

JULIANA RODRIGUES

Uso sustentável da biodiversidade brasileira: prospecção químico-farmacológica
em plantas superiores: *Miconia* spp.

Dissertação apresentada ao Instituto de Química,
Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Química.

Orientadora: Profa. Dra. Lourdes Campaner dos Santos
Co-orientador: Prof. Dr. Wagner Vilegas

Araraquara
2007

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

DADOS CURRICULARES

JULIANA RODRIGUES

DADOS PESSOAIS

- Nascimento: 05/11/1981
- Nacionalidade: Brasileira
- Naturalidade: Araraquara/SP
- Estado Civil: Solteira
- Filiação: Manoel Gilmar Rodrigues
Sonia Aparecida Doswaldto Rodrigues
- Profissão: Química
- Endereço: Avenida Jorge Biller Teixeira, 335 Araraquara-SP
- Telefone: (16) 3335 3903
- E-mail: julirodriq@yahoo.com.br

FORMAÇÃO ACADÊMICA

- Química – Licenciatura Plena
Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Concluído em 15/01/2005.
- Mestrado em Química
Área de Concentração: Química Orgânica
Instituto de Química de Araraquara, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”
Concluído em 19/01/2007

PARTICIPAÇÕES EM CONGRESSOS

- Rodrigues, J.; Rinaldo, D.; Calvo, T. R.; Tamashiro, J.; Souza-Brito, A. R. M.; Santos, L. C.; Vilegas, W. Perfil químico do extrato metanólico das folhas de espécies de *Miconia* (Melastomataceae). In: V Simpósio Brasileiro de Farmacognosia, 4 a 7 de outubro, Recife-PE, 2005.
- Rodrigues, J.; Rinaldo, D.; Calvo, T. R.; Tamashiro, J.; Souza-Brito, A. R. M.; Santos, L. C.; Vilegas, W. Perfil químico do extrato metanólico das folhas de espécies de *Miconia* (Melastomataceae). In: V Simpósio e V Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp 2005, 15 a 20 de novembro, Águas de Lindóia-SP, 2005.
- Rodrigues, J.; Santos, L. C.; Tamashiro, J.; Souza-Brito, A. R. M.; Vilegas, W. Constituintes químicos isolados das folhas de *Miconia cabucu* Hoehne (Melastomataceae). In: 29ª Reunião anual da Sociedade Brasileira de Química, 19 a 22 de maio, Águas de Lindóia-SP, 2006.
- Rodrigues, J.; Rinaldo, D.; Santos, L. C.; Tamashiro, J.; Souza-Brito, A. R. M.; Vilegas, W. Simultaneous identification of glycosides flavonoids and gallic acid in leaves of *Miconia cabucu* by solid-phase extraction and HPLC-UV-DAD. In: XV Congresso Italo Latino Americano de Etnomedicina, Perugia, Itália, 2006.
- Silva, M. A.; Rodrigues, J.; Santos, L. C.; Vilegas, W. Metabólitos secundários isolados das folhas de *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae) por HSCCC (High Speed Counter-current Chromatography). In: SIMCRO – Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, 18 a 20 de outubro, São Pedro-SP, 2006.
- Silva, M. A.; Rodrigues, J.; Santos, L. C.; Vilegas, W. Flavonóides isolados dos capítulos de *Eriocaulon ligulatum* (Eriocaulaceae) por HSCCC (High Speed Counter-current Chromatography). In: SIMCRO – Simpósio Brasileiro de Cromatografia e Técnicas Afins, 18 a 20 de outubro, São Pedro-SP, 2006.

- Participação como membro da Comissão Organizadora do V Simpósio e V Reunião de Avaliação do Programa Biota/Fapesp, 2005

TRABALHOS CIENTÍFICOS PUBLICADOS

- Santos, L. C.; Silva, M. A.; Rodrigues, C. M.; Rodrigues, J.; Rinaldo, D.; Sannomiya, M.; Vilegas, W. Fast preparative separation of flavones from capitula of *Eriocaulon ligulatum* (Vell.) L.B.Smith (Eriocaulaceae) by High-Speed Countercurrent Chromatography (HSCCC). **Rev. Bras. Cienc. Farm. Bas. Apl.**, v. 26, p. 101-103, 2005.

TRABALHOS CIENTÍFICOS SUBMETIDOS PARA PUBLICAÇÃO

- Rodrigues, J.; Rinaldo, D.; Santos, L. C.; Vilegas, W. Flavonoids from *Miconia cabucu* (Melastomataceae). **Phytochemistry**. (Submetido, 2006).
- Rinaldo, D.; Rodrigues, C. M.; Rodrigues, J.; Sannomiya, M.; Santos, L. C.; Vilegas, W.; Souza-Brito, A. R. M.; Hiruma-Lima, C. A. New flavone from the leaves of *Neea theifera* (Nyctaginaceae). **J. Braz. Chem. Soc.** (Submetido, 2006).

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à pessoa que esteve comigo em todos os momentos de minha vida e acreditou em mim mesmo quando eu mesma não acreditava.

Eternamente Mãe

Mãe...

que na presença constante me ensinou
na pureza do seu coração a vislumbrar
caminhos...

Mãe...

dos primeiros passos, das primeiras
palavras...

Mãe...

do amor sem dimensão, de cada momento,
dos atos de cada capítulo de minha vida
não ensaiados, mas vividos em cada
emoção...

Mãe...

da conversa no quintal, do acalanto do
meu sono aquecido de amor, aninhada
em seu coração...

Mãe...

do abraço, do beijo que levo na
lembrança...

Mãe...

é você que me inspira a caminhar...

Mãe...

a presença de cada passo que o
tempo não apaga: por mais longo
e escuro que seja o caminho, haverá
sempre um horizonte...

Mãe...

Mulher a quem devemos a vida,
que merece o nosso respeito,
nossa gratidão e nosso afeto.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela minha vida.

Aos meus pais e toda minha família pelo apoio e compreensão. Sei que não foi fácil me agüentar.

Ao Instituto de Química e seus professores pela formação.

À minha orientadora Lourdes Campaner dos Santos pela dedicação, paciência e atenção como orientadora e amiga.

Ao meu co-orientador Wagner Vilegas pelos ensinamentos, apoio e amizade.

Aos companheiros e amigos de laboratório Adriana, Ana Lucia, Ana Eliza, Carol, Clenilson, Daniele, Ju Gomes, Ju Severi, Kamilla, Malu, Marcelo, Márcio, Miriam e Tamara. E um obrigado especial ao Daniel. Muito obrigada pela ajuda e amizade.

Aos amigos de graduação, que fizeram e ainda fazem parte de minha vida.

Aos amigos e colegas que fiz durante minha graduação e mestrado.

Às funcionárias da Biblioteca pela grande ajuda dispensada.

Às funcionárias da Seção de pós-graduação pela atenção.

Ao Nivaldo pelos espectros e paciência.

Aos funcionários e professores do departamento de Química Orgânica, que de alguma forma contribuíram para a realização desse trabalho.

Aos professores e alunos que realizaram os ensaios biológicos.

À Capes pela bolsa concedida.

Ao programa Biota/Fapesp pelo suporte financeiro.

Você não pode ensinar nada a um homem;
Você pode apenas ajudá-lo a encontrar a resposta dentro dele mesmo.

Galileu Galilei

ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ara(f)	Arabinofuranose
ara(p)	Arabinopirranose
CC	Cromatografia em Coluna
CCC	Cromatografia em Contracorrente
CCDC	Cromatografia em Camada Delgada Comparativa
CIM	Concentração Inibitória Mínima
COSY	<i>C</i> Orrelated <i>S</i> pectroscop <i>Y</i>
cum	Cumaroil
<i>d</i>	Dubleto
<i>dd</i>	Duplo dubleto
d.i.	Diâmetro interno
DMSO- <i>d</i> ₆	Dimetilsulfóxido deuterado
Fr.	Fração
gal	Galactose
glc	Glicose
HMBC	<i>H</i> eteronuclear <i>M</i> ultiple <i>B</i> ond <i>C</i> orrelations
HMQC	<i>H</i> eteronuclear <i>M</i> ultiple <i>Q</i> uantum <i>C</i> oherence
HPLC-UV-DAD	<i>H</i> igh <i>P</i> erformance <i>L</i> iquid <i>C</i> hromatography with <i>D</i> iode <i>A</i> rray <i>D</i> etector
HSCCC	<i>H</i> igh <i>S</i> peed <i>C</i> ounter- <i>C</i> urrent <i>C</i> hromatography
Hz	Hertz
IV	Infravermelho
<i>J</i>	Constante de acoplamento
<i>m/z</i>	Massa/carga
<i>m</i>	Multiplete
MABA	<i>M</i> icroplate <i>A</i> lamar <i>B</i> lue <i>A</i> ssay
MC	<i>M</i> iconia <i>c</i> abucu
MR	<i>M</i> iconia <i>r</i> ubiginosa
NOESY	<i>N</i> uclear <i>O</i> verhause <i>E</i> ffect <i>S</i> pectroscopy
NP/PEG	Natural product-Polyethilenglycol Reagent
PVPP	Polivinilpolipirrolidona
rha	Rhamnose
Rf	Fator de Retenção
RMN- ¹³ C	Ressonância Magnética Nuclear de Carbono
RMN- ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio
<i>s</i>	Singleto
<i>sl</i>	Singleto largo

SPE	<i>Solid-phase Extraction</i>
<i>t</i>	Tripleto
TFA	Ácido trifluoroacético
TMS	Tetrametilsilano
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral α
TOCSY	<i>TOtally Correlated SpectroscopY</i>
UV	Ultravioleta
xyl	Xylose
δ	Deslocamento químico

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Metabólitos isolados de espécies da família Melastomataceae.	24
Tabela 2. Quantidade de massa obtida após maceração das folhas das espécies estudadas	35
Tabela 3. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C da substância MC1 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	44
Tabela 4. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C da substância MC2 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	46
Tabela 5. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C e experimentos bidimensionais da substância MC3 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).	51
Tabela 6. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C da substância MC4 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	53
Tabela 7. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C da substância MC5 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	55
Tabela 8. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C da substância MC6 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	57
Tabela 9. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C da substância MC7 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	59
Tabela 10. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C da substância MC8 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	61
Tabela 11. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C da substância MR1 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	66
Tabela 12. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C da substância MR2 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	68
Tabela 13. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H das substâncias MR3 e MR4 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	70
Tabela 14. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹³ C das substâncias MR3 e MR4 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	71
Tabela 15. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C da substância MR5 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	73
Tabela 16. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C da substância MR6 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).....	74

Tabela 17. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C da substância MR7 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- <i>d</i> ₆).....	75
Tabela 18. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ¹ H e RMN- ¹³ C da substância MR8 (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- <i>d</i> ₆).....	77
Tabela 19. Atividade antimicrobiana dos extratos das espécies de <i>Miconia</i>	81
Tabela 20. Concentração Inibitória Mínima (CIM) mostrada pelos extratos das espécies de <i>Miconia</i> (mg/mL).	81
Tabela 21. Determinação de H ₂ O ₂ em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss em presença de extratos das espécies de <i>Miconia</i>	82
Tabela 22. Determinação de NO em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss em presença de extratos das espécies de <i>Miconia</i>	83
Tabela 23. Determinação de TNF- α em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss em presença de extratos das espécies de <i>Miconia</i>	84
Tabela 24. Atividade dos extratos das espécies de <i>Miconia</i> contra <i>Mycobacterium tuberculosis</i>	86
Tabela 25. Atividade analgésica dos extratos das espécies de <i>Miconia</i> estudadas.	87
Tabela 26. Atividade antiinflamatória dos extratos de <i>Miconia</i>	88
Tabela 27. Atividade mutagênica expressa pela média, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) na linhagem TA98 de <i>Salmonella typhimurium</i> expostas à várias doses dos extratos das espécies de <i>Miconia</i> estudadas, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica.....	91

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Folhas da <i>Miconia cabucu</i> Hoehne.....	23
Figura 2. <i>Miconia rubiginosa</i> (Bonpl.) DC: a) Folhas; b) Flores.....	23
Figura 3. Substâncias isoladas das espécies de <i>Miconia</i> estudadas neste trabalho.	28
Figura 4. Cromatograma representando o perfil do extrato EMeOH das folhas de <i>M. cabucu</i> (RP-18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A: H ₂ O + 0,05% TFA; Solvente B: ACN + 0,05% TFA. Gradiente de 32-35% de B em A em 20 min, de 35-75% de B até 60 min e 75-100% de B até 65 min; fluxo de 1,0 mL.min ⁻¹ , λ 254 nm) e espectros de UV dos picos destacados.	38
Figura 5. Cromatograma representando o perfil do extrato EMeOH das folhas de <i>M. rubiginosa</i> (RP-18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A: H ₂ O + 0,05% TFA; Solvente B: ACN + 0,05% TFA. Gradiente de 32-35% de B em A em 20 min, de 35-75% de B até 60 min e 75-100% de B até 65 min; fluxo de 1,0 mL.min ⁻¹ , λ 254 nm) e espectros de UV dos picos destacados.	39
Figura 6. Cromatograma das substâncias MC1 e MC2 (C ₁₈ , 250 x 4,60 mm d.i. x 5 µm; Solvente A: H ₂ O + 0,05% TFA; Solvente B: ACN + 0,05% TFA. Gradiente de 32-35% de B em 20 min, de 35-75% de B até 60 min e 75-100% de B até 65 min; fluxo de 1,0 mL.min ⁻¹ , λ 254 nm) e espectros no UV das substâncias presentes. O espectro a) trata-se do padrão comercial do ácido gálico.	42
Figura 7. Quercetina-3- <i>O</i> -β-xylopiranosil-(1→2)- <i>O</i> -α-rhamnopiranosídeo (MC1).....	45
Figura 8. Ácido gálico (MC2).....	46
Figura 9. Espectro de IV da substância MC3 (pastilha de KBr).....	47
Figura 10. Espectro de UV da substância MC3 (MeOH).	47
Figura 11. Espectro de massas de alta resolução e fragmentações da substância MC3	48
Figura 12. 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona-(6-C-6'')-5''-hidroxi-3''',4''',7''-trimetoxiflavona (MC3).	52
Figura 13. Miricetina-3- <i>O</i> -β-xylopiranosil-(1→2)- <i>O</i> -α-rhamnopiranosídeo (MC4).....	54
Figura 14. Quercetina-3- <i>O</i> -α-rhamnopiranosídeo (MC5).	55
Figura 15. Miricetina-3- <i>O</i> -α-rhamnopiranosídeo (MC6).	57

Figura 16. Quercetina-3- <i>O</i> - β -glicopiranosídeo (MC7).....	59
Figura 17. Kaempferol-3- <i>O</i> - β -(6"-cumaroil)-glicopiranosídeo (MC8).	62
Figura 18. Quercetina-3- <i>O</i> - α -arabinofuranosídeo (MR2).	68
Figura 19. Quercetina-3- <i>O</i> - α -arabinopiranosídeo (MR3) e quercetina-3- <i>O</i> - β - arabinopiranosídeo (MR4).	71
Figura 20. Epicatequina (MR5).	73
Figura 21. Quercetina-3- <i>O</i> - β -galactopiranosídeo (MR7).	75
Figura 22. Quercetina-3- <i>O</i> - α -rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 4)- <i>O</i> - β -galactopiranosídeo (MR8).....	77

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1. Preparação dos extratos das folhas de <i>M. cabucu</i> e <i>M. rubiginosa</i>	36
Esquema 2. Etapas de preparação dos extratos EMeOH das folhas de <i>M. cabucu</i> e <i>M. rubiginosa</i> para análise por HPLC-UV-DAD.	37
Esquema 3. Fracionamento do extrato EMeOH das folhas de <i>M. cabucu</i>	41
Esquema 4. Fracionamento do extrato EMeOH das folhas de <i>M. rubiginosa</i>	64

LISTA DE ESPECTROS

Espectro 1. RMN- ¹ H das substâncias MC1 e MC2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	103
Espectro 2. RMN- ¹³ C das substâncias MC1 e MC2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	104
Espectro 3. 1D-TOCSY da rhamnose da substância MC1 – H1” (δ 5,30) irradiado (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	105
Espectro 4. 1D-TOCSY da xylose da substância MC1 – H1”’ (δ 4,16) irradiado (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	105
Espectro 5. gHMBC das substâncias MC1 e MC2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	106
Espectro 6. COSY das substâncias MC1 e MC2 – expansão na região de 2,6 a 4,4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	106
Espectro 7. RMN- ¹ H da substância MC3 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	107
Espectro 8. RMN- ¹³ C da substância MC3 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	108
Espectro 9. gHMQC da substância MC3 – expansão nas regiões de 1,0 a 4,3 e 15 a 73 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	109
Espectro 10. gHMQC da substância MC3 – expansão nas regiões de 6,7 a 8,1 e 87 a 130 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	109
Espectro 11. gHMBC da substância MC3 – expansão nas regiões de 1,8 a 4,4 e 145 a 170 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	110
Espectro 12. gHMBC da substância MC3 – expansão nas regiões de 6,5 a 8,2 e 101 a 126 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	110
Espectro 13. gHMBC da substância MC3 – expansão nas regiões de 6,5 a 8,4 e 147 a 169 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	111
Espectro 14. COSY da substância MC3 – expansão na região de 6,6 a 8,4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	111
Espectro 15. gNOESY da substância MC3 – expansão na região de 6,7 a 8,2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	112
Espectro 16. 1D-NOESY da substância MC3 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	112
Espectro 17. 1D-NOESY da substância MC3 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	113
Espectro 18. 1D-NOESY da substância MC3 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	113
Espectro 19. RMN- ¹ H da substância MC4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 7,04 T).....	114
Espectro 20. RMN- ¹³ C da substância MC4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 7,04 T).....	115
Espectro 21. 1D-TOCSY da rhamnose da substância MC4 – H1” (δ 5,22) irradiado (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	116
Espectro 22. 1D-TOCSY da xylose da substância MC4 – H1”’ (δ 4,14) irradiado (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	116
Espectro 23. gHMBC da substância MC4 – expansão nas regiões de 2,7 a 5,6 e 66 a 83 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	117
Espectro 24. COSY da substância MC4 – expansão na região de 2,6 a 4,5 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	117
Espectro 25. RMN- ¹ H da substância MC5 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	118
Espectro 26. RMN- ¹³ C da substância MC5 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	119
Espectro 27. 1D-TOCSY da rhamnose da substância MC5 – H1” (δ 5,25) irradiado (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	120
Espectro 28. gHMBC da substância MC5 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	120
Espectro 29. COSY da substância MC5 – expansão na região de 0,5 a 4,3 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	121
Espectro 30. RMN- ¹ H da substância MC6 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 7,04 T).....	122

Espectro 31. RMN- ¹³ C da substância MC6 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	123
Espectro 32. 1D-TOCSY da rhamnose da substância MC6 – H1” (δ 5,20) irradiado (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	124
Espectro 33. COSY da substância MC6 – expansão na região de 2,9 a 4,2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	124
Espectro 34. RMN- ¹ H da substância MC7 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	125
Espectro 35. gHMQC da substância MC7 – expansão nas regiões de 5,3 a 7,8 e 90 a 125 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	126
Espectro 36. COSY da substância MC7 – expansão na região de 2,8 a 5,6 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	126
Espectro 37. RMN- ¹ H da substância MC8 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	127
Espectro 38. RMN- ¹³ C da substância MC8 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	128
Espectro 39. 1D-TOCSY da glicose da substância MC8 – H1” (δ 5,45) irradiado (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	129
Espectro 40. gHMBC da substância MC8 – expansão nas regiões de 3,5 a 4,6 e 160 a 174 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	129
Espectro 41. COSY da substância MC8 – expansão na região de 3,0 a 5,8 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	130
Espectro 42. COSY da substância MC8 – expansão na região de 5,8 a 8,2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	130
Espectro 43. RMN- ¹ H da substância MR1 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	131
Espectro 44. RMN- ¹³ C da substância MR1 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	132
Espectro 45. 1D-TOCSY da rhamnose da substância MR1 – H1” (δ 5,24) irradiado (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	133
Espectro 46. RMN- ¹ H da substância MR2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	134
Espectro 47. RMN- ¹³ C da substância MR2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	135
Espectro 48. 1D-TOCSY da arabinofuranose da substância MR2 – H1” (δ 5,55) irradiado (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	136
Espectro 49. gHMBC da substância MR2 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	136
Espectro 50. COSY da substância MR2 – expansão na região de 2,8 a 4,5 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	137
Espectro 51. RMN- ¹ H das substâncias MR3 e MR4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	138
Espectro 52. RMN- ¹³ C das substâncias MR3 e MR4 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	139
Espectro 53. 1D-TOCSY da α -arabinopiranosose da substância MR3 – H1” (δ 5,27) irradiado (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	140
Espectro 54. 1D-TOCSY da β -arabinopiranosose da substância MR4 – H1” (δ 5,34) irradiado (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	140
Espectro 55. gHMBC das substâncias MR3 e MR4 – expansão nas regiões de 4,9 a 5,7 e 130 a 138 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	141
Espectro 56. COSY das substâncias MR3 e MR4 – expansão na região de 5,0 a 5,7 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	141
Espectro 57. COSY das substâncias MR3 e MR4 – expansão na região de 2,7 a 4,0 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	142
Espectro 58. RMN- ¹ H da substância MR5 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	143
Espectro 59. RMN- ¹³ C da substância MR5 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	144
Espectro 60. RMN- ¹ H da substância MR6 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	145
Espectro 61. RMN- ¹³ C da substância MR6 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	146
Espectro 62. RMN- ¹ H da substância MR7 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	147
Espectro 63. RMN- ¹³ C da substância MR7 (DMSO- <i>d</i> ₆ , 11,7 T).....	148
Espectro 64. 1D-TOCSY da galactose da substância MR7 – H1” (δ 5,35) irradiado	

(DMSO- d_6 , 11,7 T).....	149
Espectro 65. gHMBC da substância MR7 (DMSO- d_6 , 11,7 T).....	149
Espectro 66. COSY da substância MR7 – expansão na região de 3,0 a 5,6 (DMSO- d_6 , 11,7 T).....	150
Espectro 67. RMN- ^1H da substância MR8 (DMSO- d_6 , 11,7 T).....	151
Espectro 68. 1D-TOCSY da galactose da substância MR8 – H1'' (δ 5,30) irradiado (DMSO- d_6 , 11,7 T).....	152
Espectro 69. 1D-TOCSY da rhamnose da substância MR8 – H1''' (δ 4,38) irradiado (DMSO- d_6 , 11,7 T).....	152
Espectro 70. gHMQC da substância MR8 – expansões nas regiões de 4,0 a 8,0 e 90 a 124 (DMSO- d_6 , 11,7 T).....	153
Espectro 71. gHMBC da substância MR8 – expansões nas regiões de 4,8 a 6,0 e 120 a 143 (DMSO- d_6 , 11,7 T).....	153
Espectro 72. gHMBC da substância MR8 – expansões nas regiões de 2,8 a 4,8 e 62 a 80 (DMSO- d_6 , 11,7 T).....	154

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	21
1.1 A Família Melastomataceae	22
2 OBJETIVOS.....	30
2.1 Objetivo Geral	30
2.2 Objetivos Específicos	30
3 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS	31
3.1 Solventes.....	31
3.2 Procedimentos Cromatográficos.....	31
3.3 Reveladores para CCDC.....	32
3.4 Equipamentos	33
4 ESTUDO QUÍMICO	35
4.1 Coleta e Obtenção dos Extratos de <i>Miconia cabucu</i> e <i>Miconia rubiginosa</i>	35
4.2 Perfil Cromatográfico dos Extratos Metanólicos de <i>Miconia cabucu</i> e <i>Miconia rubiginosa</i>	36
4.3 Fracionamento e Isolamento do Extrato Metanólico das Folhas de <i>Miconia cabucu</i>	40
4.4 Elucidação Estrutural das Substâncias Isoladas do Extrato Metanólico das Folhas de <i>Miconia cabucu</i>	42
<i>Identificação das substâncias MC1 e MC2</i>	42
<i>Identificação da substância MC3</i>	46
<i>Identificação da substância MC4</i>	52
<i>Identificação da substância MC5</i>	54
<i>Identificação da substância MC6</i>	56
<i>Identificação da substância MC7</i>	58
<i>Identificação da substância MC8</i>	60
4.5 Fracionamento do Extrato Metanólico das Folhas de <i>Miconia rubiginosa</i>	62
4.6 Elucidação Estrutural das Substâncias Isoladas do Extrato Metanólico das Folhas de <i>Miconia rubiginosa</i>	65
<i>Identificação da substância MR1</i>	65
<i>Identificação da substância MR2</i>	66
<i>Identificação das substâncias MR3 e MR4</i>	69
<i>Identificação da substância MR5</i>	72

<i>Identificação da substância MR6</i>	73
<i>Identificação da substância MR7</i>	74
<i>Identificação da substância MR8</i>	76
5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	79
5.1. Atividade Antimicrobiana.....	80
5.2 Atividade Imunológica.....	82
5.3 Atividade Antituberculose.....	84
5.4 Atividade Analgésica.....	86
5.5 Atividade Antiinflamatória.....	87
5.6 Atividade Mutagênica.....	88
6 CONCLUSÕES.....	93
7 REFERÊNCIAS.....	95

RESUMO

A utilização de plantas para tratamento e prevenção de doenças é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. Porém, apenas uma pequena fração das espécies conhecidas de plantas foram investigadas pela ciência. Assim, as plantas medicinais constituem um fascinante assunto de pesquisa acadêmica e de desenvolvimento.

As espécies estudadas neste projeto foram *Miconia cabucu* Hoehne e *Miconia rubiginosa* (Bonpl.) DC, pertencentes à família Melastomataceae.

As espécies foram coletadas no Estado de São Paulo e os extratos clorofórmico e metanólico foram preparados. Através do perfil cromatográfico das espécies evidenciou-se a presença de taninos, flavonóides, ácidos fenólicos e derivados de catequina. Os extratos EMeOH das folhas de ambas as espécies foram particionados com AcOEt e água.

A fração AcOEt da *M. cabucu* foi fracionada por cromatografia de permeação em gel utilizando Sephadex LH-20, que possibilitou o isolamento da quercetina-3-*O*- β -xylopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -rhamnopiranosídeo, quercetina-3-*O*- α -rhamnopiranosídeo, miricetina-3-*O*- α -rhamnopiranosídeo, quercetina-3-*O*- β -glicopiranosídeo, kaempferol-3-*O*- β -(6"-cumaroil)-glicopiranosídeo, miricetina-3-*O*- β -xylopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -rhamnopiranosídeo, ácido gálico e 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona-(6-C-6'')-5''-hidroxi-3''',4''',7''-trimetoxiflavona. Este último é um biflavonóide derivado de uma unidade de luteolina e uma de apigenina e é inédito na literatura.

A fração AcOEt da *M. rubiginosa* foi fracionada por Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade (HSCCC), sendo isolados os compostos quercetina-3-*O*- α -rhamnopiranosídeo, quercetina-3-*O*- α -arabinofuranosídeo, quercetina-3-*O*- α -arabinopiranosídeo, quercetina-3-*O*- β -arabinopiranosídeo, quercetina-3-*O*- β -galactopiranosídeo, quercetina-3-*O*- α -rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -galactopiranosídeo, epicatequina e ácido gálico.

Ambas as espécies apresentaram atividade moduladora do sistema imunológico e mutagenicidade. Além disso, *M. cabucu* foi ativa nos ensaios de atividade antimicrobiana e analgésica e *M. rubiginosa* contra o *Mycobacterium tuberculosis*.

Palavras-chaves: *Miconia cabucu*, *Miconia rubiginosa*, Melastomataceae

ABSTRACT

The use of plants for treatment and prevention of diseases is one of the most ancient ways of the medicinal practice of the mankind. However, only a little fraction of the known species of plants was investigated by science. Therefore, the medicinal plants are a fascinating matter of academic and development research.

In this project we studied the species *Miconia cabucu* Hoehne and *Miconia rubiginosa* (Bonpl.) DC which belong to the Melastomataceae family.

Miconia species were collected at São Paulo State and the chloroformic and methanolic extracts were prepared. The chromatographic profiles of the species evidenced the presence of tannins, flavonoids, phenolic acids and catechin derivatives. The EMeOH were partitioned with AcOEt and water.

The AcOEt fraction of *M. cabucu* was submitted to gel permeation chromatography over Sephadex LH-20, that allowed the isolation of quercetin-3-*O*- β -xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -rhamnopyranoside, quercetin-3-*O*- α -rhamnopyranoside, myricetin-3-*O*- α -rhamnopyranoside, quercetin-3-*O*- β -glucopyranoside, kaempferol-3-*O*- β -(6''-coumaroyl)-glucopyranoside, myricetin-3-*O*- β -xylopyranosyl-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -rhamnopyranoside, gallic acid and 5-hydroxy-4',7-dimethoxyflavone-(6-C-6'')-5''-hydroxy-3''',4''',7''-trimethoxyflavone. This latter is a novel biflavonoid derived from luteolin and apigenin unities.

The AcOEt fraction of *M. rubiginosa* was fractioned by High Speed Counter-current Chromatography (HSCCC), that afforded quercetin-3-*O*- α -rhamnopyranoside, quercetin-3-*O*- β -arabinofuranoside, quercetin-3-*O*- α -arabinopyranoside, quercetin-3-*O*- β -arabinopyranoside, quercetin-3-*O*- β -galactopyranoside, quercetin-3-*O*- α -rhamnopyranosyl-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -galactopyranoside, (-)-*epi*-catechin and gallic acid.

Both the extracts evidenced immunomodulatory and mutagenic activities. The *M. cabucu* was active in antimicrobial and analgesic assays and *M. rubiginosa* against *Mycobacterium tuberculosis*.

Keywords: *Miconia cabucu*, *Miconia rubiginosa*, Melastomataceae.

1 INTRODUÇÃO

A utilização de plantas com fins medicinais, para tratamento, cura e prevenção de doenças, é uma das mais antigas formas de prática medicinal da humanidade. No início da década de 1990, a Organização Mundial de Saúde (OMS) divulgou que 65-80% da população dos países em desenvolvimento dependiam das plantas medicinais como única forma de acesso aos cuidados básicos de saúde (VEIGA JÚNIOR et al., 2005).

O conhecimento sobre plantas medicinais, portanto, simboliza muitas vezes o único recurso terapêutico de muitas comunidades e grupos étnicos. O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana. Ainda hoje nas regiões mais pobres do país e até mesmo nas grandes cidades brasileiras, plantas medicinais são comercializadas em feiras livres, mercados populares e encontradas em quintais residenciais e são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação de suas propriedades farmacológicas (MACIEL et al., 2002).

Esse costume é perigoso, pois segundo Veiga Júnior et al. (2005) a toxicidade de plantas medicinais e fitoterápicos é um problema sério de saúde pública, já que as pesquisas realizadas para a avaliação do uso seguro ainda são incipientes no Brasil.

O mercado mundial de fitoterápicos movimentava cerca de US\$ 22 bilhões por ano e vem seduzindo a cada ano mais adeptos nos países desenvolvidos. A balança comercial brasileira é altamente deficitária neste item. O país importa uma quantidade considerável de hormônios esteroidais, produtos cosméticos de fonte natural, verdadeiro contra-senso para uma nação que possui uma das maiores populações vegetais do planeta (PINTO et al., 2002).

O Brasil, sendo o país com a maior diversidade genética vegetal do mundo – mais de 55.000 espécies catalogadas num total estimado entre 350.000 e 550.000 (SIMÕES et al., 2001), tem apenas 8% de suas espécies vegetais estudadas, visando compostos bioativos, e apenas 1.100 espécies avaliadas em suas propriedades medicinais (GARCIA et al., 1996).

Esse imenso patrimônio genético, já escasso nos países desenvolvidos, tem na atualidade valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades, mas é no

campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade (CALIXTO, 2003).

Apesar de todo esse potencial, apenas uma pequena fração das espécies conhecidas de plantas foram investigadas pela ciência. Assim, as plantas medicinais ainda são pouco conhecidas e constituem um fascinante assunto de pesquisa acadêmica e de desenvolvimento (CRAGG; NEWMAN, 2005).

Dentro deste contexto, nosso grupo de pesquisa já estudou várias espécies de plantas do Cerrado do Estado de São Paulo, com o objetivo de obter informações sobre a composição química e farmacológica de plantas utilizadas pela população. Portanto, neste trabalho estudamos espécies do gênero *Miconia*, pertencente à família Melastomataceae.

1.1 A Família Melastomataceae

A família Melastomataceae apresenta cerca de 4300 espécies, distribuídas em 166 gêneros, sendo que o mais representativo é o gênero *Miconia* (MARTINS et al., 1996), com aproximadamente 1000 espécies, distribuídas ao longo da América tropical. No Brasil estão representadas cerca de 250 espécies, das quais 64 ocorrem no estado de São Paulo (MARTINS et al., 1996).

Miconia cabucu Hoehne e *Miconia rubiginosa* (Bonpl.) DC são conhecidas popularmente como "Pixiricão" e "Capiroquinha", respectivamente (ALONSO et al., 2006).

Miconia cabucu Hoehne é encontrada na Mata Atlântica, nos Estados de São Paulo, Paraná e Santa Catarina. São árvores possuindo de 5 a 12 metros de altura, folhas ovais e flores pentâmeras ou hexâmeras (BASE DE DADOS TROPICAL, 2005), como mostra a Figura 1.

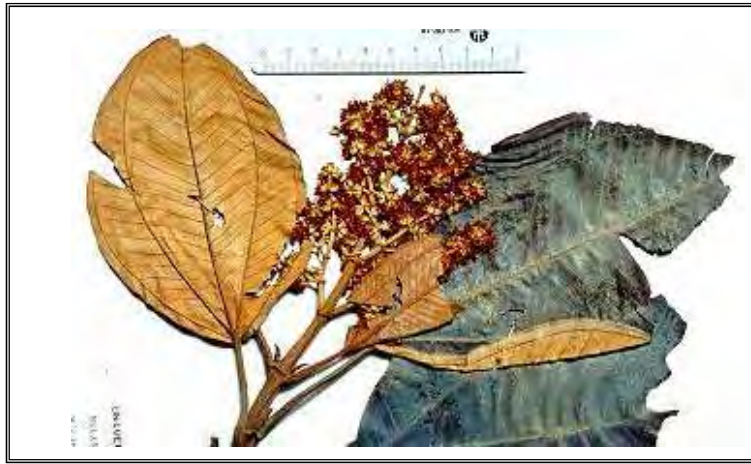


Figura 1. Folhas da *Miconia cabucu* Hoehne.

Miconia rubiginosa (Bonpl.) DC é comumente encontrada nos cerrados brasileiros, nos estados de Mato Grosso, Goiás, Bahia, Minas Gerais e São Paulo. São arbustos com cerca de 1 metro ou arvoretas com até 5 metros de altura. Possui folhas ovais e flores pentâmeras com pétalas brancas, ilustradas na Figura 2 (BASE DE DADOS TROPICAL, 2005).

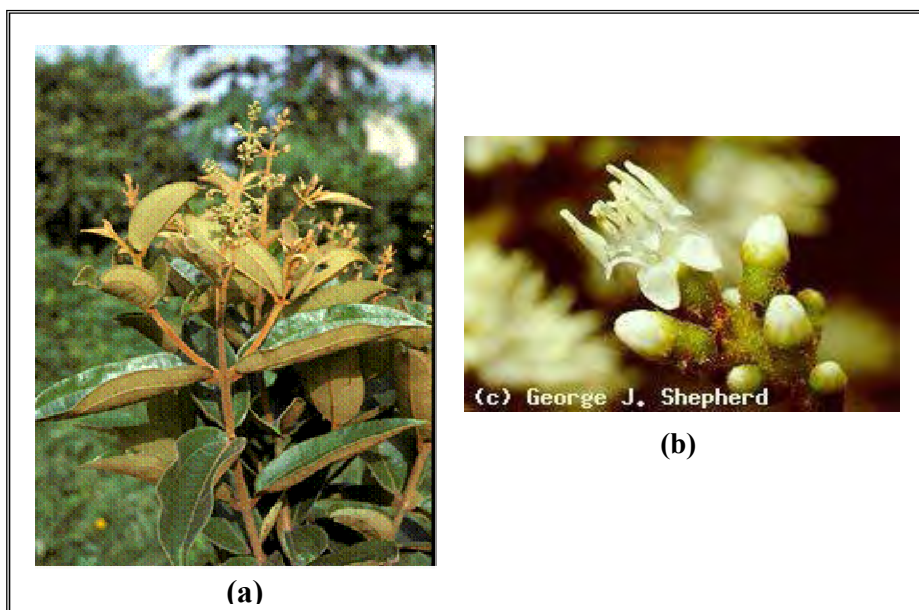


Figura 2. *Miconia rubiginosa* (Bonpl.) DC: a) Folhas; b) Flores.

A química da família Melastomataceae ainda é pouco conhecida. A partir das informações apresentadas na Tabela 1 pode-se verificar uma variedade de classes de metabólitos secundários presentes nas poucas espécies investigadas. Algumas substâncias, como os derivados de taninos hidrolisáveis e flavonóides, parecem ser comuns nestas espécies, enquanto que outras classes, como os terpenos e quinonas, ocorrem raramente.

Tabela 1. Metabólitos isolados de espécies da família Melastomataceae.

Espécie	Substâncias isoladas	Classe	Referências
<i>Bredia tuberculata</i>	Brediatina A e B; taninos monoméricos e diméricos	Taninos hidrolisáveis	YOSHIDA et al., 1994
<i>Huberia carvalhoi</i> Baumgratz	Apigenina; apigenina-7-O-glc; quercetina-3-O-glc	Flavonóides	MIMURA et al., 2004
<i>Huberia consimilis</i> DC.	Apigenina; apigenina-7-O-glc	Flavonóides	MIMURA et al., 2004
<i>Huberia espirito-santensis</i> Baumgratz	Apigenina; kaempferol; kaempferol-3-O-(gal-xy); quercetina-3-O-glc; quercetina-3-O-rha-glc	Flavonóides	MIMURA et al., 2004
<i>Huberia glazioviana</i> Cong.	Apigenina; apigenina-C-glc; apigenina-7-O-glc; apigenina-7-O-glc-rha; luteolina-7-O-glc; quercetina-3-O-glc; quercetina-3-O-rha-glc	Flavonóides	MIMURA et al., 2004
<i>Huberia minor</i> Cong.	Apigenina; kaempferol-3-O-(gal-xy); kaempferol-3-O-(glc-rha); quercetina-3-O-gal; quercetina-3-O-glc; quercetina-3-O-rha-glc	Flavonóides	MIMURA et al., 2004
<i>Huberia nettoana</i> Brade	Apigenina; luteolina; quercetina; quercetina-3-O-ara; quercetina-3-O-glc; quercetina-3-O-rha-glc	Flavonóides	MIMURA et al., 2004
<i>Huberia ovalifolia</i> Baumgratz	Apigenina; apigenina-7-O-(glc-rha); luteolina; kaempferol-3-O-glc; quercetina-3-O-glc; quercetina-3-O-rha-glc	Flavonóides	MIMURA et al., 2004
<i>Huberia semiserrata</i> DC.	Apigenina; luteolina; kaempferol; kaempferol-3-O-ara; kaempferol-3-O-glc; quercetina-3-O-gal; quercetina-3-O-glc; quercetina-3-O-rha-glc	Flavonóides	MIMURA et al., 2004

Espécie	Substâncias isoladas	Classe	Referências
<i>Henriettella fascicularis</i> (Sw.) C. Wright	4',5,7-triidroxi-6,8-dimetilisoflavona; ácido (2 <i>E</i> ,6 <i>S</i>)-6-[(1 <i>R</i> ,5 <i>Z</i> ,3 <i>aS</i> ,9 <i>R</i> ,10 <i>Z</i> ,12 <i>aR</i>)-1,2,3,3 <i>a</i> ,4,7,8,9,12,12 <i>a</i> -decaidro-9-hidroxi-3 <i>a</i> ,6,10-trimetilciclopentanocicloundecen-1- <i>il</i>]-2-metilept-2-enóico (ácido sesterterpenóico); ácido betulínico; ácido palmítico; β-sitosterol; liquexantona; (-)-pinoresinol	Flavonóides e terpenos	CALDERÓN et al., 2002
<i>Henriettella fascicularis</i> (Sw.) C. Wright	Taxifilina e ácido 3,3-di- <i>O</i> -metilelágico-4-β-D-glc	Derivados do ácido elágico	CALDERÓN et al., 2003
<i>Melastoma malabathricum</i>	Malabatrina B, C e D; isoquercitrina-6''- <i>O</i> -galato; 1,4,6-tri- <i>O</i> -galoil-β-D-glc; 1,2,4,6-tetra- <i>O</i> -galoil-β-D-glc; estricina; casuarictina; pedunculagina; nobotanino D; pterocarina; nobotanino B, G, H e J	Taninos hidrolisáveis e flavonóides	YOSHIDA et al., 1992
<i>Monochaetum multiflorum</i> (Bompl.) Naudin	Ácido 4- <i>O</i> -(6'- <i>O</i> -galoil-β-glc)- <i>cis-p</i> -cumárico; 6'- <i>O</i> -galoilprunasina (ou o isômero sambunigrina); benzil 6'- <i>O</i> -galoil-β-D-glc; monocaetina; trifolina; hiperina; quercetina-3-(6'- <i>O</i> -cafeoil)-β-D-gal; isoquercitrina	Taninos hidrolisáveis e flavonóides	ISAZA et al., 2001
<i>Monochaetum multiflorum</i>	Melastoflorinas A-D	Taninos hidrolisáveis	YOSHIDA et al., 2005
<i>Tibouchina multiflora</i>	Nobotaninos O e P	Taninos hidrolisáveis	YOSHIDA et al., 1999
<i>Tibouchina semidecandra</i>	Malvidina-3-(<i>p</i> -cumaroilglc)-5-glc	antocianidinas	HARBORNE, 1964
<i>Tibouchina urvilleana</i>	Malvidina-3-(<i>p</i> -cumaroilglc)-5-acetilxyl	antocianidinas	TERAHARA et al., 1993

Quanto aos estudos farmacológicos, as espécies da família Melastomataceae apresentam diversas atividades biológicas. Consta na literatura que a *Melastoma malabathrium* apresentou atividade antiviral significativa contra poliovírus e moderada contra HSV-1 (DÉVÉHAT et al., 2002), um dos vírus causador da herpes. Os autores também comprovaram o efeito citotóxico desta espécie em células leucêmicas. Omulokoli et al. (1997) avaliaram a atividade da *Dissotis brazzae* Cogn. em testes *in vitro* com *Plasmodium falciparum*, o parasita causador da malária, que causa alta mortalidade em regiões tropicais da África, Ásia e América do Sul. O composto 4',5,7-triidroxi-6,8-dimetilisoflavona, isolado de *Henriettella fascicularis* (Sw.) C. Wright, apresentou moderada atividade em células Ishikawa (adenocarcinoma endometrial humano) (CALDERÓN et al., 2002).

Quanto ao estudo químico das espécies do gênero *Miconia*, o extrato diclorometano de *M. stenostachya* foi estudado por Cunha et al. (2003). Neste estudo os autores isolaram e identificaram o ácido ursólico, ácido oleanólico, ácido sumaresinólico e o ácido gipsogênico. Os triterpenos ácido urjnólico, ácido oleanólico e ácido ursólico foram isolados do extrato diclorometano de *M. ligustroides*, enquanto que ácido ursólico; ácido 2 α -hidroxiursólico e ácido máslico foram identificados na espécie *M. sellowiana* (CUNHA et al., 2006). Do extrato etanólico das folhas de *M. stenostachya* foram isolados e identificados o ácido sumaresinólico e o ácido 3-*epi*-sumaresinólico (CHAN et al., 1992). Do extrato etanólico de *M. trailii* (ZHANG et al., 2003) foram isoladas duas flavanonas glicosiladas, a mateucinol-7-*O*- α -L-arabinopiranosil-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -D-glicopiranosídeo conhecida como miconiosídeo A e farrerol-7-*O*- β -D-apiofuranosil-(1 \rightarrow 6)-*O*- β -D-glicopiranosídeo conhecida como miconiosídeo B. Do extrato etanólico da *M. myriantha*, foram isolados e identificados dois compostos fenólicos, conhecidos como matucinol-7-*O*-[4'',6''-*O*-(S)-hexaidroxifenoil]- β -D-glicopiranosídeo e matucinol-7-*O*-[4'',6''-di-*O*-galoil]- β -D-glicopiranosídeo (LI et al., 2001). Do extrato acetato de etila das folhas da *M. lepidota* Gunatilaka et al. (2001) isolaram e identificaram as benzoquinonas 2-metoxi-6-heptil-1,4-benzoquinona e 2-metoxi-6-pentil-1,4-benzoquinona.

Quanto à atividade biológica desse gênero, consta na literatura que os triterpenos isolados de *M. stenostachya* possuem atividade tripanocidal (CUNHA et al., 2003), assim como os isolados de *M. ligustroides* e *M. sellowiana* (CUNHA et al., 2006).

Celotto et al. (2003) avaliaram a atividade antimicrobiana do extrato etanólico das folhas de *M. albicans*, *M. rubiginosa* e *M. stenostachya*. Spessoto et al. (2003) comprovaram a atividade analgésica dos extratos hexânico, diclorometânico e etanólico de *M. rubiginosa*. Outros estudos revelam ainda que os compostos fenólicos isolados de *M. myriantha* possuem efeitos inibitórios contra proteases aspárticas secretadas por *Cândida albicans* (LI et al., 2001). Gunatilaka et al. (2001) estudaram as benzoquinonas isoladas da *M. lepidota*, que apresentaram citotoxicidade e potencial atividade anticâncer, enquanto que Andrade e Silva et al. (2002) avaliaram a atividade analgésica do extrato etanólico de *M. fallax*.

Quanto à utilização das espécies de *Miconia* pela população existem somente relatos do uso de *M. rubiginosa* (Bonpl.) DC. no tratamento de afecções da garganta (RODRIGUES et al., 2001).

Portanto, devido à falta de informações químico-farmacológicas, neste trabalho estudamos as espécies do gênero *Miconia* (*M. cabucu* e *M. rubiginosa*).

A Figura 3 apresenta as estruturas das substâncias isoladas e identificadas nas espécies estudadas que serão discutidas neste trabalho. Os compostos isolados de *M. cabucu* foram nomeadas com o código **MC** enquanto que as substâncias isoladas de *M. rubiginosa* receberam o código **MR**.

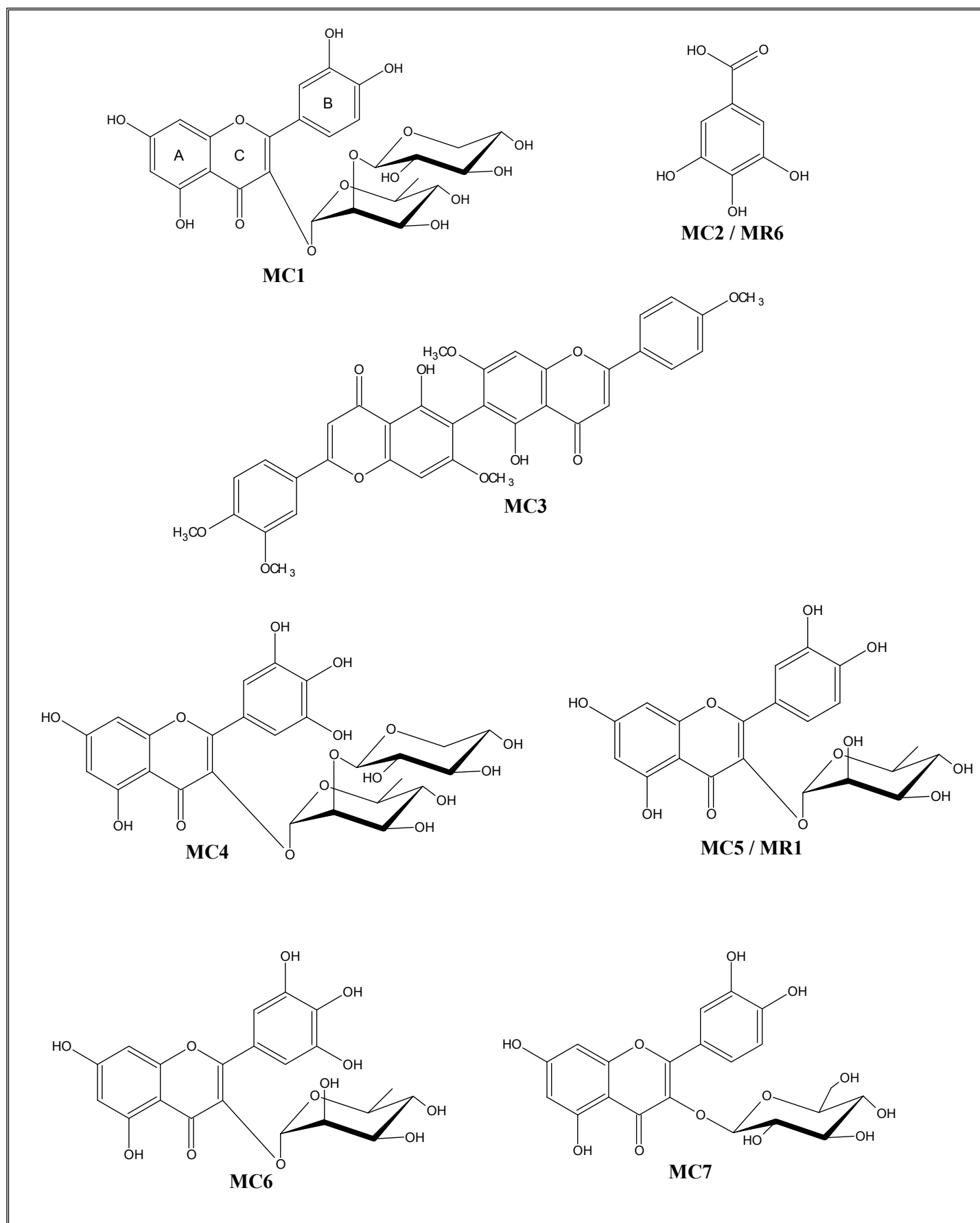


Figura 3. Substâncias isoladas das espécies de *Miconia* estudadas neste trabalho.

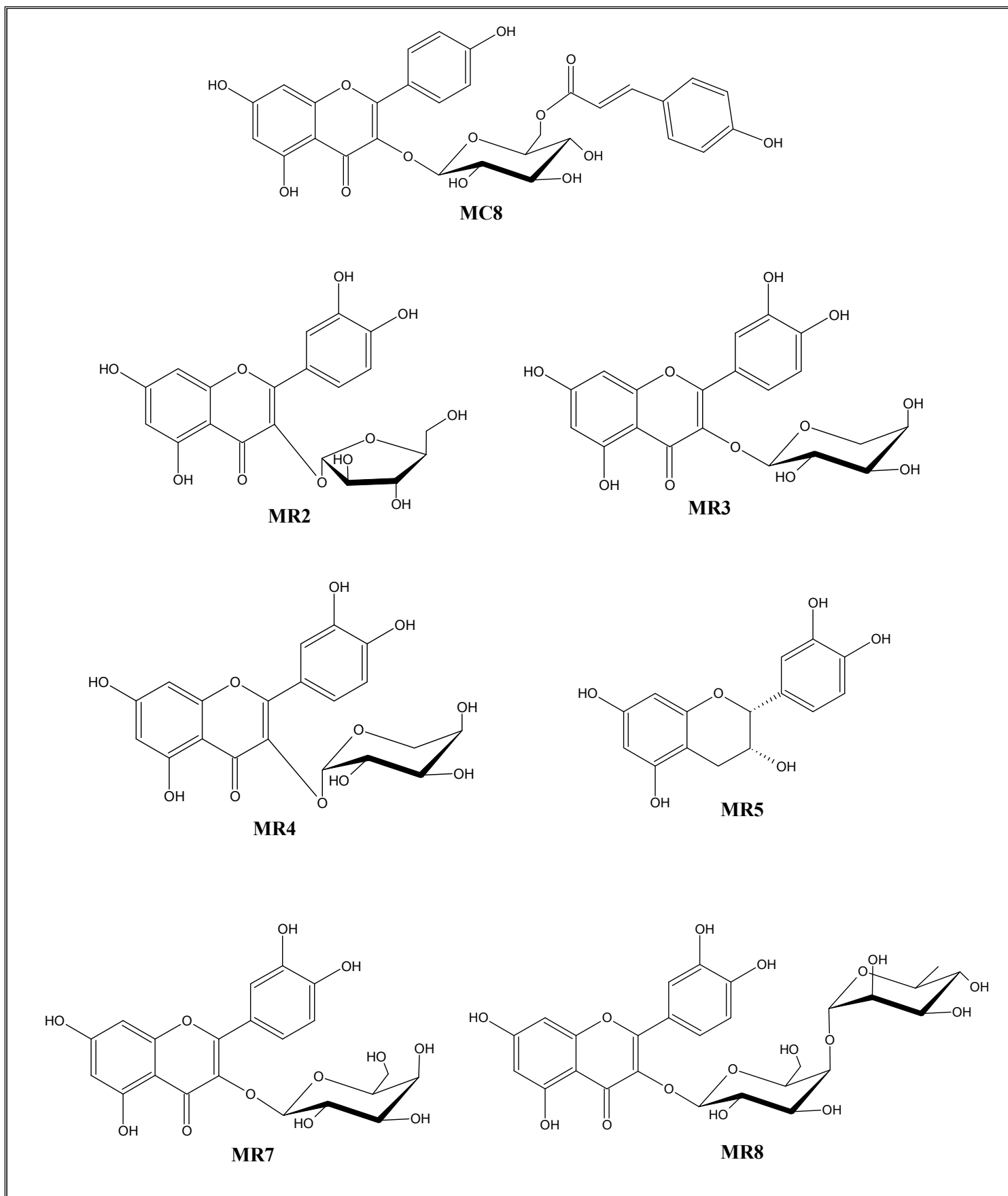


Figura 3. Substâncias isoladas das espécies de *Miconia* estudadas neste trabalho.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Contribuir para o aumento do conhecimento sobre a diversidade brasileira, investigando a composição química de espécies brasileiras, bem como obter dados que possam auxiliar a compreender suas atividades biológicas. Esse objetivo está engajado no projeto temático BIOTA-FAPESP (02/05503-6).

2.2 Objetivos Específicos

- ◆ Preparar os extratos polares e apolares das folhas de *M. cabucu* e *M. rubiginosa*;
- ◆ Traçar os perfis cromatográficos do extrato metanólico (EMeOH) das folhas de *M. cabucu* e *M. rubiginosa* por HPLC-UV-DAD;
- ◆ Isolar e caracterizar os metabólitos secundários dos extratos polares das folhas de *M. cabucu* e *M. rubiginosa*;
- ◆ Avaliar as atividades antimicrobiana, imunológica, analgésica, antiinflamatória e mutagênica de *M. cabucu* e *M. rubiginosa*.

3 MATERIAIS E EQUIPAMENTOS UTILIZADOS

3.1 Solventes

Solventes PA: acetato de etila, ácido acético, clorofórmio, metanol, *n*-butanol, *n*-propanol (Synthlab[®]).

Solventes grau HPLC: metanol, acetonitrila (Mallinckrodt[®]), água purificada em sistema Milli Q e ácido trifluoroacético (TFA) (Riedel-deHaën).

Solvente deuterado: DMSO-*d*₆ (Aldrich).

Reagentes para reveladores e triagem preliminar: anisaldeído (Riedel-deHaën[®]), difenilaminoborato (NP), polietilenoglicol (PEG), ácido sulfúrico concentrado e ácido acético (Quemis[®]).

Padrões utilizados: Quercetina, Rutina, Catequina e Ácido Gálico (Sigma Aldrich[®]).

3.2 Procedimentos Cromatográficos

Nas análises por cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC) as placas foram preparadas aplicando-se uma suspensão de sílica gel 60 G (Merck) em água destilada, na proporção 1:2 (m/v), sobre placas de vidro 5 x 10 ou 10 x 20 cm, obtendo-se 0,25 mm de espessura de adsorvente. Após a preparação das placas, estas foram deixadas em repouso por cerca de 8 horas à temperatura ambiente e depois em estufa a 120°C por cerca de 30 minutos. Foram utilizadas também placas preparadas comerciais de sílica gel 60 (Sigma Aldrich[®] e Merck[®]) sem indicador de fluorescência, de tamanho 20 x 20 cm e 0,2 mm de espessura de adsorvente.

O fracionamento por cromatografia em permeação em gel foi feito em coluna de vidro de 80 x 2,0 cm (d.i.), empacotada com Sephadex LH-20 (Pharmacia[®]). O solvente foi bombeado na coluna por meio de uma bomba peristáltica (Pharmacia[®]) modelo P1 18-1110-91 a um fluxo de 0,5 mL.min⁻¹. As frações com aproximadamente 5,0 mL foram coletadas em um coletor automático Redifrac (Pharmacia[®]).

A preparação das amostras (*clean up*) para traçar o perfil cromatográfico por HPLC-UV-DAD foi feita a partir de 20,0 mg do extrato EMeOH das folhas de *M. cabucu* e *M. rubiginosa*. As amostras foram submetidas à extração em fase sólida (SPE) em cartuchos (Supelco[®]) de fase reversa (C₁₈) com 100,0 mg de adsorvente, ativados com 5,0 mL de MeOH e ambientados com 5,0 mL de H₂O. Coletaram-se 3 frações eluídas em H₂O/MeOH 8:2 v/v, H₂O/MeOH 1:1 v/v e MeOH 100%, respectivamente. Em seguida, as frações foram filtradas em discos de 0,45 µm e 0,2 µm de poro (Millipore[®]) e analisadas por HPLC. As análises foram feitas monitorando no comprimento de onda de 254 nm.

3.3 Reveladores para CCDC

Como reveladores para CCDC foram utilizados:

- Luz UV 254-366 nm (Chromatovue[®]);
- Anisaldeído/H₂SO₄ (WAGNER et al., 1984)

0,85 mL de anisaldeído

85,0 mL de MeOH

10,0 mL de ácido acético

5,0 mL de H₂SO₄ concentrado

Pulveriza-se a placa cromatográfica com o revelador e, após aquecimento, pode-se observar manchas roxas para terpenos, avermelhadas para saponinas e catequinas, marrom para taninos e amarelas para flavonóides.

- NP/PEG (específico para flavonóides) (WAGNER et al., 1984)

100,0 mg de difenilaminoborato (NP)

500,0 mg de polietilenoglicol 2000 (PEG)

20,0 mL de MeOH

Borrifa-se sobre a placa cromatográfica e observa-se no visível e sob luz UV. Fornece manchas amarelas para derivados do kaempferol e laranjas para derivados da quercetina.

3.4 Equipamentos

A concentração do extrato foi efetuada em evaporador rotativo modelo TE-210 marca TECNAL, equipado com bomba a vácuo modelo TE-058 TECNAL.

Utilizou-se centrífuga da marca CELM[®], modelo COMBATE, a 2500 rpm na preparação das amostras para análise em Sephadex LH-20.

As análises dos perfis cromatográficos foram realizadas em um HPLC-UV-DAD da marca Varian[®] modelo *ProStar* 210/330 com coluna analítica de fase reversa C₁₈ [Luna (2), Phenomenex[®]] de 250 mm x 4,6 mm x 5 µm e poro com diâmetro interno de 100 Å, e uma coluna de guarda (Phenomenex[®]) de 4 mm x 3 mm x 5 µm. Amostras foram injetadas através de um injetor Rheodyne[®] 7125 com *loop* de 20,0 µL.

Análises por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (“HPLC: High Performance Liquid Chromatography”) no modo semipreparativo foram realizadas em aparelho constituído por uma bomba de fluxo máximo 10,0 mL.min⁻¹, injetor com *loop* de 100,0 µL e registrador modelo L250E (Knauer), acoplados a uma coluna semipreparativa de fase reversa C₁₈ (Phenomenex), de 250 mm x 10 mm x 10 µm e a um detector por Índice de Refração Differential Refractometer, modelo Waters R401, da Millipore.

