



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

ESTUDO QUÍMICO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE
Kielmeyera coriacea Mart. & Zucc (PAU-SANTO) DO CERRADO

CARLA DE MOURA MARTINS

UBERLÂNDIA – MG

2012



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE QUÍMICA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

ESTUDO QUÍMICO, ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ATIVIDADE
ANTIMICROBIANA E ANÁLISE DO ÓLEO ESSENCIAL DA ESPÉCIE
Kielmeyera coriacea Mart. & Zucc (PAU-SANTO) DO CERRADO

CARLA DE MOURA MARTINS

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

Orientação: Prof. Dr. Francisco José Tôrres de Aquino

Coorientação: Prof. Dr. Alberto de Oliveira

Uberlândia – MG

2012



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



Ata da defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO junto ao Programa de Pós-Graduação em
Química, do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia
DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO ACADÊMICO, NÚMERO 138/COPGQ.

DATA: 29/02/2012

DISCENTE: Carla de Moura Martins

MATRÍCULA: 11012QMI003

TÍTULO DO TRABALHO: Estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie Kielmeyera coriacea Mart. & Zucc (PAU-SANTO) do cerrado.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

LINHA DE PESQUISA: Química de Produtos Naturais

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo.

Às nove horas do dia vinte e nove de fevereiro do ano dois mil e doze, no Auditório D do Bloco 50, Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Rafaela Karin de Lima, da Universidade Federal de São João Del Rei, MG; Wellington de Oliveira Cruz, do IQUFU e Francisco José Tôrres de Aquino, professor orientador e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o presidente da mesa apresentou o candidato e a Banca Examinadora, agradeceu a presença do público e discorreu sobre as normas e critérios para a realização desta sessão, baseadas na Norma Interna nº 01/2010/COPGQ. Em seguida, o presidente da mesa concedeu a palavra à candidata para a exposição do seu trabalho e, em sequência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o apresentador. A duração da apresentação e o tempo de arguição e resposta deram-se conforme as normas do Programa. Ultimada a arguição, desenvolvida dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu os conceitos finais e Aprovou o candidato. Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será Estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie Kielmeyera coriacea Mart. & Zucc (PAU-SANTO) do Cerrado.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado Acadêmico é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento do estabelecido nas normas do Programa, legislação e regulamentação internas da UFU. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 11 horas e 50 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.

Profª Dra. Rafaela Karin de Lima - UFSJ

Prof. Dr. Wellington de Oliveira Cruz – IQUFU

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

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	17
1.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	19
1.2.1 Terpenos.....	20
1.2.2 Compostos fenólicos.....	24
1.2.3 Alcaloides.....	28
1.2.4 Xantonas.....	29
1.2.5 Óleos essenciais.....	32
1.3 CONSTITUINTES QUÍMICOS DA MADEIRA E CASCA.....	34
1.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	39
1.5 A ESPÉCIE <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc.....	40
1.6 FLUXOGRAMAS UTILIZADOS NO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL....	45
2 OBJETIVOS.....	47
2.1 OBJETIVOS GERAIS.....	47
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	47
3 JUSTIFICATIVA.....	48
4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	49
4.1 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL.....	49
4.2 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE.....	49
4.3 DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA CASCA E MADEIRA DE <i>Kielmeyera coriacea</i>	49
4.3.1 Determinação do teor de cinzas.....	49
4.3.2 Preparação da amostra livre de extractivos.....	50
4.3.3 Determinação de lignina insolúvel em ácido (Lignina de Klason).....	50
4.3.4 Determinação de lignina solúvel.....	51
4.3.5 Determinação de holocelulose.....	51
4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE <i>Kielmeyera coriacea</i>	52
4.4.1 Extração do óleo essencial por hidrodestilação.....	52
4.4.2 Análise dos óleos essenciais por CG-EM.....	52

4.4.3 Identificação dos óleos essenciais.....	52
4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	53
4.5.1 Preparação dos extratos em etanol.....	53
4.5.2. Partição líquido-líquido dos extratos em etanol.....	53
4.5.3 Determinação de fenóis totais (FT).....	53
4.5.4 Determinação do teor de taninos condensados (proantocianidinas).....	54
4.5.5 Análise quantitativa da atividade antioxidante.....	54
4.5.5.1 Construção da curva de calibração do DPPH.....	55
4.5.5.2 Leitura das medidas de absorbância nas amostras.....	55
4.6 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA NO INFRAVERMELHO.....	56
4.7 MONITORAMENTO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) COM SÍLICA GEL DAS PARTIÇÕES EM METANOL-ÁGUA 9:1 E EM DICLOROMETANO DA CASCA INTERNA.....	56
4.7.1 Fracionamento por cromatografia em coluna da partição em diclorometano.....	56
4.8 ANÁLISE DAS FRAÇÕES 5 E 6 POR CLAE.....	57
4.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	57
4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	58
5 RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	59
5.1 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE.....	59
5.2 DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA CASCA E MADEIRA DE <i>Kielmeyera coriacea</i>.....	59
5.2.1 Determinação do teor de cinzas.....	59
5.2.2 Preparação da amostra livre de extractivos.....	60
5.2.3 Determinação de lignina insolúvel em ácido (Lignina de Klason).....	61
5.2.4 Determinação de lignina solúvel.....	61
5.2.5 Determinação de holocelulose.....	62
5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE <i>Kielmeyera coriacea</i>.....	63
5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	69
5.4.1 Preparação dos extratos em etanol e partição líquido-líquido.....	69
5.4.2 Determinação de fenóis totais (FT).....	70
5.4.3 Determinação do teor de taninos condensados (proantocianidinas).....	72
5.4.4 Análise quantitativa da atividade antioxidante.....	74

5.4.4.1 Construção da curva de calibração do DPPH.....	75
5.4.4.2 Leitura das medidas de absorbância nas amostras.....	75
5.4.4.3 Concentração Efetiva (CE_{50}).....	80
5.5 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA NO INFRAVERMELHO.....	82
5.6 FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA PARA AS AMOSTRAS COM MELHORES CE_{50}	87
5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA), APÓS FRACIONAMENTO EM COLUNA, DA PARTIÇÃO DICLOROMETANO DA CASCA INTERNA.....	90
5.7.1 Análise dos extratos 5 e 6 por CLAE.....	91
5.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA.....	93
 6 CONCLUSÕES	97
 REFERÊNCIAS	99
 APÊNDICE A	111

AGRADECIMENTOS

A Deus, por todos os obstáculos superados.

A minha família que, com muito carinho e apoio, não mediram esforços para que eu chegassem até esta etapa de minha vida.

Ao professor e orientador Francisco J. T. de Aquino pela orientação e apoio durante o desenvolvimento do presente trabalho.

Ao professor Alberto de Oliveira por sua coorientação.

Aos professores Sérgio A. L. Morais, Roberto Chang e Evandro A. do Nascimento, por suas contribuições para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores Carlos Henrique G. Martins do Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca - LaPeMa, pela realização das análises de atividade antimicrobiana e ao professor Glein M. de Araújo do Instituto de Biologia da UFU, pela identificação da planta.

Aos amigos do laboratório de pesquisa, Brunno, Edmilson, Gabriella, Luís, Mário e Raquel, pelo companheirismo e apoio em tantos momentos e pela ajuda na realização de algumas etapas deste trabalho.

A CAPES pela bolsa de mestrado.

A todas as pessoas que diretamente e indiretamente contribuíram para que esse trabalho fosse realizado.

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1: Classificação dos compostos fenólicos de acordo com a cadeia principal.....	24
Tabela 2: Sistema de eluição para a análise em CLAE das frações 5 e 6.....	57
Tabela 3: Teor de umidade das partes da <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc estudadas.....	59
Tabela 4: Teor de cinzas da madeira e cascas de <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc... 60	
Tabela 5: Porcentagem de extractivos de <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc.....	60
Tabela 6: Porcentagem dos constituintes químicos da casca e madeira de <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc.....	62
Tabela 7: Rendimentos dos óleos essenciais de <i>Kielmeyera coriacea</i>	63
Tabela 8: Principais constituintes voláteis presentes na folha, flor, casca externa, casca interna e madeira de <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc.....	64
Tabela 9: Comparação dos constituintes voláteis de <i>K. coriacea</i> e <i>K. rugosa</i> Choisy... 67	
Tabela 10: Teor de fenóis totais (expresso em mg EAG por grama de amostra) nos extractos em etanol e nas partições de <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc.....	71
Tabela 11: Teor de proantocianidinas nos extractos etanólicos e nas partições (em mg ECAT por grama de amostra) de <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc.....	73
Tabela 12: Concentração inicial (100%) em ppm das amostras na cubeta na determinação da AA dos extractos e partições de <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc.....	76
Tabela 13: Porcentagem de atividade antioxidante (% AA) para as concentrações iniciais (em ppm) das amostras na cubeta.....	76
Tabela 14: Valores de CE ₅₀ (em ppm) para extracto em etanol e partições estudadas de <i>Kielmeyera coriacea</i>	81
Tabela 15: Valores de CE ₅₀ de extracto e frações da folha de <i>Garcinia xanthochymus</i> ... 81	
Tabela 16: Principais absorções dos espectros no infravermelho das amostras analisadas de <i>K. coriacea</i>	85
Tabela 17: Atividade antioxidante (AA, em %) para as frações obtidas após fracionamento em coluna da partição em diclorometano da casca interna.....	90
Tabela 18: Valores de CE ₅₀ das frações 4, 5, e 6.....	90
Tabela 19: Resultados da concentração inibitória mínima para os extractos e as partições de <i>Kielmeyera coriacea</i>	93

Tabela 20: Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato em diclorometano do caule de <i>Kielmeyera cuspidata</i>	95
Tabela 21. Efeito inibitório dos óleos essenciais para diferentes partes de <i>C.</i> <i>pubescens</i> contra organismos aeróbicos bucais.....	96

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa demonstrativo dos Biomas encontrados no Brasil.....	7
Figura 2 - Esquema das vias do metabolismo secundário de plantas.....	20
Figura 3: Esquema da síntese de terpenos e a sua classificação de acordo com as unidades de isopreno.....	21
Figura 4: Estruturas de alguns monoterpenos.....	22
Figura 5: Estruturas de alguns sesquiterpenos com atividade biológica.....	23
Figura 6: Estruturas da azadiractina e ecdisona.....	23
Figura 7: Estrutura e numeração básica de um flavonóide.....	25
Figura 8: Estruturas das principais classes dos flavonóides.....	25
Figura 9: Esquema da hidrólise dos taninos: galactoninos produzem ácido gálico após hidrólise; e elagitaninos produzem ácido elágico após hidrólise.....	27
Figura 10: Estrutura de uma proantocianidina, um tanino condensado.....	27
Figura 11: Estrutura do alcaloide morfina.....	29
Figura 12: Estrutura básica de xantonas com núcleos numerados.....	30
Figura 13: Estrutura da xantona glicosilada mangiferina - um composto bioativo de manga (<i>Mangifera indica L.</i>).....	30
Figura 14: Estrutura da xantona prenilada – mangostina.....	31
Figura 15: Estrutura da bis-xantona – globulixantona E.....	31
Figura 16: Estrutura da xantona xantofulvina.....	32
Figura 17: Estrutura do fenilpropanóide ácido cinâmico e do terpeno <i>beta</i> -mirceno....	33
Figura 18: Esquema dos constituintes químicos da madeira.....	34
Figura 19: Aspectos macroscópicos de uma secção transversal do tronco de uma árvore.....	35
Figura 20: Esquema de formação da estrutura da celulose. Os substituintes OH-2, OH-3 e CH ₂ OH estão orientados equatorialmente.....	36
Figura 21: Estrutura da galactoglucomanana. Unidades de açúcar: <i>beta</i> -D-glicose, <i>beta</i> -D-manoze e <i>alfa</i> -D-galactose.....	37
Figura 22: Estrutura dos álcoois precursores das unidades fenilpropanóides guaiacila (G), siringila (S) e <i>p</i> -hidroxifenila (H).....	37
Figura 23: Estrutura proposta para lignina de madeira moída do <i>Eucalyptus grandis</i>	38
Figura 24: Mapa da distribuição geográfica da espécie <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart.	

& Zucc no Brasil.....	41
Figura 25: Imagens que mostram as características morfológicas da espécie <i>Kielmeyera coriacea</i> . 1 = arbusto; 2 = folhas – nervura central proeminente; 2 = flores no ápice dos ramos; 4 = tronco suberoso – casca espessa; 5 = fruto tipo cápsula; 6 = fruto aberto.....	42
Figura 26: Estruturas químicas dos compostos isolados do extrato em diclorometano da casca do caule de <i>Kielmeyera coriacea</i> . 1 = Aucuparina; 2 = 2-hidroxi-1-metoxixantona; 3 = 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona; 4 = 4-hidroxi-2,3-dimetoxixantona; 5 = 1,3,7-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona; 6 = 1,3,5-trihidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona; 7 = 1,3,7-trihidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-xantona; 8 = kielcorina; 9 = osajaxantona.....	43
Figura 27: Estruturas químicas do <i>delta</i> -tocotrienol (1) e <i>delta</i> -tocotrienol peróxi-dímero (2).....	45
Figura 28: Fluxograma de trabalho utilizado na determinação dos óleos essenciais.....	45
Figura 29: Fluxograma de trabalho utilizado nas análises químicas.....	46
Figura 30: Estruturas dos três constituintes majoritários presentes no óleo essencial das folhas de <i>K. coriacea</i>	66
Figura 31: Estrutura química do eugenol.....	66
Figura 32: Estrutura dos três constituintes majoritários do óleo essencial da casca interna de <i>K. coriacea</i>	68
Figura 33: Estrutura química do Parsol MCX [®]	69
Figura 34: Reação típica do ácido gálico com o íon molibdênio presente no reagente de Folin.....	70
Figura 35: Curva de calibração para a determinação espectrofotométrica de fenóis totais (Método Folin-Ciocalteau).....	71
Figura 36: Reação típica da vanilina com uma proantocianidina. A seta aponta para um segundo local potencialmente reativo.....	72
Figura 37: Curva de calibração para a determinação espectrofotométrica de proantocianidinas (Método da Vanilina).....	73
Figura 38: Esquema da reação típica entre o radical DPPH e o antioxidante genérico (A—H).....	74
Figura 39: Reação típica de redução do radical DPPH pelo flavonóide antioxidante quercetina.....	75
Figura 40: Curva de calibração para a determinação espectrofotométrica da	

atividade antioxidante (Método DPPH).....	75
Figura 41: Gráficos da porcentagem de atividade antioxidante para: a- extrato em etanol da folha; b- partição em cicloexano da folha; c- partição em diclorometano da folha; d- extrato em etanol da madeira.....	77
Figura 42: Gráficos da porcentagem de atividade antioxidante para: a- extrato em etanol da casca interna; b- partição em cicloexano da casca interna; c- partição em diclorometano da casca interna; d- partição em metanol:água 9:1 da casca interna.....	78
Figura 43: Gráficos da porcentagem de atividade antioxidante para: a- extrato em etanol da casca externa; b- partição em cicloexano da casca externa; c- partição em diclorometano da casca externa.....	79
Figura 44: Gráfico comparativo normalizado da atividade antioxidante (AA, em %) para as amostras, após 1 hora de reação.....	80
Figura 45: Espectros de infravermelho de três extratos obtidos da casca externa de <i>K. coriacea</i>	83
Figura 46: Espectros no infravermelho de extratos da casca interna da <i>K. coriacea</i>	83
Figura 47: Espectros no infravermelho de extratos da folha da <i>K. coriacea</i>	84
Figura 48: Espectro no infravermelho do extrato em etanol da madeira de <i>K. coriacea</i>	84
Figura 49: Esquema da reação de ativação da sílica por aquecimento.....	88
Figura 50: Fluxograma do fracionamento cromatográfico da partição em diclorometano da casca interna.....	89
Figura 51: Espectros na região do UV para os principais picos eluídos nos cromatogramas da Figura 51: 1 = pico em 29 min fração 5; 2 = pico em 30 min fração 5; 3 = pico em 32 min fração 5; 4 = pico em 48 min fração 5; 5 = pico em 30 min fração 6; 6 = pico em 48 min fração 6.....	91
Figura 52: Cromatogramas obtidos por CLAE das frações 5 e 6. Condições: Coluna C18 (4,6 mm d.i. x 25 cm comprimento); gradiente solução 5% de KH ₂ PO ₄ 0,2 mol L ⁻¹ – metanol; fluxo de 0,7 mL min ⁻¹ ; detector a 220 nm.....	92

LISTA DE ABREVIAÇÕES E SÍMBOLOS

AA – Atividade antioxidante

CCD – Cromatografia de camada delgada

CE₅₀ – Concentração eficiente

CLAE – Cromatografia líquida de alta eficiência

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

CG-EM – Cromatografia Gasosa-Espectroscopia de Massas

CIM – Concentração inibitória mínima

DMAPP – Dimetil-alil difosfato

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

DPPH-H – 2,2-difenilpicril-hidrazina

EAG – Equivalentes de ácido gálico

ECAT – Equivalentes de catequina

FPP – Farnesil difosfato

FT – Fenóis totais

GBIF – Global Biodiversity Information Facility

GPP – Geranil difosfato

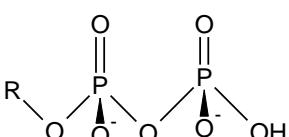
IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IK – Índice de Kovat

IPP – Isopentenil difosfato

IV – Infravermelho

OPP – oxigênio- pirofosfato =



TIC – Total ions chromatografics

UV – Ultravioleta

λ – Comprimento de onda

RESUMO

A espécie *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc, conhecida popularmente como pau-santo, pertence à família Clusiaceae. Esta planta é muito rica em xantonas, substâncias que apresentam várias propriedades farmacológicas. O objetivo do trabalho foi analisar e quantificar os constituintes químicos das partes aéreas, bem como avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos e partições de *Kielmeyera coriacea*.

As porcentagens obtidas para os constituintes macromoleculares das cascas e madeira estão dentro da faixa de aceitação para as árvores folhosas. O teor de lignina de Klason encontrado foi de 14,7, 57,3 e 28,0% e o de holocelulose foi 30,0, 5,5 e 71,7% para casca interna, casca externa e madeira, respectivamente.

O óleo essencial de diferentes partes de *Kielmeyera coriacea* foi analisado pela primeira vez neste trabalho. Os principais compostos identificados no óleo essencial da folha foram sesquiterpenos, 51,3% do óleo é constituído de D-germacreno, *trans*-cariofileno e biciclogermacreno. Na flor, o eugenol representa cerca de 44,0% do óleo essencial sendo o constituinte majoritário. Em comparação com os óleos essenciais da espécie *Kielmeyera rugosa*, houve diferenças na concentração dos componentes encontrados nas folhas e flores das duas espécies. Na casca interna a maioria dos componentes são sesquiterpenos e os constituintes presentes em maior concentração foram *alfa*-copaeno (14,9%), *alfa-trans*-bergamoteno (13,0%) e *beta*-bisaboleno (9,4%). Na casca externa, dentre os componentes identificados, os alcanos e sesquiterpenos estão presentes em maior concentração. No óleo da madeira o ácido palmítico é o componente majoritário (16,2%) e os alcanos estão presentes em grande concentração, que juntos representam 51,3% do óleo essencial. Este óleo essencial pode ser considerado uma fonte alternativa para o 2-etilexil-3-(4-metoxifenil)-2-propenoato (conhecido como Parsol MCX, encontrado em formulações de protetores solares).

Pela análise do teor de fenóis totais, através do método Folin-Ciocalteau, os extratos em etanol da folha e casca interna e a partição em metanol-água da casca interna foram as amostras que apresentaram os maiores teores, com valores de 309, 346 e 372 mg EAG g⁻¹ de extrato, respectivamente. A casca interna foi a amostra que apresentou o maior teor de proantocianidinas com valores de 328, 253 e 410 mg ECAT g⁻¹ de extrato para o extrato em etanol, partição em diclorometano e partição em

metanol-água, respectivamente. A casca interna foi também a amostra que apresentou melhor atividade antioxidante, com valores de CE₅₀ de 5,9, 6,6 e 4,3 ppm para o extrato em etanol, partição em diclorometano e partição em metanol-água, respectivamente. As frações 4, 5 e 6 da partição em metanol-água da casca interna apresentaram boa atividade antioxidante com valores de CE₅₀ de 4,7, 4,8 e 4,3 ppm, respectivamente.

A análise dos extratos por CLAE das frações 5 e 6 obtidas do fracionamento em coluna da partição em diclorometano da casca interna, e que apresentaram altos valores de CE₅₀, mostrou a presença de poucos compostos, ainda não identificados neste estudo.

A análise no IV dos extratos e das partções mostrou que os principais grupos funcionais presentes foram hidroxila, carbonila, alcanos e presença da ligação C—O. A análise de infravermelho não permitiu identificar diferenças na estrutura dos compostos fenólicos e apresentou funcionalidade global muito similar.

Os resultados da CIM frente aos microrganismos bucais mostraram que a casca interna foi a amostra com melhor atividade e a partição em cicloexano foi a mais ativa, inibindo o crescimento bacteriano para três microrganismos bucais (*S. mutans*, *S. sanguinis*, *A. naeslundii*) em concentração de 6,2 µg mL⁻¹.

Palavras-chave: *Kielmeyera coriacea*, análise química, óleo essencial, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana.

ABSTRACT

Kielmeyera coriacea Mart. & Zucc, known as “pau-santo”, belongs to the family Clusiaceae. This plant is rich in xanthones, substances that exhibit various pharmacological properties. The objective of this study was to analyze and quantify the chemical constituents of the aerial parts, evaluate the antimicrobial and antioxidant activity of extracts and partitions of *Kielmeyera coriacea*.

The percentages obtained for the macromolecular constituents of barks and wood are within the acceptable range for hardwood trees. The Klason lignin content found, was 14.7, 57.3 and 28.0 % and holocellulose was 30.0, 5.5 and 71.7 % for inner bark, outer bark and wood, respectively.

The essential oils from different parts of *Kielmeyera coriacea* was analyzed for the first time in this work. The main identified compounds in the essential oil of leaf were sesquiterpenes, 51.3% of the oil consists of D-germacrene, *trans*-caryophyllene and bicyclogermacrene. In the flower, eugenol represents about 44.0 % of the essential oil, being the major constituent. Compared with essential oils of *Kielmeyera rugosa*, there were differences in the concentration of the components found in leaves and flowers of both species. In the inner bark, the most components are sesquiterpenes and constituents in higher concentrations were *alpha*-copaene (14.9 %), *alpha*-*trans*-bergamotene (13.0 %) and *beta*-bisabolene (9.4 %). In the outer bark, alkanes and sesquiterpenes are present in higher concentration. In the oil of wood, palmitic acid is the major component (16.2 %) and the alkanes are present in high concentration, together represent 51.3 % of essential oil. This essential oil can be considered an alternative source for 2-ethylhexyl-3-(4-methoxyphenyl)-2-propenoate (known as Parsol MCX, found in formulations of sunscreens).

The levels of total phenols determined by Folin-Ciocalteau method, were 309, 346 and 372 expressed in Galic acid equivalents (GAC) per gram of sample, for ethanol extracts of leaves and inner bark and methanol-water partition of the inner bark, respectively. The inner bark was the sample that showed the highest content of proanthocyanidins with values of 328, 253 and 410 in catechin equivalents per gram of sample, for the ethanol extract, dichloromethane and methanol-water partitions, respectively. The inner bark was also the sample that showed the greatest antioxidant activity, with EC₅₀ values of 5.9, 6.6 and 4.3 ppm for ethanol extract, dichloromethane

and methanol-water partitions, respectively. The fractions 4, 5 and 6 of methanol-water partition from the inner bark presented good antioxidant activity with EC₅₀ values of 4.7, 4.8 and 4.3 ppm, respectively.

The analysis of fractions 5 and 6, obtained from the fractionation column of dichloromethane partition of the inner bark, which had high EC₅₀ values, by HPLC, showed the presence of a few compounds, not yet identified in this study.

The analysis of IV in extracts and fractions showed that the main functional groups present in the extracts were hydroxyl, carbonyl, presence of alkanes and C-O bond. The infrared analysis not allowed identify differences in the structure of phenolic compounds and presented global functionality very similar.

The results of MIC against oral microorganisms showed that, the inner bark was the sample with higher activity and cyclohexane partition was most active, inhibiting bacterial growth for three oral microorganisms (*S. mutans*, *S. sanguinis*, *A. naeslundii*) at a concentration of 6,2 µg mL⁻¹.

Keywords: *Kielmeyera coriacea*, chemical analysis, essential oil, antioxidant activity, antimicrobial activity.

1 INTRODUÇÃO

O conhecimento sobre o uso de plantas medicinais no tratamento de enfermidades é bastante antigo. Em muitas comunidades e até mesmo nas grandes cidades é comum a comercialização de plantas medicinais em feiras e mercados populares. Através do conhecimento popular sobre sua utilização e eficácia, uma grande quantidade de fitoterápicos é consumida e comercializada em diversos países. Os constituintes químicos presentes em plantas medicinais nem sempre são conhecidos e este fato acarreta grande interesse de pesquisadores de diferentes áreas multidisciplinares como a botânica, a farmacologia e a fitoquímica para o conhecimento sobre a flora medicinal (MACIEL et al., 2002).

Dentre os biomas encontrados no Brasil (Figura 1), o Cerrado constitui-se em grande fonte de plantas medicinais, sendo a maioria delas pouco estudada. A palavra Cerrado é de origem espanhola e significa fechado, termo utilizado para caracterizar a vegetação arbustivo-herbácea densa que ocorre nesse bioma. Ele ocupa aproximadamente 22% do território nacional, localizado na porção central do país e compreende os seguintes estados brasileiros: Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Rondônia, Goiás, Tocantins, Minas Gerais, Bahia, Maranhão, Piauí, São Paulo e o Distrito Federal, bem como áreas remanescentes nos Estados do Pará, Roraima e Amapá. O Cerrado Brasileiro é cortado pelas três maiores bacias hidrográficas da América do Sul: Amazônica, Platina e Sanfranciscana (FERREIRA, 2008).



Figura 1 - Mapa demonstrativo dos Biomas encontrados no Brasil.

Fonte: IBGE (2004).

O clima do Cerrado é caracterizado por duas estações climáticas bem definidas: invernos secos e verões chuvosos. A estação seca ocorre entre os meses de abril e setembro. Nesse período a umidade relativa do ar é baixa, contribuindo para a ocorrência de incêndios e a estação chuvosa ocorre entre os meses de outubro a março, período onde a flora do Cerrado se torna mais exuberante. O solo apresenta características bem marcantes, é bastante antigo, quimicamente ácido (pH 4,3 a 6,2) e profundo. Devido à profundidade do solo e a presença de água nas camadas mais profundas, as árvores e os arbustos possuem complexos sistemas de raízes que os ajudam no período mais seco, garantindo a sobrevivência e proteção contra as queimadas. Devido ao fato de abranger uma área muito grande, a vegetação do Cerrado é dividida em onze tipos fitofisionômicos, agrupados em três formações: Florestal (Mata Ciliar, Mata de Galeria, Mata Seca e Cerradão), Savânica (Cerrado sentido restrito, Parque de Cerrado, Palmeiral e Vereda) e Campestre (Campo Sujo, Campo Rupestre e Campo Limpo) (SANTOS et al., 2011).

O Cerrado sofreu uma ocupação desordenada e isso provocou grandes modificações no bioma. As principais causas dos impactos ambientais foram: implantação e construção de estradas, desmatamento e empobrecimento genético, degradação dos solos (decorrente das erosões, enchentes, elevadas concentrações de fertilizantes e adubos químicos, entre outros), introdução de espécies exóticas (causa a extinção de espécies nativas, competição com a nova espécie), contaminação química e física da água, sistemas de irrigação, exploração mineral e formação de reservatórios (FERREIRA, 2008).

Em 2004 foi lançado pelo Ministério do Meio Ambiente o Programa Nacional de Conservação e Uso Sustentável do Bioma Cerrado com o objetivo de promover a conservação, restauração e recuperação no Bioma Cerrado para reverter os impactos socioambientais negativos causados pela ocupação desordenada (BRASIL, 2004).

Encontra-se no Cerrado diversas espécies farmacologicamente ativas utilizadas na medicina popular, em virtude da grande diversidade de ordens, famílias e gêneros. Segundo Farnsworth, (1988 apud PEREIRA et al., 2007), “quanto maior a diversidade taxonômica em níveis superiores, maior é o distanciamento filogenético entre as espécies e maior é a diferença e diversidade química entre elas” contribuindo para o grande potencial de compostos bioativos produzidos pelas espécies do Cerrado.

Existem na literatura alguns trabalhos que relatam o uso de várias plantas medicinais do Cerrado pela população (VIEIRA; MARTINS, 2000; RODRIGUES;

CARVALHO, 2001; GUARIM-NETO; MORAIS, 2003), contudo ainda é necessário realizar estudos etnobotânicos para aprofundar os conhecimentos de espécies utilizadas na medicina popular, identificar essas espécies e as substâncias biologicamente ativas para comprovar a ação terapêutica e também avaliar sua toxicidade.

Os princípios ativos encontrados em plantas medicinais são formados pelo metabolismo secundário, obtidos a partir da síntese entre metabólitos primários. As principais classes dos metabólitos secundários são os compostos fenólicos, alcalóides e terpenos. Esses são os compostos responsáveis pelos efeitos medicinais e/ou tóxicos encontrados nas plantas e são compostos de grande importância ecológica, pois atuam tanto no metabolismo de defesa das plantas quanto na polinização para a perpetuação de espécies nativas (LÓPEZ, 2006).

1.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os organismos vivos produzem compostos essenciais à sua sobrevivência como açúcares, aminoácidos, ácidos graxos, proteínas e lipídios, que são denominados metabólitos primários. Os vegetais são capazes de produzir outras substâncias não necessariamente essenciais ao organismo, mas que garantem vantagens na sobrevivência e perpetuação da espécie no ecossistema, denominados metabólitos secundários (FONSECA, 2001).

Os compostos do metabolismo secundário desempenham diferentes funções nas plantas. Alguns são responsáveis por conferir cor em flores e frutos e possui um papel importante na reprodução ao atrair insetos polinizadores, ou atraindo animais que utilizam os frutos como fonte de alimento e contribuem para a disseminação das sementes (GARCÍA; CARRIL, 2009). Outros compostos possuem a função de proteger a planta contra ataque de predadores, eles conferem à planta sabores amargos tornando-a indigesta ou venenosa ou atuam como pesticidas naturais (GALLO et al., 2002).

Os metabólitos secundários podem ser divididos em três grupos distintos: terpenos, compostos fenólicos e compostos nitrogenados (Figura 2). Os terpenos são sintetizados a partir da acetil-CoA, via rota do ácido mevalônico, ou via rota do metileritritol fosfato (MEP). Os compostos fenólicos são biossintetizados a partir de duas rotas principais, do ácido chiquímico e do ácido malônico e os compostos nitrogenados são sintetizados a partir dos aminoácidos (TAIZ; ZEIGER, 2004).

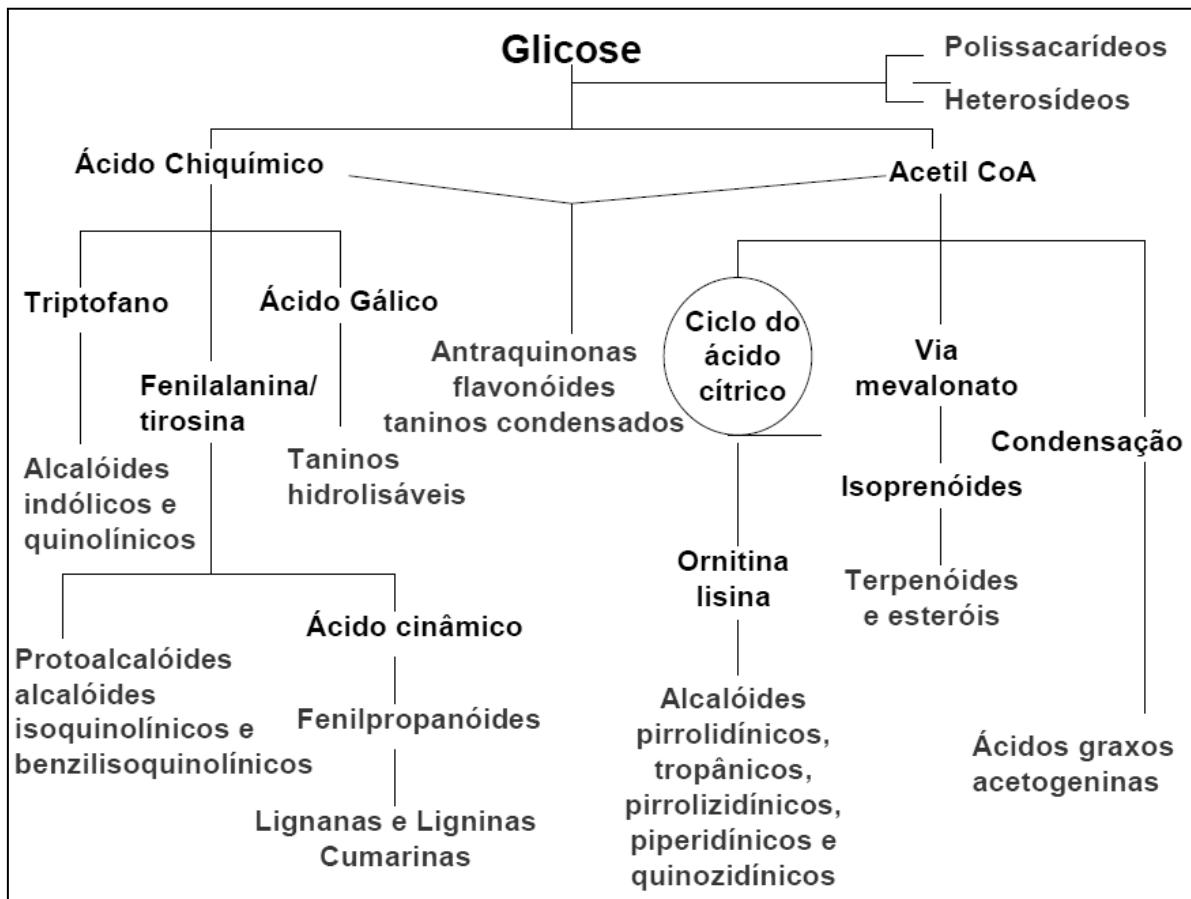


Figura 2 - Esquema das vias do metabolismo secundário de plantas.

