



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
INSTITUTO DE QUÍMICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA

EDER CLEY SANTANA

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E  
CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA CASCA  
INTERNA DE *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc

UBERLÂNDIA-MG  
2017

EDER CLEY SANTANA

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE, ANTIMICROBIANA E  
CARACTERIZAÇÃO DE COMPOSTOS BIOATIVOS DA CASCA  
INTERNA DE *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Orgânica

Orientador: Prof. Dr. Francisco J. T. de Aquino

Coorientador: Prof. Dr. Alberto de Oliveira

UBERLÂNDIA-MG

2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

S232a Santana, Eder Cley, 1977-  
2017 Atividade antioxidante, antimicrobiana e caracterização de compostos bioativos da casca interna de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc / Eder Cley Santana. - 2017.  
128 f. : il.

Orientador: Francisco José Tôres de Aquino.  
Coorientador: Alberto de Oliveira.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Química.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.8>  
Inclui bibliografia.

1. Química - Teses. 2. *Kielmeyera* - Teses. 3. *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc - Teses. I. Aquino, Francisco José Tôres de. II. Oliveira, Alberto de. III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Química. IV. Título.

---

CDU: 54



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 266/PPQUI.

DATA: 29/08/2017

DISCENTE: Eder Cley Santana

MATRÍCULA: 11512QMI003

TÍTULO DO TRABALHO: Prospecção química e avaliação biológica de *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Química

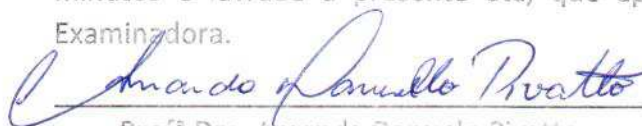
LINHA DE PESQUISA: Química de Produtos Naturais

PROJETO DE PESQUISA DE VINCULAÇÃO: Prospecção fitoquímica, ensaios biológicos e espectrofotométricos de plantas do cerrado.

Às quatorze horas do dia vinte e nove de agosto do ano dois mil e dezessete, no Auditório Prof. Manuel Gonzalo Hernández Terrones, do Bloco 5I, no Campus Santa Mônica, reuniu-se a Banca Examinadora composta pelos Professores Doutores Amanda Danuelo Pivatto, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Raquel Maria Ferreira de Sousa e Francisco José Tôrres de Aquino, da Universidade Federal de Uberlândia, professor(a) orientador(a) e presidente da mesa. Iniciando os trabalhos, o(a) presidente da mesa apresentou o(a) candidato(a) 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 03/2013/PPQUI. Em seguida, o(a) presidente da mesa concedeu a palavra ao(à) candidato(a) para a exposição do seu trabalho e, em seqüência, aos examinadores, em ordem sucessiva, para arguir o(a) apresentador(a). 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

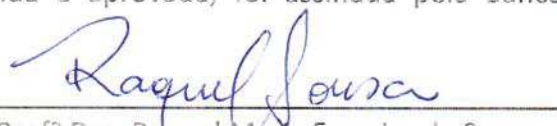
Aprovou o(a) candidato(a). Por sugestão da Banca Examinadora, o título do trabalho será Atividade antioxidante, antimicrobiana e caracterização de compostos bioativos do casca interna de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc.

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. As correções observadas pelos examinadores deverão ser realizadas no prazo máximo de 30 dias. Nada mais havendo a tratar, deu-se por encerrada a sessão às 17 horas e 30 minutos e lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pela Banca Examinadora.



Profª Dra. Amanda Danuelo Pivatto

UFTM



Profª Dra. Raquel Maria Ferreira de Sousa

UFU

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

## **AGRADECIMENTOS**

### **A DEUS**

Pela força, perseverança e coragem.

### **A minha amada MÃE MARIA CRISTINA**

Pelo incentivo, preocupação e orações.

### **AO meu PAI EDSON e minha FAMÍLIA**

Pelo apoio e entendimento.

### **AO professor Dr. FRANCISCO JOSÉ TÔRRES DE AQUINO**

Pela orientação, ensinamento, paciência e oportunidade.

### **A grande amiga ROSIMEIRE BORGES**

Pela amizade, parceria, incentivo e ajuda.

### **Ao professor LUÍS CARLOS SCALON CUNHA**

Pelo apoio, descontração, explicações, análises antimicrobianas e inestimável ajuda.

### **Ao doutorando MÁRIO MACHADO**

Pelas explicações, ajuda, incentivo e realização de análises.

### **Às colegas THAMIRES RODRIGUES e ALANA EVELIN**

Pelo apoio, dinamismo e ajuda.

### **Aos COLEGAS do laboratório, MARCOS ‘Gigas’, TIARA COSTA, LEANDRO MACHADO, MICHELE NASCIMENTO, MARÍLIA BARBOSA, EDMILSON OLIVEIRA, ROBERTA BELAZ, GAVENI, KELLY LAMOUNIER, DAIANE OLIVEIRA, CARLA MOURA, LARISSA VIEIRA.**

Pela parceria, descontração e ajuda.

### **Aos professores ALBERTO OLIVEIRA, SÉRGIO LEMOS, WELLINGTON CRUZ, MARCOS PIVATTO, RAQUEL SOUSA, ROBERTO CHANG**

Pelos inestimáveis ensinamentos.

### **Às colegas de estudo MARIA DALVA AMERICANO e ELIS REGINA**

Pela parceria e incentivo nos estudos.

### **À Secretaria de educação do Estado de Minas Gerais**

Pela licença para estudos de aperfeiçoamento profissional.

### **A amiga KERLEY CARNEIRO RÉGIS**

Pelo incentivo e parceria nos estudos. A minha eterna gratidão à grande responsável por esse momento.

*Uma mente que se abre ao conhecimento,  
jamais voltará ao seu tamanho original.*

*Albert Einstein*

## RESUMO

Este trabalho tem como objetivo contribuir com informações sobre a constituição química e a avaliação da atividade antimicrobiana do extrato etanólico e frações da casca interna de *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc, uma árvore típica do Cerrado e muito utilizada como planta medicinal. O estudo avaliou o potencial antibacteriano e antifúngico do extrato etanólico e partições. No estudo antibacteriano foram analisadas bactérias bucais aeróbias e anaeróbias pelo método da microdiluição em caldo, sendo os resultados expressos em concentrações inibitórias mínimas (CIM). Nesta análise, a partição *n*-hexano foi a mais ativa, apresentando valores de CIM entre 1,56 e 6,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$  sendo que, para as bactérias *Streptococcus mitis* e *Streptococcus sanguinis* os valores foram melhores que os encontrados para a anfotericina (CIM 3,688  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), fármaco usado como controle positivo. Estes resultados despertaram interesse para o isolamento de compostos. Os ensaios realizados com as frações da partição hexânica mostraram uma diminuição dessa atividade com valores de CIM entre 12,5-1500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Estes resultados podem estar relacionados com compostos que estavam agindo de forma sinérgica e foram separados durante o fracionamento em coluna. Na avaliação do potencial antifúngico frente às leveduras do gênero *Cândida*, tanto o extrato quanto as partições inibiram o crescimento de todas as espécies testadas, com concentrações inibitórias mínimas (CIM) variando entre 23,43 e 1500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , sendo que as partições diclorometano e *n*-butanol apresentaram os valores mais promissores, com concentrações entre 23,43 e 46,87  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A atividade antioxidante foi avaliada pelo método do radical livre DPPH e pelo método eletroquímico. Os valores de concentração efetiva ( $CE_{50}$ ) foram melhores para as partições acetato de etila e *n*-butanol (entre 2,0 e 1,6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectivamente), e menores que o controle BHT (4,8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). O potencial antioxidante foi confirmado no método eletroquímico. Estes resultados estão em conformidade com os maiores teores de compostos fenólicos presentes nestas partições polares. A prospecção fitoquímica também revelou a presença de compostos fenólicos (taninos, xantonas, cumarinas, flavonoides e saponinas), além de terpenos e terpenoides. Na partição hexânica foram identificados por Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas e por Ressonância Magnética Nuclear os esteroides  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol, campesterol e sitost-4-en-3-ona, os triterpenos  $\alpha$ -amirina e lupeol e o ácido graxo hexadecanoico. A presença desses compostos na partição hexânica está relacionada à forte atividade antibacteriana, já que esses compostos atuam na inibição contra diferentes microrganismos, incluindo os orais. Na análise do extrato etanólico e das partições de maior polaridade por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray nos modos negativo e positivo foram identificados o ácido protocatecólico, o flavonoide epi-catequina, e algumas proantocianidinas do tipo A, B, C e seus oligômeros. Na partição *n*-butanol foi identificado um dímero de epi-catequina-epi-galocatequina e a epi-catequina-3-*O*-glicosídeo; na partição acetato de etila e no resíduo metanol-água foi identificado o dímero epi-afzelequina-epi-catequina. A identificação destes compostos fenólicos nas partições polares pode explicar os resultados de atividade antioxidante e antifúngica. Este estudo indica que a casca interna da *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc é rica em compostos bioativos, exibindo atividade biológica contra bactérias orais e fungos.

**Palavras-chaves:** *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc. Extratos e partições. Atividades biológicas.

## ABSTRACT

This work aims to provide information on the chemical constitution and evaluation of antimicrobial activity of ethanolic extract and fractions from the inner bark of *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc, a typical Cerrado tree and used as a medicinal plant. The study evaluated the antimicrobial and antifungal potential of ethanolic extract (EE) and partitions. Antibacterial activities study were analyzed using aerobic and anaerobic buccal bacteria by Microdilution Method in broth, with the results expressed in minimum inhibitory concentrations (MIC). In this analysis, the *n*-hexane (HP) partition was the most active, presenting MIC values between 1.56 and 6.25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , and for the *Streptococcus mitis* and *Streptococcus sanguinis* bacteria values were better than those found for amphotericin (CIM 3.688  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), the drug used as positive control. These results awakened interest for the isolation of compounds. The tests with fractions of *n*-hexane partition showed a decrease of this activity with MIC values between 12.5 and 1500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . These results may be related to compounds that were acting synergistically and separated during the fractionation on column. In evaluating the antifungal potential against the yeasts of the genus *Candida*, both the extract and partitions inhibited the growth of all species tested, with minimum inhibitory concentrations (MIC) varying from 23.43 and 1500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , being the partitions dichloromethane and *n*-butanol that presented the most promising values, at concentrations between 23.43 and 46.87  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . The antioxidant activity evaluated by the DPPH free radical method and by the electrochemical method. The Effective Concentration (EC50) values were better for the ethyl acetate (AP) and *n*-butanol (BP) partitions (between 2.0 and 1.6  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , respectively), and lower than the BHT control (4.8  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). The antioxidant activity confirmed in the electrochemical method. These results are in accordance with the highest levels of phenolic compounds present in these partitions. Phytochemical screening also revealed the presence of phenolic compounds (tannins, xanthenes, coumarins, flavonoids and saponins), as well as terpenes and terpenoids. In the *n*-hexane partition identified by Gas Chromatography coupled to Mass Spectrometry and by Nuclear Magnetic Resonance the steroids  $\beta$ -sitosterol, stigmasterol, campesterol and sitost-4-en-3-one, the triterpenes  $\alpha$ -amirin and lupeol and the fatty acid hexadecanoic. The presence of these compounds in the *n*-hexane partition may explain the strong antibacterial activity, since these compounds act in the inhibition against different microorganisms, including the buccal ones. The analysis of ethanolic extract and more polar partitions polarity by High Performance Liquid Chromatography coupled to Mass Spectrometry with Electrospray Ionization in negative and positive modes have been identified protocatechuic acid, flavonoid epi-catechin and proanthocyanidins A, B, C type and its oligomers. In the partition *n*-butanol was identified a dimer of epi-catechin-epi-gallocatechin and gallocatechin-3-O-glycoside; on partition ethyl acetate and methanol-water residue has been identified the dimer epi-afzelequin-epi-catechin. The identification of these phenolic compounds in polar partitions can explain the results of antioxidant and antifungal activity. This study indicates that the inner bark of *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc is rich in bioactive compounds, exhibiting biological activity against oral bacteria and fungi.

Keywords: *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc. Extract and partitions. Biological activities.



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Estruturas químicas de substâncias bioativas utilizadas como fármacos.....	16
Figura 2 –	Esquema representativo de metodologia usada para a identificação de compostos bioativos oriundos de PNs.....	17
Figura 3 –	Mapa da distribuição geográfica global das plantas da espécie <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart & Zucc. Ocorrência nativa e endêmica.....	20
Figura 4 –	Imagens características da morfologia de <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc.....	21
Figura 5 –	Fotografias de troncos característicos de <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart. & Zucc.....	21
Figura 6 –	Estruturas químicas de algumas substâncias isoladas de <i>K. coriacea</i> Mart & Zucc.....	24
Figura 7 –	Fluxograma representando todas as etapas do processo desenvolvido neste trabalho.....	29
Figura 8 –	Imagens da preparação das cascas de <i>K. coriacea</i> utilizadas para pesquisa.....	30
Figura 9 –	Esquema fotográfico do processo de preparação do extrato etanólico da casca interna de <i>K. coriacea</i> .....	31
Figura 10 –	Esquema do processo de particionamento líquido-líquido do EE.....	32
Figura 11 –	Fluxograma do fracionamento em coluna da partição PH.....	39
Figura 12 –	Reação do ácido gálico com o molibdênio componente do reagente de Folin em meio alcalino.....	45
Figura 13 –	Reação simplificada entre a vanilina sulfúrica e um tanino catéquico....	46
Figura 14 –	Reação de complexação da quercetina com $AlCl_3$ .....	48
Figura 15 –	Reação redox simplificada do DPPH• com o composto fenólico BHT...	50
Figura 16 –	Reação global de oxidação da (+)-catequina.....	52
Figura 17 –	Espectros de UV-Vis do extrato e partições .....	59
Figura 18 –	Atribuições no espectro de $^1H$ dos deslocamentos químicos dos $^1H$ da fração C1H1.....	61
Figura 19 –	Ampliação do espectro RMN $^1H$ no intervalo de 5,5 a 12,5 ppm .....	61
Figura 20 –	Ampliação do espectro RMN $^1H$ no intervalo de 0,4 -6,6 ppm .....	61
Figura 21 –	Espectro de RMN $^{13}C$ (400 MHz, $CDCl_3$ ) da fração C1H1.....	62
Figura 22 –	Cromatograma de CG-EM (70eV) da subfração C1H2-F6 .....	63
Figura 23 –	Cromatograma de CG-EM (70eV) da subfração C1H2-F26 .....	64
Figura 24 –	Espectro de massas CG-EM-IE gerado para o pico 4 .....	65
Figura 25 –	Espectro de massa CG-EM-IE gerado para o pico 5 .....	65
Figura 26 –	Proposta de fragmentação da $\alpha$ -amirina por mecanismo RDA .....	66
Figura 27 –	Cromatograma de CG-EM (70eV) da subfração C1H2-F33 .....	67
Figura 28 –	Espectro de massa CG-EM-IE gerado para o pico 9 .....	67
Figura 29 –	Cromatografia em Camada Delgada (CCD) da fração C1H2-F42 .....	68
Figura 30 –	Cromatograma de CG-EM (70eV) da subfração C1H2-F42 .....	69
Figura 31 –	Espectro de massa CG-EM-IE para os compostos I, II e III .....	69
Figura 32 –	Estrutura química molecular básica dos esteroides hidroxilados em C-3.....	71
Figura 33 –	Proposta de mecanismos da fragmentação para alguns íons-fragmentos do $\beta$ -sitosterol $m/z$ 414 .....	72
Figura 34 –	Espectro RMN de $^1H$ (400 MHz, $CDCl_3$ ) da fração C1H2-F42 .....	73

Figura 35 –	Expansão do espectro RMN de $^1\text{H}$ da fração C1H2-F42, região de 4,5 a 5,8 ppm .....	74
Figura 36 –	Espectro RMN de $^1\text{H}$ ampliado da fração C1H2-F42 (região de 2,8 a 4,4 ppm) .....	74
Figura 37 –	Espectro RMN de $^{13}\text{C}$ da fração C1H2-F42 com a mistura das substâncias I, II e III. (100 MHz, $\text{CDCl}_3$ ) .....	75
Figura 38 –	Espectro RMN $^{13}\text{C}$ DEPT $^\circ$ 135 da fração C1H2-F42 com a mistura das substâncias I, II e III. ( $\text{CDCl}_3$ ) .....	75
Figura 39 –	Cromatograma de CG-EM (70eV) da subfração C1H3-F11 .....	77
Figura 40 –	Espectro de massa CG-EM-IE e proposta de fragmentação para o ácido palmítico .....	77
Figura 41 –	Cromatograma de CLAE-EM2-IES da fração PAE com os picos dos íons $m/z$ em maior concentração. A- Modo negativo; B- Modo positivo. ....	82
Figura 42 –	Espectro de fragmentação (-)-EM $^2$ -ES de moléculas desprotonadas e de íons-fragmentos de proantocianidinas do tipo B .....	83
Figura 43 –	Fragmentação com picos característicos de PAs-A detectados na partição PAE .....	85
Figura 44 –	Espectros de (+)-CLAE-EM-ESI para as PAs presentes nas partições PAE e PDM .....	85
Figura 45 –	Estruturas químicas de PA poliméricas.....	87
Figura 46 –	Estruturas dos monômeros de catequina e epicatequina.....	88
Figura 47 –	Espectro de fragmentação por EM-IES da epi-catequina (M: 290 u) .....	88
Figura 48 –	Proposta de fragmentação do íon $m/z$ 289.....	89
Figura 49 –	Proposta de fragmentação para os principais íons-fragmentos $[\text{M} + \text{H}]^+$ $m/z$ 291.....	90
Figura 50 –	Espectro de massas do íon precursor $m/z$ 577, obtido por (-)-EM $^2$ -IES... ..	91
Figura 51 –	Proposta de fragmentação do dímero de íon $m/z$ 577, modo negativo ....	92
Figura 52 –	Espectro de massas do íon $m/z$ 865, obtido por (-)-EM $^2$ -IES.....	93
Figura 53 –	Proposta de fragmentação para os trímeros de íon $m/z$ 865.....	94
Figura 54 –	Espectros de íons produtos com $[2\text{M}-\text{H}]^-$ .....	95
Figura 55 –	Espectros dos dois tipos de íons $m/z$ 575 encontrados na partição PAE. ....	96
Figura 56 –	Estruturas com as principais fragmentações (-)-CLAE-EM $^2$ -IES de I-PAs-B2 e II-PAs-A2.....	97
Figura 57 –	Espectros dos íons de PA do tipo $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ .....	98
Figura 58 –	Espectro de massas do íon precursor $m/z$ 561, obtido por (-)-EM $^2$ -IES... ..	99
Figura 59 –	Espectro do íon $m/z$ 879 $[\text{M}-\text{H}]^-$ presente na fração PAE.....	100
Figura 60 –	Espectro do íon $m/z$ 451 $[\text{M}-\text{H}]^-$ presente na fração PBU.....	100
Figura 61 –	Espectro do ácido protocatecólico de íon $[\text{M}-\text{H}]^-$ $m/z$ 153 .....	100

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Classificação etnobotânica de <i>Kielmeyera coriacea</i> Mart & Zucc.....	19
Tabela 2 –	Estudos com extratos e substâncias isoladas de <i>K. coriacea</i> Mart & Zucc.....	22
Tabela 3 –	Reagentes utilizados como controle (ou padrão) nos testes de determinação dos teores de fenóis totais, flavonóis e taninos condensados.....	26
Tabela 4 –	Reagentes utilizados no preparo de reveladores para a prospecção fitoquímica.....	26
Tabela 5 –	Faixa de concentração das soluções do extrato e das partições usadas para o teste da AA.....	33
Tabela 6 –	Rendimentos de massas obtidos das partições líquido-líquido utilizando o extrato etanólico (EE, 64,7g) da casca interna da <i>K. coriacea</i> .....	42
Tabela 7 –	Resultados da prospecção fitoquímica do extrato etanólicos e partições da casca interna da <i>K. Coriacea</i> .....	43
Tabela 8 –	Teores de fenóis totais do EE e partições.....	44
Tabela 9 –	Teores de taninos condensados (proantocianidinas) do extrato etanólico e partições.....	46
Tabela 10 –	Teores de flavonoides do extrato etanólico/partições.....	47
Tabela 11 –	Valores de CE <sub>50</sub> para o extrato etanólico e as partições.....	49
Tabela 12 –	Intensidade da AA através do sequestro do radical DPPH segundo Reynertson, Basile e Kennely (2005) .....	49
Tabela 13 –	Cargas e potenciais de oxidação por VPD do extrato etanólico/partições.	51
Tabela 14 –	Concentrações Inibitórias Mínimas ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) do extrato/partições frente às bactérias bucais.....	54
Tabela 15 –	Atividade antibacteriana de subfrações da partição hexânica frente às bactérias orais .....	55
Tabela 16 –	Resultado Comparativo de CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) entre espécies do cerrado.....	55
Tabela 17 –	CIMs ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para o extrato e as partições frente aos fungos <i>Candida spp.</i> .....	57
Tabela 18 –	Dados da análise por CG-EM da subfração C1H2-F6.....	63
Tabela 19 –	Propostas de fragmentações para formação de alguns íons dos esteróis identificados.....	71
Tabela 20 –	Dados de RMN <sup>13</sup> C dos compostos presentes na fração C1H2-F42.....	76
Tabela 21 –	Compostos identificados por CLAE-IE-EM no extrato e partições da casca interna da <i>K. coriacea</i> .....	79
Tabela 22 –	Íons [M-2H] <sup>2-</sup> de PAs encontrados no extrato/partições por CLAE-EM-IES.....	81
Tabela 23 –	Grau de polimerização (GP) e íons fragmento [M - H] <sup>-</sup> , [2M-H] <sup>-</sup> , [M-2H] <sup>2-</sup> , [M-3H] <sup>3-</sup> para PAs identificadas.....	84
Tabela 24 –	Estruturas típicas de flavan-3-ol com suas massas moleculares.....	86
Tabela 25 –	Estruturas de flavonol com suas massas moleculares.....	86

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AA	Atividade Antioxidante
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BHT	2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metilfenol
CCD	Cromatografia em Camada Delgada
CC	Cromatografia em Coluna
CG-EM-IE	Cromatografia gasosa acoplada a Espectrômetro de Massas com ionização por Impacto de elétrons
CIM	Concentração Inibitória Mínima
CLSI	Clinical and Laboratory Standarts Institute
CLAE-EM-IES	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas com Ionização por Electrospray
d	Dubleto
DPPH	2,2-difenil-1-picrilidrazil
DEPT	<i>Distortionless Enhancement by Polarization Transfer</i>
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Extrato etanólico
EM <sup>2</sup> (EM/EM)	Espectro de Massas de segunda ordem
FE	Fase Estacionária
FDA	Food and Drug Administration
FM	Fase Móvel
HRF	Heterocycle Ring Fission
IDH	Índice de Deficiência de Hidrogênio
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m</i>	Multiplete
OMS	Organização Mundial da saúde
PA	Proantocianidina
PAE	Partição acetato de etila
PBU	Partição <i>n</i> -butanol
PDM	Partição diclorometano

PH	Partição hexano
QM	Fissão quinona metídio
$R_f$	Fator de Retenção
RDA	Clivagem retro Diels-Alder
RMA	Resíduo metanol-água
RMN de $^1\text{H}$	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
RMN de $^{13}\text{C}$	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono Treze
RPMI	Roswell Park Memorial Institute medium
s	Singleto
TMS	Tetrametilsilano
TMP	Tradicional Medicina Popular
$T_r$	Tempo de retenção
UFC	Unidade formadora de colônias (micro-organismos)
UTI	Unidade de Tratamento Intensivo
UV-VIS	Ultravioleta-vísível
WHO	World Health Organization
$\Delta$	Deslocamento químico em relação ao TMS (expresso em ppm)
PA	Pro Analyse (Alta pureza)

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>14</b>
1.1	<i>Kielmeyera coriacea</i> Mart & Zucc .....	19
<b>2</b>	<b>OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>25</b>
2.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	25
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>25</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAIS</b> .....	<b>25</b>
4.1	SOLVENTES E REAGENTES .....	25
4.2	EQUIPAMENTOS .....	27
4.3	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS .....	28
4.4	ENSAIOS BIOLÓGICOS.....	28
4.5	SOFTWARES E ESTATÍSTICAS .....	28
<b>5</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>29</b>
5.1	COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL .....	29
5.2	PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO (EE) .....	30
5.3	PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO ETANÓLICO (EE) .....	31
5.4	DETERMINAÇÕES DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA) .....	32
<b>5.4.1</b>	<b>Método sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH)</b> .....	<b>32</b>
<b>5.4.2</b>	<b>Determinação do teor de fenóis totais</b> .....	<b>33</b>
<b>5.4.3</b>	<b>Determinação do teor de taninos – proantocianidinas</b> .....	<b>34</b>
<b>5.4.4</b>	<b>Determinação do teor de flavonoides</b> .....	<b>34</b>
<b>5.4.5</b>	<b>Método da voltametria cíclica por pulso diferencial (VPD)</b> .....	<b>35</b>
5.5	ANÁLISES DE METABÓLITOS PRESENTES NOS EXTRATOS ATRAVÉS DO PERFIL OBTIDO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-VIS .....	35
5.6	ATIVIDADE ANTIMICROBIANA .....	36
<b>5.6.1</b>	<b>Determinação da atividade antibacteriana do extrato e partições frente às bactérias bucais aeróbias e anaeróbias</b> .....	<b>36</b>
<b>5.6.2</b>	<b>Determinação da atividade antifúngica do extrato/partições frente à <i>Candida ssp</i></b> .....	<b>37</b>
5.7	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO E PARTIÇÕES .....	38
<b>5.7.1</b>	<b>Reveladores químicos, monitoramento UV-VIS</b> .....	<b>38</b>
5.8	FRACIONAMENTO EM COLUNA CROMATOGRÁFICA (CC) DA PARTIÇÃO HEXÂNICA (PH) .....	39
<b>5.8.1</b>	<b>Fracionamento em CC da fração hexânica C1H2</b> .....	<b>40</b>
<b>5.8.2</b>	<b>Fracionamento em CC da fração hexânica C1H3</b> .....	<b>40</b>
5.9	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM) DA PARTIÇÃO PH E FRAÇÕES .....	40
5.10	ANÁLISE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN) .....	41
5.11	ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELECTROSPRAY DO EE E DAS PARTIÇÕES PDM, PAE, PBU e RMA .....	41
<b>6</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÕES</b> .....	<b>42</b>
6.1	RENDIMENTO DAS PARTIÇÕES .....	42
6.2	PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA .....	42

6.3	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA) .....	43
6.3.1	<b>Análises da determinação dos teores de fenóis totais</b> .....	44
6.3.2	<b>Análises da determinação do teor de taninos condensados (proantocianidinas)</b> .....	46
6.3.3	<b>Análises da determinação do teor de flavonoides</b> .....	47
6.3.4	<b>Quantificação da atividade antioxidante (AA) pelo método de sequestro do radical DPPH</b> .....	48
6.3.5	<b>Análises dos resultados da atividade antioxidante por voltametria cíclica de pulso diferencial (VPD)</b> .....	50
6.4	ANÁLISES DOS ENSAIOS ANTIMICROBIANOS .....	52
6.4.1	<b>Análise dos ensaios antibacterianos frente às bactérias orais aeróbias e anaeróbias</b> .....	53
6.4.2	<b>Análises dos ensaios antifúngicos frente aos fungos <i>Candida ssp</i></b> .....	56
6.5	ANÁLISE DO PADRÃO DE METABÓLITOS NO EXTRATO E PARTIÇÕES POR ESPECTROSCOPIA NO UV-VIS .....	58
6.6	ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS DA FRAÇÃO HEXÂNICA (PH) .....	60
6.6.1	<b>Análise e identificação de compostos presentes na fração C1H1</b> .....	60
6.6.2	<b>Análise e identificação de compostos da subfração C1H2-F6</b> .....	63
6.6.3	<b>Análise e identificação de compostos da subfração C1H2-F26</b> .....	64
6.6.4	<b>Análise e identificação de componentes da subfração C1H2-F33</b> .....	66
6.6.5	<b>Análise e identificação dos componentes da subfração C1H2-F42</b> .....	68
6.6.5.1	<i>Análise da subfração C1H2-F42 por RMN</i> .....	72
6.6.6	<b>Análise e identificação de compostos da subfração C1H3-F11</b> .....	77
6.7	IDENTIFICAÇÃO DE COMPONENTES POR CLAE-EM-IES MODO NEGATIVO E MODO POSITIVO NO EXTRATO EE E PARTIÇÕES PDM, PAE, PBU E RMA .....	78
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>101</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>102</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>124</b>
	Apêndice A- Tabela de íons-fragmentos não identificados no extrato/partições por CLAE-EM-IES .....	124
	Apêndice B – I- Curva padrão de calibração típica para o ácido gálico. II- Curva de linearidade da catequina (mg de EC g <sup>-1</sup> de extrato). II- Curva de linearidade da quercetina (µg mL <sup>-1</sup> ) .....	125
	Apêndice C – Subfração C1H3- F108. Espectros de RMN <sup>1</sup> H, <sup>13</sup> C, <sup>13</sup> C DPT-135 .....	126
	Apêndice D – Cromatograma e espectros de massas de CG-EM-IE da subfração C1H3- F108. Espectros de massa CG-EM-IE dos picos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8 .....	127
	Apêndice E – Espectros de RMN 2D da subfração C1H2-F42: I- COSY. II- HMBC. III- HSQC .....	128

## 1 INTRODUÇÃO

A natureza tem sido uma fonte inesgotável para a obtenção de substâncias puras e misturas a partir de plantas, animais, fungos, algas e minerais. Uma vez que aproximadamente 95% de dois milhões de espécies de plantas, animais, fungos, microrganismos e similares da biodiversidade mundial ainda não foram avaliados, o desafio é como acessar e valorizar de forma efetiva essa diversidade química natural. Os produtos dessa extração, chamados de produtos naturais, e comumente referidos como ‘metabólitos secundários ou especializados’, são essas fontes essenciais, seja para os fármacos naturais ou para as sínteses de novos fármacos (COLEGATE et al., 2007; DAVID et al., 2015; DEWICK, 2009; MISHRA, TIWARI, 2011; SIMÕES et al., 2017b).

Os metabólitos secundários ou especializados recebem esse nome porque não estão relacionados com o fisiologismo básico (primário) de crescimento e desenvolvimento das plantas ou animais. Eles estão relacionados a questões de sobrevivência e adaptação da espécie ao seu ambiente e a sua interação com outros organismos. Possuem ação restrita a cada espécie e dependem de fatores locais como sazonalidade do clima, tipo de solos, restrição ou abundância de alimentos e água e em sua maioria apresentam efeitos biológicos e farmacológicos (GOBO-NETO, LOPES, 2007; SIMÕES et al., 2004a, 2017b).

Os produtos naturais têm sido utilizados pelo homem desde a antiguidade como infusões e medicamentos para o tratamento e a cura de enfermidades em diferentes estágios em todas as sociedades ocidentais e orientais. Grandes compêndios com formulações e indicações técnicas de preparo para diferentes usos medicinais foram elaborados por essas sociedades e difundidos por viajantes e navegadores ao longo dos tempos, e que ainda são utilizados até hoje na medicina popular e como fonte primária de fármacos para as indústrias farmacêutica e química (DIAS et al., 2012; VALLI et al., 2012).

No século XVIII, considerado o marco das sínteses de produtos naturais, quando a química e a medicina popular estreitam suas relações surgem os primeiros trabalhos que relacionam estrutura química à atividade biológica e várias substâncias como por exemplo, corantes e fármacos foram obtidas por sínteses. Dentre esses processos, um de êxito extraordinário e que se constituiu na primeira aplicação da Química Medicinal, foi a síntese do ácido acetil salicílico (AAS) (1), obtido em reações a partir da salicina (2) extraída da casca de *Salix Elba* (salgueiro). O AAS é utilizado em aplicação terapêutica como analgésico e anti-inflamatório (VIEGAS JR. et al., 2006).

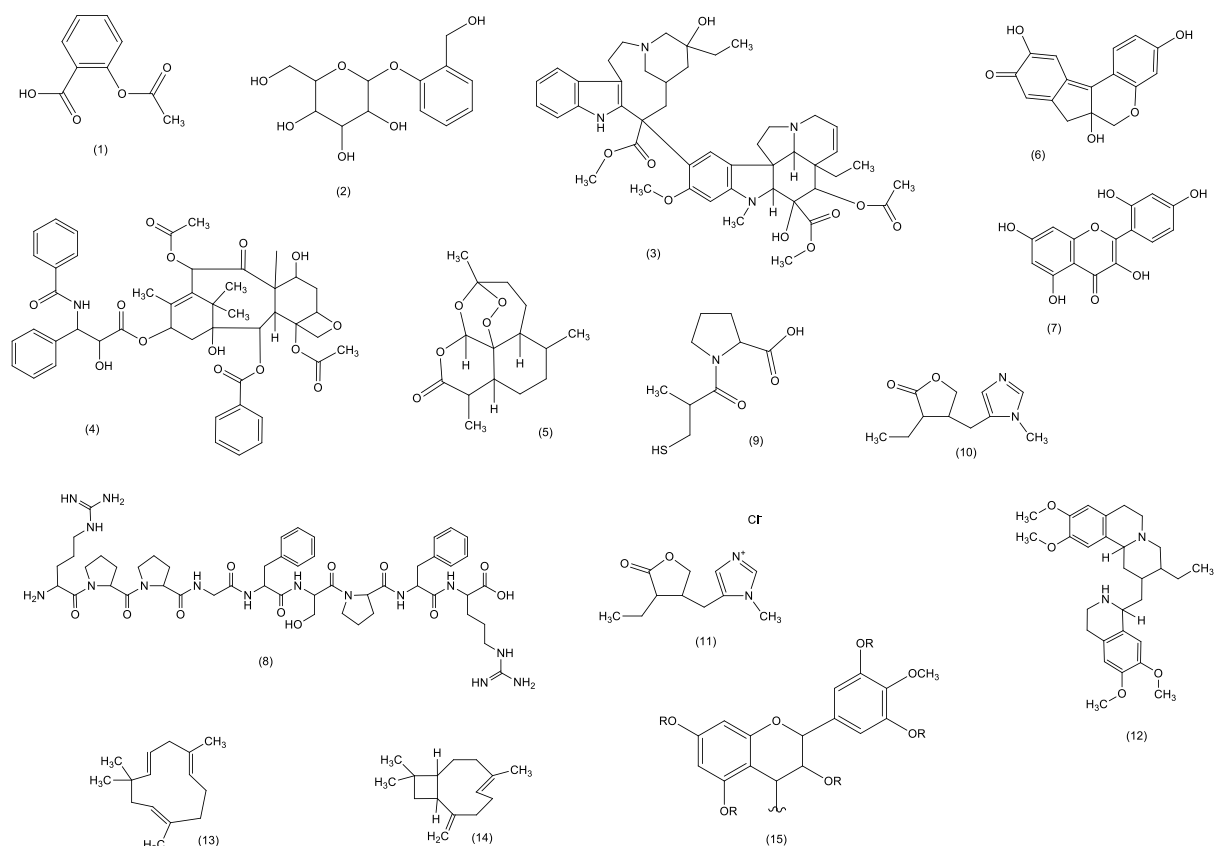


Ao longo do tempo milhares de moléculas farmacologicamente ativas extraídas ou sintetizadas a partir das plantas têm sido usadas na medicina e na indústria farmacêutica. Dos vários fármacos aprovados e de maior apelo no mercado mundial desde 2005 se destacam os alcaloides vimblastina (3), paclitaxel (4), potentes agentes antitumorais usados no tratamento de certos tipos de cânceres e a artemisinina (5) um agente antimalárico. Eles são sintetizados a partir de princípios ativos naturais extraídos respectivamente, de *Catharanthus roseus* (Vinca), *Taxus brevifolia* (Teixo do Pacífico) e *Artemisa annua* (Artemisia) (DEMAIN, 2014; HARVEY, 2008; NEWMAN, CRAGG, 2016).

A história do Brasil está intimamente ligada ao comércio de produtos naturais como especiarias, madeira, cana-de-açúcar, seringueira, e café que motivaram a sua colonização, as disputas de terras e o povoamento do país. Os corantes naturais brasileína (6) e morina (7) extraídos respectivamente do lenho de *Cesalpinia echinata* (pau-brasil) e *Chlorophora tinctoria*, (pau-amarelo) foram por muito tempo a base do comércio português do Brasil-colônia para a Europa. (VIEGAS JR. et al., 2006).

Outras descobertas representativas de produtos naturais endêmicos do Brasil foram: a) o peptídeo bradicinina (8), isolado do veneno de *Bothrops jararaca*. Este peptídeo é um inibidor de uma enzima que atua na circulação pulmonar causando a sua falência. Ela se tornou um importante alvo para a terapia de doenças hipertensivas, sendo a base estrutural para a síntese de fármacos anti-hipertensivos como o captopril® (9); b) o alcalóide pilocarpina (10), isolado de *Pilocarpus jaborandi* sp., é uma fonte estrutural para a síntese do derivado cloridrato de pilocarpina (11) (Solagen®) usado para aumentar secreções salivares em pacientes com câncer durante tratamento com radioterapia e no tratamento do glaucoma crônico há mais de 100 anos (BOLZANI et. al., 2012); c) o alcaloide emetina (12) extraído de *Carapichea ipecacuanha* (poaia), usado como antidiarreico e emético, está hoje presente em várias farmacopeias, inclusive da Organização Mundial da Saúde (OMS) (SIMÕES et al., 2005a, 2016b); d) os sesquiterpenos  $\alpha$ -humuleno (13) e *trans*-cariofileno (14), presentes no óleo extraído de *Cordia verbenaceous* (erva baleeira), são componentes ativos do anti-inflamatório tópico Acheflan®; e) e a mistura de derivados fenólicos (15) (fenóis totais e taninos) presentes no extrato seco extraído de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão) com ação cicatrizante, antimicrobiana e antisséptica e estão no fitofármaco Fitoscar®, o primeiro genuinamente de uma planta endêmica do Cerrado (ANVISA, 2016; BOLZANI et. al., 2012; DAVID et al., 2015; DIAS et al., 2012).

Figura 1 – Estruturas químicas de substâncias bioativas utilizadas como fármacos.



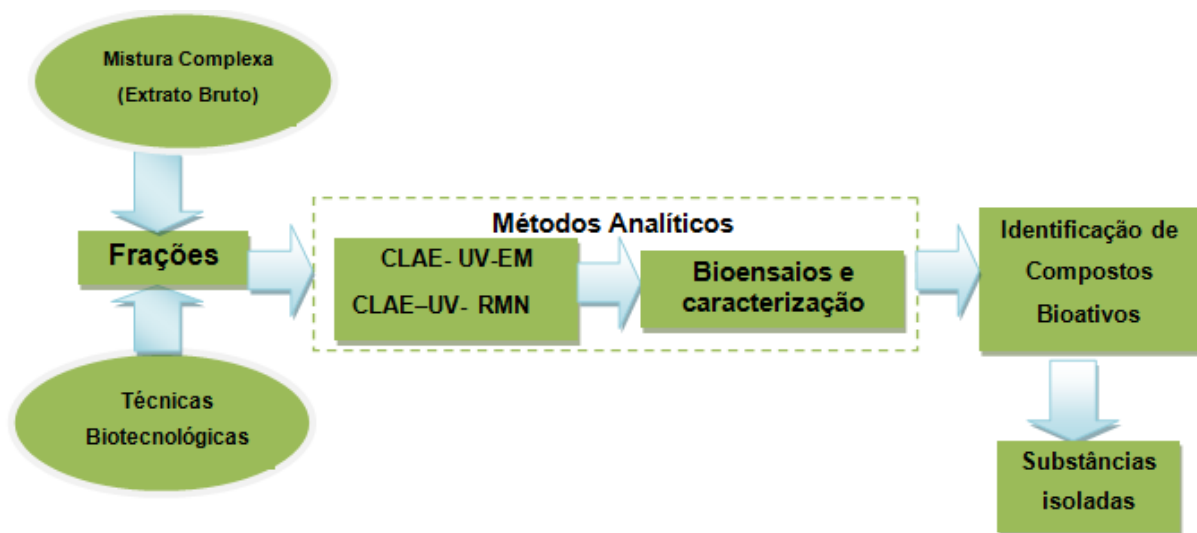
Fonte: o Autor

A análise e a elucidação estrutural desses compostos orgânicos são realizadas hoje usando uma combinação de métodos de análise que incluem técnicas espectroscópicas, espectrométricas e cromatográficas. A cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas com ionização por electrospray (CLAE-EM-IES) permite que sejam analisados compostos com ampla faixa de polaridade e massa molecular, em combinação com a espectroscopia ultravioleta (UV), infravermelho (IV), espectrometria de massa sequencial EM/EM (conhecida como MS/MS ou MS<sup>2</sup>, “*tanden mass spectrometry*”). Dentre as técnicas de espectroscopia destacam-se a ressonância magnética nuclear (RMN) unidimensionais de <sup>1</sup>H e de <sup>13</sup>C e suas correlações bidimensionais (<sup>1</sup>H-COSY, “*correlated spectroscopy*”, que correlaciona os acoplamentos dos H; NOESY, “*nuclear overhauser spectroscopy*”, que estabelece a estereoquímica por H próximos; HSQC, “*heteronuclear single quantum coherence spectroscopy*” que correlaciona C e H; HMBC, “*heteronuclear multiple bond correlations*” que correlaciona C e H adjacentes dentre outras). Outras técnicas como o dicroísmo circular (DC), que determina a configuração absoluta de enantiômeros e a cristalografia de raios-X (CRx), que determina a estrutura tridimensional de um composto por meio de um cristal, também podem ser utilizadas. Um esquema reunindo o processo de

metodológico para elucidação de compostos orgânicos com atividade biológica é apresentado na Figura 2 (COLLINS et al., 2006; NORBERTO et al., 2016; HARVEY et al., 2014; SIMÕES et al., 2017; VESSECCHI et al., 2011).

Embora eficiente cada técnica apresenta suas limitações, sendo cada vez mais utilizadas em conjunto para tornar esses métodos confiáveis, robustos, seletivos e de alta resolução aliados aos conhecimentos já realizados e acumulados em diversas bibliotecas (BOLZANI et al., 2012).

Figura 2 – Esquema representativo de metodologia usada para a identificação de compostos bioativos oriundos de PNs.



Fonte: Adaptado de Bolzani et al. (2012).

Em contraponto a todo esse processo sofisticado de estudo fitoquímico, para o isolamento e identificação de substâncias com propriedades bioativas, está a medicina popular tradicional, que se caracteriza pelo uso de preparados naturais como chás, extratos, ‘garrafadas’, infusões, emplastos, pomadas e cremes a partir de uma ou mais plantas ou mesmo animais e fungos em sua forma bruta. Em todo o mundo, a medicina popular tradicional (também chamada de medicina alternativa, não convencional, não ortodoxa ou complementar) têm a confiança de boa parte da população no tratamento alternativo de suas enfermidades, sob diversas combinações com medicamentos alopáticos, homeopáticos, entre outros (CALIXTO, 2000; FUNARI, FERRO, 2005; RAHMAN, SINGHAL, 2002). O seu uso é passado de geração para geração e contribui para a propagação de suas propriedades medicinais (FIRMO et al., 2011; LEÃO, FERREIRA, JARDIM, 2007). Em países orientais como China (tradicional medicina chinesa), Índia (medicina ayurvedica - hindu) e Japão a

medicina tradicional constitui fator milenar intrínseco de suas culturas. Como fator de preservação dos ritos culturais e medicinais de cada povo a Organização Mundial da saúde (OMS) recomenda e estimula a utilização de fitoterápicos como produtos suplementares, porém, de maneira moderada e em tratamentos médicos, apenas simultâneos aos da medicina convencional (WHO, 2015; RANDAL, BEHRENS, PEREIRA, 2016). No Brasil, embora hoje haja legislações específicas e até rigorosas para o preparo e a comercialização (BRASIL-MS, 2016a; BRASIL-ANVISA, 2016b; MACHADO et. al., 2016), esses produtos são facilmente encontrados em feiras, mercados e ruas por todo o país (VEIGA JR, PINTO, 2005; SILVEIRA et al., 2008).

Como já referenciado, muitas plantas e árvores endêmicas do Brasil têm ações medicinais comprovadas e são usadas como fitoterápicos (medicamentos produzidos a partir de uma planta medicinal e que em seu conteúdo não pode aparecer nenhum tipo de substância sintética ou qualquer derivado isolado de produto natural) e fitofármacos (contêm substâncias isoladas (ou suas misturas) de plantas medicinais ou outra fonte) (VEIGA JR, PINTO, 2005) amplamente difundidos no país, graças a uma vasta e rica biodiversidade, uma das maiores do mundo, aproximadamente 1,8 milhões de espécies de plantas, animais e microrganismos (SiBBR-BRASIL, 2016), e ainda a uma boa parte não catalogada. Essa excelência da biodiversidade tropical brasileira em seus diferentes biomas é evidente, porém, o seu estudo e o número de substâncias isoladas e usadas como fármacos são pequenos se comparados a outras regiões equivalentes. Portanto, há um amplo leque de possibilidades para estudo (BOLZANI et al., 2012, DIAS et al., 2008).

Um desses biomas, o Cerrado, conta com aproximadamente 44% de espécies endêmicas e é a savana mais rica do mundo (KLINK, MACHADO, 2005; BRASIL-MMA, 2016). É considerado um *hotspot* de biodiversidade, isto é, área de relevância ecológica por possuir vegetação diferenciada da restante e abrigar espécies endêmicas (BRASIL-MMA, 2016). Sua vegetação típica tem características arbustivas e árvores de troncos retorcidos, galhos curtos e cascas suberosas ou cortiças, folhas espessas, largas e aveludadas, raízes profundas, além de gramíneas e flores exóticas. O solo é ácido e pobre nutricionalmente, com clima seco e queimadas na maior parte do ano. Porém apresenta água freática em boa estimativa de quantidade (BRASIL-MMA, 2016; FIUZA, 2016). A grande maioria dos preparados de plantas do cerrado, tradicionalmente usados pelas populações locais, têm ações relatadas, mas sem comprovação médica de sua eficácia. Por isso estudos fitoquímicos com essas plantas têm se multiplicado pelo país e também no exterior em diversos laboratórios

farmacêuticos e universidades, dentre eles a Universidade Federal de Uberlândia (UFU), por meio do Núcleo de Pesquisas em Produtos Naturais (NuPpEN).

Uma dessas plantas difundidas pelas populações do Cerrado e estudadas no Núcleo é a *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc (Pau-santo), especificamente os extratos de suas folhas e entrecasca (ou casca interna).

### 1.1 *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc

Pertencente à família *Calophyllaceae* (antiga subfamília *Kielmeyeroideae* de *Clusiaceae* s.l.) (BARBOSA, 2015; STEVENS, 2012) compreende 46 espécies e 2 subespécies sendo que, 45 espécies e as duas subespécies são endêmicas (BITTRICH et al., 2014; MARTINELLI et al., 2014; SIBBr, 2016). Sua classificação etnobotânica é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1- Classificação etnobotânica de *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc.

Classificação	
Reino	Plantae
Filo	Tracheophyta
Classe	Magnoliopsida
Ordem	Malpighiales
Família	Calophyllaceae
Gênero	<i>Kielmeyera</i> Coriacea
Espécie	<i>Kielmeyera coriacea</i> Mart & Zucc
Nome popular	Pau-santo

Fonte: GBIF-Global Biodiversity Information Facility (GBIF) Geospatial Consortium Services; HUFU-Herbarium Uberlandense.

A espécie *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc é a mais abundante do gênero *Kielmeyera* (Figura 3) e está presente predominantemente em áreas abertas do cerrado chamadas de cerradão (SILVA, 2008). Também é encontrada em áreas de vegetação rasteira aberta da Amazônia (nos estados do Pará, Amazonas, Mato Grosso, Tocantins e Rondônia), Caatinga (nos estados da Bahia e Minas Gerais) e Mata Atlântica (nos estados de Minas Gerais, São Paulo e Paraná) (FORZZA et al., 2010; JBRJ, 2010a; 2016b; GBIF, 2016).

Figura 3 – Mapa da distribuição geográfica global das plantas da espécie *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc. Ocorrência nativa e endêmica.



Fonte: GBIF- Global Biodiversity Information Facility. Geospatial Consortium Services.

Popularmente é conhecida como pau-santo, folha-santa, pau-de-josé, saco-de-boi e boizinho (ALVES et al., 2000; VASCONCELLOS, 2009). Apresenta características morfológicas de arbusto (em regiões mais altas ou de solos mais férteis) ou árvore (de até 3,0 m de altura em regiões de solos mais pedregosos do Cerrado) (ALMEIDA-MANSO, 2011), com ramos tortuosos e sem pelos (Figura 4). As folhas são alternas (quando de cada nó sai apenas uma folha), coriáceas (semelhante a couro) e com nervuras. As inflorescências estão na extremidade dos ramos e as flores possuem pétalas brancas e estames (órgão masculino da planta) amarelo-ouro. Os frutos são do tipo cápsula e quando secos se abrem em três partes (valvas), liberando grande quantidade de sementes aladas (com estruturas que possibilitam o 'pouso' ou 'vôo' da semente) (REDE DE SEMENTES DO CERRADO, 2010; SOUZA, LORENZI, 2012).

