão
		infecções de intestino		
		dor nos rins		
		reumatismo		
66	Masculino	cicatrização	entrecasca	fazer um melado e utilizar como emplasto
51	Masculino	leucemia	entrecasca	infusão
		anemia		
		gastrite		
53	Masculino	vermífugo	entrecasca ou folhas	chá

Em relação ao conhecimento dos informantes com faixa etária de 50 a 74 anos de idade, foi observado que alguns demonstram saber mais do que outros sobre os diversos usos da espécie, uma vez que indicaram mais categorias. Isso também pode ser constatado através do Valor da diversidade do informante (VDI), TABELA 4.6, (p.79), que expressa como os informantes usam a espécie e como esse uso encontra-se distribuído no município.

TABELA 4.6. Cálculo do Valor de diversidade do informante (VDI)

VDI = Mede como muitos informantes usam a espécie e como esse uso encontra-se distribuído.

<b>Idade do informante</b>	<b>VDI</b>
66	0,16
60	0,14
74	0,08
55	0,08
59	0,08
72	0,06
51	0,06
64	0,04
53	0,04
71	0,04
54	0,04
55	0,04
50	0,02
70	0,02
63	0,02
63	0,02
57	0,02
66	0,02
53	0,02

As informações obtidas sobre os distintos usos do pau-santo atribuíram 16 indicações terapêuticas (categorias), Tabela 4.7, (p. 80). O índice de Valor de Diversidade de Uso (VDU) retrata a importância e a contribuição das categorias de uso em relação ao valor total de usos. As categorias que mais se destacaram foram: leucemia, anemia e gastrite.

TABELA 4.7. Cálculo do Valor de Diversidade do Uso (VDU)

**VDU** = Mede a importância e como as categorias de uso contribuem para o valor total de usos.

<b>Indicação de uso medicinal</b>	<b>VDU</b>
leucemia	0,16
anemia	0,14
gastrite	0,12
dor de estômago	0,02
dor na gengiva	0,02
dor de dente	0,06
cárie	0,04
artrite	0,04
artrose	0,04
infecções intestinais	0,04
cicatrização	0,06
vermífugo	0,1
dor nos rins	0,06
todos os tipos de infecções	0,02
reumatismo	0,06
infecções de útero	0,02

O Valor de Consenso para os Tipos de Usos (VCTU) infere sobre o grau de concordância entre os informantes e os usos indicados para *K. coriacea*. Sendo assim, as três categorias mais citadas foram as que tiveram a maior concordância, permanecendo as indicações: leucemia, anemia e gastrite. Indicações de uso para dor de estômago, infecções no útero, dor na gengiva e todos os tipos de infecções tiveram o menor valor de VCTU, pois foram citadas por apenas um entrevistado (TABELA 4.8, p. 81).

TABELA 4.8. Valor de consenso dos informantes para os tipos de usos (VCTU) de *K. coriacea*.

**VCTU** = Mede o grau de concordância entre os informantes referente ao uso das espécies.

<b>Indicação de uso medicinal</b>	<b>VCTU</b>
Leucemia	0,0100
Anemia	0,0088
Gastrite	0,0075
Vermífugo	0,0063
dor de dente	0,0038
Cicatrização	0,0038
dor nos rins	0,0038
Reumatismo	0,0038
Cárie	0,0025
Artrite	0,0025
Artrose	0,0025
infecções intestinais	0,0025
dor de estômago	0,0013
dor na gengiva	0,0013
todos os tipos de infecções	0,0013
infecções de útero	0,0013

O Valor de Consenso para a Forma de Uso (VCFU) expressa a concordância entre os informantes referente às formas de uso citadas para *K. coriacea*. Neste sentido, foram citadas pelos informantes 11 formas de uso, sendo que a infusão (0,20) e o chá (0,16) são as formas mais utilizadas, como pode ser observado na TABELA 4.9 (p. 82).

Tabela 4.9. Valor de consenso dos informantes para as formas de usos (VCFU) de *K. coriacea*.

**VCFU** = Mede o grau de concordância entre os informantes referente à forma de uso da planta.

<b>Forma de uso</b>	<b>VCFU</b>
Infusão	0,20
Chá	0,16
apurar com leite; utilizar pequenas porções diariamente	0,12
Mastigação	0,12
amassar e deixar de molho; posteriormente tomar	0,12
fazer um melado e utilizar como emplasto	0,08
amassar e colocar de molho na água por 24 horas	0,04
chá das partes em conjunto	0,04
fazer o emplasto	0,04
amassar e fazer a infusão com água	0,04
moer e fazer um melado	0,04

No que tange ao Valor de Consenso para a Parte da Planta (VCPP), os informantes indicaram a entrecasca, folhas e galhos finos, sendo a entrecasca a mais citada, como pode ser observado na TABELA 4.10 (p. 82).

Tabela 4.10. Valor de Consenso para a Parte da Planta (VCPP) de *K. coriacea*.

**VCPP** = Mede o grau de concordância entre os informantes referente à parte da planta usada.

<b>Parte da planta</b>	<b>VCPP</b>
Entrecasca	0,72
Folhas	0,21
galhos finos	0,07

#### 4.4 - ESTUDOS BIOLÓGICOS

Neste estudo, foi realizada a avaliação do potencial biológico de *K. coriacea* pautada em entrevistas realizadas previamente com moradores do município de Goiandira (GO), os quais tradicionalmente fazem uso de muitas plantas para fins medicinais e a maioria deles cultiva espécies em suas residências, mostrando que esse município pode ser um potencial para aquisição de informações etnobotânicas e etnofarmacológicas.

##### 4.4.1 - ENSAIO ANTIMICROBIANO

Nesse ensaio foi avaliada a Concentração Inibitória Mínima (CIM) dos extratos, frações oriundas da partição líquido-líquido e três substâncias isoladas do extrato etanólico das folhas de *K. coriacea*, frente à bactérias e fungos. Os resultados são apresentados nas TABELAS 4.11 à 4.14 (ps. 85 à 88).

Preparou-se os extratos das folhas e caule por meio da maceração em etanol; no entanto, uma vez que os entrevistados indicaram a entrecasca extraída em água como uso medicinal, foi preparado também este extrato para avaliação biológica.

As bactérias utilizadas foram: *Escherichia coli* (ATCC 14948), *Salmonella choleraesuis* (ATCC 10708), *Yersinia enterocolitica* (ATCC 9610), *Streptococcus pneumoniae* (ATCC IAL 1741), *S. pyogenes* (ATCC 12345), *S. mutans* (ATCC 25175), *S. sobrinus* (ATCC 33478), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *S. epidermidis* (ATCC 12228), *S. aureus* (ATCC 29213), *Burkholderia cepacia* (ATCC 17759), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 14502), e *Lactobacillus casei* (ATCC 11578). Os fungos foram: *Candida albicans* (ATCC 28366), *C. tropicalis* (ATCC 13803) e *C. glabrata* (ATCC 15126).

Os controles positivos utilizados para as bactérias, todos na faixa de concentração de 0,115 a 59,0 µg/mL, foram: estreptomicina para *E. coli* (CIM de 2,95 µg/mL), *S. choleraesuis* (CIM de 5,9 µg/mL), *Y. enterocolitica* (CIM de 2,95 µg/mL), *B. cepacia* (CIM de 5,9 µg/mL) e *P. aeruginosa* (CIM de 5,9 µg/mL); penicilina para *S. aureus* (ATCC 6538) (CIM de 0,0922 µg/mL), *S. aureus* (ATCC 29213) (CIM de 0,7375 µg/mL), *S. pneumoniae* (CIM de 0,1844

$\mu\text{g/mL}$ ), *S. epidermidis* (CIM de 5,9  $\mu\text{g/mL}$ ) e clorexidina para *S. mutans* (CIM de 0,922  $\mu\text{g/mL}$ ), *S. sobrinus* (CIM de 0,922  $\mu\text{g/mL}$ ) e *L. casei* (CIM de 3,688  $\mu\text{g/mL}$ ). Para os fungos, foram utilizados os seguintes controles: *C. parapsilosis* (ATCC 22019), com faixa de CIM de 0,25 a 1,0  $\mu\text{g/mL}$  e *C. krusei* (ATCC 6258), faixa de CIM de 0,25 a 2,0  $\mu\text{g/mL}$ .

Com base em dados da literatura (RÍOS & RECIO, 2005; GIBBONS, 2008), um extrato ou fração são considerados promissores quando apresentam valor de CIM igual ou inferior a 100  $\mu\text{g/mL}$ ; para substâncias puras, um valor expressivo de CIM é aquele igual ou inferior à 10  $\mu\text{g/mL}$ .

TABELA 4.11. Valores de CIM (em µg/mL) do extrato aquoso e frações da entrecasca de *K. coriacea* frente à bactérias e fungos.

Classe	Bactérias	Entrecasca		
		Extrato aquoso	Fração hidroalcoólica	Fração acetato de etila
Diarreia	<i>Escherichia coli</i>	> 400	> 400	> 400
	<i>Salmonella choleraesui</i>	> 400	> 400	> 400
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	> 400	> 400	> 400
Infecções	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	> 400	> 400	> 400
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	> 400	> 400	> 400
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	> 400	> 400	> 400
Reumatismo	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	> 400	> 400	> 400
	<i>Burkholderia cepacia</i>	> 400	> 400	> 400
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	> 400	> 400	> 400
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 400	> 400	> 400
Infecções bucais	<i>Streptococcus mutans</i>	> 400	> 400	> 400
	<i>Lactobacillus casei</i>	> 400	> 400	> 400
	<i>Streptococcus sobrinus</i>	> 400	> 400	> 400
Fungos		Entrecasca		
		Extrato aquoso	Fração hidroalcoólica	Fração acetato de etila
	<i>Candida albicans</i>	> 2000	> 2000	> 2000
	<i>Candida tropicalis</i>	> 2000	> 2000	> 2000
	<i>Candida glabrata</i>	15,62	15,62	15,62

TABELA 4.12. Valores de CIM (em µg/mL) do extrato etanólico do caule e frações de *K. coriacea* frente à bactérias e fungos.