A técnica de Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade (“HSCCC: High Speed Counter-Current Chromatography”) foi realizada utilizando o instrumento P.C. Inc., Potomac (Buffalo, NY, USA), equipado com uma coluna helicoidal multicamada com duas bobinas de politetrafluoroetileno de 1,68 mm i.d. de aproximadamente 80,0 mL e 240,0 mL conectadas em série com uma capacidade total de 320,0 mL. A velocidade foi ajustada para 850 rpm. O fluxo foi controlado com uma bomba Waters 4000 de fluxo constante (Milford, MA-USA). A amostra foi injetada através de um módulo de injeção P.C. Inc. (Buffalo, NY, USA) com *loop* de 20,0 mL.

Para medida do ponto de fusão utilizou-se o aparelho digital MQ APF-301 (Microquímica[®], Brasil).

O espectro de Ultravioleta (UV) foi obtido no espectrofotômetro HACH UV-Vis DR/4000. O espectro de Infravermelho (IV) foi obtido utilizando o espectrofotômetro Shimadzu FT-IR 8300.

O espectro de massas de alta resolução (HR-ESI-QTOF) foi realizado na USP-RP, utilizando o instrumento ultrOTOFG-ESI-TOF Bruker Daltonics (Billerica, MA – USA).

Os espectros de Ressonância Magnética Nuclear foram registrados em espectrômetro Varian, INOVA 500, operando a 500 MHz (11,7 T). Os espectros foram registrados com amostra dissolvida em dimetilsulfóxido deuterado, usando TMS como padrão interno.

4 ESTUDO QUÍMICO

4.1 Coleta e Obtenção dos Extratos de *Miconia cabucu* e *Miconia rubiginosa*

A coleta da espécie *M. rubiginosa* foi realizada no mês de março de 2005, na fazenda Palmeiras da Serra, município de Pratânia, São Paulo. A espécie foi coletada pelo Botânico Luiz Fernando Rolim de Almeida do IB-Botucatu e a exsicata foi depositada no Herbário “Irina Delanova Gemtchujnicov” BOTU, Departamento de Botânica do Instituto de Biociências, Unesp, Botucatu. A coleta da espécie *M. cabucu* foi realizada pelo Prof. Jorge Tamashiro, do IB-Unicamp, no dia 13 de abril de 2005, na Fazenda Folha Larga, município de Pariquera-Açu, São Paulo. Uma exsicata foi depositada no Herbário da Universidade Estadual de Campinas sob o nº 1430.

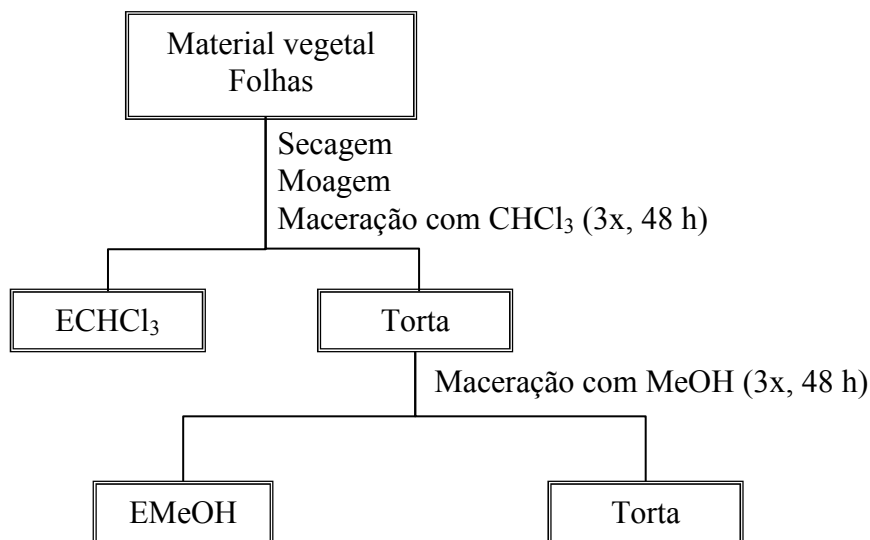
Os materiais vegetais foram secos em estufa a 40°C e moídos em moinho de facas. Os extratos foram preparados por maceração com CHCl₃ para extrair os componentes mais apolares e MeOH para a extração dos constituintes polares, e posteriormente concentrados em evaporador rotativo à pressão reduzida. As massas obtidas estão relatadas na Tabela 2. A extração de cada solvente foi realizada três vezes, a fim de obter um bom rendimento.

Tabela 2. Quantidade de massa obtida após maceração das folhas das espécies estudadas* .

	<i>Miconia cabucu</i>	<i>Miconia rubiginosa</i>
	Folhas (g)	Folhas (g)
Material seco	583,1	594,8
ECHCl ₃	14,0 (2,40%)	15,8 (2,67%)
EMeOH	20,0 (3,43%)	46,7 (7,86%)

* a extração foi realizada 3 vezes (48 horas) em cada solvente

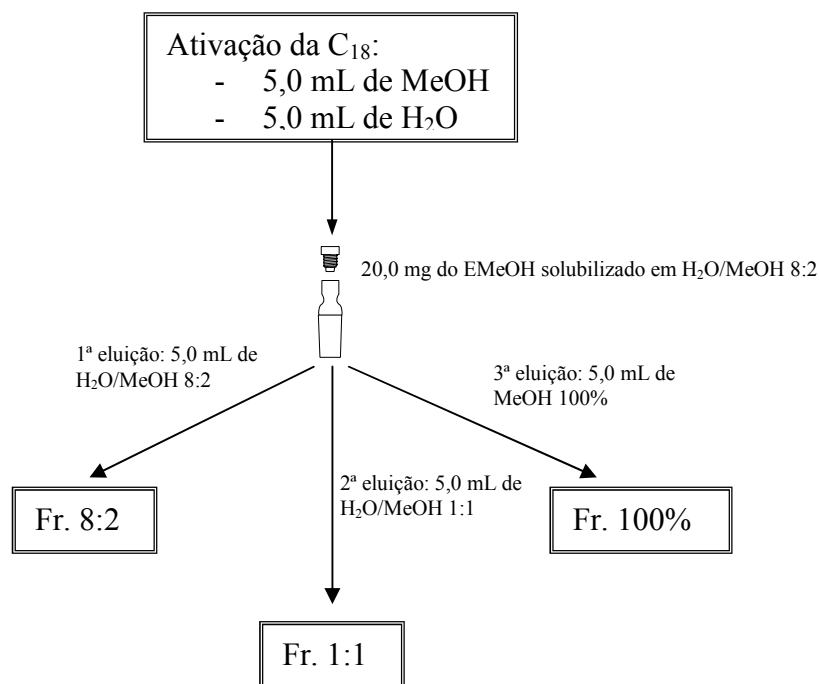
O esquema a seguir mostra o procedimento geral utilizado para a preparação dos extratos.



Esquema 1. Preparação dos extratos das folhas de *M. cabucu* e *M. rubiginosa*.

4.2 Perfil Cromatográfico dos Extratos Metanólicos de *Miconia cabucu* e *Miconia rubiginosa*

O *clean up* por SPE-C₁₈ foi realizado de acordo com o procedimento descrito na Seção 3.2 e Esquema 2. Essa metodologia foi desenvolvida em nosso laboratório a fim de se obter frações enriquecidas de metabólitos da mesma classe. As frações obtidas foram analisadas separadamente por HPLC-UV-DAD.



Esquema 2. Etapas de preparação dos extratos EMeOH das folhas de *M. cabucu* e *M. rubiginosa* para análise por HPLC-UV-DAD.

As Figuras 4 e 5 mostram os cromatogramas do extrato EMeOH das folhas de *M. cabucu* e *M. rubiginosa*, assim como os espectros de UV dos picos mais intensos.

A análise dos espectros de UV obtidos sugere a presença, nas frações H₂O/MeOH 8:2, de derivados de ácidos fenólicos de alta polaridade e taninos. Nas frações H₂O/MeOH 1:1 foram detectados flavonóides glicosilados e catequinas. As frações MeOH 100% possuem picos pouco intensos de derivados do ácido elágico (pico 2, Fig. 4) e flavonóides menos polares minoritários na espécie.

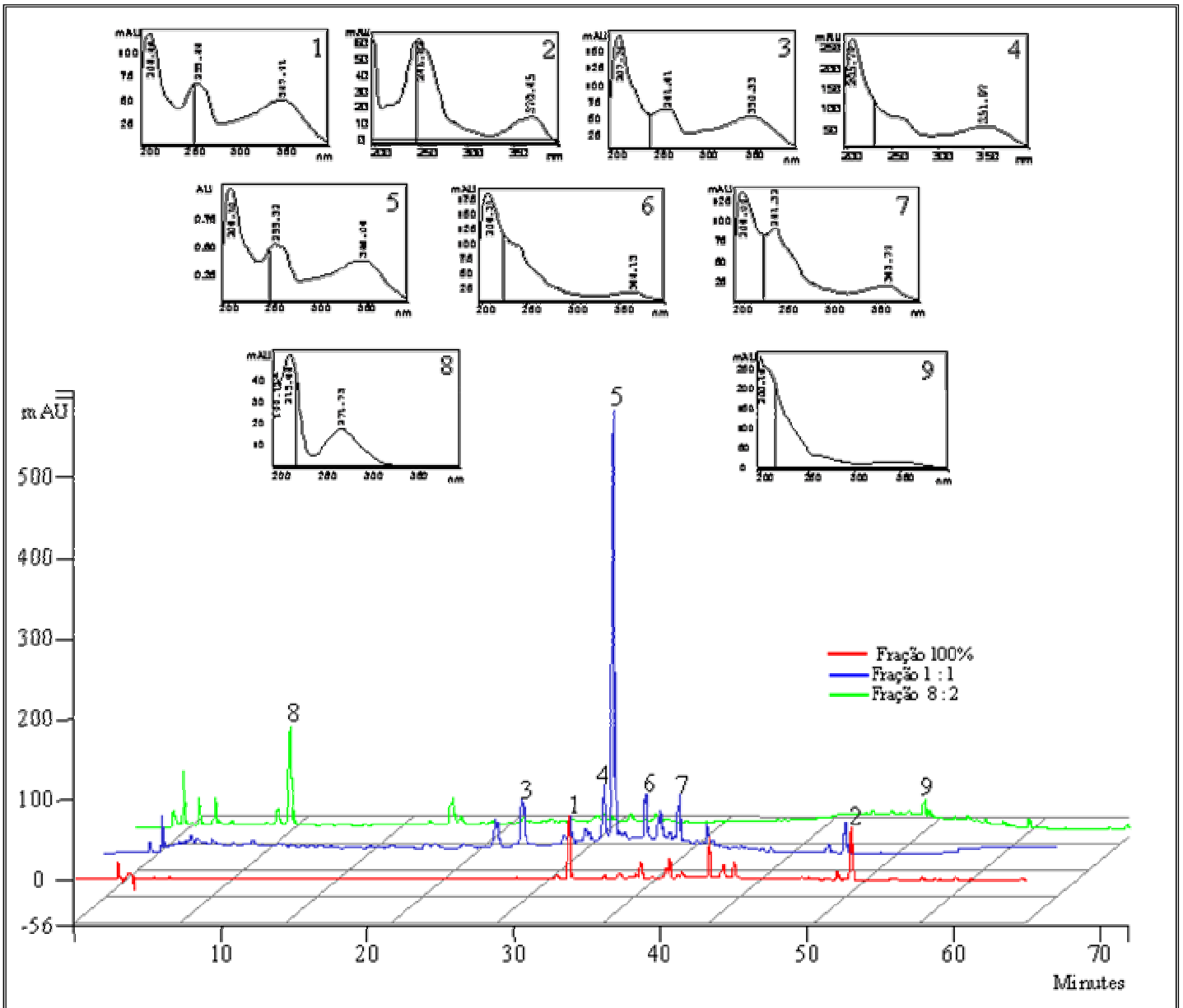


Figura 4. Cromatograma representando o perfil do extrato EMeOH das folhas de *M. cabucu* (RP-18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A: H₂O + 0,05% TFA; Solvente B: ACN + 0,05% TFA. Gradiente de 32-35% de B em A em 20 min, de 35-75% de B até 60 min e 75-100% de B até 65 min; fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, λ 254 nm) e espectros de UV dos picos destacados.

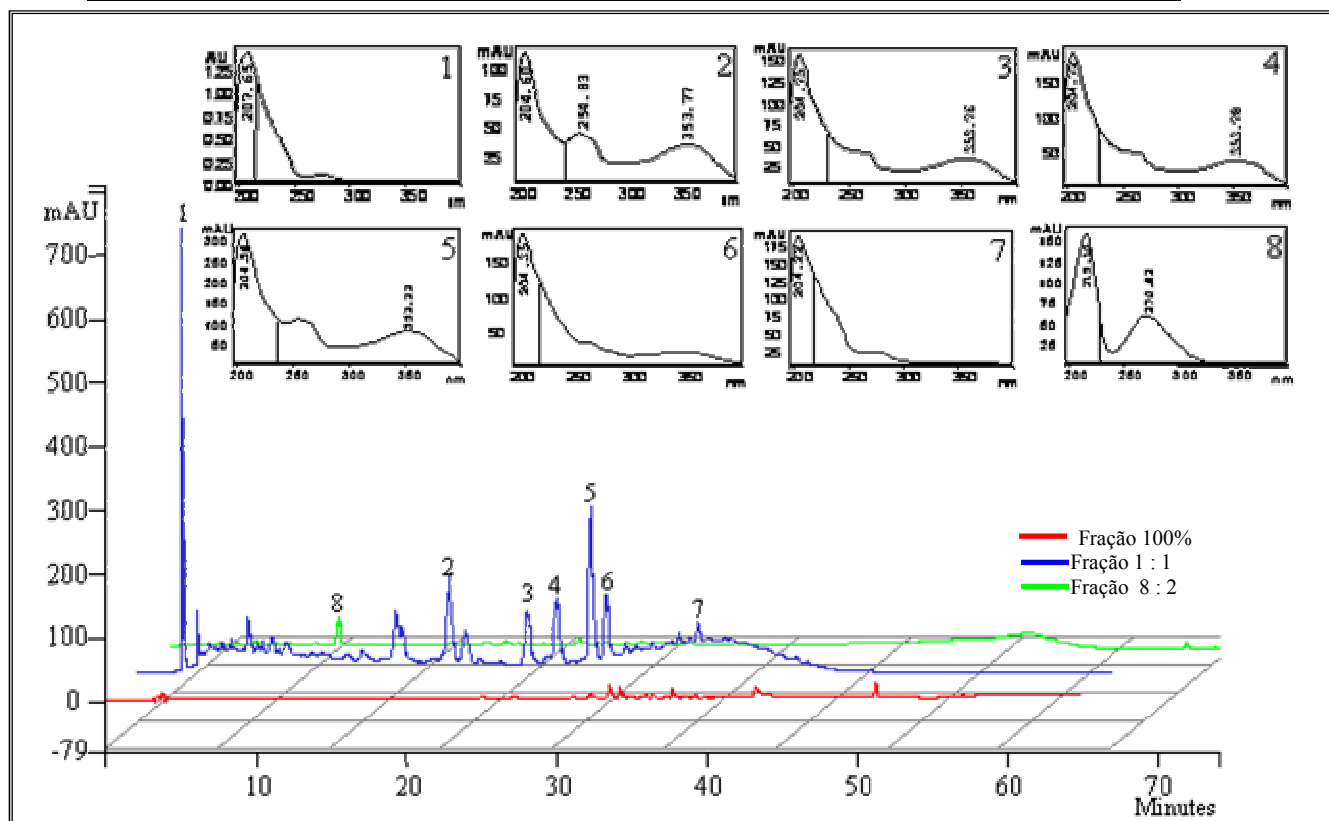


Figura 5. Cromatograma representando o perfil do extrato EMeOH das folhas de *M. rubiginosa* (RP-18, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A: H₂O + 0,05% TFA; Solvente B: ACN + 0,05% TFA. Gradiente de 32-35% de B em A em 20 min, de 35-75% de B até 60 min e 75-100% de B até 65 min; fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, λ 254 nm) e espectros de UV dos picos destacados.

A Espectroscopia de Absorção no UV é a técnica mais simples e útil para análise de flavonóides. O espectro de UV de um flavonóide consiste de dois máximos de absorção, sendo que a banda II está em um intervalo de comprimento de onda de 240-285 nm e a banda I entre 300-550 nm. A posição precisa e as intensidades relativas desses máximos fornecem informações valiosas da natureza do flavonóide e de seu padrão de oxigenação. Sendo assim, mudanças na substituição do anel A tendem a se refletir na banda II, enquanto alterações nos anéis B e C são aparentes na banda I (MABRY et al., 1970).

Quando o flavonol é substituído na posição 3, o valor da banda I passa a ser 328-357 nm. O grau de oxigenação do anel B influencia a banda I. Se o espectro apresentar somente uma banda, o flavonol é derivado do kaempferol e se mostrar duas bandas é um derivado da quercetina. Assim, de acordo com os espectros de UV dos cromatogramas de ambas as espécies (Figs. 4 (picos 1 e 3 a 7) e 5 (picos 2 a 6), pode-se sugerir, segundo Mabry et al. (1970), que os flavonóides presentes nas espécies de *Miconia* são derivados principalmente da quercetina, glicosilados na posição 3.

De acordo com os cromatogramas apresentados, verificou-se que as duas espécies possuem perfis diferentes, sendo que *M. rubiginosa* possui flavonóides mais polares que *M. cabucu*. Além dos flavonóides, ambas as espécies possuem derivados de ácidos fenólicos (Fig. 4 (picos 2 e 8) e Fig. 5 (pico 8)), de catequina (Fig 4 (pico 9), Fig. 5 (picos 1 e 7) e taninos (Figs 4 e 5, ombro).

4.3 Fracionamento e Isolamento do Extrato Metanólico das Folhas de *Miconia cabucu*

Para minimizar o problema com o fracionamento para isolamento dos flavonóides, é necessária a remoção dos taninos. Para isso, foram realizados testes de partição com *n*-BuOH e AcOEt. A análise por CCDC das duas frações obtidas mostrou que a partição com AcOEt foi mais efetiva na eliminação dos componentes poliméricos, que permaneceram na fase aquosa. O melhor sistema de solvente para a análise por CCDC deste extrato foi a mistura de CHCl₃/MeOH/*n*-PrOH/H₂O, na proporção 5:6:1:4 (v/v) (fase inferior).

O extrato EMeOH (10,0 g) foi submetido primeiramente a uma partição com 1,0 L de Hexano/(MeOH/H₂O 8:2, v/v) (1:1, v/v, 3x), para a remoção de clorofila. A fração hidro-alcoólica foi seca e solubilizada em água, sendo submetida, então, a uma partição com 1,0 L de AcOEt/H₂O (1:1, v/v, 3x). As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo à pressão reduzida e secas em capela sob jato de ar comprimido. Obteve-se 0,2 g da fração hexânica, 1,4 g da fração AcOEt e 7,4 g da fração aquosa.

Para o fracionamento da fração AcOEt utilizou-se uma coluna Sephadex LH-20 como fase estacionária. Este tipo de adsorvente proporciona boa separação de compostos polares, não causando muita adsorção.

A fração AcOEt obtida na partição foi dissolvida em 10,0 mL de MeOH e centrifugada (3x). Injetou-se a amostra na coluna de Sephadex LH-20 e procedeu-se a eluição com MeOH, em fluxo de 0,5 mL.min⁻¹, coletando-se frações de 5,0 mL cada.

As 295 frações obtidas foram analisadas por CCDC, utilizando o sistema mencionado acima e, como reveladores, luz UV e anisaldeído/H₂SO₄. As frações semelhantes foram agrupadas.

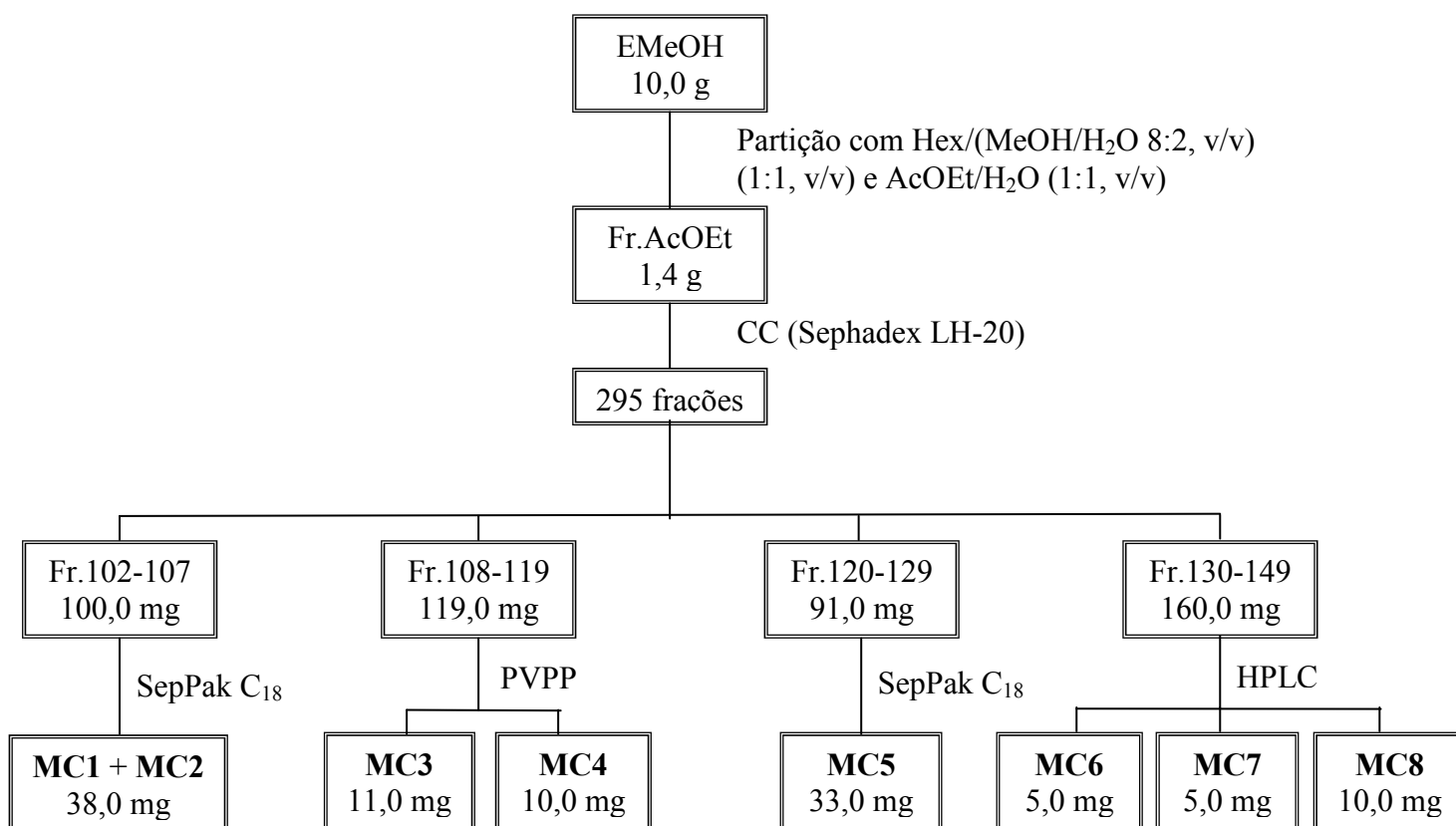
As frações 102-107 e 120-129 apresentaram duas manchas, uma amarela e outra verde, após revelação da placa com anisaldeído/H₂SO₄, indicando a presença de um flavonóide (com Rfs diferentes nas duas frações) e clorofila.

Essas frações foram purificadas utilizando um cartucho SepPak C₁₈, utilizando H₂O, H₂O/MeOH 1:1 (v/v) e MeOH para eluição. As frações aquosas de ambas as frações apresentaram-se puras e foram analisadas por RMN mono e bi-dimensionais, levando à identificação de **MC1** e **MC2** em mistura e **MC5**.

A fração 130-149 foi solubilizada em cerca de 1,5 mL de MeOH, filtrada em Millex de 0,45 µm, e submetida à purificação por HPLC-IR no modo semipreparativo (C₁₈, MeOH/H₂O 6:4; 2,0 mL.min⁻¹). Foram realizadas 24 injeções de 100,0 µL cada. Este procedimento possibilitou o isolamento das substâncias **MC6**, **MC7** e **MC8**.

A purificação da fração 108-119 em coluna de PVPP (polivinilpolipirrolidona) (10 cm x 1,0 cm d.i.), empregando MeOH como fase móvel, resultou no isolamento das substâncias **MC3** e **MC4**.

O esquema a seguir mostra o procedimento experimental desenvolvido para o fracionamento das substâncias.



Esquema 3. Fracionamento do extrato EMeOH das folhas de *M. cabucu*.

4.4 Elucidação Estrutural das Substâncias Isoladas do Extrato Metanólico das Folhas de *Miconia cabucu*

Identificação das substâncias MC1 e MC2

A análise por HPLC-UV-DAD (Fig. 6) da fração obtida após a eluição no SepPak C₁₈, mostra que há uma mistura de compostos. Os espectros de UV (Figura 6) mostram bandas com comprimentos de onda em 217 e 271 nm para um dos compostos e 255 e 348 nm para o outro. Dados da literatura (MABRY et al, 1970) indicam que um desses compostos pode ser um flavonóide, derivado da quercetina e o outro um composto fenólico, que segundo padrão existente em nosso laboratório, pode ser o ácido gálico. Para determinação correta da estrutura, registramos os espectros de RMN.

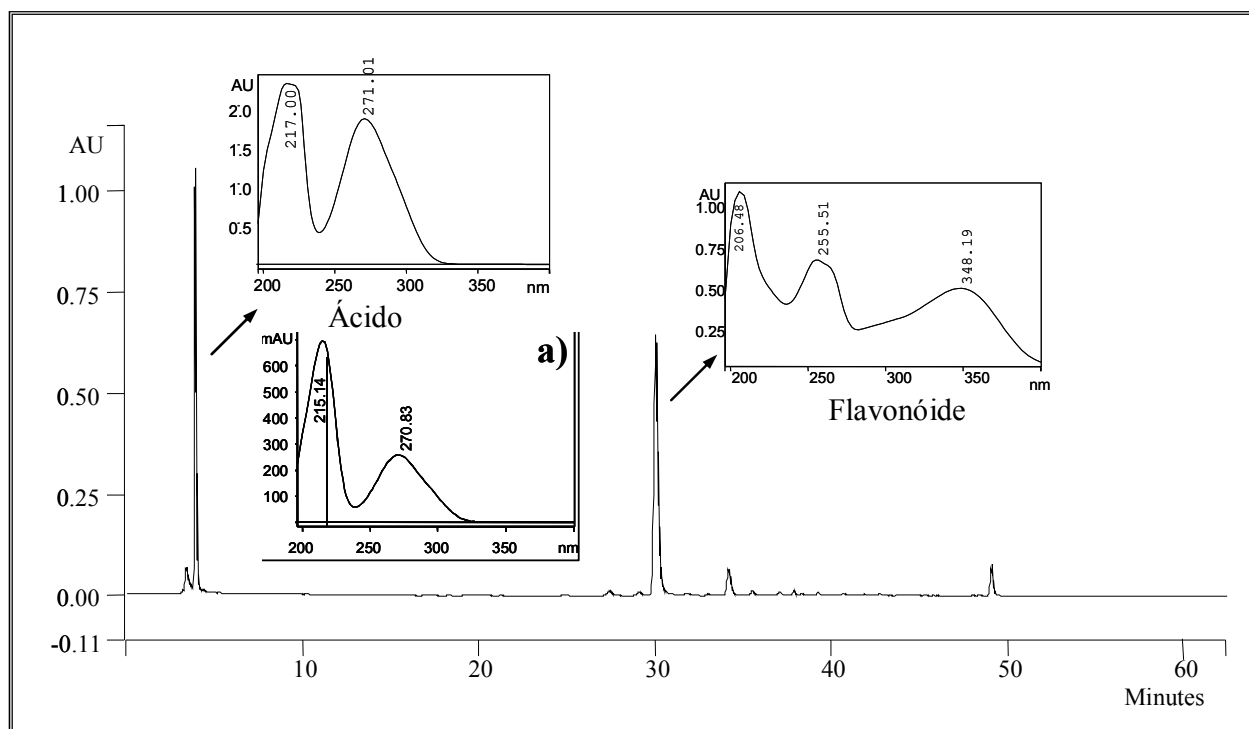


Figura 6. Cromatograma das substâncias MC1 e MC2 (C₁₈, 250 x 4,60 mm d.i. x 5 μ m; Solvente A: H₂O + 0,05% TFA; Solvente B: ACN + 0,05% TFA. Gradiente de 32-35% de B em 20 min, de 35-75% de B até 60 min e 75-100% de B até 65 min; fluxo de 1,0 mL.min⁻¹, λ 254 nm) e espectros no UV das substâncias presentes. O espectro a) trata-se do padrão comercial do ácido gálico.

O espectro de RMN-¹H (Tabela 3; Espectro 1) apresentou sinais na região aromática referentes ao esqueleto de um flavonóide: um duplete em δ 7,35 (H2', $J = 2,0$

Hz), um duplo dubleto em δ 7,27 (H6', $J = 2,0$ e $8,0$ Hz) e um dubleto em δ 6,90 (H5', $J = 8,0$ Hz), evidenciando que o anel B do núcleo flavonoídico é di-oxigenado (HARBORNE, 1984; 1996). Apresentou dubletos de $J = 2,0$ Hz em δ 6,39 e δ 6,20, referentes aos hidrogênios H8 e H6 respectivamente.

A presença de unidades de açúcares pôde ser deduzida pela presença dos sinais dos hidrogênios anoméricos. O singleto em δ 5,30 (H1'') sugeriu, em adição ao dubleto em δ 0,91 (H6'', $J = 6,5$ Hz), a presença da rhamnose. O dubleto em δ 4,16 ($J = 7,5$ Hz), sugeriu a presença de uma unidade de xylose. De acordo com a literatura, o deslocamento químico da metila de uma unidade de rhamnose quando está ligada ao C3 do flavonóide aparece em frequência baixa (δ 0,72-0,86), quando ligada à posição 7 ocorre em frequência mais alta (δ 1,04-1,21) e têm deslocamento químico em valores intermediários a esses quando está ligada a outras unidades de açúcar (Harborne, 1996). Baseado nas informações acima, pôde-se sugerir que a rhamnose está ligada à aglicona na posição 3.

O espectro de RMN-¹³C (Tabela 3; Espectro 2) apresentou 15 sinais referentes aos carbonos da aglicona, 6 sinais referentes à rhamnose e 5 sinais referentes à xylose. O sinal em δ 177,8 refere-se a C=O de um flavonol, enquanto os sinais em δ 157,0 e δ 134,3 correspondem aos C2 e C3 de um flavonol glicosilado na posição 3 (AGRAWAL, 1989). Os dados fornecidos pelos espectros bi-dimensionais (gHMQC e gHMBC) possibilitaram a atribuição de todos os hidrogênios e carbonos (Tabela 3). Especialmente importante é o experimento de gHMBC (Espectro 5) que fornece as interações à longa distância. Por meio desta técnica pode-se determinar de que forma estão ligados os açúcares. Neste espectro verificou-se o acoplamento entre H1'' (δ 5,30) com o C3 (δ 134,3) da aglicona confirmando que a rhamnose está ligada nesta posição. Pôde-se observar também o acoplamento entre o H1''' (δ 4,16) da xylose com o C2 (δ 80,6) da rhamnose. O espectro COSY (Espectro 6) possibilitou fazer a correlação dos sinais dos hidrogênios pertencentes às unidades dos açúcares. O espectro 1D-TOCSY (Espectro 3) confirmou que um dos açúcares presentes é a rhamnose, pois irradiando-se o H1'' em δ 5,30, observou-se somente os sinais do H2'' (δ 4,05), evidenciando que o H1'' e o H2'' estão em posição equatorial. Já a presença da xylose foi confirmada pelo espectro 1D-TOCSY (Espectro 4), pois irradiando-se o H1''' em δ 4,16, observou-se os sinais dos hidrogênios H2''' (δ 2,94), H3''' (δ 3,07), H4''' (δ 3,20) e H5''' (δ 3,47), indicando as correlações entre eles.

Comparação dos deslocamentos químicos de **MC1** com os da literatura (AGRAWAL, 1989; SOICKE et al., 1990) confirmaram a identificação da quercetina-3-*O*- β -xylopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -rhamnopiranosídeo (Figura 7).

Tabela 3. Deslocamentos químicos (δ) de RMN-¹H e RMN-¹³C da substância **MC1** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO-*d*₆).

Posição	RMN- ¹ H		RMN- ¹³ C	
	MC1	Literatura (SOICKE et al., 1990)	MC1	Literatura (SOICKE et al., 1996)
2	-	-	157,0	156,9
3	-	-	134,3	134,2
4	-	-	177,8	177,8
5	-	-	161,3	161,3
6	6,20 <i>d</i> (2,0)	6,15 <i>d</i> (2,0)	98,8	98,7
7	-	-	164,3	164,2
8	6,39 <i>d</i> (2,0)	6,31 <i>d</i> (2,0)	93,7	93,6
9	-	-	156,5	156,4
10	-	-	104,0	104,0
1'	-	-	120,5	120,8
2'	7,35 <i>d</i> (2,0)	7,27 <i>d</i> (2,0)	115,5	115,6
3'	-	-	145,3	145,2
4'	-	-	148,7	148,7
5'	6,90 <i>d</i> (8,0)	6,81 <i>d</i> (8,4)	115,6	115,4
6'	7,27 <i>dd</i> (2,0; 8,0)	7,19 <i>dd</i> (2,0; 8,4)	120,9	120,4
OH-5	12,70 <i>sl</i>			
<i>Rhamnose</i>				
1''	5,30 <i>s</i>	5,21 <i>d</i> (1,3)	101,0	100,9
2''	4,05 <i>d</i> (3,5)	3,98 <i>sl</i>	80,6	80,6
3''	3,57 <i>m</i>	-	70,3	70,3
4''	3,12 <i>t</i> (9,5)	-	71,8	71,7
5''	3,64 <i>m</i>	-	70,3	69,3
6''	0,91 <i>d</i> (6,5)	0,82 <i>d</i> (6,2)	17,4	17,4
<i>Xylose</i>				
1'''	4,16 <i>d</i> (7,5)	4,07 <i>d</i> (7,4)	106,5	106,5
2'''	2,94 <i>t</i> (7,5)	-	73,8	73,8
3'''	3,07 <i>t</i> (9,0)	-	76,3	76,2
4'''	3,20 <i>m</i>	-	69,4	70,2
5'''a	3,47 <i>dd</i> (4,5; 11,0)	-	65,8	65,7
5'''b	2,90 <i>d</i> (11,0)	-		

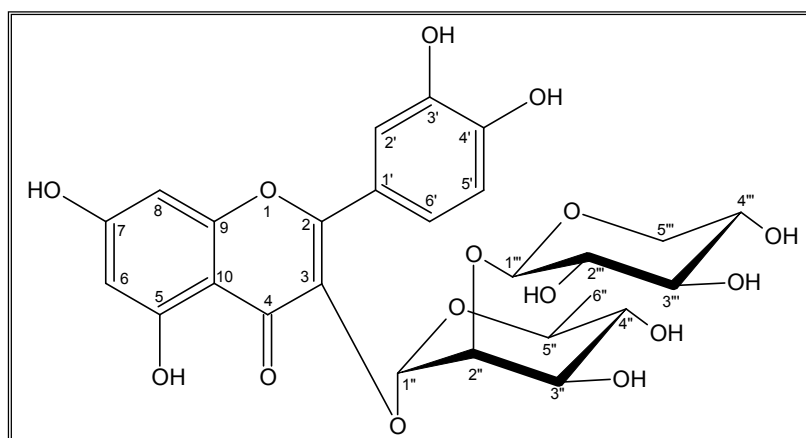


Figura 7. Quercetina-3-*O*- β -xylopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -rhamnopyranosídeo (**MC1**).

No espectro de RMN- ^1H (Tabela 4; Espectro 1) também observou-se um singlete na região dos hidrogênios aromáticos em δ 6,92. A análise do espectro de RMN- ^{13}C (Tabela 4; Espectro 2) indicou a presença de um carbono quaternário em δ 167,6 referente a carbono de ácido carboxílico.

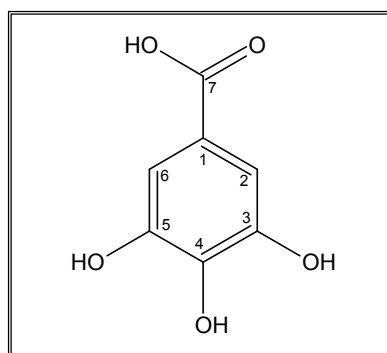
O conjunto dos dados adquiridos sugeriu a estrutura de um derivado de ácido benzóico (C6-C1), em mistura com a substância **MC1**. Os experimentos de gHMBC e gHMQC possibilitaram as correlações entre os sinais da molécula, que comparados com os dados da literatura (ALMEIDA et al., 2005), foi possível confirmar a identidade de **MC2** como sendo o ácido gálico (Figura 8).

Os sinais de RMN- ^1H e ^{13}C apresentaram pequenas diferenças em relação aos valores encontrados na literatura devido ao fato de Almeida et al. (2005) ter realizado os experimentos de RMN utilizando CD_3OD como solvente.

O ácido gálico é um derivado do ácido benzóico triidroxilado. Os ácidos fenólicos possuem comprovadas características antioxidantes. No trabalho de Dedoussis et al. (2005), por exemplo, foi discutida a atividade anticarcinogênica do ácido gálico em várias células cancerosas, inclusive células leucêmicas. Essa atividade, segundo o autor, está intimamente relacionada com sua propriedade antioxidante. Já no trabalho de Kroes et al. (1992) foi comprovada a atividade antiinflamatória dessa substância. O ácido gálico já foi isolado da espécie *Miconia myriantha* (LI et al., 2001).

Tabela 4. Deslocamentos químicos (δ) de RMN-¹H e RMN-¹³C da substância **MC2** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO-*d*₆).

Posição	RMN- ¹ H		RMN- ¹³ C	
	MC2	Literatura (ALMEIDA et al., 2005)	MC2	Literatura (ALMEIDA et al., 2005)
1	-	-	120,7	120,7
2	6,92 <i>s</i>	7,08 <i>s</i>	108,8	109,1
3	-	-	145,4	145,1
4	-	-	138,0	138,3
5	-	-	145,4	145,1
6	6,92 <i>s</i>	7,08 <i>s</i>	108,8	109,1
7	-	-	167,6	169,1

**Figura 8.** Ácido gálico (**MC2**).

Identificação da substância **MC3**

O composto **MC3** foi obtido como um sólido amarelo pálido amorfo, com ponto de fusão entre 151 e 153°C. O espectro de IV (Figura 9) exibiu uma banda vibracional larga atribuída à hidroxila em 3448 cm⁻¹ e uma banda referente à carbonila conjugada em 1658 cm⁻¹. O espectro de UV (Figura 10) mostrou bandas em 242, 276 e 336 nm, típicas de flavonas (MABRY et al., 1970). No espectro de HR-ESI-QTOF (Figura 11), apesar dos problemas ocorridos devido a contaminação do equipamento, pôde-se observar o pico do íon pseudomolecular m/z [M+H]⁺ em 625,3905 que está de acordo com a fórmula molecular C₃₅H₂₈O₁₁. Foi possível, ainda, observar fragmentos em m/z 313,1228 (M - C₁₇H₁₃O₅ - CH₃ + H)⁺, referente à unidade de luteolina com perda de uma metila, m/z 419,2933 [M - C₁₁H₁₀O₄ + H]⁺ e m/z 463,3212 [M - C₁₀H₁₀O₂ + H]⁺, referentes a fragmentos originados de reações de retro-DielsAlder.

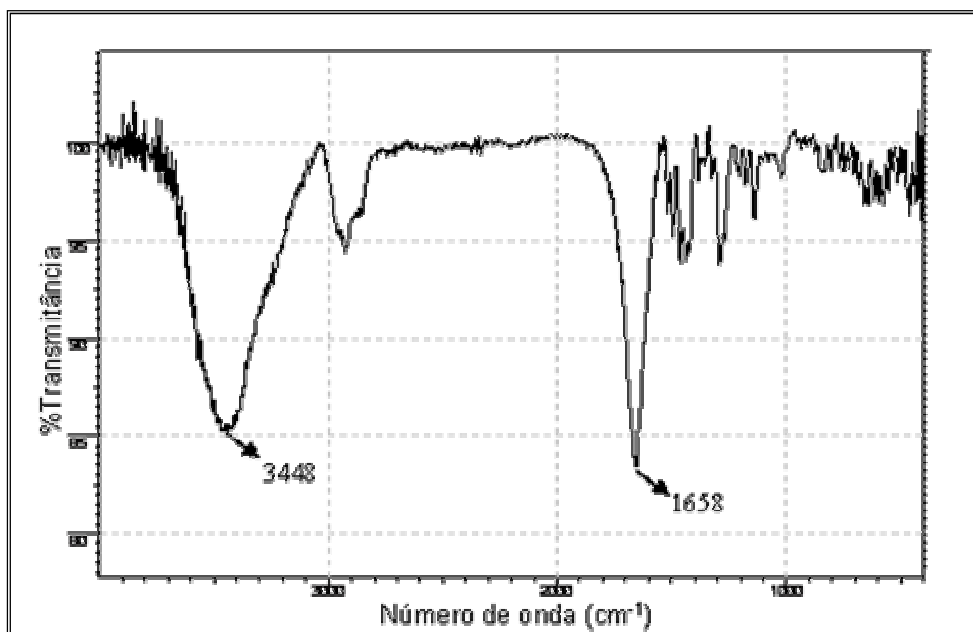


Figura 9. Espectro de IV da substância MC3 (pastilha de KBr).

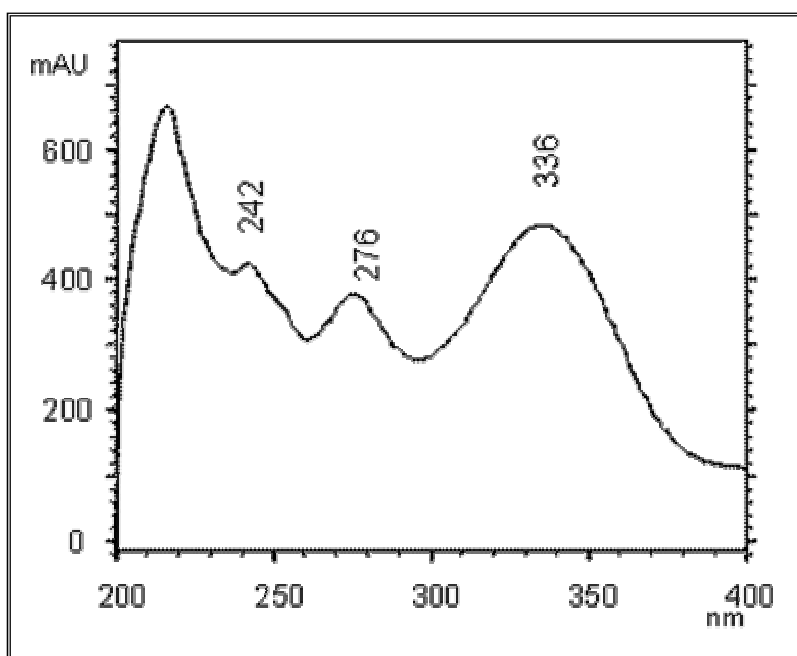


Figura 10. Espectro de UV da substância MC3 (MeOH).

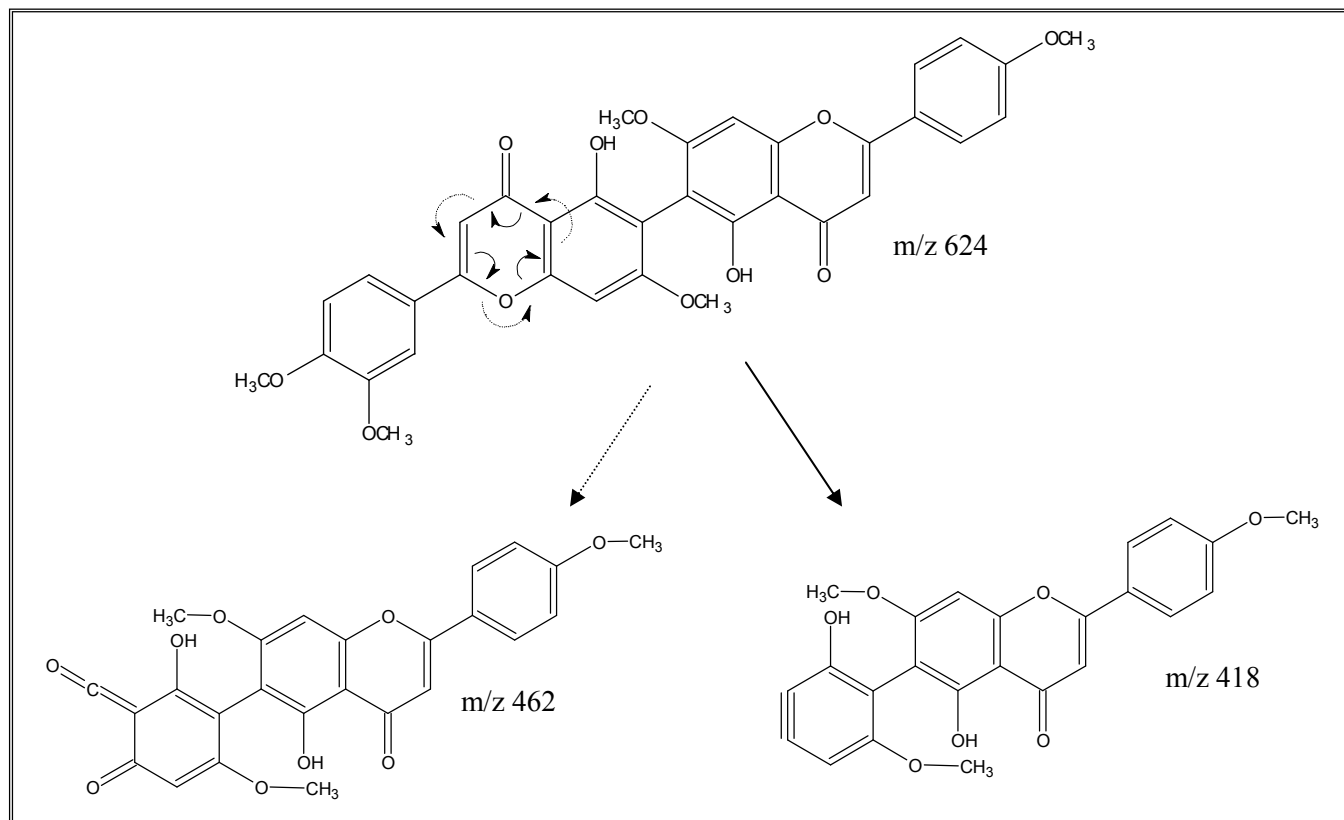
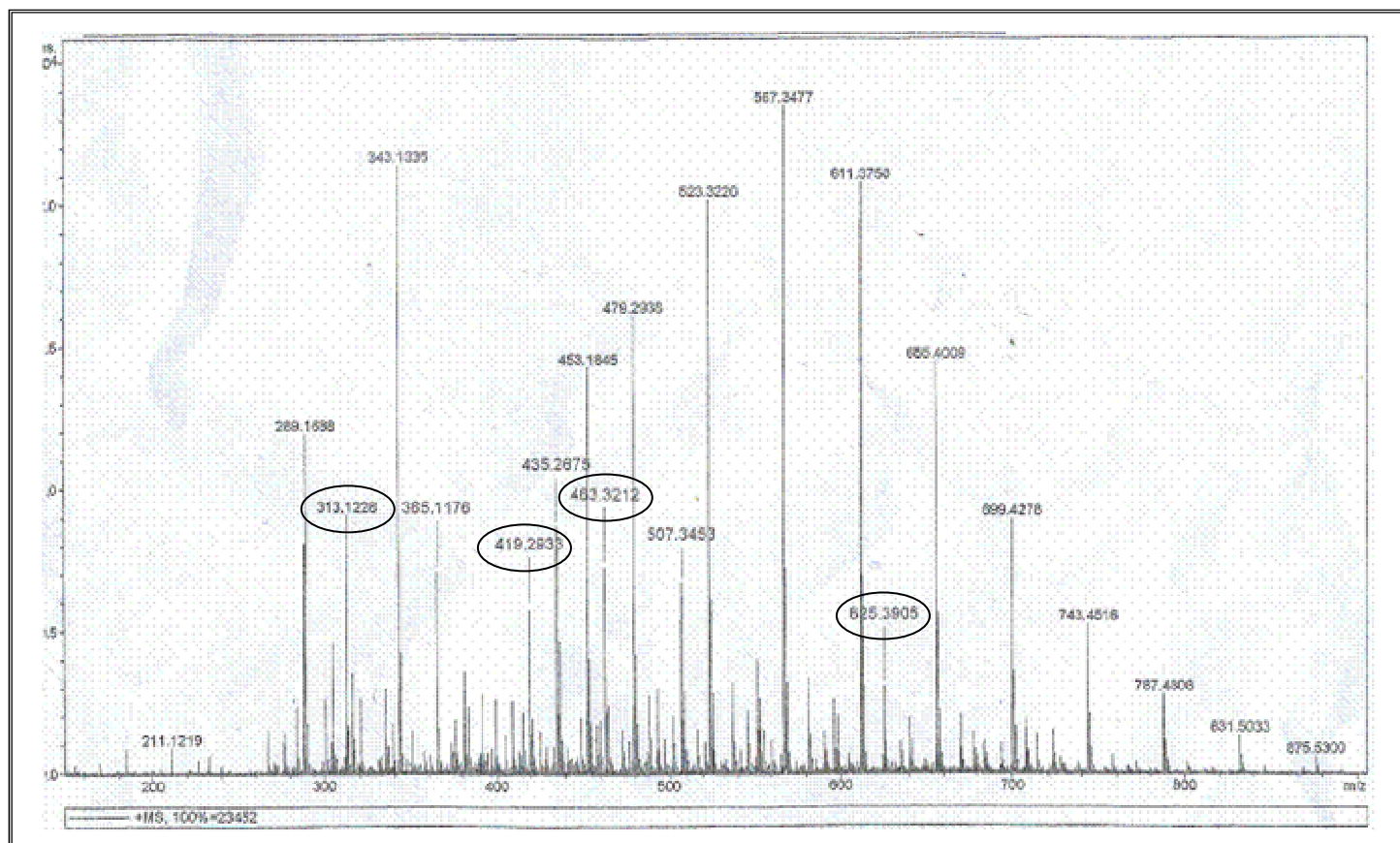


Figura 11. Espectro de massas de alta resolução e fragmentações da substância MC3.

O espectro de RMN-¹H (Espectro 7) sugeriu a existência de duas hidroxilas, cinco metoxilas, nove hidrogênios aromáticos e dois hidrogênios metínicos. O espectro de RMN-¹H (Espectro 7) mostrou um singlete largo em δ 13,01 (2H) correspondendo a dois grupos hidroxila quelados nas posições 5 e 5''. Sinais equivalentes a cinco grupos metoxila foram observados em δ 3,86 (6H), δ 3,90 (3H) e δ 3,94 (6H). Dois singletos em δ 6,92 (1H-H3) e δ 7,02 (1H-H3'') sugeriram que o composto **MC3** é um derivado de uma biflavona (Harborne, 1996). A presença dos dubletos em δ 8,07 ($J = 8$ Hz) e δ 7,11 ($J = 8$ Hz) foram atribuídos aos hidrogênios H2'/6' e H3'/5', respectivamente, do anel B de uma unidade de apigenina. Três outros sinais de hidrogênios em δ 7,73 ($J = 8,0$ e $2,0$ Hz), δ 7,60 ($J = 2,0$ Hz) e δ 7,15 ($J = 8,0$ Hz) correspondem aos hidrogênios H6''', H2''' e H5''', respectivamente, de uma unidade de luteolina. A ausência de dois conjuntos de dubletos *meta*-acoplados e a presença de dois singletos em δ 6,89 e δ 6,91 evidenciam a conexão C-C entre as duas flavonas nos anéis A. Os espectros de gHMQC (Espectros 9 e 10) permitiram estabelecer a correlação direta entre os hidrogênios e seus respectivos carbonos. Ambos os sinais em δ 6,89 (H8) e δ 6,91 (H8'') são conectados ao carbono em δ 90,4. Dessa forma o sinal em δ 90,4 pode ser atribuído a um dos carbonos C6, C8, C6'' ou C8''.

Os dados espectrais de RMN-¹³C encontrados para a agatisflavona (um dímero com ligação 6 \rightarrow 8'') apresenta deslocamentos químicos em δ 107,1 (C6), δ 97,0 (C8), δ 103,7 (C6'') e δ 107,1 (C8'') (CARVALHO et al., in press). O dímero cupressuflavona (ligação 8 \rightarrow 8'') apresenta deslocamentos químicos em δ 99,0 (C6/6'') e δ 98,7 (C8/8'') (CHARI et al., 1977; AGRAWAL, 1989). A luteolina octametil éter, outro dímero com ligação 8 \rightarrow 8'', apresenta sinais de carbono em δ 91,6 (C6/6'') e δ 102,0 (C8/8'') (ÖSTERDAHL, 1983; AGRAWAL, 1989).

Quando comparamos os deslocamentos químicos de RMN-¹³C do composto monomérico 5-hidroxi-6-metil-7,4'-dimetoxiflavona δ 105,5 (C6) e δ 89,0 (C8) com os sinais dos carbonos C6/6'' (δ 107,6) e C8/8'' (δ 90,4) de **MC3** (Espectro 8) percebemos que o C6 \rightarrow C6'' poderiam, desta forma, estar ligados.

Um conjunto de experimentos de 1D-NOESY (Espectros 16 a 18) permitiu identificar todos os grupamentos metoxila da molécula. Particularmente, a irradiação no sinal em δ 6,91 mostrou interação especial desse hidrogênio com a metoxila em δ 3,94, localizando esse grupo no carbono 7/7''. O experimento de gHMBC (Espectros 11 a 13) mostrou a interação a longa distância entre a metoxila em δ 3,94 com o sinal de carbono

em δ 163,4 (C7/7''). Foram observadas correlações entre os sinais de hidrogênio em δ 6,89/6,91 (H8/8'') com os sinais de carbono em δ 163,4 (C7/7''), δ 155,5 (C5/5''), δ 104,1 (C10/10'') e δ 107,6 (C6/C6''), que estão de acordo com a ligação interflavonoídica de C6→C6''. A estrutura foi então estabelecida como sendo 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona-(6-C-6'')-5''-hidroxi-3''',4''',7'''-trimetoxiflavona (Figura 12), o primeiro dímero constituído por uma unidade de apigenina e uma de luteolina ligados através dos carbonos C6 e C6''.

Biflavonóides são substâncias de uma série de compostos de ocorrência natural que incluem ligações do tipo flavona-flavona, flavanona-flavona e flavanona-flavanona. Na literatura, uma variedade de atividades biológicas de biflavonóides tais como anti-inflamatória, antimicrobiana e antioxidante tem sido publicada (LIN et al., 2001). Sulcatona A e 3-hidroxi-2,3-diidroapigenil-[I-4',O,II-3']-diidrokaempferol isoladas das partes aéreas de *Ouratea sulcata* exibiram significativa atividade antimicrobiana *in vitro* contra um conjunto de microrganismos (PEGNYEMB et al., 2005). Um estudo semi-empírico reporta a atividade inibitória contra *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv (Mtb) de 28 biflavonóides (DIAS et al., 2004).

Tabela 5. Deslocamentos químicos (δ) de RMN-¹H e RMN-¹³C e experimentos bidimensionais da substância **MC3** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO-*d*₆).

Posição	RMN- ¹ H	RMN- ¹³ C	gHMBC (δ ¹ H)	NOESY
2		163,4	H3; H2'/ H6'	
3	6,92 <i>s</i>	103,8		
4		182,0		
5		155,5		
6		107,6	H8	
7		163,4	OCH ₃ -7; H8	
8	6,89 <i>s</i>	90,4		
9		157,5	H8	
10		104,1	H8; H3	
1'		122,9	H3; H6'/H2'	
2'	8,07 <i>d</i> (8,0)	128,3		
3'	7,11 <i>d</i> (8,0)	114,6	H5'	
4'		163,1		
5'	7,11 <i>dd</i> (8,0)	114,6	H3'	
6'	8,07 <i>d</i> (8,0)	128,3		
2''		163,4	H3'';H2'''	
3''	7,02 <i>s</i>	104,1		
4''		182,0		
5''		155,5		
6''		107,6	H8''	
7''		163,4	OCH ₃ -7''; H8''	
8''	6,91 <i>s</i>	90,4		
9''		157,5	H8''	
10''		104,1	H8''; H3''	
1'''		122,9	H3''; H5'''	
2'''	7,60 <i>d</i> (2,0)	109,5	H6'''	
3'''		149,1	H5'''	
4'''		152,2	H2''' ; H6'''	
5'''	7,15 <i>d</i> (8,0)	111,8		
6'''	7,73 <i>dd</i> (2,0; 8,0)	120,1	H2'''	
OCH ₃ -7	3,94 <i>s</i>	55,9		H8
OCH ₃ -7''	3,94 <i>s</i>	56,3		H8''
OCH ₃ -4'	3,86 <i>s</i>	55,6		H3'; H4'
OCH ₃ -3'''	3,90 <i>s</i>	55,7		H2'''
OCH ₃ -4'''	3,86 <i>s</i>	55,6		H5'''
OH-5	13,01 <i>sl</i>			
OH-5''	13,01 <i>sl</i>			

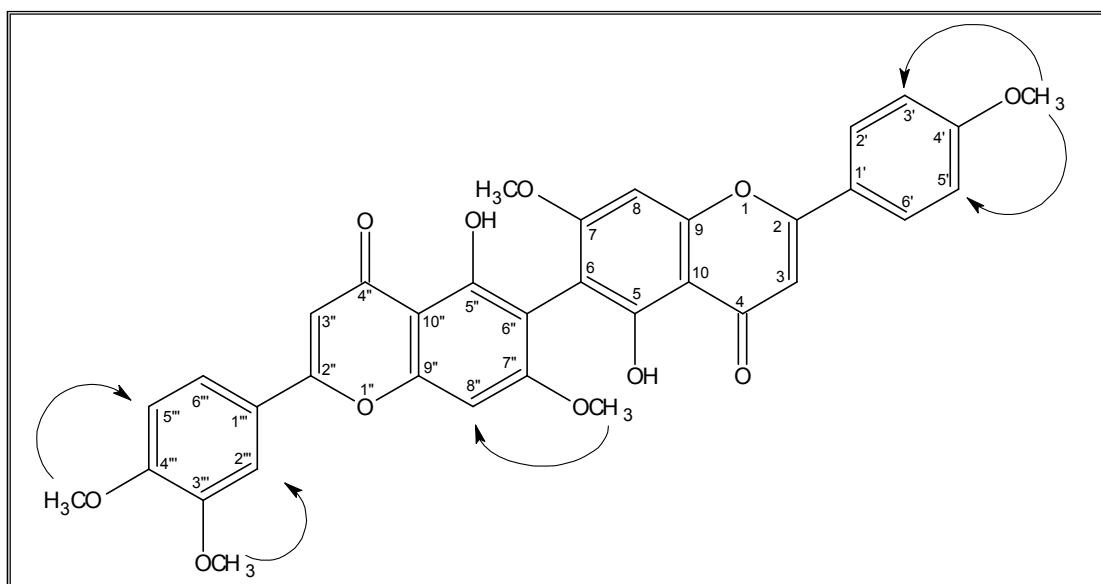


Figura 12. 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona-(6-C-6'')-5''-hidroxi-3''',4''',7''-trimetoxiflavona (MC3).

Identificação da substância MC4

O espectro de RMN-¹H (Tabela 6; Espectro 19) mostrou, além dos sinais em δ 6,19 ($J = 2,0$ Hz) e δ 6,36 ($J = 2,0$ Hz) referentes aos hidrogênios H6 e H8 em posição meta, um singlete em δ 6,92 referente aos hidrogênios H2' e H6' de um flavonóide, evidenciando que o anel B é tri-hidroxilado.