Fonte: Simões (2003).

1.2.1 Terpenos

Os terpenos ou terpenóides constituem o maior grupo de metabólitos secundários. São derivados do isopreno (C5) e são classificados em monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30) e tetraterpenos (C40). (DEWICK, 2009).

A duas rotas principais na biossíntese de terpenos, ocorrem em organelas diferentes da célula vegetal. Na rota do ácido mevalônico, que ocorre no citoplasma da mesma, (Figura 3), três moléculas de acetil-CoA reagem para formar o ácido mevalônico e este, após sofrer reações de piro-fosforilação, descarboxilação e desidratação, resulta no isopentenil-difosfato (IPP) (TAIZ; ZEIGER, 2004). Este composto ativado de fósforo se converte em seu isômero dimetilalil-difosfato (DMAPP), o qual é biossintetizado pela rota do MEP que ocorre nos cloroplastos, possui um bom grupo de saída, o oxigênio-pirofosfato (OPP). Após a protonação do seu

oxigênio e, consequentemente, a formação do carbocáton alílico, ocorre a dimerização, com formação do geranil difosfato (GPP). Na rota do MEP, ocorre a reação de condensação entre uma molécula de gliceraldeído-3-fosfato e piruvato (Figura 3), que origina o DMAPP que se converte em seu isômero IPP (DEWICK, 2009).

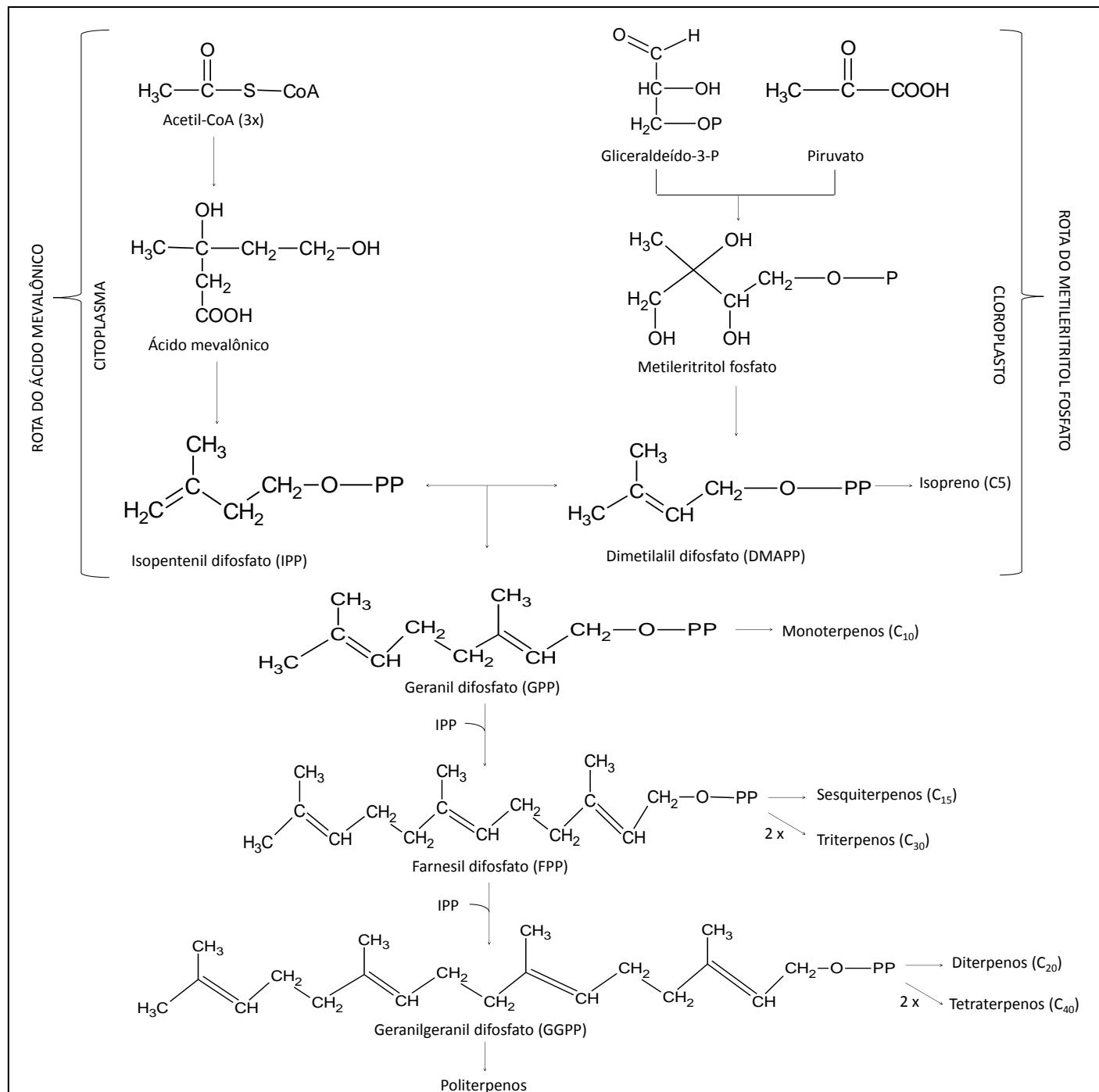


Figura 3: Esquema da síntese de terpenos e a sua classificação de acordo com as unidades de isopreno.

Fonte: García; Carril (2009).

O IPP e seu isômero DMAPP são os precursores na biossíntese dos terpenos. Eles combinam-se, também, por meio de reações de condensação para formar moléculas maiores. Na formação dos monoterpenos o IPP e o DMAPP se juntam para formar o geranil difosfato (GPP), formado por 10 átomos de carbono. O GPP, por sua vez, pode reagir com outra molécula de IPP e formar o farnesil difosfato (FPP), composto formado por 15 átomos de carbono e precursor dos sesquiterpenos, e assim sucessivamente até formar os politerpenos, como observado na Figura 3 (TAIZ; ZEIGER, 2004; GARCÍA; CARRIL, 2009; DEWICK, 2009).

Os monoterpenos são os principais constituintes dos óleos essenciais e são importantes na indústria de perfumes e fragrâncias. Alguns compostos atuam como herbicidas, pesticidas, agentes antimicrobianos e agentes anticarcinogênicos em alimentos. São biodegradáveis e por isso são utilizados também no controle de pragas (SILVA, 2005).

Alguns monoterpenos (Figura 4) são reconhecidos por suas propriedades medicinais e flavorizantes. O mirceno é utilizado na fabricação de perfumes; o lavandulol é um ingrediente presente no óleo da lavanda, utilizado em perfumes masculinos; a carvona apresenta atividade fungicida; o linalol é um composto aromatizante utilizado em chás; e o eucaliptol, principal componente do óleo de eucalipto, diminui dores e inflamações (SILVA, 2008).

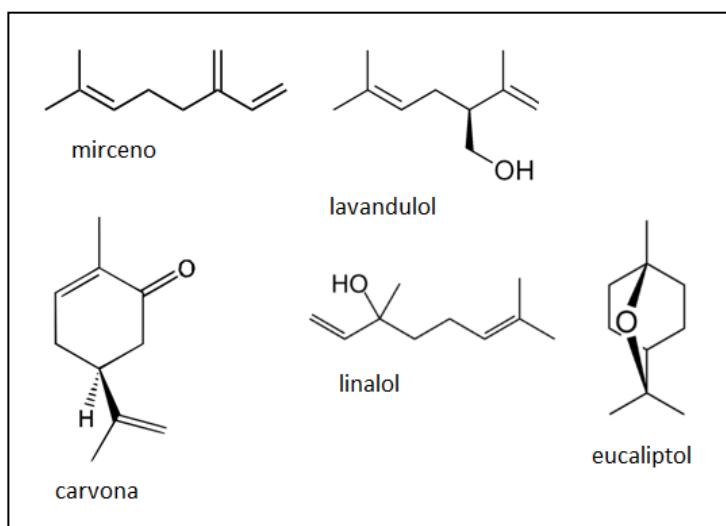


Figura 4: Estruturas de alguns monoterpenos.

Fonte: Silva (2008).

Os sesquiterpenos são a classe de terpenos com maior número de representantes. Cerca de 5000 compostos são conhecidos. Eles também estão presentes em óleos

essenciais de várias plantas. Vários sesquiterpenos possuem atividades biológicas (Figura 5), dentre eles destacam-se o *beta*-bisaboleno e o bergamoteno (que têm ação alelopática, inibindo o crescimento de raízes), o capsidiol e o hemigossipol (fitoalexinas, substâncias que atuam no sistema de defesa das plantas) e o debneiol, que apresenta atividade fungitotóxica (SEIGLER, 1998 apud GUEDES, 2004).

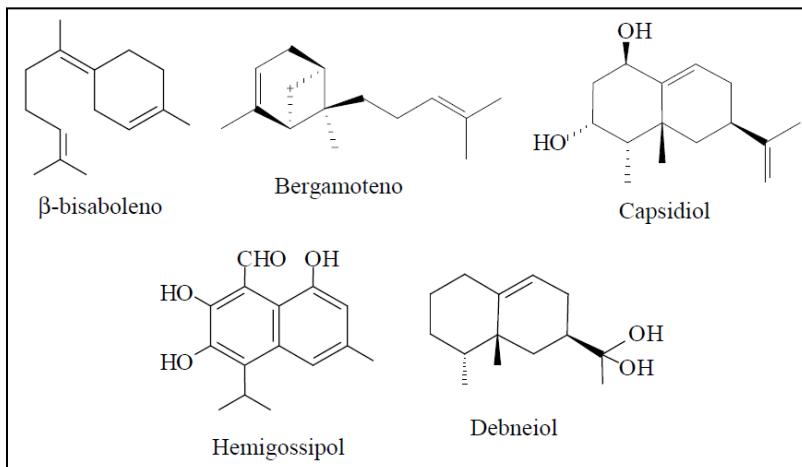


Figura 5: Estruturas de alguns sesquiterpenos com atividade biológica.

Fonte: Guedes (2004).

Os limonóides são triterpenos que possuem características amargas e atuam contra herbívoros. A azadiractina é um potente repelente de insetos usado na indústria alimentícia e na agricultura para o controle de pragas. Os esteróides são formados a partir dos triterpenos. Eles participam da formação das membranas celulares na planta. A ecdisona é um esteróide que possui função protetora contra insetos (GARCÍA; CARRIL, 2009). As estruturas da azadiractina e ecdisona estão apresentadas na Figura 6.

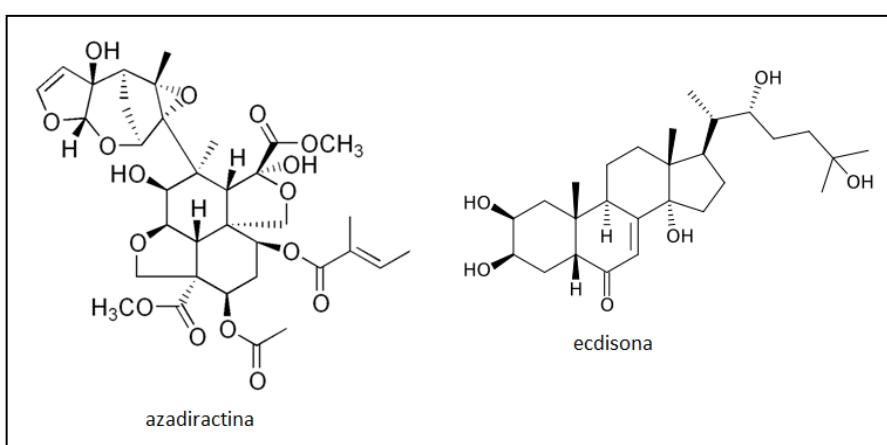


Figura 6: Estruturas da azadiractina e ecdisona.

Fonte: García; Carril (2009).

1.2.2 Compostos fenólicos

São substâncias bioativas, amplamente distribuídas no reino vegetal. São formados por um ou mais anéis aromáticos hidroxilados, sendo responsáveis pela atividade antioxidante de vegetais. Apresentam propriedades de óxido-redução atuando na absorção e neutralização de radicais livres, pois possuem elétrons π em sua estrutura que estabilizam o radical formado pela oxidação do fenol (HORST, 2008). Devido à grande diversidade estrutural dos compostos fenólicos, eles podem ser classificados de acordo com a cadeia carbônica principal que constitui o polifenol, apresentado na Tabela 1.

Tabela 1: Classificação dos compostos fenólicos de acordo com a cadeia principal (LEMOS, 2008).

ESTRUTURA	CLASSE
C ₆	Fenóis
C ₆ -C ₁	Ácidos hidroxibenzóicos
C ₆ -C ₃	Acetofenonas, ácidos fenilacéticos e hidroxicinâmicos, cumarinas e cromonas
C ₆ -C ₄	Naftoquinonas
C ₆ -C ₁ -C ₆	Benzofenonas e xantonas
C ₆ -C ₂ -C ₆	Estilbenenos e antraquinonas
C ₆ -C ₃ -C ₆	Flavonóides: flavonóis, antocianinas, flavonas, flavanonas, flavanóis e isoflavonas
(C ₆ -C ₃ -C ₆) ₂	Biflavonóides
(C ₆ -C ₁) _n	Taninos hidrolisáveis
(C ₆ -C ₃ -C ₆) _n	Taninos condensados ou proantocianidinas
C ₆ – anel benzênico	

Os flavonóides são uma importante classe de compostos fenólicos formados via ácido malônico a partir de uma unidade de cinamoil-CoA, a qual reage através de reações de eliminação, catalisada pela enzima PKS tipo III, com três moléculas de malonil-CoA, formando um policetídeo. Este, através de reações de Claisen e enolizações leva a formação de anéis aromáticos, formando os flavonóides (DEWICK, 2009), os quais são moléculas com quinze átomos de carbono arranjados em três anéis (C₆-C₃-C₆), sendo dois anéis fenólicos substituídos (A e B) e um anel heterocíclico oxigenado central C, acoplado ao anel A (Figura 7).

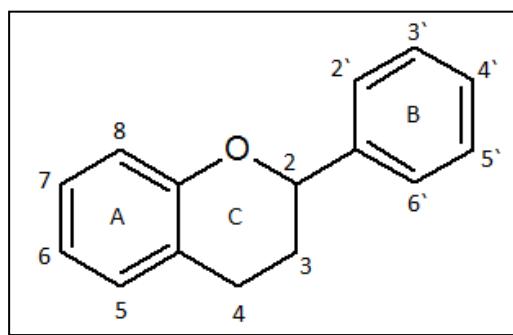


Figura 7: Estrutura e numeração básica de um flavonóide.

Fonte: Rocha (2011a).

Devido a sua diversidade estrutural, os flavonóides são subdivididos em classes, de acordo com o grau de insaturação e oxidação do anel C, apresentadas na Figura 8.

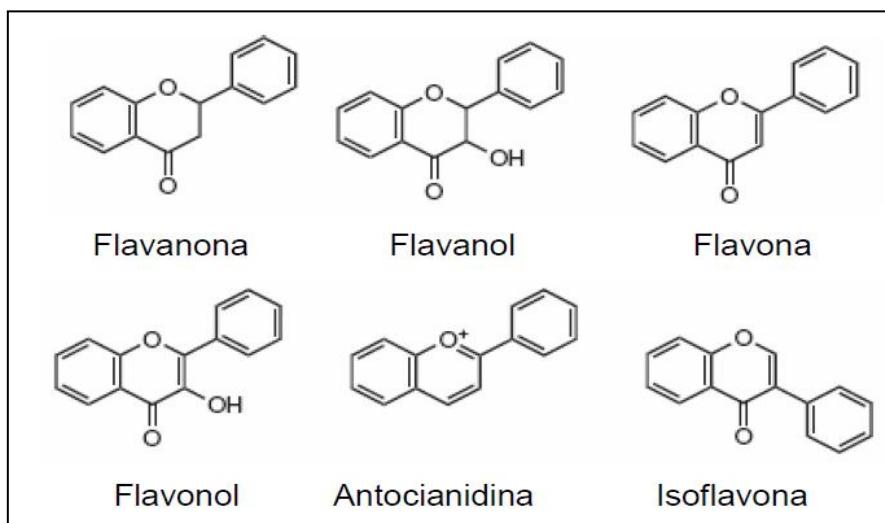


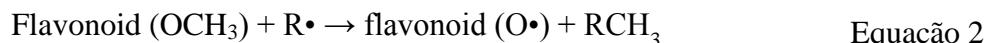
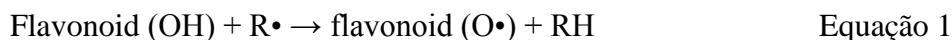
Figura 8: Estruturas das principais classes dos flavonóides.

Fonte: Dutra (2009).

Os flavonóides possuem propriedades farmacológicas comprovadas no organismo humano, como capacidade antioxidativa, atividade anti-inflamatória, ação antialérgica, atividade contra o desenvolvimento de tumores, anti-hepatotóxica, antiulcerogênica, atividades antiplaquetária, antimicrobianas e antivirais (LOPES et al., 2000).

A capacidade antioxidante é a propriedade mais difundida dos flavonóides. É comprovada sua eficácia no combate ao envelhecimento precoce ao inibir a ação da enzima xantina oxidase, responsável pela oxidação dos tecidos (DÓRES, 2007). Eles são compostos doadores de elétrons e possuem estruturas químicas conjugadas ricas em grupos hidroxilas, com grande potencial de ação sobre agentes oxidantes. Eles reagem

inativando ânions superóxido, oxigênio singlet, radicais peróxidos de lipídios e/ou estabilizando radicais livres envolvidos no processo oxidativo através da hidrogenação ou complexação com espécies oxidantes. Sua ação antioxidante pode ser representada de acordo com as equações 1 e 2 abaixo (MACHADO et al., 2008):



Nas plantas os flavonóides desempenham diversas funções, entre elas, proteção contra radiação ultravioleta B (os pigmentos formados pelos flavonóides atuam como absorventes da radiação UV-B agindo como filtro e evitando que a radiação incida sobre outras moléculas celulares como o DNA) e produção de fitoalexinas contra ataques microbianos. Nesse contexto, destacam-se os isoflavonóides, flavonas e flavanonas que inibem o crescimento das micelas, esporos e partículas virais (DÓRES, 2007).

Os taninos também pertencem ao grupo de compostos fenólicos e apresentam grande interesse econômico e ecológico como metabólitos secundários. Eles são encontrados na forma de ésteres ou de heterosídeos, sendo solúveis em água e em solventes orgânicos polares. São responsáveis pelo sabor adstringente de algumas frutas e produtos vegetais, em razão da precipitação de glicoproteínas salivares, que ocasiona a perda do poder lubrificante. São compostos reativos quimicamente e formam ligação de hidrogênio intra e intermoleculares. Podem ser identificados em extratos vegetais por meio da precipitação de proteínas e pela oxidação por influência de metais como o cloreto férreo que provoca o escurecimento da solução (MONTEIRO et al., 2005).

Os taninos são classificados de acordo com a sua estrutura química em taninos hidrolisáveis e taninos condensados. Os hidrolisáveis são ésteres de ácidos gálico e elágicos glicolisados, obtidos pela rota do chiquimato em que o grupo hidroxila do açúcar é esterificado com os ácidos fenólicos (Figura 9). Os ésteres do ácido hexaidroxidifênico são formados pelo acoplamento oxidativo fenólico de funções galoil catalisados pela enzima tipo lacase oxidase fenol (DEWICK, 2009).

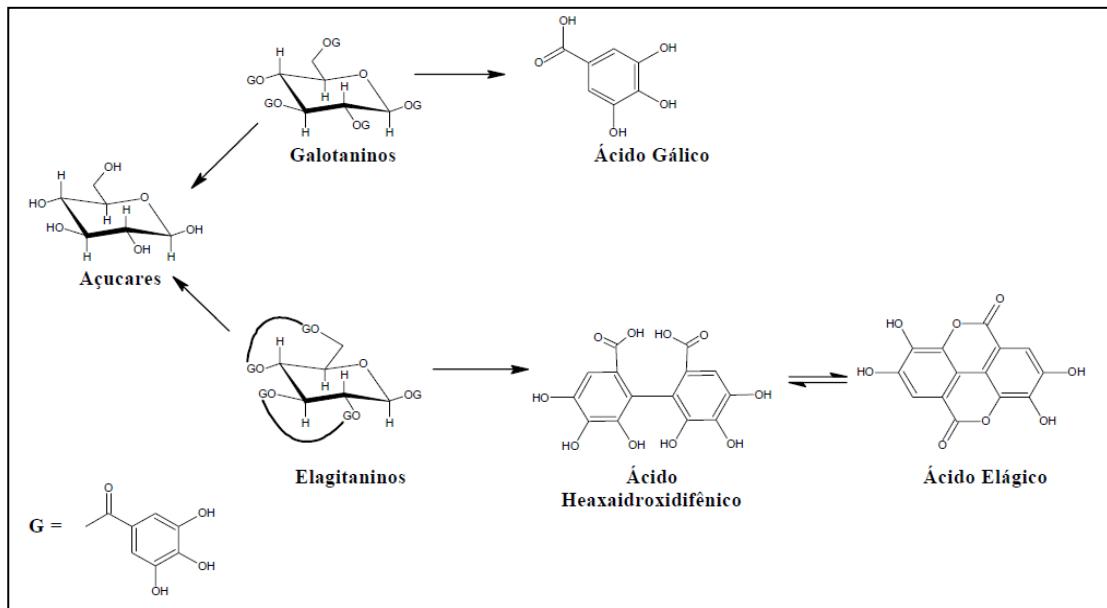


Figura 9: Esquema da hidrólise dos taninos: galactoninos produzem ácido gálico após hidrólise; e elagitaninos produzem ácido elágico após hidrólise.

Fonte: Queiroz (2002).

Os taninos condensados (Figura 10) são parecidos com os flavonóides, portanto, são provenientes de seu metabolismo, pela hidroxilação de uma flavanona. Consistem em polímeros de flavan-3-ol e/ou flavan-3,4-diol. (DÓRES, 2007; MONTEIRO et al., 2005; LEMOS, 2008; QUEIROZ et al., 2002).

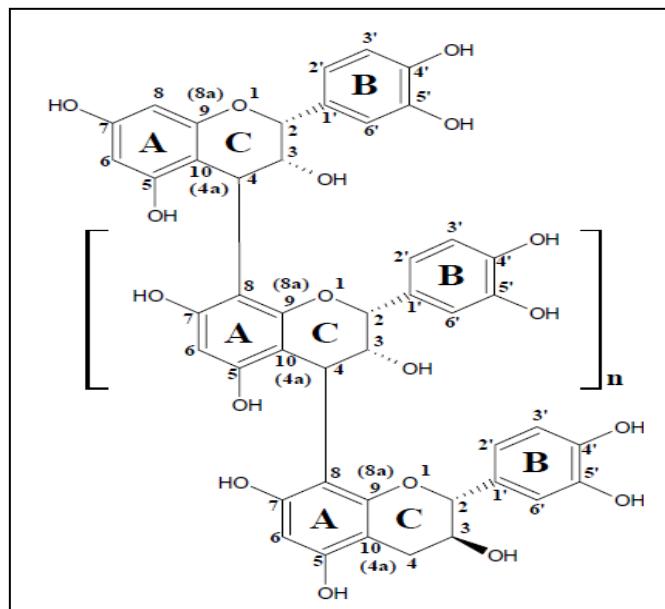


Figura 10: Estrutura de uma proantocianidina, um tanino condensado.

Fonte: Queiroz (2002).

A palavra "tanino", empregada na literatura botânica, é derivada do termo "tanante", significando que os taninos evitam a putrefação das peles dos animais e assim elas podem ser transformadas em couros (CARVALHO et al., 2002; MONTEIRO et al., 2005).

Os taninos estão envolvidos no mecanismo de defesa das plantas contra ataques de fungos, bactérias, vírus, insetos e herbívoros. Ao sofrer ataque dos fitófagos, a planta libera substâncias de sabor amargo ou adstringente ao paladar dos animais, fato que pode ser explicado pela característica dos taninos de se associarem às glicoproteínas salivares (SILVA, 2001). Além deste fato, eles aumentam o tempo de vida da planta no solo, pois proporcionam um aumento no estoque de nutrientes da planta para o próximo período de vegetação, protegendo-a contra infertilidade do solo e seca (NOZELLA, 2001).

Eles apresentam diversas atividades biológicas e farmacológicas como: efeito antidiarrético, anti-séptico, antimicrobiano e antifúngico, ação bactericida, moluscida, antielmíntica e antiepatóxica, inibição da replicação do HIV (os taninos atuam na inibição da transcriptase reversa, dificultando a replicação viral), atividades antitumorais e inibição de enzimas. Também são utilizados em algumas intoxicações, no tratamento de feridas, queimaduras e inflamações da pele (HASLAM, 1996; MONTEIRO et al., 2005).

O uso dos taninos no tratamento de doenças está relacionado a três fatores: complexação com íons metálicos (ferro, manganês, vanádio, cobre, alumínio, cálcio, entre outros), propriedades antioxidantes frente a radicais livres e a sua capacidade de complexação com macromoléculas tais como proteínas e polissacarídeos. (HASLAM, 1996).

1.2.3 Alcaloides

São compostos nitrogenados farmacologicamente ativos de baixa massa molecular e que possuem características alcalinas, fato que facilita o isolamento e a purificação destes compostos. Entretanto, o grau de basicidade depende da estrutura molecular do alcaloide e da presença e localidade de outros grupos funcionais. (DEWICK, 2009). Para exemplificar a estrutura de um alcaloide, a Figura 11 apresenta a estrutura da morfina, um alcaloide isolado da espécie *Papaver somniferum*, utilizado pelas suas propriedades soporíferas e analgésicas (PINTO, 2002). São compostos

solúveis em água e apresentam várias atividades biológicas. Dentre elas a inseticida na proteção da planta contra insetos predadores (TAIZ; ZEIGER, 2004).

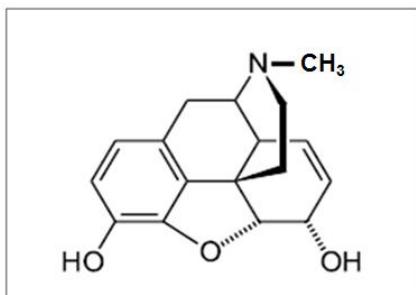


Figura 11: Estrutura do alcaloide morfina.

Fonte: Pinto (2002).

São sintetizados a partir do metabolismo secundário das plantas, através de reações de descarboxilação dos aminoácidos ou a partir de intermediários envolvidos na síntese destes. Os principais aminoácidos envolvidos na biossíntese dos alcaloides são ornitina, lisina, ácido nicotínico, tirosina, triptofano, ácido antranílico e histidina (DEWICK, 2009). Na sua rota biossintética, as enzimas triptofano descarboxilase e tirosina descarboxilase modificam estes aminoácidos transformando-os em precursores de alcalóides e desviando-os do processo de síntese de proteínas (PORTO, 2009).

Nos seres humanos os alcalóides desempenham funções fisiológicas e psicológicas devido a possuírem interação com neurotransmissores, como a cocaína, nicotina, dopamina, propranolol, metoprolol e nadolol. Em altas concentrações estes alcalóides são tóxicos, contudo, em baixas concentrações têm ação terapêutica, agindo como relaxantes musculares, tranquilizantes e analgésicos (GARCÍA; CARRIL, 2009; DEWICK, 2009).

1.2.4 Xantonas

A palavra xantona é originada do grego e significa amarelo, que é a cor característica desses compostos. São uma classe de substâncias formadas estruturalmente por dois anéis benzênicos A e B e uma *gama*-pirona central C (Figura 12). No anel A, nas posições 1-4 e no anel B, nas posições 5-8 podem ocorrer substituição nos átomos de carbonos, originando vários derivados xantônicos obtidos por meio naturais ou sintéticos (CORRÊA, 2009).

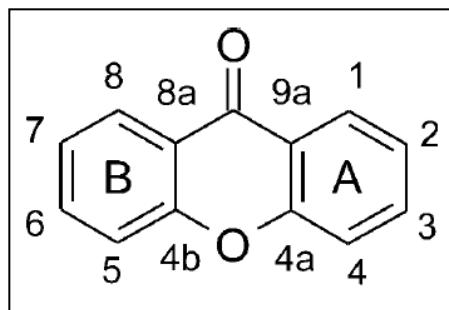


Figura 12: Estrutura básica de xantonas com núcleos numerados.

Fonte: Pedro (2002).

A mangiferina (Figura 13) é uma xantona que possui grande versatilidade de ações biológicas e farmacológicas como função neuroprotetora, cardioprotetora, hepatoprotetora, anticâncer, antioxidante, anti-inflamatória e antidiabética (CANUTO, 2009).

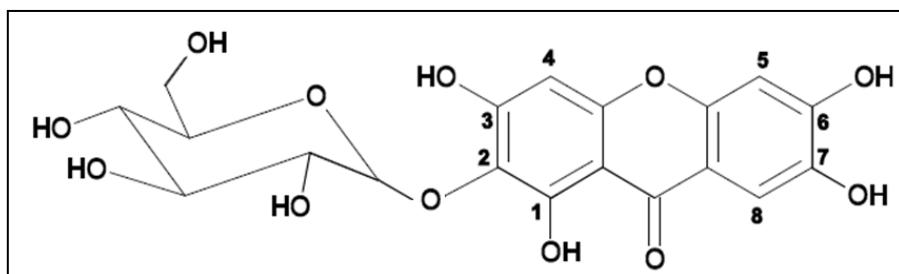


Figura 13: Estrutura da xantona glicosilada mangiferina - um composto bioativo de manga (*Mangifera indica L.*).

Fonte: Canuto (2009).

A mangostina (Figura 14) é outro exemplo de xantona isolada do cerne da madeira de *Garcinia mangostana*, conhecida como mangostão. As xantonas são os principais metabólitos secundários presentes no extrato hexânico dessa espécie, a qual também apresenta vários derivados prenilados (NILAR, 2002). O fruto dessa espécie, também apresenta xantonas preniladas que mostraram atividade inibitória contra os fungos fitopatogênicos *Fusarium oxysporum vasinfectum*, *Alternaria tenuis* e *Dreschlera oryzae* (GOPALAKRISHNAN et al., 1997).

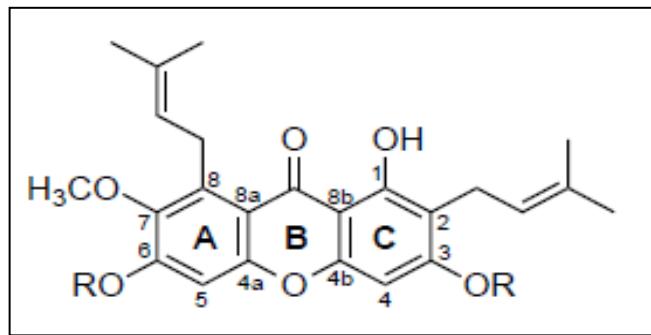


Figura 14: Estrutura da xantona prenilada – mangostina.

Fonte: Nilar (2002).

A globulixantona E (Figura 15) isolada da casca da raiz de *Sympmania globulifera*, é um xantona que apresentou atividade antimicrobiana contra as bactérias gram-positivas *Staphylococcus aureus*, *Bacillus subtilis* e *Vibrio anguillarium* com valores de CIM (em $\mu\text{g mL}^{-1}$) de 4,51, 3,12 e 5,56, respectivamente. (NKENGFACK et al., 2002).

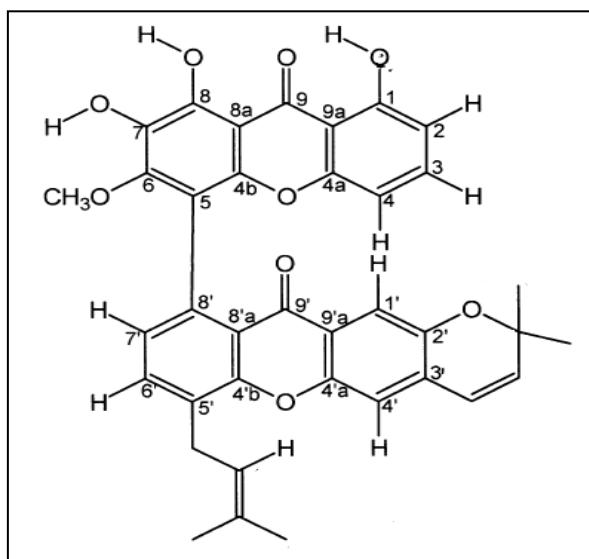


Figura 15: Estrutura da bis-xantona – globulixantona E.

Fonte: Nkengfack (2002).

A xantofulvina (Figura 16) isolada do fungo *Penicillium* sp. pode ser utilizada no tratamento da regeneração neural em alguns tipos de anosmia (KIKUCHI et al., 2003).