Classe	Bactérias	CAULE			
		Extrato etanólico	Fração hidroalcoólica	Fração acetato de etila	Fração Hexano
Diarreia	<i>Escherichia coli</i>	> 400	> 400	NA	> 400
	<i>Salmonella choleraesui</i>	> 400	> 400	NA	> 400
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	> 400	> 400	NA	200
Infecções	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	> 400	> 400	NA	> 400
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	> 400	> 400	NA	> 400
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	> 400	> 400	NA	> 400
Reumatismo	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	> 400	> 400	NA	> 400
	<i>Burkholderia cepacia</i>	> 400	> 400	NA	> 400
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	> 400	> 400	NA	200
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 400	> 400	NA	> 400
Infecções bucais	<i>Streptococcus mutans</i>	> 400	> 400	NA	> 400
	<i>Lactobacillus casei</i>	> 400	> 400	NA	> 400
	<i>Streptococcus sobrinus</i>	> 400	> 400	NA	> 400
Fungos		CAULE			
		Extrato etanólico	Fração hidroalcoólica	Fração acetato de etila	Fração Hexano
	<i>Candida albicans</i>	250	> 2000	> 2000	> 2000
	<i>Candida tropicalis</i>	500	> 2000	2000	2000
	<i>Candida glabrata</i>	15,62	> 2000	> 2000	> 2000

\*NA: não avaliado

TABELA 4.13. Valores de CIM (em µg/mL) do extrato etanólico e frações das folhas de *K. coriacea* frente à bactérias e fungos.

Classe	Bactérias	FOLHAS			
		Extrato etanólico	Fração Hidroalcoólica	Fração acetato de etila	Fração Hexano
Diarreia	<i>Escherichia coli</i>	> 400	NA	> 400	> 400
	<i>Salmonella choleraesui</i>	> 400	NA	> 400	> 400
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	400	NA	200	200
Infecções	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	100	NA	200	50
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	100	NA	100	25
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	200	NA	> 400	100
Reumatismo	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	200	NA	200	100
	<i>Burkholderia cepacia</i>	> 400	NA	> 400	> 400
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	100	NA	200	25
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	100	NA	> 400	> 400
Infecções bucais	<i>Streptococcus mutans</i>	> 400	NA	> 400	> 400
	<i>Lactobacillus casei</i>	> 400	NA	> 400	> 400
	<i>Streptococcus sobrinus</i>	> 400	NA	> 400	> 400
Fungos		FOLHAS			
		Extrato etanólico	Fração hidroalcoólica	Fração acetato de etila	Fração Hexano
	<i>Candida albicans</i>	31,25	NA	1000	> 2000
	<i>Candida tropicalis</i>	62,5	NA	> 2000	> 2000
	<i>Candida glabrata</i>	7,81	NA	15,62	3,9

\*NA: não avaliado

TABELA 4.14. Valores de CIM (em µg/mL) das substâncias isoladas do extrato etanólico das folhas de *K. coriacea* frente à bactérias e fungos.

Classe	Bactérias	SUBSTÂNCIAS ISOLADAS		
		quercetina	lupeol	lupenona
Diarreia	<i>Escherichia coli</i>	> 400	> 400	> 400
	<i>Salmonella choleraesui</i>	> 400	> 400	> 400
	<i>Yersinia enterocolitica</i>	> 400	400	> 400
Infecções	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 6538)	> 400	> 400	> 400
	<i>Streptococcus pneumoniae</i>	400	> 400	> 400
	<i>Staphylococcus epidermidis</i>	> 400	> 400	> 400
Reumatismo	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 29213)	> 400	> 400	> 400
	<i>Burkholderia cepacia</i>	> 400	> 400	> 400
	<i>Streptococcus pyogenes</i>	400	> 400	> 400
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	400	> 400	> 400
Infecções bucais	<i>Streptococcus mutans</i>	> 400	> 400	> 400
	<i>Lactobacillus casei</i>	> 400	> 400	> 400
	<i>Streptococcus sobrinus</i>	> 400	> 400	> 400
Fungos		SUBSTÂNCIAS ISOLADAS		
		quercetina	lupeol	Lupenona
	<i>Candida albicans</i>	> 2000	> 2000	> 2000
	<i>Candida tropicalis</i>	> 2000	> 2000	> 2000
	<i>Candida glabrata</i>	15,62	> 2000	> 2000

Associando os valores de CIM para os extratos aquoso da entrecasca e etanólico do caule e frações oriundas da partição líquido-líquido dos mesmos, com as indicações da população TABELA 4.5, (ps. 76 à 78), constatou-se que os mesmos não apresentaram atividade biológica expressiva (CIM  $\geq$  200  $\mu\text{g/mL}$ ).

No trabalho de AQUINO et al (2013), o extrato etanólico da entrecasca de *K. coriacea* foi avaliado frente à *S. mutans*, e em concentração menor que 10  $\mu\text{g/mL}$  inibiu o crescimento desta bactéria, a qual é o principal agente causador da cárie dentária. Possivelmente, os resultados não foram expressivos neste trabalho, devido às classes de metabólitos secundários presentes nos extratos serem distintas, pois dependendo da localização geográfica de uma planta, a mesma pode sofrer várias influências do meio, que impactua na produção de diferentes PNs. Também, o método de extração pode não ter sido eficiente o suficiente para extrair os metabólitos bioativos.

Com relação aos ensaios frente aos fungos, o extrato aquoso da entrecasca e as frações acetato de etila e hidroacóica apresentaram resultados promissores frente à *C. glabrata* com CIM de 15,62  $\mu\text{g/mL}$ . O extrato etanólico do caule se mostrou ativo somente frente à *C. glabatra*, apresentando um valor de CIM satisfatório de 15,62  $\mu\text{g/mL}$ . Esses resultados sugerem que os extratos e suas frações podem ser capazes de inibir a atividade deste fungo, o qual é o segundo maior causador da candidíase, depois de *C. albicans* (GEIGER, FOXMAN e SOBEL, 1995). Correlacionando tais dados com o fato da população fazer maior uso do extrato em detrimento às frações, sugere-se a socialização destas informações científicas à mesma, uma vez que o foco principal de uso popular ainda se dá para doenças relacionadas às bactérias.

Em relação aos resultados obtidos para amostras relacionadas às folhas de *K. coriacea* Tabela 4.13, (p. 87), o extrato etanólico e as frações acetato de etila e hexano foram ativas frente às bactérias *S. pneumoniae*, com valores de CIM de 100  $\mu\text{g/mL}$ , 100  $\mu\text{g/mL}$  e 25  $\mu\text{g/mL}$ , respectivamente e *S. aureus* com valores de CIM de 100  $\mu\text{g/mL}$  para o extrato etanólico e de 25  $\mu\text{g/mL}$  para a fração hexano. Além disso, o extrato da folhas foi ativo em uma CIM de 100  $\mu\text{g/mL}$  para *S. pyogene* (causadora de faringite bacteriana comum) e *P. aeruginosa* (responsável pelas infecções hospitalares), já a fração hexano apresentou um valor de CIM de 25  $\mu\text{g/mL}$  frente à *S. pyogenes*, mostrando que

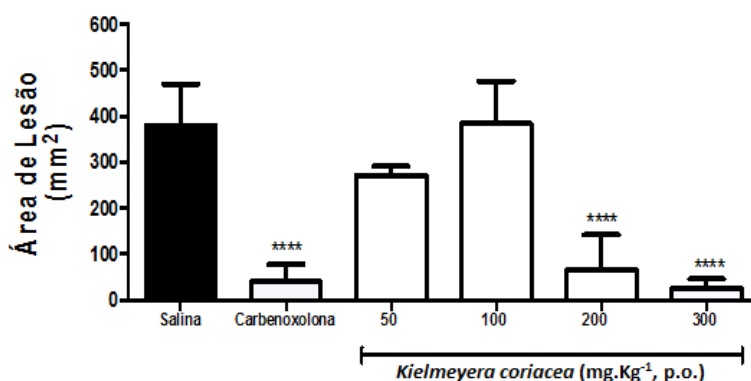
essa fração pode inibir a atividade antimicrobiana dessa bactéria. Em relação à atividade antifúngica das folhas de *K. coriacea*, o extrato etanólico apresentou resultados satisfatório frente à *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, com CIM de 31,25 µg/mL, 62,5 µg/mL e 7,81 µg/mL, respectivamente. No entanto, as frações acetato de etila e hexano só foram ativas frente à *C. glabrata*, apresentando valores de CIM bastante relevantes iguais a 12,65 µg/mL e 3,9 µg/mL, respectivamente. Possivelmente, as substâncias responsáveis pela atividade são de polaridade baixa, em especial pelo fato da fração hexano ter sido a mais ativa.

As substâncias lupeol, lupenona e quercetina TABELA 4.14 (p. 88) foram avaliadas frente às bactérias e fungos, não apresentando resultados relevantes, exceto para *C. glabrata*, em que a quercetina apresentou o mesmo valor de CIM (15,62 µg/mL) que a fração acetato de etila. Desta forma, é possível que esta substância, pertencente à classe dos flavonoides, influencie efetivamente na inibição deste fungo.

#### 4.4.2 - ENSAIO ANTIULCEROGÊNICO

No presente trabalho, a avaliação da atividade antiulcerogênica foi realizada através da indução de úlcera por etanol absoluto. Utilizou-se como controle positivo a carbenoxolona (100 mg.Kg<sup>-1</sup>) e como controle negativo uma solução salina (10 mL.Kg<sup>-1</sup>). Os resultados obtidos nesse experimento são apresentados na (FIGURA 4.11, p 90).

FIGURA 4.11. Efeito do extrato etanólico das folhas de *K. coriacea* no modelo de indução de úlcera gástrica por etanol absoluto em ratos



As áreas de lesão ulcerativas estão representadas como média  $\pm$ D .P. ANOVA seguida do teste de Tukey. \*\*\*\* $p < 0,0001$ , em relação ao grupo controle negativo tratado com salina.

De acordo com os resultados apresentados na FIGURA 4.11 (p. 90), o extrato inibiu de maneira estatisticamente significativa a formação das lesões ulcerativas induzidas por etanol na dose de  $200 \text{ mg.kg}^{-1}$ . A FIGURA 4.12, (p. 91) apresenta imagens ilustrativas desse resultado.

FIGURA 4.12. Imagens dos estômagos tratados com carbenoxolona, solução salina e extrato etanólico das de *K. coriacea* ( $200$  e  $300 \text{ mg.kg}^{-1}$ )



Carbenoxolona



extrato etanólico das  
folhas de *K. coriacea*  
 $200 \text{ mg.kg}^{-1}$



extrato etanólico das  
folhas de *K. coriacea*  
 $300 \text{ mg.kg}^{-1}$



Solução salina

Quando se compara a administração de carboxenolona em relação ao extrato etanólico das folhas de *K. coriacea* avaliado nas concentrações de 200 e 300 mg.kg<sup>-1</sup>, (FIGURA 4.12, p.91) observa-se que não houve diferenças significativas entre elas. No entanto, quando se compara a administração dessas mesmas concentrações em relação à solução salina, percebe-se uma diferença visível, mostrando que essas frações conseguiram diminuir estatisticamente a formação das lesões ulcerativas induzidas por etanol.