A presença de unidades de açúcares pôde ser observada pela presença dos sinais dos hidrogênios anoméricos em δ 5,22 (H1'') e δ 4,14 (H1''', $J = 7,5$ Hz). A semelhança desses valores com aqueles do **MC1** sugerem que trata-se de uma unidade de rhamnose e uma de xylose, o que foi confirmado pelos espectros 1D-TOCSY (Espectros 21 e 22).

O sinal em δ 134,4 no espectro de RMN-¹³C (Espectro 20) corresponde ao valor encontrado para o C3 de um flavonóide glicosilado na posição 3. No espectro de gHMBC (Espectro 23) observou-se o acoplamento entre o H1''' (δ 4,14) da xylose com o C2 (δ 80,6) da rhamnose, determinando-se assim de que forma estão ligados os açúcares. Os dados fornecidos pelos espectros bi-dimensionais (gHMBC e gHMQC) possibilitaram, ainda, a atribuição de todos os hidrogênios e carbonos (Tabela 6). O

espectro COSY (Espectro 24) possibilitou fazer a correlação dos sinais dos hidrogênios pertencentes às unidades dos açúcares.

Comparação dos deslocamentos químicos de **MC4** com os da literatura (SOICKE et al., 1990) confirmaram a identificação da miricetina-3-*O*- β -xylopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -rhamnopyranosídeo (Figura 13).

Tabela 6. Deslocamentos químicos (δ) de RMN-¹H e RMN-¹³C da substância **MC4** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO-*d*₆).

Posição	RMN- ¹ H		RMN- ¹³ C	
	MC4	Literatura (SOICKE et al., 1990)	MC4	Literatura (SOICKE et al., 1990)
2	-	-	157,0	157,2
3	-	-	134,4	134,4
4	-	-	177,8	177,8
5	-	-	161,3	161,3
6	6,19 <i>d</i> (2,0)	6,18 <i>d</i> (1,9)	98,7	98,7
7	-	-	164,2	164,4
8	6,36 <i>d</i> (2,0)	6,35 <i>d</i> (1,9)	93,5	93,5
9	-	-	156,4	156,2
10	-	-	103,9	103,9
1'	-	-	119,2	119,4
2'	6,92 <i>s</i>	6,93 <i>s</i>	107,6	107,8
3'	-	-	145,8	145,8
4'	-	-	136,8	136,8
5'	-	-	145,8	145,8
6'	6,92 <i>s</i>	6,93 <i>s</i>	107,6	107,8
<i>Rhamnose</i>				
1''	5,22 <i>s</i>	5,26 <i>d</i> (1,4)	101,0	101,0
2''	4,08 <i>dd</i> (4,0; 1,5)	4,01 <i>s</i>	80,6	80,6
3''	3,63 <i>dd</i> (9,5; 3,5)	-	70,4	70,4
4''	3,13 <i>m</i>	-	71,8	71,9
5''	3,77 <i>dd</i> (9,0; 6,0)	-	70,2	69,4
6''	0,93 <i>d</i> (6,0)	0,93 <i>d</i> (6,1)	17,4	17,4
<i>Xylose</i>				
1'''	4,14 <i>d</i> (7,5)	4,13 <i>d</i> (7,5)	106,5	106,4
2'''	2,95 <i>t</i> (8,0)	-	73,8	73,8
3'''	3,08 <i>t</i> (9,0)	-	76,2	76,3
4'''	3,19 <i>m</i>	-	69,3	70,2
5'''a	3,45 <i>dd</i> (5,0; 11,5)	-	65,6	65,7
5'''b	2,89 <i>d</i> (11,0)	-		

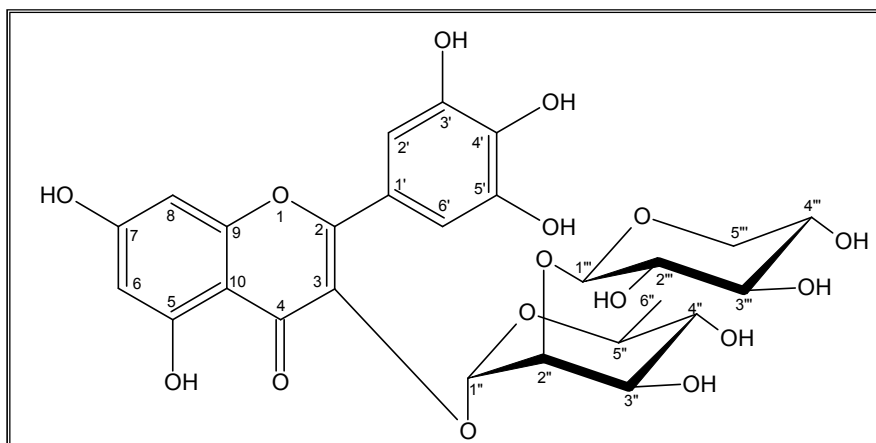


Figura 13. Miricetina-3-*O*- β -xylopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -rhamnopyranosídeo (**MC4**).

Identificação da substância MC5

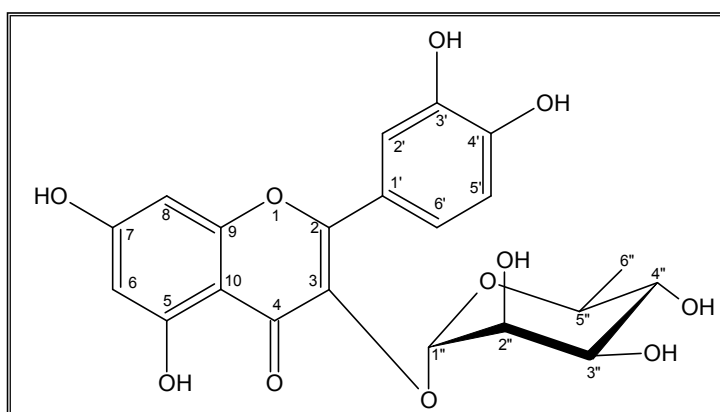
O espectro de RMN- ^1H (Tabela 7; Espectro 25) mostrou-se semelhante ao de **MC1**. As principais diferenças foram a ausência do sinal na região de δ 4,16, referente ao hidrogênio anomérico da unidade de xylose e dos respectivos sinais de carbono no espectro de RMN- ^{13}C (Espectro 26), existente em **MC1**.

Todos os hidrogênios e carbonos foram atribuídos com os dados dos espectros mono e bi-dimensionais (gHMBC e gHMQC). A seqüência dos deslocamentos químicos da unidade de açúcar foi obtida através de experimentos 1D-TOCSY (Espectro 27) e as correlações existentes no espectro COSY (Espectro 29).

Os dados de **MC5**, comparados com os existentes na literatura (BILIA et al., 1996) confirmam a identidade desta substância como sendo a quercetina-3-*O*- α -rhamnopyranosídeo (Figura 14).

Tabela 7. Deslocamentos químicos (δ) de RMN-¹H e RMN-¹³C da substância **MC5** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO-*d*₆).

Posição	RMN- ¹ H		RMN- ¹³ C	
	MC5	Literatura (BILIA et al., 1996)	MC5	Literatura (BILIA et al., 1996)
2	-	-	157,3	156,4
3	-	-	134,2	134,4
4	-	-	177,7	177,7
5	-	-	156,4	157,0
6	6,19 <i>d</i> (2,0)	6,20 <i>d</i> (2,1)	98,7	98,6
7	-	-	164,2	164,0
8	6,38 <i>d</i> (2,0)	6,36 <i>d</i> (2,1)	93,6	93,5
9	-	-	161,3	161,2
10	-	-	104,0	104,2
1'	-	-	120,7	120,3
2'	7,29 <i>d</i> (2,0)	7,33 <i>d</i> (2,1)	115,6	115,4
3'	-	-	145,2	145,1
4'	-	-	148,4	148,3
5'	6,86 <i>d</i> (8,0)	6,93 <i>d</i> (8,3)	115,4	115,8
6'	7,24 <i>dd</i> (2,0; 8,0)	7,30 <i>dd</i> (2,1; 8,3)	121,1	121,0
OH-5				
	12,65 <i>sl</i>			
<i>Rhamnose</i>				
1''	5,25 <i>s</i>	5,35 <i>d</i> (1,8)	101,8	101,9
2''	3,96 <i>dd</i> (1,5; 3,0)	3,20-3,82	70,0	70,4
3''	3,50 <i>dd</i> (3,5; 9,5)	3,20-3,82	70,4	70,6
4''	3,15 <i>t</i> (9,0)	3,20-3,82	71,2	71,5
5''	3,21 <i>dd</i> (6,0; 9,0)	3,20-3,82	70,6	70,1
6''	0,82 <i>d</i> (5,5)	0,95 <i>d</i> (6,2)	17,5	17,3

**Figura 14.** Quercetina-3-*O*- α -rhamnopiranosídeo (**MC5**).

Identificação da substância MC6

O espectro de RMN-¹H (Espectro 30) mostrou, além dos sinais em δ 6,20 ($J = 1,8$ Hz) e δ 6,36 ($J = 2,1$ Hz) referentes aos hidrogênios H6 e H8, um singlete em δ 6,89 referente aos hidrogênios H2' e H6' do anel B de um flavonóide, evidenciando que trata-se de um derivado da miricetina.

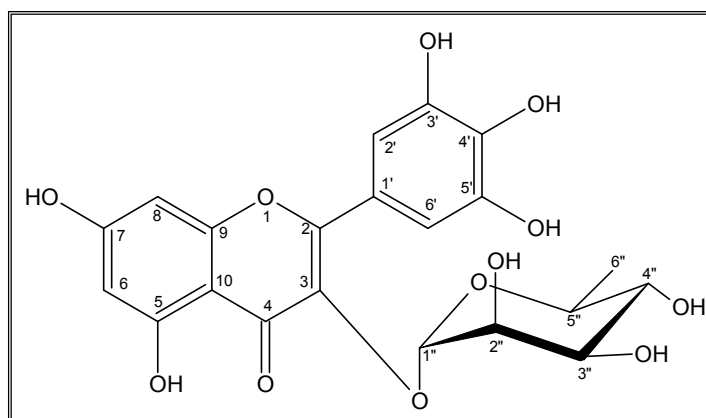
O singlete em δ 5,20 (H1''), referente ao hidrogênio anomérico, e o sinal em δ 0,85 (H6''), $J = 6,0$ Hz) sugeriram a presença de uma rhamnose. A natureza do açúcar é confirmada através do espectro 1D-TOCSY (Espectro 32), pois irradiando-se o H1'', houve correlação somente com H2'' (δ 3,98).

Os sinais em δ 157,4 (C2) e δ 134,3 (C3) indicaram que a unidade de açúcar está ligada na posição 3 do esqueleto flavonoídico. Com os dados obtidos pelos experimentos bi-dimensionais (gHMQC e gHMBC) pôde-se atribuir todos os hidrogênios e carbonos da molécula (Tabela 8), enquanto que a seqüência dos deslocamentos químicos da unidade de açúcar foi obtida através de experimentos 1D-TOCSY e as correlações existentes no espectro COSY (Espectro 33).

A comparação dos dados de **MC6** com os existentes na literatura confirmam a identificação da substância como sendo a miricetina-3-*O*- α -rhamnopiranosídeo (CHUNG et al., 2004; MARKHAM et al., 1978), ilustrada na Figura 15. Os valores de deslocamento químico de RMN-¹H de **MC6** apresentam pequenas diferenças em relação aos valores encontrados na literatura, pois Chung et al. (2004) realizou os experimentos de RMN utilizando CD₃OD como solvente.

Tabela 8. Deslocamentos químicos (δ) de RMN-¹H e RMN-¹³C da substância **MC6** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO-*d*₆).

Posição	RMN- ¹ H		RMN- ¹³ C	
	MC6	Literatura (CHUNG et al., 2004)	MC6	Literatura (MARKHAM et al., 1978)
2	-	-	157,4	156,2
3	-	-	134,3	134,5
4	-	-	177,8	177,8
5	-	-	161,3	161,4
6	6,20 <i>d</i> (1,8)	6,19 <i>d</i> (2,3)	98,6	98,7
7	-	-	164,1	164,1
8	6,36 <i>d</i> (2,1)	6,35 <i>d</i> (2,3)	93,5	93,6
9	-	-	156,4	157,4
10	-	-	104,0	104,2
1'	-	-	119,6	119,8
2'	6,89 <i>s</i>	6,94 <i>s</i>	107,9	108,3
3'	-	-	145,7	145,8
4'	-	-	136,4	136,5
5'	-	-	145,7	145,8
6'	6,89 <i>s</i>	6,94 <i>s</i>	107,9	108,3
<i>Rhamnose</i>				
1''	5,20 <i>s</i>	5,30 <i>d</i> (1,8)	101,9	102,1
2''	3,98 <i>s</i>	4,21 <i>dd</i> (3,2;1,8)	70,4	70,5
3''	3,56 <i>dd</i> (9,5; 3,0)	3,78 <i>dd</i> (9,2;3,2)	70,5	70,7
4''	3,16 <i>t</i> (9,5)	3,51 <i>dq</i> (9,2;6,4)	71,3	71,6
5''	3,36 <i>m</i>	3,33 <i>t</i> (9,2)	70,0	70,1
6''	0,85 <i>d</i> (6,0)	0,95 <i>d</i> (6,4)	17,5	21,4

**Figura 15.** Miricetina-3-*O*- α -rhamnopiranosídeo (**MC6**).

Identificação da substância MC7

A semelhança entre os espectros de RMN-¹H (Espectro 34) de **MC7** com os de **MC1** e **MC5** evidenciam que trata-se de uma molécula derivada da quercetina.

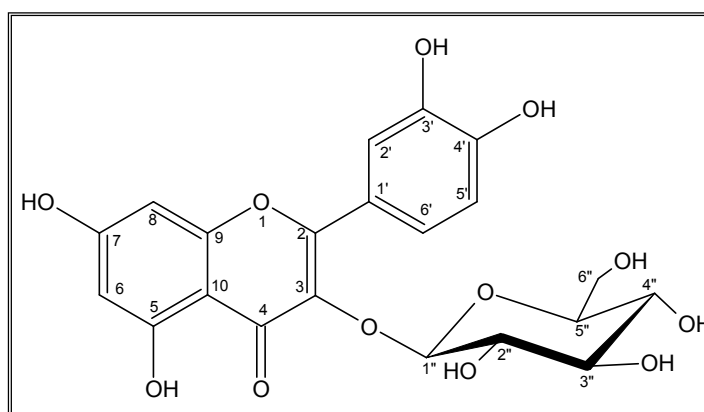
A presença de uma unidade de açúcar foi deduzida através de um dubleto em δ 5,35, com uma constante de acoplamento de $J = 7,2$ Hz. O espectro COSY (Espectro 36) possibilitou fazer a correlação dos sinais dos hidrogênios pertencentes à unidade de açúcar. A comparação desses dados com a literatura (MARKHAM et al., 1978; AGRAWAL, 1989; HARBORNE, 1996) possibilitou a identificação da glicose.

Devido a pouca massa obtida para esta substância, não foi possível registrar os espectros de RMN-¹³C dificultando, desta maneira, a caracterização completa desta estrutura. Alguns sinais foram observados nos experimentos de gHMQC e gHMBC (Tabela 9).

Com a comparação dos deslocamentos químicos de **MC7** com os da literatura (MARKHAM et al., 1978) pode-se sugerir a estrutura da quercetina-3-*O*- β -glicopiranosídeo para **MC7** (Figura 16).

Tabela 9. Deslocamentos químicos (δ) de RMN-¹H e RMN-¹³C da substância **MC7** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO-*d*₆).

Posição	RMN- ¹ H		RMN- ¹³ C	
	MC7	Literatura (SANBONGI et al., 1998)	MC7	Literatura (MARKHAM et al., 1978)
2	-	-	148,8	156,5
3	-	-	*	133,7
4	-	-	*	177,6
5	-	-	161,8	161,3
6	6,18 <i>d</i> (1,8)	6,20 <i>d</i> (2,0)	98,5	98,8
7	-	-	164,8	164,2
8	6,39 <i>d</i> (1,8)	6,40 <i>d</i> (2,0)	93,5	93,6
9	-	-	156,8	156,5
10	-	-	104,5	104,2
1'	-	-	122,0	121,4
2'	7,52 <i>d</i> (2,0)	7,57 <i>d</i>	116,0	115,3
3'	-	-	145,4	144,8
4'	-	-	149,2	148,5
5'	6,86 <i>d</i> (8,1)	6,84 <i>d</i> (9,0)	115,1	116,5
6'	7,56 <i>dd</i> (2,0; 8,0)	7,58 <i>dd</i>	121,0	121,6
OH-5				
12,60 <i>sl</i>				
Glicose				
1''	5,35 <i>d</i> (7,2)	5,46 <i>d</i> (7,4)	101,8	101,4
2''	3,18-3,30	3,23 <i>m</i>	*	74,3
3''	3,18-3,30	3,23 <i>m</i>	*	76,8
4''	3,18-3,30	3,09 <i>m</i>	*	70,3
5''	3,18-3,30	3,09 <i>m</i>	*	77,5
6''a	3,18-3,30	3,58 <i>m</i>	*	61,3
6''b	3,18-3,30	3,32 <i>m</i>	*	

Valores de RMN-¹³C atribuídos através dos experimentos gHMQC e gHMBC* Valores de RMN-¹³C não observados**Figura 16.** Quercetina-3-*O*- β -glicopiranosídeo (**MC7**).

Identificação da substância **MC8**

O espectro de RMN-¹H (Espectro 37) mostrou os sinais na região aromática característicos de um flavonóide: os dubletos em δ 6,15 e δ 6,38 referentes aos hidrogênios H6 e H8 do anel A e os dubletos em δ 6,86 e δ 7,99 referentes aos hidrogênios H3'/5' e H2'/6', com acoplamento orto, indicando que o anel B é mono-hidroxilado. Foi possível identificar também uma unidade de ácido *p*-cumárico: os dubletos em δ 6,11 e δ 7,32 ($J = 15$ Hz) foram atribuídos aos H α e H β , indicando a configuração *trans* da ligação dupla; os dubletos em δ 7,37 ($J = 8,5$ Hz) e em δ 6,78 ($J = 9,0$ Hz) foram atribuídos aos H2'''/6''' e H3'''/H5''' , respectivamente.

No espectro de RMN-¹H observou-se, ainda, um dubleto em δ 5,45 ($J = 7,5$ Hz) referente ao hidrogênio anomérico de uma unidade de açúcar. O espectro de 1D-TOCSY (Espectro 39), forneceu a seqüência dos deslocamentos químicos de uma glicose. Irradiando-se o hidrogênio anomérico, observou-se a presença dos sinais de todos os hidrogênios, indicando a correlação entre eles.

O valor do deslocamento químico do carbono 3 (δ 133,1), no espectro de RMN-¹³C (Espectro 38), sugeriu que a unidade de açúcar está ligada nesta posição do esqueleto do flavonóide.

O espectro gHMBC (Espectro 40) forneceu correlação entre o hidrogênio em δ 4,04 e o carbono em δ 166,2, indicando que o ácido está ligado na posição 6 do açúcar.

Os dados fornecidos pelos espectros bi-dimensionais (gHMQC e gHMBC) possibilitaram a atribuição de todos os hidrogênios e carbonos (Tabela 10).

Os dados de **MC8**, comparados com os existentes na literatura (BUDZIANOWSKI; SKRZYPCZAK, 1995) confirmam a identidade desta substância como sendo o kaempferol-3-*O*- β -(6"-cumaroil)-glicopiranosídeo (Figura 17).

Tabela 10. Deslocamentos químicos (δ) de RMN-¹H e RMN-¹³C da substância **MC8** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO-*d*₆).

Posição	RMN- ¹ H		RMN- ¹³ C	
	MC8	Literatura (BUDZIANOWSKI;S KRZYPCZAK, 1995)	MC8	Literatura (BUDZIANOWSKI;S KRZYPCZAK, 1995)
2	-	-	156,5	156,4
3	-	-	133,1	133,0
4	-	-	177,4	177,3
5	-	-	161,2	161,1
6	6,15 <i>d</i> (2,5)	6,18 <i>d</i> (2,1)	98,8	98,7
7	-	-	164,2	164,1
8	6,38 <i>d</i> (2,5)	6,41 <i>d</i> (2,1)	93,7	93,6
9	-	-	156,4	156,3
10	-	-	103,9	103,8
1'	-	-	120,8	120,7
2'	7,99 <i>d</i> (9,0)	8,02 <i>d</i> (8,9)	130,8	130,0
3'	6,86 <i>d</i> (9,0)	6,88 <i>d</i> (8,9)	115,1	115,7
4'	-	-	160,0	159,9
5'	6,86 <i>d</i> (9,0)	6,88 <i>d</i> (8,9)	115,1	115,7
6'	7,99 <i>d</i> (9,0)	8,02 <i>d</i> (8,9)	130,8	130,0
OH-5	12,60 <i>sl</i>			
<i>Glicose</i>				
1''	5,45 <i>d</i> (7,5)	5,48 <i>d</i> (7,5)	101,0	100,9
2''	3,39 <i>sl</i>	3,35-3,20	74,2	74,2
3''	3,26 <i>d</i> (8,5)	3,35-3,20	76,2	76,2
4''	3,19 <i>d</i> (8,5)	3,35-3,20	70,0	69,9
5''	3,23 <i>d</i> (9,0)	3,35-3,20	74,1	74,0
6''a	4,28 <i>d</i> (10,0)	4,30 <i>dd</i> (2,0;11,7)	63,0	62,9
6''b	4,04 <i>dd</i> (6,0;12,0)	4,06 <i>dd</i> (6,3;11,7)	63,0	62,9
<i>Ácido p-cumárico</i>				
1'''	-	-	124,9	124,8
2'''	7,37 <i>d</i> (8,5)	7,39 <i>d</i> (8,8)	130,1	130,7
3'''	6,78 <i>d</i> (9,0)	6,81 <i>d</i> (8,8)	115,8	115,0
4'''	-	-	159,8	159,7
5'''	6,78 <i>d</i> (9,0)	6,81 <i>d</i> (8,8)	115,8	115,0
6'''	7,37 <i>d</i> (8,5)	7,39 <i>d</i> (8,8)	130,1	130,7
7''' (β)	7,32 <i>d</i> (15)	7,37 <i>d</i> (16)	144,6	144,5
8''' (α)	6,11 <i>d</i> (15)	6,14 <i>d</i> (16)	113,7	113,6
9''' (C=O)	-	-	166,2	166,1

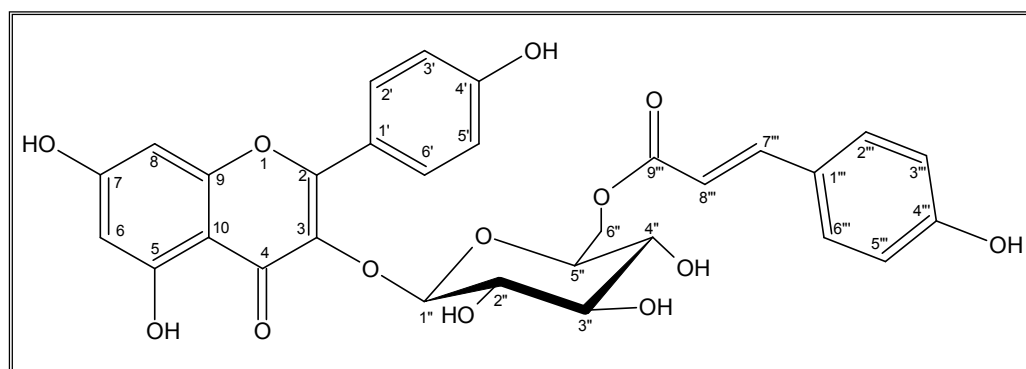


Figura 17. Kaempferol-3-O- β -(6''-cumaroyl)-glicopiranosídeo (MC8).

4.5 Fracionamento do Extrato Metanólico das Folhas de *Miconia rubiginosa*

A cromatografia em contracorrente (CCC) é uma forma de cromatografia de partição líquido-líquido sem o uso de adsorvente. Esta técnica consiste na utilização de duas fases líquidas imiscíveis, onde uma é a fase móvel e a outra a fase estacionária. A distribuição do soluto em cada uma das fases é determinada através de seus respectivos coeficientes de partição. Esta técnica é amplamente utilizada na separação de produtos naturais, pois devido à ausência de suporte sólido, evita-se problemas como a adsorção irreversível das amostras e a degradação de seus constituintes (MARSTON; HOSTETTMANN, 1994; OKA et al., 1998). Outra vantagem desta técnica é que a mesma permite a injeção de grande quantidade de amostra sem necessidade de pré-purificações, a recuperação total da mesma e, também, um baixo consumo de solventes.

A técnica de cromatografia em contracorrente mais utilizada atualmente no isolamento de produtos naturais é a Cromatografia em Contracorrente de Alta Velocidade ("HSCCC: High Speed Counter-Current Chromatography") (HAN et al., 2002), devido a suas vantagens tais como diminuição do tempo de análise sem perda de resolução e utilização de quantidades menores de solvente (MARSTON; HOSTETTMANN, 1994).

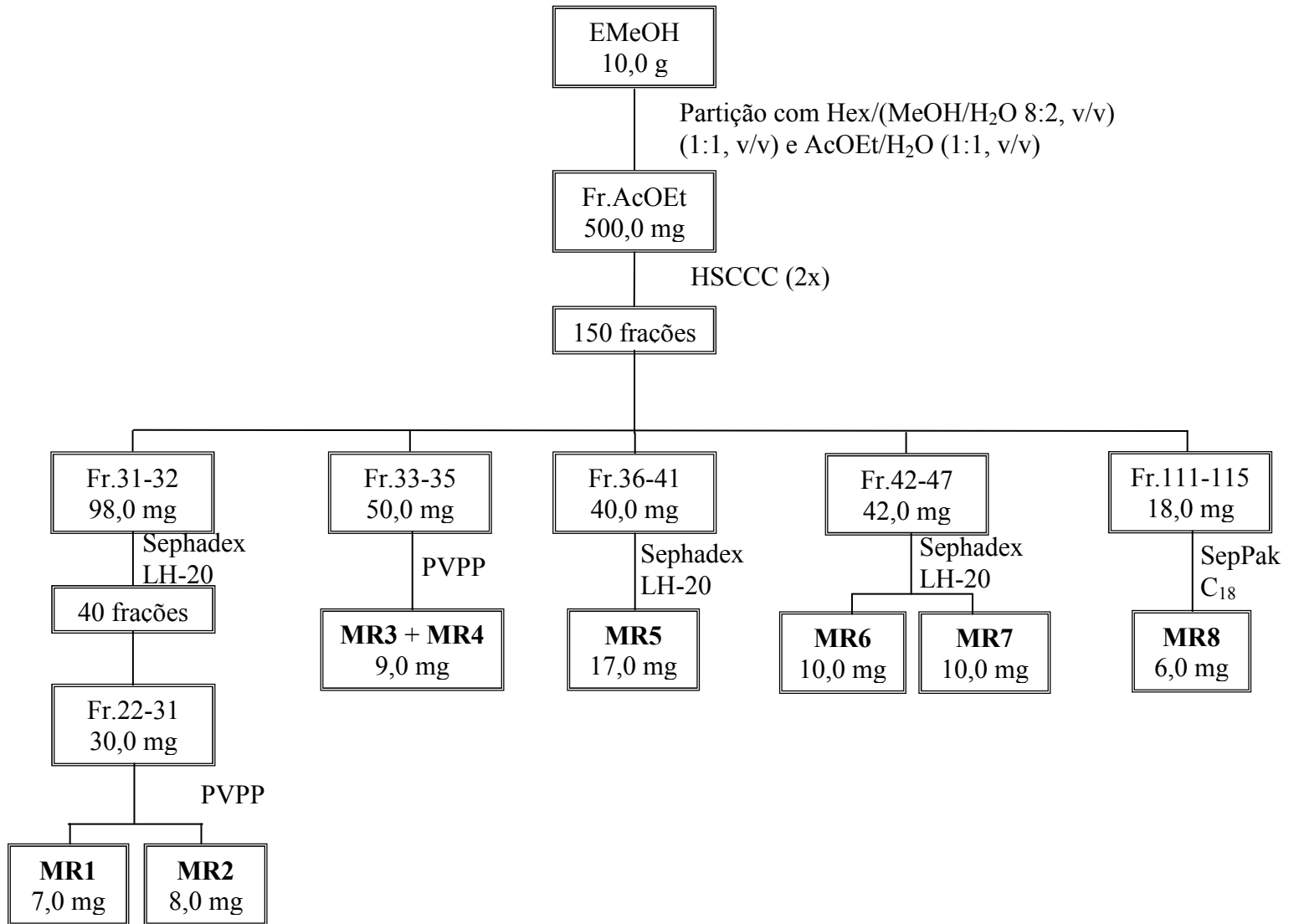
Para o estudo do extrato EMeOH das folhas de *M. rubiginosa*, primeiramente foi realizada a remoção dos taninos. Para isso, foram realizados testes de partição com *n*-BuOH e AcOEt. A análise por CCDC das duas frações obtidas mostrou que a partição com AcOEt foi mais efetiva na separação dos componentes poliméricos das substâncias

de interesse. O melhor sistema de solvente para a análise por CCDC deste extrato foi a mistura de $\text{CHCl}_3/\text{MeOH}/n\text{-PrOH}/\text{H}_2\text{O}$, na proporção 5:6:1:4 (fase inferior).

O extrato EMeOH (10,0 g) foi submetido primeiramente a uma partição com 1,0 L de Hexano/(MeOH/H₂O 8:2, v/v) (1:1, v/v, 3x), para a remoção de clorofila. A fração hidro-alcoólica foi seca e resuspendida em H₂O, sendo submetida, então, a uma partição com 1,0 L de AcOEt/H₂O (1:1, v/v, 3x). As frações obtidas foram concentradas em evaporador rotativo à pressão reduzida e secas em capela sob jato de ar comprimido. Obteve-se 0,1 g da fração hexânica, 1,7 g da fração AcOEt e 7,5 g da fração aquosa.

Após a escolha do sistema de solvente, AcOEt/*n*-PrOH/H₂O (140:8:80 v/v/v), preparou-se a mistura em funil de separação. Os solventes foram agitados e deixados em repouso por aproximadamente 12 horas para que houvesse a separação das fases e também proporcionar a saturação de ambas as fases do sistema. A fase inferior (aquosa) foi usada como fase estacionária enquanto que a fase superior (orgânica) foi usada como fase móvel. A fase inferior (estacionária) foi bombeada para a coluna. Depois da coluna toda preenchida (325,0 mL), a fase superior (móvel) foi bombeada com um fluxo de 1,0 mL.min⁻¹ para a coluna com o equipamento ligado a uma velocidade de 850 rpm. O volume morto medido foi de 48,0 mL. Pesou-se 500,0 mg da fração AcOEt e dissolveu-se em uma mistura de 1:1 da fase aquosa e da fase orgânica, totalizando 10,0 mL da mistura. A mistura foi filtrada e injetada no *loop* com auxílio de uma seringa. Coletou-se frações de 5,0 mL cada, obtendo-se 150 frações. Utilizou-se um coletor automático Redifrac (Pharmacia[®]). Este processo foi realizado duas vezes para obtenção de massa suficiente para a análise estrutural dos compostos isolados. As frações semelhantes das duas injeções foram reunidas. A purificação das substâncias foi realizada através de cromatografia em coluna (Sephadex LH-20 e PVPP) ou utilizando-se cartuchos SepPak C₁₈.

O esquema 4 mostra o procedimento experimental desenvolvido para o fracionamento das substâncias.



Esquema 4. Fracionamento do extrato EMeOH das folhas de *M. rubiginosa*.

4.6 Elucidação Estrutural das Substâncias Isoladas do Extrato Metanólico das Folhas de *Miconia rubiginosa*

Identificação da substância MR1

Os espectros de RMN-¹H (Espectro 43) e RMN-¹³C (Espectro 44) de **MR1** mostraram-se semelhantes aos de **MC5**.

Através de análise por CCDC utilizando como padrão a substância isolada para a espécie *M. cabucu* observou-se que as manchas na placa possuíam o mesmo fator de retenção (Rf) e mesma coloração quando revelados com anisaldeído/H₂SO₄. Para confirmar a estrutura desta substância, registramos os espectros de RMN-¹H e ¹³C.

A região de aromáticos do espectro de RMN-¹H mostrou os sinais de deslocamentos químicos de hidrogênio referentes a uma unidade de quercetina: δ 7,28 (H2', $J = 2,5$ Hz), δ 7,23 (H6', $J = 2,5$ e 8,0 Hz), δ 6,85 (H5', $J = 8,0$ Hz) referentes aos hidrogênios do anel B e δ 6,36 (H8, $J = 2,0$ Hz), δ 6,18 (H6, $J = 2,0$ Hz) dos hidrogênios do anel A.

O espectro de RMN-¹³C apresentou todos os sinais de deslocamentos químicos semelhantes aos da substância **MC5**.

A identificação da unidade de açúcar como sendo a rhamnose foi realizada pelo sinal do hidrogênio anomérico em δ 5,24 (H1'', $J = 1,5$ Hz) e pelo experimento 1D-TOCSY (Espectro 45), com irradiação no hidrogênio anomérico. Observou-se ainda o sinal de deslocamento químico em δ 0,81 ($J = 6,5$ Hz) referente aos hidrogênios metílicos da rhamnose.

Através do resultado obtido com a análise por CCDC e comparação dos valores de RMN-¹H e ¹³C (Tabela 11) com os encontrados para **MC5** e com a literatura (BILIA et al., 1996) confirmou-se a identificação da quercetina-3-*O*- α -rhamnopiranosídeo (Figura 14).

Tabela 11. Deslocamentos químicos (δ) de RMN-¹H e RMN-¹³C da substância **MR1** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO-*d*₆).

Posição	RMN- ¹ H	RMN- ¹³ C
2	-	157,2
3	-	134,2
4	-	177,7
5	-	156,4
6	6,18 <i>d</i> (2,0)	98,7
7	-	164,4
8	6,36 <i>d</i> (2,0)	93,6
9	-	161,3
10	-	104,0
1'	-	120,7
2'	7,28 <i>d</i> (2,5)	115,6
3'	-	145,2
4'	-	148,4
5'	6,85 <i>d</i> (8,0)	115,4
6'	7,23 <i>dd</i> (2,5; 8,0)	121,1
OH-5	12,60 <i>sl</i>	
<i>Rhamnose</i>		
1''	5,24 <i>d</i> (1,5)	101,8
2''	3,96 <i>d</i> (1,5)	70,0
3''	3,50 <i>dd</i> (3,5; 9,0)	70,6
4''	3,64 <i>m</i>	71,2
5''	3,74 <i>t</i> (6,0; 6,5)	70,4
6''	0,81 <i>d</i> (6,0)	17,5

Identificação da substância **MR2**

O espectro de RMN-¹H (Espectro 46) de **MR2** apresentou sinais na região aromática do espectro característicos de um flavonóide. Os sinais em δ 7,52 (H6', J = 2,0 e 8,5 Hz), δ 7,46 (H2', J = 1,5 Hz) e δ 6,84 (H5', J = 8,5 Hz) evidenciaram o anel B di-oxigenado de um derivado de quercetina. Nessa região também observou-se os dubletos referentes aos hidrogênios H8 e H6 em δ 6,39 (J = 1,5 Hz) e δ 6,18 (J = 1,5 Hz), respectivamente.

A presença de uma unidade de açúcar foi observada pelo hidrogênio anomérico em δ 5,55 (H1'', J = 2,5 Hz). A sequência dos deslocamentos químicos foi obtida através do experimento 1D-TOCSY (Espectro 48) e as correlações existentes no espectro COSY (Espectro 50).

Segundo Agrawal (1989), a diferenciação entre furanose e piranose pode ser prontamente realizada observando-se os deslocamentos químicos dos carbonos 1'', 2'' e 4''. Para a furanose estes valores apresentam deslocamentos químicos em campo mais baixo (4-14 ppm). Por exemplo, observa-se para o C1'' (δ 109,1 e δ 104,7); para o C2'' (δ 81,5 e δ 71,6) e para o C4'' (δ 84,7 e δ 69,1) para α -furanose e α -piranose respectivamente. Os valores dos deslocamentos químicos de **MR3** para os carbonos 1'', 2'' e 4'' foram (δ 107,9; δ 82,2 e δ 86,0), respectivamente, indicando portanto que o açúcar é a arabinofuranose.

A constante de acoplamento do hidrogênio anomérico ($J = 2,5$ Hz), confirma que a configuração relativa da arabinofuranose é alfa. (HARBORNE, 1996).

O espectro de RMN-¹³C (Espectro 47) apresentou 15 sinais referentes ao esqueleto flavonoídico, e mais cinco sinais na região de açúcares.

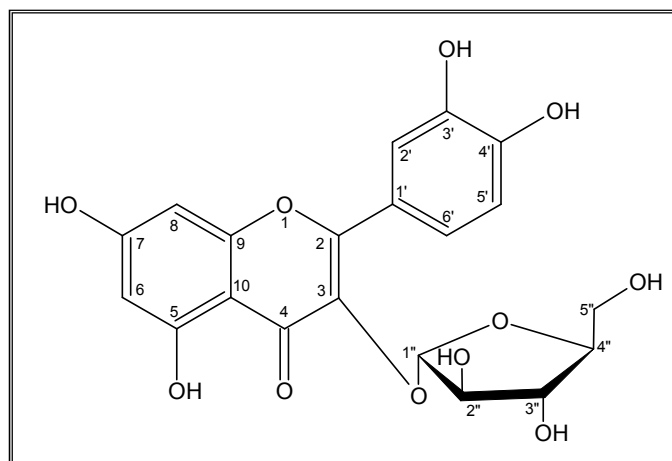
A localização da unidade de açúcar foi definida pelo experimento de gHMBC (Espectro 49). Observou-se a correlação a longa distância entre o H1'' (δ 5,55) e o C3 (δ 133,5), permitindo confirmar que o açúcar está ligado na posição 3 da aglicona.

Os dados fornecidos pelos espectros bi-dimensionais (gHMQC e gHMBC) possibilitaram a atribuição de todos os hidrogênios e carbonos da molécula.

A comparação dos dados espectroscópicos de **MR2** (Tabela 12) com os encontrados na literatura (OSSIPOV et al., 1995) permitiram a identificação do composto isolado como sendo a quercetina-3-*O*- α -arabinofuranosídeo (Figura 18).

Tabela 12. Deslocamentos químicos (δ) de RMN-¹H e RMN-¹³C da substância **MR2** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO-*d*₆).

Posição	RMN- ¹ H		RMN- ¹³ C	
	MR2	Literatura (OSSIPOV et al., 1995)	MR2	Literatura (OSSIPOV et al., 1995)
2	-	-	157,0	156,3
3	-	-	133,5	133,3
4	-	-	177,8	177,7
5	-	-	161,3	161,2
6	6,18 <i>d</i> (1,5)	6,20 <i>d</i> (2,0)	98,8	98,7
7	-	-	164,4	164,3
8	6,39 <i>d</i> (1,5)	6,40 <i>d</i> (2,0)	93,7	93,5
9	-	-	156,4	156,3
10	-	-	104,0	103,9
1°	-	-	121,0	120,9
2°	7,46 <i>d</i> (1,5)	7,48 <i>d</i> (2,0)	115,6	115,5
3°	-	-	145,2	145,1
4°	-	-	148,6	148,5
5°	6,84 <i>d</i> (8,5)	6,85 <i>d</i> (8,5)	115,6	115,5
6°	7,52 <i>dd</i> (2,0; 8,5)	7,55 <i>dd</i> (2,0; 8,0)	121,8	121,7
OH-5	12,60 <i>s</i>			
<i>Arabinofuranose</i>				
1''	5,55 <i>d</i> (2,5)	5,60 <i>s</i>	107,9	107,8
2''	4,14 <i>d</i> (3,0)	3,25-3,75	82,2	82,1
3''	3,70 <i>d</i> (4,0)	3,25-3,75	77,1	76,9
4''	3,56 <i>d</i> (5,5)	3,25-3,75	86,0	85,8
5''	3,30 <i>d</i> (13,5)	3,25-3,75	60,8	60,6

**Figura 18.** Quercetina-3-*O*- α -arabinofuranosídeo (**MR2**).

Identificação das substâncias MR3 e MR4

Os espectros de RMN-¹H (Espectro 51, Tabela 13) e RMN-¹³C (Espectro 52, Tabela 14) de **MR3** e **MR4** apresentaram dois conjuntos de sinais muito próximos, indicando tratar-se da mistura de duas substâncias, ambas derivadas da quercetina e glicosiladas na mesma posição.

Ambas as substâncias apresentaram sinais na região aromática. Uma mostrou os sinais em δ 7,56, δ 7,53, δ 6,83, δ 6,40 e δ 6,19, enquanto os valores encontrados para a segunda foram δ 7,64, δ 7,51, δ 6,84, δ 6,40 e δ 6,19, para os hidrogênios H6'A/6'B, H2'A/2'B, H5'A/5'B, H8A/8B e H6A/6B, respectivamente.

No espectro de RMN-¹H observou-se a presença de dois sinais referentes aos hidrogênios anoméricos. No experimento gHMBC (Espectro 55) pôde-se observar a interação do hidrogênio anomérico em δ 5,27 (H1'') com o carbono 3^a em δ 133,8, assim como a interação do anomérico em δ 5,34 (H1''') com o carbono em δ 133,2 (C3B). Portanto, cada unidade de açúcar está ligado a uma das agliconas isoladas, ambas na posição 3.

A natureza das unidades de açúcar foi determinada através dos dados obtidos pelos espectros 1D-TOCSY (Espectros 53 e 54), COSY (Espectros 56 e 57) e subsequente comparação com a literatura.

Segundo Agrawal (1989) os deslocamentos químicos para os carbonos 1, 2 e 4 de arabinopiranosose são observados em campo mais alto (4-14 ppm) quando comparados às arabinofuranoses. Os valores dos carbonos 1, 2 e 4 da mistura de **MR3** e **MR4** foram observados em δ (101,4; 70,7; 66,0 e 101,8; 75,9; 69,4) respectivamente. Baseado nas informações obtidas e comparadas com os dados da literatura (FRAISSE et al., 2000; KIM et al., 2006), pôde-se concluir que ambos os açúcares são a arabinopiranosose, porém devido às diferenças espectrais existentes entre eles, trata-se da α -arabinopiranosose (δ 5,27, H1''), possuindo uma constante de acoplamento de $J = 5,0$ Hz e da β -arabinopiranosose (δ 5,34 H1''') com constante de acoplamento $J = 7,5$ Hz. Segundo SERVETTAZ et al., (1984), arabinopiranosose com constante de acoplamento de 7,0 Hz é típica de β -piranosídeo.

Os dados fornecidos pelos espectros bi-dimensionais possibilitaram a atribuição de todos os hidrogênios e carbonos pertencentes a cada molécula.

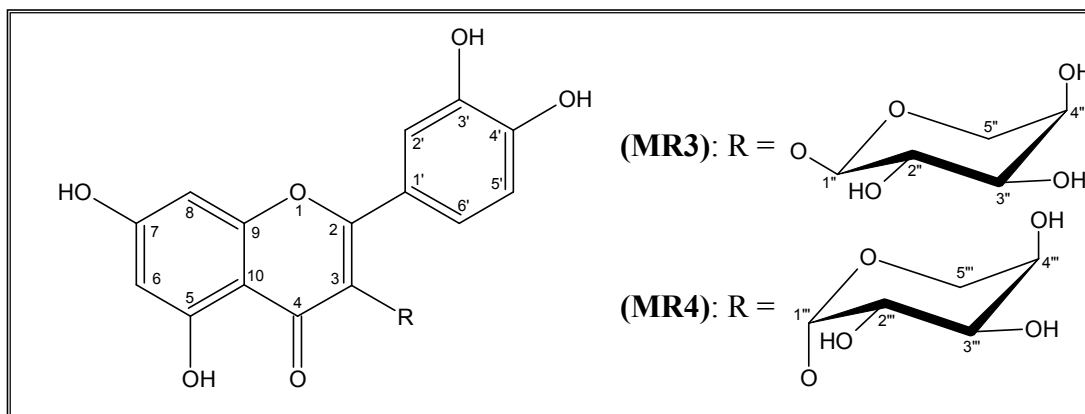
Portanto, foram confirmadas as estruturas de **MR3** e **MR4** como sendo quercetina-3-*O*- α -arabinopiranosídeo e quercetina-3-*O*- β -arabinopiranosídeo respectivamente (Figura 19).

Tabela 13. Deslocamentos químicos (δ) de RMN-¹H das substâncias **MR3** e **MR4** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO-*d*₆).

Posição	RMN- ¹ H			
	MR3	Literatura (FRAISSE et al., 2000)	MR4	Literatura (KIM et al., 2006)
2 ^a /2B	-	-	-	
3 ^a /3B	-	-	-	
4 ^a /4B	-	-	-	
5A/5B	-	-	-	
6A/6B	6,19 <i>d</i> (1,5)	6,18 <i>d</i> (2,0)	6,19 <i>d</i> (2,0)	6,20 <i>s</i>
7 ^a /7B	-	-	-	
8 ^a /8B	6,40 <i>d</i> (1,5)	6,38 <i>d</i> (2,0)	6,40 <i>d</i> (2,0)	6,40 <i>s</i>
9 ^a /9B	-	-	-	
10 ^a /10B	-	-	-	
1 [°] A/1 [°] B	-	-	-	
2 [°] A/2 [°] B	7,56 <i>d</i> (2,0)	7,50 <i>d</i> (2,0)	7,51 <i>d</i> (2,0)	7,75 <i>d</i> (1,5)
3 [°] A/3 [°] B	-	-	-	
4 [°] A/4 [°] B	-	-	-	
5 [°] A/5 [°] B	6,83 <i>d</i> (8,5)	6,83 <i>d</i> (8,5)	6,84 <i>d</i> (8,5)	6,87 <i>d</i> (8,5)
6 [°] A/6 [°] B	7,53 <i>dd</i> (2,5; 8,0)	7,65 <i>dd</i> (2,2; 8,5)	7,64 <i>dd</i> (2,0; 8,5)	7,58 <i>dd</i> (1,5; 8,0)
OH-5	12,60 <i>sl</i>			
<i>Arabino</i>				
<i>piranose</i>				
1 ^{''} (1 ^{'''})	5,27 <i>d</i> (5,0)	5,27 <i>d</i> (5,1)	5,34 <i>d</i> (7,5)	5,15 <i>d</i> (6,5)
2 ^{''} (2 ^{'''})	3,75 <i>d</i> (5,5; 7,5)	3,76 <i>dd</i> (5,1; 7,1)	3,31 <i>t</i> (8,5)	3,90 <i>t</i> (7,5)
3 ^{''} (3 ^{'''})	3,52 <i>dd</i> (3,5; 7,5)	3,52 <i>dd</i> (3,2; 7,1)	3,20 <i>t</i> (8,5)	3,65
4 ^{''} (4 ^{'''})	3,65 <i>m</i>	3,66 <i>ddd</i> (2,0; 3,2; 5,2)	3,64 <i>m</i>	3,82
5 ^{''} (5 ^{'''})a	3,20 <i>d</i> (11,5)	3,22 <i>dd</i> (2,0; 11,2)	2,97 <i>dd</i> (9,5; 11,5)	3,82
5 ^{''} (5 ^{'''})b	3,62 <i>d</i> (11,5)	3,60 <i>dd</i> (5,2; 11,2)	3,64 <i>dd</i> (5,0; 11,5)	3,45 <i>dd</i> (3,0; 13,5)

Tabela 14. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ^{13}C das substâncias **MR3** e **MR4** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).

Posição	RMN- ^{13}C			
	MR3	Literatura (FRAISSE et al., 2000)	MR4	Literatura (KIM et al., 2006)
2A/2B	156,3	156,3	156,2	158,8
3A/3B	133,8	133,6	133,2	135,8
4A/4B	177,5	177,4	177,3	179,6
5A/5B	161,2	161,1	161,2	163,2
6A/6B	98,7	98,7	98,7	100,1
7A/7B	164,3	164,6	164,3	166,3
8A/8B	93,5	93,5	93,6	94,9
9A/9B	156,3	156,1	156,3	158,6
10A/10B	103,9	103,7	103,9	105,7
1'A/1'B	121,0	120,8	120,9	123,0
2'A/2'B	116,1	115,6	115,8	117,6
3'A/3'B	144,9	144,9	145,0	146,1
4'A/4'B	148,6	148,6	148,6	150,1
5'A/5'B	115,3	115,3	115,4	116,3
6'A/6'B	121,5	122,0	122,0	123,2
<i>Arabinopiranosose</i>				
1'' (1''')	101,4	101,4	101,8	104,8
2'' (2''')	70,7	70,7	73,6	73,0
3'' (3''')	71,6	71,6	75,9	74,3
4'' (4''')	66,0	66,0	69,4	69,3
5'' (5''')a	64,3	64,2	66,0	67,1
5'' (5''')b				

**Figura 19.** Quercetina-3- O - α -arabinopiranosídeo (**MR3**) e quercetina-3- O - β -arabinopiranosídeo (**MR4**).

Identificação da substância MR5

Análise do espectro de RMN-¹H de **MR5** (Espectro 58) apresentou o sinal de um dubleto em δ 6,88 (H2', $J = 1.5$ Hz), além de sinais em δ 6,66 (H6') e δ 6,65 (H5'), os quais indicaram a presença de um anel B 3' e 4' substituído.

Outros sinais de deslocamentos químicos foram observados em δ 5,88 (H8, $J = 2,5$ Hz) e δ 5,72 (H6, $J = 2,0$ Hz) referentes ao anel A e δ 4,73 (H2, s), δ 4,01 (H3, s), δ 2,68 (H4a, $J = 4,5$ e $16,5$ Hz) e δ 2,46 (H4b, $J = 3,5$ e $16,5$ Hz) referentes ao anel C. Esses dados sugeriram que a substância poderia ser a catequina ou a epicatequina.

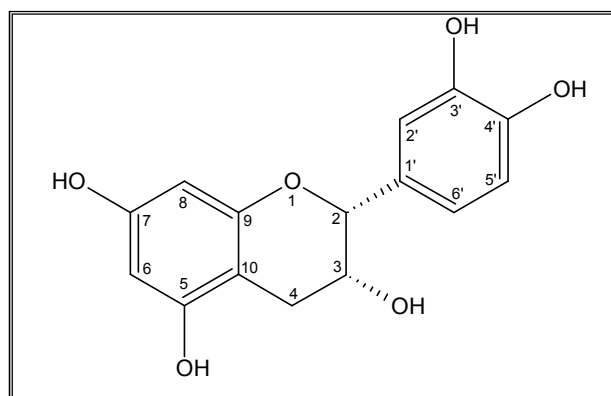
Os valores da literatura mostram que a catequina e a epicatequina são diferenciadas pelo valor do C2, o qual para a catequina apresenta deslocamento químico em δ 81,0 (WENKERT; GOTTLIEB, 1977) e para a epicatequina em aproximadamente δ 78,0 (MARKHAM; TERNAL, 1976). No espectro de RMN-¹³C de **MR5** (Espectro 59) observou-se um valor de δ 78,1 que foi atribuído ao carbono 2, indicando que se tratava da epicatequina.

Com os dados obtidos dos espectros bi-dimensionais (gHMQC e gHMBC) pôde-se atribuir todos os hidrogênios e carbonos da molécula.

A comparação dos dados de **MR5** (Tabela 15) com os disponíveis na literatura (HARBORNE, 1996; AGRAWAL, 1989) confirmam a identificação da substância como sendo a epicatequina (Figura 20).

Tabela 15. Deslocamentos químicos (δ) de RMN-¹H e RMN-¹³C da substância **MR5** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO-*d*₆).

Posição	RMN- ¹ H		RMN- ¹³ C	
	MR5	Literatura (HARBORNE, 1996)	MR5	Literatura (AGRAWAL, 1989)
2	4,73 <i>s</i>	4,74 <i>s</i>	78,1	78,1
3	4,01 <i>s</i>	4,01 <i>sl</i>	64,9	65,1
4a	2,68 <i>dd</i> (4,5; 16,5)	2,79 <i>dd</i> (4,2; 16,3)	28,2	28,0
4b	2,46 <i>dd</i> (3,5; 16,5)	2,48 <i>dd</i> (3,3; 16,3)		
5	-	-	156,5	156,4
6	5,72 <i>d</i> (2,0)	5,72 <i>d</i> (1,7)	94,1	94,5
7	-	-	156,2	156,3
8	5,88 <i>d</i> (2,5)	5,89 <i>d</i> (1,7)	95,1	95,6
9	-	-	155,8	155,7
10	-	-	98,5	98,8
1'	-	-	130,6	130,7
2'	6,88 <i>d</i> (1,5)	6,90 <i>s</i>	114,9	115,0
3'	-	-	144,4	144,4
4'	-	-	144,5	144,5
5'	6,65 <i>m</i>	6,66	114,8	115,0
6'	6,66 <i>m</i>	6,66	118,0	118,1

**Figura 20.** Epicatequina (**MR5**).

Identificação da substância **MR6**

Os espectros de RMN-¹H (Espectro 60) e RMN-¹³C (Espectro 61) (Tabela 16) de **MR6** mostraram sinais muito parecidos com os encontrados para o ácido gálico (**MC2**).

Uma análise por CCDC indicou que as duas substâncias possuíam o mesmo R_f e mesma coloração quando a placa foi revelada com anisaldeído/H₂SO₄.

A estrutura de **MR6** foi confirmada como sendo o ácido gálico (Figura 8).

Tabela 16. Deslocamentos químicos (δ) de RMN- ^1H e RMN- ^{13}C da substância **MR6** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO- d_6).

Posição	RMN- ^1H	RMN- ^{13}C
1	-	121,5
2	6,89 <i>s</i>	108,9
3	-	145,5
4	-	138,0
5	-	145,5
6	6,89 <i>s</i>	108,9
7	-	168,2

Identificação da substância MR7

A semelhança entre a região dos hidrogênios aromáticos dos espectros de RMN- ^1H e ^{13}C (Espectros 62 e 63) de **MR7** com os anteriormente estudados sugerem uma molécula derivada da quercetina.

No espectro de RMN- ^1H observou-se todos os sinais de deslocamentos químicos de um derivado da quercetina: δ 7,64 (H6', J = 2,0 e 8,5 Hz), δ 7,53 (H2', J = 2,5 Hz), δ 6,82 (H5', J = 8,5 Hz), δ 6,40 (H8, J = 1,5 Hz), δ 6,19 (H6, J = 1,5 Hz) e um hidrogênio anomérico em δ 5,35 (H1'', J = 7,5 Hz).

O experimento 1D-TOCSY (Espectro 64) evidenciou o sistema de spin da galactose.

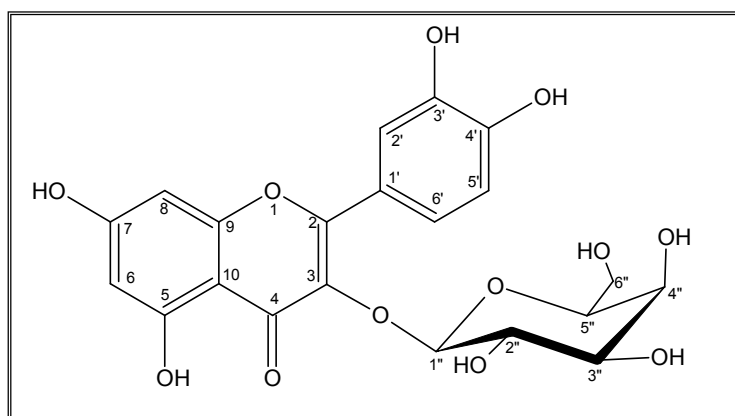
O espectro de RMN- ^{13}C apresentou 15 sinais referentes ao esqueleto flavonoídico e 6 sinais referentes a unidade de açúcar. O sinal em δ 133,6 (C3) indica que a unidade de açúcar está ligada na posição 3 da aglicona, o que é confirmado pelo experimento de gHMBC (Espectro 65).

Com os dados obtidos nos experimentos bi-dimensionais (gHMQC e gHMBC) e COSY (Espectro 66) foi possível atribuir todos os hidrogênios e carbonos da molécula (Tabela 17).

A comparação dos dados de **MR7** com os existentes na literatura (OSSIPOV et al., 1995) confirmou a identificação da substância como quercetina-3-*O*- β -galactopiranosídeo (Figura 21).

Tabela 17. Deslocamentos químicos (δ) de RMN-¹H e RMN-¹³C da substância **MR7** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO-*d*₆).

Posição	RMN- ¹ H		RMN- ¹³ C	
	MR7	Literatura (OSSIPOV et al., 1995)	MR7	Literatura (OSSIPOV et al., 1995)
2	-	-	156,3	156,3
3	-	-	133,6	133,5
4	-	-	177,5	177,5
5	-	-	161,2	161,2
6	6,19 <i>d</i> (1,5)	6,20 <i>d</i> (2,0)	98,7	98,7
7	-	-	164,2	164,3
8	6,40 <i>d</i> (1,5)	6,40 <i>d</i> (2,0)	93,6	93,5
9	-	-	156,4	156,3
10	-	-	104,0	103,9
1'	-	-	121,1	121,1
2'	7,53 <i>d</i> (2,5)	7,50 <i>d</i> (2,0)	115,2	115,2
3'	-	-	144,8	144,8
4'	-	-	148,5	148,5
5'	6,82 <i>d</i> (8,5)	6,90 <i>d</i> (8,5)	116,0	116,0
6'	7,64 <i>dd</i> (2,0; 8,5)	7,65 <i>dd</i> (2,0; 8,0)	122,0	122,0
OH-5				
	12,60 <i>s</i>			
<i>Galactose</i>				
1''	5,35 <i>d</i> (7,5)	5,38 <i>d</i> (7,0)	101,9	101,9
2''	3,55 <i>t</i> (9,5)	3,10-3,60	71,3	71,2
3''	3,37 <i>m</i>	3,10-3,60	73,2	73,2
4''	3,64 <i>d</i> (2,0)	3,10-3,60	68,0	67,9
5''	*	3,10-3,60	75,8	75,8
6''	*	3,10-3,60	60,2	60,1

* Valores de RMN-¹H não observados.**Figura 21.** Quercetina-3-*O*- β -galactopiranosídeo (**MR7**).

Identificação da substância MR8

Os sinais observados nos espectros de RMN-¹H (Espectro 67) de **MR8** são característicos de um derivado da quercetina.

Observou-se no espectro de RMN-¹H a presença de dois hidrogênios anoméricos, δ 5,30 (H1''), $J = 7,5$ Hz) e δ 4,38 (H1''', *s*), e ainda um dubleto em δ 0,98 com uma constante de acoplamento de $J = 6,5$ Hz, sugerindo um dos açúcares como sendo a rhamnose. Os valores encontrados nos espectros de RMN-¹H e no experimento 1D-TOCSY (Espectro 68) para o outro açúcar são semelhantes aqueles encontrados para o **MR7**, indicando que se tratava da galactose.

Na análise do experimento gHMBC (Espectro 71) verificou-se o acoplamento do H1'' (δ 5,30) da galactose com o C3 (δ 133,8) da aglicona, indicando a ligação do açúcar nesta posição. A ligação interglicosídica dos açúcares foi observado através da análise do experimento gHMBC (Espectro 72), pelo acoplamento do H1''' (δ 4,38) da rhamnose com o C4'' (δ 68,0) da galactose.

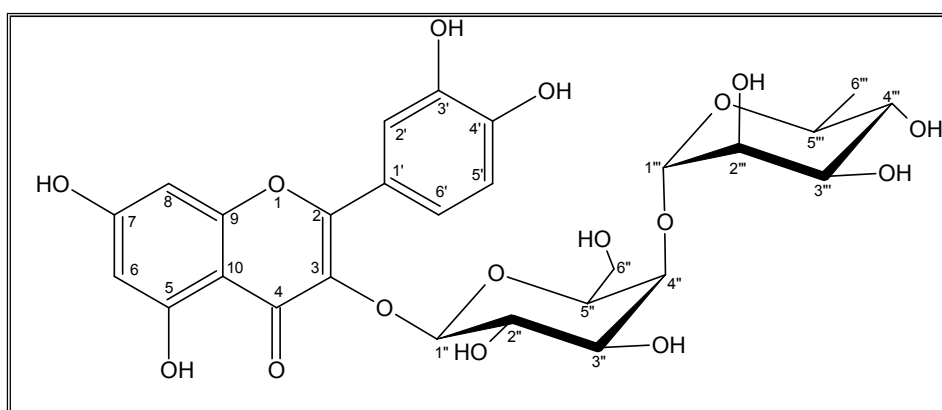
Devido a pouca massa obtida para esta substância, não foi possível registrar os espectros de RMN-¹³C dificultando, desta maneira, a caracterização completa desta estrutura. Alguns sinais de RMN-¹³C foram observados nos experimentos de gHMBC e gHMBC (Tabela 18). Portanto, os dados obtidos nos experimentos mono e bi-dimensionais possibilitaram sugerir a substância **MR8** como sendo a quercetina-3-*O*- α -rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -galactopiranosídeo (Figura 22).