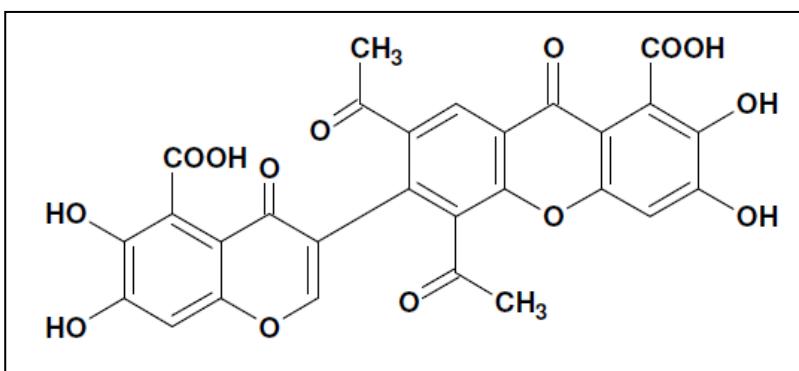


Figura 16: Estrutura da xantona xantofulvina.

Fonte: Corrêa (2009).

A possibilidade de inserção de diferentes substituintes em diferentes posições na estrutura das xantonas permite uma grande variedade de estruturas que apresentam atividade antioxidante, anti-inflamatória, anticancerígena, antifúngica, antiviral, entre outras (POULI; MARAKOS, 2009). As xantonas de origem natural possuem os substituintes em posições determinadas pela rota biossintética, assim a síntese de novos compostos pode ampliar as possibilidades das posições dos substituintes e identificar qual a característica da estrutura responsável pela atividade biológica. No trabalho de Pedro e outros (2002), vinte e sete xantonas foram avaliadas em testes *in vitro* pela capacidade de inibir o crescimento de três linhagens de células cancerígenas humanas, MCF-7 câncer de mama, TK-10 câncer renal e UACC-62 melanoma, os resultados mostraram que a posição e o número de substituintes no núcleo xântônico interfere nos efeitos das xantonas.

1.2.5 Óleos essenciais

Óleos essenciais são também chamados de óleos voláteis e constituem um dos mais importantes grupos de matérias primas para a indústria. São constituídos principalmente de monoterpenos, sesquiterpenos, fenilpropanóides (Figura 17) e outras substâncias de baixa massa molecular, formando misturas complexas de substâncias voláteis odoríferas e líquidas que formam o “bouquet” de cada óleo essencial (CRAVEIRO; QUEIROZ, 1993). Podem ser encontrados nas folhas, flores, cascas, madeira, raízes, frutos e sementes das plantas.

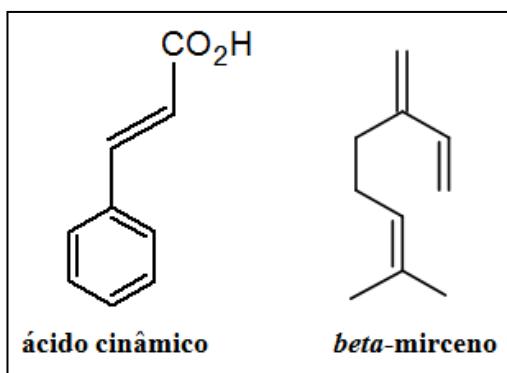


Figura 17: Estrutura do fenilpropanóide ácido cinâmico e do terpeno *beta*-mirceno.

Fonte: Dewick (2009).

A principal característica desses óleos essenciais é a volatilidade e isso os diferencia dos óleos fixos, os quais são formados por ácidos monocarboxílicos de cadeia longa saturada ou insaturada. Apresentam também outras características como: aparência oleosa à temperatura ambiente, aroma agradável e intenso, solubilidade em solventes orgânicos apolares e solventes de baixa polaridade e a maioria são incolores ou ligeiramente amarelados (LUPE, 2007).

Os óleos essenciais são importantes na sociedade por serem utilizados em diversas indústrias como a farmacêutica, a cosmética e a alimentícia. Eles são usados como aromas, fragrâncias, analgésicos, antissépticos, sedativos, expectorantes na indústria farmacêutica e na preparação de infusões para extrair os princípios ativos na medicina popular (BIZZO et al., 2009; FONSECA, 2001).

Os principais óleos produzidos no Brasil são: óleo essencial de laranja, *Citrus cinensis* L. Osbeck, com maior produção; óleo essencial de eucalipto, com destaque para a produção de óleo medicinal de *Eucalyptus globulus* e óleo para a perfumaria de *E. citriodora*, rica em citronelal e *E. staigeriana*, rica em citral; e óleo essencial de pau-rosa, *Aniba roseaodora* var *amazonica*, o Brasil é o único país fornecedor desse óleo no mundo. O linalol é o principal constituinte desse óleo extraído da madeira da planta e o estado de Amazonas é o maior exportador (BIZZO et al., 2009).

Os óleos essenciais fazem parte do metabolismo secundário das plantas e alguns fatores como o horário, a época de colheita e o ataque de patógenos podem influenciar na produção e variabilidade dos óleos. Além disso, a composição pode variar dependendo da localização e idade da planta (FONSECA, 2001). Assim, para a produção de compostos químicos desejáveis é importante o estudo do ambiente físico que a planta vive.

1.3 CONSTITUINTES QUÍMICOS DA MADEIRA E CASCA

A madeira é um material biológico bastante conhecido e utilizado como matéria-prima em diversas áreas como indústria de papel e celulose, marcenaria e carpintaria. É um material heterogêneo cuja composição química e física não pode ser determinada com precisão, uma vez que varia dentro da mesma espécie, com as condições ambientais como localização, clima, solo entre outros e com a idade da planta. Contudo, sua composição química pode ser dividida em dois grupos (Figura 18): componentes estruturais (substâncias macromoleculares que formam a parede celular das madeiras: celulose, hemicelulose e lignina) e componentes não estruturais ou extrativos (substâncias de baixa massa molecular: extrativos e substâncias minerais) (SILVA, 2010).

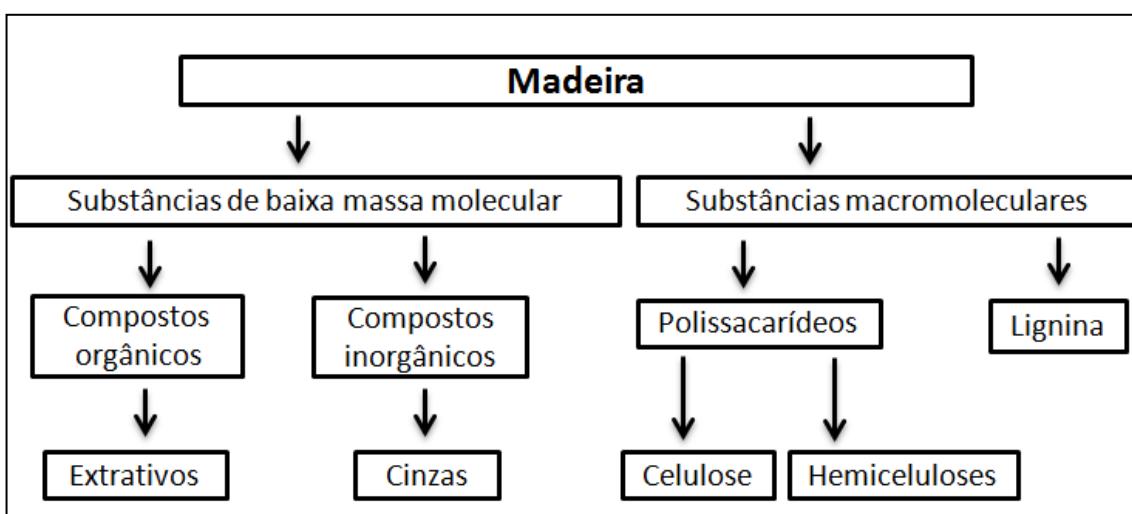


Figura 18: Esquema dos constituintes químicos da madeira.

Fonte: Silva (2010).

O tronco é constituído por seis camadas: casca externa, casca interna, câmbio vascular, alburno, cerne e âmago (Figura 19). A casca externa oferece proteção mecânica para a casca interna e também, ajuda a limitar a perda de água por evaporação. A casca interna (floema) é o tecido através do qual os açúcares produzidos pela fotossíntese são transportados das folhas para as raízes. O câmbio vascular é a camada entre a casca e a madeira e é responsável pela produção de ambos os tecidos. O alburno é a “vida ativa” da madeira, responsável pela condução de água ou seiva das raízes para as folhas. O âmago no centro do tronco é o resto do crescimento inicial do tronco, antes da madeira ser formada (WIEDENHOEFT; MILLER, 2005).

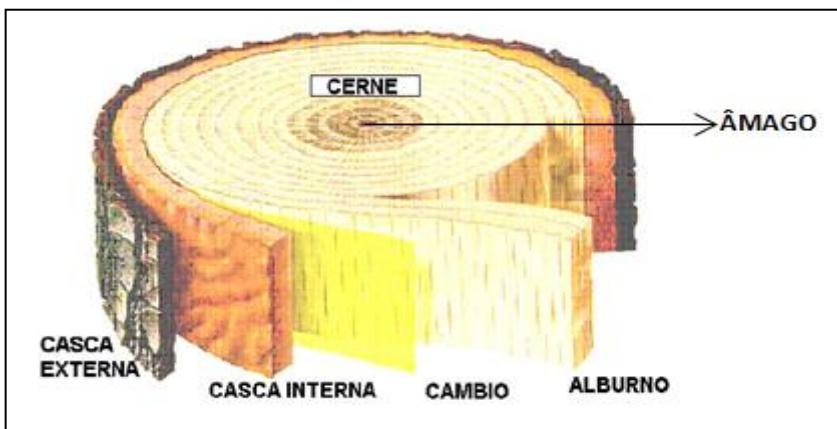


Figura 19: Aspectos macroscópicos de uma secção transversal do tronco de uma árvore.

Fonte: Adaptado de Klock (2005).

A madeira é mais bem definida quimicamente como um biopolímero tridimensional, formada por celulose, hemicelulose, lignina e uma menor quantidade de extractivos e compostos inorgânicos. O principal componente da árvore é a água, mas em base seca, a madeira é constituída de polímeros de açúcar (carboidratos, 65-75%) e lignina (18-35%). Pela análise elementar da madeira, sua constituição é 50% de carbono, 44% de oxigênio e 6% de hidrogênio (ROWELL et al., 2005). Botanicamente as árvores podem ser classificadas em coníferas (madeiras moles, gimnospermas) e folhosas (madeiras duras, angiospermas – plantas com frutos) (WIEDENHOEFT; MILLER, 2005).

A casca é um tecido complexo composto de duas regiões: casca interna, conhecida como floema ou entrecasca e casca externa, conhecida também como ritidoma ou periderme. É dividida da madeira ou xilema pelo câmbio vascular. A composição química da casca é complexa em comparação com a da madeira e varia entre diferentes espécies e entre casca interna e externa. Muitos constituintes químicos da madeira também estão presentes na casca, porém em diferentes proporções (ROWELL et al., 2005).

- **Substâncias macromoleculares**

A maior porção de carboidratos da madeira é composta de polímeros de celulose e hemicelulose. A combinação de celulose (40-45%) e hemicelulose (15-25%) é chamada holocelulose e geralmente representa 65-70% do peso seco da madeira (ROWELL et al., 2005).

A celulose é o principal constituinte da madeira. É um polímero (homopolissacarídeo) constituído de unidades de *beta*-D-glicose, ligadas entre si através de uma ligação glicosídica entre os carbonos 1 e 4 (Figura 20). Suas moléculas são lineares e têm grande tendência em formar ligações de hidrogênio intra e intermoleculares porque em cada unidade de glicose há três grupos hidroxila. Como consequência da sua estrutura fibrosa (regiões ordenadas e amorfas) e da forte ligação de hidrogênio em sua molécula, a celulose possui alta resistência à tração e elevada rigidez e é insolúvel na maioria dos solventes (SILVA, 2010; SJÖSTRÖM, 1993a).

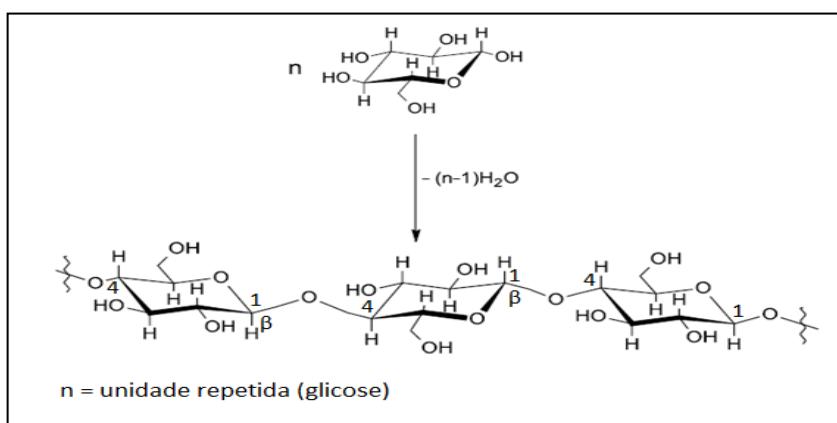


Figura 20: Esquema de formação da estrutura da celulose. Os substituintes OH-2, OH-3 e CH₂OH estão na orientação equatorial.

Fonte: Adaptado de Morais (2005).

Devido ao alto teor de extractivos da casca, especialmente de suberina, para o isolamento da celulose é necessário condições rigorosas de análise, o que provoca a degradação da celulose no processo de isolamento. Além disso, o conteúdo de celulose presente na casca é baixo (ROWELL et al., 2005).

As hemiceluloses são formadas por polissacarídeos heterogêneos como mostra a figura 21, diferenciando da celulose que é constituída apenas por unidades de glicose. Têm a função de suporte na parede celular assim como a celulose. São facilmente hidrolisadas por ácidos em seus monômeros que consistem principalmente em D-glicose, D-manoze, D-galactose, D-xilose, L-arabinose e em menor quantidade de ácidos urônicos (SJÖSTRÖM, 1993a). As cadeias carbônicas das hemiceluloses são mais curtas que as da celulose e podem conter ramificações (KLOCK et al., 2005). Na maioria das análises, as hemiceluloses encontradas na madeira são similares às encontradas na casca, com algumas variações na composição (ROWELL et al., 2005).

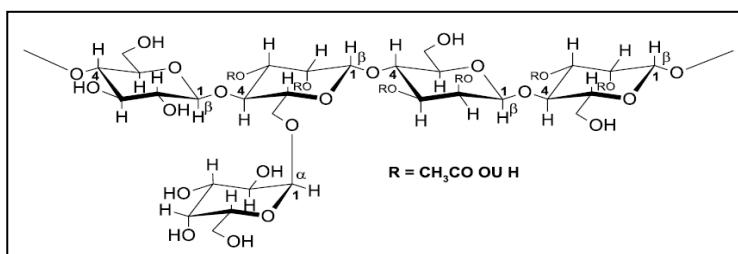


Figura 21: Estrutura da galactoglucomanana. Unidades de açúcar: *beta*-D-glicose, *beta*-D-manoze e *alfa*-D-galactose.

Fonte: Morais (2005).

A estrutura da lignina é amorfa, altamente complexa e constituída por polímeros aromáticos ramificados de unidades de fenilpropanóides. A estrutura tridimensional do polímero é composta de ligações C—C e C—O—C (ROWELL et al., 2005). É a segunda substância orgânica mais abundante na plantas, perdendo somente para a celulose. É insolúvel na maioria dos solventes orgânicos o que torna sua extração muito difícil sem ocorrer degradação. É encontrada na parede celular de vários tecidos de suporte e transporte, nos traqueídes e nos vasos do xilema. Possui função estrutural – fortalece os caules e tecidos vasculares permitindo o crescimento vertical e a condução de água e minerais através do xilema – e função protetora, devido sua resistência mecânica e natureza química evita que as plantas sirvam de alimento para os herbívoros tornando-as indigeríveis (GARCÍA; CARRIL, 2009).

Os precursores da biossíntese da lignina são o álcool *p*-cumarílico, álcool coniferílico e álcool sinapílico (Figura 22). A lignina da madeira pode ser classificada de acordo com a quantidade dos monômeros guaiacila (G), siringila (S) e *p*-hidroxifenila (H) derivados dos álcoois coniferílico, sinapílico e *p*-cumarílico, respectivamente (BARBOSA et al., 2008).

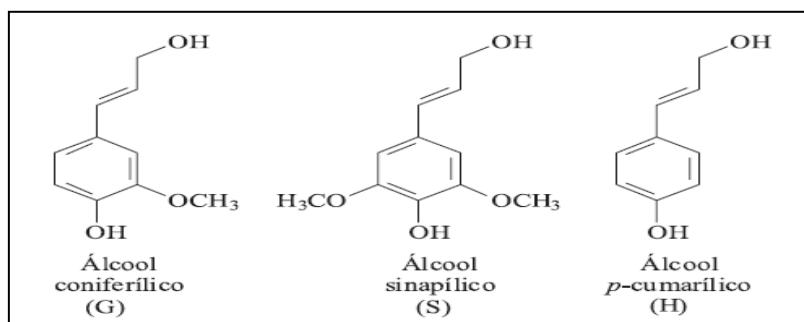


Figura 22: Estrutura dos álcoois precursores das unidades fenilpropanóides guaiacila (G), siringila (S) e *p*-hidroxifenila (H).

Fonte: Barbosa (2008).

A lignina de madeira mole é obtida como produto da polimerização do álcool coníferílico e é chamada de lignina guaiacil. A lignina de madeira dura é formada principalmente por unidades de siringil-guaiacil devido à copolimerização dos alcoóis coníferílico e sinapílico (ROWELL et al., 2005). A estrutura de uma lignina é apresentada na figura 23.

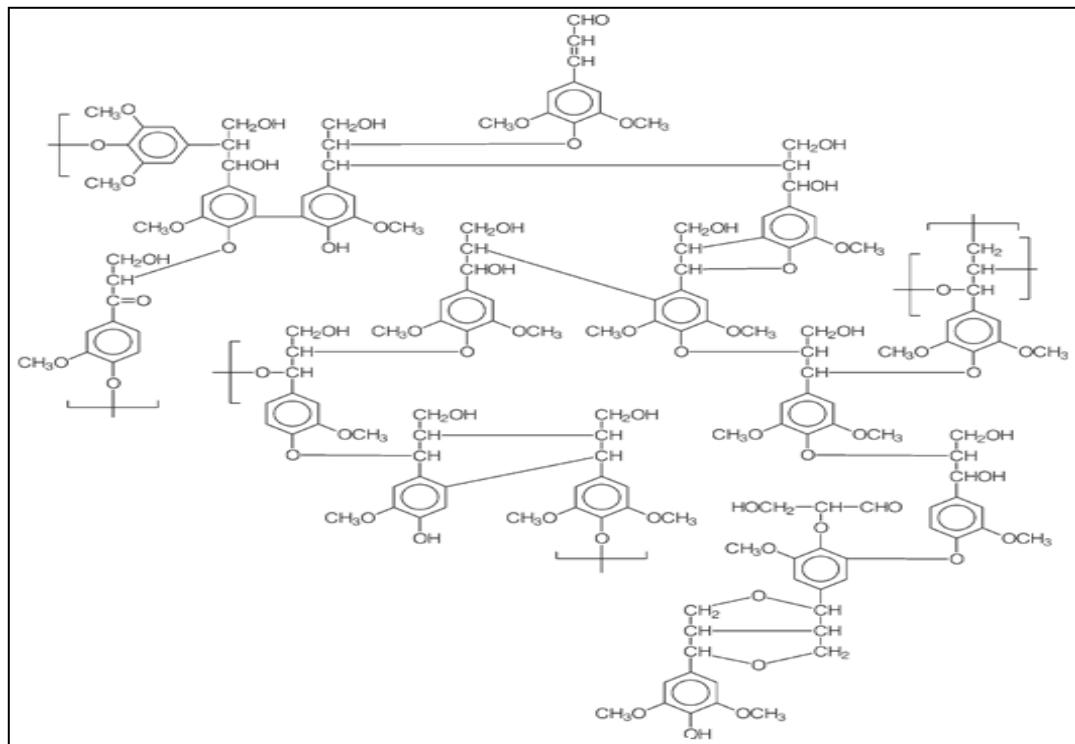


Figura 23: Estrutura proposta para lignina de madeira moída do *Eucalyptus grandis*.

Fonte: Morais (1993).

- **Substâncias de baixa massa molecular**

Os extrativos são formados por uma grande variedade de componentes solúveis em solventes orgânicos neutros ou água. Constituem um grupo de substâncias da parede celular formado principalmente de gorduras, ácidos graxos, alcoóis graxos, fenóis, terpenos, esteróides, ácidos de resina, ceras e muitos outros compostos orgânicos minoritários. Eles existem como monômeros, dímeros e polímeros. A maioria dos extrativos está localizada no cerne e são responsáveis pela cor, cheiro e durabilidade da madeira (ROWELL et al., 2005). Os diferentes tipos de extrativos são importantes para manter a diversidade biológica de funções da árvore, as gorduras constituem a fonte de energia das células da madeira e os terpenóides, ácidos de resina e compostos fenólicos protegem a madeira contra danos microbiológicos ou ataques de insetos (SJÖSTRÖM,

1993b). A casca contém maior quantidade de extractivos do que a madeira, a porcentagem de extractivos pode ser diferente mesmo para mesmas espécies porque depende do método de extração utilizado (ROWELL et al., 2005).

A madeira contém compostos inorgânicos, medidos como cinzas e não excedem 1% do peso da madeira em base seca. Eles são absorvidos pela árvore através das raízes e transportados por toda a árvore. Os metais presentes em maior quantidade nas cinzas da madeira são cálcio, potássio e magnésio, representando 80% das cinzas. Outros metais encontrados na madeira são manganês, zinco, ferro, alumínio, cromo, níquel entre outros. Os metais são encontrados como carbonatos, silicatos, oxalatos e fosfatos. A casca contém maior porcentagem de conteúdo mineral do que a madeira (2-5% do peso seca da casca), os metais são encontrados como oxalatos, fosfatos, silicatos, entre outros. Os principais metais encontrados na casca são sódio, cálcio, potássio, manganês, zinco, fósforo e magnésio (SJÖSTRÖM, 1993b; ROWELL et al., 2005).

1.4 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A pesquisa por novos agentes antimicrobianos, por exemplo, a partir de extractos vegetais, se faz necessária devido ao surgimento de microrganismos resistentes aos medicamentos atuais. O conhecimento da ação terapêutica desses extractos é importante no campo farmacêutico e cosmético para o desenvolvimento de novos medicamentos resistentes a microrganismos. O Brasil, o qual possui imensa biodiversidade vegetal, é, portanto, um país com grande potencial de estudos nessa área (OSTROSKY et al., 2008).

Os componentes responsáveis pela atividade antimicrobiana de espécies vegetais são sintetizados a partir do metabolismo secundário da planta (LOGUERCIO et al., 2005). A utilização de fitoterápicos e de plantas medicinais no tratamento de algumas doenças, também está relacionada à saúde bucal. As doenças periodontais podem ser definidas como um processo infeccioso, causado por microrganismos orais, os quais possuem a capacidade de implantar-se no sulco gengival e produzir substâncias tóxicas que provocam a degeneração do tecido periodontal (CORDEIRO et al., 2006).

As infecções odontológicas mais comuns descritas na literatura são: a cárie, a gengivite, a periodontite, a estomatite aftosa e a herpes simples. A cárie dentária é uma infecção microbiana dos tecidos calcificados dos dentes, em que ocorre a perda mineral destes, a gengivite é caracterizada por uma inflamação dos tecidos gengivais, que pode

evoluir a uma periodontite, uma doença periodontal de maior gravidade, que envolve a gengiva, o osso alveolar e o ligamento periodontal, caso não seja tratada pode levar à perda dos dentes. A estomatite aftosa é uma doença caracterizada pelo aparecimento de úlceras na mucosa da cavidade bucal e a herpes simples é uma doença infecciosa comum, causada pelo vírus do herpes simples (HSV), que se caracteriza pelo aparecimento de pequenas bolhas nos lábios (OLIVEIRA et al., 2007). Algumas destas infecções odontológicas, como a gengivite e a afta são tratadas através da fitoterapia, utilizando espécies vegetais como cravo da índia, romã, malva, amoreira, camomila, entre outras (OLIVEIRA et al., 2007).

O crescimento de microrganismos orais na cavidade bucal, é influenciado por fatores como temperatura, pH, disponibilidade de nutrientes e água, fluxo salivar e presença de substâncias antimicrobianas. Cada fator, num determinado habitat bucal, influencia a seleção de microrganismos orais e ajuda a manter o equilíbrio entre as populações bacterianas. Dessa forma, é observado diferenças da população bacteriana em diferentes partes da cavidade oral. Algumas espécies de bactérias como as do gênero estreptococos (*S. mutans*, *S. sobrinus*, *S. cricetus*, *S. rattus* e *S. sanguis*) são encontradas, principalmente, sobre os dentes, enquanto que *S. salivarius* é encontrada na língua (MARCOTTE; LAVOIE, 1998).

Nesse contexto, estudos sobre a ação terapêutica e eficácia de plantas medicinais frente a microrganismos orais, mostra-se como uma alternativa importante para melhorar o acesso da população aos cuidados com a prevenção e tratamento de doenças periodontais (CORDEIRO et al., 2006).

1.5 A ESPÉCIE *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc

Existem várias espécies pertencentes à família Guttiferae, também denominada Clusiaceae, no Brasil e algumas delas possuem propriedades medicinais. A família Clusiaceae foi descrita por Antonie Laurent de Jussieu e apresenta cerca de 1.370 espécies, distribuídas em 45 gêneros. A família é constituída por árvores ou arbustos e os gêneros *Hypericum*, *Vismia*, *Clusia*, *Calophyllum*, *Garcinia* e *Kielmeyera* têm importância econômica na produção de madeiras, gomas, pigmentos, óleos essenciais e resinas (DI STASI; HIRUMA-LIMA, 2002).

No Brasil a família Clusiaceae está distribuída nos domínios fitogeográficos Amazônia, Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (BITTRICH, 2010a). O gênero

Kielmeyera Mart. & Zucc é o segundo com maior número de representantes no Brasil, com 46 espécies e duas subespécies, perdendo somente para o gênero *Clusia* L., com 67 espécies e quatro subespécies (FRANCO et al., 2011).

A espécie *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc, conhecida popularmente como pau-santo, pertence à família Clusiaceae e foi descrita por Martius & Zuccarini. Está distribuída geograficamente no Brasil (Figura 24) nas regiões: Norte (Pará, Amazonas, Rondônia), Nordeste (Bahia), Centro-Oeste (Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, Mato Grosso do Sul), Sudeste (Minas Gerais, São Paulo) e Sul (Paraná), (BITTRICH, 2010b).

As plantas do gênero *Kielmeyera* são endêmicas na América do Sul e a espécie *Kielmeyera coriacea* frequentemente documentada, principalmente em cerrados, pode ser encontrada, além do Brasil, também no Paraguai e Bolívia. Segundo o Global Biodiversity Information Facility (GBIF, 2011), foram reportadas para esses países 31 e 7 ocorrências, respectivamente, dessa espécie .



Figura 24: Mapa da distribuição geográfica da espécie *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc no Brasil.

Fonte: Bitrich (2010b).

Esta espécie apresenta interesse econômico para a produção de madeira, carvão, celulose e tanino para a indústria de couro (PINTO et al., 1994). Da casca desta espécie é extraída a cortiça, muito utilizada na fabricação de placas de revestimentos acústicos, térmicos e decorativos (ARELLO; PINTO, 1993) e uma resina amarela tônica e emoliente, usada na medicina popular no tratamento de dores de dentes (CORREA, 1969).

A espécie em estudo (Figura 25) apresenta as seguintes características morfológicas: pode ser encontrada como arbusto ou árvore, com ramos tortuosos sem pêlos, com cicatrizes, casca espessa de cortiça que se desprega 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. As nervuras estão em destaque e em forma de pena (peninérvea). As inflorescências estão na extremidade dos ramos e possuem poucas flores (até 7 cm de diâmetro), de pétalas brancas e estames amarelo-ouro. Os frutos são secos (tipo cápsula) que abrem em 3 partes (valvas) e liberam grande quantidade de sementes aladas (REDE DE SEMENTES DO CERRADO, 1995).

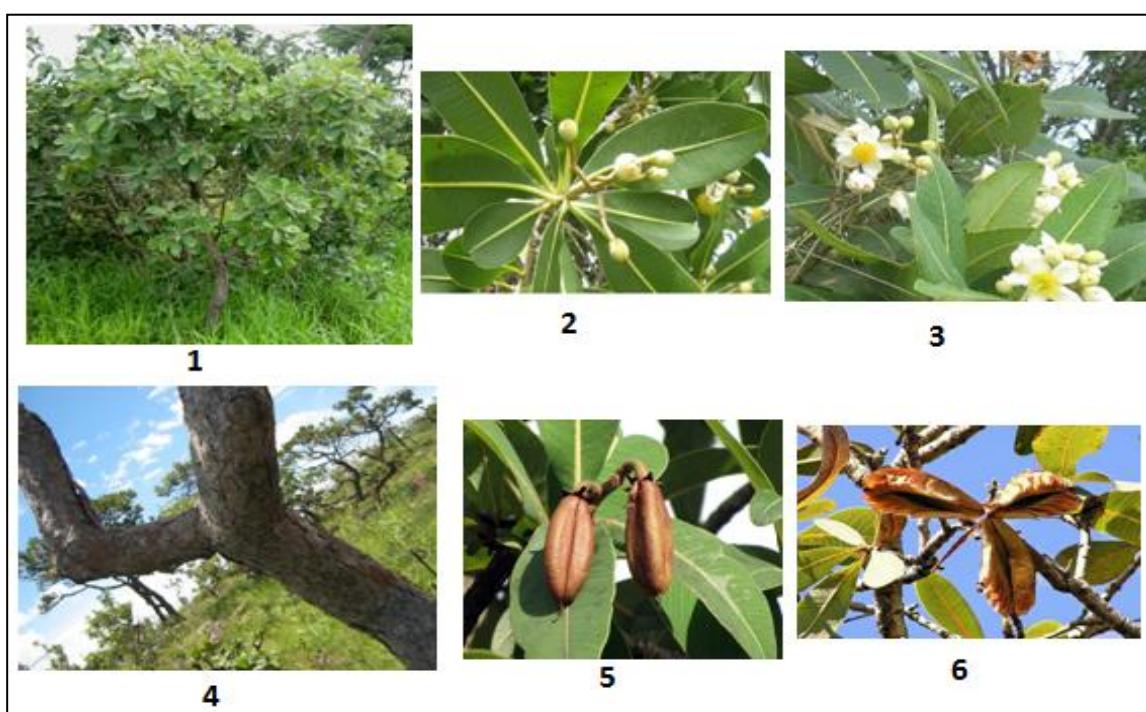


Figura 25: Imagens que mostram as características morfológicas da espécie *Kielmeyera coriacea*. 1 = arbusto; 2 = folhas – nervura central proeminente; 3 = flores no ápice dos ramos; 4 = tronco suberoso – casca espessa; 5 = fruto tipo cápsula; 6 = fruto aberto.

Fonte: Almeida-Manso (2011).

A espécie *Kielmeyera coriacea* é uma planta muito rica em xantonas, substâncias que apresentam propriedades farmacológicas como atividade antitumoral, antifúngica, antibacteriana, tuberculostática e anti-inflamatória (CORTEZ et al., 1999).

No trabalho de Cortez e outros (1999), oito xantonas e uma bifenila foram isoladas (Figura 26) do extrato em diclorometano da casca do caule de *K. coriacea*. No trabalho de Cortez e outros (1998) foram isolados e identificados dez xantonas, uma

bifenila e três tripterpenos do extrato diclorometano das folhas e caule de *K. coriacea*. Dos compostos isolados, quatro xantonas e a bifenila apresentaram atividade antifúngica contra o fungo patogênico *Cladosporium cucumerinum* e duas xantonas preniladas inibiram o crescimento de *Candida albicans*.

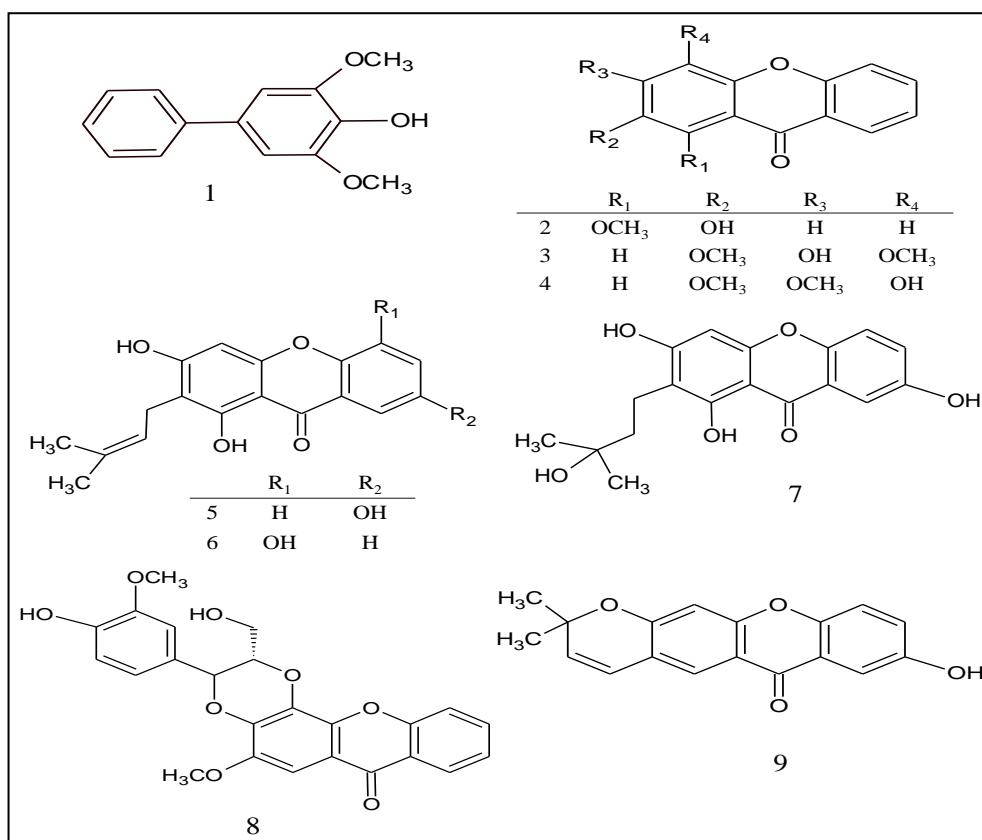


Figura 26: Estruturas químicas dos compostos isolados do extrato em diclorometano da casca do caule de *Kielmeyera coriacea*. 1 = Aucuparina; 2 = 2-hidroxi-1-metoxixantona; 3 = 3-hidroxi-2,4-dimetoxixantona; 4 = 4-hidroxi-2,3-dimetoxixantona; 5 = 1,3,7-triidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona; 6 = 1,3,5-triidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona; 7 = 1,3,7-triidroxi-2-(3-hidroxi-3-metilbutil)-xantona; 8 = kielcorina; 9 = osajaxantona.