Os resultados observados do extrato etanólico das folhas de *K. coriacea* nas doses de 50 e 100 mg.kg<sup>-1</sup> (FIGURA 4.11, p. 90), não foram eficientes na inibição das lesões ulcerativas, quando comparados com o controle negativo salina. A (FIGURA 4.13, p. 92), apresenta imagens ilustrativas desse resultado.

FIGURA 4.13. Imagens dos estômagos tratados com solução salina e extrato etanólico das folhas de *K. coriacea* (50 e 100 mg.kg<sup>-1</sup>)



Após análises estatísticas das lesões gástricas, o extrato etanólico das folhas de *K. coriacea* avaliado nas concentrações de 50 e 100 mg.kg<sup>-1</sup>, não foi capaz de inibir a ação necrotizante do etanol.

A formação das lesões gástricas induzidas por etanol tem origem multifatorial que inclui estresse oxidativo, dano ao DNA, decréscimo nos níveis de glutathiona total e peroxidação lipídica nas células da mucosa gástrica como alguns dos fatores envolvidos, produzindo necrose, hemorragia sub-epitelial, edema, esfoliação celular e aumento da permeabilidade da mucosa (DE-FARIA et al., 2012). Além disso, a atividade ulcerogênica do etanol se deve a sua capacidade de dissolver o conteúdo de muco gástrico, diminuindo o gradiente de potencial de ação entre o lúmen e a mucosa que aumenta o fluxo de íons  $\text{Na}^+$  e  $\text{H}^+$  para o lúmen gástrico, estimulando a secreção de histamina, pepsina e de íons  $\text{H}^+$  (SZABO E BROWN, 1987). Considerando que o extrato etanólico das folhas de *K. coriacea* (200 e 300  $\text{mg.kg}^{-1}$ ) inibiu em quase 100% a formação de lesões gástricas causadas por etanol, pode-se afirmar que este extrato exerce uma gastroproteção considerável.

No entanto, o estudo da elucidação dos mecanismos de ação envolvidos na gastroproteção desse extrato frente à úlcera gástrica se faz necessário.

Os resultados satisfatórios obtidos nesse estudo corroboram com os dados obtidos no levantamento etnobotânico realizado em Goiandira, onde a maioria dos entrevistados utiliza essa espécie para o tratamento de gastrite.

#### 4.4.3 – ENSAIOS ENZIMÁTICOS

Os extratos das folhas (EF), do caule (EC) e das raízes (ER) de *K. coriacea* foram avaliados frente às CatK, CatL e CatV, nas concentrações de 500  $\mu\text{g/mL}$  a 5  $\mu\text{g/mL}$ .

Diante dos resultados observados para EF, notou-se que frente à CatK houve uma inibição enzimática relevante (96%) até a concentração de 250  $\mu\text{g/mL}$ , frente à CatL apresentou inibição significativa até a concentração de 125  $\mu\text{g/mL}$ . Em relação à CatV, EF foi o único extrato que diminuiu a atividade inibitória dessa enzima em 99%, em concentrações maiores (500  $\mu\text{g/mL}$  e 250  $\mu\text{g/mL}$ ) e mesmo diminuindo a concentração testada (125  $\mu\text{g/mL}$ , 50  $\mu\text{g/mL}$  e 25  $\mu\text{g/mL}$ ), esse extrato apresentou uma percentagem de inibição elevada de 98%, em ambas as concentrações.

O EC, em relação às catepsinas testadas, apresentou os percentuais de inibição mais expressivos frente à CatV, apresentando uma inibição acima de 95% em todas as concentrações avaliadas.

Analisando os resultados do ER frente à CatL, quando avaliado em concentrações de 125 µg/mL a 25 µg/mL, apresentou potenciais inibitórios mais elevados em relação aos outros extratos testados, diminuindo a atividade enzimática em 87%, 88% e 84% respectivamente.

No entanto, foi somente frente à CatV, que em ambas as concentrações testadas, os três extratos apresentaram percentuais de inibição elevados, maiores que 90%.

Como EF foi o extrato que apresentou os potenciais de inibição mais elevados, este foi selecionado para avaliação do potencial inibitório de suas frações.

Os percentuais de inibição desempenhados pelas frações hexano (H), acetato de etila (A) e hidroalcoólica (M) oriundas da partição líquido-líquido do extrato das folhas, são mostrados na TABELA 4.15 (p. 94).

TABELA 4.15. Percentuais de inibição enzimática das frações oriundas do EF (concentração em µg/mL)

Frações	CatK		CatL		CatV	
	500	50	500	50	500	50
<b>Amostras</b>	500	50	500	50	500	50
<b>hexano (H)</b>	89	25	90	19	99	91
<b>acetato de etila (A)</b>	97	9	97	71	100	90
<b>hidroalcoólica (M)</b>	82	-	92	-	99	-

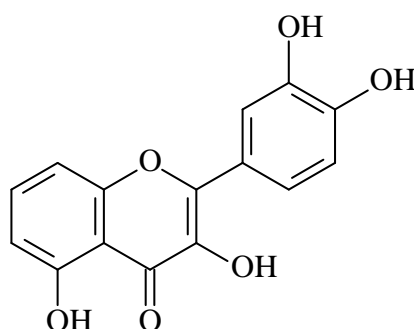
- : amostras não avaliadas

A avaliação das frações H, A e M, na concentração de 500 µg/mL, apresentou potencial inibitório elevado frente à todas as catepsinas, no entanto à medida que se reduziu a concentração das amostras para 50 µg/mL, obteve-se um resultado de inibição acima de 90% para as frações H e A somente frente à CatV. O resultado de 71% de inibição da fração A, em 50µg/mL frente à CatL pode ser considerado como moderado.

Das substâncias isoladas do extrato EF, a substância (6) (FIGURA 4.14, p. 95), teve seu potencial inibitório avaliado frente à CatV, na concentração de 100  $\mu\text{M}$ , apresentando um valor de 94%.

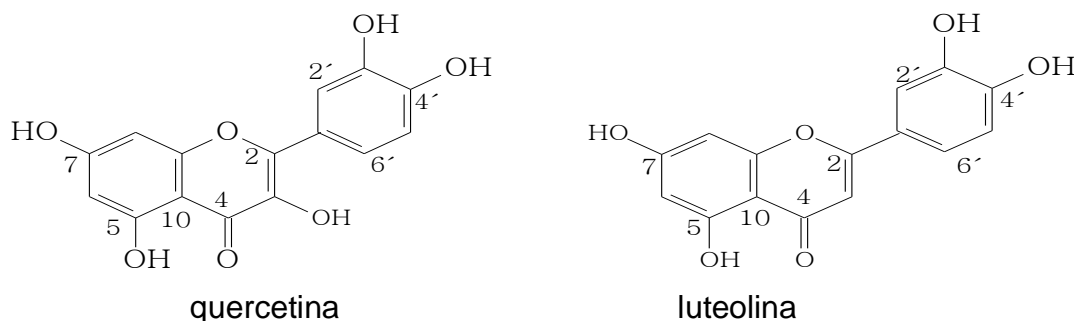
Desta forma, realizou-se a avaliação de  $\text{IC}_{50}$  desta molécula, que é definida como a concentração mínima necessária para reduzir em 50% a atividade enzimática (SEVERINO, 2008), obtendo-se um valor de  $2,2 \pm 0,2 \mu\text{M}$ , que pode ser considerado potente frente à CatV.

FIGURA 4.14. Estrutura química da quercetina (substância 6)



Uma comparação das estruturas químicas e dos potenciais inibitórios da quercetina em relação à luteolina (89% de inibição frente à CatV e  $\text{IC}_{50}$  de 2,5  $\mu\text{M}$ ) (FIGURA 4.15, p.95), isolada de *Vitex polyana* (Verbenaceae), testada em estudos anteriores (SEVERINO, 2008), revela que ambas diferem apenas pela presença de uma hidroxila na posição 3 nesta última, porém apresentam praticamente o mesmo potencial inibitório frente à essa catepsina.

FIGURA 4.15. Estruturas químicas das substâncias quercetina e luteolina



Outro flavonoide [5,4'-dihidroxi-6-(3,3-dimetilalil)-7-metoxiflavona], isolado de *Lonchocarpus subglaucescens* (Leguminosae) também foi testado frente à CatV (SEVERINO, 2008), apresentando  $\text{IC}_{50}$  de 13,5  $\mu\text{M}$ . Esses

resultados sugerem que os flavonoides são uma classe de metabólitos secundários favoráveis para o planejamento de inibidores de cisteíno proteases.

Diante dos resultados dos ensaios enzimáticos, nota-se que a espécie *K. coriacea* e a substância quercetina produzida por esta planta, são promissoras na busca por inibidores específicos da catepsina V. Logo, esses resultados corroboram com as indicações de uso medicinal da população entrevistada, sendo *K. coriacea* indicada para leucemia, artrite, artrose, reumatismo, entre outras enfermidades.

## 5. CONCLUSÕES

O estudo químico do extrato etanólico das folhas de *K. coriacea* levou à identificação estrutural de seis substâncias, sendo: lupeol, lupenona e  $\beta$ -amirina (substâncias **1**, **2** e **3**), os ácidos *cis* e *trans-p*-cumárico (substâncias **4** e **5**) e a quercetina (substância **6**).

Os resultados dos ensaios enzimáticos dos extratos oriundos de *K. coriacea* mostraram que foi somente frente à CatV, em ambas as concentrações testadas, que os extratos das folhas (EF), do caule (EC) e das raízes (ER) apresentaram percentuais de inibição expressivos (maiores que 90%), sendo que EF foi o único que conseguiu reduzir a atividade enzimática dessa enzima em 99%, em todas as concentrações testadas. A substância (**6**) foi avaliada frente à catepsina V (Cat V) e por apresentar um potencial inibitório elevado (94%), foi avaliada a IC<sub>50</sub> da mesma, apresentando um valor de 2,2  $\mu$ M. Esse valor, aliado à outros valores expressivos de IC<sub>50</sub> reportados na literatura para flavonoides, sugere que esta classe é promissora para o desenvolvimento de inibidores de cisteíno- proteases.