Tabela 18. Deslocamentos químicos (δ) de RMN-¹H e RMN-¹³C da substância **MR8** (δ = ppm; J = Hz, entre parênteses; DMSO-*d*₆).

Posição	RMN- ¹ H	RMN- ¹³ C
2	-	155,5
3	-	133,8
4	-	*
5	-	161,5
6	6,18 <i>d</i> (2,0)	98,6
7	-	*
8	6,37 <i>d</i> (2,0)	93,7
9	-	156,4
10	-	103,6
1'	-	122,0
2'	7,52 <i>d</i> (2,0)	115,9
3'	-	145,0
4'	-	148,6
5'	6,82 <i>d</i> (8,5)	115,1
6'	7,64 <i>dd</i> (8,5; 2,5)	121,8
OH-5		
	12,50 <i>sl</i>	
<i>Galactose</i>		
1''	5,30 <i>d</i> (7,5)	101,9
2''	3,57 <i>d</i> (8,5)	72,6
3''	3,40 <i>dd</i> (1,0; 6,5)	73,2
4''	3,60 <i>d</i> (1,0)	68,0
5''	3,21 <i>m</i>	75,8
6''	3,42 <i>m</i>	60,8
<i>Rhamnose</i>		
1'''	4,38 <i>s</i>	100,4
2'''	3,39 <i>d</i> (2,5)	70,3
3'''	3,26 <i>s</i>	70,4
4'''	3,07 <i>m</i>	71,8
5'''	3,34 <i>m</i>	68,4
6'''	0,98 <i>d</i> (6,5)	17,4

Valores de RMN-¹³C atribuídos através dos experimentos gHMQC e gHMBC

*Valores de RMN-¹³C não observados

**Figura 22.** Quercetina-3-*O*- α -rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -galactopiranosídeo (**MR8**).

Na literatura, até o presente momento, não há estudos indicando que esses flavonóides e a epicatequina tenham sido isolados ou identificados em espécies de *Miconia*.

Os flavonóides representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados entre os produtos de origem natural. Esses compostos possuem grande importância farmacológica devido às suas propriedades antitumoral, antiinflamatória, antioxidante, antiviral, entre outras. Mata et al. (1997) discute sobre a atividade antiespasmódica do flavonóide glicosilado derivado da quercetina, quercetina-3-*O*- β -D-glicopiranosídeo, inibindo a contração espontânea de intestino de ratos. Essa substância também possui atividade antioxidante, assim como a quercetina-3-*O*- α -arabinopiranosídeo e *epi*-catequina, como discutido por Sanbongi et al. (1998). Já Rubilar et al. (2006) e Larson (1988) também mostram a atividade antioxidante de diversos flavonóides derivados da quercetina, inclusive a quercetina-3-*O*- α -L-rhamnopiranosídeo.

5 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

Nosso grupo de pesquisa em Química de Produtos Naturais do IQ-Araraquara-Unesp, juntamente com os pesquisadores de Farmacologia de Produtos Naturais do IB-Unicamp e do IB-Botucatu-Unesp e de Ciência Biológicas da FCF-Araraquara-Unesp iniciaram colaboração há cerca de dois anos (Projeto-Biota/Fapesp, Coordenado pelo Prof. Dr. Wagner Vilegas), no qual este projeto está inserido, já investigou várias plantas com atividade antiúlceras gástricas, antioxidante, analgésica, antiinflamatória e antimicrobiana.

Os resultados originam-se de uma estratégia de pesquisa que parte de informações etnobotânicas e etnofarmacológicas, segue com a realização de ensaios farmacológicos, microbiológicos e de mutagenicidade preliminares com extratos ou chás, realiza triagem fitoquímica em busca das classes de compostos presentes nos extratos ou chás, prossegue com o isolamento e identificação estrutural dos componentes neles presentes e utiliza os componentes ou frações enriquecidas para a determinação dos prováveis mecanismos de ação farmacológica envolvida com a atividade detectada.

Na avaliação das atividades biológicas foram investigadas as atividades antimicrobiana dos extratos utilizando modelos de bactérias Gram negativas e Gram positivas e também sobre o gênero *Mycobacterium*, com ênfase ao agente etiológico da tuberculose, o *M. tuberculosis*. Também foram realizados testes de analgesia e inflamação em animais de laboratório, os quais mimetizam estas injúrias no homem. Finalmente, foram realizados ensaios para detectar a produção de NO, H₂O₂ e TNF- α com extratos das plantas para avaliar suas atividades imunoestimulantes.

Nossa contribuição para com os grupos de pesquisa com os quais trabalhamos em colaboração foi o de preparar extratos e frações enriquecidas das espécies estudadas para os ensaios biológicos.

5.1. Atividade Antimicrobiana

O teste antimicrobiano foi realizado em colaboração com a Profa. Dra. Hérica Regina Nunes Salgado da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP (Campus Araraquara).

Para os testes, utilizou-se oito cepas microbianas da coleção internacional. As bactérias: *Bacillus subtilis* (ATCC 9372), *Bacillus cereus* (ATCC 14579), *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538), *Salmonella* spp (ATCC 19196), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212), *Escherichia coli* (ATCC 10536), *Micrococcus luteus* (ATCC 9341), e o fungo *Candida albicans* (ATCC 64550).

Os extratos das plantas foram secos e ressuspensos nos mesmos solventes que foram preparados os extratos com a concentração final de 30,0 mg/mL e esterilizados por filtração com discos de 0,45 µm Millipore®. Os testes antimicrobianos foram realizados pelo método de difusão de discos descrito por Bauer et al. (1966).

As culturas dos microrganismos foram crescidas no líquido em Brain Heart Infusion a 37°C. Após 6 h, cada microrganismo (concentração de 10⁶ células/mL) foi inoculado na superfície das placas contendo 100,0 mL do meio de cultura Mueller-Hinton/ágar. Subseqüentemente, discos de papéis de filtro (6,0 mm de diâmetro) saturados com 20,0 mL de cada extrato foram colocados na superfície de cada placa inoculada. As placas foram incubadas a 35°C por 24 h para bactérias e 48 h para *C. albicans*. Após este período, foram medidas as zonas da inibição do crescimento em torno dos discos. Os microrganismos totais cultivados com os halos iguais ou maiores que 7,0 mm foram considerados suscetíveis aos extratos testados. O controle negativo foi o solvente usado em cada extrato e o controle positivo foi o ciprofloxacino (5,0 mg/disco) para as bactérias e o cetoconazol (40,0 mg/disco) para *C. albicans*. Todas as determinações foram feitas em duplicata.

A concentração inibitória mínima (CIM) foi determinada pelo método de diluição de acordo com NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (2003). As bactérias foram crescidas em nutriente de caldo de carne por 6 h. Depois 20,0 µL de concentração igual a 10⁶ células/mL foram inoculados nos tubos com o nutriente de caldo de carne com diferentes concentrações (25-800,0 mL) dos extratos. Após 24 h a 37°C, a CIM de cada amostra foi medida pela densidade ótica em

um espectrofotômetro (620 nm), comparando o *redout* da amostra com o do nutriente de caldo de carne não inoculado. Todas as determinações foram feitas em duplicata.

Os resultados observados mostraram que o extrato EMeOH de *M. rubiginosa* apresentou atividade antimicrobiana contra os microrganismos *S.epidermis*, *C. albicans*, *S.aureus*, *M.luteus*, *B.subtilis* e *B.cereus*. (Tabela 19 e 20), os quais apresentaram zonas médias de inibição de 8 a 10 mm (Tabela 19). Já o extrato ECHCl₃ de *M. cabucu* apresentou atividade contra *S.epidermi*, *C.albicans* e *S.aureus*, com zonas médias de inibição de 7 a 9 mm.

Os valores da CIM obtidos foram de 1,5 a valores maiores que 10,0 mg/mL. O melhor resultado foi observado com o extrato ECHCl₃ de *M. cabucu* no combate a *C. albicans* com a CIM de 1,5 mg/mL.

Tabela 19. Atividade antimicrobiana dos extratos das espécies de *Miconia*.

Extratos	Microrganismos								
	<i>S.e.</i>	<i>C.a.</i>	<i>S.a.</i>	<i>M.l.</i>	<i>E.f.</i>	<i>B.s.</i>	<i>B.c.</i>	<i>E.coli</i>	<i>Sal.</i>
Mc MeOH	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Mc CHCl ₃	9	9	7	-	-	-	-	-	-
Mr MeOH	9	8	10	10	-	9	8	-	-
Mr CHCl ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Ciprofloxacino	25	NT	25	20	22	20	20	22	22
Cetoconazol	NT	16	NT	NT	NT	NT	NT	NT	NT

Diâmetro de zona (mm), (-) negativo, *S.e.*, *Staphylococcus epidermidis*, *C.a.*, *Candida albicans*, *M.l.*, *Micrococcus luteus*, *E.f.*, *Enterococcus faecalis*, *B.s.*, *Bacillus subtilis*, *B.c.*, *Bacillus cereus*, *E.c.*, *Escherichia coli*, *Sal.*, *Salmonella*.

Mc = *M. cabucu*; Mr = *M. rubiginosa*

NT = não testado

Tabela 20. Concentração Inibitória Mínima (CIM) mostrada pelos extratos das espécies de *Miconia* (mg/mL).

Extratos	Microrganismos					
	<i>S.e.</i>	<i>C.a.</i>	<i>S.a.</i>	<i>M.l.</i>	<i>B.s.</i>	<i>B.c.</i>
Mc CHCl ₃	>10	1,5	7,5	NT	NT	NT
Mr MeOH	>10	>10	>10	>10	7,5	7,5

5.2 Atividade Imunológica

Os ensaios de atividade imunológica foram realizados em colaboração com o grupo de pesquisa da Profa. Dra. Iracilda Zeppone Carlos da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara, Unesp.

A determinação de H_2O_2 liberados nos sobrenadantes das culturas de células do exsudato peritoneal baseou-se na oxidação do vermelho de fenol mediado pela peroxidase de raiz forte. As principais vantagens desse método são as pequenas quantidades de reagentes e células utilizadas, a sensibilidade e reprodutibilidade, o grande número de materiais possíveis a serem testados e especialmente a velocidade e conveniência oferecida pelo leitor de ELISA automático.

O extrato de *M. cabucu* apresentou $p < 0,001$, exceto a concentração 100,0 $\mu\text{g/mL}$ do extrato EMeOH de *M. cabucu* ($p < 0,05$). A espécie *M. rubiginosa* não apresentou significância estatística quando comparada ao controle negativo ($p > 0,001$) (Tabela 21).

Tabela 21. Determinação de H_2O_2 em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss em presença de extratos das espécies de *Miconia*.

Concentração do extrato ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração de H_2O_2 (nmols/ 2.10^5 células)			
	<i>M. cabucu</i>		<i>M. rubiginosa</i>	
	ECHCl ₃	EMeOH	ECHCl ₃	EMeOH
200	54,0	72,0	16,0	12,0
100	65,0	23,0	12,0	10,0

Sob condições fisiológicas normais, o H_2O_2 é gerado em pequenas quantidades e é rapidamente utilizado ou degradado, mas longas exposições a altas concentrações deste mediador podem destruir estruturas biológicas e levar a um dano celular irreversível. A liberação de quantidades consideráveis de H_2O_2 induz a quebra da fita de DNA e/ou perturbação no citoesqueleto da membrana, levando à morte celular (RAMASARMA, 1990). A superprodução leva ao desenvolvimento do estresse oxidativo, o que ocorre no choque endotóxico (VÍCTOR; DE LA FUENTE, 2003). Os dados obtidos mostram uma produção pequena ou moderada de H_2O_2 . Os níveis detectados deste mediador podem então ser considerados benéficos.

A determinação de NO foi realizada pela técnica de Griess. O NO sofre degradação oxidativa em solução aquosa, formando nitrito (NO_2^-) que é determinado pelo reagente de Griess, reagindo primeiramente com a sulfanilamida (reação de diazotização) em meio ácido, formando um composto que reage com naftiletlenodiamino dando origem a um derivado azo colorido prontamente monitorado em espectroscopia de UV/Visível com absorvância máxima em 548 nm, pH 2,0. O meio ácido favorece a reação de diazotação, melhorando o rendimento na leitura espectrofotométrica (MALINSKI et al., 1996).

Não houve produção significativa deste mediador em nenhuma das espécies testadas de *Miconia* (Tabela 22).

Tabela 22. Determinação de NO em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss em presença de extratos das espécies de *Miconia*.

Concentração do extrato ($\mu\text{g/mL}$)	Concentração de NO ($\mu\text{mols/mL}$)			
	<i>M. cabucu</i>		<i>M. rubiginosa</i>	
	ECHCl ₃	EMeOH	ECHCl ₃	EMeOH
200	6,0	0	8,0	11,0
100	0	0	9,0	9,0

O NO está envolvido na morte ou inibição da proliferação de microrganismos, destruição de células tumorais por macrófagos ativados e na defesa inespecífica do hospedeiro (STUEHR; NATHAN, 1989). Assim, os extratos que não promoveram a liberação de NO podem estar inibindo a geração deste mediador, podendo apresentar propriedades antiinflamatórias.

A citocina TNF- α também foi estudada neste projeto. Trata-se de uma molécula multifuncional originalmente descrita por destruir tumores transplantados *in vivo* (CARSWELL et al., 1975). O mesmo estimula os fagócitos mononucleares a secretar quimiocinas que contribuem para a resposta inflamatória. Diversas ações específicas do TNF- α podem contribuir para suas ações letais nas concentrações extremamente elevadas. O TNF- α reduz a perfusão tecidual por relaxar o tônus da musculatura lisa vascular, atuando diretamente sobre as células dos músculos lisos e por agir também na produção de vasodilatadores como o NO, por indução da NOs (NO sintase).

Na espécie *M. cabucu*, concentrações de 200,0 µg/mL e 100,0 µg/mL do extrato EMeOH apresentaram respectivamente $p < 0,01$ e $p < 0,05$. As concentrações do extrato ECHCl₃ apresentaram $p < 0,001$ (200,0 µg/mL) e $p < 0,01$ (100,0 µg/mL) (Tabela 23).

Tabela 23. Determinação de TNF- α em culturas de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss em presença de extratos das espécies de *Miconia*.

Concentração do extrato (µg/mL)	TNF- α (unidades/mL)			
	<i>M. cabucu</i>		<i>M. rubiginosa</i>	
	ECHCl ₃	EMeOH	ECHCl ₃	EMeOH
200	150,0	75,0	65,0	0
100	75,0	62,0	50,0	35,0

5.3 Atividade Antituberculose

Os ensaios com a bactéria *Mycobacterium tuberculosis* foram realizados pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Clarice Queico Fujimura Leite, pesquisadora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

Quando se estuda a ação antimicrobiana de substâncias provenientes de plantas, geralmente são testadas várias bactérias Gram positivas e Gram negativas. Porém, raramente as micobactérias são estudadas. Dentro deste último grupo encontra-se o agente da tuberculose humana, o *Mycobacterium tuberculosis*. No Brasil (e isso é também uma preocupação mundial), a tuberculose é uma das principais causas de morte entre as doenças por agentes infecciosos identificáveis. A resistência às drogas apresentada pelo *M. tuberculosis*, devido ao uso incorreto dos antibióticos, está gerando uma angustiante falência de quaisquer tipos de tratamentos. O número de drogas disponíveis para o tratamento, na prática, é limitado a cerca de cinco quimioterápicos e algumas das drogas empregadas são extremamente tóxicas, produzindo diversos efeitos colaterais. Portanto, torna-se necessária a busca de novas alternativas terapêuticas.

Para triagem *in vitro* de novas drogas, as micobactérias foram testadas utilizando diferentes concentrações dos extratos, a fim de se determinar a Concentração Inibitória Mínima (CIM) em µg/mL, do agente antimicrobiano capaz de inibir 99% da população bacteriana. A diluição seriada das drogas é obtida empregando a microtécnica em placas

(COLLINS; FRANZBLAU, 1997). Nesta técnica, a sensibilidade dos microrganismos às drogas é determinada em uma série de cavidades moldadas numa placa plástica, e o Alamar Blue é usado como indicador de viabilidade microbiana.

Foi utilizado o microrganismo *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv ATCC 27294, utilizando a técnica do MABA para avaliação da atividade.

Em uma microplaca estéril de 96 orifícios (Becton Dickinson), foram depositados 200,0 µL de água destilada estéril em todos os orifícios da periferia da microplaca, para evitar a evaporação durante a incubação na estufa. A isoniazida e os extratos vegetais foram diluídos em DMSO para se obter soluções de 4,0 mg/mL e de 16,0 mg/mL respectivamente. Em seguida foram realizadas diluições destas soluções no caldo 7H9 (Middlebrook 7H9) de maneira a se obter concentrações variáveis de isoniazida (de 1,0 a 0,015 µg/mL), e dos extratos vegetais (de 4000 a 62,5 µg/mL). A cepa de *Mycobacterium tuberculosis* H37Rv - ATCC 27294 foi cultivada no caldo 7H9 a 37^o C até atingir a turvação igual à escala McFarland n^o 1. A cultura foi diluída 25 vezes e então 100,0 µL da diluição inoculada em cada um dos orifícios contendo as soluções de isoniazida e de extratos vegetais. As microplacas foram seladas com parafilme e incubadas a 37^oC por 6 dias, quando então foi adicionado o Alamar Blue aos orifícios controle da cepa de micobactérias. As placas foram re-incubadas por 24 horas após o que foi realizada a leitura final. A manutenção da cor azul nos orifícios foi interpretada como ausência de crescimento bacteriano e o desenvolvimento de cor rósea, como de sua multiplicação. As placas com orifícios violeta foram re-incubadas por mais 24 horas, e se a cor mudou para róseo o teste foi considerado positivo para crescimento bacteriano. A CIM foi definida como a menor concentração da droga capaz de impedir a mudança de cor de azul para róseo.

O extrato EMeOH de *M. rubiginosa* apresentou CIM promissor (31,2 µg/mL), ao passo que o extrato EMeOH de *M. cabucu* apresentou CIM >500,0 µg/mL. Os extratos ECHCl₃ de ambas as espécies apresentaram CIM altos de 250,0 µg/mL (Tabela 24).

Tabela 24. Atividade dos extratos das espécies de *Miconia* contra *Mycobacterium tuberculosis*.

Espécie vegetal	Extrato	CIM ($\mu\text{g/mL}$)
<i>Miconia rubiginosa</i>	EMeOH	31,2
<i>Miconia rubiginosa</i>	ECHCl ₃	250
<i>Miconia cabucu</i>	EMeOH	> 500
<i>Miconia cabucu</i>	ECHCl ₃	250

5.4 Atividade Analgésica

As análises de analgesia foram realizadas pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima, do Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp.

Nos testes de contorção abdominal (KOSTER et al, 1959) camundongos (25-35,0 g) foram tratados com o extrato EMeOH de *M. cabucu* nas concentrações de 125, 250 e 500,0 mg/kg, utilizando salina como controle negativo. O tratamento foi feito 30 min antes da administração de 10,0 mL/kg (ip) de ácido acético glacial a 0,6%. Foi efetuada a contagem individual do número de contorções apresentadas no 15º minuto após administração do ácido acético. A inibição das contorções foi calculada em relação àquelas apresentadas pelos animais controle.

O tratamento oral com o extrato EMeOH de *M. cabucu* apresentou uma redução no número de contorções abdominais de 21% na dose de 500,0 mg/Kg em relação ao grupo tratado com salina. A maior dose testada foi a única efetiva para esse modelo. Tal efetividade indica uma possível atividade analgésica inespecífica desse extrato.

O teste da placa quente foi utilizado para determinar a latência (tempo que o animal leva para lamber as patas) de acordo com a metodologia descrita por Eddy e Leimback (1953). Neste experimento foi utilizado o aparelho Hot Plate (Ugo Basile, Model-DS37), mantido a uma temperatura constante de $56 \pm 1^\circ\text{C}$. A latência foi determinada para camundongos que receberam apenas veículo (controle negativo), para animais pré-tratados com morfina 10,0 mg/kg, s.c. (controle positivo) e as doses de 125, 250 e 500,0 mg/Kg do extrato EMeOH de *M. cabucu*, pela via oral. Todas as substâncias foram administradas 30 min antes de se iniciar o experimento. Os animais foram observados antes (0) e após 30, 60 e 90 min. O período de latência de 30 s foi estabelecido como completa analgesia.

O extrato não apresentou aumento no período de latência na placa quente em nenhuma das doses utilizadas e em nenhum dos tempos testados. Tal resultado indicou que o extrato não apresentou atividade analgésica de origem central (semelhante a morfina) nas doses utilizadas.

As frações AcOEt e aquosas dos extratos EMeOH de *M. cabucu* e *M. rubiginosa* também foram testadas. As frações AcOEt não apresentaram aumento no período de latência na placa quente em nenhuma das doses e em nenhum dos tempos testados. Estes resultados indicaram que essas frações não possuem atividade analgésica sobre o sistema nervoso central.

Já em relação às frações aquosas, a menor dose da fração *M. rubiginosa* apresentou aumento no período de latência na placa quente 60 minutos após o tratamento via oral, o que indicou que essa fração pode apresentar uma atividade analgésica sobre o sistema nervoso central.

Os resultados obtidos nos testes de analgesia para os extratos e frações das espécies de *Miconia* estudados são mostrados na Tabela 25.

Tabela 25. Atividade analgésica dos extratos das espécies de *Miconia* estudadas.

Teste	Atividade analgésica			
	Contorção abdominal	Placa quente		
<i>M. cabucu</i>	EMeOH	presente	ausente	
		Fr. AcOEt	*	ausente
		Fr. H ₂ O	*	ausente
	ECHCl ₃	ausente	ausente	
<i>M. rubiginosa</i>	EMeOH	ausente	ausente	
		Fr. AcOEt	*	ausente
		Fr. H ₂ O	*	presente
	ECHCl ₃	ausente	ausente	

* não testada

5.5 Atividade Antiinflamatória

As análises de atividade antiinflamatória foram realizadas pelo grupo de pesquisa da Profª. Dra. Clélia Akiko Hiruma Lima, do Instituto de Biociências de Botucatu, Unesp.

O experimento realizado para edema de pata induzido por carragenina foi similar ao descrito por Henriques et al. (1987). Grupos de camundongos, pesando entre 30,0 e 32,0 g, foram utilizados para determinar a atividade anti-edematogênica do extrato EMeOH de *M. cabucu* e *M. rubiginosa*. Os animais foram pré-tratados com diferentes níveis de dose da amostra vegetal, por via oral, 30,0 mg/Kg de indometacina (controle positivo), por via subcutânea e 10,0 mL/Kg de salina (controle negativo). Trinta minutos após os tratamentos foi administrada a injeção de 0,05 mL da suspensão a 1% de carragenina em salina 0,9% estéril em uma das patas posteriores do animal; a pata contralateral recebeu volume similar de salina 0,9% estéril. Duas horas após a administração de carragenina, os animais foram sacrificados, as patas foram amputadas na altura da articulação tibiotársica e pesadas. O aumento de peso da pata causado pela administração do agente irritante foi determinado pela diferença de peso entre as patas.

O extrato EMeOH de *M. cabucu* não apresentou atividade anti-edematogênica na caracterização de redução do volume das patas em nenhuma das doses avaliadas. A dose de 400,0 mg/Kg na primeira avaliação (2h após a indução do edema) apresentou um efeito edematogênico, porém, isso não se manteve ao longo do período de observação. Através destes resultados podemos concluir que o extrato não apresentou efeito anti-edematogênico nas doses utilizadas (Tabela 26).

Tabela 26. Atividade antiinflamatória dos extratos de *Miconia*.

Atividade antiinflamatória		
<i>M. cabucu</i>	EMeOH	ausente
	ECHCl ₃	ausente
<i>M. rubiginosa</i>	EMeOH	ausente
	ECHCl ₃	ausente

5.6 Atividade Mutagênica

Os ensaios de mutagenicidade foram realizados pelo grupo de pesquisa da Profa. Dra. Eliana Aparecida Varanda, pesquisadora da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara.

O teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium*, também conhecido como *Salmonella*/microsomo, ou Teste de Ames, é uma das metodologias mais

utilizadas atualmente para detectar substâncias genotóxicas (VARELLA et al., 2004), sendo validado em larga escala por diversos laboratórios (MORTELMANS; ZEIGER, 2000; RIBEIRO et al., 2004). Nesse ensaio são utilizadas linhagens de *Salmonella typhimurium* que, na presença do agente mutagênico, reverterem seu caráter auxotrófico para a síntese de histidina, crescendo em meios que não possuem este aminoácido. Os crescimentos das colônias revelam uma mutação reversa induzida pelo agente, e a contagem caracteriza a ação mutagênica em função da concentração utilizada (ZEIGER, 2001).

Foram utilizadas as linhagens TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *Salmonella typhimurium*, gentilmente cedidas pelo Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, Califórnia, USA.

Os meios de cultura e soluções necessários para os ensaios de mutação reversa foram preparados de acordo com as especificações de Maron e Ames (1983). Nos ensaios de mutagenicidade foi usado ágar mínimo glicosado (AMG), constituído de ágar glicose (20,0 g de glicose, 15,0 g de Bacto ágar e 930,0 mL de água destilada) e Meio Vogel Bonner “E” 50x concentrado (10,0 g de sulfato de magnésio heptahidratado, 100,0 g de ácido cítrico, 175,0 g de fosfato de sódio e amônio, 500,0 g de fosfato de potássio dibásico e 670,0 mL de água destilada) na proporção de 980,0 mL para 20,0 mL respectivamente.

O ágar de superfície (“top-agar”) era composto de 0,5 g de cloreto de sódio, 0,6 g de Bacto ágar e 100,0 mL de água destilada, acrescido de 10,0 mL de uma solução de L-histidina 0,096 mg/mL (Sigma) e D-biotina 0,123 mg/mL (Sigma).

Os meios de cultura foram preparados e esterilizados em autoclave a 121° C por 15 minutos.

Foi utilizada a fração microsossomal S9 homogeneizada de fígado de rato (fração pós-mitocondrial, suplementada com um cofator, preparada a partir de fígado de roedores tratados com agentes indutores de enzimas, arocloror 1254). A fração S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica. Essa fração foi obtida da MOLTOX (Molecular Toxicology, Inc.USA). Para o preparo da mistura S9, todas as soluções (cloreto de magnésio 0,4M e cloreto de potássio 0,4M, glicose-6-fosfato 1M, β -nicotinamida adenina dinucleotidofosfato 0,1M, tampão fosfato 0,2M pH 7,4 e água destilada) inclusive a fração S9 hidratada, foram mantidas em banho de gelo durante

todo o ensaio, preparadas sempre a fresco e utilizadas por um período de no máximo 3 horas.

O controle negativo foi realizado com DMSO. Os ensaios foram realizados incluindo-se também controles positivos para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa. Foram utilizados como controle positivo em ensaios sem ativação metabólica o 4-Nitrofenilenodiamina (NPD) para as linhagens TA98 e Ta97a, Azida Sódica para a linhagem TA100 e Daunomicina para a linhagem TA102. Nos ensaios com ativação metabólica foi empregado o composto 2-antramina para todas as linhagens.

De acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron e Ames (1983), diferentes concentrações dos extratos vegetais eram misturadas a 0,5 mL de tampão fosfato 0,2M pH 7,4, 0,1 mL de cultura de bactérias e incubadas de 20-30 minutos a 37°C. Nos ensaios com ativação metabólica, eram adicionados, em substituição ao tampão fosfato, 0,5 mL da mistura S9. Decorrido o tempo de incubação, 2,0 mL de “top Agar”, contendo traços de L-histidina e D-biotina, eram adicionados a mistura presente nos tubos. O conteúdo de cada tubo, assim composto, era levemente homogeneizado em vórtex e vertido sobre a superfície de uma placa contendo ágar mínimo glicosado. Após solidificação do “top-agar”, as placas eram incubadas por 48 horas, a 37 °C. Ao término desse período, era realizada a contagem do número de colônias revertentes por placa. Os ensaios foram realizados em triplicata.

Os dados da mutagenicidade dos extratos vegetais foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal elaborado e gentilmente cedido pelo Dr. L. Myers do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, USA, por intermédio da Dra. Maria Ines Sato (CETESB).

Na Tabela 27 estão mostrados os dados da atividade mutagênica obtidos para *M. rubiginosa* e *M. cabucu*. Foram observados resultados positivos para ambas as espécies nos ensaios realizados com a linhagem TA98, tanto em ausência como em presença do sistema metabólico de ativação, o que caracteriza a capacidade dos extratos em induzirem mutações do tipo *frameshift*.

Tabela 27. Atividade mutagênica expressa pela média, desvio padrão e razão de mutagenicidade (valor entre parênteses) na linhagem TA98 de *Salmonella typhimurium* expostas à várias doses dos extratos das espécies de *Miconia* estudadas, com (+S9) ou sem (-S9) ativação metabólica.

Tratamento (mg/placa)	<i>M. cabucu</i>		<i>M. rubiginosa</i>	
	TA98		TA98	
	- S9	+ S9	- S9	+ S9
MeOH				
DMSO	42±5,0	28 ± 5,0	42 ± 5,0	28 ± 5,0
1,2	73 ± 2,1** (1,7)	51 ± 4,6* (1,8)	67 ± 5,0(1,6)	43 ± 3,1*(1,5)
2,4	73 ± 5,0**(1,7)	48 ± 5,3*(1,7)	69 ± 4,2*(1,6)	42 ± 4,5(1,5)
4,8	87 ± 2,7**(2,1)	48 ± 5,2*(1,7)	79 ± 4,2**(1,9)	72 ± 9,1**(2,6)
7,1	91 ± 3,1**(2,2)	50 ± 1,5**(1,8)	80 ± 5,5**(1,9)	78 ± 6,0**(2,8)
9,5	95 ± 14,1**(2,3)	53 ± 3,1**(1,9)	92 ± 3,5**(2,2)	90 ± 9,0**(3,2)
CHCl₃				
DMSO	26 ± 3,6	28 ± 5,0	26 ± 3,6	28 ± 5,0
0,8	36 ± 5,3(1,4)	26 ± 2,0(0,9)	35 ± 2,5(1,3)	28 ± 3,0(1,1)
1,7	40 ± 2,0*(1,5)	30 ± 2,0(1,1)	34 ± 3,0(1,3)	31 ± 1,7(1,1)
3,4	55 ± 4,2*(2,1)	32 ± 3,1(1,1)	34 ± 2,7(1,3)	31 ± 2,7(1,1)
5,1	63 ± 2,5**(2,4)	33 ± 2,5(1,2)	67 ± 4,6**(2,6)	32 ± 2,1(1,1)
6,8	66 ± 2,0**(2,5)	34 ± 2,5(1,2)	73 ± 4,0**(2,8)	32 ± 2,5(1,1)
Ctrol +	718 ± 40,1 ^a	951 ± 9,9 ^b	718 ± 40,1 ^a	951 ± 9,9 ^b

DMSO: 100,0 µL/placa (controle negativo). Ctról + (Controle Positivo): ^a NPD (4-nitro-*o*-phenilenediamina – 10,0 µg/placa); ^b 2-Antramina (1,25 µg/placa); *P < 0,01

Estes ensaios fazem-se necessários para comprovação ou não das atividades atribuídas às espécies de *Miconia* já discutidos anteriormente.

Muitos trabalhos discutem o uso de flavonóides contra infecções por bactérias, protozoários e fungos. Muitas linhagens de bactérias são atacadas por essas substâncias, porém, o mecanismo através do qual isso ocorre ainda é desconhecido (HAVSTEEN, 2002). Outras substâncias também possuem comprovada ação antimicrobiana. No trabalho de Matasyoh et al. (2007) é discutida a atividade de extratos ricos em monoterpenos contra uma série de microrganismos. Já Chanwitheesuk et al. (2007) mostram a ação do ácido gálico contra *Salmonella typhi* e *Staphylococcus aureus*.

As agliconas de flavonóides, somente são antigênicas se estiverem ligadas à macromoléculas no sangue, isto é, a proteínas do plasma. Portanto, flavonóides são fracamente antigênicos. Entretanto anticorpos contra essas substâncias têm sido encontrados em sangue humano. Reações alérgicas ocorrem em cerca de 3-5% da população depois da ingestão de quantidades consideráveis de produtos ricos em flavonóides (HAVSTEEN, 2002). Estudos na literatura mostraram que diversos

flavonóides, entre eles quercetina, luteolina e apigenina, inibem a produção de TNF- α e NO (COMALADA et al., 2006). Neste mesmo trabalho constatou-se que flavonóides 3' e 4' hidroxilados mostraram os mais altos graus de inibição de TNF- α , seguidos por aqueles que possuem somente uma hidroxila no anel B. Portanto, concluiu-se que essas substâncias podem apresentar atividade antiinflamatória.

Lin et al. (2002) discutiram a atividade contra *M. tuberculosis* de chalconas e flavonóides. Muitos trabalhos mostram a atividade antituberculose apresentada por biflavonóides, como por exemplo no artigo de Lin et al. (2001) que através de testes com uma série de biflavonóides constatou que as posições em que as unidades flavonoídicas estão ligadas e o aumento das propriedades lipofílicas da molécula são importantes na atividade inibitória.

Propriedades analgésicas e antiinflamatórias já tem sido observadas em muitos flavonóides, assim como em taninos e saponinas (HAVSTEEN, 2002). Essas últimas foram estudadas por Just et al. (1998). Já os resultados obtidos por Jorge et al. (2004) mostraram o potencial antiinflamatório de triterpenos, flavonóides e taninos condensados. Em relação aos flavonóides, um estudo interessante foi realizado por Rotelli et al. (2003), que constatou que a quercetina apresenta uma atividade significativa no tratamento de edema induzido por carragenina.

Muitas substâncias orgânicas são capazes de induzir mutações no teste de Ames. A frequência de mutações induzida por flavonóides não é superior a de outras substâncias comuns na alimentação humana. Importante razão para a baixa toxicidade dos flavonóides é a baixa solubilidade da aglicona em água e o rápido catabolismo do núcleo da pirona no fígado (HAVSTEEN, 2002). No trabalho de Nogueira et al. (2006) discutiu-se que a ausência de atividade mutagênica, assim como potencial antimutagênico do extrato das flores de *Melampodium divaricatum* pode estar relacionado com a presença de triterpenos (lupeol, α,β -amirina, entre outros) e clorofila neste extrato.

Portanto, diante dos resultados preliminares apresentados nos ensaios biológicos realizados com os extratos de espécies de *Miconia* e com os dados já existentes na literatura, percebe-se o grande potencial que estas espécies possuem justificando-se o aprofundamento do trabalho com frações enriquecidas e substâncias puras.

6 CONCLUSÕES

As espécies de *Miconia* escolhidas foram pouco estudadas quimicamente, inclusive não consta nenhum estudo sobre *M. cabucu* na literatura. Em relação a família Melastomataceae, nas poucas espécies estudadas, foram encontrados principalmente derivados de taninos hidrolisáveis e flavonóides.

Traçamos o perfil cromatográfico dos extratos EMeOH das folhas de *M. cabucu* e *M. rubiginosa*. O perfil das folhas das duas espécies apresentaram principalmente flavonóides glicosilados derivados da quercetina, além de ácidos fenólicos, catequinas e taninos. No entanto observou-se diferenças significativas entre os cromatogramas das espécies, considerando que o protocolo usado para análises por HPLC-UV-DAD foi idêntico para ambas as espécies. *M. rubiginosa* possui flavonóides mais polares que *M. cabucu*.

O estudo fitoquímico realizado com o extrato EMeOH das folhas de *M. cabucu* possibilitou, até o presente, o isolamento e a identificação de sete flavonóides: quercetina-3-*O*- β -xylopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -rhamnopiranosídeo (**MC1**), o biflavonóide 5-hidroxi-4',7-dimetoxiflavona-(6-C-6'')-5'''-hidroxi-3''',4''',7'''-trimetoxiflavona (**MC3**), miricetina-3-*O*- β -xylopiranosil-(1 \rightarrow 2)-*O*- α -rhamnopiranosídeo (**MC4**), quercetina-3-*O*- α -rhamnopiranosídeo (**MC5**), miricetina-3-*O*- α -rhamnopiranosídeo (**MC6**), quercetina-3-*O*- β -glicopiranosídeo (**MC7**), kaempferol-3-*O*- β -(6''-cumaroil)-glicopiranosídeo (**MC8**), além do ácido gálico (**MC2**). O composto **MC3** é o primeiro biflavonóide constituído de uma unidade de apigenina e uma unidade de luteolina ligadas pelas posições 6-C-6'' descrito na literatura. Os outros flavonóides estão sendo descritos pela primeira vez no gênero *Miconia*, enquanto que o ácido gálico já foi isolado da espécie *Miconia myriantha* (LI et al., 2001).

Quanto a *M. rubiginosa* foram isoladas e identificadas as substâncias quercetina-3-*O*- α -rhamnopiranosídeo (**MR1**), quercetina-3-*O*- α -arabinofuranosídeo (**MR2**), quercetina-3-*O*- α -arabinopiranosídeo (**MR3**), quercetina-3-*O*- β -arabinopiranosídeo (**MR4**), epicatequina (**MR5**), ácido gálico (**MR6**), quercetina-3-*O*- β -galactopiranosídeo (**MR7**) e quercetina-3-*O*- α -rhamnopiranosil-(1 \rightarrow 4)-*O*- β -galactopiranosídeo (**MR8**). Nenhuma dessas substâncias, com exceção do ácido gálico, foram encontradas em espécies do gênero *Miconia*.

Os ensaios farmacológicos realizados forneceram resultados interessantes para as espécies estudadas. Nos ensaios antimicrobianos, o extrato EMeOH de *M. rubiginosa* e o extrato ECHCl₃ de *M. cabucu* mostraram-se ativos contra alguns dos microrganismos testados. A atividade antimicrobiana observada pode ser explicada pela presença de uma mistura de substâncias, incluindo triterpenos, que possuem comprovadas propriedades antimicrobianas. O melhor resultado foi obtido no teste do extrato ECHCl₃ de *M. cabucu* na inibição do fungo *Candida albicans*, com um CIM de 1,5 mg/mL.

Nos testes imunológicos, observou-se que os extratos não apresentaram produções consideráveis de H₂O₂, um mediador que pode destruir estruturas biológicas e levar a um dano celular irreversível. Não observou-se também produção de NO, o que pode indicar que as espécies testadas possuem propriedades antiinflamatórias.

No ensaio com o microrganismo *Mycobacterium tuberculosis*, observou-se um resultado promissor para o extrato EMeOH de *M. rubiginosa*, apresentando um CIM (Concentração Inibitória Mínima) de 31,2 µg/mL.

Nos ensaios de analgesia com o teste de contorção abdominal induzida por ácido acético, observou-se que o extrato EMeOH de *M. cabucu* possui uma possível atividade analgésica inespecífica. Através do teste da placa quente, os resultados obtidos indicaram que a fração aquosa de *M. rubiginosa* pode apresentar uma atividade analgésica sobre o sistema nervoso central.

Os extratos de ambas as espécies apresentaram atividade mutagênica com a linhagem TA98 da *Salmonella typhimurium*, o que indica que os extratos induzem mutações do tipo *frameshift*.

A literatura apresenta ainda inúmeras atividades biológicas relacionadas a flavonóides derivados da quercetina, principalmente antiulcerogênica (MARTIN et al., 1988), o que justifica a importância da continuidade dos estudos químico-farmacológicos de espécies do gênero *Miconia*, agora com frações semi-purificadas e substâncias puras.

7 REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, P. K. **Carbon-13 NMR of flavonoids**. Amsterdam: Elsevier, 1989.
- ALMEIDA, S. C. X.; LEMOS, T. L. G.; SILVEIRA, E. R.; PESSOA, O. D. L. Volatile and non-volatile chemical constituents of *Cochlospermum vitifolium* (willdenow) sprengel. **Quim. Nova**, v. 28, n. 1, p. 57-60, 2005.
- ALONSO, A. P. O.; CARAÇA, R. A.; LIMA, A. L.; MORITA, V. U.; RIOS, N. M.; SPOLON, M. G. **Um novo olhar sobre o cerrado de Itirapina-SP: avaliações e propostas de trabalho**. 2005. Disponível em: <<http://www.ib.unicamp.br/profs/fsantos/ecocampo/bt791/2005/R3-b>>. Acesso em: 09 fev. 2006.
- ANDRADE E SILVA, M. L.; CUNHA, W. R.; PEDRO, C.; GARCIA, P. A.; MARTINS, C. Evaluation of the analgesic activity of an ethanol extracts of *Miconia fallax*. **Boll. Chim. Farmac.**, v. 141, n. 2, p. 158-160, 2002.
- BAUER, A. W.; KIRBY, M. D. K.; SHERRIES, J. C.; TRUCK, M. Antibiotic susceptibilities testing by standart single disc diffusion method. **Am. J. Clin. Pathology**, v. 45, n. 4, p. 493-496, 1966.
- BASE DE DADOS TROPICAL. **O gênero *Miconia* Ruiz & Pav. (Melastomataceae) no Estado de São Paulo**. Fundação Tropical de Pesquisa e Tecnologia André Tosello. Disponível em: <<http://www.bdt.fat.org.br/iRead>>. Acesso em: 25 fev. 2005.
- BILIA, A. R.; CIAMPI, L.; MENDEZ, J.; MORELLI, I. Phytochemical investigations of *Licania* genus. Flavonoids from *Licania pyrifolia*. **Pharm. Acta Helv.**, v. 71, n. 3, p. 199-204, 1996.
- BUDZIANOWSKI, J.; SKRZYPCZAK, L. Phenylpropanoid esters from *Lamium album* flowers. **Phytochemistry**, v. 38, n. 4, p. 997-1001, 1995.
- CALDERÓN, A. I.; TERREAUX, C.; SCHENK, K.; PATTISON, P.; BURDETTE, J. E.; PEZZUTO, J. M.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Isolation and structure elucidation of an isoflavone and a sesterterpenoic acid from *Henriettella fascicularis*. **J. Nat. Prod.**, v. 65, n. 12, p. 1749-1753, 2002.
- CALDERÓN, A. I.; TERREAUX, C.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Occurrence of taxiphyllin and 3, 3-di-Omethylellagic acid 4-β-D-glucoside in *Henriettella fascicularis*. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 31, n. 7, p. 789-791, 2003.
- CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. **Cienc. Cult.**, v. 55, n. 3, p. 37-38, 2003.
- CARVALHO, M. G.; GOMES, M. S. R.; PEREIRA, A. H. F.; DANIEL, J. F. S.; SCHRIPSEMA, J. Carbon-13 and proton NMR assignments of a new agathisflavone derivative. **Magn. Reson. Chem.** In press.

CARSWELL, E. A.; OLD, L. J.; KASSEL, R. L.; GREEN, S.; FIORE, N.; WILLIAMSON, B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 72, n. 9, p. 3666-3670, 1975.

CELOTTO, A. C.; NAZARIO, D. Z.; SPESSOTO, M. A.; MARTINS, C. H. G.; CUNHA, W. R. Evaluation of the *in vitro* antimicrobial activity of crude extracts of three *Miconia* species. **Braz. J. Microb.**, v. 34, n. 4, p. 339-340, 2003.

CHAN, W. R.; SHEPPARD, V.; MEDFORD, A.; TINTO, W. F.; REYNOLDS, W. F.; McLEAN, S. Triterpenes from *Miconia stenostachya*. **J. Nat. Prod.**, v. 55, n. 7, p. 963-966, 1992.

CHANWITHEESUK, A.; TEERAWUTGULRAG, A.; KILBURN, J. D.; RAKARIYATHAM, N. Antimicrobial gallic acid from *Caesalpinia mimosoides* Lamk. **Food Chem.**, v. 100, n. 3, p. 1044-1048, 2007.

CHARI, V. M.; ILYAS, M.; WAGNER, H.; NESZMELYI, A.; CHEN, F. C.; CHEN, L. K.; LIN, Y. C.; LIN, Y. M. C-13-NMR spectroscopy of biflavanoids. **Phytochemistry**, v. 16, n. 8, p. 1273-1278, 1977.

CHUNG, S. K.; KIM, Y. C.; TAKAYA, Y.; TERASHIMA, K.; NIWA, M. Novel flavonol glycoside, 7-O-methyl Mearnsitrin, from *Sageretia theezans* and its antioxidant effects. **J. Agric. Food Chem.**, v. 52, n. 15, p. 4664-4668, 2004.

COLLINS, L. A.; FRANZBLAU, S. G. Microplate alamar blue assay versus BACTEC 460 system for high-throughput screening of compounds against *M. tuberculosis* and *M. avium*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 41, n. 5, p. 1004-1009, 1997.

COMALADA, M.; BALLESTER, I.; BAILÓN, E.; SIERRA, S.; XAUS, J.; GALVÉZ, J.; MEDINA, F. S.; ZARZUELO, A. Inhibition of pro-inflammatory markers in primary bone marrow-derived mouse macrophages by naturally occurring flavonoids: analysis of the structure-activity relationship. **Biochem. Pharmacol.**, v. 72, n. 8, p. 1010-1021, 2006.

CRAGG, G. M.; NEWMAN, D. J. Biodiversity: a continuing source of novel drug leads. **Pure Appl. Chem.**, v. 77, n. 1, p. 7-24, 2005.

CUNHA, W. R.; CREVELIN, E. J.; ARANTES, G. M.; CROTTI, A. E. M.; ANDRADE E SILVA, M. L.; FURTADO, N. A. J. C.; ALBUQUERQUE, S.; FERREIRA, D. S. A study of the tripanocidal activity of triterpene acids isolated from *Miconia* species. **Phytother. Res.**, v. 20, n. 6, p. 474-478, 2006.

CUNHA, W. R.; MARTINS, C.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E. M.; LOPES, N. P.; ALBUQUERQUE, S. *In vitro* trypanocidal activity of triterpenes from *Miconia* species. **Planta Med.**, v. 69, n. 5, p. 468-470, 2003.

DEDOUSSIS, G. V. Z.; KALIORA, A. C.; ANDRIKOPOULOS, N. K. Effect of phenols on natural killer (NK) cell-mediated death in the K562 human leukemic cell line. **Cell Biol. Int.**, v. 29, n. 11, p. 884-889, 2005.

DÉVÉHAT, F. L.; BAKHTIAR, A.; BÉZIVIN, C.; AMOROS, M.; BOUSTIE, J. Antiviral and cytotoxic activities of some Indonesian plants. **Fitoterapia**, v. 73, n. 5, p. 400-405, 2002.

DIAS, J. C.; REBELO, M. M.; ALVES, C. N. A semi-empirical study of biflavonoid compounds with biological activity against tuberculosis. **J. Mol. Struct. (Theochem)**, v. 676, n. 1/3, p. 83-87, 2004.

EDDY, N. B.; LEIMBACK, D. Synthetic analgesics II. Dithienylbutenyl and dithienylbutylamines. **J. Pharmacol. Exp. Ther.**, v. 107, n. 3, p. 385-393, 1953.

FRAISSE, D.; HEITZ, A.; CARNAT, A.; CARNAT, A. P. ; LAMAISON, J. L. Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora*. **Fitoterapia**, v. 71, n. 4, p. 463-464, 2000.

GARCIA, E. S.; SILVA, A. C. P.; GILBERT, B.; CORRÊA, C. B. V.; CAVALHEIRO, M. V. S.; SANTOS, R. R.; TOMASINI, T. **Fitoterápicos**. Campinas: André Tosello, 1996.

GUNATILAKA, A. A. L.; BERGER, J. M.; EVAN, R.; MILLER, J. S.; WISSE, J. H.; NEDDERMANN, K. M.; BURSUKER, I.; KINGSTON, D. G. I. Isolation, synthesis and structure-activity relationships of bioactive benzoquinonas from *Miconia lepidota* from Suriname rainforest. **J. Nat. Prod.**, v. 64, n. 1, p. 2-5, 2001.

HAN, X.; ZHANG, T.; WEI, Y.; CAO, X.; ITO, Y. Separation of salidroside from *Rhodiola crenulata* by high-speed counter-current chromatography. **J. Chromatogr., A**, v. 971, n. 1/2, p. 237-241, 2002.

HARBORNE, J. B. **Phytochemical methods**: a guide to modern techniques of plant analysis. 2nd. ed. London: Chapman and Hall, 1984.

HARBORNE, J. B. **The flavonoids**: advances in research since 1986. London: Chapman and Hall, 1996.

HARBORNE, J. B. Plant polyphenols – XI. The structure of acylated anthocyanins. **Phytochemistry**, v. 3, n. 2, p. 151-160, 1964.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacol. Ter.**, v. 96, n. 2/3, p. 67-202, 2002.

HENRIQUES, M. G. M. O.; SILVA, P. M. R.; MARTINS, M. A.; FLORES, C. A.; CUNHA, F. Q.; ASSREYU-FILHO, J.; CORDEIRO, R. S. B. Mouse Paw edema. A new model for inflammation? **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 20, n. 2, p. 243-249, 1987.

ISAZA, J. H.; ITO, H.; YOSHIDA, T. A flavonol glycoside-lignan ester and accompanying acylated glucosides from *Monochaetum multiflorum*. **Phytochemistry**, v. 58, n. 2, p. 321-327, 2001.

JORGE, R. M.; LEITE, J. P. V.; OLIVEIRA, A. B.; TAGLIATI, C. A. Evaluation of antinociceptive, anti-inflammatory and antiulcerogenic activities of *Maytenus ilicifolia*. **J. Ethnopharm.**, v. 94, n. 1, p. 93-100, 2004.

JUST, M. J.; RECIO, M. C.; GINER, R. M.; CUÉLLAR, M. J.; MÁÑEZ, S.; BILIA, A. R.; RIOS, J. L. Anti-inflammatory activity of unusual lupane saponins from *Bupleurum fruticosens*. **Planta Med.**, v. 64, n. 5, p. 404-407, 1998.

KIM, M.; LEE, J. Y.; LEE, H.; ARYAL, D. K.; KIM, Y. G.; KIM, S. K.; WOO, E.; KANG, K. W. Antioxidative effects of quercetin-glycosides isolated from the flower buds of *Tussilago farfara* L. **Food Chem. Toxic.**, v. 44, n. 8, p. 1299-1307, 2006.

KOSTER, R.; ANDERSON, M.; DE BEER, E. J. Acetic acid for analgesic screening. **Fed. Proc.**, v. 18, n. 1, p. 412, 1959.

KROES, B. H.; BERG, A. J. J. van der; UFFORD, H. C. Q. van; DIJK, H. van; LABADIE, R. P. Anti-inflammatory activity of gallic acid. **Planta Med.**, v. 58, n. 6, p. 499-504, 1992.

LARSON, R. A. The antioxidants of higher plants. **Phytochemistry**, v. 27, n. 4, p. 969-978, 1988.

LI, X. C.; JACOB, M. R.; PASCO, D. S.; ELSOHLY, H. N.; NINROD, A. C.; WALKER, L. A.; CLARK, A. M. Phenolic compounds from *Miconia myriantha* inhibiting *Candida* Aspartic proteases. **J. Nat. Prod.**, v. 64, n. 10, p. 1282-1285, 2001.

LIN, Y. M.; FLAVIN, M. T.; CASSIDY, C. S.; MAR, A.; CHEN, F. C. Biflavonoids as novel antituberculosis agents. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 11, n. 16, p. 2101-2104, 2001.

LIN, Y. M.; ZHOU, Y.; FLAVIN, M. T.; ZHOU, L. M.; NIE, W.; CHEN, F. C. Chalcones and flavonoids as anti-tuberculosis agents. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 10, n. 8, p. 2795-2802, 2002.

MABRY, T. J.; MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **The systematic identification of flavonoids**. New York: Springer-Verlag, 1970.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Quim. Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MALINSK, T.; KUBASZEWSKI, E.; KIECHLE, F. **Nitric oxide synthase characterization and functional analysis**. New York: Mahin D. Maines, 1996.

MARKHAM, K. R.; TERNAL, B. ¹³C NMR of flavonoids II. Flavonoids other than flavone and flavonol aglycones. **Tetrahedron**, v. 32, n. 21, p. 2607-2612, 1976.

MARKHAM, K. R.; TERNAL, B.; STANLEY, R.; GEIGER, H.; MABRY, T. J. Carbon-13 NMR studies of flavonoids III. Naturally occurring flavonoid glycosides and their acylated derivatives. **Tetrahedron**, v. 34, n. 9, p. 1389-1397, 1978.

- MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test. **Mutat. Res.**, v. 113, n. 3/4, p. 173-215, 1983.
- MARSTON, A.; HOSTETTMANN, K. Counter-current chromatography as a preparative tool – applications and perspectives. **J. Chromatogr., A**, v. 658, n. 2, p. 315-341, 1994.
- MARTINS, A. B.; SEMIR, J.; GOLDENBERG, R.; MARTINS, E. O gênero *Miconia* Ruiz & Pav. no Estado de São Paulo. **Acta Bot. Bras.**, v. 10, n. 2, p. 267-316, 1996.
- MARTIN, M. J.; LA CASA, C.; ALARCÓN-DE-LA-LASTRA, C.; CABEZA, J.; VILLEGAS, I.; MOTILVA, V. Antioxidant mechanisms involved gastroprotective effects of quercetin. **Zeit. Nat. J. Biocences**, v. 53, p. 82, 1988.
- MATA, R.; ROJAS, A.; ESTRADA, S.; CALZADA, F.; ROJAS, I.; BYE, R.; LINARES, E. Smooth muscle relaxing flavonoids and terpenoids from *Coniza filaginoids*. **Planta Med.**, v. 63, n. 1, p. 31-35, 1997.
- MATASYOH, J. C.; KIPLIMO, J. J.; KARUBIU, N. M.; HAILSTORKS, T. P. Chemical composition and antimicrobial activity of essential oil of *Tarconanthus camphorates*. **Food Chem.**, v. 101, n. 3, p. 1183-1187, 2007.
- MIMURA, M. R. M.; SALATINO, A.; SALATINO, M. L. F. Distribution of flavonoids and the taxonomy of *Huberia* (Melastomataceae). **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 32, n. 1, p. 27-34, 2004.
- MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay. **Mutat. Res.**, v. 455, n. 1/2, p. 29-60, 2000.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. **Performance standards for antimicrobial disc susceptibility tests. M02-A7.** Pennsylvania, 2003.
- NOGUEIRA, M. E. I.; PASSONI, M. H.; BISO, F. I.; LONGO, M. C.; CARDOSO, C. R. P.; SANTOS, L. C.; VARANDA, E. A. Investigation of genotoxic and antigenotoxic activities of *Melampodium divaricatum* in *Salmonella typhimutium*. **Toxicol. Vitro**, v. 20, n. 3, p. 361-366, 2006.
- OKA, H.; HARADA, K.; ITO, Y.; ITO, Y. Separation of antibiotics by counter-current chromatography. **J. Chromatogr., A**, v. 812, n. 1/2, p. 35-52, 1998.
- OMULOKOLI, E.; KHAN, B.; CHHABRA, S. C. Antiplasmodial activity of four kenyan medicinal plants. **J. Ethnopharm.**, v. 56, n. 2, p. 133-137, 1997.
- OSSIPOV, V.; NURMI, K.; LOPONEN, J.; PROKOPIEV, N.; HAUKIOJA, E.; PIHLAJA, K. HPLC isolation and identification of flavonoids from white birch *Betula pubescens* leaves. **Biochem. Syst. Ecol.**, v. 23, n. 3, p. 213-222, 1995.

- ÖSTERDAHL, B. J. Chemical studies on *Bryophytes* .23. C-13 NMR analysis of a biflavone from *Dicranum-Scoparium*. **Acta Chem. Scand. B**, v. 37, n. 1/5, p. 69-71, 1983.
- PEGNYEMB, D. E.; MBING, J. N.; ATCHADE, A. T.; TIH, R. G.; SONDEGAM, B. L.; BLOND, A.; BODO, B. Antimicrobial biflavonoids from the aerial parts of *Ouratea sulcata*. **Phytochemistry**, v. 66, n. 16, p. 1922-1926, 2005.
- PINTO, A. C.; SILVA, D. H. S.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A. Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Quim. Nova**, v. 25, p. 45-61, 2002. Suplemento 1.
- RAMASARMA, T. H₂O₂ has a role in cellular regulation. **Indian J. Biochem. Biophys.**, v. 27, n. 5, p. 269-274, 1990.
- RIBEIRO, A.; AIUB, C.; STANKEVICINS, L.; DA COSTA, V.; FERREIRA, F.; MAZZEI, J.; MOURA, R. S.; FELZENSZWALB, I. Genotoxic evaluation of a vinifera skin extract that present pharmacological activities. **Food Chem. Toxicol.**, v. 42, n. 6, p. 969-973, 2004.
- RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio do cerrado na região do Alto Rio Grande-Minas Gerais. **Cienc. Agrotec.**, v. 25, n. 1, p. 102-123, 2001.
- ROTELLI, A. E.; GUARDIA, T.; JUÁREZ, A. O.; DE LA ROCHA, N. E.; PELZER, L. E. Comparative study of flavonoids in experimental models of inflammation. **Pharmacol. Res.**, v. 48, n. 6, p. 601-606, 2003.
- RUBILAR, M.; PINELO, M.; IHL, M.; SCHEUERMANN, E.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. J. Murta leaves (*Ugni molinae* Turcz) as a source of antioxidant polyphenols. **J. Agric. Food Chem.**, v. 54, n. 1, p. 59-64, 2006.
- SANBONGI, C.; OSAKABE, N.; NATSUME, M.; TAKIZAWA, T.; GOMI, S.; OSAWA, T. Antioxidative polyphenols isolated from *Theobroma cacao*. **J. Agric. Food Chem.**, v. 46, n. 2, p. 454-457, 1998.
- SERVETTAZ, O.; COLOMBO, M. L.; DE BERNARDI, M.; UBERTI, E.; VIDARI, G.; VITA-FINZI, P. Flavonol glycosides from *Dryas octopetala*. **J. Nat. Prod.**, v. 47, n. 5, p. 809-814, 1984.
- SIMÕES, C. M. O.; SCHEMKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A. ; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia, da planta ao medicamento**. 3. ed. Porto Alegre: Ed. UFRGS; Florianópolis: UFSC, 2001.
- SOICKE, H.; GÖRLER, K.; WARING, H. Flavonol glykoside aus *Moghania faginea*. **Planta Med.**, v. 56, n. 4, p. 410-412, 1990.
- SPESSOTO, M. A.; FERREIRA, D. S.; CROTTI, A. E. M.; SILVA, M. L. A.; CUNHA, W. R. Evaluation of the analgesic activity on extracts of *Miconia rubiginosa* (Melastomataceae). **Phytomedicine**, v. 10, n. 6/7, p. 606-609, 2003.

STUEHR, D. J.; NATHAN, C. F. Nitric oxide. A macrophage product responsible for cytostasis and respiratory inhibition in tumor target cells. **J. Exp. Med.**, v. 169, n. 5, p. 1543-1555, 1989.

TERAHARA, N.; SUZUKI, H.; TOKI, K.; KUWANO, H.; SAITO, N.; HONDA, T. A diacylated anthocyanin from *Tibouchina urvilleana* flowers. **J. Nat. Prod.**, v. 56, n. 3, p. 335-340, 1993.

VARELLA, S. D.; POZETTI, G. L.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. Mutagenic activity of sweepings and pigments of a household-was factory assayed with *Salmonella typhimutium*. **Food Chem. Toxicol.**, v. 42, n. 12, p. 2029-2035, 2004.

VEIGA JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Quim. Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528, 2005.