Figura 4 – Imagens características da morfologia de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc.



A-Árvore no cerrado. B-Arbusto. C-Flores no ápice dos ramos. D-Fruto tipo cápsula. E-Flor. F-Tronco suberoso, casca espessa. G-Fruto seco aberto. H-Folhas com nervura central proeminente.

Fonte: ALMEIDA-MANSO, (2011), MERCADANTE, (2012), MORAES, (2014).

As cascas externas apresentam cicatrizes na forma de cortiça espessa que se despregam facilmente (Figura 5). A casca interna apresenta coloração rósea clara e, quando cortada, libera um látex de cor creme (LIMA, MARCATI, 1989; RIOS et al., 2011).

Figura 5 – Fotografias de troncos característicos de *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc.



A-Troncos com a casca externa; B- Tronco com a casca externa descolada; C-Troncos com a casca interna exposta.

Fonte: O autor.

Árvores do gênero *Kielmeyera coriacea* sempre apresentaram interesse econômico principalmente para a produção de madeira, carvão, celulose e tanino para a indústria de couro (CORTEZ et al., 1997; PINTO et al., 1996; SOUZA, 1974). Da casca desta espécie é extraída a cortiça, muito utilizada na fabricação de placas de revestimentos acústicos, térmicos e decorativos (ARELLO, PINTO, 1993). Considerada a principal espécie corticeira do Brasil (DIONELO, BASTA, 1980) foi intensamente utilizada para exportação durante e após a Segunda Guerra Mundial. As flores e os frutos são utilizados em ornamentação (RIOS, 2011).

Considerada uma planta medicinal, a *K. coriacea* é utilizada pelas populações locais do interior brasileiro no preparo de banhos e unguentos. Esses diversos preparados aquosos das folhas, caule e cascas são utilizados no tratamento de diversas enfermidades tropicais como malária, esquistossomose, leishmaniose (ALVES et al., 2000; PINHEIRO et al., 2003). Sua resina amarela tônica e emoliente extraída do caule é usada no tratamento de dores de dentes (CORREA, 1969; OBICI et al., 2008).

Diversos estudos comprovam a ação biológica dos componentes da *K. coriacea* encontrados em seus extratos brutos. A Tabela 2 apresenta esses estudos com extratos utilizados e a ação testada com sua bioatividade. A Figura 6 apresenta as estruturas das substâncias isoladas (1 a 27) em maior quantidade de seus extratos.

Tabela 2 – Estudos com extratos e substâncias isoladas de *K. coriacea* Mart & Zucc.

Extrato	Substância* (número)	Bioatividade	Referência
Etanólico (Folhas e caule)	1 a 27	Cercaricida, Anti-inflamatória, antitumoral, antifúngica, antibacteriana, tuberculostática	Cortez et al., 1999a, 2002b; Dharmaratne, 1999; Pinto et al. 1996; Silva et al., 2009; Vasconcelos, 2008; Martins et al., 2015.
Clorofórmio (folhas, caules)	1 a 11, 18 a 23 e 26, 27	Antifúngica, antibacteriana, antitumoral	Cortez et al., 1997a, 2002b; Gottlieb et al., 1971; Lopes et al., 1977; Mesquita, et al., 2009a, 2011b; Ottobone et al., 2007; Pinto et al. 1987; Scio, 2004; Zagotto et al., 2006.



Tabela 2 – Continuação

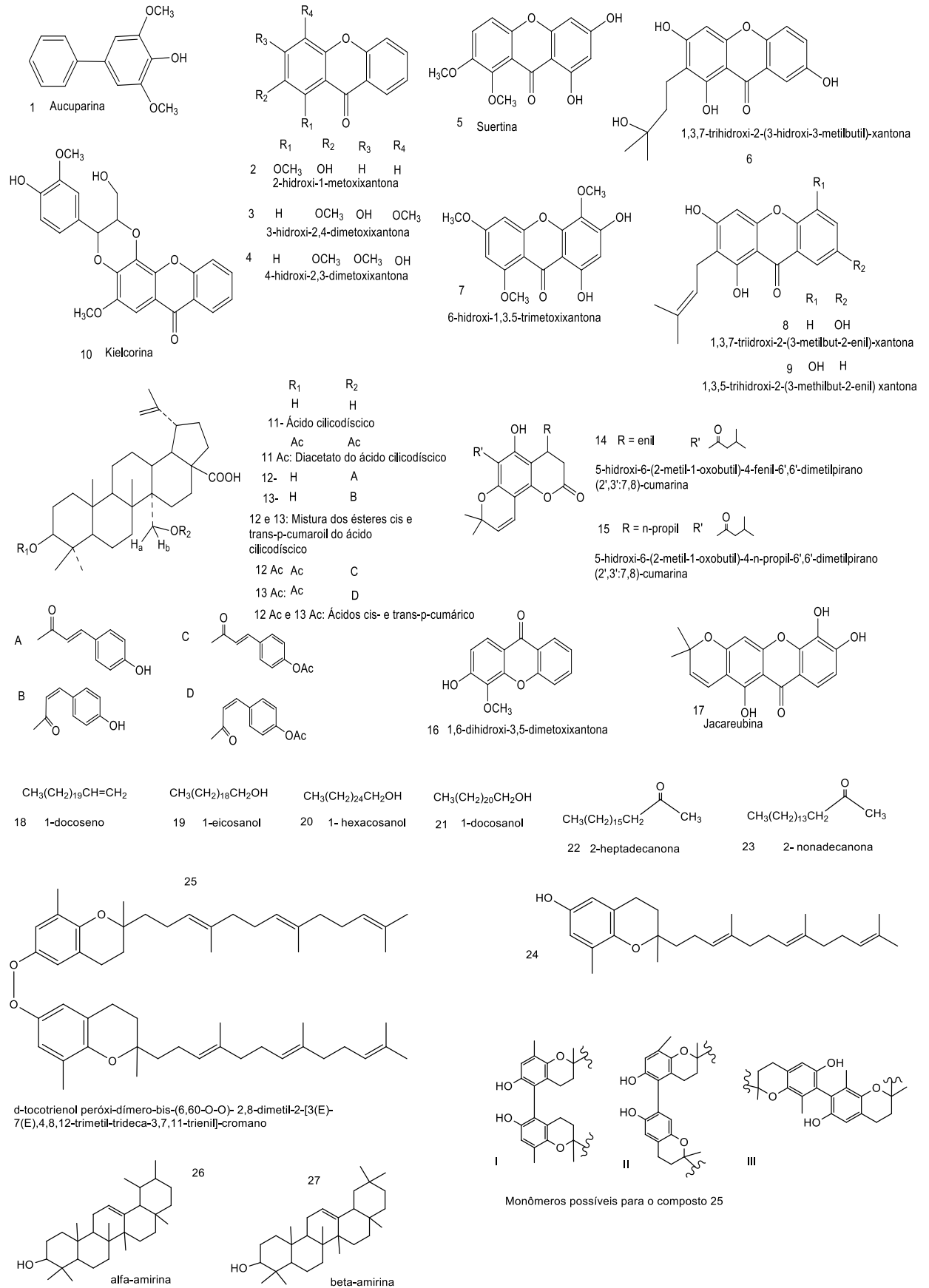
Metanol-água (caule)	8 e 9	Antitumoral	Martins et al., 2015.
Hexano (raiz) Clorofórmio,	24 e 25	Antitumoral	Mesquita et al., 2011.
hexano, heptano (folhas)	18 a 23	Antitumoral	Figueiredo et al., 2014
Diclorometano (folhas e caules)	1 a 17	Antifúngica, antibacteriana, antitumoral Antiulcerativo, Antilarvicida	Audi et al., 2002; Bagatin et al., 2014; Biesdorf et al., 2012; Coelho et al., 2009; Goulart et al., 2005; Martins et al., 2004; Obici et al., 2008; Ottoboni et al., 2007; Sela et al., 2010; Silva, 2008; Zagotto et al., 2006.

\* As estruturas químicas se encontram na Figura 6.

Fonte: o Autor

Diversas substâncias foram isoladas da *K. coriacea* Mart & Zucc, em sua maioria xantonas. Também foram isolados compostos pertencentes às classes das cumarinas, dos terpenos e terpenoides. Na Figura 6 estão representadas algumas estruturas químicas e os respectivos nomes dessas substâncias. Conforme estudos relatados na literatura, essas classes de metabólitos apresentam atividade antimicrobiana, anti-inflamatória e antitumoral (SIMÕES et al., 2004a) e são substâncias comuns tanto na espécie *Kielmeyera coriacea* Mart quanto nas outras espécies de *Kielmeyera* (BARBOSA, 2015).

Figura 6 – Estruturas químicas de algumas substâncias isoladas de *K. coriacea* Mart & Zucc.



Fonte: Autor.

## 2 OBJETIVO GERAL

Avaliar e caracterizar quimicamente compostos bioativos presentes no extrato e partições da casca interna da *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc.

### 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar o particionamento líquido-líquido do extrato etanólico e o fracionamento em coluna cromatográfica das partições;
- ✓ Realizar testes de atividade antimicrobiana e atividade antioxidante com o extrato, as partições e suas frações.
- ✓ Caracterizar quimicamente compostos presentes no extrato etanólico e nas partições em hexano, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol da casca interna de *K. coriacea*.

## 3 JUSTIFICATIVA

Os extratos etanólicos e suas partições de diversas partes aéreas da *K. coreacea* Mart & Zucc apresentaram importantes resultados antioxidantes (DPPH) e antimicrobianos (AQUINO et al. 2013). Entretanto, os componentes químicos do extrato e partições da casca interna que apresentaram melhores resultados ainda não foram caracterizados estruturalmente. O desenvolvimento do presente trabalho contribuirá desta forma, para o maior conhecimento desta espécie de planta do Cerrado.

## 4 MATERIAIS

### 4.1 SOLVENTES E REAGENTES

Os solventes e reagentes utilizados nas extrações, particionamentos, prospecção fitoquímica e análises cromatográficas e espectroscópicas foram com grau técnico PA, HPLC, deuterados ou purificados por destilação fracionada, quando necessário. Os solventes utilizados foram obtidos das seguintes empresas Synth®, Vetec® e Sigma-aldrich®. O etanol utilizado para extração da marca Vetec® PA 95°GL.

Para os testes de determinação dos teores de metabólitos específicos fenóis totais, flavonoides, taninos – proantocianidinas e análise da atividade antioxidante frente ao radical livre DPPH foram utilizados os reagentes indicados na Tabela 3.

Tabela 3 – Reagentes utilizados como controle (ou padrão) nos testes de determinação dos teores de fenóis totais, flavonóis e taninos condensados.

REAGENTE	MARCA
Ácido gálico	Sigma-Aldrich
Folin Ciocalteau	Cromoline
Quercetina	Arborvita
Catequina	Sigma-Aldrich
Cloreto de alumínio	Vetec Química Fina
Vanilina	Vetec Química Fina
2,2-difenil-1-picrilidrazila (DPPH)	Sigma-Aldrich
2,6-di- <i>terc</i> -butil-4-metilfenol (BHT)	Sigma-Aldrich

Fonte: O Autor.

Para a prospecção fitoquímica de grupos metabólicos foram utilizados os reagentes indicados na Tabela 4.

Tabela 4 – Reagentes utilizados no preparo de reveladores para a prospecção fitoquímica.

Revelador	Reagentes
Liebermann- Buchard	Anidrido acético, ácido sulfúrico, etanol.
Anisaldeído	Anisaldeído, acético glacial, metanol, ácido sulfúrico.
NP/ PEG	Ácido $\beta$ -etilaminodifenilbórico éster (NP) /metanol; polietilenoglicol-4000 (PEG) etanol.
Vanilina sulfúrica	Vanilina/etanol, Ácido sulfúrico.
Cloreto de alumínio	Cloreto de alumínio.
Cloreto férrico	Cloreto férrico.
Sulfato de cério	Sulfato de cério, ácido sulfúrico.
Hidróxido de potássio	Hidróxido de potássio.
Iodocloroplatinado	Ácido hexacloroplatínico, iodeto de potássio/água.
Reagente de Dragendorff	Nitrato de bismuto, ácido acético glacial, iodeto de potássio.

Fonte: O Autor.

## 4.2 EQUIPAMENTOS

- ✓ Estufa modelo 411/FPD1551 marca Nova Ética®.
- ✓ Balança de luz infravermelha Kett, modelo FD-600.
- ✓ Balança analítica SHIMADZU modelo AUW220D.
- ✓ Evaporador rotatório sob pressão reduzida Ika, modelo RV 10.
- ✓ Aparelho liofilizador Terroni, modelo LS3000.
- ✓ Placa aquecedora FISATOM modelo 550.
- ✓ Espectrofotômetros UV-VIS Genesys, modelo 10S e HITACHI, modelo U-2000.
- ✓ Potenciostato Drop Sens  $\mu$ Stat 200 e o software Drop View 1.0 e sistema com eletrodos de carbono vítreo (diâmetro de 1,5 mm); Ag (s) /AgCl (s) /Cl<sup>-</sup>(aq) (saturado em cloreto de potássio (KCl) e platina.
- ✓ Cromatógrafo a gás acoplado a espectrômetro de massas (CG-EM) Shimadzu modelo QP2010 equipado com coluna capilar OV-5/ 121345, d.i. 0,25 m c.30m.
- ✓ Cromatógrafo líquido de alta eficiência semipreparativo, modelo SHIMADZU LC-6AD com injetor automático modelo SIL-10AF e degaseificador DGU-20A5E, sistema de bomba binário LC-6AD, forno CTO20A, autofracionador FRC-10A, detectores de UV/VIS por arranjo de diodo (DAD, modelo SPD-M20A) e por espalhamento de luz (ELSD - *evaporative light scattering detector*, modelo ELSD-LTII) com coluna analítica Phenomenex Lunna C18 (250 mm × 4,6 mm, 5  $\mu$ m) e coluna semipreparativa Phenomenex Synergi Hydro-RP C18 80 Å Axia Packed (100 mm × 21,20 mm, 4  $\mu$ m).
- ✓ Espectrômetros de ressonância magnética nuclear (RMN) Bruker modelo Ascend™ (9,2 Tesla) frequências de 400 MHz para <sup>1</sup>H e 100 MHz para <sup>13</sup>C. Equipamento do laboratório multiusuário do IQ-UFU.
- ✓ Aparelho de infravermelho com transformada de Fourier Shimadzu IRPrestige-21.
- ✓ Cromatógrafo líquido Agilent® Infinity 12060 acoplado ao espectrômetro de massa do tipo QTOF Agilent® 6520B. Com ionização por electrospray, coluna Zorbax Extend C18 Rapid Resolution HT (2,1mm x 50 mm, 1,8 micro). Equipamento do laboratório de Nanobiotecnologia - INGEB-UFU.
- ✓ Cromatógrafo a gás acoplado a detector de ionização de chama (CG-DIC) Shimadzu modelo CG2014, com coluna SPB 5 (30m, 0,25 milímetro com filme de 1,25 micro)
- ✓ Aparelho de Ressonância Magnética Nuclear, RMN, Bruker Avance 400, III HD (9,4 Tesla), 400 MHz (<sup>1</sup>H) e 100 MHz (<sup>13</sup>C).

### 4.3 ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS

As análises em cromatografia em camada delgada comparativa (CCD) foram realizadas em placas comerciais de sílica gel 60 com indicador de fluorescência (UV<sub>254</sub>) 0,20 mm de espessura (ALUGRAM XTRA SIL G).

Para as separações cromatográficas em coluna aberta (CC) foram utilizadas as seguintes fases estacionárias: Sílica gel (63–200 µm, diâmetro de poro 60 Å) Sigma Aldrich; Sílica gel para cromatografia flash (40–63 µm, diâmetro de poro 60 Å) Sigma Aldrich;

### 4.4 ENSAIOS BIOLÓGICOS

Os ensaios e testes de atividades antimicrobianas frente às bactérias bucais e os fungos do gênero *Candida*, para o extrato etanólico, as frações e subfrações foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada da UNIFRAN em Franca/SP. As bactérias e as leveduras foram obtidas da “*American Type Culture Collection*” (ATCC, Rockville MD, USA). O meio de cultura utilizado com as bactérias aeróbicas foi o caldo tripton de soja (TSB) e com as bactérias anaeróbicas foi o caldo Schaedler® suplementado com hemina (5,0 µg mL<sup>-1</sup>) e menadiona (10,0 µg mL<sup>-1</sup>).

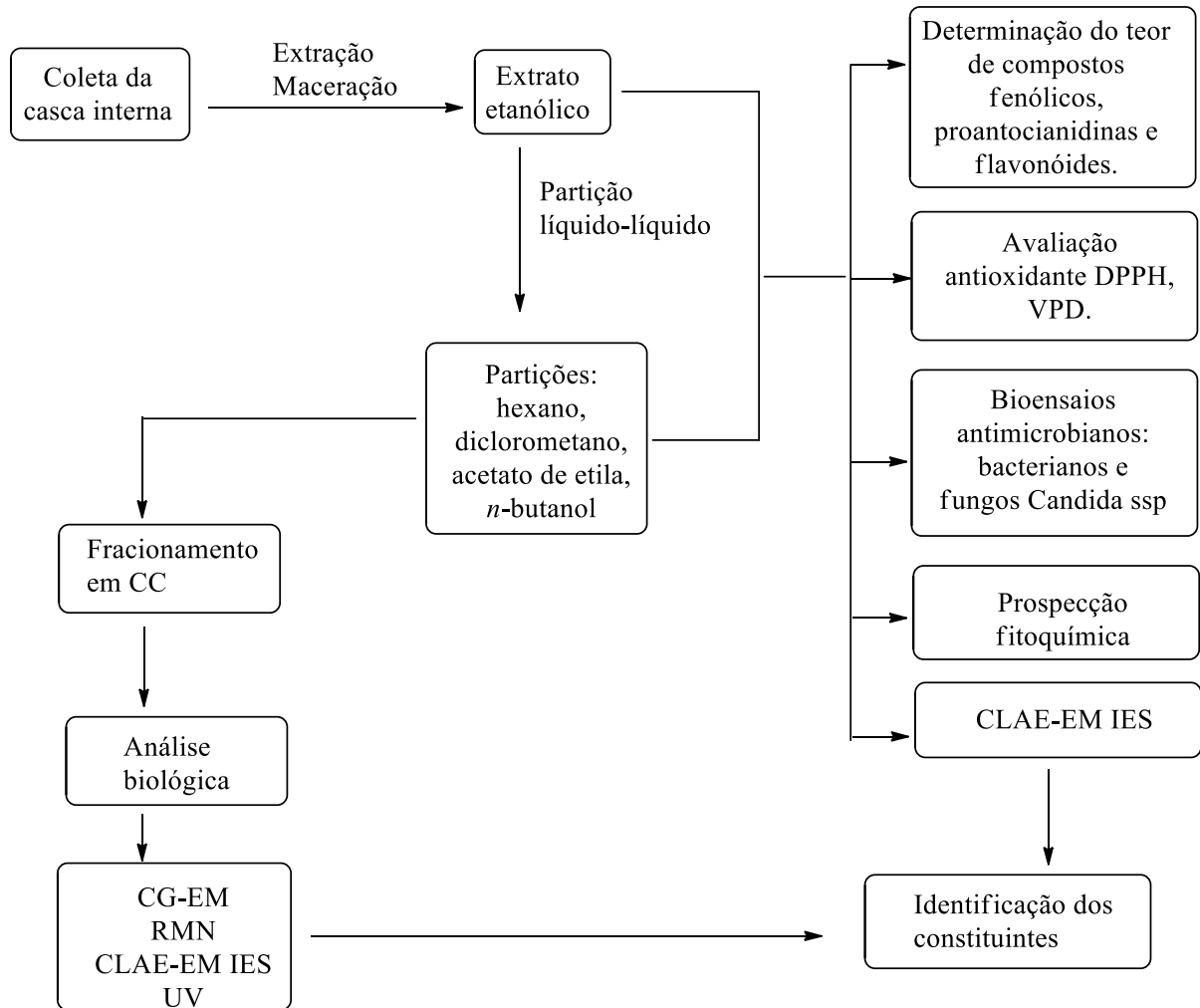
### 4.5 SOFTWARES E ESTATÍSTICAS

- ✓ As análises na determinação dos constituintes macromoleculares, fenóis totais, flavonóides e proantocianidinas, bem como da atividade antioxidante foram realizadas em triplicata e os resultados correspondem à média ± o desvio padrão.
- ✓ Programa Sigma Plot 11.0. Com aplicação do método de Análise de Variância (ANOVA) e o teste de Turkey para analisar a semelhança entre os dados, sendo considerados os valores com nível de significância menor ou igual 0,05 (5 %) para denotar diferença estatística significativa.
- ✓ Programa ChemDraw ultra 12.0. Desenho de estruturas, cálculo de massas teóricas e fragmentações.
- ✓ Agilent Mass Hunter Qualitative Analysis B0700 para análise dos testes CLAE-EM.
- ✓ MestReNova 5.3.2.Mestrelab Research para análise dos testes de RMN.
- ✓ TopSpin 3.5pl7 Bruker para análise dos testes de RMN.
- ✓ CGMS Postrum Analysis para análise dos testes de CG-EM.

## 5 METODOLOGIA

A Figura 7 apresenta um fluxograma representativo das etapas desenvolvidas neste trabalho.

Figura 7: Fluxograma representando todas as etapas do processo desenvolvido neste trabalho.



### 5.1 COLETA E IDENTIFICAÇÃO DO MATERIAL

As amostras do espécime escolhido foram coletadas no município de Monte Alegre de Minas/MG, sob as coordenadas geográficas 18°58'50.70``S, 49°04'30.46``W, no mês de junho de 2015, e após aprovação do pedido de estudo feito junto ao CNPq, sob o nº 010302/2015-8. As amostras foram levadas ao *Herbarium Uberlandense* (HUFU) onde foram identificadas pelo especialista prof. Dr. Glein Monteiro de Araújo, do Instituto de Biologia da UFU. Uma exsicata foi depositada sob o número 71.873.

## 5.2 PREPARO DO EXTRATO ETANÓLICO (EE)

As amostras da casca interna de *K. coriacea* Mart & Zucc (Figura 8) foram cortadas, descascadas e secas em estufa à temperatura de 30°C. Durante este período, foi feito o monitoramento do teor de umidade pelo método gravimétrico em balança de infravermelho, sob temperatura de 105±5 °C. Foram usadas no teste amostras de aproximadamente 1,0 grama e os teores de umidade entre 8-14%. (ANVISA, FIOCRUZ, 2010). O material seco foi triturado até obter um pó. Em seguida, a casca interna foi triturada e colocada em frasco de vidro envolto com papel escuro, contendo etanol 95% PA, em processo de extração por maceração.

Figura 8 – Imagens da preparação das cascas de *K. coriacea* utilizadas para pesquisa.



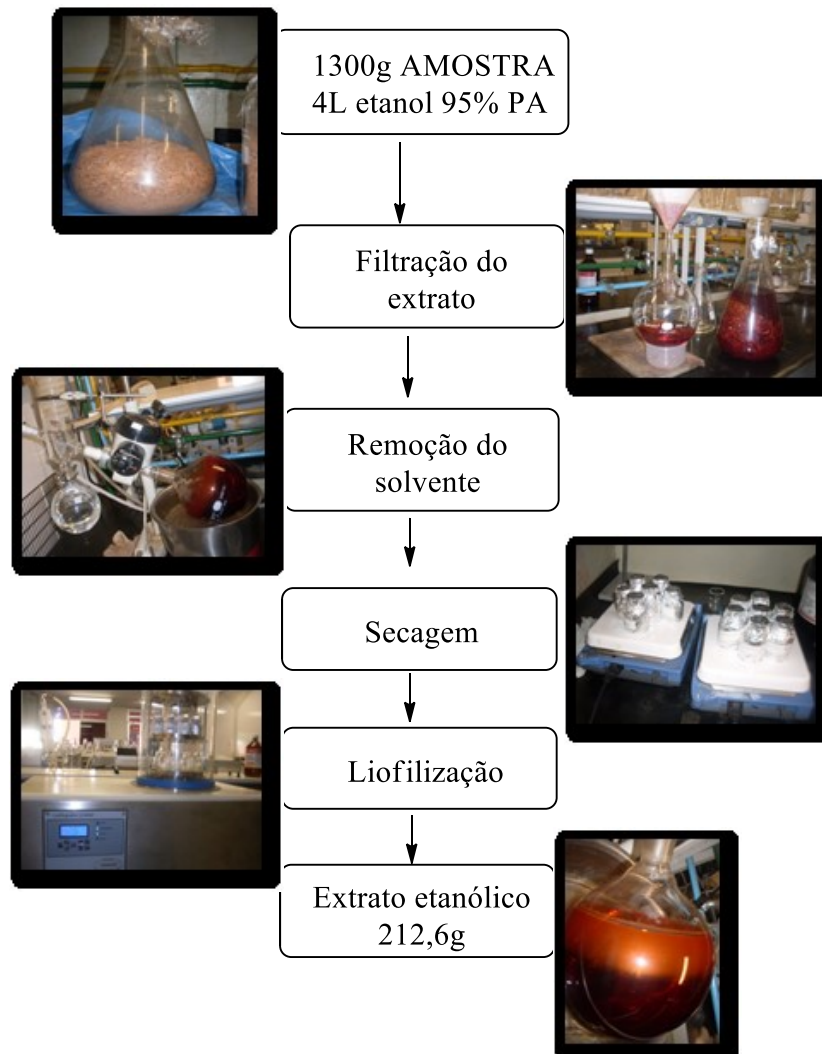
A- Pedações do tronco com a casca externa. B- Pedações do tronco sem a casca externa. C- Casca interna (ou entreasca) picada. D- Casca interna triturada.

Fonte: O autor.

Após esse tempo, o extrato de coloração vinho intenso foi filtrado e concentrado em aparelho evaporador rotativo, a 40°C e sob pressão reduzida. O extrato vinho escuro obtido foi seco a 30°C e liofilizado (Figura 9). O solvente removido foi retornado ao frasco. Esse processo de extração foi repetido sucessivamente por cinco vezes. Foram obtidos 212,60g de extrato etanólico seco.



Figura 9 – Esquema fotográfico do processo de preparação do extrato etanólicos da casca interna da *K. coriacea*.



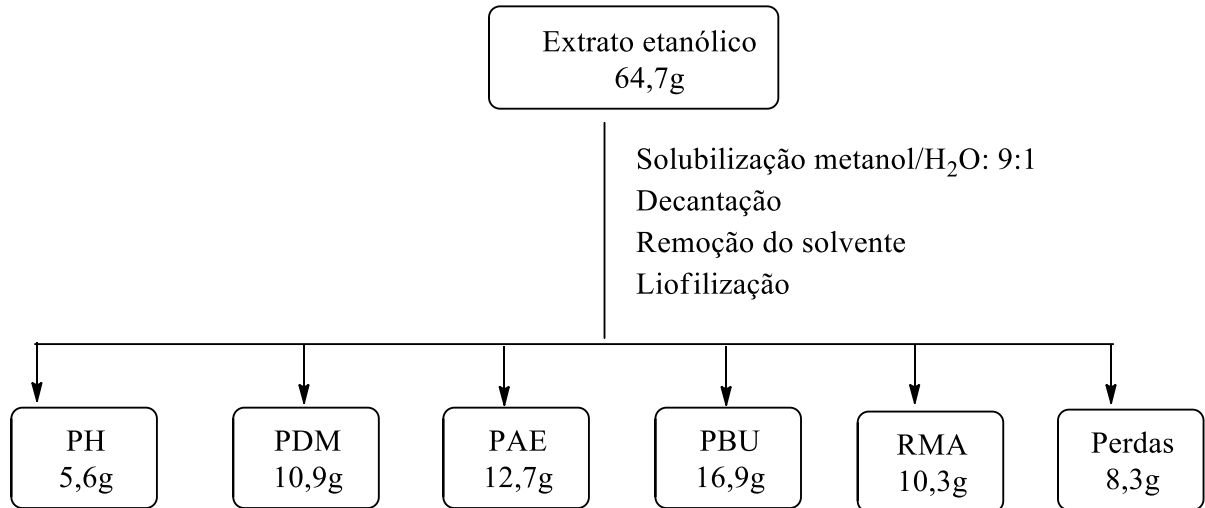
Fonte: O Autor.

### 5.3 PARTIÇÃO LÍQUIDO-LÍQUIDO DO EXTRATO ETANÓLICO (EE)

Para a obtenção das partições, o extrato etanólico (EE) foi submetido à extração líquido-líquido, utilizando solventes de polaridades crescentes: hexano (PH), diclorometano (PDM), acetato de etila (PAE) e *n*-butanol (PBU). A amostra de casca interna (64,7g) foi ressolubilizada em 200,0 mL de metanol/água (9:1) e submetida à extração sucessiva (5 vezes cada) com volumes de 200,0 mL: primeiro hexano, seguido de diclorometano, acetato de etila, e por último *n*-butanol. Cada solução foi concentrada em evaporador rotativo, a 40°C, e pressão reduzida. Em seguida, os extratos obtidos foram secos a 30°C, congelados e, em seguida, liofilizados. A partição hidrometanólica residual (RMA) também foi submetida ao mesmo procedimento de secagem das outras partições. A Figura 10 apresenta o esquema de

particionamento e as massas secas e liofilizadas das partições obtidas no processo de fracionamento.

Figura 10 – Esquema do processo de particionamento líquido-líquido do EE.



Fonte: O Autor.

#### 5.4 DETERMINAÇÕES DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA)

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).

##### 5.4.1 Método sequestro do radical 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH)

Foram preparados 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. Para o teste foram usadas cubetas de vidro com percurso óptico de um centímetro. Para o controle “branco” foi usado o metanol e as absorbâncias foram medidas em 517 nm. As soluções do extrato e das partições foram preparadas em metanol nas faixas de concentrações expressas na Tabela 5. O BHT (2,6-bis (1,1-dimetiletil)-4-metilfenol) foi utilizado como controle positivo e sua solução foi preparada nas mesmas condições das amostras. Para a medida das absorbâncias de cada amostra, 0,3 mL de sua solução foi misturada com 2,7 mL da solução de DPPH. Para a medida da absorbância

do ‘branco’ a amostra foi substituída pelo metanol. Os procedimentos foram feitos em triplicata.

Tabela 5 – Faixa de concentração das soluções do extrato e das partições usadas para o teste da AA.

Amostra	Concentração (em $\mu\text{g mL}^{-1}$ )
EE	7 – 46
RMA	20 – 83
PH	75 – 500
PDM	6 – 40
PAE	7 – 45
PBU	5 – 30
*BHT	15 – 75

\*Controle positivo.

Fonte: O Autor

Para o cálculo da concentração eficiente (CE50), que corresponde a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH, foi plotado um gráfico por meio da regressão linear (Apêndice B-I), da capacidade antioxidante de cada amostra: porcentagem de DPPH sequestrado (após 1 h de reação) *versus* concentração. Esse cálculo foi realizado utilizando a Equação 1:

$$\% \text{DPPH (sequestrado)} = \frac{[\text{ABS}(\text{controle}) - \text{ABS}(\text{amostra}) - \text{ABS}(\text{branco})] \times 100}{\text{ABS}(\text{controle})} \quad (\text{Equação 1})$$

Onde: ABS (controle) é a absorbância inicial da solução metanólica de DPPH; ABS (amostra) é a absorbância da mistura reacional (DPPH + amostra) e ABS (branco) é a absorbância da amostra em metanol.

#### 5.4.2 Determinação do teor de fenóis totais

A determinação do teor de fenóis totais foi feita utilizando-se a metodologia proposta por MORAIS et al. (2008). Foram preparados 50,0 mL de soluções do extrato/partições, com concentração inicial de  $60,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ . O reagente utilizado foi Folin-Ciocalteu (sol. aquosa

10% v/v). Como padrão, foi utilizado o ácido gálico. Inicialmente, em um tubo de ensaio foi adicionado 0,5 mL de solução metanólica do extrato e/ou frações ( $60,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), 2,5 mL de solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteu 10,0% (v/v) e 2,0 mL de uma solução recém-preparada de carbonato de sódio 7,5% (m/v). A mistura foi mantida, por 5 min, em banho de água, a 50 °C. No espectrofotômetro de UV, a absorvância da mistura foi medida em 760 nm. Para obtenção do branco, o mesmo procedimento foi realizado utilizando 0,5 mL de metanol.

O resultado foi expresso em mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por grama de extrato. Para isto, o ácido gálico, em variadas concentrações (10,0 a  $80,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), foi reagido com a solução Folin-Ciocalteu, sendo construída uma curva analítica da absorvância obtida *versus* concentração de ácido gálico utilizada (Apêndice B-II).

#### 5.4.3 Determinação do teor de taninos - proantocianidinas

Os testes para a determinação do teor de proantocianidinas foram realizados utilizando-se a metodologia proposta por Morais et al., 2008. Foram preparadas 10 mL de solução metanólica do extrato/partições ( $60,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), 100,0 mL de vanilina em ácido sulfúrico 70% m/m ( $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Inicialmente, em um tubo de ensaio foi adicionado 2,0 mL de solução metanólica do extrato ( $60,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) e 3 mL de solução de vanilina ( $5,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) em ácido sulfúrico 70% (m/m). A mistura foi mantida por 15 min em banho de água, a 50 °C.

No espectrofotômetro de UV, a absorvância da mistura foi medida em 500 nm. Para obtenção do branco, o mesmo procedimento foi realizado utilizando 2 mL de metanol. O resultado foi expresso em mg de equivalente de catequina (EC) por grama de extrato. Para isto, solução de catequina, em variadas concentrações (1,0 a  $20,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), foi reagida com a vanilina sulfúrica, sendo construída uma curva analítica da absorvância obtida *versus* concentração de catequina utilizada (Apêndice B-III).

#### 5.4.4 Determinação do teor de flavonoides

Os testes para a determinação do teor de flavonoides foram realizados utilizando-se a metodologia proposta por Woisky e Salatino (1998). Inicialmente, em um tubo de ensaio foi adicionado 2,0 mL de solução metanólica do extrato/frações ( $500,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ , como os resultados não foram satisfatórios essa concentração foi aumentada para  $1000,0 \mu\text{g mL}^{-1}$ ) 1,0 mL de solução metanólica de  $\text{AlCl}_3$  3,5% m/v e 2,0 mL de metanol. A mistura foi deixada em repouso por 30 min a temperatura ambiente.

No espectrofotômetro de UV, a absorvância da mistura foi registrada em 425 nm. Para obtenção do branco, o mesmo procedimento foi realizado substituindo a amostra por metanol. O resultado foi expresso em mg de equivalente de quercetina (EQ) por grama de extrato e material vegetal. Para isto, a quercetina, em variadas concentrações (40,0 a 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), foi reagida com a solução de  $\text{AlCl}_3$ , sendo construída uma curva analítica da absorvância obtida *versus* concentração de quercetina utilizada (Apêndice B-IV).

#### 5.4.5 Método da voltametria cíclica por pulso diferencial (VPD)

O teste antioxidante de voltametria por pulso diferencial foi realizado no potenciostato Drop Sens  $\mu\text{Stat}$  200, sendo utilizado o software Drop View 1.0 para a aquisição dos dados, conforme metodologia descrita por SOUSA, 2013. Uma célula eletroquímica contendo um sistema com três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar) foi utilizada no experimento. O eletrodo de trabalho utilizado foi o de carbono vítreo. O eletrodo de referência foi de  $\text{Ag/AgCl}$  (saturado em  $\text{KCl}$ ), e como eletrodo auxiliar um fio de platina. Os eletrólitos utilizados constituíam-se de 10,0 mL de solução tampão fosfato 0,2 mol/L, pH 7,0, contendo  $\text{KCl}$  0,5 mol/L como eletrólito suporte e 10,0 mL de solução tampão acetato 0,2 mol/L, pH 4,5, contendo  $\text{KCl}$  0,5 mol/L como eletrólito suporte. Utilizou-se 1,0 mL de solução de extrato ou fração de 1000,0  $\mu\text{g/ mL}$  em etanol. A velocidade de varredura (Srate) foi 25 mV/s, sendo aplicada uma faixa de potencial entre - 0,3 a 1,0 V. A altura do potencial (Epuls) foi de 60,0 mV. A duração do pulso (tpuls) foi de 10 ms. O degrau de potencial (Estep) foi de 6 mV. O tempo de coleta da corrente (“sampling period”) foi de 50 ms. O eletrodo de carbono vítreo foi polido entre as medidas voltamétricas (FERNANDES et al., 2015).

#### 5.5 ANÁLISES DE METABÓLITOS PRESENTES NOS EXTRATOS ATRAVÉS DO PERFIL OBTIDO POR ESPECTROFOTOMETRIA DE UV-VIS.

Os espectros de absorção UV-Vis do extrato/partições foram obtidos a fim de verificar a presença majoritária de classes de compostos bioativos.

Soluções de extrato e partições na concentração de 200,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  foram preparadas utilizando metanol como solvente. Inicialmente a linha de base do espectrofotômetro UV-Vis foi calibrada com metanol. Em seguida, utilizando-se uma cubeta de quartzo, foram obtidos

os espectros de UV-VIS das amostras por meio da leitura das absorvâncias entre 200 e 700 nm, com uma velocidade de varredura de 5 nm por segundo.

## 5.6 ATIVIDADE ANTIMICROBIANA

Os ensaios biológicos para verificação da atividade antimicrobiana foram realizados determinando a Concentração Inibitória Mínima (CIM). As análises foram feitas no Laboratório de Pesquisa em Microbiologia Aplicada (LaPeMA) da Universidade de Franca/SP sob coordenação do Prof. Dr. Carlos Henrique Gomes Martins, seguindo o método da microdiluição em caldo contra bactérias bucais aeróbias e anaeróbias e leveduras de diferentes espécies de *Candida*.

### 5.6.1 Determinação da atividade antibacteriana do extrato e partições frente às bactérias bucais aeróbias e anaeróbias

A atividade antibacteriana foi determinada utilizando o método da microdiluição em caldo, de acordo com o CLSI para os microrganismos anaeróbios (CLSI, 2012a) e aeróbios (CLSI, 2012b).

A análise da atividade antibacteriana foi realizada em microplacas contendo 96 poços. O inóculo, o caldo e a amostra (extrato/frações) foram adicionados em cada poço, obtendo-se um volume final de 100,0  $\mu\text{L}$  para as bactérias aeróbicas e 200,0  $\mu\text{L}$  para as anaeróbicas. O volume de inóculo adicionado nos orifícios da microplaca foi de 20,0  $\mu\text{L}$  para os testes com bactérias aeróbicas e 40,0  $\mu\text{L}$  para os testes com bactérias anaeróbicas. O inóculo foi preparado e padronizado por comparação com o tubo 0,5 para bactérias na escala McFarland.

As concentrações das amostras testadas frente às bactérias aeróbias e anaeróbias foram de 0,195  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 400,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . As concentrações do controle positivo testado para as aeróbias (Dicloridrato de clorexidina) foram de 0,115  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 59,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Metronidazol foi utilizado como controle positivo no intervalo de concentrações 0,0115  $\mu\text{g mL}^{-1}$  a 5,9  $\mu\text{g mL}^{-1}$  frente as cepas *Bacteroides fragilis* (ATCC 25285) e *Bacteroides thetaiotaomicron* (ATCC 2974) para validação do método. Como controle negativo foi utilizado o DMSO (concentração de 5,0% a 1,0% v/v). Foram ainda realizados os controles de esterilidade do controle positivo, do meio de cultura e das amostras.

Para os microrganismos aeróbios, as microplacas foram incubadas em microaerofilia pelo sistema chama/vela, a 37 °C, por 24 h. Após o período de incubação, foram adicionados 30,0 µL do indicador resazurina (0,01% m/v) em cada orifício.

Os microrganismos anaeróbios foram incubados por 72 h em câmara de anaerobiose (atmosfera contendo: 5 - 10% de H<sub>2</sub>, 10% CO<sub>2</sub>, 80-85% N<sub>2</sub>), a 36 °C, sendo revelado com o mesmo indicador. A coloração azul resultante após a adição do indicador representa a ausência de crescimento bacteriano, enquanto a coloração vermelha indica a presença do crescimento bacteriano.

### **5.6.2 Determinação da atividade antifúngica do extrato/partições frente à *Candida* ssp.**

Os ensaios foram realizados utilizando o método da microdiluição em caldo conforme recomendado pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2008). Os microrganismos utilizados neste ensaio foram *Candida albicans* (ATCC 28366), *Candida tropicalis* (ATCC 13803) e *Candida glabrata* (ATCC 15126). Para validação do método as leveduras *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) e *Candida krusei* (ATCC 6258) foram utilizadas.

Soluções de estoque foram inicialmente preparadas dissolvendo as amostras dos extratos/frações em DMSO na concentração 192.000,0 µg mL<sup>-1</sup>. Diluições com as soluções com as soluções de estoque foram realizadas utilizando meio de cultura RPMI 1640 tamponado a pH 7,2 com 0,165 mol L<sup>-1</sup> do ácido 3-*N*-morfolinopropanosulfônico (MOPS) a 12.000,0 µg mL<sup>-1</sup>. O inóculo foi preparado usando método espectrofotométrico e comparado com a 0,5 escala de McFarland para se obter o valor de 6,0 x10<sup>6</sup> UFC mL<sup>-1</sup>. Em seguida foram realizadas as diluições padrão em caldo RPMI até que o inóculo atingisse 1,2 x10<sup>3</sup> UFC mL<sup>-1</sup>.

A análise da atividade antifúngica foi realizada em placas de microdiluição com 96 poços, onde as diluições seriadas foram realizadas com as concentrações finais das amostras variando entre 1,46 a 3000,0 µg mL<sup>-1</sup>. Cada poço recebeu 100,0 µL da suspensão do inóculo e o volume final em cada poço foi de 200,0 µL.

A anfotericina B foi utilizada como controle positivo, sendo diluída em caldo para concentrações entre 0,031 e 16,0 µg mL<sup>-1</sup>. O controle negativo dimetilsulfóxido (DMSO) foi testado com concentrações variando de 1% a 10% v/v e não foi influenciado no crescimento de levedura.

Para validar os ensaios, a anfotericina B foi utilizada como controle positivo frente as leveduras de referência *Candida krusei* (ATCC 6258) e *Candida parapsilosis* (ATCC 22019) com valores de CIM variando entre 0,25 e 2,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . Se os valores de CIM obtidos para estas leveduras estiverem dentro desse intervalo, os resultados para as demais leveduras testadas estarão validados de acordo com o protocolo de referência M27-A3 CLSI (2008).

Após o período de incubação, por 48 horas, foram adicionados 30  $\mu\text{L}$  de uma solução aquosa de resazurina (Sigma) a 0,02% a cada poço e as microplacas foram novamente incubadas por mais 30 minutos para posterior revelação. A CIM calculada corresponde à concentração mínima de amostra que é capaz de inibir o crescimento das leveduras. A resazurina permite a observação imediata do crescimento microbiano. As cores azul e vermelha representam a ausência e a presença de crescimento microbiano, respectivamente (GOUGHENOUR et al., 2015). Foram realizados ainda os controles de esterilidade do meio de cultura, dos extratos e partições e do inóculo.

## 5.7 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA DO EXTRATO ETANÓLICO E PARTIÇÕES

Para o estudo fitoquímico preliminar foram utilizados como fase estacionária (FE) placas de sílica gel sob alumina e como fase móvel (FM) a mistura de solventes conforme metodologia descrita por Vagner e Bladt (2001). Para a fase polar utilizou-se como FM: 10,0 mL de acetato de etila, 1,1 mL de ácido acético, 1,1 mL de ácido fórmico, 2,6 mL de água destilada; para a fase apolar utilizou-se como FM: 9,0 mL de clorofórmio, 1,0 mL de metanol e 0,25 mL de hidróxido de amônio.

### 5.7.1 Reveladores químicos, monitoramento UV-VIS

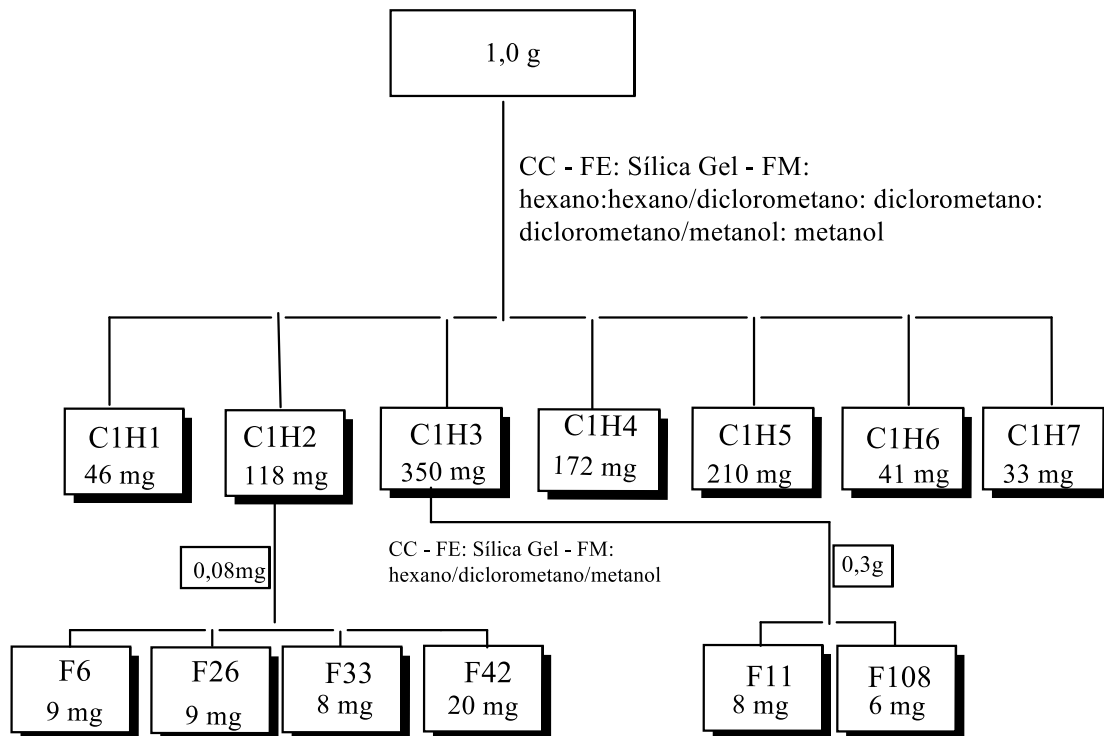
Aproximadamente 2,0 mL de soluções metanólicas, do extrato/partições foram preparadas e aplicadas em placas de sílica gel e colocadas em uma cuba para desenvolvimento. As análises foram realizadas após a eluição com base no aparecimento de pequenas ‘manchas’ nas cromatoplas e seus diferentes fatores de retenção (Rf), inspeção de fluorescência das placas na presença de luz UV<sub>254-365nm</sub> e visível à temperatura ambiente ou a 50°C. Os reveladores químicos utilizados encontram-se descritos na Tabela 3, p. 26.



## 5.8 FRACIONAMENTO EM COLUNA CROMATOGRÁFICA (CC) DA PARTIÇÃO HEXÂNICA (PH)

O fracionamento da partição foi realizado levando-se em consideração os resultados dos ensaios antimicrobianos. O fluxograma de fracionamento em coluna cromatográfica está apresentado na Figura 11.

Figura 11 - Fluxograma do fracionamento em coluna da partição PH.



Fonte: O autor.

Para o preparo da coluna da partição hexânica (PH), rotulada de C1H, foi usado 1,0 g de massa. O fracionamento foi realizado em coluna de vidro 3,0 cm de diâmetro. Como fase estacionária foram utilizadas 48,95g de sílica gel 60 (MN: 0,063-0,2mm, 70-230 mesh ASTM). O monitoramento das cromatoplas, em CCD, foi realizado seguido de revelação com reagentes químicos e análise por UV<sub>254nm-365nm</sub>, em temperatura ambiente e temperatura à 50 °C. O sistema de solventes da fase móvel foi o gradiente hexano→diclorometano→metanol. No fracionamento foram coletadas 105 frações que foram agrupadas em sete subfrações (Figura 11) de acordo com a similaridade observada nas cromatoplas de CCD.

### 5.8.1 Fracionamento em CC da fração hexânica C1H2.

Foram utilizados como material de partida 0,08 mg de massa da fração C1H2. O fracionamento foi realizado em coluna de vidro 2,5 cm de diâmetro. Como FE foram utilizadas 30,8g de sílica gel tipo 'flash' (Aldrich 60A, 40-60  $\mu\text{m}$ ). O sistema de solventes da fase móvel foi o gradiente hexano→diclorometano→metanol. No fracionamento foram coletadas 95 frações que foram agrupadas em nove subfrações (Figura 11) de acordo com a similaridade observadas nas cromatoplasmas de CCD.