Fonte: Cortez (1999).

Dos compostos isolados na Figura 26, a substância 1 (aucuparina) apresentou atividade antimicrobiana contra *Bacillus subtilis* com valor de concentração inibitória mínima (CIM) de $3,12 \mu\text{g mL}^{-1}$ e a substância 5 (1,3,7-triidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona) foi ativa contra *Staphylococcus aureus* com valor de CIM de $12,5 \mu\text{g mL}^{-1}$ (CORTEZ et al., 2002). Alguns trabalhos da literatura que relatam outros estudos referentes aos extratos da planta são apresentados a seguir.

Foi avaliado o efeito do extrato hidroalcoolico das folhas (AUDI et al., 2002) e caule (MARTINS et al., 2004) de *Kielmeyera coriacea* no sistema nervoso central em ratos e o extrato da folha mostrou-se efetivo como ansiolítico, mas não como um antidepressivo e o do caule apresentou perfil de composto ansiolítico e antidepressivo.

Com o objetivo de encontrar novos medicamentos de produtos naturais para o tratamento da úlcera, Goulart e outros (2005) relataram o efeito do extrato hidroetanólico do caule de *K. coriacea* em lesões gástricas induzidas em ratos. Os resultados mostraram que o extrato aumentou a resistência a agentes necrosantes, fornecendo efeito de proteção sobre a mucosa gástrica.

A literatura relata que a classe das xantonas inibe o metabolismo energético mitocondrial. A ação do extrato hidroetanólico do caule foi investigada sobre o metabolismo energético hepático utilizando uma mitocôndria isolada de fígado de rato. Os resultados da pesquisa sugerem que o extrato de *Kielmeyera coriacea* prejudica o metabolismo energético hepático, atuando como desacoplador e inibidor mitocondrial, podendo levar ao aparecimento de efeitos adversos. Contudo, esse resultado pode ser à base da ação antifúngica e antiprotozoário que o extrato apresenta (ZAGOTO et al., 2006).

A toxicidade do extrato diclorometano do caule de *K. coriacea* foi avaliada em roedores e os resultados mostraram que a administração oral do extrato não apresentou nenhum efeito tóxico podendo ser utilizado com segurança (OBICI et al., 2008).

Extratos de *K. coriacea* foram testados contra o fungo dermatófito *Trichophyton rubrum* e apresentaram atividade promissora contra essa fungo. Existe um grande interesse em descobrir novas substâncias a partir de extratos de plantas do cerrado para o tratamento de infecções dermatofíticas (SILVA et al., 2009).

A ação larvicida sobre larvas de *Aedes aegypti* do extrato diclorometânico das folhas de *K. coriacea* foi avaliada. Os resultados sugerem o fracionamento e a biomonitoração do extrato para o isolamento de substâncias ativas sobre as larvas do mosquito *A. aegypti* (COELHO et al., 2009).

A partir do fracionamento do extrato hexânico da casca da raiz de *K. coriacea* obtém-se uma mistura de *delta*-tocotrienol e o seu dímero (Figura 27). A citotoxicidade dessa mistura foi testada contra quatro células cancerígenas humanas (melanoma, cólon, leucemia e glioblastoma). Os resultados sugerem que a mistura suprime o crescimento da leucemia e reduz a sobrevivência da célula, dependendo da concentração utilizada (MESQUITA et al., 2011).

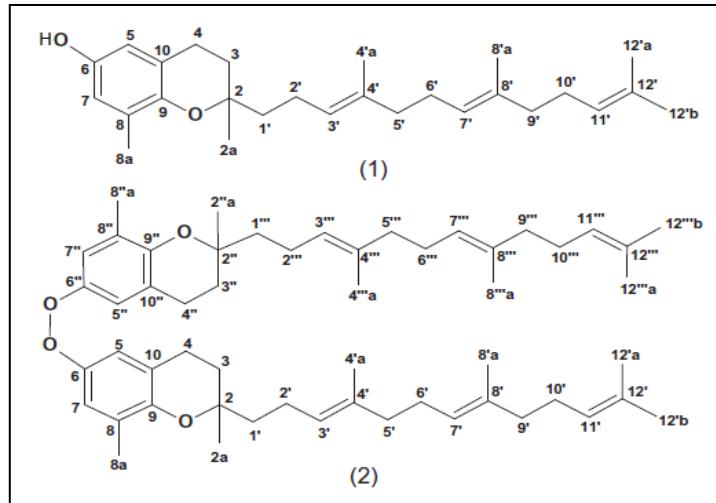


Figura 27: Estruturas químicas do *delta*-tocotrienol (1) e *delta*-tocotrienol peróxido dímero (2).

Fonte: Mesquita (2011).

1.6 FLUXOGRAMAS UTILIZADOS NO PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

Para os procedimentos experimentais a metodologia utilizada encontra-se resumida nos fluxogramas das Figuras 28 e 29.

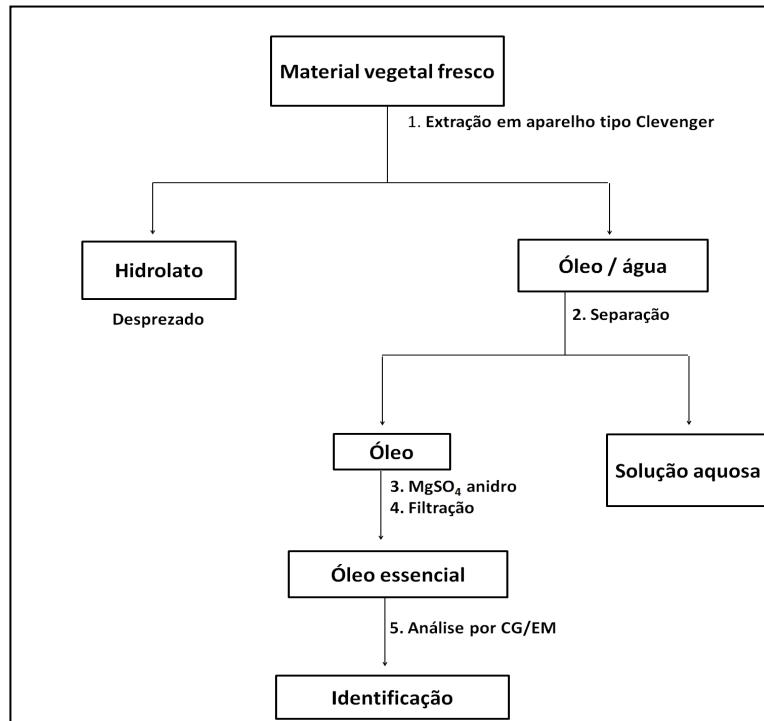


Figura 28: Fluxograma de trabalho utilizado na extração e identificação dos óleos essenciais.

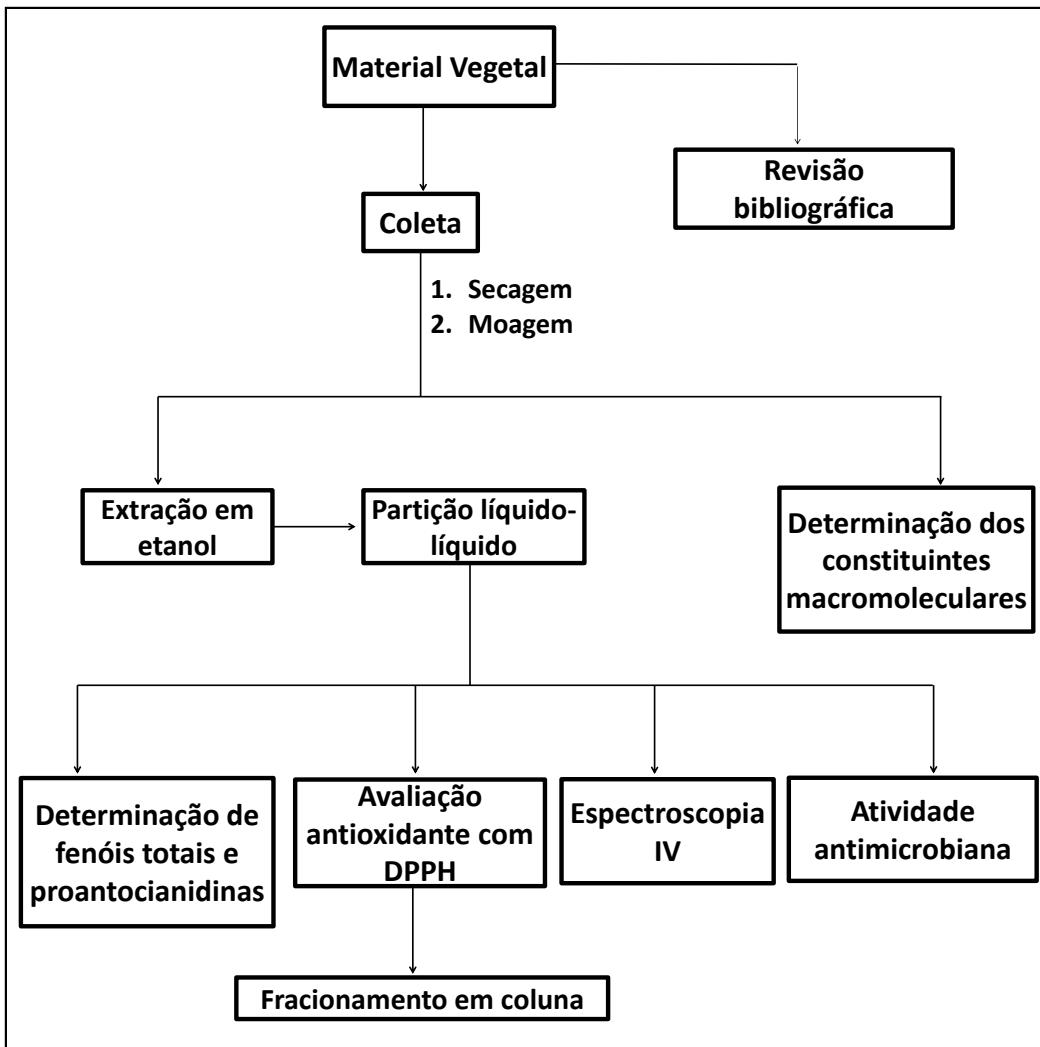


Figura 29: Fluxograma de trabalho utilizado nas análises químicas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Este trabalho teve como objetivo analisar e quantificar os constituintes químicos das partes aéreas, bem como avaliar a atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos da espécie *Kielmeyera coriacea*, conhecida popularmente como pau-santo, árvore típica do Cerrado brasileiro.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os constituintes macromoleculares da madeira, casca interna e casca externa;
- Identificar os constituintes voláteis do óleo essencial da folha, flor, casca interna, casca externa e madeira por CG-EM;
- Determinar o teor de fenóis totais e proantocianidinas dos extratos e das partições;
- Caracterizar os extratos e partições por espectroscopia no infravermelho;
- Avaliar a atividade antioxidante dos extratos e das partições frente ao radical livre DPPH;
- Fracionar em coluna a partição em diclorometano da casca interna que apresentou melhor atividade antioxidante;
- Avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos e das partições frente a microrganismos bucais (*Streptococcus sanguinis*, *Streptococcus mitis*, *Streptococcus mutans* e *Actinomyces naeslundii*).

3 JUSTIFICATIVA

O bioma Cerrado é a segunda maior área em abundância de plantas nativas do Brasil, ocupando 23% do território nacional. Está localizado basicamente no planalto central e é considerado um complexo vegetacional de grande heterogeneidade fitofisionômica. Este bioma é apontado como grande detentor de diversidade biológica, sendo a formação savânica com maior diversidade vegetal do mundo, especialmente quando se consideram as espécies lenhosas (GUARIM-NETO; MORAIS, 2003).

A flora do Cerrado ainda é pouco conhecida e há poucos estudos voltados para a identificação de plantas úteis, principalmente quando comparada à diversidade e à área ocupada. A pouca informação sobre a flora do Cerrado brasileiro acarreta uma grande perda de conhecimento sobre a utilização de plantas para uso medicinal, uma vez que estima-se que cerca de 40% do bioma já tenha sido devastado e que este possui somente 1,5% de sua extensão protegida por lei, sendo atualmente a vegetação em maior risco no país (GUARIM-NETO; MORAIS, 2003).

Neste contexto, nosso grupo de pesquisa de Produtos Naturais do Instituto de Química da UFU vem estudando algumas espécies nativas e tem interesse em estudar a espécie vegetal *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc, típica do cerrado. Existem poucos estudos sobre sua identificação química. Seu óleo essencial, por exemplo, ainda não foi caracterizado. Adicionalmente, ela apresenta grande interesse econômico para produção de madeira, carvão, celulose, tanino para indústria de couros e placas para revestimento acústico e é considerada como planta medicinal pelas suas propriedades cercaricidas e pela presença de xantonas (substâncias medicinais) que são fitonutrientes com poderosas propriedades antioxidantes. Com a expansão agrícola nos cerrados, a espécie *K. coriacea* vem sendo vítima de uma exploração predatória tornando-se extinta em muitas regiões (PINTO et al., 1996).

4 PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL

4.1 COLETA E PREPARO DO MATERIAL VEGETAL

As partes aéreas de *Kielmeyera coriacea* foram coletadas na cidade de Uberlândia, em abril de 2010, no bairro Jardim Karaíba, próximo a Vila Royal Park ($18^{\circ}94'08.27''S$; $48^{\circ}26'06.40''W$) e transportada para o laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de Uberlândia. Em seguida sua exsicata foi preparada, identificada pelo professor Glein Monteiro de Araújo (Instituto de Biologia – UFU), e depositada no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia (HUFU) com o número 57181. As amostras (folha, madeira, casca interna e casca externa) da planta foram cortadas, descascadas e posteriormente picadas. A secagem ocorreu em temperatura ambiente. Após esse período, o material seco foi triturado até a forma de fino pó.

Para a análise de óleo essencial foi utilizado material fresco, coletado poucas horas antes da extração.

4.2 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE

Para a determinação da umidade utilizou-se uma balança de luz infravermelha da marca Kett, modelo FD-600. Cerca de 1,0 g de amostra foi deixada a uma temperatura de $105^{\circ}C$ por quinze minutos até que o teor de umidade permanecesse constante.

4.3 DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA CASCA E MADEIRA DE *Kielmeyera coriacea*

4.3.1 Determinação do teor de cinzas

Para a determinação do teor de cinzas, aproximadamente de 2 g de amostra foi transferido para cadinhos de porcelana previamente calcinados, esfriados e pesados. Após a distribuição uniforme das amostras nos cadinhos, as mesmas foram incineradas na temperatura de aproximadamente $600^{\circ}C$ por 6 horas. Após esta etapa foram calculadas as porcentagens de cinzas em relação ao pó que foi submetido ao processo de secagem.

4.3.2 Preparação da amostra livre de extractivos

Uma amostra de aproximadamente 40 g de madeira e cascas foi colocada em um cartucho de papel filtro e adaptado ao extrator Soxhlet. Foram realizadas três extrações com 300,0 mL dos solventes: cicloexano, cicloexano:etanol (2:1 v v⁻¹) e água sucessivamente. A extração com cada solvente foi feita por um período de 25 horas. Em seguida, o material vegetal livre de extractivos foi retirado do aparelho Soxhlet e deixado em dessecador até a evaporação completa do solvente (amostra A).

Esse procedimento de extração foi realizado por mais duas vezes, obtendo-se as amostras B e C. As amostras A, B e C foram utilizadas na determinação de lignina insolúvel e lignina solúvel em ácido e determinação de holocelulose.

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

Para a determinação de lignina de Klason, lignina solúvel em ácido e da holocelulose nas cascas é necessário a realização de um pré-tratamento da casca em meio básico para solubilização de substâncias que também são insolúveis em ácidos minerais e seriam contabilizadas no rendimento final.

Nesse pré-tratamento, 2 g (40/60 meshes) das cascas foram tratadas com uma solução de hidróxido de sódio 1% (m v⁻¹) a 90 °C durante 1 hora. O resíduo obtido foi filtrado em cadinho de vidro sinterizado, lavado sucessivamente com 100 mL de água destilada quente, 50,0 mL de ácido acético 10% (v v⁻¹) e novamente com 200,0 mL de água quente, seco a 105 ± 3 °C e pesado. O rendimento foi calculado.

A lignina de Klason foi determinada de acordo com o método descrito por Browning (1967). Aproximadamente 1 g da amostra livre de extractivos e pré-tratada (40/60 meshes), foi colocada em um béquer e adicionou-se 15,0 mL de uma solução de ácido sulfúrico 72%, de forma lenta e sob agitação constante. A mistura foi deixada em repouso por duas horas à temperatura ambiente, agitando a cada 10 minutos. Em seguida a mistura foi diluída num balão de destilação de 1,0 L com 560,0 mL de água e refluxada durante 4 horas. Depois disso, a solução foi resfriada, filtrada e o resíduo lavado com água destilada até pH neutro. O resíduo foi seco em estufa a 105 °C até massa constante. O rendimento foi determinado pela diferença entre a massa pré-tratada e a massa do resíduo obtido.

4.3.4 Determinação de lignina solúvel

O filtrado do procedimento anterior foi colocado em um balão volumétrico de 1,0 L e completado com água destilada até o volume do balão. A partir dessa solução, foi retirado 10,0 mL e acrescentado mais 5,0 mL de água destilada, formando assim uma segunda solução. A partir dessa nova solução foi possível determinar quantitativamente a lignina solúvel por espectroscopia ultravioleta (UV), a partir da análise das bandas de absorção nas regiões de 215 e 280 nm do espectro. Foi feito um branco realizando o mesmo procedimento para determinação de lignina insolúvel, entretanto, sem a presença de cascas livres de extractivos. A concentração de lignina solúvel foi calculada segundo a equação 3 (GOLDSCHIMID, 1971 apud MORAIS, 2005):

$$C_{LS} = \frac{4,53A_{215} - A_{280}}{300} \quad \text{Equação 3}$$

em que:

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

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

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

4.3.5 Determinação de holocelulose

O teor de holocelulose foi determinado pelo método descrito por Browning (1967). Inicialmente foi realizado o pré-tratamento de 8,0 g das cascas livres de extractivos com solução de hidróxido de sódio 1% (m v^{-1}) como descrito anteriormente. Em seguida, em um erlenmeyer de 1,0 L foram adicionados cerca de 5,0 g de amostra livre de extractivos e pré-tratada (40/60 meshes). Foram adicionados 110,0 mL de água destilada; 3,0 mL de ácido acético glacial; 22,0 mL de solução de acetato de sódio a 20% (m v^{-1}) e 9,0 mL de clorito de sódio a 40% (m v^{-1}), respectivamente. A mistura foi homogeneizada com agitação magnética, vedada com um erlenmeyer de 100,0 mL invertido para evitar a saída prematura de gases e colocada em banho aquecido a 75 °C por 60 minutos, sob agitação frequente. A adição dos reagentes foi repetida por mais três vezes a cada intervalo de 60 minutos, até que foi observada a holocelulose com coloração branca. Em seguida, a solução foi filtrada em cadinho de vidro sinterizado sob vácuo. O filtrado foi lavado com cerca de 1,0 L de água destilada, duas porções

pequenas de acetona (cerca de 10,0 mL cada porção) e aspirado até a holocelulose ficar relativamente seca. O produto foi seco em estufa a 70 °C por 24 horas e o rendimento calculado.

4.4 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE *Kielmeyera coriacea*

4.4.1 Extração do óleo essencial por hidrodestilação

A extração dos óleos voláteis foi realizada por hidrodestilação em aparelho Clevenger. Aproximadamente 30 g das amostras frescas (folha, flor, casca externa, casca interna e madeira) foram colocadas em um balão volumétrico com 150,0 mL de água. Após 4 horas em ebulição, o óleo foi recolhido em um funil de separação com cerca de 2,0 mL de diclorometano, onde foi separado da fase aquosa (MORAIS et al., 2009). Os óleos essenciais extraídos foram secos com sulfato de sódio anidro, acondicionados em pequenos frascos de vidro âmbar e mantidos sob refrigeração, à temperatura de aproximadamente $-18,0 \pm 5^{\circ}\text{C}$ até o momento das análises. A massa do óleo essencial obtido foi pesada em uma balança analítica, e calculou-se percentagem correspondente de óleo, em relação à massa da amostra.

4.4.2 Análise dos óleos essenciais por CG-EM

A identificação dos constituintes voláteis foram realizadas por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG-EM) num aparelho da Shimadzu, modelo GC17A/QP5000. O programa de temperatura foi de 60-240 °C ($3^{\circ}\text{C min}^{-1}$); injetor no modo split 1:20 a 220°C; hélio a fluxo constante de 17 mL min^{-1} . O detector de massas operou com energia de impacto de 70 eV e foram captados os fragmentos de 40 a 650 u; a temperatura da interface foi de 240 °C. Dois microlitros das amostras foram injetados. (ADAMS, 2001).

4.4.3 Identificação dos óleos essenciais

A identificação dos compostos foi feita por comparação dos seus espectros de massas com aqueles armazenados nas bibliotecas de espectros de massas da Wiley (7, 139 e 229) e Nist (127 e 147), por comparação com índices de Kovat tabelados

(ADAMS, 2001) e por meio de alguns padrões de terpenos. Para obtenção da equação do índice de Kovats, foi utilizada uma mistura de padrões de alcanos pares (C8-C20). A quantificação de cada componente foi obtida através da normalização das áreas dos picos no cromatograma de íons totais (*TIC, total ions chromatografics*).

4.5 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.5.1 Preparação dos extratos em etanol

Foram pesadas 100,0 g das amostras (folha, madeira e cascas) e transferidas para um cartucho e colocado em um extrator Soxhlet com 650 mL de etanol. A extração foi realizada por 6 horas após o inicio da ebulação. A solução obtida foi filtrada e levada a um evaporador rotativo a 40 °C para retirada do etanol. Os extratos foram guardados em frascos de vidro e armazenados no freezer a -18,0 ± 5 °C até sua utilização (FERRI, 1996).

4.5.2. Partição líquido-líquido dos extratos em etanol

Os extratos em etanol foram submetidos à partição líquido-líquido com solventes de polaridades crescentes (cicloexano, diclorometano e acetato de etila). Cada uma das soluções obtidas foi concentrada em evaporador rotativo, sob pressão reduzida, fornecendo, então, as respectivas partições do extrato bruto (MATOS, 1997).

4.5.3 Determinação de fenóis totais (FT)

A determinação do teor de fenóis totais presentes no extrato em etanol e nas partições obtidas foi realizada por meio de espectroscopia na região do visível utilizando o método de Folin–Ciocalteau (SINGLETON; ROSSI, 1965; SOUSA et al., 2007) que contém uma mistura de ácidos fosfomolibídico e fosfotungstico, com formação de um complexo de coloração amarela, e com absorção máxima em 760 nm. Uma alíquota contendo 25 mg de amostra foi dissolvida em metanol, transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50,0 mL e o volume final completado com metanol. Para a reação colorimétrica, uma alíquota de 0,5 mL da solução

metanólica de extrato foi adicionada de 2,5 mL de solução aquosa do reativo Folin-Ciocalteau a 10% e 2,0 mL de carbonato de sódio a 7,5%. A mistura foi incubada por 5 minutos em banho-maria a 50 °C e, posteriormente, a absorbância foi medida a 760 nm, utilizando-se cubetas de vidro, tendo como “branco” o metanol e todos os reagentes, menos a amostra. O teor de fenóis totais foi determinado empregando-se a equação da reta obtida pela curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e expressos como mg de EAG (equivalentes de ácido gálico) por grama de extrato.

4.5.4 Determinação do teor de taninos condensados (proantocianidinas)

Para a determinação dos taninos condensados foi utilizado o método da vanilina (GODEFROOT et al., 1981 apud MORAIS et al., 2009). Uma alíquota contendo 25 mg de amostra foi dissolvida em metanol, transferida quantitativamente para um balão volumétrico de 50,0 mL e o volume final completado com metanol. Desta solução foi retirado uma alíquota de 2,0 mL, transferida para um tubo de ensaio e adicionado 3,0 mL de uma solução recém-preparada de vanilina em ácido sulfúrico 70%, na concentração de 5,0 mg mL^{-1} . A mistura foi mantida em um banho de água a uma temperatura de 50 °C por 15 minutos. A amostra foi esfriada e a absorbância medida a 500 nm utilizando-se cubetas de vidro, tendo como “branco” o metanol e todos os reagentes, menos a amostra. O teor de taninos condensados foi determinado empregando-se a equação da reta obtida pela curva de calibração construída com padrões de catequina (1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 22 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). A curva padrão foi construída nas mesmas condições da reação em que a amostra foi substituída pela catequina. Os resultados foram expressos como mg de ECAT (equivalentes de catequina) por grama de extrato.

4.5.5 Análise quantitativa da atividade antioxidante

A avaliação quantitativa da atividade antioxidante dos extratos e partições foi feita seguindo metodologia descrita na literatura, com pequenas modificações, monitorando-se o consumo do radical livre DPPH pelas amostras, através da medida do decréscimo da absorbância de soluções de diferentes concentrações. Estas medidas

foram feitas em espectrofotômetro UV-Vis no comprimento de onda 517 nm (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; SOUSA et al., 2007).

4.5.5.1 Construção da curva de calibração do DPPH

Preparou-se 50 mL de solução estoque de DPPH em metanol na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$, mantida sob refrigeração e protegida da luz. Foram feitas diluições de 35, 30, 25, 20, 15, 10, 5 e 1 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A curva de calibração foi construída a partir dos valores da absorbância a 517 nm de todas as soluções (1 a 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$), medidas em cubetas de vidro com percurso óptico de 1 cm e tendo como “branco” o metanol.

4.5.5.2 Leitura das medidas de absorbância nas amostras

Soluções dos extratos em etanol (500 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e das partições obtidas foram diluídas nas concentrações de 250, 200, 150, 100, 50 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$. As medidas das absorbâncias das misturas reacionais (0,3 mL da solução da amostra e 2,7 mL da solução estoque de DPPH na concentração de 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) foram realizadas a 517 nm, no 1º, 5º e 10º min até completar 1 hora. A mistura de metanol (2,7 mL) e solução em metanol do extrato e das partições (0,3 mL) foi utilizada como branco. A partir da equação da curva de calibração e dos valores de absorbância no tempo de 60 min para cada concentração testada, foram determinados os percentuais de DPPH remanescentes (% DPPH_{REM}), conforme a Equação 4 (YILDIRIM et al., 2001):

$$\% \text{ DPPH}_{\text{REM}} = [\text{DPPH}]_{T=t} / [\text{DPPH}]_{T=0} \times 100 \quad \text{Equação 4}$$

onde $[\text{DPPH}]_{T=t}$ corresponde à concentração de DPPH no meio, após a reação com o extrato e $[\text{DPPH}]_{T=0}$ é a concentração inicial de DPPH, ou seja, 40 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A concentração eficiente, quantidade de antioxidante necessária para decrescer a concentração inicial de DPPH em 50% (CE_{50}) foi determinada a partir de uma curva exponencial de primeira ordem, obtida plotando-se na ordenada as concentrações da amostra ($\mu\text{g mL}^{-1}$) e na abscissa a porcentagem de DPPH remanescente (% DPPH_{REM}). Os valores de absorbância em todas as concentrações testadas, no tempo de 60 min, foram também convertidos em porcentagem de atividade antioxidante (AA), determinada pela Equação 5 (SOUSA et al., 2007):

$$\% \text{AA} = \{[\text{Abs}_{\text{controle}} - (\text{Abs}_{\text{amostra}} - \text{Abs}_{\text{branco}})] \times 100\} / \text{Abs}_{\text{controle}} \quad \text{Equação 5}$$

Onde: $\text{Abs}_{\text{controle}}$ é a absorbância inicial da solução em metanol de DPPH e $\text{Abs}_{\text{amostra}}$ é a absorbância da mistura reacional (DPPH+amostra).

4.6 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA NO INFRAVERMELHO

Os extratos em etanol e as partições obtidas das amostras foram submetidos à análise por espectroscopia no infravermelho, utilizando-se de um espectrômetro Shimadzu IR - Prestige-21, que permite a leitura do espectro de infravermelho na região de 4000 a 500 cm^{-1} , com resolução de 4 cm^{-1} e acumulando 32 varreduras. Os espectros foram registrados a partir de pastilhas de KBr na proporção 1:100 (m m^{-1}).

4.7 MONITORAMENTO POR CROMATOGRAFIA EM CAMADA DELGADA (CCD) COM SÍLICA GEL DAS PARTIÇÕES EM METANOL-ÁGUA 9:1 E EM DICLOROMETANO DA CASCA INTERNA

No monitoramento por CCD das partições em metanol-água 9:1 e em diclorometano da casca interna foram utilizadas placas de vidro (11,2 x 2,8 cm). A espessura do adsorvente (sílica gel 60, 70-230 MESH ASTM) foi de 0,5 mm. Uma suspensão do adsorvente foi preparada em água destilada e mantendo-se a placa na horizontal. Em seguida, a suspensão foi transferida para a superfície da placa, espalhando-se o material de maneira bem uniforme. A ativação das placas (adsorvente livre do solvente) foi feita em estufa a 105°C, por 30 minutos.

4.7.1 Fracionamento por cromatografia em coluna da partição em diclorometano

Para o fracionamento da partição em diclorometano da casca interna em coluna empacotada com sílica gel (fase estacionária) foram utilizadas 2,0 g da partição em diclorometano da casca interna, que foram eluídas nos seguintes solventes: cicloexano/acetato de etila 1:1, cicloexano/acetato de etila 4:6, cicloexano/acetato de etila 3:7, cicloexano/acetato de etila, 2:8, acetato de etila, acetato de etila/metanol 9:1, acetato de etila/metanol 8:2, acetato de etila/metanol 7:3, acetato de etila/metanol 6:4,

acetato de etila/metanol 1:1, acetato de etila/metanol 4:6, acetato de etila/metanol 3:7, acetato de etila/metanol 2:8, acetato de etila/metanol 1:9, metanol e metanol/água 8:2.

4.8 ANÁLISE DAS FRAÇÕES 5 E 6 POR CLAE

As frações 5 e 6 obtidas após fracionamento em coluna foram submetidas a análise por CLAE. Para a análise das amostras foi utilizado um cromatógrafo da marca Shimadzu, modelo SCL-10A VP, equipado com detector SPD-M10A VP do tipo “rede de diodos”, com um sistema de bombeamento quaternário LC-10AD VP. Foi usada uma coluna de fase reversa C18 da marca Shimadzu modelo CLC-ODS (M), 4,6 mm de diâmetro interno e 25 cm de comprimento, tamanho das partículas de 5 µm e tamanho dos poros com 10 nm de diâmetro. O volume injetado em cada corrida foi de 20 µL com um fluxo de 0,7 mL min⁻¹. Foi usado um sistema de solventes com gradiente de tampão de fosfato (solução A) preparado com 5% de solução de diidrogeno fosfato de potássio 0,2 mol L⁻¹ e metanol (solução B).

O sistema de eluição dos solventes está apresentado na Tabela 2.

Tabela 2: Sistema de eluição para a análise em CLAE das frações 5 e 6.

Tempo (min)	Gradiente	
	A	B
5,0	90	10
15,0	80	20
20,0	65	35
30,0	55	45
50,0	0	100
55,0	90	10
60,0	90	10

(A)= solução 5% de KH₂PO₄ 0,2 mol L⁻¹, (B) = metanol

4.9 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A metodologia utilizada na determinação da atividade antimicrobiana dos extratos e das partições consistiu em avaliar a menor quantidade de amostra necessária para inibir o crescimento dos microrganismos-teste. Esse valor é expresso como Concentração Inibitória Mínima (CIM) (OSTROSKY, 2008). A leitura da concentração inibitória mínima (CIM) foi efetuada visualmente após incubação das bactérias durante 24 horas, a 37 °C.

A atividade antimicrobiana foi determinada utilizando o método da microdiluição em caldo (MIC), segundo o CLSI para os microrganismos aeróbios (CLSI, 2006) e CLSI para os microrganismos anaeróbios (CLSI, 2007). As análises foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da Universidade de Franca (LaPeMA), com a colaboração do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins. O procedimento experimental para a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) está detalhado no Apêndice A.

4.10 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises na determinação dos constituintes macromoleculares, fenóis totais, e proantocianidinas, bem como da atividade antioxidante foram realizadas em triplicata e os resultados correspondem à média \pm o desvio padrão.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 DETERMINAÇÃO DA UMIDADE

A secagem por radiação infravermelha é uma técnica rápida e fornece a quantidade de calor suficiente para a liberação de moléculas de água (BORGES et al., 2005).

A determinação do excesso de água em matérias-primas vegetais é importante para evitar a atividade enzimática e a proliferação de microrganismos como fungos e bactérias (NASCIMENTO et al., 2005).

Os valores obtidos para a umidade das amostras estão na Tabela 3.