VÍCTOR, V. M.; DE LA FUENTE, M. Several functions of immune cells in mice changed by oxidative stress caused by endotoxin. **Phys. Res.**, v. 52, n. 6, p. 789-796, 2003.

WAGNER, H. M.; BLADT, S.; ZGAINKI, E. M. **Plant drug analysis**. Berlin: Springer, 1984.

WENKERT, E.; GOTTLIEB, H. E. Carbon-13 nuclear magnetic resonance spectroscopy of flavonoid and isoflavonoid compounds. **Phytochemistry**, v. 16, n. 11, p. 1811-1816, 1977.

YOSHIDA, T.; NAKATA, F.; HOSOTANI, K.; NITTA, A.; OKUDA, T. Dimeric hydrolysable tannins from *Melastoma malabathricum*. **Phytochemistry**, v. 31, n. 8, p. 2829-2833, 1992.

YOSHIDA, T.; ARIOKA, H.; FUJITA, T.; CHEN, X.; OKUDA, T. Monomeric and dimeric hydrolysable tannins from two Melastomataceae species. **Phytochemistry**, v. 37, n. 3, p. 863-866, 1994.

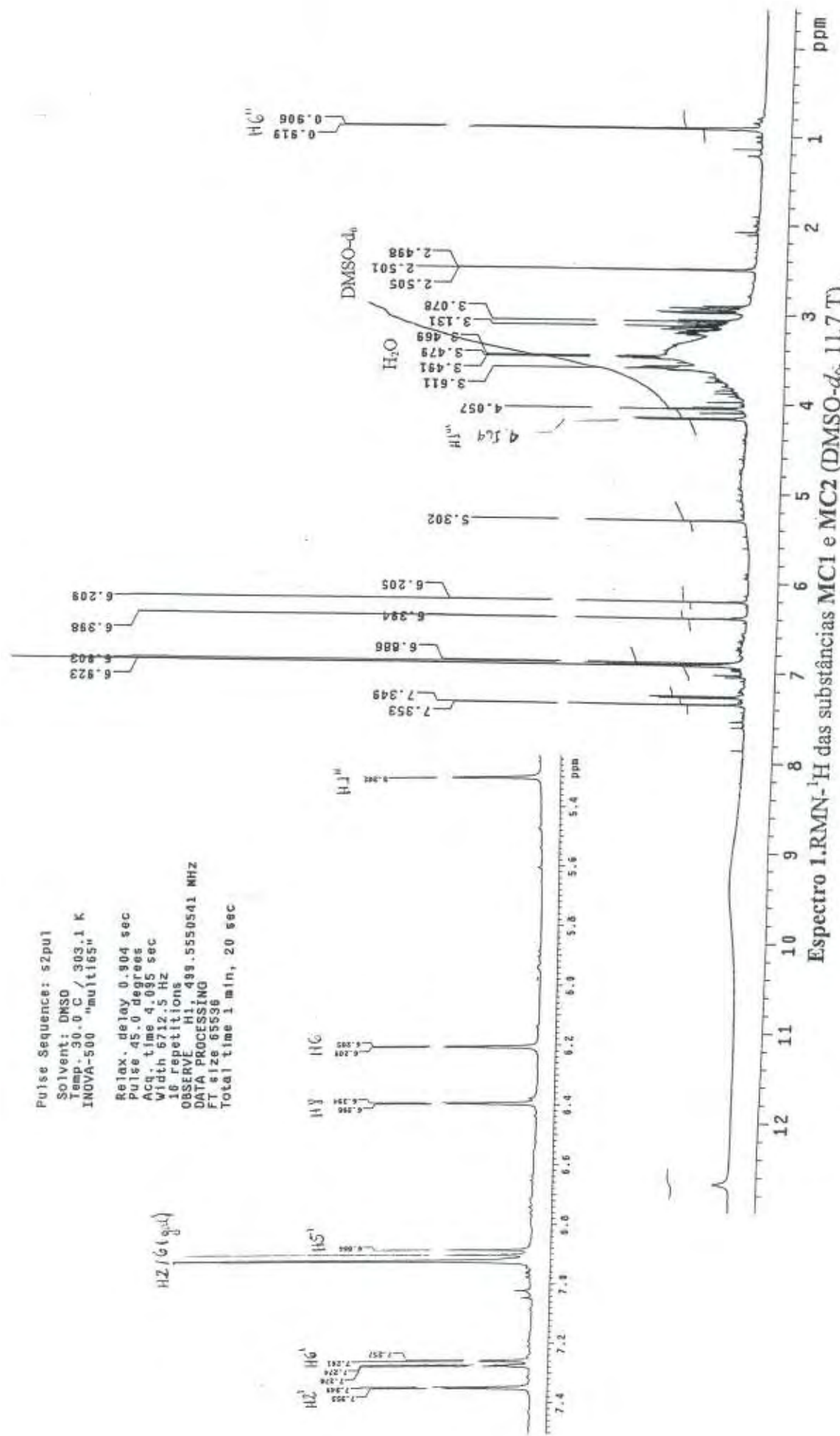
YOSHIDA, T.; AMAKURA, Y.; YOKURA, N.; ITO, H.; ISAZA, J. H.; RAMIREZ, S.; PELAEZ, D. P.; RENNERT, S. S. Oligomeric hydrolysable tannins from *Tibouchina multiflora*. **Phytochemistry**, v. 52, n. 8, p. 1661-1666, 1999.

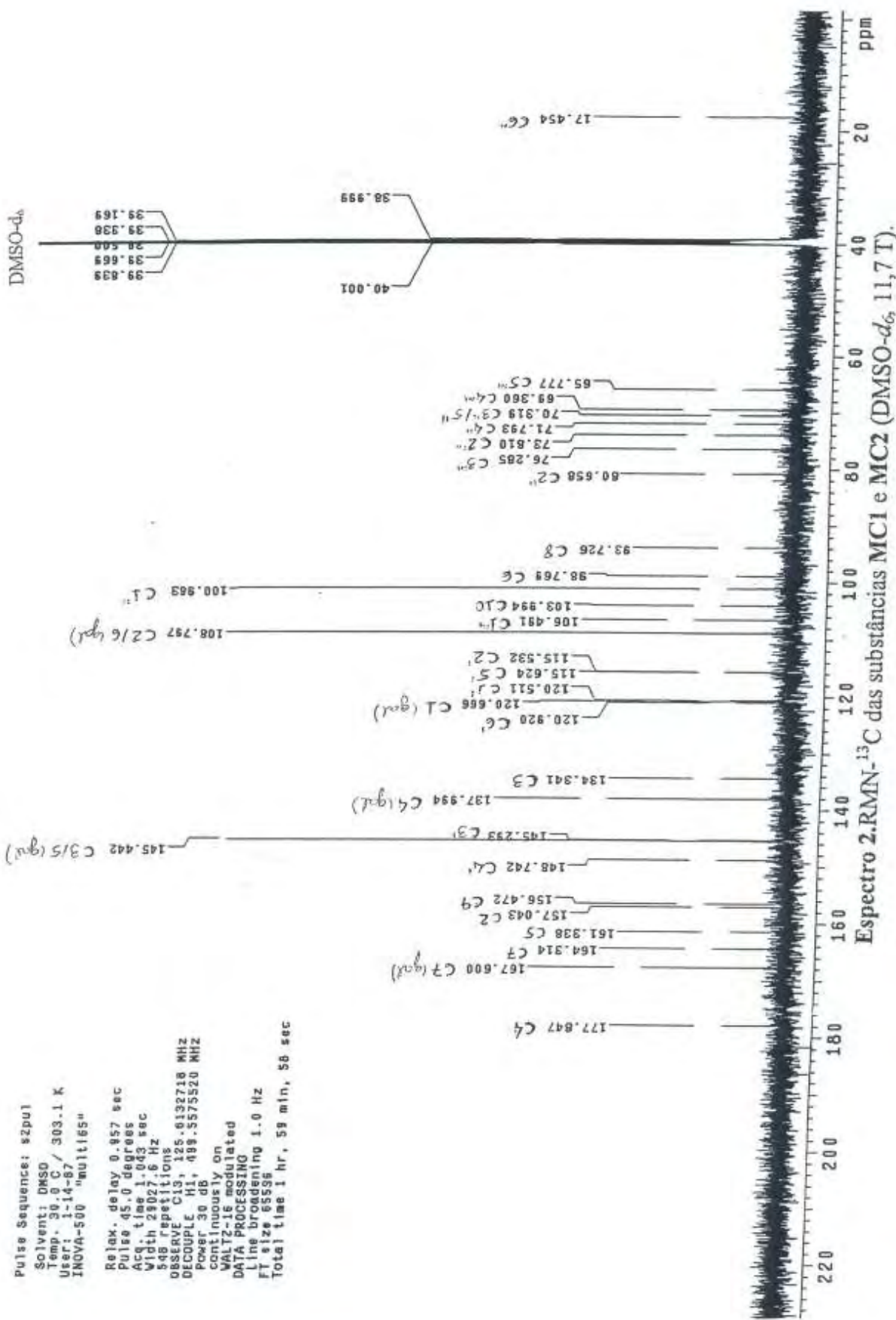
YOSHIDA, T.; ITO, H.; HIPÓLITO, I. J. Pentameric ellagitannin oligomers in melastomataceous plants—chemotaxonomic significance. **Phytochemistry**, v. 66, n. 17, p. 1972-1983, 2005.

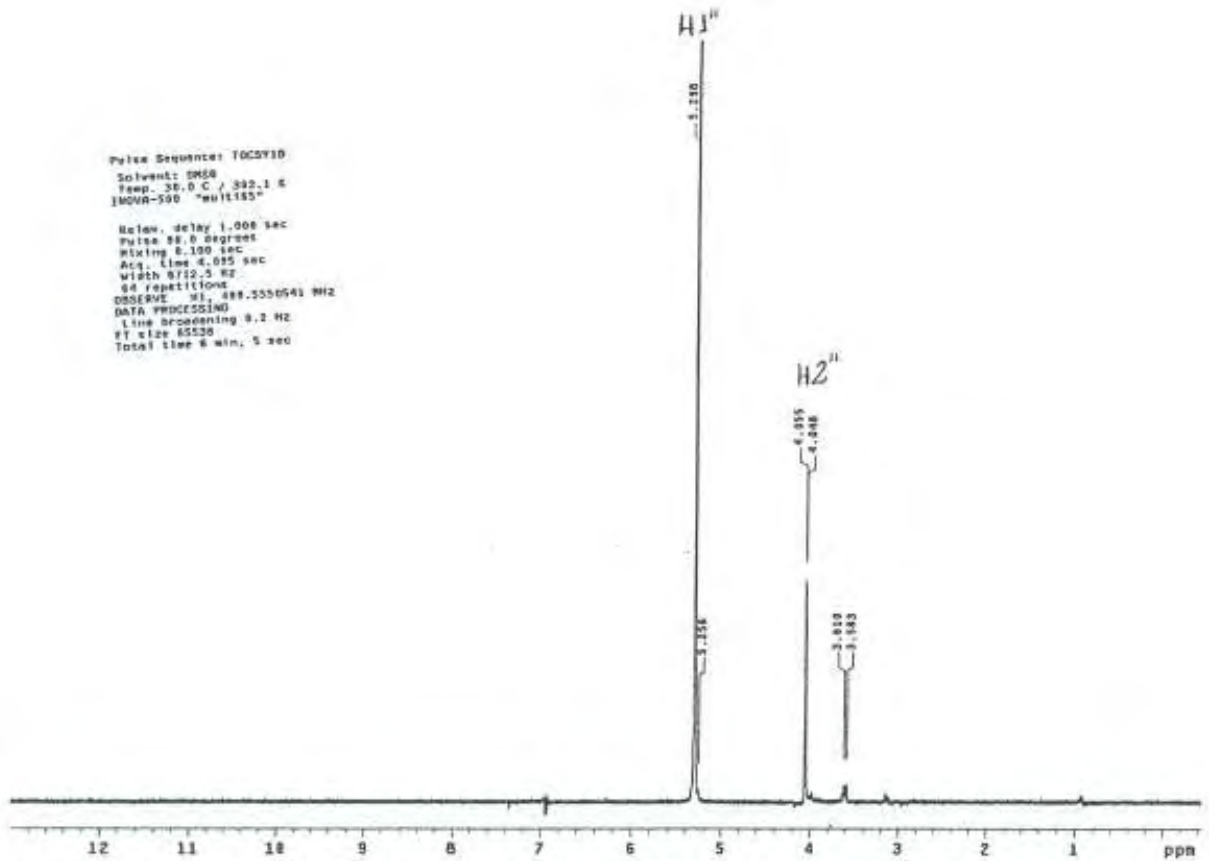
ZEIGER, E. Mutagens that are not carcinogens: faulty theory or fault tests? **Mutat. Res.**, v. 492, n. 1/2, p. 29-38, 2001.

ZHANG, Z.; ELSOHLY, H. N.; LI, X. C.; KHAN, S. I.; BROEDEL JÚNIOR, S. E.; RAULLI, R. E.; CIHLAR, R. L.; WALKER, L. A. Flavanone glycosides from *Miconia trailii*. **J. Nat. Prod.**, v. 66, n. 1, p. 39-41, 2003.

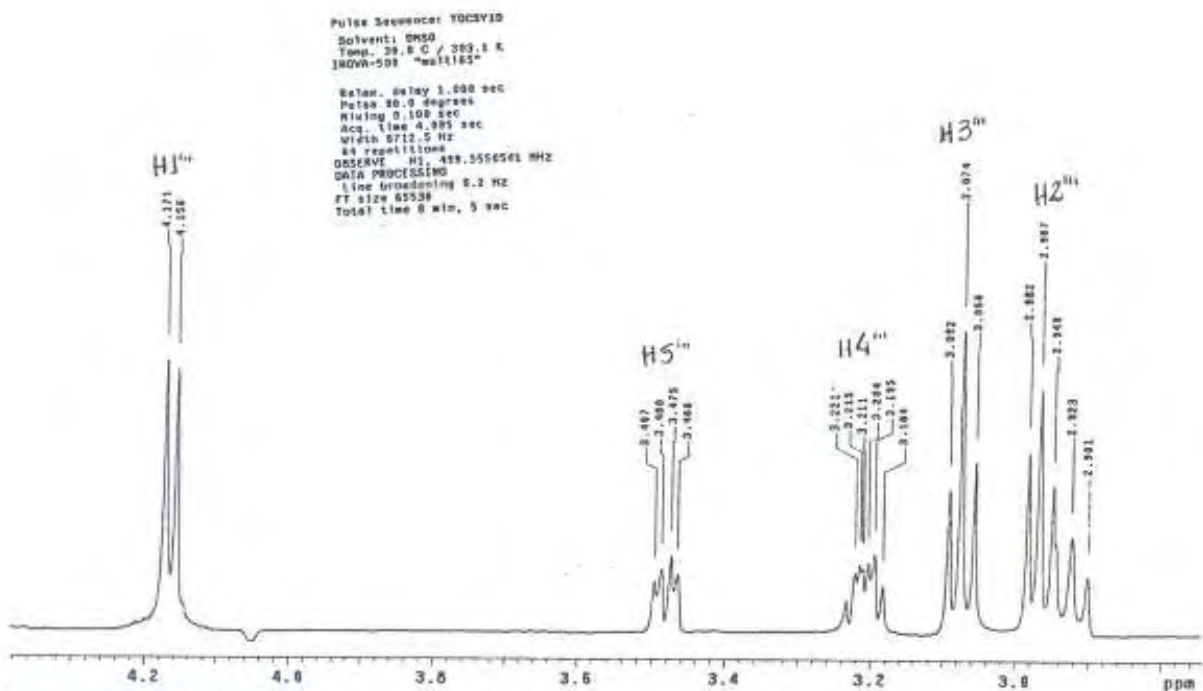
***Espectros de RMN mono e
bidimensionais***



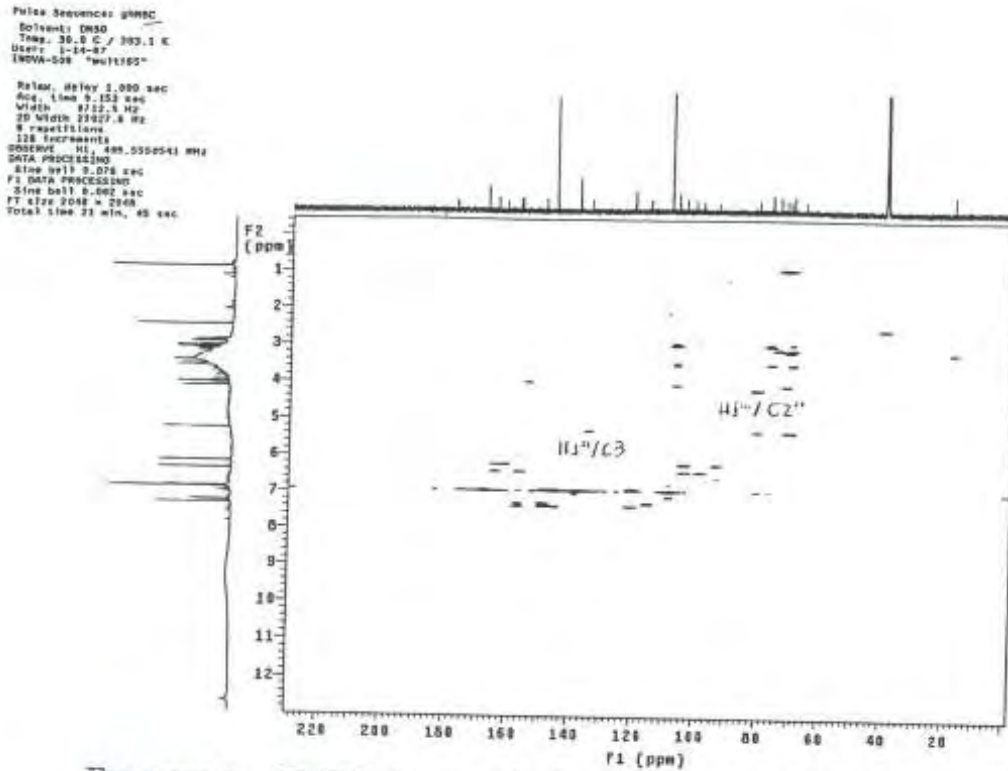




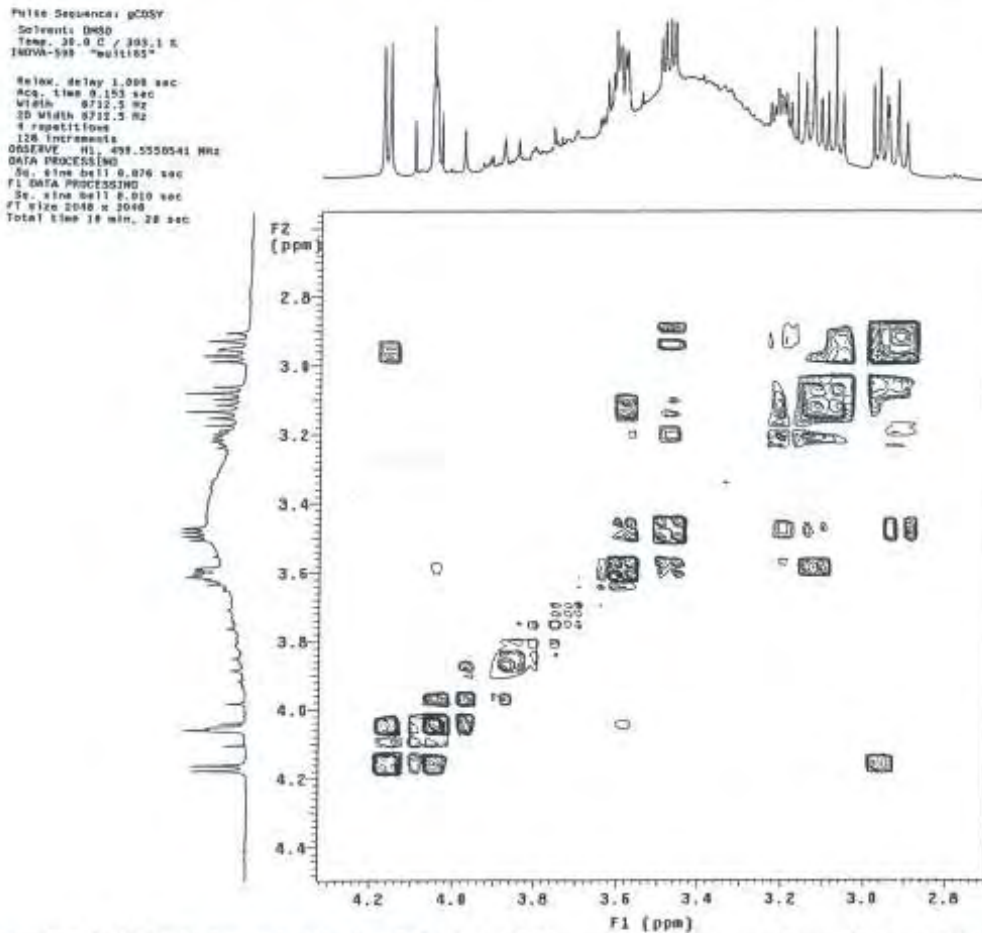
Espectro 3. 1D-TOCSY da rhamnose da substância MC1 – H1'' (δ 5,30) irradiado (DMSO- d_6 , 11,7 T).



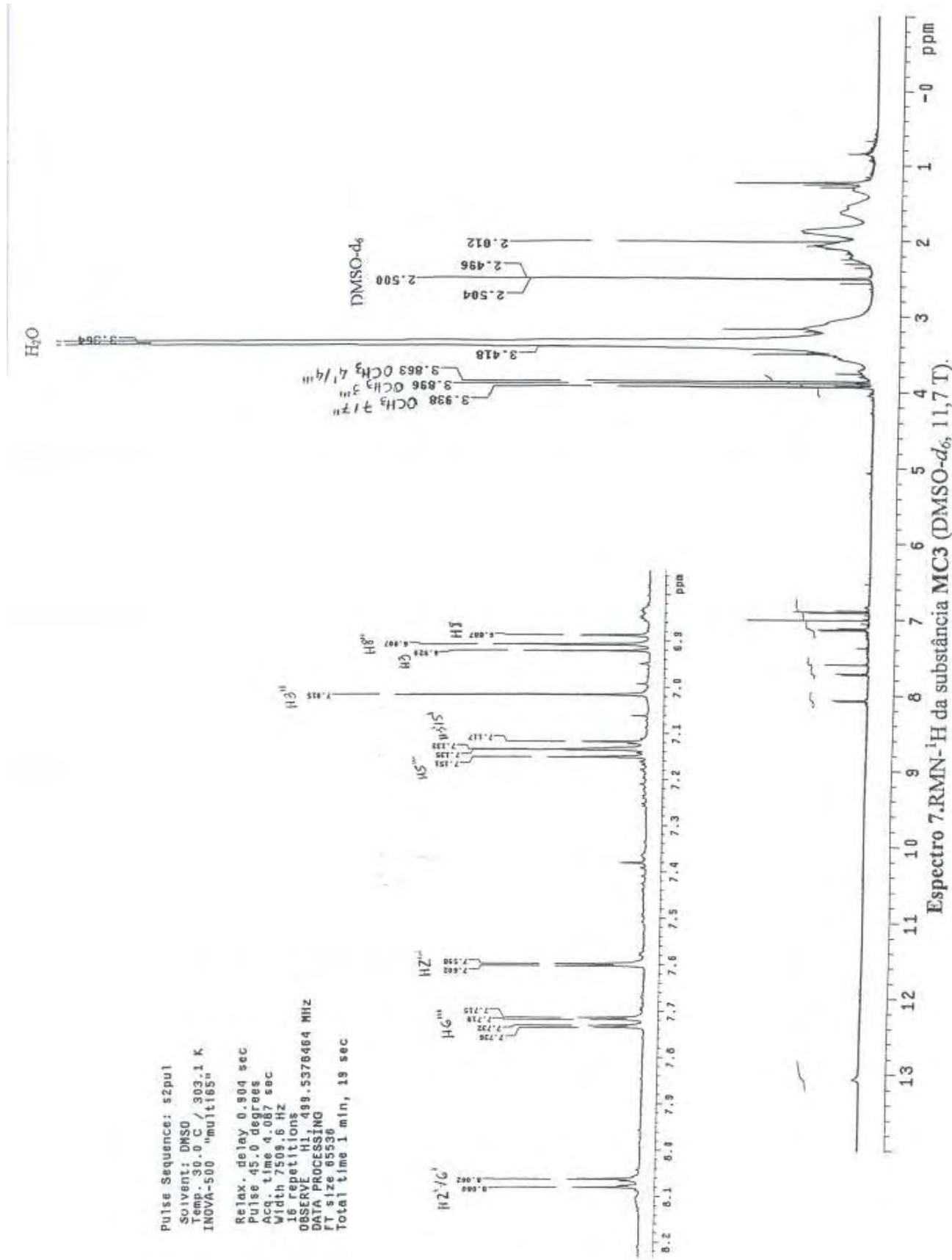
Espectro 4. 1D-TOCSY da xylose da substância MC1 – H1'' (δ 4,16) irradiado (DMSO- d_6 , 11,7 T).

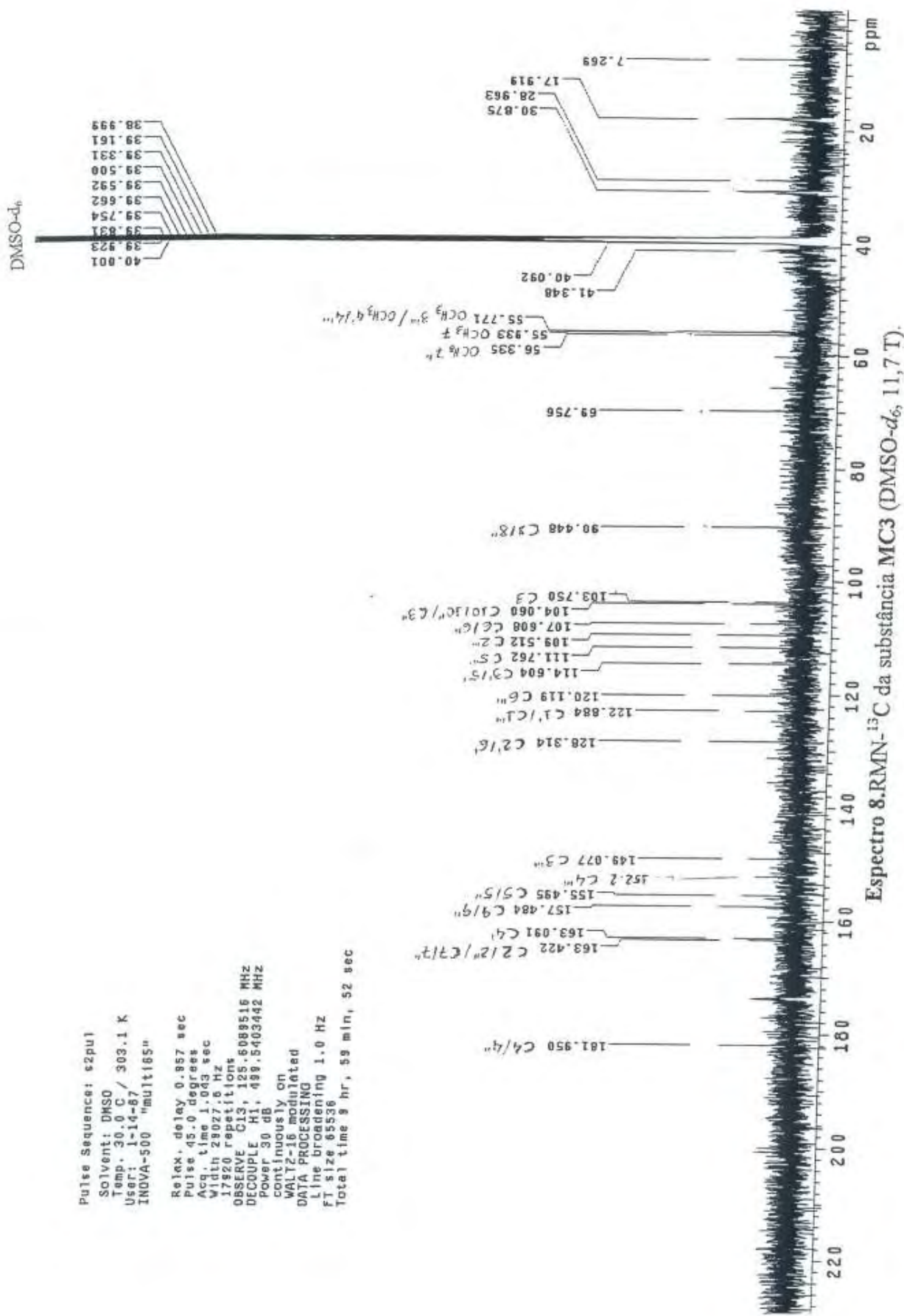


Espectro 5. gHMBC das substâncias MC1 e MC2 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).



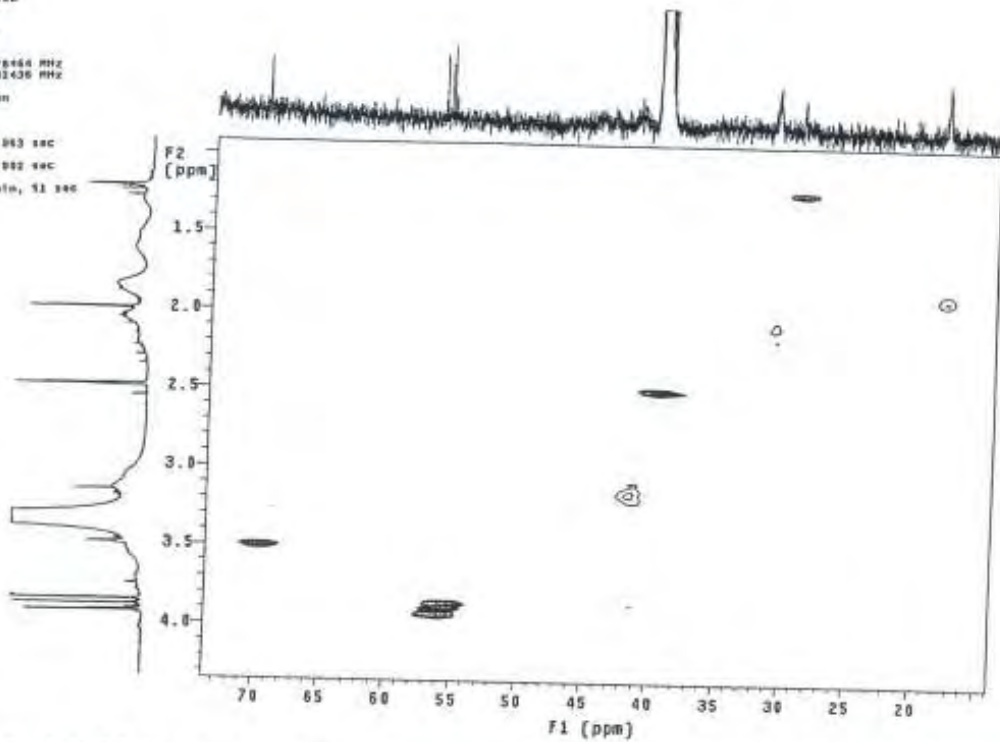
Espectro 6. COSY das substâncias MC1 e MC2 – expansão na região de 2,6 a 4,4 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).





Pulsa Sequence: ghmqc
 Solvent: DMSO
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 User: j-14-87
 INOVA-500 "multis"

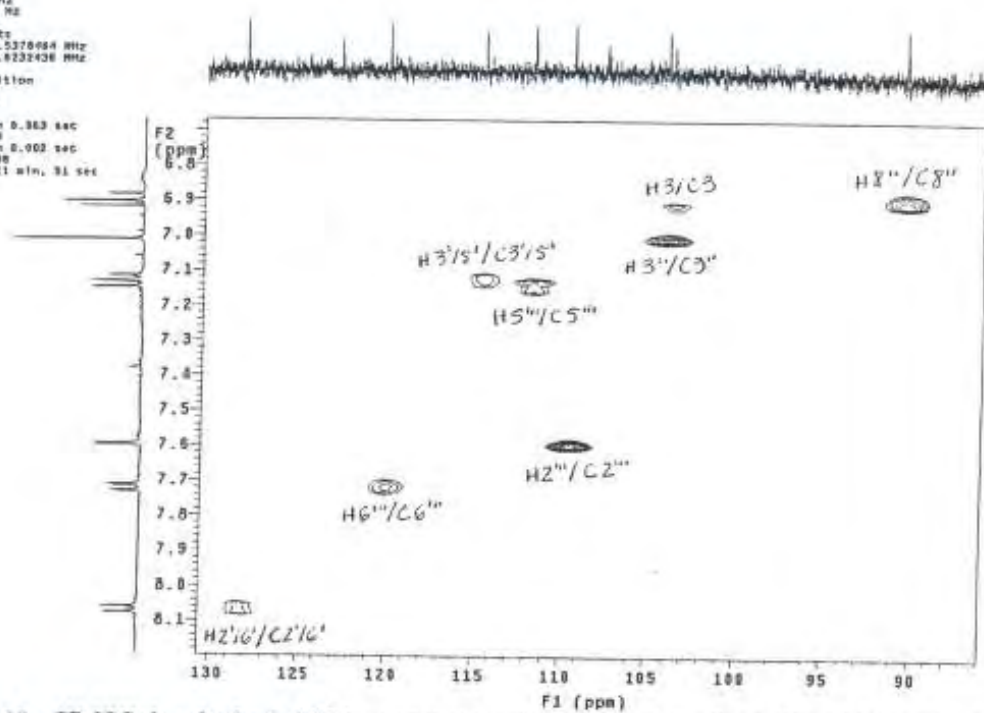
 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.126 sec
 Width 7500.0 Hz
 2D Width 29227.0 Hz
 18 repetitions
 2 x 128 increments
 OBSERVE H1, 499.5378664 MHz
 DECOUPLE C13, 125.8232436 MHz
 Power 47 dB
 on during acquisition
 off during delay
 GMP-1 modulated
 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.983 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.982 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 1 hr, 21 min, 51 sec



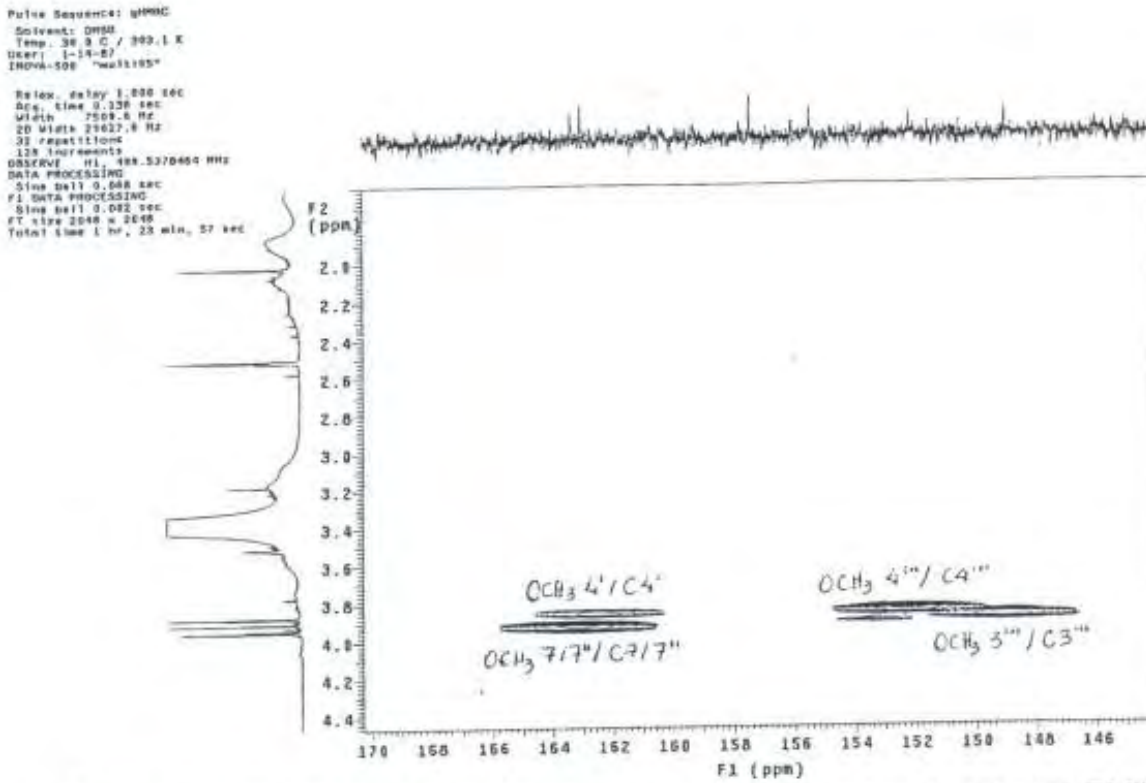
Espectro 9. gHMQC da substância MC3 – expansão nas regiões de 1,0 a 4,3 e 15 a 73 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).

Pulsa Sequence: ghmqc
 Solvent: DMSO
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 User: j-14-87
 INOVA-500 "multis"

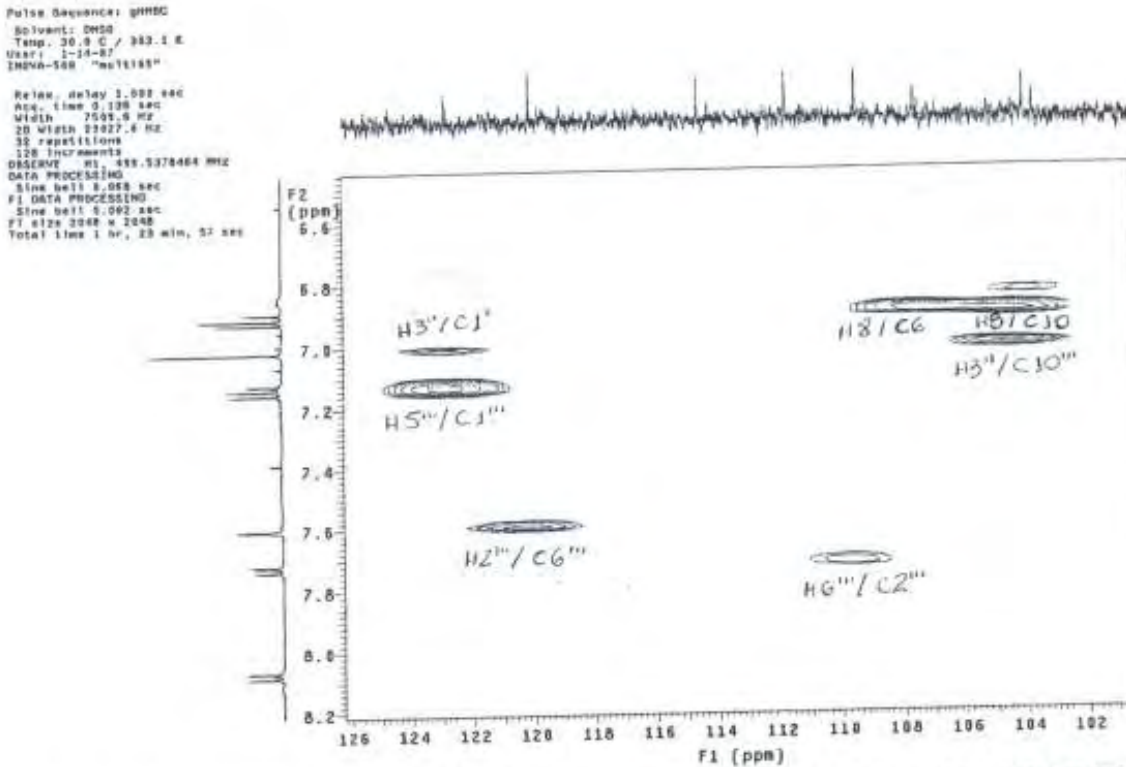
 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.126 sec
 Width 7500.0 Hz
 2D Width 29227.0 Hz
 18 repetitions
 2 x 128 increments
 OBSERVE H1, 499.5378664 MHz
 DECOUPLE C13, 125.8232436 MHz
 Power 47 dB
 on during acquisition
 off during delay
 GMP-1 modulated
 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.983 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.982 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 1 hr, 21 min, 51 sec



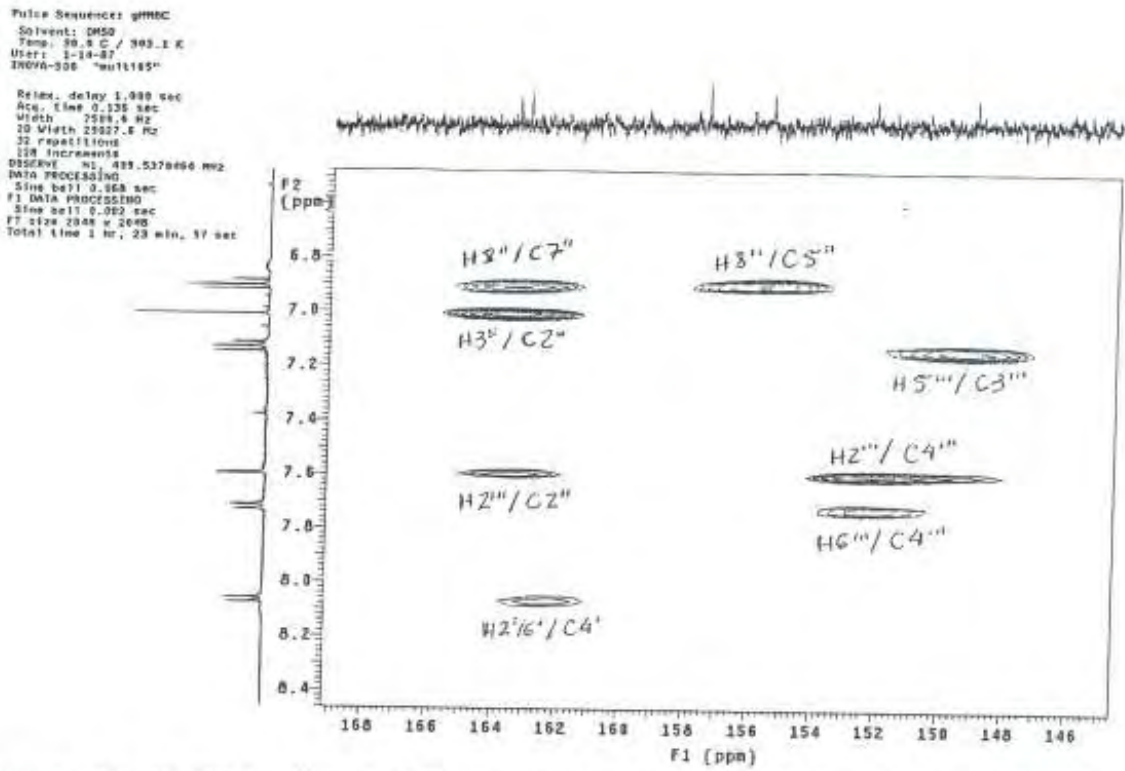
Espectro 10. gHMQC da substância MC3 – expansão nas regiões de 6,7 a 8,1 e 87 a 130 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).



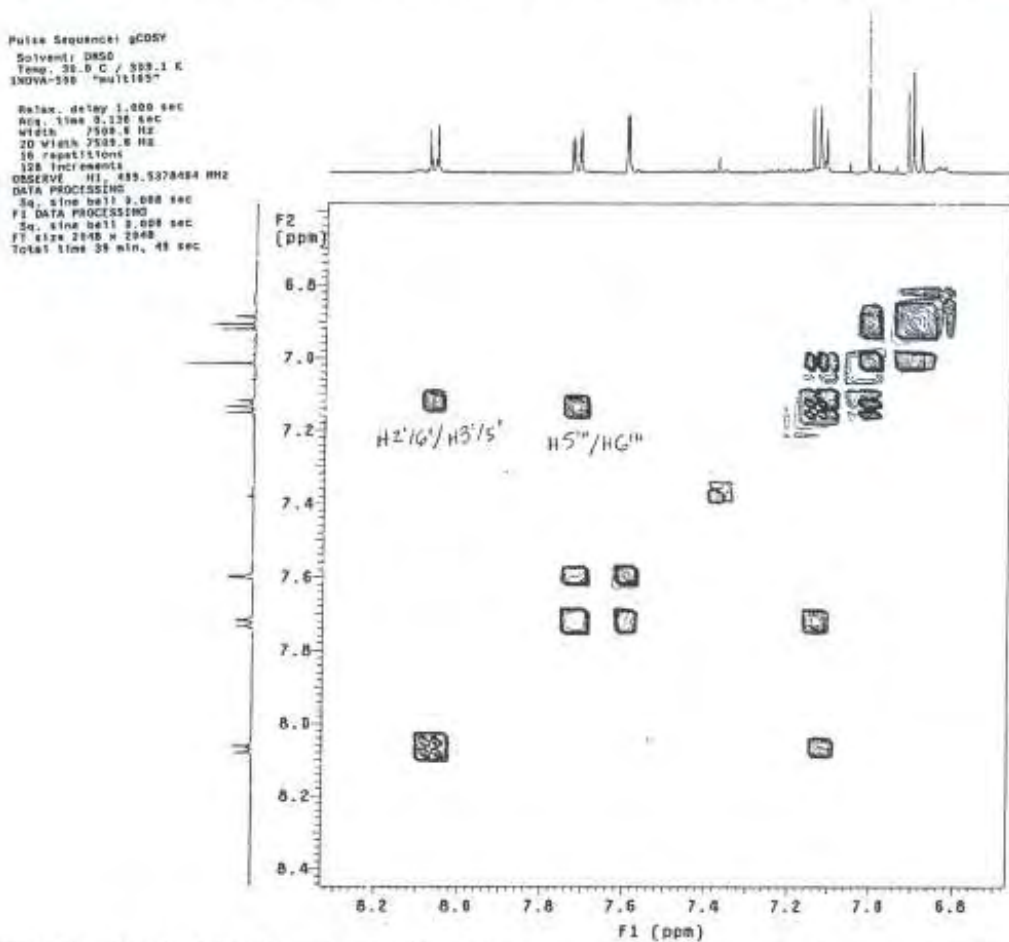
Espectro 11. gHMBC da substância MC3 – expansão nas regiões de 1,8 a 4,4 e 145 a 170 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).



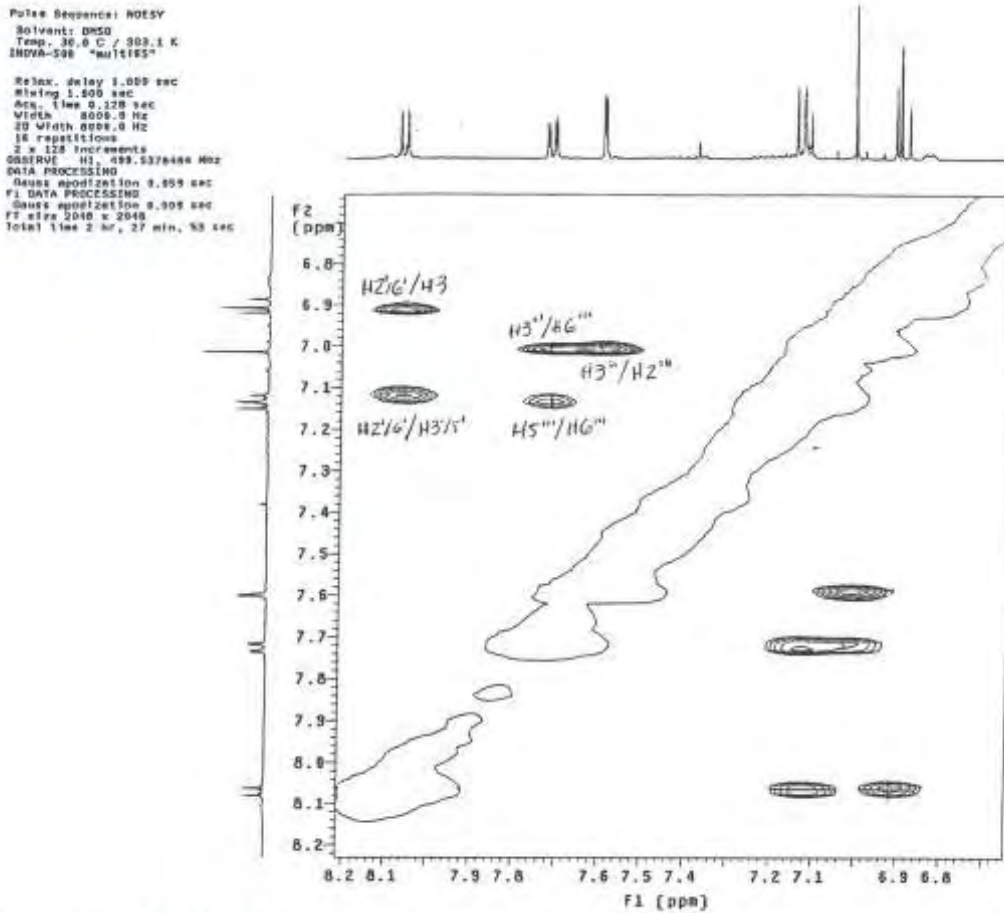
Espectro 12. gHMBC da substância MC3 – expansão nas regiões de 6,5 a 8,2 e 101 a 126 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).



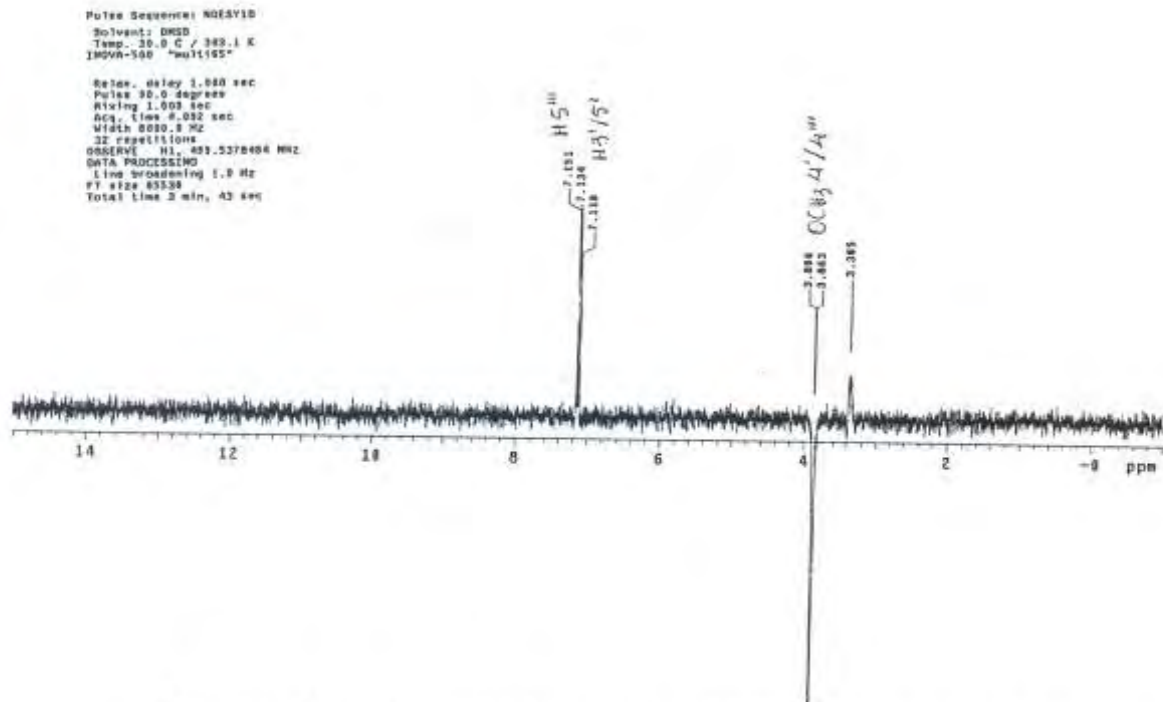
Espectro 13. gHMBC da substância MC3 – expansão nas regiões de 6,5 a 8,4 e 147 a 169 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).



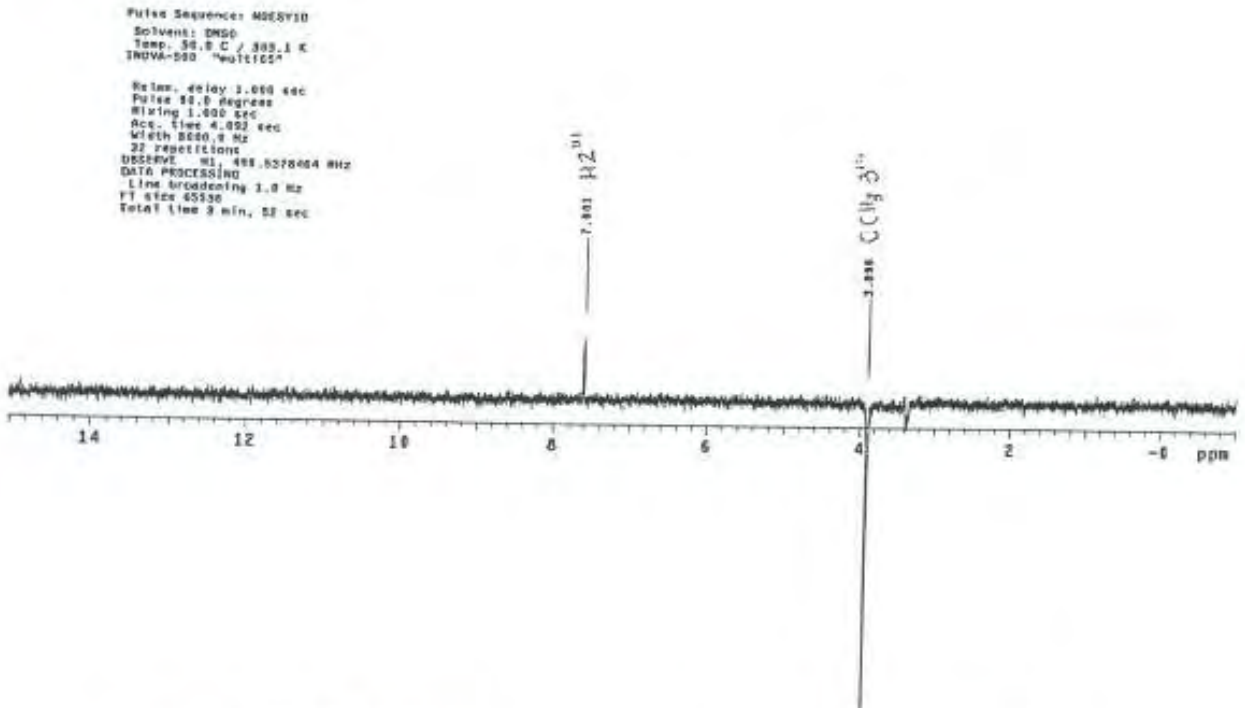
Espectro 14. COSY da substância MC3 – expansão na região de 6,6 a 8,4 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).



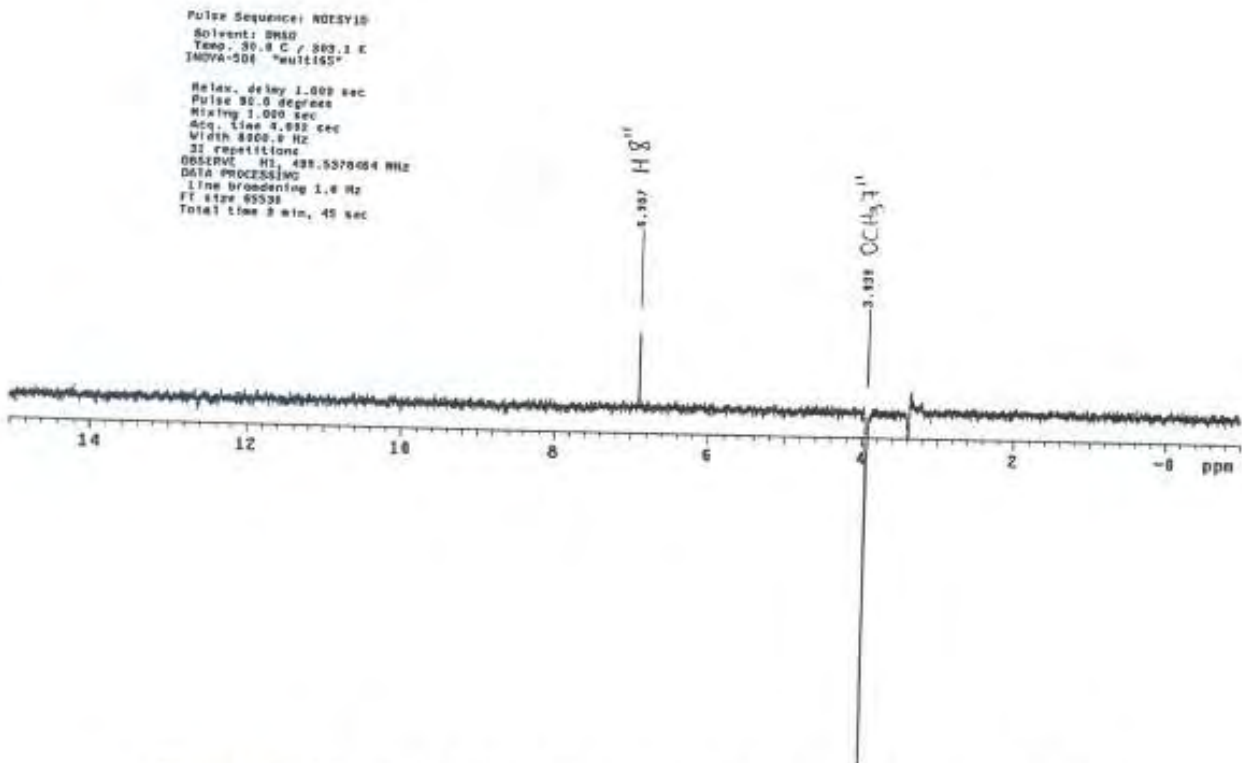
Espectro 15. gNOESY da substância MC3 – expansão na região de 6,7 a 8,2 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).



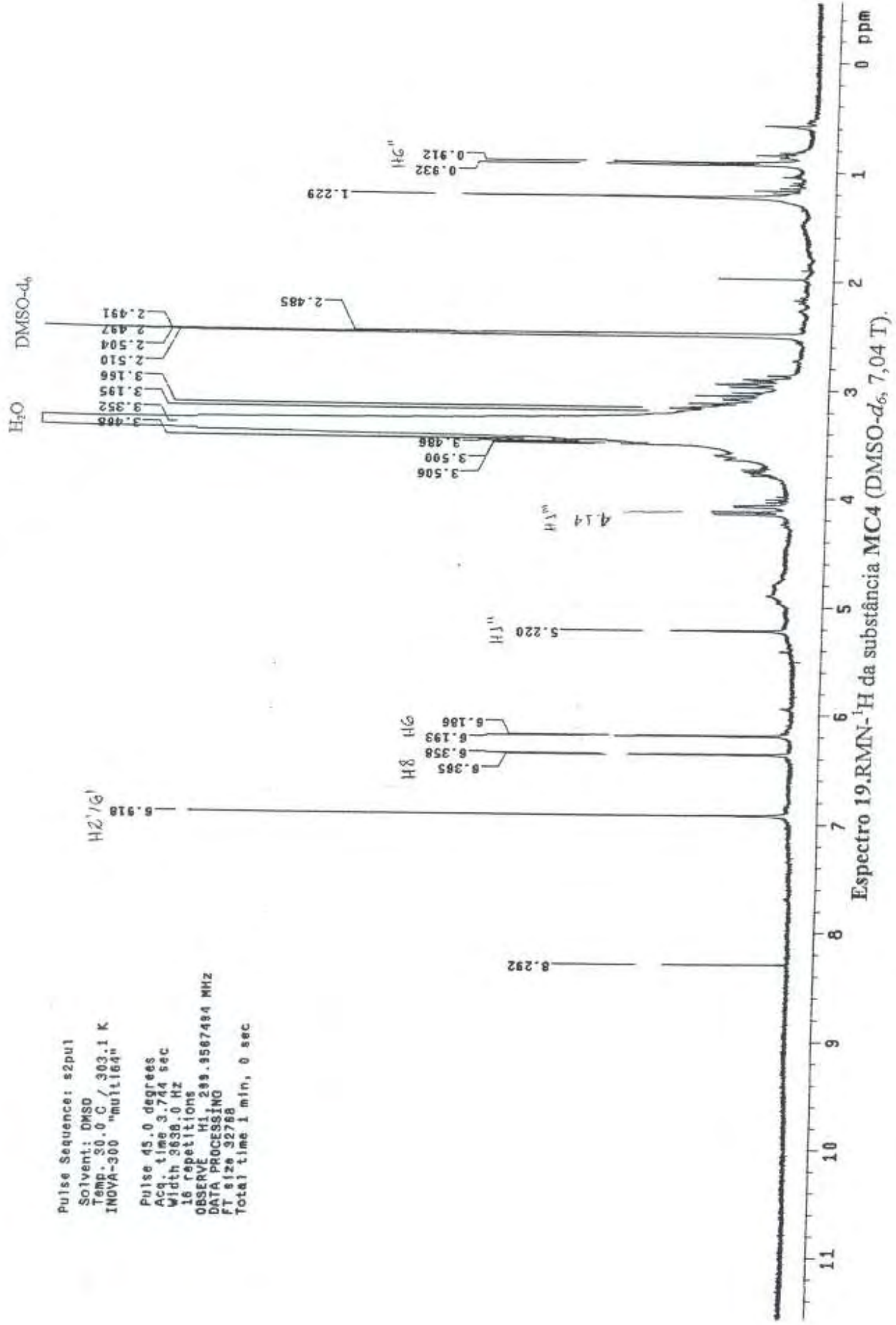
Espectro 16. 1D-NOESY da substância MC3 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).