### 5.8.2 Fracionamento em CC da fração hexânica C1H3.

Foram utilizados como material de partida 0,3mg de massa da fração C1H3. O fracionamento foi realizado em coluna vidro 2,5 cm de diâmetro. Como FE foram utilizadas 54,8g de sílica gel tipo 'flash' (Aldrich 60A, 40-60  $\mu\text{m}$ ). O sistema de solventes da fase móvel foi o gradiente hexano→diclorometano→metanol. No fracionamento foram coletados 140 frascos que foram agrupadas em 15 subfrações (Figura 11), de acordo com a similaridade observada nas cromatoplasmas de CCD.

## 5.9 ANÁLISE POR CROMATOGRÁFIA GASOSA ACOPLADA A ESPECTROMETRIA DE MASSAS (CG-EM) DA PARTIÇÃO PH E FRAÇÕES.

As frações C1H2-F6, C1H2-F26, C1H2-F33, C1H2-F42, C1H3-F11 foram dissolvidas em clorofórmio grau espectroscópico, na concentração de 1,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e analisadas em um cromatógrafo gasoso acoplado ao espectrômetro de massas. Os parâmetros do método de análise foram: tempo 43,85 min.; temperatura: 280°C; pressão: 172,9 kPa. Foi utilizado como gás carreador o gás Hélio e fluxo de 50,0 mL min<sup>-1</sup>, a fluxo constante de 2,7 mL min<sup>-1</sup>. As temperaturas utilizadas do injetor (modo split 1:20) e detector foram 220 e 280 °C, respectivamente, sendo o gradiente de aquecimento de 60 a 240°C (3°C min<sup>-1</sup>). O detector de massas atuou com energia de impacto de 70 eV e os fragmentos foram obtidos entre de 40 a 650 Da.

## 5.10 ANÁLISE POR RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR (RMN)

As amostras C1H1, CIH2-F42 foram dissolvidas em clorofórmio deuterado ( $\text{CDCl}_3$ : D-99,8%) e a análise foi realizada no equipamento Bruker<sup>®</sup> do laboratório multiusuário do IQ-UFU, operando, respectivamente, em frequências de 400 MHz para o núcleo de hidrogênio, e 100 MHz para o carbono. A temperatura do ensaio foi 30 °C e foi utilizado TMS ( $\delta\text{TMS} = 0,00$ ) como padrão interno ou sinal residual do solvente ( $\text{CHCl}_3$ , como referência para os núcleos  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$ , respectivamente). Também foram realizadas análises de correlações bidimensionais  $^1\text{H}$  COSY, HSQC e HMBC (Apêndice E).

## 5.11 ANÁLISE POR CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA ACOPLADA A ESPECTRÔMETRIA DE MASSAS COM IONIZAÇÃO POR ELECTROSPRAY DO EE E DAS PARTIÇÕES PDM, PAE, PBU, RMA.

Para as análises de CLAE, as amostras foram preparadas na concentração de 1,0 mg  $\text{mL}^{-1}$ . Foram injetados 10,0  $\mu\text{L}$  no cromatógrafo à líquido de alta eficiência em coluna C18 (2,1 por 5 mm, 1,8  $\mu\text{m}$ ), fase móvel: solução aquosa de ácido fórmico (0,1%, v/v) (fase móvel A) e metanol (fase móvel B). No sistema de gradiente de solventes utilizado, começou-se com 2% de B e 98% de A, atingiu-se 98% de B em 15 min, permaneceu-se 2 minutos com 98% de B, e retornou-se a 2% de B, com 1 minuto, a um fluxo de 0,4  $\text{mL min}^{-1}$ .

O detector utilizado foi um espectrômetro de massas de alta resolução da marca Agilent<sup>®</sup> 6520B, modelo QTOF, com ionização por electrospray. O nebulizador operou a 58 PSI, com o fluxo do gás secante operando a 8,0  $\text{L min}^{-1}$ , a uma temperatura de 220°C. No capilar foi aplicada uma energia de 4,5 kV. Os dados foram adquiridos nos modos positivo e negativo. As medidas dos dados obtidos foram de alta resolução de massa e comparadas por meio do erro (em ppm), de acordo com a equação abaixo:

$$E_{ppm} = \left[ \frac{(\text{massa exata} - \text{massa experimental})}{\text{massa exata}} \right] 10^6 \quad (\text{Equação 2})$$

Foi realizado o modo de fragmentação  $\text{EM}^2$  em diferentes energias de colisão. A partir do estudo dos fragmentos e da massa de alta resolução foi possível propor a presença dos constituintes de cada amostra.

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 6.1 RENDIMENTO DAS PARTIÇÕES

Após as extrações sucessivas (cinco vezes) foram processados os rendimentos de massas obtidos, que estão representados na Tabela 6.

O rendimento do processo foi de aproximadamente 87%, em massa. A partição em hexano (PH) apresentou o menor rendimento (8,5%), enquanto a partição *n*-butanol (PBU) apresentou o maior rendimento (30,0%). Na análise desses valores observamos que um maior número de compostos polares foi extraído. As perdas em massa durante o processo foram de 13%, em sua maioria retidas nos filtros.

Tabela 6 – Rendimentos de massas obtidos das partições líquido-líquido utilizando o extrato etanólico (EE, 64,7g) da casca interna de *K. coriacea*.

Partição	Total (g)	%
PH	5,6	8,5
PDM	10,9	16,9
PAE	12,7	19,6
PBU	16,9	26,3
RMA	10,3	15,9
	Total	87,2

EE- Extrato etanólico; PH- Partição hexano; PDM- Partição diclorometano; PAE- Partição acetato de etila; PBU- Partição *n*-butanol; RMA- resíduo metanol-água.

Fonte: O Autor.

### 6.2 PROSPECÇÃO FITOQUÍMICA

Os testes qualitativos das principais classes de metabólitos secundários indicaram a presença de compostos fenólicos taninos-proantocianidinas, flavonoides cumarinas, xantonas, saponinas terpenoides e esteróis. Porém não foi identificada a presença de alcaloides ou nitrogenados (Tabela 7). Para comparação e indicação dos grupos de metabólitos presentes foram utilizados dados da literatura (WAGNER, BLADT, 1996).

Tabela 7 – Resultados da prospecção fitoquímica do extrato etanólicos e partições da casca interna da *K. Coriaceae*.

Amostra	Classes de compostos					
	Triterpenos, terpenóides e esteroides <sup>a</sup>	Fenólicos, taninos <sup>b</sup>	Flavonoides <sup>c</sup>	Saponinas <sup>d</sup>	Cumarinas xantonas <sup>e</sup>	Alcaloides, nitrogenados <sup>f</sup>
EE	+	+	+	+	+	-
PH	+	-	-	-	-	-
PDM	+	+	-	-	+	-
PAE	-	+	+	+	+	-
PBU	-	+	+	-	-	-
RMA	-	+	+	-	-	-

Revelador: <sup>a</sup>Lieberman-Buchard, Anisaldeído Ce<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>; <sup>b</sup>Anisaldeído, FeCl<sub>3</sub>, NP/PEG, Ce<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>, vanilina; <sup>c</sup>NP/PEG, AlCl<sub>3</sub> Ce<sub>2</sub>(SO<sub>4</sub>)<sub>3</sub>; <sup>d</sup> Liebermann Buchard, Anisaldeído; <sup>e</sup> KOH; <sup>f</sup>Iodocloro-platinado, Dragendorff.

Fonte: O Autor.

Os reveladores Lieberman-Buchard, anisaldeído, vanilina sulfúrica e sulfato de cério são considerados reveladores universais pois detectam a presença de várias classes de metabólitos. Os reveladores KOH, FeCl<sub>3</sub>, AlCl<sub>3</sub>, NP/PEG e iodocloro-platinado são chamados de reagentes específicos pois detectam um determinado grupo (WAGNER, BLADT, 1996; REGINATTO, SOARES, FARIAS, 2017). Essas detecções são feitas por colorações específicas no UV-VIS devido às complexações entre componentes do revelador e os metabólitos presentes no extrato/partições.

### 6.3 AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE (AA)

A análise quantitativa da atividade antioxidante do extrato e frações da casca interna da *K. coriaceae* foi baseada na quantificação do teor de fenóis totais, proantocianidinas, flavonoides e pelo ensaio “*in vitro*” da capacidade de seqüestro do radical livre DPPH (MORAIS, et al., 2008).

### 6.3.1 Análises da determinação dos teores de fenóis totais

O teor de fenóis totais foi calculado após testes reacionais das amostras com o Reagente de Folin-Ciocalteu em meio básico. Os resultados são apresentados na Tabela 8. Os cálculos do teor de fenóis totais foram realizados por meio da regressão linear da curva analítica do gráfico da absorbância (Apêndice B-I) da reação entre o ácido gálico e o reagente de Folin *versus* concentração de ácido gálico [ $y = 0,0112x - 0,0157$ ;  $y =$  absorbância,  $x =$  concentração de ácido gálico ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ );  $r^2 = 0,9993$ ] (Apêndice B-I). O resultado está expresso em mg de equivalente de ácido gálico por g de extrato (mg EAG  $\text{g}^{-1}$  extrato).

Tabela 8 – Teores de fenóis totais do EE e partições.

Extrato/Partições	Fenóis totais (mg de EAG $\text{g}^{-1}$ de amostra) *
EE	527,8 $\pm$ 2,22 <sup>b</sup>
RMA	420,7 $\pm$ 3,22 <sup>c</sup>
PH	65,5 $\pm$ 3,40 <sup>d</sup>
PDM	505,0 $\pm$ 2,53 <sup>e</sup>
PAE	522,9 $\pm$ 2,86 <sup>b</sup>
PBU	555,1 $\pm$ 1,86 <sup>a</sup>

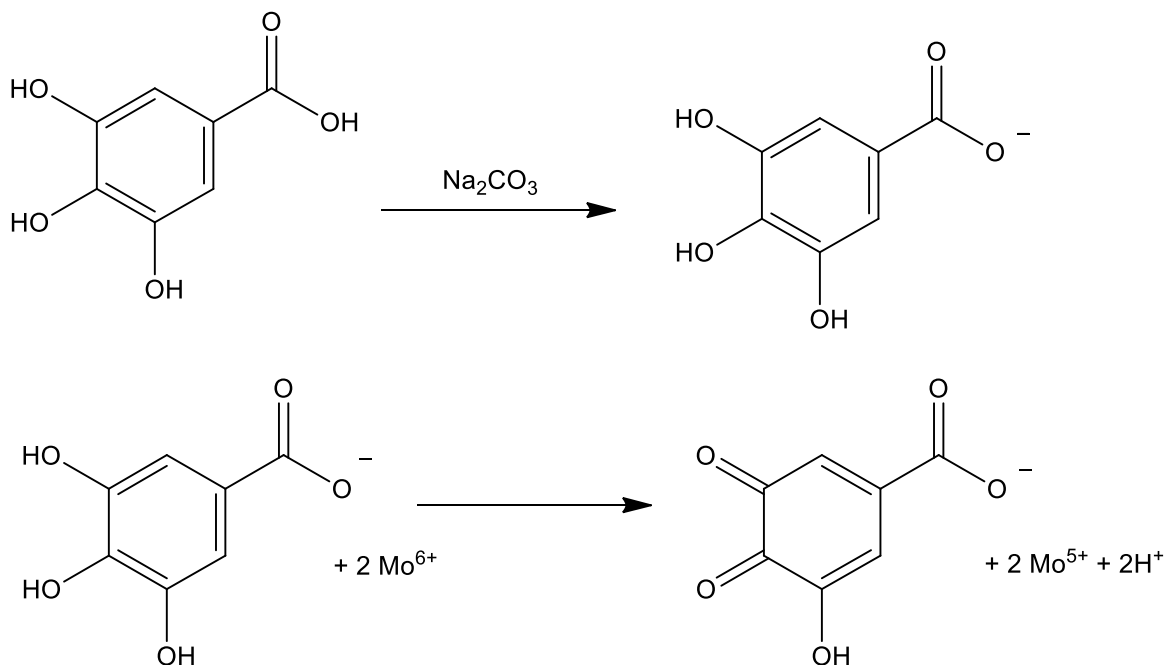
\*As análises com as mesmas letras não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido  $p < 0,01$  para todas as correlações com médias diferentes.

Os dados obtidos permitem inferir que aumentando a polaridade do solvente da partição aumenta o teor de compostos fenólicos. Desta forma, a partição hexano (PH) foi a que apresentou a menor concentração de fenóis totais.

O processo ocorre em etapas, inicialmente o composto fenólico de características ácidas reage com o carbonato de sódio formando o íon benzoato. O meio alcalino é utilizado para acelerar a reação de retirada de elétrons do íon fenolato (facilitada em pH mais altos). Removendo-se um elétron de um ânion fenolato, o produto é um radical livre semiquinona. Se um segundo elétron for removido a partir de orto-para-difenóis produz uma quinona. Essa mistura de fenol e quinona equilibra-se para produzir intermediários de semiquinona (oxidação-redução). Quando esse radical livre encontra outra espécie radicalar eles reagem formando um composto neutro. O elétron não emparelhado da semiquinona ressoa entre a hidroxila anterior e as posições orto e para (dois, quatro ou seis do anel). Uma mistura de produtos dimerizados resulta à medida que a reação se processa regenerando o fenolato e

mantendo o ciclo. Em seguida esse íon reage com o reagente de Folin de coloração amarela [mistura dos ácidos fosfomolibdico  $\text{H}_3\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4$  e fosfotungstístico  $\text{H}_3\text{P}(\text{W}_3\text{O}_{10})_4$ ] formando um complexo azul cuja absorvância pode ser monitorada a 760 nm (Figura 12). Embora a reação seja complexa, Singleton, Orthofer e Lamuela-Raventós, (1999) consideram que o molibdênio inicialmente no estado de oxidação (VI) (no complexo  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) sofre redução, pelos fenolatos, formando um complexo com o tungstênio,  $(\text{PMoW}_{11}\text{O}_4)^4$ , de estado de oxidação entre (V) e (VI). Essa mudança de cor permite a determinação dos agentes redutores, no caso os compostos fenólicos (OLIVEIRA et al., 2009).

Figura 12 – Reação do ácido gálico com o molibdênio componente do reagente de Folin em meio alcalino.



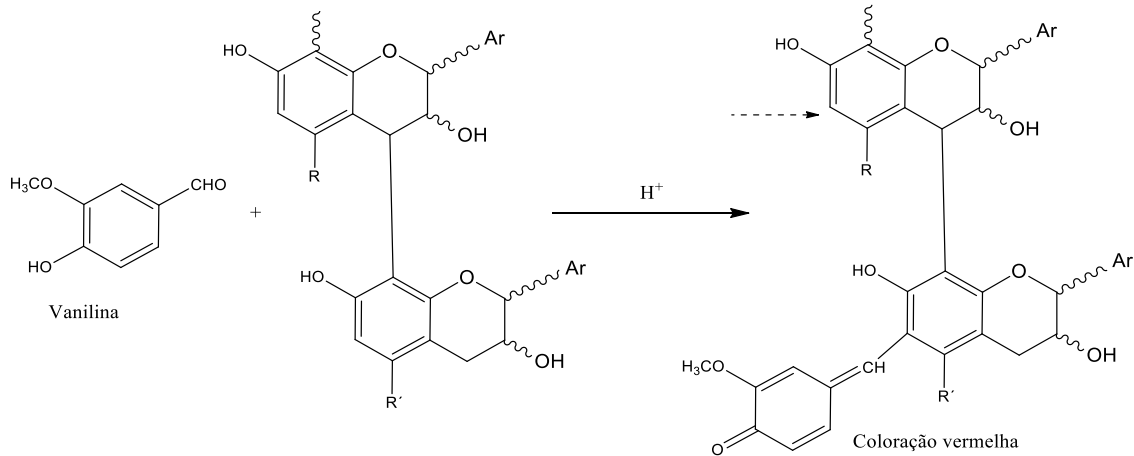
Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, (2009).

### 6.3.2 Análises da determinação do teor de taninos condensados (proantocianidinas)

O teor de taninos condensados (proantocianidinas) do extrato/partições foi determinado pelo método da vanilina sulfúrica. A complexação da vanilina com o tanino catéuico (Figura 13) ocorre, por reação do tipo substituição eletrofílica aromática no anel A do monômero de catequina, formado um composto vermelho cuja intensidade espectrofotométrica pode ser monitorada a 500 nm (SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001).

Esta metodologia não identifica os taninos hidrolisáveis, pois estes não complexam com o reagente utilizado.

Figura 13 – Reação simplificada entre a vanilina sulfúrica e um tanino catéuico.



Fonte: Adaptado de SCHOFIELD, MBUGUA, PELL. (2001).

O teor de proantocianidinas (Tabela 9) foi calculado por meio da curva analítica do gráfico da absorbância (Apêndice B-II) da reação entre a catequina e a vanilina *versus* a concentração de catequina [ $y = 0,3418x - 0,074$ ;  $y =$  absorbância,  $x =$  concentração de catequina ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ );  $r^2 = 0,9994$ ]. O resultado está expresso em mg de equivalente de catequina por g de extrato ( $\text{mg EC g}^{-1}$  extrato).

Tabela 9 – Teores de taninos condensados (proantocianidinas) do extrato etanólico/partições.

Extrato/Partições	Proantocianidinas (mg de EC $\text{g}^{-1}$ de extrato) *
EE	115,25 $\pm$ 0,8 <sup>a</sup>
RMA	80,55 $\pm$ 0,8 <sup>b</sup>
PH	32,69 $\pm$ 1,8 <sup>c</sup>
PDM	68,64 $\pm$ 1,3 <sup>b</sup>
PAE	124,36 $\pm$ 1,4 <sup>a</sup>
PBU	118,87 $\pm$ 0,6 <sup>a</sup>

\*As análises com as mesmas letras não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido  $p < 0,01$  para todas as correlações com médias diferentes.

Com exceção da partição hexânica que apresentou baixos valores as partições em solventes mais polares apresentaram valores mais concentrados. A partição em acetato de etila



apresentou o maior valor, mas dentro da análise estatística muito próximo da quantidade em *n*-butanol. Segundo Hagerman, (1998), Sun e colaboradores, (1998) e Schofield, Mbugua e Pell, (2001) o método apresenta limitações por interferência da temperatura, da concentração e do tipo do ácido utilizado e principalmente nas diferenças entre as reações da vanilina ácida com o monômero de catequina e com os polímeros de proantocianidinas, o que pode acarretar em distorções nos valores reais desses polímeros numa amostra.

### 6.3.3 Análises da determinação do teor de flavonoides

O teor de flavonoides foi calculado (Tabela 10) por meio da regressão linear da curva analítica do gráfico da absorbância (Apêndice B-III) obtida da reação entre a quercetina e o  $AlCl_3$  *versus* a concentração de quercetina [ $y = 0,0549x + 0,0085$ ;  $y =$  absorbância,  $x =$  concentração de quercetina ( $\mu g mL^{-1}$ );  $r^2 = 0,9992$ ]. O resultado está expresso em mg de equivalente de quercetina por g de extrato (mg EC  $g^{-1}$  extrato).

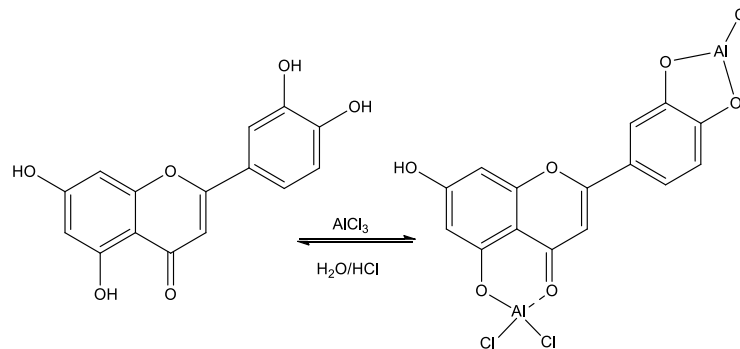
Tabela 10 – Teores de flavonoides do extrato etanólico/partições.

Extrato/Partições	Flavonoides (mg de EQ $g^{-1}$ de extrato) *
EE	$57,3 \pm 0,3^a$
RM/A	$50,6 \pm 2,1^b$
PH	$19,8 \pm 0,8^c$
PDM	$57,2 \pm 1,8^a$
PAE	$58,8 \pm 3,7^a$
PBU	$63,6 \pm 2,9^a$

As análises com as mesmas letras não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido  $p < 0,01$  para todas as correlações com médias diferentes.

A quantificação do teor de flavonoides foi realizada por meio do método com  $AlCl_3$  segundo Woisky e Salatino, (1998). Nesta análise o cátion alumínio ( $Al^{3+}$ ) forma complexos estáveis com os flavonoides. O complexo formado apresenta absorção em comprimento de onda maior que o flavonoide não complexado, assim o monitoramento desta complexação é realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de 425 nm (Figura 14).

Figura 14 – Reação de complexação da quercetina com  $\text{AlCl}_3$ .



Fonte: Adaptado de AMORIM et al., (2008).

A partição em *n*-butanol apresentou os maiores teores, porém o valor está dentro da margem estatística com os teores da partição em acetato de etila e o extrato etanólico. A partição em hexano apresentou os menores teores, isso pode ser explicado pela baixa solubilidade desse grupo de substâncias no solvente. Os testes revelaram a baixa presença de flavonoides que complexaram com o reagente cloreto de alumínio, já que foram utilizadas amostras com  $1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Algumas classes de flavonoides não complexam ou complexam em baixa quantidade com o reagente utilizado, isso indica que os flavonoides presentes nas amostras podem apenas ser monômeros de taninos e então não complexam com o  $\text{AlCl}_3$  ou não apresentam hidroxilas como substituintes capazes de complexar com  $\text{AlCl}_3$ , ou ainda o comprimento de onda do flavonoide complexado com  $\text{AlCl}_3$  é diferente de 425 nm (SOUSA, 2015b). Essa técnica de determinação do teor de flavonoides pode apresentar limitação dependendo da estrutura do composto analisado, o que resulta na variação do comprimento de onda do complexo (AMORIM et al., 2008; PEKAL, PYRZYNSKA, 2014).

#### 6.3.4 Quantificação da atividade antioxidante (AA) pelo método de sequestro do radical DPPH

A análise quantitativa da atividade antioxidante do extrato e frações da casca interna da *K. coriaceae* foi realizada pelo ensaio “*in vitro*” da capacidade de sequestro do radical livre DPPH (SOUZA, et al., 2007; MORAIS, et al., 2009). O método de sequestro de radicais livres DPPH $\cdot$  é bastante utilizado para a avaliação da capacidade antioxidante por ser considerado de fácil manipulação, altamente sensível, preciso, e de alta praticidade (OLIVEIRA, 2015).

As análises mostraram que tanto o extrato quanto as partições, apresentaram índices muito bons de concentrações efetivas ( $CE_{50}$ ). O  $CE_{50}$  representa a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH.

Para a obtenção do  $CE_{50}$  (Tabela 11) foram realizados cálculos e plotadas as curvas analíticas de regressão linear cuja porcentagem de DPPH• sequestrado, após 1 h de reação, *versus* as concentrações de extrato/partições utilizadas.

Tabela 11 – Valores de  $CE_{50}$  para o extrato etanólico e as partições.

Extrato/Partições	$CE_{50}$ ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DPPH•) *
EE	$2,8 \pm 0,2^a$
RMA	$3,1 \pm 0,2^a$
PH	$90,0 \pm 3,4^b$
PDM	$2,3 \pm 0,2^a$
PAE	$2,0 \pm 0,1^a$
PBU	$1,6 \pm 0,1^a$
BHT (controle positivo)	$4,8 \pm 0,1$

\*As análises com as mesmas letras não mostraram diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey a 5% para o mesmo ensaio. Foi obtido  $p < 0,01$  para todas as correlações com médias diferentes.

Tabela 12 – Intensidade da AA através do sequestro do radical DPPH segundo Reynertson, Basile e Kennely (2005).

DPPH ( $CE_{50}$ , $\mu\text{g mL}^{-1}$ )	Atividade Antioxidante Relativa
< 50	Elevada
50-100	Moderada
100-200	Baixa
> 200	Inativa

Fonte: O autor.

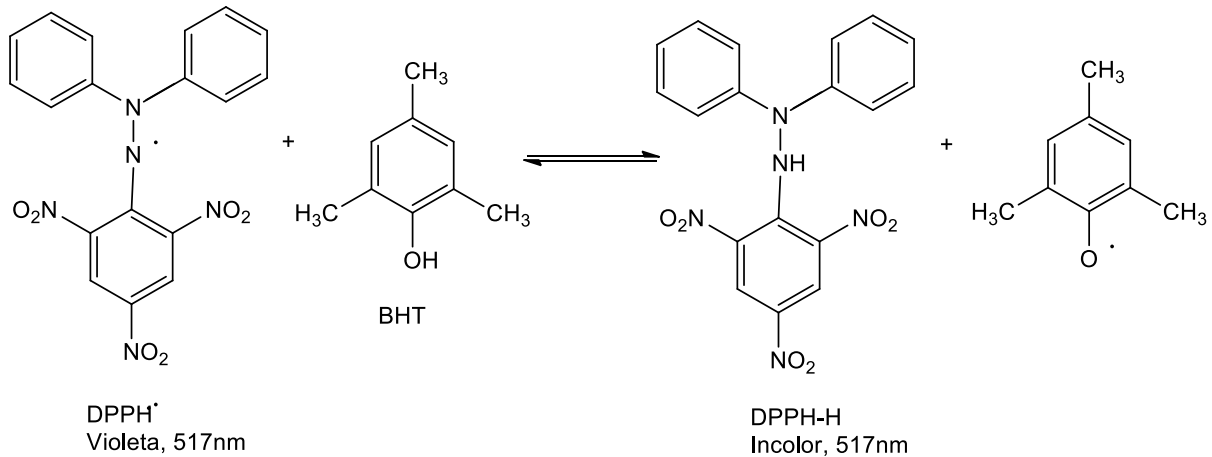
Os resultados indicam que aumentando a polaridade do solvente o potencial antioxidante do extrato/partição também aumenta. Tanto o extrato quanto as partições em diclorometano, acetato de etila, *n*-butanol e o resíduo metanol-água apresentaram valores excelentes e muito próximos entre si. A partição em hexano foi a que apresentou menor atividade antioxidante, ainda que moderada. Segundo Reynertson, Basile e Kennely (2005), a

intensidade da atividade antioxidante pode ser correlacionada com o valor obtido de  $CE_{50}$  conforme mostrado na Tabela 12.

Portanto, quanto menor esse valor, melhor é a atividade antioxidante. Essa análise permite afirmar o excelente potencial antioxidante do extrato e das partições polares.

O DPPH• é uma substância altamente reativa, assim o teste consiste numa reação de oxidação-redução do DPPH• com substâncias ditas antioxidantes, em geral, carotenoides, compostos fenólicos, vitaminas A C e E (SOUSA et al., 2007) presentes nos extratos. Na reação essas substâncias se oxidam doando elétrons ao DPPH• causando sua redução (Figura 15). Isso é evidenciado pela mudança de cor (violeta para amarelo) no meio reacional com consequente desaparecimento da banda de absorção, o que é monitorado pelo decréscimo da absorbância (de OLIVEIRA et al., 2009; HASLAM, 1996). Os radicais derivados fenólicos formados são mais estáveis devido a ressonância de anel aromático presente em suas estruturas. (VALKO et al., 2004; QUIDEAU et al., 2011).

Figura 15 – Reação redox simplificada do DPPH• com o composto fenólico BHT.



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA et al., (2009).

### 6.3.5 Análises dos resultados da atividade antioxidante por Voltametria Cíclica de Pulso Diferencial (VPD)

A voltametria de pulso diferencial (VPD) consiste na aplicação de pequenos pulsos de potencial com amplitude constante (10-100 mV). Nesta técnica é medida a corrente ao longo do tempo após a aplicação de cada pulso. A corrente obtida do experimento é na verdade uma diferença entre as correntes medidas antes e depois do pulso (GANDRA et al., 2004; GONÇALVES et al., 2010; PACHECO, 2013). A carga ( $I_p$ ) no pico de oxidação está

relacionada com a concentração de substâncias antioxidantes e depende também do coeficiente de difusão da substância (GANDRA et al., 2004). O potencial ( $E_p$ ) está relacionado com a capacidade redutora (antioxidante) de um composto, o aumento desse potencial de oxidação representa uma menor atividade antioxidante, ou seja, a amostra apresenta menor quantidade de compostos que se oxidam nesse potencial (PACHECO et al., 2013; SERUGA, NOVAK, JAKOBEK, 2011). A Tabela 13 apresenta o resultado dos valores médios obtidos para o potencial de oxidação e a carga no pico de oxidação medidos por esse método eletroquímico do extrato/partições, analisados em tampão acetato e fosfato.

Tabela 13 – Cargas e potenciais de oxidação por VPD do extrato etanólico/partições.

Extrato/Partições	Tampão acetato		Tampão fosfato	
	Carga ( $\mu\text{C}$ )	Potencial (mV)	Carga ( $\mu\text{C}$ )	Potencial (mV)
EE	31,5±0,2	325±2	43,5±0,2	186±2
PH	8,9 ±0,7	337±3	4,9±0,5	196±3
PDM	32,7±0,2	324±1	42,8±0,2	186±1
PAE	40,7±0,5	326±1	60,8±0,6	185±2
PBU	33,7±0,2	326±1	48,4±0,1	186±2
RMA	29,6±0,5	328±2	48,7±0,1	185±2

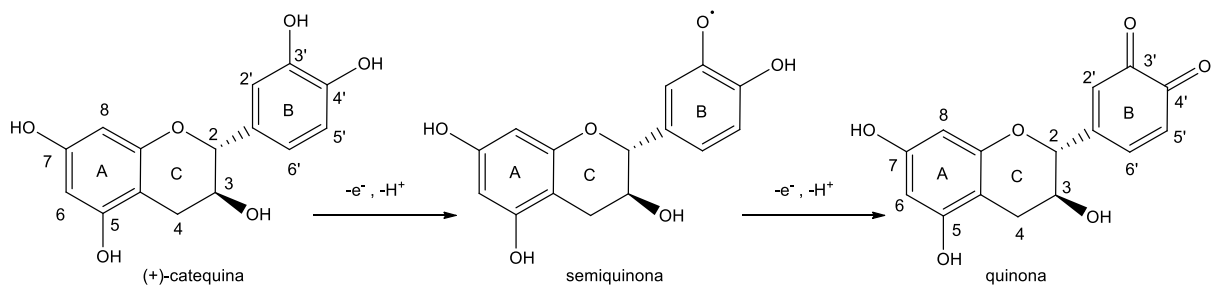
Fonte: O Autor.

A interpretação dos resultados da atividade antioxidante por voltametria cíclica de pulso diferencial (VPD) mostra a mesma tendência no teste frente ao radical DPPH, a boa atividade antioxidante das amostras mais polares. Para uma correlação desses dados eletroquímicos deve-se lembrar que nesse teste os resultados estão relacionados com a concentração das substâncias que reagem e inibem a oxidação do radical, quanto maior o número dessas substâncias menor será seu CE50.

Analisando os resultados da tabela observa-se que a partição acetato de etila (PAE) apresenta valores de carga (40,7 e 60,8  $\mu\text{C}$  nos tampões acetato e fosfato respectivamente) bem mais altos que as outras amostras indicando uma maior concentração de compostos redutores. A partição hexano apresentou os menores valores, portanto menor concentração. Os potenciais de oxidação estão muito próximos nos dois sistemas, com exceção da partição hexano que apresenta os maiores valores (337 e 196 mV nos tampões acetato e fosfato respectivamente), isso confirma o dado de que nessa partição há uma menor concentração de compostos redutores (ação antioxidante). Também se observa que no tampão fosfato, sistema

de maior pH, essas cargas no pico de oxidação são mais intensas que no tampão acetato, de menor pH (exceto para a PH). Porém, para os potenciais de oxidação observa-se o contrário. Segundo trabalhos de Kilmartin e colaboradores, (2001a, 2002b), Janeiro e Oliveira Brett, (2004), Seruga, Novak e Jakobek, (2011) isso ocorre porque a oxidação de compostos redutores, como os fenólicos é diretamente dependente do pH do meio e ocorrem com mais intensidade em pHs próximos de 7,0. A Figura 16 apresenta o mecanismo simplificado de oxidação do monômero de epicatequina.

Figura 16 – Reação global de oxidação da (+)-catequina.



Fonte: Kilmartin et al. (2001, 2002); Janeiro e Oliveira Brett (2004); Seruga, Novak e Jakobek (2011).

Segundo os estudos eletroquímicos realizados por Kilmartin et al., (2001, 2002), Janeiro e Oliveira Brett, (2004), Seruga, Novak e Jakobek, (2011), o anel B é mais facilmente oxidável do que o anel A, pois a hidroxila mais oxidável é aquela de menor acidez. E no anel B, em especial, observa-se maior pKa. Assim a transferência de elétrons ocorre seletivamente no anel B do catecol.

#### 6.4 ANÁLISES DOS ENSAIOS ANTIMICROBIANOS

A análise dos ensaios biológicos para verificação da atividade antimicrobiana foi realizada após a determinação da concentração mínima inibitória (CIM), que representa a menor quantidade da amostra capaz de inibir o crescimento microbiano. Alguns trabalhos são parâmetros de referência para avaliar o potencial antimicrobiano de produtos naturais. Para valores de CIM iguais ou abaixo de 100 µg mL<sup>-1</sup> a atividade é considerada promissora (HOLETZ et al. 2002; RÍOS, RECIO, 2005); valores entre 100 e 500 µg mL<sup>-1</sup> a atividade é considerada moderada; entre 500 e 1.000 µg mL<sup>-1</sup> a atividade é considerada fraca e para valores acima de 1.000 µg mL<sup>-1</sup> a amostra é considerada inativa (HOLETZ et al. 2002). Para substâncias puras é relevante que a CIM seja igual ou abaixo 10 µg mL<sup>-1</sup> (RÍOS, RECIO, 2005).

As bactérias utilizadas nos ensaios são as causadoras das principais doenças bucais que afetam a população. Esses micro-organismos possuem a capacidade de se implantar no sulco gengival e produzir substâncias tóxicas que provocam a degeneração do tecido periodontal (RIBEIRO et al., 2015). Em geral, bactérias do gênero *Streptococcus* se instalam interagindo com proteínas e formando um biofilme que causa a desmineralização do tecido duro dentário e que pode levar à formação de cavidade, constituindo a cárie (SILVA et al., 2015; KRZYŹCIAK et al., 2014). Essas enfermidades são um verdadeiro caso de saúde pública em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento como o Brasil devido a falta de higiene bucal, desinformação e falta de condições socioeconômicas básicas mínimas de saúde (SB-Brasil, 2010; SBSP,2015).

Os fungos utilizados nos ensaios são do gênero *Cândida* (*C. albicans*, *C.tropicalis*, *C. glabrata*, *C. krusei*, *C. parapsilosis*). Esse grupo específico de fungos são a causa da maioria das infecções fúngicas invasivas em pacientes nas UTI em todo o mundo (CALANDRA et al., 2016). Os tipos mais simples de candidíase são aquelas bucais (popularmente no Brasil são chamadas de ‘sapinho’) e que são altamente contagiosas. Algumas se instalam no sistema digestivo chegando ao estômago causando sérios danos ao paciente podendo causar sua morte. Comercialmente para seu tratamento, que é lento e altamente debilitante para o paciente, são usados, por exemplo, fármacos antifúngicos como o fluconazol, a anfotericina e as equinocandinas (ANVISA, 2015; CALANDRA et al., 2016; BRUNKE et al., 2011). Com isso, a busca por novas substâncias potencialmente antifúngicas e menos tóxicas pode ser uma saída para tantos efeitos colaterais graves.

#### **6.4.1 Análise dos ensaios antibacterianos frente às bactérias orais aeróbias e anaeróbias.**

Os resultados de atividade antibacteriana estão apresentados na Tabela 14. Para avaliar o potencial antibacteriano dos extratos e partições de *K. coriacea* alguns parâmetros sobre as concentrações inibitórias mínimas (CIM) foram observados conforme descrição no item metodologia. O EE apresentou moderada atividade antibacteriana contra a maioria das bactérias testadas (100 - 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e forte atividade contra *P. gingivalis* (50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A partição PH foi a amostra mais ativa, apresentando fortíssima atividade antibacteriana (1,56-6,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ), com valores abaixo do atribuído para substâncias puras (RÍOS, RECIO, 2005). A PH inibiu o crescimento das bactérias *S. mitis* e *S. sanguinis* com CIMs menores do que foi encontrado para o controle positivo. A PDM apresentou moderada atividade contra *S. mitis*, *S.*

*sanguinis*, *P. gingivalis* e *A. naeshundii* (200 – 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). As demais partições não foram ativas no intervalo de concentração testado.

Tabela 14 – Concentrações Inibitórias Mínimas (CIM,  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) do extrato/partições frente às bactérias bucais.

Microrganismos	EE	RMA	PH	PDM	PAE	PBU	Controle
Bactérias aeróbias							Clorexidina
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	400	>400	6,25	>400	>400	>400	0,922
<i>S. mitis</i> ATCC 49456	100	>400	1,56	400	>400	>400	3,688
<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	200	>400	3,12	400	>400	>400	3,688
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43717	400	>400	12,5	>400	>400	>400	1,844
Bactérias anaeróbias							Metronidazol
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	50	>400	3,12	200	>400	>400	
<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	400	>400	6,25	>400	>400	>400	
<i>A. naeshundii</i> ATCC 19039	100	>400	3,12	200	>400	>400	
<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	200	>400	6,25	>400	>400	>400	1,475
<i>B. thetaiotaomicron</i> ATCC 29741							2,95

Fonte: O Autor.

Contudo, a partição PH foi mais ativa que suas frações e subfrações, inibindo a maioria dos microrganismos bucais, com CIMs abaixo de 10  $\mu\text{g mL}^{-1}$  e menores que outros estudos com plantas do cerrado. Por exemplo, extratos e partições da madeira e casca de *Maclura tinctoria* testados contra várias bactérias bucais aeróbias e anaeróbias apresentaram valores de CIM entre 20 e 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (LAMOUNIER et al., 2012). Os extratos e partições das folhas de *Banisteriospsis laevifolia* não foram ativos contra *S. mutans*, *S. mitis*, *S. sanguinis* e *B. fragilis* e apresentaram moderada atividade contra *F. nucleatum* e *A. naeshundii* (NUNES et al., 2016). As partições das folhas de *Cordia sessilis* inibiram o crescimento de bactérias bucais com CIMs entre 50 e 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (AQUINO et al., 2013). A partição em diclorometano da espécie *Cassia bakeriana* apresentou atividade frente a diferentes microrganismos bucais com concentrações entre 12,5 e 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$  (CUNHA et al., 2017a). Esses valores estão representados na Tabela 15.



Tabela 15 – Resultados comparativos de CIM ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) entre espécies do cerrado.

Micro-organismos	Extratos e partições/Espécie			
	PDM (folhas) <sup>a</sup> <i>Cordia sessilis</i>	PH (cascas) <sup>b</sup> <i>Cassia bakeriana</i>	EE (cascas) <sup>c</sup> <i>M. tinctoria</i>	RMA (folhas) <sup>d</sup> <i>B. laevifolia</i>
<i>S. mutans</i>	200	25	>400	>400
<i>S. mitis</i>	200	200	300	>400
<i>S. sanguinis</i>	400	100	>400	>400
<i>F. nucleatum</i>	-	12,5	-	200
<i>A. naeslundii</i>	400	12,5	200	100

<sup>a</sup> Aquino et al., 2013; <sup>b</sup> Cunha et al., 2017; <sup>c</sup> Lamounier et al., 2012; <sup>d</sup> Nunes et al., 2016.

Os resultados para PH são ainda mais relevantes quando se observa o fato de que esta partição inibiu importantes patógenos envolvidos com a cárie dental, infecções endodônticas, periodontites e doenças sistêmicas (AAS et al., 2005).

Pelo fato da fração PH ter evidenciado forte efeito antibacteriano contra as bactérias bucais testadas, foi proposto o seu fracionamento em coluna cromatográfica e os resultados estão apresentados na Tabela 16.

Tabela 16 – Atividade antibacteriana (CIM,  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) de subfrações da partição hexânica frente às bactérias orais.

Microrganismos	<b>C1H1</b>	C1H2	<b>C1H3</b>	<b>C1H3 F108</b>	C1H2 F42	Controle
Bactérias aeróbias						Clorexidina
<i>S. mutans</i> ATCC 25175	<b>50</b>	400	<b>25</b>	<b>50</b>	>400	0,922
<i>S. mitis</i> ATCC 49456	<b>12,5</b>	400	<b>25</b>	<b>25</b>	>400	3,688
<i>S. sanguinis</i> ATCC 10556	<b>25</b>	400	<b>50</b>	<b>50</b>	>400	0,922
<i>A. actinomycetemcomitans</i> ATCC 43717	<b>12,5</b>	400	<b>25</b>	<b>25</b>	>400	0,460
Bactérias anaeróbias						Metronidazol
<i>P. gingivalis</i> ATCC 33277	200	200	400	400	>400	
<i>F. nucleatum</i> ATCC 25586	200	400	200	>400	>400	
<i>A. naeslundii</i> ATCC 19039	>400	>400	>400	>400	>400	
<i>B. fragilis</i> ATCC 25285	200	200	400	400	>400	0,3688
<i>B. thetaiotaomicron</i> ATCC 29741						1,475

Fonte: O Autor.

De forma geral, as subfrações testadas apresentaram valores de CIM mais altos que a partição em hexano (PH) frente a todas bactérias avaliadas, indicando menor atividade antibacteriana. Observa-se que o refração da partição PH promoveu uma diminuição da ação antibacteriana. A perda da atividade pode estar relacionada com compostos que estavam agindo de forma sinérgica e foram separados durante o fracionamento (CUNHA et al., 2017a). As frações C1H1, C1H2 e C1H3 exibiram moderada atividade contra as bactérias anaeróbias, com CIMs variando entre 200 e 400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ , enquanto as frações C1H1, C1H3 e a subfração C1H3-F108 foram fortemente ativas contra as bactérias aeróbias (12,5 - 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A fração C1H2 exibiu moderada atividade frente as bactérias aeróbias (400  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). A subfração C1H2-F42 foi inativa frente a todas as bactérias testadas.

A forte atividade da partição PH pode estar relacionada com a presença de triterpenoides, esteroides, ácidos graxos e álcoois determinados por cromatografia em camada delgada, cromatografia gasosa e RMN. Estudos com essas classes de compostos têm demonstrado sua importância na inibição contra diferentes microrganismos, incluindo os bucais (BORDOLOI et al., 2017; CUNHA et al., 2007b; EVARISTO et al., 2014). As frações C1H1, C1H3 e a subfração C1H3-F108, ricas em ácidos graxos, apresentaram forte atividade frente as bactérias bucais aeróbias. Esses resultados evidenciam a importância dos ácidos graxos como agentes antimicrobianos (BORDOLOI et al., 2017, CHOI et al., 2013). A subfração C1H2-F42, rica em esteroides não apresentou atividade relevante contra nenhuma das bactérias no intervalo de concentrações testado.

#### 6.4.2 Análises dos ensaios antifúngicos frente aos fungos *Candida ssp.*

Os resultados da atividade antifúngica frente às leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata* estão apresentados na Tabela 17. O extrato etanólico da casca interna de *K. coriacea* e partições inibiram o crescimento de todas as espécies de *Candida* testadas, com CIMs variando entre 23,43 e 1500,0  $\mu\text{g mL}^{-1}$ . A partição PH foi a amostra menos ativa (CIMs entre 375 e 1500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). As amostras EE e RMA mostraram moderada atividade contra *C. tropicalis* e *C. glabrata* (187,5  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) e forte atividade contra *C. albicans* (23,43  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). Os melhores resultados foram encontrados com as partições PDM e PBU onde evidenciaram promissora atividade contra todas as leveduras testadas, com CIMs entre 23,43 e 46,87  $\mu\text{g mL}^{-1}$ .

Tabela 17 – CIMs ( $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) para o extrato e as partições frente aos fungos *Candida ssp.*

Leveduras	EE	RMA	PH	PDM	PAE	PBU	Controle
							Anfotericina
<i>C. albicans</i> ATCC 28366	<b>23,43</b>	<b>23,43</b>	375	<b>23,43</b>	375	<b>46,87</b>	
<i>C. tropicalis</i> ATCC 13803	187,5	187,5	1500	<b>46,87</b>	375	<b>46,87</b>	
<i>C. glabrata</i> ATCC 15126	187,5	187,5	375	<b>46,87</b>	<b>46,87</b>	<b>46,87</b>	
<i>C. krusei</i> ATCC 6258							2,0
<i>C. parapsilosis</i> ATCC 22019							1,0

Fonte: O Autor.

Fazendo-se uma correlação destes resultados com os teores de flavonoides (Tabela 10), observou-se que não houve diferença estatística entre as partições PDM e PBU. Desta forma os compostos fenólicos dessa classe podem estar contribuindo para o relevante efeito antifúngico encontrado para estas partições (EDZIRI et al., 2012). Teores de fenóis totais e proantocianidinas mais altos na partição PBU comparados a PDM não promoveram maior atividade anticândida.

Os compostos identificados por LC-EM/EM na partição PDM (epicatequina, taninos-proantocianidinas A e B) foram também identificados na partição PBU. Na partição PDM foi evidenciada a possibilidade de triterpenos, cumarinas e xantonas, classes estas de compostos não evidenciadas na partição PBU. É possível que essas diferenças na composição expliquem a maior atividade de PDM frente a *C. albicans*. ( $23,43 \mu\text{g mL}^{-1}$ ), uma vez que a presença de triterpenos e xantonas em diferentes extratos de plantas já foi relacionada com a inibição de *C. albicans* (SINGH et al., 2011; ZUBRICKÁ et al., 2015, MOKOKA et al., 2013; MONTAGNER et al., 2008).

Destaca-se aqui a importância dos resultados antifúngicos encontrados para PDM e PBU, não só pelo fato das concentrações inibitórias estarem abaixo de  $100 \mu\text{g mL}^{-1}$  (RIOS, RECIO, 2005), mas pela dificuldade de um produto natural inibir o crescimento dessas leveduras em baixas concentrações. Recente revisão aponta vários estudos mostrando a atividade antifúngica de vegetais contra as leveduras *C. albicans*, *C. tropicalis* e *C. glabrata*, dentre outras espécies de *Candida* (MARTINS et al., 2015). Grande parte das plantas

estudadas inibiram essas leveduras com elevadas concentrações ( $>1000 \mu\text{g mL}^{-1}$ ). Este mesmo trabalho destaca a importância da presença de compostos fenólicos nas plantas para que se tenha uma boa atividade antifúngica. Esta revisão também aponta que extratos preparados com solventes polares como metanol, água e misturas hidroalcoólicas são mais efetivos contra as espécies de *Candida*. E isto se deve a alta solubilidade de compostos fenólicos nesses solventes.

Taninos hidrolisados e flavonoides também exercem considerável efeito anti-*Candida* (MARTINS et al., 2015). Portanto, os bons valores de CIM encontrados para PDM e PBU podem ser justificados devido aos altos teores de compostos fenólicos (acima de 500 mg de EAG  $\text{g}^{-1}$  de amostra) e também pela presença de taninos e flavonoides encontrados nessas amostras.

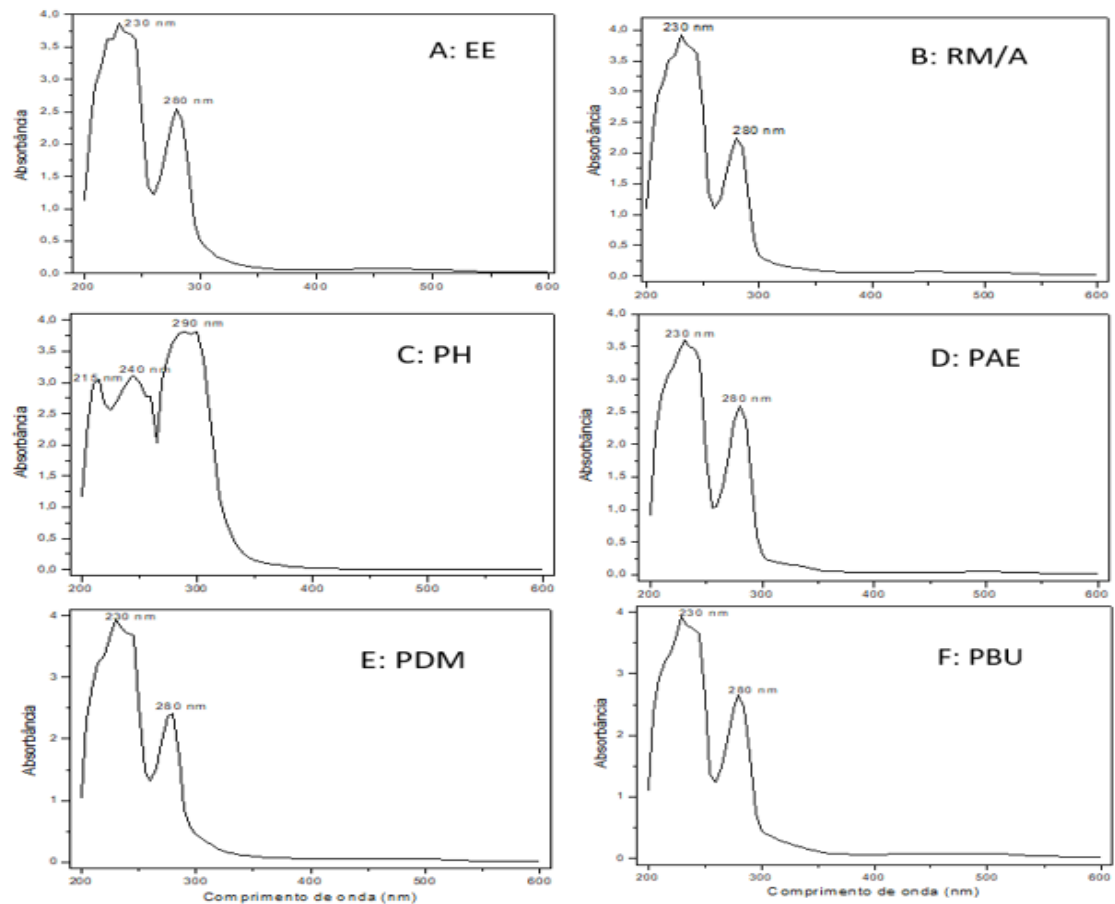
Quando a amostra PAE foi analisada por UV-VIS foram observados compostos fenólicos, taninos e flavonoides. Por LC-EM/EM foram identificados os mesmos compostos que em PDM e PBU. Por CCD foi indicada a possibilidade de presença de cumarinas, xantonas e saponinas. Entretanto, a partição PAE não apresentou bons valores de CIM como as partições PDM e PBU em relação às leveduras *C. albicans* e *C. tropicalis* ( $375 \mu\text{g mL}^{-1}$ ).