Em relação aos ensaios antiulcerogênicos, EF apresentou uma inibição significativa das lesões ulcerativas quando testado nas concentrações de 200 e 300 mg.kg<sup>-1</sup>. Tais resultados são promissores, em particular porque os estudos etnobotânicos realizados nesse trabalho mostraram que a maioria dos entrevistados utiliza essa espécie para o tratamento de gastrite.

A avaliação dos extratos de *K. coriacea* frente aos ensaios antimicrobianos revelou que EF apresentou resultados satisfatório frente à *C.*

*albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, com CIM de 31,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 7,81  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente. Além disso, EF foi ativo em uma CIM de 100  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  para *S. pyogenes* e *P. aeruginosa*; já a fração hexano apresentou um valor de CIM de 25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  frente à *S. pyogenes*, mostrando que essa fração pode inibir a atividade antimicrobiana dessa bactéria.

Em relação ao EC, este se mostrou ativo somente frente à *C. glabrata*, apresentando um valor de CIM satisfatório (15,62  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ); o ER foi o que apresentou os resultados mais promissores em relação aos outros extratos, pois foi ativo frente à *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, apresentando CIM de 31,25  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , 62,5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  e 7,81  $\mu\text{g.mL}^{-1}$ , respectivamente.

Com os ensaios biológicos realizados, foi possível comprovar que os resultados obtidos com o levantamento etnobotânico são significativos, mostrando que a espécie em estudo, possui atividades antimicrobianas, anti-ulcerogênicas, entre outras.

Portanto, relacionando os dados científicos com etnobotânicos, nota-se que *K. coriacea* é uma espécie promissora para a descoberta de substâncias com atividades biológicas relevantes, sugerindo a continuidade de seus estudos químico-biológicos.

## 6 - REFERÊNCIAS

- ALKIMIM, W. O. PROENÇA, C. E. B. & BITTRICH, V. Clusiaceae. In: Cavalcanti, T. B. & Silva, A. P. Flora do Distrito Federal, Brasil. Brasília: Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia. vol. 9, p. 71-96, **2011**.
- ALKIMIN, W. O. Calophyllaceae J. Agardh em Goiás e Tocantins & Hypericaceae Juss. no Distrito Federal, Brasil. Dissertação de Mestrado - (Mestrado em Botânica), Universidade de Brasília, Instituto de Ciências Biológicas, Brasília, **2014**.
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M. & RIBEIRO, J. F. **1998**. Cerrado: espécies vegetais úteis. Planaltina: EMBRAPA-CPAC.
- ALVES T. M. A., SILVA A. F., BRANDÃO M, GRANDI T. S. M., SMÂNIA E. F. , SMÂNIA J. R. A., ZANI CL Biological screening of Brazilian medicinal plants. Mem Inst Oswaldo Cruz 95: 367-373, **2000**.
- ANDRADE, M. S. Estudo Fitoquímico de *Kielmeyera rugosa* Choisy (Clusiaceae). Dissertação de Mestrado – (Mestrado em Química), Universidade Federal de Sergipe, SÃO CRISTOVÃO /SERGIPE, **2007**.
- ANDRIKOPOULOS, N. K.; KALIORA, A. C.; ASSIMOPOULOU, A. N.; PAPAPEORGIU, V. P. Biological activity of some naturally occurring resins, gums and pigments against *in vitro* LDL oxidation. *Phytother. Res.* 17(5), p. 501–507, **2003**.
- ANTONACCIO, L. D.; SILVA, L. G. F. E; CORREA, D. DE B.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHAES, M. T. Chemistry of Brazilian Guttiferae. III. Euxanthonenes from *Kielmeyera excelsa* and *K. corymbosa*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 37(2): 229-230, **1965**.
- 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*, Vol. 7(37), pp.2722-2728, Outubro, **2013**.
- AUDI, E.A.; OTOBONE, F.; MARTINS, J.V.C.; CORTEZ, D.A.G. Preliminary evaluation of *Kielmeyera coriacea* leaves extract on the central nervous system. *Fitoterapia*, v.73, p.517–519, **2002**.
- ARANTES, V. P. Studying of Antimycobactericide Activity of Vegetal Extracts from Brazilian's "Cerrado". Araraquara. Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho" – UNESP, Dissertação de mestrado, **2005**.
- BARBASTEFANO, V., COLA, M., LUIZ-FERREIRA, A., FARIAS-SILVA, E., HIRUMA-LIMA, C.A., RINALDO, D., VILEGAS, W., SOUZA-BRITO, A.R. *Vernonia polyanthes* as a new source of antiulcer drugs. *Fitoterapia* 78(7-8): 545-51, **2007**.

- BASAR, S. Phytochemical investigation on *Boswellia species*; Hamburg, **2005**.  
BECKER, H.S. Métodos de pesquisa em ciências sociais. São Paulo: Ed.HUCTEC. **1993**.
- BECKER, H.S. Métodos de pesquisa em ciências sociais. São Paulo: Ed. HUCTEC. **1993**.
- BITTRICH, V. Clusiaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, **2010**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB006860>>. Acesso em: 09 dezembro 2013.
- BITTRICH, V, **2012**. Calophyllaceae e Hypericaceae in Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 06 dezembro 2014.
- BROCKLEHURST, K., PHILPOTT, M.P. Cysteine proteases: mode of action and role in epidermal differentiation. *Cell Tissue Res.* 351, 237–244, **2013**.
- BROMME, D. & KALETA, J.; “Thiol-Dependent Cathepsins: Pathophysiological Implications and Recent Advances in Inhibitor Design”. *Curr. pharm. des* 8: 99-110, **2002**.
- BRUNTON L. L. Agents for control of gastric acidity and treatment of peptic ulcers, New York, pp. 663-691, **1996**.
- CAMEJO RODRIGUES, J. S. Estudo etnobotânico das plantas aromáticas e medicinais. Curso teórico – prático. *Ameal.* v. 8, n. 57, p. 168- 174. **2007**.
- COELHO, A. A. M., PAULA, J. E., ESPÍNDOLA, L. S. Atividade larvicida de extratos vegetais sobre *Aedes aegypti* (L.) (Diptera: Culicidae), em condições de laboratório. *Bio Assay*, Jaboticabal, v.4, p. 1-6, **2009**.
- COQUEIRO, A. Fracionamento bioguiado para seleção de substâncias antioxidante, antimalárica e antibiótica potenciais nas espécies *Kielmeyera variabilis* (Clusiaceae) e *Brosimum glaziovii* (Moraceae) -Tese de Doutorado (Doutorado em Química Orgânica) - Departamento de Química Orgânica- UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA – UNESP, Araraquara/SP, **2010**.
- CORREA, D. DE B.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHAES, M. T. Chemistry of Brazilian Guttiferae. VII. Constituents of *Kielmeyera corymbosa*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, 38(2): 269-271, **1966**.
- CORREA, M. P. Dicionário das plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas. Rio de Janeiro: IBDF, **1969**.
- CORTEZ, D. A. G., YOUNG, M. C. M., MARSTON, A., WOLFENDER, J. L., HOSTETTMANN, K. Xanthonés, triterpenes and a biphenyl from *Kielmeyera coriacea*. *Phytochemistry*, New York, v. 47, n. 7, p.1367-1374, **1998**.

CORTEZ, D. A. G., YOUNG, M. C. M., MARSTON, A., WOLFENDER, J. L., HOSTETTMANN, K. Xanthonenes, triterpenes and a biphenyl from *Kielmeyera coriacea*. *Phytochemistry*, New York, v. 47, n. 7, p.1367-1374, **1999**.

CORTEZ, D.A.G.; ABREU FILHO, B.A.; NAKAMURA, C.V.; DIAS FILHO, B.P.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Antibacterial Activity of a Biphenyl and Xanthonenes from *Kielmeyera coriacea*. *Pharm. Biol.*, v.40, p.485 – 489, **2002**.

CUNHA, W.R., SILVA, M. L. A.; TURATTI, I. C. C., FERREIRA, D. S. E BETARELLO, L. H.; Avaliação da atividade analgésica de *Miconia ligustróides* (Melastomataceae) utilizando o teste de contorção abdominal em camundongos. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, n.84 (2), **2003**.

CRAGG, G. M. & NEWMAN, D. J. Natural products: a continuing source of novel drug leads. *Biochim. et Biophys. Act.* 1830, 3670–3695, **2013**.

CRUZ, S. Sample methods of monocrystal of organic compounds for X-ray structural studies. *Química Nova*, v.31, n.4, p.906-909, **2008**.

CRUZ, F.G.; MOREIRA, L.M.; DAVID, J.M.; GUEDES, M.L.S.; CHÁVEZ, J.P. Coumarins from *Kielmeyera reticulata*. *Phytochemistry* 47: 1363-1366, **1998**.

CRUZ, F.G.; Da SILVA-NETO, J.T.; GUEDES, M.L.S. Xanthonenes and Coumarins from *Kielmeyera lathrophyton*. *J Braz.Chem.Soc.* 12 (1): 117-122, **2001**.

CRUZ, F.G.; MOREIRA, L. M.; SANTOS, N.A.S.; GUEDES, M.L.S. HAdditional coumarins from *Kielmeyera reticulata*H. *J Braz.Chem.Soc* 13 (5): 704-707, **2002**.

DAS, K., TIWARI, R. K. S., SHRIVASTAVA, D. K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. *Journal of Medicinal Plants Research* Vol. 4(2), pp. 104-111, 18 January, **2010**.

DANTAS, A. M. Avaliação da Toxicidade e atividade antiulcerogênica das folhas de *Spondias purpurea* L. Trabalho de conclusão de curso – (Graduação em farmácia), Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande/PB, **2012**.

D'ACAMPORA JA, LIMA D.A.N., SOUSA M.V., AQUINO A.C., RUSSI R.F, VIEIRA J, LOPES A. Perfil epidemiológico dos pacientes portadores de úlcera péptica perfurada atendidos no centro cirúrgico do Hospital Florianópolis. *Rev. Med Res*, 10(4):141-146, **2008**.