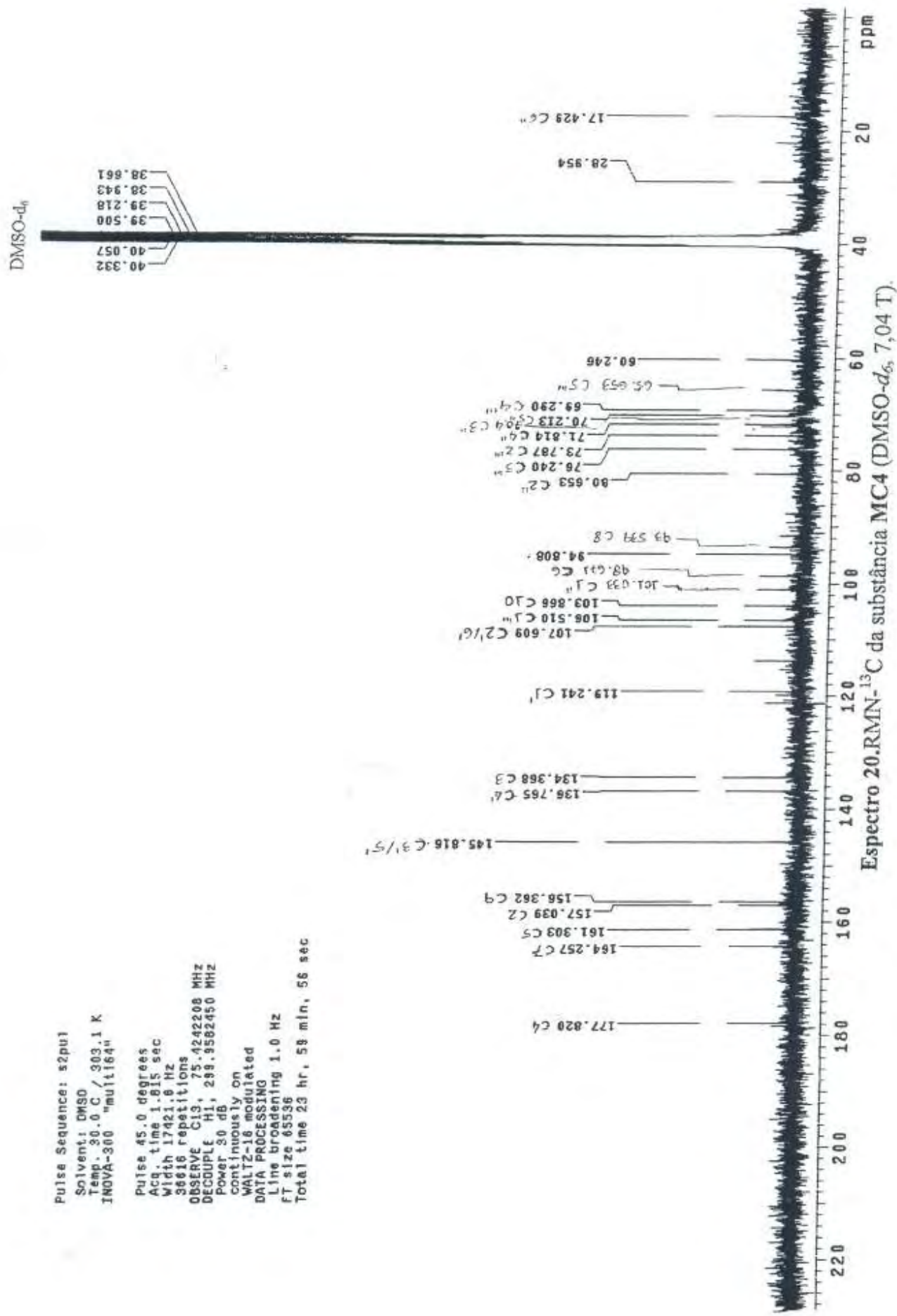


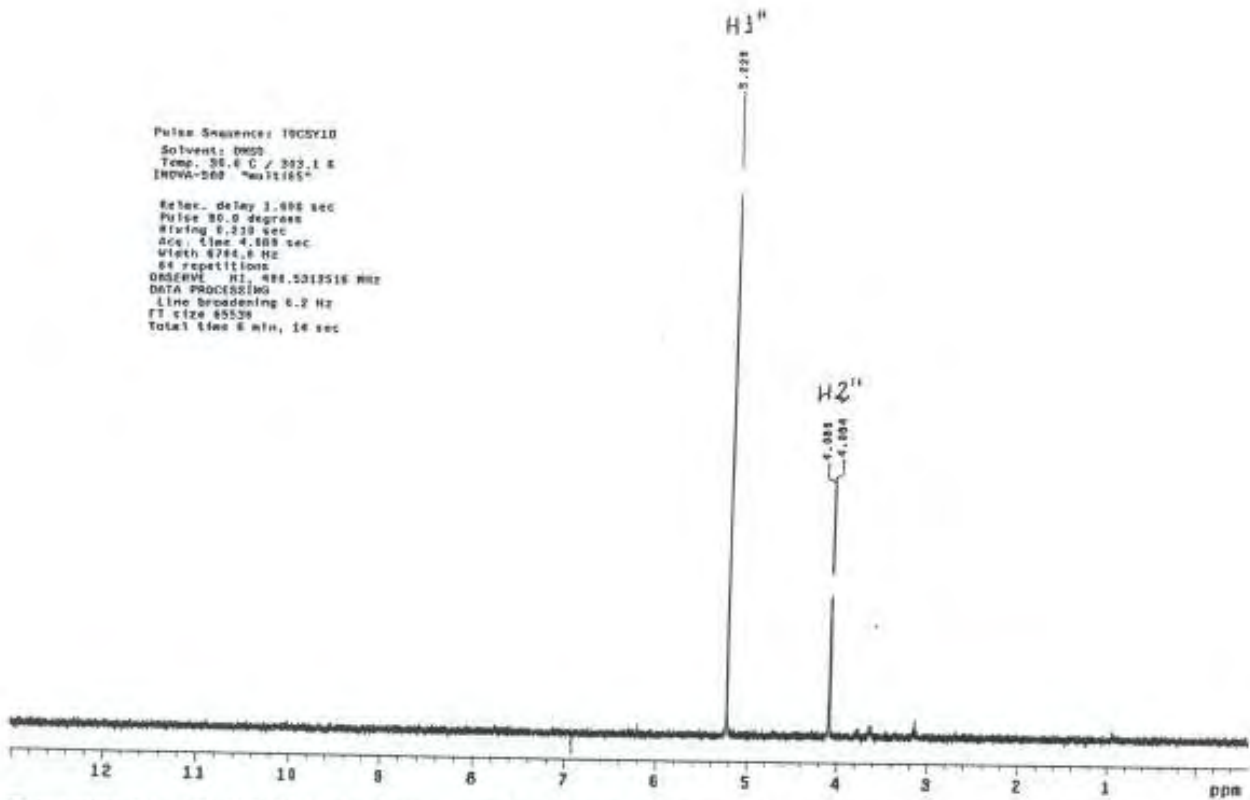
Espectro 17. 1D-NOESY da substância MC3 (DMSO- d_6 , 11,7 T).



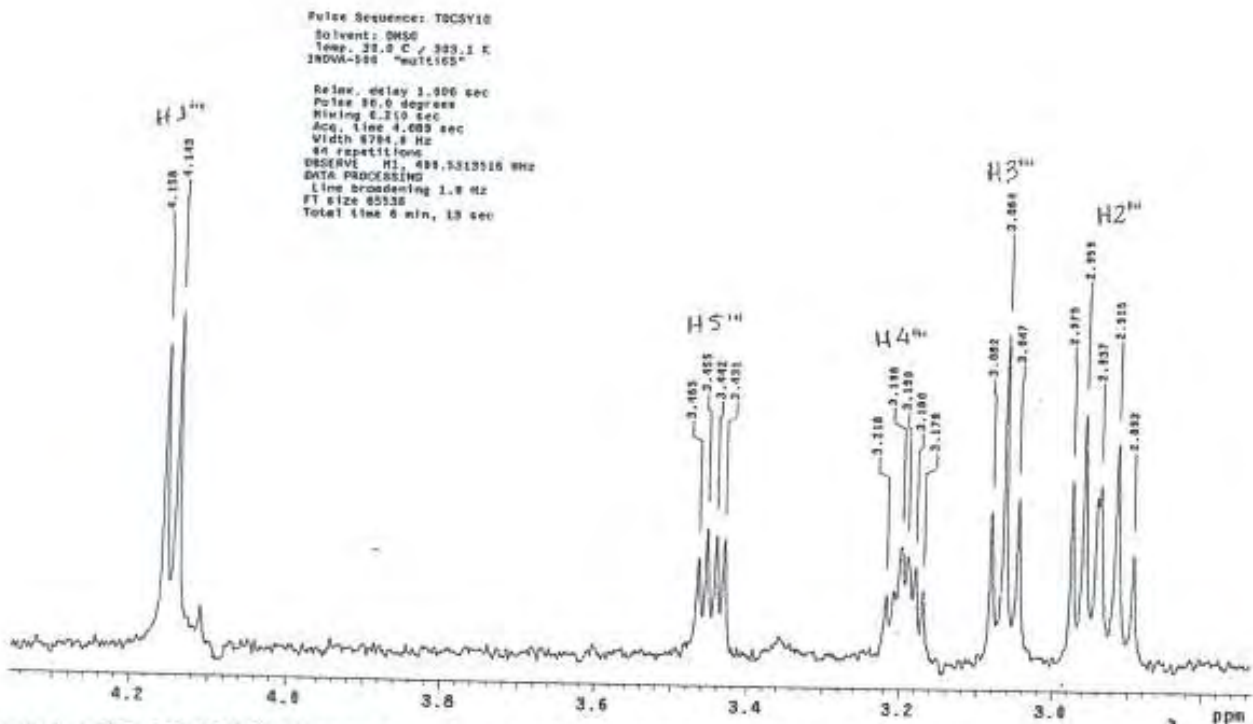
Espectro 18. 1D-NOESY da substância MC3 (DMSO- d_6 , 11,7 T).



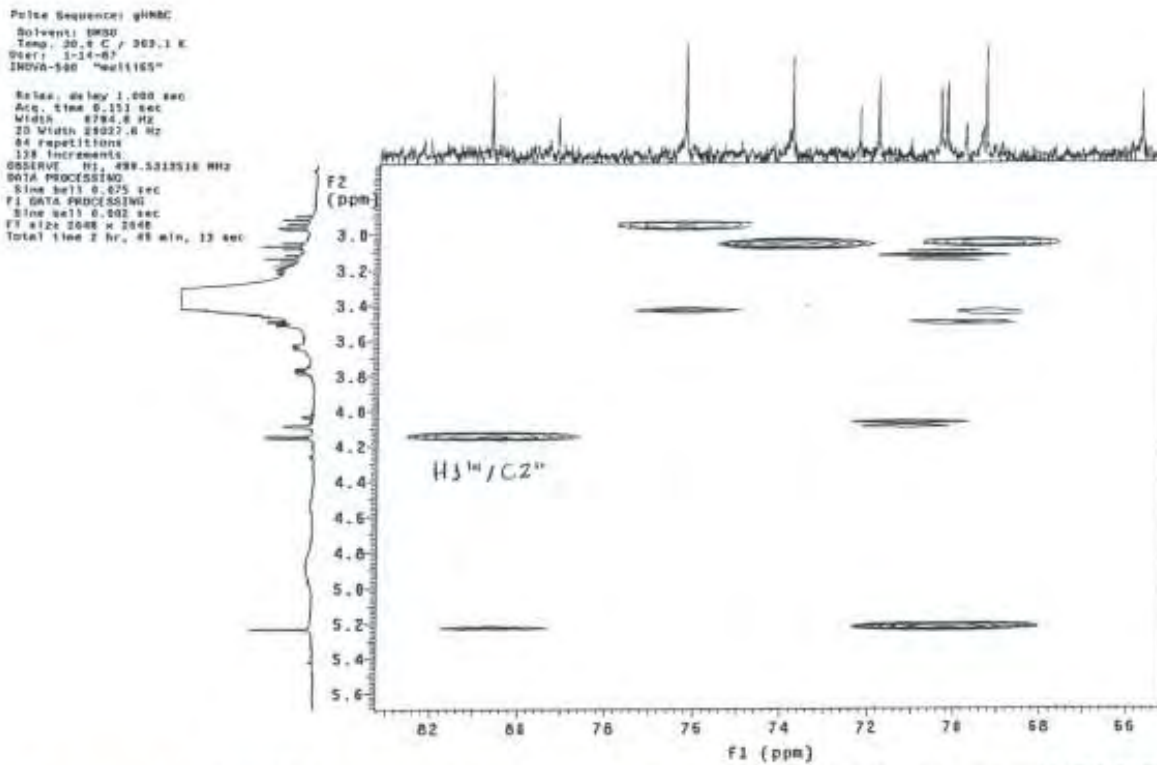




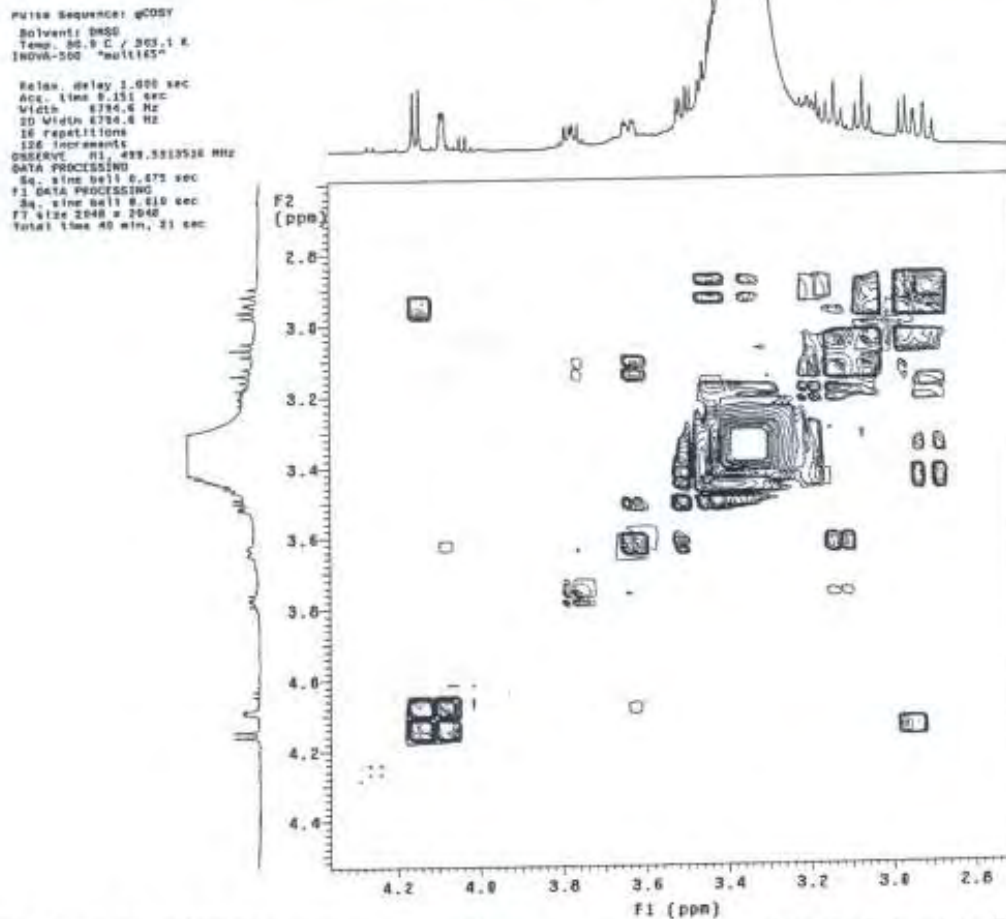
Espectro 21. 1D-TOCSY da rhamnose da substância MC4 - H1'' (δ 5,22) irradiado (DMSO- d_6 , 11,7 T).



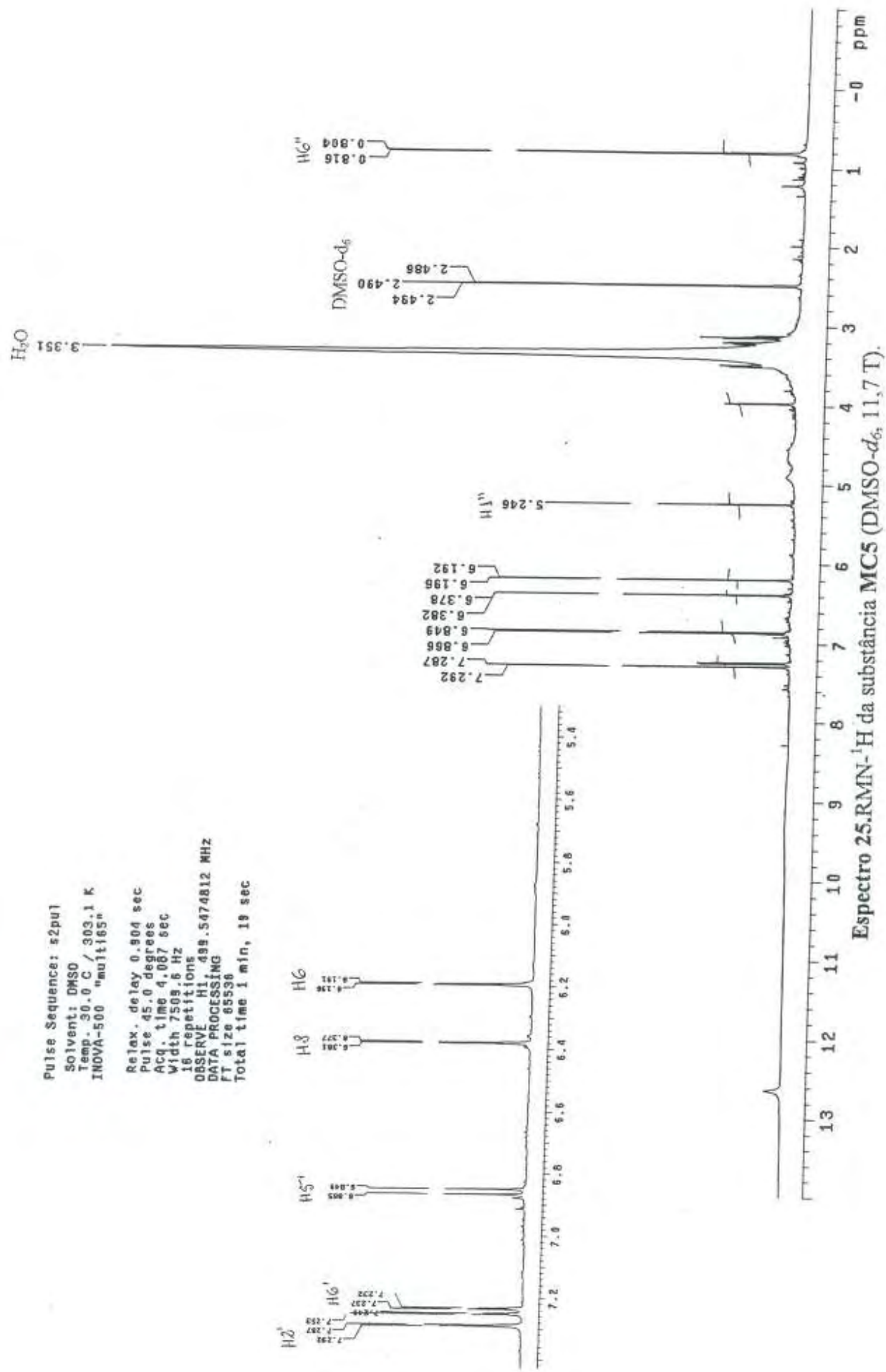
Espectro 22. 1D-TOCSY da xylose da substância MC4 - H1''' (δ 4,14) irradiado (DMSO- d_6 , 11,7 T).

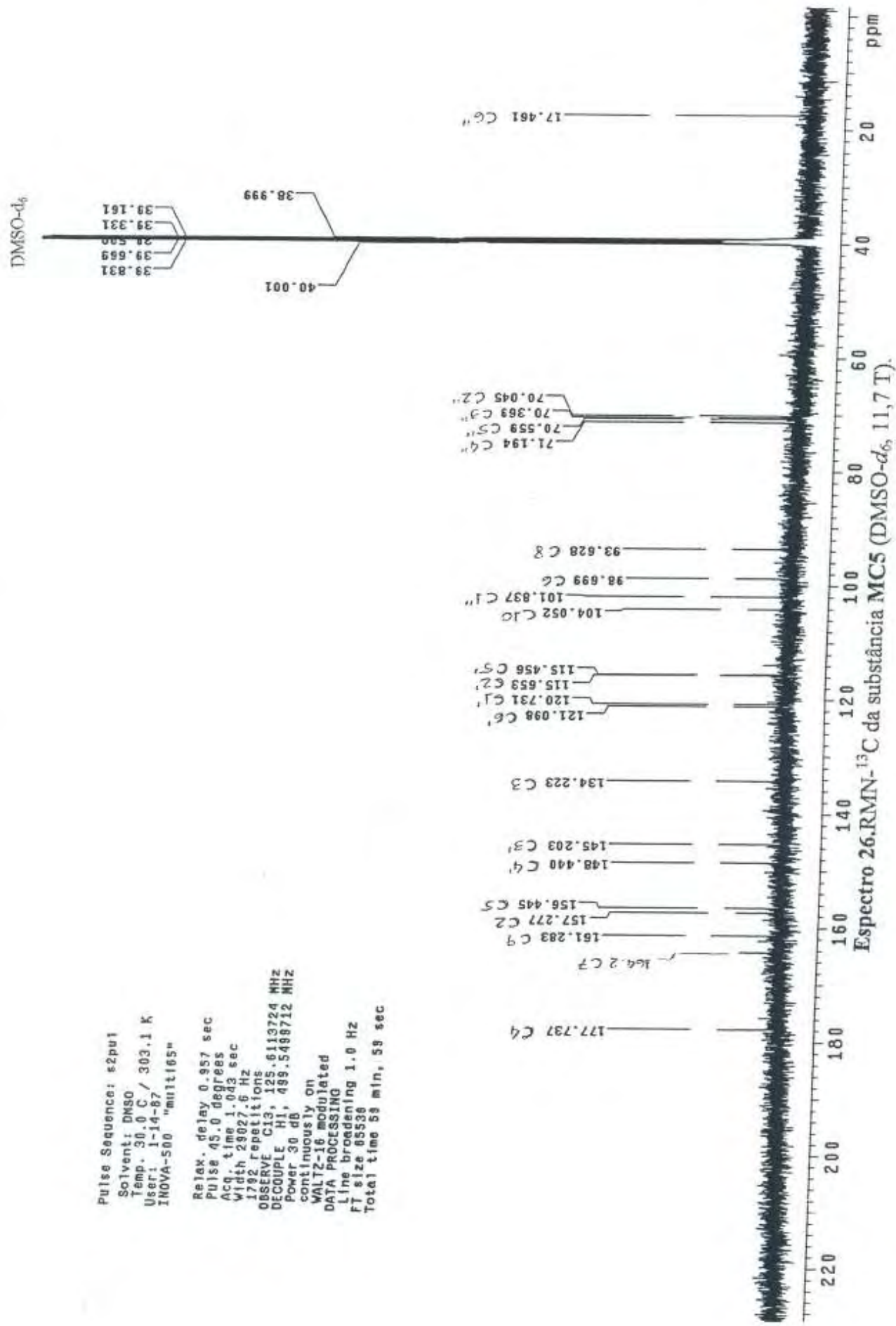


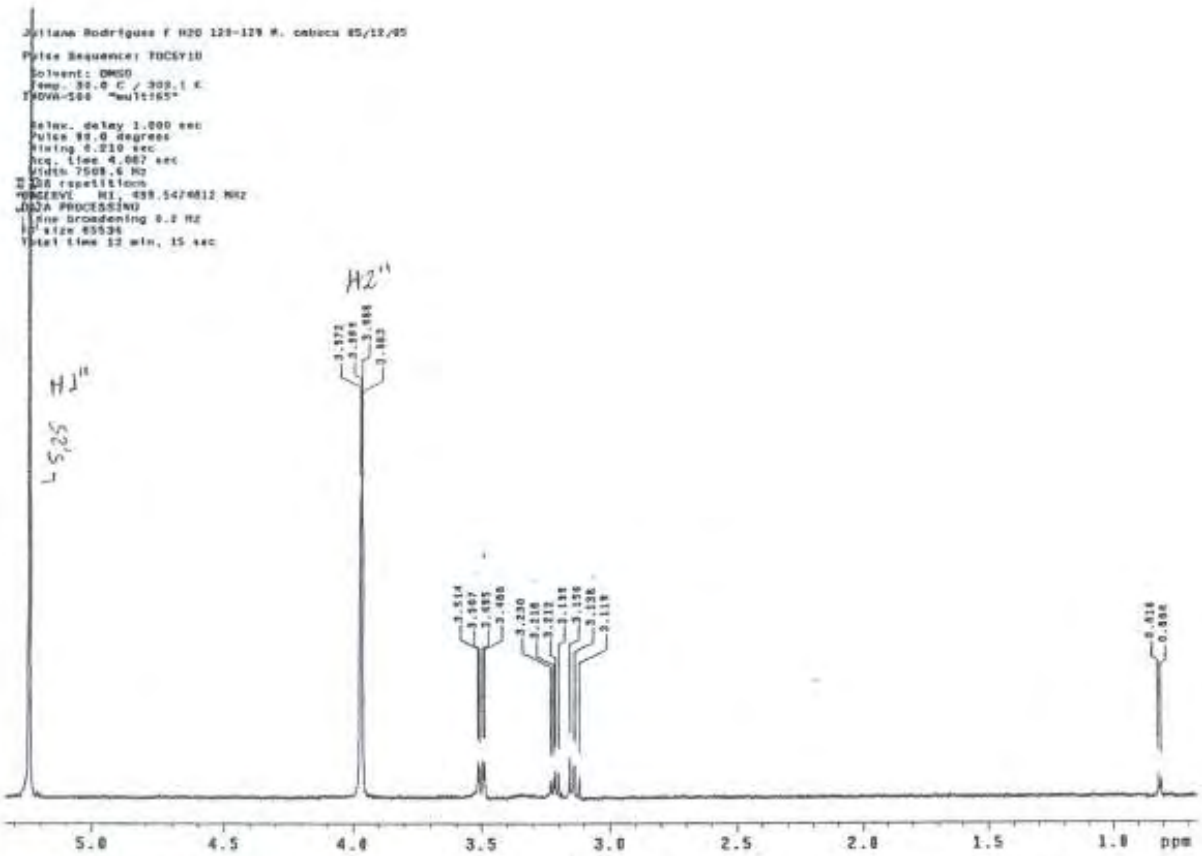
Espectro 23. gHMBC da substância MC4 – expansão nas regiões de 2,7 a 5,6 e 66 a 83 (DMSO- d_6 , 11,7 T).



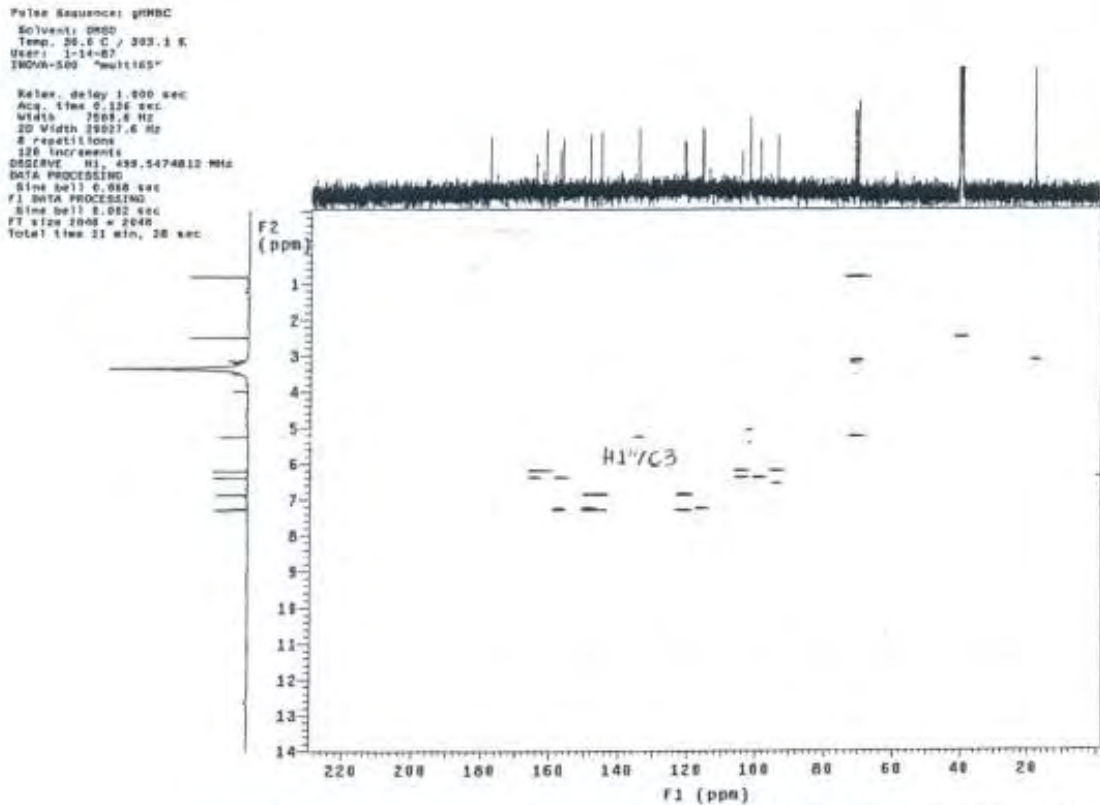
Espectro 24. COSY da substância MC4 – expansão na região de 2,6 a 4,5 (DMSO- d_6 , 11,7 T).







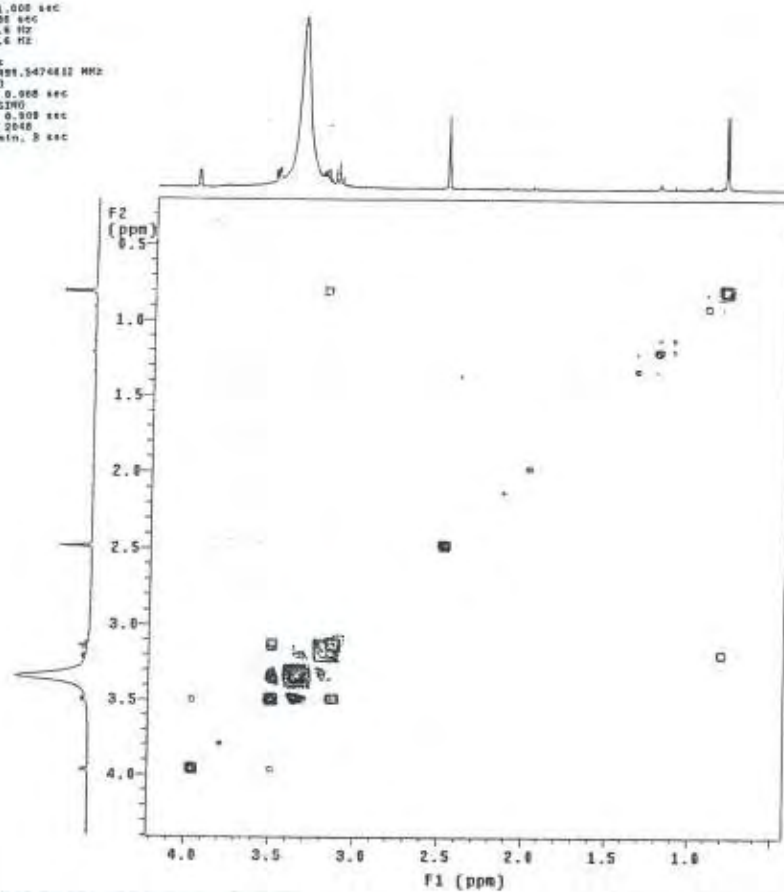
Espectro 27. 1D-TOCSY da rhamnose da substância MC5 - H1" (δ 5,25) irradiado (DMSO- d_6 , 11,7 T).



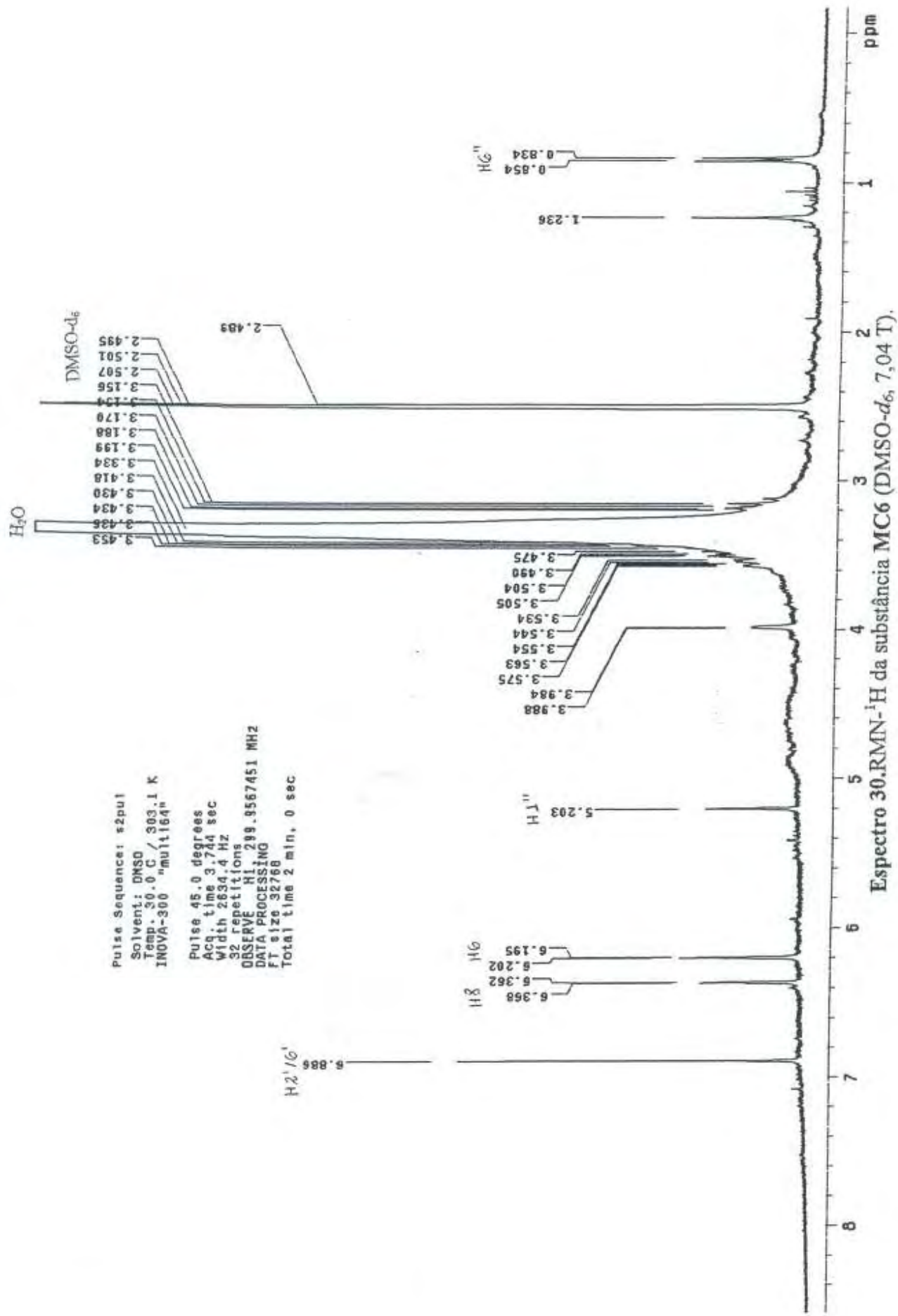
Espectro 28. gHMBC da substância MC5 (DMSO- d_6 , 11,7 T).

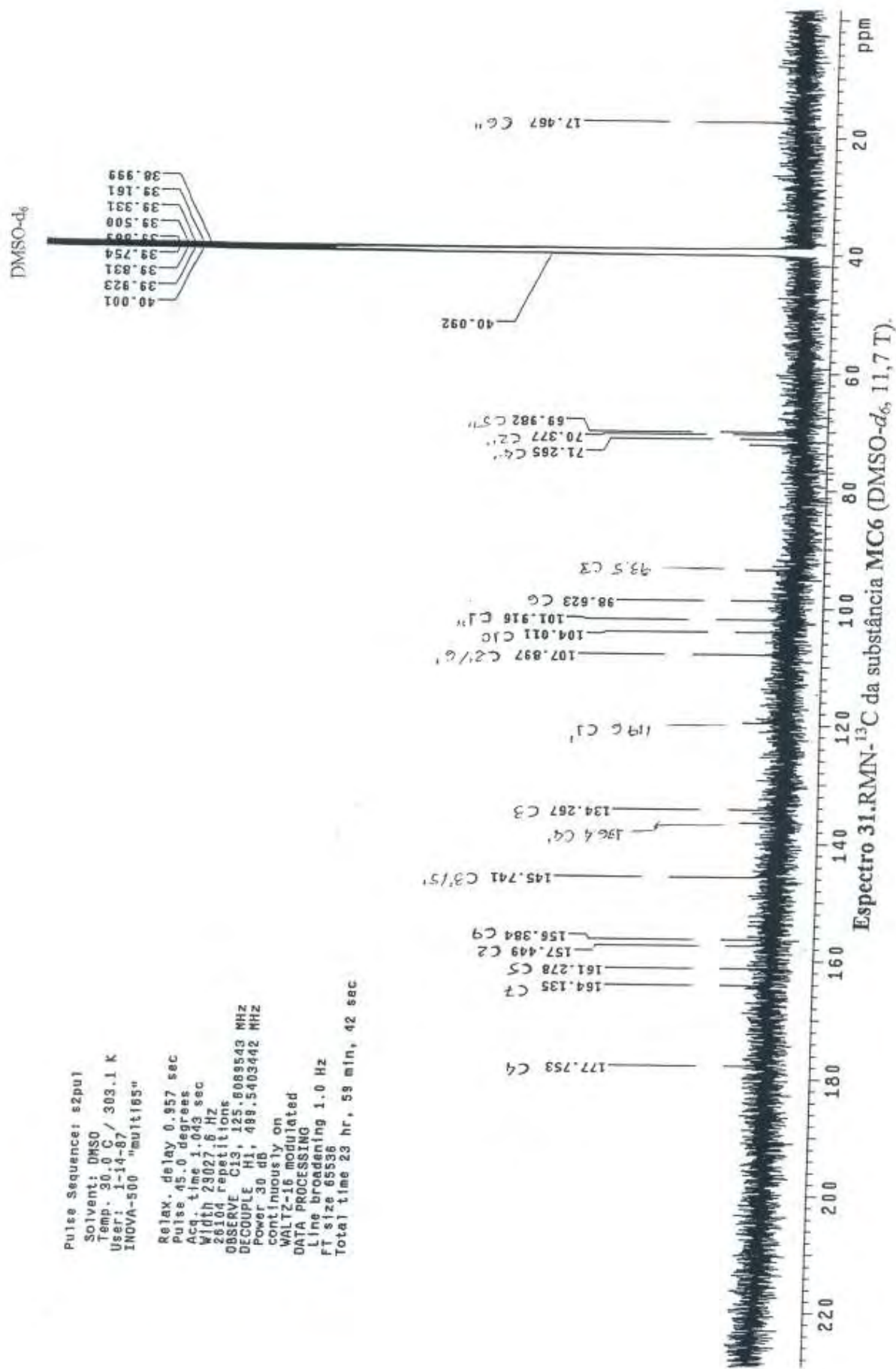
Pulse Sequence: gCDEY
Solvent: DMSO
Temp. 30.0 C / 293.1 K
P80VA-350 "multis" "

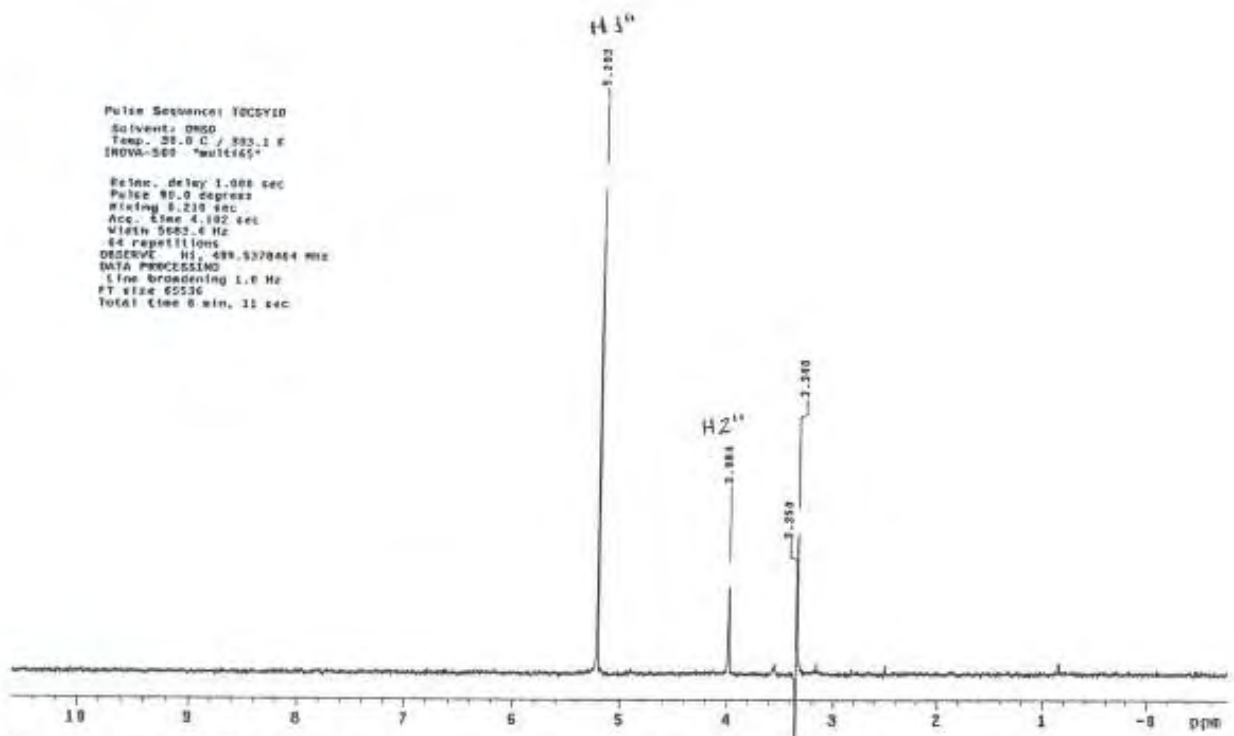
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 2.150 sec
Width 7500.0 Hz
2D Width 7500.0 Hz
8 repetitions
128 increments
OBSERVE F1, 499.9474810 MHz
DATA PROCESSING
Sf. time bc11 0.000 sec
F1 DATA PROCESSING
Sf. time bc11 0.000 sec
FT size 2048 x 2048
Total time 20 min. 8 sec



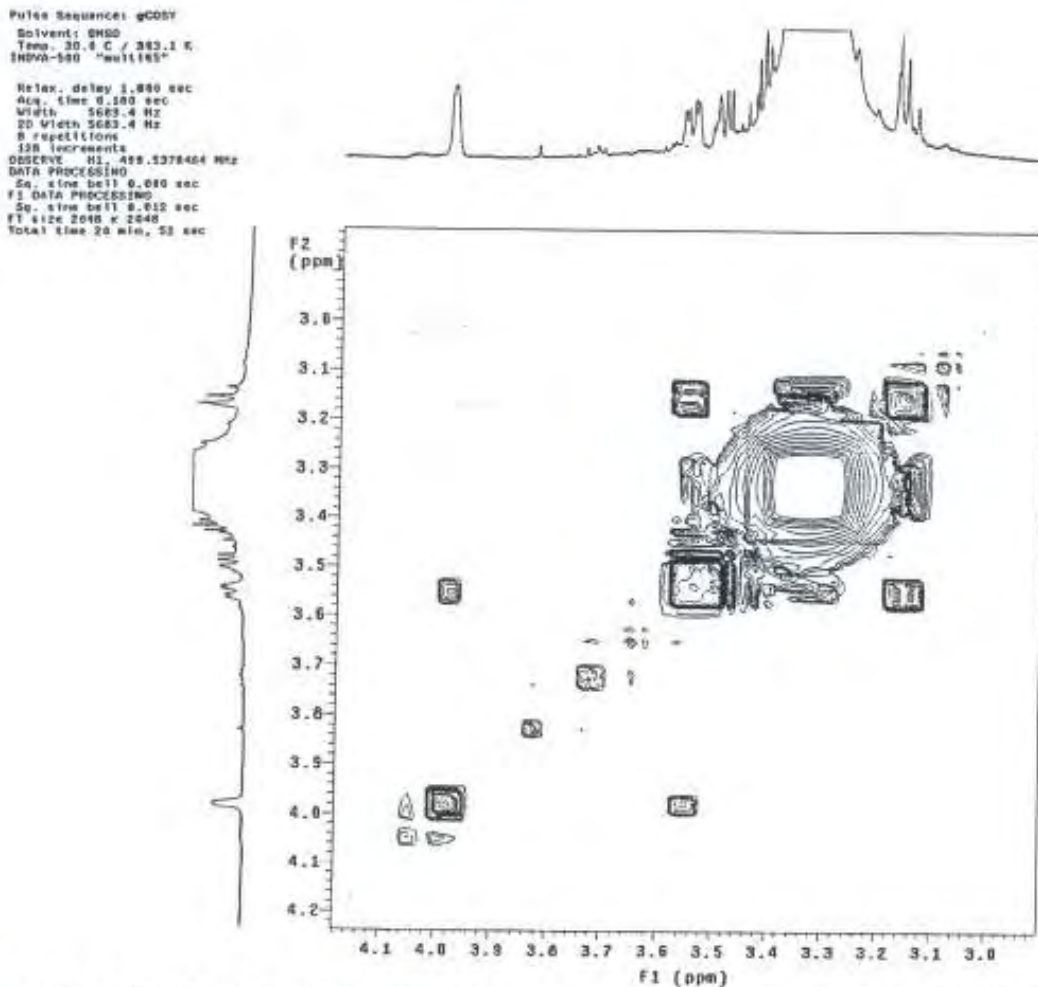
Espectro 29. COSY da substância MC5 – expansão na região de 0,5 a 4,3 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).



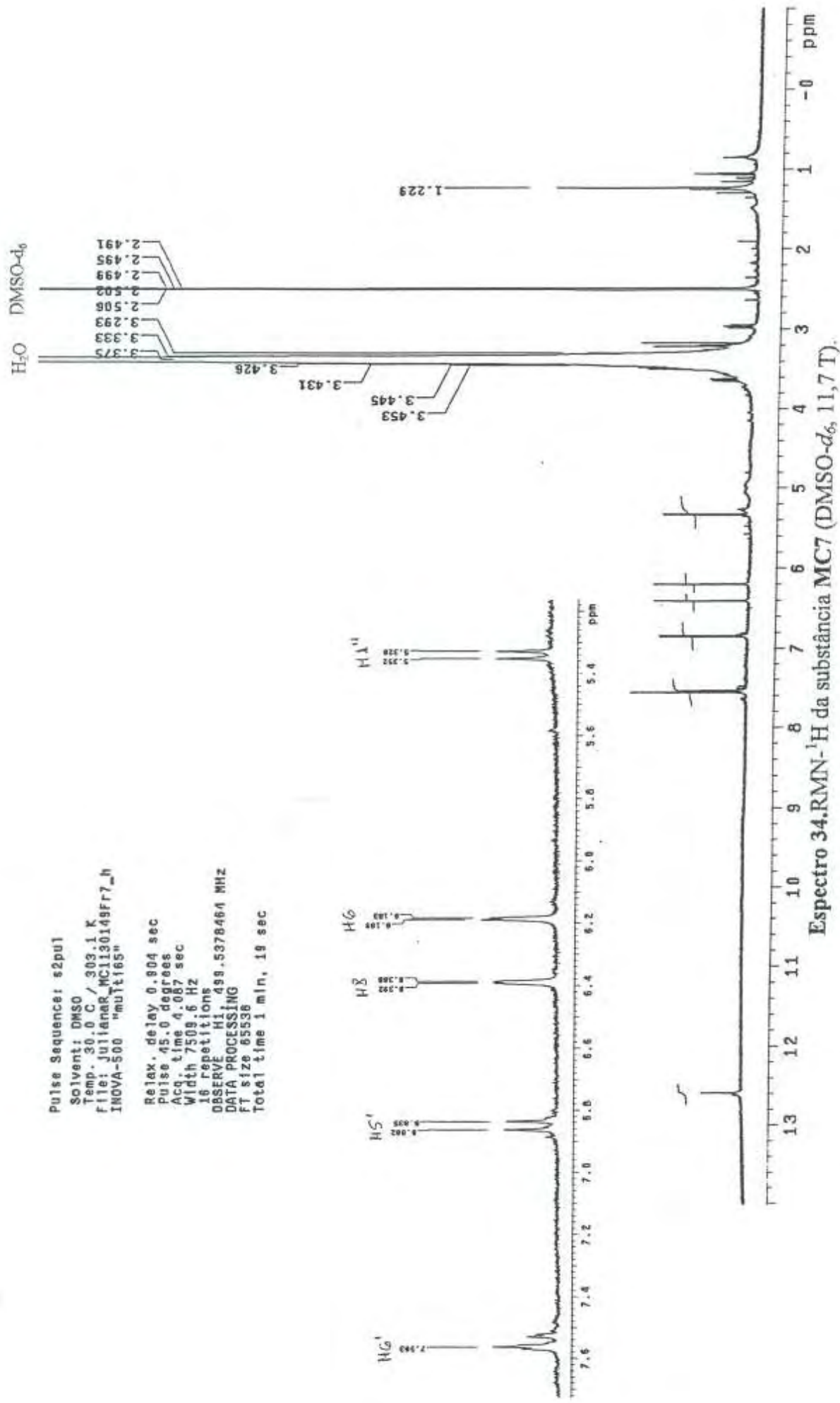




Espectro 32. 1D-TOCSY da rhamnose da substância MC6 – H1'' (δ 5,20) irradiado (DMSO- d_6 , 11,7 T).

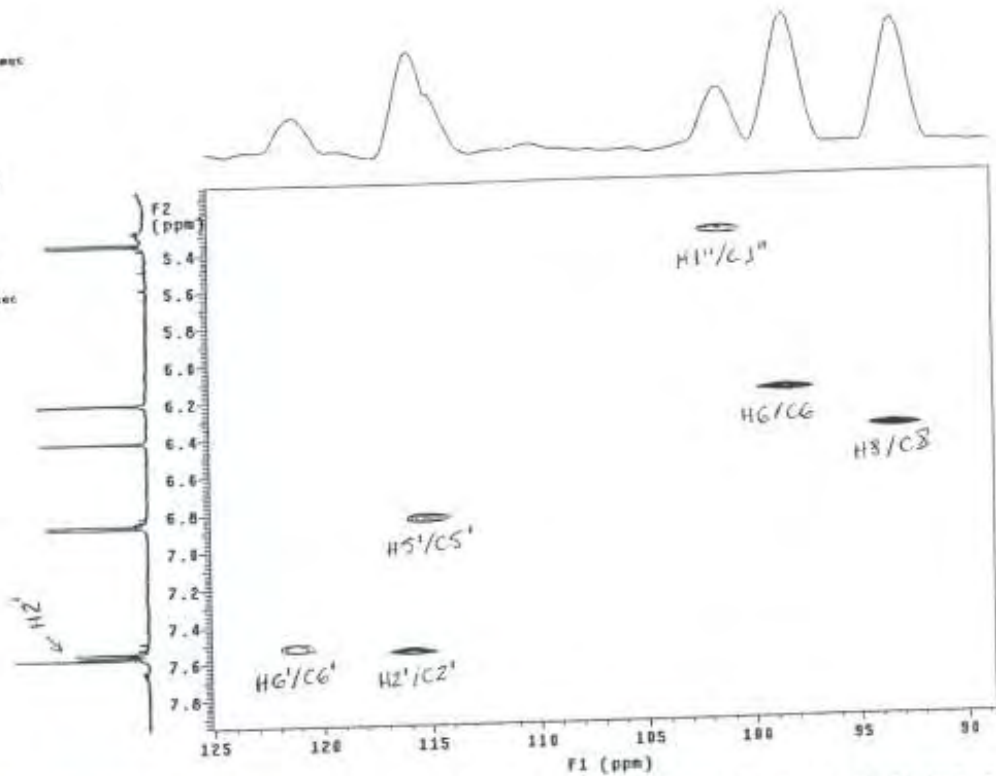


Espectro 33. COSY da substância MC6 – expansão na região de 2,9 a 4,2 (DMSO- d_6 , 11,7 T).



Pulse Sequence: gHMQC
 Solvent: DMSO
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 File: juliana_MC1130149r7_ghmqc
 INOVA-500 "mult165"

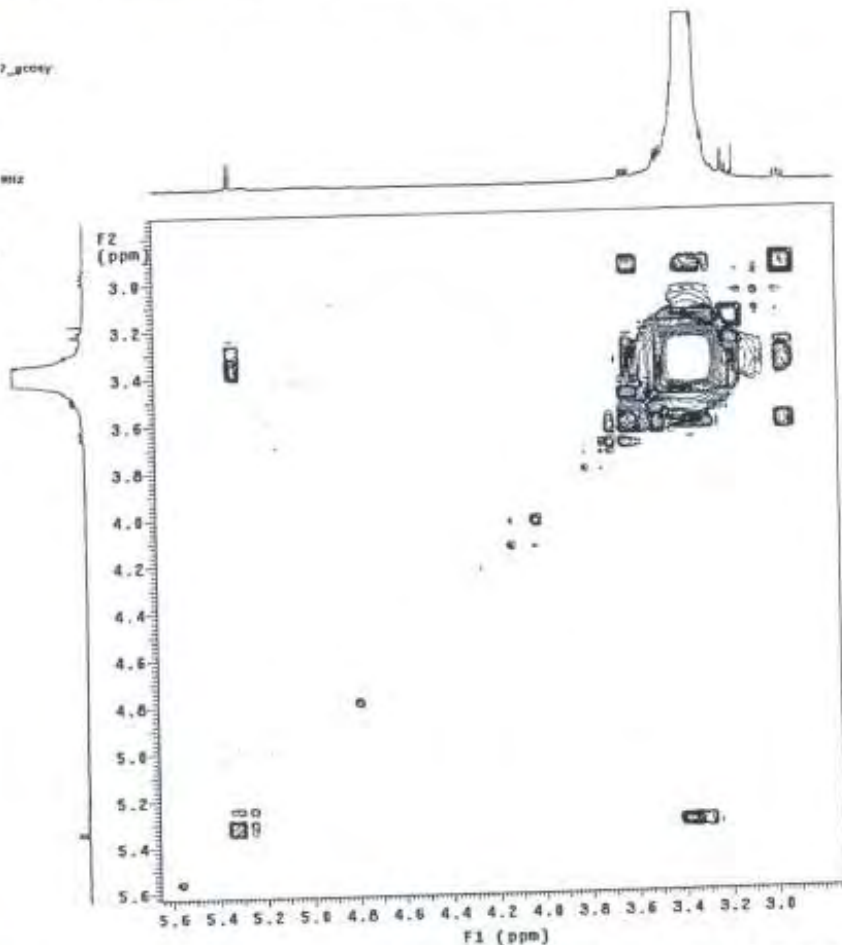
Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.130 sec
 Width 7509.6 Hz
 2D Width 28037.6 Hz
 16 repetitions
 2 x 120 increments
 OBSERVE H1, 499.5370404 MHz
 DECOUPLE C13, 125.9139428 MHz
 Power 47 dB
 on during acquisition
 off during delay
 GASP: j modulated
 SOYA PROCESSING
 Gauss apodization 0.003 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Gauss apodization 0.003 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 1 hr, 21 min, 51 sec



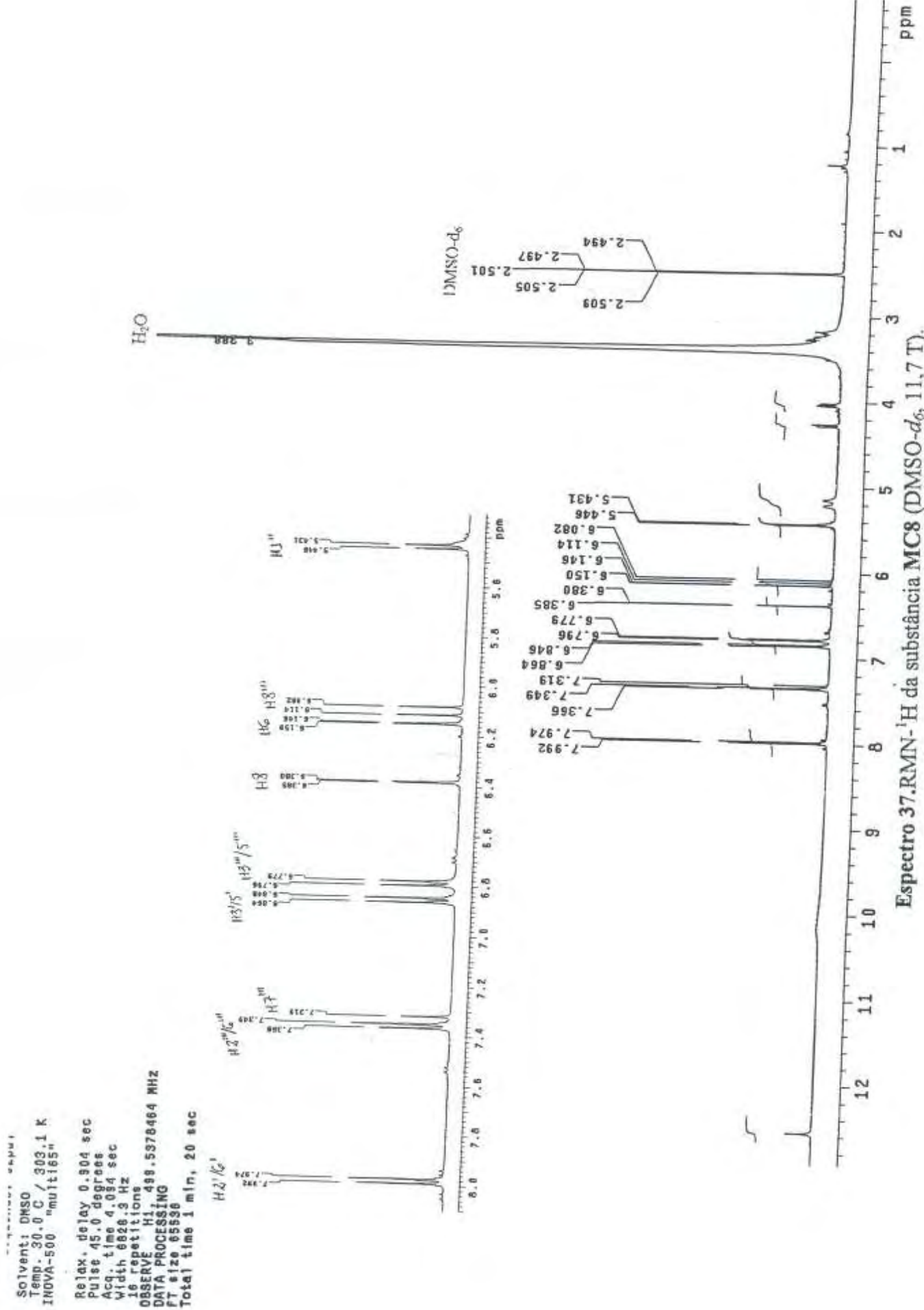
Espectro 35. gHMQC da substância MC7 – expansão nas regiões de 5,3 a 7,8 e 90 a 125 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).