De qualquer forma, é possível afirmar que os extratos e partições da casca interna de *K. coriacea* mostraram ser promissores agentes anti-*Candida*, particularmente as partições PDM e PBU. Provavelmente compostos fenólicos, taninos e flavonoides são os responsáveis pela atividade antifúngica encontrada.

## 6.5 ANÁLISE DO PADRÃO DE METABÓLITOS NO EXTRATO E PARTIÇÕES POR ESPECTROSCOPIA NO UV-VIS

Na análise dos cromatogramas de UV-Vis pode-se identificar similaridades entre o extrato e as partições (Figura 17). Todas as amostras apresentam duas bandas bem definidas em 230 nm e 280 nm e a partição PH (Figura 17 B) apresentou uma terceira banda em 215 nm.

Figura 17 – Espectros de UV-vis do extrato e partições.



Fonte: O Autor.

A banda em 215 nm é referente a compostos insaturados com duas duplas ligações. No fracionamento em coluna cromatográfica realizado seguido de análise por CCD, CG-EM e RMN  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  da fração PH foram encontrados alquenos, esteroides triterpênicos, triterpenos e compostos alquílicos de cadeia longa como ácido carboxílico, álcool, éster e cetona.

A banda de absorvância em 230nm poderia ser atribuída aos flavonoides, já que os taninos condensados são formados por unidades de flavan-3-ol (uma classe de flavonoides). Porém, tanto nos teores calculados quanto na análise de CLAE-EM-IES, a presença desses flavonoides foi detectada em baixas concentrações, a exceção da epicatequina, identificada em sinais intensos. Os flavonoides apresentam duas bandas de absorção bem características: a banda I em 320-400 nm devida ao anel B (chamado de sinamoil) e a banda II em 200-250 nm, devida aos anéis A e C (a parte benzoil).

A banda em 280 nm é característica das proantocianidinas (SUN et al., 2007; WHYREPKWSKI, 2016), compostos conhecidos como taninos condensados ou catecóicos. Esse grupo de substâncias é formado por flavonoides do tipo flavan-3-ol e se distinguem dos

outros grupos de flavonoides porque têm apenas a banda II, provocado pela não conjugação entre os anéis A e B. O alto teor de taninos condensados calculado para as frações (Tabela 11 p 49) e a identificação de vários tipos de proantocianidinas, na análise das amostras por CLAE-EM-IES, corroboram esse dado.

## 6.6 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS DA FRAÇÃO HEXÂNICA (PH)

Com o resultado das atividades biológicas da fração hexânica (PH), notadamente os resultados frente aos microrganismos bucais, foi feito o fracionamento em coluna cromatográfica desta partição que resultou em 7 subfrações, as quais foram submetidas a análise por CG-EM. As frações C1H2, C1H3 foram particionadas e as suas subfrações foram submetidas a análises por CG-EM, e/ou RMN.

### 6.6.1 Análise e identificação de compostos presentes na fração C1H1.

Essa fração (oriunda do fracionamento de PH) se constitui num óleo amarelo viscoso, inodoro e não volátil. A análise por CCD revelou várias manchas de coloração azul no UV<sub>365nm</sub>. Pela análise dos espectros de RMN a maioria dos sinais de <sup>1</sup>H aparece nas regiões com deslocamentos químicos entre  $\delta$  0,5-3,0 ppm (Figura 18), apresentando alta blindagem, sendo tipicamente sinais de hidrogênios em carbonos metílicos, metínicos e metilênicos. Há <sup>1</sup>H em deslocamentos mais baixos com sinais menos intensos ( $\delta$  3,0-6,5), indicando a presença de ligação dupla e ligação com oxigênio do tipo éster, éter e álcool. Os sinais pouco intensos na região de  $\delta$  10 ppm e  $\delta$  11,5 ppm indicam <sup>1</sup>H de ácido carboxílico, cetona ou aldeído. Esses sinais são vistos com mais nitidez na parte ampliada do espectro apresentados nas Figuras 19 e 20.

Figura 18– Atribuições no espectro de  $^1\text{H}$  dos deslocamentos químicos dos  $^1\text{H}$  da fração C1H1.

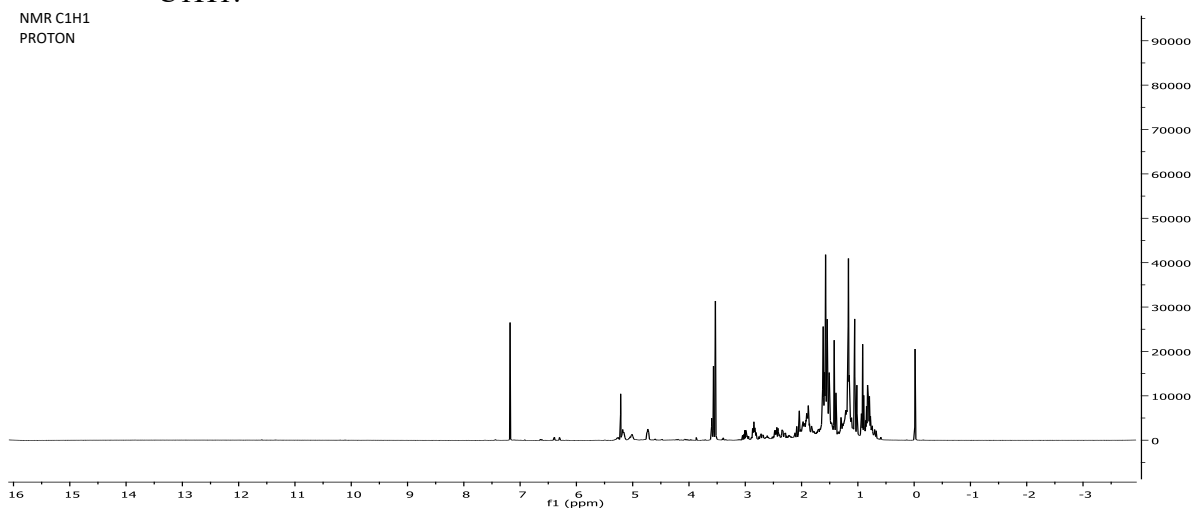


Figura 19 – Ampliação do espectro RMN  $^1\text{H}$  no intervalo de 5,5- 12,5.

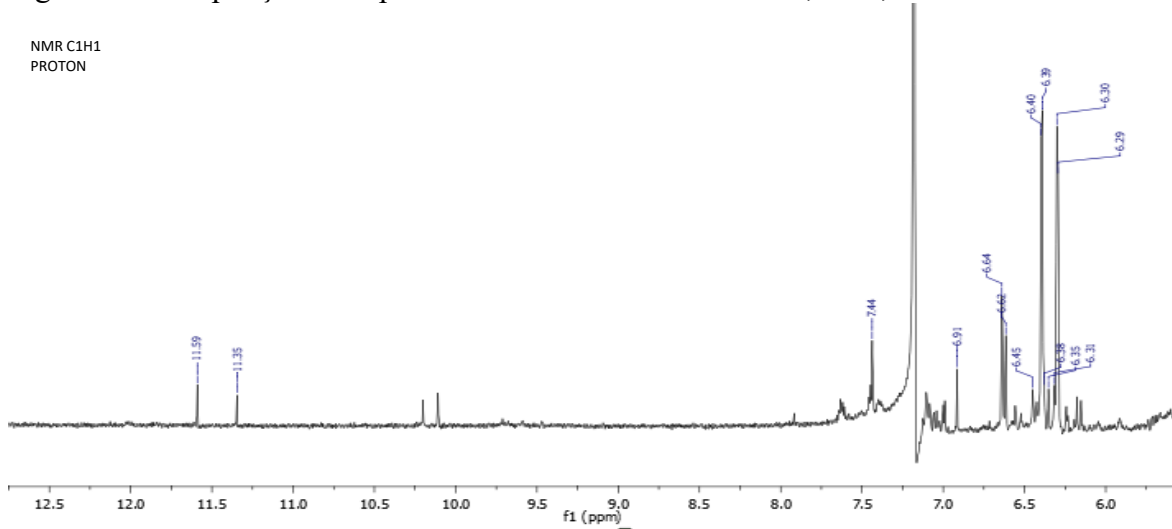
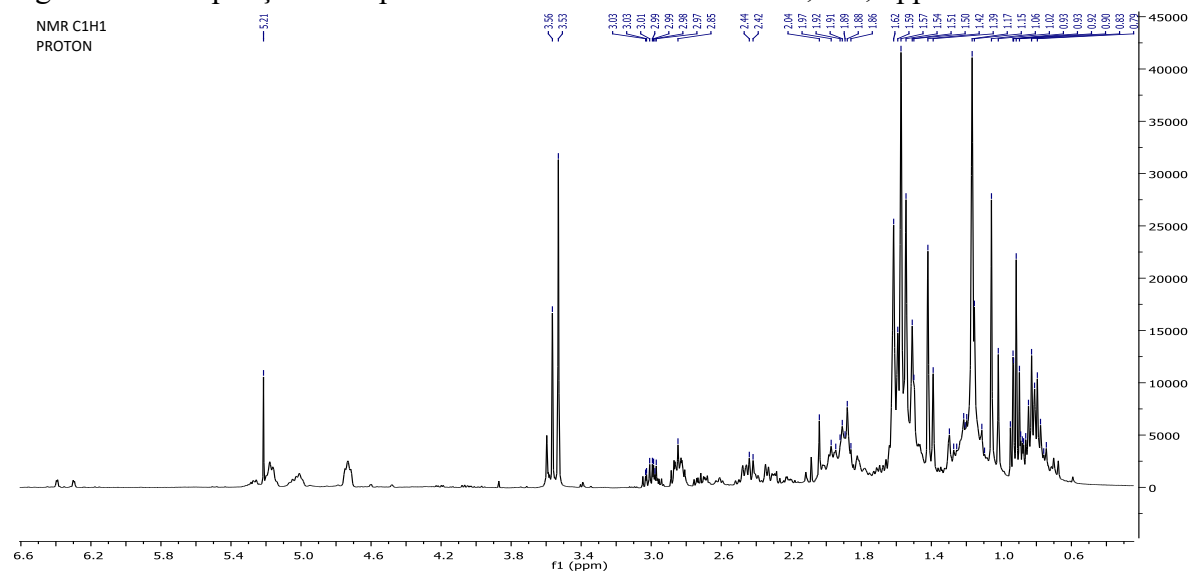


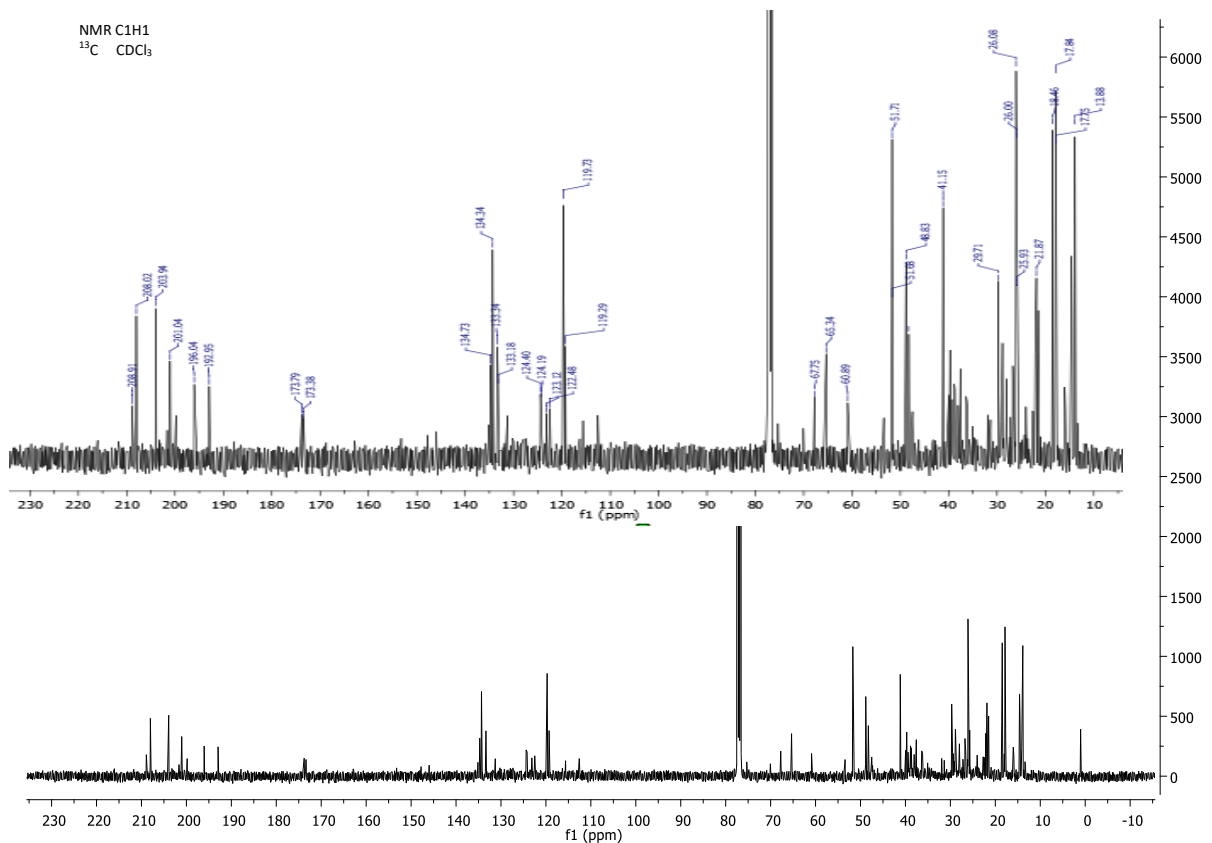
Figura 20 – Ampliação do espectro RMN  $^1\text{H}$  no intervalo de 0,4 -6,6 ppm.



Fonte: O Autor

Pela análise dos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) pode-se observar que se trata de uma mistura de compostos de cadeia com grande número de carbonos alifáticos (Figura 20). A alta concentração de sinais intensos de carbonos com deslocamento químico entre  $\delta$  10 ppm e  $\delta$  50 ppm típicos dos carbonos de cadeias carbônicas alifáticas. Os sinais na região de  $\delta$  110-130 ppm indicam carbonos vinílicos, e os sinais em  $\delta$  172 ppm e no intervalo de 190-210 ppm indicam a presença de carbonilas. Portanto, a análise indica que essa fração é composta de substâncias de cadeia alifática longa como alqueno, álcool, cetona, aldeído, éster e/ou ácido graxo (Figura 21).

Figura 21– Espectro de RMN  $^{13}\text{C}$  (400 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ) da fração C1H1.



Fonte: O Autor

Essas substâncias com cadeia alifática longa têm se constituído como bons agentes antimicrobianos pela forte interação entre sua parte lipofílica e as paredes celulares microbianas, especificamente de bactérias (BORDOLOI et al., 2017). Essas informações podem sinalizar que, a presença dessas classes de compostos seja responsável pela boa atividade encontrada no ensaio antibacteriano frente às bactérias bucais aeróbias (CIMs 12,5-50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).



Recentemente, foram identificados no extrato em heptano das folhas de *K. coreacea* um alqueno, três álcoois e duas cetonas de cadeia alifática com 10 a 20 carbonos (FIGUEIREDO et al., 2014).

### 6.6.2 Análise e identificação de compostos da subfração C1H2-F6

Essa subfração é oriunda do fracionamento em coluna de C1H2. A fração foi submetida à Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (Figura 22). O cromatograma apresentou uma grande quantidade de sinais e na comparação com as bibliotecas NIST, SHIMADZU e WILLEY presente no equipamento foi sugerido a presença de compostos alifáticos de cadeia carbônica longa, o que se mostrou compatível na comparação dos espectros de massas com padrões de fragmentações descritos na literatura. A tabela 18 apresenta a relação desses compostos.

Figura 22 – Cromatograma de CG-EM (70eV) da subfração C1H2-F6

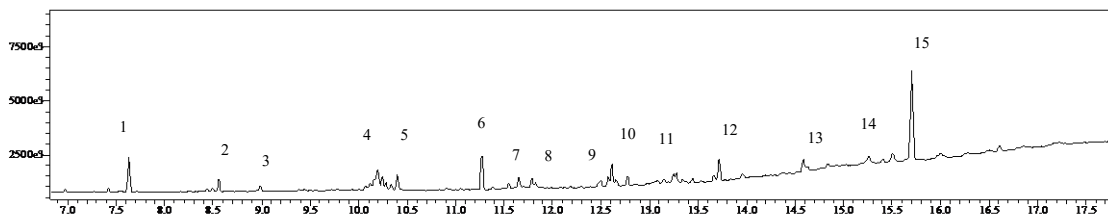


Tabela 18 – Dados da análise por CG-EM da subfração C1H2-F6

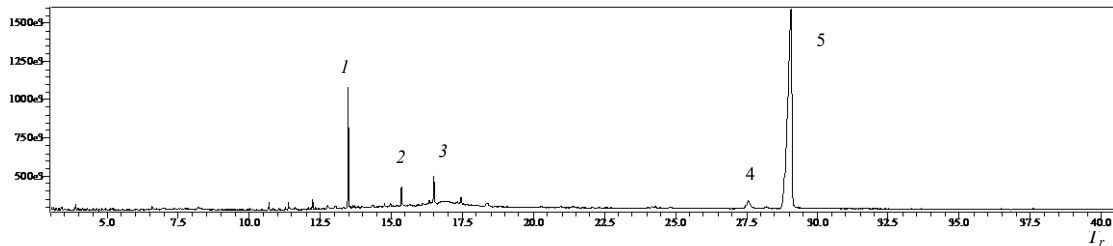
Identificação (Bibliotecas do equipamento)	Pico	Massa	$T_r$ (min.)	Fórmula
Bis-2-etil-hexiléter	1	242	7,5	$C_{16}H_{34}O$
Ácido 2-etil-hexiléster octanoico	1	256	8,5	$C_{16}H_{32}O_2$
Eicoseno	4	280	10,2	$C_{20}H_{40}$
Tetradecan-1ol	5	214	10,4	$C_{14}H_{30}O$
Ácido metiléster eicosanoico	6	326	11,2	$C_{21}H_{42}O_2$
Ácido metiléster octadec-6-enoico	9	296	12,6	$C_{19}H_{36}O_2$
Ácido Pentadecanoico	12	242	13,7	$C_{15}H_{30}O_2$
Octadec-9-en-1-ol	13	268	14,5	$C_{18}H_{36}O$

Fonte: O Autor.

### 6.6.3 Análise e identificação de compostos da subfração C1H2-F26

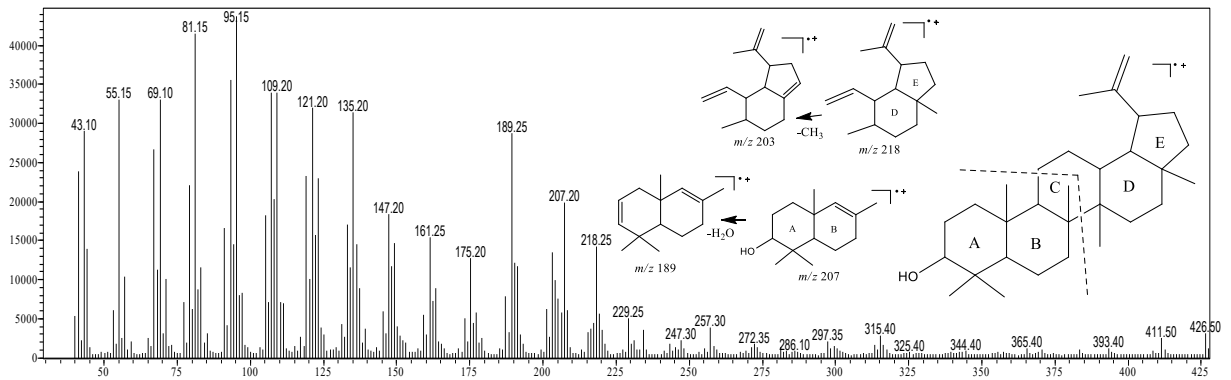
Essa fração é oriunda do fracionamento em CC de C1H2. A análise do espectro de CG indica que a fração é constituída de uma mistura de compostos (Figura 23). Foram identificados com base nas bibliotecas do aparelho e dados da literatura os picos 1, 4 e 5. O pico 1 ( $t_r$ :13 min.) foi identificado como sendo de um ftalato, uma substância contaminante. O fragmento  $m/z$  149 identificado no espectro de massa gerado é característico de ésteres derivados do ácido ftálico (GIESE, 2005). Os picos 4 e 5 foram atribuídos aos triterpenos lupeol e  $\alpha$ -amirina. O isômero  $\beta$ -amirina encontrado conjuntamente em extratos de outras partes de *K. coriacea* (VASCONCELOS, 2009) não foi identificado nesse estudo.

Figura 23 – Cromatograma de CG-EM (70eV) da subfração C1H2-F26



O pico 4 ( $t_r$ : 27,1 min.) apresentou íon  $m/z$  426 e fragmentos  $m/z$  411, 365, 207, 203, 189, 95, dentre outros. O padrão de fragmentação (Figura 24) é compatível com o padrão fragmentação de triterpenos do tipo lupeno com uma hidroxila em C-3 (CULIOLI et al., 2004). O pico base da fragmentação desses compostos é o íon  $m/z$  189 [ $M^+$ -207-18]. Esse íon juntamente com outros íons também intensos, 218 [ $M^+$ -208], 207 [ $M^+$ -219] e 203 [ $M^+$ -218-15] são resultantes da clivagem no anel C do lupeol. O íon  $m/z$  365 [ $M^+$ - 43-18] é resultante da perda da cadeia lateral seguido de perda de água; o íon  $m/z$  411 [ $M^+$ -15] é formado pela perda de um radical metil. Esse composto apresenta fórmula  $C_{30}H_{50}O$  (BASYUNI et al., 2007; ZANON, 2006).

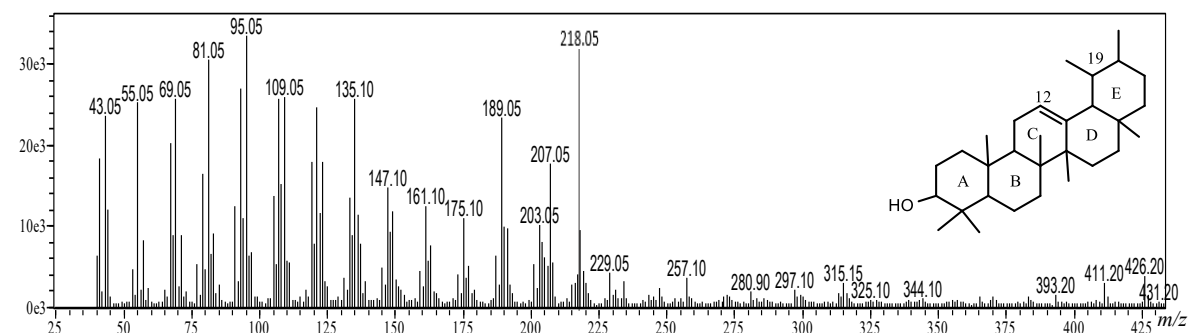
Figura 24 – Espectro de massas CG-EM-IE gerado para o pico 4.



Fonte: O Autor.

O pico 5 ( $t_r$ : 29 min.) de  $m/z$  426 foi identificado como pertencente a substância  $\alpha$ -amirina. O espectro de CG-EM-IE apresenta o padrão de fragmentação idêntico aqueles descritos na literatura para triterpenos do tipo amirinas (Figura 25), onde o pico base é o íon  $m/z$  218 (BASYUNI et al., 2007). O espectro também apresenta os fragmentos mais abundantes,  $m/z$  189, 203, 207, 218, 107, 95, dentre outros. O composto poderia ser identificado também como  $\beta$ -amirina que apresenta o mesmo padrão de fragmentação (GIESE, 2005). O ciclo triterpênico da  $\beta$ -amirina (chamado de oleano) tem como fragmentos mais intensos os íons  $m/z$  203 ou 207, e a  $\alpha$ -amirina, cujo ciclo triterpênico é chamado de ursano, tem o íon-fragmento  $m/z$  189 mais intenso (BASAR, 2005; MATOS, 2007).

Figura 25 – Espectro de massa CG-EM-IE gerado para o pico 5.

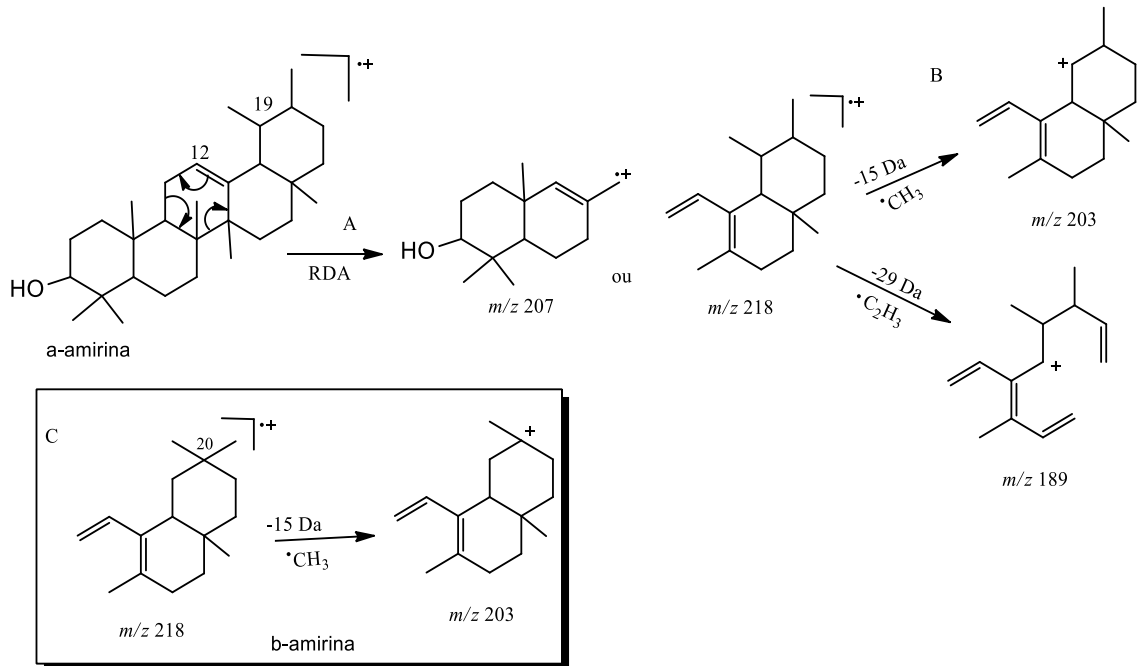


Fonte: O Autor.

O padrão de fragmentação para os triterpenos pentacíclicos com dupla ligação em C-12, como os triterpenos pentacíclicos ursanos ou oleanos, apresentam seus principais fragmentos formados decorrentes da quebra do ciclo C por uma reação retro Diels-Alder (Figura 26 A). A cisão heterolítica gera os fragmentos  $m/z$  207 e  $m/z$  218. A partir do

fragmento  $m/z$  218 (Figura 26 B) há a perda de um radical  $C_2H_3$  (29 Da) produzindo o fragmento  $m/z$  189. A maior intensidade desse fragmento na  $\alpha$ -amirina ocorre porque, preferencialmente, há a perda do grupo metila no C-19; já na  $\beta$ -amirina a fragmentação (Figura 26 C) ocorre no C-20 (BASAR, 2005; CULIOLI, et al., 2004).

Figura 26 - Proposta de fragmentação da  $\alpha$ -amirina por mecanismo RDA.

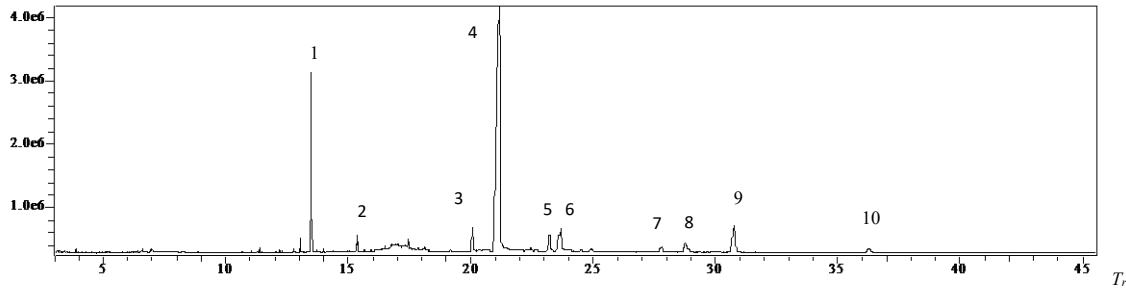


A- RDA triterpenos ursano e oleano; B- Perda metila em C-19  $\alpha$ -amirina; C- Perda metila  $\beta$ -amirina.  
 Fonte: Basar, (2005); MATOS, (2007).

#### 6.6.4 Análise e identificação de componentes da subfração C1H2-F33

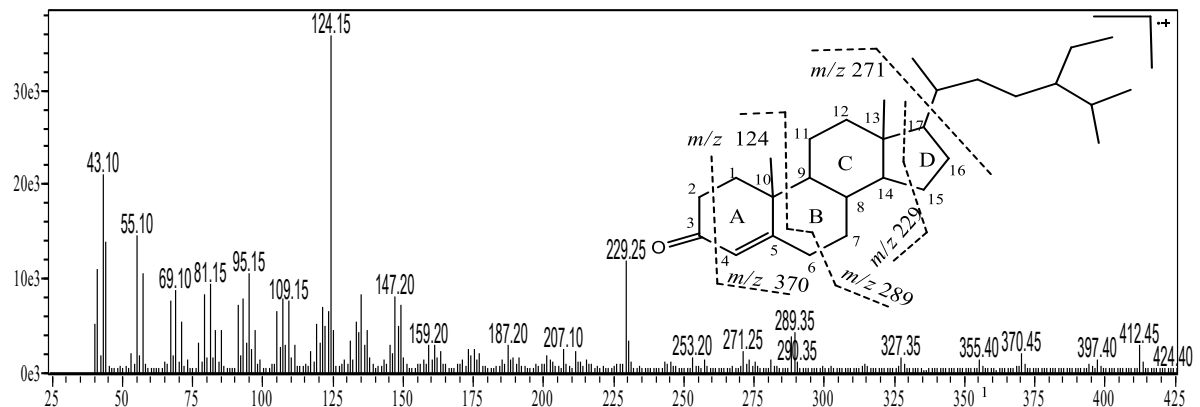
Essa fração é proveniente do fracionamento em CC da fração C1H2. O cromatograma (Figura 27) da análise por CG-EM apresentou 10 picos. Destes, os picos 1 e 9 foram identificados conforme análise de seus espectros de massas e comparação com as bibliotecas do equipamento e com dados da literatura. A mistura sólida apresentou, na análise por CCD, coloração vermelha após revelação com o reagente Liebermann-Buchard, em temperatura de 50°C.

Figura 27- Cromatograma de CG-EM (70eV) da subfração C1H2-F33.



O pico 1 foi identificado como um derivado do ácido ftálico, um contaminante. Os picos 2, 3, 5, 6, 7, 8 e 10 não foram identificados. O pico 9 ( $t_r$ : 30,9 min.) apresentou  $m/z$  412 e fórmula molecular  $C_{29}H_{48}O$  (Figura 28). Na análise das bibliotecas do aparelho o íon se refere ao composto sitost-4-en-3-ona. Ao comparar o espectro com outros dados da literatura (MOREIRA, 2009) verificou-se que pelo padrão de fragmentação trata-se realmente desse esteroide.

Figura 28 – Espectro de massa CG-EM-IE gerado para o pico 9.



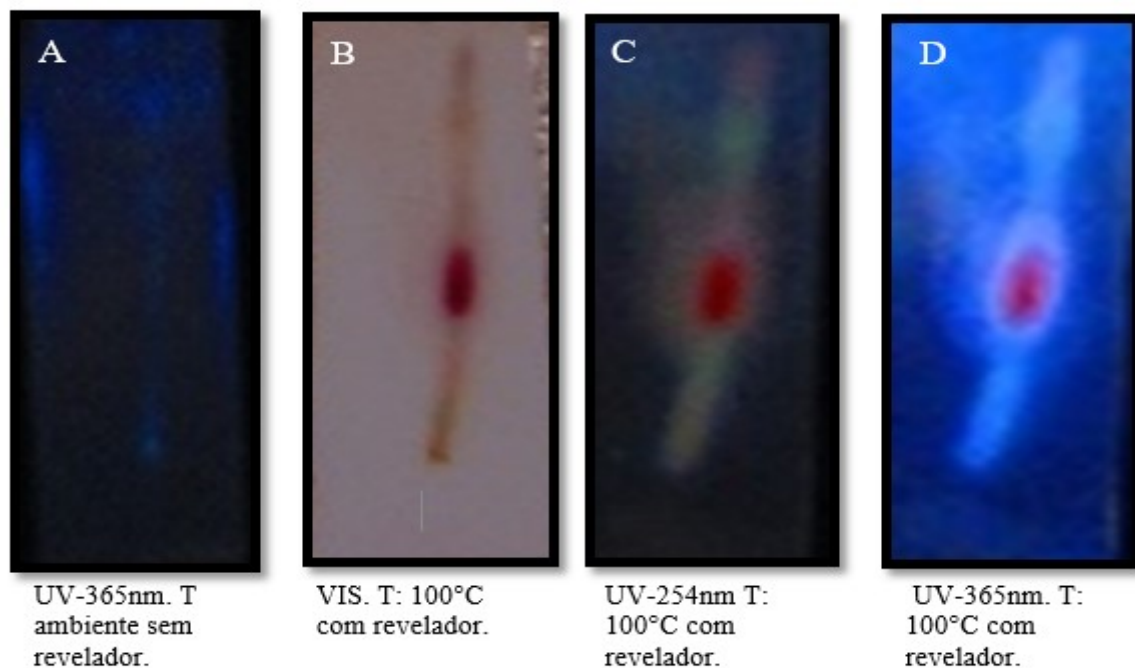
Fonte: O Autor.

O pico base  $m/z$  124 [ $M^+ - 288$ ] é característico da fragmentação do anel B de esteroides 3-ceto C-4 insaturados com a perda de 288 unidades. O íon  $m/z$  229 [ $M^+ - C_{13}H_{27}$ ] é resultante da clivagem do anel D entre C13-C17 e C14-C15 com a migração de um  $^1H$  para o fragmento neutro eliminado. O íon  $m/z$  397 resulta da perda de um radical metil [ $M^+ - 15$ ] e o íon  $m/z$  271 [ $M^+ - C_{10}H_{21}$ ] é indicativo da perda de 141 unidades correspondente a cadeia lateral (MOREIRA, 2009). O íon  $m/z$  370 é resultante da fissão do anel A pela carbonila com perda de 42 unidades. O íon  $m/z$  289 é formado na fissão do anel B com eliminação de 123 unidades (SILVESTRONI, 2014).

### 6.6.5 Análise e identificação dos componentes da subfração C1H2-F42.

Essa subfração é proveniente do fracionamento em CC de C1H2. A fração apresentou-se como um sólido cristalino branco (20mg), que após análise fitoquímica inicial em CCD com sistema de solvente (Fase Móvel) hexano, diclorometano, metanol (96:2:2), revelador Liebermann-Buchard a temperatura ambiente e a temperatura de 50°C, e câmara de UV<sub>254-365nm</sub>, apresentou as cores mostradas na Figura 29.

Figura 29 – Cromatografia em Camada Delgada (CCD) da fração C1H2-F42.

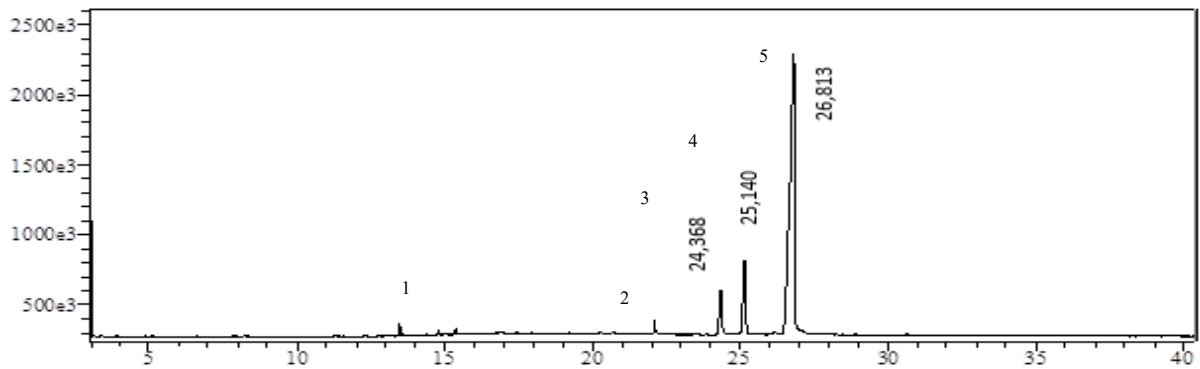


Fonte: O autor.

A mancha com coloração vermelha sugere a presença de uma substância esteroidal/triterpênica (SIMÕES et al., 2004; VAGNER, BLADT, 2001), fato que foi confirmado pelos dados de CG-EM-IE e RMN da amostra.

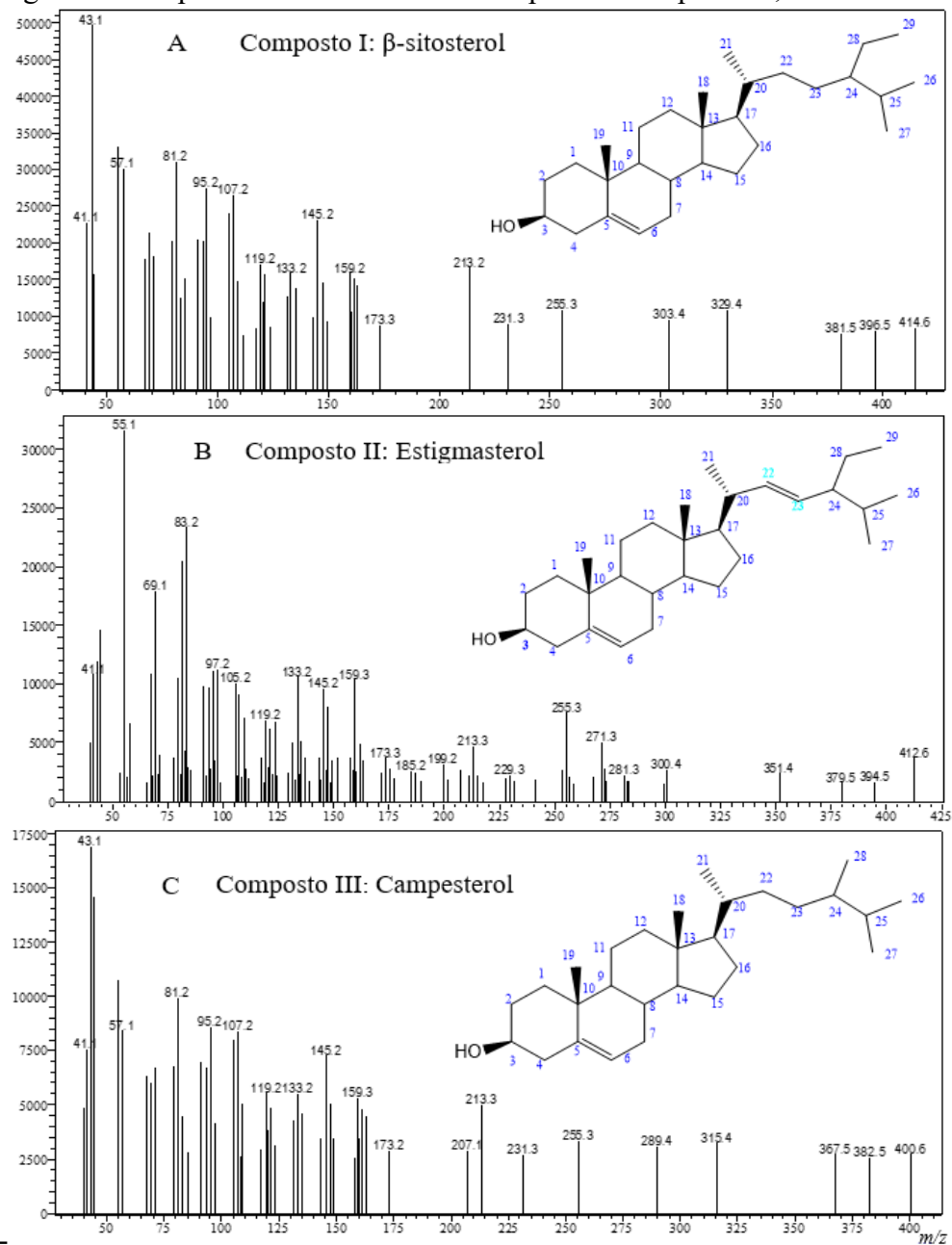
O cromatograma de íons totais da análise por CG-EM apresentou cinco picos, destes, os três picos mais intensos ( $T_r$ : 24,37; 25,14 e 26,81 min., respectivamente) foram identificados (Figura 30). A identificação foi feita utilizando-se dados das bibliotecas disponíveis no equipamento (NIST, SHIMATSU, WILLEY). O padrão de comparação apresentou 97% de similaridade com uma mistura de esteroides. O pico 3 foi identificado como referente ao campesterol; o pico 4 como referente ao estigmasterol e o pico 5 como sendo o  $\beta$ -sitosterol.

Figura 30 – Cromatograma de CG-EM (70eV) da subfração C1H2-F42.



Os espectros de massas gerados são mostrados na Figura 32 e apresentaram íons moleculares de  $m/z$  400,6, 412,6 e 414,6, respectivamente, estando compatíveis com as fórmulas moleculares  $C_{28}H_{48}O$  do campesterol,  $C_{29}H_{48}O$  do estigmasterol e  $C_{29}H_{50}O$  do  $\beta$ -sitosterol, que têm índices de insaturação iguais a 5, 6 e 5 respectivamente. O estudo comparativo do espectro de massa (Figura 31) correspondente a cada pico com os espectros das bibliotecas do aparelho foi consistente com o padrão de fragmentação, apresentado por estes esteroides, relatados na literatura (ANDRADE, 2003; QUEIROZ, 2008).

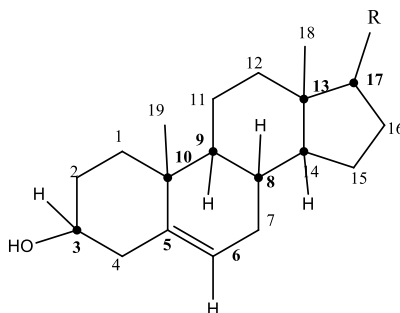
Figura 31 – Espectro de massa CG-EM-IE para os compostos I, II e III.



Os esteróis ou esteroides são unidades triterpênicas modificadas (SIMÕES et al., 2017), tendo como unidade básica o núcleo ciclopentanoperidrofenantreno com uma hidroxila no em C-3 e uma ligação dupla em C5-C6 (Figura 32). O fator diferencial nas estruturas dos três compostos é a cadeia alifática lateral, representada por R, ligadas a esse ciclo (ROBBERS et al., 1998). A diferença de massa entre o  $\beta$ -sitosterol e o estigmasterol é de 2 unidades e entre o estigmasterol e o campesterol é de 12 unidades, isso se verifica na formação de seus íons. Portanto as diferentes fragmentações da cadeia lateral é de grande valia para a identificação desses três compostos.



Figura 32 – Estrutura química molecular básica dos esteroides hidroxilados em C-3.



R: Cadeia alifática lateral ao ciclo esteroidal.

Fonte: Adaptado de Robbers et al., (1997)

Os espectros de massa apresentaram uma grande quantidade de íons-fragmentos (DARNET, RAHIER, 2004; QUEIROZ, 2008), característico da ionização por impacto de elétrons. Nessa técnica as moléculas gasosas são bombardeadas por elétrons com alta energia, havendo remoção de um elétron da molécula produzindo um cátion radical, o íon molecular (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2007). Na tabela 19 são apresentados alguns desses íons com as respectivas eliminações propostas para os três compostos identificados.

Tabela 19 – Propostas de fragmentações para formação de alguns íons dos esteróis identificados.

Composto	Fórmula molecular	Tr: (min)	Íon molecular	Fragmentação EM-IE ( $m/z$ )
$\beta$ -sitosterol	C <sub>29</sub> H <sub>50</sub> O	26,81	414	396(M <sup>+</sup> -18), 381(M <sup>+</sup> -18-15), 329(M <sup>+</sup> -85), 255(M <sup>+</sup> -141-18), 231(M <sup>+</sup> -42-141), 213(M <sup>+</sup> -42-141-18), 57(M <sup>+</sup> -357)
Estigmasterol	C <sub>29</sub> H <sub>48</sub> O	25,14	412	394(M <sup>+</sup> - 18), 271(M <sup>+</sup> - 139 - 2H), 231(M <sup>+</sup> -139-18), 231(M <sup>+</sup> - 42-139), 213(M <sup>+</sup> -42-139-18)
Campesterol	C <sub>28</sub> H <sub>48</sub> O	24,36	400	382(M <sup>+</sup> -18), 271(M <sup>+</sup> -127-18), 231(M <sup>+</sup> -42-127), 213(M <sup>+</sup> -42-127-18)

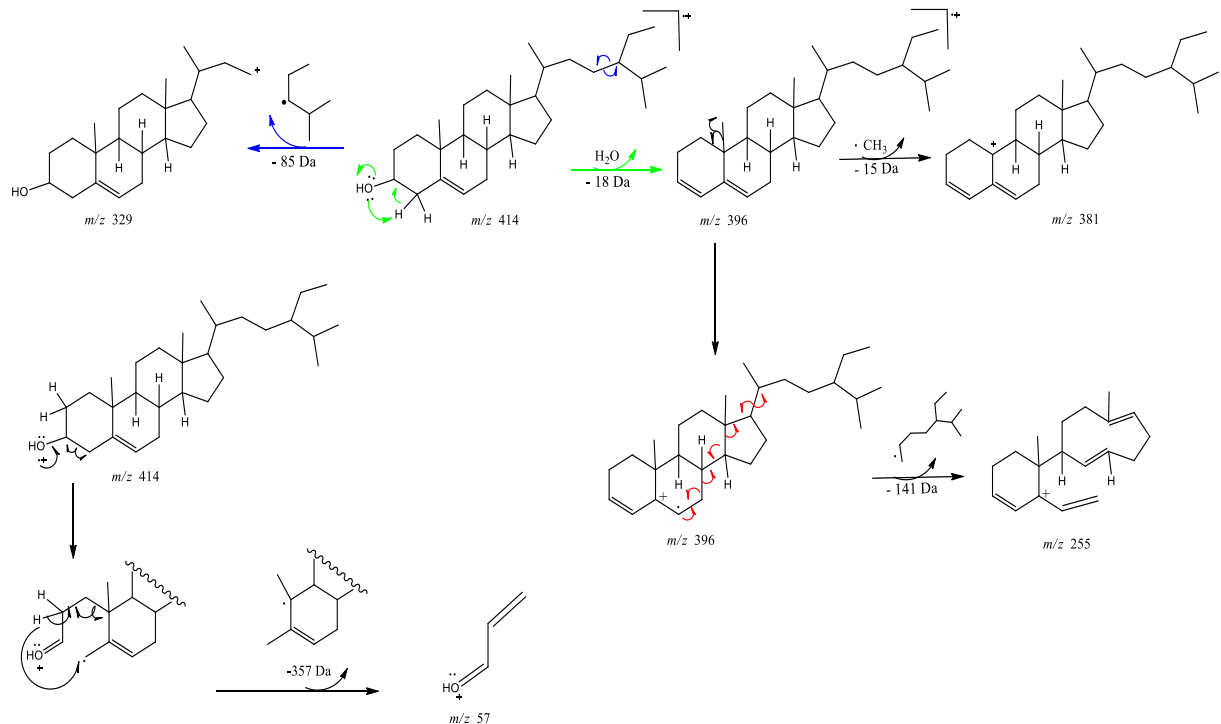
Tr: tempo de retenção.