DE-FARIA, F.M., ALMEIDA, A.C., LUIZ-FERREIRA, A., TAKAYAMA, C., DUNDER, R.J., DA SILVA, M.A., SALVADOR, M.J., ABDELNUR, P.V., EBERLIN, M.N., VILEGAS, W., TOMA, W., SOUZA-BRITO, A.R. Antioxidant action of mangrove polyphenols against gastric damage induced by absolute ethanol and ischemia-reperfusion in therat. *Scientific World Journal*, **2012**

- DEWICK, P. M. Medicinal Natural Products: A Biosynthetic Approach. 2nd Ed. England: John Wiley & Sons LTD, 507p, **2002**.
- DIAS, D. A., URBAN, S. & ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. *Metabolites* 2, 303–333, **2012**
- DONATINI, R.S.; ISHIKAWA, T.; BARROS, S. B.M.; BACCHI, E. M. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato das folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). *Ver. Bras. Farm.*, v.19, n.1<sup>a</sup>, p.89-94, **2009**.
- DUARTE, A. P., CORRÊA, D. de B., SILVA, L. G. F., GONÇALVES, S. J., GOTTLIEB, O. R. Constituintes do *Kielmeyera rupestris*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*, v. 40: 307-311, **1968**.
- DUONG, L.T. Therapeutic inhibition of cathepsin K-reduction of bone resorption while maintaining bone formation. *BoneKEy*;67:3–8, **2012**.
- DUONG, L.T., ZHUO, Y., GAUTHIER, J. Y., BLACK, W.C., PERCIVAL, M.D. Inhibition of bone resorption by the cathepsin K inhibitor odanacatib is fully reversible. *Bone* 67, 269–280, **2014**.
- ESTEVINHO, L.; PEREIRA, A. P.; MOREIRA, L.; DIAS, L. G.; PEREIRA, E. Antioxidant and antimicrobial effects of phenolic compounds extracts of Northeast Portugal honey. *Food and Chem. Toxic.*, 46, 3774–3779, **2008**.
- FEITOSA, I. S. Etnobotânica e extrativismo de *Stryphnodendron coriaceum* Benth. na Floresta Nacional do Araripe, nordeste do Brasil. Dissertação de Mestrado em Botânica. UFRP. Recife, 83 fls. **2012**.
- FERRAZ, S.; FREITAS, L. O controle fitonematóides por plantas antagonistas e produtos naturais; Universidade Federal de Viçosa, Disponível em <<http://www.ufv.br/dfp/lab/nematologia/antagonistas.pdf>> acesso em 23 fevereiro **2007**.
- FERREIRA A. L. Atividade antiulcerogênica da espécie *Anacardium humile* St. Hil. (Anacardiaceae) – Dissertação de Mestrado – (Mestrado em Farmacologia), Universidade Estadual de Campinas-SP, **2005**.
- FERNÁNDEZ, M. A.; HERAS, B.; GARCIA, M. D.; SÁENZ, M. T.; VILLAR, A. New insights into the mechanism of action of the anti-inflammatory triterpene lupeol. *J. Pharm. Pharmacol.* 53(11), p.1533–1539, **2001**.
- FORZZA RC, LEITMAN PM, COSTA A, CARVALHO AA JR, PEIXOTO AL, WALTER BMT, BICUDO C, ZAPPI D, COSTA DP, LLERAS E, MARTINELLI G, LIMA HC, PRADO J, STEHMANN JR, BAUMGRATZJFA, PIRANI JR, SYLVESTRE LS, MAIA LC, LOHMANN LG, PAGANUCCI L, SILVEIRA M, NADRUZ M, MAMEDE MCH, BASTOS MNC, MORIM MP, BARBOSA MR, MENEZES M, HOPKINS M, SECCO R, CAVALCANTI T, SOUZA V. C.

Catálogo de plantas e fungos do Brasil. Instituto de Pesquisas do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, **2010**.

FLORESCER. Plataforma Florescer: Flora da Região Centro-Oeste e Cerrado. Disponível em: <<http://www.florescer.unb.br>>. Acesso em: 13 novembro **2013**.

GAUTHIER J. Y., CHAURET N., CROMLISH W., DESMARAIS S., DUONG L.T., FALGUEYRET J. P. The discovery of odanacatib (MK-0822), a selective inhibitor of cathepsin K. *Bioorg Med Chem Lett*; 18:923–8, **2008**.

GEIGER, A. M., B. FOXMAN, AND J. D. SOBEL. Chronic vulvovaginal candidiasis: characteristics of women with *Candida albicans*, *Candida glabrata*, and no *Candida*. *Genitourin. Med.* **71**:304–307, **1995**.

GIBBONS, S. Phytochemicals for bacterial resistance – Strengths, weaknesses and opportunities. *Plant Med.* 74(6): 594-602, **2008**.

GIESE, S. O., Estudo da Composição Química dos Óleos Florais de *Byrsonima brachybotrya* (Malpighiaceae). Curitiba: Pós graduação em Química da Universidade Federal do Paraná. Dissertação de Mestrado, **2005**.

GIULIETTI, A. M.; HARLEY, R. M.; QUEIROZ, L. P.; WANDERLEY, M. G. L.; BERG, C. V. D. Biodiversidade e conservação das plantas no Brasil. *Mega diversidade*, 1, 1, 52-61, **2005**.

GORENFLO, L. J.; ROMAINE, S.; MITTERMEIER, R. A.; WALKER-PAINEMILLA, K., Co-occurrence of linguistic and biological diversity in biodiversity hotspots and high biodiversity wilderness areas. *Proce. of the Nat Acad of Sci.*, 109: 8032, **2012**.

GOULART, Y. C. F., SELA, V. R., OBICI, S., MARTINS, J. V. C., OTOBONE, F., CORTEZ, D. A., AUDI, E. A. Evaluation of gastric anti-ulcer activity in a hydroethanolic extract from *Kielmeyera coriacea*. *Braz. Arch. of Biol. and Tech.*, Curitiba, v. 48, n. 1, p. 211-216, **2005**.

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

GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T.; STEFANI, G. M. The chemistry of brazilian guttiferiae-VI : 1,2,8-trioxygenated xanthenes from *Kielmeyera petiolaris*. *Tetrahedron*, 22 (6): 1785-1788, **1966**.

GOTTLEIB, O. R.; MESQUITA, A. A. LINS; MARTINS DA SILVA, E.; TEIXEIRA DE MELO, M. Chemistry of Brazilian Guttiferae. XVII. Xanthenes of *Kielmeyera ferruginea*. *Phytochemistry*, 8(3): 665-666, **1969**.

GOTTLIEB, O. R.; STEFANI, G. M. Chemistry of Brazilian Guttiferae. XIX. Xanthones from *Kielmeyera excelsa*. *Phytochemistry*, 9 (2): 453-454, **1970**.

GOTTLIEB, O.R.; LINSMESQ. A.A.; NAGEM T.J. H Chemistry of brazilian guttiferæ .27. Xanthones from *kielmeyera rubriflora* H. *Phytochemistry*, 10 (9): 2253-2255, **1971**.

GRAMACHO, R.S.; NAGEM, T.J.; OLIVEIRA, T.T.; QUEIROZ, M.W.L.R.; NEVES, A.A.; SADDI, N. PHENYLCOUMARINS FROM *KIELMEYERA ELATA*. *PHYTOCHEMISTRY*, 51: 579-581, **1999**.

HARVEY, A. L., EDRAR-EBEL, R. A., QUINN R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. *Nat. Ver. Drug Disc.*, Janeiro, **2015**.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. *Drug Disc. Tod.* 13, 894–901, **2008**.

HELSKE S, SYVÄRANTA S, LINDSTEDT KA, LAPPALAINEN J, OÖRNI K, MÄYRÄNPÄÄ MI. Increased expression of elastolytic cathepsins S, K, and V and their inhibitor cystatin C in stenotic aortic valves. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* ;26:1791 e 8, **2006**.

HIRUMA\_LIMA, C. A., CALVO, T. R., RODRIGUÊS, C. M., ANDRADE, F. D. P., VILEGAS, W., SOUZA BRITO, A.R.M. Antiulcerogenic activity of *Alchornea castaneaefolia*: Effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. *J. of Ethnop.*, v.104, p. 215-224, **2006**.

HÖFLING, J. F., SPOLIDÓRIO D. M. P., PEREIRA, C. V., ROSA, E. A. R., MOREIRA, D. Presença de *Streptococcus mutans* e *Streptococcus mutans* associado a *Streptococcus sobrinus* em escolares de diferentes classes sócio-econômicas e sua relação com a atividade cariogênica dessas populações, vol.13 n.2 São Paulo , Revista de Odontologia da Universidade de São PauloAbril/Junho, **1999**.

IBGE. Mapa de vegetação do Brasil. Rio de Janeiro: IBGE, 2011. Disponível em: < <http://www.ibge.gov.br>> Acesso em: 05 jun. **2011**.

IBAMA, **2014**. Disponível em [www.wwf.org.br](http://www.wwf.org.br) > Notícias >. Acesso em 12/02/2015.

IBGE, **2014**. Disponível em: <http://www.cidades.ibge.gov.br/xtras/perfil.php?lang=&codun=520850>. Acesso em março de 2015

IKEDA, Y. IKATA, T., MISHIRO, T., NAKANO, S., IKEBE, M., YASUOKA, S. Cathepsins B and L in synovial fluids from patients with rheumatoid arthritis and the effect of cathepsin B on the activation of pro-urokinase, *J. Med. Invest.* 47,61–75, **2000**.

INSTITUTO NACIONAL DE METEOROLOGIA, **2013**. Normas climatográficas do Brasil 1961–1990. Precipitação acumulada mensal e anual (mm). Disponível em: <http://www.inmet.gov.br/portal/index.php?r=clima/normaisClimatologicas>. Acesso em 08 novembro, **2013**.

JOLY, A.B. Botânica: Introdução à taxonomia vegetal. Editora Nacional, São Paulo, p.319-337, **1983**.

KAMYSZ, W.; NADOLSKI, P. Antibacterial activity of peptides from amphibians skin. *Annales Academiae Medicae Gedanensis*, v. 35, p. 29-34, **2005**.

KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E.JR. Free radical scavenging and antioxidant activity of plants flavonoids. *Adv. Exp. Med. Biol.*, New York, v. 366, p. 351-376, **1994**.

KAPLAN, M. A. C.; FIGUEIREDO, M. R.; GOTTLIEB, O. R. Chemical diversity of plants from Brazilian Cerrados. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 66 (Supl. 1 - parte I): 50-55, **1994**.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do Cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, vol.1, n. 1, julho, **2005**, p. 147-155. Disponível em: <[http://www.conservacao.org/publicacoes/files/20\\_Klink\\_Machado.pdf](http://www.conservacao.org/publicacoes/files/20_Klink_Machado.pdf)>. Acesso em 02 dezembro, 2014.

KORT, R.; VONK, H.; XU, X.; HOFF, W. D.; CRIELAARD, W.; HELLINGWERF, K. J. Evidence for *trans-cis* isomerization of the *p*-coumaric acid chromophore as the photochemical basis of the photocycle of photoactive yellow protein. *FEBS Letters*, 382, 73-78, **1996**.