Pulse Sequence: gCOSY
 Solvent: DMSO
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 File: juliana_MC1130149r7_gcosy
 INOVA-500 "mult165"

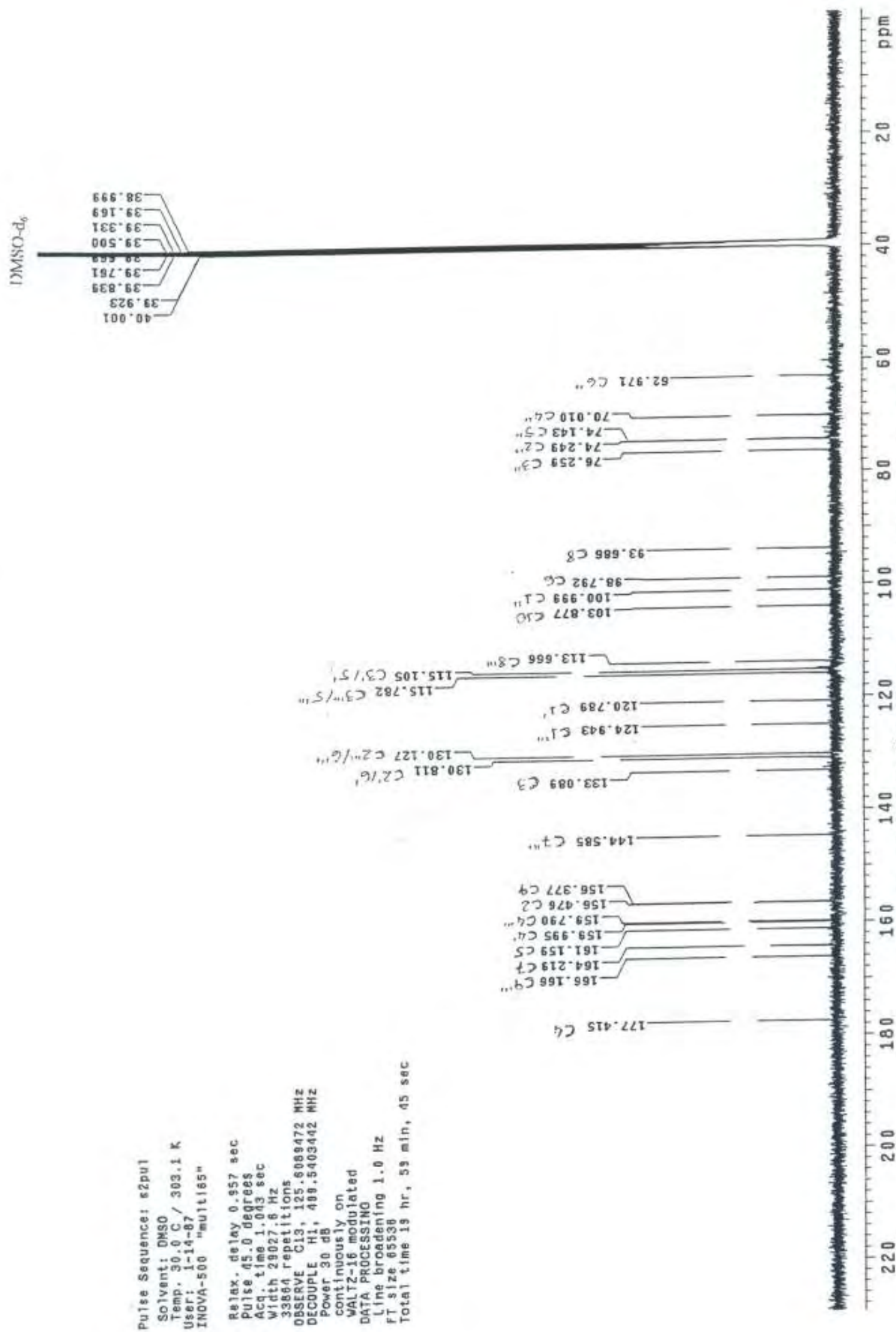
Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.130 sec
 Width 7509.6 Hz
 2D Width 7509.6 Hz
 16 repetitions
 120 increments
 OBSERVE H1, 499.5370404 MHz
 DATA PROCESSING
 Gv. time 0.011 0.008 sec
 F1 DATA PROCESSING
 Gv. time 0.011 0.008 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 30 min, 49 sec



Espectro 36. COSY da substância MC7 – expansão na região de 2,8 a 5,6 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).



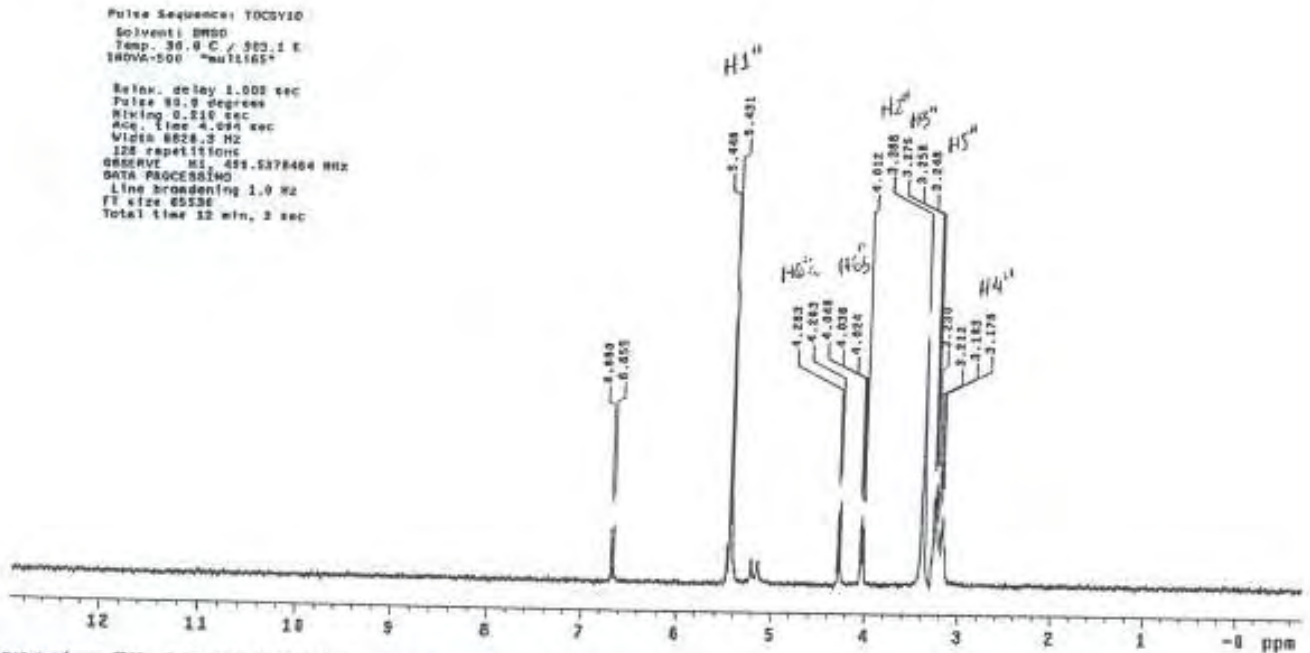
Espectro 37.RMN-¹H da substância MC8 (DMSO-d₆, 11,7 T).



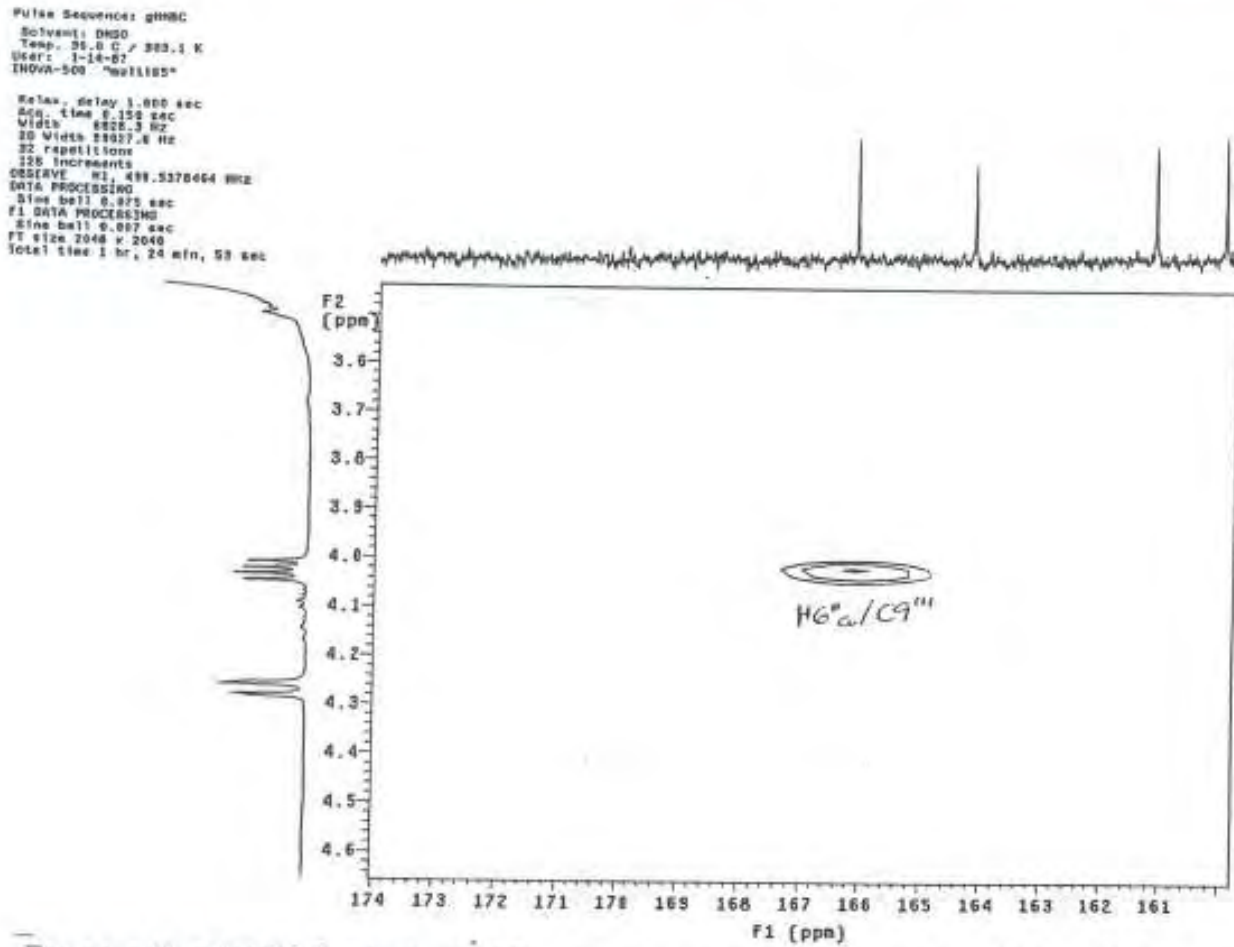
Espectro 38.RMN-¹³C da substância MC8 (DMSO-d₆, 11,7 T).

Pulse Sequence: e2pul
 Solvent: DMSO
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 User: 1-14-07
 INOVA-500 "mult155"

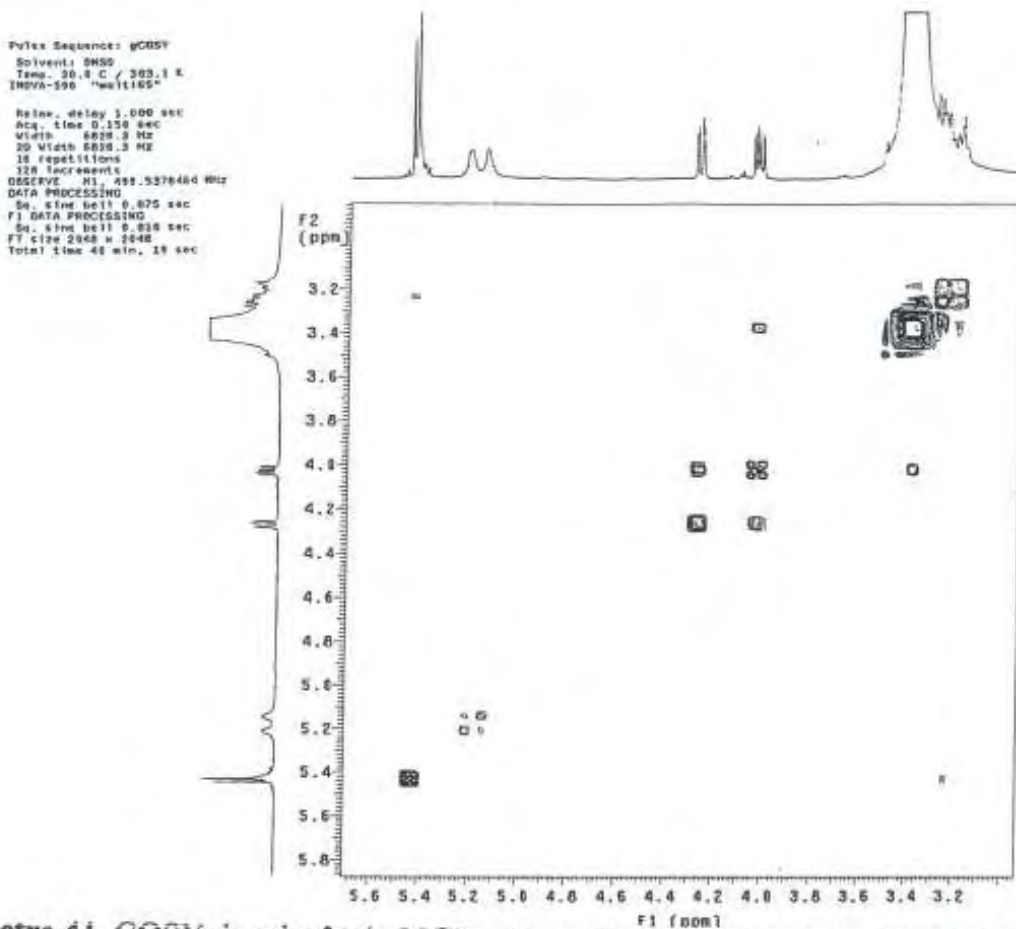
Relax. delay 0.957 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq time 1.083 sec
 Width 23027.6 Hz
 32864 repetitions
 OBSERVE C13, 125.6089472 MHz
 DECOUPLE H1, 499.5403442 MHz
 Power 30 dB
 continuously on
 WALTZ-16 modulated
 DATA PROCESSING
 Line broadening 1.0 Hz
 FT size 65536
 Total time 19 hr, 59 min, 45 sec



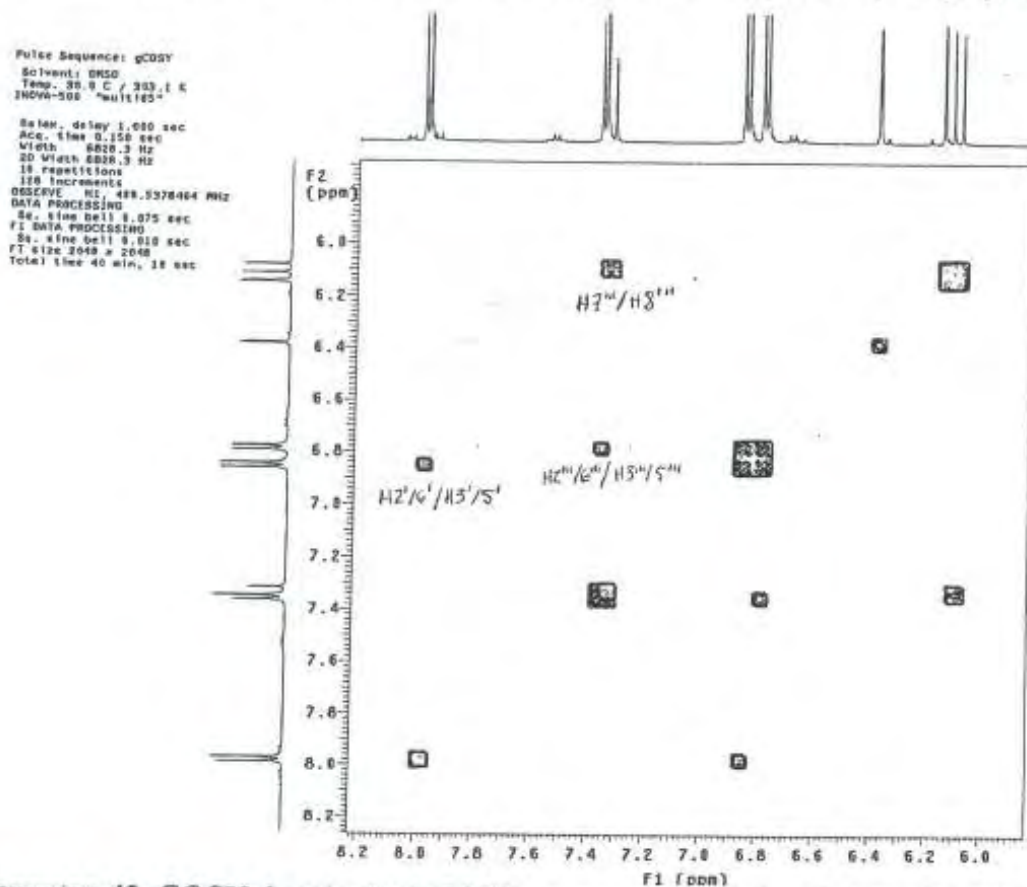
Espectro 39. 1D-TOCSY da glicose da substância MCS – H1'' (δ 5,45) irradiado (DMSO- d_6 , 11,7 T).



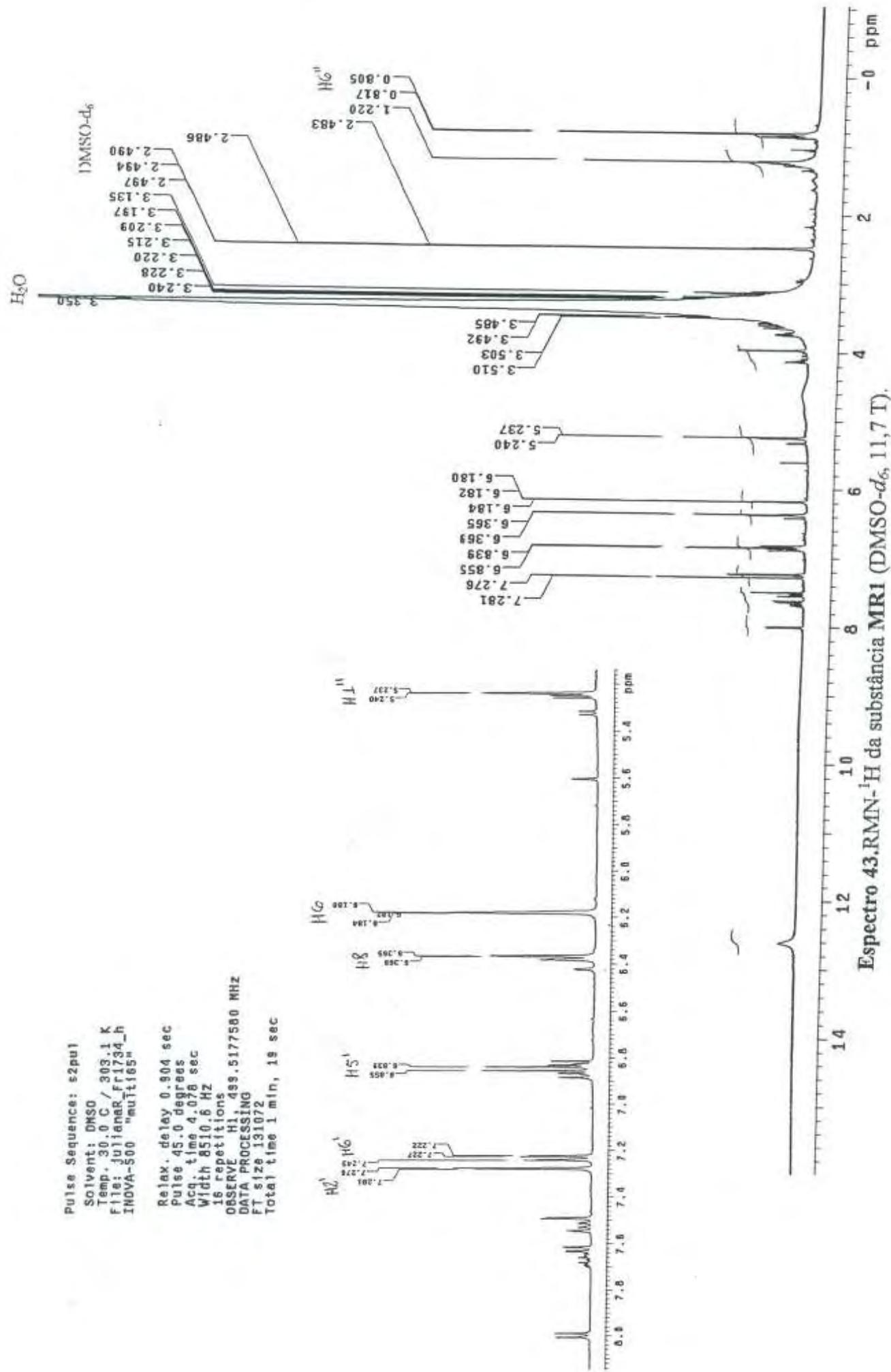
Espectro 40. gHMBC da substância MCS – expansão nas regiões de 3,5 a 4,6 e 160 a 174 (DMSO- d_6 , 11,7 T).



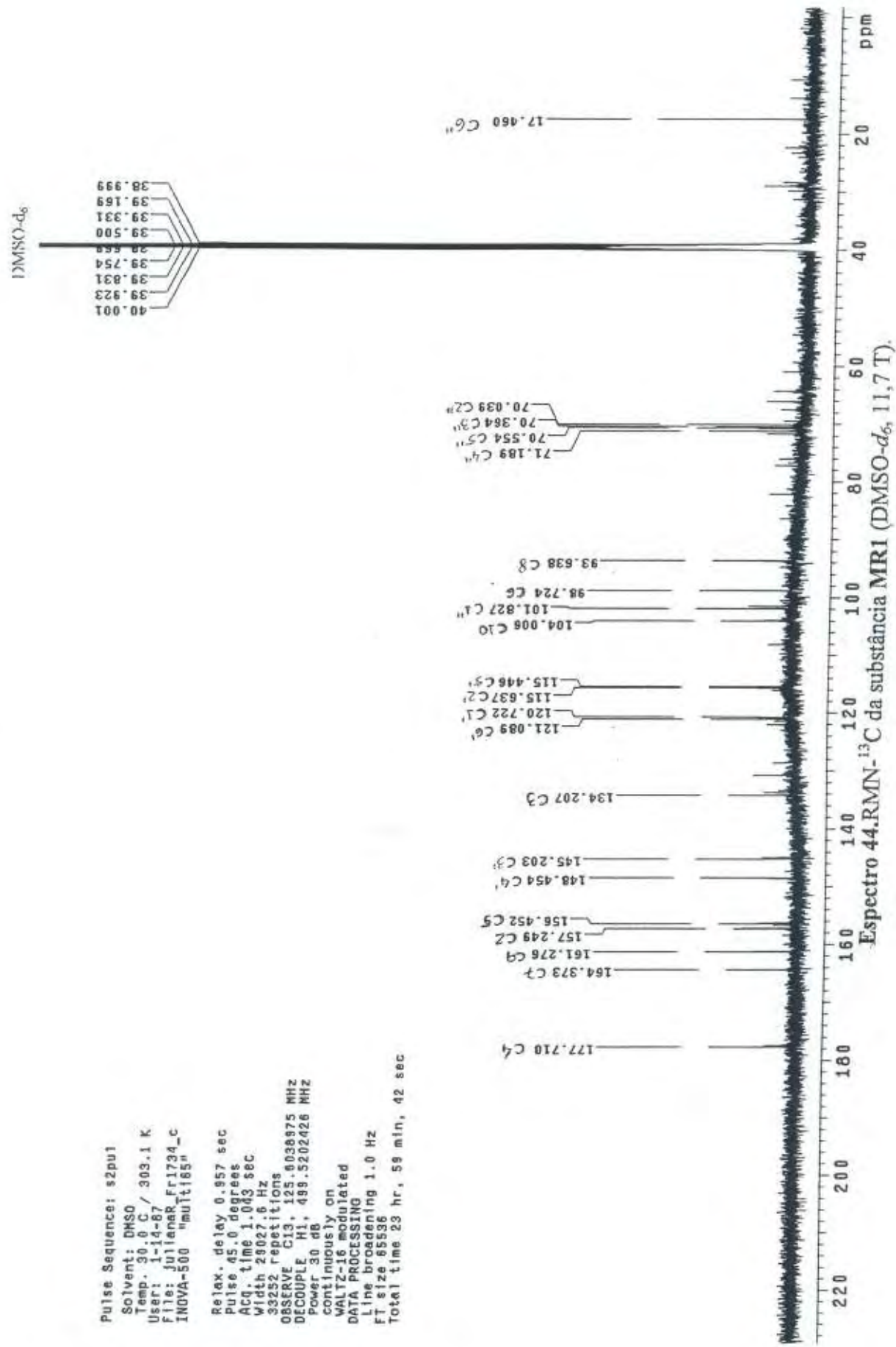
Espectro 41. COSY da substância MC8 – expansão na região de 3,0 a 5,8 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).

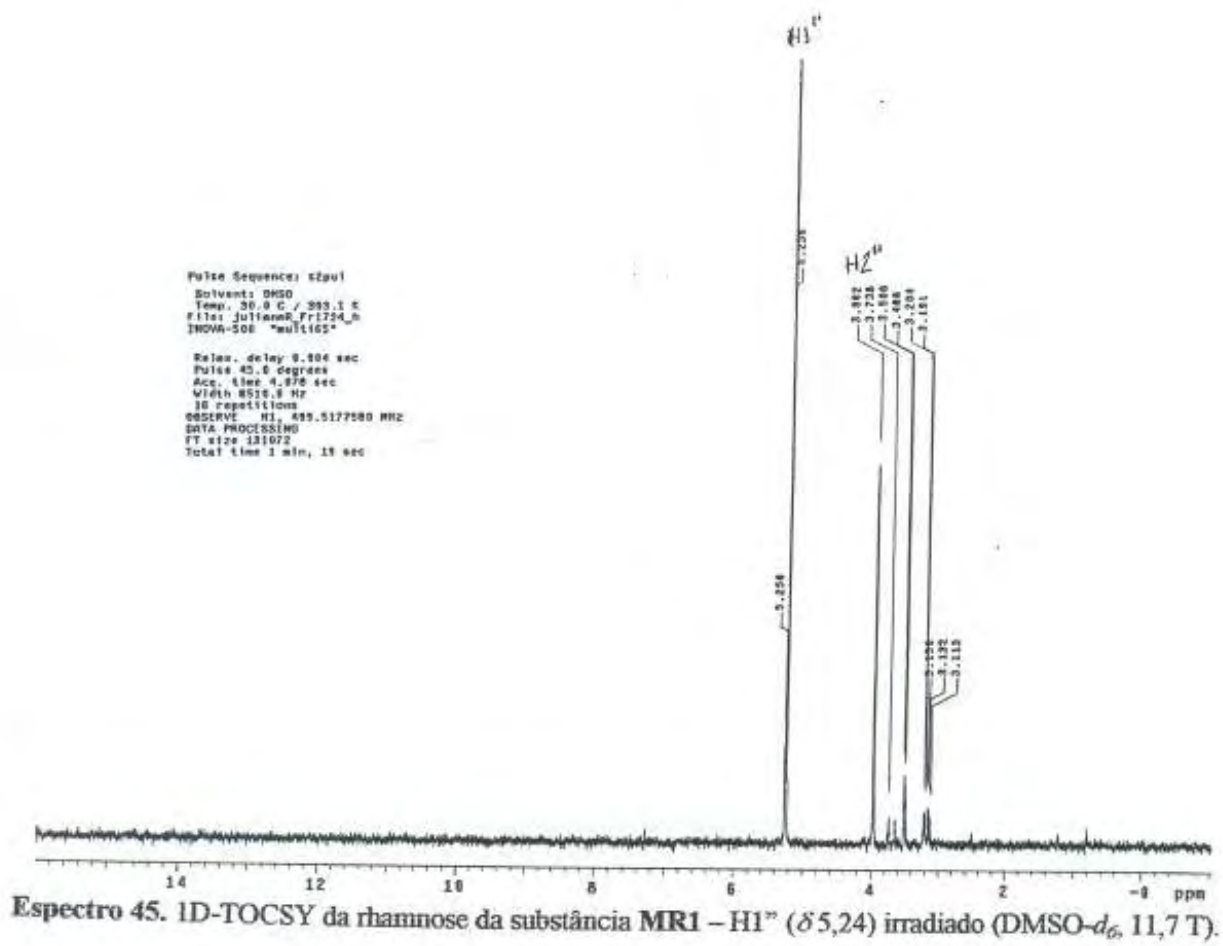


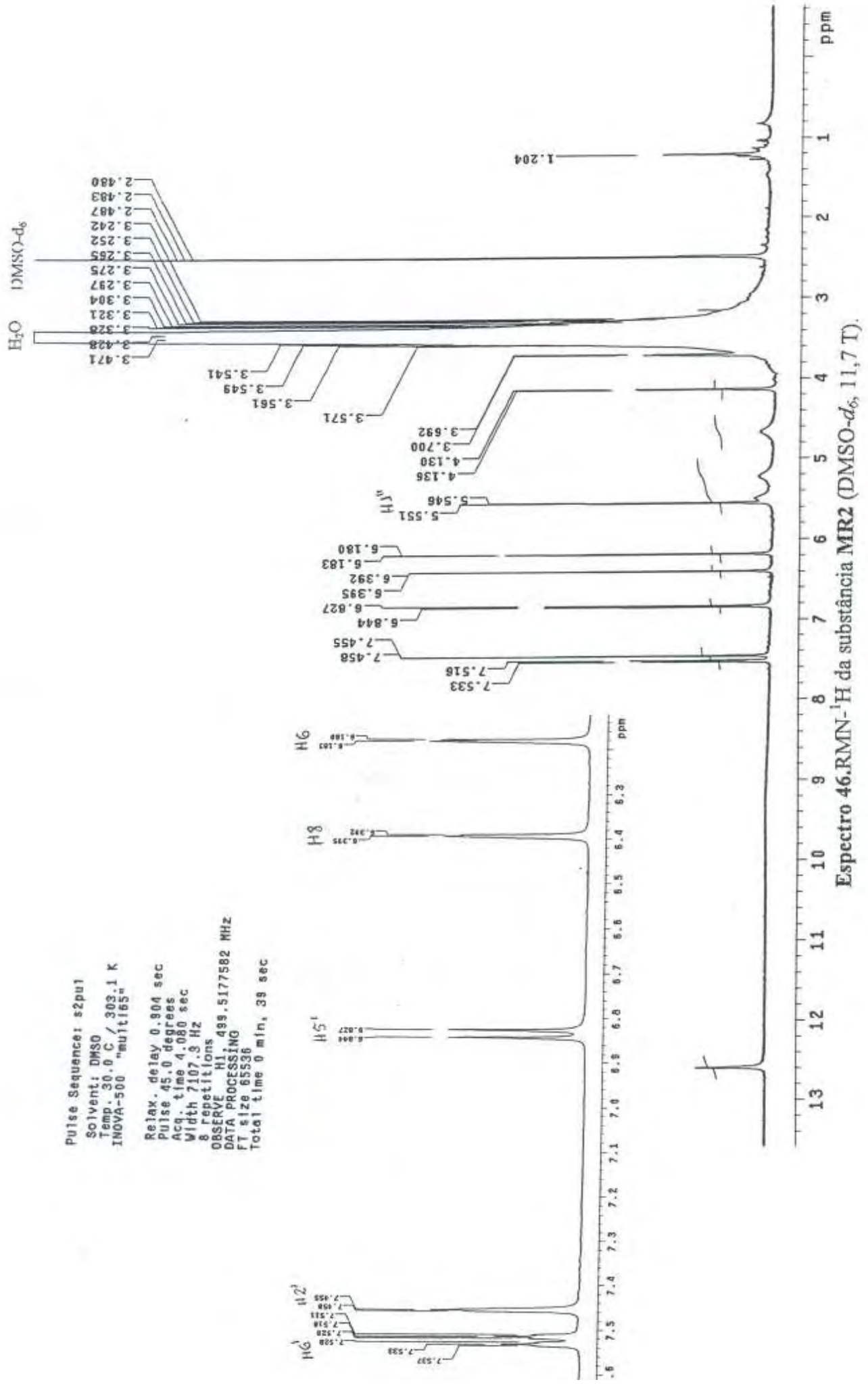
Espectro 42. COSY da substância MC8 – expansão na região de 5,8 a 8,2 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).



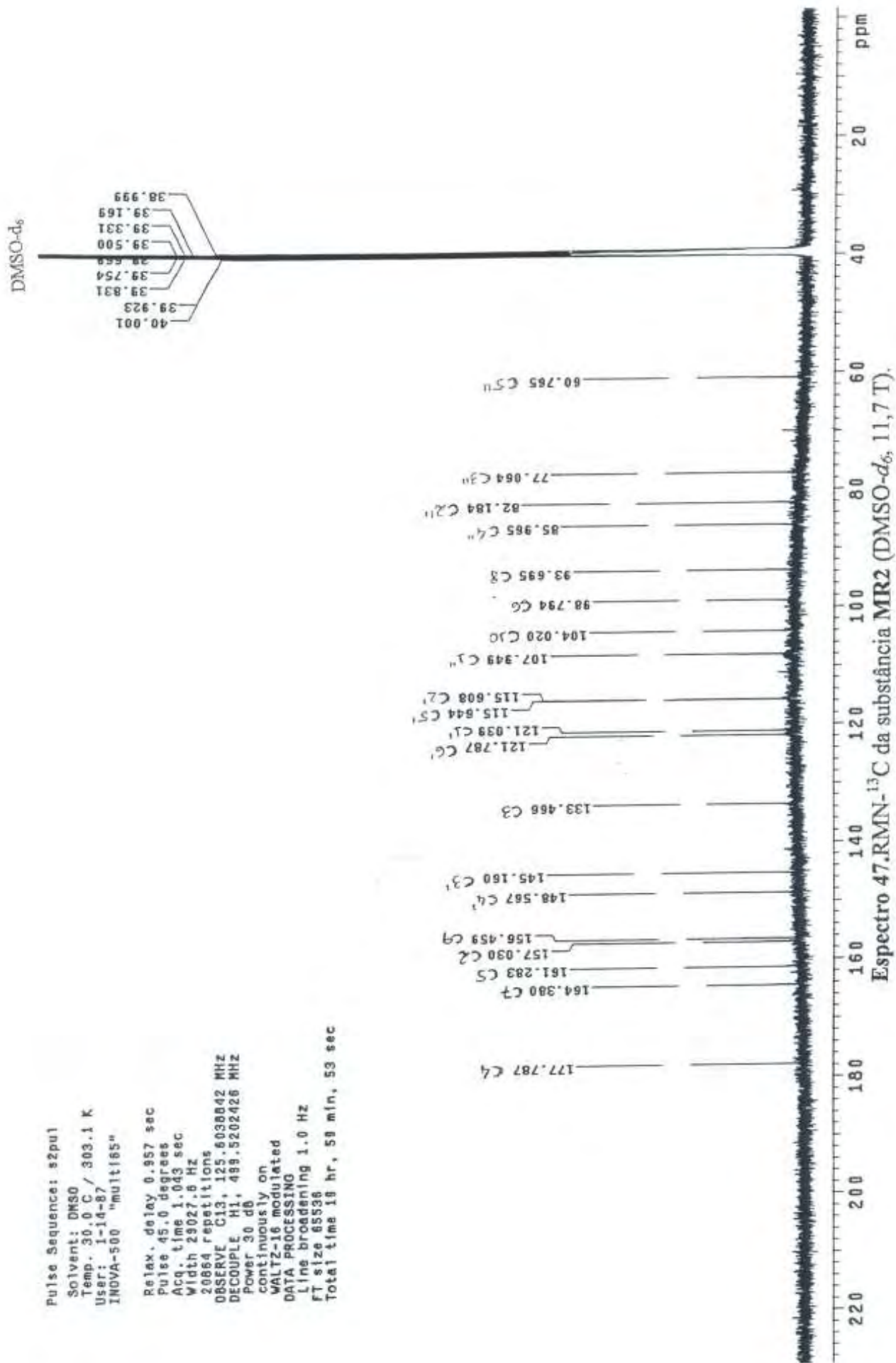
Espectro 43.RMN-¹H da substância MRI (DMSO-d₆, 11,7 T).

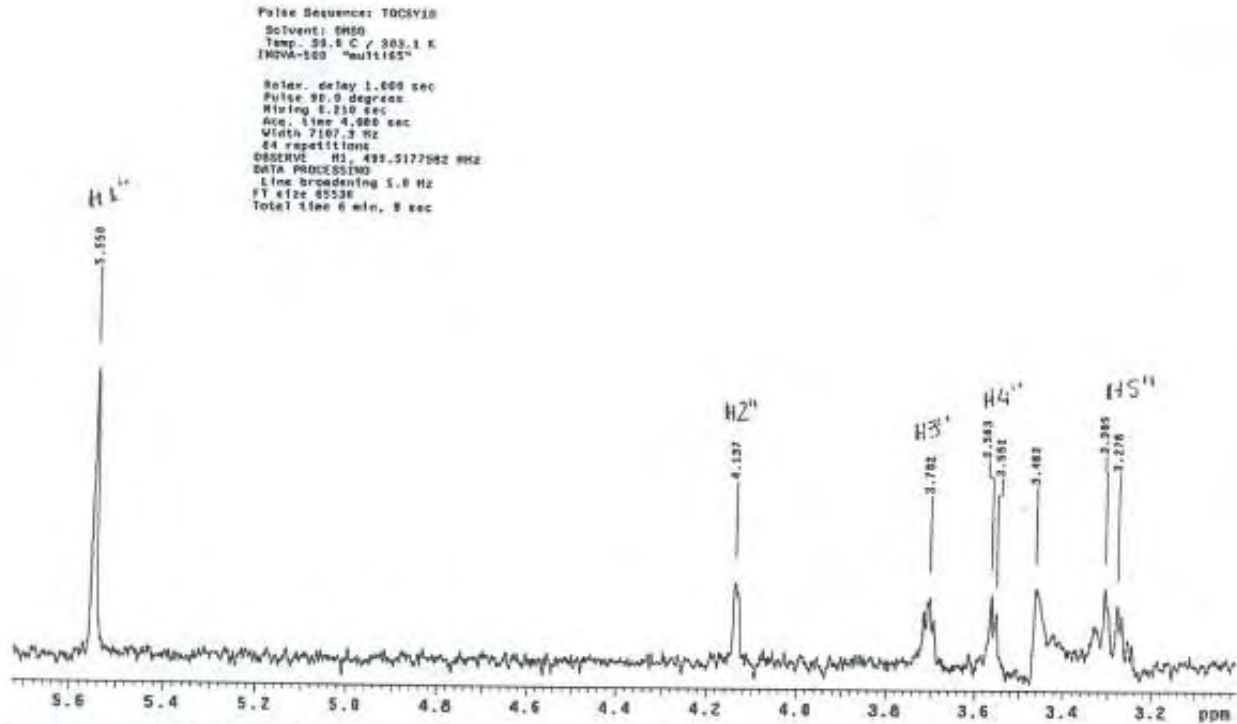




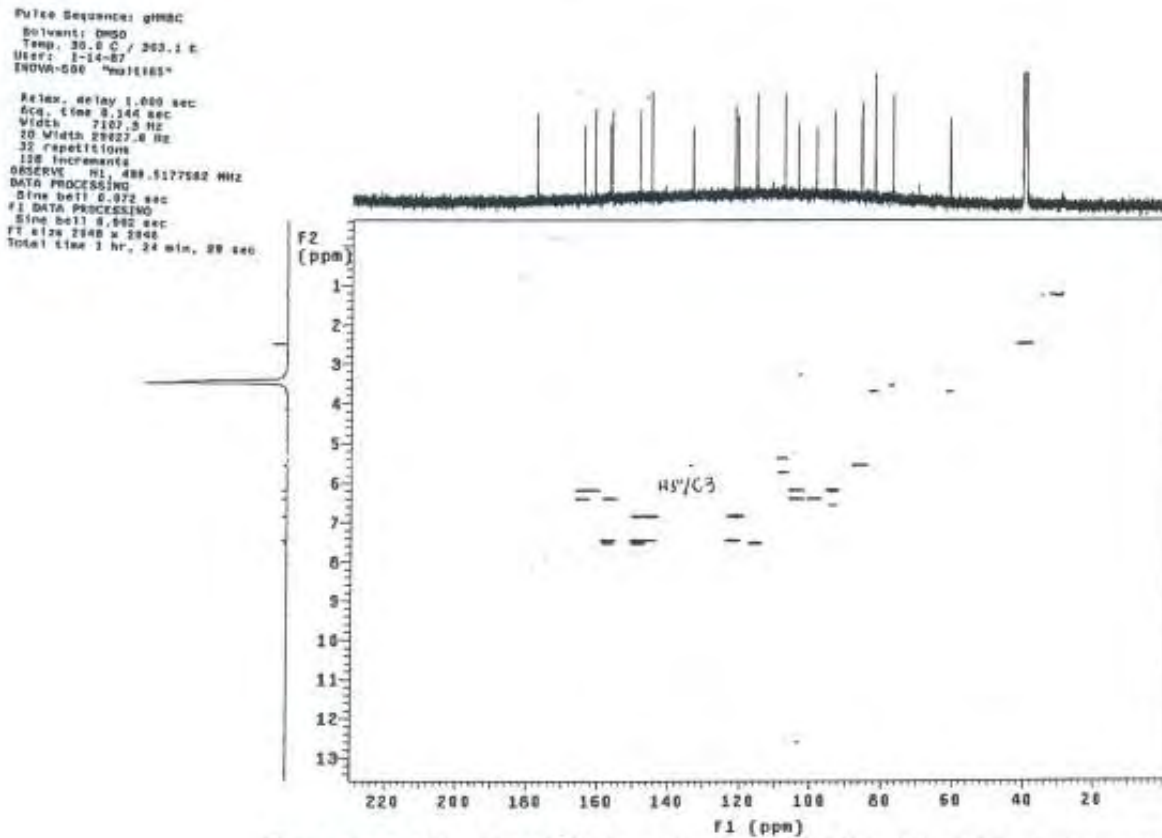


Espectro 46.RMN¹-H da substância MR2 (DMSO-d₆, 11,7 T).



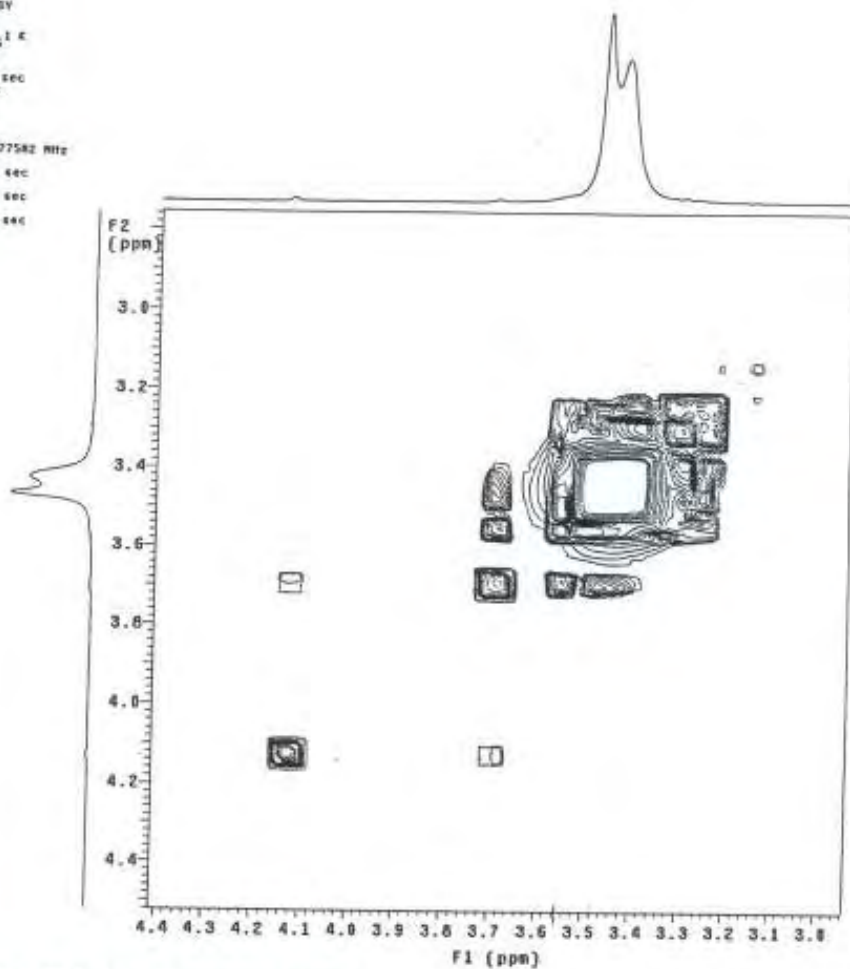


Espectro 48. 1D-TOCSY da arabinofuranose da substância MR2 – H1' (δ 5,55) irradiado (DMSO- d_6 , 11,7 T).

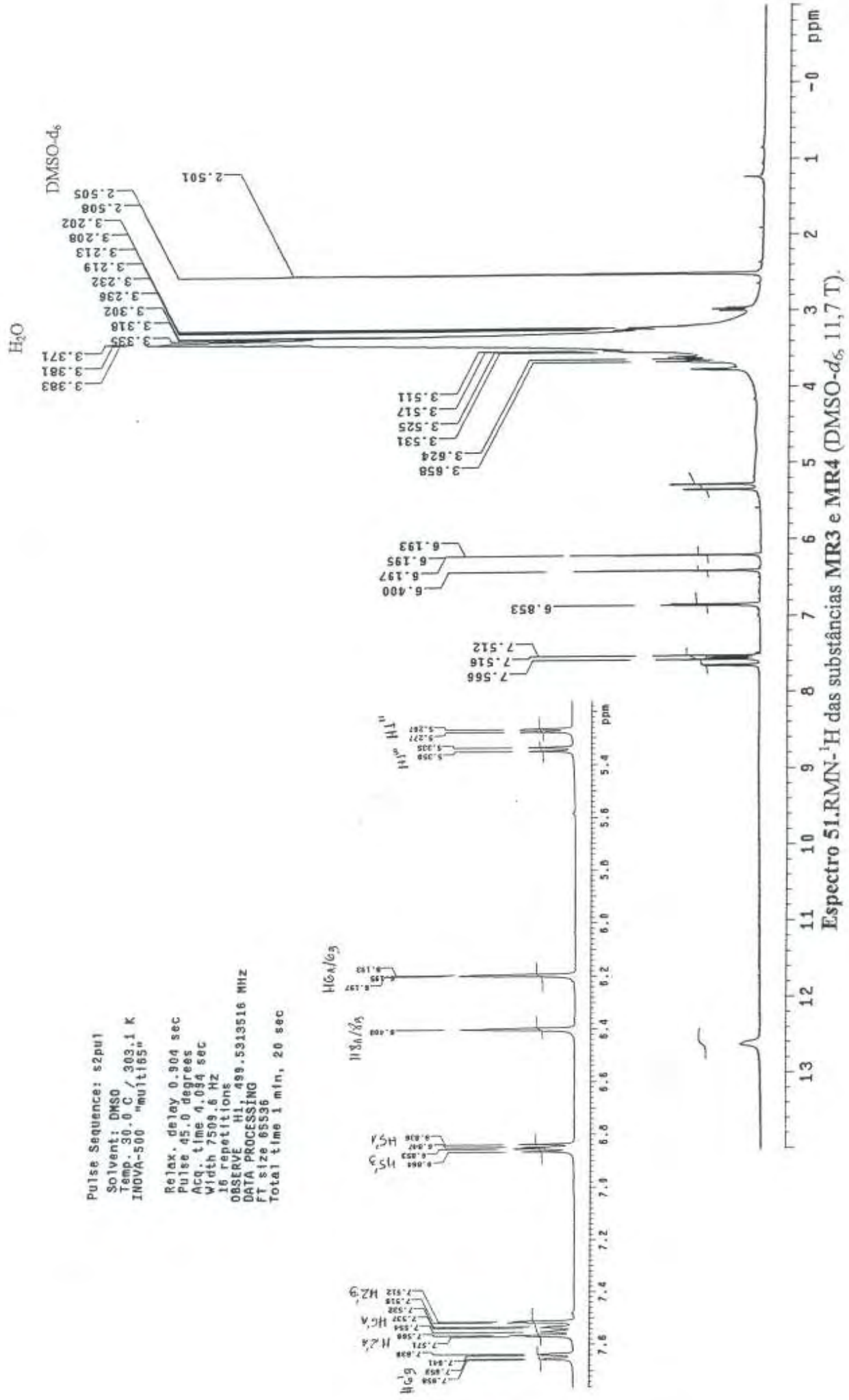


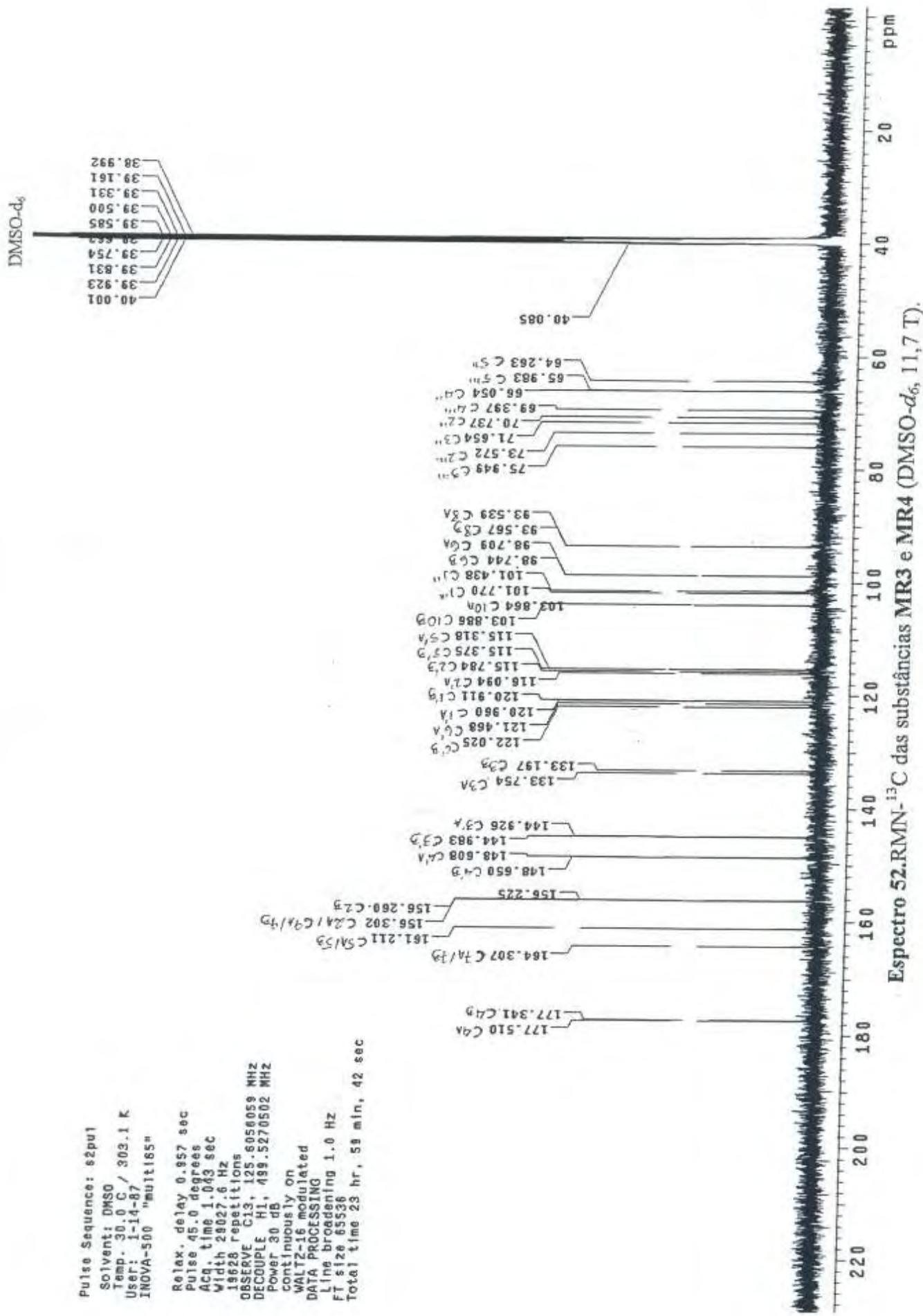
Espectro 49. gHMBC da substância MR2 (DMSO- d_6 , 11,7 T).

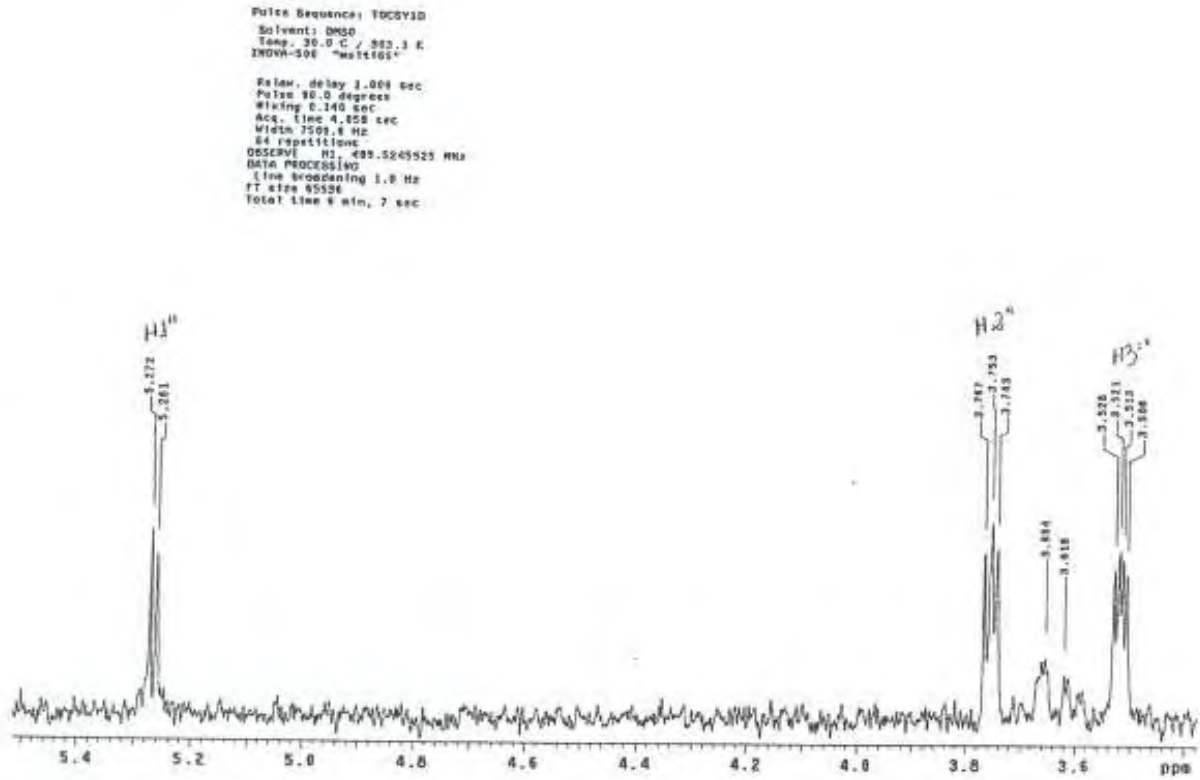
Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: DMSO
Temp. 30.9 C / 303.1 K
INSTR-500 "multis" ¹H
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 0.146 sec
Width 7187.3 Hz
SD Width 7187.3 Hz
18 repeats/loop
128 increments
OBSERVE F2, 489.5177582 MHz
DATA PROCESSING
Sg. sine bell 0.071 sec
F1 DATA PROCESSING
Sg. sine bell 0.910 sec
FT size 2048 x 2048
total time 40 min, 6 sec



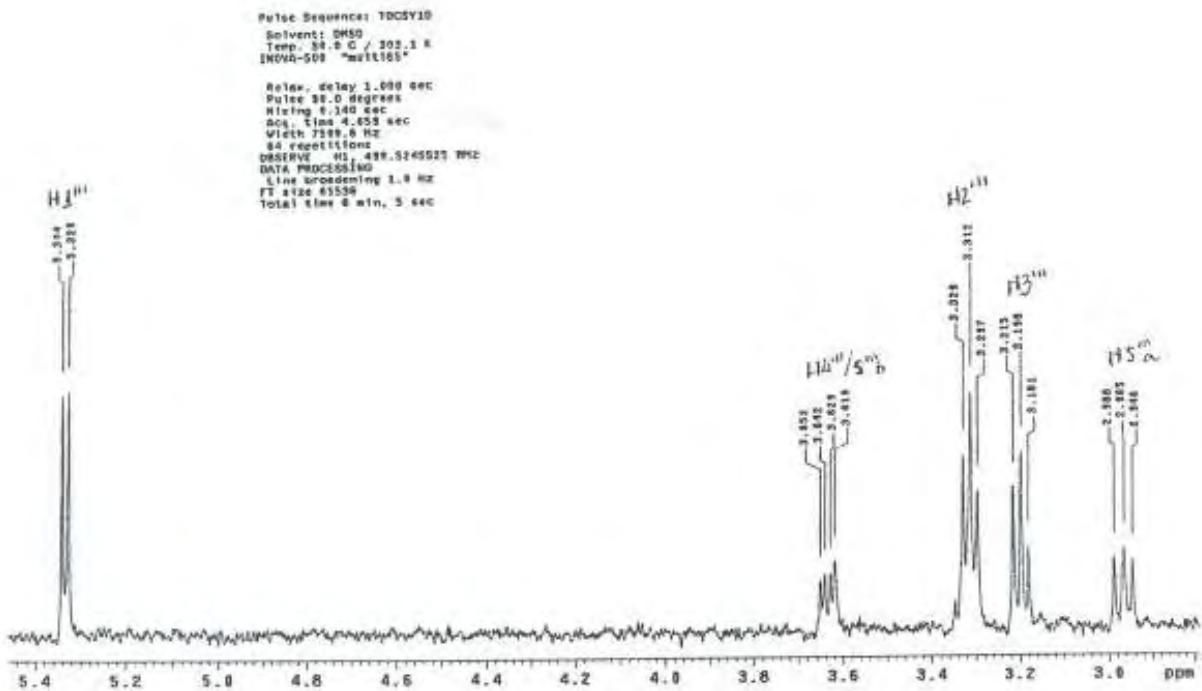
Espectro 50. COSY da substância MR2 – expansão na região de 2,8 a 4,5 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).