A perda de água na hidroxila do C-3 ou na instauração do C-5,6 do anel esteroidal leva a perda de 18 unidades formando os íons de  $m/z$  396, 394 e 382 para o  $\beta$ -sitosterol, estigmasterol e campesterol, respectivamente (Figura 34 B). A sequente eliminação de um radical metil, desse íon, leva a formação dos íons de  $m/z$  381, 379 e 367 [M<sup>+</sup>-18-15], respectivamente. O estigmasterol pode sofrer ionização na insaturação entre C-22 e C-23

(ALTOÉ, 2014). A ionização na cadeia lateral com eliminação de 85 unidades forma o íon de  $m/z$  329.

Na Figura 33 são apresentadas propostas de mecanismos para os principais fragmentos apresentados no espectro de EM-IE do  $\beta$ -sitosterol, componente de maior proporção em massa na mistura. Após a desidratação obtendo  $m/z$  396, pode haver fissões no ciclo esteroidal com eliminação da cadeia lateral obtendo  $m/z$  381 e abertura do anel obtendo  $m/z$  255. A ionização da hidroxila pode levar à ruptura das ligações e quebra do anel provocando a eliminação de 355 unidades formando  $m/z$  57. (ALTOÉ, 2014; NASCIMENTO, 2014; SIMOTE, 2006).

Figura 33: Proposta de mecanismos da fragmentação para alguns íons-fragmentos do  $\beta$ -sitosterol  $m/z$  414



A-Fissão na cadeia lateral. B-Eliminação de água seguida da perda do radical metil. C- Quebra e rearranjos com saída da cadeia lateral. D-Ionização na hidroxila e rompimento do ciclo.

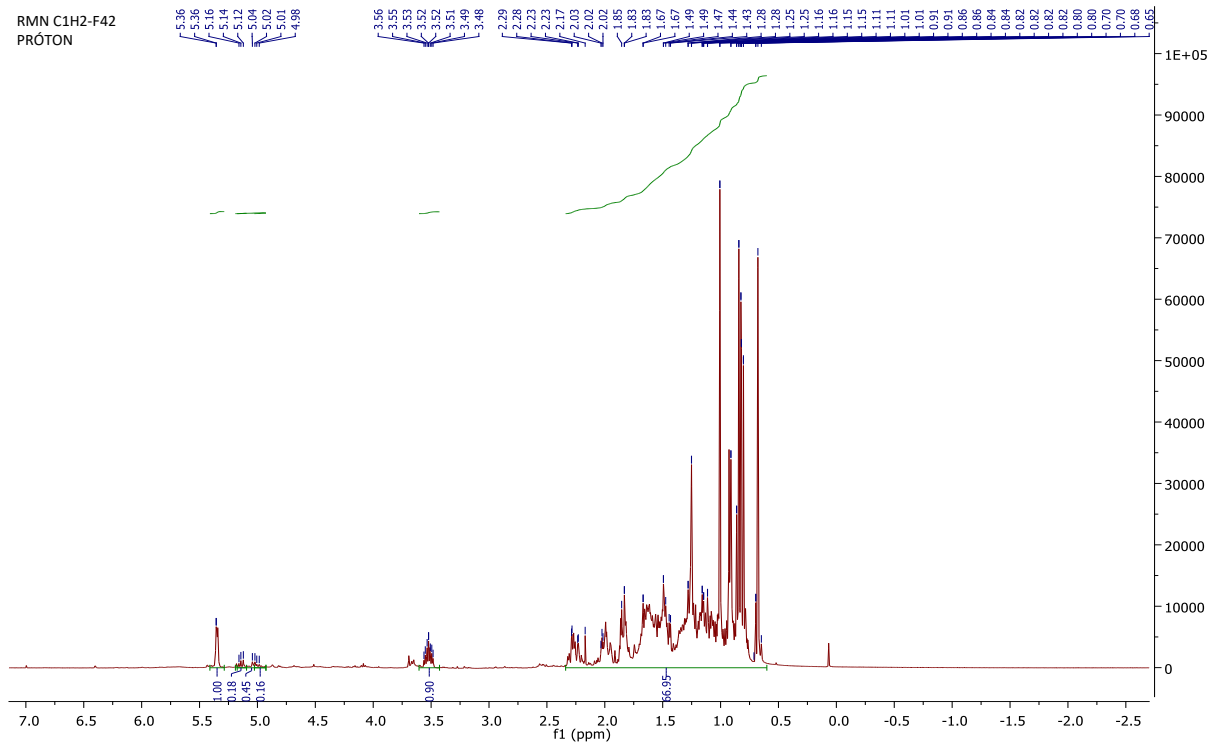
Fonte: O Autor.

### 6.6.5.1 Análise da subfração C1H2-F42 por RMN

O espectro de RMN (Figura 34) de  $^1H$  (400 MHz,  $CDCl_3$ ) da fração C1H2-F42 identificou a presença da mistura dos esteroides campesterol, estigmasterol e  $\beta$ -sitosterol. A mistura é caracterizada por um duplete em 5,31 ppm, referente ao hidrogênio H-6 que em seu

acoplamento com os hidrogênios H<sub>a</sub> e H<sub>b</sub> de C-7 apresenta uma constante de 5,3 Hz. Em 3,38 ppm há a presença de um multipeto relativo ao acoplamento do hidrogênio H-3 com os H de C-1, C-2 e C-4, respectivamente. Também foi observado um grande número de sinais intensos na região de 0,6-2,4 ppm, atribuídos aos hidrogênios metílicos, metilênicos e metínicos que representam o esqueleto esteroidal (Figura 35). Pelo fato dos três compostos apresentarem estruturas semelhantes, os sinais resultantes são coincidentes. Como as diferenças entre os compostos restringem-se essencialmente à cadeia lateral (Figura 36), os duplo-dupletos detectados em 4,98 ppm ( $J = 8,6$  e  $15,1$  Hz) e 5,12 ppm ( $J = 8,6$  e  $15,1$  Hz) são referentes aos hidrogênios dos carbonos vinílicos C-22 e C-23 do estigmasterol (ANDRADE, 2003; ZANON et al., 2008).

Figura 34 - Espectro RMN de <sup>1</sup>H (400 MHz, CDCl<sub>3</sub>) da fração C1H2-F42.



Fonte: O Autor.

Figura 35 - Expansão do espectro RMN de  $^1\text{H}$  da fração C1H2-F42, região de 4,5 a 5,8 ppm.

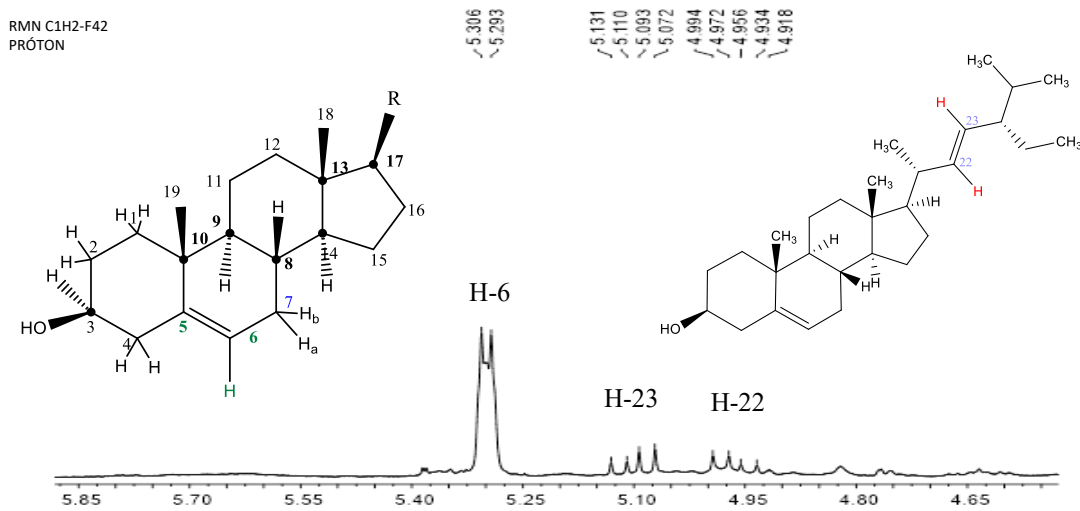
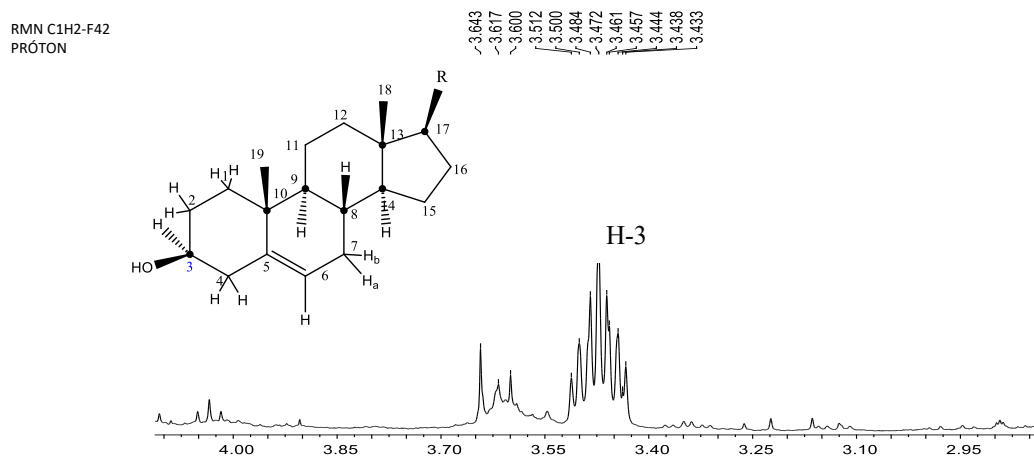


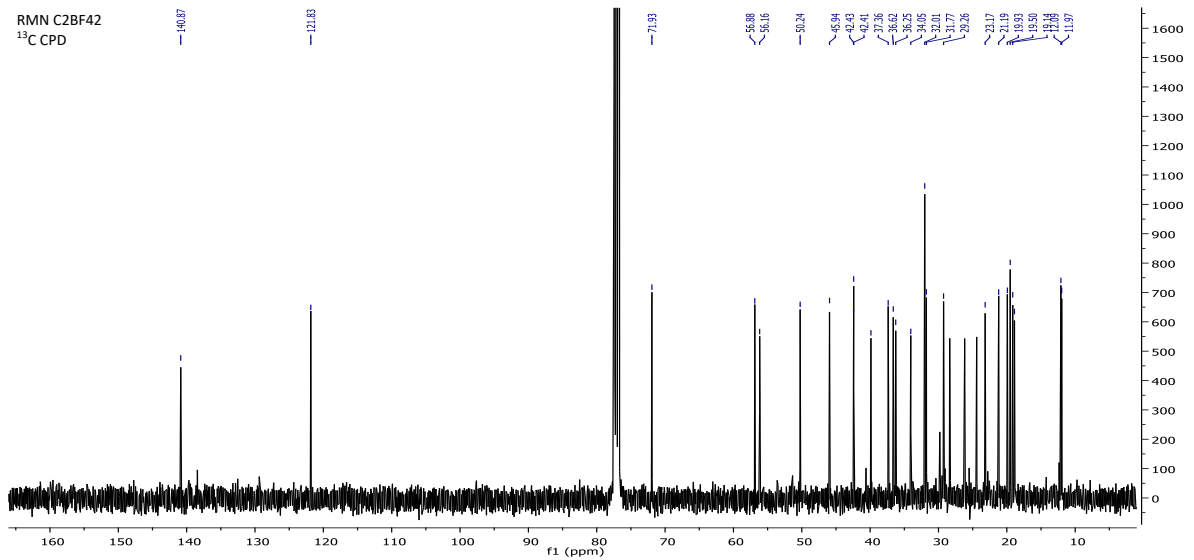
Figura 36 - Espectro RMN de  $^1\text{H}$  ampliado da fração C1H2-F42 (região de 2,8 a 4,4 ppm).



Fonte: O Autor.

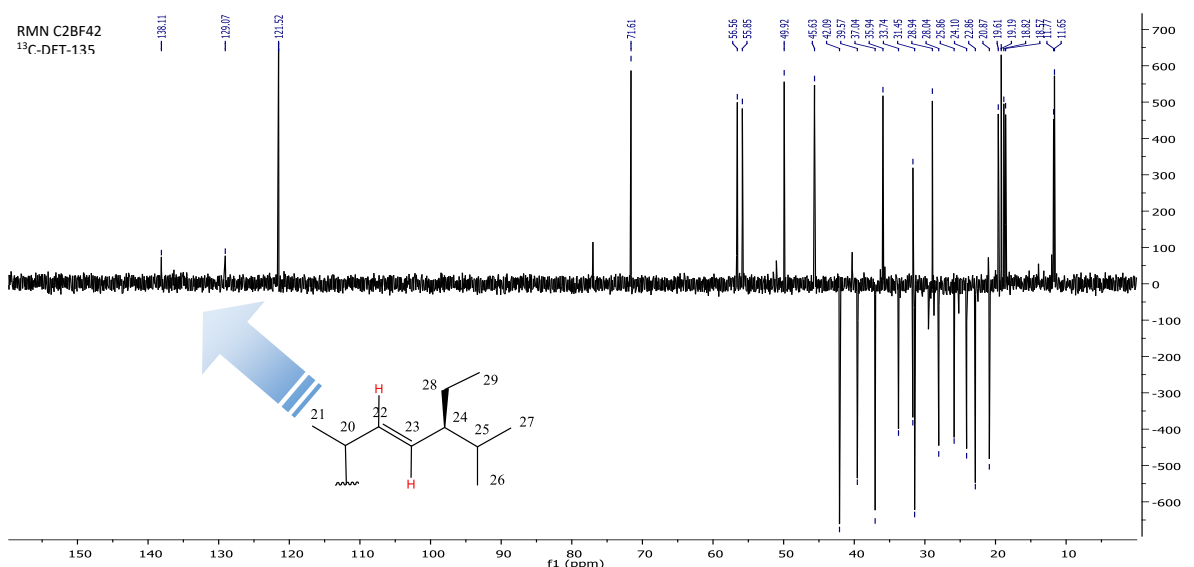
O espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$  (Figura 37), apresenta sinais característicos atribuídos ao carbono C-3 ligado a hidroxila e chamado de carbono carbinólico em 71,8 ppm, essa ligação com o -OH torna a região desblindada aumentando o seu deslocamento. Os sinais em 11,9 e 19,4 ppm são referentes as metilas C-18 e C-19 respectivamente. Quatro sinais na região de carbono  $\text{sp}^2$  (140,7; 121,7; 129,3; 138,3 ppm) indicam a presença de duas duplas ligações. Os sinais em 121,7 e 140,7 ppm são característicos de esteroides com uma dupla ligação entre C-5 e C-6 e os sinais em 129,3 e 138,3 ppm são referentes aos carbonos C-22 e C-23 na cadeia lateral do estigmasterol (GOULART, 1993).

Figura 37 – Espectro RMN de  $^{13}\text{C}$  da fração C1H2-F42 com a mistura das substâncias I, II e III. (100 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ).



Como os sinais em 121,7 e 140,7 ppm são referentes à cadeia esteroidal, comum às três substâncias, eles aparecerão mais intensos que os sinais em 129,3 e 138,3 ppm, referentes apenas ao estigmasterol (ZANON, et al., 2008). Esse fato pode ser comprovado na análise do espectro de RMN de  $^{13}\text{C}$ , DEPT-135. (Figura 38).

Figura 38 – Espectro RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT $^{135}$  da fração C1H2-F42 com a mistura das substâncias I, II e III. ( $\text{CDCl}_3$ ).



As principais atribuições dos deslocamentos com os sinais dos carbonos presentes na amostra e indicados nos espectros de RMN  $^{13}\text{C}$  DEPT-135 estão representadas na Tabela 20. Os valores encontrados estão de acordo com os valores encontrados para a mistura dos três

esteroides descritos na literatura (ANDRADE, 2003; GOULART, 1993; QUEIROZ, 2008; NASCIMENTO, 2014).

Tabela 20 – Dados de RMN  $^{13}\text{C}$  dos compostos presentes na fração C1H2-F42.

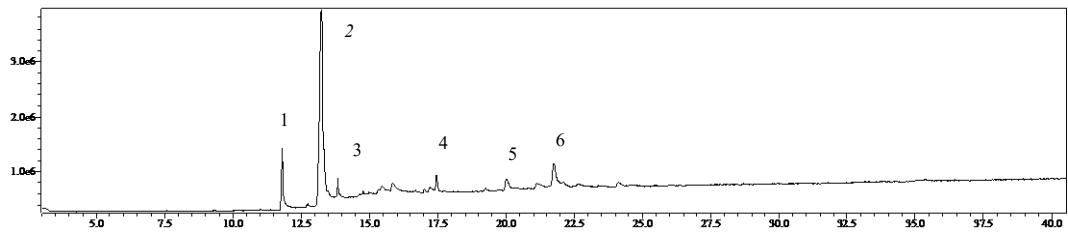
Carbono	$\delta$ (ppm) (400 MHz, $\text{CDCl}_3$ )	$\delta$ (ppm)*		
		Campesterol	Estigmasterol	$\beta$ -sitosterol
1	37,3 (CH <sub>2</sub> )	37,3	37,3	37,3
2	31,7 (CH <sub>2</sub> )	31,7	31,7	31,7
3	71,8 (CHOH)	71,8	71,8	71,8
4	42,3 (CH <sub>2</sub> )	42,3	42,3	42,3
5	140,8 (C=)	140,8	140,8	140,8
6	121,7(CH=)	121,7	121,7	121,7
7	31,9(CH <sub>2</sub> )	31,9	31,9	31,9
8	31,9(CH)	31,9	31,9	31,9
9	50,2(CH)	50,2	50,2	50,2
10	36,5(C)	36,5	36,5	36,5
11	21,1(CH <sub>2</sub> )	21,1	21,1	21,1
12	39,8(CH <sub>2</sub> )	39,8	39,8	39,8
13	42,3(C)	42,3	42,3	42,3
14	56,8(CH)	56,8	56,8	56,8
15	24,3(CH <sub>2</sub> )	24,3	24,3	24,3
16	28,2(CH <sub>2</sub> )	28,2	28,2	28,2
17	56,1(CH)	56,1	56,1	56,1
18	11,9(CH <sub>3</sub> )	11,9	11,9	11,9
19	19,4(CH <sub>3</sub> )	19,4	19,4	19,4
20	36,2(CH)	36,2(CH)	39,8(CH)	36,2(CH)
21	19,0(CH <sub>3</sub> )	19,1(CH <sub>3</sub> )	21,1(CH <sub>3</sub> )	18,8(CH <sub>3</sub> )
22	33,9(CH <sub>2</sub> )	34,0(CH <sub>2</sub> )	138,3 (CH=)	31,9(CH <sub>2</sub> )
23	138,3 (CH=)			
	26,1(CH <sub>2</sub> )	26,2(CH <sub>2</sub> )	129,3(CH)	29,7(CH <sub>2</sub> )
	129,3 CH=)			
	29,8 (CH <sub>2</sub> )			
24	45,8(CH)	45,9(CH)	51,2(CH)	39,7(CH)
	39,7 (CH)			
25	29,2(CH)	29,2(CH)	31,9(CH)	31,7(CH)
26	18,8 (CH <sub>3</sub> )	18,8(CH <sub>3</sub> )	19,0(CH <sub>3</sub> )	21,1(CH <sub>3</sub> )
27	19,8(CH <sub>3</sub> )	19,1(CH <sub>3</sub> )	19,0(CH <sub>3</sub> )	19,8(CH <sub>3</sub> )
28	23,1(CH <sub>3</sub> )	23,1(CH <sub>3</sub> )	26,2(CH <sub>2</sub> )	18,8(CH <sub>2</sub> )
	25,4 (CH <sub>2</sub> )			
29	12,2(CH <sub>3</sub> )		12,0(CH <sub>3</sub> )	12,2(CH <sub>3</sub> )
	11,9 (CH <sub>3</sub> )			

\*Andrade, 2003 (200 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ); Goulart, 1992 (50,3 MHz,  $\text{CDCl}_3$ ); Nascimento, 2014 (500 MHz, acetona- $d_6$ )

### 6.6.6 Análise e identificação de compostos da subfração C1H3-F11

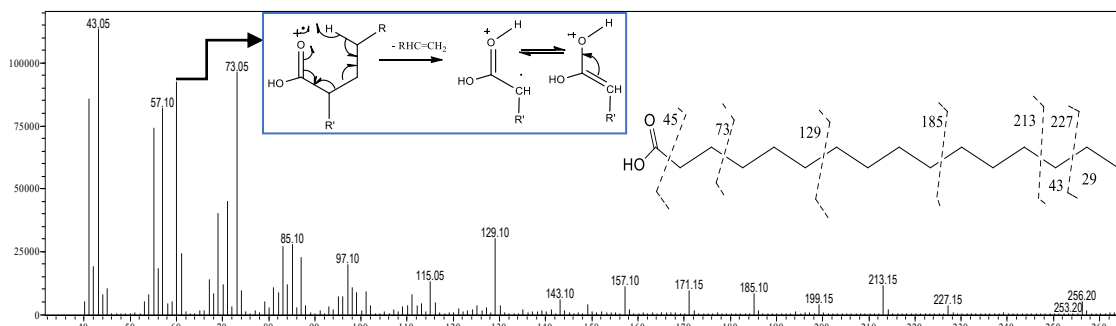
Essa subfração é proveniente do fracionamento de C1H3. A análise do cromatograma de CG (Figura 38) revelou vários picos, sendo dois mais intensos. Foram identificados os picos 1 ( $t_r$ : 11,8 min.) como sendo referente ao ácido hexadecanóico e o pico 2 ( $t_r$ : 13 min) como um éster do ácido ftálico (GIESE, 2005), um contaminante. Os picos 3, 4, 5, e 6 não foram identificados.

Figura 39 - Cromatograma de CG-EM (70eV) da subfração C1H3-F11.



O pico 1 ( $T_r$ : 11,8 min.) foi identificado por seu padrão de fragmentação como pertencente ao ácido hexadecanóico ou ácido palmítico, com base na biblioteca do equipamento e descrição na literatura (DOSHI et al., 2015). Sendo um ácido graxo de cadeia longa, o ácido hexadecanóico apresenta em seu espectro de massa padrões de fragmentações típicos desse grupo de substâncias, assemelhando-se a ‘aglomerados’ com eliminação de 14 unidades de diferença (SILVERSTEIN, WEBSTER, KIEMLE, 2006). Além do pico  $m/z$  60 proveniente de um rearranjo de MacLafferty, o espectro apresenta uma série de picos resultantes de quebras sucessivas das ligações C-C com retenção de carga pelo fragmento que possui oxigênio ( $m/z$  73, 87, ..., 115, 129, 143, 157, 171, 185, 199, 213, 227), outra série com a retenção das cargas na parte alquila ( $m/z$  43, 57, 71, 85, ...) e outros picos como mostra o espectro na Figura 40.

Figura 40 – Espectro de massa CG-EM-IE e proposta de fragmentação para o ácido palmítico.



Fonte: O Autor.

## 6.7 IDENTIFICAÇÃO DE COMPONENTES POR CLAE-EM-IES MODO NEGATIVO E MODO POSITIVO NO EXTRATO EE E PARTIÇÕES PDM, PAE, PBU E RMA

Para a identificação dos compostos fenólicos foram utilizados, conjuntamente aos dados de CLAE-EM-IES modos negativo e positivo, os dados da fitoquímica inicial e dos cálculos dos teores de compostos fenólicos, taninos – proantocianidinas e flavonoides, as análises de UV, o histórico de substâncias já identificadas no gênero da planta e dados comparativos da literatura para esses grupos de substâncias. As estruturas moleculares foram propostas a partir dos cálculos das massas exatas dos íons majoritários. Para isso, foram consideradas aquelas cujas diferenças calculadas de massas (exata e teórica) não ultrapassassem 5 ppm (KIND, FIEHN, 2007). As substâncias identificadas tiveram suas estruturas justificadas por meio de propostas de fragmentações baseadas nos íons-produtos obtidos nos experimentos de segunda ordem ( $EM^2$ ) e comparados com dados da literatura.

Desta forma, as partições PDM, PAE, PBU e RMA e o extrato (EE) foram submetidas à análise por CLAE- $EM^2$ -IES, modo positivo e negativo, para a verificação de sua composição, na qual foram observados e identificados íons  $m/z$  consistentes com compostos fenólicos. As proantocianidinas A1, A2, B1, B2, B3, C, a epicatequina e o ácido protocatecólico identificados foram encontrados em todas as partições.

As informações desses compostos identificados são apresentadas na Tabela 21. As informações referentes às proantocianidinas (PAs), cujos íons isotópicos são duplamente carregados, estão relacionadas na Tabela 22, onde também são apresentadas as informações sobre proantocianidinas do tipo  $[2M-H]^-$ . No Apêndice A está mostrada uma tabela contendo os íons não identificados nas partições e extrato, e os seus respectivos espectros de massa de segunda ordem ( $EM^2$ ), estão relacionados nos anexos.



Tabela 21 – Compostos identificados por CLAE-IE-EM no extrato e partições da casca interna da *K. coriacea*.

T <sub>r</sub> (min)	Massa exata calculada	[M – H] <sup>-</sup>	[M – H] <sup>+</sup>	Erro (ppm)	EM <sup>2</sup>	Fórmula molecular/ (MM)	Extrato/partição	Identificação	Referência
4,00	575,1232	575,1219		2,3	451, 425, 407, 289, 151, 125	C <sub>30</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub> <sup>-</sup> (576)	PAE	[M-3H] <sup>-</sup> Dímero de PA-B	LIN et al., 2014; SHUYI et al., 2012.
5,03	153,0193	153,0195		-1,3	109	C <sub>7</sub> H <sub>6</sub> O <sub>4</sub> (154)	EE, PDM, PAE, PBU	Ácido protocatecóico	Abu-Reidah et al., 2015; Sans et al., 2010; Ivanova et al., 2011.
5,62	865,1985	865,1993		-0,92	713, 577, 451, 287, 125	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub> (866)	EE, PDM, PAE, PBU	Proantocianidina C (E)Cat-(E)Cat-(E)Cat	Rodrigues et al., 2007; Callemien, collin, 2008; Lin et al., 2014.
5,71	879,1802	879,1815		-1,5	721, 709, 591, 439, 301, 259	C <sub>45</sub> H <sub>36</sub> O <sub>11</sub> (890)	PAE	PA-A (E)Gal-(E)Cat-(E)Cat	Salminen et al., 2005. Estatbeyoglu, Winterhalter, 2010; Hamed et al., 2014; Rockenbach et al., 2012.
6,72	867,2131		867,2143	-1,4	715, 579, 409, 289, 249, 127	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub> (866)	EE, PDM, PAE, PBU	(E)Cat-(E)Cat-(E)Cat PA- C	Fraser, Collette, Hancock, 2016; Souza, 2008.
5,89	577,1351	577,1371		-3,4	451, 425, 407, 289, 151, 125	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub> (866)	EE, PDM, PAE, PBU	PA-B (E)Cat-(E)Cat	Ge et al., 2017; Rodrigues et al., 2007; Sun et al., 2007; Stefova et al., 2017.
5,97	579,1548		579,1529	3,3	427, 409, 291, 127	C <sub>30</sub> H <sub>26</sub> O <sub>12</sub> (866)	EE, PDM, PAE, PBU	PA-B (E)Cat-(E)Cat	Fraser, Collette, Hancock, 2016; Souza, 2008.
6,32	451,1256	451,1275		4,2	365, 331, 289	C <sub>21</sub> H <sub>24</sub> O <sub>11</sub> (452)	PBU	(E)Cat-3- <i>O</i> -glucosídeo	Patras et al., 2014; Salminen et al., 2005.
7,60	865,1985	865,1998		-1,5	713, 577, 451, 287, 125	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub> (866)	EE, PDM, PAE, PBU	PA-C: trímero (E)Cat-(E)Cat-(E)Cat	Rodrigues et al., 2007; Callemien, Collin, 2008; Lin et al., 2014.
7,12	867,2131		867,2158	-3,1	715, 579, 409, 289, 249, 127	C <sub>45</sub> H <sub>38</sub> O <sub>18</sub> (866)	EE, PDM, PAE, PBU	PA-C: trímero (E)Cat-(E)Cat-(E)Cat	Salminen et al., 2005. Fraser, Collette, Hancock, 2016; Souza, 2008.
7,12	1157,2966		1157,2952	-1,2	579	C <sub>60</sub> H <sub>52</sub> O <sub>24</sub> (1156)	PAE	[2M+H] <sup>+</sup> (E)Cat-(E)Cat	Fraser, Collette, Hancock, 2016; Souza, 2008.

Tabela 21 – Continuação

7,20	1155,2765	1155,2756		0,8	577	$C_{60}H_{52}O_{24}$ (1156)	PAE	[2M-H] <sup>-</sup> (E)Cat-(E)Cat	Karonen et al., 2004; Salminen et al., 2005.
7,53	289,0727	289,0730		-1,0	271, 245, 205, 179, 151, 125	$C_{15}H_{14}O_6$ (290)	EE, PDM, PAE, PBU, RMA	Epicatequina (E)Cat	Bravo et al., 2006; Hamed et al., 2014; Schimidt et al., 2016; Callemien, Collin, 2008.
7,58	291,0875		291,0880	-1,7	273, 207, 165, 139, 123	$C_{15}H_{14}O_6$ (290)	EE, PDM, PAE, PBU, RMA	Epicatequina (E)Cat	Cren-Olivé et al., 2000; Fraser, Collette, Hancock, 2016.
8,12	289,0727	289,0731		-1,4	271, 245; 205; 179, 151; 125	$C_{15}H_{14}O_6$ (290)	EE, PDM, PAE, PBU, RMA	Epicatequina (E)Cat	Bravo et al., 2006; Hamed et al., 2014; Schimidt et al., 2016; Callemien, Collin, 2008.
8,25	291,0875		291,0884	3,1	273, 207, 165, 139, 123	$C_{15}H_{14}O_6$ (290)	EE, PDM, PAE, PBU, RMA	Epicatequina (E)Cat	Cren-Olivé et al., 2000; Fraser, Collette, Hancock, 2016.
8,01	579,1548	579,1558		-1,7	289	$C_{30}H_{28}O_{12}$ (580)	PAE	[2M+H] <sup>+</sup> (E)-Cat	Karonen et al., 2004;
8,01	581,1675		581, 1688	-2,2	291		PAE	[2M-H] <sup>-</sup> (E)-Cat	Salminen et al., 2005.
8,95	575,1195	575,1219		2,3	449, 407, 341, 289, 271, 125	$C_{30}H_{24}O_{12}$ (576)	PAE	PA-A: dímero	LIN et al., 2014; SHUYI et al., 2012.
9,07	577,1351	577,1370		-3,3	451, 425, 407, 289, 151, 125	$C_{30}H_{26}O_{12}$ (866)	EE, PDM, PAE, PBU, RMA	PA-B: trímero	Ge et al., 2017;
9,07	579,1499		579,1522	-3,9	427, 409, 291, 127		EE, PDM, PAE, PBU, RMA	PA-B: trímero	Rodrigues et al., 2007; Sun et al., 2007; Stefova et al., 2017.
9,90	561,1402	561,1400		0,4	516, 425, 289, 271, 112	$C_{30}H_{26}O_{11}$ (562)	EE, PAE, RMA	(E)Afz--(E)Cat Epiáfzelequina- epicatequina	Gu et al., 2003; Ge et al., 2016; Souza, 2008.
11,52		575,1219			449, 407, 341, 289, 271, 125	$C_{30}H_{24}O_{12}$ (576)	PAE	PA-A: dímero	Souza, 2008.

Fonte: O Autor.

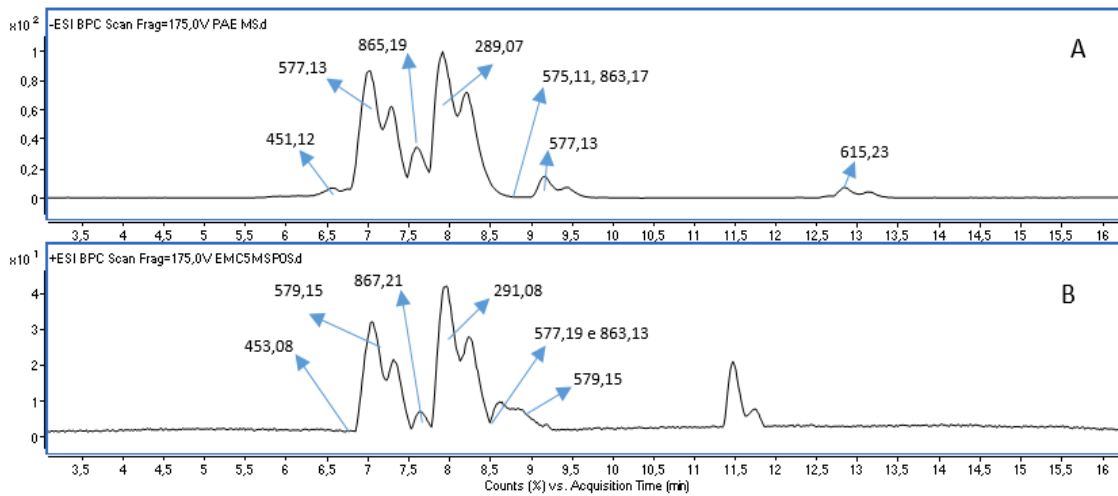
Tabela 22 – Íons  $[M-2H]^{2-}$  de PAs encontrados no extrato/partições por CLAE-EM-IES.

$T_r$ (min.)	Massa exata calculada	$[M-H]^-$	$[M-H]^+$	Erro (ppm)	EM <sup>2</sup>	Extrato/ Partição	Identificação	Referência
4,00	575,1232	575,1219		2,3	451, 407, 289, 229, 151, 125	PAE	$[M-3H]^-$ Dímero PA- B	LIN et al., 2014; SHUYI et al., 2012.
5,64	576,1308	576,1300		1,4	425, 289, 125	EE, PDM, PAE, PBU	$[M-2H]^{2-}$	Lin et al., 2014; Karonen et al., 2004. Hammerstone et al., 1999.
6,18	720,1599	720,1590		1,3	677, 449, 289, 125	EE, PDM, PAE, PBU	$[M-2H]^{2-}$	Karonen et al., 2004. Lin et a., 2014.
8,34	864,1887	864,1898		1,3	720, 577, 407, 289	PBU	$[M-2H]^{2-}$	Lin et al., 2014; Karonen et al., 2004. Hammerstone et al., 1999.

Fonte: O Autor.

O perfil geral dos espectros de EM<sup>2</sup>-IES mostrou que, tanto no modo positivo quanto no modo negativo, as partições PDM, PAE, PBU, RMA e o EE apresentaram o mesmo padrão. Predominantemente em todas as amostras, foram detectados no modo negativo  $[M-H]^-$  os íons-fragmentos  $m/z$  577,13; 865,19 e 289,07. Também apareceram no modo positivo  $[M+H]^+$  os íons-fragmentos  $m/z$  579,15; 867,21 e 291,08. Na partição PAE os sinais foram mais intensos (Figura 41). É nessa fração que se concentra a maior variedade de proantocianidinas detectadas e identificadas. Vários outros picos com fragmentações típicas foram detectados, porém não foram elucidados.

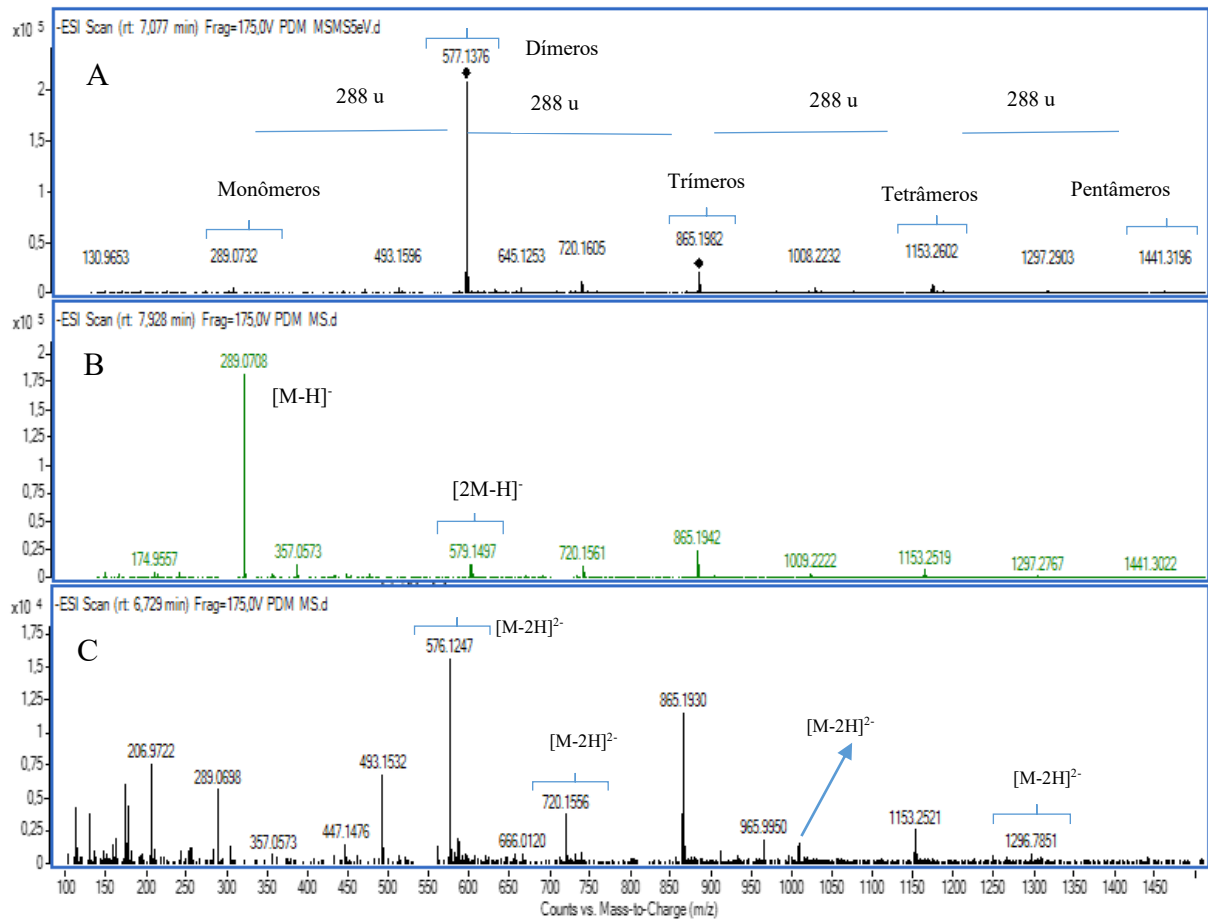
Figura 41 – Cromatograma de CLAE-EM<sup>2</sup>-IES da fração PAE com os picos dos íons  $m/z$  em maior concentração. A- Modo negativo; B- Modo positivo.



Os espectros gerados para o extrato e as partições, mostrados na Figura 41-A e B, apresentaram, na faixa compreendida entre 6,5 e 13,5 min, picos intensos compatíveis e característicos de taninos oligoméricos e poliméricos, como as proantocianidinas (PAs) do tipo B, nas formas dímeras, trímeras, tetrâmeras, pentâmeras e hexâmeras. Também foi identificada a presença do seu monômero na forma livre, o flavonoide epi-catequina. Outros íons  $m/z$  com picos menos intensos indicam a presença de outros tipos de PAs, de compostos glicosilados e de fenólicos mais simples, além de outros picos que não foram identificados.

O padrão de fragmentação na análise de (-)-EM-IES das partições PDM e PAE é apresentado na Figura 42.

Figura 42 – Espectro de fragmentação (-)-EM<sup>2</sup>-ES de moléculas desprotonadas e de íons-fragmentos de proantocianidinas do tipo B.



Fonte: O Autor.

O padrão na análise de (-)-EM<sup>2</sup>-IES da partição PDM é apresentado na Figura 42-A, seja qual for o íon em maior proporção ([M-H]<sup>-</sup> de  $m/z$  289, 577 ou 865). O perfil apresenta 288 unidades de diferença entre os polímeros detectados. Também foram detectados íons-fragmentos intermediários do tipo [M-2H]<sup>2-</sup> e [M-3H]<sup>3-</sup> (Figura 42-C) com aproximadamente 144 unidades de diferença ( $m/z$  720→576), ( $m/z$  1008→864) e ( $m/z$  1297→1153). Os íons  $m/z$  576 e  $m/z$  864 aparecem também nas partições PAE e PBU. Os íons  $m/z$  579 e  $m/z$  1153 da partição PDM (Figura 42-B) também aparecem na partição PAE e são espécies do tipo [2M-H]<sup>-</sup>. Esse padrão é característico das procianidinas polímeros e oligômeros formados a partir dos monômeros de catequina ou epicatequina. As procianidinas são uma classe de proantocianidinas (LIN et al., 2014; QIANG et al., 2015; SALMINEN et al., 2009).

Também foram identificados compostos com outros dois flavonoides, a epi-afzelequina e a epi-galocatequina, embora tenham sido detectados e identificados íons livres apenas da epi-galocatequina na forma glicosilada.

A diferença de 288 unidades ( $m/z$  577→289) ocorre porque na formação da ligação interflavanoídica do tanino há a perda de um átomo de H. A formação dos íons-fragmentos intermediários ocorre porque à medida que aumenta o grau de polimerização as PAs de massas mais elevadas estão propensas a formar cargas múltiplas. O estado de carga das espécies multiplicadas pode ser definido pela diferença  $m/z$  entre seus picos isotópicos de  $^{13}\text{C}$  e  $^{12}\text{C}$ . À medida que a carga aumenta de 1 para 2 e para 3 a distância isotópica diminui de 1 para 0,5 e para 0,33 a unidade de massa atômica (SARNOSKI et al., 2012). A Tabela 23 mostra essas relações. Assim esses íons-fragmentos estão associados a  $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$  de um ômero de massa maior. O íon de  $m/z$  576 está associado aos tetrâmeros de  $m/z$  1153; o íon de  $m/z$  720 está associado aos pentâmeros de  $m/z$  1441, e assim sequencialmente (HAMMERSTONE et al., 1999; KARONEN et al., 2004; LIN et al., 2014). Os sinais dos oligômeros somente aparecem relacionados no espectro de primeira ordem (EM) com pouca intensidade e não apresentam fragmentações no espectro de segunda ordem (EM/EM).

Tabela 23 – Grau de polimerização (GP) e íons fragmento  $[\text{M} - \text{H}]^-$ ,  $[2\text{M}-\text{H}]^-$ ,  $[\text{M}-2\text{H}]^{2-}$ ,  $[\text{M}-3\text{H}]^{3-}$  para PAs identificadas.

GP	$[\text{M} - \text{H}]^-$	$[2\text{M}-\text{H}]^-$	$[\text{M}-2\text{H}]^{2-}/2$	$[\text{M}-3\text{H}]^{3-}/3$
1	289,07	579,12		
2	577,13	1155,27		
3	865,19			
4	1153,25		576,12	
5	1441,31		720,15	
6			864,18	575*
7			1008/9	672*
8			1152	768*
9			1296/7	864*
10			1440	960*

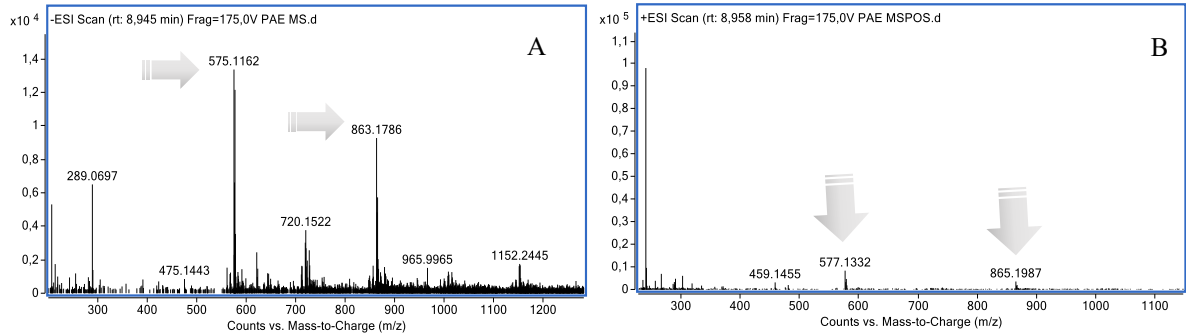
\*Não detectados na análise dos espectros das partições desse trabalho.

Fonte: Hammerstone et al., (1999); LIN et al., (2014); Karonen et al., (2004).

Os íons  $[\text{M}-\text{H}]^-$   $m/z$  575,11 e 863,17 e  $[\text{M}+\text{H}]^+$   $m/z$  577,19 e 865,13, encontrados na partição PAE, são mostrados na Figura 43-A, modo negativo e Figura 43-B, modo positivo. Eles são compatíveis com os íons  $m/z$  dos dímeros e trímeros, respectivamente, de PAs do tipo A. Aparecem como vestígios no espectro de EM-ESI. Mas na fragmentação de segunda

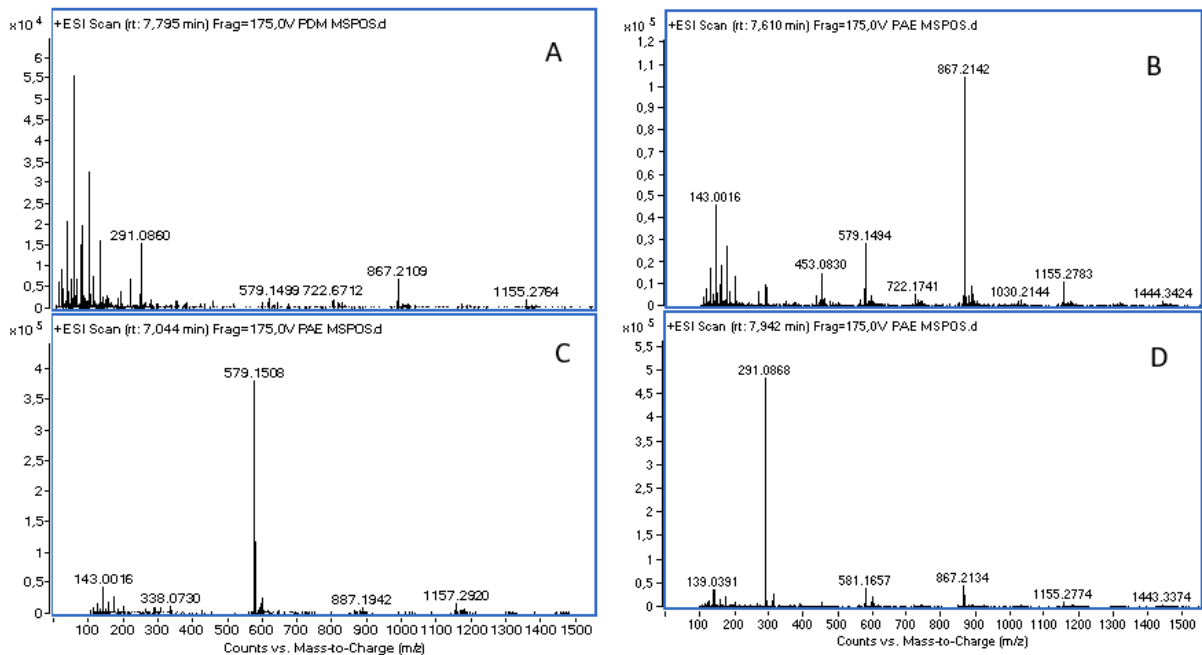
ordem EM/EM somente foram encontrados íons-fragmentos, em pequena quantidade, que correspondem ao íon  $m/z$  575 na partição PAE. Íons referentes ao trímero não foram encontrados em nenhuma das amostras.

Figura 43 – Fragmentação com picos característicos de PAs-A detectados na partição PAE.



A análise dos espectros por (+)-EM-ESI revelou o mesmo padrão para todas as amostras. As diferenças estruturais ocorrem na partição PAE, onde aparecem uma maior concentração de PAs, como verificado na Figura 44-B, C e D. Os íons  $m/z$  291, 722, 579, 867, 1155 são aqueles que aparecem em todas as análises. Os íons  $m/z$  581 e 1157 aparecem somente na análise da partição PAE.