LALMANACH, G., SAIDI, A., MARCHAND-ADAM, S., LECAILLE, F., KASABOVA, M. Cysteine cathepsins and cystatins: from ancillary tasks to prominent status in lung diseases. *Biol. Chem.*, 396(2): 111–130, **2015**.

LEHNINGER, A. Princípios de Bioquímica. 5. ed. São Paulo: Sarvier. COOPER, Geoffrey M. A célula - Uma abordagem molecular. 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2007, **2011**.

ŁĘGOWSKA, M., WYSOCKA, M., BURSTER, T., PIKUŁA, M., ROLKA, K., & LESNER, A. Ultrasensitive internally quenched substrates of human cathepsin L. *Analytical Biochemistry*, 466, 30–7, **2014**.

LIU, J.; SUKHOVA, G. K.; SUN, J. S.; XU, W. H.; LIBBY, P.; SHI, G. P. ARTERIOSCLER. THROMB. VASC. BIOL. 24, 1359, **2004**.

LOPES, J. L. C.; LOPES, J. N. C.; GILBERT, B.; BONINI, S. E. Osajaxanthone from *Kielmeyera coriacea*. *Phytochemistry*, 16 (7): 1101, **1977**.

LÓPEZ, S.; BASTIDA, J.; VILADOMAT, F.; CODINA, C. Acetylcholinesterase inhibitory activity of some Amaryllidaceae alkaloids and Narcissus extracts. *Life sci* 71: 2521–2529, **2002**.

LOPES, J. Triterpenoides com atividade anti-cancerígena, Cadeira de documentação e informação, Química aplicada, Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, **2007**.

LUZ, S.M., SOUZA FILHO, A.P.S., GUILLOHN, G.M.S.P. e VILHENA, K.S.S., Atividade alelopática de substâncias químicas isoladas da acacia mangium e suas variações em função do ph 1, v. 28, n. 3, p. 479-487, **2010**.

MARTINS, J. V. C., OTOBONE, F. J., SELA, V. R., OBICI, S., TROMBELLI, M. A., CORTEZ, D. A. G., AUDI, E. A. Activity of hydroethanolic extract from *Kielmeyera coriacea* stems on central nervous system in rats. *Act. Sci. Heal. Scienc.*, Maringá, v. 26, n. 2, p. 365-368, **2004**.

MARTINS, C. M. Estudo Químico Atividade Antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie *Kielmeyera coriácea* Mart. & Zucc (Pau-Santo) do Cerrado. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Química da Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia/MG, **2012**.

MENDEZ-NATERA, J. R.; GRNTON, R.J.S.; DAUTANT, M. A.; GUERRA, N. A.; LAYNEZ, J. Efeito del médio de enraizamento, número de hojas por estaca y lesionado de lãs estacas de *Ixora enana* (*Ixora coccuneae* L.) com Hormojardin Nro 4. *Revista UDO agrícola*, vol. 4, n. 1, pp.31-35, **2004**.

MESQUITA, M. L., ARAÚJO, R. M., BEZERRA, D. P., FILHO, R. B., PAULA, J. E., SILVEIRA, E. R., PESSOA, C., MORAES, M. O., LOTUFO, L. V. C., ESPINDOLA, L. S. Cytotoxicity of  $\delta$ -tocotrienols from *Kielmeyera coriacea* against câncer cell lines. *Biog. & Medic. Chem. Oxford*, v. 19, p. 623-630, **2011**.

MEYERS, N. "Threatened biotas: 'hotspots' in tropical forests". *Environmentalist*, 8, 187, **1988**.

MIYAMOTO, K., IWADATE, M., YANIGASAWA, Y., ITO, E., IMAI, J., YAMAMOTO, N. SAWADA, M. SAITO, S. SUZUKI, J. NAKAMURA, S. OHKI, Z. SAZE, M. KOGURE, M. GOTOH, K. OMIKRONBARA, H. OHIRA, K. TASAKI, M. ABE, N. GOSHIMA, S. WATANABE, S. W., Cathepsin L is highly expressed in gastrointestinal stromal tumors, *Int. J. Oncol.* 39, 1109–1115, **2011**.

MOREIRA, F. P. M., COUTINHO, V. MONTANHER, A. B. P., CARO, M. S. B., BRIGHENTE, I. M. C., PIZZOLATTI, M. G.; Flavonóides e triterpenos de *Baccharis pseudotenuifolia* – Bioatividade sobre *Artemia salina*. *Química Nova*, v.26, n.3, **2003**.

NAIDU, P.V.S.; KINTHADA, P.M.M.S.; KALYANI, P.; MURALIDHAR, P. "Characterization and biological activities of quercetin thiosemicarbazone derivatives: potential anti cancer drugs". *Int J Pharm Biomed Sci.*, 3: 25, **2012**.

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

NIJVELDT, R.J. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. *Am. J. Clin. Nutr.*, Bethesda, v. 74, p. 418-425, **2001**.

NOLDIN, V.F.; ISAIAS, B.; FILHO, V.C. Gênero *Calophyllum*: Importância Química e Farmacológica. *Química nova*, 29 (3): 549-554, **2006**.

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

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.; CORTEZ, D.A.G.; VIDOTTI, G.J.; YOUNG, M.C.M; FERREIRA, A. G. Phytochemical study and evaluation of the molluscicidal activity of *Kielmeyera variabilis* Mart. (Clusiaceae). *Química Nova*, 26 (2): 157-160, **2003**.

PINTO, M.M. DE M.; MESQUITA, A.A.L.; GOTTLIEB, O.R. The chemistry of Brazilian Guttiferae. Part 4. Xanthonolignoids from *Kielmeyera coriacea*. *Phytochemistry*, 26 (7): 2045-2048, **1987**.

PINTO, J. E. B. P., ARELLO, E. F., PINTO, C. A. B. P., BARBOSA, M. H. P. Uso de diferentes explantes e concentrações de benzilaminopurina na multiplicação *in vitro* de brotos de *Kielmeyera coriacea*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira*. Brasília. v. 9, n. 6, p. 867-873, junho **1994**.

RAJIC, A.; KWEIFIO-OKAI, G.; MACRIDES, T.; SANDEMAN, R. M.; CHANDLER, D. S.; POLYA, G. M.; *Planta Med.*, 66, 206, **2000**.

RANDAZZO CL, RESTUCCIA C, ROMANO AD, CAGGIA C. "Lactobacillus casei, dominant species in naturally fermented Sicilian green olives". *Int. J. Food Microbiol.* **90** (1): 9–14, **2004**.

RAWLINGS, N.D., BARRETT, A.J., AND BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. *Nucleic Acids Res.* **40**, D343–350, **2012**.

REDE DE SEMENTES DO CERRADO. *Kielmeyera coriacea* (Spreng.) Mart. **1995**. Disponível em:

<[http://www.rededesementesdocerrado.com.br/Especies/Guttiferae\\_3320/Kielmeyera/coriacea\\_2439/index.html](http://www.rededesementesdocerrado.com.br/Especies/Guttiferae_3320/Kielmeyera/coriacea_2439/index.html)>. Acesso em: 17 novembro 2013.

REVISTAS AGARANA, 2011. <<http://revistasagarana.com.br/vastos-gerais-brasileiros>>. Acesso em 27/11/2014

RIOS JL, RECIO MC. Medicinal plants and antimicrobial activity. *J Ethnopharm.* 100(1-2):80-84, **2005**.

ROBICHAUD, J.; OBALLA, R.; PRASIT, P.; FALGUEYRET, J.; PERCIVAL, M.D.; WESOLOWSKI, G.; RODAN, S.B.; KIMMEL, D.; JOHNSON, C.; BRYANT, C.; VENKATRAMAN, S.; SETTI, E.; MENDOCA, R.; PALMER, J.; "A novel class of nonpeptidic biaryl inhibitors of human cathepsin K". *J. Med. Chem.*, **46**: 3709-3727, **2003**.

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**.

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

RUHFEL, B. R. Systematics and biogeography of the clusioid clade (Malpighiales). Tese de Ph.D. Cambridge, Mass.: Harvard University. p. 233, **2011**.

SANTANA, A. L. B. D. Estudo químico, antitérmico e antifúngico da madeira de lei *Anadenanthera colubrina* Brenan var. Cebil (Griseb.) Von Reis Alt. (Angico-de-carço) Tese (Doutorado), (Doutorado em Química Orgânica) Universidade Federal de Pernambuco, Recife/PE, **2011**.

SADDI, N. A taxonomic revision of the genus *Kielmeyera* Mart. (Guttiferae). PhD thesis, University of Reading, **1982**.

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* vol. 42, no. 4, pp. 321-324, **2007**.

SEVERINO, R. P. Busca de Produtos Naturais como Inibidores Específicos de Enzimas, Tese (Doutorado), (Doutorado em Química Orgânica) Universidade Federal de São Carlos, São Paulo/ SP, **2008**.

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**.

SILVA, C. A. M. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Pouteria gardnerii* (Mart. & Miq) Baehin (Sapotaceae) Tese (Doutorado), (Doutorado em Química Orgânica) Universidade de Brasília, Brasília/DF, **2007**

SILVEIRA, C. V. Caracterização e quantificação dos compostos polifenólicos e triterpênicos em extratos obtidos a partir das folhas, cascas, frutos e talos de *Caraipa densifolia* Mart. Tese de Doutorado (Doutorado em Química Orgânica) Departamento de Química Orgânica e Inorgânica – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza/CE, **2010**.

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, 19(3): 686-689, **2008**.

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. 3. ed. São Paulo: Instituto Plantarum. p. 406-407, 414, **2012**.

SOUZA FILHO, A. P. S.; PEREIRA, A. A. G.; BAYAMA, J. C. Aleloquímico produzido pela gramínea forrageira *Brachiaria humidicola*. *Planta Daninha*, 23 (1), 25-32, **2005**.

SCIO, E.; RIBEIRO, A.; ALVES, T.M.A.; ROMANHA, A.J.; SHIN, Y.G.; CORDELL, G.A.; ZANI, C.L. New bioactive coumarins from *Kielmeyera albopunctata*. *J. Nat. Prod*, 66: 634-637, **2003**.

STEVENS, P. F. Angiosperm Phylogeny Website. Versão 11, maio **2011**. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em: 07 dez. 2015.