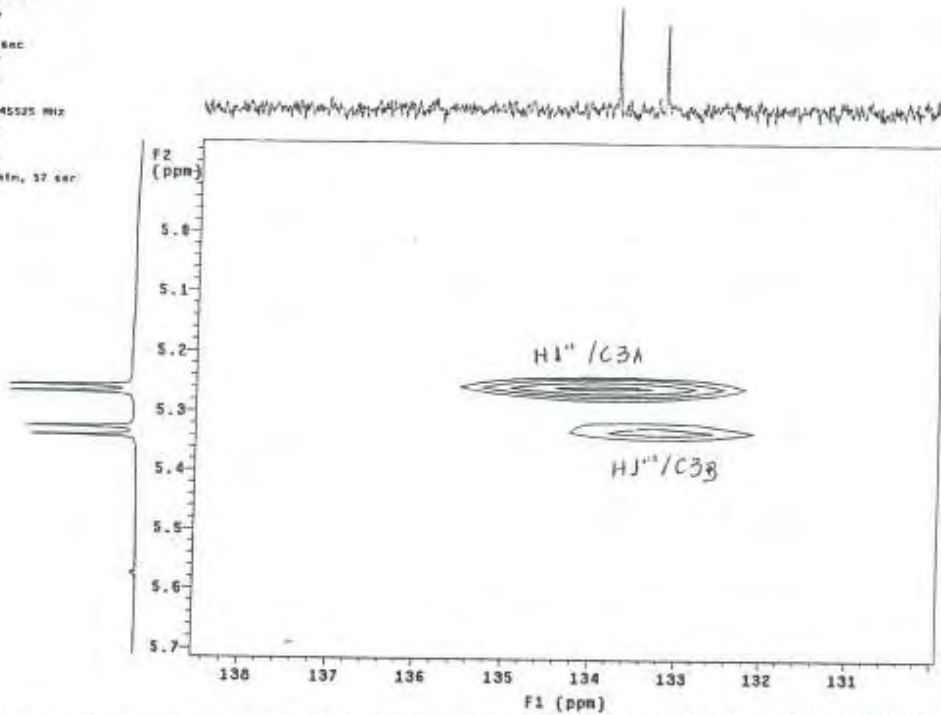


Espectro 53. 1D-TOCSY da α -arabinopiranosose da substância MR3 – H1^{ir} (δ 5,27) irradiado (DMSO- d_6 , 11,7 T).



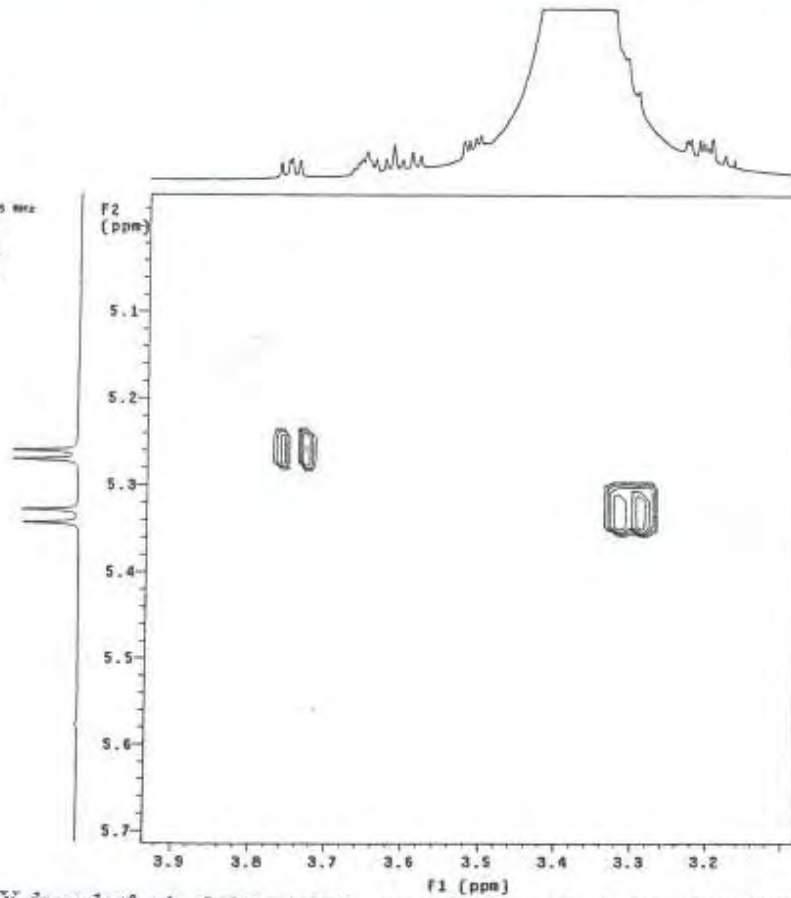
Espectro 54. 1D-TOCSY da β -arabinopiranosose da substância MR4 – H1^{ir} (δ 5,34) irradiado (DMSO- d_6 , 11,7 T).

Pulse Sequence: gHMBC
 Solvent: DMSO
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 User: 1-14-07
 INOVA-500 "multispec"
 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.156 sec
 Width 7500.0 Hz
 2D Width 20027.6 Hz
 32 repetitions
 128 increments
 OBSERVE: H1, 499.5245525 MHz
 DATA PROCESSING
 Sg. sine bell 0.000 sec
 f1 DATA PROCESSING
 Sg. sine bell 0.002 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 1 hr, 23 min, 37 sec



Espectro 55. gHMBC das substâncias MR3 e MR4 – expansão nas regiões de 4,9 a 5,7 e 130 a 138 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).

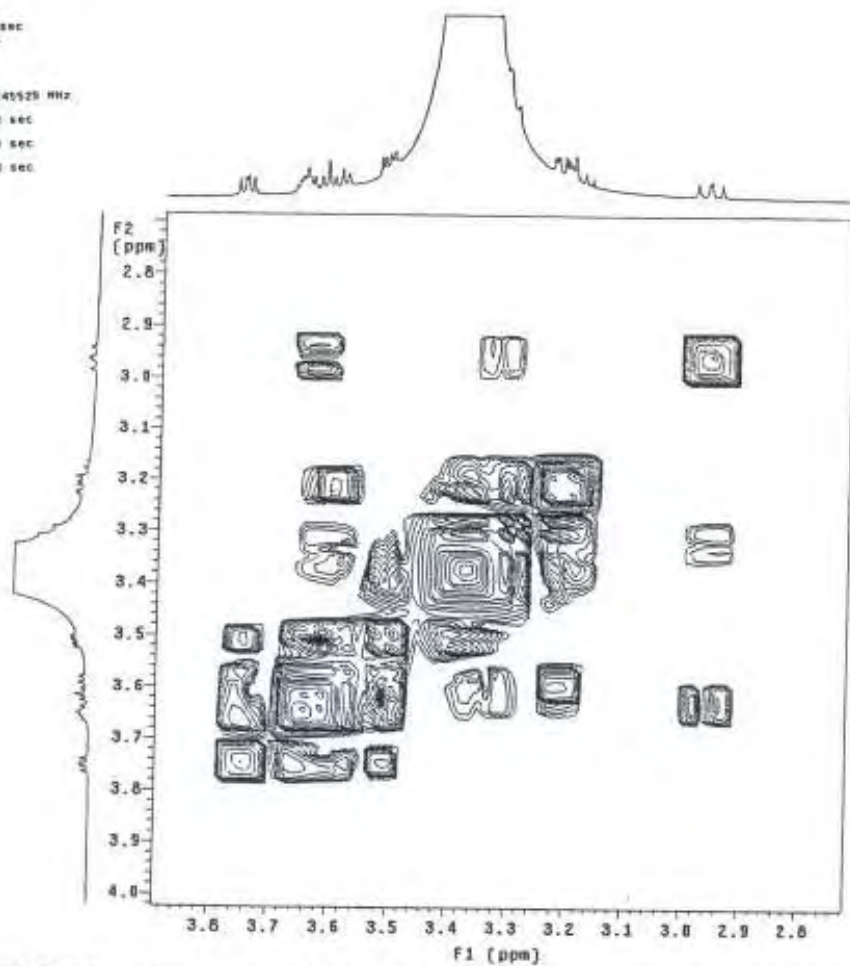
Pulse Sequence: gCOSY
 Solvent: DMSO
 Temp: 30.0 C / 303.1 K
 User: INOVA-500 "multispec"
 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.136 sec
 Width 7500.0 Hz
 2D Width 7500.0 Hz
 8 repetitions
 120 increments
 OBSERVE: H1, 499.5245525 MHz
 DATA PROCESSING
 Sg. sine bell 0.000 sec
 f1 DATA PROCESSING
 Sg. sine bell 0.000 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 20 min, 3 sec



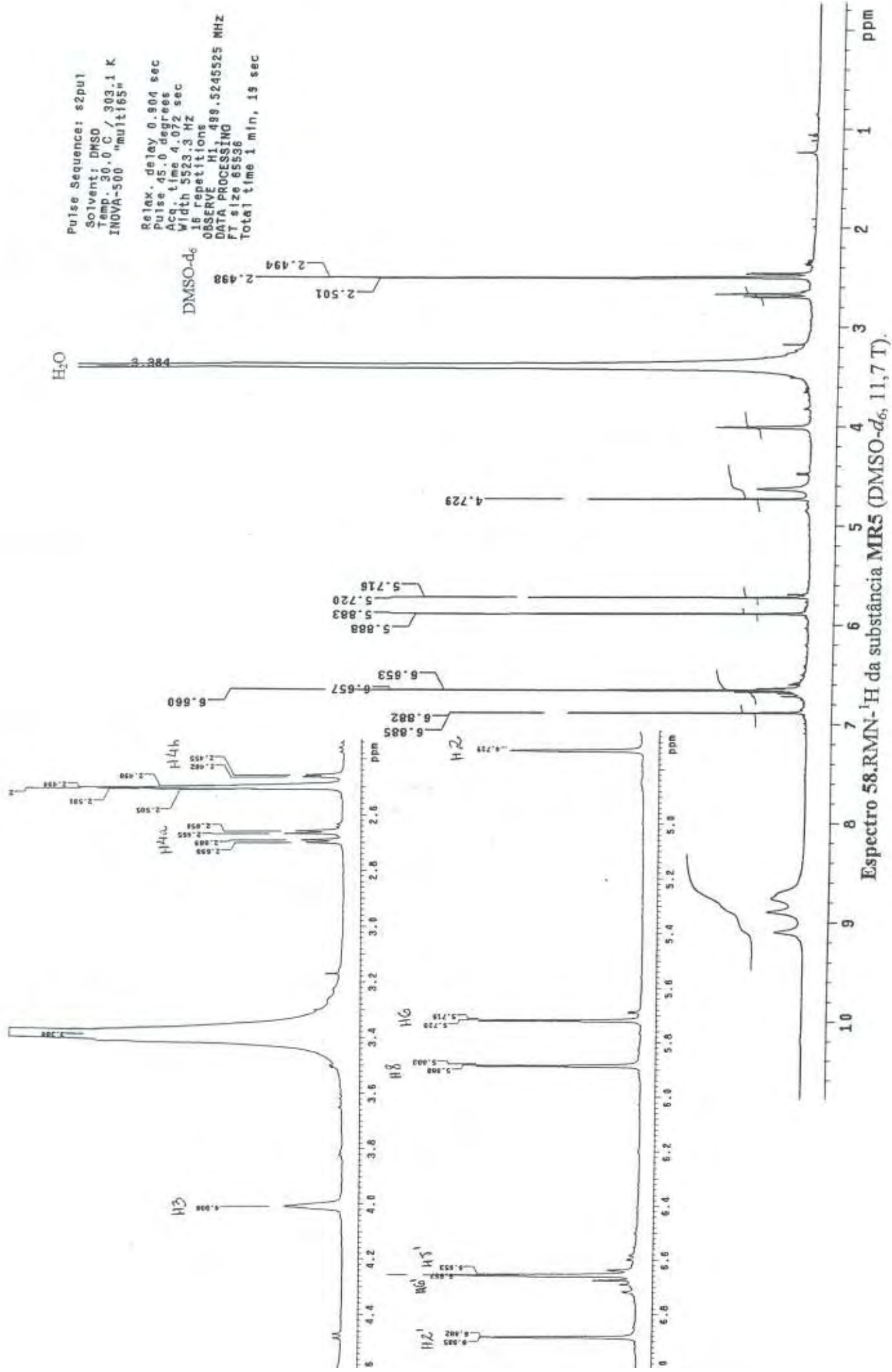
Espectro 56. COSY das substâncias MR3 e MR4 – expansão na região de 5,0 a 5,7 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).

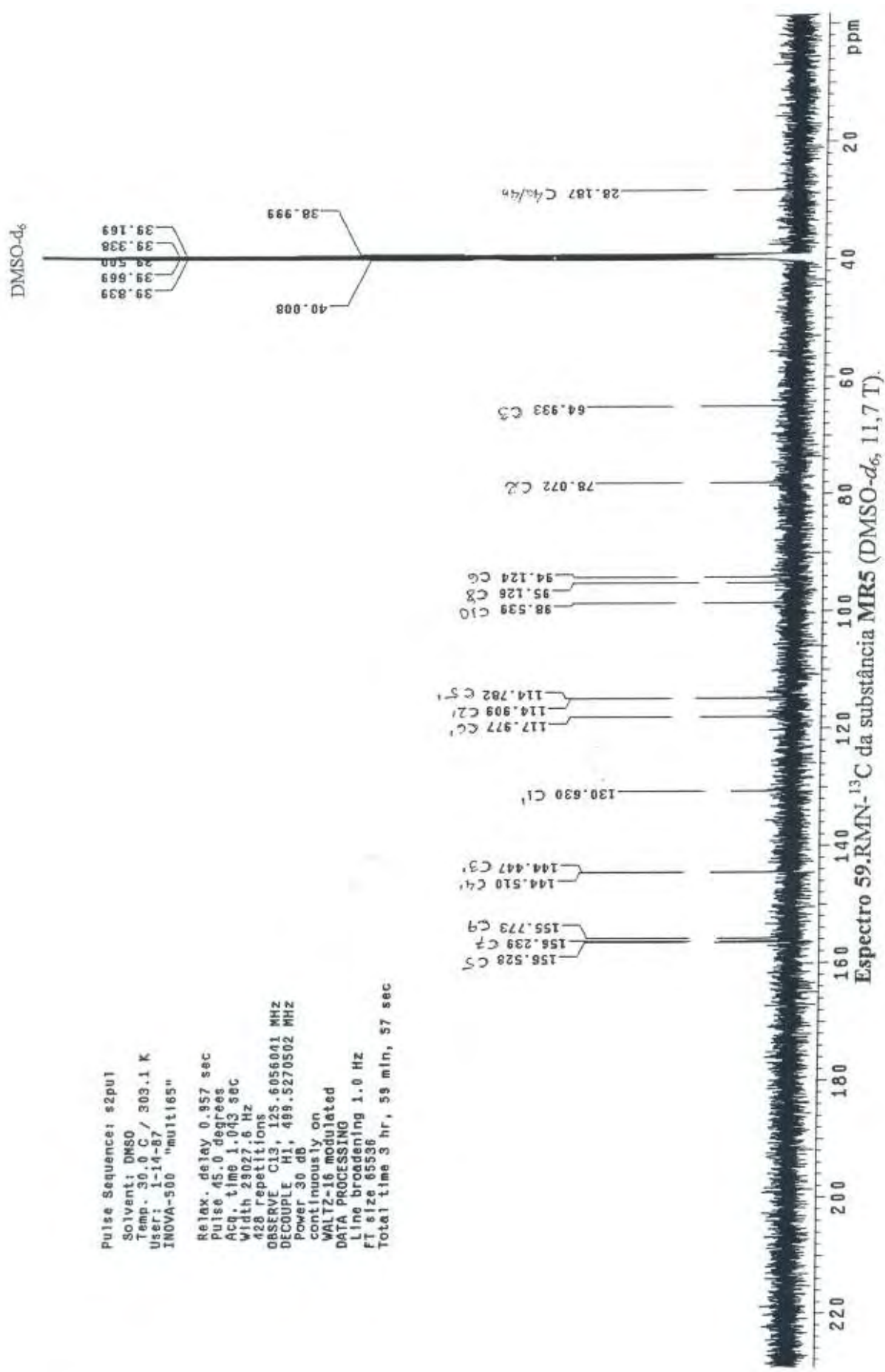
Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: DMSO
Temp: 30.0 C / 300.1 K
180VA-60 "multis"

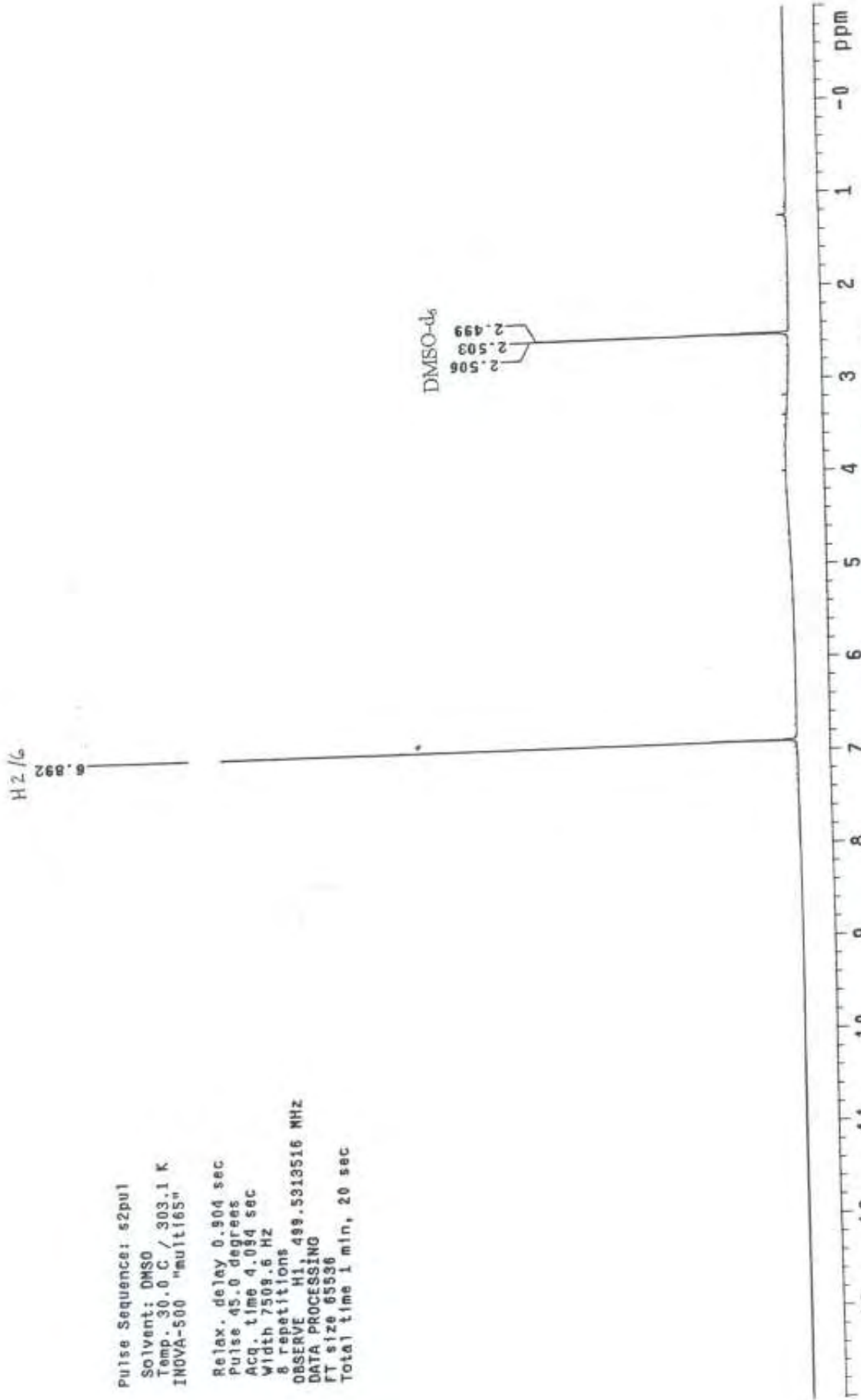
Pulse delay 1.800 sec
Acq. time 8.136 sec
Width 7500.6 Hz
SD width 7502.0 Hz
8 repetitions
128 increments
OBSRV1 R1: 499.5245525 MHz
DATA PROCESSING
Ss. sine bell 0.068 sec
F1 DATA PROCESSING
Ss. sine bell 0.009 sec
F1 size 2048 w 2248
Total time 20 min, 3 sec



Espectro 57. COSY das substâncias MR3 e MR4 – expansão na região de 2,7 a 4,0 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).

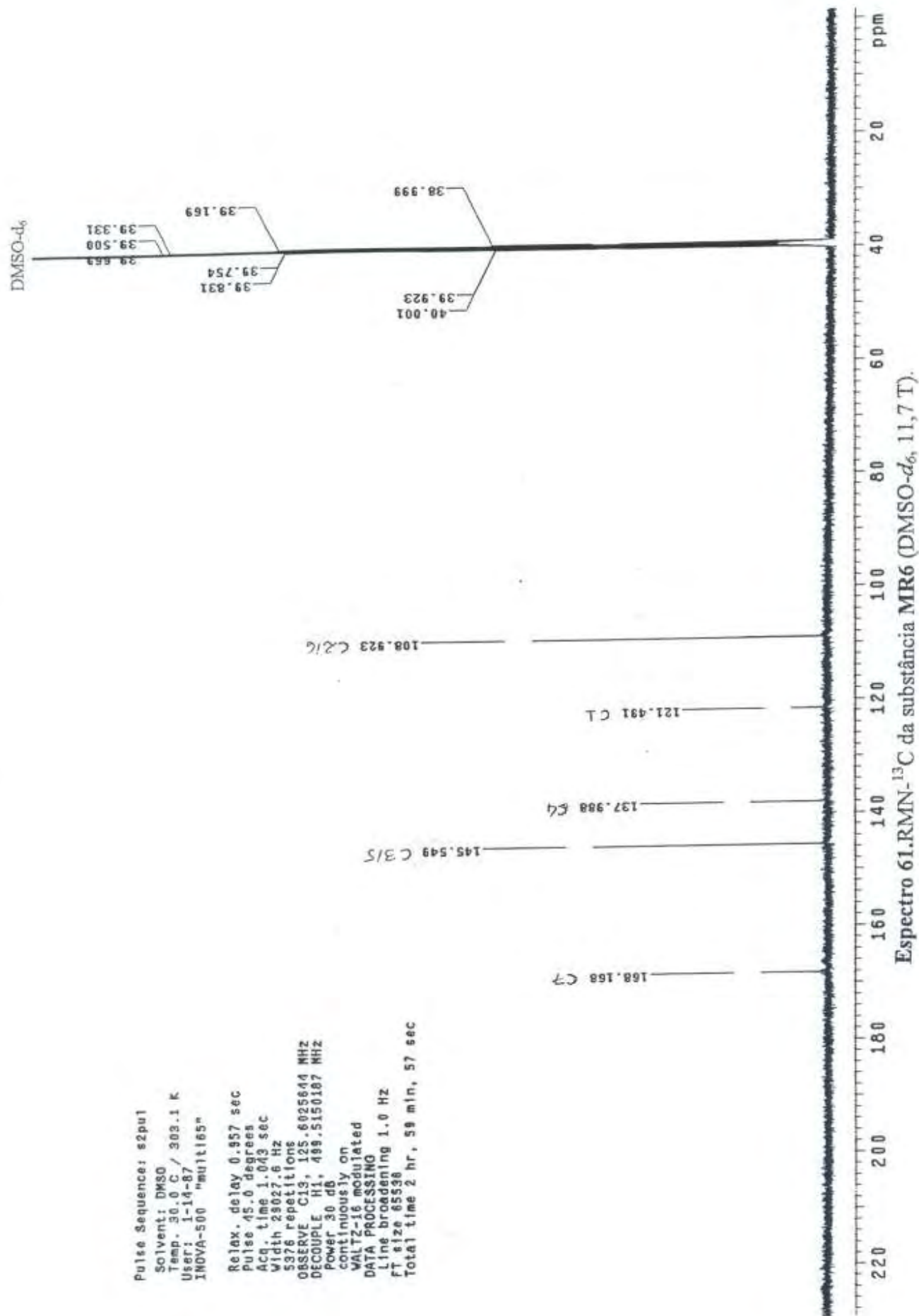


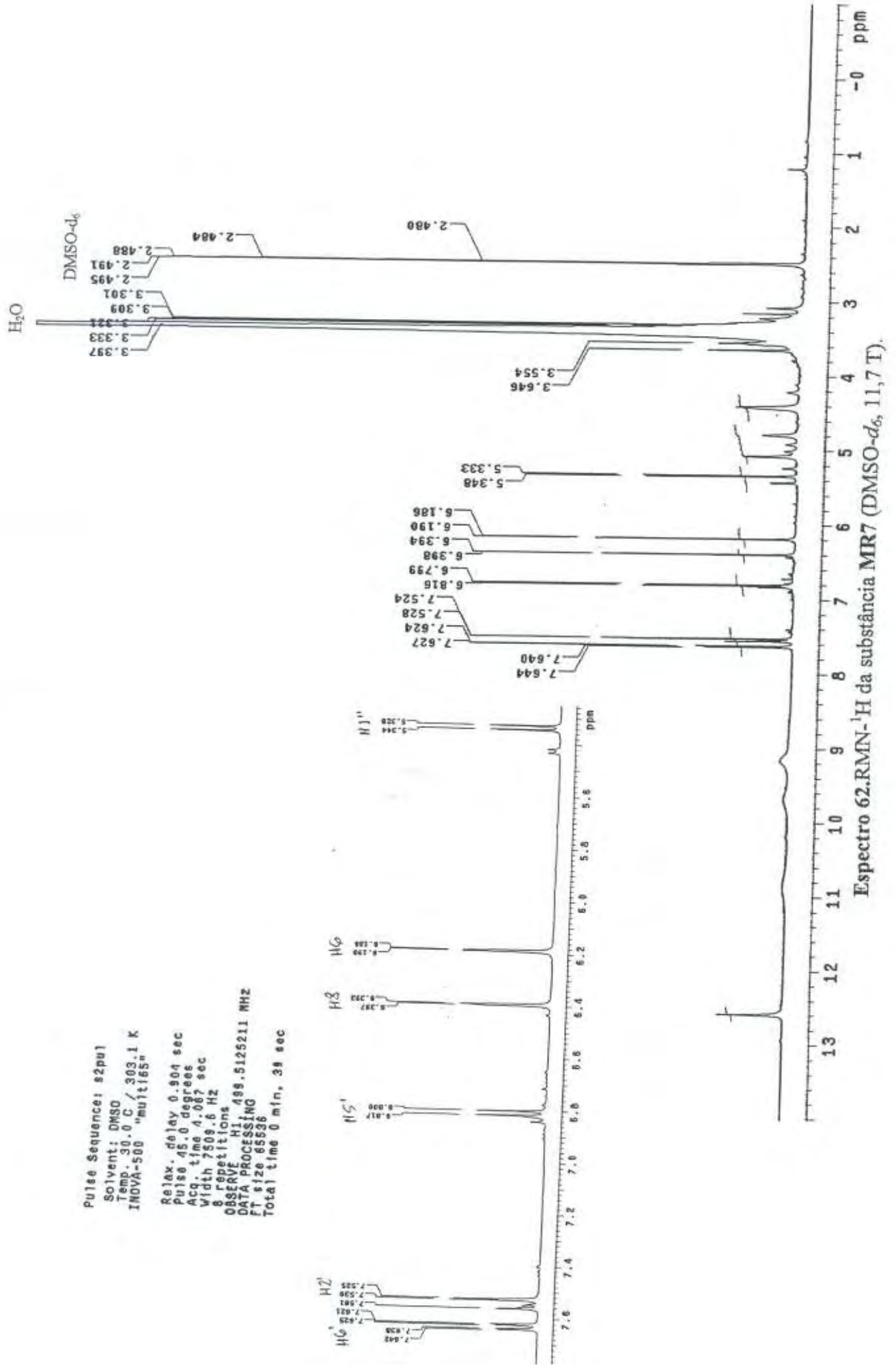


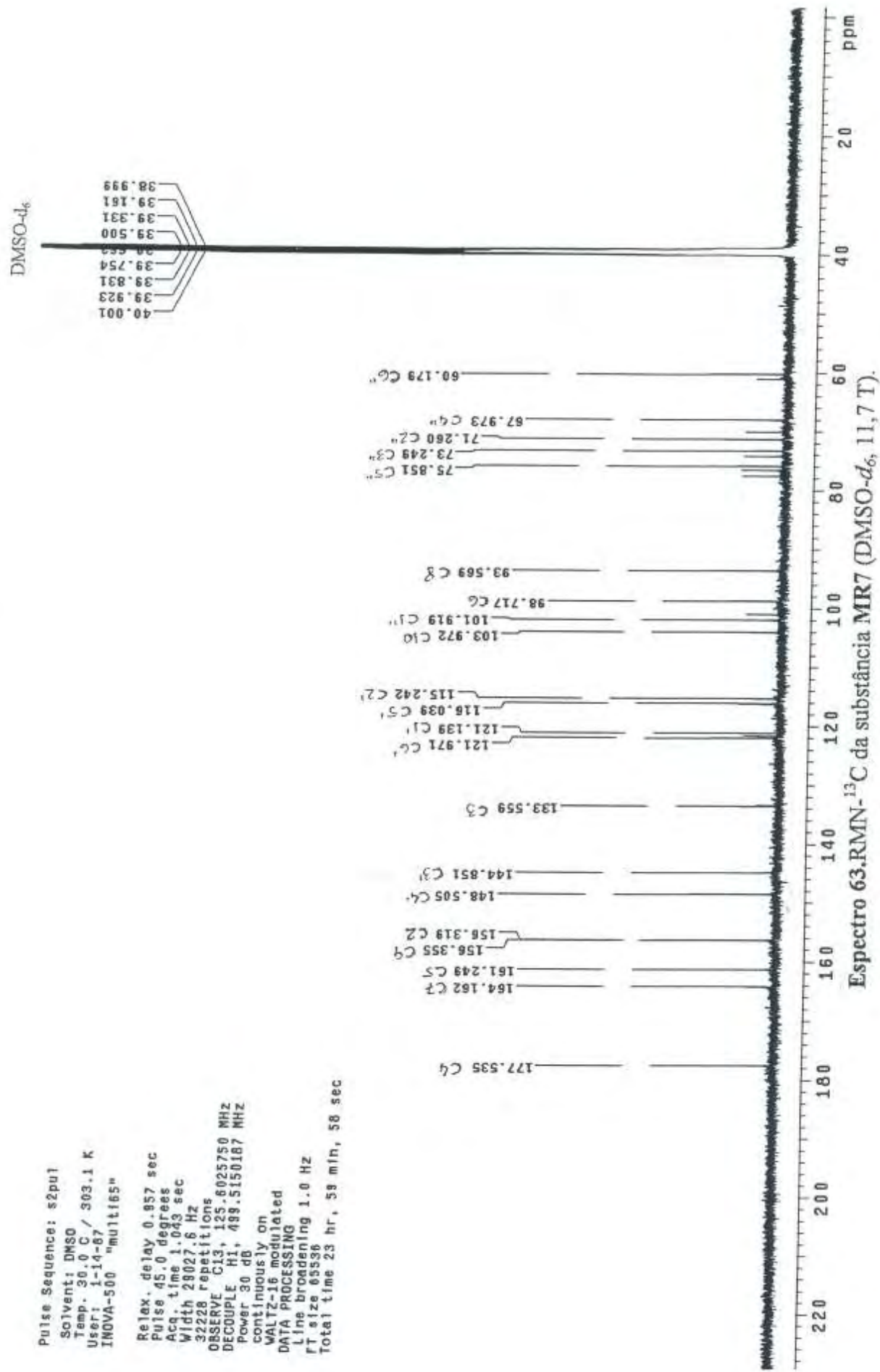


Pulse Sequence: s2pul
 Solvent: DMSO
 Temp. 30.0 C / 303.1 K
 INOVA-500 "mult165"
 Relax. delay 0.504 sec
 Pulse 45.0 degrees
 Acq. time 4.094 sec
 Width 7509.6 Hz
 8 repetitions
 OBSERVE H1, 499.5813516 MHz
 DATA PROCESSING
 FT size 65536
 Total time 1 min, 20 sec

Espectro 60.RMN-¹H da substância MR6 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).

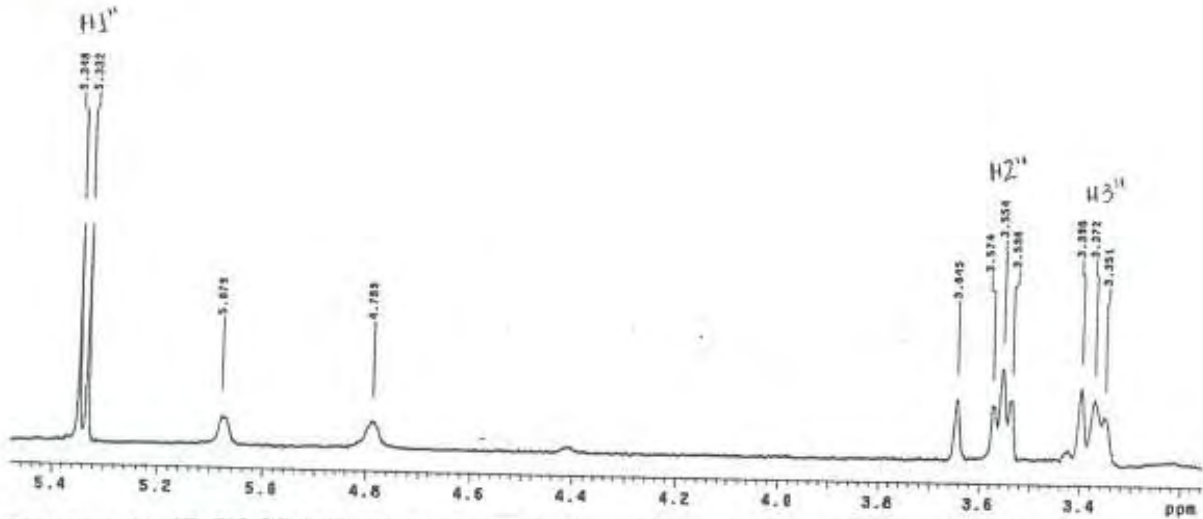






Pulse Sequence: TOCSY1D
 Solvent: DMSO
 Temp: 30.0 C / 303.2 K
 INOVA-S00 "multis"

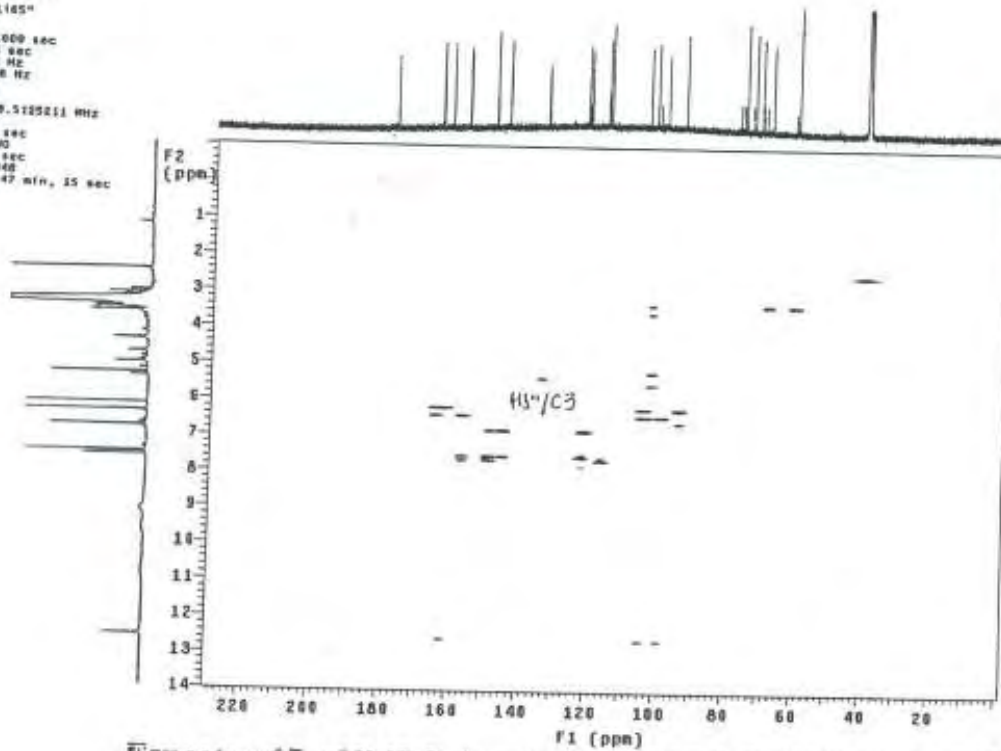
 Relax. delay 1.000 sec
 Pulse 90.0 degree
 Rfling 9.100 sec
 Acq. time 6.007 sec
 Width 7500.0 Hz
 32 repetitions
 OBSRV: H1, 499.5125211 MHz
 DATA PROCESSING
 Line broadening 0.2 Hz
 FT size 65536
 Total time 2 min, 10 sec



Espectro 64. 1D-TOCSY da galactose da substância MR7 – H1'' (δ 5,35) irradiação (DMSO- d_6 , 11,7 T).

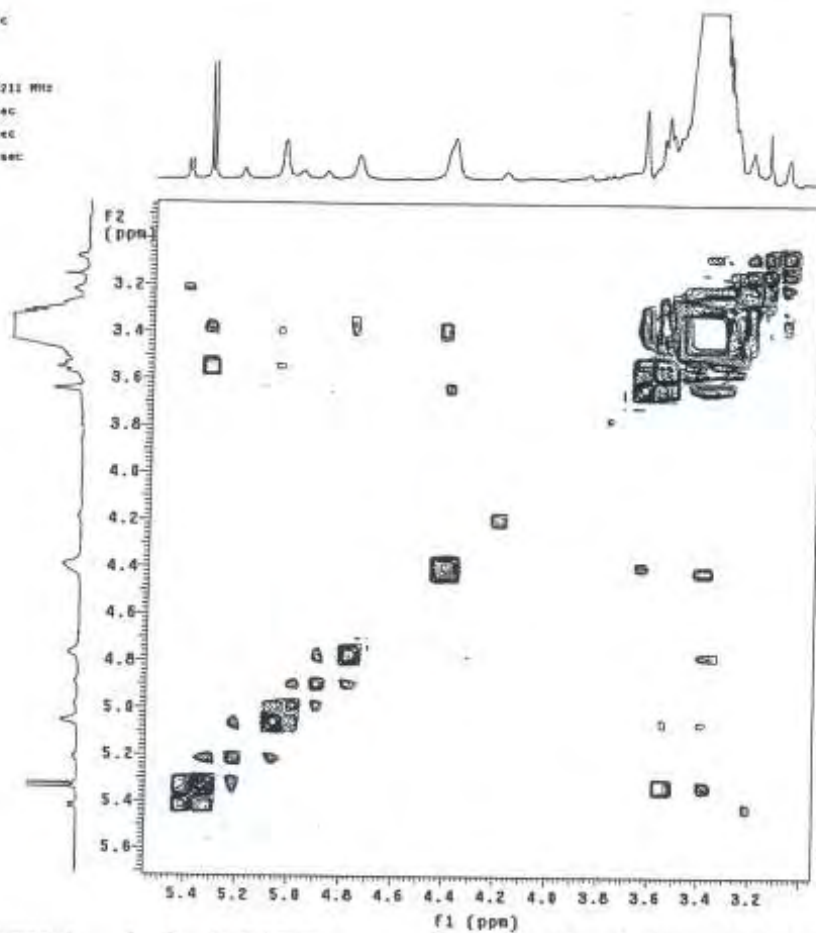
Pulse Sequence: gHMBC
 Solvent: DMSO
 Temp: 30.0 C / 303.2 K
 INOVA-S00 "multis"

 Relax. delay 1.000 sec
 Acq. time 0.136 sec
 Width 7500.0 Hz
 20 Width 2000.0 Hz
 64 repetitions
 128 increments
 OBSRV: H1, 499.5125211 MHz
 DATA PROCESSING
 Sine bell 0.000 sec
 F2 DATA PROCESSING
 Sine bell 0.002 sec
 FT size 2048 x 2048
 Total time 2 hr, 47 min, 15 sec

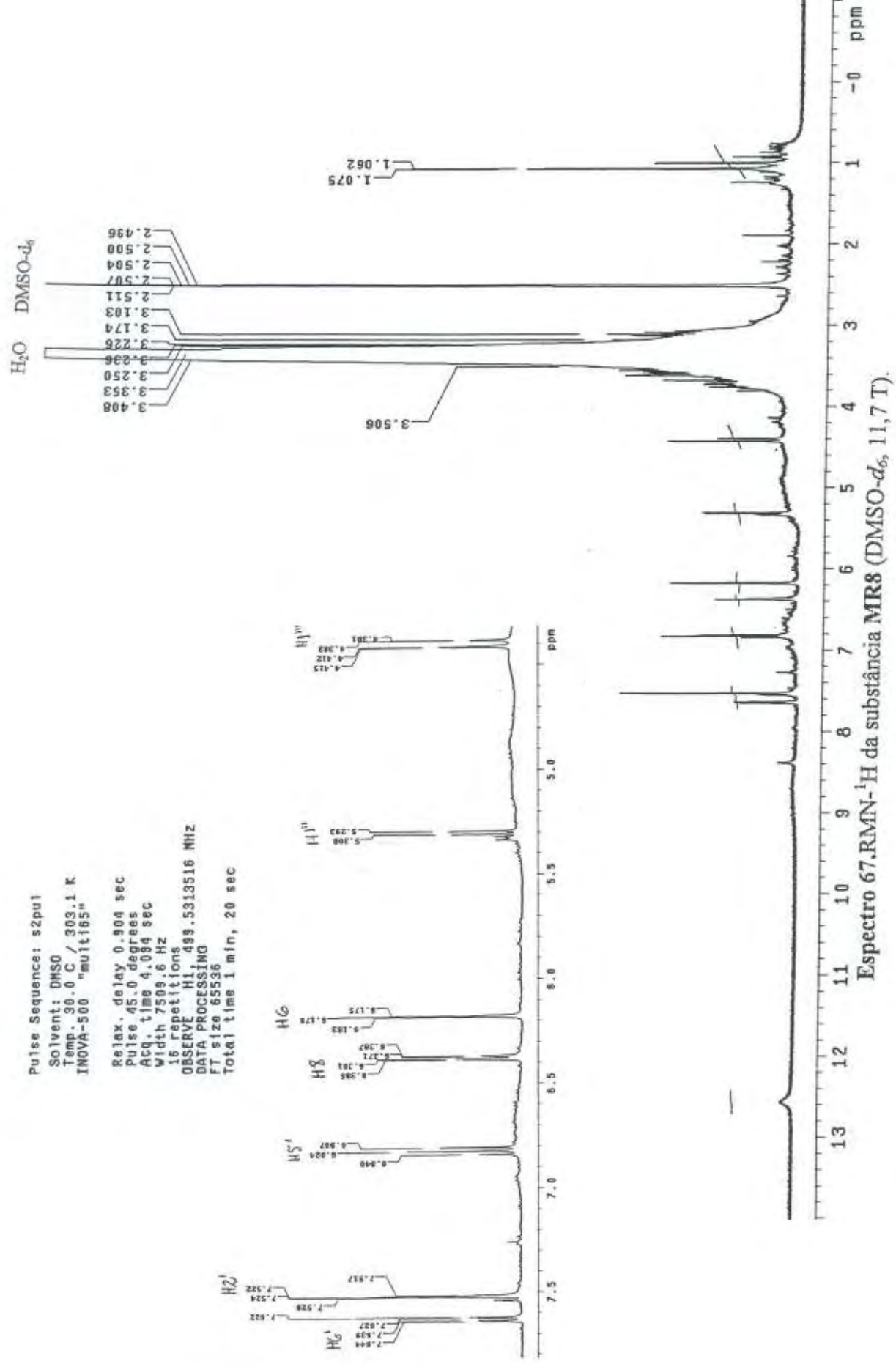


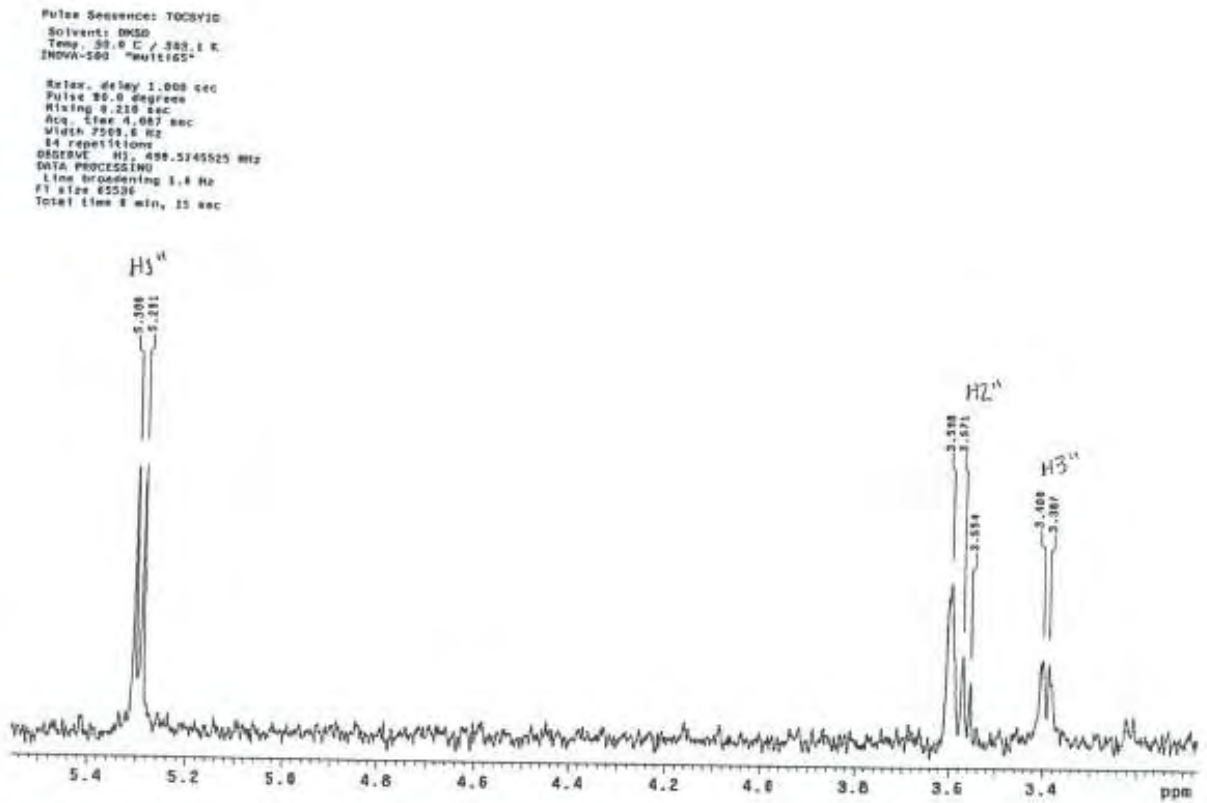
Espectro 65. gHMBC da substância MR7 (DMSO- d_6 , 11,7 T).

Pulse Sequence: gCOSY
Solvent: DMSO
Temp. 30.8 C / 303.1 K
INSTR: spect
Relax. delay 1.000 sec
Acq. time 5.120 sec
Width 7500.0 Hz
2D Width 7500.0 Hz
16 repetitions
128 increments
OBSERVE F1: 499.1325211 MHz
DATA PROCESSING
Sf. time bell 8.098 sec
F1 DATA PROCESSING
Sf. time bell 8.098 sec
F1 size 2048 x 2048
Total time 28 min, 49 sec

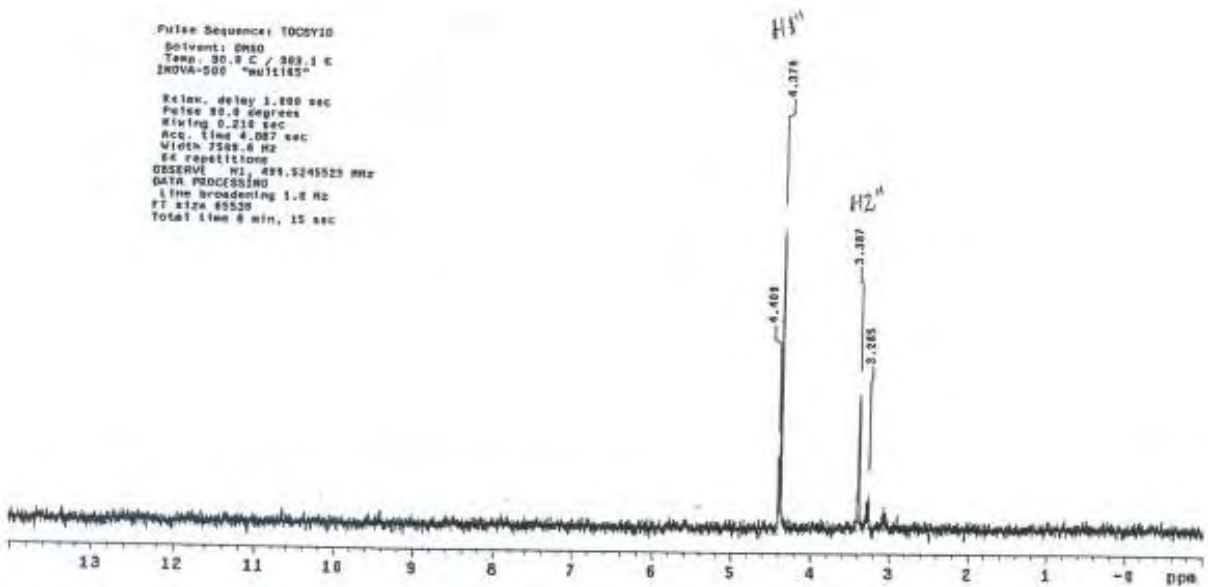


Espectro 66. COSY da substância MR7 – expansão na região de 3,0 a 5,6 (DMSO- d_6 , 11,7 T).

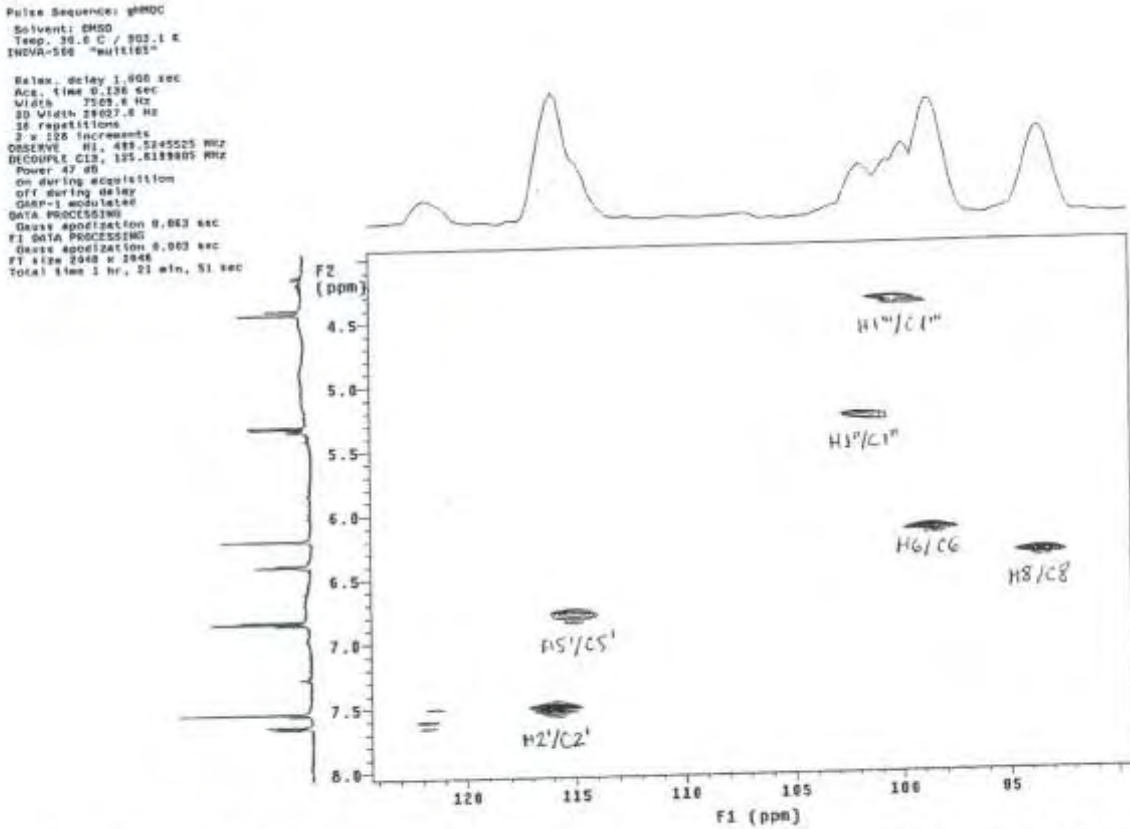




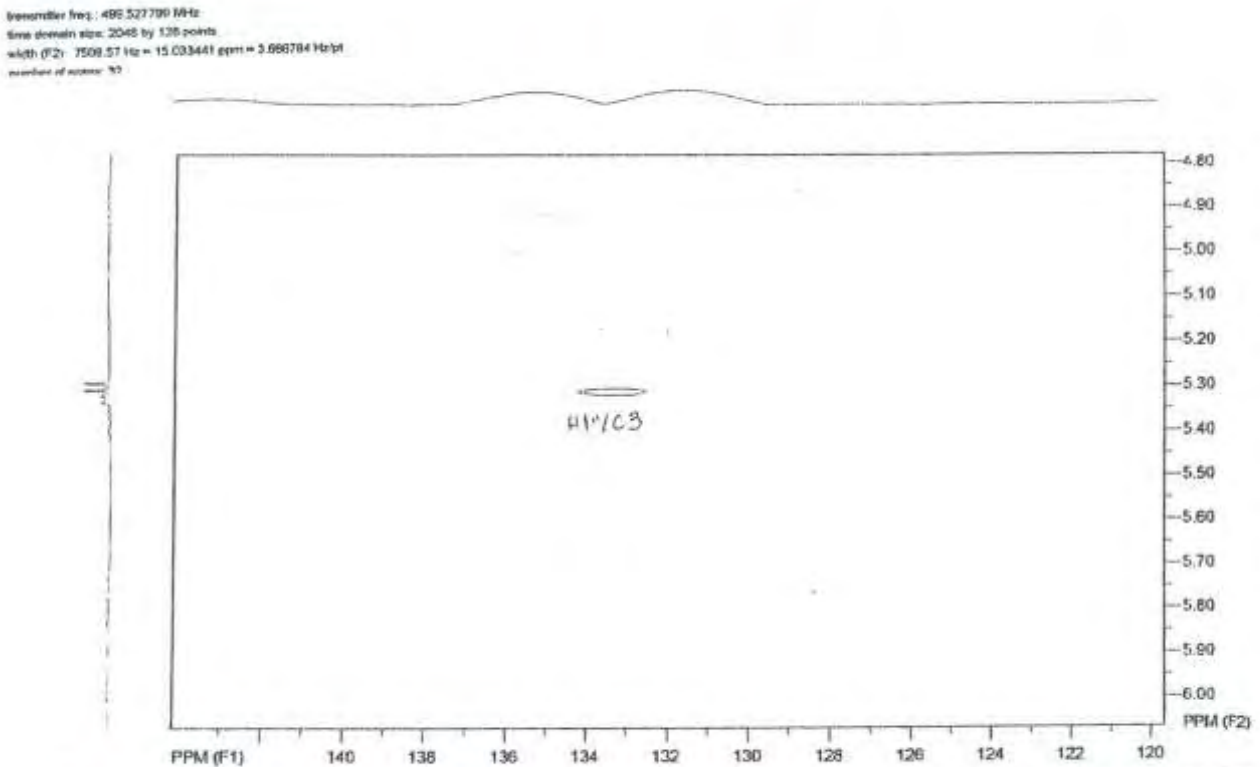
Espectro 68. 1D-TOCSY da galactose da substância MR8 - H1'' (δ 5,30) irradiado (DMSO- d_6 , 11,7 T).



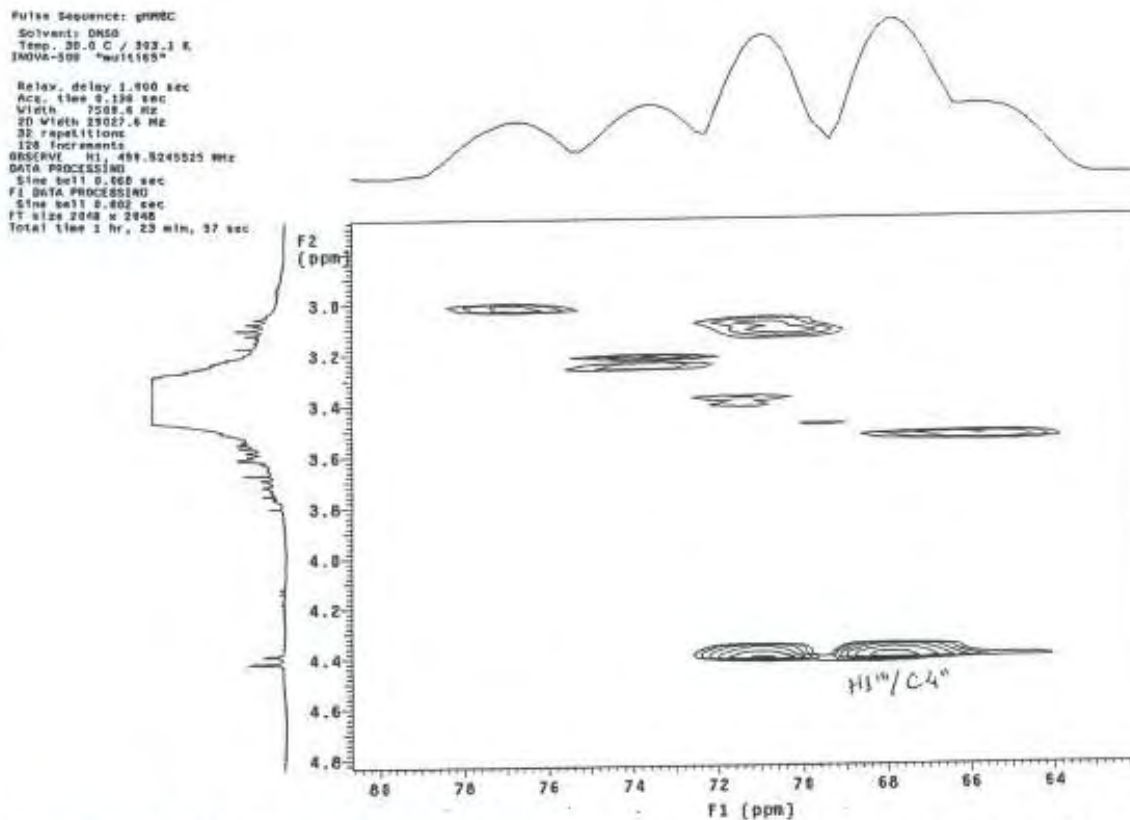
Espectro 69. 1D-TOCSY da rhamnose da substância MR8 - H1'' (δ 4,38) irradiado (DMSO- d_6 , 11,7 T).



Espectro 70. gHMOC da substância **MRS** – expansões nas regiões de 4,0 a 8,0 e 90 a 124 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).



Espectro 71. gHMBC da substância **MRS** – expansões nas regiões de 4,8 a 6,0 e 120 a 143 (DMSO-*d*₆, 11,7 T).



Espectro 72. gHMBC da substância MR8 – expansões nas regiões de 2,8 a 4,8 e 62 a 80 (DMSO- d_6 , 11,7 T).

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)