Figura 44 – Espectros de (+)-CLAE-EM-ESI para as PAs presentes nas partições PAE e PDM.



Fonte: O Autor.

As procianidinas do tipo B, uma variedade de proantocianidinas, são comumente chamadas de taninos catéquicos por serem formadas exclusivamente por unidades de catequina ou epicatequina (GU et al., 2003). Quando há a presença de outro tipo de unidade de flavan-3-ol como afzelequina ou galocatequina, as PAs recebem os nomes de propelargonidinas e prodelfinidinas, respectivamente. Esse grupo de metabólitos pode ainda apresentar uma variedade de compostos acilados (geralmente galoil) em C3, formando 3-*O*-galatos, glicosilados e outros substituintes (HELLSTRÖM et al., 2009; RODRIGUES et al., 2007). A Tabela 24 apresenta as estruturas típicas de flavan-3-ol e a Tabela 25 apresenta as estruturas típicas de flavonóis mais comuns com suas diferenças estruturais.

Tabela 24 – Estruturas típicas de flavan-3-ol com suas massas moleculares.

Flavan-3-ol	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>	M (u)
(+)-Afzelequina Afz	H	OH	H	H	OH	274
(-)-Epiafzelequina (E)afz	H	OH	H	H	H	274
(+)-Catequina Cat	H	OH	OH	OH	OH	290
(-)-Epicatequina (E)cat	H	OH	OH	OH	H	290
(+)-Galocatequina Gal	OH	OH	OH	OH	OH	306
(-)-Epigalocatequina (E)Gal	OH	OH	OH	OH	H	306

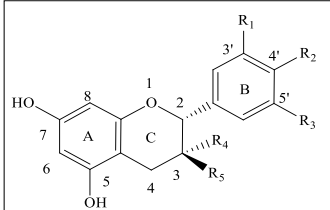
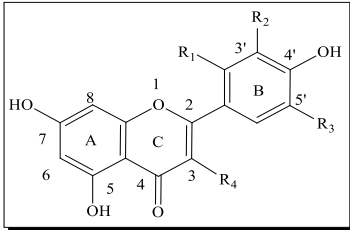


Tabela 25 – Estruturas de flavonol com suas massas moleculares.

Flavonol	R <sub>1</sub>	R <sub>2</sub>	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	M (u)
Quercetina	H	OH	H	OH	302
Miricetina	H	OH	OH	OH	318
Kampferol	OH	H	H	OH	286
Morina	H	H	H	OH	302
Rutina	H	OH	H	ORut	610
Quercitrina	H	OH	H	ORham	448
Hiperosídeo	H	OH	H	OGal	464



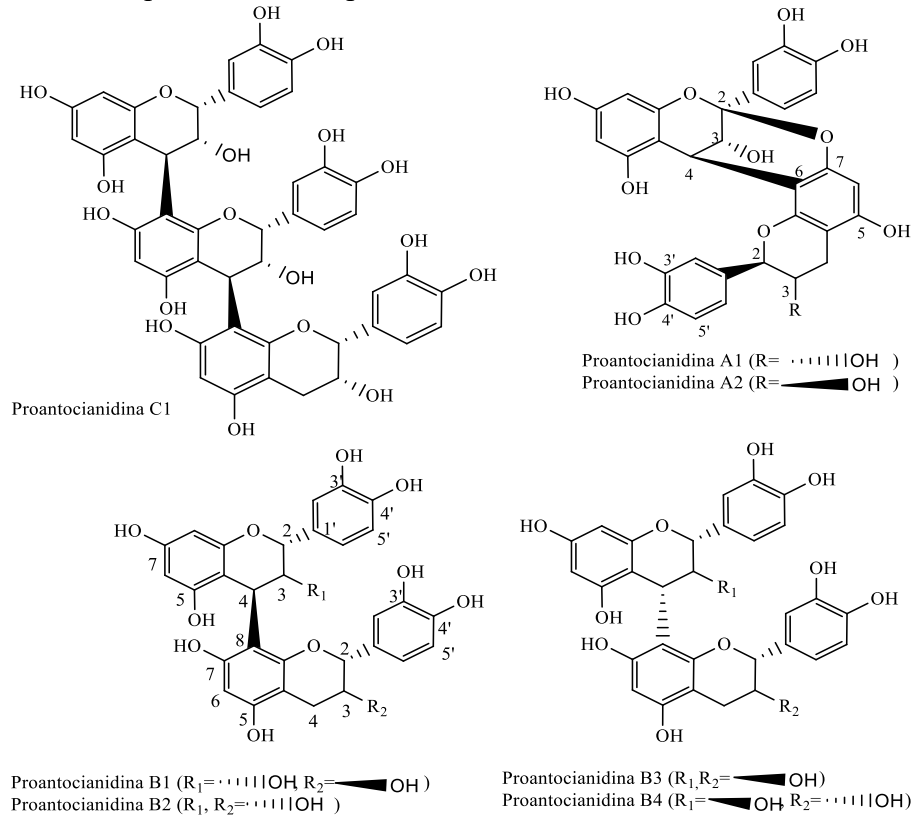
Rut: Rutinose; Rham: Raminose; Gal: galactose

Fonte: Adaptado de GU et al., (2003) e SUN et al., (2007).

As proantocianidinas são caracterizadas pelo seu grau de polimerização, onde os monômeros formam ligações que levam a oligômeros, podendo formar polímeros de até 30000 Da. (LIN et al., 2014; RUE et al., 2017). Quando a ligação interflavanoídica ocorre entre C4-C8 e C4-C6 as PAs são do tipo B e quando ocorre através da ligação entre C2-O-C7 ou C2-O-C5 elas são do tipo A (GU et al., 2003; LIN et al., 2014). Devido a essa ligação éter as PAs do tipo A tem 2 unidades a menos que as do tipo B em seus compostos (SARNOSKI et al., 2012). As proantocianidinas do tipo B são, portanto, epi-catequinas homo-oligoméricas com dois grupos hidroxilas no anel B (RUE et al., 2017; SIMÕES et al., 2004a). Embora haja mais subclasses de PAs-B, as estruturas daquelas mais comuns estão especificados na Figura 45. As proantocianidinas com três unidades, os dímeros, são chamadas de PA-C.



Figura 45- Estruturas químicas de PA poliméricas.

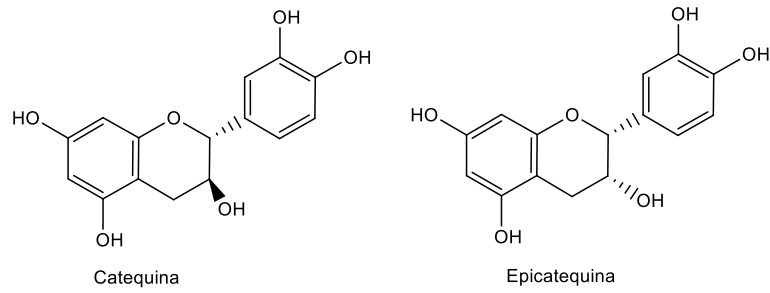


Fonte: Adaptado de XIE e Dixon, (2005); RUE et al., (2017).

Na análise dos picos detectados por (-)-CLAE-EM<sup>2</sup>-IES, os íons  $[M - H]^-$   $m/z$  289 foram observados numa faixa de tempo  $t_r$ : 7,5 a 9,0 min (Figura 23). Os principais íons-fragmentos apresentados foram:  $m/z$  271, 245 (100%), 205, 179, 125.

No modo positivo  $[M + H]^+$  para  $m/z$  291 os principais íons-fragmentos foram: 273, 249, 207, 165, 139 (100%), íons  $[M - H]^-$ , e para  $m/z$  123, para uma faixa de  $t_r$  7,5 a 8,5 min. Esses íons são referentes a molécula desprotonada de (+)-catequina ou (-)-catequina/epicatequina (figura 48A e B) que por serem flavonoides diastereoisômeros apresentam o mesmo padrão de fragmentação. Os padrões observados, tanto em modo negativo quanto positivo, são compatíveis com dados dessas substâncias relatados na literatura (BRAVO et al., 2006; CALLEMIEN e COLLIN, 2008; CREN-OLIVÉ et al., 2000; SCHIMIDT, 2016). A faixa de tempo e a variedade de picos pode indicar a presença dos dois tipos de isômeros. Como observado, as fragmentações nos dois modos apresentam algumas diferenças.

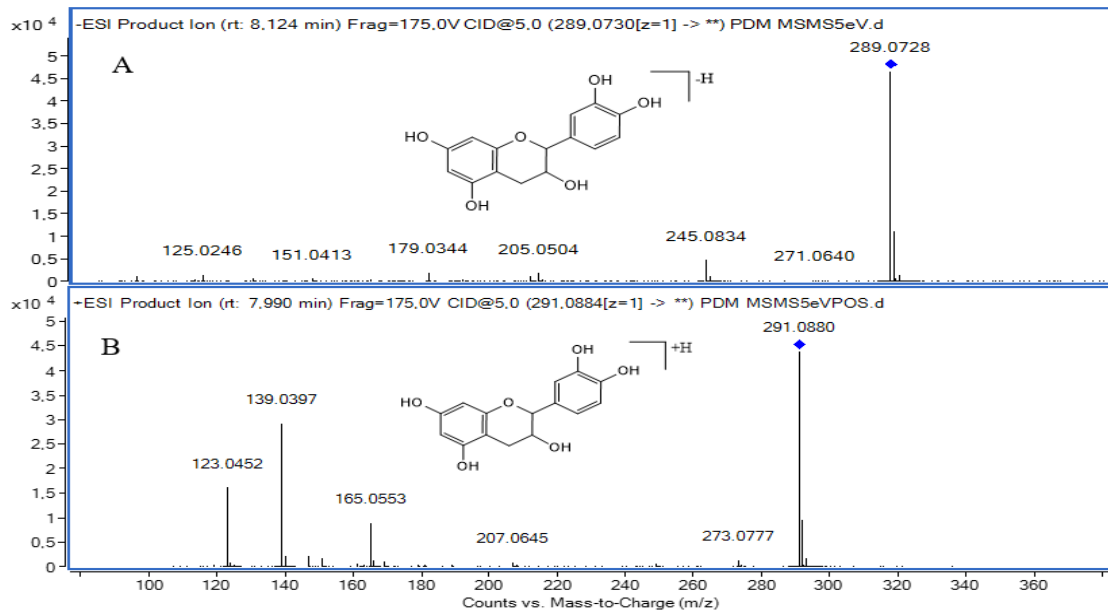
Figura 46 – Estruturas dos monômeros de catequina e epicatequina.



Fonte: o autor.

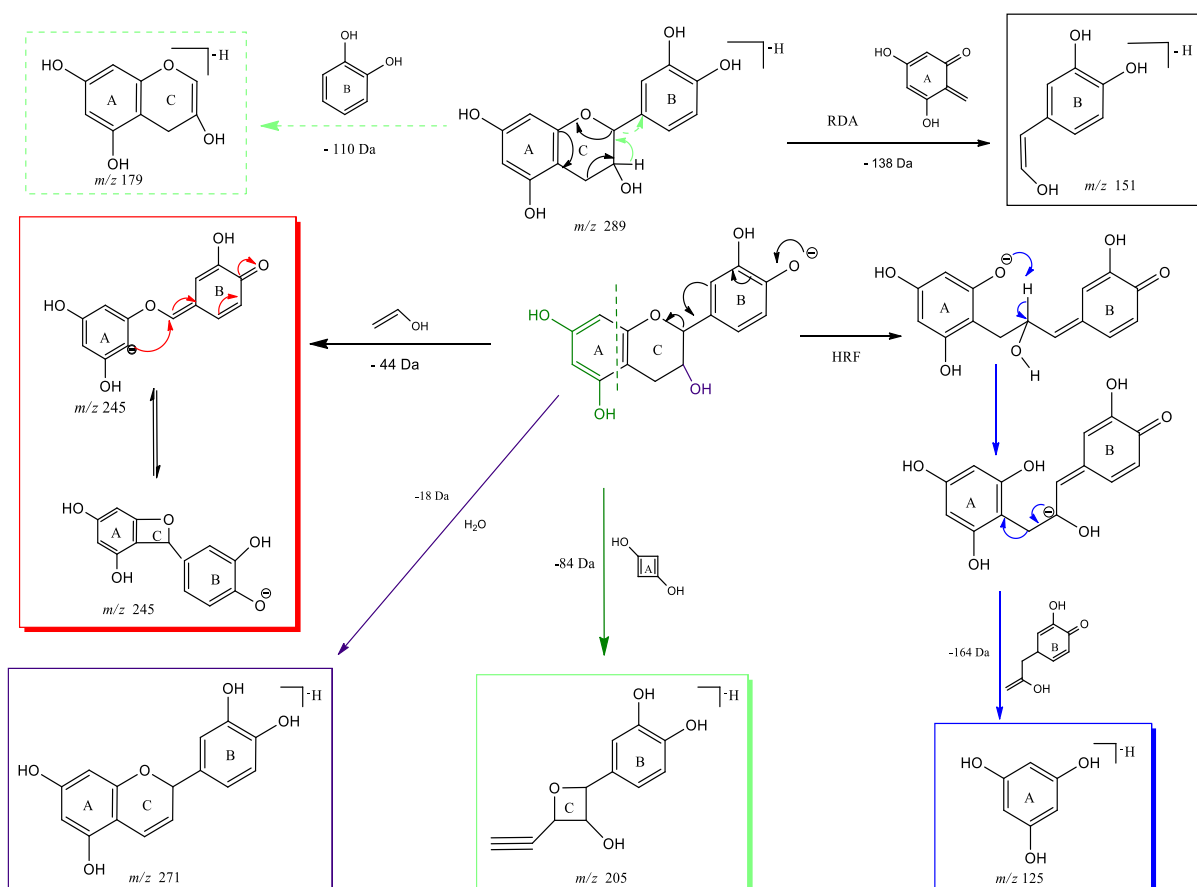
Devido aos vários estereoisômeros da catequina e da epicatequina suas identificações e a identificação de seus polímeros somente por espectrometria de massas tornam-se difíceis (HELLSTRÖM et al., 2007; RUE et al., 2017; SUN et al., 2007). Em vários trabalhos (PEREZ-MAGARIÑO et al., 1999; ESATBEYUGLU, WINTERHALTER, 2010) onde se utilizou várias técnicas de separação e identificação com os padrões das duas substâncias puras, a catequina apresentou sempre tempos de retenção menores com intervalos consideráveis entre ambas (PRASAIN et al., 2009; SARNOSKY et al., 2014). Como nenhuma diferenciação entre estereoisômeros foi realizada, bem como nenhuma informação sobre a posição e a estereoquímica da ligação interflavonoídica, o termo epi-catequina será usado neste trabalho. A Figura 47 apresenta o espectro de fragmentação por CLAE-EM-IES (-) e (+) da epicatequina (M: 290 u).

Figura 47 – Espectro de fragmentação por EM-IES da epi-catequina (M: 290 u).



A Figura 48 apresenta propostas de fragmentações onde rearranjos com as perdas de pequenas moléculas favorecem a formação dos íons detectados. O íon  $m/z$  245, em maior proporção, é devido a perda de 44 unidades  $[M-44-H]^-$ , referente ao grupo  $CH_2=CHOH$  ou  $CO_2$ . O íon  $m/z$  271 é formado pela perda de 18 unidades  $[M-18-H]^-$ , referente a uma molécula neutra de água e representa uma perda característica desse tipo de flavonoide agliconado. O íon  $m/z$  205  $[M-84-H]^-$  deve-se a perda de 84 unidades referente a perda de  $(C_4H_4O_2)$  do anel A numa clivagem por reação RDA, retro Diels-Alder. O íon  $m/z$  125  $[M-164-H]^-$  ocorre devido à perda de 164 unidades após a fissão heterocíclica (HRF) do anel C o que é comprovado pela presença do íon  $m/z$  165  $[M-124-H]^-$ . O íon  $m/z$  151 é atribuído a uma clivagem do anel C por reação retro Diels-Alder (RDA) (CALLEMIEN e COLLIN, 2008; HAMED et al.,2014).

Figura 48 – Proposta de fragmentação do íon  $m/z$  289.

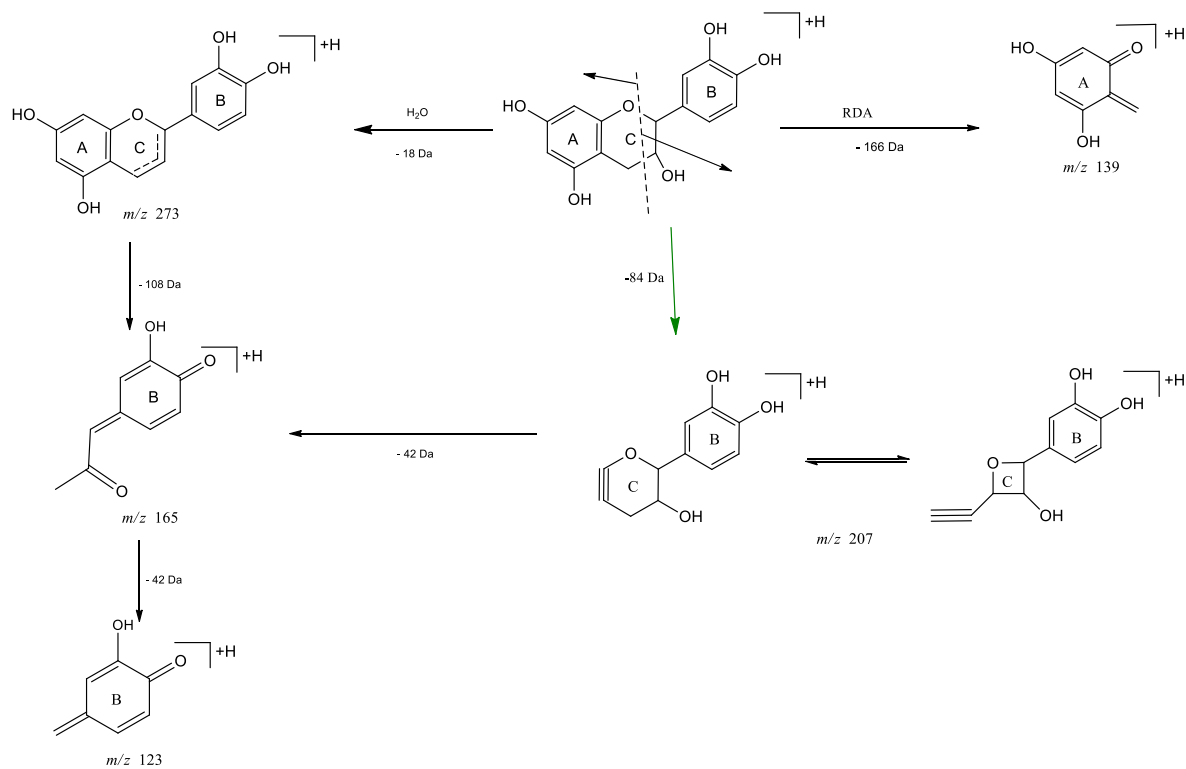


HRF = clivagem heterocíclica do anel C. RDA = fissão Retro-Diels-Alder.

Fonte: o autor.

A análise do espectro  $[M + H]^+$   $m/z$  291 da epi-catequina (Figura 49) apresentou o íon  $m/z$  139 proveniente da perda de 166 unidades por uma clivagem do anel C por fissão RDA. O fragmento  $m/z$  273 é proveniente da perda de 18 unidades, uma molécula de água. O fragmento  $m/z$  207 é formado por uma fissão no anel A havendo perda de 184 unidades, uma molécula de  $C_4H_4O_2$ . O íon  $m/z$  165 é formado por uma HRF do anel C e perda do anel A a partir do íon  $m/z$  273 (perda de 108 unidades) ou do íon  $m/z$  207 (perda de 42 unidades). O íon  $m/z$  123, uma quinona metídeo, pode ser formado a partir do fragmento  $m/z$  165 com perda de 28 unidades, uma molécula de  $C_2H_4$  (CREN-OLIVÉ et al., 2000).

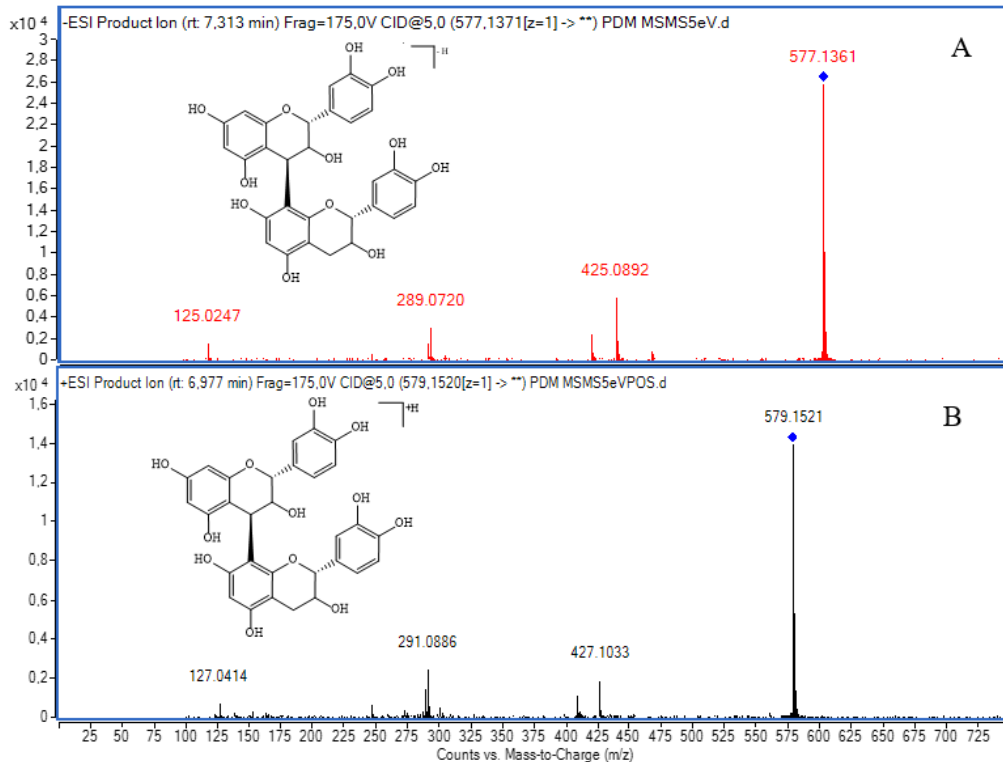
Figura 49 - Proposta de fragmentação para os principais íons-fragmentos  $[M + H]^+$   $m/z$  291.



Fonte: O autor.

Os íons  $[M-H]^-$   $m/z$  577,13 são referentes às moléculas desprotonadas dos dímeros isoméricos de PAs do tipo B cuja massa é 578 e também chamadas de proantocianidinas C. Foram detectados no intervalo de  $t_r$ : 5,8 a 9 minutos (Figura 52). Os principais íons-fragmentos detectados foram: 425, 407, 289, 125. As principais rotas de fragmentação desses compostos são a fissão quinona-metídeo (QM), a fissão com reação retro Diels-Alder (RDA), a fissão heterocíclica do anel (HRF). No modo positivo  $[M+H]^+$  apresentou o mesmo padrão de fragmentação com o íon  $m/z$  579,15.

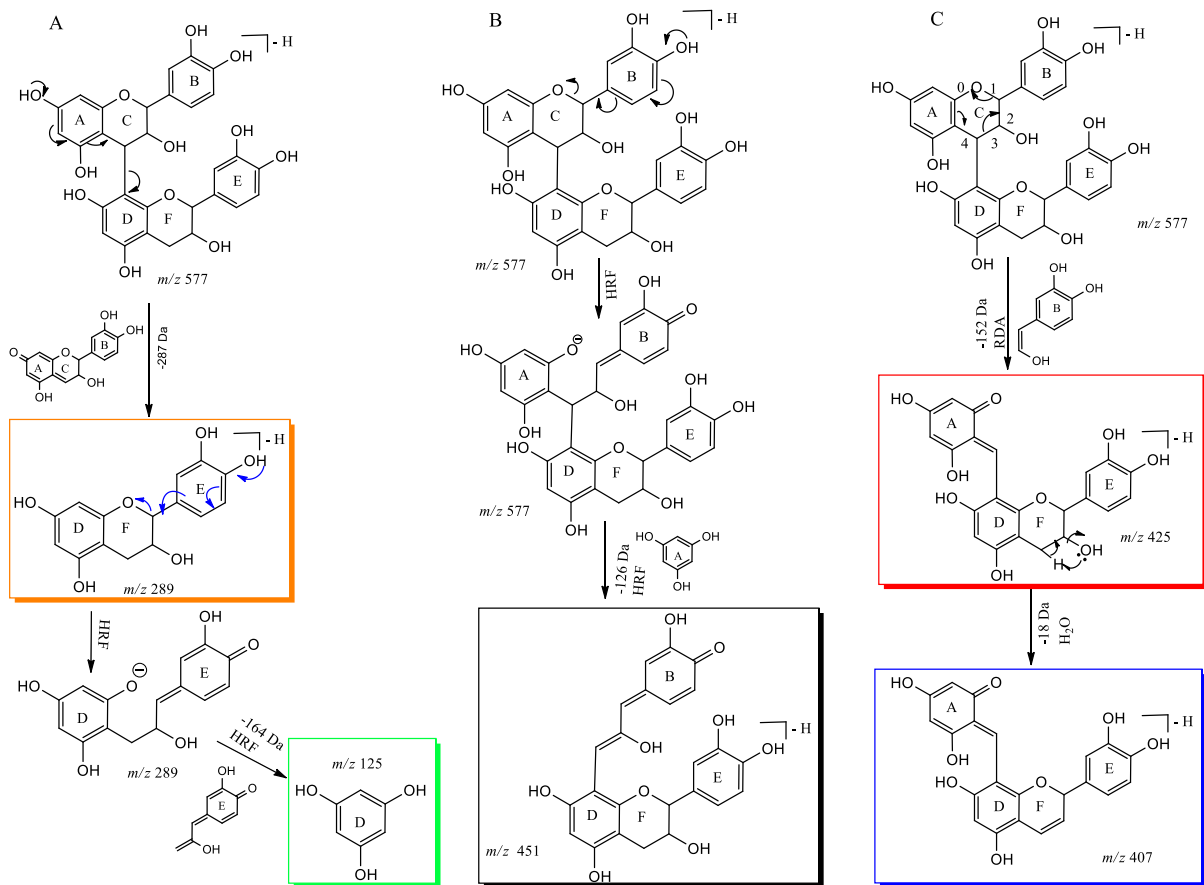
Figura 50. Espectro de massas do íon precursor  $m/z$  577, obtido por (-)-EM<sup>2</sup>-IES.



Fonte: O Autor.

Na proposta de fragmentação do íon  $m/z$  577 temos que a formação do íon de  $m/z$  425 deve-se a perda de  $[M-H-152]^-$  como molécula neutra através de um rearranjo do anel C por uma fissão Retro Diels-Alder (Figura 51). A RDA pode ocorrer nas duas unidades oligoméricas, porém ocorre preferencialmente na unidade superior. A eliminação do anel B dá origem a um íon-produto com sistema conjugado  $\pi$ - $\pi$  mais estável. Na sequência à RDA a eliminação de 18 unidades (uma molécula de água) leva a formação do íon  $m/z$  407  $[M-H-152-18]^-$ . Essa eliminação da hidroxila do C-3 forma um íon com uma ligação cuja conjugação é mais prolongada e estável (CALLEMIEN e COLIN, 2008; RODRIGUES et al., 2007). O íon de  $m/z$  451 é formado após a clivagem entre C4-C5 e O-C do anel C por HRF com eliminação da molécula neutra de 1,3,5-tri-hidroxibenzeno  $[M-H-126]^-$ . Da mesma forma que a RDA ocorre na unidade superior porque forma sistemas conjugados mais estáveis. A formação do íon de  $m/z$  289,  $[M-H-287]^-$ , ocorre por QM onde a clivagem da ligação C-C interflavanoídica leva a perda de uma unidade do oligômero. A formação do íon de  $m/z$  125 ocorre a partir do íon  $m/z$  289 através de uma HRF  $[M-H-164]^-$  levando a perda de 164 unidades (GE et al., 2017; MAGRINI, 2016). No modo positivo  $[M+H]^+$  apresentou o mesmo padrão de fragmentação, com duas unidades maior.

Figura 51 – Proposta de fragmentação do dímero de ion  $m/z$  577, modo negativo.

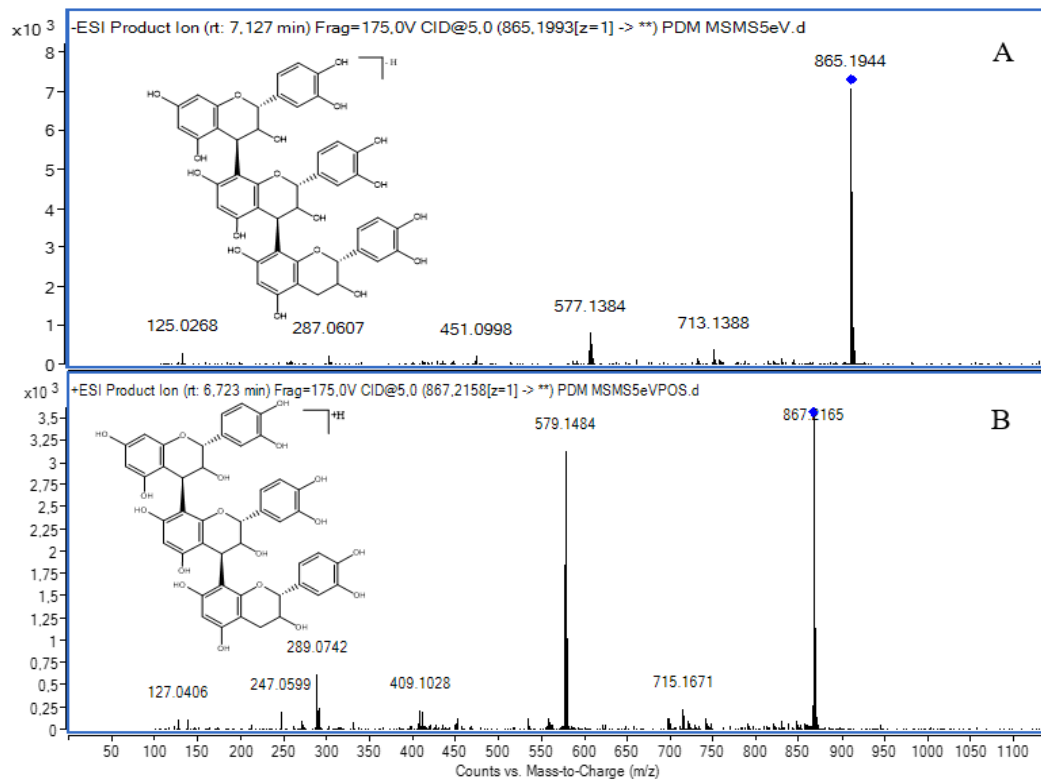


A- Mecanismo Quinona metídeo (QM) e perda de água por HRF; B- Mecanismo de clivagem heterocíclica do anel C (HRF); C- mecanismo Retro - Diels - Alder (RDA).

Fonte: Adaptado de Ge et al., (2016); Magrini, (2016); Rodrigues et al., (2007).

Os  ns de  $m/z$  865,19  $[M-H]^-$  são característicos de trímeros de proantocianidinas do tipo B com massa 866 (Figura 52), e aparecem ( $t_r$ : 4,5 a 8 min.) em todas as amostras. Na proposta de fragmenta o do ion  $m/z$  865 temos que os principais  ns produtos de suas fragmenta es são: 713, 695, 577 (pico base) 425, 407, 289, 287, 125 (Figura 52). O padrão dessa fragmenta o   o mesmo apresentado pelos dímeros. O pico base  $m/z$  577   produzido por uma fissão QM no anel A. essa fissão ocorre com elimina o de 288 unidades  $[M-288-H]^-$  liberando o dímero com as unidades D-F, G-I. Os  ns de  $m/z$  289 e  $m/z$  287 são formados num processo idêntico de fissão QM no anel D do dímero onde uma molécula de epicatequina desprotonada   eliminada (CALLEMIEN e COLIN, 2008).

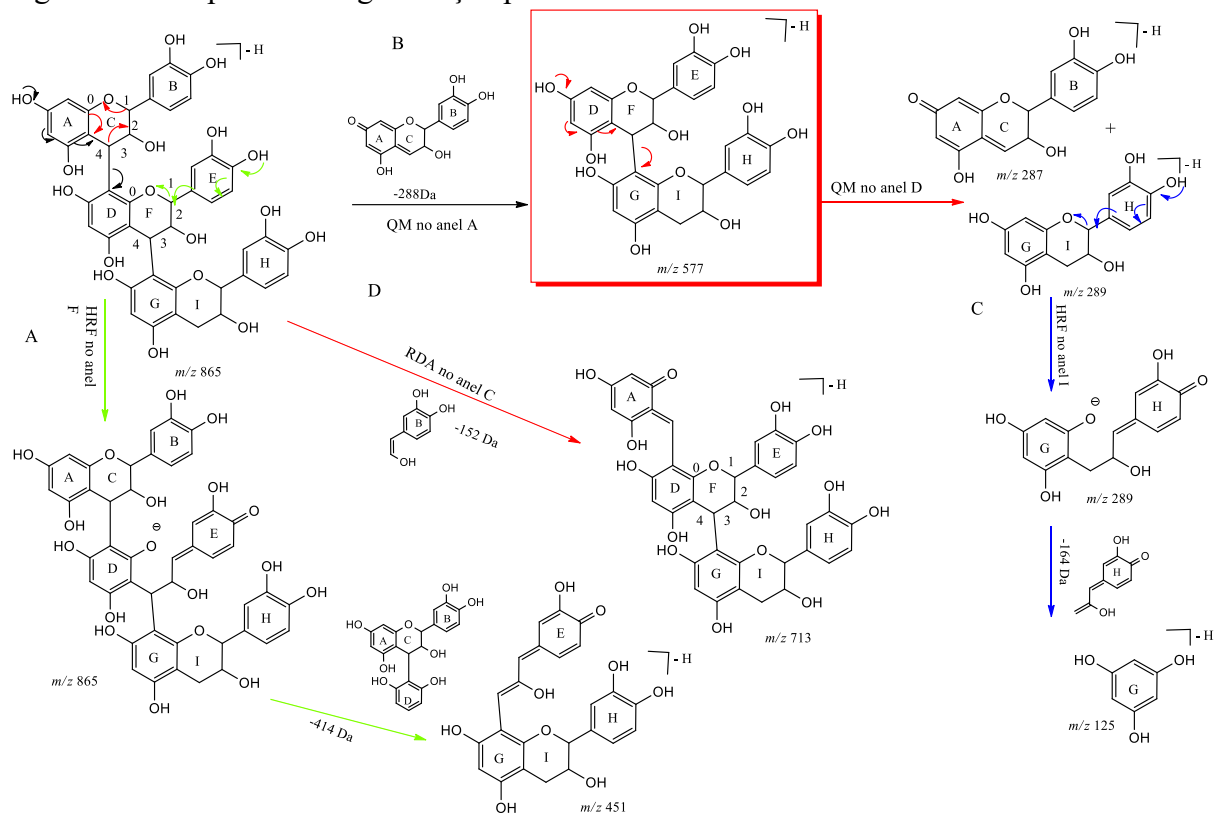
Figura 52 - Espectro de massas do íon precursor de  $m/z$  865, obtido por (-)-EM<sup>2</sup>-IES.



O dímero ( $m/z$  577) produzido também pode gerar os íons de  $m/z$  425 [M-288-152-H]<sup>-</sup>, mas o mecanismo de fragmentação ocorre por RDA (Figura 53). Após esse processo, a eliminação de água gera os íons de  $m/z$  407 [M-288-152-18-H]<sup>-</sup> como descrito na Figura 51 p. 92. O íon de  $m/z$  713 pode ser formado por uma fissão RDA no anel C, no anel F ou no anel I com eliminação dos fragmentos <sup>1,3</sup>B, <sup>1,3</sup>E ou <sup>1,3</sup>H. As fissões nas unidades C ou F são favorecidas porque geram sistemas com íons-produtos mais estáveis eletronicamente. Sequencialmente o íon  $m/z$  695 pode ser formado pela eliminação de uma molécula de água [M-152-18-H]<sup>-</sup> a partir do grupo 3-OH dos anéis C, F ou I que restaram intactos na reação. A ligação dupla será do tipo <sup>2,3</sup>Δ porque favorece um sistema mais estável de conjugação mais prolongada (RODRIGUES, 2007).

O íon de  $m/z$  451 [M- 414-H]<sup>-</sup> foi gerado após uma clivagem HRF no anel F com eliminação de um resíduo de 414 unidades. O íon  $m/z$  125 [M-288-164-H]<sup>-</sup> pode ser formado a partir de rearranjos por HRF promovendo a quebra do anel C, E ou I e após eliminação de 164 unidades (MAGRINI, 2016).

Figura 53 – Proposta de fragmentação para os trimeros de íon  $m/z$  865.



A- HRF: Rota com mecanismo de clivagem heterocíclica do anel E. B- QM: Rota com mecanismo Quinona metídeo no anel A anel D. C- mecanismo HRF no anel I. D- RDA: Rota com mecanismo Retro - Diels - Alder no anel C.

Fonte: Adaptado de Callemien e Collin, (2008); Magrini, (2016); Rodrigues, (2007).

Pelo padrão de formação desses íons, é possível afirmar que eles são provenientes de moléculas desprotonadas e não *clusters* da epicatequina. Esses aglomerados, que se formam durante o processo, têm em geral compostos agregados por interações intermoleculares. Os *clusters*, também chamados de adutos, podem ser formados com várias substâncias presentes no sistema. As mais comuns no modo negativo são água, ácido acético ou ácido fórmico e no modo positivo, sódio, potássio ou amônio. Em geral, são solventes ou aditivos utilizados nas análises (CARNEVALE NETO, 2014; SOUSA, 2015).

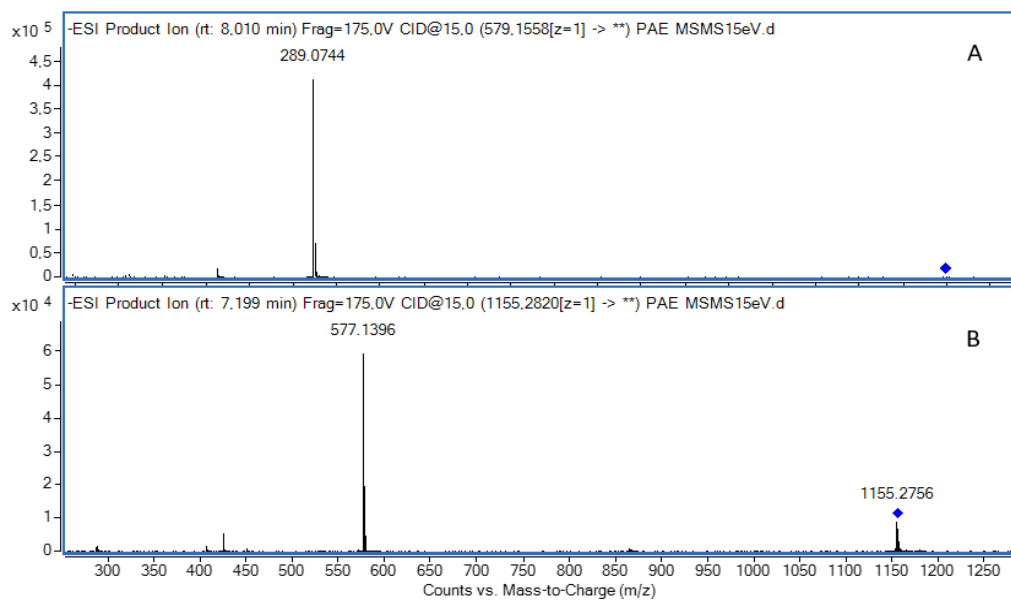
Dois íons do tipo  $[2M-H]^-$  foram encontrados na partição PAE, são eles o íon  $m/z$  579  $\rightarrow$  289 e o íon  $m/z$  1155  $\rightarrow$  577.

Os íons  $m/z$  579 (Figura 54) foram identificados como provenientes de moléculas de massa 580 e aparecem nas partições PDM e PAE na faixa de  $t_r$ : de 7,8 a 8,5 min. Eles são formados pela ligação entre duas moléculas do monômero de epicatequina com perda de um H  $[2M-H]^-$ . O que pode ser comprovado pela sua fragmentação, que apresenta apenas o íon  $m/z$  289  $[2M-290-H]^-$ . Aparecem também no modo positivo  $m/z$  581 com o mesmo padrão.



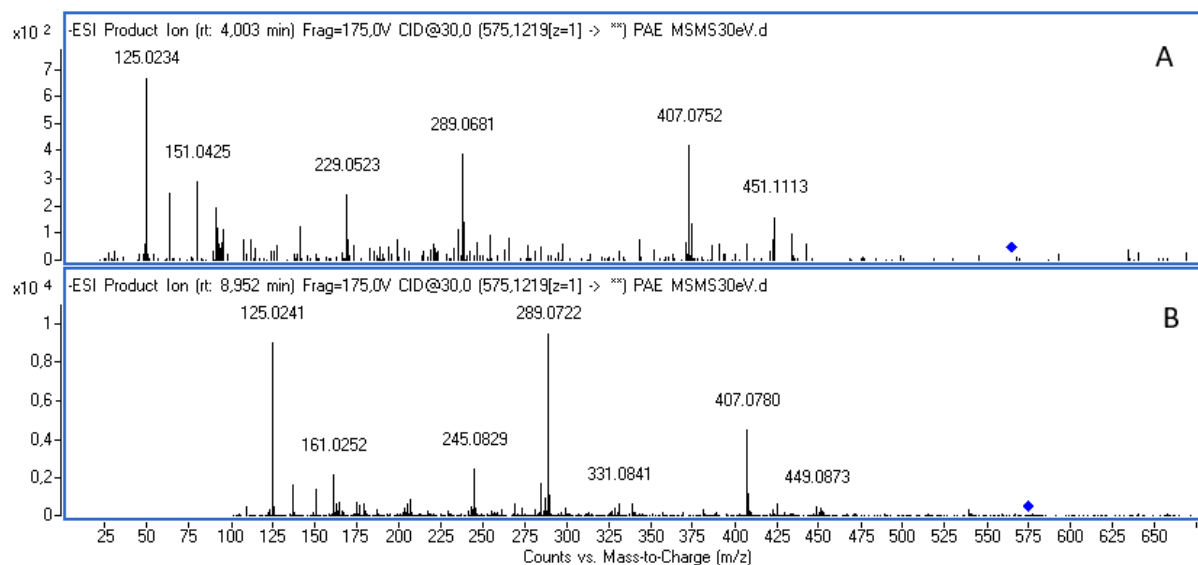
Os íons  $m/z$  1155 são referentes à moléculas de massa 1156 e foram observados na partição PAE e seu espectro de massa é apresentado na Figura 54. São formados pela ligação entre duas moléculas do dímero de (E)cat de massa 578 ( $[M-H]^-$   $m/z$  577) com perda de um H,  $[2M-H]^-$  (KARONEN et al., 2004). Esse fato pode ser comprovado ao analisar a fragmentação em seu espectro de massa de segunda ordem, que apresenta como pico base o íon  $m/z$  577  $[2M-578-H]^-$ . Os íons dessa substância também aparecem no modo positivo ( $m/z$  1157) com o mesmo padrão de fragmentação.

Figura 54 – Espectros de íons produtos com  $[2M-H]^-$ .



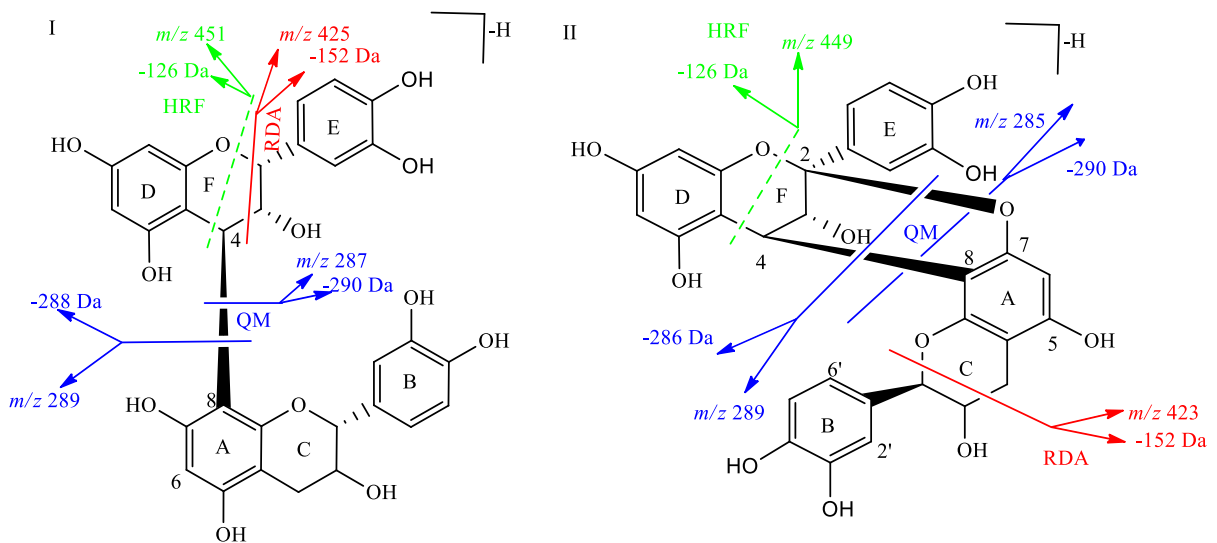
Os íon-fragmentos  $m/z$  575,12 representados na Figura 55 A, aparecem na fração PAE simultâneos com os íons de  $m/z$  577 ( $t_r$ : 4 min.). Seus principais íons-fragmentos apresentaram  $m/z$  451, 407, 289 125. A formação desses íons ocorre quando o dímero resultante da união de duas moléculas de epi-catequina são desprotonados perdendo 3 H  $[2M-3H]^-$ . Também podem ser formados a partir de heptâmeros isotópicos de PAs-B de  $m/z$  1729 triplamente carregados  $[M-3H]^{3-}$  (LIN et al., 2015).

Figura 55– Espectros dos dois tipos de íons  $m/z$  575 encontrados na partição PAE.



Essa conclusão pode ser elaborada pelo perfil de fragmentação apresentado, porque seus principais íons-fragmentos,  $m/z$  451, 407 e 289, são idênticos aos do íon de  $m/z$  577 sendo assim, caracterizado como uma PA-B (Figura 55 A). Esses íons poderiam ser identificados como sendo pertencentes aos dímeros de PAs-A que diferem das PAs-B por uma ligação C2–O–C5 ou C2–O–C7. Porém, o padrão de fragmentação encontrado apresenta os íons com  $m/z$  285, 449 e 423 (LIN et al., 2012) que são idênticos aos de um segundo íon (Figura 55 B) encontrado em  $t_r$ : 8,95 min. ( $m/z$  449, 407, 289). Devido ao tipo da ligação, a fissão no anel heterocíclico (HRF) produz o íon de  $m/z$  449 na PA-A e de  $m/z$  451 na PA-B. A fissão via RDA produz o íon  $m/z$  423 na PA-A e o íon  $m/z$  423 na PA-B. As fragmentações características e que diferenciam os dois tipos de PA são apresentadas na Figura 56. A representação feita foi para as PAs B2 e A2. Portanto, o espectro de massa dos íons encontrados em 8,95 min. e também em 11 min. na partição PAE e apresentados na Figura 55-B são característicos de uma PA-A.

Figura 56 – Estruturas com as principais fragmentações (-)-CLAE-EM<sup>2</sup>-IES de I-PAs-B2 e II-PAs-A2.



QM- Mecanismo via fissão quinona metídeo. HRF- Mecanismo via fissão heterocíclica do anel F. RDA- Mecanismo via clivagem retro Diels-Alder. I: fragmentação do íon  $m/z$  577; II: fragmentação do íon  $m/z$  575.