Tabela 3: Teor de umidade das partes da *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc estudadas.

Amostras	Umidade (%)
Folha	8,3 ± 0,1
Casca interna	10,7 ± 0,3
Casca externa	5,1 ± 0,2
Madeira	9,9 ± 0,3

Os teores de umidade encontrados para a madeira, casca interna e folha estão dentro da faixa estabelecida pela Sociedade Brasileira de Farmacognosia que é de 8,0 a 14,0% de água para drogas vegetais, exceto para a casca externa que apresentou valor pouco inferior.

5.2 DETERMINAÇÃO DOS CONSTITUINTES QUÍMICOS DA CASCA E MADEIRA DE *Kielmeyera coriacea*

5.2.1 Determinação do teor de cinzas

As cinzas de madeira e casca são substâncias de baixa massa molecular e constituem os materiais inorgânicos. São determinadas com a amostra seca e picada porque no processo de extração elas podem ser removidas por solventes como a água (KLOCK et al., 2005).

A Tabela 4 mostra as porcentagens obtidas de cinzas na madeira, casca interna e casca externa.

Tabela 4: Teor de cinzas da madeira e cascas de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc.

Amostras	Cinzas (%)
Casca interna	1,6 ± 0,1
Casca externa	1,6 ± 0,1
Madeira	0,7 ± 0,1

As cascas das árvores geralmente apresentam maior teor de cinzas do que a madeira, como foi encontrado na análise realizada. Na literatura (FOELKEL, 2005) é encontrado que as cinzas das cascas correspondem de 3 a 10% de seu peso. Os principais componentes das cinzas são sódio, potássio, cálcio, magnésio e manganês, os quais são obtidos na forma de óxidos durante a incineração.

5.2.2 Preparação da amostra livre de extractivos

Na análise dos compostos macromoleculares da casca e madeira (lignina e holocelulose) é necessário remover os extractivos a fim de evitar que produtos de condensação com a lignina sejam formados (KLOCK et al., 2005).

Dos solventes utilizados na extração, a água foi a mais eficiente para a casca interna e madeira, representando 85% e 88%, respectivamente do total da extração, enquanto o cicloexano foi melhor para a casca externa representando 59% do total da extração. Os teores obtidos de extractivos estão na tabela 5.

Tabela 5: Porcentagem de extractivos de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc.

Solventes	Casca interna	Casca externa	Madeira
Cicloexano	0,6 ± 0,1	5,3 ± 0,4	0,02 ± 0,01
Cicloexano-etanol 2:1	4,4 ± 0,4	2,2 ± 0,2	0,6 ± 0,2
Água	29,1 ± 2,4	1,5 ± 0,2	4,4 ± 0,3
Total %	34,1	9,0	5,0

Pode-se inferir que a maioria dos extractivos presentes na casca interna e na madeira sejam polares, porque a água foi o solvente que com maior porcentagem de

extração destes compostos e os extractivos constituintes da casca externa sejam apolares, porque o cicloexano foi o solvente com maior porcentagem na remoção dos compostos orgânicos.

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

Os métodos tradicionais utilizados na determinação quantitativa da lignina da madeira são insatisfatórios quando aplicados à casca. Este fato acontece, porque a casca é formada por uma mistura de substâncias, algumas destas, são solúveis em soluções alcalinas, mas insolúveis em soluções ácidas. Se essas substâncias não forem devidamente removidas por uma pré-extração alcalina, elas não são solubilizadas e aparecem como lignina (BROWNING, 1967).

Durante a análise ocorre uma reação de hidrólise dos polissacarídeos com ácido sulfúrico a 72% formando vários oligossacarídeos, que são hidrolisados na segunda etapa com o H₂SO₄ diluído. O resíduo resultante é a lignina de Klason ou lignina insolúvel em ácido (ROSA, 2003).

Nos trabalhos descritos na literatura (FOELKEL, 2005), o teor de lignina encontrado na casca é inferior ao teor encontrado na madeira da mesma árvore. Entretanto, a casca externa apresentou alto teor de lignina, maior que a madeira e a casca interna (Tabela 6). Na casca externa há a presença de cortiça, a qual interfere na análise e para removê-la é necessário realizar uma saponificação alcalina, que causa degradação da lignina. É comum a análise da lignina somente na casca interna porque esta apresenta menor quantidade de substâncias que interferem na análise (BROWNING, 1967). O alto teor de lignina encontrado na casca externa pode ser atribuído a presença de cortiça, uma vez que a casca externa da planta é utilizada na fabricação da mesma.

5.2.4 Determinação de lignina solúvel

Os valores encontrados de lignina solúvel em ácido foram baixos para a casca interna e externa como pode ser observado na Tabela 6. Para a madeira, os valores de absorvância medidos, quando aplicados a equação 3, encontrou-se um valor negativo, o que indica que na madeira não há lignina solúvel em ácido (MORAIS et al., 2005).

5.2.5 Determinação de holocelulose

Os valores obtidos para o teor de holocelulose estão na Tabela 6. A madeira apresentou alto teor de holocelulose, representando cerca de 70% do total dos constituintes. A holocelulose é o componente majoritário da madeira e é constituída de celulose e hemicelulose (SANTOS, 2008), sendo a celulose o principal componente.

O termo holocelulose é empregado para indicar o produto obtido após a remoção da lignina. Para obter uma deslignificação ideal é necessária a remoção total da lignina, porém, não há metodologia que satisfaça essa condição. Assim, durante a determinação da holocelulose pode haver uma porcentagem de lignina residual que permanece na holocelulose (KLOCK et al., 2005).

A porcentagem total dos constituintes químicos da casca interna, casca externa e madeira não foi igual a 100%. Porém, esse resultado é esperado, devido à deficiência do método analítico. De acordo com Browning (1967), a falha no somatório total dos constituintes pode ser atribuída a alguns fatores como: perda de um constituinte, sobreposição na análise, presença de impurezas e interferências de outros componentes. É comum a porcentagem total variar de 95 a 102%. Entretanto os valores encontrados acima de 102% são aceitáveis devido aos problemas que acontecem durante análise química.

Tabela 6: Porcentagem dos constituintes químicos da casca e madeira de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc.

Constituintes	Casca interna	Casca externa	Madeira
Extrativos	34,1	9,0	5,0
Extrativos solução de hidróxido de sódio a 1%	$24,0 \pm 3,0$	$21,7 \pm 1,9$	-
Lignina de Klason	$14,7 \pm 1,8$	$57,3 \pm 0,2$	$28,0 \pm 1,0$
Lignina solúvel em ácido	$2,7 \cdot 10^{-3} \pm 0,1$	$2,8 \cdot 10^{-3} \pm 0,1$	-
Holocelulose	$30,0 \pm 3,4$	$5,5 \pm 1,0$	$71,7 \pm 3,3$
Cinzas	$1,6 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,1$	$0,7 \pm 0,1$
Total	104,4	95,1	105,4

A metodologia utilizada na deslignificação baseia-se na reação da lignina com ClO_2 e ClO^- , que são sub-produtos obtidos na reação de oxirredução do ClO_2^- (Equação 6) em meio ácido (REYES et al., 1998).



5.3 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPOSTOS VOLÁTEIS DE *Kielmeyera coriacea*

Existem vários estudos na literatura sobre o isolamento de substâncias a partir dos extratos de *Kielmeyera coriacea*. Entretanto, não há relatos sobre a composição química do óleo essencial desta espécie. No trabalho de Andrade e outros (2007), apresenta a composição dos compostos voláteis das folhas, flores e frutos do gênero *Kielmeyera*, sendo a espécie estudada *Kielmeyera rugosa* Choisy.

A Tabela 7 mostra os rendimentos (%) obtidos do óleo essencial de *K. coriacea* em base seca.

Tabela 7: Rendimentos dos óleos essenciais de *Kielmeyera coriacea*.

Amostra	Rendimento %
Folha	$0,7 \pm 0,1$
Flor	$0,5 \pm 0,1$
Casca interna	$0,3 \pm 0,1$
Casca externa	$0,4 \pm 0,1$
Madeira	$0,2 \pm 0,1$

O maior rendimento do óleo foi encontrado para a folha, seguido da flor, casca externa, casca interna e madeira. Esse resultados estão próximos dos teores de óleos essenciais encontrados para as folhas e caule, por exemplo, de *Campomanesia pubescens*, que foram $0,64 \pm 0,06\%$ e $0,15 \pm 0,01\%$, respectivamente (ROCHA, 2011a).

A Tabela 8 mostra os principais compostos identificados por CG-EM nas diversas partes da *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc.

Tabela 8: Principais constituintes voláteis presentes na folha, flor, casca externa, casca interna e madeira de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc.

	Compostos	IK	Área do pico (% TIC)				
			Folha	Flor	Casca interna	Casca externa	Madeira
1	Cicloexano	-	-	2,8	-	-	-
2	3-Z-hexen-1-ol	859	2,1	0,6	-	-	1,3
3	Benzenoetanol	1107	-	16,2	-	-	-
4	Benzildrazina	-	-	3,3	-	-	-
5	Eugenol	1359	-	44,9	-	-	-
6	Alfa-copaeno	1377	3,5	-	14,9	2,1	-
7	Beta-bourboneno	1388	1,6	-	-	-	-
8	Beta-elemeno	1391	1,3	-	-	-	-
9	Trans-carofileno	1419	15,5	11,9	-	-	-
10	Beta-cedreno	1421	-	-	5,2	0,9	-
11	n.i. (MM = 204)	-	-	-	3,6	-	-
12	Widreno	1431	-	-	4,2	0,8	-
13	Alfa-E-bergamoteno	1435	-	-	13,0	0,8	-
14	n.i. (MM = 204)	-	-	-	2,4	0,7	-
15	Alfa-humuleno	1455	3,0	1,2	-	-	-
16	Beta-E-farneseno	1457	-	-	8,6	-	-
17	Beta-acoradieno	1471	-	-	1,3	-	-
18	Beta-chamigreno	1478	-	0,2	1,3	1,0	-
19	Alfa-curcumeno	1481	-	-	7,4	0,7	-
20	D-germacreno	1485	24,2	0,5	-	-	-
21	Alfa-selineno	1498	-	1,0	-	-	-
22	Alfa-muuroleno	1500	-	-	0,6	1,1	-
23	Biciclogermacreno	1500	11,6	-	-	-	-
24	Beta-bisaboleno	1506	-	-	9,4	-	-
25	Alfa-chamigreno	1508	-	-	1,7	0,3	-
26	n.i. (MM = 202)	-	-	-	-	2,3	-
27	Gama-cadineno	1514	1,11	0,4	-	-	-
28	Gama-bisaboleno (Z)	1515	-	-	1,5	-	-
29	Delta-cadineno	1523	4,8	2,1	2,2	-	-
30	Gama-dehidro-Ar-	1532	-	-	1,0	-	-
	himachaleno						
31	Espatulenol	1578	1,1	-	-	-	-
32	Viridiflorol	1593	3,3	-	-	-	-
33	Sesquiterpeno oxigenado	1597	3,1	-	-	-	-
34	Beta-oplopenona	1608	-	-	-	3,8	-
35	Sesquiterpeno oxigenado		2,2	-	-	-	-
36	n.i. (MM = 220)	-	-	-	-	2,4	-
37	Gama-eudesmol	1632	-	-	-	0,8	-
38	Alfa-eudesmol	1654	-	-	-	4,2	-
39	Alfa-cadinol	1654	4,4	-	-	-	-
40	Delta-cadinol		4,3	-	-	-	-
41	Beta-bisabolol	1675	-	-	1,4	-	-

42	Cadalenó	1677	-	-	-	1,8	-
43	Bisabolol <epi-alfa>	1685	-	-	1,8	-	-
44	Alfa-bisabolol	1686	-	-	1,9	-	-
45	Sesquiterpeno oxigenado		-	-	-	2,7	-
46	Sesquiterpeno oxigenado		-	-	-	2,2	-
47	Sesquiterpeno oxigenado		-	-	-	6,4	-
48	Sesquiterpeno oxigenado		-	-	-	6,3	-
49	Sesquiterpeno oxigenado		-	-	-	1,6	-
50	Longipinocarvona		-	-	-	1,6	-
51	Beta-bisabolenol	1790	-	-	-	2,7	-
52	Ácido tetradecanóico		-	-	-	-	1,6
53	n.i.		-	-	2,3	-	-
54	Hexadecanol	1876	-	-	-	-	2,5
55	Nonadecano	1900	-	-	-	1,0	-
56	Ácido palmítico		-	0,5	0,7	1,0	16,2
57	Eicosano	2000	-	-	-	1,4	-
58	Óxido manoil <epi-13>	2017	-	-	-	1,7	-
59	Kaureno	2043	-	-	-	2,3	-
60	Octadecanol	2078	-	-	0,6	-	4,0
61	Heneicosano	2100			-	1,1	-
62	Gama-palmitolactona		-	0,6	0,7	-	-
63	Ácido oleico		-	-	-	-	1,8
64	Parsol MCX (Z)		-	-	-	-	2,2
65	Docosano	2200	-	-	-	0,9	-
66	n.i.		-	-	-	0,9	-
67	n.i.		-	-	-	0,8	-
68	n.i.		-	-	-	1,1	-
69	Tricosano	2300	-	-	-	1,1	1,3
70	Parsol MCX (E)		-	-	-	-	2,3
71	Amida do ácido oleico		-	-	-	-	2,4
72	Tetracosano	2400	-	-	-	1,3	1,5
73	Pentacosano	2500	-	-	-	2,7	3,2
74	Hexacosano	2600	-	-	-	3,0	4,8
75	Heptacosano	2700	-	-	-	3,7	7,4
76	Octacosano	2800	-	-	-	4,9	8,4
77	Esqualeno		-	-	-	1,7	1,5
78	Hidroc. saturado		-	-	-	-	1,3
79	Nonacosano	2900	-	-	-	5,8	9,7
80	Hidroc. saturado		-	-	-	2,4	7,4
81	Hidroc. saturado		-	-	-	-	6,3
Total			87,1	86,2	87,7	86,0	87,1
Rendimento do óleo (% m/m), base seca			0,7± 0,1	0,5± 0,1	0,3±0,1	0,4± 0,1	0,2± 0,1

IK = índice de Kovat; n.i. = não identificado; MM = massa molecular; TIC = Total ions chromatografics

Nas folhas, aproximadamente 85% dos constituintes voláteis são sesquiterpenos, sendo os principais representantes o D-germacreno (24,2%), o *trans*-cariofileno (15,5%) e o biciclogermacreno (11,6%). Estes sesquiterpenos apresentam-se em quantidades bem superiores quando comparados com óleos essenciais de outras espécies do Cerrado (ROCHA, 2011a). Os sesquiterpenos *trans*-cariofileno e *alfa*-humuleno (3,0%), apresentaram potencial de utilização no tratamento de doenças inflamatórias (FERNANDES et al., 2007). As estruturas dos principais componentes do óleo essencial das folhas estão apresentadas na Figura 30.

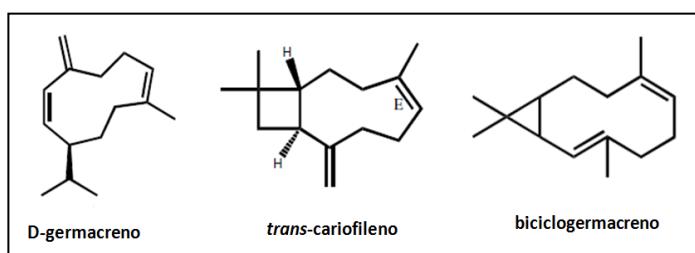


Figura 30: Estruturas dos três constituintes majoritários presentes no óleo essencial das folhas de *K. coriacea*.

O espatulenol e o viridiflorol também foram encontrados nas folhas desta planta do cerrado, nas mesmas concentrações daquelas encontradas recentemente nas folhas da *Campomanesia pubescens* (ROCHA, 2011a).

Nas flores, o monoterpeno oxigenado eugenol, é o constituinte majoritário, responsável por 44,9% do óleo essencial. O benzenoetanol é o segundo maior componente do óleo com 16,2%, seguido do *trans*-cariofileno (11,9%) e benzildiazina (3,28%). O eugenol (Figura 31) é o principal constituinte do óleo essencial do cravo-da-índia (*Eugenia caryophyllata*), e que apresenta propriedades anti-inflamatória, cicatrizante, analgésica, e eficácia na eliminação de bactérias bucais. Foi demonstrado também, que o eugenol pode suprimir o crescimento de linhas de células de câncer cervical (HeLa) (CHANG et al., 2011).

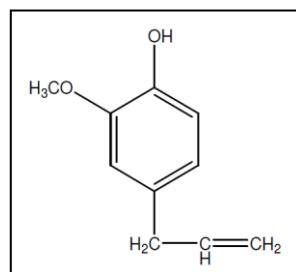


Figura 31: Estrutura química do eugenol.

Fonte: Chang (2011).

Os principais componentes identificados no óleo essencial das folhas e flores de *K. coriacea* são apresentados na Tabela 9. Para efeito de comparação, estes resultados foram confrontados com os resultados encontrados em *K. rugosa*.

Tabela 9: Comparação dos constituintes voláteis de *K. coriacea* e *K. rugosa* Choisy.

Compostos	<i>Kielmeyera rugosa</i> [*]	<i>Kielmeyera coriacea</i>
	Folha (%)	Folha (%)
<i>alfa</i> -cubebeno	11,8	0,6
<i>alfa</i> -copaeno	11,0	3,5
<i>trans</i> -cariofileno	10,8	15,5
<i>delta</i> -cadineno	8,5	4,8
biciclogermacreno	-	11,6
D-germacreno	3,1	24,2
	Flor (%)	Flor (%)
benzenoetanol	58,2	16,2
álcool benzílico	18,6	-
eugenol	15,9	44,9
benzildrazina	-	3,3
<i>trans</i> -cariofileno	0,1	11,9

* ANDRADE e outros, 2007.

No trabalho de Andrade e outros (2007), foram identificados os constituintes voláteis das folhas e flores da espécie *Kielmeyera rugosa* Choisy, proveniente do Estado de Sergipe, nordeste do Brasil. Os principais componentes encontrados nas folhas foram *alfa*-cubebeno, *alfa*-copaeno, *trans*-cariofileno e *delta*-cadineno, representando cada um cerca de 10% do óleo essencial. Esses compostos também foram encontrados em *Kielmeyera coriacea*, porém em diferentes concentrações (0,6%, 3,5%, 15,5% e 4,8%, respectivamente, totalizando 24,4%). Não foi identificado o biciclogermacreno nas folhas de *Kielmeyera rugosa*.

Nas flores de *Kielmeyera rugosa*, o componente majoritário identificado foi o benzenoetanol, seguido pelo álcool benzílico e eugenol. Assim como nas folhas, houve

diferenças na concentração dos componentes encontrados nas flores das duas espécies. Em *K. rugosa*, o componente majoritário nas flores foi o benzenoetanol (58,2%) enquanto em *K. coriacea* é o eugenol (44,9%). Não foi identificado o composto benzildiazina nas flores de *K. rugosa*.

As diferenças encontradas nas concentrações desses compostos são comuns porque a composição química dos óleos essenciais pode variar dependendo de fatores como época de coleta, ataque de patógenos, localização e idade da planta (GOBBO-NETO; LOPES, 2007).

Na casca interna, os hidrocarbonetos sesquiterpênicos são os constituintes principais, representam aproximadamente 72% do óleo essencial, sendo o *alfa*-copaeno (14,9%) o componente majoritário. Outros componentes identificados em maior quantidade foram *trans*-*alfa*-bergamoteno (13,0%), *beta*-bisaboleno (9,4%), *E-beta*-farneseno (8,62%), *alfa*-curcumeno (7,4%), *beta*-cedreno (5,2%) e widreno (4,2%).

Foram identificados três isômeros do bisabolol (*beta*-bisabolol, *epi*-*alfa*-bisabolol e *alfa*-bisabolol), que juntos representam cerca de 5% do óleo essencial. O bisabolol é uma substância atóxica e possui propriedades anti-inflamatórias, bactericidas e cicatrizantes. É utilizado principalmente na indústria farmacêutica e de higiene pessoal. Devido à sua propriedade anti-inflamatória, ele reduz a vermelhidão da pele causada pela exposição aos raios ultravioleta do sol; através da ação antibacteriana, o bisabolol é utilizado no tratamento da bromidose diminuindo a concentração de bactérias nos locais afetados (AZAMBUJA, 2009). As estruturas dos principais componentes do óleo essencial da casca interna estão apresentadas na Figura 32.

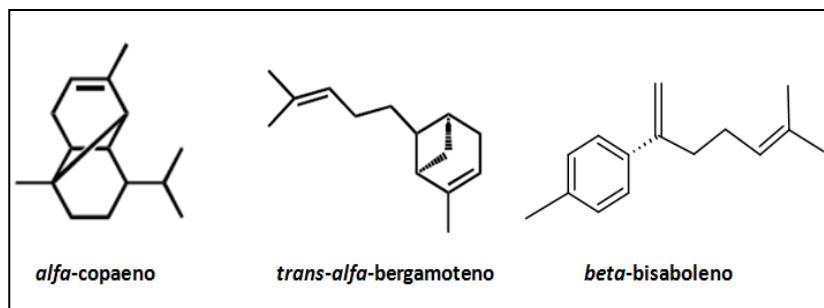


Figura 32: Estrutura dos três constituintes majoritários do óleo essencial da casca interna de *K. coriacea*.

Os componentes voláteis majoritários da casca externa, não foram identificados pela comparação de seus espectros de massa com aqueles armazenados nas bibliotecas

de espectros de massa Nist e Wiley (compostos 47e 48) e juntos representam aproximadamente 13% do óleo essencial. Dos componentes identificados, os alcanos estão presentes em maior concentração, alguns alcanos identificados foram hexacosano (3,0%), heptacosano (3,7%), octacosano (4,9%) e nonacosano (5,8%). *Alfa-eudesmol* (4,2%) e *beta-oploopenona* (3,8%) são os sesquiterpenos oxigenados em maior concentração no óleo. O óleo da madeira é constituído especialmente de alcanos e ácidos orgânicos. O ácido palmítico (16,2%) é o componente majoritário e os principais alcanos identificados foram hexacosano (4,8%), heptacosano (7,4%), octacosano (8,4%) e nonacosano (9,7%). Foi identificado pela primeira vez o 2-etiletil-3-(4-metoxifenil)-2-propenoato (4,5%), composto sintetizado e conhecido como Parsol MCX[®] (Figura 33). Esse composto é um forte absorvedor de radiação UVB. É um óleo solúvel, incolor e inodoro utilizado em várias formulações de protetores solares. Se combinado com outros filtros solares UV, o fator de proteção solar (FPS) aumenta (DMS, 2009).

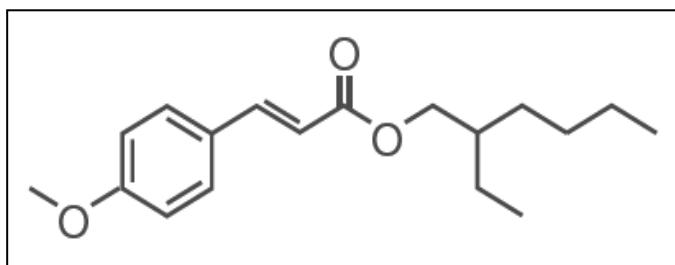


Figura 33: Estrutura química do Parsol MCX[®].

Fonte: DMS (2009).

Por estas informações de atividades biológicas, conclui-se que o óleo essencial das diferentes partes da *K. coriacea* apresenta um potencial significativo para a sua utilização na farmacopéia nacional.

5.4 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

5.4.1 Preparação dos extratos em etanol e partição líquido-líquido

A folha (100,0 g), a casca interna (100,0 g), a casca externa (200,0 g) e a madeira (120,0 g) seca e moída foram submetidas à extração com etanol em Soxhlet. Após filtração e evaporação do solvente sob pressão reduzida, em evaporador rotativo, foram obtidas 20,5, 16,4, 14,9 e 0,6 g de extrato bruto para a folha, casca interna, casca

externa e madeira, respectivamente. A partição líquido-líquido do extrato em etanol da madeira não foi realizada porque a massa de extrato obtida foi insuficiente e, além deste fato, a madeira é constituída principalmente de lignina e holocelulose.

5.4.2 Determinação de fenóis totais (FT)

A metodologia utilizada baseia-se no uso do reagente Folin-Ciocalteau, constituído por uma mistura dos ácidos fosfomolibídico ($H_3PMo_{12}O_{40}$) e fosfotungstico ($H_3PW_{12}O_{40}$), resultando numa solução de cor amarela. Em meio básico, ocorre a desprotonação dos compostos fenólicos, gerando ânions fenolatos. Em seguida, ocorre uma reação de oxirredução entre o ânion gerado e o reagente de Folin, no qual o molibdênio sofre redução, ocasionando a mudança de cor do meio reacional de amarela para azul e o composto fenólico é oxidado, como pode ser observado na Figura 34 (OLIVEIRA et al., 2009).

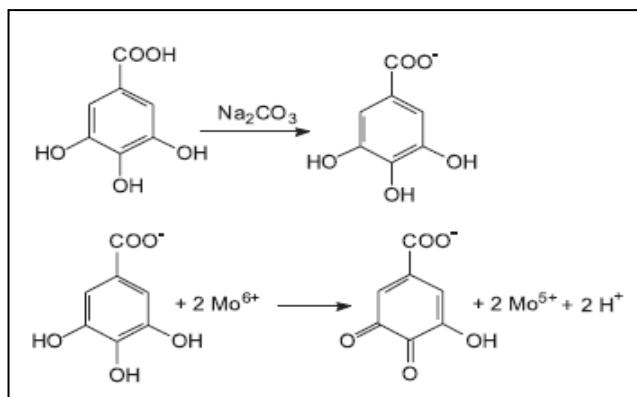


Figura 34: Reação típica do ácido gálico com o íon molibdênio presente no reagente de Folin.

Fonte: Oliveira (2009).

A partir da determinação das absorvâncias obtidas para as amostras de concentração conhecida de ácido gálico foi traçada uma curva de calibração (Figura 35).

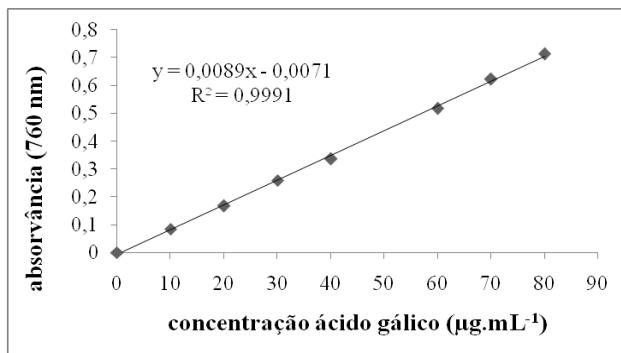


Figura 35: Curva de calibração para a determinação espectrofotométrica de fenóis totais (Método Folin-Ciocalteau).

A partir dos valores de absorvância medidos das amostras em 760 nm e empregando-se a equação da reta obtida pela curva de calibração do ácido gálico, foram obtidos os teores de fenóis totais, expressos em miligrama equivalente de ácido gálico por grama de amostra, mostrados na Tabela 10.

Tabela 10: Teor de fenóis totais (expresso em mg EAG por grama de amostra) nos extratos em etanol e nas partições de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc.

Amostra	Folha	Casca	Casca	Madeira
		interna	externa	
Extrato em etanol	309 ± 4	346 ± 2	$77,2 \pm 2,7$	130 ± 2
Partição em cicloexano	$57,5 \pm 1$	$82,3 \pm 0,6$	$27,7 \pm 2,7$	-
Partição em diclorometano	139 ± 1	241 ± 1	125 ± 1	-
Partição em metanol-água 9:1	-	372 ± 1	-	-

Os extratos em etanol da folha e da casca interna e a participação em metanol-água 9:1 da casca interna apresentaram a maior quantidade de fenóis totais. Em comparação com os teores encontrados para *Campomanesia pubescens* O. Berg (gabiroba peluda), também estudada por nosso grupo (ROCHA 2011a,b), que foram de 115 e 114 mg de EAG g^{-1} (para folha e casca, respectivamente), e em comparação com a *Eugenia umbelliflora* (pitanga), 128 e 106 mg de EAG g^{-1} para folha e casca, respectivamente, (MAGINA et al., 2010) estes valores para os extratos da folha e da casca interna são superiores.

A participação em diclorometano também apresentou bons conteúdos de fenóis totais, em relação aos trabalhos acima citados. As partições em cicloexano das amostras

foram as que resultaram na menor quantidade de fenóis totais. Este fato pode ser atribuído ao efeito do solvente, dada a sua apolaridade. Uma vez que os compostos fenólicos possuem grupos hidroxila e carbonila, existe uma maior afinidade destas estruturas com solventes polares, como o etanol e metanol.

5.4.3 Determinação do teor de taninos condensados (proantocianidinas)

Os taninos condensados ou proantocianidinas são amplamente encontrados no reino vegetal. São produtos do metabolismo secundário e possuem imensa diversidade estrutural, devido aos padrões de substituições entre as unidades flavânicas, variações nas posições de suas ligações e na estereoquímica de suas moléculas. Este fato acarreta dificuldades na sua determinação analítica (MONTEIRO et al., 2005).

A metodologia empregada baseia-se na reação da vanilina com os taninos condensados, formando complexos coloridos que absorvem em 500 nm (Figura 36). O método depende do solvente usado, da concentração do ácido, do tempo da reação, da temperatura e da concentração da vanilina (SCHOFIELD et al., 2001).

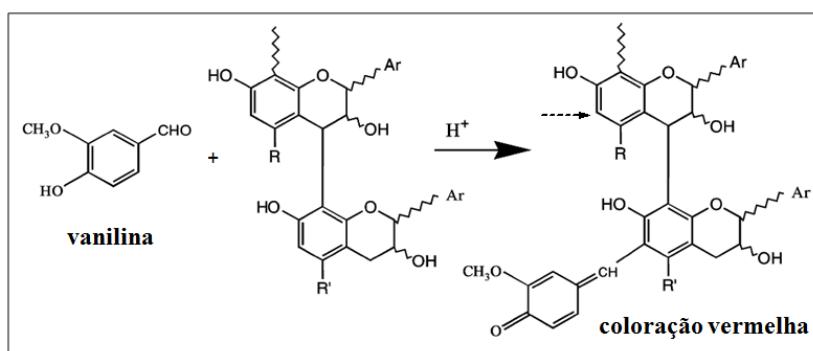


Figura 36: Reação típica da vanilina com uma proantocianidina. A seta aponta para um segundo local potencialmente reativo.

Fonte: Schofield (2001).

A partir da determinação das absorvâncias para as amostras de concentrações de catequina conhecidas, foi traçado uma curva de calibração, apresentada na Figura 37.

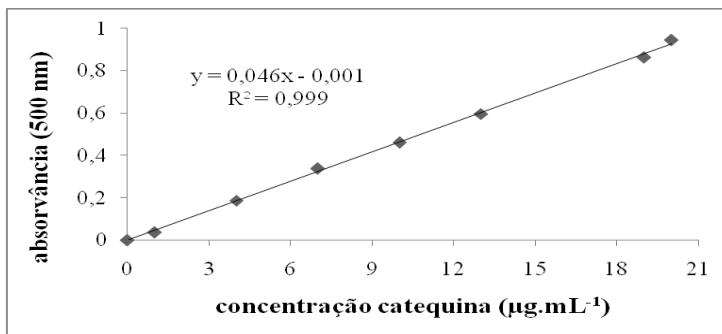


Figura 37: Curva de calibração para a determinação espectrofotométrica de proantocianidinas (Método da Vanilina).

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

Tabela 11: Teor de proantocianidinas nos extratos etanólicos e nas partições (em mg ECAT por grama de amostra) de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc.

Amostra	Folha	Casca	Casca	Madeira
		interna	externa	
Extrato em etanol	109 ± 1	328 ± 1	19,9 ± 0,3	18,4 ± 1,0
Partição em cicloexano	32,2 ± 1,4	102 ± 1	8,5 ± 0,3	-
Partição em diclorometano	52,0 ± 2,2	253 ± 3	28,1 ± 1,4	-
Partição em metanol-água 9:1	-	410 ± 3	-	-

Os extratos em etanol da folha e da casca interna e a participação em metanol-água 9:1 da casca interna aqui também apresentaram as maiores quantidades deste polifenol, com valores entre 102 a 410 mg ECAT g⁻¹ de amostra. O rendimento do extrato em etanol para as diferentes partes da planta decrescem na seguinte ordem: casca interna, folha, casca externa, e madeira. Estes resultados são bem superiores aos encontrados por Rocha e outros (2011b) para *Campomanesia pubescens* O. Berg.

A participação em diclorometano também apresentou bons conteúdos de proantocianidinas quando comparados aos trabalhos logo acima citados. A casca externa apresentou a menor quantidade de proantocianidinas também na participação em diclorometano. As amostras estudadas na participação em cicloexano foram as que

resultaram na menor quantidade de proantocianidinas, a exemplo do que aconteceu com o teor de fenóis totais.

O uso de drogas contendo taninos está relacionado com as propriedades adstringentes que esses possuem. Algumas propriedades dos taninos já foram comprovadas, como efeito antidiarréico, antisséptico e na precipitação de proteínas, ajudando nos processos de cura da pele, como feridas, queimaduras e inflamações (MONTEIRO et al., 2005). Enquanto que as plantas se utilizam destes compostos para seu mecanismo de defesa à exposição térmica e mecânica.

5.4.4 Análise quantitativa da atividade antioxidante

A metodologia para verificar a capacidade antioxidante baseia-se em avaliar a atividade sequestradora do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH), que possui coloração violeta, e absorve em 517 nm. Numa reação típica (Figura 38), o radical DPPH é reduzido e forma-se a 2,2-difenilpicrilidrazina (DPPH-H) por meio da ação do antioxidante (A—H), originando uma solução de coloração amarela. Através do decréscimo da absorbância, determina-se a porcentagem de atividade antioxidante, ou seja, a quantidade do radical DPPH que é consumido pelo antioxidante ou a porcentagem do radical livre DPPH que permanece no meio reacional (BRAND-WILLIAMS et al., 1995; OLIVEIRA et al., 2009).