STEVENS, P.F., Calophyllaceae. Angiosperm Phylogeny Website. Versão 12, julho **2012**. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/APweb/>>. Acesso em: 06 dez. 2014

S'WISŁOCKA, R.; REGULSKA, E.; SAMSONOWICZ, M.; LEWANDOWSKI, W. Experimental and theoretical study on benzoic acid derivatives. *J. of Molec. Struct.*, 1044, 181–187, **2013**

SZABO, S. & BROWN, A. Prevention of ethanol-induced vascular injury and gastric mucosa lesions by sucralfate and its components: possible role of endogenous sulphhydryls. *Proceeding of the society for Experimental Biology and Medicine* 4, 493-497, **1987**.

THIOLLENT, M., Metodologia da pesquisa- ação. São Paulo: Cortez, **1994**.

TIMBLINDIM, 2012. <<http://timblindim.wordpress.com/arvores/pau-santo>>. Acesso em 16/12/2014.

TURK, D. & GUNCAR, G.; “Lysosomal cysteine protease (cathepsinas): promising drug targets”. *Acta Cryst.*, (D59), 203-213, **2003**.

VILLEGAS, J. H. Y.; LANÇAS, F. M.; BILEGAS, W. POZETTI, G. L. Further triterpenes, steroids and furanocoumarins from brazilian medicinal plants of *Dorstenia* genus (Moraceae). *Journal of the Brazilian Chemical Society*, Vol. 8, n. 5, pp., 529 -538, **1997**.

YASUDA Y, LI Z, GREENBAUM D, BOGYO M, WEBER E, BRÖMME D, Cathepsin V. a novel and potent elastolytic activity expressed in activated macrophages. *J. Biol Chem* ,279:36761e70, **2004**.

WALLACE, J.L., MA, L. Inflammatory mediators in gastrointestinal defense e injury. *Exp. Biol. Med.* 226: 1003-1115, **2001**.

WATANABE, K. Effective use of heterologous hosts for characterization of biosynthetic enzymes allows production of natural products and promotes new natural product discovery. *Chemic. and Pharmac. Bulletin*, 62(December) 1153–1165, **2014**.

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. *J. of Ethnop.*, Lausanne, v. 105, p. 47–54, **2006**.

ZASLOFF, M. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* , Vol 415, January, **2002**.

ZHANG, W., WANG, S., WANG, Q., YANG, Z., PAN, Z., LI, L. Overexpression of cysteine cathepsin L is a marker of invasion and metastasis in ovarian cancer, *Oncol. Rep.* 31,1334–1342, **2014**.

## 7 – ANEXOS

### 7.1 - Anexo 1



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



Goiânia, 02/04/2012

#### PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA, PROTOCOLADO NESTE COMITÊ SOB O Nº: 033/12

##### I – Identificação

- Título do projeto:  
Conhecimentos etnobotânicos nos municípios de Catalão e Goiandira, Goiás
- pesquisador responsável: Núbia Alves Mariano Teixeira Pires
- Orientador (quando necessário): não há
- Pesquisadores participantes: Fabiana Pires Carneiro e Ginaldo Inácio Carvalho Júnior
- Instituição onde será realizado o estudo:  
Universidade Federal de Goiás/ Departamento de Ciências Biológicas- Campus Catalão
- Data de apresentação ao CEP/UFV: 02/03/2012
- Área Temática: GRUPO III

Comentários do relator frente à Resolução CNS 196/96 e complementares em particular sobre:

##### II – Estrutura do Protocolo (verificação dos documentos solicitados)

CD; Folha de Rosto CEP/UFV; Termos de Compromisso dos pesquisadores participantes; termo de Consentimento Livre e Esclarecido; Termo de Anuência do Campus de Catalão; Folha de rosto CONEP; Projeto de Pesquisa; Roteiro de entrevista estruturada; Termo de Anuência do Curso de Ciências Biológicas da UFV-Catalão.

##### III – Projeto de pesquisa

- Descrição sucinta das justificativas e objetivos do projeto;

###### Objetivo geral

Realizar o levantamento etnobotânico nas comunidades rurais do "Riacho" no município de Catalão (GO), "Lajeado" e "Povoado Veríssimo" no município de Goiandira (GO), bem como inventariar e conhecer a etnobotânica das espécies vegetais existentes nos quintais residenciais no município de Goiandira (GO).

###### Objetivos específicos

- Conhecer quais plantas são utilizadas pela população e para quais fins.
- Compreender como o conhecimento a ser registrado foi adquirido e transmitido.
- Comparar o conhecimento popular com literaturas científicas etnobotânicas.
- Realizar levantamento florístico para identificação das espécies existentes nos quintais residenciais.

- Análise das questões éticas (informações relativas aos sujeitos da pesquisa - item 3.5.1 do Protocolo)

- Descrição clara do desenho e metodologias do projeto (análise da metodologia e sua adequação aos objetivos da pesquisa (item 3.5 do Protocolo);

A coleta de dados etnobotânicos será realizada por meio da aplicação de entrevistas estruturadas, nas áreas rurais, com 15 moradores da comunidade "Riacho" no município de Catalão (GO), 15 moradores da comunidade "Lajeado" e 15 do "Povoado Veríssimo". Na área urbana será aplicada uma entrevista a cada residência visitada, ressaltando que será realizado o inventário total do município de Goiandira (GO), contando com cerca de mil residências urbanas, segundo a Prefeitura Municipal de Goiandira.

O levantamento etnobotânico e florístico nos quintais residenciais tem o intuito de conhecer as plantas cultivadas pelos moradores da cidade. O levantamento florístico será baseado na coleta de materiais botânicos – partes reprodutivas, para posterior processamento e

Prédio da Reitoria - Térreo - Campus II - CEP-74001-970 - Goiânia-GO - Fones: 0 XX62 3521-1076 - Fax:3521-1163  
Homepage: [www.prppg.ufv.br](http://www.prppg.ufv.br) - E\_mail: [prppg@prppg.ufv.br](mailto:prppg@prppg.ufv.br)

K2 035



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

identificação no laboratório de Microscopia Óptica, na Universidade Federal de Goiás, Campus Catalão, onde serão confeccionadas as exsicatas e encaminhadas ao acervo do *Herbarium Uberlandense* (HUFU), da Universidade Federal de Uberlândia.

- Referência sucinta aos critérios de participação (recrutamento, critérios de inclusão/exclusão, interrupção da pesquisa);

**Recrutamento:**

O estudo compreenderá 15 entrevistados residentes em cada área do estudo, totalizando 45 indivíduos, previamente selecionados, pelo critério de possuir conhecimento acerca da vegetação do Cerrado.

Na área urbana do município de Goiandira (GO) será aplicada uma entrevista a cada residência, e será necessária a permissão para a visita nos quintais residências, bem como a coleta de amostras das plantas.

**Inclusão:**

Indivíduos com conhecimento acerca da vegetação do cerrado moradores do município de Goiandira.

- Identificação dos riscos e possíveis benefícios aos sujeitos

**Benefícios para os Sujeitos:** Benefícios no que diz respeito ao conhecimento sobre as plantas do Cerrado.

**Riscos para os Sujeitos:** Não há riscos com a participação no Projeto. As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e sigilosas a respeito participação dos sujeitos. Os dados serão divulgados de forma que serão asseguradas suas identidades e a qualquer momento eles poderão receber informações a respeito do projeto, se quiserem.

- Adequação das condições para realização da pesquisa (local e infra-estrutura; orçamento; anuência dos responsáveis pela instituição onde serão coletados os dados, *curriculum vitae* do pesquisador responsável e dos pesquisadores participantes)  
Segundo o projeto, o local e a infra-estrutura estão adequados, o orçamento é compatível, o *curriculum vitae* do pesquisador foi apresentado.

**IV – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

- Avaliação do processo de obtenção do Termo de Consentimento Adequado

- Análise do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (adequação da linguagem e observância dos aspectos solicitados no item 4 do Protocolo)

Responde aos requisitos.

- Verificação das garantias de privacidade e confidencialidade

Estabelecidas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, que estabelece sigilo sobre os entrevistados.

**V – Parecer do CEP**

- Protocolo "Aprovado"

**VI – Data da reunião: 02/04/2012**

Assinatura do(a) relator(a): *Marília Intran de Mello*

Assinatura do(a) Coordenador(a) CEP/UFPG:

*João Batista de Souza*  
Prof. João Batista de Souza  
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/UFPG

Prédio da Reitoria - Térreo - Campus II - CEP-74001-970 - Goiânia-GO - Fones: 0 XX62 3521-1076 - Fax:3521-1163  
Homepage: [www.prppg.ufg.br](http://www.prppg.ufg.br) - E\_mail: [prppg@prppg.ufg.br](mailto:prppg@prppg.ufg.br)

2/2 2012

## 7.2 – Anexo 2



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

I

### *TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO*

Você está sendo convidado(a) para participar, como voluntário(a), de uma pesquisa, intitulada **Conhecimentos etnobotânicos nos municípios de Catalão e Goiandira, Goiás**. Meu nome é **Núbia Alves Mariano Teixeira Pires**, sou a pesquisadora responsável e minha área de atuação é em Biologia – Ecologia e Botânica. Após receber os esclarecimentos e as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será penalizado(a) de forma alguma.

Em caso de dúvida **sobre a pesquisa**, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável, Núbia Alves Mariano Teixeira Pires, nos telefones: (64) 34415350 e (64) 81315537. Em casos de dúvidas **sobre os seus direitos** como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Goiás, nos telefones: 3521-1075 ou 3521-1076.

### **INFORMAÇÕES IMPORTANTES SOBRE A PESQUISA**

A sua participação começará a partir da aplicação de um roteiro de entrevista que será utilizado apenas como um parâmetro para saber sobre o conhecimento que a população de Catalão e Goiandira, Goiás tem acerca das plantas do Cerrado. A qualquer momento, você poderá desistir de participar e retirar o seu consentimento.

Os objetivos do trabalho são: conhecer as utilidades da vegetação das áreas rurais denominada “Riacho”, no município de Catalão (GO), “Lajeado” e “Povoado Veríssimo”, no município de Goiandira (GO), e área urbana do município de Goiandira (GO) para verificar se há o aproveitamento dessas espécies de alguma forma, seja ela para madeira, alimentação, medicinal, artesanato entre outros usos.

O estudo compreenderá 25 entrevistados residentes em cada área do estudo, totalizando 75 indivíduos, previamente selecionados, pelo critério de possuir conhecimento acerca da vegetação do Cerrado

Prédio da Reitoria - Térreo - Campus II - CEP-74001-970 - Goiânia-GO - Fones: 0XX62 3521-1076 - Fax:3521-1163

Homepage: [www.prppg.ufg.br](http://www.prppg.ufg.br) - E\_mail: [prppg@prppg.ufg.br](mailto:prppg@prppg.ufg.br)



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

I

Na área urbana do município de Goiandira (GO) será aplicada uma entrevista a cada residência escolhida, e será necessária a permissão para a visita nos quintais residências, bem como a coleta de amostras das plantas.