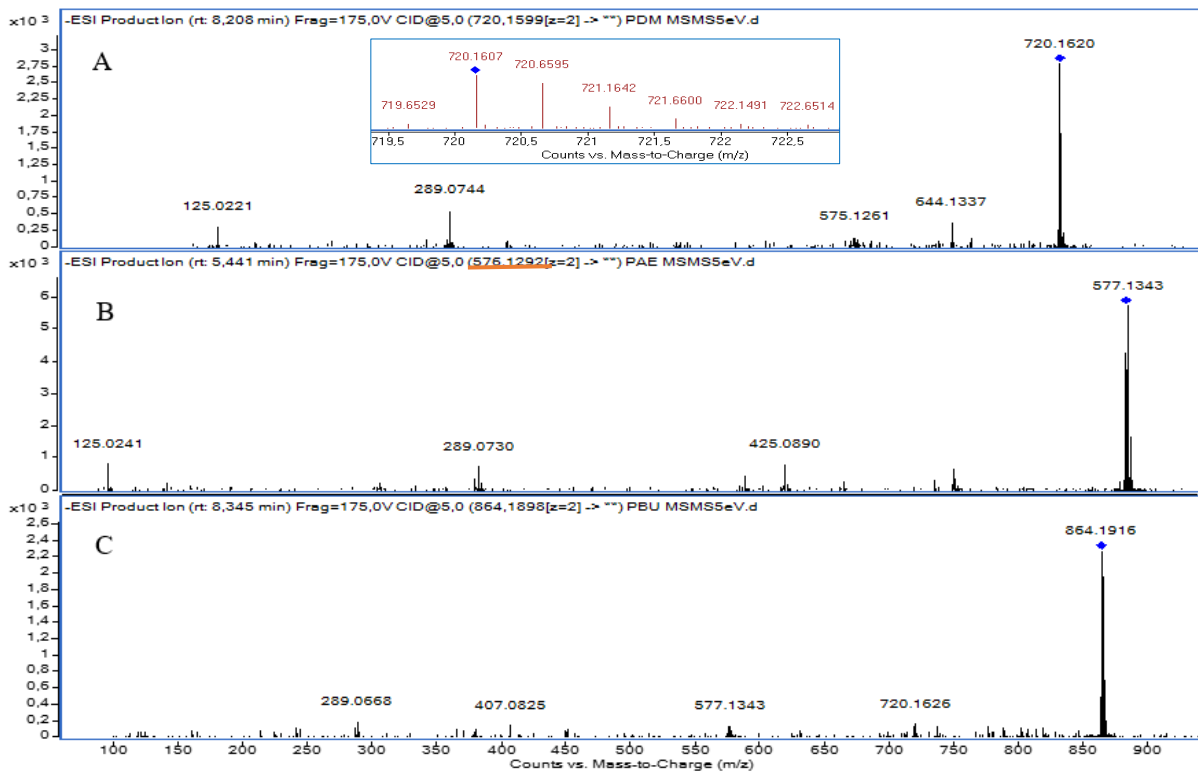
Fonte: Poupard et al., (2011); Lin et al., (2014).

Os íons  $m/z$  576, 720 e 864 são espécies formadas pela divisão de moléculas duplamente carregadas após perderem 2 H  $[M-2H]^{2-}$ . São originários de, respectivamente, tetrâmeros  $m/z$  1153, pentâmeros  $m/z$  1441 e hexâmeros  $m/z$  1729 (Figura 57). Enquanto os íons  $m/z$  720 aparecem abundantemente em todas as partições os íons  $m/z$  576 aparecem nas partições PDM e RMA, e os íons de  $m/z$  864 aparecem apenas na partição PDU.

Os íons  $m/z$  576 (Figura 57 B) apresentam o mesmo padrão de fragmentação dos dímeros de PA-B com  $m/z$  577: 425, 407, 289 e 125. Consequentemente, apresentam os mesmos mecanismos para fragmentações, as fissões RDA, QM e HRF como já descrito anteriormente para os dímeros.

Os íons  $m/z$  864 (Figura 57 C) apresentam o mesmo padrão de fragmentação dos trimeros  $m/z$  865 e, portanto, as vias mecanísticas de fragmentação dos seus íons são as mesmas. Da mesma forma que alguns íons  $m/z$  865, eles apresentam um íon-fragmento  $m/z$  720 decorrente da perda de 145 unidades.

Figura 57 – Espectros dos íons de PA do tipo  $[M-2H]^{2-}$ .



Os íons  $m/z$  720 apresentam os fragmentos de  $m/z$  644, 575, 289 e 125 como principais íons-fragmentos (Figura 57-A). Os fragmentos de  $m/z$  576 (Figura 57 B), são formados pela eliminação de 145 unidades e os íons de  $m/z$  289 pela eliminação de 431 unidades. Em geral esses íons apareceram simultaneamente, por exemplo, com os íons  $m/z$  864 (Figura 57 C), o que comprova a relação em suas origens. Também podem ser formados em fissões HRF de trímeros de epi-catequina ( $m/z$  865 e 864) com eliminação de 145 unidades como visto na figura 59 C.

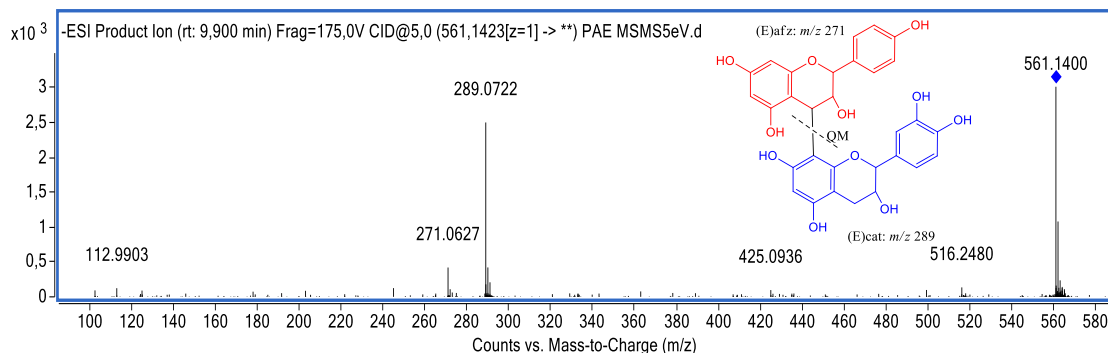
A origem do íon  $m/z$  720 pode ser melhor observada na ampliação de seu espectro de massa (Figura 57 A). A indicação de dois fragmentos distantes 0,5 unidades é o que identifica íons de dupla carga, os íons de carga única apresentam um único pico e este está distante uma unidade de outros picos. Pode ser visto ainda, na ampliação, vários outros picos do mesmo tipo indicando íons isotópicos como  $m/z$  721 e 722.

Porém, devido a diversidade de íons encontrados em tempos de retenção e fragmentações variadas pode-se dizer que, da mesma forma que os íons de  $m/z$  576, estes íons compõem outros tipos de estereoisômeros de PAs-A ou B e A-B.

Os íons  $[M-H]^-$   $m/z$  561,14 foram identificados como pertencentes a um dímero de epi-afzelequina-epi-catequina, (E)Afz--(E)Cat, de massa 562 sendo, portanto, uma PA do tipo

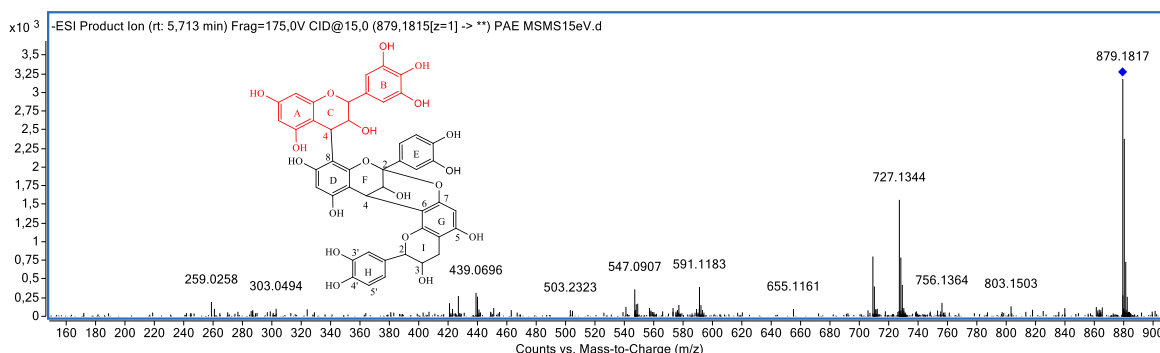
propelargonidina. Os íons-produtos principais foram  $m/z$  516, 425, 289, 271 e 112. Seu padrão de fragmentação é apresentado na Figura 58 e são coerentes com os dados da literatura (GE et al., 2016; GU et al., 2007). A (E)Afz tem uma hidroxila no anel B e sua massa molecular é 273. Em dímeros com a (E)Cat apresenta íons  $m/z$  271[M-288-H]<sup>-</sup> ou 273 [M-272-H]<sup>-</sup> (SOUZA, 2008; ESTATBEYOGLU e WINTERHALTER, 2010). A principal rota de fragmentação ocorre por QM formando os íons  $m/z$  289 e 271. Os outros íons são formados por fissões HRF. O íon  $m/z$  516 é formado pela perda de 45 unidades [M-45-H]<sup>-</sup> e RDA, enquanto o íon  $m/z$  425 é formado pela perda de 136 unidades [M-136-H]<sup>-</sup>.

Figura 58 - Espectro de massas do íon precursor  $m/z$  561, obtido por (-)-EM<sup>2</sup>-IES.



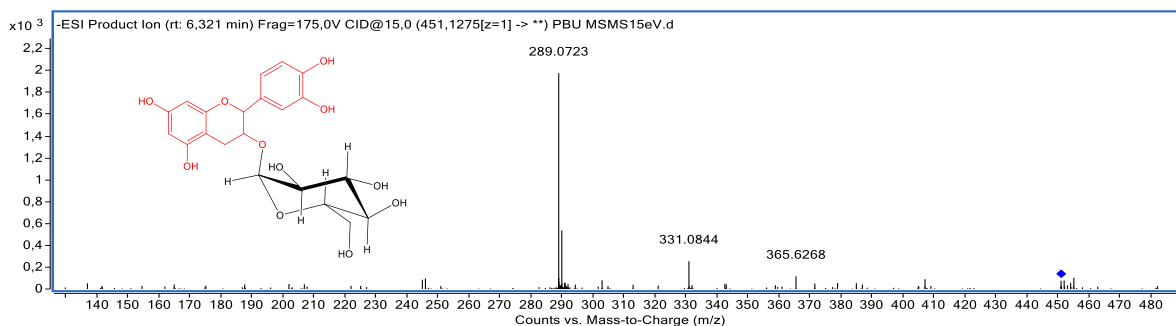
Os íons  $m/z$  879 [M-H]<sup>-</sup> foram identificados como sendo uma PA-A do tipo (E)Gal-(E)Cat-(E)Cat de massa 890, chamada de prodelfinidina devido a presença de uma epigallocatequina na unidade superior (ESTATBEYOGLU e WINTERHALTER, 2010; HAMED et al., 2014; ROCKENBACK, et al., 2012). O espectro de massa (Figura 58) apresentou como principais fragmentos os íons  $m/z$  721 (pico base), resultante da perda de 152 unidades [M-152-H]<sup>-</sup> por HRF na unidade de (E)Gal, referente a uma molécula de ácido gálico; os íons  $m/z$  709 são resultantes da eliminação de água [M-152-18-H]<sup>-</sup>; os íons  $m/z$  591 e  $m/z$  439 são decorrentes de fissões RDA. O primeiro íon é proveniente da clivagem na parte catecólica com perda de 288 unidades; o íon  $m/z$  301 é formado por uma fissão QM com eliminação [M-579-H]<sup>-</sup> de 579 unidades da parte catéuica, assim como o íon  $m/z$  259. A presença desse íon-fragmento é que indica a presença da unidade (E)Gal.

Figura 59 – Espectro do íon  $m/z$  879  $[M-H]^-$  presente na fração PAE.



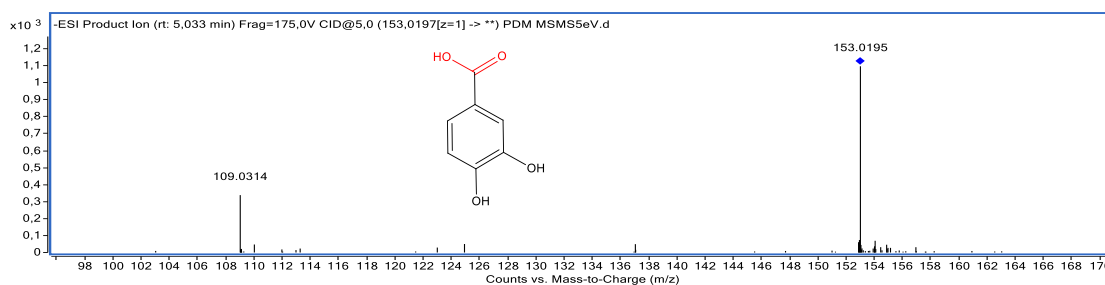
Os íons  $[M-H]^-$   $m/z$  451 (Figura 60) detectados na partição PBU foram identificados como referentes a uma epi-catequina-3-*O*-glucosídeo de massa 452 (PATRAS et al., 2014). Apresenta como principais fragmentos os íons  $m/z$  289 (pico base) resultante da eliminação de 162 unidades, a molécula neutra do glucosídeo. Os íons  $m/z$  331 resultantes da eliminação de 120 unidades da fissão do anel glucosídeo. E os íons  $m/z$  407 (eliminação de 44 unidades),  $m/z$  365 (perda de 86 unidades) e  $m/z$  245 (perda de 44 unidades) são resultantes de fissões HRF no anel da epicatequina.

Figura 60 - Espectro do íon  $m/z$  451  $[M-H]^-$  presente na fração PBU.



Os íons  $m/z$  153 (Figura 61), presentes no EE, e nas PDM, PAE, PBU, RMA foram identificados como  $[M-H]^-$  do ácido protocatecico, um composto fenólico de massa 194. Seu principal íon-produto  $m/z$  109  $[M-44-H]^-$  é formado pela eliminação de 44 unidades de uma molécula neutra de  $CO_2$  (ABU-REIDAH et al., 2015; SANS et al., 2009).

Figura 61 - Espectro do ácido protocatecico de íon  $[M-H]^-$   $m/z$  153.



## 7 CONCLUSÃO

Diversas classes de metabólitos (triterpenos, estróides, compostos fenólicos, taninos, flavonóides, saponinas, cumarinas e xantonas) foram identificadas na prospecção fitoquímica dos extratos da casca interna de *K. coreacea*. Entretanto, não foram identificados compostos nitrogenados pelos testes utilizados. A presença de taninos condensados nas frações mais polares (diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol), e em alto teor, foi comprovada pelas análises de CLAE-EM/EM-IES. A presença das proantocianidinas também foi confirmada pela análise dos espectros de UV-vis das amostras, que apresentam o mesmo padrão de bandas em 280 nm, características dessas substâncias fenólicas. Os taninos, por serem compostos fenólicos, e em sinergia com outras classes de compostos bioativos identificadas têm sido relacionados às ações antioxidantes, cicatrizantes e antifúngicos. Os triterpenos  $\alpha$ -amirina e lupeol e os esteróis campesterol, estigmasterol,  $\beta$ -sitosterol e sitost-4-en-3-ona, de reconhecida atividade biológica, foram identificados e caracterizados, por CG-EM e RMN, na partição hexânica. Também foram identificados compostos de cadeia longa e ácidos graxos de conhecida ação antibacteriana. Nas partições de maior polaridade como diclorometano (PDM), acetato de etila (PAE) e *n*-butanol (PBU) verificou-se, por CLAE-EM-IES, a presença de compostos polifenólicos, identificados como proantocianidinas, dímeros ou trímeros de ( $\pm$ ) catequina/epicatequina.

Esses fatos corroboram os excelentes resultados da atividade antioxidante frente ao radical DPPH e nos testes eletroquímicos de voltametria de pulso diferencial, bem como da ação antifúngica frente ao grupo de leveduras da espécie *Candida*.

O extrato etanólico da casca interna apresentou, no geral, atividade antibacteriana moderada. Entretanto, a partição hexânica (PH) apresentou alta atividade antibacteriana, tanto para as bactérias aeróbias quanto para as anaeróbias (CIMs entre 1,56-6,25  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ). As demais frações não apresentaram atividades antibacterianas relevantes nas concentrações analisadas.

As frações em diclorometano e *n*-butanol apresentaram atividade antifúngica muito ativa (CIMs abaixo de 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ) frente a todas as leveduras avaliadas. As demais frações apresentaram atividades antifúngicas moderadas (valores entre 100 e 500  $\mu\text{g mL}^{-1}$ ).

Desta forma, os resultados de atividade biológica para o extrato bruto e partições da casca interna da *K. coriacea* Mart & Zucc, bem como a caracterização dos compostos bioativos na fração hexânica, diclorometano, acetato de etila e *n*-butanol contribuem para preencher uma lacuna no conhecimento fitobioquímico desta parte da planta do Cerrado.

## REFERÊNCIAS

- AAS, J. A.; PASTER, B. J.; STOKES, L. N.; OLSEN, I.; DEWHIRST, F. E. Defining the Normal Bacterial Flora of the Oral Cavity. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 43, n. 11, p. 5721-5732, 2005. <https://doi.org/10.1128/JCM.43.11.5721-5732.2005>
- ABU-REIDAH, I. M.; ALI-SHTAYEH, M. S.; JAMOUS, R. M.; ARRÁEZ-ROMÁN, D.; SEGURA-CARRETERO, A. HPLC–DAD–ESI-MS/MS screening of bioactive componentes from *Rhus coriaria* L. (Sumac) fruits. **Food chemistry**, v. 166, p. 179-191, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.011>
- ALMEIDA-MANSO A. J. Exercícios de botânica no Planalto Central. 2011. Disponível em: <[http://www.sbpaisagismo.com.br/arquivos/botanica\\_planalto\\_central.pdf](http://www.sbpaisagismo.com.br/arquivos/botanica_planalto_central.pdf)>. Acesso em: 17 nov. 2011.
- ALVES, T.A.; SILVA, A.S.; BRANDÃO, M.; GRANDI, T.M.; SMÂNIA, E.; ZANI, C.L. Biological. Screening of Brazilian Medicinal Plants. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 95, n. 3, p. 367-373, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762000000300012>
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-2210, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010001000033>
- ALVES, E. G.; VINHOLIS, A. H. C.; CASEMIRO, L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Estudo comparativo de técnicas de screening para avaliação da atividade antibacteriana de extratos brutos de espécies vegetais e de substâncias puras. **Química Nova**, v.31, n.5, 1224-1229, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422008000500052>
- AMORIM, E. L. C.; NASCIMENTO, J. E.; MONTEIRO, J. M.; SOBRINHO, T. J. S. P.; ARAÚJO, T. A. S.; ALBUQUERQUE, U. P. A simple and accurate procedure for the determination of the tannin and flavonoid levels and some applications in ethnobotany and ethnopharmacology. **Functional Ecosystems and Communities**, v. 2, n. 1, p. 88-94, 2008.
- ANDRADE, M. R. Alcaloides de *Rutaceae*: Química e Atividade Biológica. 2003. 216 f. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química, Universidade Federal de São Carlos. São Carlos, 2003.
- ANDRADE, M. S.; SAMPAIO, T. S.; NOGUEIRA, P. C. L.; BITTRICH, V.; AMARAL, M. C. E. Volatile compounds of leaves, flowers and fruits of *Kielmeyera rugosa* Choisy (*clusiaceae*). **Flavour and Fragrance Journal**, v. 22, n. 1, p. 49-52, 2006. <https://doi.org/10.1002/ffj.1751>
- AQUINO, F. J. T.; MARTINS, C. M.; MORAIS, S. A. L.; CUNHA, L. C. S.; ALOISE, G. R. G.; CHANG, R.; OLIVEIRA, A.; MORAES, T. S.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Antioxidant and antimicrobial activity of *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 7, n. 37, p. 2722-2728, 2013a. <https://doi.org/10.5897/JMPR2013.4480>



AQUINO, F. J. T.; CANELLAS, B. B.; CUNHA, L. C. S.; SOUZA, L. C.; BARROS, T. T.; OLIVEIRA, A.; MORAIS, S. A. L.; CHANG, R.; NASCIMENTO, E. A.; SOUZA, M. G. M.; CUNHA, W. R.; MARTINS, C. H. G. Essential Oil Composition and Extracts of *Cordia sessilis* (Vell.) Kuntze with Antioxidant and Antimicrobial Activity. **Latim American Journal of Pharmacy**, v. 32, n. 3, p. 371-377, 2013b.

ARELLO, E. F.; PINTO, J. E. B. P. Propagação em vitro de *Kielmeyera coriacea*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 28, n. 1, p. 25-31, 1993.

ARENDRUP, M. C. Epidemiology of invasive candidiasis. **Current Opinion in Critical Care**, v. 16, n. 5, p. 445-452, 2010. <https://doi.org/10.1097/MCC.0b013e32833e84d2>

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. [https://doi.org/10.1016/S0367-326X\(02\)00183-1](https://doi.org/10.1016/S0367-326X(02)00183-1)

AUTOÉ, T. D. P. Estudo químico-biológico de *Pyrostegia Venusta* (ker Gawl.) Miers Bignoneaceae. 2014. 124 f. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2014.

BAGATIN, M. C.; TOZATTI, C. S. S.; ABIKO, L. A.; YAMAZAKI, D. A. S.; SILVA, P. R. A.; PEREGO, L. M.; AUDI, E. A.; SEIXAS, F. A. V.; BASSO, E. A.; GAUZE, G. F. Molecular Docking and Panicolytic Effect of 8-Prenylnaringenin in the Elevated T-Maze **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v. 62, n. 12, p. 1231-1237, 2014. <https://doi.org/10.1248/cpb.c14-00569>

BARBOSA, L. S. Estudo etnobotânico, químico e avaliação do potencial efeito biológico de *Kielmeyera coriacea* (calophylaceae). 2015. 118 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Goiás, Catalão, 2015.

BASAR, S. Phytochemical investigation on *Boswellia* species. 2005. 256 f. (Dissertation). Universitat Hamburg, Hamburg, 2005.

BASTOS, D. H.; SALDANHA, L. A.; CATHARINO, R. R.; SAWAYA, A. C.; CUNHA, I. B.; CARVALHO, P. O.; EBERLIN, M. N. Phenolic Antioxidants Identified by ESI-MS from Yerba Maté (*Ilex paraguariensis*) and Green Tea (*Camelia sinensis*) Extracts. **Molecules**, v. 12, n. 3, p. 423-432, Mar. 2007. <https://doi.org/10.3390/12030423>

BASYUNI, M., OKU, H.; TSUJIMOTO, E.; KINJO, K., BABA, S.; TAKARA, K. Triterpene synthases from the Okinawan mangrove tribe, *Rhizophoraceae*. **The FEBS Journal**, v. 274, p. 5028-5042, 2007. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2007.06025.x>

BEGUM, F.; MOHANKUMAR, R.; GEEVAN, M.; RAMANI, K; GC-MS Analysis of Bio-active Molecules Derived from *Paracoccus pantotrophus* FMR19 and the Antimicrobial Activity Against Bacterial Pathogens and MDROs. **Indian Journal of Microbiology**, v. 56, n. 4, p. 426-432, 2016. <https://doi.org/10.1007/s12088-016-0609-1>

BIESDORF, C.; CORTEZ, D. A. G.; AUDI, E. A. Assessment of anxiolytic and panicolytic effects of dichloromethane fraction from stems of *Kielmeyera coriacea*. **Phytomedicine**, v. 19, n. 3-4, p. 374-377, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2011.08.067>

BITTRICH, V.; TRAD, R.J.; CABRAL, F.; NASCIMENTO JR., J. E. *Calophyllaceae* In: FORZZA, R.C. et al. (orgs.). Lista de espécies da flora do Brasil. Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro (2014). Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/jabot/floradobrasil/FB121875>>. Acesso em: 25 set. 2015.

BOLZANI, V. S.; FLAUSINO, O.; VALLI, M. “Biodiversidade brasileira: uma fonte potencial de agentes terapêuticos ainda inexplorada”. IN: Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia. YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. (org). Itajaí, Universidade do Vale do Itajaí, p. 353-383, 2012.

BOLZANI, V. S.; VALLI, M.; PIVATTO, M., VIEGAS JR, C. Natural products from Brazilian biodiversity as a source of new models for medicinal chemistry. **Pure and Applied Chemistry**, v. 84, n. 9, p. 1837-1846, 2012. <https://doi.org/10.1351/PAC-CON-12-01-11>

BORDOLOI, M.; SAIKIA, S.; BORDOLOI, P. K.; KOLITA, B.; DUTTA, P. P.; BHUYAN, P. D.; DUTTA, S. C.; RAO, P. G. **Journal of molecular structure**, v. 1142, p. 200-210, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.molstruc.2017.04.027>

BOTELHO, S.A.; CARNEIRO, J. D. A. Influência da umidade, embalagens e ambientes sobre a viabilidade e vigor de sementes de pau-santo (*Kielmeyera coriacea* Mart.). **Revista Brasileira de Sementes**, v. 14, n. 1, p. 41-46, 1992. <https://doi.org/10.17801/0101-3122/rbs.v14n1p41-46>

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. [https://doi.org/10.1016/S0023-6438\(95\)80008-5](https://doi.org/10.1016/S0023-6438(95)80008-5)

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. Brasília: ANVISA, 2011. 126 f.

\_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Farmacopeia brasileira nº 5, volumes 1 e 2. 2010. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd\\_farmacopeia/index.htm](http://www.anvisa.gov.br/hotsite/cd_farmacopeia/index.htm)>. Acesso: em 26 ago. 2016.

\_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Método de Referência para Testes de Diluição em Caldo para Determinação da Sensibilidade de Leveduras à Terapia Antifúngica: Norma Aprovada sob licença da NCCL – Segunda Edição. M27-A2, vol. 22, n. 15. Brasília, 2015.

\_\_\_\_\_. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Memento de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira (MFFB). 1. ed. ANVISA, Brasília, 2016, 115 p. Disponível em: <[www.anvisa.gov.br](http://www.anvisa.gov.br)>. Acesso em: 14 set. 2016.

BRASIL BIOMA. Biodiversidade brasileira: Dados atuais [2016]. Disponível em: <<http://brasilbioma.com.br/biodiversidade-brasileira/>> Acesso em: 14 set. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fitoterapia no SUS. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 13 mar. 2016.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde/Secretaria de Vigilância em Saúde Departamento de Atenção Básica Coordenação Geral de Saúde Bucal. Pesquisa nacional da saúde bucal, dados principais, Ângelo Giuseppe Roncalli da Costa Oliveira (Coord. Geral), UFRN, Brasília, 2011. 95 p.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Portaria nº 886, de 20 de abril de 2010. Institui a Farmácia Viva no âmbito do Sistema Único de Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2010. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 23 mar. 2016.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica. Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. Brasília: Ministério da Saúde, 2007. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br>>. Acesso em: 23 mar. 2016.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares em Saúde. PNPIC. 2015. Disponível em: <<http://dab.saude.gov.br/portaldab/pnpic.php>>. Acesso em: 23 mar.2016.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Projeto SB Brasil 2010. Condições de saúde bucal da população brasileira. Resultados Principais. Brasília, 2010. 120 p.

\_\_\_\_\_. Ministério da Saúde. Política nacional de medicina natural e práticas complementares – PMNPC. Brasília, DF, 2005.

\_\_\_\_\_. Ministério de Meio Ambiente. Biodiversidade Brasileira. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>> Acesso em: 16 set. 2016.

\_\_\_\_\_. Ministério de Meio Ambiente. O bioma cerrado. Disponível em: <<http://www.mma.gov.br/biomas/cerrado>>. Acesso em 14 set. 2016.

BRAVO, M. N.; SILVA, S.; COELHO, A. V.; VILLAS BOAS, L.; BRONZE, M. R. Analysis of phenolic compounds in Muscatel wines produced in Portugal. **Analytica Chimica Acta**. v. 563, p. 84-92, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2005.11.054>

BRUNKE, S.; HUBE, B. Two unlike cousins: *Candida albicans* and *C. glabrata*, infection strategies. **Cellular Microbiology**, v. 15, n. 5, p. 701-708, 2013. <https://doi.org/10.1111/cmi.12091>

BURKE, R. W.; DIAMONDSTONE, B. I.; VELAPOLDI, R. A.; MENIS, O. Mechanism of the Liebermann-Buchard and Zak color reactions for cholesterol. **Clinical Chemistry**, v. 20, n. 4, p. 75-84, 1974.

CALANDRA, K. Diagnosis and management of invasive candidiasis in the ICU: an updated approach to an old enemy. **Critical Care**, v. 20, p. 125-131, 2016. <https://doi.org/10.1186/s13054-016-1313-6>

CALEARE, A. O.; LAZARIN-BIDÓIA, D.; GARCIA CORTEZ, D. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; SILVA, S. O.; NAKAMURA, C. V. Trypanocidal activity of 1,3,7-trihydroxy-2-(3-methylbut-2-enyl)-xanthone isolated from *Kielmeyera*

*coriacea*. **Parasitology International**, v. 62, p. 405-411, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2013.05.001>

CALLEMIEN, D.; COLLIN, S. Use of RP-HPLC-ESI(-)-MS/MS to Differentiate Various Proanthocyanidin Isomers in Lager Beer Extracts. **American Society of Brewing Chemists**, v. 66, n. 2, p. 109-115, 2008. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2008-0215-01>

CALIXTO J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and guidelines for herbal medicines (phytotherapeutics agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33 p. 179-189, 2000. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2000000200004>

CARNEVALE NETO, F. Estudo de espécies de *Chrysobalanaceae* com ação citotóxica: análise metabolômica visando ao entendimento de associações sinérgicas e da complexidade micromolecular. 2014. 108 f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2014.

CARVALHO, T. C.; SIMÃO, M. R.; AMBRÓSIO, S. R.; FURTADO, N. A.; VENEZIANI, R. C.; HELENO, V. C.; DA COSTA, F. B.; GOMES, B. P.; SOUZA, M. G.; REIS, R. B. Antimicrobial activity of diterpenes from *Viguiera arenaria* against endodontic bacteria. **Molecules**, v. 16, n. 1, p. 543-551, 2011. <https://doi.org/10.3390/molecules160100543>

CATALOGUE OF LIFE. Species. Leiden: Species, 2000. Disponível em: <[www.catalogueoflife.org/](http://www.catalogueoflife.org/)>. Acesso em: 15 mai. 2015.

CHOI, J.-S.; PARK, N.-H.; HWANG, S.-Y.; SOHN, J. H.; KWAK, I.; CHO, K. K.; CHOI, I. S. The antibacterial activity of various saturated and unsaturated fatty acids against several oral pathogens. **Journal of environmental biology**, v. 34, p. 371-373, 2013.

CLSI. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of yeasts, in: 34 (Ed.), CLSI document M 27–A3. PA, **Wayne**, p. 27, 2008.

CLSI Methods for antimicrobial susceptibility testing of anaerobic bacteria: CLSI document M11-A8. 8. Ed. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2012a. 39p.

CLSI Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically: CLSI document M7-A9. 9. ed. Wayne, PA: **Clinical and Laboratory Standards Institute**, 2012b. 63p.

CNCFlora. Base de Dados do Centro Nacional de Conservação da Flora. (2013). Disponível em: <[www.cncflora.jbrj.gov.br](http://www.cncflora.jbrj.gov.br/)>. Acesso em: 12 nov. 2015.

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**, v. 4, n. 3, p. 12-17, 2009. <http://dx.doi.org/10.14295/BA.v4.0.22>

COLEGATE, S. M.; MOLYNEUX, R. J. Bioactive natural products: detection, isolation, and structural determination. 2nd ed. Boca Raton: **CRC Press**, 624 p. 2007.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos da cromatografia. **Editora da Unicamp**, Campinas, 2006, 456 p.

COQUEIRO, A.; CHOI, Y. H.; VERPOORTE, R.; GUPTA, K. B. S. S.; DE MIERI, M.; HAMBURGER, M.; YOUNG, M. C. M.; STAPLETON, P.; GIBBONS, S.; BOLZANI, V. S. Antistaphylococcal Prenylated Acylphoroglucinol and Xanthenes from *Kielmeyera variabilis*. **Journal of Natural Products**, v. 79, p. 470-476, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b00858>

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

CORTEZ, D. A. G.; FILHO, B. A. A.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D., MARSTON, A., HOSTETTMANN, K. Antibacterial activity of a biphenyl and xanthenes from *Kielmeyera coriacea*. **Pharmaceutical Biology**, v. 40, n. 7, p. 485-489, 2002a. <https://doi.org/10.1076/phbi.40.7.485.14687>

CORTEZ, D. A. G.; MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Separation of xanthenes and a biphenyl from *Kielmeyera coriacea* by centrifugal partition chromatography. **Chromatographia**, v.50, n. 1-2, p. 7-10, 1999b. <https://doi.org/10.1007/BF02493609>

CORTEZ, D. A. G.; YOUNG, M. C. M.; MARSTON, A., WOLFENDER, J. L.; HOSTETTMANN, K. Xanthenes, Triterpenes and biphenyl from *Kielmeyera coriacea*. **Phytochemistry**, v. 47, n. 7, p. 1367-1374, 1997c. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(97\)00731-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(97)00731-0)

CREN-OLIVÉ, C.; DÉPREZ, S.; LABRUN, S.; CODDEVILLE, B.; ROLANDO, C. Characterization of methylation site of monomethylflavan-3-ols by liquid chromatography/electrospray ionization tandem mass spectrometry. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 14, p. 2312-2319, 2000. [https://doi.org/10.1002/1097-0231\(20001215\)14:23<2312::AID-RCM160>3.0.CO;2-A](https://doi.org/10.1002/1097-0231(20001215)14:23<2312::AID-RCM160>3.0.CO;2-A)

CRUZ, F. G.; MOREIRA, L. M.; DAVID, J. M.; GUEDES, M. L. S.; CHÁVES, J. P. Coumarines from *Kielmeyera argenta*. **Phytochemistry**, v. 48, n. 4, p. 703-706, 1998. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(98\)00128-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(98)00128-9)

CTFB - Catálogo Taxonômico da Fauna do Brasil.  
Disponível em: < <http://fauna.jbrj.gov.br/fauna/>>. Acesso em: 16 set. 2016.

CULIOLI, G.; MATHE, C.; ARCHIER, P.; VIEILLESCHAZES, C. Characterization of archaeological frankincense by gas chromatography–mass spectrometry. **Journal of Chromatography A**, v. 1023, p. 273-285, 2004.

CUNHA, L. C. S.; SILVA, M. L. A.; FURTADO, N. A. J. C.; VINHÓLIS, A. H. C.; MARTINS, C. H. G.; SILVA FILHO, A. A.; CUNHA, W. R. Antibacterial Activity of Triterpene Acids and Semi-Synthetic Derivatives against Oral Pathogens. **Zeitschrift für Naturforsch**, v. 62, p. 668-672, 2007. <https://doi.org/10.1515/znc-2007-9-1007>

CUNHA, L. C. S.; MORAIS, S. A. L.; MARTINS, C. H. G.; MARTINS, M. M.; CHANG, R.; AQUINO, F. J. T.; OLIVEIRA, A.; MORAES, T. S.; MACHADO, F. C.; SILVA, C. V.; NASCIMENTO, E. A. Chemical Composition, Cytotoxic and Antimicrobial Activity of Essential Oils from *Cassia bakeriana* Craib against Aerobic and Anaerobic Oral Pathogens. **Molecules**, v. 18, p. 4588-4598, 2013. <https://doi.org/10.3390/molecules18044588>

CUNHA, L. C. S.; MORAIS, S. A. L.; MARTINS, C. H. G.; MARTINS, M. M.; CHANG, R.; AQUINO, F. J. T.; OLIVEIRA, A.; SILVA, C. V.; SOUSA, L. C. F.; BARROS, T. T.; SILVA, C. V.; NASCIMENTO, E. A., Bioassay-guided fractionation and antimicrobial and cytotoxic activities of *Cassia bakeriana* extracts. **Brazilian Journal of Farmacognosy**, v. 27, p. 91-98, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2016.08.002>

DARNET, S.; RAHIER, A. Plant sterol biosynthesis: identification of two distinct families of sterol 4- $\alpha$ -methyl oxidases. **Biochemistry Journal**, v. 378, p. 889-898, 2004. <https://doi.org/10.1042/bj20031572>

DAVID, B.; WOLFENDER, J. L.; DIAS, D. A. The pharmaceutical industry and natural products: historical status and new trends. **Phytochemistry Reviews**, v. 14, p. 299-315, 2015. <https://doi.org/10.1007/s11101-014-9367-z>

DEMARQUE, D. P.; NORBERTO, P. L.; CROTTI, A. E. M.; VESSECCHI, R.; LOPES, J. L. C. Fragmentation reactions using electrospray ionization mass spectrometry: an important tool for the structural elucidation and characterization of synthetic and natural products. **The Royal Society of Chemistry**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 367-524. Mar. 2016. <https://doi.org/10.1039/c5np00073d>

DHARMARANTNE, H. R.; WIJESINGHE, W. M.; THEVANASEM, V. Antimicrobial activity of xanthenes from *Calophyllum* species against methicilin-resistant *Staphylococcus aureus*. **Journal Ethnopharmacology**, v. 66, p. 339-342, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(98\)00239-6](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(98)00239-6)

DEMAIN, A. L. Importance of microbial natural products and the need to revitalize their Discovery. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v. 41, p. 185-201, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10295-013-1325-z>

DEWICK, P. M. Medicinal natural products: a biosynthetic approach, Chichester: **John Wiley & Sons, LTD**, 2009. <https://doi.org/10.1002/9780470742761>

DIAS, D. A., URBAN, S. ROESSNER, U. A historical overview of natural products in drug discovery. **Metabolites**, v. 2, p. 303-336, 2012. <https://doi.org/10.3390/metabo2020303>

Dictionary of Natural Products (DNP). Molecules and structures. Disponível em: <<http://dnp.chemnetbase.com/dictionarysearch.do?jsessionid=28C92723B6178CEDB51ED69D5BFB666F?method=view&id=11980142&si=>>>. Acesso 15: mai. 2015.

DIONELLO, S. B.; BASTA, F. Informações sobre os caracteres quantitativos e qualitativos dos frutos e sementes de *Kielmeyera coriacea* Mart. **Brasil Florestal**, Rio de Janeiro, v. 58, p. 25-30, 1980.

DOSHI, G. M.; NALAWADE, V. V.; MUKADAN, A. S.; CHASKAR, P. K.; ZINE, S. P.; SOMAN, R. R.; UNE, H. D. Structural elucidation of chemical constituents from *Benincasa hispida* seeds and *Carissa congesta* roots by gas chromatography: Mass spectroscopy. **Farmacognosy Research A**, v. 7, n. 3, p. 282-293, 2015. <https://doi.org/10.4103/0974-8490.157179>

EDZIRI, H.; MASTOURI, M.; MAHJOUB, A. M.; MIGHRI, Z.; MAHJOUB, A. Antibacterial, Antifungal and cytotoxic Activities of two flavonoids from *Retama raetam* flowers. **Molecules**, v. 17, p. 7284-7293, 2012. <https://doi.org/10.3390/molecules17067284>

EOL, Encyclopedia of life. *Kielmeyera coriacea*. Disponível em: <<http://eol.org/pages/5711182/overview>>. Acesso em: 10 abr. 2015.

ESATBEYOGLU, T.; WINTERHALTER, P. Preparation of Dimeric Procyanidins B1, B2, B5, and B7 from a Polymeric Procyanidin Fraction of Black Chokeberry (*Aronia melanocarpa*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 5147-5153, 2010. <https://doi.org/10.1021/jf904354n>

EVARISTO, F. F. V.; ALBUQUERQUE, M. R. J. R.; SANTOS, H. S.; BANDEIRA, P. N.; ÁVILA, F. N.; SILVA, B. R.; VASCONCELOS, A. A.; RABELO, E. M.; NASCIMENTO-NETO, L. G.; ARRUDA, F. V. S.; VASCONCELOS, M. A.; CARNEIRO, V. A.; CAVADA, B. S.; TEIXEIRA, E. H. Antimicrobial Effect of the Triterpene  $3\beta,6\beta,16\beta$ -Trihydroxylup-20(29)-ene on Planktonic Cells and Biofilms from Gram Positive and Gram Negative Bacteria. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-7, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/729358>

FERNANDES, D. M.; SOUSA, R. M. F.; OLIVEIRA, A.; MORAIS, S. A. L.; RICHTER, E. M.; MUÑOZ, R. A. A. Moringa oleifera: A potential source for production of biodiesel and antioxidant additives. **Fuel**, v. 146, p. 75-80, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.fuel.2014.12.081>

FERREIRA, L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997. <https://doi.org/10.1590/S0104-42301997000100014>

FIGUEIREDO, C. R.; MATSUO, A. L.; MASSAOKA, M. H.; GIROLA, N.; AZEVEDO, R. A.; RABAÇA, A. N.; FARIAS, C. F.; PEREIRA, F. V.; MATIAS, N. S.; SILVA, L. P.; RODRIGUES, E. G.; LAGO, J. H. G.; TRAVASSOS, L. R.; SILVA, R. M. G. Antitumor Activity of Kielmeyera Coriacea Leaf Constituents in Experimental Melanoma, Tested in Vitro and in Vivo in Syngeneic Mice. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 4 (Suppl 1), p. 429-436, 2014. <https://doi.org/10.5681/apb.2014.063>

FINGOLO, C. E.; SANTOS, T. S.; VIANA FILHO, M. D. M.; KAPLAN, M. A. C. Triterpene Esters: Natural Products from *Dorstenia arifolia* (Moraceae) **Molecules**, v. 18, p. 4247-4257, 2013. <https://doi.org/10.3390/molecules18044247>

FIRMO W. C. A. Contexto histórico, uso popular e concepção científica sobre plantas medicinais. **Caderno de Pesquisa São Luís**, v. 18, n. especial, dez. 2011.

FIÚZA, A.G. Implicações jurídicas do desmatamento e ocupação do cerrado. *Revista Jurídica da Universidade de Cuiabá*, 2016. Disponível em: <[revistaemam.ghost.net](http://revistaemam.ghost.net)>. Acesso em: 21 abr. 2016.

FRASER, K.; COLLETTE, V.; HANCOCK, K. R. Characterisation of Proanthocyanidins from seeds of Perennial Ryegrass (*Lolium perenne* L.) and Tall Fescue (*Festuca arundinacea*) by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 35, p. 6676-6684, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.6b02563>

FRIAS, A. C.; PEREIRA A. C.; Vieira, V. Pesquisa estadual de saúde bucal: relatório final. SBSP. Águas de São Pedro: **livronovo**, 2016, 120 p.

FRIEDRICH, W.; EBERHARDT, A.; GALENSA, R. Investigation of proanthocyanidins by HPLC with electrospray ionization mass spectrometry. **European Food Research and Technology**, v. 211, n. 1, p. 56-64, 2000. <https://doi.org/10.1007/s002170050589>

FREDERIC, E.; FERREIRA, R.A. P. G.; GEHLEN, M. H. Molecular Fluorescence in Silica Particles Doped with Quercetin-Al<sup>3+</sup> Complexes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 7, p. 1213-1217, 2010. <https://doi.org/10.1590/S0103-50532010000700008>

FUNARI C.S.; FERRO V.O. Uso ético da biodiversidade brasileira: necessidade e oportunidade. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 178-182, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2005000200018>

GALLEGOS OLEA, R. S.; ROQUE, N. F. Análise de mistura de triterpenos por RMN de <sup>13</sup>C. **Química Nova**, v. 13, n. 4, p. 278-281, 1990.

GANDRA, P. G.; ALVES, A. A.; MACEDO, D. V. de. Determinação eletroquímica da capacidade antioxidante para avaliação do exercício físico. **Química Nova**, v. 27, n. 6, p. 980-985, 2004. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422004000600024>

GASCON, C. Global Biodiversity Conservation: The Critical Role of Hotspots. In: Zachos F.E.; Habel J.C. (Eds.). **Biodiversity Hotspots**. Heidelberg: Springer, p. 529-536, 2011.

GE, Y.-W.; ZHU, S.; KAZUMA, K.; WEI, S.-L.; YOSHIMATSU, K. Molecular ion index assisted comprehensive profiling of B-type oligomeric proanthocyanidins in rhubarb by high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 408, n. 13, p. 3555-3570, 2016. <https://doi.org/10.1007/s00216-016-9433-z>

GIESE, S. O. K. Estudo da composição química dos óleos florais de *Byrsonima brachybotrya* (Malpighiaceae). 2005. 180 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

Global Biodiversity Information Facility (GBIF). Geospatial Consortium Services. Disponível em: <<http://www.gbif.org/species/7330272>>. Acesso em: 10. jul. 2017.

GOBBO-NETO L.; LOPES N. P. Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 374-381, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>

GONÇALVES, D.; COUTO, O.; CONCEIÇÃO, E. C.; REIS, N. S.; GIL, E. S. Voltametria de pulso diferencial (VPD) em estado sólido de manchas de cromatografia de camada delgada (CCD): Um novo método de análise para fitoativos antioxidantes. **Química Nova**, v. 34, n. 2, p. 330-334, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011000200028>

GOTTLIEB, O. R.; LINS, A. A. M.; NAGEM, T. J. Xanthones of *Kielmeyera rubriflora*. **Phytochemistry**, v. 19, p. 665-666, 1971.



GOULART, M. O. F.; SANT'ANA, A. E. G.; LIMA, R. A.; CAVALCANTE, S. H.; BRAZ FILHO R.; CARVALHO, M. G. Fitoconstituintes químicos isolados de *Jatropha Elliptica*. Atribuição dos deslocamentos químicos dos átomos de carbono e de hidrogênio dos diterpenos jatrolonas A e B. **Química Nova**, v. 16, n. 2, p. 95-100, 1993.

GOULART, Y. C. F.; SELA, V. R.; OBICI, S.; MARTINS, J. V. C.; OTOBONE, F.; CORTEZ, D. A.; AUDI, E. A. Evaluation of gastric antiulcer activity in a hydroethanolic extract from *kielmeyera coriacea*. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v. 48, p. 211-216, 2005. <https://doi.org/10.1590/S1516-89132005000200007>

GOUVEIA, S.; GONÇALVES, J.; CASTILHO, P. C. Characterization of phenolic compounds and antioxidant activity of ethanolic extracts from flowers of *Andryala glandulosa* ssp. varia (Lowe ex DC.) R.Fern. an endemic species of Macaronesia region. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 573-582, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.06.040>

GOUGHENOUR, K. D.; BALADA-LLASAT, J-M.; RAPPLEYE, C. A. Quantitative microplate-based growth assay for determination of antifungal susceptibility of histoplasma capsulatum yeasts. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 53, p. 3286-3295, 2015. <https://doi.org/10.1128/JCM.00795-15>

GU, H.; NAGANA GOWDA, G. A.; CARNEVALE NETO, F.; OPP, M. R.; RAFTERY, D. RAMSY: ratio analysis of mass spectrometry to improve compound identification. **Analytical Chemistry**, v. 85, n. 22, p. 10771-10779, 2013. <https://doi.org/10.1021/ac4019268>

GU, L.; KELM, M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; PRIOR, R. L. Liquid chromatographic/electrospray ionization mass spectrometric studies of proanthocyanidins in foods. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 38, n. 12, p. 1272-1280, 2003a. <https://doi.org/10.1002/jms.541>

GU, L.; KELM, M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; BEECHER, G.; HOLDEN, J.; HAYTOWITZ, D.; PRIOR, R. L. Screening of foods containing proanthocyanidins and their structural characterization using LC-MS/MS and thiolytic degradation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, n. 25, p. 7513-7521, 2003b. <https://doi.org/10.1021/jf034815d>

GUO-QIANG, L.; JING, D.; HONG, W.; LE-REN, W.; YUKI, H.; SHI-ZHONG, C. ESI Fragmentation studies of four tea catechins. **Chemical Journal of Chinese Universities**, v. 30, n. 8, p. 1566–1570, 2009.

GUYOT, S.; DOCO, T.; SOUQUET, J.-M.; MOUTOUNET, M.; DRILLEAU, J.-F. Characterization of highly polymerized procyanidins in cider apple (*Malus sylvestris* var. kermierien) skin and pulp. **Phytochemistry**, v. 44, n. 2, p. 351-357, 1997. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(96\)00480-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(96)00480-3)

HAGERMAN, A. E.; RICE, M. E.; RITCHARD, N. T. Mechanisms of Protein Precipitation for Two Tannins, Pentagalloyl Glucose and Epicatechin16 (4f8) Catechin (Procyanidin). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 2590-2595, 1998. <https://doi.org/10.1021/jf971097k>

HASLAM E. Natural polyphenols (vegetable tannins) as drugs: possible modes of action. **Journal of Natural Products**, v. 59, n. 2, p. 205-15, 1996. <https://doi.org/10.1021/np960040+>

HAMED, A. I.; AL-AYED, A. S.; MOLDOCH, J.; PIACENTE, S.; OLESZEK, W.; STOCHMAL, A. Profiles analysis of proanthocyanidins in the argun nut (*Medemia argun*: an ancient *Egyptian palm*) by LC–ESI–MS/MS. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 49, n. 4, p. 306-315, 2014. <https://doi.org/10.1002/jms.3344>

HAMMERSTONE, J. F., LAZARUS, S. A., MITCHEL, A. E., RUCKER, R., SCHIMITZ, H. H. Identification of Procyanidins in Cocoa (*Theobroma cacao*) and Chocolate Using High-Performance Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 47, p. 490-496, 1999. <https://doi.org/10.1021/jf980760h>

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R. A.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews**, v. 14, p. 111-129, 2014a. <https://doi.org/10.1038/nrd4510>

HARVEY, A. L. Natural product drug in discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19-20, p. 894-901, 2008b. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.07.004>

HE, F.; PAN, Q.-H.; SHI, Y.; DUAN, C.-Q. Biosynthesis and genetic regulation of proanthocyanidins in plants. **Molecules**, Basel, v. 13, n. 10, p. 2674-2703, 2008. <https://doi.org/10.3390/molecules13102674>

HELLSTRÖM, J., SINKKONEN, J., KARONEN, M., MATTILA, P. Isolation and Structure Elucidation of Procyanidin Oligomers from Saskatoon Berries (*Amelanchier alnifolia*). **Journal Agriculture and food Chemistry**, v. 55, p. 157-164, 2007. <https://doi.org/10.1021/jf062441t>

HOLETZ, F. B.; PESSINI, G. L.; SANCHES, N. R.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P. Screening of some plants used in the brazilian folk medicine for the treatment of infectious diseases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 1027-1031, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762002000700017>

ICMBio. Instituto Chico Mendes de conservação da biodiversidade. Ministério de Meio Ambiente. Monitoramento da conservação da biodiversidade. Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/>>. Acesso em: 16 set. 2016.