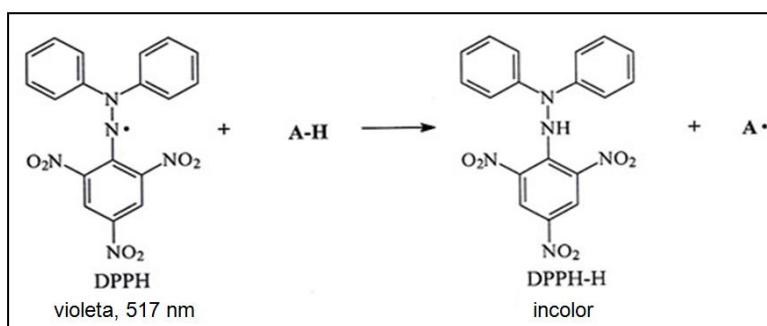


Figura 38: Esquema da reação típica entre o radical DPPH e o antioxidante genérico (A—H).

Fonte: Halliwell; Gutteridge (2007).

Os compostos com ação antioxidante possuem a capacidade de reagir com os radicais livres e transformá-los em espécies estáveis não reativas (Figura 39). Esta reatividade impede que os radicais ataquem as células, causem danos ao DNA ou oxide lipídios e proteínas. (TEIXEIRA; SILVA, 2011).

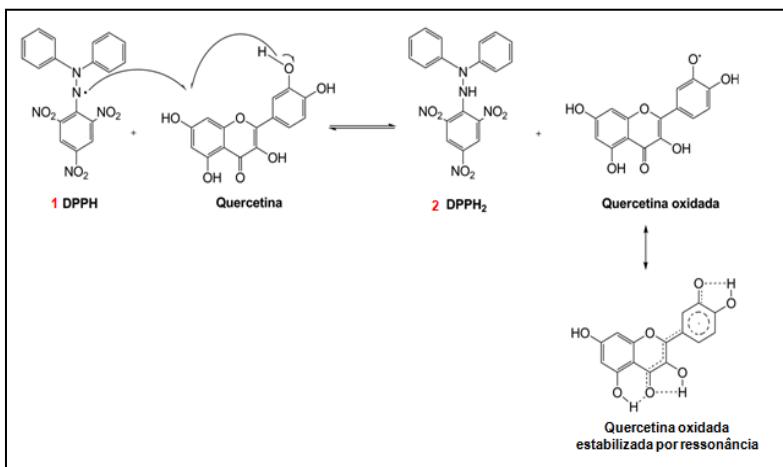


Figura 39: Reação típica de redução do radical DPPH pelo flavonóide antioxidante quercetina.

Fonte: Teixeira; Silva (2011).

5.4.4.1 Construção da curva de calibração do DPPH

A partir da determinação das absorvâncias para as amostras de concentrações do radical DPPH conhecidas, foi traçada uma curva de calibração, apresentada na Figura 40.

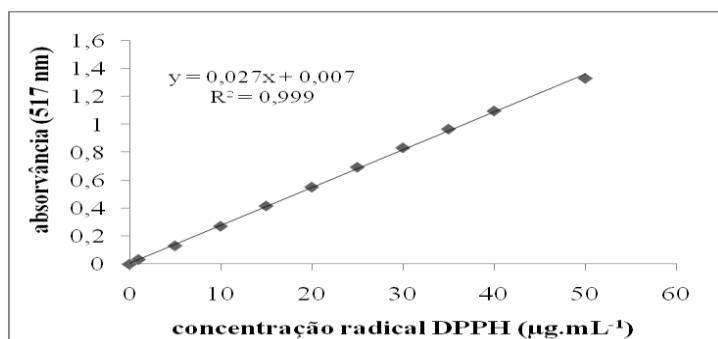


Figura 40: Curva de calibração para a determinação espectrofotométrica da atividade antioxidante (Método DPPH).

5.4.4.2 Leitura das medidas de absorbância nas amostras

Na Tabela 12 estão as concentrações das amostras utilizadas na determinação da atividade antioxidante (AA). Todas as amostras foram testadas a partir da concentração inicial (100%), diluídas em 5 concentrações diferentes e na mesma proporção: 83 % - 66 % - 49 % - 32 % - 15 %. Na análise, para obter o valor do CE_{50} é necessário que o

valor de 50% na porcentagem de DPPH remanescente (Equação 4) esteja entre a concentração 100% e 15%.

Tabela 12: Concentração inicial (100%) em ppm das amostras na cubeta na determinação da AA dos extratos e partições de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc.

Amostra	Folha	Casca interna	Casca externa	Madeira
Extrato em etanol	25	10	50	50
Partição em cicloexano	100	50	200	-
Partição em diclorometano	25	10	50	-
Partição em metanol-água 9:1	-	10	-	-

A partir da Equação 5, a porcentagem da atividade antioxidante foi calculada, no tempo de 60 minutos. A atividade antioxidante (AA, em %) para a concentração inicial das amostras na cubeta e após 1 hora de reação estão apresentados na Tabela 13.

Tabela 13: Porcentagem de atividade antioxidante (% AA) para as concentrações iniciais (em ppm) das amostras na cubeta.

Amostra	Folha	Casca interna	Casca externa	Madeira
Extrato em etanol	93,7	75,9	45,1	92,8
Partição em cicloexano	39,6	84,7	92,3	-
Partição em diclorometano	86,8	78,6	92,9	-
Partição em metanol-água 9:1	-	93,7	-	-

Os gráficos obtidos da cinética da atividade antioxidante das amostras nas seis concentrações estão apresentados nas figuras 41 a 43.

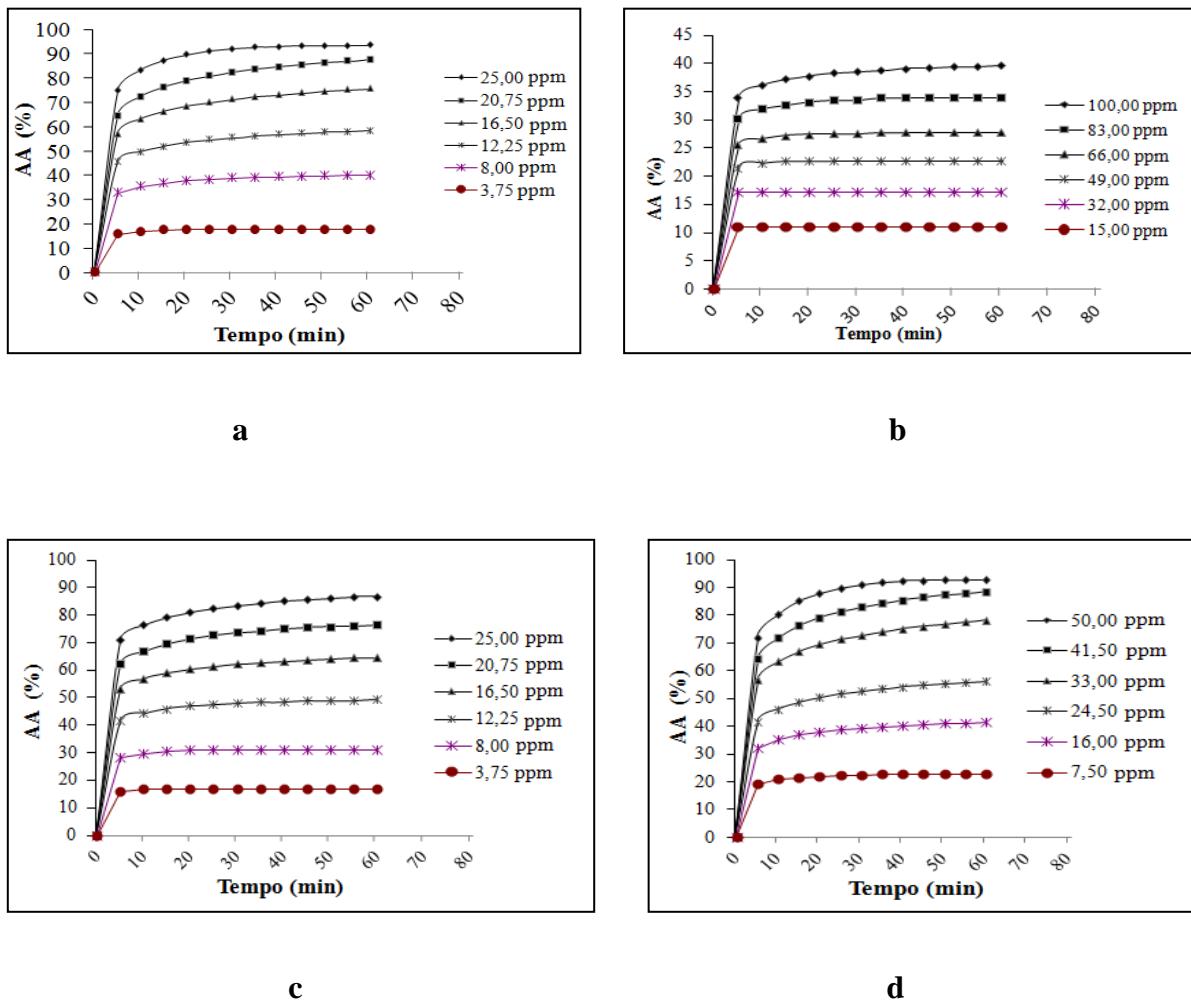


Figura 41: Gráficos da cinética de atividade antioxidante para: a- extrato em etanol da folha; b- partição em cicloexano da folha; c- partição em diclorometano da folha; d- extrato em etanol da madeira.

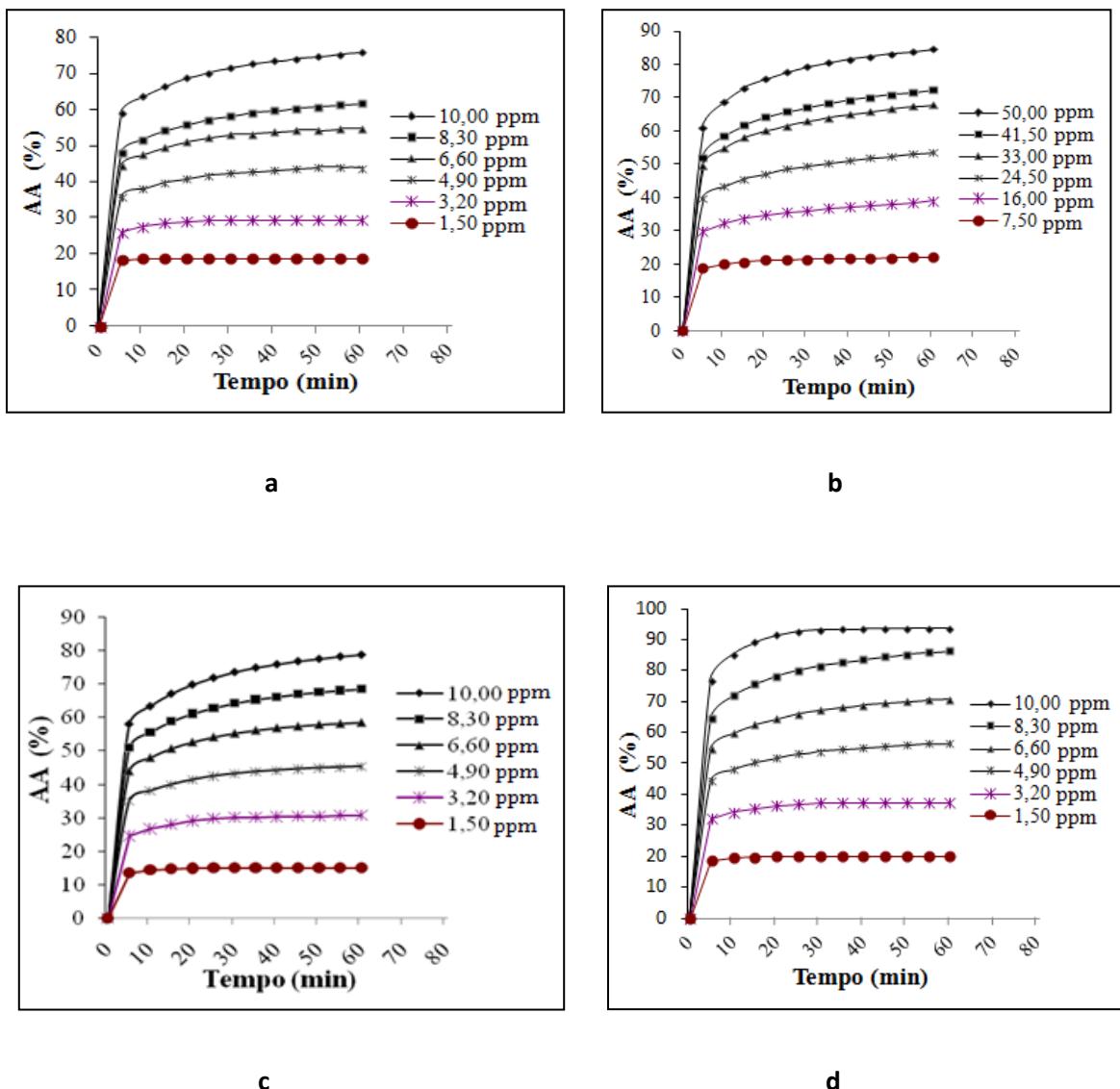


Figura 42: Gráficos da cinética de atividade antioxidante para: a- extrato em etanol da casca interna; b- partição em cicloexano da casca interna; c- partição em diclorometano da casca interna; d- partição em metanol:água 9:1 da casca interna.

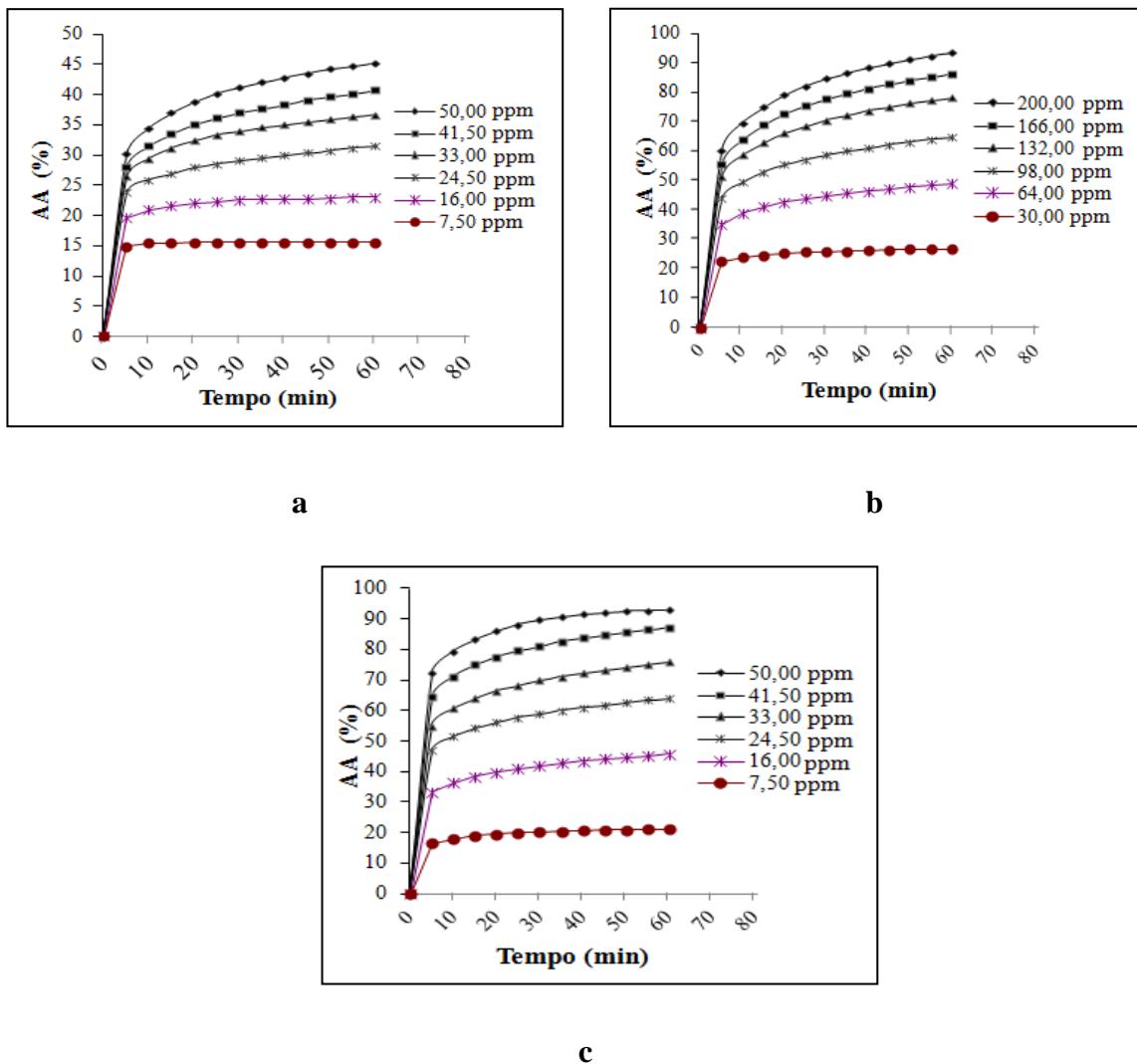


Figura 43: Gráficos da cinética de atividade antioxidante para: a- extrato em etanol da casca externa; b- partição em cicloexano da casca externa; c- partição em diclorometano da casca externa.

Para comparação das atividades antioxidantes (AA) das amostras, foi construído um gráfico normalizado, dividindo-se a porcentagem de AA dos extratos e das partições pela concentração inicial das amostras, na cubeta. O gráfico obtido está apresentado na Figura 44.

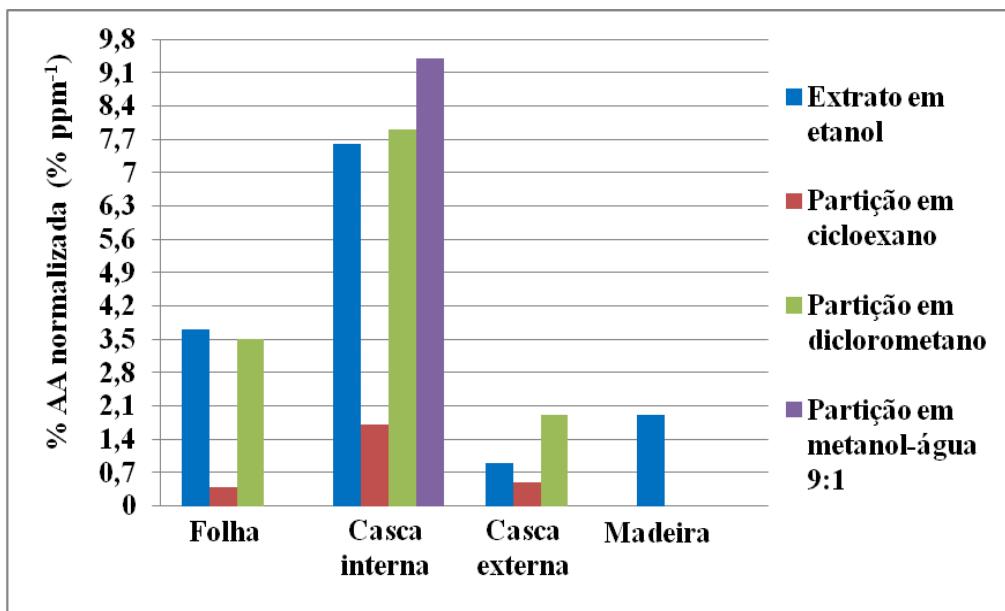


Figura 44: Gráfico comparativo normalizado da atividade antioxidante (AA, em %) para as amostras, após 1 hora de reação.

Pode-se verificar através do gráfico que as melhores porcentagens de atividade antioxidante da folha foram obtidas para o extrato em etanol e para a partição em diclorometano. Para a casca interna, as melhores porcentagens de AA foram obtidas nas partições em metanol-água 9:1, em diclorometano e no extrato em etanol, nesta ordem. A partição em cicloexano foi a que apresentou menor AA. Estes fatos têm correlação direta com os teores de fenóis totais e de proantocianidinas já discutidos. Desta forma, pode-se concluir que a casca interna é a amostra com o melhor potencial atividade antioxidante.

5.4.4.3 Concentração Efetiva (CE_{50})

Os resultados da atividade antioxidante (AA) dos extratos estudados também podem ser expressos através da concentração efetiva média (CE_{50}) que representa a concentração de amostra necessária para sequestrar 50% do radical livre DPPH. Assim, o valor do CE_{50} foi calculado a partir da Equação 4 (item 4.5.5.2). Os valores obtidos estão na Tabela 14.

Tabela 14: Valores de CE₅₀ (em ppm) para extrato em etanol e partições estudadas de *Kielmeyera coriacea*.

Amostra	Folha	Casca	Casca	Madeira
		interna	externa	
Extrato em etanol	10,6 ± 0,7	5,9 ± 0,1	55,2 ± 1,7	25,5 ± 3,9
Partição em cicloexano	133 ± 2	16,0 ± 1,7	70,1 ± 0,4	-
Partição em diclorometano	12,7 ± 0,6	6,6 ± 0,9	21,1 ± 0,8	-
Partição em metanol-água 9:1	-	4,3 ± 0,3	-	-

Os melhores resultados para o valor de CE₅₀ foram encontrados na casca interna (extrato em etanol, participação em diclorometano e participação em metanol-água 9:1) como pode ser observado na Tabela 14. Essas amostras também foram as que apresentaram a maior quantidade de compostos fenólicos e a melhor % de AA.

Comparando os resultados obtidos com dados da literatura, verifica-se que o valor de CE₅₀ encontrado para a folha de *Kielmeyera coriacea* foi maior que o encontrado para as partições em acetato de etila e em butanol, da folha de *Kielmeyera variabilis* (planta também encontrada no cerrado), a qual apresentou CE₅₀ de 3,5 e 4,4 ppm, respectivamente (COQUEIRO, 2010).

Em comparação com os extratos e frações da folha da espécie *Garcinia xanthochymus*, conhecida como falso mangostão, (FERNANDES, 2009) e que pertence também à família Clusiaceae, os resultados de CE₅₀ do extrato em etanol e da participação em diclorometano da folha de *K. coriacea* foram similares (Tabela 15).

Tabela 15: Valores de CE₅₀ de extrato e frações da folha de *Garcinia xanthochymus* (FERNANDES, 2009).

Extratos e frações	CE₅₀ (ppm)
Extrato em etanol	11,7
Fração em acetato	12,1
Fração em butanol	17,8

Estes resultados para extrato em etanol e participação em diclorometano da folha são bem superiores aos resultados encontrados para esta parte aérea de três plantas medicinais do semi-árido nordestino (SOUZA et al, 2007), região próxima ao cerrado. Comparando-se o valor de CE₅₀ do extrato em etanol da casca interna com o resultado

(27,59 ppm) para o mesmo extrato de *Terminalia brasilienses camb.* (conhecida como catinga de porco), neste mesmo trabalho, temos um resultado para *K. coreacea* muito superior.

O resultado de CE₅₀ para a partição em cicloexano da folha foi alto, revelando um baixo efeito de sequestro do radical livre DPPH. Semelhante efeito foi observado para a partição em outro solvente apolar, o hexano, das folhas de *Campomanesia pubescens* (CARDOSO et al., 2008).

Segundo padrões da literatura, o valor de CE₅₀ menor que 50 ppm é considerado um resultado muito ativo, de 50 – 100 ppm é moderadamente ativo, de 100 - 200 é um pouco ativo. Entretanto um valor acima de 200 ppm é considerado um resultado inativo (REYNERTSON et al., 2005). Comparando os resultados encontrados nas amostras estudadas com estes padrões, oito amostras são muito ativas em relação à capacidade antioxidante, duas são moderadamente ativas e 1 é pouco ativa. Pode-se concluir, em geral, que esta planta do cerrado possui atividade antioxidante significativa, uma vez que a maioria das amostras demonstrou serem ativas frente ao radical livre DPPH.

Em geral, a boa atividade antioxidante está relacionada com a presença de compostos fenólicos, como flavonóides, antocianinas, taninos e ácidos fenólicos (derivados do ácido hidroxicinâmico e do ácido hidroxibenzólico) (DEGÁSPARI; WASZCZYNSKYJ, 2004). Desta forma, as amostras aqui estudadas que apresentaram os melhores resultados de CE₅₀ foram as mesmas que apresentaram a maior quantidade de fenóis totais e proantocianidinas. Além da propriedade antioxidante os compostos fenólicos possuem propriedades fisiológicas como: antialergênica, antiarteriogênica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, cardioprotetiva e vasodilatadora (ANDREO; JORGE, 2006).

5.5 ANÁLISE ESPECTROSCÓPICA NO INFRAVERMELHO

A espectroscopia de absorção no IV é uma técnica analítica que permite a determinação dos grupos funcionais de uma amostra. Cada grupo funcional absorve em uma frequência característica de radiação na região do IV. Assim, através do gráfico de intensidade de radiação versus frequência, é possível identificar os principais grupos funcionais presentes em uma amostra desconhecida.

Os espectros no infravermelho obtidos para os extratos estudados estão apresentados nas Figuras de 45 a 48.

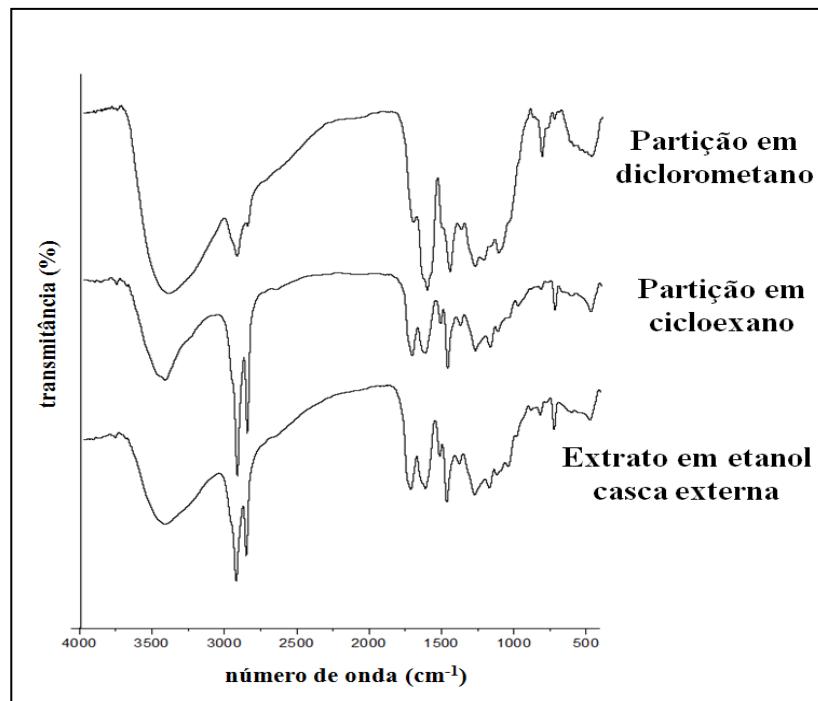


Figura 45: Espectros de infravermelho de três extratos obtidos da casca externa de *K. coriacea*.

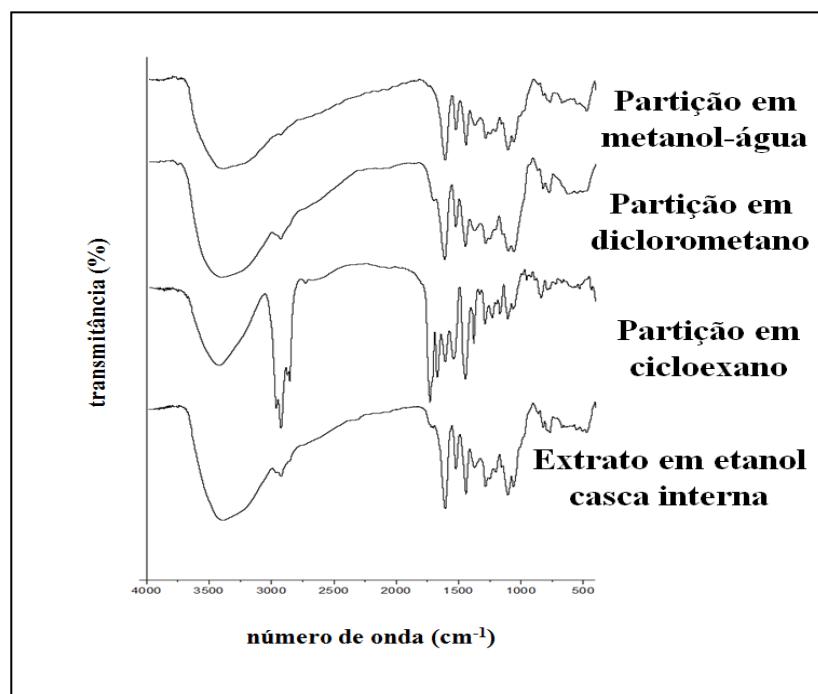


Figura 46: Espectros no infravermelho de extratos da casca interna da *K. coriacea*.

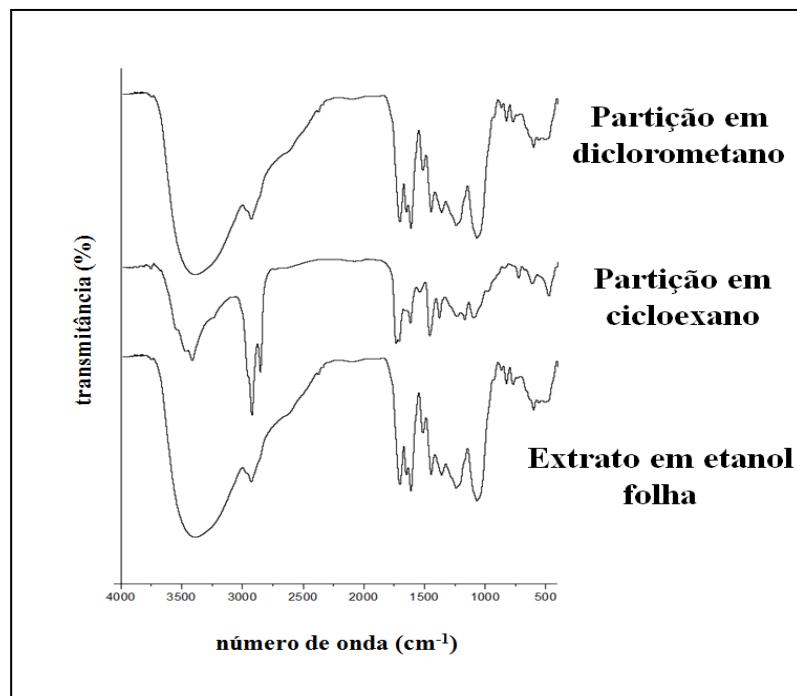


Figura 47: Espectros no infravermelho de extratos da folha da *K. coriacea*.

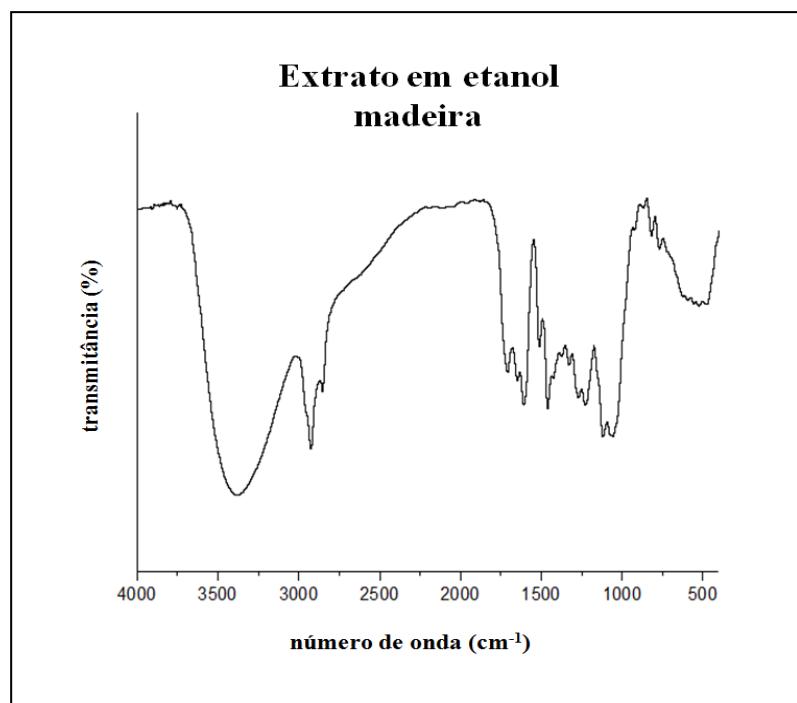


Figura 48: Espectro no infravermelho do extrato em etanol da madeira de *K. coriacea*.

Na faixa de 3000 a 3500 cm⁻¹ foram observadas bandas de absorção alargadas. Essa região é característica da absorção da vibração de deformação de grupos OH em ligação de H inter- e intra-moleculares. Em todos os espectros foram observadas absorções na faixa de 2950 a 2850 cm⁻¹, atribuídas normalmente à presença de grupos metilas (deformação C-H de grupos CH₃), o que confirma a presença de estruturas alifáticas. Nos espectros da casca externa, essa banda de absorção foi mais evidente para a partição em cicloexano e para o extrato em etanol, provocando uma diminuição na banda de absorção característica de hidroxila. Nos espectros da casca interna e da folha, verifica-se, com mais evidência, a banda característica de grupamentos alifáticos na partição em cicloexano. Pode-se inferir que, as partições em cicloexano das amostras possuem compostos com estruturas alifáticas, fato que fica comprovado, ao observar os espectros de IV para estas amostras. No espectro de IV do extrato em etanol da madeira, também é observado a banda de absorção de alifáticos, porém com menor intensidade que as observadas nas partições em cicloexano.