Portanto, não há riscos com a sua participação no Projeto. E sim, benefícios no que diz respeito ao conhecimento sobre as plantas do Cerrado. As informações obtidas através desta pesquisa serão confidenciais e sigilosas a respeito de sua participação. Os dados serão divulgados de forma que serão asseguradas suas identidades e a qualquer momento você pode receber informações a respeito do projeto.

Nome e Assinatura do pesquisador

\_\_\_\_\_  
Núbia Alves Mariano Teixeira Pires

#### CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu, \_\_\_\_\_, RG/ CPF/ n.º de prontuário/ n.º de matrícula \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar \_\_\_\_\_ do \_\_\_\_\_ estudo \_\_\_\_\_, como sujeito.

Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo pesquisador(a) \_\_\_\_\_ sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade (ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento, se for o caso).

Local e data: \_\_\_\_\_

Nome e Assinatura do sujeito: \_\_\_\_\_

### 7.3 – Anexo 3



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



Goiânia, 10 de fevereiro de 2014.

## PARECER CONSUBSTANCIADO REFERENTE AO PROJETO DE PESQUISA DO PROTOCOLO N. 001/14

**I - Finalidade do projeto:** Pesquisa

**II - Identificação:**

- Título do projeto:** Efeito de Plantas Medicinais Presentes no Cerrado de Goiás Sobre a Doença Ulcerosa Péptica e Inflamatória Intestinal
- Pesquisador Responsável/ Unidade:** Anderson Luiz Ferreira - *Campus Catalão* – Universidade Federal de Goiás
- Pesquisadores Participantes:**

Prof. Dr. Hélder Nagai Consolaro	UFG	Ciências Biológicas
Prof. Dr. Karla Graziella Moreira	UFG	Ciências Biológicas
Profa. Dra. Lúcia de Paula	UFG	Ciências Biológicas
Profa. Dra. Vanessa Gisele Pasqualotto Severino	UFG	Bacharel em Química
- Unidade onde será realizado:** *Campus Catalão* – Universidade Federal de Goiás
- Data de apresentação a CEUA:** 13/01/14

**III - Objetivos e justificativa do projeto:**

**Objetivos:** Encontrar novas substâncias farmacologicamente ativas com potencial terapêutico para o combate e/ou prevenção das úlceras gástricas e da colite experimental.

**Justificativa:** As doenças inflamatórias intestinais (DII) são desordens inflamatórias intestinais idiopáticas que compreendem a doença de Crohn e a retocolite ulcerativa. Uma das fontes de substâncias para uso terapêutico tanto das úlceras quanto das DII são os produtos naturais, originados de plantas, animais, microrganismos ou minerais. Plantas são a base da medicina popular e utilizadas para o tratamento das mais diversas enfermidades. Este estudo pode colaborar com a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos visando o aproveitamento do potencial terapêutico da flora e fauna nacionais, e enfatizando a certificação de suas propriedades medicamentosas.

**IV - Sumário do projeto:**

- Discussão sobre a possibilidade de métodos alternativos e necessidade do número de animais:**  
**Método alternativo:** Os modelos experimentais com animais têm desempenhado um papel importante na pesquisa que visa compreender a patofisiologia de várias doenças, incluindo a doença inflamatória intestinal (DII) e a úlcera péptica.

*Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA*  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.  
Email: ceua.ufg@gmail.com



Na úlcera péptica eles ajudaram a definir mecanismos básicos de defesa e reparação da mucosa gástrica. Adicionalmente, a base para o entendimento da lesão gástrica após a administração do DAINE foi facilitada pela utilização de modelos animais que podem ser correlacionados com a doença em seres humanos (Lee et al., 2000).

Os modelos animais de DII têm sido muitas vezes utilizado para identificar alvos terapêuticos, para testar fisiopatologia da DII e verificar a toxicidade de possíveis candidatos a fármacos (Valatas et al., 2013). Existem semelhanças fisiológicas dos modelos experimentais de DII durante as fases ativas de inflamação intestinal. Além disso, o modelo animal de colite oferece a possibilidade de acompanhar de perto o desenvolvimento da doença nos diferentes estágios da doença (Bamias et al., 2005). Neste contexto, não há dúvidas de que os modelos animais representam ferramentas indispensáveis para estudar a patogênese das úlceras pépticas e das DII.

**Número de animais:** Considerando que os animais são sanitariamente homogêneos e que as variáveis ambientais serão controladas, diminuindo desta forma a variabilidade amostral, os critérios utilizados para definir a amostra foram aqueles propostos por Eckelman et al. (2007) que determina o número de animais necessários para alcançar significância para  $P < 0,05$  para várias diferenças entre o grupo controle e o tratado, com coeficiente de variação máxima de 20%.

**❑ Descrição do animal utilizado (número, espécie, linhagem, sexo, peso, etc):**

Serão utilizados ratos Wistar machos, com 8 semanas de idade e peso corporal entre 150 a 200g.

Serão realizados dois modelos experimentais com oito grupos experimentais com  $n = 7 - 10$  animais.

Os mecanismos envolvidos em ambos os modelos serão realizados com seis modelos experimentais com três grupos experimentais com  $n = 7$  animais.

**❑ Espécie e número total de animais utilizados:** Ratos Wistar, não é informado o número total, mas entende-se pela descrição na ficha protocolo que o número pode variar de 138 a 186 animais.

**❑ Descrição das instalações utilizadas e número de animais/área/qualidade do ambiente (ar, temperatura, umidade), alimentação/hidratação:**

Os animais, fornecidos pelo Centro de Bioterismo da Universidade Federal de Goiás, serão mantidos em câmaras com temperatura controlada ( $20 \pm 2$  o. C), alternância de ciclos claro-escuro de 12 horas, além de água e ração ad libitum. Umidade do ar:  $45 \pm 15\%$ . As trocas das gaiolas serão realizadas duas vezes por semana no período da manhã por uma equipe treinada para esta finalidade.

**❑ Utilização de agente infeccioso/gravidade da infecção a ser observada e análise dos riscos aos pesquisadores/alunos:**

Não se aplica

**❑ Adequação da metodologia e considerações sobre o sofrimento imposto aos animais:**

A metodologia é embasada na literatura e a equipe apresenta experiência para a devida execução da mesma, todavia faltam algumas informações que são solicitadas na lista de pendências. O projeto é exequível, contanto com recursos já aprovados e infraestrutura da Universidade.

Os autores descrevem os detalhes do manejo para o bem estar dos animais, e como a eutanásia dos mesmos será realizada pouco tempo após a indução das úlceras, não há a necessidade de maiores informações sobre possíveis sinais de sofrimento impostos pela metodologia, bem como a conduta em caso de constatação desse aspecto.

*Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA*

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.

Email: ceua.ufg@gmail.com



**Método de eutanásia:**

A eutanásia será realizada com CO<sub>2</sub>.

**Destino do animal:**

Após a eutanásia adequada dos animais, as carcaças serão segregadas de outros materiais como gases, linhas de sutura e acondicionadas em sacos brancos antes de serem descartadas para incineração.

**IV – Comentários do relator frente às orientações da CEUA:**

**Quanto a documentos:**

- O processo apresenta todos os elementos necessários para sua análise.
- Possui orçamento detalhado e segundo os pesquisadores, a execução será com verba oriunda do Projeto Universal CNPq aprovado recentemente pelo coordenador do presente projeto.
- Apresenta cronograma adequado.
- 

**Quanto aos cuidados e manejo dos animais e riscos aos pesquisadores:**

Riscos físicos: Eventuais acidentes com materiais perfurocortantes (seringas, agulhas, vidrarias, lancetas). Os pesquisadores e alunos serão treinados quanto ao manuseio e descarte desses materiais para evitar acidentes.

Riscos Biológicos: Eventuais contaminações com fungos e parasitos no biotério de manutenção. Todos os envolvidos com o projeto deverão utilizar equipamentos de segurança (máscara, luvas, aventais, óculos de proteção) para diminuir as chances de contaminação.

Riscos psicológicos e sociais: A manipulação dos animais nos procedimentos pode gerar riscos psicológicos aos pesquisadores. No entanto, estes são orientados das questões éticas que envolvem estes procedimentos, principalmente aqueles relacionados com a eutanásia.

**V - Parecer da CEUA:**

De acordo com a documentação apresentada à CEUA, consideramos o projeto **COM PENDÊNCIAS**, smj desta Comissão.

**Solicitamos aos pesquisadores:**

- ✓ Informar a distribuição dos animais por gaiola.
- ✓ Não há no projeto a informação do número de animais, somente na ficha protocolo. Deixar claro o número total de animais a serem utilizados no projeto. Seria interessante, se possível, informar a composição e distribuição dos grupos em cada aspecto avaliado.
- ✓ Na ficha protocolo é citada a utilização de 7-10 animais por grupo. Por que essa variação? Solicitamos indicar o número exato de animais/grupo.
- ✓ Como não há veterinário na equipe, indicar um profissional médico veterinário com experiência com animais de laboratório para ser responsável pela saúde dos animais.

*Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA*

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFPG, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.

Email: ceua.ufg@gmail.com



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS  
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA



- ✓ Descrever a anestesia (anestésico, dosagem e via de administração) dos ratos para a avaliação dos parâmetros do suco gástrico e dosagem de muco pelo modelo de ligadura de piloro.
- ✓ Indicar o local de incineração dos animais.

Lembramos ao pesquisador que o prazo para apresentação do atendimento de pendências é de 60 dias (sessenta). Após este prazo, o projeto será considerado retirado. Para projetos retirados, ao interesse do pesquisador, novo protocolo deverá ser aberto e, então, reiniciado o processo de registro na CEUA.

**VI - Data da reunião:** 10/02/2014

**Dra. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera**

Coordenadora da CEUA/PRPPG/UFV

*Prof<sup>a</sup>. Ekaterina Akimovna Botovchenco Rivera*  
Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais  
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação / UFV

*Comissão de Ética no Uso de Animais/CEUA*

Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação/PRPPG-UFV, Caixa Postal: 131, Prédio da Reitoria, Piso 1, Campus Samambaia (Campus II) - CEP:74001-970, Goiânia – Goiás, Fone: (55-62) 3521-1215.

Email: ceua.ufv@gmail.com