\_\_\_\_\_. Instituto Chico Mendes de conservação da biodiversidade. Sistema de autorização e informação em biodiversidade - SISBio. Brasília, 2016 Disponível em: <<http://www.icmbio.gov.br/sisbio/>>. Acesso em 16 set. 2016.

JBRJ. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Catálogo de plantas e fungos do Brasil, Jardim Botânico do Rio de Janeiro, v. 1-2, 2010, 1900 p.

\_\_\_\_\_. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Flora Brasiliensis. Disponível em: <<http://florabrasiliensis.cria.org.br/opus>>. Acesso em: 14 Jul. 2016.

JANEIRO, P.; OLIVEIRA BRETT, A. M. Catechin electrochemical oxidation mechanisms. **Analytica Chimica Acta**, v. 518, p. 109–115, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.05.038>

KARONEN, M.; LOPONEN, J.; VLADIMIR, O.; PIHLAJA, K. Analysis of procyanidins in pine bark with reversed-phase and normal-phase high-performance liquid chromatography electrospray ionization mass spectrometry. **Analytica Chimica Acta**, v. 522, p. 105-112, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2004.06.041>

KELM, M. A.; HAMMERSTONE, J. F.; SCHMITZ, H. H. Identification and quantitation of flavanols and proanthocyanidins in foods: how good are the datas? **Clinical and Developmental Immunology**, v. 12, n. 1, p. 35-41, 2005. <https://doi.org/10.1080/10446670410001722177>

KILMARTIN, P. A.; ZOU, H.; WATERHOUSE, A. L. A cyclic voltammetry method suitable for characterizing antioxidant properties of wine and wine phenolics. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 1957-1965, 2001a. <https://doi.org/10.1021/jf001044u>

KILMARTIN, P. A.; ZOU, H.; WATERHOUSE, A. L. Correlation of wine phenolic composition *versus* cyclic voltammetry response. **American Journal Enology and Viticulture**, v. 53, n. 4, p. 294-302, 2002b.

KIND, T.; FIEHN, O. Seven golden rules for heuristic filtering of molecular formulas obtained by accurate mass spectrometry. **BMC Bioinformatics**, v. 8, n.105, p. 1-20, 2007. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-8-105>

KLINK, C. A. MACHADO, R. B. A. A conservação do Cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.

KRZYŹCIAK, W.; JURCZAK, A.; KOŒCIELNIAK, D.; BYSTROWSKA, B.; SKALNIAK, A. The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 33, n. 4, p. 499-515, 2014. <https://doi.org/10.1007/s10096-013-1993-7>

LAMOUNIER, K. C.; CUNHA, L. C. S.; MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; CHANG, R.; NASCIMENTO, E. A.; SOUZA, M. G. M.; MARTINS, C. H. G.; CUNHA, W. R. Chemical Analysis and Study of Phenolics, Antioxidant Activity, and Antibacterial Effect of the Wood and Bark of *Maclura tinctoria* (L.) D. Don ex Steud. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, p. 1-7, 2012. <https://doi.org/10.1155/2012/451039>

LEÃO, R. B. A.; FERREIRA, M. R. C.; JARDIM, M. A. G. Levantamento de plantas de uso terapêutico no município de Santa Bárbara do Pará, Estado do Pará, Brasil. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 88, n. 1, p. 21-25, 2007.

LE COUTEUR, P.; BURRESON, J. Napoleon's buttons; (how 17 molecules changed history. Tradução, BORGES, M. L. X. de A. Os botões de Napoleão: as 17 moléculas que mudaram a história. Rio de Janeiro: **Zahar**, 2006, 343 p.

LEITE, T. C. C., Estudo químico e farmacológico biomonitorado de sete espécies do gênero *Miconia* (*Melastomataceae*). 2016. 96 f. Tese (Doutorado em Química). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2016.

LIMA, J. T.; MARCATI, C. R. Anatomia da madeira de *Kielmeyera coriacea* Mart. (Pausanto) - Guttiferae. In: Congresso Nacional de Botânica Cuiabá, n. 40, p. 301, 1989.

LIN, L.-Z.; SUN, J.; CHEN, P.; MONAGAS, M. J.; HARMY, J. M. UHPLC-PDA-ESI/HRMSn Profiling Method To Identify and Quantify Oligomeric Proanthocyanidins in Plant Products. **Jornal Agriculture and Food Chemistry**, v. 62, p. 9387-9400. 2014. <https://doi.org/10.1021/jf501011y>

LINS MESQUITA, A. A.; CORRÊA, B. D.; GOTTLIEB, O. R.; MAGALHÃES, M. T. Methods for the structural investigation of xanthenes. **Analytica Chimica Acta**, v. 42, p. 311-322, 1968. [https://doi.org/10.1016/S0003-2670\(01\)80312-3](https://doi.org/10.1016/S0003-2670(01)80312-3)

LOPES, J. L. C., GILBERT, B. BONINI, S. E. Osajaxanthenes from *Kielmeyera coriacea*. **Phytochemistry**, v. 16, p. 1101, 1977. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)86753-9](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)86753-9)

MACHADO, A. C.; FREITAS, A.; SALES-PERES, S. H. C. Atividade anti-inflamatória de produtos naturais em odontologia: uma revisão sistemática. **Revista fitos**, v. 10, n. 1, p. 1-93, 2016. <http://dx.doi.org/10.5935/2446-4775.20160005>

MAGRINI, V. Estudo fitoquímico de folhas, galhos e cascas do caule de *Calycophyllum spruceanum* Benth para testes de potencial cosmético funcional. 2016. 147 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Araraquara. 2016.

MARTINELLI, G. et al. (Orgs.) Livro vermelho da flora do Brasil: plantas raras do Cerrado. Rio de Janeiro: Andrea Jakobsson Estúdio; Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 1 ed. Rio de Janeiro. **CNCFlora**, 2014, 320 p.

MARTINS, C. M. M. Estudo químico, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e análise do óleo essencial da espécie *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc (PAU-SANTO) do cerrado. 2012. 116 f. Dissertação. (Mestrado em Química) - Instituto de Química Universidade Federal de Uberlândia. 2012a.

MARTINS, C. M.; AQUINO, F. J. T.; MORAIS, S. A. L.; MARTINS, M. M. M.; CUNHA, L. C. S.; CHANG, R., OLIVEIRA, A., MORAES, T. S., SILVA, V. C.; MARTINS, C. H. G.; RODRIGUES, P. V.; NASCIMENTO, E. A. Chemical Constituents and Evaluation of Antimicrobial and Cytotoxic Activities of *Kielmeyera coriacea* Mart. & Zucc. Essential Oils. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 7, n. 37, p. 1-9, 2015b. <https://doi.org/10.1155/2015/842047>

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

MARTINS, N.; BARROS, L.; HENRIQUES, M.; SILVA, S. Activity of phenolic compounds from plant origin against *Candida* species. **Industrial Crops and Products**, v. 74, p. 648-670, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.05.067>

MATOS, C. A. S. Contribuição ao estudo químico e biológico de *Pouteria Gardinerie* (Mart & Miq.) Baheni (*sapotaceae*). 2007. 197 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade de Brasília, Brasília. 2007.

MERCADANTE, W. *Kielmeyera coriacea*. Fotos. 2010. Disponível em: <<https://www.flickr.com/photos/mercadanteweb/5112318147/in/photostream/>>. Acesso em: 10 abr. 2015.

MESQUITA, M. L.; ARAUJO, R. M. A.; BEZERRA, D. P.; BRAZ FILHO, R.; PAULA, J. E.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; LOTUFO, L.V.C.; ESPINDOLA, L.S. Cytotoxicity of d-tocotrienols from *Kielmeyera coriacea* against cancer cell lines. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.19, n.1, p. 623–630, 2011b. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2010.10.044>

MISHRA, B. B.; TIWARI, V. K. Natural products: an evolving role in future drug discovery. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 46, p. 4769-4807, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2011.07.057>

MOKOKA, T. A.; MCGAW, L. J.; MDEE, L. K.; BAGLA, V. P.; IWALEWA, E. O.; ELOFF, J. N. Antimicrobial activity and cytotoxicity of triterpenes isolated from leaves of *Maytenus undata* (Celastraceae). **BMC Complementary and Alternative Medicine**, v. 13, p. 111-120, 2013. <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-111>

MONTAGNER, C.; SOUZA, S. M.; GROPOSO, C.; MONACHE, F. D.; SMÂNIA, E. F. A.; SMÂNIA JUNIOR, A. Antifungal Activity of Coumarins. **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 63, p. 21-28, 2008.

MORAES, J. Viver o Cerrado. [Blog]. Pau Santo - *Kielmeyera coriacea*. Disponível em: <<http://viverocerradoifb.blogspot.com.br/2012/10/pau-santo-kielmeyera-coriacea-e.html>>. Acesso em: 14 jul.2016.

MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; NASCIMENTO, E. A.; OLIVEIRA, G. S.; CHANG, R.; SANTOS, N. C.; ROSA, G. M. Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e da atividade antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de seus grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. S, p. 198-207, 2008.

MOREIRA, J. S. Triagem de microrganismos isolados no estado da Bahia para biotransformação de compostos esteroidais. 2009. 71 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Estadual da Bahia. Feira de Santana. 2009.

NASCIMENTO, C. Ressonância magnética nuclear. – São Paulo: **Blucher**, 2016, 118 p.

NASCIMENTO, M. N. G. Estudo químico de *Erythroxyllum suberosum* (erythroxyllaceae) frente às catepsinas K, L e V. 2014. 104 p. Dissertação (Mestrado em química) Universidade Federal de Goiás. Catalão. 2014.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79 p. 629-661, 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>

NG, L.-K.; LAFONTAINE, P.; VANIER, M. Characterization of Cigarette Tobacco by Direct Electrospray Ionization-Ion Trap Mass Spectrometry (ESI-ITMS) Analysis of the Aqueous Extracts. A Novel and Simple Approach. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, p. 7251-7257, 2004. <https://doi.org/10.1021/jf040203x>

NUNES, B. C.; MARTINS, M. M.; CHANG, R.; MORAIS, S. A.L.; NASCIMENTO, E. A. OLIVEIRA, A., CUNHA, L. C.S., SILVA, C. V., TEIXEIRA, T. L., AMBRÓSIO, M. A.L.V., MARTINS, C. H.G., AQUINO, F. J.T. Antimicrobial activity, cytotoxicity and selectivity index of *Banisteriopsis laevifolia* (A. Juss.) B. Gates leaves. **Industrial Crops and Products**, v. 92, p. 277-289, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.08.016>

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. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2007.09.013>

OLIVEIRA, A. C. D.; VALENTIM, I. B.; GOULART, M. O. F.; SILVA, C. A.; BECHARA, E. J. H.; TREVISAN, M. T. S. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689–702, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422009000300013>

OLIVEIRA, D. M. Estudo fitoquímico e biológico das folhas de *Banisteriopsis argyrophylla* (A. Juss.) B. Gates (Malpighiaceae) 2016. 138 f. Dissertação (Mestrado em Química), Instituto de Química Universidade Federal de Uberlândia. Uberlândia, 2016.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais in vitro pelo método do radical DPPH: estudo de revisão. **Revista Brasileira Plantas Mediciniais**, Campinas, v. 17, n. 1, p. 36-44, 2015. [https://doi.org/10.1590/1983-084X/12\\_165](https://doi.org/10.1590/1983-084X/12_165)

OTOBONE, F. J.; SELA, V. R.; OBICI, S.; MOREIRA, L.Y.; CORTEZ, D. A. G.; AUDI, E. A. Role of 5-HT<sub>1</sub> Receptors in antidepressant-like effect of dichloromethane fraction of *Kielmeyera coriacea* in rats subjected to the forced swim test. **Indian Journal of Pharmacology**, v. 39, n. 2, p. 75-79, 2007. <https://doi.org/10.4103/0253-7613.32524>

PACHECO, W. F.; SEMAAN, F. S.; ALMEIDA, V. G. K.; RITTA, A. G. S. L.; AUCÉLIO, R. Q. Voltametrias: uma breve revisão sobre os conceitos. **Revista Virtual de Química**, Rio de Janeiro, v. 5, n. 4, p. 516-537, 2013. <https://doi.org/10.5935/1984-6835.20130040>

PATRAS, M. A.; MILEV, B. P.; VRANCKEN, G.; KUHNERT, N. Identification of novel cocoa flavonoids from raw fermented cocoa beans by HPLC-MSn. **Food Research International**, v. 63, p. 353-359, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2014.05.031>

PEKAL, A.; PYRZYNSKA, K. Evaluation of aluminium complexation reaction for flavonoid content Assay. **Food Analytical Methods**, v. 7, n. 9, p. 1776-1782, 2014. <https://doi.org/10.1007/s12161-014-9814-x>

PÉREZ-MAGARIÑO, S.; REVILLA, M. L.; GONZÁLEZ-SAN-JOSÉ, M. L.; BELTRÁN, S. various applications of liquid chromatography–mass spectrometry to the analysis of phenolic compounds. **Journal of chromatography A**, v. 847, p. 75-81, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0021-9673\(99\)00255-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9673(99)00255-1)

PIMENTA, S. M. Germinação de sementes de *Kielmeyera coriacea* em diferentes substratos e condições de luz. **Revista de biologia e Ciências da Terra**, v. 11, n. 2, 2011.

PIMENTEL, B. S. Constituintes de ceras cuticulares de espécies de Croton L. 2014. 85 f. Dissertação (Mestrado em Química) Universidade de São Paulo, São Paulo, 2014.

PINHEIRO L.; NAKAMURA C.V.; FILHO B.P.D.; FERREIRA A.G.; YOUNG M.C.M.; CORTEZ D.A.G. Antibacterial xanones from *Kielmeyera variabilis* Mart. (*Clusiaceae*). **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 4, 2003.  
<https://doi.org/10.1590/S0074-02762003000400023>

PINTO, M. M. M.; MESQUITA, A. A. L.; GOTTLIEB, O. R.; Xanthonolignoids from *kielmeyera coriacea*. **Phytochemistry**, v. 26, n. 7, p. 2045-2048, 1987.  
[https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(00\)81755-0](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(00)81755-0)

PINTO, J. E. B. P.; ARELO, E. F. A.; PINTO, C. A. B. P. PINTO; 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**, v. 26, n. 1, p. 57-61, 1996. <https://doi.org/10.1590/S0103-84781996000100011>

POUPARD, P.; SANOREN, P.; BARON, A.; RENARD, C. M. G. C.; GUYOT. S. Characterization of procyanidin B2 oxidation products in an apple juice model solution and confirmation of their presence in apple juice by high-performance liquid chromatography coupled to electrospray ion trap mass spectrometry. **Journal of Mass spectrometry**, v. 46, p. 1186-1197, 2011. <https://doi.org/10.1002/jms.2007>

PRASAIN, J. K.; PENG, N.; DAI, Y.; MOORE, R.; ARABISHIARI, A.; WILSON, L.; BARNES, S.; WYNSS, J. M.; KIM, H.; WATTS, R. L. Liquid chromatography tandem mass spectrometry identification of proanthocyanidins in rat plasma after oral administration of grape seed extract. **Phytomedicine**, v. 16, p. 233-243, 2009.  
<https://doi.org/10.1016/j.phymed.2008.08.006>

QIANG, L.; FENGLI, L.; XIAOYONG, Z.; YU, L.; XIANG, L.; GUIBING, H.; CHONG, S.; KUNSONG, C. Identification of Proanthocyanidins from Litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) Pulp by LC-ESI-Q-TOF-MS and Their Antioxidant Activity. **PloS One**, v. 10, n. 3, p. 1-17, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0120480>

QUEIROZ, G. S. Análise de esteróides em extratos vegetais e estudo fitoquímico e biológico preliminar de *brunfelsia uniflora*. 2008. 148 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Departamento de Química. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2008.

QUIDEAU, S.; DEFFIEUX, D.; DOUAT-CASASSUS, C.; POUYSEGU, L. Plant polyphenols: chemical properties, biological activities, and synthesis. **Angewandte Chemie, Weinheim**, v. 50, n. 3, p. 586–621, 2011. <https://doi.org/10.1002/anie.201000044>

RAHMAN. S.; Z, SINGHAL, K. C. Problems in pharmacovigilance of medicinal products of herbal origin and means to minimize them. **Uppsalla Reports**, v.17, suplement, jan, 2002.

RANDAL, V. B.; BEHRENS, M.; PEREIRA, A. M. S. Farmácia da natureza: um modelo eficiente de farmácia viva. **Revista fitos**, v. 10, n. 1, p. 1-93, 2016.

REDE DE SEMENTES DO CERRADO. *Kielmeyera coriacea* (Spreng.) Mart. var. Coriacea. 2010. Disponível em: <<http://www.rededesementesdocerrado.com.br>>. Acesso em: 17 nov. 2015.

REFLORA. Flora do Brasil 2020 em construção. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 10 abr. 2015.

REGINATTO, F. H.; SOARES, L. A. L.; FARIAS, M. R. Introdução à análise fitoquímica. Qualidade de insumos farmacêuticos ativos de origem natural. In SIMÕES, C. M. O. (Org) ... [et al.]. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. 1.ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2017. 486p.

REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, Manoa, v. 3, n. 1, p. 25-35, 2005. <https://doi.org/10.17348/era.3.0.25-36>

RIBEIRO, A. S. C.; PINTO, A. T. M.; SILVA, D. J.; PEIXOTO, I. T. A. Atividade Antimicrobiana de Diferentes Colutórios Fitoterápicos. **Ensaio e Ciências Biológicas, Agrárias e da Saúde**, v. 19, n. 4, p. 178-183, 2015. <http://dx.doi.org/10.17921/1415-6938.2015v19n4p%25p>

RIOS, P. D.; FARBIO, A. M.; BARBOSA, A. C. Morphological characterization of *Kielmeyera coriacea* Mart. cork from Brazilian Cerrado. **Cerne**, v. 17, n. 3, p. 387–392, 2011a. <https://doi.org/10.1590/S0104-77602011000300013>

RIOS, P. D.; CABRAL, V.; SANTOS, S.; MORI F.; GRAÇA, J. The chemistry of *Kielmeyera coriacea* outer bark: a potential source for cork. **European Journal of Wood and Wood Products**, v. 72, p. 509-519, 2014. <https://doi.org/10.1007/s00107-014-0811-y>

RÍOS, J.; RECIO, M. C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 100, n. 1–2, p. 80-84, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.04.025>

ROBBERS, J. E.; SPEEDIE, L. K.; TYLER, V. E. Farmacognosia e farmacobiocologia. Traduzido por BENEDETTI, I. C. São Paulo: **Editorial Premier**, 1997, 372p.

ROCKENBACH, I. I.; JUNGFER, E.; RITTER, C.; THIELLE, B.; SANTIAGO-SCHÜBEL, B.; FETT, R.; GALENSA, R. Characterization of flavan-3-ols in seeds of grape pomace by CE, HPLC-DAD-MS<sup>n</sup> and LC-ESI-FTICR-MS. **Food Research International**, v. 48, p. 848-855, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.001>

RODRIGUES, C. M.; RINALDO, D.; SANTOS, L. C. dos; MONTORO, P.; PIACENTE, S.; PIZZA, C.; HIRUMA-LIMA, C. A.; BRITO, A. R.; VILEGAS, W. Metabolic fingerprinting using direct flow injection electrospray ionization tandem mass spectrometry for the characterization of proanthocyanidins from the barks of *Hancornia speciosa*. **Rapid Communications in Mass Spectrometry**, v. 21, n. 12, p. 1907-1914, 2007. <https://doi.org/10.1002/rcm.3036>



RUE, E. A., RUSH, M. D., BREEMEM, R. B. Procyanidins: a comprehensive review encompassing structure elucidation via mass spectrometry. **Phytochemical Reviews**, v. 16, p. 1-16, 2016. <https://doi.org/10.1007/s11101-017-9507-3>

SALMINEN, J-P.; KARONEN, M.; LEMPA, K.; LIIMATAINEN, J.; SINKKONEN, J.; LUKKARINEN, M.; PIHLAJA, K. Characterisation of proanthocyanidin aglycones and glycosides from rose hips by high-performance liquid chromatography–mass spectrometry, and their rapid quantification together with Vitamin C. **Journal of Chromatography A**, v. 1077, p 170-180. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2005.04.073>

SANS, M.; CADAHÍA, E.; ESTERVELAS, E.; MUÑOZ, A. M.; SIMÓN, B. F., HERNANDEZ, T.; ESTRELLA, I. Phenolic Compounds in Chestnut (*Castanea sativa* Mill.) Heartwood. Effect of Toasting at Cooperage. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 58, p. 9631-9640, 2010. <https://doi.org/10.1021/jf102718t>

SARNOSKI, P. J.; JOHNSON, J. V.; REED, K. A.; TANKO, J. M.; O'KEEFE, S. F. Separation and characterisation of proanthocyanidins in Virginia type peanut skins by LC–MSn. **Food Chemistry**, v. 131, n. 3, p. 927-939, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.09.081>

SERUGA, M.; NOVAK, I.; JAKOBEK, L. Determination of polyphenols content and antioxidant activity of some red wines by differential pulse voltammetry, HPLC and spectrophotometric methods. **Food Chemistry**, v. 124, p. 1208-1216, 2001. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.07.047>

SCHMIDT, J. Negative ion electrospray high-resolution tandem mass spectrometry of polyphenols. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 51, p. 33-43, set. 2016. <https://doi.org/10.1002/jms.3712>

SCIO, E. Cumarinas encontradas no gênero Kielmeyera - Família Clusiaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 85, n. 1, p. 27-31, 2004.

SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91, n. 1-2, p. 21-40, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0377-8401\(01\)00228-0](https://doi.org/10.1016/S0377-8401(01)00228-0)

SELA, V. R.; HATTANDA, I.; ALBRECHT, C. M.; DEALMEIDA, C. B.; OBICI, S.; CORTEZ, D. A.; AUDI, E. A. Effect of xanthone from Kielmeyera coriacea stems on serotonergic neurons of the median raphe nucleus. **Phytomedicine**, v. 17, p. 274-278, 2010. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2009.07.002>

SHUY, L.; CHEN, L., HU, C., CHEN, P., XIE, B., SUN, Z. Identification of A-series oligomeric procyanidins from pericarp of *Litchi chinensis* by FT-ICR-MS and LC-MS. **Food Chemistry**, v. 135, p. 31-38. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.04.039>

SIBBr - Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira. Disponível em: <<http://www.sibbr.gov.br/areas/?area=biodiversidade>>. Acesso em: 26 nov. 2016.

\_\_\_\_\_. Sistema de Informação sobre a Biodiversidade Brasileira. Ficha de espécies. *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc. Disponível em:

<[https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/kielmeyera\\_coriacea](https://ferramentas.sibbr.gov.br/ficha/bin/view/especie/kielmeyera_coriacea)>. Acesso em: 10 abr. 2015.

SILVA, E. M. Ação inibitória de extratos de plantas do cerrado sobre alfa-amilases com ênfase em *kielmeyera coriacea*. Universidade de Brasília. Programa de pós-graduação em ciências da saúde. 2008. 126 p. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade de Brasília, Brasília, 2008a.

SILVA, E. M.; VALENCIA, A.; GROSSI-DE-SÁ, M. F.; ROCHA T. L. ; FREIRE, E.; PAULA, J. E. de; ESPINDOLA, L. S. Inhibitory action of Cerrado plants against mammalian and insect a-amylases. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, v. 95, p. 141-146, 2009b. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2009.08.003>

SILVA, N. L.; ZOBIOLE, N. N.; DA SILVA, D. B.; SARTORI, A. L. B.; OLIVEIRA, R. J.; PINTO, M. E. A.; DOS SANTOS, F. J. L.; SIQUEIRA, J. M. Constituintes químicos e atividade fitotóxica das folhas de *Annona nutans*, **Química Nova**. São João Del Rei, v. 38, n. 5, p. S1-S10, 2015. <http://dx.doi.org/10.5935/0100-4042.20150066>

SILVEIRA P. F. D. da, BANDEIRA, M. A. M., ARRAIS, P. S. Farmacovigilância e reações adversas às plantas medicinais e fitoterápicos: uma realidade. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. 4, p. 618-626, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000400021>

SILVERSTEIN, R. M., WEBSTER, X. F., KIEMLE, D. J. Identificação espectrométrica de compostos orgânicos. Tradução ALENCASTRO, R. B. Rio de Janeiro: **LTC**, 2007.

SIMÕES, C. M. O.... [et al.]. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: **Editora da UFSC**, 2004a. 1104 p.

SIMÕES, C. M. O. (Org) ... [et al.]. Farmacognosia: do produto natural ao medicamento. 1.ed. Porto Alegre: **Artmed**, 2017b. 486 p.

SIMOTE, S. Y. Estudo fitoquímico de *Helietta puberula* (Rutaceae), *Simarouba versicolor* (Simaroubaceae) e busca de um processo de microencapsulação de ativos visando o controle de formigas cortadeiras. 2006. 232 p. Tese (Doutorado em Química) - Programa de Pós-Graduação em Química – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2006.

SINGH, O.; ALI, M.; AKHTAR, N. New Antifungal Xanthones from the Seeds of *Rhus coriaria* **Zeitschrift für Naturforschung**, v. 66, p. 17-23, 2011. <https://doi.org/10.1515/znc-2011-1-203>

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

SLABBERT, N. P. Ionisation of some flavanols and dihydroflavonols. **Tetrahedron**, v. 33, p. 821-824, 1977. [https://doi.org/10.1016/0040-4020\(77\)80200-7](https://doi.org/10.1016/0040-4020(77)80200-7)

SOBRAL, I. S. Xantonas, triterpenos e atividade antibacteriana do extrato em diclorometano de *Kielmeyera cuspidata* Saddi, *Clusiaceae*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 3, p. 686-689, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2009000500006>

SOUSA, C. M. M.; SILVA, H. R.; VIEIRA-JR., G. M.; CRUZ M.; AYRES, C.; COSTA, C. L. S.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, 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**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200021>

SOUSA, L. M. Aplicações da espectrometria de massas e da cromatografia líquida na caracterização estrutural de biomoléculas de baixa massa molecular. 2008, 164 p. Tese (Doutorado em bioquímica) - Programa de Pós-Graduação em Bioquímica, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2008.

SOUZA, F. P. Tecnologia de produtos florestais. Rio de Janeiro: **Nacional**, 1974. 409 p.

SOUSA, R. M. F. Estudo Químico De *Eugenia calycina* Cambess e Avaliação Das Atividades Antimicrobiana, Antioxidante e Inibidora Da Enzima Alfaamilase. 2015. 213f. Tese (Doutorado em Química), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

SOUZA NOVAIS, C. Estudo fitoquímico de espécies de *Clusia* presente no cerrado com potencial atividade biológica. [Manuscrito]. 2016. 180 p. Tese (Doutorado em química), Universidade Federal de Goiás. Goiânia, 2016.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado na APG III. 3. ed. Nova Odessa: **Instituto Plantarum**, 2012. 768 p.

SOUZA, V.R. Triterpenos, xantonas, cumarinas, bifenilas e derivados do floroglucinol de *Kielmeyera lathrophyton* e *Kielmeiera coreaceae*. 2005. 192 p. Tese (Doutorado em química), Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2005.

STEFOVA, M.; PETKOVSKA, A.; UGARKOVIC. S.; STANOEVA, J. P. Strategy for optimized use of LC-MSn for determination of the polyphenolic profiles of apple peel, flesh and leaves. **Arabian Journal of Chemistry**, v. 10, n. 2, p. 57-85, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.12.009>

STEVENS, P. F. (2001 onwards). Angiosperm phylogeny website. Version 12, July 2012. Disponível em: <<http://www.mobot.org/MOBOT/Research/APweb/>>. Acesso em: 22 Jan. 2016.

SUN, B.; SILVA, J. M. R.; SPRANGER, I. Critical Factors of Vanillin Assay for Catechins and Proanthocyanidins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4267-4274, 1998. <https://doi.org/10.1021/jf980366j>

SUN, J.; LIANG, F.; BIN, Y.; LI, P.; DUAN, C. Screening non-colored phenolics in red wines using liquid chromatography/ultraviolet and mass spectrometry/mass spectrometry libraries. **Molecules**, Beijing, v. 12, n. 3, p. 679-693, 2007. <https://doi.org/10.3390/12030679>

TALA, V. R. S.; SILVA, V. C.; RODRIGUES, C. M.; NKENGFACK, A. E.; SANTOS, L. C.; VILEGAS, W. Characterization of Proanthocyanidins from *Parkia biglobosa* (Jacq.) G. Don. (Fabaceae) by Flow Injection Analysis – Electrospray Ionization Ion Trap Tandem Mass Spectrometry and Liquid Chromatography/Electrospray Ionization Mass Spectrometry. **Molecules**, v. 18, p. 2803-2820, mar. 2013. <https://doi.org/10.3390/molecules18032803>

MORAES, R. TIMBLINDIM, [Blog]. Plantas do Brasil: Pau-Santo. Disponível em: <<https://timblindim.wordpress.com/arvores/pau-santo-1/>>. Acesso 14 jul. 2016.

TRENTIN, D.S.; GIORDANI, R.B.; MACEDO, A.J. Biofilmes bacterianos patogênicos: aspectos gerais, importância clínica e estratégias de combate. **Revista Liberato**, v. 14, n. 22, p. 113-238, 2013.

UNITED NATIONS. UN- UNEP. The Convention on Biological Diversity. Disponível em: <<https://www.cbd.int/>>. Acesso em: 25 nov. 2016.

VALKO, M.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M.; RHODES, C. J.; TELSER, J. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 266, p. 37–56, 2004. <https://doi.org/10.1023/B:MCBI.0000049134.69131.89>

VALLI, M.; PIVATTO, M. DANUELLO, A.; CASTRO-GAMBOA, I.; SILVA, D. H. S.; CAVALHEIRO, A. J.; ARAÚJO, Â. R.; FURLAN, M.; LOPES, M. N.; E BOLZANI, V. S. Tropical biodiversity: has it been a potential source of secondary metabolites useful for medicinal chemistry? **Química Nova**, v. 35, n. 11, p. 2278-2287, 2012. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422012001100036>

VASCONCELLOS, M.C.B.L.M. Atividade antitumoral, isolamento e identificação dos princípios ativos da *Kielmeyera coriacea* Mart & Zucc. 2008. 342 p. Tese (Doutorado em Química). Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2008.

VIEGAS JUNIOR, C.; BOLZANI, V. S.; BARREIRO, E. J. Os produtos naturais e a química medicinal moderna. **Química Nova**, v. 29, n. 2, p. 326-337, 2006. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422006000200025>

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422005000300026>

VESSECHI, R.; LOPES, N. P.; GOZZO, F. C.; DÖRR, F. C.; MURGU, M.; LEBRE, D. T.; ABREU, R.; BUSTILLOS, O. V.; RIVEROS, J. M. Nomenclatura de espectrometria de massas em língua portuguesa. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p.1875-1887, 2011. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422011001000025>

VIVER O CERRADO. [Blog]. Pau Santo - *Kielmeyera coriacea*. Disponível em: <<http://viverocerradoifb.blogspot.com.br/2012/10/pau-santo-kielmeyera-coriacea-e.html>>. Acesso em: 14 jul. 2016.

WAGNER, H.; BLADT, S. Plant drug analysis: a thin layer chromatography atlas. 2. ed. Berlin: **Springer**, 2001. 384 p.

WHO. World Health Organization. Traditional medicine strategy. Hong kong. 2014-2023. Disponível em: <[http://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm\\_strategy14\\_23/en/](http://www.who.int/medicines/publications/traditional/trm_strategy14_23/en/)>. Acesso em: 23 ago. 2016.

WOISKY, R. G.; SALATINO, A. Analysis of propolis: some parameters and procedures for chemical quality control. **Journal Apicultural Research**, v. 37, n. 2, p. 99-105, June 1998. <https://doi.org/10.1080/00218839.1998.11100961>

WYREPKOWISKI, C. C.; COSTA, G. M. L. D.; SINHORIN, P. A.; VILEGAS, W.; GRANDIS, R. A.; RESENDE, F. A.; VARANDA, E. A.; SANTOS, L. C. Characterization and Quantification of the Compounds of the Ethanolic Extract from *Caesalpinia ferrea* Stem Bark and Evaluation of Their Mutagenic Activity. **Molecules**, v. 12, p. 679-693, 2014. <https://doi.org/10.3390/molecules191016039>

XIE, D.Y., DIXON, R. Proanthocyanidin biosynthesis – still more questions than answers? **Phytochemistry**, v. 66, p. 2127-2144, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2005.01.008>

XIONG, Q.; WILSON, W. K.; PANG, J. The Liebermann–Burchard Reaction: Sulfonation, Desaturation, and Rearrangement of Cholesterol in Acid. **Lipids**, v. 42, p. 87-96, 2007. <https://doi.org/10.1007/s11745-006-3013-5>

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 rat liver. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 105, n. 1-2 p. 47-54, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.036>

ZANON, R. B. Triterpene Esters: Natural Products from *Dorstenia arifolia* (Moraceae). 2006. 180 f. Dissertação (Mestrado em Química). Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2006.

ZANON, R. B.; PEREIRA, D. F.; BOSCHETTI, T. K.; SANTOS, M.; ATHAYDE, M. L. Fitoconstituintes isolados da fração em diclorometano das folhas de *Vernonia tweediana* Baker. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v.18, n. 2, p. 226-229, 2008. <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2008000200015>

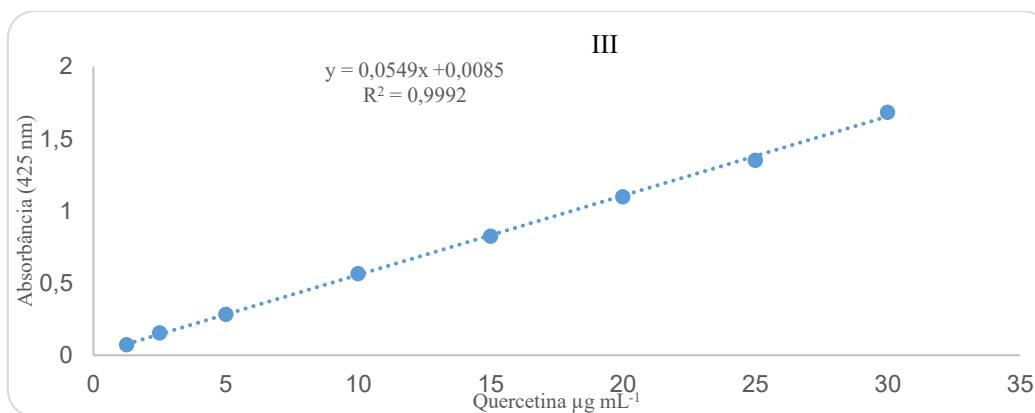
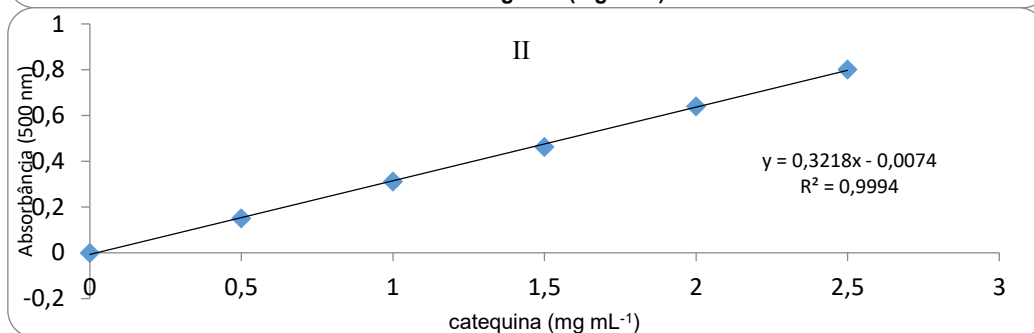
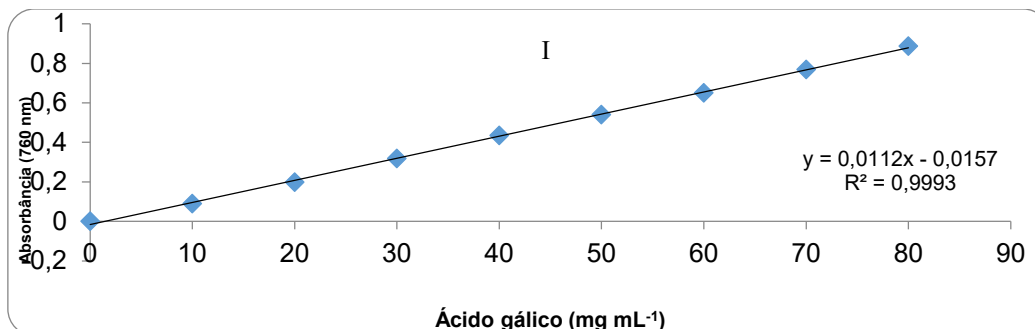
ZUBRICKÁ, D.; MISIANIKOVÁ, A.; HENZELYOVÁ, J.; VALLETTA, A.; DE ANGELIS, G.; D1AURIA, F. D.; SIMONETTI, G.; PASQUA, G.; CELLÁROVÁ, E. Xanthones from roots, hairy roots and cell suspension cultures of selected *Hypericum* species and their antifungal activity against *Candida albicans*. **Plant Cell Reports**, v. 34, p 1953–1962, 2015. <https://doi.org/10.1007/s00299-015-1842-5>

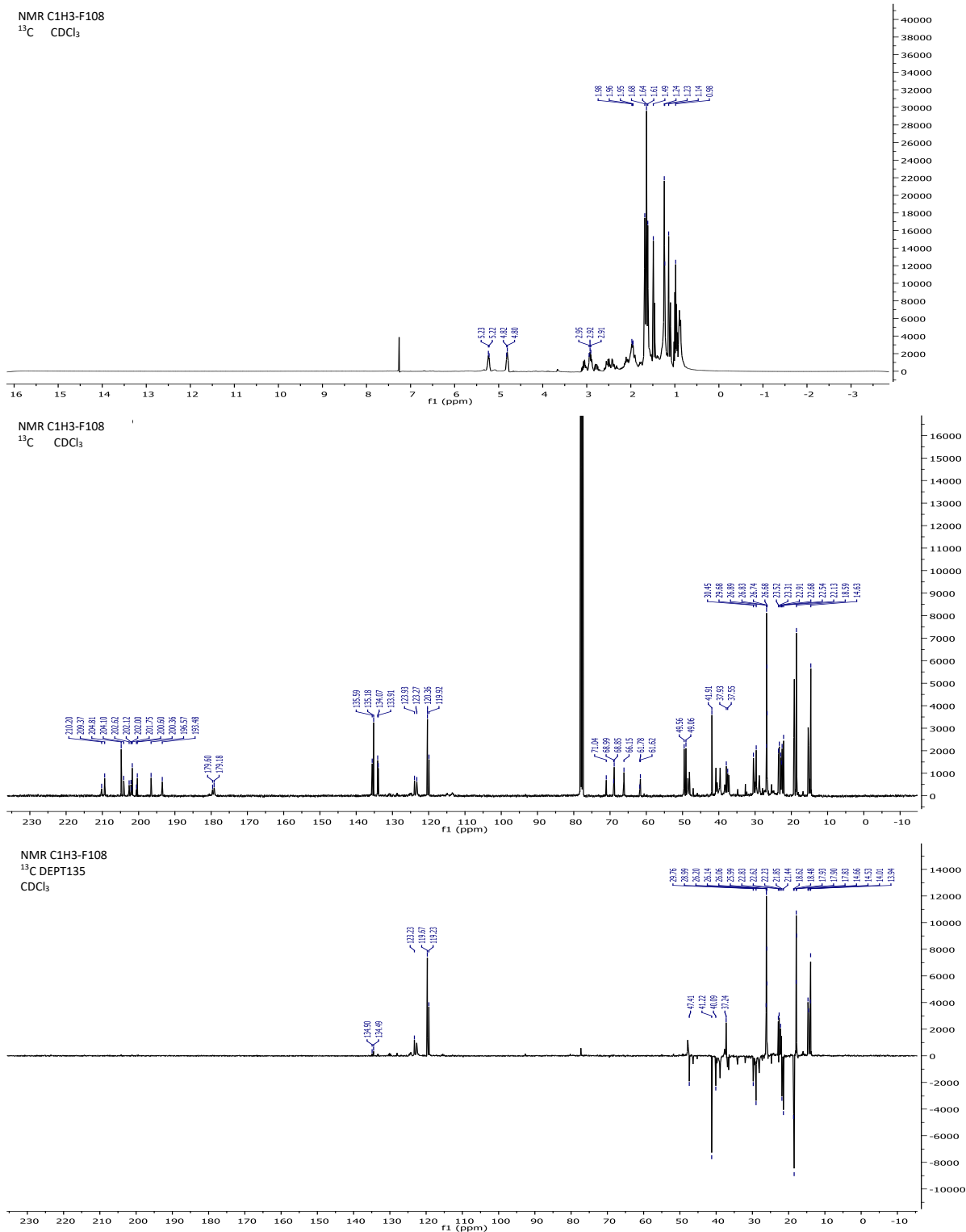
## APÊNDICES

Apêndice A- Tabela de íons-fragmentos não identificados no extrato/partições por CLAE-EM-IES.

$T_R$ (min.)	[M - H] <sup>-</sup>	[M - H] <sup>+</sup>	EM <sup>2</sup>	Não Identificado	Extrato/partição
<b>5,02</b>	576,1300		500, 289, 125	n.i.	PBU
<b>5,50</b>	583,1180		507, 431, 303, 289, 151	n.i.	PAE
<b>5,60</b>	583,1180		507, 431, 303, 289, 104	n.i.	EE, PAE
<b>6,80</b>	493,1597		447, 307,139	n.i.	PBU, RMA
<b>10,28</b>	567,1734		484, 381, <b>273</b> , 167	n.i.	EE, PDM, PAE
<b>10,50</b>	633,2424		589, 503, 307, <b>289</b> , 203, 120	n.i.	PAE, PBU
<b>10,78</b>	435,1325		385, 315, <b>273</b> , 243, 185, 119	n.i.	PAE
<b>10,10</b>	549,1844		503, 424,, 369, 245, 195, 153	n.i.	PAE, PDM, PBU EE
<b>12,20</b>	769,2210		723, 623, 557, 428, 253, 172	n.i.	EE, PDM, PAE, PBU
<b>12,40</b>	615,2322		598, 542, 434, 358, 307, 187	n.i.	EE, PDM, PAE, PBU
<b>12,19</b>	823,2865		77, 692, 615, 481, 377, 252, 103	n.i.	PDM
<b>12,87</b>	661,2376		615, 545, 513, 451, 307, 237, 125	n.i.	PDM, PAE
<b>12,60</b>		593,1888	506, 447, 397, 327, 285, 147	n.i.	PAE
<b>13,74</b>	483,1885		452, 321, 115	n.i.	EE, PDM
<b>14,27</b>	431,1729		374, 323, 249, 191, 130	n.i.	PAE, RMA
<b>14,28</b>		387,1826	369, 342, 281, 267	n.i.	PDM, PAE, EE
<b>15,84</b>	409,1646		394, 375, 325, 267, 177	n.i.	EE
<b>16,45</b>		289,1561	223, 179, 107	n.i.	EE, PDM
<b>15,70</b>	527,3414		497, 399, 344, 281, 215, 125	n.i.	EE, PDM, PAE, PBU, RMA
<b>15,90</b>		529,3356	461, 371, 303, 235, 137	n.i.	EE, PDM, PAE, PBU, RMA
<b>16,24</b>	513,3257		463, 385, 344, 272, 218, 143	n.i.	EE, PDM, PAE, PBU, RMA
<b>16,28</b>		515,1340	447, 371, 303, 235, 137	n.i.	EE, PDM, PAE, PBU, RMA

Apêndice B – I- Curva padrão de calibração típica para o ácido gálico. II- Curva de linearidade da catequina (mg de EC g<sup>-1</sup> de extrato). II- Curva de linearidade da quercetina (µg mL<sup>-1</sup>).

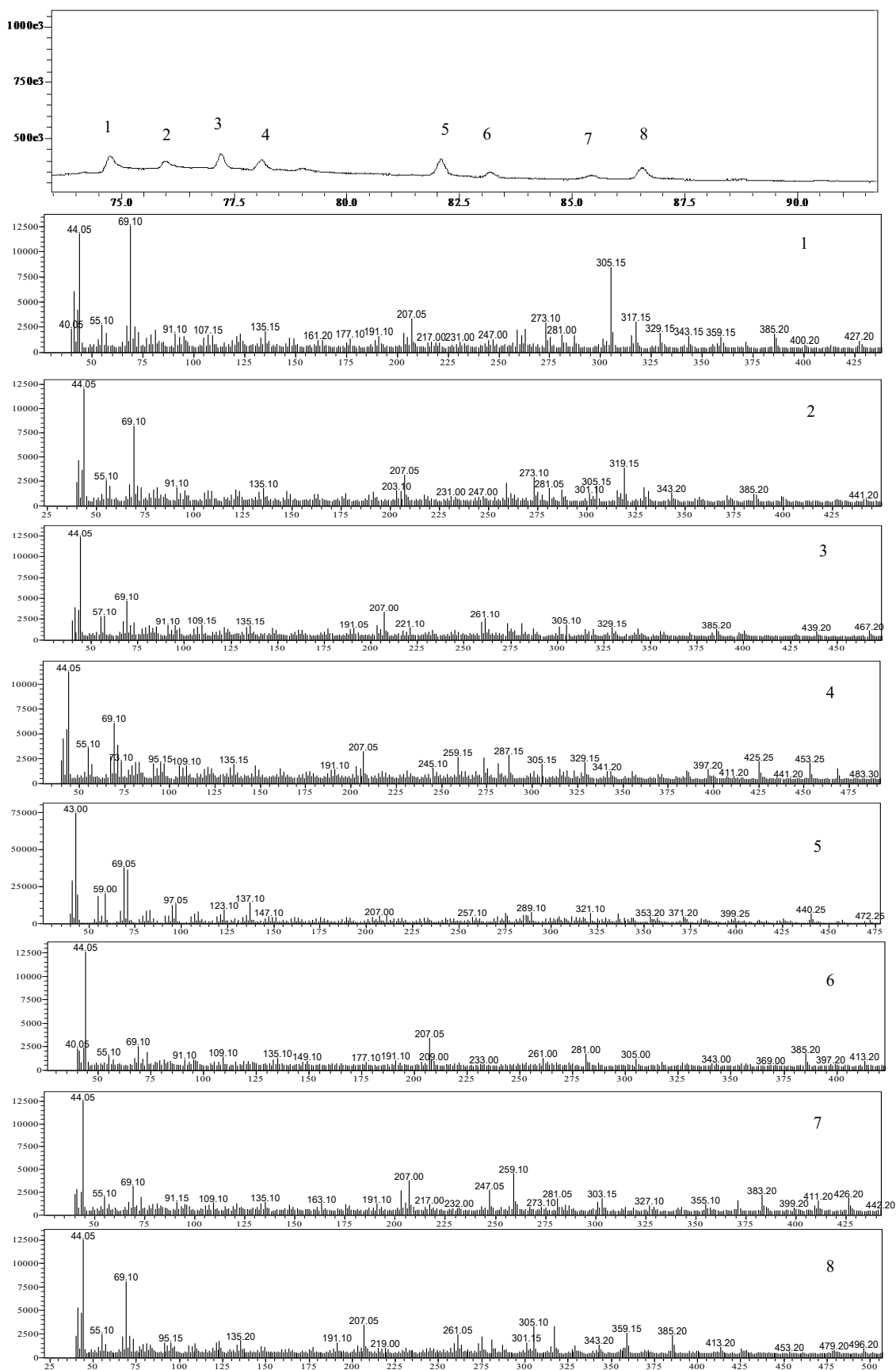


Apêndice C - Subfração C1H3- F108. Espectros de RMN  $^1\text{H}$ ,  $^{13}\text{C}$ ,  $^{13}\text{C}$  DPT-135.



Apêndice D – Cromatograma e espectros de massas de CG-EM-IE da subfração C1H3- F108.

Espectros de massa CG-EM-IE dos picos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e 8.



Apêndice E – Espectros de RMN 2D da subfração C1H2-F42: I- COSY. II-HMBC. III- HSQC.