Na região de 1700 cm⁻¹, foram observadas bandas característica de carbonilas.

As bandas de absorção atribuídas à presença de grupamentos fenólicos são encontradas habitualmente na região entre 1290 e 1350 cm⁻¹.

Para a região de absorção correspondente à de formação de CH aromático (800-950 cm⁻¹), as absorções foram distintas entre os diferentes tipos de extratos. O mesmo foi observado para as absorções na região de impressão digital (de 500 a 750 cm⁻¹).

A Tabela 16 mostra as principais bandas de absorção nos diferentes extratos das amostras estudadas.

Tabela 16: Principais absorções dos espectros no infravermelho das amostras analisadas de *K. coriacea*.

Número de onda (cm ⁻¹)	Grupo funcional	Comentários
		Extrato
3000 - 3500	deformação axial da ligação O—H	-Partições em diclorometano da casca externa, casca interna e folha; -Extrato em etanol da casca interna, casca externa, folha e da madeira; - Partição em cicloexano da casca externa, casca interna e folha;

		- Partição em metanol-água da casca interna.
2950 e 2850	deformação axial de CH ₃	-Partição em cicloexano da casca externa, da casca interna e folha; -Extrato em etanol da casca externa e da madeira.
1760 - 1700	deformação da ligação C=O de carbonilas	-Partição em diclorometano da casca externa, casca interna e folha; -Partição em cicloexano da casca externa, casca interna e folha; -Extrato em etanol da casca externa, casca interna e folha; -Partição metanol-água da casca interna; -Extrato em etanol da madeira.
1500	deformação das ligações C-H e C=C de aromáticos	-Partição em diclorometano da casca externa; -Partição em cicloexano da casca externa; -Extrato em etanol da casca externa, folha e madeira.
1290 - 1350	deformação das ligações C-O de fenóis	-Partição em diclorometano da casca externa, casca interna e folha; -Partição em cicloexano da casca externa, casca interna e folha; -Extrato em etanol da casca externa, casca interna e folha; -Partição em metanol-água da casca interna; -Extrato em etanol da madeira.
1200-1050	deformação da ligação C—O de alcoóis e éteres	-Partição em diclorometano da casca interna e folha; -Partição em cicloexano da casca

		interna; -Extrato em etanol da casca interna, folha e madeira; - Partição em metanol-água da casca interna.
930-810	deformação C-H de aromático	Partição em diclorometano da casca externa, casca interna e folha; -Partição em cicloexano da casca externa, casca interna e folha; -Partição em diclorometano da casca externa, casca interna e folha.

Os espectros de IV dos extratos foram bastante similares. A principal absorção que pode diferenciá-los é em 2950 e 2850 cm⁻¹, (deformação axial de alcanos) que aparece principalmente nas partições em cicloexano da casca externa, casca interna e folha, e no extrato em etanol da casca externa e madeira, com absorções específicas na região de impressão digital.

5.6 FRACIONAMENTO POR CROMATOGRAFIA EM COLUNA PARA AS AMOSTRAS COM MELHORES CE₅₀

A triagem fitoquímica é um procedimento muito utilizado na determinação da composição química de plantas, permitindo identificar quais substâncias estão presentes na amostra e descobrir qual a rota biossintética de origem (DÔRES, 2007).

Antes de fazer o fracionamento em coluna, as amostras com o melhor resultado de CE₅₀ (partição em metanol-água 9:1 e partição em diclorometano da casca interna) foram analisadas em CCD. O extrato em etanol da casca interna não foi testado porque neste extrato estão solubilizadas várias substâncias químicas, enquanto nas partições os constituintes estão separados por afinidade nos solventes usados nas partições.

A partição em diclorometano da casca interna resultou no melhor fator de retenção em CCD para o fracionamento em coluna. A partição em metanol-água 9:1 da casca interna, por ser uma amostra muito polar, não resultou em uma boa separação na sílica, pois a sílica apresenta grupos O—H em sua superfície que, durante sua ativação

por aquecimento disponibiliza ligações O-H (Figura 49), permitindo maior interação destas ligações com os compostos polares presentes na partição.

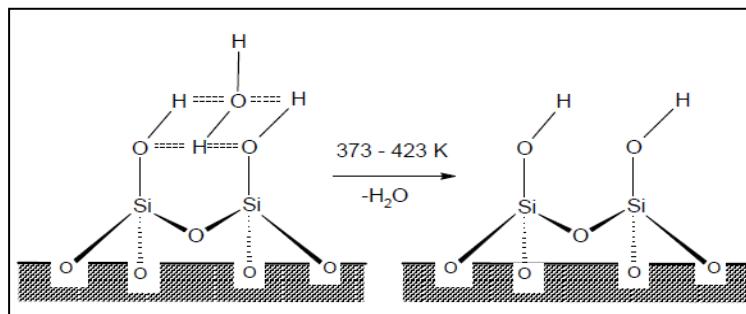
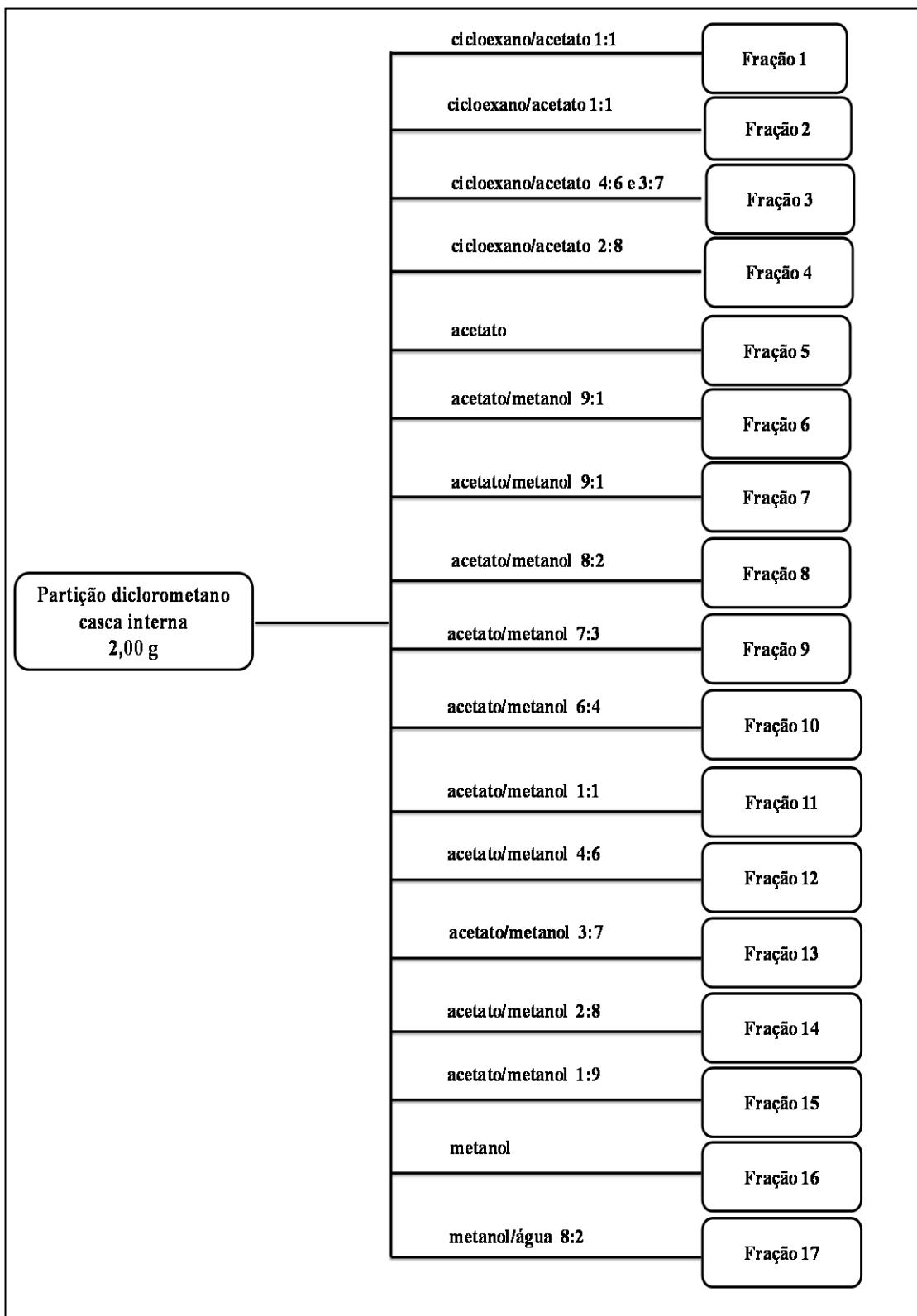


Figura 49: Esquema da reação de ativação da sílica por aquecimento.

Fonte: Costa (2007).

Na Figura 50, está representado sob a forma de fluxograma o fracionamento cromatográfico. A escolha da sequência dos solventes foi realizada após monitoramento por cromatografia em camada delgada (CCD) com sílica gel (MATOS, 1997). Ao todo, foram obtidas 17 frações.



acetato = acetato de etila

Figura 50: Fluxograma do fracionamento cromatográfico da partição em diclorometano da casca interna.

5.7 ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA), APÓS FRACIONAMENTO EM COLUNA, DA PARTIÇÃO DICLOROMETANO DA CASCA INTERNA

A avaliação da atividade antioxidante (AA) de todas as 17 frações foi realizada com o objetivo de verificar qual das frações tinha a melhor atividade antioxidante. A análise da atividade antioxidante (AA) foi realizada uma única vez para todas as frações. Para aquelas que apresentaram o melhor resultado foi repetida a análise para o cálculo do CE_{50} . A Tabela 17 mostra a concentração usada e a porcentagem de atividade antioxidante (AA), após 1 h de reação, para cada fração. Estão destacadas nesta tabela as frações 4, 5, e 6, que apresentaram a mais alta porcentagem de AA.

Tabela 17: Atividade antioxidante (AA, em %) para as frações obtidas após fracionamento em coluna da partição em diclorometano da casca interna.

Frações	Concentração (ppm)	AA (%)
1	500	50,77
2	500	57,61
3	100	43,90
4	100	93,74
5	100	93,13
6	100	95,49
7	100	38,36
8	100	52,62
9	100	44,20
10	100	40,10
11	300	90,46
12	300	46,30
13	300	63,24
14	300	74,15
15	300	69,51
16	300	27,48
17	300	21,20

Os valores de CE_{50} obtidos à partir das atividades antioxidantes (%) para as frações 4,5, e 6 estão apresentados na Tabela 18.

Tabela 18: Valores de CE_{50} das frações 4, 5, e 6.

Frações	4	5	6
CE_{50} (ppm)	$4,7 \pm 1,1$	$4,8 \pm 1,1$	$4,3 \pm 0,1$

Os resultados de CE₅₀ para as frações 4, 5, e 6 foram praticamente iguais. Isso indica que em todas as frações existem substâncias com alto potencial de combater radicais livres.

5.7.1 Análise dos extratos 5 e 6 por CLAE

As frações 5 e 6 foram analisadas em CLAE a fim de obter o perfil cromatográfico das amostras. Foram preparadas soluções (1000 ppm) em metanol das frações. Foi obtido pequena quantidade da amostra 4 (0,06 g), o que impossibilitou a continuação da análise para essa fração. Além deste fato, essa fração dissolve-se com dificuldade em metanol, solvente utilizado na análise em CLAE. A escolha do comprimento de onda (λ) a ser utilizado foi feita através da análise do espectro de UV da fração 6 (Figura 51-6) em que o pico de maior intensidade apresentou maior absorção em 220 nm. Nesse comprimento de onda obteve-se o maior número de picos.

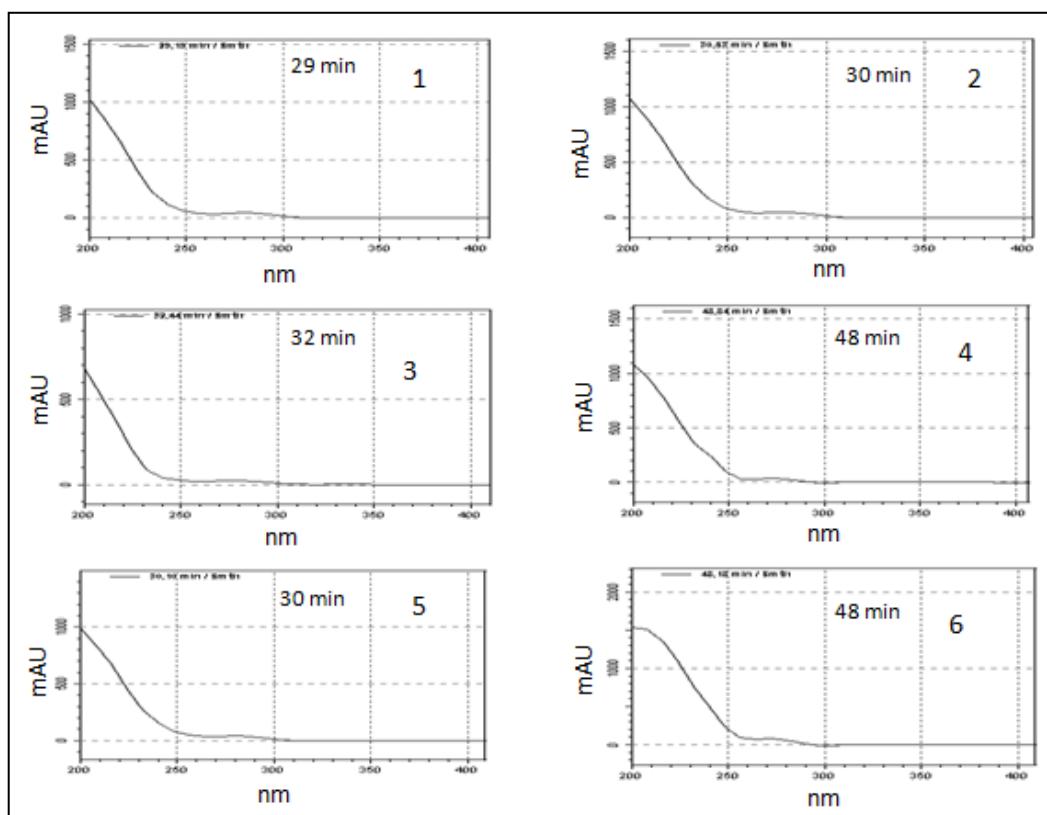


Figura 51: Espectros na região do UV para os principais picos eluídos nos cromatogramas da Figura 51: 1 = pico em 29 min fração 5; 2 = pico em 30 min fração 5; 3 = pico em 32 min fração 5; 4 = pico em 48 min fração 5; 5 = pico em 30 min fração 6; 6 = pico em 48 min fração 6.

Os cromatogramas obtidos por CLAE das frações 5 e 6 estão apresentados na Figura 52.

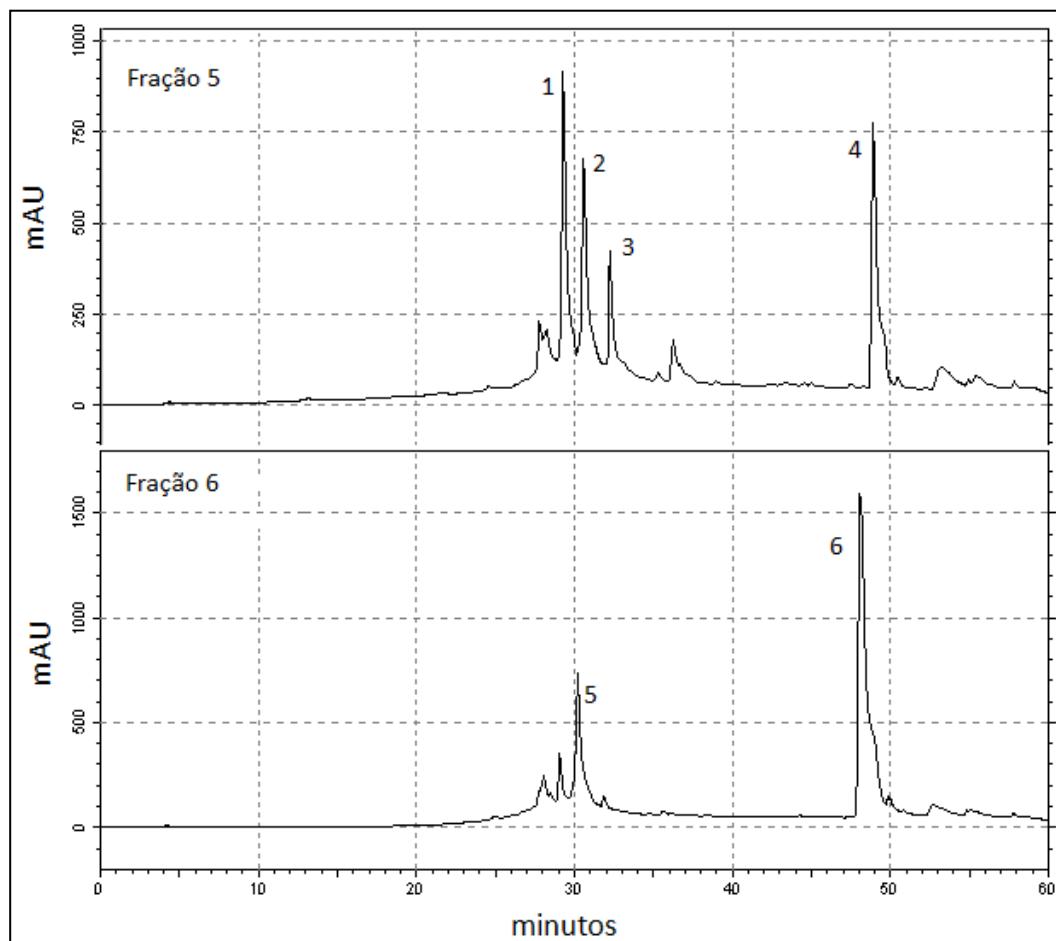


Figura 52: Cromatogramas obtidos por CLAE das frações 5 e 6. Condições: Coluna C18 (4,6 mm d.i. x 25 cm comprimento); gradiente solução 5% de KH_2PO_4 0,2 mol L^{-1} – metanol; fluxo de 0,7 mL min^{-1} ; detector a 220 nm.

Através da análise dos cromatogramas verificou-se que as duas frações apresentam picos no mesmo tempo de retenção e em intensidades diferentes. A fração 5 apresentou 4 picos principais: em 29 min, 30 min, 32 min e 48 min. O pico de maior intensidade é o de 29 min. A fração 6 apresentou um pico majoritário em 48 min. Esse pico apareceu na fração 5 em menor intensidade. A análise serve para mostrar quantos compostos as frações possuem e indicar um possível grau de “pureza” das frações, pois quanto menor a quantidade de picos mais pura está a fração. É necessário realizar outro fracionamento em coluna para separar os constituintes das frações. Esse procedimento será realizado posteriormente e fará parte das análises a serem realizadas na continuação do trabalho.

5.8 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana através da CIM mostrou que os extratos e partições de diferentes partes aéreas de *K. coriacea* possuem diferentes níveis de atividade contra cada estirpe bacteriana estudada (Tabela 19). Quanto menor o valor de CIM, melhor a atividade antimicrobiana das amostras. E resultados de CIM menores de 100 µg mL⁻¹ são considerados promissores (RÍOS; RECIO, 2005).

Tabela 19: Resultados da concentração inibitória mínima para os extratos e as partições de *Kielmeyera coriacea*.

AMOSTRAS	RESULTADOS - µg mL ⁻¹			
	AERÓBIAS		ANAERÓBIA	
	<i>S. mitis</i> ATCC 49456	<i>S. mutans</i> ATCC 25175	<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	<i>A. naeslundii</i> ATCC 19039
Extrato em etanol da casca interna	3,1	50	25	100
Partição em cicloexano da casca interna	25	6,2	6,2	6,2
Partição em diclorometano da casca interna	400	400	> 400	> 400
Partição em metanol-água da casca interna	400	> 400	> 400	200
Extrato em etanol da folha	400	> 400	400	200
Partição em cicloexano da folha	> 400	> 400	200	> 400
Partição em diclorometano da folha	200	> 400	> 400	400
Extrato em etanol da casca externa	> 400	> 400	400	> 400
Partição em cicloexano da casca externa	400	> 400	> 400	> 400
Partição em diclorometano da casca externa	> 400	> 400	400	400
CONTROLE Clorexidina	3,688	3,688	1,844	1,844

Houve atividade de todos os extratos partições frente aos microrganismos bucais *S. mitis*, *S. mutans*, *S. sanguinis* e *A. naeslundii*, avaliada pelo método de microdiluição.

Para a bactéria anaeróbia *A. naeslundii* estudada os valores de CIM das amostras estiveram entre 6,2 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. A amostra mais ativa frente à bactéria anaeróbia foi a partição em cicloexano da casca interna com um valor excelente de CIM (6,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$). As bactérias anaeróbias são mais resistentes que as aeróbias porque possuem uma bicamada fosfolipídica na sua parede celular.

Para as bactérias aeróbias os valores de CIM estiveram entre 3,1 e 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados demonstram que os extratos e partições da casca externa, extrato em etanol da folha e partições em metanol-água e em diclorometano da casca interna não inibiram o crescimento das bactérias em concentrações menores que 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$, enquanto as partições em cicloexano e em diclorometano da folha não inibiram o crescimento de bactérias aeróbias em concentrações menores de 200 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

As amostras mais ativas frente às bactérias aeróbias foram o extrato em etanol da casca interna (com valores de CIM de 3,1, 25 e 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$); e a partição em cicloexano da casca interna (com valores de CIM de 6,2 e 25 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Nessas duas amostras os resultados de CIM foram bastante significativos e promissores.

Dessa forma, essas amostras possuem potencial de utilização na prevenção da cárie e em lesões mais complexas, como as periodontites (perda de fibras e osso) e infecções endodônticas (infecção no canal do dente).

Duas substâncias isoladas do extrato em diclorometano das folhas e caules de *K. coriacea*, a aucupurina e a 1,3,7-triidroxi-2-(3-metilbut-2-enil)-xantona (Figura 26, p. 43 – substâncias 1 e 5) foram testadas contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* e *Pseudomonas aeruginosa*. Os resultados de CIM para a substância 1 (aucuparina) frente a estas bactérias foram de 12,5, 100, 3,1 e 100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. E os valores de CIM para a substância 5 (uma xantona) foram de 12,5, <100, 12,5 e <100 $\mu\text{g mL}^{-1}$, respectivamente. Para substâncias isoladas, valores de CIM menores de 10 $\mu\text{g mL}^{-1}$ são promissores. Assim, pode-se concluir que o valor de CIM para a aucuparina frente à bactéria *Bacillus subtilis* foi bastante significativo.

Nesse contexto, pode-se verificar que a partição em cicloexano da casca interna, no geral, foi a amostra mais ativa frente aos microrganismos testados, com resultados de CIM (6,2 $\mu\text{g mL}^{-1}$), para as bactérias *S. mutans*, *S. sanguinis* e *A. naeslundii*. Esse resultado para uma partição é bastante promissor e indica que essa partição tem

potencial significativo para combater microrganismos bucais. Vale aqui ressaltar que o resultado de CIM ($25 \mu\text{g mL}^{-1}$) desta partição é cerca de 5000 vezes mais eficiente frente a *S. mitis*, do que o composto puro Timol, regularmente encontrado em formulações farmacêuticas (colutórios e dentifrícios) encontradas no mercado brasileiro para o controle bacteriano bucal (LIMA et al., 2009).

Os resultados de CIM igual a $6,2 \mu\text{g mL}^{-1}$ da partição em cicloexano da casca interna é superior ao observado para o extrato em diclorometano do caule de *Kielmeyera cuspidata* contra *M. luteus*, que exibiu uma CIM de $7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$, e chega a ser significativo frente a CIM de $3,9 \mu\text{g mL}^{-1}$ do cloranfenicol, antibiótico utilizado como controle positivo (SOBRAL et al., 2009). A Tabela 20 mostra os valores de CIM para o extrato em diclorometano do caule de *Kielmeyera cuspidata* Saddi (SOBRAL et al., 2009).

Tabela 20: Concentração inibitória mínima (CIM) do extrato em diclorometano do caule de *Kielmeyera cuspidata* (SOBRAL et al., 2009).

Microrganismos	Extrato em diclorometano ($\mu\text{g mL}^{-1}$)
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 6633	15,6
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	31,2
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 5175	31,2
<i>Micrococcus luteus</i> ATCC 10240	7,8
<i>Escherichia coli</i> ATCC 94863	> 500
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	> 500
<i>Salmonela choleraesuis</i> ATCC 14028	> 500

Comparando os resultados de *K. coriacea* com os resultados de CIM do extrato em diclorometano do caule de *K. cuspidata*, pode-se verificar que este foi mais ativo frente a bactérias aeróbias do que as partições em diclorometano de diferentes partes de *K. coriacea*. Os resultados demonstram que a partição em diclorometano da folha de *K. coriacea* não conseguiu inibir o crescimento bacteriano em concentração menor do que $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ e o extrato em diclorometano do caule de *K. cuspidata* exibiu CIM de $7,8 \mu\text{g mL}^{-1}$.

São encontrados poucos estudos sobre atividade antimicrobiana de óleos essenciais frente a bactérias bucais (BOTELHO et al., 2007; SEGHATOLESAMI et al., 2009; MECCIA et al., 2007; SCHENEIDER et al., 2008; SILVA et al., 2010). Em

recente trabalho realizado por Rocha e outros (2011b) foi observado que os óleos essenciais da raiz, caule, folhas e frutos da planta do cerrado *Campomanesia pubescens* O. Berg (gabiroba peluda) exibiram importante efeito antimicrobiano (Tabela 21) contra *S. mitis*, *S. mutans* e *S. sanguinis*, também aqui estudados. Como se pode observar, os resultados obtidos pelos extratos e partições da *K. coriacea* (Tabela 19) são, em geral, bem superiores.

Tabela 21. Efeito inibitório dos óleos essenciais para diferentes partes de *C. pubescens* contra organismos aeróbicos bucais (ROCHA, 2011b).

Óleo essencial	Microrganismos (CIM $\mu\text{g mL}^{-1}$)		
	<i>S. mitis</i>	<i>S. mutans</i>	<i>S. sanguinis</i>
do fruto	500	500	1000
da folha	500	500	1000
do caule	>2000	>2000	>2000
da raiz	>2000	>2000	2000

Em recente trabalho de Montanari e outros (2011) a composição química e a atividade antimicrobiana de óleos essenciais de diferentes espécies de Verbanaceae foi comparada. Neste trabalho, estes óleos foram caracterizados com alto teor de sesquiterpenos como o *trans*-cariofileno, o D-germacreno e o biciclogermacreno como os principais componentes.

A presença de *trans*-cariofileno no óleo essencial da folha de *K. coriacea* (15%) pode explicar, sinergeticamente com outros sesquiterpenos oxigenados, a boa atividade antimicrobiana do extrato em diclorometano, uma vez que já foi comprovada a sua ação antibacteriana também por Deena e Thopppil (2000).

O bisabolol presente no óleo essencial da casca interna de *K. coriacea* (5,1%) também apresenta atividade antimicrobiana (HERNADEZ, 2005). Sinergicamente com outros compostos de baixa concentração podem exercer a boa atividade antimicrobiana do extrato não polar em cicloexano desta parte da planta.

6 CONCLUSÕES

A análise e a quantificação dos constituintes químicos das partes aéreas de *Kielmeyera coriacea* (pau-santo), bem como a atividade antioxidante de seus extratos, apresentaram resultados que confirmam a utilização desta planta pelas populações do cerrado. A sua casca externa apresentou alto teor de lignina, o que pode explicar o fato da casca ser utilizada na produção de cortiça. As porcentagens obtidas para os constituintes macromoleculares da casca interna e madeira estão dentro da faixa de aceitação para as árvores folhosas.

O óleo essencial de *Kielmeyera coriacea* foi analisado pela primeira vez. O óleo da folha é constituído principalmente de D-germacreno, *trans*-cariofileno e biciclogermacreno. No óleo essencial da flor, o eugenol é o constituinte majoritário. Na casca interna, os constituintes presentes em maior concentração foram *alfa*-copaeno, *alfa-trans*-bergamoteno, *beta*-bisaboleno, *E-beta*-farneseno e *alfa*-curcumeno. Na casca externa, os dois componentes presentes em maior concentração no óleo não foram identificados. A maioria dos componentes identificados são sesquiterpenos e alcanos. E no óleo da madeira, o ácido palmítico é o componente majoritário. Foi encontrada uma grande concentração de alcanos, (tricosano, tetracosano, pentacosano, hexacosano, heptacosano, entre outros) que juntos representam 51,3% do óleo essencial. Em comparação com os óleos essenciais da *Kielmeyera rugosa*, houve diferenças na concentração dos componentes encontrados nas folhas e flores das duas espécies. Foi identificado, ainda, no óleo da madeira, o 2-etilexil-3-(4-metoxifenil)-2-propenoato (conhecido como Parsol MCX), um composto que absorve fortemente a radiação UVB. É um óleo solúvel, incolor e inodoro utilizado em várias formulações de protetores solares. Pelas informações de atividades biológicas dos compostos identificados, conclui-se que o óleo essencial das diferentes partes da *K. coriacea* apresenta um potencial significativo para a sua utilização na farmacopéia nacional.

Os extratos e as partições da folha e casca interna apresentaram altos teores de compostos fenólicos, o que explica a boa atividade antioxidante (AA), avaliada pelo método DPPH para esses extratos. As amostras que apresentaram os melhores resultados de CE₅₀ foram também as que obtiveram a maior quantidade de fenóis totais e proantocianidinas. As frações 5 e 6, obtidas após fracionamento em coluna da partição diclorometano da casca interna, caracterizou-se com grande potencial antioxidante.

A análise dos extratos por CLAE das frações 5 e 6 obtidas do fracionamento em coluna da partição diclorometano da casca interna e que apresentaram altos valores de CE₅₀, mostrou a presença de poucos compostos, ainda não identificados neste estudo.

A análise de infravermelho dos diferentes extratos não permitiu identificar diferenças na estrutura dos compostos fenólicos. Apesar da funcionalidade global muito similar, identificou-se o efeito das partes da planta na assinatura química das diversas frações estudadas.

Na análise da atividade antimicrobiana a partição em cicloexano da casca interna foi, no geral, a mais ativa frente a três microrganismos bucais com resultados de CIM de 6,2 µg mL⁻¹ para as bactérias *S. mutans*, *S. sanguinis* e *A. naeslundii*., sendo uma amostra promissora no tratamento de infecções periodontais. Os extratos e as partições da folha e casca interna apresentaram altos teores de compostos fenólicos que, sinergicamente, agindo com sesquiterpenos oxigenados podem explicar a boa atividade antimicrobiana destes extratos.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, R. P. **Identification of essential oil components by gas chromatography/quadrupole mass spectroscopy.** Carol Stream: Allured Publishing Corporation, 2001.
- ALMEIDA-MANZO A. J. **Exercícios de botânica no Planalto Central.** 2011. Disponível em: <http://www.sbpaisagismo.com.br/arquivos/botanica_planalto_central.pdf>. Acesso em: 17 nov. 2011.
- ANDRADE, M. S., SAMPAIO, T. S., NOGUEIRA, P. C. L., RIBEIRO, A. S., BITTRICH, V., AMARAL, M. C. E. Volatile compounds of the leaves, flowers and fruits of *Kielmeyera rugosa* Choisy (Clusiaceae). **Flavour and Fragrance Journal**, Chichester, v. 22, p. 49-52, 2007.
- ANDREO, D., JORGE, N. Antioxidantes naturais: técnicas de extração. **Boletim CEPPA**, Curitiba, v. 24, n. 2, p. 319-336, jul./dez. 2006.
- ARELLO, E. F., PINTO, J. E. B. P. Propagação em vitro de *Kielmeyera coriacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, DF, v. 28, n.1, p. 25-31, jan. 1993.
- 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**, Milano, v. 73, n. 6, p. 515-519, 2002.
- AZAMBUJA, W. **Bisabolol.** 2009. Disponível em: <http://oleosessenciais.org/category/padroes_tipos/padroes/a_d_padroes/bisabolol/>. Acesso em: 01 dez. 2011.
- BARBOSA, L. C. A., MALTHA, C. R. A., SILVA, V. L., COLODETTE, J. L. Determinação da relação siringila/guaiacila da lignina em madeiras de eucalipto por pirólise acoplada à cromatografia gasosa e espectrometria de massas (PI CG/EM). **Química Nova**, São Paulo, v. 31, n. 8, p. 2035-2041, 2008.
- BITTRICH, V. Clusiaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro , 2010a. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB000089>>. Acesso em: 17 nov. 2011.
- BITTRICH, V. Clusiaceae in **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2010b Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010/FB006860>>. Acesso em: 17 nov. 2011.
- BIZZO, H. R., HOVELL, A. M. C., REZENDE, C. M. Óleos essenciais no Brasil: aspectos gerais, desenvolvimento e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 588-594, 2009.
- BORGES, D. B, FARIAS, M.R., SIMÕES, C.M.O., SCHENKEL, E.P. Comparação das metodologias da Farmacopéia Brasileira para determinação de água em matérias-primas vegetais, e validação da determinação de água em analisador de umidade para

Calendula officinalis L., *Foeniculum vulgare* Miller, *Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reissek e *Passiflora alata* Curtis. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 15, p. 229-236, jul./set. 2005.

BOTELHO, M. A., NOGUEIRA, N. A. P., BASTOS, G. M., FONSECA, S. G. C., LEMOS, T. L. G., MATOS, F. J. A., MONTENEGRO, D., HEUKELBACH, F., RAO, J. H. V. S., BRITO, G. A. C. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol an thymol against oral pathogens. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Ribeirão Preto, v. 40, n. 3, p. 349-356, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 28, n. 1, p.25-30, 1995.

BRASIL. Ministério do Meio Ambiente. **Programa Nacional de Conservação e Uso Sustentável do Bioma Cerrado**. Brasília, DF, 2004. Proposta elaborada pelo grupo de Trabalho do Bioma Cerrado, instituído pela Portaria MMA nº. 361 de 12 de setembro de 2004. Disponível em: <<http://cerradobrasil.cpac.embrapa.br/prog%20cerrado%20sustent.pdf>>. Acesso em: 26 nov. 2011.

BROWNING, B. L. **Methods of Wood Chemistry**. New York : Interscience,, 1967. v.2.

CANUTO, K. M. **Propriedades químicas e farmacológicas de mangiferina: um composto bioativo de manga (*Mangifera indica* L.)**. Petrolina: Embrapa Semi-Árido, 2009.

CARDOSO, C. A. L., SILVA, J. R. M., KATAOKA, V. M. F., BRUM, C. S., POPPI, N. R. Avaliação da atividade antioxidante , toxicidade e composição química por CG-EM do extrato hexânico das folhas de *Campomanesia pubescens*. **Revista de Ciências Farmacêutica Básica e Aplicada**, v. 29, n. 3, p. 297-301, 2008.

CARVALHO, R. A., LACERDA, J. T., OLIVEIRA, E. F., SANTOS, E. S. Extratos de plantas medicinais como estratégia para o controle de doenças fúngicas do inhame (*Dioscorea* sp.) no Nordeste. SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 2, 2002, João Pessoa, PB. **Anais**. João Pessoa, PB: EMEPA-PB, 2002. v. 1.

CHANG, W-C., HSIAO, M-W., WU, H-C., CHANG, Y-Y., HUNG, Y-C., YE, J-C. The analysis of eugenol from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* by HPLC and against the proliferation of cervical cancer cells. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 5, n.7, p. 1121-1127, 2011.

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

CLSI – CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. **Methods for dilution antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria, approved standard** – M11-A7, 7^a ed., v. 27, 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. **BioAssay**, Jaboticabal, v.4, p. 1-6, 2009.

COQUEIRO, A., SKRZEK, S. C. G., REGASINI, L. O., QUEIROZ, M. M. F., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S. Flavonóides e atividade antioxidante de *Kielmeyera variabilis* (Clusiaceae). Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 33, 2010, Águas de Lindóia. **Resumo**. Águas de Lindóia, SP: Sociedade Brasileira de Química, 2010.

CORDEIRO, C. H. G., SACRAMENTO, L. V. S., CORRÊA, M. A., PIZZOLITTO, A. C., BAUAB, T. M. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulação para a higiene bucal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 42, n. 3, p. 395-404, jul./set. 2006.

CORREA, M. P. **Dicionário das plantas úteis do Brasil e exóticas cultivadas**. Rio de Janeiro: IBDF, 1969.

CÔRREA, R. S. **Xantonas oxigenadas bioativas:** cristalização, estrutura e suas interações intra e intermoleculares. 2009. 182 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Instituto de Física de São Carlos, Universidade de São Paulo, São Carlos, 2009.

CORTEZ, D. A. G., YOUNG, M. C. M., MARSTON, A., WOLFENDER, J. L., HOSTETTMANN, K. Xanthones, triterpenes and a biphenyl from *Kielmeyera coriacea*. **Phytochemistry**, New York, v. 47, n. 7, p.1367-1374, 1998.

CORTEZ, D. A. G., MARSTON, A., HOSTETTMANN, K. Separation of xanthones and a biphenyl from *Kielmeyera coriacea* by centrifugal partition chromatography. **Chromatographia**, New York, v. 50, n. 1/2, p. 7-10, 1999.

CORTEZ, D. A. G.; FILHO, B. A. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D., MARSTON, A., HOSTETTMANN, K. Antibacterial activity of a biphenyl and xanthones from *Kielmeyera coriacea*. **Pharmaceutical Biology**, Lisse, v. 40, n. 7, p.485-489, 2002.

COSTA, J. R. **Novos agentes sililantes contendo nitrogênio e enxofre como precursores para a síntese de sílica gel e de sílicas mesoporosas modificadas**. 2007. 89 f. Dissertação (Mestrado em Química)-Centro de Ciências Exatas e da Natureza, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2007.

CRAVEIRO, A. A., QUEIROZ, D. C. Óleos essenciais e química fina. **Química Nova**, São Paulo, v. 16, n. 3, p. 224-228, 1993.

DEENA, M. J., THOPPIL, J. E. Antimicrobial activity of the essential oil of *Lantana camara*. **Fitoterapia**, Milano, v. 71, p. 453-455, 2000.

DEGÁSPARI, C. H., WASZCZYNSKYJ, N. Propriedades antioxidantes de compostos fenólicos. **Visão Acadêmica**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 33-40, jan./jun. 2004.

DEWICK, P.M. The mevalonate and methylerythritol phosphate pathways: terpenoids and steroids. In: _____ **Medicinal Natural Products**: a biosynthetic approach. 3 ed, Chichester: John Wiley & Sons, 2009. cap. 5, p. 187-306.

DI STASI, L. C., HIRUMA-LIMA, C. A. **Plantas medicinais na Amazônia e na Mata Atlântica**. 2. ed. rev. e ampl. São Paulo: UNESP, 2002.

DSM-Nutritional Products Ltd. **Parsol MCX**. 2009. Disponível em: <http://www.dsm.com/en_US/downloads/dnp/118_033_DSM_Parsol_MCX.pdf>. Acesso em: 25 nov. 2011.

DÓRES, R. G. R. Determinação de compostos fenólicos em *Dimorphandra mollis* Benth. In: _____. **Análise formológica e fitoquímica da fava d'anta (*Dimorphandra mollis* Benth)**. 2007. Tese (Doutorado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2007. Cap. 4. Disponível em: <http://www.tede.ufv.br/tedesimplificado/tde_arquivos/17/TDE-2007-04-18T081213Z-453/Publico/06%20-%20capitulo%204.pdf>. Acesso em: 11 nov. 2011.

DORNAS, W. C., OLIVEIRA, T. T., RODRIGUES-DAS-DORES, R. G., SANTOS, A. F., NAGEM, T. J. Flavonóides: potencial terapêutico no estresse oxidativo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 28, n. 3, p. 241- 249, 2007.

DUTRA, F. L. G. **Compostos fenólicos e metilxantinas em erva-mate armazenada em sistemas de estacionamento natural e acelerado**. 2009. 77 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos)-Universidade federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FARMACOPÉIA brasileira, 5. ed., Brasília, 2010. v. 1.

FERNANDES, D. C., SKRZEK, S. C. G., GIANINI, M. J. M., MARTINS, A. B. G., CASTRO-GAMBOA, I., BOLZANI, V. S., SILVA, D. H. S. Perfil químico e atividade biológica das folhas de *Garcinia xanthochymus* (Clusiaceae). Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 32, 2009, Fortaleza. **Resumo**. Fortaleza, CE: Sociedade Brasileira de Química, 2009.

FERNANDES, E. S., PASSOS, G. F., MEDEIROS, R., CUNHA, F. M., FERREIRA, J., CAMPOS, M. M., PIANOWSKI, L. F., CALIXTO, J. B. Anti-inflammatory effects of compounds alpha-humulene and (-)-trans-caryophyllene isolated from the essential oil of *Cordia verbenacea*. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 569, p. 228–236, 2007.

FERREIRA, I. M. **Bioma Cerrado—Um estudo das paisagens do Cerrado**. 2008. Disponível em: <<http://www4.fct.unesp.br/ceget/paisagens.pdf>>. Acesso em: 24 nov. 2011.

FERRI, P. H. Química de produtos naturais: métodos gerais. In: DI STASI, L.C. **Plantas medicinais:** arte e ciência—um guia de estudo interdisciplinar. São Paulo:Unesp, 1996. cap.10, p. 129-156.

FOELKEL, C. Casca da árvore do eucalipto: aspectos morfológicos, fisiológicos, florestais, ecológicos e industriais, visando a produção de celulose e papel. **Eucalyptus Online Book & Newsletter**, n. 1, jun. 2005. Disponível em: <http://www.eucalyptus.com.br/capitulos/capitulo_casca.pdf>. Acesso em: 13 out. 2011.

FONSECA, M. C. M. **Crescimento, composição do óleo essencial, teores de óleo e de tanino em *Porophyllum ruderale* (Jacq.) Cassini.** 2001. 120 f. Dissertação (Mestrado em Fitotecnia)-Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, MG, 2001.

FRANCO, I. M., COTA, M. M. T., COSTA, F. N. *Kielmeyera Mart. & Zucc.* (Clusiaceae) do campus JK da Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, MG. In: CONGRESSO DE ECOLOGIA DO BRASIL, 10, 2011, São Lourenço. **Resumo.** São Lourenço, MG: Sociedade de Ecologia do Brasil, 2011.

GALLO, D., NAKANO, O., SILVEIRA NETO, S., CARVALHO, R. P .L., BAPTISTA, G. C., BERTI FILHO, E., PARRA, J. R. P., ZUCCHI, R. A., ALVES, S. B., VENDRAMIN, J. D., MARCHINI, L. C., LOPES, J. R. S., OMOTO, C. **Entomologia agrícola.** Piracicaba: FEALQ, 2002. 920p.

GARCÍA, A. A., CARRIL, E. P-U. Metabolismo secundário de plantas. **Reduca** (Biología). Serie Fisiología Vegetal, Madrid, v. 2, n. 3, p. 119-145, 2009.

GLOBAL BIODIVERSITY INFORMATION FACILITY. **Species: *Kielmeyera coriacea Mart.*** 2011. Disponível em: <<http://data.gbif.org/species/3714041/>>. Acesso em: 17 nov. 2011.

GOBBO-NETO, L., LOPES, N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007.

GOPALAKRISHNAN, G., BANUMATHI, B., SURESH, G. Evaluation of the antifungal activity of natural xanthones from *Garcinia mangostana* and their synthetic derivatives. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 60, n. 5, p. 519-524, 1997.

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*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v. 48, n. 1, p. 211-216, 2005.

GUARIM-NETO, G., MORAIS, R. G. Recursos medicinais de espécies do cerrado de Mato Grosso: um estudo bibliográfico. **Acta Botânica Brasilica**, Porto Alegre, v. 17, p. 561-584, 2003.

GUEDES, V. R. **Estudo fitoquímico do extrato hexânico e dos óleos voláteis de *Acriptopappus micropappus***. 2004. 162 p. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química-Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2004.

HALLIWELL B., GUTTERIDGE J. M. C. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 4 th ed. Oxford: Oxford University, 2007. In: TRIDSKIN. Biosciences. Avaliação da atividade antioxidante – DPPH. Disponível em: <<http://www.tridskin.com/servicos2.html>>. Acesso em: 09 nov. 2011.

HASLAM, E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs and medicines: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 59, p. 205-215, 1996.

HERNÁNDEZ, T., CANALES, M., AVILA, J. G., GARCÍA, A. M., MARTÍNEZ, A., CABALLERO, J., VIVAR, A. R., LIRA, R. Composition and antibacterial activity of essential oil of *Lantana achyranthifolia* Desf. (Verbenaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 96, p. 551-554, 2005.

HORST, H. **Análise química e biológica dos constituintes fenólicos de *Croton celtidifolius baill.*** 2008. 79 f. Dissertação (Mestrado em Química) – Centro de Ciências Físicas e Matemáticas-Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

IBGE. **Mapa de biomas e de vegetação**. 2004. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/noticia_visualiza.php?id_noticia=169>. Acesso em: 24 nov. 2011.

KIKUCHI, K., KISHINO, A., KONISHI, O., KUMAGAI, K., HOSOTANI, N., SAJI, I., NAKAYAMA, C., KIMURA, T. *In vitro* and *in vivo* characterization of a novel Semaphorin 3A inhibitor, SM-216289 or Xanthofulvin. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 278, n. 44, p. 42985–42991, 2003.

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

LEMOS, A. R. **Caracterização físico-química, bioquímica e avaliação da atividade antioxidante em genótipos de urucueiros (*Bixa orellana L.*)**. 2008. 69 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos)-Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Itapetinga, 2008.

LIMA, D. L. F., GONÇALVES, E. M., VASCONCELOS, A. M., MAIA, C. R. N., FREITAS, R. A., CARLOS, M. X. Investigação dos ingredientes ativos presentes nos colutórios e dentifrícios encontrados no mercado brasileiro. **Revista Periodontia**, Fortaleza, v. 19, n. 1, p. 52-57, 2009.

LOGUERCIO, A. P., BATTISTIN, A., VARGAS, A. C., HENZEL, A., WITTS, N. M. Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells). **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 35, n. 2, p. 371-376, mar./abr. 2005.

LOPES, R. M., OLIVEIRA, T. T., NAGEM, T. J., PINTO, A. S. Flavonóides. Farmacologia de flavonóides no controle hiperlipidêmico em animais experimentais. **Biotecnologia Ciência & Desenvolvimento**, Brasília-DF, ano 3, n. 17, p. 18-22, 2000.

LÓPEZ, C. A. A. Considerações gerais sobre plantas medicinais. **Ambiente: Gestão e Desenvolvimento**, Boa Vista, v.1, p.19-27, 2006.

LUPE, F. A. **Estudo da composição química de óleos essenciais de plantas aromáticas da Amazônia**. 2007. 120 f. Dissertação (Mestrado em Química). Instituto de Química-Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

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

MACIEL, M. A. M., PINTO, A. C., VEIGA, V. F., GRYNBERG, N. F., ECHEVARRIA, A. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAGINA, M. A., GILIOLI, A., MORESCO, H .H., COLA, G., PIZZOLATTI, M. G., BRIGHENTE, I. M. C., Atividade antioxidante de três espécies de *Eugenia* (Myrtaceae) **Latin American Journal of Pharmacy**, Buenos Aires, v. 29, n. 3, p. 376-382, 2010.

MARCOTTE, H.; LAVOIE, M. C. Oral microbial ecology and the role of *salivary immunoglobulin A*. **Microbiology Molecular Biology Reviews**, v. 62, p. 71-109, 1998.

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

MATOS, F. J. A. **Introdução à fitoquímica experimental**. 2. ed. Fortaleza: EUFC, 1997.

MECCIA, G., ROJAS, L. B., VELASCO, J., DIAZ, T., USUBILLAGA, A. Composition and antibacterial screening of the essential oils of leaves and roots of *Espeletiopsis angustifolia* Cuatrec. **Natural Products Communications**, v. 22, n. 12, p. 1221-1224, 2007.

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 δ-tocotrienols from *Kielmeyera coriacea* against cancer cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 19, p. 623-630, 2011.

MONTANARI, R. M., BARBOSA, L. C., DEMUNER, A. J., SILVA, C. J. Chemical composition and antibacterial activity of essential oils from *Verbenaceae* species: alternative sources of *E*-caryophyllene and germacrene-D. **Química Nova**, São Paulo, v. 34, n. 9, p. 1550-1555, 2011.

MONTEIRO, J. M., ALBUQUERQUE, U. P., ARAÚJO, E. L., AMORIM, E. L. C. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, 2005.

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

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

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

NASCIMENTO, V.T., LACERDA, E.U., MELO, J.G., LIMA, C.S.A., AMORIM, E.L.C., ALBUQUERQUE, U.P. Controle de qualidade de produtos à base de plantas medicinais comercializados na cidade do Recife-PE: erva-doce (*Pimpinella anisum* L.), quebra-pedra (*Phyllanthus* spp.), espinheira santa (*Maytenus ilicifolia* Mart.) e camomila (*Matricaria recutita* L.) **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 7, n. 3, p. 56-64, 2005.

NILAR, L. J. H. Xanthones from the heartwood of *Garcinia mangostana*. **Phytochemistry**, New York, v. 60, p. 541-548, 2002.

NKENGFACK, A. E., MKOUNGA, P., MEYER, M., FOMUM, Z. T., BODO, B. Globulixanthones C, D and E: three prenylated xanthones with antimicrobial properties from the root bark of *Sympodia globulifera*. **Phytochemistry**, New York, v. 61, p.181-187, 2002.

NOZELLA, E. F. **Determinação de taninos em plantas com potencial forrageiro para ruminantes**. 2001. 72 f. Dissertação (Mestrado em Ciências)-Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2001.

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

OLIVEIRA, A. C., VALENTIM, I. B., GOULART, M. O. F., SILVA, C. A., BECHARA, E. J. H., TREVISON, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.

OLIVEIRA, F. Q., GOBIRA, B., GUIMARÃES, C., BATISTA, J., BARRETO, M., SOUZA, M. Espécies vegetais indicadas na odontologia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 17, p. 466-476, jul./set. 2007.

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

PEDRO, M., CERQUEIRA, F., SOUSA, M. E., NASCIMENTO, M. S. J., PINTO, M. Xanthones as inhibitors of growth of human cancer cell lines and their effects on the proliferation of human lymphocytes in vitro. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 10, p. 3725-3730, 2002.

PEREIRA, Z. V., GOMES, C. F., LOBTCHENKO, G., GOMES, M. E. S., SIMÕES, P. D. A., SARUWATARI, R. P. S., RIGO, V. F., CORDEIRO, W. P. Levantamento das Plantas Medicinais do Cerrado *Sensu Stricto* da Fazenda Paraíso – Dourados, MS. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, supl. 1, p. 249-251, 2007.

PINTO, A. C., SILVA, D. H. S., BOLZANI, V. S., LOPES, N. P., EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, supl. 1, p.45-61, 2002.

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.

PINTO, J. E. B. P., ARELLO, E. F., PINTO, C. A. B. P., BARBOSA, M. H. P. Resposta à regeneração e crescimento de brotos *in vitro* de *Kielmeyera coriacea* quando influenciado por diferentes concentrações dos sais e de sacarose. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 26, n. 1, p. 57-61, 1996.

PORTE, D. D. Papel do alcalóide branquicerina na resposta ao estresse por radiação ultravioleta e dano mecânico em *Psychotria brachyceras* Müll Arg. 2009. 138 f. Tese (Doutorado em Ciências)-Centro de Biotecnologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

POULI, N., MARAKOS, P. Fused xanthone derivatives as antiproliferative agents. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry**, v. 29, p. 77-98, 2009.

QUEIROZ, C. R. A. dos A., MORAIS, S. A. L. de., NASCIMENTO, E. A. Caracterização dos Taninos da Aroeira-Preta (*Myracrodruon urundeuva*). **Revista Árvore**, Viçosa-MG, v. 26, p. 485-492, 2002.

REDE DE SEMENTES DO CERRADO. *Kielmeyera coriacea* (Spreng.) Mart. var. *coriacea*. 1995. Disponível em: <http://www.rededesementesdocerrado.com.br/Especies/Guttiferae_3320/Kielmeyera/coriacea_2439/index.html>. Acesso em: 17 nov. 2011.

REYES, J., ZAMORA, P. P., DURÁN, N. Hidrólise enzimática de casca de arroz utilizando-se celulases. Efeito de tratamentos químicos e fotoquímicos. **Química Nova**, São Paulo, v. 21 n. 2, p. 140-143, 1998.

REYNERTSON, K. A., BASILE, M. J., KENNELLY, E.J. Antioxidant potential of seven *Myrtaceous* fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, v. 3 p. 25-36, 2005.

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

ROCHA, E. O. **Avaliação dos constituintes fenólicos e voláteis, atividade antioxidante e antimicrobiana de *Campomanesia pubescens* O. Berg (Gabiroba)**. 2011a. 80 f. Dissertação (Mestrado em Química)-Instituto de Química, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

ROCHA, E. O., MORAIS, S. A. L., CHANG, R., NASCIMENTO, E. A., CUNHA, L.C. S., AQUINO, F. J. T., SOUZA, M. G. M., CUNHA, W. R., MARTINS, C. H. G.. Essential oil composition and atioxidant and antimicrobial properties of *Campomanesia pubescens* O. Berg, native of Brazilian Cerrado. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, Buenos Aires, v. 30, p. 1843-1848, 2011b.

RODRIGUES, V. E. G., CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio Cerrado na região do Alto Rio Grande – Minas Gerais. **Revista Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n.1, p.102-123, 2001.

ROSA, C. A. B. **Influência do teor de lignina da madeira de *Eucalyptus globulus* na produção e na qualidade da celulose kraft**. 2003. 150 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Florestal)-Centro de Ciências Rurais-Programa de Pós-Graduação em Engenharia Florestal, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2003.

ROWELL, R. M., PETTERSEN, R., HAN, J.S., ROWELL, J. S., TSHABALALA, M. A. Cell wall chemistry. In: ROWELL, R. M. **Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites**. New York, Taylor & Francis Group., 2005, cap. 3 p. 35-74.

SANTOS, E. V., FERREIRA, L. A. B., LAMBERT, D., SOUZA, C. L., MENDES, E. A. P., FERREIRA, I. M. **A ocupação do bioma Cerrado: da expansão da fronteira agrícola aos dias atuais**. 2011. Disponível em: <http://www.catalao.ufg.br/historia/arquivosSimposios/historia/VIISIMPOSIO/comunicacoes/Eduardo%20Vieira/eduardo_vieira.pdf>. Acesso em: 24 nov. 2011.

SANTOS, I. D. **Influência dos teores de lignina, holocelulose e extractos na densidade básica e contração da madeira e nos rendimentos e densidade do carvão vegetal de cinco espécies lenhosas do cerrado**. 2008. 57 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Florestais)-Faculdade de Tecnologia-Departamento de Engenharia Florestal, Universidade de Brasília, Brasília DF, 2008.

SCHENEIDER, N. F. Z., MOURA, N. F., COLPO, T., MARINS, K., MARONGONI, C., FLACH, A. Estudos dos compostos voláteis e atividade antimicrobiana da *Myrciaria tenella* (Cambuí). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 89, n.2, p. 131-133, 2008.

SCHOFIELD, P., MBUGUA, D. M., PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91 p. 21-40. 2001.

SEGHATOLESLAMI, S., SAMADI, N., SALEHNIA, A., AZIMI, S. Antibacterial activity of endemic *Satureja Khuzistanica Jamzad* essential oil against oral pathogens effects. **Iran Endodontic Journal**, v. 4, n. 1, p. 5-9, 2009.

SILVA, C. P. *Poiretia latifolia* e *Poiretia tetraphylla*: estudo dos óleos voláteis e atividades biológicas preliminares. 2005. 120f. Dissertação (Mestrado em Química)-Centro de Ciências Naturais e Exatas, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2005.

SILVA, D. G. **Isolamento e caracterização do óleo essencial da *Lippia alba* (Mill.) N. E. Brown (Erva cidreira) e investigação da atividade biológica.** 2008. 55 f. Trabalho de conclusão de curso (Graduação)—Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

SILVA, F. M., PAULA, J. E., ESPINDOLA, L. S. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian *Cerrado* medicinal plants. ***Mycoses***, Berlin, v. 53, n. 6, p. 511-517, 2009.

SILVA, L. L., HELDWEIN, C. G., REETZ, L. G. B., HORNER, R., MALLMANN, C. A., HEINZMANN, B. M. Composição química, atividade antimicrobiana *in vitro* e toxicidade em Artemia salina do óleo essencial das inflorescências de *Ocimum gratissimum* L., Lamiaceae. ***Revista Brasileira de Farmacognosia***, São Paulo, v. 20, n. 5, p. 700-705, 2010.

SILVA, M. E. C. M. **Apontamentos de Tecnologia dos Produtos Florestais- Composição Química da Madeira.** UTAD, 2010. Disponível em:
http://www.cifap.utad.pt/Composicao_quimica_madeira.pdf. Acesso em: 13. Out. 2011.

SILVA, R. V. **Uso de taninos da casca de três espécies de eucalipto na produção de adesivos para madeira.** 2001. 57 f. Tese (*Magister Scientiae*)-Programa de Pós-graduação em Ciência Florestal, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2001.

SIMÕES, C. M., O., SCHENKEL, E. P., GOSMANN, G., MELLO, J. C. P., MENTZ, L. A., PETROVICKA, P. R. **Farmacognosia:** da planta ao medicamento. 5 Ed.; Ed. UFRGS, 1104 p. 2003

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

SJÖSTRÖM, E. Wood Polysaccharides. In: _____ **Wood Chemistry:** fundamentals and applications. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1993a. cap. 3, p. 51-70.

SJÖSTRÖM, E. Extractives. In: _____ **Wood Chemistry:** fundamentals and applications. 2. ed. San Diego: Academic Press, 1993b. cap. 5, p. 90-108.

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. ***Revista Brasileira de Farmacognosia***, São Paulo, v. 19, p. 686-689, jul./set. 2009.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE FARMACOGNOSIA. **Controle de qualidade farmacognóstico de matéria-prima vegetal.** 2009. Disponível em:

<http://sbfgnosia.org.br/Ensino/cq_materia_prima_vegetal.html>. Acesso em: 12 out. 2011.

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

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia Vegetal**, 3. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004.

TEIXEIRA, F. A., SILVA, C. G. **DPPH,C₁₈H₁₂N₅O₆**. 2011. Disponível em: <<http://qnint.sbj.org.br/qni/visualizarMolecula.php?idMolecula=160>>. Acesso em: 09 nov. 2011.

VIEIRA, R. F., MARTINS, M. V. M. Recursos genéticos de plantas medicinais do Cerrado: uma compilação de dados. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v. 3, n. 1, p. 13-36, 2000.

WIEDENHOEFT, A. C., MILLER, R. B. Structure and function of wood. In: ROWELL, R. M. **Handbook of Wood Chemistry and Wood Composites**. New York, Taylor & Francis Group., 2005, cap. 2, p. 9-33.

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

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

APÊNDICE A – METODOLOGIA PARA A DETERMINAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

1 MICRORGANISMOS UTILIZADOS NOS ENSAIOS

Para a determinação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos e das partições foram utilizadas as seguintes cepas padrão, provenientes da “American Type Culture Collection” (ATCC): *Streptococcus sanguinis* (ATCC 10556), *Streptococcus mitis* (ATCC 49456), *Streptococcus mutans* (ATCC 25175) e *Actinomyces naeslundii*, (ATCC 19039) (Tabela 1).

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

Microrganismo/Cepas Padrão ATCC	Morfotipo	Meio de cultura do inóculo	Meio de cultura do teste
<i>Streptococcus sanguinis</i> ATCC 10556	Coco Gram positivo	TSB Ágar	TSB
<i>Streptococcus mitis</i> ATCC 49456	Coco Gram positivo	TSB Ágar	TSB
<i>Streptococcus mutans</i> ATCC 25175	Coco Gram positivo	TSB Ágar	TSB
<i>Actinomyces naeslundii</i> ATCC 19039	Bacilo Gram positivo	Schaedler Agar	Schaedler

TSB: Triptona de soja

2 MEIOS DE CULTURA UTILIZADOS

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

O termo “suplementado”, encontrado no decorrer do texto, deve ser considerado como a adição de 1,0 mL de solução de Hemina a uma concentração de 5,0 mg mL⁻¹ e 1,0 mL de menadione a uma concentração de 1,0 mg mL⁻¹ para cada 1,0 L de meio de cultura.

Caldo Schaedler (BD[®])

Composição:

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

Preparação: Dissolveu-se aproximadamente 28,4 g desta composição em 1,0 L de água destilada, a qual foi homogeneizada e autoclavada por 15 min a 121 ± 1 °C. Após autoclavagem a solução foi suplementada com 1,0 mL de solução de Hemina a 5,0 mg mL⁻¹ e 1,0 mL de solução de menadione a 1,0 mg mL⁻¹.

Caldo triptona de soja TSB (DB[®])

Composição:

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

Preparação: Dissolveram-se 30,0g desta composição em 1,0 L de água destilada, a qual foi homogeneizada e autoclavada por 20 min a 121 ± 1 °C.

Base para ágar sangue (BD®)

Composição:

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

Preparação: Dissolveu-se 40,0g desta composição em 1,0 L de água destilada. A solução resultante foi aquecida e homogeneizada até a dissolução do pó e autoclavada por 15 min, a 121°C. Após autoclavagem, a base foi resfriada de 45 a 50 °C e adicionada uma solução de 5% de sangue desfibrinado de carneiro. 25,0 mL dessa mistura foram colocados em placas de Petri.

Ágar Schaedler (DB®)

Composição:

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

Preparação: Dissolveu-se aproximadamente 41,9 g desta composição em 1,0 L de água destilada. A solução resultante foi aquecida e homogeneizada até a completa dissolução do pó e autoclavada por 15 min a 121 °C. Logo em seguida, a solução foi suplementada com 1,0 mL de solução de Hemina (5,0 mg mL⁻¹), 1,0 mL de solução de menadione (

1mg mL⁻¹) e com solução 5% de sangue desfibrinado de carneiro. Em seguida, foram distribuídos 30,0 mL da solução resultante em placas de Petri.

Solução de Heminha

Dissolveu-se 0,5 g de Heminha em 10,0 mL de solução NaOH a 1,0 N e adicionou-se 90,0 mL de água destilada esterilizada. Após obter a solução na concentração final de 5 mg mL⁻¹, esta foi filtrada em membrana filtrante de 0,22 µm de porosidade para um tubo esterilizado.

Solução Menadione

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

3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

A avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos brutos e das partições foi determinada pelo método da microdiluição em caldo (MIC) através da concentração inibitória mínima (CIM).

4 PREPARO DAS AMOSTRAS DOS EXTRATOS PARA O MÉTODO DE MICRONDILUIÇÃO

Para a realização da técnica de microdiluição em microplaca, todas as amostras selecionadas foram inicialmente preparadas com concentrações de 8000 µg mL⁻¹ (solução de partida). Para se obter esta concentração, dissolveram-se 2,0 mg de cada amostra em 250 µL de dimetilsulfóxido (DMSO). Em seguida preparam-se as seguintes soluções:

1-Solução mãe para o teste de microdiluição em caldo para aeróbios:

Retirou-se 125 µL da solução de partida, colocou-se em um frasco de 10,0 mL e acrescentou-se 1875 µL de caldo TSB, obtendo-se uma nova solução de concentração 500 µg mL⁻¹.

2-Solução mãe para o teste de microdiluição em caldo para anaeróbios:

Retirou-se 162,5 µL da solução de partida e acrescentou-se 2437,5 µL de caldo Schaedler suplementado, obtendo-se uma nova solução de concentração 500 µg mL⁻¹.

5 PREPARO DO INÓCULO

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

6 PREPARAÇÃO DA DROGA PADRÃO

A droga padrão utilizada para validação da técnica foi o dicloridrato de clorexidina. Primeiro pesou-se 1 mg da droga e diluiu-se em 10,0 mL de água destilada esterilizada, tendo uma concentração final de 0,1 mg mL⁻¹. Em seguida, transferiu-se 1 mL dessa primeira diluição para um tubo contendo 4,0 mL de caldo Schaedler suplementado; essa ultima diluição de concentração de 0,02 mg mL⁻¹ é a solução estoque para realização da técnica. Levou-se em consideração a potência de 100 % da droga.

7 CONTROLES POSITIVOS E NEGATIVOS

Para a determinação de atividade antimicrobiana pelo método da microdiluição, utilizou-se como controle positivo, frente aos microrganismos indicadores e dicloridrato de clorexidina. Para o método de CIM, as concentrações de dicloridrato de clorexidina variam de 0,0115 µg mL⁻¹ a 5,9 µg mL⁻¹.

Ainda realizaram-se para o método de microdiluição em caldo os seguintes controles: esterilidade dos caldos TSB e Schaedler; controle da cultura (inóculo); esterilidade da clorexidina, esterilidade dos extratos e partições e controle do DMSO.

8 MÉTODO DA MICRONDILUIÇÃO PARA DETERMINAÇÃO DA CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA

A determinação de concentração inibitória mínima das soluções dos extratos e das partições foi realizada segundo o método de microdiluição em caldo segundo os padrões CLSI para os microrganismos aeróbios (CLSI, 2006) e o CLSI para os microrganismos anaeróbios (CLSI, 2007).

Realizou-se todo procedimento em capela de fluxo laminar, com os cuidados necessários; as vidrarias, ponteiras e os meios de cultura foram esterilizados. Foram utilizadas microplacas estéreis com 96 orifícios. Cada orifício recebeu inóculo, caldo triptona soja ou caldo Schaedler e amostra das soluções preparadas. O volume final em cada orifício foi de 100,0 µL para os microrganismos aeróbios e 200,0 µL para os anaeróbios.

Avaliaram-se as amostras das soluções nas seguintes concentrações: 400 a 3,0 µg mL⁻¹. Determinou-se, então, a concentração mínima de cada amostra capaz de inibir o crescimento dos microrganismos indicadores.

As microplacas foram seladas com parafilm e incubadas a 37 °C por 24 horas. As placas que continham *S. mutans*, *S. sanguinis* e *S. mitis* foram incubadas em microaerofilia pelo sistema de chama/vela. Após o período de incubação, foram adicionados em cada orifício 30,0 µL de resazurina (Sigma) preparada em solução aquosa (0,01%) para bactérias.

Este sistema revelador permite a observação imediata da atividade antimicrobiana da amostra testada, sendo que a cor azul representa ausência de crescimento bacteriano e a cor vermelha, a presença de crescimento bacteriano. Os microrganismos anaeróbicos são incubados por 48 a 72 horas em câmara de anaerobiose, a 36 °C. Em seguida, utiliza-se o mesmo revelador (resazurina) para a determinação das concentrações inibitórias mínimas (CIM) frente aos microrganismos anaeróbios.

Para todas as bactérias testadas foi realizado o controle do solvente (DMSO) nas concentrações de 5 a 1%. Todos os extratos e as partições foram avaliados frente aos microrganismos indicadores em triplicata.